

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

LE RECRUTEMENT DES CANAUX DE LIBÉRATION DU
CALCIUM (Ca^{2+}), PAR LA LIBÉRATION DU Ca^{2+}
INDUITE PAR LE Ca^{2+} (LCIC), ÉVALUÉ PAR
L'INTRODUCTION DE 8 mM BAPTA DANS LE
MYOPLASME DE LA FIBRE MUSCULAIRE COUPÉE DE
LA GRENOUILLE

PAR: Karine Fénelon

Département de physiologie et biophysique

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

29 août 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.

0-612-80584-0

Canada

TABLE DES MATIÈRES

page

1 – INTRODUCTION

1.1 - <i>Couplage excitation-contraction</i>	1
1.2 - <i>Les récepteurs impliqués dans le couplage excitation-contraction</i>	4
1.2.1 - Les senseurs de voltage	4
1.2.2 - Les canaux de libération de Ca du RS	6
1.3 - <i>Couplage des DHPRs et des RyRs</i>	9
1.4 - <i>Régulation des DHPRs</i>	10
1.4.1 - Régulation des RyRs par le Ca ²⁺ , Mg ²⁺ et les nucléotides d'adénine	10
1.4.2 - Régulation des RyRs par les lipides et les métabolites polycationiques	12
1.4.3 - Régulation des RyRs par la calmoduline	12
1.4.4 - Autres protéines qui régulent les RyRs	13
1.5 - <i>Mécanismes rétroactifs du calcium</i>	14
1.6 - <i>Libération du Ca du RS</i>	20
1.7 - <i>But du projet de maîtrise</i>	24

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 - <i>Chambre expérimentale et montage optique</i>	30
2.2 - <i>Composition des solutions internes et externes</i>	34
2.3 - <i>Méthode de l'EGTA et du Rouge de phénol</i>	35
2.4 - <i>Estimation du pH myoplasmique par absorbance du Rouge de Phénol</i>	37
2.5 - <i>Estimation de [Ca_{RS}] en absence et en présence de BAPTA</i>	39
2.6 - <i>Estimation de $\Delta[CaBAPTA]_{MAX}$</i>	40

2.7 - Estimation de la perméabilité à la libération, en présence de EGTA et BAPTA	42
2.8 - Libération de protons lors de la liaison du Ca au BAPTA	44
2.9 - Mesure des paramètres électriques	45
2.10 - Statistiques	46
<u>3 - RÉSULTATS</u>	
Premier projet	
3.1 - Introduction	47
3.2 - Protocole de stimulation et signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$	47
3.3 - f_{Ca} vs. $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ à -60 mV en condition contrôle	50
3.4 - f_{Ca} vs. $[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en présence de 8 mM BAPTA	54
3.5 - L'estimation de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ dépend du pH	54
3.6 - L'estimation de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ dépend du D_{BAPTA}	55
3.7 - Test de réversibilité	56
3.8 - Effets du BAPTA sur la relation entre le f_{Ca} et $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$	59
3.9 - Résumé des effets du BAPTA sur le f_{Ca} et $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$	61
3.10 - Les deux protocoles expérimentaux des expériences avec BAPTA	64
3.11 - Forme de la courbe en cloche obtenue avec le premier protocole	64
3.12 - Forme de la courbe en cloche obtenue avec le deuxième protocole	65
<u>4 - DISCUSSION (Premier projet)</u>	
4.1 - Les deux mécanismes de LCIC	67
4.2 - Résultats d'études antérieures sur des RyRs isolés	69
4.3 - Le BAPTA n'a pas d'effet sur la phase plateau du f_{Ca} vs. $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$	70

4.4 - Effet du BAPTA sur la phase descendante du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$	70
4.5 - Résultats obtenus à de grandes dépolarisations	73

5 - RÉSULTATS

Deuxième projet

5.1 - Introduction	74
5.2 - Protocole de stimulation	74
5.3 - Effet de 8mM BAPTA sur le $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ et sur le temps de décours de $\Delta[CaEGTA]$	76
5.4 - Effet du BAPTA sur le f_{Ca} à -45 et à -60 mV	79
5.5 - Effet du BAPTA sur les mouvements de charges intramembranaires, Q_{cm}	81
5.6 - Résumé des effets du BAPTA sur la libération du Ca^{2+} et sur le Q_{cm}	83

6 - DISCUSSION (deuxième projet)

6.1 - Effets du BAPTA	86
6.2 - Composante d'activation additionnelle Ca-dépendante présente à de grandes dépolarisations	88
6.3 - Augmentation de la perméabilité à la libération peut-être due à la somme du Ca de deux RyRs couplés, et accélération de la cinétique de Q_{γ} par le Ca	90
6.4 - Possibilité selon laquelle la composante additionnelle à -45 mV n'implique pas les RyRs non-couplés	93

RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES

ANNEXE 1- Article de Fénelon et Pape, 2002

ANNEXE 2- Article de Pape *et al.*, 2002b

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	page
Figure 1 - Structure microscopique du tissu musculaire strié des mammifères	2
Figure 2 - Couplage excitation-contraction	3
Figure 3 - Canaux impliqués dans le couplage excitation-contraction	8
Figure 4 - Mécanismes rétroactifs du calcium	14-15
Figure 5 - Exemple d'un signal de perméabilité	20
Figure 6 - Disposition des récepteurs dans leurs membranes respectives	21
Figure 7 - Conséquence de la présence du fura-2 dans le myoplasme d'une fibre musculaire coupée de la grenouille sur l'amplitude et le temps de décours du signal de la perméabilité à la libération	22
Figure 8 - But de la première partie du projet de recherche	24
Figure 9 - But de la deuxième partie du projet de recherche	27
Figure 10 - Courbes de la perméabilité à la libération et de la charge Q_T en fonction du voltage	29
Figure 11 - Schéma de la chambre expérimentale à double cloison de Vaseline	31
Figure 12 - Schéma du montage optique pour l'acquisition de données	33
Figure 13 - Effet du BAPTA sur $\Delta[\text{CaEGTA}]$ et $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps durant l'expérience	48
Figure 14 - Fin du signal de la libération du Ca à de petites $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$, et f_{Ca} en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$	51
Figure 15 - Graphiques de f_{Ca} en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ d'une expérience en condition contrôle et d'une expérience avec BAPTA, et test de réversibilité	57
Figure 16 - Effet du BAPTA sur $\Delta[\text{CaEGTA}]$	77

Figure 17 - Temps de décours du $f_{Ca}(-45 \text{ mV})$ et $f_{Ca}(-60 \text{ mV})$ en présence du BAPTA et en condition contrôle	80
Figure 18 - Effet du BAPTA sur les mouvements de charges intramembranaires	82
Figure 19 - Perméabilité à la libération vs. $[Ca_{RS}]$ à -45 mV et à -60 mV	89
Figure 20 - Effet de sommation et de 8 mM BAPTA sur le gradient de $\Delta[Ca^{2+}]$ de canaux de libération du Ca du RS ouverts	91
Table 1 - Effet de 8 mM BAPTA sur le f_{Ca} à -60 mV	62
Table 2 - Effets du BAPTA sur la libération du Ca et sur les mouvements de charges intramembranaires	83

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

A = absorbance

$A_{(\lambda)}$ = absorbance à une longueur d'onde donnée

$A_{\text{ind}(\lambda)}$ = absorbance relative à un indicateur et à une longueur d'onde donnée

β = pouvoir tampon du myoplasme

C = concentration d'indicateur dans le myoplasme

Ca = calcium

Ca^{2+} = Ca libre

[] = concentration

$[\text{Ca}^{2+}]_R$ = concentration de Ca libre au repos

$[\text{BAPTA}_T]$ = concentration totale de BAPTA dans le myoplasme

$[\text{EGTA}_T]$ = concentration totale d'EGTA dans le myoplasme

$[\text{CaBAPTA}]$ = concentration de Ca lié au BAPTA au repos

$[\text{CaEGTA}]$ = concentration de Ca lié à l'EGTA au repos

$[\text{Ca}_{RS}]$ = contenu en Ca du RS durant une stimulation

$[\text{Ca}_{RS}]_R$ = contenu en Ca du RS au repos

Δ = variation

$\Delta[\text{Ca}_T]$ = concentration totale de Ca libéré dans le myoplasme suite à une dépolarisation

$\Delta[\text{CaBAPTA}]$ = variation de la concentration de Ca lié au BAPTA durant une stimulation

$\Delta[\text{CaEGTA}]$ = variation de la concentration de Ca lié à l'EGTA durant une stimulation

$\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$ = concentration *maximale* de Ca lié au BAPTA durant une stimulation

$\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ = concentration *maximale* de Ca lié à l'EGTA durant une stimulation

ΔpH = variation de pH myoplasmique

D_{BAPTA} = constante de diffusion du BAPTA dans le myoplasme

D_{Ca} = coefficient de diffusion du Ca dans le myoplasme

DHPR = senseur de voltage dans la membrane des tubules-t

ϵ = coefficient d'extinction (loi de Beer)

f_{Ca} = fraction de la concentration en Ca du RS libéré par un pulse dépolarisant

I_{cm} = courant dû au mouvement des charges intramembranaires des DHPRs

$I_{t(\lambda)}$ et $I_{i(\lambda)}$ = intensité de la lumière transmise (t) et incidence (i) à une longueur d'onde donnée

k_1 = constante de vitesse de réaction

$K_{Dapp,X}$ = constante de vitesse de la dissociation du Ca (X = BAPTA ou EGTA)

l = distance parcourue par la lumière du microscope (loi de Beer)

λ_{Ca} = distance parcourue par le Ca avant d'être tamponné

LCIC = libération du Ca induite par le Ca

P_o = probabilité d'ouverture

Q_{cm} = charge intramembranaire

RS = réticulum sarcoplasmique

RyR = canal de libération du Ca du RS

RÉSUMÉ

LE RECRUTEMENT DES CANAUX DE LIBÉRATION DU CALCIUM (Ca^{2+}), PAR LA LIBÉRATION DU Ca^{2+} INDUITE PAR LE Ca^{2+} (LCIC), ÉVALUÉ PAR L'INTRODUCTION DE 8 mM BAPTA DANS LE MYOPLASME DE LA FIBRE MUSCULAIRE COUPÉE DE LA GRENOUILLE

Dans les muscles squelettiques, les senseurs de voltage (DHPRs), situés dans la membrane des tubules transverses, subissent un changement de conformation suite à une dépolarisation. Ceci provoque l'ouverture des canaux de libération de Ca (RyRs) dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) via un couplage mécanique. Ces deux systèmes membranaires sont apposés, et les RyRs forment une rangée double où un RyR sur deux est couplé à un DHPR. À de faibles dépolarisations, peu de DHPRs sont activés et un site de libération de Ca est isolé de l'influence du Ca libéré par un site voisin. La première partie du projet de recherche consistait à évaluer si un site de libération de Ca est composé soit d'un RyR couplé à son DHPR, soit d'un RyR activé par le voltage avec des RyRs voisins recrutés par libération de Ca induite par le Ca (LCIC).

Des études antérieures avaient montré que la perméabilité à la libération des RyRs pour le Ca en fonction de la concentration en Ca du réticulum sarcoplasmique ($[\text{Ca}_{\text{RS}}]$) décrit une courbe en forme de cloche, avec un sommet lorsque la $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ est entre 300 et 500 μM . L'augmentation de la perméabilité lorsque $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ augmente de 100 à 300 μM a été attribuée à LCIC. Le but du premier projet était donc d'évaluer l'effet de 8 mM de BAPTA, introduit dans le myoplasme de fibres musculaires coupées de grenouilles, sur la relation entre la perméabilité et la $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$. Les résultats ne montrant aucun effet du BAPTA mena à la suggestion que les canaux voisins ne sont pas recrutés par LCIC.

Ainsi, la conclusion de la première partie était qu'à de faibles dépolarisations, un site de libération du Ca est composé d'un seul RyR et son DHPR associé.

Suite à cette observation, la deuxième partie du projet était d'étudier ce qui se passe à de grandes dépolarisations, lorsqu'une grande densité de DHPR est activée. L'hypothèse était que comme 1 RyR sur 2 est couplé à un DHPR, les RyRs non-couplés pourraient être activés par LCIC seulement à de grandes dépolarisations, grâce à une composante additionnelle de la libération du Ca. Afin d'évaluer cette idée, BAPTA a encore une fois été introduit dans le myoplasme pour diminuer la concentration de calcium libre à l'embouchure d'un RyR ouvert ($\Delta[Ca^{2+}]$). Les résultats ont montré que le BAPTA a diminué le ratio de la perméabilité à -45 mV sur -60 mV d'environ 2 fois, lorsque $[Ca_{RS}]$ était $>1000 \mu M$ (valeurs physiologiques). Comme le BAPTA a diminué la perméabilité à -45 mV (grande dépolarisation) et non à -60 mV (faible dépolarisation), ceci suggère la présence d'une composante Ca-dépendante additionnelle de la libération du Ca, présente à de grandes dépolarisations, et différente de l'activation de la libération seulement due au voltage. Cependant, pour que cette hypothèse soit complète, il faut tenir compte de l'effet d'accélération du Ca sur la cinétique des mouvements de charge des DHPRs. En effet, les DHPRs possèdent des particules chargées qui bougent suite à une variation de potentiel, et ce mouvement peut être accéléré par une grande libération de Ca. Ainsi, à de grandes dépolarisations, la probabilité que deux DHPRs voisins soient activés en même temps pourrait être augmentée par l'effet d'accélération du Ca sur les mouvements de charges. Ceci permettrait aux DHPRs voisins d'activer leurs RyRs apposés, et la somme du Ca libéré pourrait recruter des RyRs voisins non couplés, par LCIC.

La résultats de la deuxième partie de ce projet supportent cette hypothèse selon laquelle à de grandes dépolarisations seulement, une composante additionnelle de libération de Ca permet aux RyRs non couplés d'être recrutés par LCIC. Ceci est possible car la grande quantité de Ca libéré accélère les mouvements de charges intramembranaires, ce qui augmente la probabilité que deux DHPRs soient activés en même temps, de sorte que les $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ venant de leurs RyRs s'additionnent pour recruter des RyRs intermédiaires non couplés.

mots clés généraux: couplage excitation-contraction, libération de Ca, muscle squelettique, réticulum sarcoplasmique, senseurs de voltage

1 - INTRODUCTION

1.1 - COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

C'est entre autre grâce aux os, aux articulations et aux muscles squelettiques que le corps humain produit des mouvements. Pour accomplir cette tâche, les muscles striés doivent se contracter et se relâcher par le mécanisme du couplage d'excitation-contraction. Ce mécanisme a intrigué pendant plusieurs décennies et intrigue encore aujourd'hui de nombreux physiologistes. Mais avant d'expliquer et de commenter les controverses relatives au mécanisme de couplage excitation-contraction, il serait utile de revoir l'anatomie du tissu musculaire strié des mammifères, où une cascade de réactions chimiques et mécaniques mènent à la contraction. La figure 1 illustre schématiquement deux cellules ou fibres musculaires très longues et cylindriques, regroupant de nombreuses myofibrilles formées de myofilaments. Chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane plasmique nommée le sarcolemme, qui présente des invaginations périodiques en forme de tube, les tubules-t. Ces tubules-t pénètrent jusqu'à l'intérieur de la fibre le long de la jonction des bandes A-I des myofilaments (des muscles squelettiques des mammifères) ou des stries Z (du muscle cardiaque et des muscles squelettiques de la grenouille). A l'intérieur des fibres, les tubules-t deviennent étroitement associés aux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS), situées de part et d'autre de chaque tubule-t. Les citernes terminales du RS sont les réserves intracellulaires en calcium (Ca) de la fibre. Le sandwich que forment un tubule-t entre deux RS porte le nom de triade. Et c'est au niveau des triades que se déroule le mécanisme de couplage excitation-contraction.

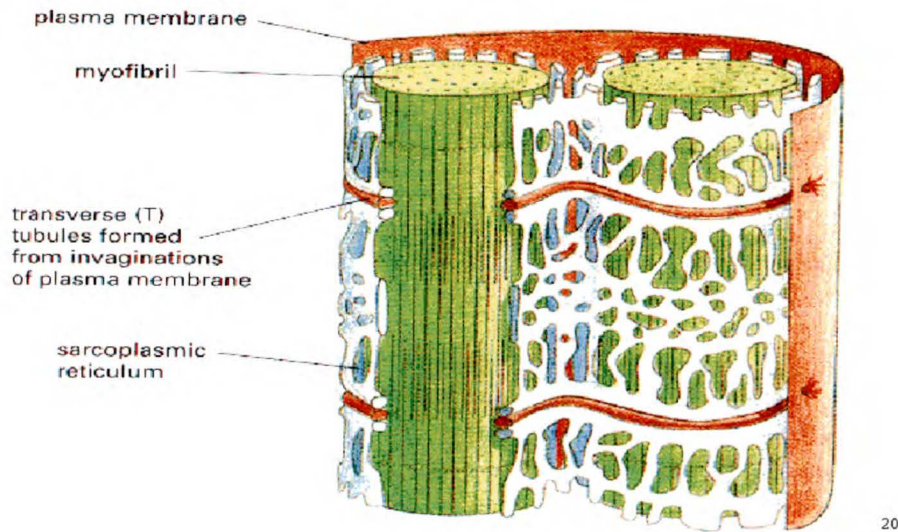


Figure 1. Structure microscopique du tissu musculaire strié des mammifères. Les fibres musculaires (en vert) possèdent plus d'un noyau (non illustré) et sont disposées de façon parallèle. Elles peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de longueur et leur diamètre varie entre 50 et 150 μm . Chez la grenouille (notre modèle expérimental) ces fibres peuvent avoir un diamètre de plus de 100 μm . Chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane plasmique, le sarcolemme (couche orange) qui se prolonge à l'intérieur de la fibre en invaginations périodiques, les tubules-t (tubes oranges). De part et d'autre des tubules-t et de façon perpendiculaire, est apposé un réseau membranaire, le réticulum sarcoplasmique (en blanc). C'est dans les citernes terminales du RS que se trouvent les réserves calciques intracellulaires.

Un élément déclencheur est nécessaire à la contraction d'un muscle. Dans les muscles squelettiques, cet élément déclencheur est la dépolarisation des membranes de surface et des tubules-t. Ainsi, lorsqu'un influx nerveux arrive à la terminaison axonale d'un neurone moteur, il y a dépolarisation du sarcolemme et un potentiel d'action se propage le long de la fibre musculaire. Ce potentiel d'action pénètre à l'intérieur de la fibre par les tubules-t où se trouvent les senseurs de voltage ou récepteurs sensibles aux dihydropyridines (DHPRs, voir figure 2). Dans la membrane des tubules-t, la variation de potentiel induit le mouvement de charges intramembranaires des DHPRs qui est associé à un changement de conformation. Une réaction mécanique permet ensuite aux DHPRs (Hui et Chandler, 1990) d'activer les canaux de libération du Ca, aussi appelés récepteurs

sensibles à la ryanodine (RyRs, figure 2), situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique et apposés aux DHPRs. Il a été proposé que les RyRs et les DHPRs sont physiquement liés car leurs systèmes membranaires respectifs sont distancés d'environ 12 nm (Block *et al.*, 1988; c.f. Melzer *et al.*, 1995). Ainsi, les RyRs activés s'ouvrent et libèrent le calcium emmagasiné dans les citernes terminales du RS (figure 2). Suite à sa libération, le Ca^{2+} peut lier la troponine C des filaments fins d'actine, pour induire une contraction musculaire.

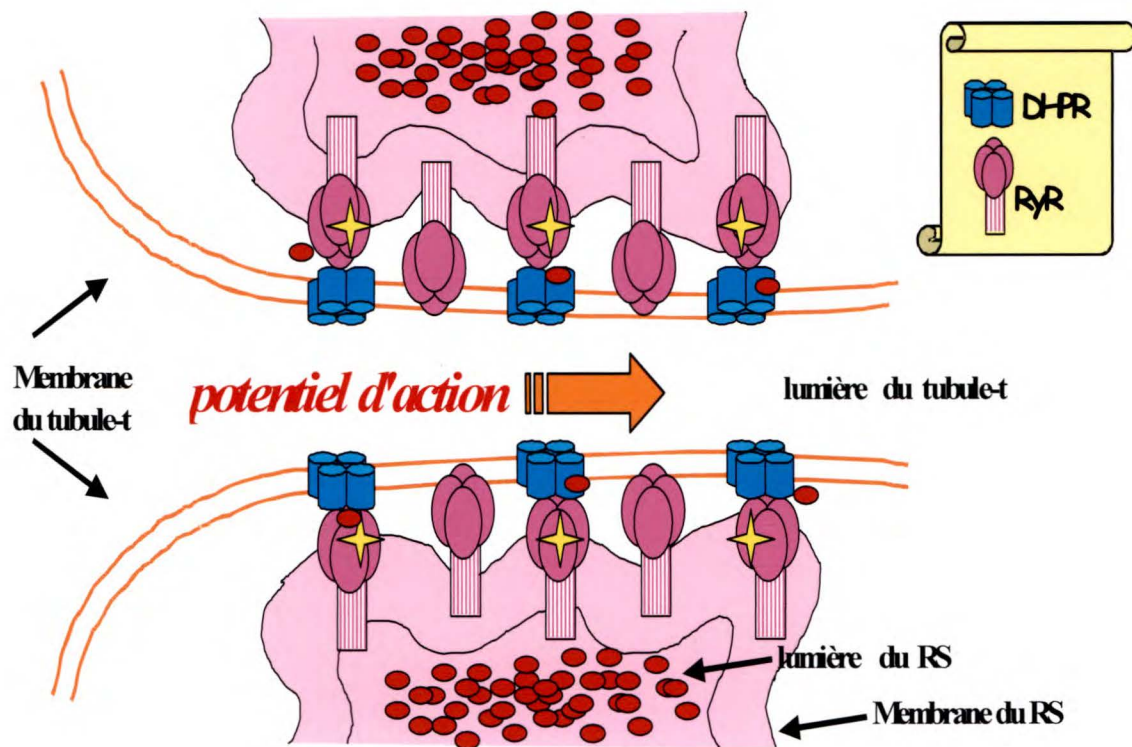


Figure 2. Couplage excitation-contraction. Le potentiel d'action qui se propage le long des tubules-t active les DHPRs. Les DHPRs activent ensuite les RyRs qui leur sont apposés, par un type de couplage mécanique (les étoiles jaunes sont les RyRs activés). Cette activation permet au Ca^{2+} (cercles rouges) d'être libéré du RS afin de lier la troponine C pour engendrer une contraction musculaire.

1.2 - LES RÉCEPTEURS IMPLIQUÉS DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Les récepteur impliqués dans le processus du couplage excitation-contraction sont les senseurs de voltage (DHPRs) et les canaux de libération du Ca (RyRs), situés respectivement dans la membrane du tubule-t et dans la membrane du RS.

1.2.1 - Les senseurs de voltage

Les senseurs de voltage perçoivent les variations de potentiel de la membrane des tubules-t et activent les canaux de libération de Ca du RS (Ríos et Brum, 1987; Imagawa *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1988). Ils sont aussi appelés récepteurs sensibles aux dihydropyridines (ou DHPRs, pour «dihydropyridine receptors»), car les dihydropyridines sont des antagonistes de ces récepteurs. Les DHPRs font partie de la catégorie des «voltage operated Ca channels» (VOCs) de type L, qui sont des canaux activés par de grandes dépolarisations. Les canaux calciques de type L ont initialement été décrits au niveau des fibres musculaires cardiaques et des neurones périphériques, mais ont par la suite été retrouvés dans plusieurs autres types cellulaires, tant excitables que non-excitables (c.f. Tsien et Tsien, 1990). Auparavant, cette catégorie de canaux englobait tous les canaux à la fois voltage-dépendants et sensible aux dihydropyridines. Les DHPRs ont ensuite été inclus dans cette catégorie.

Comme les DHPRs sont très abondants dans les tubules-t des muscles squelettiques, ils ont été les premiers modèles biochimiques et moléculaires utilisés dans des études concernant les canaux calciques (Curtis et Catterall, 1984; Borsotto *et al.*, 1985). Tout comme les autres canaux calciques, ils modulent l'entrée de Ca en réponse à une dépolarisation. Cependant, ils sont activés par de grandes dépolarisations et

s'inactivent lentement avec un courant de longue durée mais le plus important est que l'entrée de Ca extracellulaire par ces canaux calciques voltage-dépendants n'est pas nécessaire à la contraction. Ainsi, bien qu'il ait déjà été proposé qu'un faible pourcentage des DHPRs des muscles squelettiques soient des canaux calciques fonctionnels, le rôle primordial de ces canaux dans les muscles squelettiques est celui de senseur de voltage dans le mécanisme de couplage excitation-contraction (Schwartz *et al.*, 1985).

Les DHPRs des muscles squelettiques possèdent 5 sous-unités (figure 3) : 1) α_{1S} , forme le pore du canal, formé de 4 répétitions (domaines I-IV) ayant chacune 6 segments transmembranaires, et où chaque segment S_4 (contenant des particules chargées positivement, appelées charges intramembranaires des DHPRs) serait responsable de la sensibilité aux variations de potentiel. De plus, selon un modèle (Jong *et al.*, 1995b), il a été proposé que le potentiel doit être perçu par les 4 segments S_4 afin que le canal soit activé et qu'il y ait un changement de conformation. Ainsi, la voie menant à l'activation des DHPRs semble être un processus à plusieurs étapes, passant par l'activation (et le mouvement) de différentes particules; 2) α_2 , glycoprotéine hydrophobe, contenant les sucres et participant à l'expression fonctionnelle de α_{1S} ; 3) β_1 , protéine hydrophile intracellulaire ayant des sites de phosphorylation, contribuant au bon fonctionnement de la cinétique des canaux Ca dans les muscles squelettiques; 4) γ , feuillet transmembranaire au rôle obscur; 5) δ , protéine hydrophobe et glycosylée, fragment de α_2 , rôle obscur (Catterall, 1995).

Bien que la structure des DHPRs semble maintenant bien établie par des études biochimiques, physiologiques et par microscopie électronique, peu d'expériences ont réussi à exprimer la sous-unité α_{1S} dans des lignées cellulaires de mammifères. Entre

autre, le groupe de Jingsong Zhou (1998) a cloné α_{1S} de la grenouille et même si leurs résultats biochimiques semblaient confirmer que cette molécule correspondait à une sous-unité des DHPRs, seulement 10% des cellules transfectées ont montré un large courant entrant de type L. La raison de l'insuccès de l'expression fonctionnelle de l'ADNc de cette sous-unité dans cette étude ainsi que dans des études antérieures (Perez-Reyes *et al.*, 1989; Lacerda *et al.*, 1991; Nakai *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997) reste nébuleuse mais les tentatives de transfection et d'expression se poursuivent.

1.2.2 - Les canaux de libération du Ca du RS

Les canaux de libération du Ca forment une famille de canaux qui jouent un rôle primordial dans la régulation de la concentration de Ca intracellulaire (Coronado *et al.*, 1994). Les RyRs (pour « Récepteurs sensibles à la ryanodine ») sont appelés ainsi à cause de leur grande affinité pour la plante alcaloïde ryanodine, qui est un métabolite produit par un arbuste d'Afrique du Sud appelé *Ryania speciosa* (Jenden et Fairhurst, 1969). Ils ont initialement été purifiés et solubilisés à partir de tissus musculaires et neurones. Ils ont ensuite été isolés et purifiés dans le muscle cardiaque et dans les muscles lisses mais leur présence est maintenant confirmée dans une grande variété de types cellulaires (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997). Par centrifugation selon un gradient de densité, un complexe protéinique de 30S peut être obtenu, constitué de 4 polypeptides ayant approximativement 5000 résidus d'acides aminés chacun (Meissner, 1994).

Trois isoformes des RyRs sont aujourd'hui connus et sont générés par les gènes RyR₁ (muscles squelettiques), RyR₂ (muscle cardiaque) et RyR₃ (muscles squelettiques de façon minoritaire, cerveau, et cellules épithéliales entre autre). La structure primaire des trois isoformes a été déterminée par clonage et séquençage d'ADN complémentaire.

Les échantillons teints négativement et les études en microscopie électronique révèlent un assemblage tétramérique des sous-unités des RyRs, formant ainsi une structure en forme de trèfle à 4 feuilles (Saito *et al.*, 1989). De plus, grâce à la technique de reconstruction angulaire entre autre, des images 3D du canal ont été obtenues à haute résolution (environ 3 nm) permettant d'obtenir des détails sur les domaines cytoplasmiques et segments transmembranaires (Wagenknecht et Radermacher, 1995). Ces études indiquent que les RyRs des muscles squelettiques ont une dimension cytoplasmique de 27x27x14 nm, avec un canal central et une partie transmembranaire de 7 nm de longueur (Wagenknecht *et al.*, 1989). Ainsi, les RyRs sont constitués de 2 régions structurales majeures: 4 à 10 segments transmembranaires formant le pore du canal avec une petite terminaison-C cytoplasmique, ainsi qu'une grande terminaison-N cytoplasmique formant le "foot protein" (figure 3), qui interagirait physiquement avec la sous-unité α_{1S} des DHPRs, dans le couplage excitation-contraction (le couplage entre les DHPRs et les RyRs sera discuté plus en détail à la section suivante). Il a déjà été mentionné que les RyRs sont sensibles à la ryanodine, d'où leur nom. Par exemple, à faible concentration (nM), la ryanodine garde le canal dans un état ouvert plus longtemps, mais à grande concentration, la ryanodine inactive ces canaux (Melzer *et al.*, 1995). Suite à ces observations, des études effectuées en présence de faibles concentrations de ryanodine ont permis de visualiser les RyRs à l'état ouvert et fermé. Le canal ouvert présenterait une ouverture visible du côté de la lumière de l'assemblage transmembranaire (Orlova *et al.*, 1996). La structure cytoplasmique des RyRs serait grandement hydratée et posséderait de nombreux canaux et passages entre les domaines protéiques faiblement liés. Il a également été proposé que les canaux orientés de façon radiale pourraient servir

à diriger le Ca^{2+} du canal central vers la périphérie de la molécule. Finalement, les 4 coins de la molécule possèdent plusieurs crevasses pouvant interagir avec les RyRs voisins, et permettant aux RyRs de se regrouper en une rangée double et ordonnée dans la membrane du RS (voir figures 2 et 6; Franzini-Armstrong et Jorgensen, 1994).

