

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

Caractérisation et étude des propriétés
des canaux potassiques unitaires des cellules
isolées du coeur de mammifère, en cultures primaires.

par

Eric Rousseau

M.Sc. - Docteur de 3ième cycle

Département de Biophysique

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

de l'Université de Sherbrooke

en vue de l'obtention du grade de

PHILOSOPHIAE DOCTOR

(Ph.D. en Biophysique)

7 octobre 1985



Sherbrooke, Québec, Canada

LIVRES
RARES

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-33516-5

Ne paraissez point si savant, de grâce humanisez votre discours et parlez pour être entendus.

Molière

Critique de l'école des
femmes.
Scène 7.

A CRISTELLE
et A GHYSLAINE,
gens de mon ... foyer

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le Docteur Elena Ruiz-Ceretti, Directrice du Département de Biophysique de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke, lors de mon arrivée.

Je remercie également le Docteur Jean-Pierre Caillé, actuel Directeur du Département de Biophysique, pour avoir accepté la Présidence de mon jury de thèse de Ph.D. Ses remarques ont été une constante source de réflexions. Elles ont souvent suscité des discussions impromptues au cours de mon séjour.

Le présent travail a été réalisé sous la direction du Docteur Marcel Daniel Payet. Je tiens notamment à lui exprimer ici toute ma reconnaissance pour m'avoir suivi et guidé tout au long de ces trois années.

Je voudrais exprimer ma gratitude au Docteur Gabor Szabo, du Département de Physiologie et de Biophysique de l'Université du Texas, branche médicale à Galveston, et au Docteur Raynald Laprade, Directeur du Groupe de Recherche en Transport Membranaire (GRTM), membre du Département de Physique de la Faculté des Sciences de l'Université de Montréal, d'avoir bien voulu accepter d'évaluer ce mémoire.

Les réflexions, les suggestions et les critiques du Docteur Remy Sauvé du (GRTM), Département de Physiologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, ont été d'une aide précieuse. Sa compétence et sa collaboration n'ont fait que favoriser l'approche difficile que constitue l'analyse des signaux électriques des canaux unitaires.

Je me dois également de remercier l'ensemble des Professeurs du Département de Biophysique pour les remarques et les questions qu'ils m'ont adressées.

Quant à celles de mon collègue et ami, le Docteur Jean-Louis Schwartz, de la division des Sciences Biologiques du Conseil de Recherche Scientifique du Canada à Ottawa, elles ont été une source constante de motivation et l'expression concrète d'une collaboration scientifique et technique efficace.

Je remercie de façon unanime l'ensemble des membres du département, étudiants, chercheurs, techniciens et secrétaires, pour leur amical soutien, malgré mon caractère parfois entier!

Enfin, je ne peux passer sous silence l'assistance hospitalière que m'ont procurée mes amis Benarrous, lors de mes escapades scientifiques à Montréal; ou bien encore celle de ma belle-famille, lors de mes retours nocturnes.

Ce manuscrit a été réalisé avec soin et efficacité par Madame Carmen Labrecque Nolet.

Quant au support financier de ce travail, il a été assuré la première année par une bourse de la Fondation de la Recherche Médicale (France) et les deux années suivantes par une bourse de la Fondation Canadienne des Maladies du Coeur.

TABLE DES MATIERES

| | <u>page</u> |
|--|-------------|
| REMERCIEMENTS | iii |
| TABLE DES MATIERES | vi |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | x |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES | xiii |
| RESUME | xv |
| | |
| CHAPITRE I - INTRODUCTION | 2 |
| | |
| CHAPITRE II - ASPECTS HISTORIQUES ET CONCEPTUELS | 8 |
| 1. De l'étude des courants potassiques | 8 |
| 2. Notion de transporteur et de canal ioniques | 14 |
| | |
| CHAPITRE III - MATERIELS ET METHODES | 22 |
| 1. Matériel biologique | 22 |
| A. Choix de la préparation | 22 |
| B. Protocole d'isolement et de mise en culture retenu | 24 |
| 2. Composition des solutions | 30 |
| A. Solutions physiologiques | 30 |
| B. Solutions de remplissage des micropipettes | 31 |
| 3. Dispositif d'enregistrement | 34 |
| A. Montage général | 34 |
| B. Les différentes configurations d'enregistrement . | 36 |

| | <u>page</u> |
|--|-------------|
| C. Les micropipettes | 38 |
| D. L'amplificateur | 39 |
| E. Le stimulateur | 41 |
| F. La visualisation des signaux | 42 |
| G. Le stockage et la digitalisation des données | 43 |
| 4. Analyse des données expérimentales | 44 |
| A. L'analyse des enregistrements a pour but de dé- terminer l'amplitude, la probabilité pour le canal d'être ouvert, la durée moyenne des temps ouverts et des temps fermés | 44 |
| B. Le programme "ACQUIR" | 45 |
| C. Le programme "HISTO" | 46 |
| D. Le programme "FIT" | 47 |
| E. Le programme "EXAMIN" | 47 |
| F. Le programme "JUMPS" | 48 |
| CHAPITRE IV - RESULTATS EXPERIMENTAUX | 53 |
| 1. Excitabilité des cellules isolées mises en culture .. | 53 |
| A. Activité électrique cellulaire | 53 |
| B. Interférence des potentiels d'action pendant l'enregistrement de l'activité des canaux unitaires | 57 |
| 2. Enregistrement des courants globaux | 59 |
| A. Introduction | 59 |
| B. Protocole | 60 |
| C. Résultats | 61 |

| | <u>page</u> |
|---|-------------|
| 3. Mise en évidence de différents types de canaux K^+ dans la membrane des cellules cardiaques | 66 |
| A. Introduction | 66 |
| B. Protocole | 67 |
| C. Observations | 68 |
| 4. Enregistrement de l'activité du canal de type I en fonction de la concentration potassique externe et du potentiel | 75 |
| A. Introduction | 75 |
| B. Protocoles | 75 |
| C. Résultats - Activité du canal | 76 |
| D. Résultats - Conductance du canal | 81 |
| E. Résultats - Sélectivité et perméabilité du canal. | 84 |
| F. Discussion | 91 |
| 5. Etude des propriétés statistiques du canal | 92 |
| A. Introduction | 92 |
| B. Résultats | 94 |
| C. Discussion | 97 |
| 6. Etude de la cinétique du canal | 101 |
| A. Introduction | 101 |
| B. Résultats - Evaluation des constantes de temps .. | 102 |
| C. Résultats - Evaluation des constantes de vitesse | 105 |
| D. Discussion | 108 |

| | <u>page</u> |
|---|-------------|
| 7. Etude du comportement du canal pendant des impulsions de voltage | 109 |
| A. Introduction | 109 |
| B. Résultats | 110 |
| C. Discussion | 117 |
| 8. Mode d'inhibition fonctionnelle du canal | 122 |
| A. Introduction | 122 |
| B. Etude du comportement du canal sous l'action de la 4.A.P. | 123 |
| C. Bloquage du canal par le Cs | 131 |
| D. Influence du barium sur l'activité du canal de type I | 146 |
| 9. Essais de l'acetylcholine pendant les enregistrements unitaires | 152 |
| A. Introduction | 152 |
| B. Résultats | 153 |
| C. Conclusions | 155 |
| CHAPITRE V - DISCUSSION GENERALE | 158 |
| CONCLUSION | 169 |
| BIBLIOGRAPHIE | 171 |
| ANNEXE 1 | 196 |

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

| | | <u>page</u> |
|--------------|--|-------------|
| Figure No 1 | Cellules ventriculaires de rat nouveau-né en culture. | 27 |
| Figure No 2 | Cellules ventriculaires de rat nouveau-né en culture. | 29 |
| Figure No 3 | Diagramme fonctionnel du dispositif d'enregistrement et de traitement des signaux. | 35 |
| Figure No 4 | Schéma des différentes configurations d'enregistrement des signaux. | 37 |
| Figure No 5 | Schéma des circuits équivalents des différentes fonctions de l'amplificateur (DAGAN 8900). | 40 |
| Figure No 6 | Exemple de "listing" du programme "HISTO". | 48 |
| Figure No 7 | Exemple d'analyse des signaux unitaires. | 49 |
| Figure No 8 | Exemple d'activités électriques cellulaires contemporaines de potentiels d'action. | 54 |
| Figure no 9 | Exemple d'interférence entre l'enregistrement des signaux unitaires d'un fragment de membrane en "cell attached" et les P.A. générés par le reste de la membrane cellulaire. | 58 |
| Figure no 10 | Courant sodique rapide enregistré en configuration "whole cell recording". | 62 |
| Figure no 11 | Courants entrants enregistrés en hyperpolarisation. | 65 |
| Figure no 12 | Exemple de différents patrons d'activités de canaux unitaires. | 69 |
| Figure no 13 | Enregistrements unitaires multicanaux. | 73 |
| Figure no 14 | Exemple d'enregistrement réalisé en 5.4 mM de KCl + 144.5 mM NaCl dans la micropipette pour différents potentiels transmembranaires. | 77 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Figure no 15 | Exemple d'enregistrement réalisé en 50 mM de KCl + 100 mM NaCl dans la micropipette pour différents potentiels transmembranaires. | 78 |
| Figure no 16 | Exemple d'enregistrement réalisé en 75 mM de KCl + 75 mM NaCl dans la micropipette pour différents potentiels transmembranaires. | 79 |
| Figure no 17 | Exemple d'enregistrement réalisé en 150 mM de KCl dans la micropipette pour différents potentiels. | 80 |
| Figure no 18 | Courbes courant/voltage pour différentes concentrations potassiques dans la micropipette et valeur des conductances calculées sur la partie linéaire des courbes. | 82 |
| Figure no 19 | Comportement du canal de type I pendant des rampes de voltage. | 83 |
| Figure no 20 | Evaluation de la perméabilité relative et de la conductivité du canal en fonction de $[K]_o$. | 86 |
| Figure no 21 | Saturation du canal et constante de dissociation apparente du K. | 90 |
| Figure no 22 | Effet du potentiel sur la P_o et sur le courant moyen à travers le canal en fonction de $[K]_o$. | 95 |
| Figure no 23 | Distribution des temps d'ouverture et de fermeture du canal de type I. | 103 |
| Figure no 24 | Valeurs des constantes de temps en fonction du potentiel et de $[K]_o$. | 104 |
| Figure no 25 | Valeurs des constantes de vitesses recalculées pour un modèle C-O-C en fonction du potentiel et de $[K]_o$. | 107 |
| Figure no 26 | Comportement du canal pendant des variations de potentiel. | 111 |
| Figure no 27 | Comportement du canal pendant des impulsions dépolarisantes de grande amplitude. | 113 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Figure no 28 | Probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert à la rupture des impulsions test en fonction du potentiel pendant ces impulsions (potentiel conditionnant). | 115 |
| Figure no 29 | Enregistrement de l'activité du canal de type I sous l'action de la 4.A.P. pour différentes valeurs de potentiel transmembranaire. | 124 |
| Figure no 30 | Courbe I/V et temps moyens d'ouverture et de fermeture du canal en présence de 4.A.P. | 126 |
| Figure no 31 | Diminution de la P_0 par la 4.A.P., et taux d'inhibition par la 4.A.P. en fonction du potentiel. | 128 |
| Figure no 32 | Enregistrement de l'activité du canal de type I en présence de 75 mM de KCl + 75 mM de NaCl + 0.5 mM de CsCl. | 132 |
| Figure no 33 | Bloquage de l'activité du canal de type I par le Cs. | 133 |
| Figure no 34 | Aspects des enregistrements pendant les temps d'ouverture du canal en présence de Cs. | 136 |
| Figure no 35 | Courbe I/V en présence de Cs. | 138 |
| Figure no 36 | Distribution des temps d'ouverture et des temps de fermeture en présence de Cs. | 141 |
| Figure no 37 | Valeur des constantes de temps déterminées lors de l'action du césium en fonction du potentiel. | 143 |
| Figure no 38 | Enregistrement de l'activité du canal en présence de barium. | 148 |
| Figure no 39 | Courbe I/V en Ba^{2+} et en Ach. | 151 |
| Figure no 40 | Activité unitaire induite par l'acétylcholine. | 154 |
| Tableau No 1 | Agents bloqueurs des canaux K. | 13 |
| Tableau No 2 | Composition des solutions utilisées pour le remplissage des micropipettes. | 33 |

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

| | |
|------------|---|
| A.A.: | acide aminé |
| Ach: | acetylcholine |
| 4 A.P.: | 4 amino pyridine |
| C.A.: | courant d'action |
| D: | diamètre |
| E_K : | potentiel d'équilibre au potassium |
| E_m : | potentiel de membrane |
| fc: | fréquence de coupure |
| fd: | fréquence de digitalisation |
| F: | constante de FARADAY |
| G: | conductance macroscopique |
| H.P.: | potentiel de maintien |
| i: | courant du canal unitaire |
| Ic: | courant capacitif |
| Icl: | courant chlore |
| I_{Kl} : | courant potassique macroscopique indépendant du temps |
| I_{Na} : | courant sodique rapide |
| I_{si} : | courant calcico-sodique lent |
| I/V: | courbe courant voltage |
| k: | constante de vitesse |
| Keq: | constante d'équilibre |
| n: | nombre de mesures |
| P.A.: | potentiel d'action |
| P_{Ca} : | perméabilité au calcium |
| P_K : | perméabilité au potassium |
| P_o : | probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert |

| | |
|------------------------------|---|
| P_{Na} : | perméabilité au sodium |
| R: | constante des gaz parfaits |
| R_e : | résistance extracellulaire |
| R_{fb} : | résistance de "feedback" |
| R_i : | résistivité du milieu intracellulaire |
| R_{inp} : | résistance d'entrée |
| R_m : | résistance membranaire |
| R_s : | résistance de "seal" ou de "shunt" |
| $t_{1/2}$: | temps de demi-vie moyen |
| t_o : | temps d'ouverture moyen |
| t_f : | temps de fermeture moyen |
| t: | température |
| T: | période |
| TTX: | tétradotoxine |
| V_p : | voltage appliqué dans la pipette |
| W.C.R.: | configuration "Whole cell recording" |
| $\tau_o \approx \tau_{op}$: | constante de temps des événements passés dans l'état ouvert |
| $\tau_f \approx \tau_{cl}$: | constante de temps des événements passés dans l'état fermé |
| Δ : | variation ou différence de ... |
| γ : | conductance unitaire |
| \emptyset : | diamètre |
| $[]_i$: | concentration intracellulaire |
| $[]_o$: | concentration extracellulaire |
| λ : | inverse de τ |

RESUME

Le but du travail présenté dans ce mémoire, était d'étudier le mode de fonctionnement d'un canal unitaire potassique.

Il a été précédé par la mise au point d'une technique d'isolation et de mise en culture primaire des cellules ventriculaires de coeur de mammifère (rats nouveau-nés). La seconde partie technique du travail a consisté à adapter la méthode de "patch clamp" proposée par HAMILL et coll., en 1981, à l'étude des canaux ioniques unitaires et aux courants macroscopiques des cellules cardiaques.

Ceci nous a permis de montrer l'existence de plusieurs types de canaux K à la surface de ces cellules. Malgré leur faible densité ($1 \text{ canal}/\mu\text{m}^2$) ces canaux ioniques transmembranaires doivent être groupés par petits nombres de 2 à 6 unités, en particulier pour ceux de type I, pour lesquels les enregistrements de type multi-canaux sont très souvent observés par rapport au petit nombre d'expériences où un seul canal est actif dans les fragments de membrane testés. Ce canal de type I, sur lequel s'est focalisé l'ensemble de l'étude, a été défini comme étant un canal plutôt sélectif au K bien qu'il laisse perméer des ions Na avec un rapport de perméabilité de $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 0.056$. Ce canal a la propriété de s'activer quand la membrane est dépolarisée, ce qui correspond à une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal P_o en dépolarisation. D'autre part, la courbe courant/voltage du canal unitaire semble rectifier d'autant plus drastiquement que la concentration externe de K est élevée.

Il a également été montré que l'ion perméant pouvait influencer la conductance unitaire et le "gating" du canal. En effet, la propriété du canal à conduire les ions et son aptitude à passer dans l'état conducteur (état ouvert) augmente en fonction de $[K]_o$. La conductance du canal est un phénomène saturable qui rappelle les propriétés des systèmes enzymatiques. Une constante de dissociation apparente $K_D = 100 \text{ mM}$ a été

évaluée pour le K pour une conductance maximale: $\gamma_{\max} = 50$ pS avec $[K]_o^{\infty} \approx 500$ mM.

Ce travail a permis de montrer que le Na aurait un effet facilitateur sur la conductance pour les $[K]_o$ faibles.

Le canal étudié a également la propriété intrinsèque de rectifier dans le sens entrant. Une série d'expériences a permis de montrer que le comportement global du canal pendant des impulsions de potentiels, dépendait du voltage avant et après les transitions. Ces expériences ont également permis de montrer que la propriété de rectification du canal était une caractéristique du canal dans l'état ouvert, et que cette rectification était un phénomène instantanément réversible en fonction du voltage qui correspond à une modification de la propriété de conduction du "pore".

La cinétique du canal a été étudiée en détail à partir d'un modèle à 3 états de type C-O-C en fonction du potentiel transmembranaire et de la $[K]_o$.

Les effets d'inhibiteurs, tels que la 4.A.P., le Cs et le Ba, ont permis de montrer différents modes d'inhibition fonctionnelle de ce type de canal.

Enfin, les canaux de type I ne sont pas sensibles à l'acetylcholine un activateur connu de certains types de canaux K.

Citation

"What drives life ..., is a little electric current, kept up
by the sunshine."

Albert SZENT GYORGYI
Prix Nobel de Biochimie

C H A P I T R E I

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'étude des propriétés électriques des êtres, des organismes et des tissus vivants a, de tout temps, intrigué, pour ne pas dire excité, la curiosité et l'imagination des savants, (GALVANI 1737-1798), puis plus tard celle des scientifiques. Comme dans bien des domaines, l'évolution des connaissances a toujours été liée au brassage des idées, à l'amélioration des techniques d'investigation, donc au niveau de résolution atteint, en définitive, à l'émergence de concepts nouveaux pour expliquer les phénomènes observés.

Le présent travail concerne l'étude des propriétés électriques des structures biologiques unitaires qui sous-tendent l'activité électrique des membranes des cellules cardiaques isolées en culture. Il a été réalisé dans une période de renouveau aussi bien sur le plan technique, avec l'avènement d'une méthodologie nouvelle, que sur le plan scientifique en ce qui a trait à l'analyse et aux concepts qui se rattachent aux processus biophysiques étudiés.

C'est la publication d'une technique nouvelle par HAMILL et coll., en 1981, suite à une série de travaux préliminaires publiés par NEHER et SAKMANN (1978); SIGWORTH et NEHER (1981), qui a augmenté la résolution à laquelle les électrophysiologistes pouvaient prétendre pour étudier les courants ioniques des membranes des cellules (excitables ou non).

Il était désormais possible d'étudier de façon élégante l'activité d'un seul canal ionique d'une petite portion de membrane.

Il était également possible d'étudier le courant global résultant de l'activation d'une population de canaux de l'ensemble de la membrane d'une cellule isolée. Les cellules interrogées pouvaient être de petite taille, tel que des globules rouges ($< 8 \mu\text{m}$) et provenir de n'importe quel tissu (SCHROEDER et coll., 1984), ce qui conférait à la méthode sa grande versatilité, sa relative simplicité et sa puissance résolutive.

La principale caractéristique de l'activité des canaux unitaires réside dans le fait que les transitions entre les différents états, apparaissent de façon aléatoire. L'analyse de l'apparition et de la durée des événements devra donc se faire en terme de probabilité.

Le caractère stochastique de ces activités a changé radicalement le mode d'analyse des signaux électrophysiologiques par rapport à ce qui était proposé classiquement ainsi que l'approche théorique des problèmes à résoudre.

L'objectif du présent travail a été de caractériser et d'étudier les propriétés électriques des canaux unitaires K^+ des cellules cardiaques isolées en culture primaire.

Les courants potassiques globaux jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de repos et dans les phases de repolarisation des potentiels d'action des cellules cardiaques ainsi que dans les

phases de dépolarisations diastoliques.

De nombreuses études en "voltage-clamp" ont démontré la nature hétérogène des courants potassiques transmembranaires que cela soit sur la fibre auriculaire (LENFANT et coll., 1972, 1983), sur les fibres de Purkinje (McALLISTER et NOBLE, 1966; CARMELIET et RAMON, 1980) ou des cellules ventriculaires (BEELER et REUTER, 1970a,b,c).

L'utilisation d'inhibiteurs souvent peu spécifiques rendait difficile l'étude des mécanismes d'activation, d'inactivation et de désactivation de ces courants. Les méthodes utilisées limitaient l'étude de certaines propriétés telles que la conductance, la sélectivité, les processus de rectification, de blocage ou d'inhibition.

Dans le but de mieux comprendre les processus moléculaires qui sous-tendent les différentes propriétés, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences en "patch clamp". Différents mécanismes et modèles cinétiques seront envisagés et discutés.

Suite aux premiers travaux sur l'étude des canaux unitaires activés par neurotransmetteurs (NEHER et coll., 1978), les canaux potassiques voltage-dépendant ont été étudiés sur différents types de préparations, les myocytes de rats (OHMORI et coll., 1981), les oeufs d'oursins (FUKUSHIMA, 1981, 1982), les cellules HeLa (SAUVE et coll., 1983). En 1982, DE FELICE et CLAPHAM montraient l'existence d'un canal K qui s'active pour des voltages positifs sur les amas ventriculaires de coeur d'embryon de poulet. MOMOSE et coll. (1984), sur les cellules

atriales de coeur de grenouille et SAKMANN et coll. (1983), sur des cellules nodales de coeur de mammifère montraient également qu'il existait également des canaux K activés par l'acetylcholine (Ach).

Deux études plus complètes sur les propriétés de rectification des canaux potassiques donnaient des résultats contradictoires: au niveau des cellules isolées de l'oreillette de cobaye, BECHEM et coll. (1983) montraient que c'était la probabilité d'ouverture faible pour des potentiels positifs qui était apparamment responsable de la rectification. Alors que sur des cellules ventriculaires en culture, SAKMANN et TRUBE (1984a) montraient que c'était la courbe courant/voltages du canal qui rectifiait, la probabilité d'ouverture augmentant pour les potentiels plus positifs.

Les deux éventualités étant plausibles pour expliquer les phénomènes de rectifications observés au niveau macroscopique.

Nous serons donc amenés à considérer la propriété des courants potassiques à rectifier dans le sens entrant en terme de conductances unitaires et de probabilités d'ouverture du canal.

L'influence des variations de la concentration K externe sur la conductance et la sélectivité du canal sera évaluée.

Afin de mieux comprendre le mode de fonctionnement d'un canal unitaire, son comportement sera étudié pendant des rampes et des impulsions de voltage.

Les différents modes d'inhibition fonctionnelle ont retenu notre attention dans le but de mieux cerner le mode d'action de certaines substances et pour préparer l'étude des propriétés électropharmacologiques de certaines drogues telles que les antidisrythmiques et autres substances cardio-actives.

Citation

"Philosophically, it is curious that random numbers which are the purest expression of our ignorance, should underline our ability to gain new knowledge of complex systems."

A.K. DEWDNEY
Scientific American
(April 1985)

C H A P I T R E I I

CHAPITRE II

ASPECTS HISTORIQUES ET CONCEPTUELS

1. De l'étude des courants potassiques.

C'est JULIUS BERNSTEIN en 1902 qui fut le premier à postuler une perméabilité sélective aux ions potassium pour les membranes des cellules excitables. Et comme B. HILLE le suggère en 1984: "le crédit d'avoir ouvert la route à la découverte des canaux potassiques peut lui être accordé".

Les perméabilités potassiques ont longtemps été étudiées de façon indirecte à partir de l'étude des modifications des potentiels d'action (WEIDMAN, 1956).

A la même époque, les Anglais de l'école de Cambridge commençaient à poser les bases de la théorie ionique du potentiel de repos (P.R.) et des potentiels d'action (P.A.) des structures excitables (HODGKIN, 1951).