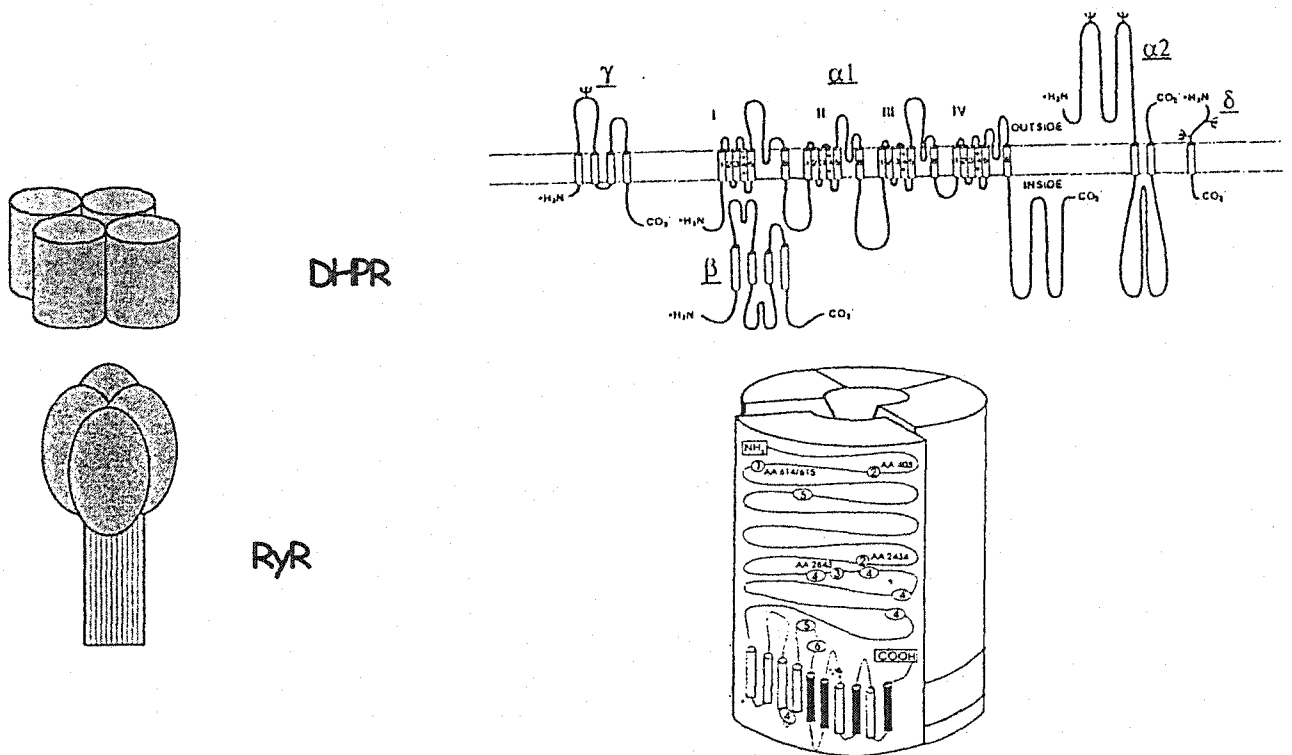


Figure 3. Canaux impliqués dans le couplage excitation-contraction. Le senseur de voltage, aussi appelé récepteur sensible aux dihydropyridines (DHPR) est représenté en bleu sur le schéma de gauche. Les sous-unités α_{1s} , α_2 , β_1 , γ , et δ du DHPR sont représentées à droite. En mauve est schématisé le récepteur sensible à la ryanodine (RyR), aussi appelé canal de libération du Ca du RS. Les 4 segments transmembranaires, la terminaison-C cytoplasmique et le "foot protein" ou terminaison-N du RyR sont représentés à droite. (Tiré de la fig. 2 de Catterall, 1995 ;et de la fig.32 de Melzer *et al.*, 1995.)

1.3 - COUPLAGE DES DHPRs ET DES RyRs

Comme il était bien établi que dans les muscles squelettiques un changement de conformation des DHPRs permet l'activation des RyRs par couplage mécanique, plusieurs chercheurs ont voulu caractériser les régions impliquées dans le couplage allostérique entre les DHPRs et les RyRs. Des résultats obtenus à partir d'expériences effectuées sur des souris dysgéniques (c'est-à-dire, sans α_{1S}) ont révélé que la région s53 de la boucle entre les domaines II et III de α_{1S} est nécessaire au signal (bidirectionnel) entre les RyRs et les DHPRs (Nakai *et al.*, 1998; Grabner *et al.*, 1999). Les résultats d'autres expériences effectuées sur des myotubes dyspédiques (c'est-à-dire, sans RyR₁) suggèrent que les régions R9 et R10 des RyR₁s participent à l'interaction avec α_{1S} . Il a également été proposé que les RyR₁s augmentent à leur tour la densité de courant produit par α_{1S} , par rétroaction positive (Nakai *et al.*, 1996). Malgré les résultats de ces études effectuées *in vitro*, peu d'évidences permettent de conclure que l'interaction entre les 2 protéines se fait par contact directe. Plus récemment, le groupe de Catherine Proenza (2002) a effectué des études de double-hybride sur la levure, afin d'identifier les domaines des RyRs et des DHPRs participant à la fois à la liaison et au couplage fonctionnel de ces 2 protéines. Leurs résultats ont permis de conclure que les résidus 1837 à 2168 de la région sR16 (faisant partie de R10) des RyRs interagissent avec la région s53 des DHPRs. Ils n'ont cependant pas pu écarter la possibilité que d'autres sites de contact de faible affinité pourraient également médier le signal entre les 2 protéines. De plus, les méthodes utilisées comportent certains désavantages. Par exemple, la méthode de double hybride ne peut tester que des fragments d'ADN de moins de 300 résidus, ce qui est problématique vu la grande taille des RyRs. Aussi, les expériences effectuées *in*

vitro ne reflètent pas nécessairement ce qui se passe *in vivo*. Néanmoins, les résultats de Proenza et son groupe montrent qu'il existe une interaction entre α_{1S} et RyR1.

Ainsi, ces évidences physiologiques et biochimiques indiquent que les RyRs sont contrôlés par le potentiel perçu par les DHPRs cependant, une variété de molécules endogènes participent également à la régulation des RyRs, discuté à la prochaine section.

1.4 - RÉGULATION DES RyRs

Le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , les nucléotides d'adénine, la calmoduline, les métabolites lipidiques, les polyamines et la phosphorylation, pour n'en nommer que certaines, comptent parmi les autres molécules qui participent à la régulation des RyRs. La plupart des études concernant la régulation des RyRs ont été effectuées par les techniques d'efflux calcique de vésicules, d'enregistrement de canaux unitaires incorporés dans des bicouches lipidiques planes, et de liaison à la [^3H]ryanodine.

1.4.1 - Régulation des RyRs par le Ca^{2+} , Mg^{2+} et les nucléotides d'adénine

En absence d'ATP et de Mg^{2+} , des résultats d'expériences sur des canaux unitaires incorporés dans des bicouches planes ont montré que des concentrations nanomolaires de Ca réduisaient la probabilité d'ouverture (P_o) des RyRs à environ 0. Mais l'addition de quelques micromolaires de Ca activait le canal, en induisant des ouvertures et des fermetures rapides, augmentant ainsi la P_o à presque 1. Des [Ca] plus élevées (ex.: mM) inactivaient le canal (Ma *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1986). Sous ces conditions expérimentales, la courbe en forme de cloche du graphique de la libération de Ca^{2+} en fonction de la [Ca] dans le RS présente un sommet à des [Ca] micromolaires. Une telle

courbe suggère que les RyRs possèdent des sites de liaison et d'activation à haute affinité pour le calcium, ainsi que des sites d'inhibition à faible affinité.

Outre le Ca^{2+} , le Sr^{2+} peut également activer les RyRs, tandis que le Ba^{2+} et le Mg^{2+} peuvent jouer un rôle inhibiteur (Kirino *et al.*, 1983; Meissner *et al.*, 1992; Nagasaki et Kasai, 1984; Rousseau *et al.*, 1992).

Un autre régulateur physiologique des RyRs est le Mg-ATP plutôt que l'ATP libre car le Mg^{2+} lie presque tous les nucléotides présents dans les cellules. D'une part, les études portant sur la régulation des RyRs par l'ATP seulement sont difficiles d'exécution car non seulement le Mg-ATP est la forme prédominante présente dans les cellules, mais aussi car (comme mentionné plus haut) le Mg^{2+} libre inhibe les canaux activés par le Ca et l'ATP. D'autre part, il a été montré que l'addition de Mg^{2+} et d'adénine à des concentrations physiologiques stimulent l'activation des RyRs, à des $[\text{Ca}] \mu\text{M}$. Il semble donc exister un site de régulation qui rend les RyRs plus sensibles, une fois le Mg-ATP lié (Meissner *et al.*, 1986). Un peu plus tard, G.D.Lamb (1993) a suggéré la présence deux sites de régulation du Mg^{2+} : un site inhibiteur et à faible affinité pour le Ca, et un site d'activation à haute affinité pour le Ca, pour lequel le Mg^{2+} compétitionne avec 50% moins d'affinité (Meissner *et al.*, 1986; Nagasaki *et al.*, 1983). Selon lui, après une dépolarisation, le senseur de voltage diminue l'affinité du site inhibiteur, provoquant la dissociation du Mg^{2+} de ce site et l'ouverture partielle des RyRs. Le Ca^{2+} déplace ensuite le Mg^{2+} du site d'activation, augmentant la P_o des canaux (nécessitant $10 \mu\text{M}$ de Ca). Une fois la $[\text{Ca}]$ cytoplasmique élevée, la libération de Ca prend fin dû à la liaison du Ca au site inhibiteur, mais l'hypothèse selon laquelle l'arrêt de la libération serait due à un processus de phosphorylation initié par une phosphatase activée par le Ca, est aussi

possible (Lamb, 1993).

Les RyRs sont également affectés par le pH, la force ionique et la composition des anions. L'efflux de Ca du RS diminue lorsque le pH diminue de 7.5 à environ 6 (Meissner *et al.*, 1984; Sumbilla *et al.*, 1987), sans affecter l'affinité des sites de liaison. Une augmentation de [KCl] ou la substitution du Cl par ClO^4 augmente la libération du Ca du RS, tandis que la substitution du Cl^- par le gluconate diminue la libération.

1.4.2 - Régulation des RyRs par les lipides et les métabolites polycationiques

Certaines études suggèrent que l' IP_3 favorise la libération du Ca du RS (Vergara *et al.*, 1985; Volpe *et al.*, 1985) et que l' IP_3 joue un rôle central dans le couplage excitation-contraction. Cette hypothèse est toutefois controversée. D'un côté, des observations ont montré que la dépolarisation des tubules-t augmente l'efficacité de l' IP_3 dans la libération du Ca de fibres sans sarcolemme. D'un autre côté, l'inefficacité de l'héparine à bloquer la libération de Ca contredit la supposition que l' IP_3 soit un ligand jouant un rôle primordial dans le couplage excitation-contraction.

Plusieurs lipides sont également impliqués dans la libération de Ca du RS. Par exemple, le palmitoyl carnitine et palmitoyl CoA stimulent la liaison de [^3H]ryanodine et la libération de Ca (El-Hayek *et al.*, 1993).

1.4.3 - Régulation des RyRs par la calmoduline

Dans des études effectuées sur des canaux unitaires, la calmoduline a inhibé les RyRs en réduisant le temps moyen d'ouverture sans avoir d'effet sur la conductance unitaire. Cette inhibition était Ca-dépendante, partielle et réversible. L'effet inhibiteur de

la calmoduline, en absence d'ATP, suggère qu'une liaison directe existe entre la calmoduline et le RyR (Meissner *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1989). Cependant, une régulation indirecte des RyRs médiée par la phosphorylation de la calmoduline par une kinase pourrait aussi être possible (cf. Melzer *et al.*, 1995).

1.4.4 - Autres protéines qui régulent les RyRs

La triadine est une protéine membranaire intrinsèque, formant de nombreuses liaisons disulfides intramembranaires, et est impliquée dans le couplage fonctionnel entre les DHPRs et les RyRs (Brant *et al.*, 1992; Knudson *et al.*, 1993).

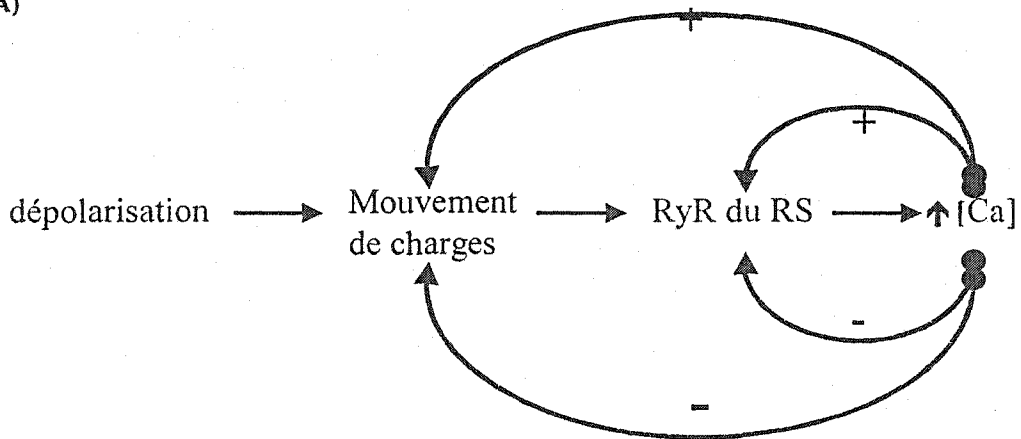
La calsequestrine est une protéine acide liée au Ca du RS et concentrée dans les citernes terminales du RS. Des observations suggèrent qu'en plus d'augmenter la capacité en Ca du RS la calsequestrine, liée à la protéine de liaison junctine, pourrait jouer un rôle dans la régulation de la libération du Ca du RS (Ikemoto *et al.*, 1991).

L'annexine VI est une protéine de liaison du Ca dans la lumière du RS qui module la libération du Ca en augmentant la P_o et le temps moyen d'ouverture des RyRs (Diaz-Munoz *et al.*, 1990).

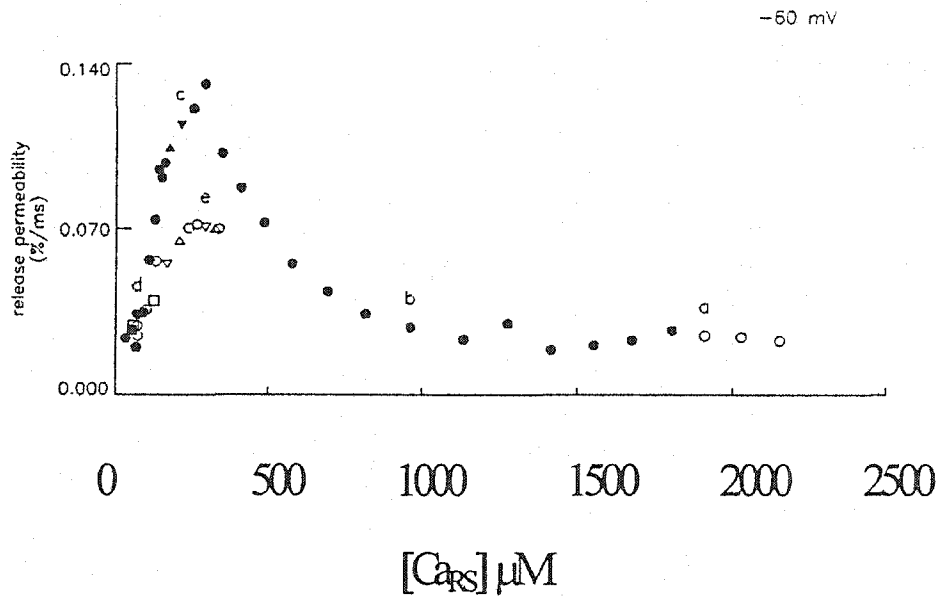
1.5 - MÉCANISMES RÉTROACTIFS DU Ca

Une fois le calcium libéré du RS, des mécanismes rétroactifs (figure 4A) peuvent réguler la libération additionnelle de calcium du RS, tels que : 1) la libération du Ca induite par le Ca (LCIC); 2) l'inactivation de la libération du Ca par le Ca; 3) une augmentation de la cinétique de la composante Q_y des mouvements de charges intramembranaires des DHPRs; 4) une diminution de la cinétique de Q_y .

A)



B)



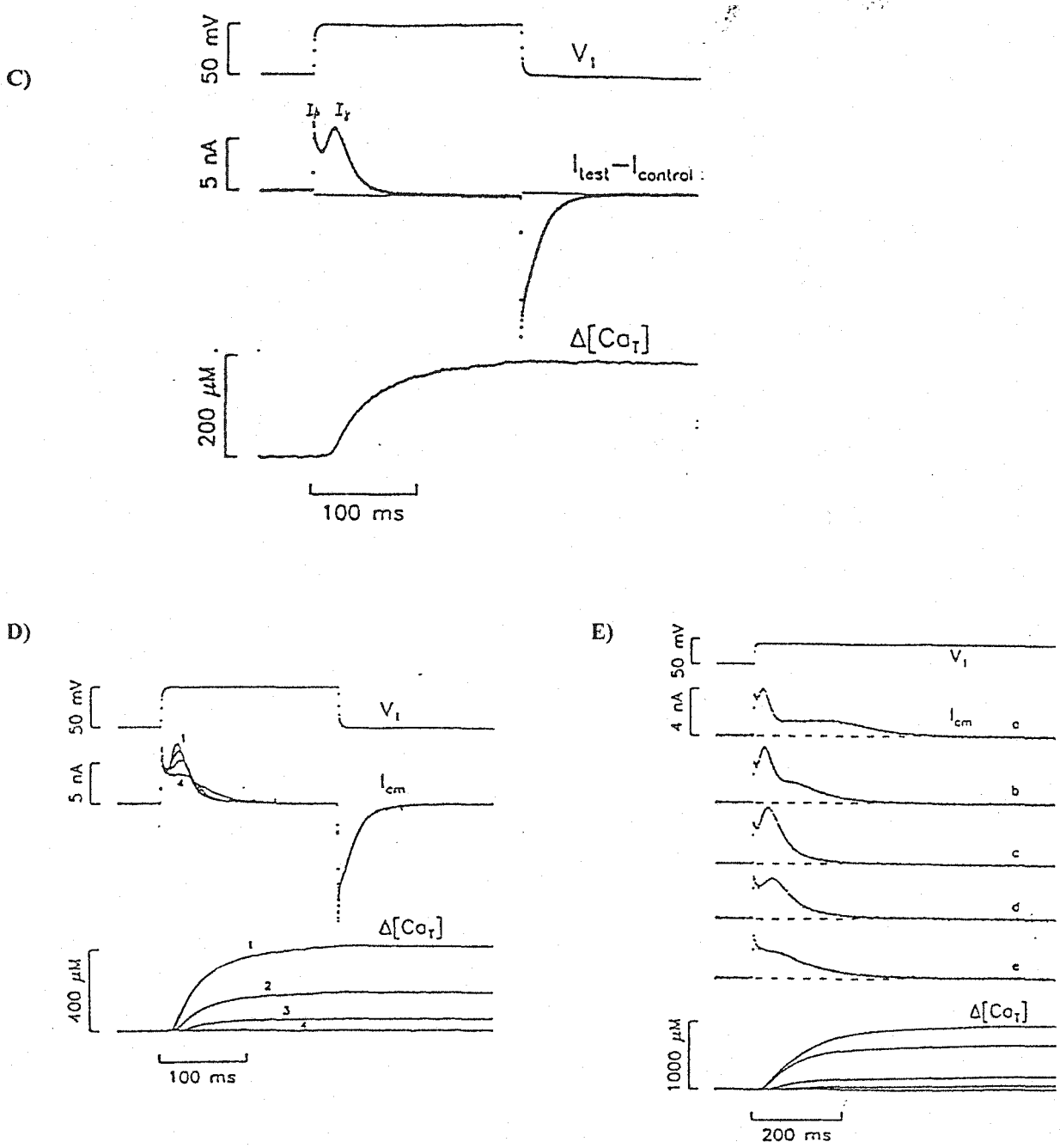


Figure 4. Mécanismes rétroactifs du calcium. A) Une fois libéré des citernes terminales du RS, le Ca peut agir selon 4 mécanismes rétroactifs (2 positifs et 2 négatifs) afin de réguler la libération supplémentaire de Ca: 1) par libération du Ca induite par le Ca (LCIC) représenté par la petite boucle positive "+"; 2) par l'inactivation de la libération du Ca par le Ca, comme le montre la petite boucle négative "-"; 3) par l'accélération de la cinétique de Q_T , représenté par la grande boucle positive "+"; 4) par un ralentissement de la cinétique de Q_T , illustré par la grande boucle négative "-". B) Graphique de la perméabilité à la libération en fonction de $[Ca_{RS}]$ à -60 mV. Les valeurs de la perméabilité ont été obtenues par la formule: $100 * d\Delta[Ca_T]/dt \div ([Ca_{RS}]_R - \Delta[Ca_T])$. Les cercles blancs et noirs représentent respectivement des stimulations où le Ca est présent et absent de la solution interne. Un triangle "inversé" représente une stimulation effectuée environ une minute avant une autre stimulation par un carré. Un triangle illustre une stimulation obtenue 5 minutes plus tard. Les stimulations identifiées avec les lettres a-e sont des stimulations à différentes $[Ca_{RS}]$, soit 2 043, 1 029, 267, 74, et 347 μM respectivement. (Pour plus de détails, voir fig.5A de Pape et Carrier, 1998). C) La première trace est un pulse dépolarisant de 200 ms à -40 mV dans une fibre partiellement dépourvue de Ca. La trace suivante est le courant ($I_{test} - I_{contrôle}$) avec les

composantes I_{β} et I_{γ} des mouvements de charges intramembranaires. La dernière trace est celle de la variation de la concentration de Ca totale myoplasmique, $\Delta[Ca_T]$ (Tiré de la fig.1 de Jong *et al.*, 1995). **D**) Le signal de voltage est une dépolarisation de 200 ms à -40 mV. Les traces de $I_{\text{test}}-I_{\text{contrôle}}$ suivantes montrent une diminution de la composante I_{γ} avec une diminution de $\Delta[Ca_T]$, par le mécanisme de rétroaction négative du Ca sur le Q_{γ} (Tiré de la fig.2 de Jong *et al.*, 1995) **E**) La première trace est le début d'un pulse dépolarisant de 700 ms à -48 mV. Les traces suivantes sont les I_{cm} pour des $[Ca_{\text{RS}}]_{\text{R}}$ de 949 μM (a), 662 μM (b), 194 μM (c), 64 μM (d), et 6 μM (e). Les dernières traces superposées sont les $\Delta[Ca_T]$ correspondantes.

Dans le muscle cardiaque, le couplage excitation-contraction nécessite l'entrée de Ca extracellulaire. En effet, des études effectuées par Fabiato (1983) sur des fibres musculaires cardiaques ont montré qu'une augmentation de la concentration de Ca myoplasmique cause la libération de Ca du RS additionnelle. Il a donc été établi que ce mécanisme, appelé LCIC, est physiologiquement important dans le cœur, et pourrait aussi être présent dans les muscles squelettiques. Cependant, contrairement au muscle cardiaque, le couplage excitation-contraction ne dépend pas de la présence de Ca extracellulaire dans les muscles squelettiques (Armstrong *et al.*, 1972). Malgré ceci, Ford et Podolsky (1970) ont montré qu'une application de Ca sur des fibres musculaires dépourvues de sarcolemme provoque la libération additionnelle de Ca du RS. Même si ces premiers résultats suggéraient la présence de LCIC dans les muscles squelettiques, Endo (1977) conclut que LCIC dans le muscle squelettique n'était possible que sous des conditions artificielles, conclusion encore débattue de nos jours.

La LCIC est illustré à la figure 4B montrant un graphique de la perméabilité du RS à libérer le Ca (expliqué plus bas) en fonction de la concentration du Ca dans le RS ($[Ca_{\text{RS}}]$). Le mécanisme de LCIC est à son maximum au sommet de cette courbe en forme de cloche.

L'inactivation de la libération du Ca par le Ca est un mécanisme de rétroaction négative étudié par plusieurs chercheurs dans les muscles squelettiques (Baylor *et al.*

1983; Schneider et Simon, 1988; Jong *et al.* 1995). Ce processus est très rapide, même en présence d'une grande concentration d'un tampon calcique comme l'EGTA. Selon ce mécanisme, une grande augmentation de la concentration de Ca myoplasmique induit l'inactivation des RyRs. La partie descendante à droite du sommet de la courbe en cloche de la figure 4B illustre les effets de ce mécanisme.

Suite à ces observations, il a été proposé que les mécanismes de LCIC ainsi que d'inactivation de la libération du Ca par le Ca sont tous deux omniprésents dans les muscles squelettiques.

En 1973, Schneider et Chandler ont identifié la présence d'un courant, le I_{cm} (voir figure 4C), dû au mouvement des molécules chargées dans la membrane des DHPRs (charges intramembranaires, dénotées "Q"). Ces charges sont les acides aminés chargés positivement des segments S4 de la sous-unité α_{1S} des DHPRs. Cependant, ce courant ne doit pas être confondu avec le courant de "gates". En effet, dans le cas des du canal sodique par exemple, le mouvement des charges voltage-sensible initie un changement de conformation dans la structure du canal, permettant aux ions de passer par le pore central et les "gates" (petites barrières) de ce même canal. Ce mouvement de charges produit un petit courant mesurable qu'on appelle "courant de gates". Dans le cas des DHPRS cependant, suite à une dépolarisation, les senseurs de voltage subissent un changement de conformation (induisant le I_{cm}) mais contrairement à l'exemple précédent, le pore et les gates par lequel les ions passent ne se trouvent pas dans le même canal mais dans le canal opposé, le RyR. Il a toutefois été proposé que les DHPRs sont contrôlés par deux gates distinctes et voltage-dépendantes: une gate lente et une rapide qui doivent toutes deux bouger afin d'ouvrir le pore du canal. Plus précisément, le groupe de Nakai

(1994) a montré que le segment S3 ainsi que la boucle entre S3 et S4 du domaine I de α_{1S} sont les structures importantes dans la détermination du gating lent. Selon le modèle de Feldmeyer *et al.*, (1992), le domaine I constitue la gate lente, et les domaines II-IV forment la gate rapide (Melzer, 1995). Une dépolarisation causerait la transition rapide de l'état 1 à l'état 2, mais l'ouverture du canal serait ralentie par la transition lente entre les états 2 et 3. L'état 4 serait l'état du canal repolarisé. Les gates rapides et lentes semblent déterminer l'ouverture du canal, mais la gate rapide seule contrôle la libération de calcium. Bien que de nombreuses études aient été menées et que plusieurs évidences supportent l'hypothèse que certaines charges intramembranaires causent la libération de Ca du RS (Pape et Carrier, 2002a), il reste encore à déterminer si la gate rapide des DHPRs des muscles squelettiques est corollée avec la libération de Ca également. Ce faisant, le courant de gate pourrait être clairement identifié, et classé séparément du I_{cm} . Finalement, parmi les chercheurs qui ont tenté de confirmer l'existence d'un courant de gates pour les senseurs de voltage se trouve le groupe de Nakai (1996). Selon ce groupe, les RyRs augmentent le courant produit par la sous-unité α_{1S} des DHPRs, ce qui pourrait être expliqué par le courant de gates des canaux calciques de type L. Actuellement, il n'y a pas d'évidence qui le prouve et il a même été suggéré que ce signal pourrait être le courant de gates des RyRs. Des expériences électrophysiologiques et moléculaires supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir caractériser le courant de gates des DHPRs.

C'est en 1979 qu' Adrien et Perez ont identifié les deux composantes du I_{cm} : une composante initiale, le I_{β} dû au mouvement des charges Q_{β} , et une composante retardée dû aux charges Q_{γ} , le I_{γ} ("hump component"). Des résultats suggèrent que c'est le I_{γ} qui

serait associé à la libération voltage-dépendante du Ca du RS. D'autres études ont montré qu'il existe des charges " Q " supplémentaires qui pourraient être dues à un courant de gates des DHPRs, mais ces charges n'ont pas pu être clairement dissociées de Q_β et Q_γ moléculairement avec succès. Ainsi, bien que le Q_γ n'ait pas été étudié de façon moléculaire, les résultats de Hui et Chandler (1990, 1991) montrent que le Q_γ est extrêmement voltage-dépendant, tout comme les résultats de tension (Hodgkin et Horowicz, 1960) et de libération de Ca (Baylor *et al.*, 1983; Klein *et al.*, 1996). C'est pourquoi le I_γ est parfois considéré comme étant le courant de gates associé au Q_γ (car la cinétique de ce courant est sensible au voltage et au Ca).

En 1995, Jong *et al.* ont étudié la relation entre Q_γ et la concentration de Ca dans le RS ($[Ca_{RS}]$). Ils ont observé qu'à de faibles $[Ca_{RS}]$, si la variation de Ca total libéré dans le myoplasme ($\Delta[Ca_T]$) augmente, l'amplitude de Q_γ augmente également. Ainsi, à de petites $[Ca_{SR}]$, le Ca libéré du RS peut augmenter la cinétique de Q_γ , par rétroaction positive (figure 4D). Inversement, Pape et collaborateurs (1996) ont étudié la relation entre Q_γ et $[Ca_{RS}]$, à de grandes $[Ca_{RS}]$. Leurs observations leur ont permis de conclure que lorsque la $[Ca_{RS}]$ est grande, si la $\Delta[Ca_T]$ augmente, alors la cinétique de Q_γ diminue (figure 4E), freinant la libération de Ca additionnelle. Ce processus de rétroaction négative empêche une trop grande libération de Ca du RS.

Ces quatre mécanismes rétroactifs sont très importants car ils permettent de mieux comprendre et expliquer la régulation de la libération du Ca dans les muscles squelettiques.

1.6 - LIBÉRATION DU Ca DU RS

La libération du Ca du RS dépend de la perméabilité du RS à libérer du Ca. Ce qu'on appelle la perméabilité à la libération du Ca du RS correspond à la vitesse de libération du Ca du RS normalisée par la force motrice de la libération. Il a été suggéré que cette force motrice est proportionnelle à $[Ca_{RS}]$ et proportionnelle à $[Ca^{2+}]$ (concentration du calcium libre), mais n'est pas reliée au voltage. Suivant cette supposition, la perméabilité à la libération est une bonne estimation de la perméabilité du RS à libérer du Ca, et cela correspond au degré d'activation des RyRs (Pape et Carrier, 1998). Il est à noter que dans ce contexte, la perméabilité à la libération représente aussi la conductance unitaire moyenne des RyRs du RS et dépend de la densité des canaux présents dans la fibre musculaire ainsi que leur probabilité d'ouverture (P_o). Une augmentation de la perméabilité est donc due soit à une augmentation du nombre de canaux ouverts, soit à une augmentation de leur conductance unitaire.

En réponse à une grande dépolarisation (ex.: >-57 mV), le signal de la perméabilité à la libération atteint un sommet, puis redescend au niveau de base, suivi d'un plateau (figure 5).

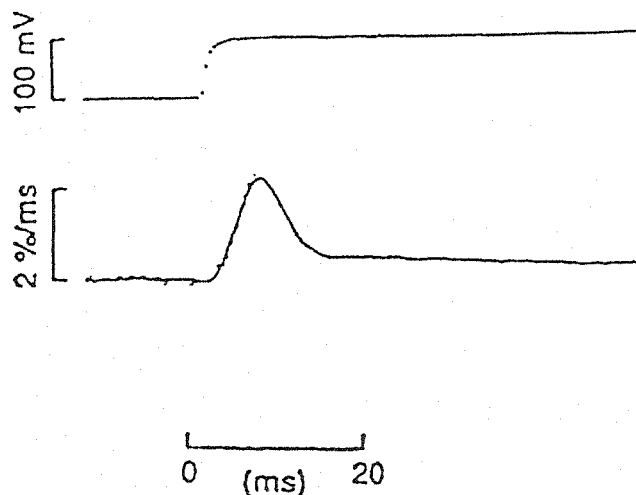


Figure 5. Exemple d'un signal de perméabilité à la libération en réponse à une dépolarisation, en voltage imposé. Le signal montre un sommet, suivi d'une phase descendante et d'un plateau (Jong *et al.*, 1993).

Dans les citernes terminales du RS, les RyRs sont disposés de façon alternée formant ce qu'on appelle un "double array" (figure 6), où 1 RyR sur 2 est couplé à un senseur de voltage (Block *et al.*, 1988).

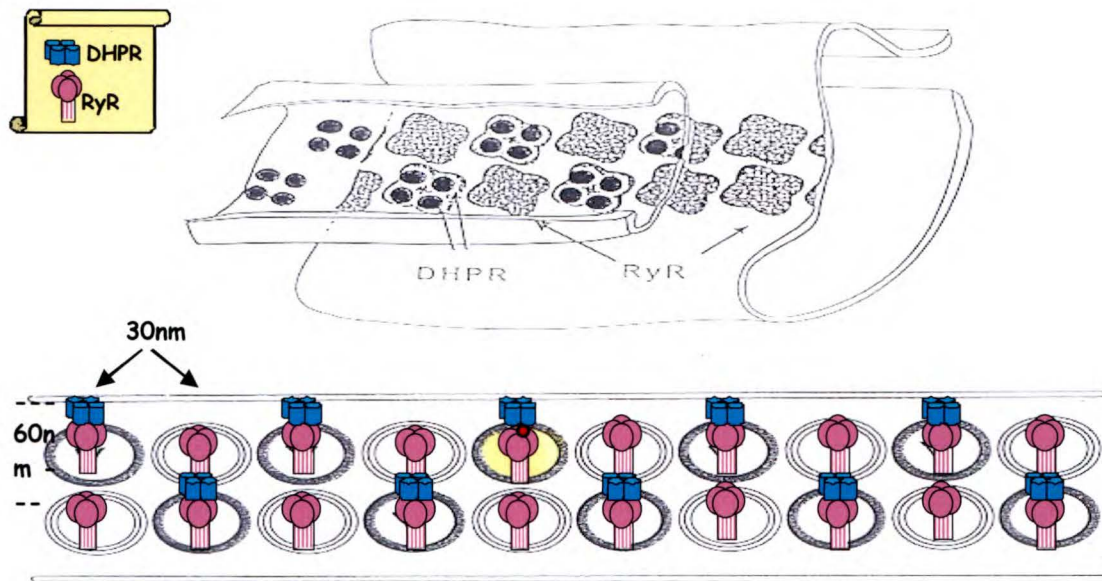


Figure 6. Disposition des récepteurs dans leurs membranes respectives. Les DHPRs sont situés dans la membrane des tubules-t, et les RyRs sont situés dans la membrane du RS. Ces deux systèmes membranaires sont distancés d'environ 12 nm. Un RyR sur deux est couplé à un senseur de voltage, et forment une rangée double ("double array"), d'approximativement 60 nm d'épaisseur. La distance entre 2 RyRs est d'environ 30 nm (modifié de Block *et al.*, 1988).

La découverte de la disposition des RyRs et des DHPRs mena plusieurs chercheurs à proposer que le sommet du signal de la perméabilité, où la LCIC est à son maximum, serait dû à l'ouverture des RyRs non-couplés à un DHPR mais activés par le Ca (Block *et al.*, 1988; Ríos *et al.*, 1988). Le déclin du signal (après le sommet) serait causé par l'inactivation de la libération du Ca par le Ca. Et finalement la phase plateau du signal de la perméabilité refléterait l'activation des RyRs couplés à un DHPR, et ces RyRs couplés ne seraient sensibles qu'au voltage, c'est-à-dire, ni activés ni inactivés par le Ca. Afin de vérifier expérimentalement ces hypothèses, Schneider et collaborateurs

(Jacquemond *et al.*, 1991) ont introduit une grande concentration de deux tampons à haute affinité pour le Ca, soient le BAPTA ou le fura-2, dans le myoplasme d'une fibre musculaire. Selon leurs résultats, 1-2 mM BAPTA ou 2.2-2.8 mM fura-2 a aboli le sommet du signal de la perméabilité, ce qui leur a permis de conclure que la chélation du Ca^{2+} par un tampon calcique peut éliminer le mécanisme de LCIC dans les muscles squelettiques (figure 7A).

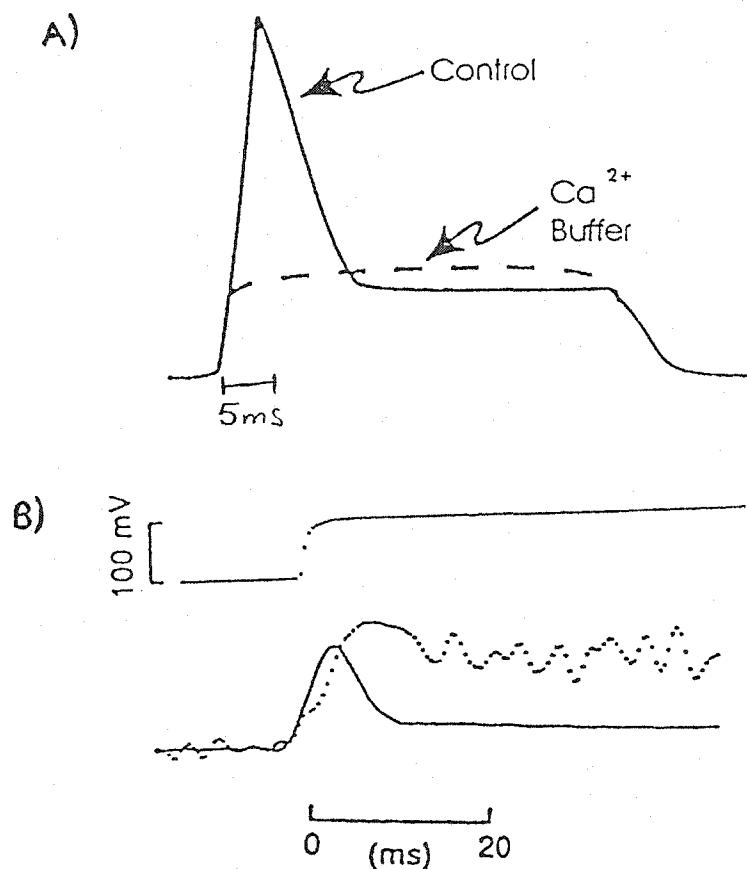


Figure 7. Conséquence de la présence du fura-2 dans le myoplasme d'une fibre musculaire coupée de la grenouille, sur l'amplitude et le temps de décaissement du signal de la perméabilité à la libération du Ca. A) Les résultats de Schneider et collaborateurs (1991) montrent que l'ajout de 2.2-2.8 mM de fura-2 réduit le sommet initial contrairement aux résultats de Jong *et al.* (1993), et Pape *et al.* (1993) qui ont observé une faible augmentation du sommet mais surtout, l'abolition de la phase plateau, avec 2-4 mM de fura-2, en B). (Modifié de la fig.2 de Sutko et Airey, 1996).

Contrairement à leurs résultats, les expériences menées par Jong *et al.* (1993) et Pape *et al.* (1993) ont montré que 2-4 mM fura-2 n'augmente pas (ou très peu) le sommet du signal de la perméabilité mais augmente la phase plateau au même niveau que le sommet (figure 7B). Ces deux résultats contradictoires montrent bien que la présence LCIC au sommet du signal de la perméabilité, ainsi qu'au sommet de la courbe en cloche (voir figure 4B) fait l'objet d'une controverse encore de nos jours.

Ainsi, les approches précédentes cherchant à étudier la LCIC consistaient à utiliser des tampons à haute affinité pour le Ca. Une autre approche consiste à diminuer $[Ca_{RS}]$. Pape et Carrier (1998) ont utilisé cette méthode afin d'évaluer si, à de faibles dépolarisations et en présence d'une grande concentration du tampon calcique EGTA (20 mM), la LCIC agit au niveau de sites de libération de Ca. Sous ces conditions expérimentales, très peu de RyRs sont activés par leurs DHPRs, et la distance entre 2 sites de libération de Ca est trop grande pour que le Ca venant d'un site de libération puisse activer des sites voisins. Il est à noter que dans ce contexte, un site de libération du Ca peut être:

- soit un seul RyR activé par son senseur de voltage
- soit un RyR activé par son DHPR et des RyRs voisins recrutés par LCIC.

Ils ont ensuite fait le graphique de la perméabilité de la libération du Ca du RS (correspondant au degré d'activation des RyRs) en fonction de $[Ca_{RS}]$ (proportionnel à $[Ca^{2+}]$ libre à l'embouchure d'un RyR ouvert). Ils ont obtenu une courbe en forme de cloche, avec un maximum lorsque $[Ca_{RS}]$ est environ 300 μM (figure 4B). A partir de cette courbe en cloche, ils ont conclu que la LCIC augmente lorsque $[Ca_{RS}]$ augmente de <100 à environ 300 μM , et que l'inactivation de la libération du Ca par le Ca explique la

diminution de la perméabilité lorsque $[Ca_{RS}]$ augmente de >300 à environ $1000 \mu M$. Pape et Carrier ont donc suggéré qu'à de faibles dépolarisations, ces 2 mécanismes rétroactifs agissent au niveau de RyRs de sites de libération isolés et activés par leurs senseurs de voltage (DHPRs) correspondants. Ils n'ont cependant pas pu écarter la possibilité que les RyRs non-couplés pourraient être activés par LCIC et ensuite, inactivés par le Ca.

1.7 - BUT DU PROJET DE MAÎTRISE

Suite aux observations de Pape et Carrier (1998), le but de la première partie de mon projet de recherche était d'évaluer si oui ou non, les RyRs non-couplés voisins peuvent être recrutés par LCIC, à de faibles dépolarisations (figure 8). En d'autres termes, si oui ou non, à de faibles dépolarisations, **un site de libération** est composé d'un RyR couplé à un DHPR et des RyRs voisins recrutés par LCIC.

1^{er} projet : un site de libération implique 1 ou plusieurs RyR à de faibles dépolarisations ?

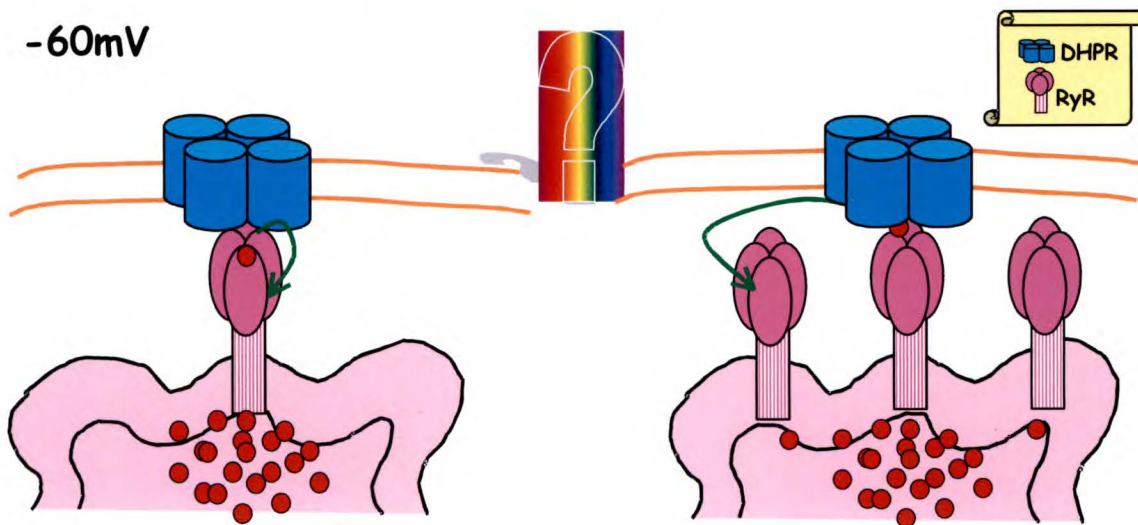


Figure 8. But de la première partie du projet de recherche. Un site de libération du Ca peut être défini soit par un RyR isolé et activé par son senseur de voltage (gauche), soit par un RyR activé par le voltage avec des RyRs voisins recrutés par LCIC (droite). Le but de cette partie était de déterminer si à de faibles dépolarisations, le Ca relâché d'un RyR peut activer des canaux voisins (droite) ou si ce Ca peut activer le RyR dont il provient via un mécanisme d'autorégulation (gauche).

Le but expérimental de ce projet de recherche était d'évaluer l'effet d'une grande concentration du tampon calcique à action rapide, le BAPTA (8 mM) introduit dans le myoplasme d'une fibre musculaire stimulée par de faibles dépolarisations, soit -60 mV, sur la perméabilité à la libération du Ca du RS à différentes $[Ca_{RS}]$. Grâce à son pouvoir tampon, le BAPTA peut diminuer $\Delta[Ca^{2+}]$ libre à l'embouchure d'un canal ouvert. Ainsi, à -60 mV, si le Ca venant d'un RyR couplé à un DHPR peut recruter un RyR voisin non couplé (situé à 30 nm, voir figure 6) par LCIC, alors l'ajout de 8 mM BAPTA devrait diminuer le sommet de la courbe en cloche de la perméabilité en fonction de $[Ca_{RS}]$ (voir figure 4B). Dans ce cas, un site de libération serait constitué d'un RyR activé par son DHPR et d'autres RyRs voisins recrutés par LCIC (figure 8, droite). Si cependant, la LCIC est un mécanisme d'autorégulation selon lequel le Ca libéré par un RyR activé peut lier un site de régulation sur ce même canal (à environ 5 nm de son ouverture, par exemple), et augmenter sa conductance et/ou son temps moyen d'ouverture, alors l'ajout du BAPTA ne devrait pas affecter significativement le sommet de la courbe en cloche. Dans ce cas, si on suppose que le Ca libéré lie un site très près de l'embouchure du RyR, le Ca ne serait pas bien tamponné par un tampon calcique comme le BAPTA, car la distance entre le site de libération et l'embouchure du canal serait trop petite. Ainsi, si le BAPTA n'a pas (ou peu) d'effet sur la perméabilité, cela indiquerait qu'un site de libération du Ca serait composé d'un seul RyR activé par son senseur de voltage, et auto-régulé par le Ca libéré par sa propre embouchure (figure 8, gauche). Le choix de 8 mM BAPTA a été fait à partir de l'équation de la distance que le Ca peut parcourir (λ_{Ca}) dans le myoplasme suite à sa libération, avant d'être capturé par un tampon calcique comme l'EGTA ou le BAPTA (tiré de l'équation B14 de Pape *et al.*, 1995) :

$$\lambda_{Ca} = \sqrt{D_{Ca} / \sqrt{k_1} * [EGTA]_R} \quad (i)$$

où D_{Ca} est le coefficient de diffusion, et k_1 est une constante de vitesse. Selon cette équation (avec les valeurs appropriées pour les différents paramètres, discuté plus en détail dans la discussion du premier projet), en présence d'EGTA seulement, $\lambda_{Ca} = 81$ nm. Cependant, en présence d'une concentration moyenne de BAPTA dans le myoplasme, il est possible de réduire λ_{Ca} à 21.5 nm (après avoir introduit 8 mM BAPTA, la [BAPTA] myoplasmique moyenne était de 6.5 mM, voir résultats du premier projet). Ainsi, l'ajout de 8 mM BAPTA devrait nous permettre de discerner si oui ou non un site de libération comprend les RyRs non couplés voisins, selon que le BAPTA a un effet ou non, respectivement. Une plus grande concentration d'EGTA aurait aussi pu être utilisée. Cependant, afin d'avoir le même λ_{Ca} que 8 mM BAPTA (21.5 nm), il aurait fallu introduire 320 mM d'EGTA! (équation (i)). De plus, comme il sera expliqué dans les résultats, la liaison du Ca au BAPTA possède une constante de vitesse plus rapide que l'EGTA. Les résultats de ce premier projet font l'objet d'une publication dans le "*Journal of Physiology*" (voir ANNEXE 1).

La deuxième partie de mon projet complètent des résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire, portant sur la LCIC à de grandes dépolarisations. Ces résultats sont également publiés dans le "*Journal of Physiology*" (voir ANNEXE 2). Suite aux études effectuées à de faibles dépolarisations, il semblait logique d'investiguer ce qui se passe à de grandes dépolarisations. L'hypothèse était qu'à de grandes dépolarisations, en plus d'activer une plus grande densité de sites de libérations du Ca via leurs DHPRs, de grandes dépolarisations devraient également augmenter l'activation des RyRs, en augmentant la LCIC dépendant du voltage. Afin de tester cette hypothèse, les signaux de

la perméabilité à la libération à -60 mV (faible dépolarisation) ont été comparés aux signaux obtenus à -45 mV (grande dépolarisation), en présence de 8 mM de BAPTA.

Le but expérimental de la deuxième partie de mon projet était de tester si, à de grandes dépolarisations seulement, une composante additionnelle Ca-dépendante est présente à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ physiologiques et que les RyRs sont activés à leur maximum. Selon cette hypothèse, à de grandes dépolarisations, la composante Ca-dépendante additionnelle de la libération du Ca serait due à l'activation par LCIC des RyRs non couplés, en plus des RyRs activés par leurs senseurs de voltage (figure 9).

2^e projet: étudier l'activation Ca^{2+} -dépendante additionnelle présente à de grandes dépolarisations

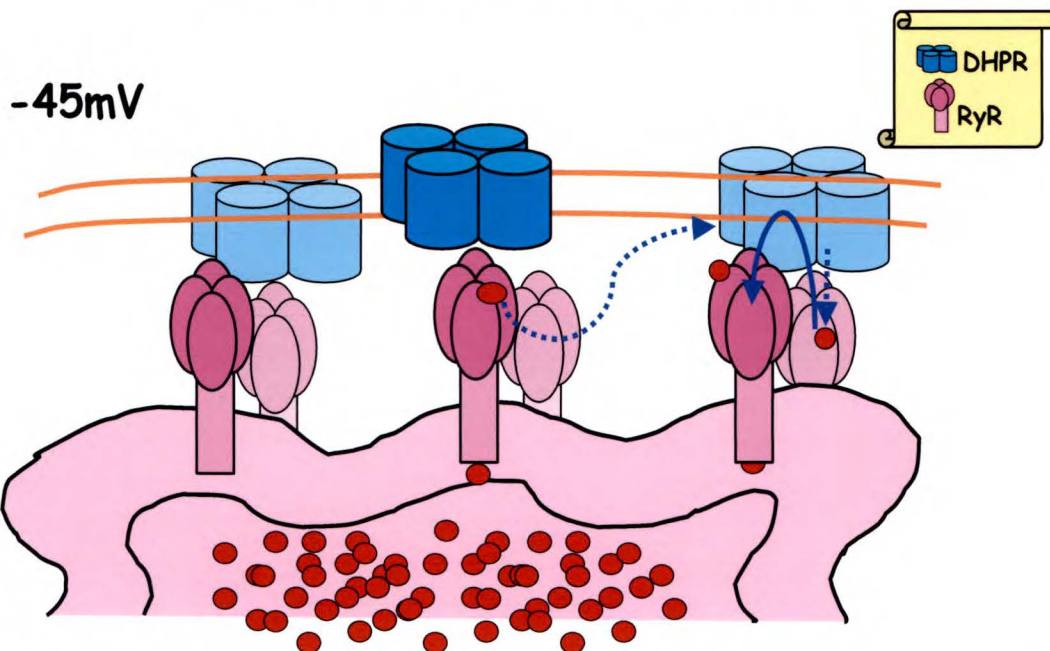


Figure 9. But de la deuxième partie du projet de recherche. Un RyR sur deux est couplé à un DHPR. Le but de cette partie était d'évaluer si à de grandes dépolarisations, il existe une composante additionnelle Ca-dépendante, impliquée dans l'activation de la libération du Ca par le Ca. Cette composante additionnelle ne serait présente qu'à de grandes dépolarisations car la densité de canaux activés par le voltage est plus élevée. Comme le montre la figure, si cette hypothèse est exacte, un RyR non couplé à un DHPR pourrait être recruté par LCIC par le Ca venant de 2 RyRs voisins couplés.

Ainsi, si cette composante additionnelle implique la LCIC, l'ajout de 8 mM BAPTA

devrait diminuer les valeurs de la perméabilité à de grande dépolarisations (-45 mV) sans affecter la perméabilité à de faibles dépolarisations (-60 mV).

Les pulses à -60 mV et à -60 mV ont été choisis en se basant sur les résultats obtenus par Pape et Carrier (2002a). Leur étude visant à comparer la libération de Ca du RS avec la charge Q_γ à l'état stable sur une échelle de voltages de -70 à 10 mV, le RS de leurs fibres musculaires avaient été dépourvues en Ca ($< 250 \mu\text{M}$) afin de réduire considérablement les mécanismes rétroactifs du Ca sur sa libération ainsi que sur la cinétique de Q_γ . Ainsi, leurs résultats représentent la dépendance au voltage de Q_γ et la dépendance au voltage de la perméabilité à la libération du RS. Selon leur figure 5 (figure 10) où les valeurs ont été obtenues à des $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ entre 65 et 55 μM , la perméabilité à la libération est très dépendante au voltage tout comme Q_γ et les valeurs saturent à des valeurs au-dessus de -30 mV. On voit qu'à -60 mV il n'y a pas beaucoup de charges Q_γ qui ont bougé et la perméabilité à la libération n'est pas très élevée mais suffisante pour observer la libération de Ca. A -45 mV cependant, le maximum des charges pouvant bouger est presque atteint et la perméabilité à la libération est aussi environ à son maximum. Afin de tester l'hypothèse du premier projet, il serait préférable d'avoir des conditions expérimentales où un site de libération serait isolé des influences du Ca venant d'un site voisin. Dans ce cas, le choix du pulse à -60 mV semble répondre à cette condition car la faible valeur de Q_γ ainsi que la faible perméabilité à la libération indiquent que peu de DHPRs sont activés en même temps, et donc la probabilité que le Ca libéré par un site puisse affecter un site voisin est faible. Ceci devrait permettre d'évaluer l'implication du mécanisme de LCIC au niveau d'un site de libération de Ca. En ce qui concerne le deuxième projet, afin de tester s'il existe une composante additionnelle

Ca-dépendante présente à de grandes dépolarisations seulement, le pulse à -45 mV semble approprié. En effet, à -45 mV, si une grande densité de canaux sont activés, une grande concentration de Ca libéré pourrait induire une activation de libération supplémentaire en augmentant l'activation et la perméabilité des RyRs, en plus de la grande perméabilité à la libération due uniquement au voltage, observée dans l'expérience de Pape et Carrier (2002a). Si cela est le cas, le BAPTA devrait diminuer la perméabilité à la libération à -45 mV, sans avoir d'effet sur la perméabilité à -60 mV, à de grandes $[Ca_{RS}]$.

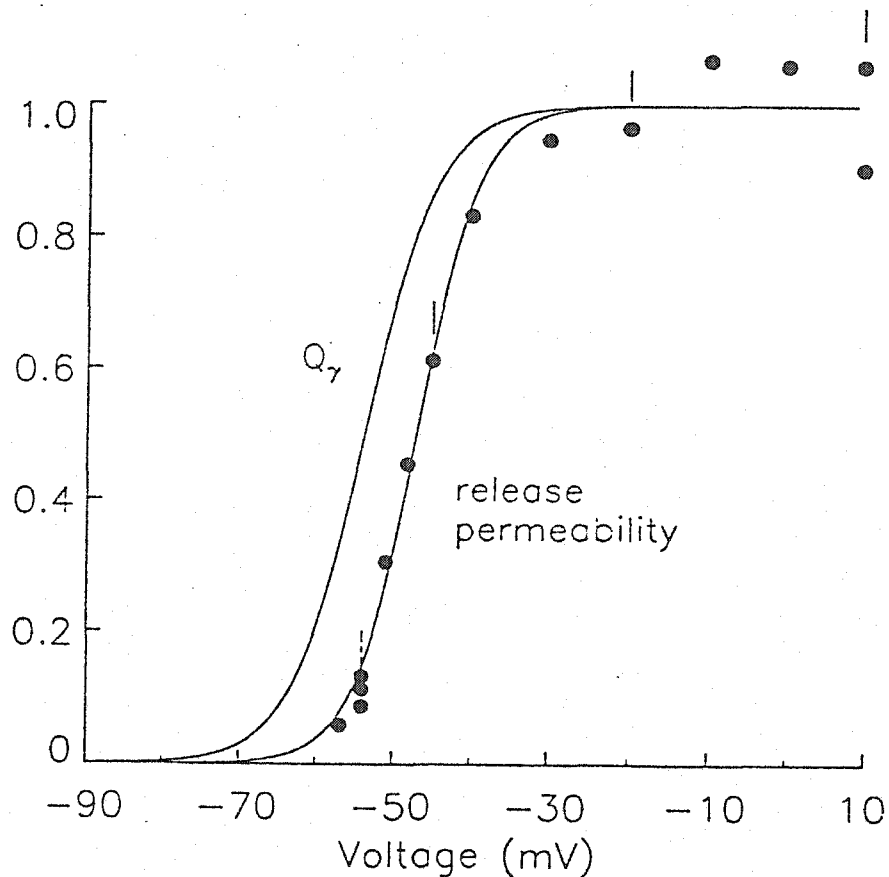


figure 10. Courbes de la perméabilité à la libération et de la charge Q_7 en fonction du voltage. La courbe de gauche représente la fonction de Boltzmann pour les valeurs de Q_7 en fonction du voltage. La courbe de droite représente la fonction de Boltzmann pour les valeurs de perméabilité en fonction du voltage, à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ entre 55 et 65 μM . (Tiré de Pape et Carrier, 2002a)

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 - CHAMBRE EXPÉRIMENTALE ET MONTAGE OPTIQUE

Les procédures expérimentales utilisées dans les deux parties de ce projet sont sensiblement pareilles, c'est-à-dire que la chambre expérimentale, le montage pour l'acquisition des mesures optiques, les solutions internes et externes ainsi que les techniques de mesure du pH et de la libération du Ca du RS sont les mêmes.

Les fibres musculaires utilisées pour les expériences provenaient de muscles à contraction rapide (soit le semi-tendineux, soit l'iléo-fibularis) de la grenouille de la famille *Rana Temporaria*. Les grenouilles étaient adaptées à environ 5 degrés Celsius et gardées à jeun. Les muscles étaient isolés à l'intérieur des 12 minutes suivant la décapitation et la dénervation de la grenouille à l'aide d'un pic introduit dans la colonne vertébrale (selon un protocole approuvé par le Comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke). Ces muscles étaient ensuite gardés dans une solution de Ringers afin d'être utilisés jusqu'à 48 heures après le sacrifice. La dissection des fibres musculaires était effectuée dans un pétri d'agar contenant une solution de Relaxing, pour détendre le muscle. Une fois dans cette solution, les muscles pouvaient être utilisés pendant une période d'environ 3 heures. Un segment de fibre musculaire coupé et manipulé avec soin était ensuite placé dans une chambre expérimentale à double cloison de Vaseline, selon la technique de Hille et Campbell (1976). Ces cloisons de Vaseline servaient à isoler électriquement les compartiments latéraux du compartiment central qui contenaient respectivement les solutions interne et externe (figure 11). Les extrémités de la fibre situées dans les compartiments latéraux étaient perméabilisées par un traitement de 2 minutes avec une solution de 0.01% de saponine, un détergent introduit dans la solution interne (de Cesium-glutamate) permettant la diffusion

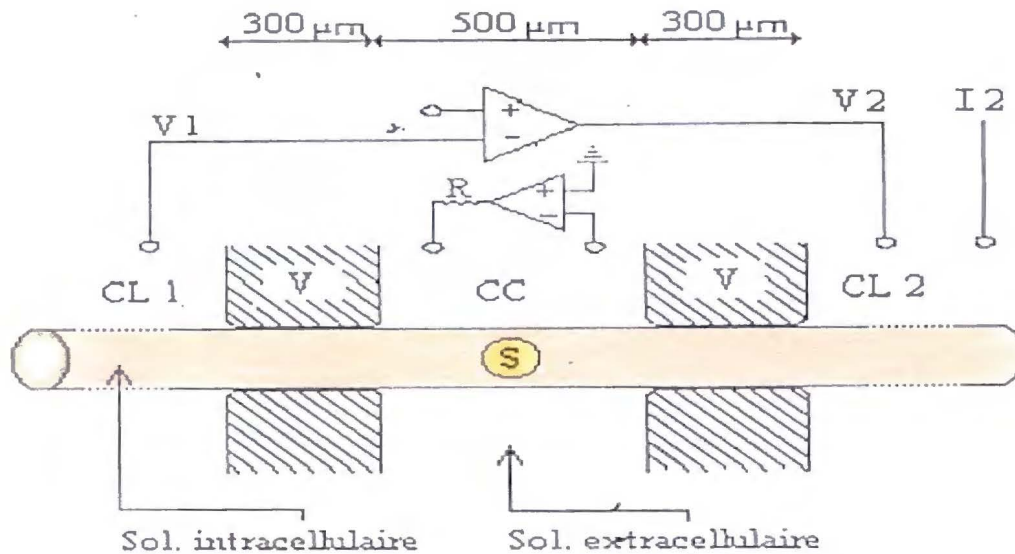


Figure 11. Schéma de la chambre expérimentale à double cloison de Vaseline. Selon la technique de Hille et Campbell (1976), une fibre musculaire est placée dans la chambre expérimentale où les cloisons de vaseline (V) isolent électriquement les compartiments latéraux (CL1 et CL2) du compartiment central (CC). Le voltage en V1 est maintenu au potentiel de commande par le petit courant passant par I2. Le courant est enregistré dans le compartiment central et est déterminé à partir de la chute de potentiel passant par la résistance "R". Les informations concernant la concentration de Ca intracellulaire sont obtenues par l'absorbance d'indicateurs intracellulaires. Cette absorbance est obtenue par trans-illumination de la fibre à l'aide du focus d'un faisceau de lumière ("S" pour "spot"), au milieu de la fibre musculaire.

d'indicateur dans le myoplasme, jusqu'au milieu de la fibre. À la fin du traitement, les compartiments latéraux étaient rincés avec une solution interne sans saponine, et la solution de Relaxing du compartiment central était remplacée avec la solution externe de Tea-Gluconate contenant $1\mu\text{M}$ tetrodotoxine (TTX). L'espace entre chaque sarcomère était de 3.5 à $3.9\ \mu\text{m}$ et la température de la chambre était maintenue entre 14 - 16 degrés Celsius, par une plaque de cuivre refroidie par un système hydraulique muni d'un condensateur et d'un thermostat. Une fois la fibre dans la chambre expérimentale, celle-ci était placée sur un montage en voltage imposé où des connections électriques avec les solutions des compartiments centraux et latéraux étaient assurées par des ponts d'agar et des électrodes en Ag/AgCl. Selon ce montage (figure 11), le courant en I_2 était injecté

dans un des compartiments latéraux (C_2), et mesuré dans le compartiment central (CC) normalement maintenu au potentiel de la terre par le bain clampé. Ceci permettait d'imposer un voltage en V_1 maintenu au potentiel de repos (-90 mV), grâce à un petit courant de maintien injecté en I_2 .

Les mesures optiques étaient obtenues de la façon suivante (figure 12): la chambre expérimentale était placée sur le support d'un microscope inversé (Axiovert-100TV Zeiss, Allemagne). Lorsqu'une mesure optique était commandée par informatique, l'obturateur (OBT) s'ouvrait et un faisceau de lumière blanche circulaire était dirigé vers la fibre. Cette lumière, venant de la lampe tungstène halogène (TH), était déviée par un miroir sphérique (MS), traversait une lentille (L_1) et un filtre de chaleur (FCH). Ensuite, deux miroirs plans servaient à diriger le faisceau vers la fibre musculaire (FM), en passant par le diaphragme (DGM) et par l'objectif à immersion à l'eau. Par la suite, un séparateur de faisceau (SF) et un miroir dichroïque 610 DRLP divisaient le faisceau de lumière en trois, traversant chacun un filtre spécifique ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) pour finalement être focalisé par des lentilles (L_1, L_2, L_3) sur trois cellules photosensibles (ou PD pour photodiodes). Les filtres spécifiques étaient choisis selon leurs longueurs d'ondes pour les mesures optiques. Les cellules photosensibles étaient reliées à un amplificateur et un système de filtration (filtre Bessel) avec une fréquence de coupure de 1kHz. A l'aide de ce système de filtration, les signaux provenant de chaque photodiode pouvaient être amplifiés avant (gain de 1, 10 ou 100) ou après (gain de (1, 2, 5, 10) le filtre. Les signaux électriques étaient ensuite convertis par une carte d'interface IT16-MAC d'un ordinateur McIntosh. L'analyse des signaux était faite par une programmation en IDL écrite dans notre laboratoire.