En 1952, HODGKIN et HUXLEY publiaient leurs travaux sur la description quantitative des courants ioniques Na et K et leurs implications dans les phénomènes d'excitation et de conduction des fibres nerveuses. Leurs travaux s'appuyaient sur des expériences réalisées sur l'axone géant de calmar à l'aide de la technique de voltage imposé, COLE (1949) et MARMONT (1949).

Le principe de cette technique, qui consiste à contrôler le voltage et à mesurer le courant, a été appliqué dans différentes configurations. En "double sucrose-gap", STAMPFLI (1954) étudie les courants ioniques globaux de la fibre nerveuse. Puis la technique fut adaptée aux structures multicellulaires telles que les trabécules auriculaires de coeur de grenouille (ROUGIER et coll., 1969) puis aux fibres musculaires lisses utérines (MIRONNEAU et LENFANT, 1971). L'application de cette méthode de mesure avait un bon nombre d'inconvénients intrinsèques qui limitaient la résolution en amplitude, en temps et en fréquence: (JOHNSON et LIBERMAN, 1971). En particulier au niveau du coeur, où le contrôle du voltage des préparations multicellulaires est approximatif du fait de l'existence des résistances séries créées par l'interstitium et d'un isolement électrique insuffisant ($2 \text{ M}\Omega$).

En double microélectrodes, la technique de "voltage clamp" a été très utilisée pour étudier les propriétés passives des membranes, (WEIDMAN, 1956) et les courants ioniques des fibres de Purkinje, en particulier ceux de cinétique lente, (DECK et coll., 1964; NOBLE, 1979), et des cellules ventriculaires (BEELER et REUTER, 1970a,b,c).

Les études concernant les différentes composantes des courants globaux ont permis de distinguer, outre les composantes sodiques et calciques, plusieurs types de courants potassiques. Les composantes anioniques, telles que celles au chlore, ont été plus difficiles à mettre en évidence (CARMELIET, 1961).

Les différents courants transportés par les ions potassiques peuvent être résumés comme suit:

Le courant potassique retardé rectifiant dans le sens sortant appelé "delayed outward rectifier". Il est en partie responsable de la brièveté des P.A. courts sur les axones, les motoneurones, et les fibres musculaires rapides. Il est bloqué par l'action du T.E.A.

Le courant potassique sortant transitoire qui influence la fréquence des décharges de P.A. des neurones de mollusques (CONNOR et STEVENS, 1971). Mais ce courant qui, depuis, a été décrit sur d'autres préparations, a la propriétés de s'activer et de s'inactiver très vite. Il est bloqué par la 4-Amino-Pyridine (4.A.P.) (THOMPSON, 1977). Dans la nomenclature des courants potassiques, le terme IA lui est généralement réservé.

Le courant potassique, dépendant de la concentration de calcium intra-cellulaire libre. Le terme, impropre d'ailleurs, de " GK_{Ca} " lui est généralement réservé. Des études récentes ont montré que ce n'était pas la conductance mais le "gating" du canal qui était affecté par les variations de $[Ca^{2+}]_i$ (VERGARA et LATORRE, 1983).

Ce courant fut tout d'abord décrit sur certains types de neurones qui avaient la propriété de générer des salves de potentiels. L'activation de ce type de conductance a été mise en rapport avec les variations cycliques de calcium intracellulaire libre (MEECH et STANDEN, 1975).

Depuis, l'introduction des techniques de "patch clamp" des canaux K dont l'activation est sous la dépendance du $[Ca^{2+}]_i$ libre, ont été décrits sur pratiquement toutes les structures excitables ou non: cellules β du pancréas (COOK et coll., 1984), cellules HeLa (SAUVE et coll., 1984).

La plupart des cellules qui possèdent des GK_{Ca} n'ont pas la propriété de "pacemaker". Bien qu'en général cette conductance serve à repolariser la membrane après une période d'entrée transitoire de Ca^{2+} , elle peut éventuellement servir à hyperpolariser les cellules. Mais, dans la plupart des cas, sa fonction physiologique réelle reste à élucider.

L'étude de la micro-cinétique de ce type de canaux a été entreprise par de nombreux groupes (LATORRE et coll., 1982; MAGLEBY et PALLOTA, 1983), mais elle semble complexe et de nombreux schémas cinétiques ont été proposés pour rendre compte des patrons de transitions observés. L'apamine, l'une des toxines de venin d'abeilles, serait un inhibiteur spécifique de ce type de conductance (HUGUE et coll., 1982a,b), bien qu'il existe une GK_{Ca} Apamine résistante sur les cellules β du pancréas (LEBRUN et coll., 1983).

Les courants potassiques rectifiant dans le sens entrant, appelés "inward rectifiers". Dans ce cas, il existe plusieurs types de courants K rectifiant de façon anormale (\approx anomalie) tel que KATZ (1949) les a définis, par opposition à la rectification retardée dite "normale". Particulièrement bien décrits par ADRIAN (1969) sur les fibres musculaires squelettiques de grenouille et par HAGIWARA et coll. (1979) sur les membranes d'oeufs d'oursin. Les premières observations concluaient à une diminution de la conductance globale pendant le plateau des P.A.

Leurs propriétés singulières permettent de les distinguer des autres courants potassiques. Les expériences menées au niveau des canaux unitaires depuis quelques années ont permis de les définir: leur probabilité d'ouverture est grandement dépendante du potentiel polarisant.

Leur "gating", ou processus de changement d'état, est dépendant du potentiel. Il est déplacé par la concentration K externe ($[K]_o$) sur l'axe des voltages. D'autre part, la rectification semble être un phénomène rapide qui dépendrait plus de $E-E_K$ que E seul. Bien que des expériences montrent que $\Delta[K]_i$ n'ait pas le même effet (HAGIWARA et YOSHII, 1979).

Au niveau du coeur, il semble qu'il puisse exister 2 types de canaux K^+ rectifiant dans le sens entrant: ceux de l'oreillette de cobaye décrits par BECHEM et coll. (1983) dont la rectification s'expliquerait par une diminution de la probabilité d'ouverture pour des potentiels très positifs. Ces canaux s'activeraient en hyperpolarisation.

D'autre part, SAKMANN et TRUBE (1984a,b) ont récemment décrit au niveau des cellules ventriculaires un type de canal K dont la conductance intrinsèque semble rectifier, alors que la probabilité d'ouverture augmente en dépolarisation.

Nous serons amenés à discuter nos résultats en fonction de ces deux types de comportements. Ce type de "rectifier" correspondant sur le coeur au courant décrit par NOBLE (1979) et CARMELIET (1982) et généralement appelé I_{K1} .

Il semble pouvoir être bloqué par les cations mono- ou divalents tels que le cesium ou le barium. Voir le tableau récapitulatif des bloqueurs des différents courants K des structures excitables emprunté à HILLE (1984).

TABLE 1. BLOCKING AGENTS FOR POTASSIUM CHANNELS

| Potassium channel | Acting from outside | Acting from inside | Membrane-permeant |
|-------------------|---|---|--|
| Delayed rectifier | TEA Cs ⁺ , H ⁺ , Ba ²⁺ | TEA and QA Cs ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺ Ba ²⁺ | 4-Aminopyridine Strychnine Quinidine |
| K(Ca) | TEA Cs ⁺ Apamin | TEA Na ⁺ | Quinidine |
| A | TEA | TEA | 4-Aminopyridine Quinidine |
| Inward rectifier | TEA Cs ⁺ , Rb ⁺ , Na ⁺ , Ba ²⁺ , Sr ²⁺ | H ⁺ | ? |

Abbreviations: TEA, tetraethylammonium; QA, quaternary ammonium ions related to TEA.

TABLEAU I. AGENTS BLOQUEURS DES CANAUX K.
(D'APRES HILLE, 1984).

Un autre type de courant qui semble essentiellement transporté par les ions K et qui a été décrit par DIFRANCESCO (1981) sous le vocable I_f , équivalent à I_h tel que décrit par NOMA et IRISAWA (1976) sur les cellules pacemaker du coeur de lapin. Ce courant s'activerait en dépolarisation pour des potentiels assez négatifs compris entre -110 et -65 mV. Il serait en partie responsable de la phase de dépolarisation diastolique des cellules "pacemaker" du coeur.

2. Notion de transporteur et de canal ionique.

Au-delà de la mesure et de la caractérisation des différents courants ioniques transmembranaires, il était légitime de se demander quelles étaient les structures biologiques (ou biochimiques) responsables de ces transferts de charges à travers la matrice lipidique et d'imaginer leur mode de fonctionnement (SINGER et NICHOLSON, 1972; HOFFMAN, 1966). Les physiologistes ont, depuis longtemps, défini deux grands types de mécanismes pouvant rendre compte des transferts de charges à travers les membranes: ceux sous la dépendance de transporteurs ou "carriers", et ceux sous la dépendance de canaux ou "pores". La discrimination entre les deux mécanismes étant basée sur des critères quantitatifs, c'est-à-dire du nombre de charges transportées par unité de temps.

Le concept de transporteur est plus que vraisemblable et généralement bien admis pour expliquer différents types d'échanges. Mais les mécanismes moléculaires restent encore à démontrer, bien que de nombreuses éventualités aient été envisagées pour rendre compte du mode de fonctionnement des pompes et autres systèmes d'échange ou de co-transport (BERTHELOOT, 1984).

Ces transporteurs étaient vus comme des molécules protéiques liposolubles effectuant un véritable transbordement d'éléments ou des petites molécules à travers les membranes biologiques. Actuellement, les "carriers" sont plus conçus comme des protéines insérées dans la membrane et capables d'exposer alternativement des sites d'affinité

sélective vers les milieux intra- et extracellulaires. Ces structures auraient en fait une mobilité restreinte.

Le vocable "pore" au sens large a été employé depuis longtemps pour qualifier les structures membranaires qui modulaient le passage de l'eau, des ions et autres petites molécules (DANIELLI et DAVSON, 1935). Mais ce n'est que depuis quelques années que certaines de ces structures ont été isolées par des techniques biochimiques et que leurs propriétés ont été étudiées par des méthodes biophysiques (STEVENS, 1972).

Actuellement les canaux ioniques sont connus comme étant des macromolécules transmembranaires de nature protéique. Ceci, grâce aux techniques de marquages sélectifs à l'aide d'agents chimiques, pharmacologiques, de toxines animales ou végétales (LAZDUNSKI et RENAUD, 1982).

Ils sont dotés de propriétés qui rappellent celles des enzymes (saturation, sélectivité). Ils catalysent le passage des ions. Cet effet facilitateur débouchera sur la notion de conductance, c'est-à-dire l'aptitude du canal à conduire les ions ($\approx 10^6$ à 10^9 ions par seconde).

De la saturation se dégagera la notion de site "d'affinité" et différents modes d'inhibition pourront être envisagés. Ces différentes notions ont été passées en revue par LATORRE et MILLER en 1983.

Toutes ces propriétés peuvent être modulées par des facteurs physiques tels que: la température, l'osmolarité, le potentiel... Par des facteurs chimiques: le pH, la concentration, et par des facteurs

biologiques: hormones, neurotransmetteurs (NEHER et SAKMANN, 1976, 1978).

Le concept physique de canal ionique n'est pas trivial à concevoir du fait, certainement, des propriétés dynamiques des interactions moléculaires et atomiques. Depuis le début des années 1960, les études menées consécutivement sur les membranes biologiques, les microvésicules, et sur les différents modèles de membranes artificielles ont contribué à améliorer les connaissances et la compréhension des différents mécanismes envisageables. Par exemple, les liposomes et les bicouches lipidiques planes permettent de ré-inclure des molécules ayant la propriété de former des canaux ioniques comme la gramicidine (SZABO, 1981), ou l'alaméthicine (HALL et coll., 1984), ou plus récemment, des protéines canal isolées des membranes biologiques (CORONADO et coll., 1984; BELL et MILLER, 1984).

La structure physique servant de "canal" est envisagée comme étant une région de la protéine "tapissée" de groupements polaires, portée par les résidus d'acides aminés (A.A.), dont certains peuvent être marqués sélectivement s'ils sont accessibles. Par exemple, l'arginine chargée positivement est marquée sélectivement par le phénylglyoxal, qui inhibe ainsi la perméabilité aux anions.

Mais la stéréochimie de ces zones qui favorisent le passage des charges mobiles, n'est que peu, ou pas connue. Bien que différentes ébauches ont récemment été tentées dans des cas simples, par l'étude des valeurs de conductance de différentes molécules de gramicidine de synthèse pour lesquelles certains A.A. ont été substitués (MAZET et coll., 1984).

Quant aux ions, ils passeraient à travers les canaux à l'état partiellement déshydraté (MULLINS, 1959). Le principal argument qui permet d'étayer cette hypothèse est sans aucun doute l'énorme quantité d'énergie qu'il faudrait fournir à l'ion pour qu'il passe la membrane à l'état complètement déshydraté. Cependant une déshydratation de l'ion par étapes peut être envisagée; dans ce cas les molécules d'eau seraient remplacées séquentiellement par les ligands du pore. Des taux de réaction très rapides peuvent être atteints, de l'ordre de 10^8 s^{-1} . Ces phénomènes ne sauraient donc limiter que la diffusion aqueuse.

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le passage des ions. Suite aux travaux théoriques de HECKMANN (1972) sur la "single file diffusion", HILLE et SCHWARZ, en 1978, ont proposé le concept de "multi-ions single file pore" qui prédit que le canal est occupé par plus d'un ion à la fois et que ceux-ci se déplacent par sauts à la suite les uns des autres sur les sites vacants en fonction de paramètres énergétiques tels que les barrières d'énergie, le potentiel et les répulsions électrostatiques. Plus récemment EISENMAN et HORN (1983), dans un article de revue ont publié une conception théorique plus générale et plus dynamique du canal dans l'état ouvert. Elle est connue sous le nom de "rate theory". Schématiquement, cette théorie assume l'existence de barrières d'énergie multiples et dissymétriques, à travers lesquelles les puits d'énergie correspondraient à des sites sur lesquels interagiraient les ions perméants. Ils ne sont pas forcément tous de la même espèce. Dans ces conditions, les notions de sélectivité, de rapport de perméabilité et de conductance perdent de leur importance. Car le fait d'avoir intégré le facteur temps oblige à décrire les canaux en d'autres termes. Combien existe-t-il de barrières d'énergie? Où sont-elles placées dans le champ de potentiel? Quelle est la sélectivité de chaque barrière? ...

Dans un premier temps, ce modèle prend uniquement en compte les "séquences" qui peuvent avoir lieu pendant que le canal est dans l'état ouvert. En un mot, il fait abstraction de l'influence de l'ion perméant sur la cinétique de changement d'état du canal: le "gating". Alors qu'il existe actuellement de nombreuses indications selon lesquelles la concentration d'ions susceptibles de perméer est capable d'affecter le mécanisme de "gate" qui fait basculer le canal vers un état conducteur (MARCHAIS et MARTY, 1979; FREHLAND, 1980; JUNGE, 1982).

Le second aspect évoqué lors de l'étude du mode de fonctionnement des canaux ioniques c'est le processus de "gate", c'est-à-dire du mécanisme qui fait passer le canal d'un état non conducteur (fermé) à l'instant "t" à un état conducteur (ouvert) à l'instant $t+\Delta t$.

Les techniques qui permettent d'étudier les canaux au niveau unitaire ne procurent aucune information directe sur ce qui se passe pendant la transition ou sur ce qui la conditionne. Mais le fait de pouvoir mesurer les temps moyens d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_f) permet dans les cas simples, de déterminer la constante d'équilibre du système K:

$$\begin{array}{ccc}
 & k_1 & \\
 0 & \rightleftharpoons & C \\
 & k_2 &
 \end{array}$$

$$K = \frac{\tau_o}{\tau_f} = \frac{k_2}{k_1}$$

K équivaut au rapport k_2/k_1 des constantes de vitesse du système. Elle peut également s'exprimer en terme de probabilité,

$$K = \frac{P_o}{1-P_o}$$

Pour des raisons certainement pédagogiques, il est convenu, depuis les premiers travaux sur les propriétés des canaux ioniques, de faire une discrimination entre les mécanismes de "gate", c'est-à-dire changement de conformation de la protéine, et la conduction qui est l'aptitude de la protéine à laisser passer les ions.

En fait, d'un point de vue dogmatique, il est tout-à-fait possible, comme cela a été proposé par FREHLAND (1979) et repris par LAUGER (1983), que les transitions entre les différents états conformationnels de la protéine canal puissent être couplés à la translocation des ions à l'intérieur de ce dernier. Dans ce cas, la perméabilité du canal dépendrait expressément des constantes de vitesse de changement de conformation.

D'un point de vue pratique, ces mécanismes moléculaires ayant un caractère aléatoire, il sera souhaitable d'étudier le comportement des canaux ioniques en terme de probabilité. Par exemple, à un voltage donné le courant moyen dans le canal sera: $\langle I \rangle = P_o \cdot i$. C'est-à-dire la probabilité que le canal soit dans l'état ouvert, P_o , par la valeur de l'amplitude (moyenne) du courant du canal unitaire, i . Dans ces conditions, il sera possible d'étudier les propriétés d'activation, d'inactivation et de désactivation du canal considéré. Ce qui reviendra à se poser la question de savoir si les propriétés statistiques des signaux observés sont stationnaires ou non en fonction du temps et du potentiel.

Un processus stationnaire aura des propriétés statistiques indépendantes du temps; qui est susceptible de se répéter après une certaine période T (COLQUHOUN et HAWKES, 1983).

Un processus non-stationnaire aura une probabilité qui évoluera en fonction du temps et ne se répètera pas après une période T (ALDRICH et YELLEN, 1983).

Ces deux notions très générales serviront à classer les canaux ioniques en deux grandes catégories. Les canaux qui ont des propriétés statistiques stationnaires en fonction du temps et ceux aux propriétés non stationnaires. Cependant, cette tentative de classification ne résout pas de façon définitive les problèmes inhérents à la nomenclature des canaux ioniques. Car ils diffèrent également par le ou les types d'ions transportés par leurs valeurs de conductance, et par les agents modulant leurs activités.

Citation

"Les méthodes sont les habitudes de l'esprit, et les économies de la mémoire."

RIVAROL

C H A P I T R E I I I

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

La méthode utilisée et son adaptation à l'étude des canaux unitaires des cellules cardiaques isolées a déjà fait l'objet d'un document audio-visuel (ROUSSEAU, 1984). Ce chapitre du mémoire en précisera et actualisera les différents aspects.

1. Matériel biologiqueA. Choix de la préparation.

En physiologie, le choix de la préparation a toujours été un problème délicat, voire même crucial, face aux divers impératifs à respecter. Ce choix pose le problème du "modèle expérimental" qui devrait être simple et suffisamment général pour permettre une bonne compréhension des résultats obtenus et éventuellement répondre à des questions plus générales posées en physio-pathologie humaine.

Le scientifique expliquera que toutes les cellules sont construites avec les mêmes matériaux et fonctionnent sur les mêmes processus fondamentaux. Mais il existe une grande variation dans l'expression de ces derniers et dans leurs régulations en fonction des espèces et des tissus biologiques. L'étude de l'expression du code génétique en est certainement un bon exemple.

En biophysique, il sera souhaitable de choisir des systèmes simples où le maximum de paramètres seront connus ou contrôlés.

Dans notre cas, il s'agissait de trouver une préparation cardiaque dont les cellules étaient faciles à isoler et à mettre en culture et dont la géométrie se prêtait aux impératifs techniques du contrôle spatial du potentiel. En particulier dans la configuration "whole cell recording", où il est possible d'enregistrer les courants globaux générés au niveau de la membrane cellulaire, il est impératif d'avoir des cellules sphériques et de petites tailles.

De plus, il était souhaitable de prendre une préparation simple et suffisamment bien caractérisée d'un point de vue électrophysiologique (SCHANNE et coll., 1983; PAYET et coll., 1980).

Notre choix s'est porté sur les cellules ventriculaires du coeur de rat nouveau-né. Ces cellules sont de petite taille, généralement sphériques après l'isolement et résistantes à l'hypoxie.

Leur mise en culture primaire est relativement aisée bien qu'il nous aura fallu quelque temps pour améliorer la quantité et la qualité des isolats. Les travaux antérieurs menés par différentes équipes (MASSON-PEVET et coll., 1976; JACOBSON et coll., 1977), ainsi que ceux menés au département sur la mise en culture d'amas de cellules (FERMINI et coll., 1985) ont permis une approche comparative pour définir des conditions d'isolement et de culture optimums.

B. Protocole d'isolement et de mise en culture retenu.

Ce protocole est donné de façon détaillée pour pouvoir être recon-
duit par d'autres expérimentateurs.

Matériaux requis:

- . 10 rats nouveaux-nés de 24 à 28 heures.
- . Collagénase type I et II Worthington.
- . Solution de McEwen: 0 Ca^{2+} (25 ml + glucose)
- . 1 paire de gants.
- . 1 boîte de Petri de 8 cm Ø.
- . 2 paires de ciseaux et une pince.
- . Tubes à centrifuger.
- . 10 petites boîtes de Petri.
- . Pipettes Pasteur, 5 et 10 ml.
- . Seringues de 1 et de 5 ml.
- . 1 filtre millipore 0.22 μm de Ø.
- . 1 lame de bistouri
- . Milieu de culture: M.E.M.-d-VALINE (préparé
avec différentes concentrations de S.F.B.)
- . Pénicilline/streptomycine (Pen/strep)
- . Sérum foetal bovin (S.F.B.)

Tous ces éléments
doivent être
stériles.

- Prélèvement des apex myocardiques.

Cette opération se fait dans une chambre de prélèvement stérile.
Les rats sont décapités aux ciseaux, près de la ceinture scapulaire.
Une pression sur la cage thoracique suffit à faire apparaître le coeur

dont la partie apicale est prélevée et déposée dans la boîte de Pétri contenant 5 ml M.E.M-d-Valine + 1% de pénicilline/streptomycine.

L'isolement cellulaire: Toutes les manipulations, autres que l'agitation, se font sous une hotte stérile.

- Les apex sont émincés avec une lame de bistouri et rincés dans la même solution que précédemment.

- Une solution de collagénase à 0.1% est préparée (25 ml de McEWEN 0 [Ca⁺] + 0.025 g de collagénase), passée sur filtre millipore (0.22 µm) à l'aide d'une seringue et stockée dans un tube à centrifuger.

- Les morceaux de tissu sont transférés à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml dans un autre tube à centrifuger dans lequel sont rajoutés 3 ml de solution de collagénase.

- Le tube est fermé et mis à agiter pendant 20 minutes dans un Dubnoff réglé à 40 cycles par minute et thermostaté à 37°C.

- Le premier surnageant est rejeté, il en sera de même du second, car ils contiennent beaucoup de cellules sanguines et de débris.

- Remettre 3 ml de solution de collagénase pré-incubée.

- Agiter pendant 10 minutes.

- Prélever et stocker le surnageant.

- Répéter ces trois dernières opérations 5 fois de suite.

Remarque: Dans le but d'augmenter le rendement de l'isolation, il est possible d'aspirer lentement les petits morceaux de tissu et leur surnageant dans une pipette de 10 ml à une ou deux reprises après la dernière digestion enzymatique. La turbidité permet une dissociation tardive mais efficace des cellules.

- A chaque fois, le surnageant contenant les cellules est déposé dans un tube à centrifuger contenant 25 ml de milieu de culture M.E.M-d-Valine + 1% de pénicilline streptomycine + 15% S.F.B.

- Ce tube est centrifugé à 100 g (\approx 820 r.p.m.) pendant 10 minutes.

- Le surnageant est éliminé.

- Le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 ml de M.E.M-d-Valine + 1% pen/strep. + 15% S.F.B.

- 8 boîtes de Petri ($\emptyset = 2.5$ m) sont préparées avec 2 ml de solution M.E.M-d-Valine + 1% pen/strep. + 15% S.F.B.

- La suspension cellulaire est répartie à raison de 0.5 ml par boîte.