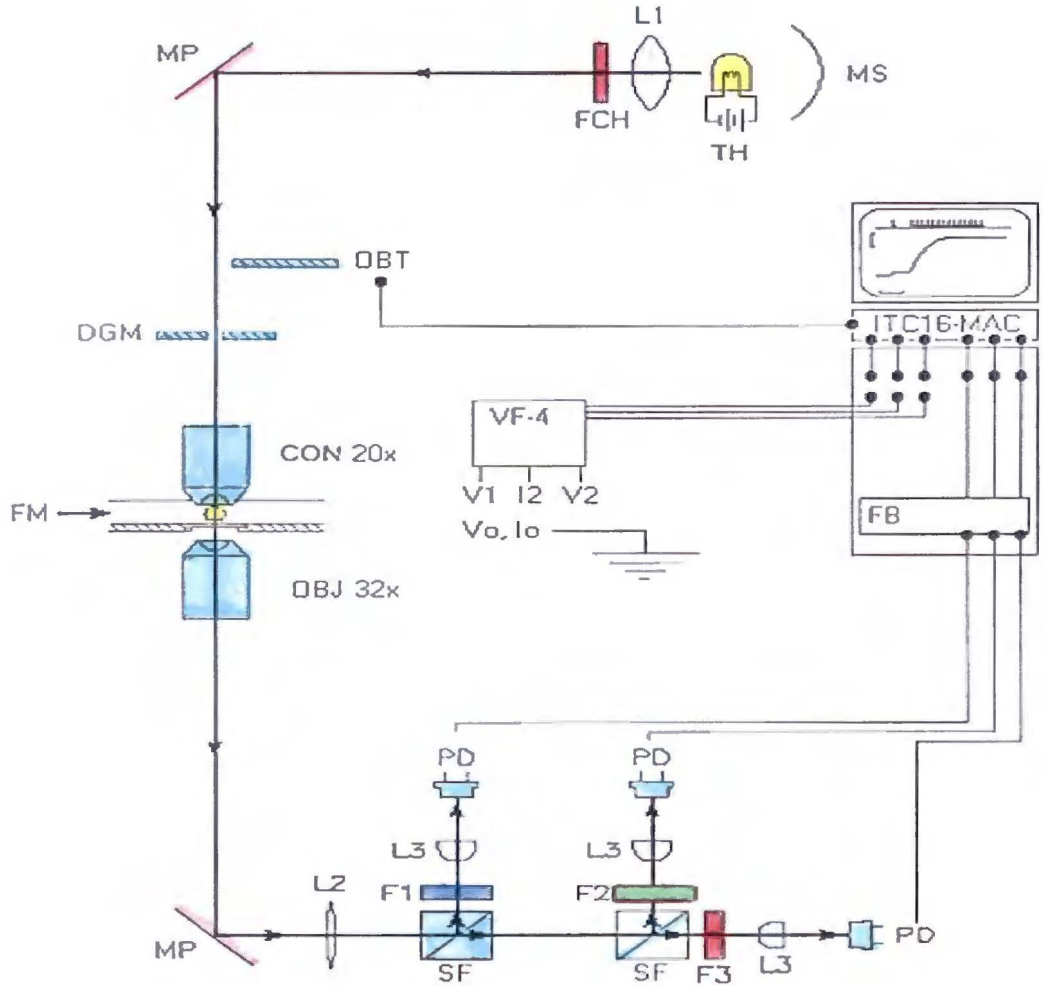


Figure 12. Schéma du montage optique pour l'acquisition des données. MS, miroir sphérique; TH, lampe tungstène halogène 100 W; L1, lentille convergente; FCH, filtre de chaleur; MP, miroir plan; OBT, obturateur contrôlé par ordinateur pour limiter l'exposition de la fibre à la lumière; CON, condensateur à immersion à l'eau 20X avec ouverture numérique de 0.4, servant à faire le focus de la lumière sur la fibre; FM, fibre musculaire dans la chambre expérimentale; OBJ, objectif 32X pour recueillir la lumière venant de la fibre, avec une ouverture numérique de 0.4; MP, miroir plan à l'intérieur du microscope, qui transmet 100% de la lumière de l'objectif vers la lentille 2 (L2); L2, lentille qui permet de transmettre un faisceau de lumière parallèle; SF, séparateur de faisceau de lumière ou miroir dichroïque; F1, F2 et F3, filtres avec 3 longueurs d'ondes sélectionnées pour les mesures optiques; L3, lentille pour le focus de la lumière sur une photodiode (PD); VF-4, bain clampé; FB, amplificateur ("feedback"); ITC16-MAC, ordinateur MacIntosh. (Pour plus de détails concernant la provenance des appareils et accessoires, voir fig.1 de Pape et Carrier, 1998).

2.2 - COMPOSITION DES SOLUTIONS INTERNES ET EXTERNES

Solution interne sans Ca: 45mM Cs₂-glutamate, 20mM EGTA, 6.8mM MgSO₄, 5mM Cs₂-ATP, 20mM Cs₂-créatine phosphate, 5mM Cs₂-phospho(enol)pyruvate, et 5mM 3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid (MOPS).

Solution interne avec Ca : idem, mais avec 1.76mM Ca ([Ca²⁺] libre estimée à 36 nM).

Solution interne sans Ca, avec BAPTA : 8mM 1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), 33mM Cs₂-glutamate, 20mM EGTA, 6.8mM MgSO₄, 5mM Cs₂-ATP, 20mM Cs₂-créatine phosphate, 5mM Cs₂-phospho(enol)pyruvate, et 5mM 3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid (MOPS).

Solution interne avec Ca, avec BAPTA : idem, avec 3.57mM Ca ([Ca²⁺] libre aussi estimée à 36nM).

Le pH des solutions internes était ajusté à pH = 7.0 à la température de la pièce avec du CsOH. La [Mg²⁺] libre était estimée à 1mM.

Solution externe : 110mM TEA-gluconate, 10mM MgSO₄, 10mM MOPS, et 1μM tetrodotoxine (TTX).

La solution externe était ajustée à pH = 7.1 et n'avait pas de Ca.

Ainsi, afin d'introduire 8 mM BAPTA dans le myoplasme d'une fibre musculaire par exemple, il suffisait de remplacer la solution interne initialement présente dans les compartiments latéraux, par une autre solution de même composition mais avec 8 mM BAPTA. Le même procédé s'applique pour enlever ou ajouter du Ca dans le myoplasme (par le biais de la solution interne).

2.3 - MÉTHODE DE L'EGTA ET DU ROUGE DE PHÉNOL

En 1995, W. Knox Chandler et collègues ont suggéré une nouvelle approche pour estimer la libération du Ca du RS nommée la “méthode de l'EGTA et du Rouge de Phénol”. Tout comme d'autres méthodes qui utilisent une grande concentration d'un tampon calcique, la méthode de l'EGTA et du Rouge de Phénol présente plusieurs avantages. Premièrement, le pouvoir tampon de l'EGTA diminue la $[Ca^{2+}]$, ce qui diminue l'activation mécanique responsable des “artifacts” optiques. Deuxièmement, puisque l'EGTA capture essentiellement tout le Ca qui est libéré, l'estimation de la libération du Ca est directe et indépendante des propriétés des autres tampons calciques myoplasmiques intrinsèques tels que la parvalbumine ou la troponine.

Dans toutes les expériences de ce projet de maîtrise, l'EGTA et le Rouge de Phénol avaient une concentration de 20 mM et 1 mM respectivement, dans les solutions internes.

L'EGTA non lié au Ca existe sous cinq états : $EGTA^{4-}$, $HEGTA^{3-}$, H_2EGTA^{2-} , H_3EGTA^- , H_4EGTA . Les fractions de EGTA présentes sous chaque forme $[EGTA^{4-}] / [EGTA]$, $[HEGTA^{3-}] / [EGTA]$, $[H_2EGTA^{2-}] / [EGTA]$, $[H_3EGTA^-] / [EGTA]$, $[H_4EGTA] / [EGTA]$ ont été estimés selon l'échelle de valeurs de pH normalement obtenues au repos ($\cong 6.7-7.1$) et durant une stimulation ($\cong 6.3$) au cours des expériences, à l'aide des valeurs de pK de Martell et Smith (1974). D'après ces calculs, c'est H_2EGTA^{2-} qui était la forme prédominante de EGTA aux valeurs de pH myoplasmiques typiquement retrouvées dans nos fibres musculaires. L'EGTA lié au Ca existe aussi sous différents états: $CaEGTA^{2-}$, $CaHEGTA^-$ et CaH_2EGTA . Suivant les mêmes calculs que ceux pour trouver la forme prédominante de EGTA non-lié, c'est $CaEGTA^{2-}$ qui était la

forme prédominante lorsque l'EGTA est lié, dans nos expériences. Ainsi, comme les 2 formes prédominantes sont divalentes, la réaction à l'équilibre entre le Ca et l'EGTA peut être écrite de la façon suivante :



où le produit intermédiaire qui est formé est CaH₂EGTA, d'après les expériences de "stopped-flow" de Smith *et al.*, 1984. Selon l'équation (1), deux protons se dissocient pour chaque ion Ca²⁺ libéré du RS après une stimulation, d'où une variation de pH myoplasmique. Cette variation de pH induit une variation de la couleur de l'indicateur Rouge de phénol et donc une variation de son absorbance. La vitesse de réaction entre l'EGTA et le Ca a aussi été étudiée (Harafuji et Ogawa, 1980; Smith *et al.* 1984) et les valeurs de k₁ (constantes de vitesse de réaction) obtenues montrent qu'elle est très rapide (1.0-3.0 * 10⁻⁶ M⁻¹ s⁻¹). L'effet de la présence des tampons myoplasmiques (ex.: parvalbumine et troponine) sur la liaison du Ca à l'EGTA a aussi été évalué et les résultats démontrent qu'environ 96% du Ca relâché du RS lie l'EGTA.

Ainsi, avec la méthode de l'EGTA et du Rouge de phénol, si on connaît le pouvoir tampon du myoplasme (β) et la variation de pH myoplasmique (ΔpH), alors la concentration de Ca libéré dans le myoplasme (Δ[Ca_T]) qui correspond à la variation de la concentration de Ca lié à l'EGTA (Δ[CaEGTA]) peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\Delta[\text{Ca}_T] = \Delta[\text{CaEGTA}] = (-\beta/2) \Delta\text{pH} \quad (2)$$

(où β = 22mM/unité de pH, selon Pape *et al.* 1995)

Comme mentionné à l'équation (1), une variation de pH résulte de la liaison du Ca à l'EGTA. Donc, l'estimation du pH est très importante pour l'estimation de Δ[Ca_T].

Cependant, d'autres facteurs peuvent être responsable d'une variation de pH myoplasmique, comme: la libération de protons liés aux tampons myoplasmiques, l'hydrolyse de l'ATP, la rephosphorylation de l'ADP par l'hydrolyse de la phosphocréatine, et les protons libérés par la pompe calcique du RS. Mais comme, selon Pape *et al.* (1990) ces réactions ne semblent pas affecter significativement les signaux de ΔpH , les deux facteurs qui doivent être considérés dans le calcul de ΔpH durant la libération de Ca du RS sont: les protons libérés par la liaison du Ca à l'EGTA, et le mouvement des protons du myoplasme vers l'intérieur du RS pour balancer électriquement les charges des ions Ca libérés (stœchiométrie de 1 Ca^{2+} libéré: 0.2-0.3 H^+ qui entrent à l'intérieur du RS).

2.4 - ESTIMATION DU pH MYOPLASMIQUE PAR ABSORBANCE DU ROUGE DE PHÉNOL

La valeur du pH myoplasmique est estimée par l'absorbance de l'indicateur Rouge de Phénol. L'absorbance à une longueur d'onde donnée (λ), est calculée selon la loi de Beer par : $A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)}CI$, où " ε " est le coefficient d'extinction; " C " est la concentration de l'indicateur; et " I " est la distance parcourue par la lumière (ou le diamètre de la fibre).

Au début de chaque expérience (avant l'ajout du Rouge de Phénol dans la solution interne) le faisceau de lumière du microscope qui passe à travers le milieu de la fibre est divisé et focalisé vers les trois filtres de différentes longueur d'onde (voir λ_1 , λ_2 , λ_3 de la figure 11) où $\lambda_1 = 480_{(\pm 5)}$ nm, la longueur d'onde isobestique (insensible aux variations de pH du Rouge de Phénol); $\lambda_2 = 570_{(\pm 15)}$ nm, la longueur d'onde sensible aux variations de pH; et $\lambda_3 = 690_{(\pm 15)}$ nm, la longueur d'onde à laquelle le Rouge de Phénol n'absorbe pas et reflète donc les propriétés intrinsèques de la fibre. L'intensité de la lumière

incidente pour chaque λ ($I_{i(\lambda)}$) est d'abord mesurée avec la fibre hors du champ, puis l'intensité de la lumière **transmise** ($I_{t(\lambda)}$) est mesurée avec la fibre dans le champ. L'absorbance intrinsèque de la fibre est ensuite mesurée par la formule $\log_{10} [I_{i(\lambda)}/I_{t(\lambda)}]$. L'indicateur est ajouté, et les mesures d'absorbances de la fibre au repos pour les trois longueurs d'ondes sont enregistrées. Ces mesures sont effectuées aux 3 minutes pendant environ une heure, correspondant au temps nécessaire à la diffusion de l'indicateur jusqu'au milieu de la fibre. Finalement, les valeurs d'absorbance sont corrigées en tenant compte de l'absorbance intrinsèque de la fibre et des petites fluctuations dans l'intensité de la lumière de la lampe. L'absorbance ainsi obtenue correspond à l'absorbance reliée à l'indicateur, dénotée $A_{ind(\lambda)}$.

Le Rouge de Phénol existe sous deux formes: protonée (dénotée "p") et non protonée (dénotée "np"), mais c'est la forme non protonée qui est prédominante au repos. Alors, une fois calculée, l'absorbance peut être utilisée pour calculer le pH **au repos** à l'aide de la relation suivante :

$$pH = pK + \log (f/1-f) \quad (3)$$

où $pK = 7.7$ (Lisman et Strong, 1979) et où f est la fraction du Rouge de Phénol sous forme **non-protonée**, calculée comme suit :

$$f = (r-r_{min}) / (r_{max}-r_{min}) \quad (4)$$

$$\text{où } r = A_{ind(570)} / A_{ind(480)}$$

L'absorbance du Rouge de Phénol peut aussi être calculée **durant une stimulation**. Comme il a été mentionné plus haut, le Rouge de Phénol existe sous deux formes. La concentration totale de cet indicateur est donc égale à la somme de ces deux formes présentes dans le myoplasme (p+np). Ainsi, durant une stimulation, la variation

d'absorbance du Rouge de Phénol à deux temps donnés "t1" et "t2" (correspondant à la durée d'une stimulation), et à une longueur d'onde (λ) donnée, est calculée:

$$\Delta A = A_{(\lambda, t2)} - A_{(\lambda, t1)} \text{ où}$$

$$A_{(\lambda, t2)} = \epsilon_{np(\lambda)} * C_{np,t2} * l + \epsilon_{p(\lambda)} * C_{p,t2} * l$$

$$A_{(\lambda, t1)} = \epsilon_{np(\lambda)} * C_{np,t1} * l + \epsilon_{p(\lambda)} * C_{p,t1} * l$$

et après soustraction, on obtient: $\Delta A = \Delta \epsilon * \Delta C * l$ (loi de Beer).

Cette équation suppose que les variables C_{np} et C_p restent invariables étant donné le court laps de temps entre t1 et t2, ne permettant pas une diffusion importante de l'indicateur. Donc la variation de pH durant une stimulation peut aussi être calculée selon la relation donnée par l'équation (3) :

$$\Delta pH = \log [(f_r + \Delta f) / f_r] - \log [(1 - f_r - \Delta f) / 1 - f_r] \quad (5)$$

où f_r est obtenu au repos (voir plus haut), et où $\Delta f = \Delta A_{(570)} / A_{(480)}$.

2.5 - ESTIMATION DE $[Ca_{RS}]$ EN ABSENCE ET EN PRÉSENCE DE BAPTA

Si l'EGTA (20 mM) est le seul tampon calcique introduit dans une fibre musculaire, la concentration totale de Ca libérée du RS dans le myoplasme ($\Delta[Ca_T]$) peut être estimée selon l'équation (2) plus haut :

$$\Delta[Ca_T] = \Delta[CaEGTA] = (-\beta/2) \Delta pH$$

Pour que cette relation soit correcte, il faut supposer que tout le Ca relâché lie l'EGTA. Cependant, dans ce projet de recherche, un autre tampon myoplasmique à haute affinité pour le Ca, le BAPTA, a également été utilisé dans certaines expériences. Ce tampon est un dérivé de l'EGTA où les liens méthylènes entre les atomes d'oxygènes et d'azotes sont remplacés par des hétérocycles benzènes (Tsien, 1980). Le BAPTA est

moins affecté par les variations de pH que l'EGTA. En effet, lors d'une stimulation, alors que 2 protons se dissocient de l'EGTA dû à la liaison du Ca, c'est 0.2 protons qui se dissocient du BAPTA. De plus, l'association et la dissociation du Ca au BAPTA possèdent une cinétique plus rapide celle avec l'EGTA. Alors, en présence du BAPTA, la relation:

$$\Delta[\text{CaEGTA}] = (-\beta/2) \Delta\text{pH}$$

est encore valide, sauf que dans ce cas, $\Delta[\text{Ca}_T]$ est approximativement égal à :

$$\Delta[\text{Ca}_T] = \Delta[\text{CaEGTA}] + \Delta[\text{CaBAPTA}] \quad (6)$$

et le contenu en Ca du RS **au repos**, $[\text{Ca}_{\text{SR}}]_R$, est obtenu par :

$$[\text{Ca}_{\text{SR}}]_R = \Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}} + \Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}} \quad (7)$$

tandis que le contenu en Ca du RS **durant une stimulation**, $[\text{Ca}_{\text{SR}}]$, est obtenu par :

$$[\text{Ca}_{\text{SR}}] = [\text{Ca}_{\text{SR}}]_R - \Delta[\text{Ca}_T] \quad (7a)$$

Ici, $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ correspond à la concentration maximale de Ca lié à l'EGTA en réponse à une stimulation capable de relâcher le maximum du contenu en Ca du RS. $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$ correspond à la concentration de Ca lié au BAPTA correspondante.

2.6 - ESTIMATION DE $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$

C'est à partir des équations à l'équilibre suivantes que $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$ a été estimé :

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_{\text{Dapp,EGTA}} \frac{[\text{CaEGTA}]}{[\text{EGTA}_T] - [\text{CaEGTA}]} = K_{\text{Dapp,BAPTA}} \frac{[\text{CaBAPTA}]}{[\text{BAPTA}_T] - [\text{CaBAPTA}]} \quad (8)$$

$$\text{où } K_{\text{Dapp}} = K_D (1 + 10^{\text{pK1} - \text{pH}} + 10^{\text{pK1} + \text{pK2} - 2\text{pH}}) \quad (9)$$

Mais afin d'obtenir $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$, il fallait d'abord la valeur de $[\text{Ca}^{2+}]_R$ ("R"

pour "repos"). Et en connaissant la valeur de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$, il est possible de calculer $[\text{CaSR}]_{\text{R}}$ à l'aide de l'équation (7) plus haut.

Pour les expériences de la première partie du projet de recherche (dans lesquelles le Ca a été enlevé de la solution interne au cours de l'expérience, pour faire varier $[\text{CaSR}]_{\text{R}}$), $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$ a été obtenu à partir de la procédure itérative suivante:

- 1) Dans l'équation (8), la valeur de $[\text{Ca}^{2+}]$ est égale à 0 pour la première itération (ou pour la valeur obtenue à l'étape 7) ci-dessous).
- 2) Comme les valeurs de $K_{\text{Dapp,EGTA}}$ et de $K_{\text{Dapp,BAPTA}}$ peuvent être calculées avec l'équation (9), et que $[\text{EGTA}_{\text{T}}]$ et de $[\text{BAPTA}_{\text{T}}]$ étaient respectivement 20 mM et 8 mM, on peut obtenir $[\text{CaEGTA}]_{\text{R}}$ et $[\text{CaBAPTA}]_{\text{R}}$ en utilisant l'équation (8).
- 3) Après un pulse dépolarisant, la valeur maximale du signal de libération de calcium donne $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$. Et $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}} = [\text{CaEGTA}] - [\text{CaEGTA}]_{\text{R}}$.
- 4) Ainsi, on obtient : $[\text{CaEGTA}] = \Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}} + [\text{CaEGTA}]_{\text{R}}$.
- 5) $[\text{CaBAPTA}]$ est aussi calculée à partir de cette valeur et de l'équation (8).
- 6) Et $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}} = [\text{CaBAPTA}] - [\text{CaBAPTA}]_{\text{R}}$.
- 7) Finalement on peut calculer $[\text{CaSR}]_{\text{R}} = \Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}} + \Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$, et si une autre itération est nécessaire, la valeur de $[\text{Ca}^{2+}]$ devient égale à cette valeur de $[\text{CaSR}]_{\text{R}}$ dans l'équation (8), et les étapes 1-6 sont répétées.

En général, 2-3 itérations étaient requises pour l'obtention de $[\text{CaSR}]_{\text{R}}$.

Pour les expériences de la deuxième partie du projet de recherche, la procédure pour obtenir $\Delta[\text{CaBAPTA}]_{\text{MAX}}$ à partir de l'équation (8) était différente car le Ca n'a pas été enlevé de la solution interne durant ces expériences. Ainsi, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{R}}$ dans ces expériences a été calculée avec l'équation (8), en supposant que la $[\text{CaEGTA}]_{\text{R}}$ au milieu

de la fibre était égale à la concentration de la solution dans les compartiments latéraux.

2.7 - ESTIMATION DE LA PERMÉABILITÉ À LA LIBÉRATION, EN PRÉSENCE DE EGTA ET BAPTA.

Encore une fois, le but expérimental des 2 projets de recherche était d'évaluer l'effet du BAPTA sur la perméabilité à la libération de Ca du RS vs. $[Ca_{RS}]$ à de faibles dépolarisations (-60 mV) et à de grandes dépolarisations (-45mV), respectivement. Selon Pape et Carrier 1998, la perméabilité à la libération du Ca du RS est égale à:

$$100 * \frac{d\Delta[Ca_T]/dt}{[Ca_{SR}]_R - \Delta[Ca_T]} \quad (10)$$

où $d\Delta[Ca_T]/dt$ est la vitesse de libération du Ca du RS, et $[Ca_{SR}]_R - \Delta[Ca_T]$ est le contenu en Ca du RS durant une stimulation. En absence de BAPTA, il est possible de calculer le $d\Delta[Ca_T]/dt$ et par conséquent, d'obtenir la valeur de la perméabilité. En effet, suite à une faible dépolarisation, une petite quantité de Ca est libérée, et la valeur de la perméabilité à la libération peut être obtenue en calculant l'intégrale (ou l'aire sous la courbe) du signal de la libération du Ca (Pape et Carrier, 1998). Le f_{Ca} est la fraction du contenu en Ca du RS libérée par un pulse dépolarisant. Comme mentionné plus haut, suite à une faible dépolarisation, le RS ne libère qu'une petite partie de son contenu. Dans ce cas, comme le $[Ca_{RS}]$ ne varie pas (ou très peu), alors le f_{Ca} est environ égal à l'intégrale de la perméabilité. Le f_{Ca} est donc une bonne estimation de la perméabilité à la libération ou libération moyenne du RS suite à une dépolarisation, en présence ou en absence du BAPTA.

Cependant, en présence de BAPTA, il n'est pas possible d'obtenir $d\Delta[Ca_T]/dt$ directement car le BAPTA ne libère pas une quantité suffisante de protons à la suite de la

liaison au Ca pour produire un signal (0.2 protons pour le BAPTA vs. 2 protons pour l'EGTA). Une alternative pour évaluer la perméabilité en présence du BAPTA est de calculer le f_{Ca} (la fraction de Ca libérée par un pulse dépolarisant) :

$$f_{Ca} = \frac{\Delta[Ca_T]}{[Ca_{RS}]} \quad (11)$$

Le $\Delta[Ca_T]$ est la quantité de Ca libéré par un pulse et $[Ca_{RS}]$ est le contenu en Ca du RS durant une stimulation.

En présence du BAPTA, l'équation (11) devient :

$$f_{Ca} = \frac{\Delta[CaEGTA] + \Delta[CaBAPTA]}{\Delta[CaEGTA]_{MAX} + \Delta[CaBAPTA]_{MAX}} \quad (12)$$

En fait, $\Delta[Ca_T] = \Delta[CaEGTA] + \Delta[CaBAPTA] + \Delta[Ca^{2+}]$, mais le dernier terme est négligeable car $[Ca^{2+}]$ libre est inférieur aux K_{DS} de BAPTA et de EGTA, alors l'équation devient :

$$f_{Ca} = \frac{\Delta[Ca_T]_{après} - \Delta[Ca_T]_{avant}}{[Ca_{RS}]_R - \Delta[Ca_T]_{avant}} \quad (13)$$

où les indices "avant" et "après" signifient avant et après le pulse dépolarisant, respectivement. Le numérateur correspond au Ca total libéré par le pulse et le dénominateur correspond à la concentration de Ca présente dans le RS. Le f_{Ca} est donc un paramètre relié au degré d'activation des RyR durant un pulse. Enfin, comme le terme $\Delta[CaBAPTA]$ n'est pas mesuré, en présence de BAPTA le f_{Ca} est estimé comme suit :

$$f_{Ca} \approx \frac{\Delta[CaEGTA]_{après} - \Delta[CaEGTA]_{avant}}{\Delta[CaEGTA]_{MAX} - \Delta[CaEGTA]_{avant}} \quad (14)$$

ce qui correspond à la même relation utilisée pour estimer le f_{Ca} en absence de BAPTA (voir équation (13)). Finalement, si on utilise la procédure pour estimer $\Delta[CaBAPTA]$ plus haut (voir équation (8)) afin d'obtenir $\Delta[Ca_T]$ (avec l'équation (6)), les valeurs de

f_{Ca} obtenues à partir des équations (13) et (14) sont sensiblement les mêmes. Ceci confirme donc que l'équation (14) représente une bonne estimation de f_{Ca} lorsque BAPTA est présent, et c'est donc cette équation qui a été utilisée pour exprimer f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$, en présence et en absence de BAPTA.

2.8 - LIBÉRATION DE PROTONS LORS DE LA LIAISON DU Ca AU BAPTA.

Comme mentionné plus haut, la liaison d'un ion Ca^{2+} au BAPTA libère 0.2 protons. Ceci implique qu'une petite partie du signal de ΔpH est due à cette réaction. Afin d'évaluer l'erreur dans l'estimation du f_{Ca} reliée à cette réaction, la première étape était d'estimer $[Ca^{2+}]$ avant et après le pulse et aussi, après que tout le Ca ait été libéré, en utilisant l'équation (8). Le terme $K_{Dapp,EGTA}$ de l'équation (8) est sensible aux variations de pH et a donc aussi été calculé avant et après le pulse ainsi qu'après que tout le Ca ait été relâché, et ce, à partir de toutes les valeurs de pH, c'est-à-dire à partir de $pH + \Delta pH$. Les valeurs de $[Ca^{2+}]$, $\Delta[CaEGTA]$ et $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ étant obtenues, les valeurs de $\Delta[CaBAPTA]$ et $\Delta[CaBAPTA]_{MAX}$ ont pu être calculées afin d'estimer le f_{Ca} à l'aide de l'équation (12). L'erreur dans l'estimation du f_{Ca} relié à cette réaction a ensuite été calculée en soustrayant cette valeur calculée de f_{Ca} , du f_{Ca} obtenu à partir du signal de $\Delta[CaEGTA]$ seulement (voir équation (14)). La deuxième étape pour l'évaluation de cette erreur était de soustraire le signal de ΔpH dû à la dissociation des protons du BAPTA ($\Delta pH_{BAPTA} = -0.2 * \Delta[CaBAPTA]/\beta$) du signal de ΔpH mesuré ($\Delta pH_{mesuré}$). Le ΔpH résultant correspondait au ΔpH dû à libération des protons de EGTA seulement (ΔpH_{EGTA}). Ce ΔpH_{EGTA} a ensuite été utilisé pour calculer le $\Delta[CaEGTA]$ selon l'équation (2), et une fois cette valeur de $\Delta[CaEGTA]$ corrigée en tenant compte du pH

dans l'équation (8), une autre valeur de $[Ca^{2+}]$ était obtenue. Ainsi, plusieurs itérations pour l'obtention d'une valeur de $\Delta[CaBAPTA]$ avec des estimations de $\Delta[CaEGTA]$ corrigées ont été effectuées. Finalement, les valeurs de $K_{Dapp,EGTA}$ basées sur les valeurs de $\Delta pH_{mesuré}$ (et non sur le ΔpH_{EGTA}) ont été obtenues, car l'important était la valeur et non la source de ΔpH . Et les valeurs de $\Delta[CaBAPTA]$ et de $\Delta[CaEGTA]$ ont été utilisées pour calculer l'erreur en faisant la différence entre les valeurs de f_{Ca} obtenues avec les équations (12) et (14). Cette erreur (seulement présente dans les expériences avec BAPTA) a donné en moyenne une surestimation du f_{Ca} actuel d'environ 2.4%. Cette petite surestimation s'explique par le fait que le BAPTA est moins sensible aux variations de pH comparativement à l'EGTA, mais aussi parce que le numérateur et le dénominateur de l'équation (12) sont diminués par sensiblement le même facteur. Enfin, cette erreur, et d'autres erreurs concernant l'estimation du f_{Ca} en présence du BAPTA sont expliquées plus en détail dans l'article de Fénelon et Pape (2002; ANNEXE 1). Mais la conclusion générale est que malgré la présence de ces erreurs dans l'estimation du f_{Ca} des expériences avec le BAPTA, le f_{Ca} obtenu devrait être une bonne estimation du f_{Ca} actuel .

2.9 - MESURE DES PARAMÈTRES ÉLECTRIQUES

Afin d'annuler toute différence de potentiel possible entre les électrodes, un pont d'agar de 3 mM KCl était placé entre le V_1 (figure 11) et son électrode associée dans le compartiment central (Irving *et al.* 1987). Au début et à la fin de chaque expérience, la différence de potentiel était mesurée, et la différence entre ces deux mesures était, en général, inférieure à 2 mV.

La quantité de charges ayant bougé durant un pulse (Q_{cm}) a été mesurée en faisant l'intégrale du courant "OFF" du mouvement de charges intramembranaires. Ce signal ayant lui-même été obtenu en soustrayant les petites composantes ioniques des signaux $I_{test} - I_{contrôle}$ (Hui et Chandler, 1990; Jong *et al.*, 1995). Les paramètres tels que: le courant de maintien ("holding potentiel", hP), la capacitance apparente de la fibre (C_{app}), la capacitance de surface et du système-t par unité de longueur de la fibre (c_m), et la résistance interne longitudinale par unité de longueur de la fibre (r_i), ont aussi été monitorés durant les expériences (voir Chandler et Hui, 1990 pour plus de détails concernant ces paramètres). Ces paramètres sont en général restés constants tout au long des expériences.

2.10 - STATISTIQUES

Les résultats ont été considérés comme étant significativement différents si le paramètre " p " du Student's two-tailed t-test était inférieur à 0.05.

3 - RÉSULTATS

Premier projet

3.1 - INTRODUCTION

À de faibles dépolarisations, la libération de Ca du RS devrait être la somme du Ca libéré par plusieurs sites de libération de Ca isolés. Chaque site devrait contenir au moins un RyR activé par son senseur de voltage. Le but du premier projet de mon travail de maîtrise était d'évaluer si un site pouvait aussi inclure des RyRs voisins activés par LCIC. Pour se faire, l'effet de 8 mM BAPTA sur la relation du f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ a été étudié.

3.2 - PROTOCOLE DE STIMULATION ET SIGNAL DE $\Delta[CaEGTA]$

La première trace de la figure 13A illustre le protocole de stimulation utilisé dans toutes les expériences de cette étude. Il consistait en des pulses dépolarisants de -70, -65, -60, -45, -20 mV. Ces pulses avaient des durées de 400, 400, 400, 800, 400 ou 1200 ms respectivement, séparés par des pulses repolarisants de 600 ms à -90 mV. Les trois premiers pulses servaient à suivre la linéarité entre le voltage et la libération de Ca, à de faibles dépolarisations. Cette linéarité est restée constante durant et pour toutes les expériences de cette étude. Les deux derniers pulses à -45 et -20 mV servaient non seulement à suivre les mouvements de charges intramembranaires, mais aussi à vider le RS de son contenu en Ca. La paire de traces suivantes montre les signaux de $\Delta[CaEGTA]$ correspondants. Le plus grand signal de $\Delta[CaEGTA]$ (correspondant au protocole avec le pulse à -20 mV le plus court) a été obtenu en absence de 8 mM BAPTA. Sans BAPTA, le maximum de cette trace est une bonne estimation du contenu en Ca du RS avant la stimulation, dénoté $[Ca_{RS}]_R$ ("R" pour "repos").

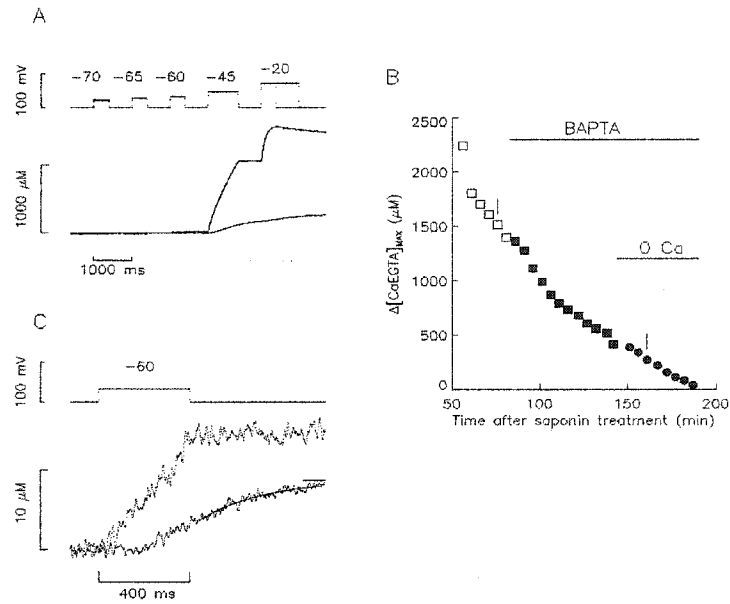


Figure 13. Effet du BAPTA sur $\Delta[\text{CaEGTA}]$ et $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps durant l'expérience. A) La première trace montre le protocole de stimulation. En ordre, des pulses de -70, -65, -60, -45 et -20 mV ayant des durées de 400, 400, 400, 800 et 400 ou 1200 ms, respectivement. Le pulse de -90 mV après le pulse de -60 mV avait une durée de 600 ms. Les traces suivantes sont les traces de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ correspondantes (le signal le plus haut correspondant au pulse avec le pulse de -20 mV le plus court). B) Graphique de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps durant l'expérience après le traitement à la saponine qui perméabilise les extrémités de la fibre dans les compartiments latéraux. Le Rouge de Phénol a été introduit dans le myoplasme 12 minutes après le traitement. Chaque symbole représente une stimulation durant l'expérience, effectuée à 5 minutes d'intervalle. Les carrés blancs représentent des stimulations effectuées en présence de la solution interne initiale contenant du Ca mais pas de BAPTA. La solution a ensuite été remplacée après 84 minutes par une solution avec Ca et 8 mM BAPTA, représenté par les carrés noirs. Finalement, après 145 minutes, le Ca a été enlevé de la solution interne, comme le montrent les cercles noirs (avec le BAPTA toujours présent). C) Le pulse à -60 mV et le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ du panneau A) représentés sur une plus grande échelle.

Le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ le plus petit correspond au signal obtenu 77 minutes après l'ajout de 8 mM BAPTA. En présence de BAPTA, le maximum de cette trace est $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$, car cela représente la quantité maximale de Ca lié à l'EGTA. Le pulse qui nous intéresse est celui à -60 mV. Dans la moitié des expériences, le pulse à -60 mV était en tête, tandis que dans l'autre moitié des expériences, ce pulse était le troisième.

Cependant, l'ordre des pulses n'a pas influencé les résultats.

La figure 13B montre un graphique de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps de l'expérience. Les carrés blancs représentent les stimulations en condition contrôle, c'est-à-dire, en présence d'EGTA seulement dans la solution interne. Les carrés noirs représentent les stimulations en présence de 8 mM BAPTA et les cercles noirs représentent des stimulations avec BAPTA, mais en absence de Ca. Les petits segments verticaux au-dessus du carré blanc et du cercle noir marquent les stimulations à partir desquelles les traces du panneau précédent ont été obtenues. Les stimulations étaient effectuées toutes les 5 minutes. Le graphique montre une diminution progressive de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ avant l'ajout de BAPTA. Cette diminution progressive était plus grande que celle typiquement observée dans des expériences similaires (Pape et Carrier, 1998) effectuées auparavant dans le laboratoire, effet attribué à une valeur de pH au repos plus élevée d'environ 0.1-0.2 unités de pH au site d'enregistrement optique. Une valeur de pH plus élevée réduit la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre myoplasmique au repos établie par l'équilibre pH-sensible entre le Ca et l'EGTA (Pape *et al.* 1995). Par contre, cette diminution progressive de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ était avantageuse car le but de ces expériences était de faire varier $[\text{Ca}_{\text{RS}}]_{\text{R}}$ ce qui correspond à varier $[\text{Ca}^{2+}]$ libre à l'embouchure d'un canal ouvert. Le graphique montre aussi que l'ajout de BAPTA a augmenté la vitesse de la diminution progressive de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$, ce qui concorde bien avec le pouvoir tampon de ce chélateur qui lie rapidement le Ca libéré. Une fois le Ca enlevé de la solution interne, $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ tendait vers zéro.

La figure 13C, montre à plus grande échelle, les mêmes traces de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ en fonction du temps pour le pulse à -60 mV. La plus grande trace est celle de $\Delta[\text{CaEGTA}]$

avant l'ajout de BAPTA. L'apparence en forme de rampe de ce signal était due à l'activation rapide des RyRs après le début du pulse, et la fin rapide de la libération de Ca à la fin du pulse. Le plus petit signal est celui obtenu en présence de BAPTA. La forme de ce signal ne correspondait plus à celle en forme de rampe, mais indiquait bien que le BAPTA avait diffusé dans la fibre. En effet, lorsque le Ca est libéré, le BAPTA tamponne presque tout le Ca très rapidement, due à la rapidité de la réaction entre le Ca et le BAPTA. À la fin du pulse, le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ a lentement continué à augmenter et de façon mono-exponentielle, avec une constante de temps (286 ms) correspondant à la redistribution du Ca allant du BAPTA à l'EGTA. La fin de cette redistribution correspondait au moment où un équilibre entre le BAPTA et l'EGTA avec le Ca dans le myoplasme était atteint. Comme mentionné plus haut, le but de cette partie de mon projet de recherche était d'estimer le f_{Ca} , c'est-à-dire, la fraction du contenu en Ca du RS libéré par le pulse à -60 mV. Le f_{Ca} a été estimé à l'aide des signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ et de l'équation (14). Pour cette estimation, les valeurs de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ choisies (c'est-à-dire $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{avant}}$, $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{après}}$ et $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$) étaient celles à l'équilibre. Par exemple, le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{après}}$ a été estimé durant l'intervalle des points entre 500 et 600 ms après la fin de la stimulation.

3.3 - f_{Ca} vs. $[\text{Ca}_{RS}]$ À -60 mV EN CONDITION CONTRÔLE

La figure 14A montre un pulse à -60 mV et deux signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ d'une expérience contrôle. Les expériences en condition contrôle ont été effectuées de la même façon que celles avec BAPTA, en faisant un rinçage avec la solution initiale au moment où le BAPTA aurait autrement été introduit.

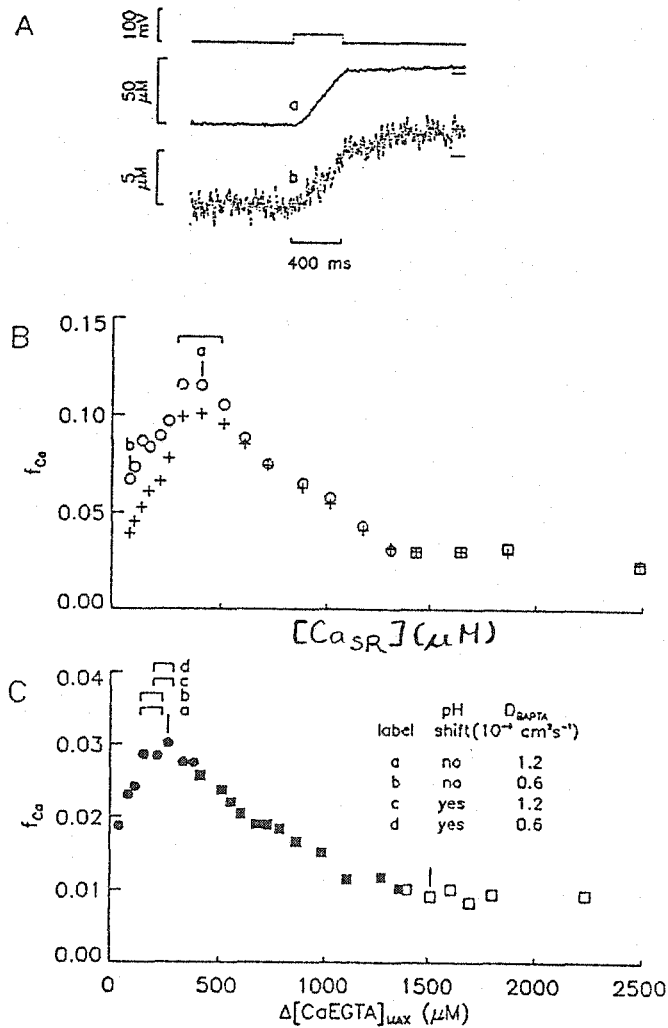


Figure 14. Fin de la libération du Ca à de petites $[Ca_{RS}]$, et f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$. A) La première trace est le pulse dépolarisant à -60 mV d'une expérience en condition contrôle. Les traces identifiées "a" et "b" sont les signaux de $\Delta[CaEGTA]$ correspondants obtenus lorsque la $[Ca_{RS}]$ était respectivement de 409 et 82 μM . B) Graphique de f_{Ca} à -60 mV en fonction de $[Ca_{RS}]$, pour la même expérience qu'en A). Les courbes en cloche avec les symboles de "+" et de carrés/cercles blancs ont été obtenues à partir des valeurs de $\Delta[CaEGTA]_{après}$ déterminées respectivement juste après la fin du pulse à -60 mV (petits segments inférieurs sous les traces du panneau A) et 900-1000 ms après le pulse (segments supérieurs). Les carrés représentent des stimulations en présence de Ca et les cercles blancs, en absence de Ca dans la solution interne. Les stimulations identifiées "a" et "b" correspondent aux traces en A. L'échelle des valeurs au-dessus des courbes délimite les valeurs de $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM . C) Graphique de f_{Ca} à -60 mV en fonction de $[CaEGTA]_{MAX}$ pour l'expérience en présence de BAPTA de la figure 13. Les symboles noirs et blancs représentent respectivement des conditions expérimentales avec et sans BAPTA, et les carrés et cercles, avec et sans Ca respectivement dans la solution interne. Les deux traits verticaux marquent les stimulations illustrées dans les panneaux A et C de la figure 13. Les échelles de valeurs au-dessus des courbes délimitent les valeurs de $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM .

Dans cette expérience, un signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ correspond au Ca libéré par un pulse dans le myoplasme ($\Delta[\text{Ca}_T]$), et le maximum de ce signal correspond au contenu en Ca du RS au repos ($[\text{Ca}_{\text{RS}}]_{\text{R}}$). Afin de calculer le f_{Ca} avec l'équation (14), le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{après}}$ a été déterminé à partir des 5 millisecondes après la fin du pulse à -60 mV, indiqué par le petit segment horizontal sous les traces de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ de ce panneau. Cette approche a été utilisée afin de comparer ces résultats avec ceux de la perméabilité à la libération en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ de Pape et Carrier (1998), comme ces deux approches reflètent la libération du Ca durant le pulse. La courbe en forme de cloche représentée par les symboles " + " de la figure 14B résulte de cette approche. Comme mentionné plus haut, dans cette expérience, le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ correspond à $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ avant le pulse à -60 mV, premièrement parce que le BAPTA n'a jamais été introduit, et deuxièmement, comme le premier pulse était celui à -60 mV, le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{avant}}$ était égal à zéro. Les principales caractéristiques de cette courbe sont :

- 1) une augmentation du f_{Ca} lorsque la $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ augmente de <100 à environ 300 μM , 2) un sommet lorsque la $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ est d'environ 300 μM , 3) une grande diminution du f_{Ca} lorsque la $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ augmente jusqu'à environ 1 300 μM , et 4) une "région plateau" du f_{Ca} pour des valeurs de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ entre 1 300 et 2 500 μM . Ces caractéristiques et leurs proportions relatives sont similaires à celles du graphique de la perméabilité à la libération en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ de Pape et Carrier (1998). Selon eux, la montée initiale du sommet avec l'augmentation de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ est due à LCIC, et la descente subséquente est due à l'inactivation de la libération du Ca par le Ca.

Afin de pouvoir comparer les expériences en condition contrôle avec celles en présence de BAPTA, la $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{après}}$ a également été déterminée à partir des 100

dernières millisecondes de la période de repolarisation à -90 mV suivant le pulse à -60 mV. Les petits segments au-dessus de la fin des signaux de $\Delta[Ca_T]$ de la figure 14A indiquent les valeurs ainsi obtenues pour la même expérience (le segment est plus difficile à discerner pour la trace a)). La courbe en cloche du f_{Ca} représentée avec les carrés et les cercles blancs de la figure en B montre les résultats obtenus selon cette deuxième approche pour toutes les stimulations. Cette 2^e courbe en cloche est similaire à la précédente sauf que les valeurs de f_{Ca} pour les petites $[Ca_{RS}]$ de cette courbe n'extrapolent pas à zéro. Ceci peut être expliqué en comparant les signaux de $\Delta[Ca_T]$ du panneau A pour le pulse à -60 mV. La trace a) correspond à une stimulation pour laquelle le f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ est près du maximum de la courbe en cloche, comme l'indique le point "a" du panneau B). A la fin du pulse à -60 mV, une toute petite quantité de Ca a été libérée durant la repolarisation à -90 mV comme l'indique le tournant abrupte, suivi d'un plateau, typiquement observé dans les expériences en condition contrôle lorsque la $[Ca_{RS}]$ est près du sommet de la relation du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$. Cependant, pour les stimulations à des $[Ca_{RS}] < 300 \mu M$, une grande quantité de Ca a été relâchée même après la fin du pulse à -60 mV, comme le montre la trace b) du panneau A. En effet, le signal de $\Delta[Ca_{EGTA}]$ de la trace b) continue à augmenter durant la période de repolarisation à -90 mV. Mais comme le but de cette première partie du projet de recherche était d'évaluer les effets du BAPTA sur le f_{Ca} lorsque $[Ca_{RS}]$ était entre 300 et 500 μM , c'est-à-dire au sommet de la courbe en cloche, cette contribution de la libération de Ca après le pulse (environ 10%) n'était pas considérable dans cette échelle de valeurs pour les expériences en condition contrôle ainsi que dans les expériences avec BAPTA. Ayant évalué le f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ en condition contrôle, la section suivante portera sur le f_{Ca} en

présence du BAPTA.

3.4 - f_{Ca} vs. $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ À -60 mV EN PRÉSENCE DE 8 mM BAPTA

La figure 14C représente un graphique de f_{Ca} en fonction de $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ à -60 mV, pour toutes les stimulations de l'expérience avec BAPTA de la figure précédente. Il faut se rappeler que le but de ces expériences était d'évaluer les effets du BAPTA à -60 mV sur la courbe en cloche du f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$. Cependant, en présence du BAPTA, les signaux calciques obtenus sont des signaux de $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ et non $[Ca_{RS}]_R$. Les petites lignes verticales indiquent les stimulations à partir desquelles les signaux des panneaux A et C de la figure 13 ont été obtenus. La forme de la courbe en cloche de ce panneau est similaire à celle obtenue en B en condition contrôle selon les mêmes critères (courbe avec carrés et cercles blancs du panneau B), avec un sommet à de petites valeurs de $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$. Encore une fois, sous ces conditions expérimentales (avec BAPTA), les valeurs en abscisse représentent celles de $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$ et non celles de $[Ca_{RS}]_R$ comme en condition contrôle (panneau B). Ainsi, afin de comparer l'effet du BAPTA sur la relation entre le f_{Ca} et $[Ca_{RS}]$, il fallait estimer la $[Ca_{RS}]_R$ en présence du BAPTA d'abord, en utilisant la méthode énoncée aux pages 40 et 41 et ensuite, en tenant compte du pH myoplasmique et de la constante de diffusion du BAPTA (D_{BAPTA}). Les deux sections suivantes porteront sur ces deux dernières conditions, nécessaires à l'évaluation de $[Ca_{RS}]$.

3.5 - L'ESTIMATION DE $[Ca_{RS}]$ DÉPEND DU pH

Ce sont les relations à l'équilibre du Ca avec l'EGTA et le BAPTA qui ont été utilisées pour estimer $[Ca_{RS}]$. Ces deux relations sont pH-dépendantes à cause de la

sensibilité au pH de leurs K_{DS} . Bien que le Rouge de Phénol monitore bien les variations de pH (ΔpH), les valeurs de pH absolues obtenues sont trop acides de 0.1-0.4 unités, dues à une variation du pK du Rouge de Phénol dans le myoplasme (Pape, 1990). Afin d'évaluer cette incertitude du pH, l'estimation de $[Ca_{RS}]$ a été effectuée avec les valeurs de pH enregistrées avec le Rouge de Phénol, ainsi qu'avec 0.2 unités de pH ajoutées à ces valeurs. L'estimation de $[Ca_{RS}]$ dépend du temps après l'addition du BAPTA dans la solution interne mais aussi de $[BAPTA_T]$ au site optique d'enregistrement, estimée à l'aide de l'équation de diffusion (p.47 de Maylie *et al.*, 1987), en supposant que le BAPTA n'est ni lié à des sites myoplasmiques, ni séquestré:

$$\frac{C}{C_1} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp\left[\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4(R+1)L^2}\right]$$

où C et C_1 sont les concentrations totales de l'indicateur au centre de la fibre au temps $t = 0$ et $t = \infty$, respectivement; D est la "vraie" constante de diffusion de l'indicateur; R est le ratio de la concentration d'indicateur lié sur la concentration d'indicateur libre; et L est la distance parcourue par l'indicateur, lors de sa diffusion.

3.6 - L'ESTIMATION DE $[Ca_{RS}]$ DÉPEND DU D_{BAPTA}

L'estimation de la $[BAPTA_T]$ (et donc de $[Ca_{RS}]_R$, voir équation (7)) au site d'enregistrement dépend aussi de la constante de diffusion du BAPTA (D_{BAPTA}) qui a un poids moléculaire de 472. Les valeurs $0.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ et $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ont été choisies comme étant les limites inférieures et supérieures des valeurs possibles pour D_{BAPTA} , respectivement. La plus grande valeur a été sélectionnée en se basant sur la constante de diffusion de l'indicateur purpurate-3,3' diacetic acid (PDAA, poids moléculaire = 380)

égale à $1.31 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ dans les fibres musculaires de Hirota (1989), et aussi sur la constante de diffusion de l'ATP (poids moléculaire = 507) égale à $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Kushmerick et Podolsky, 1969). Contrairement à de nombreux indicateurs, seulement une petite fraction de PDAA est lié ou séquestré dans le myoplasme.

La plus petite valeur de D_{BAPTA} a été estimée à partir de la constante de diffusion du fura-2 (poids moléculaire = 637) égale à $0.54 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Pape *et al.* 1993). Comme le fura-2 ne semble pas être ni lié ni séquestré de façon significative (environ 27% seulement) dans le myoplasme, et comme cette constante a été calculée en tenant compte de ces facteurs, la lenteur de $D_{\text{Fura-2}}$ reste nébuleuse.

En résumé, sachant que l'extrapolation de la constante de diffusion entre 2 substances de poids moléculaire différent est proportionnelle au poids moléculaire, à la puissance ($^{-1/3}$), et qu'une grande partie de la structure moléculaire du Fura-2 est similaire à celle du BAPTA, les deux valeurs de D_{BAPTA} de $0.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ et $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ choisies semblaient raisonnables. Ainsi, l'estimation de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ a été menée avec chacune de ces deux valeurs. Les résultats du f_{Ca} en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ avec ces valeurs seront illustrés à la figure 15, et commentés plus en détail dans la discussion.

3.7 - TEST DE RÉVERSIBILITÉ

Pour s'assurer que les variations du f_{Ca} en fonction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ n'étaient pas dues à des effets à long terme ou inattendus du BAPTA, des tests de réversibilité ont été effectués. En général, le temps entre les stimulations était de 5 minutes, pour permettre au Ca libéré d'être repompé à l'intérieur du RS. Afin d'imiter la diminution de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ à long terme par diffusion du Ca hors de la fibre, le temps entre deux stimulations a été diminué.

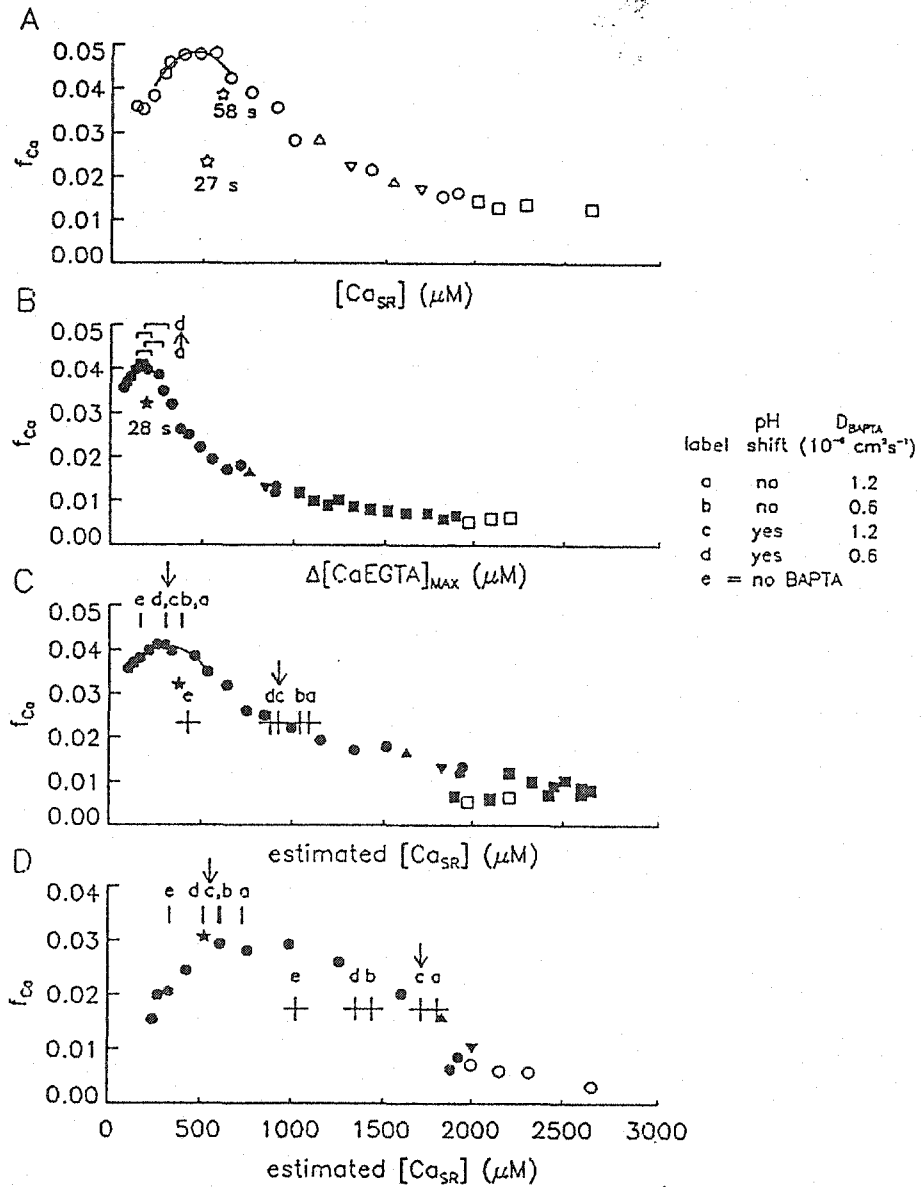


Figure 15. Graphiques de f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ d'une expérience en condition contrôle et d'une expérience avec BAPTA, et test de réversibilité. Les symboles noirs et blancs représentent des stimulations avec et sans BAPTA respectivement, et les carrés et cercles ont été obtenus avec et sans Ca respectivement dans les compartiments latéraux. Les triangles inversés, étoiles et triangles illustrent des tests de réversibilité, tous effectués sans Ca dans la solution interne (voir texte). A) Graphique de f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ dans une expérience en condition contrôle. B) Graphique de f_{Ca} en fonction de $[CaEGTA]_{MAX}$ dans une expérience avec BAPTA. Les échelles de valeurs indiquent des $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM . C) Graphique pareil à celui en B, mais en fonction de $[Ca_{RS}]$ estimée. Les croix et les petits segments verticaux indiquent les valeurs de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ et de $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ respectivement. Dans tous les cas, la plus grande $[Ca_{RS}]$ a été obtenue sans correction de pH, et avec $D_{BAPTA} = 1.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. La plus petite valeur de $[Ca_{RS}]$ a été obtenue avec une correction de 0.2 unités de pH et avec $D_{BAPTA} = 0.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. D) Graphique pareil à celui en C, f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ estimée, dans une expérience avec BAPTA et où le Ca a été retiré des compartiments latéraux tôt, au début de l'expérience. Les symboles identifiés de la lettre "e" correspondent à $[Ca_{RS}]$ estimée en absence de BAPTA.

Dans les quatre panneaux de la figure 15, les triangles à l'envers, les étoiles, et les triangles représentent respectivement une stimulation précédant une stimulation rapprochée, la stimulation rapprochée, et une stimulation effectuée après 5 minutes. Le panneau A représente une expérience contrôle dans laquelle le symbole en forme d'étoile (identifié "27 s") est le premier test de réversibilité effectué lorsque $[Ca_{RS}]$ était de 1697 μM . Comme le montre le graphique, cette réversibilité a été effectuée environ 27 secondes après la stimulation précédente, ce qui a causé une augmentation très modeste du f_{Ca} . Ce phénomène a aussi été observé dans les autres expériences contrôles durant lesquelles des tests de réversibilité à l'intérieur de 25-30 secondes ont été effectués. Un autre test de réversibilité effectué 58 secondes après la stimulation précédente et lorsque $[Ca_{RS}]$ était de 1306 μM est également illustré sur la figure. Cette diminution à court terme de $[Ca_{RS}]$ a augmenté la valeur de f_{Ca} à des valeurs similaires à celles observées après la diminution à long terme de $[Ca_{RS}]$, due à la diffusion progressive du Ca hors de la fibre. Le triangle suivant représente une stimulation effectuée 5 minutes après, et la valeur de f_{Ca} de cette stimulation suit le décours de la courbe. Cet effet réversible sur le f_{Ca} a été observé dans toutes les autres expériences où ce test a été effectué environ 1 minute après la stimulation précédente, incluant les expériences antérieures de Pape et Carrier (1998). Dans toutes ces expériences, la réversibilité a diminué la $[Ca_{RS}]$ de 970-1300 μM à 350-630 μM .

La figure 15B montre une expérience où le BAPTA était présent depuis 67 minutes et dans laquelle une stimulation a été effectuée 28 secondes après la précédente, diminuant temporairement $[Ca_{RS}]$. Cette diminution à court terme de $[Ca_{RS}]$ a augmenté le f_{Ca} de la même façon que le test de réversibilité effectué après 58 secondes en

condition contrôle, illustré par l'étoile identifiée "58 s" en A.

Sur le panneau A), le test effectué après 27 secondes n'a pas augmenté le f_{Ca} de façon significative car le temps entre les deux stimulations n'était pas suffisant pour repomper le Ca libéré à l'intérieur du RS, et l'inactivation de la libération du Ca par le Ca a empêché l'augmentation du f_{Ca} . Cette inactivation peut être diminuée en diminuant $[Ca^{2+}]$ libre myoplasmique de 2 façons: 1) en ajoutant le BAPTA pour "tamponner" $\Delta[Ca^{2+}]$ comme le montre le test de réversibilité en B, ou 2) en augmentant le temps à environ 1 minute pour ce test de réversibilité (ex.: 58 secondes en A), afin de permettre à une partie du Ca libéré d'être repompé à l'intérieur du RS. Tous les tests de réversibilité de 25-30 secondes effectués dans les autres expériences avec BAPTA montrent des résultats similaires.

En résumé, les deux premiers panneaux de la figure 15 indiquent que l'augmentation du f_{Ca} lorsque la $[Ca_{RS}]$ diminue d'environ 1000 à 300 μM en condition contrôle n'est pas due à un changement à long terme causé par la longueur des expériences. Aussi, ces deux panneaux montrent que les tests de réversibilité en présence de BAPTA ne sont pas causés par des effets inattendus ou à long terme du BAPTA.

3.8 - EFFETS DU BAPTA SUR LA RELATION ENTRE LE f_{Ca} ET $[Ca_{RS}]$

La figure 15C représente le graphique du f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ pour la même expérience que le panneau B. Sur ce panneau, la $[Ca_{RS}]$ a été estimée avec les valeurs de pH_R apparent à partir des variations d'absorbance du Rouge de Phénol, additionné de 0.2 unité de pH et avec un D_{BAPTA} de $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (ainsi, c'est la condition "c" de la légende qui est illustrée). Juste après l'ajout du BAPTA, les valeurs de $[Ca_{RS}]$ ont

augmenté possiblement car la $[Ca^{2+}]$ de la solution interne contenant le BAPTA était plus grande que celle de la solution sans BAPTA au début de l'expérience, même si la $[Ca^{2+}]$ estimée dans la fibre était la même. Une autre explication serait que les valeurs de $[BAPTA_T]$ utilisées pour estimer $[Ca_{RS}]$ étaient trop élevées (le terme $[BAPTA_T]$ est utilisé pour estimer $\Delta[CaBAPTA]_{MAX}$, qui est ensuite additionné à $\Delta[CaEGTA]_{MAX}$, pour donner $[Ca_{RS}]_R$). Cette augmentation initiale de $[Ca_{RS}]$ après l'ajout de BAPTA n'était pas observée lorsque D_{BAPTA} était de $0.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (voir les conditions "b" et "d" de la légende) car ceci diminue l'estimation de $[BAPTA_T]$. C'est pour ceci que cette valeur de D_{BAPTA} ($0.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) a plutôt été considérée dans l'analyse et la comparaison de tous les résultats. Le panneau C illustre aussi les caractéristiques de la courbe du f_{Ca} en fonction de $[Ca_{RS}]$ évaluées dans cette partie du projet de recherche. Ces caractéristiques étaient le f_{Ca} au sommet, et le f_{Ca} à la moitié du sommet de cette courbe en cloche, dénotés respectivement $f_{Ca, \text{sommet}}$ et $f_{Ca, 1/2 \text{ sommet}}$ et indiqués par les symboles en forme de traits verticaux et de croix surmontés de la lettre "c". Les valeurs de $f_{Ca, \text{sommet}}$ et $f_{Ca, 1/2 \text{ sommet}}$ ont été obtenues respectivement par les fonctions quadratiques correspondant au sommet (courbe sur le graphique du panneau C) ainsi qu'à la phase descendante (non illustré) de la relation entre le f_{Ca} et $[Ca_{RS}]$. Comme l'indique la légende, les quatre segments et les croix donnent les valeurs de $[Ca_{RS}]$ du $f_{Ca, \text{sommet}}$ et du $f_{Ca, 1/2 \text{ sommet}}$ respectivement, des quatre conditions d'analyses. Diminuer D_{BAPTA} n'a pas affecté l'estimation de $[Ca_{RS}]$ parce que le temps nécessaire pour que la $[BAPTA_T]$ au site optique d'enregistrement égale approximativement celle des compartiments latéraux était suffisant, quelles que soient les valeurs de D_{BAPTA} utilisées. L'emplacement du sommet de la courbe était, cependant, sensible à une correction de 0.2 unités de pH. En effet, la

figure indique qu'avec la correction de 0.2 unité de pH, la vitesse de dissociation du Ca de l'EGTA diminue (la vitesse de dissociation dépend de la liaison de 2 protons à CaEGTA^{2-}) ce qui diminue le $K_{D,\text{apparent}}$ de la liaison du Ca à l'EGTA, diminuant aussi le signal de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ estimé par le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$. Par la même occasion, le $[\text{Ca}_{\text{RS}}]_{1/2 \text{ sommet}}$ diminue, mais la plus petite valeur de D_{BAPTA} diminue aussi $[\text{Ca}_{\text{RS}}]_{1/2 \text{ sommet}}$, contrairement à son manque d'effet sur le $[\text{Ca}_{\text{RS}}]_{\text{sommet}}$ (voir les conditions "b" vs. "a" et "d" vs. "c").