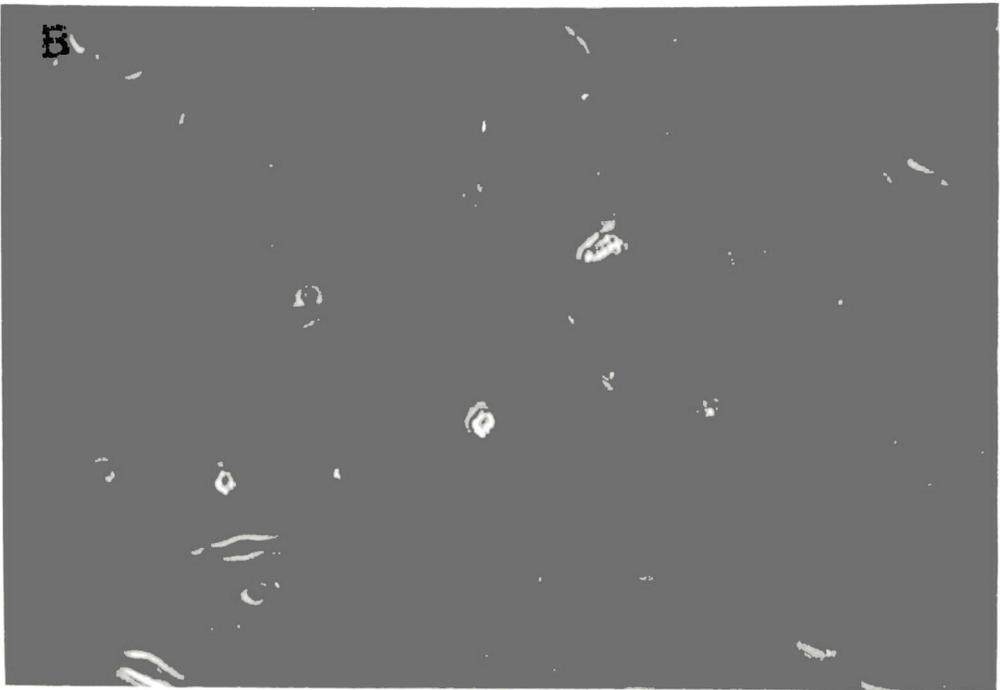
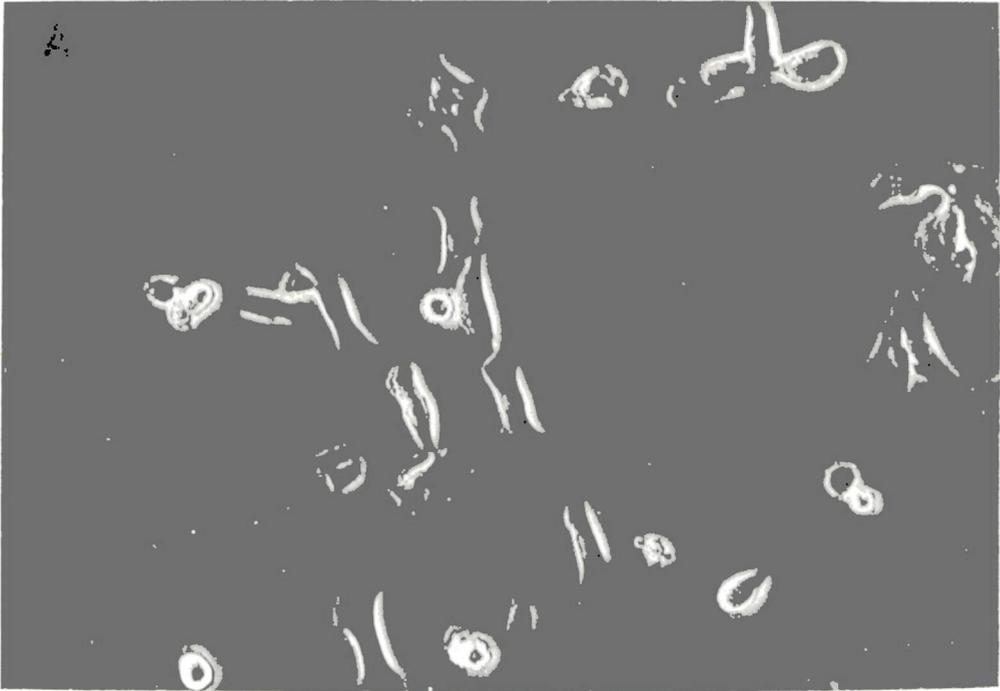
FIGURE No 1

Cellules ventriculaires de rat nouveau-né en culture.

A) moins de 24 heures en culture MEM-d-Valine 2.5% SFB.

B) moins de 72 heures en culture MEM-d-Valine 2.5% SFB

échelle 8 mm = 20 μ m



- Les boîtes ensemencées (densité $\approx 10^4$ cellules/boîte) sont mises à l'étuve à 37°C avec $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ et à pression de vapeur d'eau saturante.

- Après 4 heures, les cellules sont suffisamment collées.

- Le milieu de culture à 15% S.F.B. est changé pour un milieu M.E.M.d-valine + 1% pen/strep ne contenant que 2.5% de S.F.B. pour ralentir le processus d'attachement et d'aplatissement des cellules.

- Ensuite le milieu de culture est changé une fois par jour..

Remarques: Le milieu de culture (M.E.M.d-Valine) est utilisé, car il a la propriété d'enrayer le développement des fibroblastes (GILBERT et MIGEON, 1973; RAMACHADRAN et coll., 1977).

Dans les premières 24 heures, les cellules ont une forme sphérique. Elles ont tendance à développer des pseudopodes d'attachement, ce qui leur confère l'aspect d'escargots (Fig. No IA). Au cours de cette période, leur géométrie est particulièrement favorable aux expériences dans la configuration "whole cell recording". Les jours suivants les cellules s'aplatissent progressivement (Figs. No IB et IIC). Par la suite, elles se divisent et tendent à la confluence (Fig. No II, D).

Des cellules trop aplaties sont moins favorables à la réalisation et surtout au maintien des joints tore-ioniques. Toutes les expériences électrophysiologiques ont donc été réalisées dans les cinq premiers

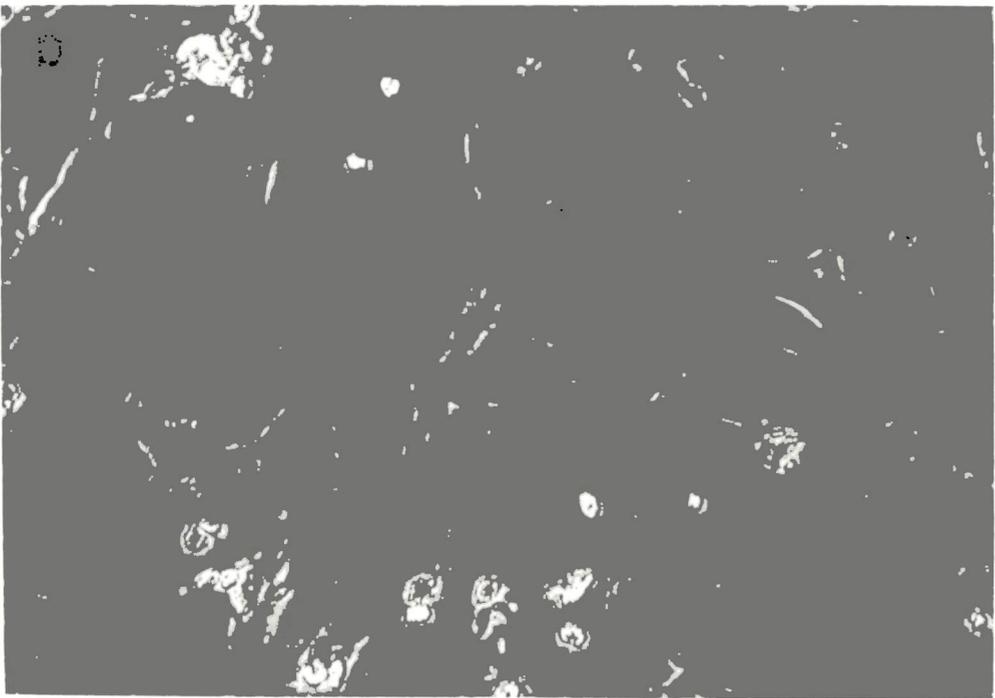
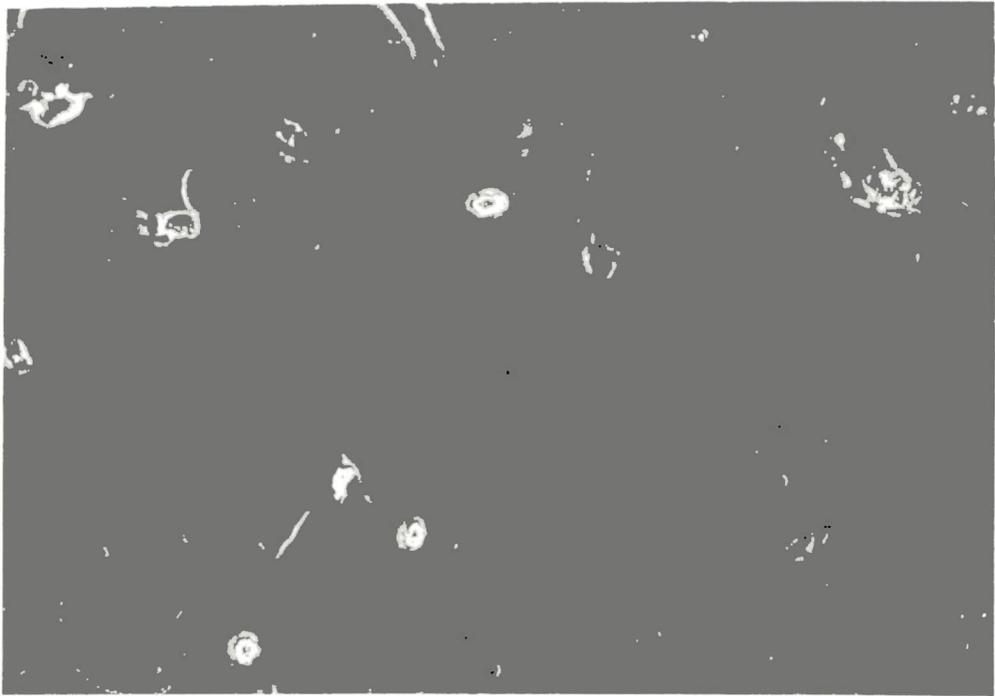
FIGURE No 2

Cellules ventriculaires de rat nouveau-né en culture.

C) à 5 jours, en MEM-d-Valine + 2.5% SFB

D) à 15 jours, en MEM-d-Valine + 2.5% SFB

échelle 8 mm = 20 μ m



jours de culture.

N.B. Il est possible de réaliser l'isolement des cellules en présence de trypsine à faible concentration 0.1% (MORIER et PAYET, 1985, non publié).

2. Composition des solutions

A. Solutions physiologiques

Différentes solutions physiologiques ont été utilisées au cours des diverses étapes expérimentales.

- Milieux "0" calcium.

Pour faciliter l'isolement des cellules et accroître le rendement lors de la digestion à la collagénase, une solution sans calcium est utilisée. Il s'agit d'une solution type McEWEN modifiée dont la concentration en chlorure de sodium a été augmentée de 130 à 134.4 mM pour compenser l'absence de chlorure de calcium. Le glucose (1 g/l) était rajouté au moment de l'emploi.

- M.E.M.d-Valine.

Les cellules ont été mises en culture dans une solution de type "Minimum essential medium" où l'un des acides aminés est du d-Valine: (92 mg/l). Ce milieu complexe, fourni par les laboratoires GIBCO, a la propriété d'inhiber le développement des fibroblastes dans les cultures.

Après 24 heures il peut être remplacé indifféremment par des milieux non carencés sans aucun problème. Dulbeco (Gibco) ou Hanks (Gibco).

- Solution de McEWEN

Toutes les expériences électrophysiologiques ont été réalisées en présence de McEWEN dont la composition est en (mM) NaCl: 130, KCl: 5.4; CaCl₂: 2.2, MgCl₂: 0.24; tampon-HEPES: 5. Le pH est ajusté à 7.4 avec NaOH (1 M).

Préparée à l'avance, cette solution est conservée au froid. Le glucose (1 g/litre) est rajouté au moment de l'emploi.

B. Solutions de remplissage des micropipettes.

Les micropipettes ont été remplies avec des solutions salines conductrices dont l'osmolarité a été maintenue constante.

Le tableau II donne la composition des différentes solutions utilisées.

En W.C.R., les micropipettes en contact avec le milieu intracellulaire étaient remplies de solution contenant (mM): KCl: 130, NaCl: 20; EGTA: 5, Hepes 5 tamponnée à pH: 7.2 par KOH.

D'autres expériences ont été conduites en utilisant de l'acetylcholine ou différents inhibiteurs dans la micropipette.

Les solutions de 4-amino pyridine (4 A.P.), de CsCl, de BaCl₂, et

d'acetylcholine ont été préparées en solution mère à 10^{-2} M. Puis diluées à la concentration désirée dans une solution de KCl à 150 ou à 75 mM de façon extemporanée.

Note: La perfusion des micropipettes était l'un des objectifs techniques de ce travail. Mais force est de constater que changer la solution dans la pointe de la micropipette est une prouesse technique aléatoire. Bien que CULL-CANDY et PARKER (1984) aient présenté quelques résultats d'expériences réalisées après modification de la composition de la solution dans la pipette à l'aide d'une microélectrode de type double baril. Mais ce type d'approche n'est définitivement pas assez fiable et reproductible pour conduire des expériences de type pharmacologique.

Récemment, toujours dans le but de tester l'action d'agents pharmacologiques, nous avons utilisé un remplissage différentiel des micropipettes. La base de la pipette était remplie de solution de référence sur 8 mm de hauteur environ, et la partie supérieure de la hampe de solution contenant un agent pharmacologique.

Par simple diffusion et à température ambiante, il faut plus de 5 minutes pour qu'une substance commence à interagir sur le fragment de membrane isolé en configuration "cell attached" ou à l'intérieur de la cellule dialysée en W.C.R. (communication personnelle, PAYET et BACANER). Bien qu'aucun résultat obtenu à l'aide de cette technique ne soit présenté dans le mémoire, la procédure décrite ci-dessus a l'avantage de permettre d'enregistrer dans les toutes premières minutes de l'expérience des tracés en condition référence, soit du courant global, soit du courant unitaire. Par la suite, l'effet de la drogue peut être

TABLEAU II

Composition des solutions utilisées pour le
remplissage des micropipettes (en mM)

| Solutions | Na | K | Ca | Choline | HEPES | Cl |
|-------------------------|-------|-----|-----|---------|-------|-------|
| 300 K | 0 | 300 | 0 | 0 | 0 | 300 |
| 150 K | 0 | 150 | 0 | 0 | 5 | 150 |
| 150 K Acetate | 0 | 150 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| 150 K-Ca | 0 | 150 | 2.2 | 0 | 5 | 154.2 |
| 75 K | 75 | 75 | 0 | 0 | 5 | 150 |
| 50 K | 100 | 50 | 0 | 0 | 5 | 150 |
| 20 K (ONa) [*] | 0 | 20 | 0 | 130 | 5 | 150 |
| 10 K | 140 | 10 | 0 | 0 | 5 | 150 |
| 5.4 K | 144.6 | 5.4 | 0 | 0 | 5 | 150 |

Tous les sels utilisés étaient sous forme chlorure sauf pour la solution d'acétate de potassium. Toutes les solutions étaient tamponnées à pH: 7.4 et filtrées sur filtre millipore ($\emptyset = 0.22 \mu\text{m}$).

* De l'atropine 0.1 mM a été ajoutée à la solution de chlorure de choline.

visualisé sans avoir à imposer de modifications mécaniques dans la pipette. Les seuls désavantages de cette procédure sont qu'elle reste uniquement qualitative et qu'elle ne permet pas de retour en condition initiale.

3. Dispositif d'enregistrement

A. Montage général

La technique utilisée est basée sur les propositions faites dans l'article de HAMILL et coll. (1981). Le diagramme fonctionnel représenté sur la figure No 3 comprend les différents éléments de notre dispositif d'enregistrement, de stockage et de traitement des signaux électriques.

La table anti-vibration qui supporte le microscope et le micro-manipulateur ainsi que la cage de FARADAY qui les isole des radiations H.F., n'apparaissent pas sur ce schéma. Outre un microscope inversé (type Olympus) sur la platine duquel sont insérées les boîtes de Pétri. Le circuit de mesure comprend une micropipette dans son porteur qui est connectée à la tête du pré-amplificateur, lui-même relié à l'amplificateur de type DAGAN 8900, l'une des entrées de l'amplificateur couplé à un stimulateur programmable (WAVETEK 175). A la sortie de l'amplificateur, les signaux sont filtrés à 640 Hz par un filtre actif (2 x 4 poles de type BUTTERWORTH), avant d'être visualisés sur l'écran d'un oscilloscope TEKTRONIK R7704.

Les signaux sont directement enregistrés sur bandes magnétiques à l'aide d'un magnétophone E.M.I. Eight Four ayant une $f_c = 2.5$ KHz pour

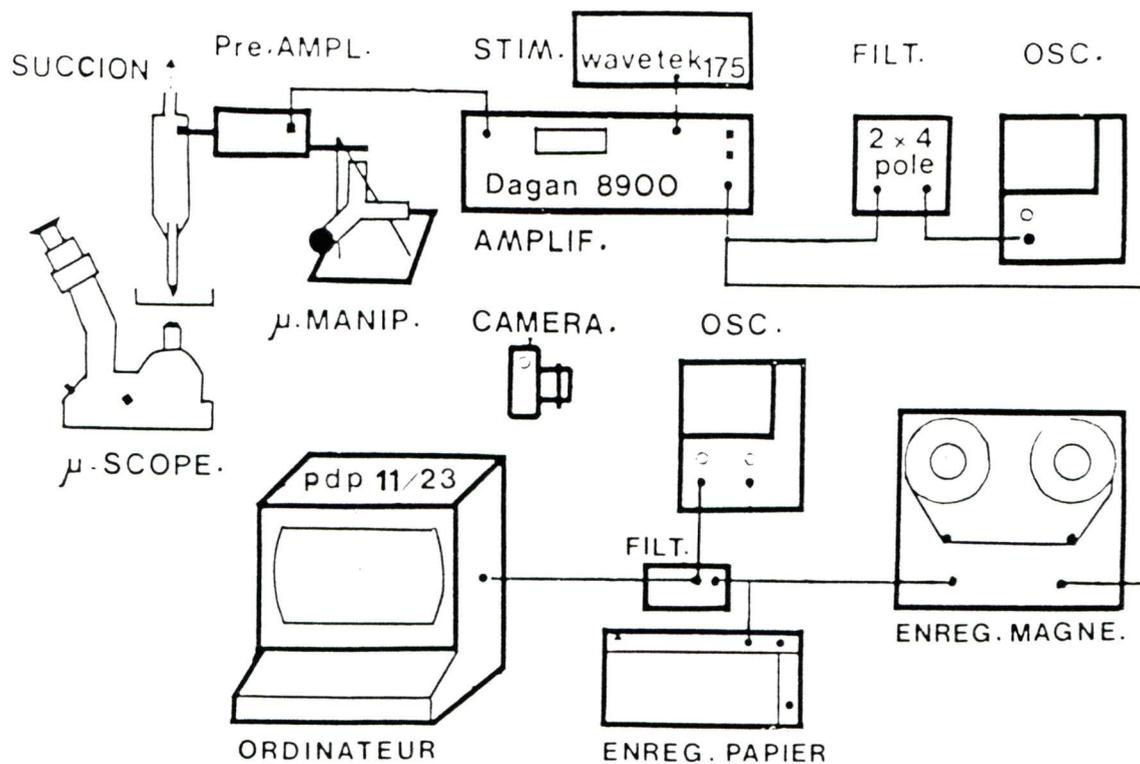


FIGURE No 3

Diagramme fonctionnel du dispositif d'enregistrement et de traitement des signaux. (Description dans le texte).

vitesse de 7 1/2 p/sec. Ils sont analysés en différé à l'aide d'un ordinateur type PDP 11/23 après avoir été digitalisés par une interface analogue digitale (A/D 12 bit D.E.C.).

Les illustrations ont été réalisées à partir des enregistrements sur bandes magnétiques. Ils sont sortis sur un enregistreur à papier (MOSELEY 7100 BM). Ou à partir des signaux digitalisés, ressortis sur une table trancente (type H.P. 72-25B) ou bien encore à partir des photos prises sur l'écran de l'oscilloscope de contrôle.

B. Les différentes configurations d'enregistrement

Le montage général s'adapte à quatre configurations d'enregistrement. Dans notre étude, la plupart des expériences ont été réalisées en configurations "cell attached". Les différents schémas de principe sont parfaitement bien résumés par des dessins de l'article de HAMILL et coll (1981) reproduits sur la figure no 4.

Trois de ces configurations permettent de travailler au niveau des canaux unitaires configuration "cell attached", "outside-out patch", et "inside-out patch". Les deux dernières configurations permettent entre autres de contrôler les milieux de part et d'autre du fragment de membrane isolé.

La configuration "whole cell recording" permet à la fois de contrôler le milieu intra-cellulaire du fait des échanges rapides avec la solution de remplissage de la micropipette, et de mesurer le ou les courants globaux transmembranaires. Elle permet également de travailler dans le

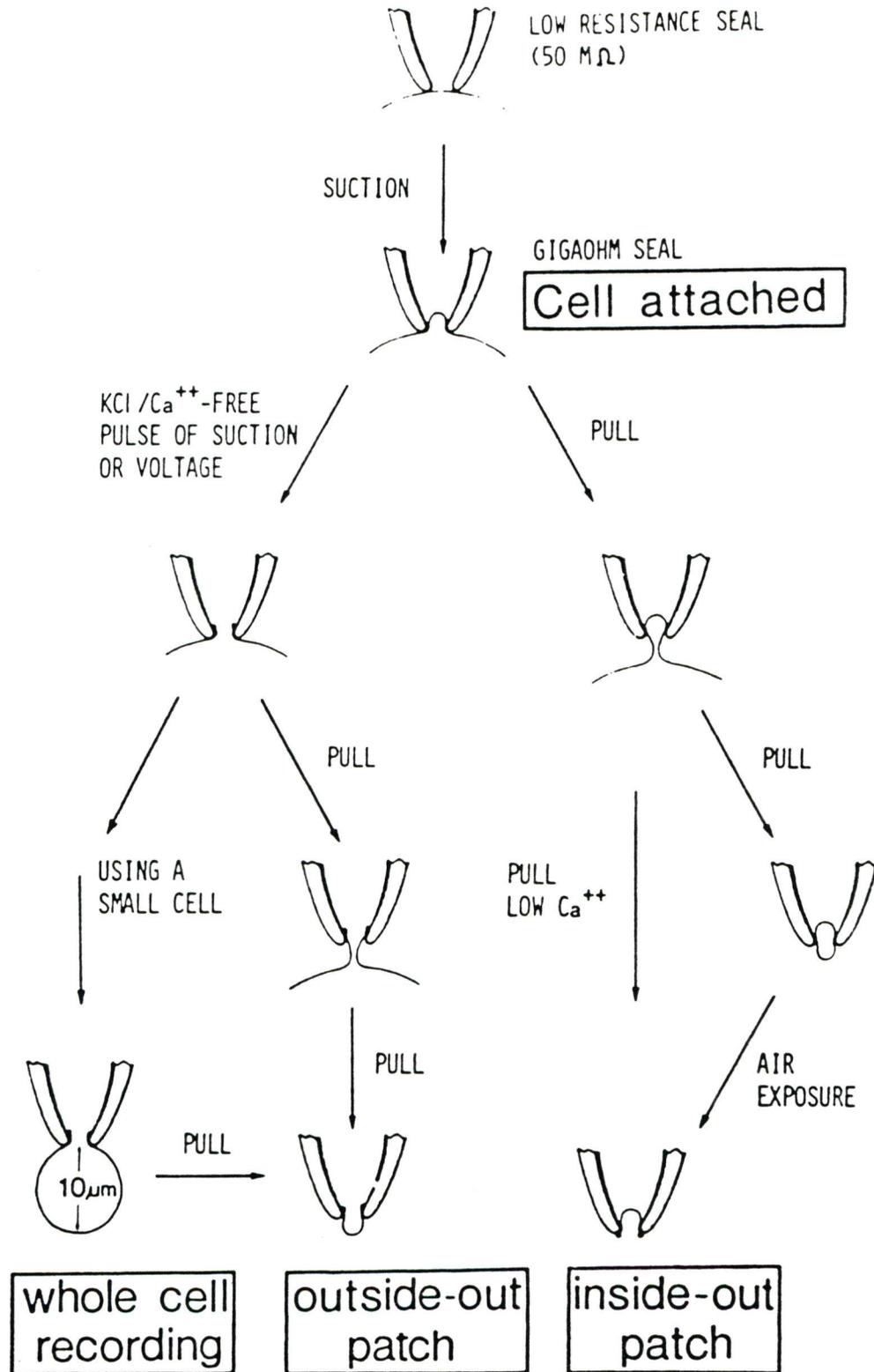
FIGURE No 4

Schéma des différentes configurations d'enregistrement des signaux.

Dans le travail, 3 configurations ont été utilisées:

Cell attached, inside-out patch, whole cell recording.

(D'après HAMILL et coll., 1981).



mode "current clamp" qui offre la possibilité d'enregistrer les potentiels de repos et les potentiels d'action, de cellules réputées difficile d'accès par les méthodes de microélectrodes classiques, du fait de leur petite taille, ou de leur géométrie.

Note: Une variante de la configuration "cell attached" a été proposée par STUHMER et coll. (1983).

Elle est appelée "loose patch" et permet, grâce à l'emploi de micropipettes ayant des diamètres compris entre 5 et 20 μm , de réaliser des enregistrements de courant multicanaux dont les décours s'apparentent à ceux des courants globaux.

Cette méthode qui se caractérise par une résistance de "shunt" peu élevée (2 à 20 $\text{M}\Omega$) qui permet d'une part de défaire et de refaire les "seals" entre la pipette et la membrane cellulaire, et d'autre part de déplacer la même micropipette le long d'une préparation biologique. Ces propriétés ont récemment permis de mettre en évidence la décroissance exponentielle de la densité de canaux Na^+ le long d'une fibre musculaire squelettique par rapport à la position de la plaque motrice (BEAN et coll., 1985).

C. Les micropipettes

Deux sortes de verre ont été employés, soit du verre capillaire à hémato-crite (type "blue-tips"). Dans ce cas, les pointes des micropipettes n'étaient pas polies et les résistances des joints tore-ioniques étaient de l'ordre de 1 à 2 $\text{G}\Omega$.

Soit du verre pyrex de type dur (Corning glass 7740). Dans ce cas les pointes des micropipettes étaient polies. Les résistances obtenues étaient de l'ordre de 10 à 20 G Ω , et les joints tore-ioniques étaient beaucoup plus stables.

Quant aux interactions entre le verre de la micropipette et la matrice membranaire, qui permettent d'obtenir de telles résistances, elles n'ont jamais été étudiées systématiquement. Bien que différentes éventualités peuvent être envisagées: liaisons ioniques, liaisons hydrogènes, ponts salins par le Ca⁺⁺, ou forces de Van der WAALS (COREY et STEVEN, 1983).

Le fait de recouvrir la pointe des micropipettes de résine synthétique isolante (SYLGARD 184) permet de réduire l'effet capacitif pendant les transitions de voltage.

D. L'amplificateur

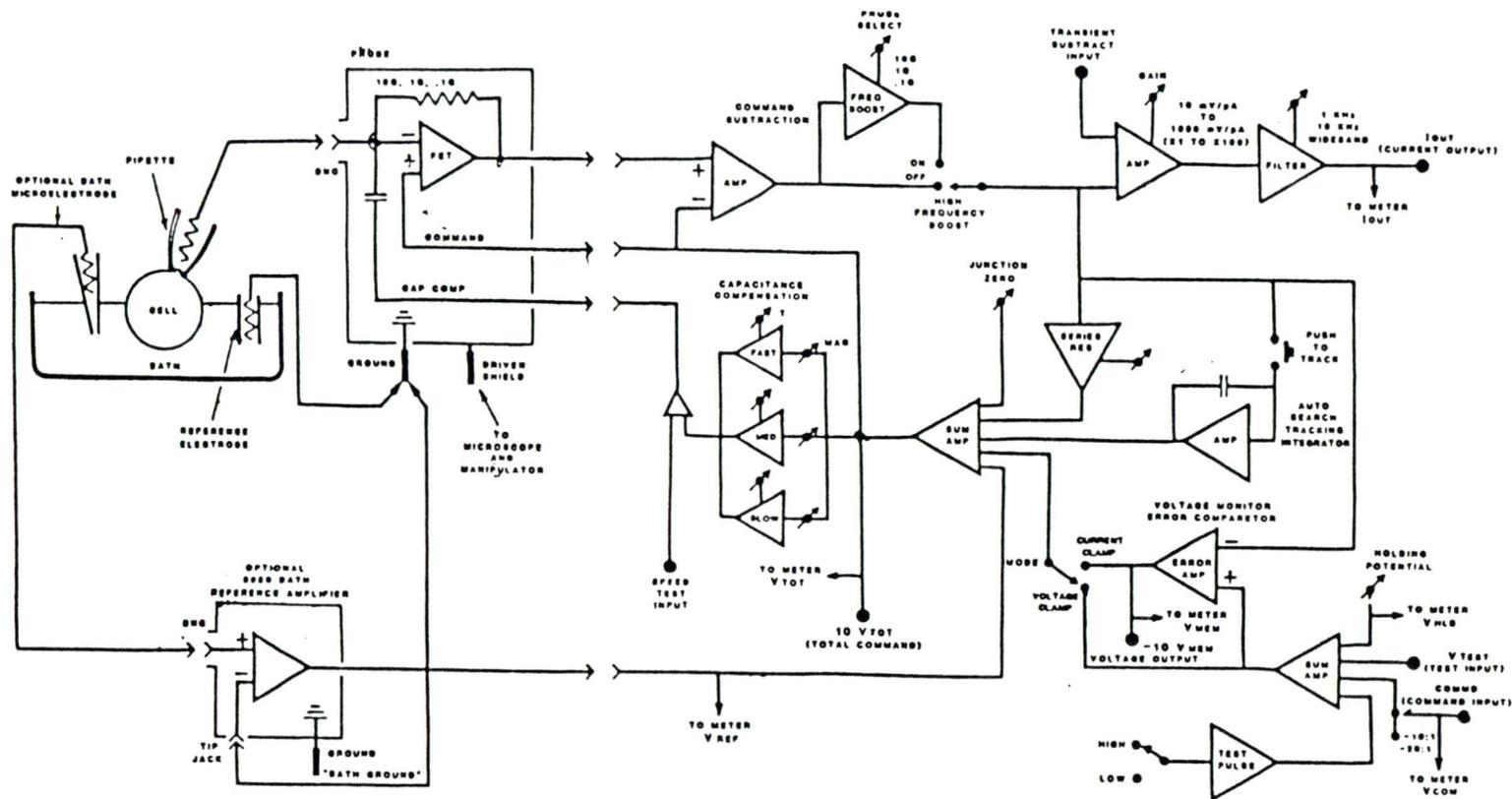
Les circuits électroniques équivalents du pré-amplificateur et de l'amplificateur sont représentés sur la figure no 5.

La tête du préamplificateur sert à la fois d'adaptation d'impédance et de convertisseur de courant/voltage. La troisième fonction concerne son aptitude à contrôler et à imposer un voltage à la micropipette. Elle lui confère son originalité et sa potentialité pour étudier un courant ionique transmembranaire.

Le circuit de l'amplificateur possède différentes fonctions qui servent à traiter le signal (amplificateur de fréquence, amplificateur

FIGURE No 5

Schéma des circuits équivalents des différentes fonctions de
l'amplificateur (DAGAN 8900), décrites dans le texte.



8900 SYSTEM DIAGRAM

d'amplitude, filtre) et à évaluer certaines caractéristiques du dispositif; (test de résistance de micropipette ou de "shunt", compensation de capacité et/ou de la résistance série). L'optimisation de ces fonctions a été étudiée et discutée par SIGWORTH (1983).

L'option utilisant une microélectrode de référence dans le bain a été testée mais n'a pas été utilisée régulièrement. Cette procédure de contrôle du voltage de façon différentielle se révèle efficace dans le cas où le bain est perfusé. Dans ce cas, des variations du potentiel de jonction peuvent apparaître au niveau de l'électrode de référence. Les courants unitaires ont été enregistrés avec une résistance de "feedback" de 10 G Ω , alors que les courants macroscopiques sont enregistrés avec une résistance de "feedback" de 0.1 G Ω .

Globalement le dispositif a un faible niveau de bruit (0.2 pA à 3 KHz) et une limite en fréquence de 10 KHz.

Une table de spécification des différentes fonctions est donnée en annexe I.

E. Le stimulateur

C'est un générateur digital, de type WAVETEK 175 à fonctions programmées. Les fonctions pré-programmées telles que les sinusoides, les dents de scie ou les ondes carrées ont été utilisées pour faciliter le repérage sur nos bandes magnétiques au début de chaque expérience. Quant aux formes d'impulsions test, elles ont été programmées manuellement et stockées dans des mémoires vives de type P.R.O.M.

L'amplitude et la durée des impulsions sont ajustées en fonction des protocoles expérimentaux suivis.

F. La visualisation des signaux

Les problèmes posés par la visualisation directe ou différée des signaux recueillis sont inhérents aux caractéristiques du signal et aux supports matériels utilisés.

L'oscilloscope est certainement la meilleure solution pour observer les phénomènes rapides du fait de sa bonne résolution en temps, en amplitude et en fréquence (105 MHz).

L'apparition et la durée aléatoire des événements, ainsi que l'amplitude des transitions rapides resteront des propriétés du signal toujours difficiles à représenter objectivement sur papier. D'une part, à cause de la probabilité plus ou moins stationnaire de l'apparition des événements dans le temps, et d'autre part, à cause de l'existence d'un choix arbitraire qui devra être fait pour les illustrations.

Quant à la résolution en amplitude des transitions rapides, elle sera limitée par la bande passante du dispositif électronique, puis par l'enregistreur papier qui fait office de filtre passe-bas.

Une restitution plus élégante des enregistrements de l'activité des canaux unitaires, consiste à faire relire des portions de fichier de données digitalisées par l'ordinateur et à les faire sortir sur la table traçante (Type HP-72-25B). Dans ce cas, la résolution sera

conditionnée par la fréquence de digitalisation, par le facteur d'échelle de temps, et par le facteur d'échelle choisi pour l'amplitude.

Il reste toujours la possibilité de fixer le décours des enregistrements sur pellicule photo, à partir des signaux visualisés sur l'écran de l'oscilloscope. Cette technique n'a été utilisée que pour illustrer le décours des enregistrements des courants globaux obtenus en configuration "whole-cell recording".

G. Le stockage et la digitalisation des données

Le stockage des données brutes (non filtrées) a été réalisé sur bande magnétique de magnétophone F.M. à quatre pistes de type E.M.I. Eight-Four dont la bande passante est de 2.5 KHz en D.C. pour une vitesse d'enregistrement de 7 1/2 p/sec.

La digitalisation des données se faisait à 1500 ou 2500 Hz par l'intermédiaire d'un programme d'acquisition (ACQUIR) utilisant l'interface analogue/digital (A/D, 12 bits, D.E.C.) de l'ordinateur P.D.P 11/23.

Les signaux étaient préalablement filtrés par un filtre de type Bessel, dont la fréquence de coupure était ajustée en fonction des caractéristiques du signal: niveau de bruit, rapidité des transitions. La fréquence de digitalisation est de 3 à 5 fois supérieure à la fréquence de coupure du filtre.

La mise en mémoire des données numérisées était faite sur disques

durs à accès rapide (type RL-02).

Les fichiers digitalisés sont généralement recopiés sur disquettes, ainsi que certains fichiers de traitement, afin de libérer le disque principal. Ce dernier, malgré une capacité de mémoire de 10 méga-bites, a souvent été saturé.

La durée des enregistrements numérisés était très variable, de 60 à 120 sec pour chaque niveau de potentiel en général.

Quand la fréquence des événements est faible, il est parfois nécessaire de digitaliser des portions d'enregistrement de 2 à 3 minutes, pour réaliser une mesure plus fiable des probabilités d'ouverture et de la répartition des temps d'ouverture et de fermeture.

4. Analyse des données expérimentales

A. L'analyse des enregistrements a pour but de déterminer l'amplitude, la probabilité pour le canal d'être ouvert, la durée moyenne des temps ouverts et des temps fermés.

Mais le caractère aléatoire de chacun des paramètres, impose une analyse statistique des signaux en terme de probabilité.

L'analyse de nos signaux unitaires a été faite de façon semi-automatique à partir des fichiers de données digitalisées.

L'ensemble des programmes utilisés ont été développés ou adaptés

par le Dr Sauvé. Ils ont l'avantage d'être très interactifs. Ce qui leur confère une certaine souplesse d'utilisation. En particulier pour étudier de façon comparative l'influence d'un paramètre de traitement à partir d'un même fichier de données expérimentales. SACHS (1983), a proposé une analyse des fichiers de données plus automatisée.

La description détaillée de ces différents programmes d'analyse sortirait du cadre de ce mémoire. Cependant, nous pouvons rappeler les principes de base sur lesquels fonctionnent chacun d'entre eux.

B. Le programme "ACQUIR"

Le programme "ACQUIR" sert uniquement à l'acquisition; donc à créer les fichiers de données digitalisées et à les stocker sur disques (ou disquettes).

Les paramètres d'initialisations sont les suivants:

| <u>Paramètres</u> | <u>exemples</u> | <u>utilités</u> |
|---|-----------------|------------------------------------|
| - Le nom du fichier | DL1: ER20CS.001 | Repérage en mémoire |
| - La référence du canal d'entrée de l'interface analogue/digital | 1 | Voie d'acquisition |
| - La fréquence de digitalisation | 1500 Hz | Taux de mémorisation du signal |
| - Le rapport de vitesse entre l'enregistrement et la restitution du signal sur bandes magnétiques | 1 | Calcul de l'échelle des temps |
| - Le gain | 5E.11 | échelle et résolution en amplitude |

| <u>Paramètres</u> | <u>exemples</u> | <u>utilités</u> |
|---|---------------------|---|
| - La durée du segment à digitaliser soit en secondes soit en nombre de points | - D 60 - N 90000 | calcul de l'espace à réserver en mémoire |
| - Le mode de déclenchement du processus de digitalisation soit manuel soit automatique par utilisation d'un "SCHMIT TRIGGER" | K S | déclenchement du processus de digitalisation. |

C. Programme "HISTO"

Le premier programme de traitement sert à évaluer l'amplitude moyenne des événements d'un enregistrement préalablement digitalisé. En confectionnant les histogrammes de densité de probabilité, il est possible de définir la probabilité relative de chaque niveau. Ce programme, appelé "HISTO" permet de découper le fichier de données et d'en faire l'analyse par section. Ceci est possible car les signaux étudiés ont des probabilités stationnaires. Cette procédure est une façon astucieuse de contourner l'un des problèmes inhérents aux variations lentes de la ligne de base. Bien qu'il existe des algorithmes de correction de la ligne de base (SACHS et coll., 1982).

Le programme fonctionne en plusieurs étapes:

- Visualisation et découpage arbitraire du fichier à analyser.
- Répartition des points en histogrammes de probabilité en fonction de leur valeur en amplitude.
- Détermination de la valeur de référence pour chaque segment.
- Recallage et sommation des différents histogrammes et calcul de la valeur moyenne de la variance et de la probabilité relative de chaque population de points.

Ce programme donne une liste des différentes valeurs moyennes et permet la création d'un fichier des paramètres: fréquence des événements en fonction de l'amplitude. La figure No 6 donne un exemple de "listing" sorti par le programme "HISTO".

D. Le programme "FIT"

Le programme "FIT" permet de tracer différents types de fichiers de paramètres et de leur superposer une fonction mathématique en ajustant certaines variables dépendamment des fonctions choisies.

E. Le programme "EXAMIN"

Le programme "EXAMIN" permet de visualiser en tout ou en partie les fichiers de données digitalisées sur l'écran. Outre une option permettant un filtrage digital supplémentaire, il sert à sortir des illustrations sur papier grâce à la table traçante qui est couplée à l'ordinateur.

Les planches de la figure No 7A-B donnent deux exemples de fichiers (En A, la présence d'un seul canal, et en B, la présence d'au moins deux canaux), traités par les programmes:

"EXAMIN": pour illustrer les 2 types d'enregistrements.

"HISTO": pour confectionner les histogrammes de densité de probabilité en fonction de l'amplitude avec mise en évidence des différents pics.

"FIT": pour tracer et "fitter" les histogrammes avec l'équation de 2 gaussiennes (en A) et de 3 gaussiennes (en B).

FIGURE No 6

Exemple de "listing" du programme "HISTO":

- Traitement du fichier: DL1:B6P317-012
- Temps total analysé: 143.5 sec.
- niveau de courant moyen de l'enregistrement -
- et sa variance.

- Pic No 1
- probabilité relative = 0.388 canal dans l'état ouvert
- valeur moyenne = -1.22 pA amplitude du courant
- variance = 0.14 pA unitaire.

- Pic No 2
- probabilité relative = 0.611 canal dans l'état fermé
- valeur moyenne = 0.006 pA ≈ ligne de 0 courant
- variance = 0.124 pA

Remarquez que la variance est plus grande quand le canal est dans l'état ouvert (<=>). Le bruit est augmenté.

PROGRAM HISTO

FILE NAME: DL1:R6P317.017

TOTAL TIME FROM SEGMENTATION 143.57133

THE MEAN CURRENT OF THIS RECORD = $-0.473E-12$ A
 THE VARIANCE OF THIS RECORD = $0.380E-24$ A²

FIGURE No 6:

| | |
|----------------------|---------------|
| MAXIMUM NO: 1 | |
| RELATIVE PROBABILITY | = 0.38812 |
| MEAN VALUE | = -1.22957 pA |
| VARIANCE | = 0.14118 pA |

| | |
|----------------------|--------------|
| MAXIMUM NO: 2 | |
| RELATIVE PROBABILITY | = 0.61192 |
| MEAN VALUE | = 0.00698 pA |
| VARIANCE | = 0.12486 pA |

F. Le programme "JUMPS"

Le programme "JUMPS" permet d'identifier les transitions, de déterminer la durée des événements et de les classer en histogrammes de probabilités cumulées en fonction de leur durée. Le principe de fonctionnement de ce programme est basé sur la détection des transitions, par la technique de la demi-ligne de base (SACHS, 1983). Cette astuce technique permet de déterminer le début et la fin de chaque événement, donc de mesurer sa durée. La position de cette dernière ligne de base "virtuelle" est fixée arbitrairement à partir des histogrammes d'amplitude.

La catégorie à laquelle appartient l'événement (état ouvert ou fermé) est déterminée par sa position par rapport à la demi-ligne de base, et par la variance qui a généralement une valeur plus élevée quand le canal est dans l'état ouvert.

Les événements d'une même catégorie sont ensuite classés en histogrammes de probabilités cumulées en fonction de leur durée.

Le programme permet également d'assigner une durée minimum et une

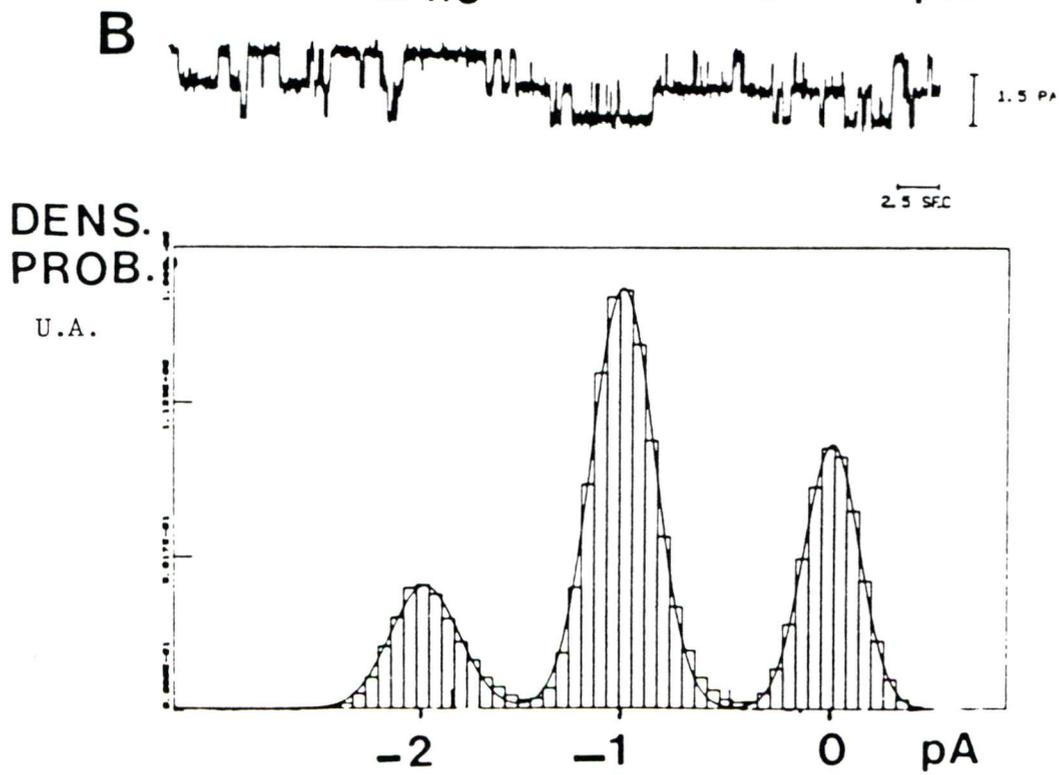
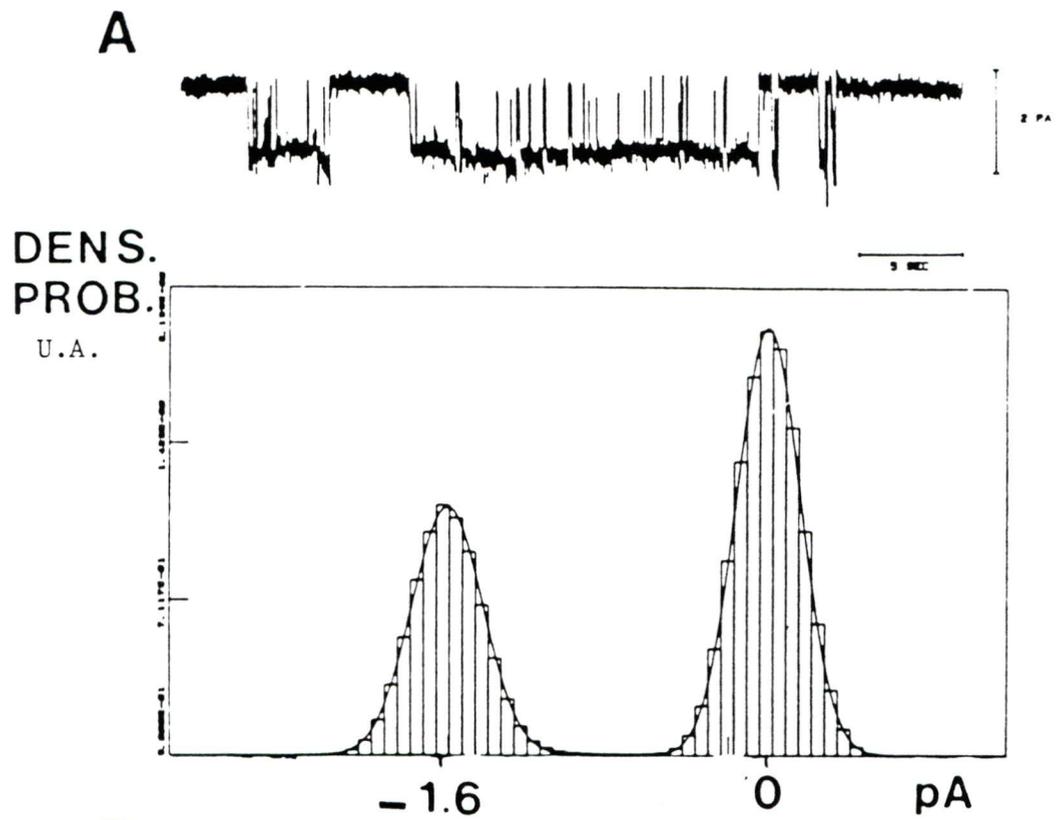
FIGURE No 7

Exemple d'analyse des signaux unitaires:

Après digitalisation par le programme "ACQUIR",

- observation des fichiers par le programme "EXAMIN"
 - confection des histogrammes de densité de probabilité en fonction de l'amplitude des événements: programme "HISTO"
- et traçage des gaussiennes par le programme "FIT".