3.9 - RÉSUMÉ DES EFFETS DU BAPTA SUR LE f_{Ca} ET $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$

La table 1 résume les résultats de toutes les expériences de cette première partie. Les deux sections de la table correspondent aux deux protocoles expérimentaux, c'est-à-dire sans (première section) et avec BAPTA (deuxième section). La section des expériences dans lesquelles 8 mM BAPTA a été ajouté est divisée en 4 sous-sections selon que les calculs de f_{Ca} ont été faits avec et sans la correction relative au pH, et avec les deux constantes de diffusion (D_{BAPTA}). La première colonne donne les numéros d'identification des expériences. La deuxième colonne correspond aux valeurs moyennes de f_{Ca} des stimulations pour lesquelles $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ était entre 1500-3000 μM , la région plateau. Comme toutes les valeurs de cette colonne ont été obtenues sous les mêmes conditions, c'est-à-dire sans BAPTA dans les deux types d'expériences (contrôle ou BAPTA), ces valeurs ne devraient pas être significativement différentes. Ainsi, quoique la moyenne des valeurs obtenues en conditions contrôles soit deux fois plus élevée que celle en présence de BAPTA, la différence n'était pas statistiquement significative. Des variations semblables ont aussi été observées dans des expériences effectuées plus tôt dans le laboratoire (Pape et Carrier, 1998). En résumé, les expériences de la première

section de la table 1 sont des contrôles adéquats pour les expériences dans lesquelles le BAPTA a été ajouté.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Fiber	f_{Ca} at -60 mV 1500-3000 μ M	300-500 μ M	(3) + (2)	$f_{Ca,peak}$	$[Ca_{SR}]_{peak}$ (μ M)	$[Ca_{SR}]_{1/2}$ (μ M)
<i>Control Experiments with no BAPTA added</i>						
O29011	0.0151	0.0471	3.12	0.0483	460	954
N01011	0.0149	0.0726	4.87	0.0806	318	840
N02011	0.0075	0.0573	7.64	0.0600	348	944
N07011	0.0284	0.1154	4.06	0.1032	443	864
D04011	0.0146	0.0535	3.66	0.0540	359	727
D07011	0.0639	0.3438	5.38	0.3441	368	969
MEAN	0.0241	0.1150	4.79	0.1150	383	883
S.E.M.	0.0084	0.0469	0.66	0.0466	23	38
<i>Experiments in which 8 mM BAPTA was added</i>						
<i>no pH shift correction</i>						
O05011	0.0093	0.0285	3.06	0.0296	572	1400
O10011	0.0059	0.0406	6.94	0.0408	404	1094
O12011 [#]	0.0056	0.0201	3.62	(0.0312)	(735)	(1808)
O15011 [#]	0.0259	0.0800	3.08	(0.1113)	(564)	(1814)
O16011	0.0160	0.1381	8.61	0.1432	576	1414
MEAN	0.0125	0.0610	4.97	0.0712	517*	1303*
S.E.M.	0.0038	0.0220	1.17	0.0361	57	104
<i>0.2 pH shift</i>						
MEAN	0.0125	0.0664	5.31	0.0713	402	1113*
S.E.M.	0.0038	0.0234	1.09	0.0362	45	180
<i>no pH shift correction, D_{BAPTA} halved</i>						
MEAN	0.0125	0.0664	5.27	0.0712	491	1159*
S.E.M.	0.0038	0.0234	1.06	0.0361	48	73
<i>0.2 pH shift, D_{BAPTA} halved</i>						
MEAN	0.0125	0.0654	5.26	0.0713	383	993
S.E.M.	0.0038	0.0225	1.06	0.0362	38	55

Table 1. Effet de 8 mM BAPTA sur le f_{Ca} à -60 mV. La première section donne les résultats en condition contrôle, et la section suivante (avec ses sous-sections) donne les résultats en présence du BAPTA. La première colonne donne le numéro d'identification des fibres. La deuxième colonne donne les valeurs de f_{Ca} pour les stimulations ayant une $[Ca_{RS}]$ entre 1500 et 3000 μ M (et pour ces mêmes valeurs avant l'ajout du BAPTA dans les expériences où le BAPTA a été introduit). La troisième colonne donne les valeurs moyennes de f_{Ca} pour les stimulations ayant une $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μ M. La 4^e colonne est le ratio des valeurs des colonnes 3 sur 2. Les colonnes 5, 6 et 7 donnent les valeurs de $f_{Ca,sommet}$, $[Ca_{RS}]_{sommet}$, et $[Ca_{RS}]_{1/2 sommet}$. Le Ca a été enlevé tôt dans les expériences identifiées d'un "#". Le symbole "*" indique que cette valeur était statistiquement différente de la valeur en condition contrôle. Les quatre échelles de valeurs suivantes pour chaque paramètres sont respectivement pour les valeurs en condition contrôle quand $[Ca_{RS}]$ est entre 1 500 et 3 000 μ M et ensuite, entre 300 et 500 μ M (première et deuxième échelles), et pour les valeurs correspondantes en présence du BAPTA (troisième et quatrième échelles). Ainsi: temps après la saponine: 56-101, 116-153, 55-87, 126-226 min; diamètre de la fibre: 97-119, 97-113, 111-143, 103-138 μ m; pH_R: 6.88-7.11, 6.80-7.05, 6.94-7.10, 6.85-7.10; courant de maintien: -18 à -52, -19 à -64, -21 à -69, -23 à -68 nA; C_{app}: 0.00861-0.01700, 0.00847-0.01745, 0.01184-0.02089, 0.01288-0.01963 μ F; r_i: 1.98-3.90, 2.05-3.62, 1.90-2.66, 1.62-2.84 M Ω /cm.

La troisième colonne donne f_{Ca} à des $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM , région du sommet de la courbe en cloche. Les valeurs moyennes de f_{Ca} des expériences avec BAPTA sont très similaires et ne varient pas significativement selon les différents paramètres utilisé pour estimer la $[Ca_{RS}]$ (c'est-à-dire, avec et sans l'addition de 0.2 unités de pH, et avec les deux valeurs de D_{BAPTA}). Ceci indique que les incertitudes concernant la $[Ca_{RS}]$ en présence du BAPTA n'ont pas influencé les effets du BAPTA sur le f_{Ca} dans la région du sommet (voir figure 13C).

La colonne 4 donne le ratio des valeurs de la colonne 3 sur les valeurs de la colonne 2. Ce ratio correspond au facteur d'augmentation du f_{Ca} lorsque la $[Ca_{RS}]$ diminue de 1500-3000 μM (2^e colonne) à 300-500 μM (3^e colonne). Les ratios des expériences avec BAPTA variant de 4.97-5.31, dépendamment des critères utilisés pour l'estimation de $[Ca_{RS}]$, n'étaient pas significativement différents du ratio de 4.79 des expériences en condition contrôle. Ces résultats démontrent que le BAPTA n'a pas diminué la perméabilité à la libération au sommet de la relation entre le f_{Ca} et la $[Ca_{RS}]$.

Les valeurs de $f_{Ca, \text{sommet}}$, $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ et $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ sont tabulées aux colonnes 5-7. En condition contrôle, les valeurs de $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ et $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ (383 et 883 μM respectivement) sont sensiblement les mêmes que celles obtenues auparavant par Pape et Carrier (1998), sous des conditions similaires. Aussi, les valeurs des colonnes 3 et 5 sont très semblables, car la $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ correspondent aux $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM , expliquant ainsi pourquoi le $f_{Ca, \text{sommet}}$ et le f_{Ca} pour les $[Ca_{RS}]$ entre 300 et 500 μM sont presque similaires en condition contrôle.

Comme 2 protocoles expérimentaux ont été utilisés en ce qui concerne les expériences en présence de BAPTA, les valeurs des colonnes 5 à 7 de ces expériences

seront commentées dans les trois sections suivantes. Aussi, pour plus de clarté, les effets du BAPTA pour les deux protocoles seront traités séparément.

3.10 - LES DEUX PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DES EXPÉRIENCES AVEC BAPTA

Deux protocoles ont été utilisés pour les expériences avec BAPTA. Le **premier protocole** consistait à enlever le Ca de la solution interne environ 57-61 minutes après l'ajout de BAPTA (figure 15C). En ce qui concerne le **deuxième protocole**, le Ca était enlevé de la solution interne très tôt, c'est-à-dire, environ 10 minutes avant la première stimulation. Et les premiers résultats étant obtenus, le BAPTA était introduit dans la solution interne. La figure 15D montre les résultats d'une expérience effectuée selon le 2^e protocole. La forme de cette courbe en cloche diffère de celle en C par le fait que: 1) le sommet de la relation entre le f_{Ca} et $[Ca_{RS}]$ est plus large, ressemblant plus à un plateau qu'à un sommet, et 2) la valeur de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ est plus grande. Toutefois, il est à noter ici que les effets différents observés pour les deux protocoles ne sont pas dus au fait que le Ca soit retiré au début versus plus tard durant l'expérience. En effet, les expériences en condition contrôle effectuées selon le 1^{er} protocole (Pape et Carrier 1998, où 2 des 7 expériences avaient été menées selon ce protocole) ou selon le 2^e protocole (expériences contrôles de ce projet) ont donné les mêmes résultats concernant la perméabilité à la libération en fonction de $[Ca_{RS}]$.

3.11 - FORME DE LA COURBE EN CLOCHE OBTENUE AVEC LE PREMIER PROTOCOLE

Le 1^{er} protocole a été utilisé dans 3 des 5 expériences de la table 1 (c'est-à-dire

O05011, O10011 et O16011). La moyenne des valeurs de $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ de ces expériences varie de 383 μM à 517 μM , mais ce n'est que la moyenne des valeurs de $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ de la première sous-section qui est significativement différente de la moyenne des valeurs contrôles (517 \pm 57 μM est significativement différent de 383 \pm 23 μM). Tout comme en condition contrôle, les valeurs des colonnes 3 et 5 se ressemblent.

Les valeurs de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ ont varié de 993 à 1303 μM . A l'exception de la plus petite de ces valeurs (993 μM), toutes les $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ étaient significativement plus grandes que celle en condition contrôle (883 μM).

En résumé, le pouvoir tampon du BAPTA ne semble pas avoir d'effet sur l'emplacement du sommet de la relation entre le f_{Ca} et la $[Ca_{RS}]$ mais semble avoir augmenté le f_{Ca} des valeurs de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ des expériences effectuées selon le protocole 1. Cet effet pourrait être dû à une diminution de l'inactivation de la libération du Ca par le Ca, causé par le BAPTA, à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ intermédiaires.

3.12 - FORME DE LA COURBE EN CLOCHE OBTENUE AVEC LE DEUXIÈME PROTOCOLE

Les valeurs de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ des 2 expériences effectuées selon le 2^e protocole (identifiées par le symbole "#", table 1) n'ont pas été incluses dans la moyenne des valeurs des expériences effectuées selon le premier protocole car elles étaient significativement plus élevées que les valeurs en condition contrôle (1353-1811 μM > 883 μM). Ces valeurs étaient aussi significativement plus élevées que celles des expériences du 1^{er} protocole (sauf pour la condition avec le plus petit D_{BAPTA} où $p = 0.064$). Ainsi, comme selon ce protocole le Ca avait été enlevé de la solution interne très tôt après le début des expériences, le mécanisme d'inactivation de la libération du Ca par le Ca a été diminué et

la phase descendante de la courbe en cloche du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$ a donc été significativement réduite. Ceci pourrait expliquer pourquoi, comme mentionné plus haut, le sommet de cette courbe en cloche ressemble plus à un plateau qu'à un sommet (figure 15D). Ainsi, afin de définir le $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$, la plus petite $[Ca_{RS}]$ des stimulations formant ce sommet-plateau a été sélectionnée, c'est-à-dire, la stimulation la plus à gauche et indiquée par la lettre "c" du panneau D. De même que les valeurs de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$, la valeur moyenne des $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ de ces deux expériences (entre 495 et 650 μM) était significativement plus élevée que la moyenne en condition contrôle (383 μM) et du 1^{er} protocole (383-517 μM). En effet, ces plus grandes $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ sont associées à des valeurs de $f_{Ca, \text{sommet}}$ environ 50% plus élevées que f_{Ca} lorsque $[Ca_{RS}]$ était entre 300 - 500 μM (voir colonne 5 vs. 3 de la table 1 pour ces deux expériences). Une explication serait que le BAPTA aurait diminué le f_{Ca} lorsque $[Ca_{RS}]$ était entre 300-500 μM dans ces deux expériences, dans lesquelles le Ca a été enlevé relativement tôt des compartiments latéraux. Finalement, les valeurs élevées de $[Ca_{RS}]_{\text{sommet}}$ et de $[Ca_{RS}]_{1/2 \text{ sommet}}$ de ces 2 expériences peuvent aussi être expliquées par une diminution de l'inactivation Ca-dépendante de la libération du Ca.

4 - DISCUSSION

Premier projet

Cette première partie de mon projet de recherche consistait à évaluer si un site de libération de Ca comprend un RyR activé par son DHPR et d'autres RyR recrutés par LCIC. L'approche expérimentale pour tester cette hypothèse était d'évaluer si la perméabilité à la libération du Ca (estimée par le f_{Ca} , la fraction du contenu en Ca du RS relâchée par un pulse à -60 mV) serait altérée par l'introduction d'une grande concentration du tampon à haute affinité pour le Ca, le BAPTA (8 mM), dans la solution interne. Plus précisément, le but était d'évaluer si oui ou non, 8 mM BAPTA affecterait le sommet de la relation du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$.

4.1 - LES DEUX MÉCANISMES DE LCIC

Comme le montre la courbe avec les symboles en forme de "+" de la figure 14B, l'augmentation de $[Ca_{RS}]$ de 100 à 400 μ M en absence de BAPTA fait augmenter la perméabilité de la libération à -60 mV par un facteur de 2. Cette augmentation pourrait être due à deux types de LCIC: 1) un mécanisme d'autorégulation selon lequel le Ca libéré d'un RyR activé par son DHPR peut se lier à un site d'activation sur ce même RyR et ainsi moduler sa conductance unitaire ou son temps moyen d'ouverture, ou 2) un mécanisme où un RyR couplé à son DHPR peut recruter des RyRs voisins. La deuxième hypothèse semble peu probable, comme le montrera l'analyse suivante, montrant que 8 mM de BAPTA produit la même diminution de $\Delta[Ca^{2+}]$ à l'embouchure d'un canal ouvert que diminuer $[Ca_{RS}]$ de 400 à 100 μ M.

L'équation de la diffusion d'un tampon calcique comme le BAPTA ou l'EGTA

est estimée par la solution suivante :

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}] = \frac{\varphi * e^{-r/\lambda}}{4 \pi D_{\text{Ca}} r} \quad (16)$$

où φ est le flux de Ca à travers le canal, D_{Ca} est la constante de diffusion du Ca, r est la distance à partir de l'ouverture d'un RyR, et λ_{Ca} est la constante reliée à la distance qu'un ion de Ca^{2+} peut parcourir avant d'être lié par un tampon calcique (Stern, 1992). Si le terme " $e^{-r/\lambda}$ " est égal à 1, alors l'équation (16) donne $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ en absence d'un tampon calcique. (Il est à noter que comme 20 mM EGTA a un effet très négligeable sur le λ_{Ca} en présence de 8 mM BAPTA, l'EGTA n'a pas été considéré dans cette équation qui deviendrait plus compliquée autrement). Il a été mentionné précédemment que faire varier $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ correspond à varier $[\text{Ca}^{2+}]$ à l'embouchure d'un RyR ouvert du RS et, par le fait même, à changer la force motrice de la libération du Ca, φ , ainsi que $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ à n'importe quelle distance de l'embouchure du canal. Avec le BAPTA, l'estimation de λ_{Ca} est égale à **21.5 nm** (selon l'équation B14 de Pape *et al.*, 1995 $\rightarrow \lambda_{\text{Ca}} = \sqrt{D_{\text{Ca}}} / \sqrt{k_1 * [\text{BAPTA}]_{\text{R}}}$, avec $D_{\text{Ca}} = 3 * 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $k_1 = 1 * 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; et $[\text{BAPTA}]_{\text{R}} = 6.5 \text{ mM}$. Cette valeur de 6.5 mM est la moyenne des valeurs de $[\text{BAPTA}]_{\text{R}}$ - allant de 5.4 à 7.3 mM - pour les stimulations des expériences utilisées dans cette étude). Si le site de régulation du Ca est situé à 30 nm de son site de libération - 30 nm correspondant à la distance entre 2 RyRs voisins - le BAPTA devrait réduire $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ à 0.25 fois sa valeur en absence de BAPTA ($e^{-30/21.5}$). Ceci aurait le même effet qu'une réduction de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ de 400 à 100 μM ($100/400 = 0.25$).

Ainsi, si l'augmentation de la perméabilité (ou f_{Ca}) de 2 fois lorsque $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ augmente de 100 à 400 μM est due à l'activation de canaux voisins par LCIC, alors

l'ajout de 8 mM BAPTA devrait réduire le f_{Ca} à 0.5 (1/2) sa valeur en absence de BAPTA. Si, d'un autre côté, cette augmentation de la perméabilité est due à un mécanisme d'autorégulation du Ca sur son propre canal de libération, alors l'équation (16) indique que le BAPTA devrait avoir très peu, sinon pas, d'effet sur le sommet de la courbe en cloche. C'est-à-dire que le site de régulation du Ca pourrait aussi être situé sur le canal lui-même, vu sa grande taille - par exemple, à 5 nm de son embouchure - et donc BAPTA ne devrait pas réduire $\Delta[Ca^{2+}]$ plus que 0.79 ($e^{-5/21.5}$) fois sa valeur en absence de BAPTA.

En résumé, comme le BAPTA ne semble pas avoir d'effet sur le f_{Ca} lorsque $[Ca_{RS}]$ est entre 300-500 μM , ceci suggère que les RyRs voisins ne sont pas recrutés par LCIC à -60 mV. Les résultats indiquent que le Ca libéré par un canal activé par son senseur de voltage augmente le flux de Ca passant à travers ce canal calcique. Contrairement à une hypothèse basée sur des études de modélisation (Stern *et al.*, 1997; Ríos et Stern, 1997), ce mécanisme d'autorégulation signifie qu'un RyR activé par le voltage peut aussi être modulé par le Ca.

4.2 - RÉSULTATS D'ÉTUDES ANTÉRIEURES SUR DES RyRs ISOLÉS

En 1996 Tripathy et Meissner ont effectué l'étude de la probabilité d'ouverture (P_o) en fonction du flux de Ca à travers des RyRs de muscles squelettiques de mammifères, reconstitués dans des bicouches lipidiques planes. Selon leurs résultats, le graphique de la P_o en fonction du flux de Ca atteint un maximum suivi d'une diminution. Cela leur a permis de conclure que les effets observés sur la P_o étaient dus à une modulation du temps moyen d'ouverture des canaux, contrairement à une modulation de

la fréquence d'ouverture ou de la conductance unitaire des canaux. Ces résultats ainsi que ceux obtenus à de faibles dépolarisations indiquent que les mêmes sites de liaison calcique sont à la fois impliqués dans la régulation de la libération de Ca de RyRs isolés activés par l'ATP, et dans la libération du Ca activée par une dépolarisation. Ceci suggère également que l'activation d'un RyR par son DHPR implique aussi la modulation de son temps d'ouverture.

4.3 - LE BAPTA N'A PAS D'EFFET SUR LA PHASE PLATEAU DU f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$

Des résultats antérieurs indiquent que 8 mM BAPTA n'influencent pas le f_{Ca} lorsque $[Ca_{RS}]$ est dans la région plateau de la courbe en cloche, c'est-à-dire, lorsque $[Ca_{RS}] > 1\ 500\ \mu\text{M}$ (table 1, Pape *et al.*, 2002b; ANNEXE 2). Cette conclusion a été tirée suite à la comparaison à -60 mV entre le ratio des valeurs de f_{Ca} 50 à 60 minutes après l'addition de BAPTA sur les valeurs de f_{Ca} juste avant l'ajout du BAPTA, avec le ratio des valeurs correspondantes en condition contrôle (discuté en détail dans le deuxième projet de ce mémoire). Dans cette étude, les expériences en condition contrôle avaient été effectuées de la même façon que celles avec BAPTA, y compris un rinçage des compartiments latéraux au moment où le BAPTA aurait normalement été introduit. En bref, les résultats ont montré que l'ajout de 8mM BAPTA dans la solution interne n'affecte pas significativement la perméabilité à la libération à -60 mV, quand $[Ca_{RS}]$ est dans la région plateau du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$.

4.4 - EFFET DU BAPTA SUR LA PHASE DESCENDANTE DU f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$

L'évaluation de l'effet du BAPTA sur la phase descendante de la courbe en cloche du f_{Ca} vs. $[Ca_{RS}]$ (pour les valeurs de $[Ca_{RS}]$ de 500 à $>1000\ \mu\text{M}$) indiquent que le

BAPTA augmente légèrement les valeurs de f_{Ca} . Ces résultats suggèrent que le BAPTA diminue l'inactivation de la libération du Ca à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ intermédiaires.

Il a déjà été mentionné que deux protocoles expérimentaux ont été utilisés pour les expériences en présence du BAPTA: l'un selon lequel le Ca est resté présent jusqu'à environ 60 minutes après l'ajout du BAPTA (1^{er} protocole) et l'autre selon lequel le Ca a été enlevé de la solution interne relativement tôt, au début de l'expérience (2^e protocole). Les résultats obtenus avec le 2^e protocole ont montré une réduction beaucoup plus prononcée de l'inactivation de la libération du Ca par le Ca, à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ intermédiaires comparativement aux résultats du 1^{er} protocole. La différence entre les deux protocoles est que la diminution de $[Ca_{RS}]$ entre les stimulations était plus rapide dans les expériences où le Ca a été enlevé au début de l'expérience (2^e protocole). Ainsi, dans les expériences effectuées de cette façon, le BAPTA avait moins de temps pour diffuser jusqu'au milieu de la fibre, d'où une plus petite concentration. Ceci pourrait expliquer les effets différents sur l'inactivation de la libération du Ca obtenus selon les deux protocoles. L'analyse des résultats plus haut montre aussi que lorsque $[Ca_{RS}]$ est de 300-500 μM , la $\Delta[Ca^{2+}]$ libre à l'embouchure d'un canal semble trop faible pour activer les canaux voisins. Cependant, des RyRs voisins pourraient être activés par LCIC à des valeurs de $[Ca_{RS}]$ intermédiaires (phase descendante) mais cette activation pourrait d'abord être inhibée par une inactivation initiale Ca-dépendante. Dans les expériences effectuées selon le 2^e protocole, la $[BAPTA]$ aux grandes $[Ca_{RS}]$ était faible mais suffisante et donc la réduction de l'inactivation observée pourrait être due à une diminution de cette inactivation initiale Ca-dépendante grâce au BAPTA, ce qui permettrait le recrutement de RyRs voisins par LCIC. D'un autre côté, la $[BAPTA]$ plus

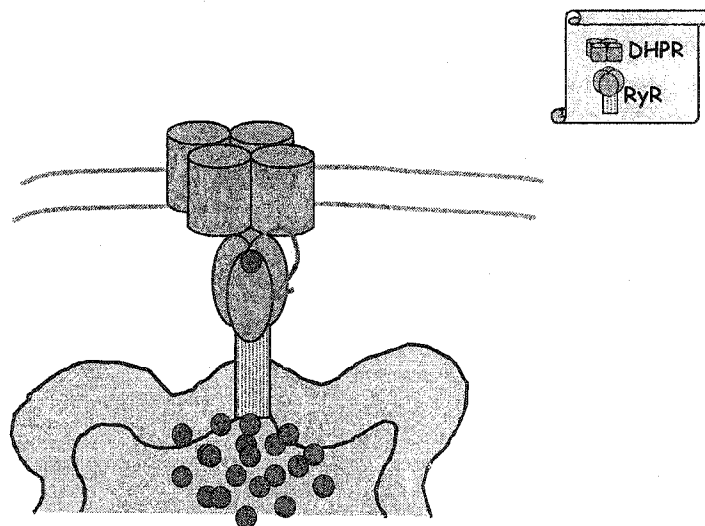
élevée dans les expériences du 1^{er} protocole devrait aussi diminuer cette inactivation initiale aux valeurs de $[Ca_{RS}]$ intermédiaires, cependant, le pouvoir tampon du BAPTA pourrait avoir aussi tout simplement inhibé LCIC. Et si c'était le cas, la figure 15B aurait montré augmentation du f_{Ca} suivie d'une diminution, correspondant respectivement à la diminution de l'inactivation initiale Ca-dépendante suivie de l'inhibition de LCIC. Cette dernière hypothèse ne semble pas possible car aucune augmentation dans le f_{Ca} , suivie d'une diminution n'a été observée dans les expériences effectuées selon le 1^{er} protocole. Enfin, l'absence d'activation des RyRs voisins à des $[Ca_{RS}]$ intermédiaires pourrait être expliquée par le fait que les RyRs activés par leurs DHPRs sont d'abord inactivés à de grandes $[Ca_{RS}]$ avant qu'une quantité de Ca suffisante soit libérée pour activer les canaux voisins. Ainsi, la différence entre les deux protocoles pourrait être due aux différentes activations possibles des RyRs couplés à leurs DHPRs. Ceci pourrait expliquer les formes différentes des courbes en forme de cloche obtenues à partir des deux protocoles expérimentaux avec le BAPTA.

En résumé, les résultats de cette section indiquent que le BAPTA ne semble pas diminuer la perméabilité à la libération (ou f_{Ca}) à -60 mV pour toutes les valeurs de $[Ca_{RS}]$ investiguées (300-3000 μ M), et ne semble augmenter le f_{Ca} que sous certaines conditions (2^e protocole). Ceci indique que les canaux voisins ne sont pas recrutés par LCIC en réponses à de faibles dépolarisations. Les résultats n'excluent pas, cependant, la possibilité que les canaux voisins pourraient être recrutés à des $[Ca_{RS}]$ intermédiaires, mais que ce mécanisme serait inhibé par une inactivation initiale de la libération du Ca par le Ca.

4.5 - RÉSULTATS OBTENUS À DE GRANDES DÉPOLARISATIONS.

L'hypothèse de Ríos et collègues (1988) selon laquelle le recrutement de canaux voisins par LCIC augmente la libération du Ca suite à de grandes dépolarisations, n'est pas observée à de faibles dépolarisations. Ceci semble être dû au fait qu'à de faibles dépolarisations, la $\Delta[Ca^{2+}]$ venant d'un seul RyR ouvert n'est pas suffisante pour initier une grande augmentation de la libération. Cependant, à de grandes dépolarisations, la somme de $\Delta[Ca^{2+}]$ venant de deux RyRs adjacents activés en même temps par leurs DHPRs respectifs augmente la libération du Ca. Ainsi, cette augmentation de la perméabilité serait seulement observée à de grandes dépolarisations car la densité des sites activés par le voltage est plus grande. Pour que cette explication soit complète, il faudrait aussi supposer qu'à de faibles dépolarisations, un RyR isolé activé par son senseur de voltage ne puisse pas recruter à lui seul des RyRs voisins par LCIC. Les résultats de cette partie du projet de recherche appuient cette condition.

-60mV



5 - RÉSULTATS

Deuxième projet

5.1 - INTRODUCTION

Comme mentionné ci-haut, la perméabilité à la libération (ou f_{Ca}) est augmentée à de grandes dépolarisations, probablement dû au recrutement de canaux voisins par LCIC. En effet, les études de Pape et Carrier (1998) sur la perméabilité à la libération du Ca du RS leur ont permis de remarquer une libération de Ca additionnelle présente seulement à -45 mV, et non à de faibles dépolarisations (< -60 mV). Ainsi, le but de la deuxième partie de mon projet de recherche était d'évaluer si oui ou non il existe une composante additionnelle Ca-dépendante seulement présente à de grandes dépolarisations, lorsque la perméabilité à la libération du Ca est à son maximum. Pour ce faire, mon travail était de diminuer $\Delta[Ca^{2+}]$ à l'embouchure de RyRs ouverts en introduisant 8 mM BAPTA dans la solution interne. L'introduction de 8 mM BAPTA devrait diminuer $[Ca_{RS}]$, ce qui diminuerait le flux de Ca à travers un canal de libération de Ca, ce qui devrait aussi diminuer $\Delta[Ca^{2+}]$ à l'embouchure d'un RyR ouvert. Ensuite, il suffisait de comparer la perméabilité à la libération aux deux voltages suivants : -45 mV (grande dépolarisation) et -60 mV (faible dépolarisation). Si une composante additionnelle est effectivement présente à de grandes dépolarisations, diminuer la $\Delta[Ca^{2+}]$ à l'aide du BAPTA devrait diminuer la perméabilité à -45 mV, sans diminuer celle à -60 mV.

5.2 - PROTOCOLE DE STIMULATION

La première trace de la figure 16A illustre le protocole de stimulation typiquement utilisé dans les expériences de cette deuxième partie du projet de recherche. Des pulses

dépolarisants de -60, -45, -45 et -20 mV avec des durées de 400, 30, 1600 et 800 ms ont été utilisés, séparés par de longues périodes au potentiel de repos à -90 mV. Les paires de traces suivantes représentent les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ avant et 57 minutes après l'ajout du BAPTA. Comme le but était de comprendre ce qui se passe à de grandes dépolarisations lorsque le degré d'activation des RyRs est à son maximum, un petit pulse de 30 ms à -45 mV a été utilisé. Trente ms correspond au temps requis pour que le signal de la perméabilité d'une stimulation atteigne son maximum. La perméabilité à -45 mV a donc été estimée à l'aide du pulse de 30 ms, et comparée avec la perméabilité du pulse à -60 mV (en présence et en absence du BAPTA). Les deux derniers pulses à -45 et -20 mV ont été utilisés afin de suivre la stabilité les mouvements de charges intramembranaires tout au long des expériences. Ces deux pulses ont également été utilisés pour relâcher tout le Ca possible d'être libéré du RS par une stimulation. En absence de BAPTA, le maximum de cette trace est la $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$, qui représente une bonne estimation de la concentration de Ca présent dans le RS. Dans ces expériences, le Ca n'a jamais été enlevé de la solution interne, et le BAPTA a été ajouté pendant une période d'environ une heure, avant d'être enlevé.