- A) Exemple de signal unitaire recueilli à -60 mV, en cell attached, avec 150 mM de KCl dans la micropipette.
- B) Exemple de signal unitaire, multi-canaux. Au moins 2 canaux sont présents sous le "patch" à -30 mV, en cell attached, avec 150 mM de KCl dans la pipette.



durée maximum pour les événements à classer dans chaque catégorie.

L'effet d'omission des événements les plus courts a été discuté par COLQHOUN et SIGWORTH (1983). En tout état de cause, la durée minimum pouvant être détectée, est imposée par le taux de digitalisation.

Exemple: 2500 Hz \rightarrow 400 μ sec entre chaque point. Pour avoir une définition suffisante d'un événement, il sera nécessaire d'avoir au moins 2, sinon 3 points. C'est-à-dire qu'il serait souhaitable de prendre un temps minimum: $t_{\min} \geq 0.8$ msec.

Une étude théorique détaillée du problème de l'omission arbitraire des événements, d'une durée inférieure à un temps minimum donné, a été faite par ROUX en 1984 aux chapitres 3 et 9 de son mémoire. Il discute en particulier du problème des fausses alertes dues à la superposition du bruit sur le signal idéal. Une solution générale a été présentée par ROUX et SAUVE en 1985.

Leur formalisme a été utilisé pour l'analyse des cinétiques de changements d'états en 150 et 75 mM de KCl dans les micropipettes (PAYET et coll., 1985).

Quand nous avons eu à étudier des cinétiques rapides (expériences en chlorure de césium), nous avons également utilisé des t_{\min} différents pour évaluer dans quelles proportions ils affectent le nombre des événements détectés et le nombre et la valeur des constantes de temps des exponentielles permettant de "fitter" les histogrammes de probabilité cumulée. Dans ce cas, les événements courts étant particulièrement

nombreux, le choix de temps minimum (t_{\min}) sera crucial pour essayer de quantifier les cinétiques en fonction des potentiels appliqués et des différentes concentrations utilisées.

Citation

"Quand on est un canal ... on coupe la campagne en deux plaines
étalées ..."

Pierre BACHELET

C H A P I T R E I V

CHAPITRE IV

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Excitabilité des cellules isolées mises en cultureA. Activité électrique cellulaire

La qualité électrophysiologique des préparations biologiques utilisées a été évaluée à plusieurs reprises et comparée à ce qui était connu antérieurement.

Les cellules fraîchement isolées ainsi que celles depuis moins de 24 heures en culture (Fig. No 1A) ne présentaient pas d'activité électrique spontanée. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, approche de la micropipette remplie de solution riche en potassium, application d'impulsions ou de rampes de voltage, il est possible de déclencher des activités électriques caractéristiques qui peuvent être reliées sans aucun doute à des potentiels d'action générés par la cellule (Fig. No 8A).

Ce type de réponses électriques peut être supprimé si les cellules sont baignées en solution pauvre en Na^+ (30 mM au lieu de 130 mM en McEwen normal) ou en milieu 150 mM de KCl. Dans ce cas les cellules sont complètement dépolarisées ce qui supprime l'éventualité de déclencher des potentiels d'action et des contractions.

Cette dernière procédure est d'ailleurs souvent utilisée par les équipes qui travaillent sur la cinétique des canaux unitaires des

FIGURE No 8

Exemple d'activités électriques cellulaires contemporaines de potentiel d'action à 3 stades différents.

A) Courants d'actions déclenchés lors d'une hyperpolarisation de 20 mV par rapport au potentiel de repos sur une cellule en culture depuis moins de 24 h. Des événements unitaires sont également visibles.

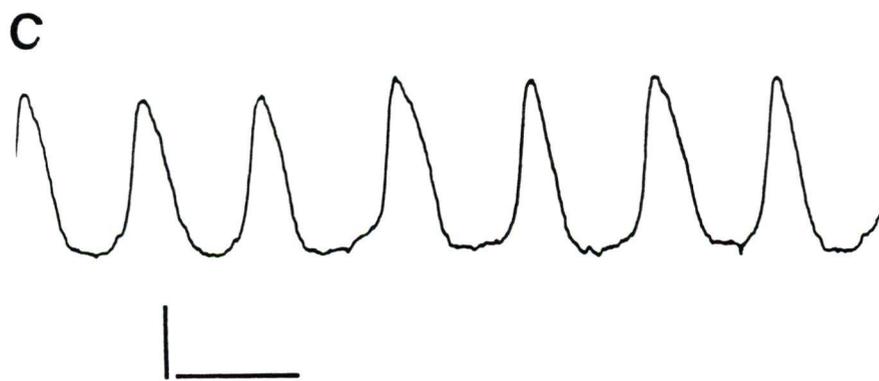
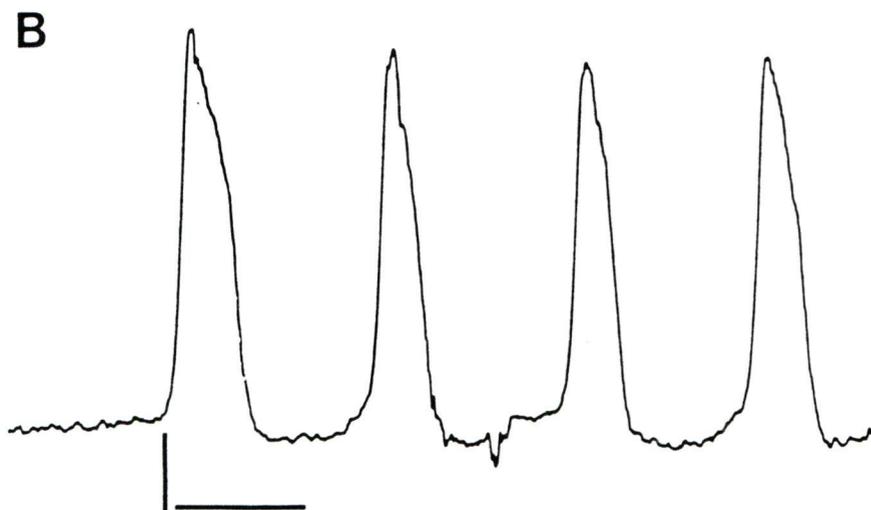
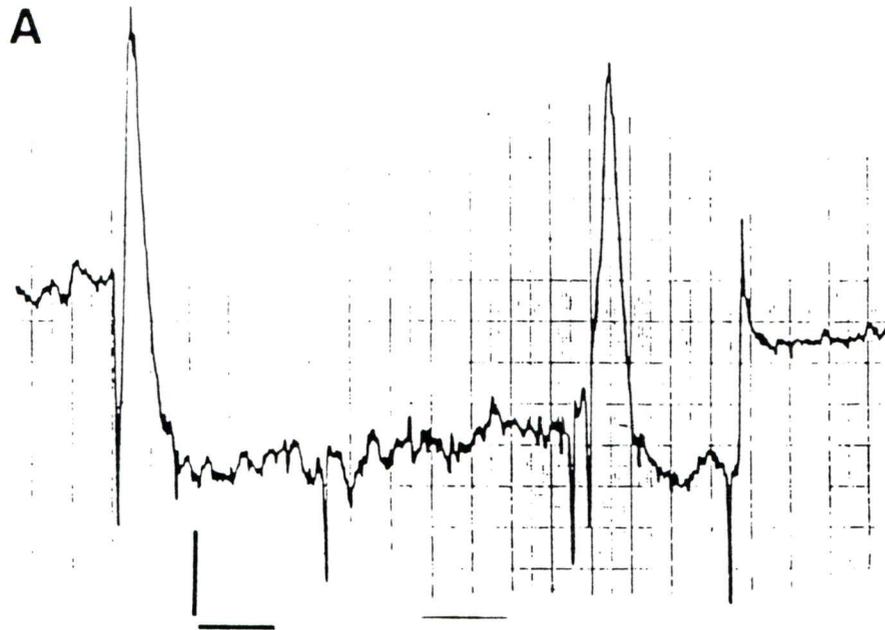
Calibration horizontale: 500 msec; calibration verticale: 1 pA.

B) Activité automatique de cellules en culture depuis 48 h dans un milieu (MEM-d-Valine) contenant 15% de S.F.B.. La fréquence des décharges, 80 par minute.

Calibration horizontale: 500 msec; calibration verticale: 1 pA.

C) Activité automatique à pentes diastoliques très marquées sur des cellules après 5 jours en culture dans un milieu (MEM-d-Valine) contenant 2.5% de S.F.B. La fréquence des décharges, 120 par minute.

Calibration horizontale: 500 msec; calibration verticale: 2 pA.



cellules cardiaques de mammifères adultes (PATLAK et ORTIZ, 1985) pour éviter toute fluctuation du potentiel de membrane.

Les cellules mises en culture dans un milieu contenant 15% de S.F.B. montrent des activités électriques répétitives, type pacemaker, à partir de 48 heures (Fig. no 8B). Ces activités sont facilement abolies si du chlorure de cobalt est ajouté au milieu de perfusion à la concentration de 3 mM. Ce qui atteste de la nature vraisemblablement calcique ou calcico-sodique de ces P.A. Ces observations sont cohérentes avec celles publiées par FERMINI et coll. (1985) sur l'évolution des propriétés électrophysiologiques des cellules de coeur de rat nouveau-né en culture.

Si les cellules sont mises en culture dans un milieu contenant seulement 2.5% de S.F.B. pour ralentir le processus d'aplatissement, les activités électriques autorégénératives n'apparaissent qu'au bout de 4 à 5 jours.

Le fait d'avoir abaissé la concentration de S.F.B. à 2.5% ralentit les changements morphologiques des cellules ainsi que la mise en place des activités pacemaker.

Néanmoins, après 5 jours de culture en 2.5% de S.F.B., et à 37°C, les cellules montrent systématiquement des patrons d'activité automatique plus ou moins réguliers (Fig. No 8C). Ils sont abolis par le chlorure de cobalt (3 mM) et semblent donc bien correspondre à des P.A. de nature calcique.

Mais ces activités électriques membranaires des cellules isolées en culture primaire posent vraisemblablement plus de problèmes qu'elles n'en résolvent.

Tout d'abord, la façon d'enregistrer des activités n'est pas conventionnelle. Les différents aspects ont été discutés par FENWICK et coll. (1982a).

Par ailleurs, elles reflètent une hétérogénéité des valeurs des P.R. des cellules en culture ce qui ne facilitera pas la détermination des potentiels transmembranaires des fragments interrogés en conformation "cell attached".

Mais plus que la valeur absolue du potentiel de membrane, c'est son instabilité au cours du temps qui peut devenir un problème réel, car seul le potentiel appliqué dans la pipette est contrôlé par le système électronique.

Donc, toute variation du potentiel de membrane (ou du potentiel de jonction au niveau de l'électrode de référence d'ailleurs) sera une source de variations de la ligne de base lors de nos enregistrements de l'activité des canaux unitaires.

En conséquence, nous avons donc travaillé sur des cellules mises en culture en 2.5% de S.F.B. dont les potentiels de repos sont plutôt stables au cours des expériences, même si leur valeur peut varier d'une cellule à l'autre. Le P.R. des cellules varie également en fonction de

l'âge des cultures. Les valeurs mesurées sont de l'ordre de -52 ± 7 mV en conformation "whole cell recording", mode "current clamp" entre 2 et 5 jours de culture ($n = 12$).

Les mesures réalisées par la technique des microélectrodes classiques donnent des valeurs de -60 ± 5 mV (FERMINI et coll., 1985).

B. Interférence des potentiels d'action pendant l'enregistrement de l'activité des canaux unitaires

Malgré les précautions évoquées précédemment, il est parfois possible d'enregistrer l'interaction entre l'activité des canaux unitaires et les P.A. de la cellule.

Ce type d'interaction est illustré sur la figure No 9a,b,c. Pendant les temps où le canal unitaire est dans l'état fermé, les P.A. apparaissent sous forme de spikes qui correspondent à la dérivée première du signal généré par la cellule. La capacité et la résistance élevée de la membrane isolée sous la micropipette font office de circuit R.C. différentiateur. Quand le canal est passé dans l'état ouvert lorsque la cellule génère un P.A. à la déflexion rapide fait suite une trace de courant dont le décours a l'aspect d'un P.A. de Purkinje.

Si le canal n'a pas changé d'état pendant ce temps, la trace de courant revient au niveau de la ligne courant correspondant à la valeur du courant initial (Fig. No 9B).

Le fait de pouvoir enregistrer une composante résistive pendant ce

FIGURE No 9

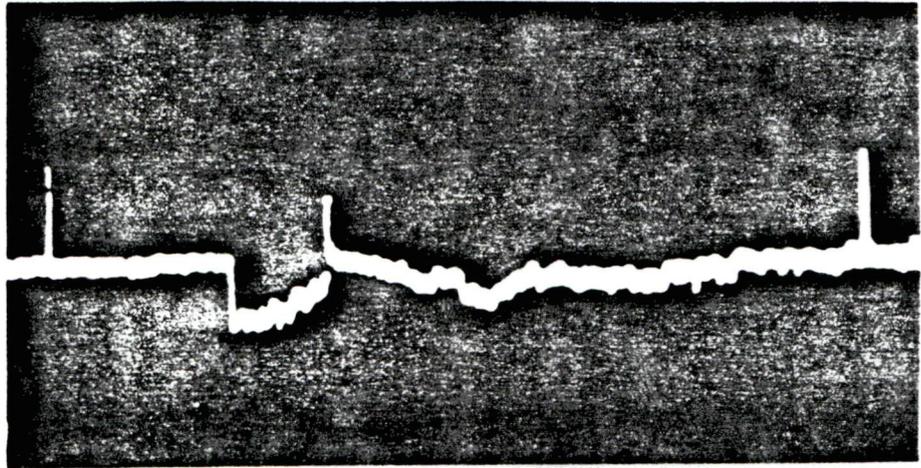
Exemple d'interférence entre l'enregistrement des signaux unitaires d'un fragment de membrane en "cell attached" et les P.A. générés par le reste de la membrane cellulaire.

- a) avant, pendant et après un événement unitaire;
- b) pendant l'ouverture d'un canal, observation d'une composante capacitive et d'une composante résistive.
- c) immédiatement après la fermeture du canal, seule la composante capacitive est présente.

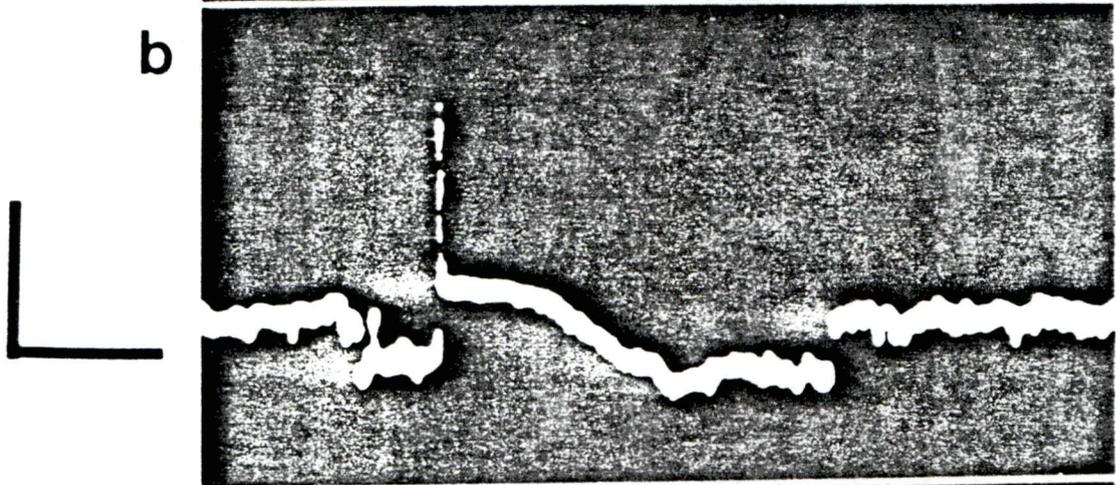
Calibration horizontale: 200 msec; calibration verticale: 1 pA.

Les composantes capacitatives ont été surtracées d'encre blanche.

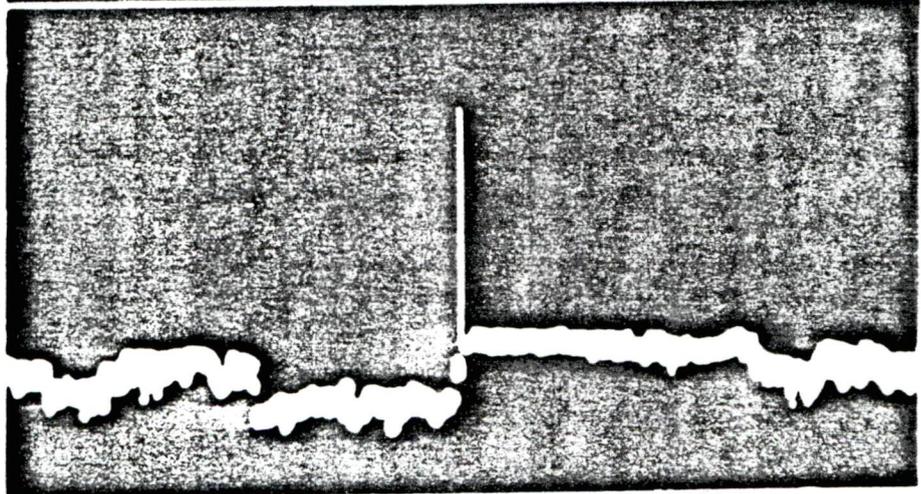
a



b



c



courant d'action s'expliquerait par une diminution de la résistance de la membrane sous le "patch", concomitante à l'augmentation de la conductance pendant le temps d'ouverture du canal (FENWICK et coll., 1982; FISCHMEISTER et coll., 1984).

2. Enregistrement des courants globaux

A. Introduction

L'étude des courants ioniques des cellules cardiaques s'est toujours heurtée à des problèmes techniques. Ils sont inhérents aux méthodes utilisées ou aux types de préparations biologiques souvent multicellulaires et donc non-homogènes (trabécules auriculaires de grenouille, fibres de Purkinje de mammifère).

Le fait de pouvoir travailler sur des cellules isolées apparaissait un avantage certain, en éliminant les problèmes liés aux résistances parasites et aux accumulations d'ions.

Mais, essayer d'insérer deux microélectrodes dans une cellule cardiaque isolée pour travailler en condition de voltage imposé, est un exercice périlleux et très aléatoire.

Une alternative technique a été développée pour contrôler le voltage et mesurer le courant résultant à l'aide d'une seule microélectrode (FINKEL et REDMAN, 1974). Elle est connue sous le nom de "chop-clamp", et a pour inconvénient majeur d'utiliser des microélectrodes à très forte impédance ce qui limite le courant pouvant être injecté.

Par contre, l'une des conformations proposées par HAMILL et coll. (1981) permet d'avoir accès à des cellules de petites tailles et de forme sphérique (8 à 15 μm de diamètre). Elle permet ainsi un contrôle électrique pratiquement idéal de la totalité de la membrane cellulaire du fait de la géométrie du modèle et de la qualité de l'isolement électrique (Voir Fig. No 4, Chap. III, 3.B).

Cette configuration, appelée "whole cell recording" (W.C.R.), utilisée sur les cellules isolées de coeur de rat nouveau-né, nous a permis d'enregistrer les courants ioniques transmembranaires.

B. Protocole

Dans la configuration "W.C.R.", les micropipettes utilisées avaient une résistance comprise entre 3 et 6 $\text{M}\Omega$. Elles étaient recouvertes de résine polymérisée à chaud (type SYLGARD 180), pour réduire les problèmes liés à la réponse capacitive de la paroi de verre immergée.

Dans cette configuration, les micropipettes doivent être remplies d'un milieu salin dont la force ionique et l'osmolarité sont comparables à celles du milieu intracellulaire (composition, chap. III, 2b).

Les courants globaux sont obtenus à partir d'un potentiel de maintien (H.P.) de -80 mV pendant des impulsions de voltage de polarité, d'amplitude et de durées différentes en fonction du type de courant à caractériser.

C. Résultats

Les résultats ont été obtenus sur des cellules en culture depuis moins de 24 heures.

Il est possible d'enregistrer un courant entrant s'activant et inactivant en fonction du temps pour des potentiels compris entre -65 et +40 mV. A 22°C, ce courant de cinétique rapide s'active en moins de 2 msec pour le pic de courant maximum obtenu pour un potentiel de -30 mV (Fig. No 10A).

Ce courant global est de nature sodique car dans des conditions expérimentales identiques il peut être bloqué par la tétrodotoxine (TTX) (CACHELIN et coll., 1983).

La plupart des enregistrements sont exempts de courant de fuite et d'oscillation, ce qui tend à prouver la bonne qualité du contrôle électrique dans cette configuration.

Un courant de background stable peut être enregistré pour des dépolarisations supérieures au potentiel d'inversion.

Sur la courbe courant/voltage de la figure No 10B, le courant commence à s'activer pour des potentiels supérieurs à -65 mV. Le maximum de courant est atteint à -30 mV et le potentiel d'inversion de ce courant est proche de +42 mV.