En présence de BAPTA, le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ représente la concentration de Ca lié à l'EGTA à l'équilibre, après un pulse. Les traces de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ du panneau A montrent qu'après l'ajout du BAPTA, le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ est plus petit qu'en condition contrôle, dû au pouvoir tampon du BAPTA qui capture très rapidement une grande fraction du Ca libéré par un pulse dépolarisant.

5.3 - EFFET DE 8 mM BAPTA SUR $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ ET SUR LE TEMPS DE DÉCOURS DE $\Delta[\text{CaEGTA}]$

Il a souvent été proposé que les indicateurs peuvent avoir un effet pharmacologique, toxique ou non prévisible (Stroffekova et Heiny, 1997). Les panneaux B et C de la figure 16 illustrent les stratégies utilisées pour tester cette possibilité.

Le panneau B illustre le déroulement d'une des expériences de cette étude, représenté sous la forme d'un graphique de la $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps après le traitement à la saponine, pour toutes les stimulations de cette expérience. Les traits verticaux identifient les stimulations à partir desquelles les traces en A ont été obtenues. La pente initiale débutant même avant l'ajout du BAPTA est probablement due au fait que la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans la solution interne était inférieure à la concentration physiologique de la fibre. Cependant, l'ajout du BAPTA augmente la vitesse de déclin de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$. Une fois le BAPTA enlevé de la solution interne, même si le déclin du signal semble atténué, les valeurs de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ ne reviennent pas aux valeurs de base à cause de la diminution progressive de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ non reliée au BAPTA.

Le panneau C illustre les deux premiers pulses ainsi que les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ correspondants du panneau A, à plus grande échelle. La plus grande trace correspond à la stimulation en condition contrôle, et la plus petite, en présence du BAPTA. Le délai de cette deuxième trace est dû au fait que le BAPTA lie rapidement le Ca libéré par un pulse, et ce délai confirme la présence de ce tampon de Ca dans le myoplasme.

La trace expérimentale du panneau D (trace non "lisse") est la trace avec BAPTA du panneau C. Afin de confirmer la présence du BAPTA dans le myoplasme, mais aussi afin de tester si le BAPTA ne cause pas d'effets inattendus dans la fibre, les signaux de

$\Delta[\text{CaEGTA}]$ ont été reproduits par un modèle mathématique (voir annexe B de Pape *et al.*, 2002b; ANNEXE 2). Ce modèle mathématique décrit aussi le temps de décours du signal auquel on s'attend si le BAPTA diffuse normalement dans la fibre.

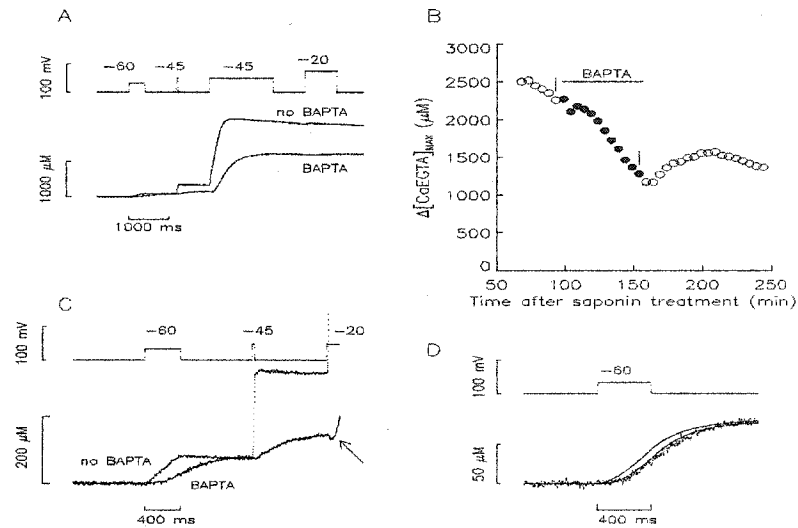


Figure 16. Effet du BAPTA sur $\Delta[\text{CaEGTA}]$. **A)** La première trace est le protocole de stimulation utilisé pour les expériences de cette partie du projet. Des dépolarisations à -60, -45, -45 et -20 mV avec des durées respectives de 400, 30, 1600 et 800 ms ont été effectuées. Les périodes de repolarisations à -90 mV avaient des durées de 800 ms. Les traces suivantes sont les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ avant ("no BAPTA") et 56 minutes après ("BAPTA") l'ajout de 8 mM BAPTA dans la solution interne. **B)** Graphique de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ en fonction du temps après le traitement à la saponine. Les stimulations, effectuées chaque 5 minutes, sont représentées par les cercles blancs et noirs. Les cercles noirs indiquent la période durant laquelle le BAPTA était présent dans la solution interne (trait horizontal). Les petits segments verticaux correspondent aux stimulations illustrées en A. **C)** Traces du panneau A à plus grande échelle pour les deux premiers pulses du protocole de stimulation. **D)** La trace non lisse est le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ expérimental en présence de BAPTA de la trace en C, pour le pulse à -60 mV. Les deux traces lisses sont les traces de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ obtenues à partir du modèle mathématique.

Avec ce modèle mathématique, les constantes nécessaires à la génération des traces lisses du panneau D ont été obtenues, en supposant que le signal de $\Delta[\text{Ca}_T]$ agit comme force motrice, ayant une fonction en forme de rampe, comme la trace sans BAPTA du panneau C. La première courbe lisse (la plus à gauche) en D correspond au signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ prédit selon le modèle mathématique. Les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ mesurés

expérimentalement et calculés mathématiquement ont une forme similaire, les deux montrant un délai mais aussi ayant perdu la forme de rampe des signaux sans BAPTA. En présence du BAPTA, une grande fraction du signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ continue après le pulse, ce qui correspond au temps pendant lequel le Ca est redistribué du BAPTA à l'EGTA. Selon le modèle, la redistribution est de type mono-exponentielle, avec une constante de temps de 262 ms. Les fonctions exponentielles calculées pour les pulses à -60 et -45 mV du signal avec BAPTA du panneau C avaient des constantes de temps de 339 et 315 ms respectivement, valeurs qui se rapprochent de la constante de temps prédite par le modèle mathématique de 262 ms.

Il a déjà été mentionné que bien que la méthode de l'EGTA et du Rouge de Phénol donne une mesure précise de ΔpH myoplasmique, ces valeurs de pH peuvent être estimées de 0.1-0.4 unités de pH trop acides (0.2 unités de pH en moyenne). Si le pH myoplasmique est plus alcalin que le pH calculé avec le Rouge de Phénol, alors la redistribution du Ca allant du BAPTA à l'EGTA devrait être plus lente. Et si on calcule mathématiquement le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ en tenant compte de ce facteur, le signal calculé devrait montrer un délai plus grand, et donc être superposé à la trace expérimentale. Cependant, contrairement aux attentes, malgré une correction relative au pH, les deux signaux ne se superposaient pas (résultats non illustrés). Ainsi, un autre facteur devait jouer un rôle pour permettre la superposition des deux signaux. Ce deuxième facteur était le mouvement à contre-sens des protons se déplaçant du myoplasme vers l'intérieur du RS afin de contrebalancer les charges du Ca libéré du RS lors d'une dépolarisation. Ce mouvement de protons rend le myoplasme plus alcalin, comme le montre la petite dépression du signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ du panneau C pour le

pulse à -20 mV indiquée par la flèche (car plus visible à de grandes dépolarisations). Ainsi la courbe lisse du panneau D superposée à la courbe de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ expérimentale a été générée à partir du modèle mathématique en incluant la contribution des protons. Comme les traces expérimentales et calculées avec les paramètres appropriés se superposaient (et ce, pour toutes les stimulations de toutes les expériences) ceci a indiqué que le BAPTA agissait comme prévu, selon ses propriétés de tampon calcique.

5.4 - EFFET DU BAPTA SUR LE f_{Ca} À -45 ET À -60 mV

Encore une fois, afin d'estimer la perméabilité à la libération du Ca du RS, le f_{Ca} , la fraction du Ca libéré par un pulse, a été calculée. Comme mentionné plus haut, en présence du BAPTA, le temps de décours de la libération du Ca ($d\Delta[\text{Ca}_T]/dt$) ne peut pas être directement estimé. C'est pourquoi le f_{Ca} a été utilisé car le f_{Ca} est une bonne estimation de l'intégrale de la perméabilité lorsqu'une petite fraction du contenu en Ca du RS est libérée par un pulse, ce qui était le cas pour les deux premiers pulses du protocole de stimulation. Il faut se rappeler que le but de cette 2^e partie était de confirmer l'existence d'une composante additionnelle Ca-dépendante de la libération du Ca, présente seulement à de grandes dépolarisations et lorsque la perméabilité à la libération est maximale. Si on compare les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ du panneau C de la figure 16, on voit que le f_{Ca} à -60 mV a augmenté suite à l'ajout du BAPTA. En effet, selon le panneau A, les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ sont pareils pour les deux stimulations à -60 mV mais le signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ est plus petit en présence de BAPTA. Bien que cette augmentation du f_{Ca} à -60 mV ait également été observée dans les expériences en condition contrôle (non illustré sur cette figure), la grande réduction du signal de

$\Delta[\text{CaEGTA}]$ à -45 mV est associée à la présence du BAPTA. Cette observation supporte donc de l'existence d'une composante additionnelle Ca-dépendante de la libération du Ca durant les 30 ms d'un pulse à -45 mV, absente à -60 mV. Les panneaux A, B, C et D de la figure 17 sont des graphiques du f_{Ca} en fonction du temps après le traitement à la saponine.

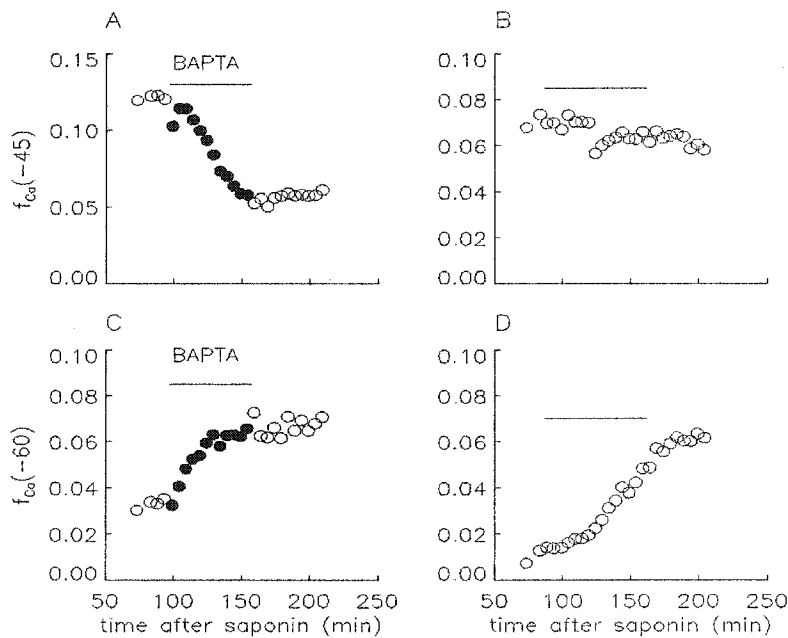


Figure 17. Temps de décours du $f_{Ca}(-45$ mV) et $f_{Ca}(-60$ mV) en présence du BAPTA et en condition contrôle. **A)** Graphique du $f_{Ca}(-45$ mV) en fonction du temps après le traitement à la saponine. Les cercles blancs représentent les stimulations en condition contrôle. Les cercles noirs sont les stimulations en présence de 8 mM BAPTA (trait horizontal). **B)** Graphique de $f_{Ca}(-45$ mV) vs. temps, pour une expérience contrôle. Comme en D, le début et la fin du trait horizontal représente le temps où la solution interne a été rincée (soit avec une solution contenant 8 mM de BAPTA ou avec la même solution contrôle du début des expériences). **C)** et **D)** sont des graphiques correspondant respectivement aux expériences des panneaux A et B à -60 mV.

Les segments horizontaux indiquent le temps pendant lequel les compartiments latéraux contenaient soit une solution avec 8 mM BAPTA (panneaux A et C), soit une solution contrôle (panneaux B et D). Les panneaux A et B montrent les valeurs obtenues pour

toutes les stimulations d'une expérience, à -45 mV. Le panneau A indique que l'addition de 8 mM BAPTA dans la solution interne diminue le f_{Ca} en fonction du temps, diminution non observée en condition contrôle (panneau B). Quoique vraisemblablement attribuable au BAPTA, la diminution du f_{Ca} aurait pu être due à des effets non reliés au pouvoir tampon du BAPTA, car le f_{Ca} ne remonte pas aux valeurs initiales après le retrait du BAPTA des compartiments latéraux. Ceci sera adressé plus en détail dans la discussion. Les panneaux C et D montrent aussi la relation entre le f_{Ca} et le temps de l'expérience pour le pulse à -60 mV. Comme mentionné plus haut, le BAPTA n'a pas diminué mais a augmenté le f_{Ca} dans toutes les expériences à -60 mV (contrôle et avec BAPTA). Quoique non explicable, cette augmentation du f_{Ca} obtenue avec et sans BAPTA n'était pas significativement différente dans les deux types d'expériences.

5.5 - EFFETS DE 8mM BAPTA SUR LES MOUVEMENTS DE CHARGES INTRAMEMBRANAIRES, Q_{cm}

La figure 18 illustre la quantité de charges intramembranaires ayant bougé (Q_{cm}) durant un pulse en fonction du temps pour toutes les stimulations et tous les pulses du protocole expérimental. Les cercles noirs, les cercles blancs, les étoiles et les losanges blancs représentent respectivement les pulses à -60, -45 (30 ms), -45 et -20 mV. Considérant la non-uniformité des valeurs obtenues à chacun des pulses, les symboles de cette figure indiquent que la quantité de charges ayant bougé est restée approximativement constante. Les symboles de Q_{cm} pour le pulse dépolarisant de 30 ms à -45 mV semblent plus stables que les autres car ces valeurs n'ont pas subi la correction relative au courant ionique non-linéaire. Les losanges représentant le pulse à -20 mV montrent une légère augmentation de 8% 50-60 min après l'addition de BAPTA. Cette

petite augmentation n'est cependant pas significativement différente de l'augmentation de 11% en condition contrôle.

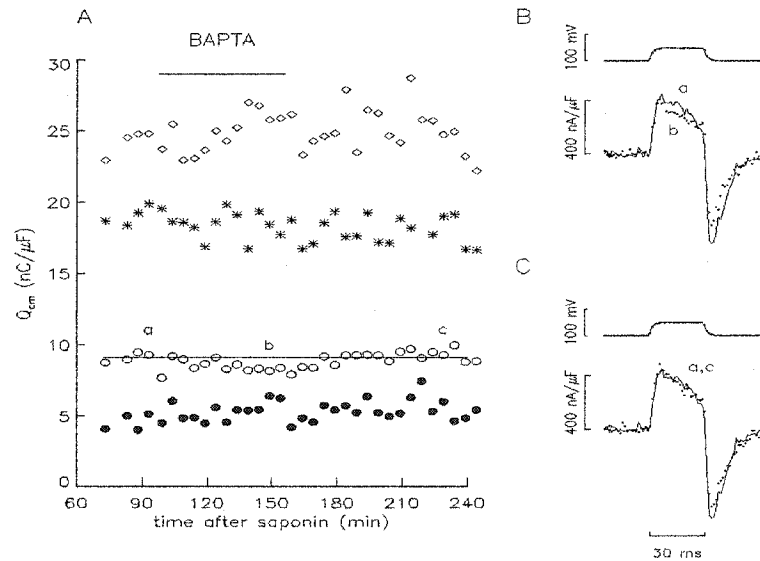


Figure 18. Effet du BAPTA sur les mouvements de charges intramembranaires. **A)** Graphique de Q_{cm} vs. temps après le traitement à la saponine. Les symboles en forme de cercles noirs, cercles blancs, étoiles, et losanges blancs représentent respectivement les Q_{cm} du pulse à -60, le petit pulse à -45, le long pulse à -45 et celui à -20 mV. Le trait horizontal indique la période pendant laquelle le BAPTA était présent dans la solution interne de cette expérience, qui est la même que celle des figures 16 et 17. À l'exception des valeurs obtenues pour le petit pulse de -45 mV, les valeurs des autres pulses ont été obtenues par l'intégrale de l'aire sous la courbe du signal de Q_{cm} correspondant à la fin du pulse. La ligne constante traversant les valeurs du petit pulse à -45 mV correspond à la moyenne des valeurs de Q_{cm} pour les stimulations en condition contrôle. Elle indique que les valeurs de Q_{cm} diminuent en présence du BAPTA et reviennent au niveau de base après le retrait du BAPTA de la solution interne. **B)** Les traces de Q_{cm} pour le pulse à -45 mV continues et pointillées représentent respectivement les périodes avant et 53 minutes après l'ajout du BAPTA. **C)** La trace continue est la même qu'en B), mais la trace pointillée a été obtenue 72 minutes après le retrait du BAPTA des compartiments latéraux. Les lettres "a", "b", et "c" correspondent aux mêmes stimulations qu'en A).

Contrairement aux deux derniers pulses (le long pulse à -45 mV et le pulse à -20 mV), les valeurs de Q_{cm} du petit pulse à -45 mV ont diminué de 12% durant la période en présence du BAPTA. Cette diminution de 12% est plus petite que l'augmentation de 3% en condition contrôle, quoique non statistiquement différente.

Le panneau en B montre les traces superposées de $I_{test}-I_{contrôle}$ associées au petit

pulse à -45 mV juste avant (trace continue) et environ 1 heure après l'ajout du BAPTA (trace pointillée). Le BAPTA diminue la composante Q_γ de $I_{\text{test}} - I_{\text{contrôle}}$, sans affecter la composante Q_β . Ceci peut être expliqué par le fait que le BAPTA inhibe le Q_γ sans affecter (ou seulement très peu) le Q_β . Comme le BAPTA ne semble pas affecter la quantité maximale de charges ou le nombre de charges totales durant le pulse à -45 mV, cela indique que le BAPTA diminue les effets du Ca sur la cinétique Q_γ (voir mécanismes rétroactifs du Ca de l'introduction). Cet effet du BAPTA sur le Q_γ est réversible, comme montré en C où la trace continue représente le $I_{\text{test}} - I_{\text{contrôle}}$ avant l'ajout du BAPTA et la trace pointillée représente le courant d'une stimulation effectuée 72 minutes après le retrait du BAPTA de la solution interne. Ces deux traces se superposent, indiquant que l'effet du BAPTA est réversible.

5.6 - RÉSUMÉ DES EFFETS DU BAPTA SUR LA LIBÉRATION DU Ca^{2+} ET SUR LE Q_{cm}

La Table 2 résume les effets du BAPTA sur la libération du Ca du RS en termes de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$, de charges intramembranaires (Q_{cm}) et de f_{Ca} .

		Before		After/before	
		Control	BAPTA	Control	BAPTA
1	$\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}} (\mu\text{M})$	2383 ± 117	2062 ± 187	0.73 ± 0.04	0.42 ± 0.06
2	$Q_{\text{ON}}(-45) (\text{nC } \mu\text{F}^{-1})$	4.70 ± 0.49	4.22 ± 0.96	1.03 ± 0.12	0.88 ± 0.10
3	$Q_{\text{OFF}}(-20) (\text{nC } \mu\text{F}^{-1})$	22.3 ± 2.5	16.6 ± 2.2	1.11 ± 0.07	1.08 ± 0.03
4	$f_{\text{Ca}}(-60)$	0.0212 ± 0.0027	0.0215 ± 0.0041	1.90 ± 0.25	1.54 ± 0.27
5	$f_{\text{Ca}}(-45)$	0.0642 ± 0.0210	0.0485 ± 0.0170	0.847 ± 0.050	0.400 ± 0.046

Values were obtained before and 50–60 min after exchanging the end-pool solution for one containing no BAPTA (control) or 8 mM BAPTA. Values are means \pm s.e.m. For control, $n = 5$; for BAPTA, $n = 7$. These values were obtained 80 min on average after saponin treatment in both the BAPTA and control experiments. $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$: maximum of $\Delta[\text{CaEGTA}]$ signal. $Q_{\text{ON}}(-45)$: integral of the $I_{\text{test}} - I_{\text{control}}$ signal during the short ON pulse to -45 mV. $Q_{\text{OFF}}(-20)$: estimate of the amount of charge from the OFF current following the pulse to -20 mV. $f_{\text{Ca}}(-60)$ and $f_{\text{Ca}}(-45)$: f_{Ca} at -60 and -45 mV, respectively. Average values before and 50–60 min after the solution change in the BAPTA experiments were: holding current, -44.8 and -64.1 nA; phenol red concentration, 1.07 – 1.97 mM; resting pH, 7.18 – 7.07 ; C_{app} , 0.0149 – 0.0159 μF ; r_b , 4.40 – 5.52 $\text{M}\Omega \text{cm}^{-1}$; c_m , 0.193 – 0.191 $\mu\text{F cm}^{-1}$. The corresponding values in the control experiment were -41.5 and -49.6 nA; 1.07 – 1.88 mM; 7.15 – 7.07 ; 0.0142 – 0.0142 μF ; 4.85 – 5.30 $\text{M}\Omega \text{cm}^{-1}$; and 0.182 – 0.175 $\mu\text{F cm}^{-1}$. With the exception of a small increase in C_{app} in the BAPTA experiments, none of these parameter values or changes in values with time were significantly different in the BAPTA vs. the control experiments.

Table 2.

Les expériences en condition contrôle et celles avec BAPTA avaient approximativement le même $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ avant le rinçage des compartiments latéraux. En effet, les valeurs de 2383 ± 117 et $2062 \pm 187 \mu\text{M}$ respectivement n'étaient pas significativement différentes. En condition contrôle, le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ a diminué à 0.73 fois sa valeur avant le rinçage des compartiments latéraux. En présence de BAPTA, 50-60 minutes après le rinçage, le $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ a diminué à 0.42 fois sa valeur (en moyenne) avant le rinçage.

En ce qui concerne le Q_{ONcm} ("ON" définissant la composante initiale sortante du courant dû au mouvement des charges intramembranaires, au début d'une dépolarisation) du petit pulse à -45 mV , le BAPTA a diminué les valeurs initiales de 12%, contrairement à l'augmentation après rinçage de 3% du Q_{ONcm} en condition contrôle. Quoique ces deux effets donnèrent des résultats non statistiquement différents, la diminution des valeurs de Q_{ONcm} due au BAPTA était typiquement observée. Le BAPTA a augmenté les valeurs de Q_{OFF} du pulse à -20 mV ("OFF" définissant la composante finale entrante de I_{cm}) de 8%, effet non significativement différent de l'augmentation de 11% en condition contrôle.

Les valeurs de f_{Ca} à -60 mV avant le rinçage étaient essentiellement pareilles pour les expériences contrôles et celles avec BAPTA. En effet, 0.0212 ± 0.0027 n'est pas significativement différent de 0.0215 ± 0.0041 . La table 2 indique aussi que le BAPTA n'a pas affecté le f_{Ca} à -60 mV , comme le montrent les valeurs de 1.90 ± 0.25 (contrôle) et 1.54 ± 0.27 (avec BAPTA).

Finalement, en ce qui concerne les valeurs de f_{Ca} à -45 mV pour les deux types d'expériences, ces valeurs ne diffèrent pas avant le rinçage. Cependant, contrairement aux valeurs à -60 mV , le BAPTA a significativement diminué les valeurs de f_{Ca} à -45

mV. Cette diminution statistiquement significative du f_{Ca} était de 0.400 ± 0.046 fois sa valeur avant le rinçage avec le BAPTA comparativement à une petite diminution de 0.847 ± 0.050 en condition contrôle.

6 - DISCUSSION

Deuxième projet

Le but de cette 2^e partie de mon projet de recherche était d'évaluer si oui ou non il existe un mécanisme Ca-dépendant responsable de l'augmentation de la libération de Ca du RS, seulement présent à de grandes dépolarisations. Pour se faire, la relation entre $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ myoplasmique et la perméabilité à la libération du Ca (ou f_{Ca}) à -45 mV comparativement à -60 mV a été étudiée. Une grande concentration de BAPTA (8 mM) a donc été introduite dans le myoplasme afin de moduler $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ à l'embouchure d'un canal de libération du Ca ouvert. Ces expériences complètent une série d'expériences effectuées plus tôt dans le laboratoire où la $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ myoplasmique était modulée par la variation de $[\text{Ca}_{RS}]$, toujours dans le but d'étudier le f_{Ca} à -45 mV vs. -60 mV.

6.1 - EFFETS DU BAPTA

Les résultats des expériences de ce projet indiquent que 8 mM BAPTA réduit significativement la perméabilité à la libération, estimée par le f_{Ca} , à -45 mV sans diminuer significativement le f_{Ca} à -60 mV (Table 2). Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme Ca-dépendant présent à de grandes dépolarisations. D'après les figures 16B et 17A, les expériences en présence du BAPTA n'ont pas retrouvé leurs valeurs de f_{Ca} de base, suite au retrait du BAPTA des compartiments latéraux. Ceci aurait pu être causé par le BAPTA n'ayant pas diffusé complètement par les extrémités de la fibre. Mais ceci ne semble pas être le cas car la diminution des valeurs de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ a cessé après que le BAPTA ait été retiré de la fibre (figure 16B). Il faut se rappeler que comme les valeurs de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ diminuent initialement même en absence de

BAPTA, un retour complet de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ aux valeurs initiales ne devraient pas être observé à la fin des expériences. Aussi, le délai observé dans les signaux de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ dû au BAPTA ainsi que la composante exponentielle lente associée à la redistribution du Ca allant du BAPTA à l'EGTA après le pulse, étaient des paramètres réversibles dans toutes les expériences avec BAPTA. Il semble donc que le BAPTA soit responsable d'une diminution irréversible des valeurs de $\Delta[\text{CaEGTA}]_{\text{MAX}}$ à -45 mV, même après son retrait du le myoplasme. Un autre effet relié au BAPTA est que ce tampon semble réduire la composante Q_γ du I_{cm} à -45 mV (figure 18B). En effet, le pouvoir tampon du BAPTA semble ralentir la cinétique de Q_γ , ce qui expliquerait la diminution de la partie initiale du signal de I_{cm} . Ainsi, une diminution de l'activation voltage-dépendante à -45 mV pourrait causer, en totalité ou en partie, la réduction du f_{Ca} à -45 mV.

En résumé, il n'est pas possible de conclure si c'est le pouvoir tampon du BAPTA pour le Ca, un changement irréversible et/ou une diminution de l'activation voltage-dépendante qui est en grande partie responsable de la diminution de la perméabilité à la libération à -45 mV en présence du BAPTA. Il est à noter que le BAPTA modifie l'amplitude et le temps de décours du signal de $\Delta[\text{CaEGTA}]$ dû à ses propriétés de tampon calcique (Table 2 et figure 16B et D). Mais le BAPTA n'a pas diminué le f_{Ca} à -60 mV comparativement à la condition contrôle, ce qui serait le cas si le BAPTA avait un effet pharmacologique ou toxique imprévisible. Ainsi, malgré ces incertitudes, les résultats en présence du BAPTA supportent l'existence d'une augmentation Ca-dépendante de la perméabilité à la libération à de grandes dépolarisations.

6.2 - COMPOSANTE D'ACTIVATION ADDITIONNELLE Ca-DÉPENDANTE PRÉSENTE À DE GRANDES DÉPOLARISATIONS.

Les résultats de cette partie complètent des résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire. Ces expériences antérieures avaient été menées en diminuant le $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ à l'embouchure d'un canal de libération ouvert en enlevant le Ca de la solution interne. Des courbes de la perméabilité vs. $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ avaient ensuite été obtenues à -60 et -45 mV (figure 19A). L'approche était de comparer le ratio de la perméabilité à -45 mV sur celle à -60 mV à des $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ physiologiques ($>1000 \mu\text{M}$), au ratio de la perméabilité à ces deux voltages lorsque $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ était $\cong 300 \mu\text{M}$ (au sommet de la courbe en cloche, figure 19C). A des valeurs de $[\text{Ca}_{\text{RS}}] < 300 \mu\text{M}$, les mécanismes rétroactifs Ca-dépendants sont grandement réduits et presque toutes les charges intamembranaires devraient avoir bougé à l'état stable (figure 19B). Alors à de petites $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$, le ratio de $f_{\text{Ca}}(-45\text{mV})/f_{\text{Ca}}(-60\text{mV})$ devrait refléter l'activation voltage-dépendante uniquement. Les résultats ont montré que le ratio de $f_{\text{Ca}}(-45\text{mV})/f_{\text{Ca}}(-60\text{mV})$ était plus grand lorsque $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ était $>1000 \mu\text{M}$ vs. lorsque $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ était $< 300 \mu\text{M}$. Le ratio plus élevé aux grandes valeurs de $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ pourrait être expliqué par la composante additionnelle de la libération du Ca seulement présente à de grandes dépolarisations.

Il avait aussi été observé que le signal de perméabilité atteignait son maximum très rapidement après le début du pulse à -45 mV (environ après 30 ms), AVANT que nombre total de charges ayant bougé n'ait atteint son maximum. De plus, à de grandes $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$, au moment où la perméabilité était maximale, le I_{cm} était associé à une composante Q_{γ} plus grande que la composante Q_{γ} aux petites $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$. Ainsi, au maximum de la perméabilité et à de grandes $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$, la cinétique de Q_{γ} était accélérée par le Ca, par

rétroaction positive. Mais cette augmentation de Q_r semblait insuffisante pour expliquer à elle seule le grand ratio de $f_{Ca}(-45mV)/f_{Ca}(-60mV)$ lorsque $[Ca_{RS}]$ était $>1000 \mu M$ vs. lorsque $[Ca_{RS}]$ était $< 300 \mu M$.

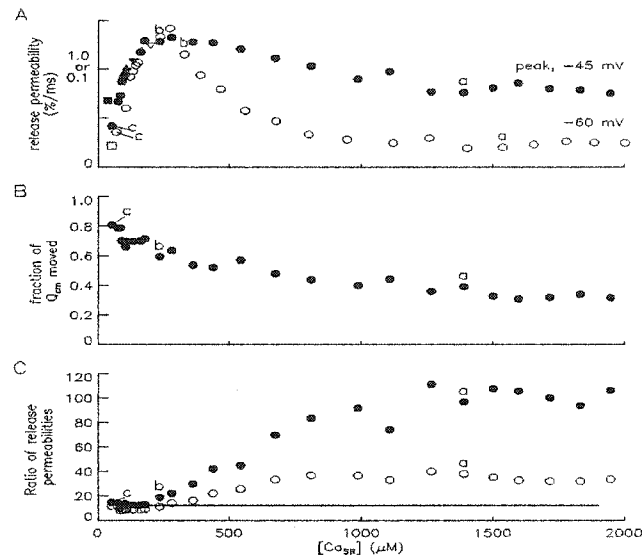


Figure 19. Perméabilité à la libération vs. $[Ca_{RS}]$ à -45 mV et à -60 mV. **A)** Les symboles noirs et blancs représentent des stimulations effectuées toutes les 5 minutes. Les symboles noirs représentent la perméabilité à -45 mV en fonction des valeurs de $[Ca_{RS}]$, ces deux valeurs étant obtenues au maximum du signal de $\Delta[Ca_T]/dt$. Les symboles blancs représentent aussi la valeur de la perméabilité à -60 mV en fonction $[Ca_{RS}]$, les deux valeurs étant obtenues dans ce cas-ci à partir des 100 dernières ms du pulse à -60 mV. Les axes de 0.1 et 1.0 sont pour les valeurs à -60 et à -45 mV respectivement. Les symboles en forme de triangles inversés sont des stimulations effectuées environ 1 minute avant la stimulation suivante, représentée par un carré. Les triangles suivant les carrés sont des stimulations effectuées 5 minutes après. Même si les pulses à -60 et -45 mV ont été effectués durant la même stimulation, les symboles ne sont pas alignés (c'est-à-dire que la $[Ca_{RS}]$ n'est pas la même pour les 2 pulses) car la concentration en Ca du RS est moindre pour un pulse à -45 vs. le pulse à -60 mV durant la même stimulation. Dans ces expériences, le Ca a été enlevé de la solution interne après les trois premières stimulations. **B)** Graphique de la fraction de Q_{cm} qui a bougé au maximum du signal de $\Delta[Ca_T]/dt$ à -45 mV, à l'état stable. **C)** Les cercles blancs représentent le ratio de la perméabilité à la libération à -45 mV sur celle à -60 mV comme en A, à partir de la même stimulation. Les cercles noirs représentent le même ratio, normalisé par la fraction de Q_{cm} qui a bougé, selon les valeurs obtenues au panneau B. La ligne horizontale représente ce ratio si seulement le voltage était impliqué dans le mécanisme de la libération (c'est-à-dire, si les processus Ca-dépendants sont éliminés) et a une valeur de 12.2.