Ces résultats sont tout-à-fait compatibles avec ceux de COLATSKY en

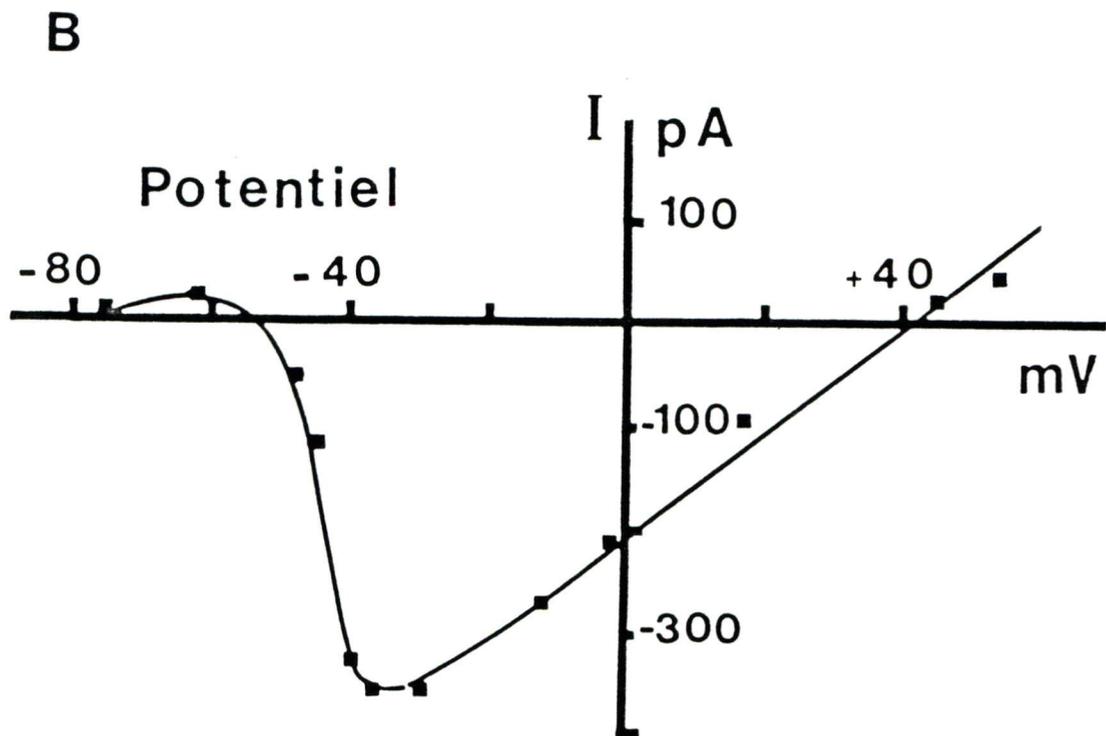
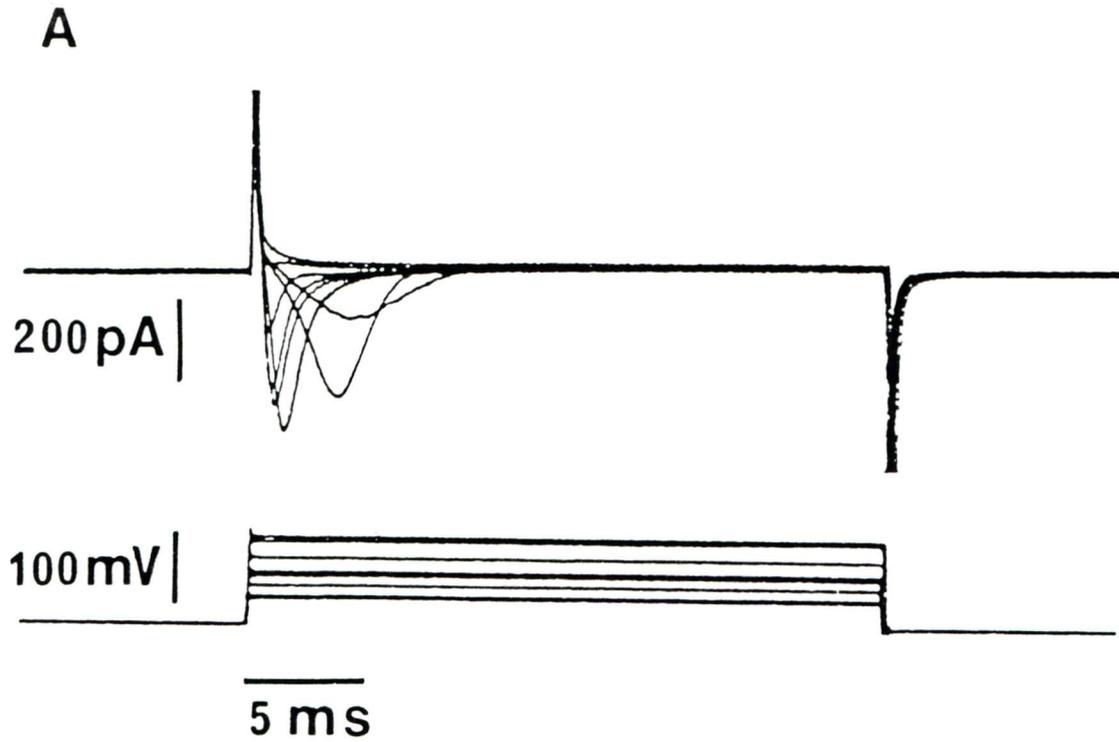
FIGURE No 10

Courant sodique rapide enregistré en configuration "whole cell recording".

A) famille de tracés montrant l'activation puis l'inactivation du courant Na rapide pour des impulsions dépolarisantes d'amplitudes croissantes. Noter l'absence de courant de fuite.

B) Courbe I/V du courant Na rapide.

- Amplitude mesurée au pic du courant. Outre l'allure de la courbe, le potentiel d'inversion qui est de +42 mV est la preuve que ce courant est essentiellement transporté par les ions Na.



1980 sur des préparations cardiaques multicellulaires et par BROWN et coll en 1981 sur des cellules isolées de coeur de rat.

Les cellules en culture de rat nouveau-né semblent donc bien se prêter à l'étude du courant sodique rapide. Récemment, PAYET et MORIER (communication personnelle) ont étudié l'activité des canaux sodiques unitaires de ces structures de façon comparative à l'étude du courant sodique global.

Par contre, il semble beaucoup plus difficile d'étudier le courant calcique lent sur ces cellules. Bien que REUTER et coll. (1982) ont réussi à évaluer l'activité des canaux unitaires calciques, mais en mesurant un courant Barium. En effet, ce cation divalent est très perméant à travers les canaux normalement sélectifs au Ca.

Par ailleurs, il est possible pour des impulsions hyperpolarisantes de grandes amplitudes et de longues durées, toujours à partir d'un H.P. de -80 mV, d'enregistrer des courants entrant, instantanés ou en régime établi à l'état stable ("steady state").

Ces types d'enregistrement sont illustrés sur la figure No 11A. Immédiatement après la décharge du courant capacitif, un courant "instantané" peut être évalué environ 3 msec après la transition de voltage. Par la suite une relaxation peut être observée. Elle est d'autant plus rapide que l'hyperpolarisation est de grande amplitude. Ce processus peut être vu comme un phénomène de désactivation.

Les courbes courant/voltage sont représentées sur la figure No 11B. Celle du courant instantané est essentiellement linéaire avec une conductance d'environ 2.3 nS. Alors que celle du courant mesuré à l'état stable semble avoir une courbure caractéristique. Elle augmente jusqu'à -130 mV puis tend à diminuer pour des potentiels plus négatifs.

Cette courbe I/V sera mise en relation avec celle recalculée à partir de la probabilité d'ouverture et des courants des canaux unitaires étudiés à voltage constant.

Par ailleurs, la relaxation observée pourra être mise en relation avec le comportement du canal unitaire après une transition hyperpolarisante.

Pour des dépolarisations de longue durée et d'amplitudes variables, un très faible courant sortant dépendant uniquement du voltage peut être mesuré. Il correspondrait à un courant de type I_{K1} tel que défini par NOBLE (1979).

Par contre, il n'existe apparemment pas de courant sortant qui s'activerait en fonction du potentiel et du temps sur ces préparations.

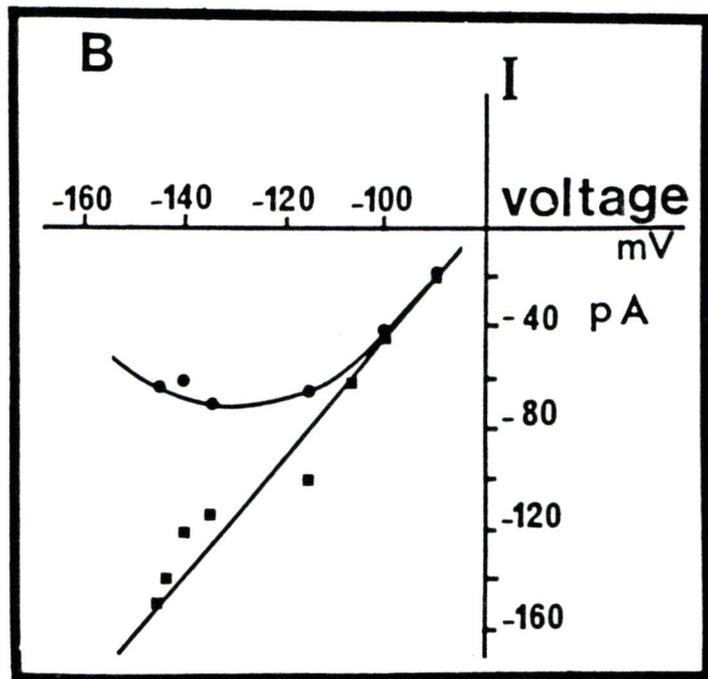
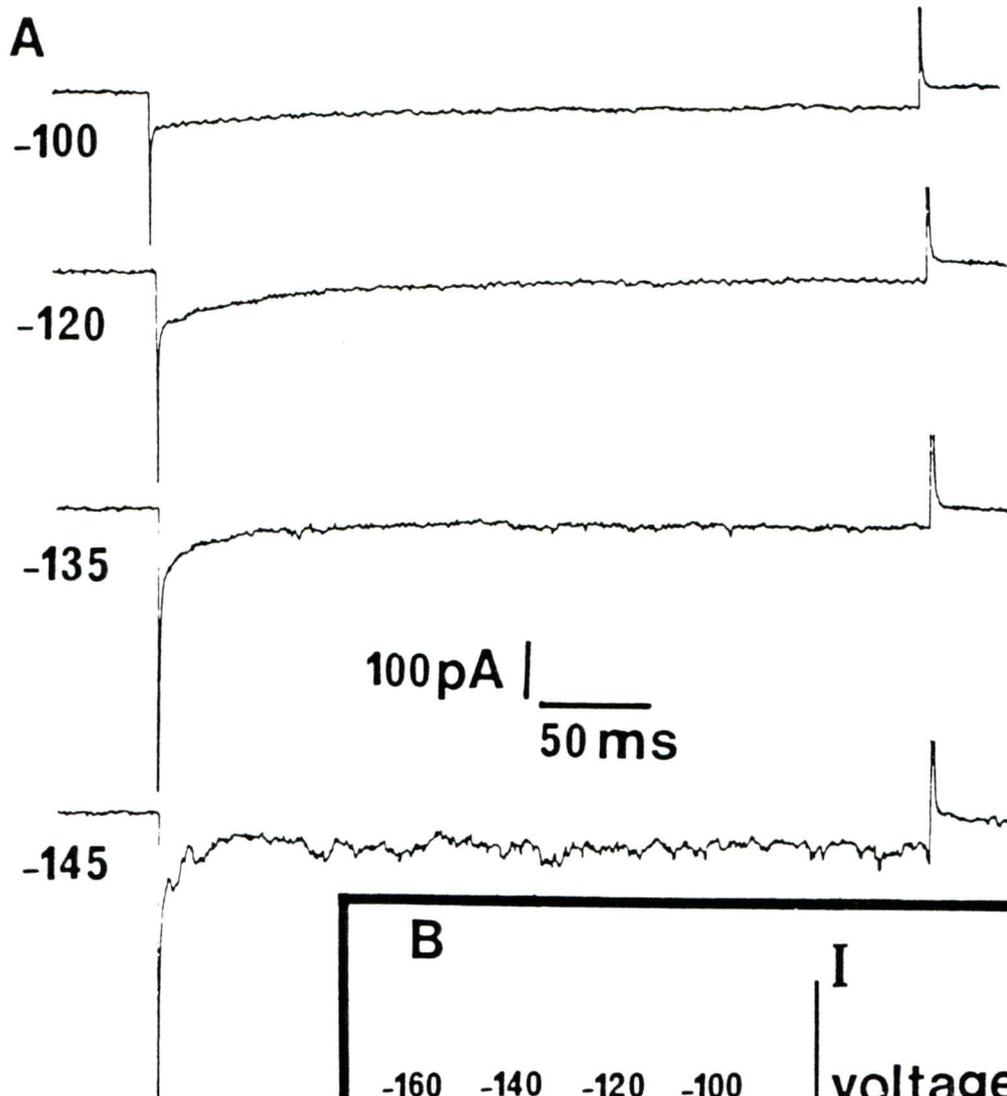
Cette observation est compatible avec celles de PAYET et coll. (1978) qui ne notent aucun type de courant sortant s'activant en fonction du temps sur les trabécules ventriculaires de rat adulte.

Les expériences sur la mise en évidence et la mesure des courants

FIGURE No 11

Courants entrant enregistrés en hyperpolarisation.

- A) Tracés enregistrés pour 4 potentiels différents dont les valeurs sont inscrites à gauche des enregistrements.
- B) Courbe I/V du courant instantané (carrés noirs) et du courant à l'état stable (ronds noirs).



macroscopiques n'ont pas été conduites de façon extensive dans le cadre de cette étude. Néanmoins, elles nous ont permis de maîtriser la technique pour réaliser les enregistrements des courants macroscopiques dans la configuration W.C.R.

Outre la qualité des pipettes, la forme des cellules et la qualité de leur membrane sont des facteurs déterminants pour la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

Ces derniers montrent que la résolution du courant sodique rapide d'une seule cellule est tout-à-fait satisfaisante par cette approche.

Par ailleurs, l'évaluation des courants globaux servira de point de référence aux études qui seront réalisées au niveau élémentaire sur les canaux Na^+ ou K^+ .

3. Mise en évidence de différents types de canaux K^+ dans la membrane des cellules cardiaques

A. Introduction

Quand nous avons abordé l'étude des canaux potassiques unitaires des cellules cardiaques, un grand nombre de questions subsistaient sur les différents types de canaux K^+ postulés et sur leur mode de fonctionnement.

Les études menées à l'aide des techniques classiques avaient permis de montrer l'hétérogénéité des courants potassiques et les difficultés à les résoudre spécifiquement. Le fait d'avoir accès à l'activité des

canaux potassiques unitaires des cellules cardiaques de mammifère ouvrirait des perspectives nouvelles pour étudier sélectivement chacun d'entre eux.

Cependant, la technique utilisée pour atteindre ce niveau de résolution constitue un mode d'investigation aléatoire.

En effet, il est impossible de savoir à priori quel type de canal sera fonctionnel sous le fragment isolé. Néanmoins, le contrôle de certains paramètres tels que le choix des solutions de remplissage des micropipettes ou le protocole de contrôle du voltage, permettent de caractériser un canal.

Cette partie du mémoire se propose de répondre à la question:
Existe-t-il différents types de canaux potassiques à la surface de ces cellules cardiaques en culture?

B. Protocole

Toutes les expériences de cette section ont été réalisées dans la configuration "cell attached" en présence de 150 mM de KCl dans la micropipette, sauf indication contraire. L'emploi de la solution de 150 mM de KCl, outre le fait d'annuler le gradient chimique aux K, permet d'augmenter la conductance et l'activité des canaux potassiques.

Toutes les expériences sont réalisées entre 20 et 22°C, et les différents niveaux de potentiel sont imposés en continu.

C. Observations

Des exemples de tracés caractéristiques de différents types de canaux sont représentés sur la figure No 12a,b,c,d.

La première portion d'enregistrement illustre l'un des patrons d'activité les plus fréquemment rencontrés (Fig. 12a). Il est possible de voir que l'activité du canal se manifeste par des groupes d'événements qui apparaissent de façon aléatoire en fonction du temps. Il faut noter que ces périodes d'activité sont séparées par des temps plus ou moins longs pendant lesquels le canal reste silencieux. Ce comportement est rapporté par SAKMANN et coll. (1980) pour les canaux K^+ activés par l'acetylcholine mais également par SAUVE et coll (1983) pour les canaux K^+ activés par le voltage.

Les salves d'événements sont appelées "burst" et les périodes d'activité qui les regroupent sont appelées "cluster". Notons cependant que l'échelle de temps pour définir ces phénomènes varie en fonction des types de canaux observés (PALLOTA et coll., 1983).

Le tracé de la figure No 12b montre la superposition de l'activité de deux canaux du même type que celui défini précédemment.

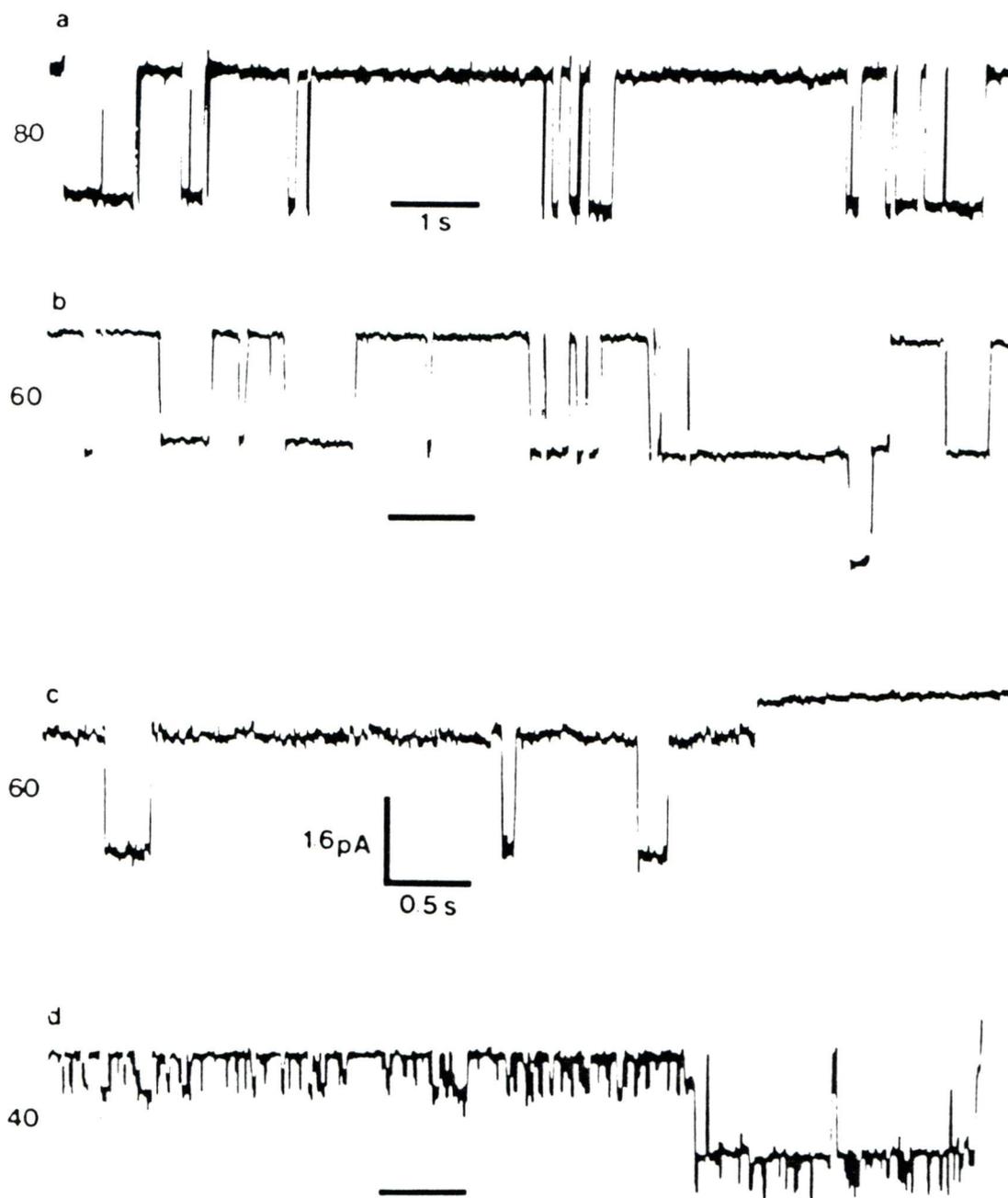
L'étude du comportement de ce canal de type I constituera l'axe majeur de ce mémoire.

Il est parfois possible d'enregistrer des fluctuations de courant

FIGURE No 12

Exemple de différents patrons d'activités de canaux unitaires pour différents potentiels transmembranaires en 150 mM de KCl.

- a) Activité du canal le plus souvent rencontré: Type I.
Les événements apparaissent par salves de façon aléatoire.
- b) Superposition de l'activité de deux canaux de type I enregistrés simultanément.
- c) L'activité du canal de type I superposée à un long temps d'ouverture d'un canal de plus faible amplitude.
- d) Superposition de l'activité d'un canal de cinétique rapide et de celle du canal de type I. Dans ce cas, l'expérience a été réalisée en 300 mM de KCl.



de faible amplitude mais de longue durée (5% de nos expériences). La figure No 12c illustre ce comportement où l'un des canaux semble être resté ouvert pendant plusieurs secondes à 22°C. Les événements de grande amplitude correspondent à l'activité du canal de type I enregistrée simultanément.

Un troisième type de canal a pu être caractérisé par des fluctuations rapides et une amplitude équivalente à la moitié de celle du canal de type I pour un même potentiel. Un enregistrement simultané de ces 2 types de canaux est illustré sur la figure No 12d. Cet enregistrement est réalisé avec 300 mM de KCl dans la micropipette.

D'autres types de comportement ont été enregistrés, mais dans la plupart des cas, il s'agissait de comportements intermédiaires, ou des variantes du canal de type I.

Les modifications d'amplitude et/ou des durées moyennes des événements observés peuvent être attribuées à différents facteurs:

- soit l'état physiologique des cellules
(âge des cultures)
- soit au mode d'enregistrement
(température, pH, qualité de l'isolement...)
- soit à une variance (au sens biologique et probabilistique du terme, dans le mode de fonctionnement de la protéine-canal)

L'état physiologique des cellules en culture est sans aucun doute un facteur important dans l'expression et la régulation de l'activité

des canaux ioniques unitaires.

Au cours de nos expériences, il nous est parfois arrivé de réaliser plusieurs séries de joints tore-ioniques ($R_s > 15 \text{ G}\Omega$) sans pouvoir visualiser l'activité d'un canal de type I. Cette constatation est un argument pour postuler qu'il existe une faible densité de canaux K^+ à la surface de ces cellules.

De façon comparative, pour le même type de micropipettes, la densité de canaux sodiques à la surface de ces cellules paraît relativement plus élevée: les enregistrements unitaires plus fréquents permettent de détecter de deux à dix canaux Na^+ sous le même "patch" (PAYET et MORIER, communication personnelle). Par ailleurs, sur l'ensemble des expériences au cours desquelles l'activité du canal de type I a été observée, environ 60% des enregistrements étaient de type multicanaux (2 à 5 canaux actifs). Ce qui tendrait à prouver que les protéines-canal sont regroupées par petits groupes de deux à cinq unités. Ces observations tendent donc à prouver que la répartition des canaux K de type I ne serait pas uniforme à la surface de la membrane des cellules.

La figure No 13A donne un exemple caractéristique d'enregistrements multicanaux de type I qui s'activent progressivement en dépolarisation.

La figure No 13B illustre un cas particulier d'enregistrement multicanaux. Dans ce cas, les canaux n'ont pas exactement la même amplitude, il est donc possible de décrypter la cinétique de chacun d'entre deux sur cette portion de tracé. Ces canaux semblent flucuter indépendamment,

FIGURE No 13

Enregistrements unitaires multicanaux.

A) Les différents tracés montrent qu'en fonction du potentiel, il est possible de révéler la présence d'au moins 3 canaux de type I qui s'activent en dépolarisation:

à -60 mV: 1 seul niveau d'ouverture est visible (ligne interrompue).

à -40 mV: 2 niveaux apparaissent.

à -30 mV: 3 niveaux de même amplitude apparaissent fréquemment.

Expérience réalisée en cell-attached avec 150 mM de KCl dans la pipette.

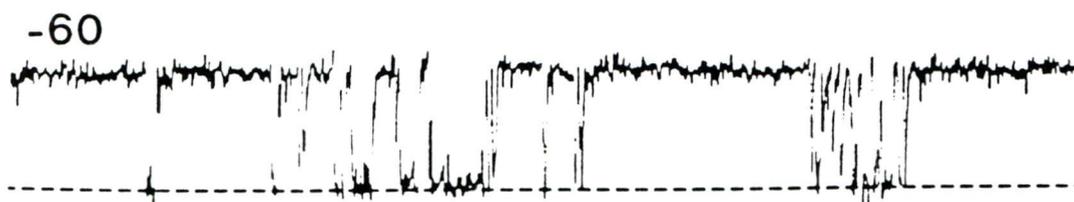
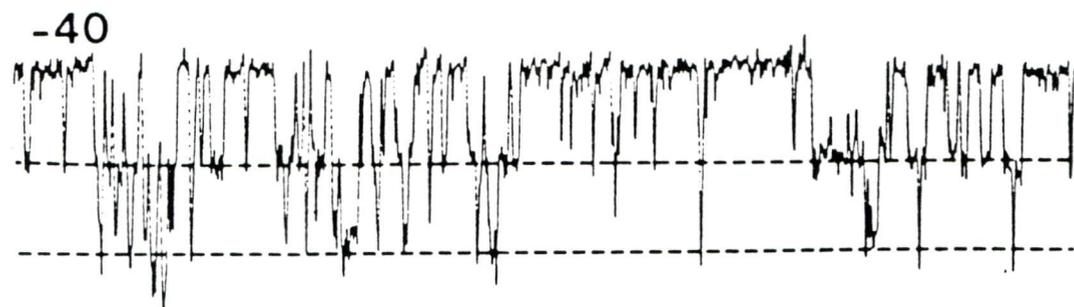
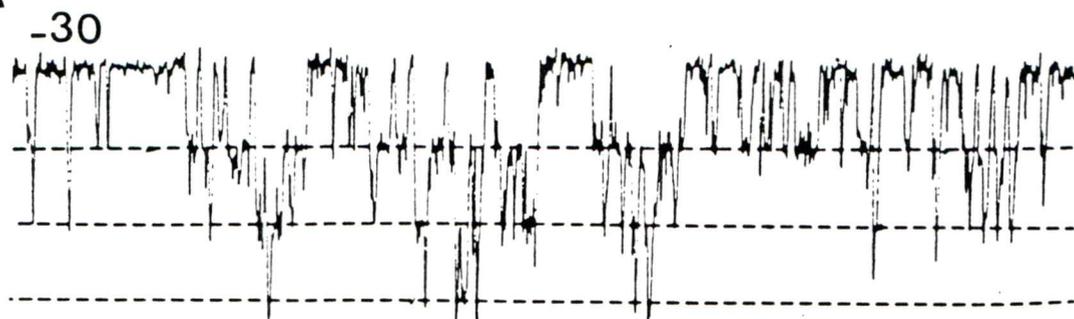
B) Décryptage de la cinétique de 2 canaux fluctuant simultanément.

Dans un cas particulier, la détermination des séries chronologiques est rendue possible car les 2 canaux n'ont pas la même amplitude sur cet enregistrement réalisé à -30 mV en cell-attached avec 150 mM de KCl dans la pipette.

α = événements du canal de faible amplitude $P_o \approx 0.60$

β = événements du canal de grande amplitude $P_o \approx 0.36$

Calibration horizontale: 500 msec; calibration verticale: 1 pA.

A

1 pA |
2 s

B

et l'éventualité que les différents niveaux de courant puissent correspondre à différents niveaux de conductance d'un même canal peut être écartée. En effet, il n'est pas possible d'enregistrer des transitions directes (simultanées) entre l'état fermé (non conducteur) et l'état ouvert d'amplitude maximum, tel que cela a été décrit par TRAUTMAN (1982) et SACHS (1983) pour certains canaux K^+ activés par l'acetylcholine.

D'autres types de canaux ont été observés, en particulier dans la configuration inside-out patch. Nous avons rapproché nos observations de celles publiées précédemment par différentes équipes travaillant sur l'activité des canaux K des cellules cardiaques.

L'un des canaux correspond tout à fait au type de comportement décrit par NOMA (1983) dans des conditions identiques. Il s'agit d'un canal K^+ ayant une conductance d'environ 80 pS qui n'est jamais observé en configuration "cell attached", dans des conditions normales. Ce canal s'active en l'absence d'ATP comme l'ont démontré TRUBE et HESCHELER en 1984. Par ailleurs, NOMA (1983) a montré qu'un canal de 34 pS de type "inward rectifier", régulièrement observé en configuration "cell attached" ne restait fonctionnel en "inside out" qu'en présence d'ATP. Ces deux types de canaux ont donc une sensibilité à l'ATP qui s'exprime de façon opposée: selon NOMA, le canal K de type "inward rectifier" (de 34 pS en 150 mM de KCl) a besoin d'ATP pour être fonctionnel. Alors que le canal K^+ de conductance plus élevée (80 pS) lui, s'active uniquement en l'absence d'ATP. Ceci suggère que ces deux types de canaux ont des rôles physiologiques complémentaires au niveau des cellules ventriculaires du coeur de mammifère. En second lieu, ceci nous a conduit à utiliser de l'ATP à 4 mM pour conserver le canal de type I "inward rectifier" actif dans la configuration "inside out patch". Ce canal a, selon toute vraisemblance, besoin d'être en présence d'ATP pour rester fonctionnel pendant plusieurs minutes.

Un autre type de canal que nous avons observé à plusieurs reprises dans la configuration "inside-out" est un canal de cinétique rapide, de

grande amplitude, comparativement à celle du canal de type I au même potentiel. La conductance serait de l'ordre de 120 pS. Il s'agit vraisemblablement d'un canal au chlore (COULOMBE et DUCLOHIER, 1984).

4. Enregistrement de l'activité du canal de type I en fonction de la concentration potassique externe et du potentiel

A. Introduction

L'ensemble des expériences réalisées dans cette partie ont été conduites pour élucider le comportement de ce canal en fonction de la concentration potassique externe et du potentiel électrique transmembranaire. Elles permettront de discuter l'influence de ces paramètres expérimentaux sur les modifications des propriétés physiques intrinsèques de ce canal, telles que la conductance, la sélectivité, la perméabilité.

Les propriétés statistiques du canal et les cinétiques de changement d'état seront étudiées dans les parties suivantes.

B. Protocoles

Ils consistent à utiliser des micropipettes remplies de solutions contenant différentes concentrations de chlorure de potassium mais dont la force ionique est maintenue constante par addition de NaCl (Voir tableau No 2, p. 33). Les différents niveaux de voltage sont appliqués en continu pendant 2 à 3 minutes.

C. Résultats - Activité du canal

Quelques exemples de comportements caractéristiques observés en fonction des concentrations potassiques utilisées sont rapportés sur la série de planches successives des figures No 14, 15, 16, 17.

En présence de 150 mM de KCl dans la pipette (Fig. No 17), il est clair que le comportement général du canal est dépendant du potentiel électrique appliqué au fragment de membrane isolé sous la pointe de la pipette. En effet dans ce cas où le gradient de concentration aux ions K^+ est pratiquement nul, l'amplitude des événements unitaires varie en fonction du potentiel transmembranaire qui est égal à :

$$E_p = E_m - V_p$$

E_p = potentiel électrique transmembranaire sous le "patch"

E_m = potentiel de repos de la membrane cellulaire ≈ -60 mV

V_p = voltage appliqué dans la micropipette.

Sur cet enregistrement, il est également possible de voir que les durées et les fréquences d'ouverture sont modifiées par le potentiel électrique à travers la membrane. La durée des événements "ouverts" semble augmenter quand la membrane est dépolarisée.

Les autres enregistrements, en 75 mM de KCl (Fig. No 16), en 50 mM de KCl (Fig. No 15) et en 5.4 mM de KCl (Fig. No 14) traduisent le même comportement général. Bien que l'amplitude des événements soit moins grande et que les temps fermés soient plus longs quand la

FIGURE No 14

Exemple d'enregistrement réalisé en 5.4 mM de KCl + 144.5 mM NaCl dans la micropipette pour différents potentiels transmembranaires (colonne de gauche).

5.4 mM KCl

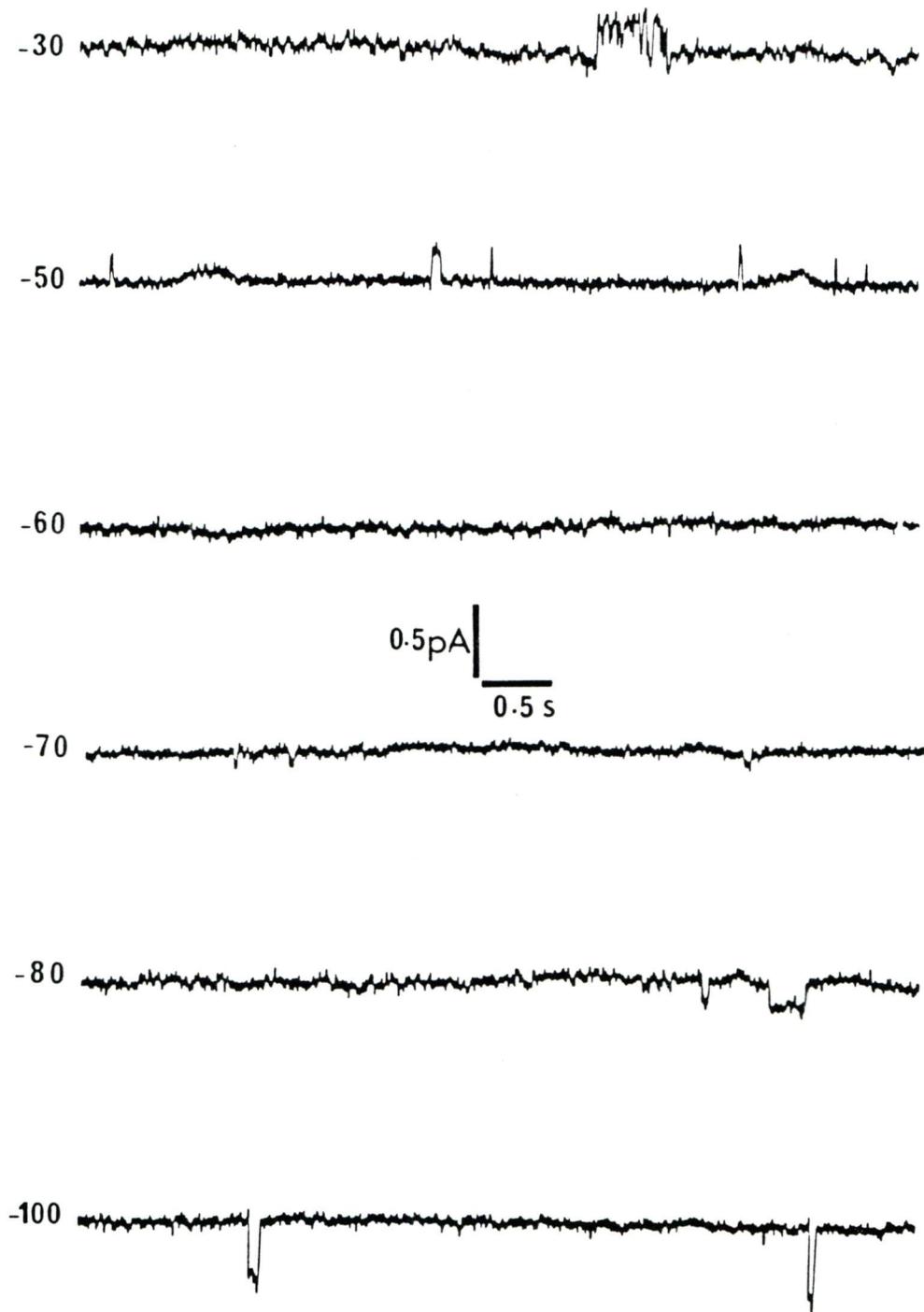


FIGURE No 15

Exemple d'enregistrement réalisé en 50 mM de KCl + 100 mM NaCl
dans la micropipette pour différents potentiels transmembranaires.
(colonne de gauche).

50 mM KCl

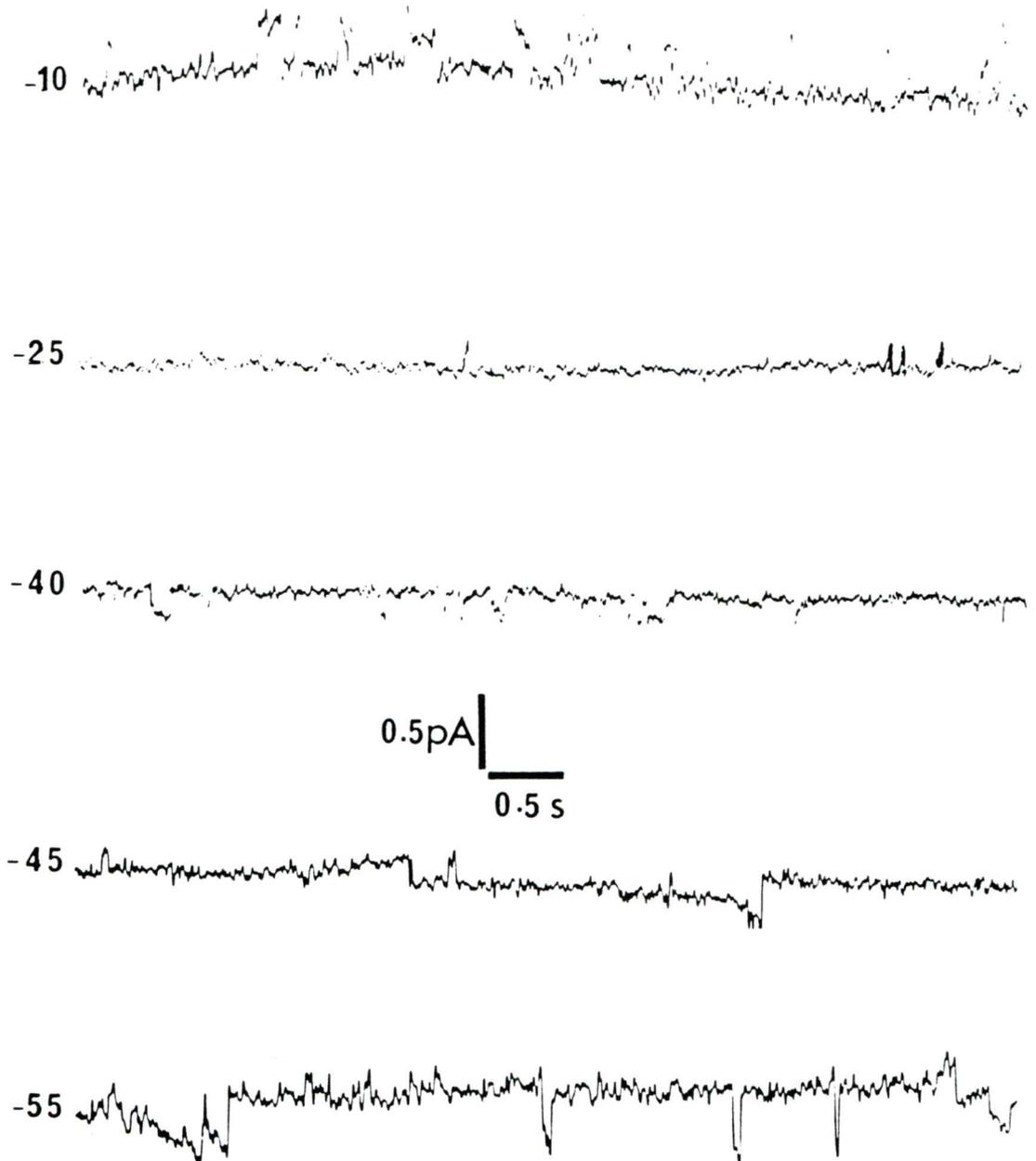


FIGURE No 16

Exemple d'enregistrement réalisé en 75 mM de KCl + 75 mM NaCl dans
la micropipette pour différents potentiels transmembranaires.
(Colonne de gauche).

75 mM KCl

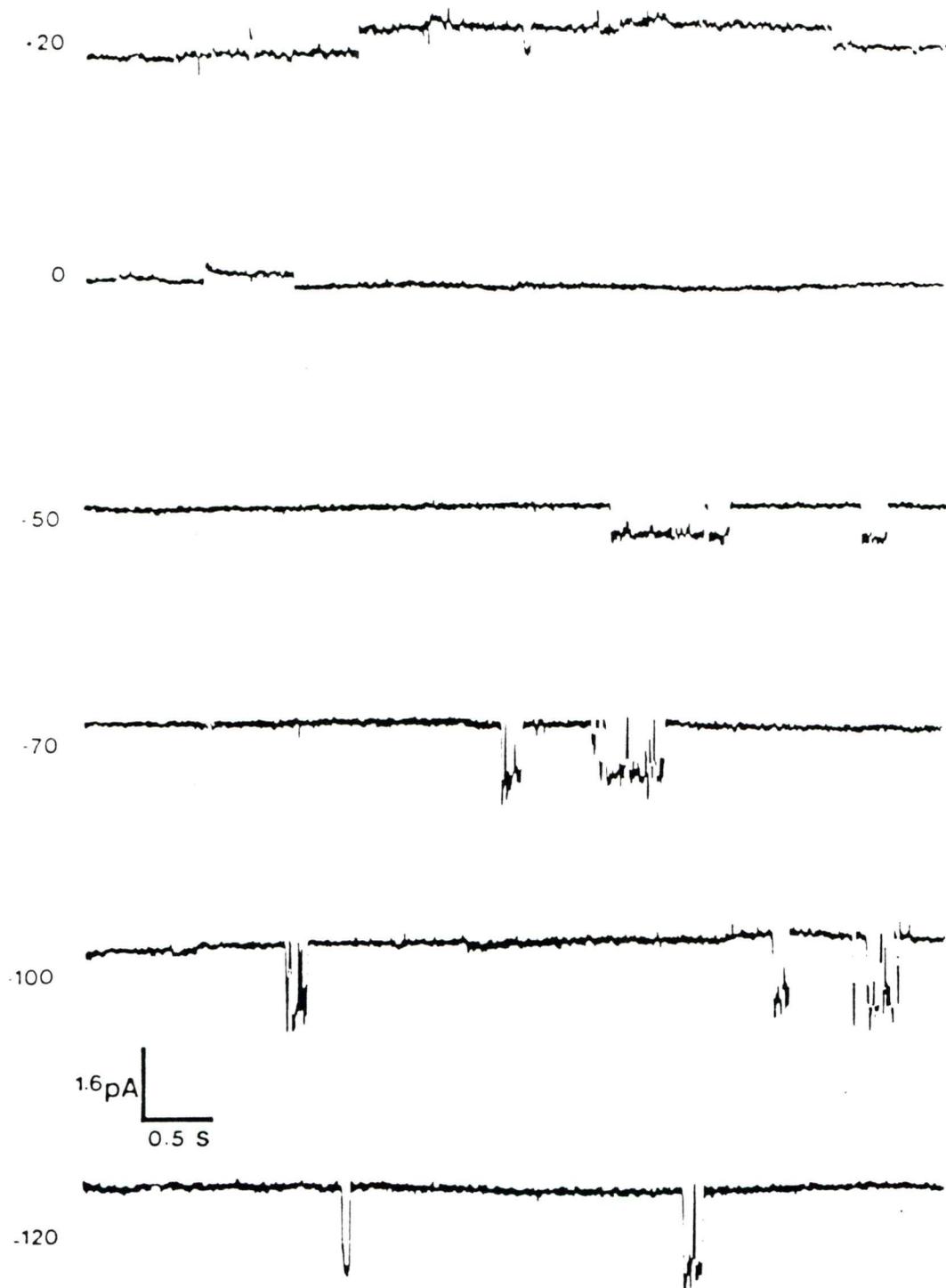
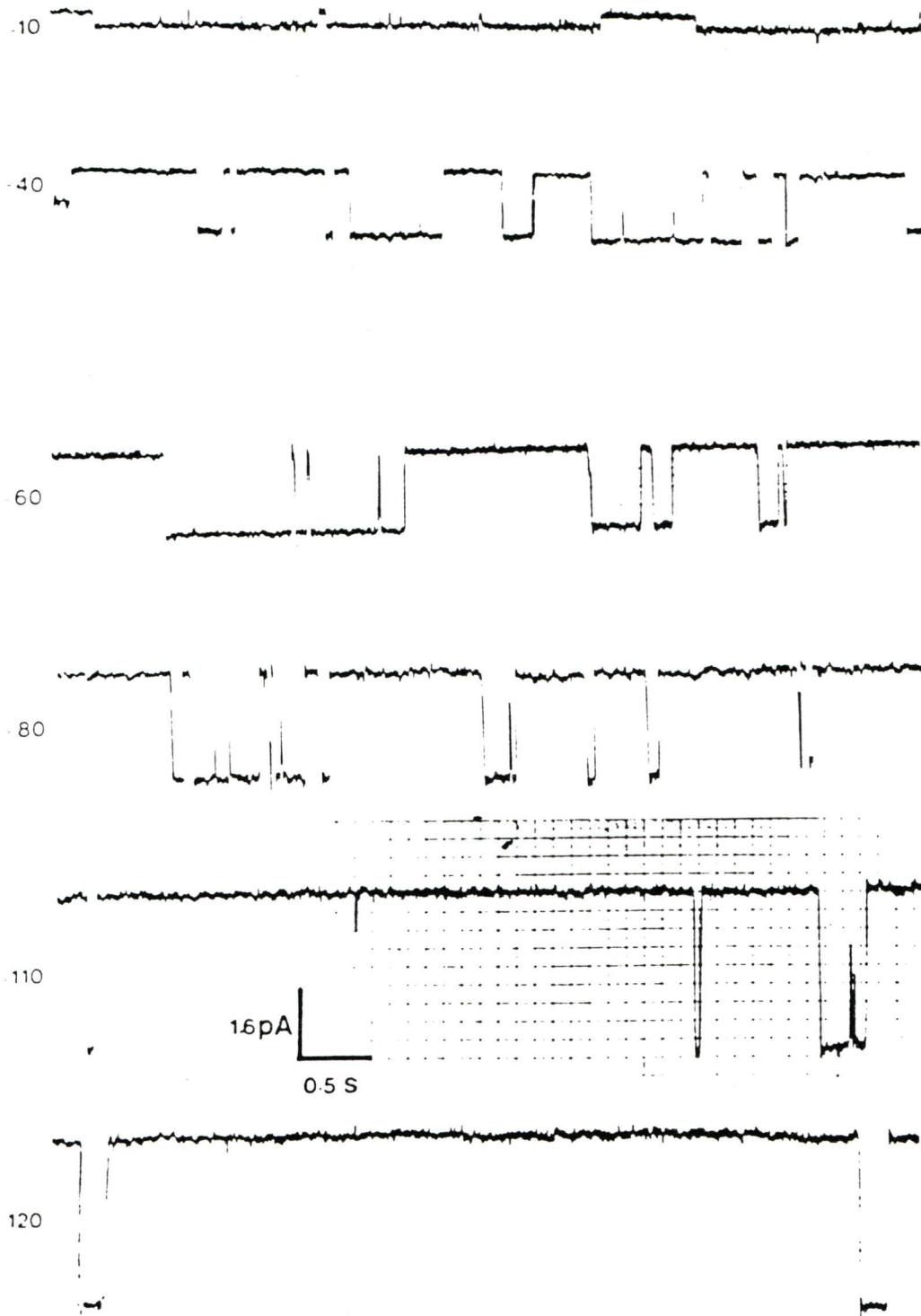


FIGURE No 17

Exemple d'enregistrement réalisé en 150 mM de KCl dans la micro-pipette pour différents potentiels. (Colonne de gauche).

150mM KCl



concentration K^+ externe, $[K]_o$, diminue. Cependant, dans ces trois derniers cas, il est possible d'enregistrer des sauts de courant sortant de faibles amplitudes.

D. Résultats - conductance du canal

Les courbes courant/voltage (I/V) permettent de quantifier les variations d'amplitude des événements en fonction du potentiel. Elles ont été construites pour plusieurs $[K]_o$ (Figure No 18). Les courbes sont linéaires pour les courants entrant ce qui traduit un comportement ohmique du canal dans la gamme de potentiels correspondants.

$$\gamma = \frac{i}{E_m}$$

γ = conductance unitaire

i = courant unitaire

E_m = potentiel transmembranaire

La pente de ces courbes traduit les conductances unitaires du canal dans les différentes conditions. Elles sont respectivement 150, 75, 50, 10.8, 5.4 mM de KCl. Par ailleurs, il faut noter que, en 150 mM de $[K]_o$, aucun courant sortant ne peut être détecté dans la limite de résolution de notre système qui est de 0.2 pA. Ce qui tend à prouver que dans ces conditions, le canal rectifie de façon importante pour les potentiels supérieurs au potentiel d'équilibre aux ions K^+ (≈ 0 mV en 150 mM $[K]_o$). Cette propriété de rectification dans le sens entrant est une caractéristique du canal de type I qui est bien traduit sur la courbe I/V réalisée en 75 mM de $[K]_o$, (les carrés ouverts sur la Fig. No 18), bien que le phénomène soit moins marqué qu'en 150 mM de KCl. La rectification semble donc dépendre à la fois du potentiel vu par la membrane et de $[K]_o$.