Suite à ces observations, il avait tout de même été proposé que la diminution du f_{Ca} à -45 mV par le BAPTA (figure 17A) était due à la diminution du mécanisme Ca-

dépendant, responsable de l'augmentation du ratio des $f_{Ca(-45mV)}/f_{Ca(-60mV)}$ lorsque $[Ca_{RS}]$ était $>1000 \mu M$. Les expériences de cette deuxième partie de mon projet de recherche visaient donc à compléter ces résultats antérieurs selon lesquels une composante Ca-dépendante additionnelle était responsable de l'augmentation de la perméabilité à de grandes dépolarisations (-45 mV) et à de grandes $[Ca_{RS}]$, lorsque le degré d'activation des RyRs était à son maximum, et lorsqu'une petite fraction de charges intramembranaires avait bougé.

6.3 - AUGMENTATION DE LA PERMÉABILITÉ À LA LIBÉRATION PEUT-ÊTRE DUE À LA SOMME DU Ca DE 2 RyRs COUPLÉS, ET ACCÉLÉRATION DE LA CINÉTIQUE DE Q_r PAR LE Ca

La somme du Ca libéré par deux RyRs voisins activés en même temps par le voltage, et recrutant des canaux voisins par LCIC pourrait expliquer cette activation additionnelle de la libération à -45mV. La figure 20 modifiée de Shirokova *et al.* (1996), illustre comment ce mécanisme pourrait agir. Chaque panneau montre une rangée double de RyRs (cercles blancs), où un RyR sur deux est couplé à un capteur de voltage (illustré par un cercle identifié d'un "V"). Le panneau A illustre deux RyRs voisins activés par le voltage (entourés d'un carré blanc). Les courbes qui tendent vers la rangée double représentent les gradients de $\Delta[Ca^{2+}]$ de ces deux RyRs couplés et activés, en absence de BAPTA. La courbe médiane résulte de la somme des gradients de $\Delta[Ca^{2+}]$ si les deux RyRs sont ouverts en même temps. La ligne brisée horizontale représente un seuil d'activation hypothétique pour activer un RyR intermédiaire par LCIC (par le Ca venant des deux RyRs couplés). Au point médian entre les deux RyRs couplés, ce seuil hypothétique est au-dessus du gradient de $\Delta[Ca^{2+}]$ d'un seul RyR couplé, et juste en-

dessous de la somme des gradients des deux RyRs couplés. Ainsi, si les deux RyRs voltage-dépendants sont activés en même temps, un RyR voisin non couplé pourrait être activé par la somme de leurs gradients, par le mécanisme de LCIC. Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de la perméabilité à -45 mV et non observée à -60 mV, car à de grandes dépolarisations la probabilité que 2 RyRs couplés soient activés en même temps est plus élevée.

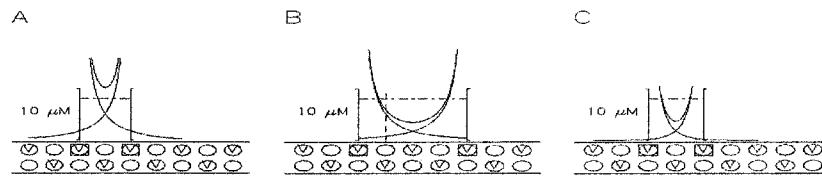


Figure 20. Effets de sommation et de 8 mM BAPTA sur le gradient de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ de canaux de libération du Ca du RS ouverts. **A)** Les deux rangées de cercles illustrent la disposition des RyRs dans la membrane du RS. Les canaux identifiés d'un "V" sont associés à un DHPR situé dans la membrane du tubule-t. Les canaux ouverts (activés) sont entourés d'un carré. Chacune des courbes qui tend vers la rangée double de cercles représente le gradient de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ venant d'un RyR ouvert, en présence de 20 mM d'EGTA seulement. Les courbes ont été calculées selon les équations B14 et B21 de Pape *et al.*, (1995) et avec les paramètres suivants: la constante de diffusion, $D_{\text{Ca}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; la constante de vitesse de réaction, $k_D = 0.025 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; la concentration de EGTA libre = 18.24 mM et le flux des ions Ca = $5 \cdot 10^5 \text{ ions s}^{-1}$. Il est à noter que l'état stable du gradient à l'embouchure d'un canal est atteint presque instantanément, de l'ordre de milliseconde. La courbe la plus haute représente la somme des deux courbes de gradients, si les deux canaux sont ouverts simultanément. La distance entre deux canaux est de 30 nm. La ligne horizontale pointillée est un seuil hypothétique d'activation de RyR par LCIC. **B)** Même que A, sauf que la distance entre les canaux activés par le voltage est plus grande. La ligne brisée verticale indique un RyR non couplé à un DHPR. **C)** Même que A, sauf que les calculs ont été faits avec 8 mM BAPTA, sans EGTA.

En B, les gradients de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ entre 2 RyRs couplés et séparés par 120 nm - la distance entre 2 RyRs étant d'environ 30 nm - est une situation plus représentative de ce qui pourrait se passer à -60 mV, en présence d'EGTA seulement. Comme le montre la

figure, la somme des gradients de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ de ces RyRs distancés est trop faible pour qu'un RyR voisin immédiat non couplé à un DHP soit activé (la ligne pointillée verticale montre ce RyR non couplé). Ainsi, même si ces deux RyRs éloignés sont activés en même temps par leurs DHPs respectifs (quoique la probabilité que cela se produise soit faible, à de faibles dépolarisations), la somme de leurs gradients de Ca est sous le seuil de $[\text{Ca}^{2+}]$ requis (ligne brisée horizontale) pour l'activation d'un RyR non couplé voisin, ce qui expliquerait le manque d'effet du BAPTA à -60 mV. En C, on voit qu'en présence de 8 mM de BAPTA, l'activation d'un RyR intermédiaire est impossible, même si ses voisins immédiats sont activés. En résumé, pour qu'un RyR non couplé soit activé par LCIC, une situation telle qu'illustrée en A est requise. Une fois ce RyR intermédiaire activé par LCIC, d'autres RyRs non-couplés voisins pourraient être recrutés par la somme de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ libéré par ces 3 RyRs par un processus de propagation qui pourrait mener au recrutement de plusieurs RyRs. Des résultats de modélisation (Stern *et al.*, 1997) ont proposé qu'une réponse de "tout ou rien" est évitée par l'inactivation de la libération du Ca par le Ca et/ou des "trous" périodiques observés dans la rangée double de RyRs dans la membrane du RS (Franzini-Armstrong *et al.*, 1999). Mais selon les hypothèses mentionnées ci-haut, il faut se rappeler que les RyRs couplés voisins doivent être stimulés et activés en même temps pour que ce mécanisme de propagation d'activation ait lieu.

Cependant, il existe un problème relié aux hypothèses énoncées plus haut: dans les expériences, le maximum du signal de la perméabilité coïncidait avec le moment où seulement une petite fraction des charges intramembranaires avait bougé, ce qui implique qu'une petite densité de RyRs étaient activés par le voltage. De plus, si les sites

d'activation de la libération du Ca voltage-dépendants sont distribués au hasard, la probabilité que 2 RyRs soient activés par le voltage en même temps devrait être très faible, même à de grandes dépolarisations. Mais selon Jong et collaborateurs (1995), une augmentation de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ libéré par des RyRs ouverts voisins à de grandes $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$ peut augmenter la cinétique de Q_{γ} . Ainsi, le Ca venant d'un RyR activé pourrait accélérer la cinétique de Q_{γ} d'un DHPR voisin qui activerait son RyR couplé, menant à l'activation de 2 RyRs couplés voisins.

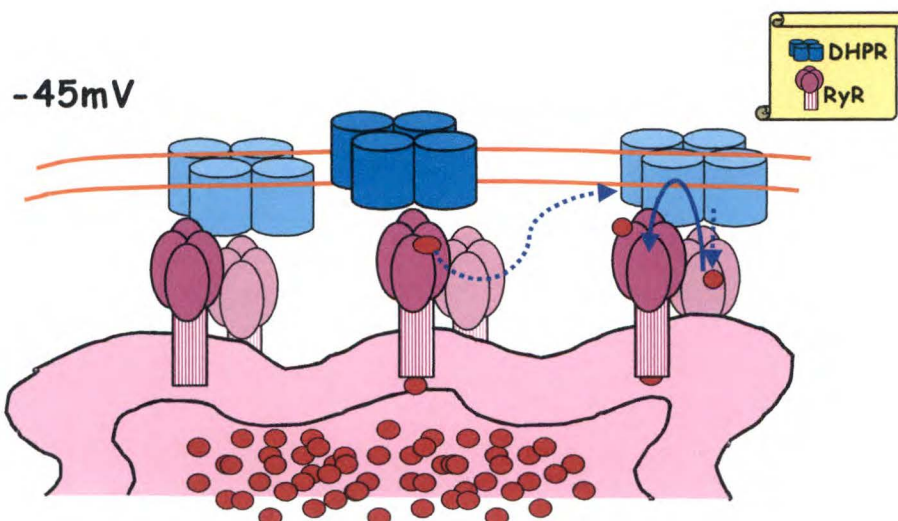
En résumé, une composante de la libération de Ca additionnelle Ca-dépendante était seulement présente à de grandes dépolarisations car la densité de RyRs couplés et activés était plus grande, mais aussi parce que le Ca pouvait accélérer la cinétique de Q_{γ} . A de grandes dépolarisations, le degré d'activation maximal des RyRs était atteint au moment où seulement une petite quantité de charges intramembranaires avaient bougé. Suivant cette observation, il semblait donc peu probable que même à de grandes dépolarisations, 2 RyRs couplés voisins soient activés en même temps. Il avait toutefois déjà été démontré que le Ca pouvait accélérer la cinétique de Q_{γ} à de grandes $[\text{Ca}_{\text{RS}}]$. Ainsi, comme une grande quantité de Ca avait été libérée à de grandes dépolarisations, ce Ca avait dû accélérer la cinétique de Q_{γ} , et augmenter de la perméabilité à -45 mV, même si seulement une petite partie des charges avaient bougé.

6.4 - POSSIBILITÉ SELON LAQUELLE LA COMPOSANTE ADDITIONNELLE À -45 mV N'IMPLIQUE PAS LES RyRs NON-COUPLÉS

L'hypothèse selon laquelle les RyRs couplés pourraient être partiellement activables par le Ca a déjà été suggérée. En effet, la sous-unité α_{1S} des DHPRs est formée de 4 répétitions à 6 domaines transmembranaires (figure 3) et donc 4 segments S_4 qui,

selon Jong et collaborateurs (1995) devraient tous passer à un état actif avant que le DHPR ne puisse ouvrir un RyR. Selon une étude récente de Pape et Carrier (2002), certaines charges Q_T bougent durant les périodes de transition entre l'état inactivé et activé des DHPRs, confirmant l'hypothèse de Jong et collaborateurs. Alors, il serait possible que durant ces transitions, le Ca se lie à l'un des sites d'activation du DHPR, ce qui remplacerait l'activation par le potentiel. Le résultat de cette combinaison d'activation par le voltage et par LCIC pourrait être augmentée par la libération du Ca venant d'autres RyRs couplés, eux-mêmes activés sans qu'une grande quantité de charges intramembranaires n'ait bougé.

Ainsi, les canaux non couplés ne seraient pas nécessaires à ce processus d'activation Ca-dépendant n'impliquant que les RyRs couplés, quoiqu'un contrôle minimal par le voltage serait nécessaire au recrutement de canaux couplés additionnels. Pour terminer, quel que soit le mécanisme impliqué, l'augmentation Ca-dépendante de la libération du Ca à des potentiels plus positifs semble importante pour qu'une fibre musculaire atteigne un niveau d'activation maximal durant un potentiel d'action.



RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES

En résumé, les résultats des expériences concernant le premier projet de recherche suggèrent qu'à de faibles dépolarisations, et sous des conditions expérimentales permettant l'isolation des sites de libération de Ca, un site de libération de Ca est constitué d'un RyR activé par son DHPR associé. Ceci implique que le mécanisme régissant la LCIC au niveau d'un tel site est un mécanisme d'autorégulation, selon lequel le Ca libéré par un RyR peut se lier sur ce même RyR pour activer la libération de Ca additionnel. Ces études ayant été conduites en voltage imposé sur des muscles de grenouilles pourraient être reproduites sur des fibres de mammifères, se rapprochant plus de l'anatomie des fibres musculaires humaines. De plus, des expériences en courant imposé pourraient nous informer sur l'importance de ce mécanisme, sous des conditions plus physiologiques.

Les expériences du deuxième projet proposent que la composante de libération de Ca additionnelle, observée seulement à de grandes dépolarisations et à de grandes concentration de Ca dans le RS, est due au recrutement de canaux voisins par LCIC. Ceci est possible car à de grandes dépolarisations, une plus grande densité de DHPRs est activée. De plus, il semble qu'un mécanisme d'accélération du mouvement de charges intramembranaires par le Ca soit impliqué pour permettre cette activation additionnelle. Comme ces études ont été effectués seulement à deux potentiels (-60 et -45 mV), il serait utile de refaire ces expériences sur une échelle de potentiels (par exemple, -80 à +40 mV) afin de savoir à partir de quelle valeur cette composante est observée. Il serait ainsi peut-être possible d'expliquer pourquoi LCIC n'est pas un mécanisme de "tout ou rien".

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier du fond du cœur mon professeur et mentor, le Dr. Paul C. Pape d'abord pour m'avoir accueillie pendant deux ans et demi dans son laboratoire. Ensuite pour m'avoir donné la chance de travailler avec lui pour me donner le bagage nécessaire à la poursuite d'études supérieures scientifiques. Et enfin, pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de mon cheminement. Mille fois merci!

J'aimerais ensuite remercier ma famille, mon pilier sans quoi les obstacles de la vie m'auraient paru insurmontables. Merci à Mamy, Papy et Poupette!

Il ne faudrait pas oublier ma formidable technicienne de laboratoire, Nicole Carrier, qui m'a appris les techniques de base, et avec qui j'ai développé une profonde amitié...

Enfin, je tiens à remercier tous les professeurs qui ont participé à ma formation d'étudiante-chercheuse, ainsi que mes collègues qui ont su mettre du piquant dans ma vie universitaire!!!

BIBLIOGRAPHIE

1. ADRIAN, R.H., et PEREZ, A. (1979). Charge movement and membrane capacity in frog muscle. *Journal of Physiology* **289**, 83-97.
2. ARMSTRONG, C.M., BENZANILLA, F.M., et P., HOROWICZ. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis(aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* **267**, 605-608.
3. BAYLOR, S.M., CHANDLER, W.K., et M.W. MARSHALL. (1983). Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibers estimated from arsenazo III calcium transients. *Journal of Physiology* **334**, 625-666.
4. BLOCK, B.A., IMAGAWA, T., CAMPBELL, K.P., et C. FRANZINI-ARMSTRONG. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* **107**, 2587-2600.
5. BORSOTTO, M., BARHANIN, J., FOSSET, M., et M., LAZDUNSKI. (1985). The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependant Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 14255-14263.
6. BRANDT, N.R., CASWELL, A.H., BRUNSCHWIG, J.P., KANG, J.J., ANTONIU, B., et N., IKEMOTO. (1992). Effects of anti-triadin antibody on Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **299**, 57-59.
7. CATTERALL, W.A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Reviews in Biochemistry* **64**, 493-531.
8. CHANDLER, W.K., et C.S., HUI. (1990). Membrane capacitance in frog cut twitch fibers mounted in a double Vaseline-gap chamber. *Journal of General Physiology* **96**, 225-256.
9. CORONADO, R., MORRISSETTE, J., SUKHAREVA, M., et D.M., VAUGHAN. (1994). Structure and fonction of ryanodine receptors. *American Journal of Physiology* **266**, C1485-C1504.
10. CURTIS, B.M., et W.A., CATTERALL. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**, 2113-2118.
11. DIAZ-MUNOZ, M., HAMILTON, S.L., KAETZEL, M.A., HAZARIKA, P., et J.R., DEDMAN. (1990). Modulation of Ca^{2+} release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa Calcimedine). *Journal of Biological Chemistry* **265**, 15894-15899.

12. EL-HAYEK, R., VALDIVIA, C., VALDIVIA, H., HOGAN, K., et R., CORONADO. (1993). Palmitoyl carnitine: Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine and related long chain fatty acid derivatives. *Biophysical Journal* **65**, 779-789.
13. ENDO, M. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews* **57**, 71-108.
14. FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology* **247** (*Cell Physiology* **14**) C1-C14.
15. FABIATO, A. (1984). Dependence of the Ca^{2+} -induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers from the frog semi-tendinosus on the rate of change of free Ca^{2+} concentration at the outer surface of the sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology* **353**, 56P (Abstract).
16. FELDMEYER, D., MELZER, W., POHL, B., et P., ZÖLLNER. (1992). Modulation of calcium current gating in frog skeletal muscle by conditioning depolarization. *Journal of Physiology* **457**, 639-653.
17. FÉNELON, K., et P.C., PAPE. (2002). Recruitment of Ca^{2+} release channels by calcium-induced Ca^{2+} release does not appear to occur in isolated Ca^{2+} release sites in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology* **544** (3), 777-791.
18. FORD, L.E., et R.J., PODOLSKY. (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* **167** (914), 58-59.
19. FRANZINI-ARMSTRONG, C., et A.O., JORGENSEN. (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annual Review of Physiology* **56**, 509-534.
20. FRANZINI-ARMSTRONG, C., et F. PROTASI. (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Reviews* **77**, 669-729.
21. FRANZINI-ARMSTRONG, C., PROTASI, F., et V. RAMESH. (1999). Shape, size and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and muscles. *Biophysical Journal* **77**, 1528-1539.
22. GRABNER, M., DIRKSEN, R.T., SUDA, N., et K.G., BEAM. (1999). The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the bi-directional coupling with the ryanodine receptor *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21913-21919.

23. HARAFUJI, H., et Y., OGAWA. (1980). Re-examination of the apparent binding constant of the ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N, N, N', N' tetraacetic acid with calcium around neutral pH. *Journal of Biochemistry* **87** (5), 1305-1312.
24. HILLE, B., et D.T. CAMPBELL. (1976). An improved Vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. *Journal of General Physiology* **67**, 265-293.
25. HIROTA, A., CHANDLER, W.K., SOUTHWICK, P.L., et A.S. WAGGONER. (1989). Calcium signals recorded from two new purpurate indicators inside frog cut twitch fibers. *Journal of General Physiology* **94**, 597-631.
26. HODGKIN, A.L., et P., HOROWICZ. (1960). Potassium contractures in single muscle fibers. *Journal of Physiology* **153**, 386-403.
27. HUI, C.S., et W.K. CHANDLER. (1990). Intramembranous charge movement in frog cut twitch fibers mounted in a double Vaseline-gap chamber. *Journal of General Physiology* **96**, 257-297.
28. HUI, C.S., et W.K. CHANDLER. (1991). Q_{β} and Q_{γ} components of intramembranous charge movement in frog cut twitch fibers. *Journal of General Physiology* **98**, 429-464.
29. IMAGAWA, T., SMITH, J.S., CORONADO, R., et K.P., CAMPBELL. (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 16636-16643.
30. IKEMOTO, N., ANTONIU, B., KANG, J.J., MESZAROS, L.G., et M., RONJAT. (1991). Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**, 5230-5237.
31. IRVING, M., MAYLIE, J., SIZTO, N.L., et W.K. CHANDLER. (1987). Intrinsic optical and passive electrical properties of cut frog twitch fibers. *Journal of General Physiology* **89**, 1-40.
32. JACQUEMOND, V., CSERNOCH, L., KLEIN, M.G., et M.F. SCHNEIDER. (1991). Voltage-gated and calcium-gated calcium release during depolarization of skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal* **60**, 867-873.
33. JENDEN, D.J., et A.S., FAIRHURST. (1969). The pharmacology of ryanodine. *Pharmacological Reviews* **21**, 1-25.
34. JONG, D.S., PAPE, P.C., et W.K. CHANDLER. (1995 a). Calcium inactivation of calcium release in cut frog muscle fibers that contain millimolar EGTA or fura-2. *Journal of General Physiology* **106**, 337-388.

35. JONG, D.S., PAPE, P.C., CHANDLER, W.K., et S.M., BAYLOR. (1993). Reduction of calcium inactivation of sarcoplasmic reticulum calcium release by fura-2 in voltage-clamped cut twitch fibers from frog muscle. *Journal of General Physiology* **102**, 333-370.
36. JONG, D.S., PAPE, P.C., et W.K. CHANDLER. (1995 *b*). Effect of sarcoplasmic reticulum calcium depletion on intramembranous charge movement in frog cut muscle fibers. *Journal of General Physiology* **106**, 659-704.
37. JOHNSON, B.D., BROUSAL, J.P., PETERSON, B.Z., GALLOMBARDO, P.A., HOCKERMAN, G.H., LAI, Y., SCHEUER, T., et W.A., CATTERALL. (1997). Modulation of the cloned skeletal muscle L-type Ca^{2+} channel by anchored cAMP-dependant protein kinase. *Journal of Neuroscience* **17**, 1243-1255.
38. KIRINO, Y., OSAKABE, M., SHIMIZU, H. (1983). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from fragmented sarcoplasmic reticulum: Ca^{2+} -dependant passive Ca^{2+} efflux. *Journal of Biochemistry* **94**, 1111-1118.
39. KLEIN, M.G., CHENG, H., SANTANA, L.F., JIANG, Y.H., LEDERER, W.J., et M.F., SCHNEIDER. (1996). Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* **379**, 455-458.
40. KNUDSON, C.M., STANG, K.K., MOOMAW, C.R., SLAUGHTER, C.A., et K.P., CAMPBELL. (1993). Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12646-12654.
41. KUSHMERICK, M.J., et R.J. PODOLSKY. (1969). Ionic mobility in muscle cells. *Science* **166**, 1297-1298.
42. LACERDA, A.E., KIM, H.S., RUTH, P., PEREZ-REYES, E., FLOCKERZI, V., HOFMANN, F., BIRNBAUMER, L., et A.M., BROWN. (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* **352** (6335), 527-530.
43. LAI, F.A., ERICKSON, H.P., ROUSSEAU, E., LIU, Q.-Y., et G., MEISSNER. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* **331** (6154), 315-319.
44. LAMB, G.D. (1993). Ca^{2+} inactivation, Mg^{2+} inhibition and malignant hyperthermia. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **14**, 554-556.
45. LISMAN, J.E., et J.A. STRONG. (1979). The initiation of excitation and light adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *Journal of General Physiology* **73**, 219-243.

46. MA, J., FILL, M., KNUDSON, C.M., CAMPBELL, K.P., et R., CORONADO. (1988).
47. Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* **242**, 99-102.
48. MAYLIE, J., IRVING, M., SIZTO, N.L., et W.K. CHANDLER. (1987). Comparison of arsenazo III optical signals in intact and cut frog twitch fibers. *Journal of General Physiology* **89**, 41-81.
49. MARTELL, A.E., et R.M. SMITH. (1974). Critical Stability Constants. Vol 1. *Amino Acids*. Plenum Publishing Corp., New York. 469 pp.
50. MEISSNER, G. (1984). Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **159**, 1365-1374.
51. MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology* **56**, 485-508.
52. MEISSNER, G., DARLING, E., et J., EVELETH. (1986). Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides. *Biochemistry* **25**, 236-244.
53. MEISSNER, G., et A., EL-HASHEM. (1992). Ryanodine as a functional probe of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *Molecular and Cellular Biochemistry* **114**, 119-123.
54. MELZER, W., HERRMANN-FRANK, A., et H. Ch. LÜTTGAU. (1995). *Biochimica et Biophysica Acta* **1241**, 59-116.
55. NAGASAKI, K. et M., KASAI. (1983). Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence. *Journal of Biochemistry* **94**, 1101-1109.
56. NAGASAKI, K. et M., KASAI. (1984). Channel selectivity and gating specificity of calcium-induced calcium release channel in isolated sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biochemistry* **96**, 1769-1775.
57. NAKAI, J., ADAMS, B.A., IMOTO, K., et K.G., BEAM. (1994). Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1014-1018.
58. NAKAI, J., DIRKSEN, R.T., NGUYEN, H.T., PESSAH, I.N., BEAM, K.G., et P.D., ALLEN. (1996). Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* **380**, 72-75.

59. NAKAI, J., TANABE, T., KONNO, T., ADAMS, B., et K.G., BEAM. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24983-24986.
60. ORLOVA, E.V., SERYSHEVA, I.I., VAN HEEL, M., HAMILTON, S.L., et W., CHIU. (1996). Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel. *National Structural Biology* **3**, 547-552.
61. PAPE, P.C. (1990). pH in cut frog muscle fibers. *Biophysical Journal* **57**, 347A (ABSTRACT).
62. PAPE, P.C., JONG, D.-S., CHANDLER, W.K., et S.M. BAYLOR. (1993). Effect of fura-2 on action-potential stimulated calcium release in cut twitch fibers from frog muscle. *Journal of General Physiology* **102**, 295-332.
63. PAPE, P.C., JONG, D.-S., et W.K. CHANDLER. (1995). Calcium release and its voltage dependence in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *Journal of General Physiology* **106**, 259-336.
64. PAPE, P.C., JONG, D.-S., et W.K. CHANDLER. (1996). A slow component of intramembranous charge movement during sarcoplasmic reticulum calcium release in frog cut muscle fibers. *Journal of General Physiology* **107**, 79-101.
65. PAPE, P.C., et N. CARRIER. (1998). Effet of sarcoplasmic reticulum (SR) calcium content on SR calcium release elicited by small voltage-clamp depolarizations in frog cut skeletal muscle fibers. *Journal of General Physiology* **112**, 161-179.
66. PAPE, P.C., et N. CARRIER. (2002a). Calcium release and intramembranous charge movement in frog skeletal muscle fibers with reduced (< 250 μ M) calcium content. *Journal of physiology* **539** (1), 253-266.
67. PAPE, P.C., FÉNELON, K., et N. CARRIER. (2002b). Extra activation component of calcium release in frog muscle fibres. *Journal of physiology* **542** (3), 867-886.
68. PEREZ-REYES, E., KIM, H.S., LACERDA, A.E., HORNE, W., WEI, X.Y., RAMPE, D., CAMPBELL K.P., BROWN, A.M., et L., BIRNBAUMER. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* **340**, 233-236.
69. PROENZA, C., O'BRIEN, J., NAKAI, J., MUKHERJEE, S., ALLAN, P.D., et K.G., BEAM. (2002). Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha 1S Cav1.1 II-III loop. *Journal of biological chemistry* **277** (8), 6530-6535.

70. RÍOS, E., et G. BRUM. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* **325**, 717-720.
71. RÍOS, E., et G. PIZARRO. (1988). Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *News in Physiological Sciences* **3**, 223-227.
72. RÍOS, E., et M.D. STERN. (1997). Calcium in close quarters: microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**, 47-82.
73. ROUSSEAU E., PINKOS, J., et D., SAVARIA. (1992). Functional sensitivity of the native skeletal Ca^{2+} -release channel to divalent cations and the Mg-ATP complex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **70**, 394-402.
74. SAITO, A., INUI, M., WALLS, J.S., et S., FLEISCHER. (1989). Mass measurement of the feet structures/calcium release channel of sarcoplasmic reticulum by scanning transmission electron microscopy (STEM). *Biophysical Journal* **55**, 206a.
75. SCHNEIDER, M.F., et W.K. CHANDLER. (1973). Voltage-dependant charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-246.
76. SCHNEIDER, M.F., et B.J. SIMON. (1988). Inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology* **405**, 727-745.
77. SCHWARTZ, L.M., McCLESKEY, E.W., et W., ALMERS (1985). Dihydropyridine receptors in muscle are voltage-dependant but most are not functional calcium channels. *Nature* **314**, 747-751.
78. SHIROKOVA, N., GARCIA, J., PIZARRO, J., et E., RÍOS. (1996). Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *Journal of General Physiology* **107**, 1-18.
79. SMITH, P.D., LIESEGANG, G.W., BERGER, R.L., CZERLINSKI, G., et R.J., PODOLSKY. (1984). A stopped-flow investigation of calcium ion binding by ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N' tetraacetic acid. *Analytical Biochemistry* **143** (1), 188-195.
80. SMITH, J.S., CORONADO, R., et G. MEISSNER. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: activation of Ca^{2+} , ATP, and modulation by Mg^{2+} . *Journal of General Physiology* **88**, 573-588.
81. SMITH, J.S., ROUSSEAU, E., et G., MEISSNER. (1989). Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circulation Research* **64**, 352-359.

82. STERN, M.D. (1992). Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* **13**, 183-192.
83. STERN, M.D., PIZARRO, G., et E. RÍOS. (1997). Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Journal of General Physiology* **110**, 415-440.
84. STROFFEKOVA, K., et J.A. HEINEY. (1997). Triadic Ca^{2+} modulates charge movement in skeletal muscle. *General Physiology and Biophysics* **16**, 59-77.
85. SUMBILLA, C., et G., INESI. (1987). Rapid filtration measurements of Ca^{2+} release
86. from cisternal sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Letters* **210**, 31-36.
87. SUTKO, J.L., et J.A. AIREY. (1996). Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiological Reviews* **76**, 1027-1071.
88. TRIPATHY, A., et G. MEISSNER. (1996). Sarcoplasmic reticulum luminal Ca^{2+} has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophysical Journal* **70**, 2600-2615.
89. TSIEN, R.W., et R.Y. TSIEN. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Review of Cell Biology* **6**, 715-760.
90. TSIEN, R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons, design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396-2404.
91. VERGARA, J., TSIEN, R.Y., et M., DELAY. (1985). Inositol 1,4,5-triphosphate: A possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6352-6356.
92. VOLPE, P., SALVIATI, G., DiVIRGILIO, F., et T., POZZAN. (1985). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* **316**, 347-349.
93. WAGENKNECHT, T., et M., RADERMACHER. (1995). Three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Letter* **369**, 43-46.
94. WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R., FRANK, J., SAITO, A., INUI, M., et S., FLEISCHER. (1989). Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* **338**, 167-170.
95. ZHOU, J., CRIBBS, L., YI, J., SHIROKOV, R., PEREZ-REYES, E., et E., RÍOS. (1998). Molecular cloning and functional expression of a skeletal muscle

dihydropyridine receptor from *Rana catesbeiana*. *Journal of Biological Chemistry* 273 (39), 25503-25509.

Annexe 1

Fénelon, K., & Pape, P. C. (2002). Recruitment of Ca²⁺ release channels by calcium-induced Ca²⁺ release does not appear to occur in isolated Ca²⁺ release sites in frog skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 544(3), 777-791.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026658>

Annexe 2

Pape, P. C., Fénelon, K., & Carrier, N. (2002). Extra activation component of calcium release in frog muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 542(3), 867-886.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.017095>