FIGURE No 18

Courbes courant/voltage pour différentes concentrations potassiques dans la micropipette et valeurs des conductances calculées sur la partie linéaire des courbes.

| | | |
|-----|-----------------------------|-----------|
| (▼) | 5.4 mM, KCl + 144.6 mM NaCl | = 12 pS |
| (●) | 50 mM, KCl + 100 mM NaCl | = 15.5 pS |
| (□) | 75 mM, KCl + 75 mM NaCl | = 25 pS |
| (■) | 150 mM, KCl | = 35 pS |
| (○) | 150 mM, K Acétate | = 35 pS |

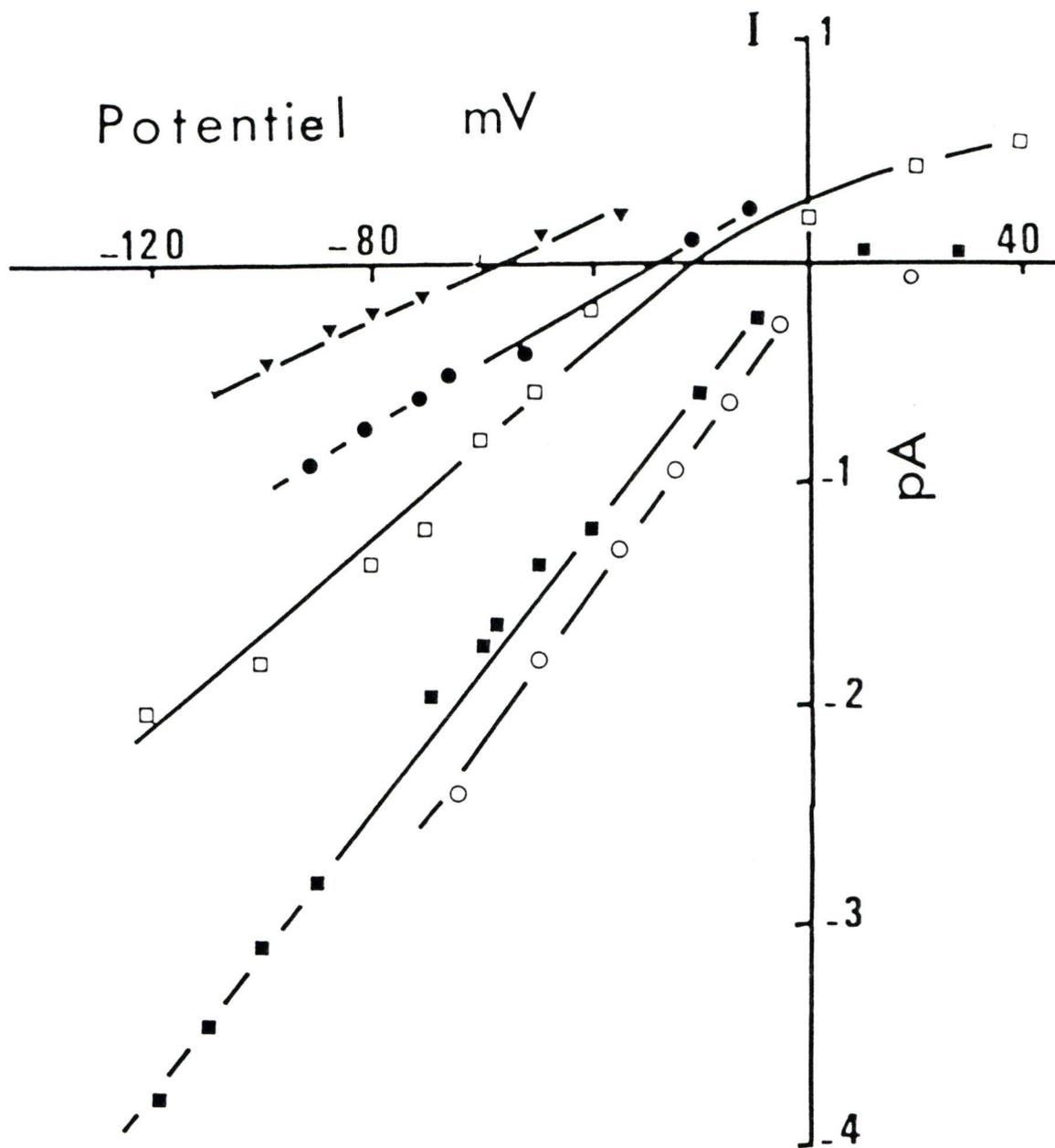


FIGURE No 19

Comportement du canal de type I pendant des rampes de voltage.

- A) Rampes de type "dents de scie" symétriques de 60 mV de part et d'autre des potentiels d'équilibre aux ions K^+ .

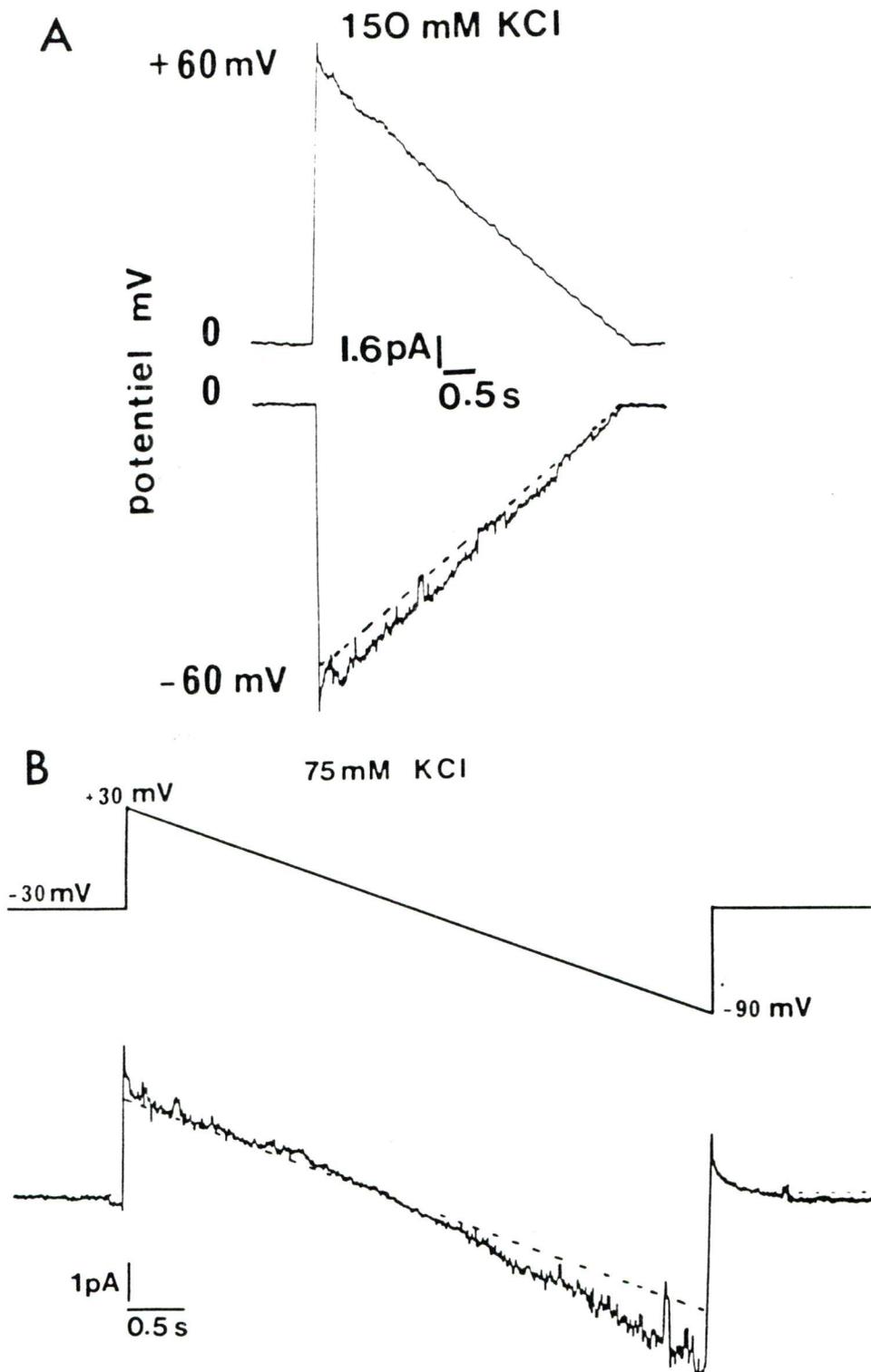
($E_K = 0$ mV en 150 mM de KCl).

Dans la gamme des potentiels négatifs des événements entrant se superposent à la ligne de courant de fuite (ligne en tirets).

Dans la gamme des potentiels positifs, aucun événement sortant n'est détectable par rapport à la ligne du courant de fuite. La pente des lignes de courant de fuite est pratiquement identique.

- B) Rampe continue en 75 mM KCl + 75 mM NaCl. Symétrique de part et d'autre de -30 mV. Ce qui correspond à un potentiel de 12 mV plus négatif que le potentiel d'équilibre aux ions dans ces conditions.

Les événements sortant sont nettement moins amples que les événements entrant.



Deux autres façons d'illustrer cette propriété de rectification du canal sont montrées sur la Figure No 19A et B. Sur la figure 19A, il s'agit de deux rampes symétriques de part et d'autre du potentiel d'équilibre aux ions.

Il est possible de constater que la ligne de courant de fuite, pour les potentiels positifs, a une pente pratiquement symétrique à la ligne de courant de fuite qui relie les événements dans l'état fermé pour les potentiels négatifs (tracé en pointillés sur l'enregistrement).

Si le canal conduisait de façon ohmique: c'est-à-dire si sa conductance était linéaire pour les potentiels positifs, la ligne de courant sortant, pour ces potentiels positifs, devrait avoir une pente supérieure.

Un autre type de rampe, réalisé en continu de part et d'autre d'un potentiel proche du potentiel d'équilibre aux ions en 75 mM de $[K]_o$, est présenté sur la figure No 19B. Elle illustre de façon dynamique et non-équivoque la propriété de rectification de ce canal, qui est moins important qu'en 150 mM de KCl. Mais aucune explication satisfaisante ne peut être avancée pour expliquer ce comportement.

Quelques expériences ont été par ailleurs réalisées en présence de 300 mM de KCl dans les pipettes, et bien que peu d'enregistrements aient une durée supérieure à 1 ou 2 minutes, la membrane paraissant se labiliser rapidement, il a été possible de mesurer une conductance maximale de l'ordre de 40 pS.

E. Résultats - sélectivité et perméabilité du canal

La sélectivité du canal a été testée de deux façons différentes:

- Premièrement, la substitution des ions chlorures par des ions acétates ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$) n'a pas eu d'effet appréciable sur la valeur de la conductance (Fig. No 18) qui est de 35 pS (en 150 mM de K-acétate). Une valeur tout-à-fait comparable à celle obtenue en 150 mM de KCl. Ce qui a permis d'écartier l'éventualité que ce canal puisse être perméable aux anions, au chlore en particulier.

- Deuxièmement, la sélectivité du canal a été déterminée par le déplacement des valeurs du potentiel d'inversion (ou potentiel d'équilibre) aux ions pour les différentes concentrations K utilisées (Fig. No 18).

Ces potentiels d'équilibre sont déplacés vers des valeurs plus négatives lorsque la concentration $[\text{K}]_o$ diminue. Pour des concentrations de 75 et 50 mM de KCl, elles correspondent à celles qui peuvent être recalculées par l'équation de Nernst pour ces ions:

$$E_K = + \frac{\text{R.T.}}{\text{z.F.}} \cdot \ln \frac{[\text{K}]_o}{[\text{K}]_i}$$

Ce qui donne une valeur de potentiel d'équilibre calculée pour $[\text{K}]_o = 75$ mM de -18.6 mV et la valeur trouvée expérimentalement sur la courbe I/V est de -20 mV.

Ceci tendrait donc à prouver la bonne sélectivité du canal aux ions K.

Sur la courbe de la figure No 20A, la valeur des potentiels d'inversion a été portée en coordonnées semilogarithmiques en fonction de

FIGURE No 20

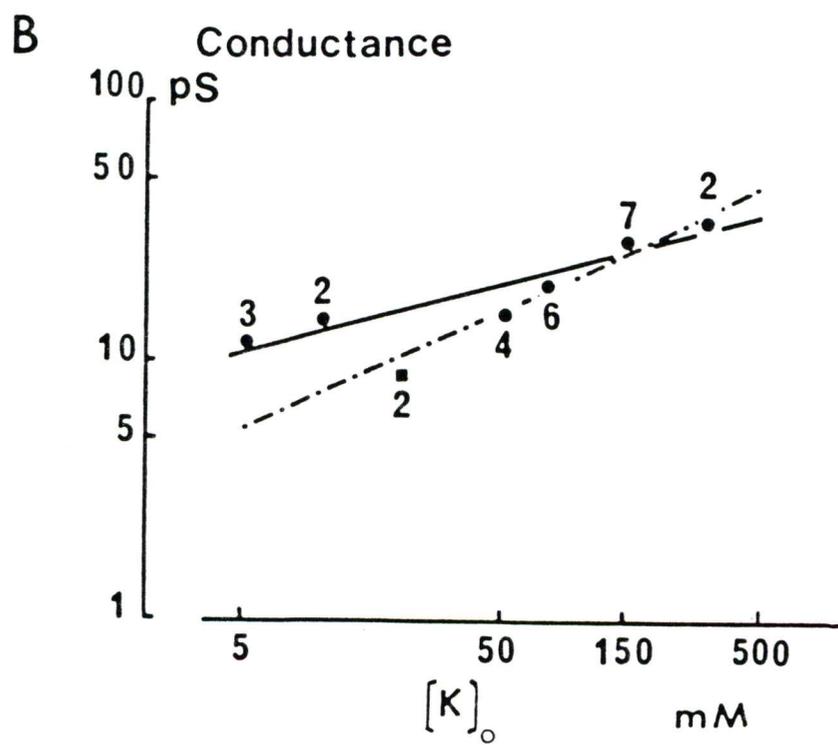
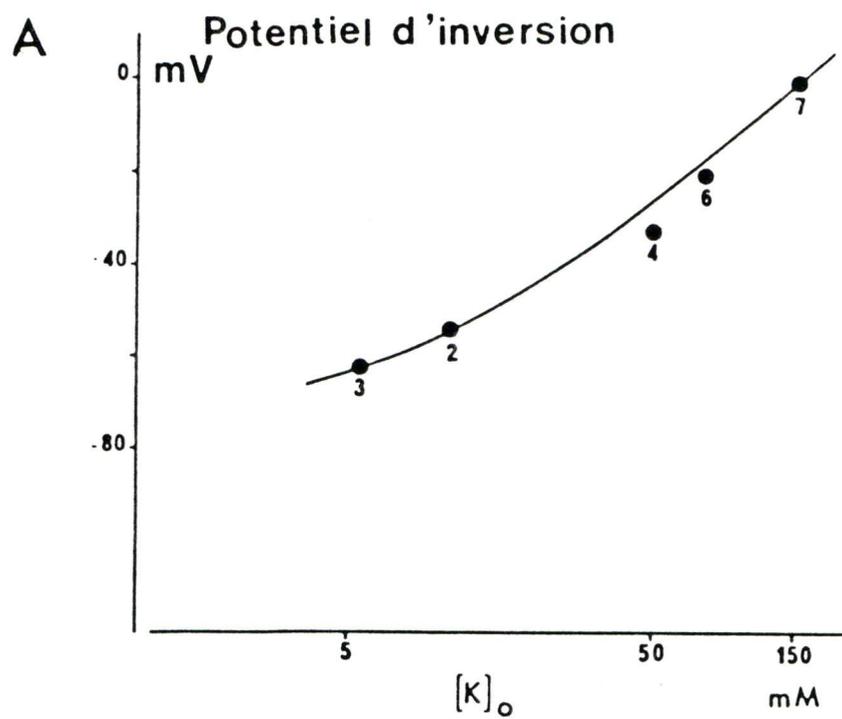
Evaluation de la perméabilité relative et de la conductivité du canal en fonction de $[K]_o$.

A) Valeurs des potentiels d'inversion en fonction de $[K]_o$.

La ligne en traits continus reliant les points expérimentaux a été tracée à l'aide de l'équation de GOLDMAN-HODGKIN et KATZ, pour un rapport de perméabilité optimum de $P_{Na}/P_K = 0.056$. (régression non-linéaire par la technique des moindres carrés).

B) Valeur de la conductance unitaire en fonction de $[K]_o$.

La ligne continue est une régression linéaire à travers tous les points expérimentaux, et sa pente est de 0.29. Alors que la ligne en tirets est une régression linéaire qui tient uniquement compte des points obtenus pour les concentrations $K > 50$ mM, sa pente est de 0.46. Le carré noir (■) correspond à la valeur de conductance moyenne obtenue en solution 20 mM de KCl, + 130 mM de chlorure de choline + 0.1 mM d'atropine (sans Na dans les pipettes). Pour chaque point, le nombre d'expériences est indiqué.



la concentration potassique. Les points ne sont pas alignés, ce qui signifierait que le canal de type I ne serait pas uniquement perméable aux ions K. Les pipettes contenant des ions Na^+ , l'équation de GOLDMAN, HODGKIN et KATZ qui tient compte du rapport de perméabilité ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$) a été utilisée pour relier les points expérimentaux par une courbe théorique.

Cette courbe a donc été calculée par régression non-linéaire par la méthode des moindres carrés avec un rapport de $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ optimum de 0.056.

$$E_{\text{rev}} = - \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_{\text{K}} [\text{K}]_o + P_{\text{Na}} [\text{Na}]_o}{P_{\text{K}} [\text{K}]_i + P_{\text{Na}} [\text{Na}]_i} \quad \text{GOLDMAN HODGKIN KATZ} \\ \text{(G.H.K.)}$$

Les courbes de la figure No 20B tracées en ordonnées logarithmiques ont été tracées pour évaluer la relation entre la concentration potassique la conductance du canal.

La droite de régression linéaire qui relie les points expérimentaux par la méthode des moindres carrés, a une pente de 0.287. Ce qui est très différent de la valeur théorique de 0.5 si les valeurs de la conductance étaient proportionnelles à $[\text{K}]_o^2$. SAKMANN et TRUBE (1984a) rapportent une valeur de 0.62 pour le même type de canal sur les cellules ventriculaires de cobaye.

Si la droite de régression linéaire porte uniquement sur les valeurs des points correspondant aux concentrations supérieures à 50 mM, la pente de la courbe (en tirets) a une valeur de 0.46 plus proche de la valeur théorique de 0.5 qui traduit la proportionnalité entre les

valeurs de la conductance et la $[K]_0^2$ (HAGIWARA et coll., 1976).

Par la suite, nous avons réalisé une série d'expériences sans NaCl, dans les micropipettes, pour évaluer l'impact du sodium sur les valeurs de la conductance. Dans ces expériences, les pipettes étaient remplies de 20 mM de KCl + 130 mM de chlorure de choline + 0.1 mM d'atropine. L'atropine a été ajoutée afin de prévenir toute activation de canaux de faible conductance par la choline (voir l'action de Ach p. 152 du mémoire).

La valeur de conductance moyenne obtenue, pour 3 expériences cohérentes, était de 9.2 pS. Cette valeur était donc bien inférieure à celle à laquelle il était possible de s'attendre si la pipette avait été remplie de 20 mM KCl + 130 mM NaCl (courbe en traits pleins, Fig. No 20B).

Mais la valeur de conductance moyenne de 9.2 pS, calculée à partir des expériences réalisées en présence de choline (sans Na), était très proche de celle qui pouvait être envisagée à priori en fonction de la droite de régression linéaire (en tirets) calculée à partir des valeurs expérimentales pour les $[K]_0 > 50$ mM.

En tout état de cause, les conductances pour les $[K]_0$ faibles et en présence de Na ont des valeurs supérieures à celles mesurées pour les expériences sans Na^+ , ce qui prouverait un effet facilitateur du Na sur la conductance de ce canal.

Deux autres types de graphes ont été confectionnés à partir du même ensemble de résultats expérimentaux.

La figure No 21A montre que les valeurs de conductance en fonction de $[K]_0$ atteignent un plateau. Ceci traduit un phénomène de saturation qui peut être mis en rapport avec ce qui est connu au niveau des cinétiques de réaction des systèmes enzymatiques.

Sur ce graphique, les étoiles pleines correspondent aux expériences réalisées sans Na dans les micropipettes. Elles sont reliées par une courbe tracée à main levée en traits interrompus. Alors que la courbe en traits continus est tracée en prenant en compte les valeurs de conductance également obtenues pour les plus faibles $[K]_0$ et en présence de Na^+ .

La différence de formes entre les deux pieds de courbes reflète la contribution du Na^+ . Cet ion jouerait en quelque sorte le rôle d'agoniste partiel avec une activité intrinsèque moindre que celle du K^+ . Le rapport d'activité serait vraisemblablement de l'ordre du rapport de perméabilité $P_{Na}/P_K = 0.056$.

Toujours à partir des mêmes valeurs expérimentales, portées en graphe de LINEWEAVER-BURK (1934) (Fig. No 21B), il est possible de définir deux autres paramètres théoriques: γ_{max} et K_D .

La conductance théorique maximum (γ_{max}) qui correspondrait à l'intersection de la droite en tirets, qui relie les points expérimentaux obtenus sans Na^+ , et l'axe des ordonnées.

Pour une concentration $[K]_0$ de 500 mM ($[K]_0 = \infty$), la valeur de

FIGURE No 21

Saturation du canal et constante de dissociation apparente en K.

Les étoiles pleines représentent les expériences réalisées en absence de Na dans les pipettes.

A) Saturation de la conductance du canal en fonction de $[K]_o$.

Mise en évidence de l'effet facilitateur du Na pour les expériences réalisées avec $[K]_o$ faible. Noter la différence entre les formes des pieds des deux courbes tracées à la main.

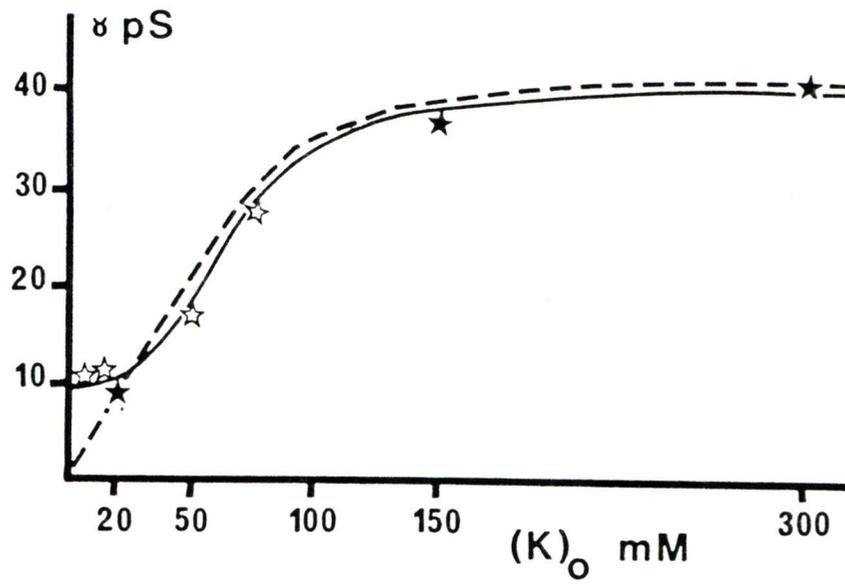
B) Graphe de LINEWEAVER-BURK.

L'inverse de la conductance unitaire ($1/\gamma$) en fonction de l'inverse de $1/[K]_o$ permet d'avoir accès à des paramètres tels que:

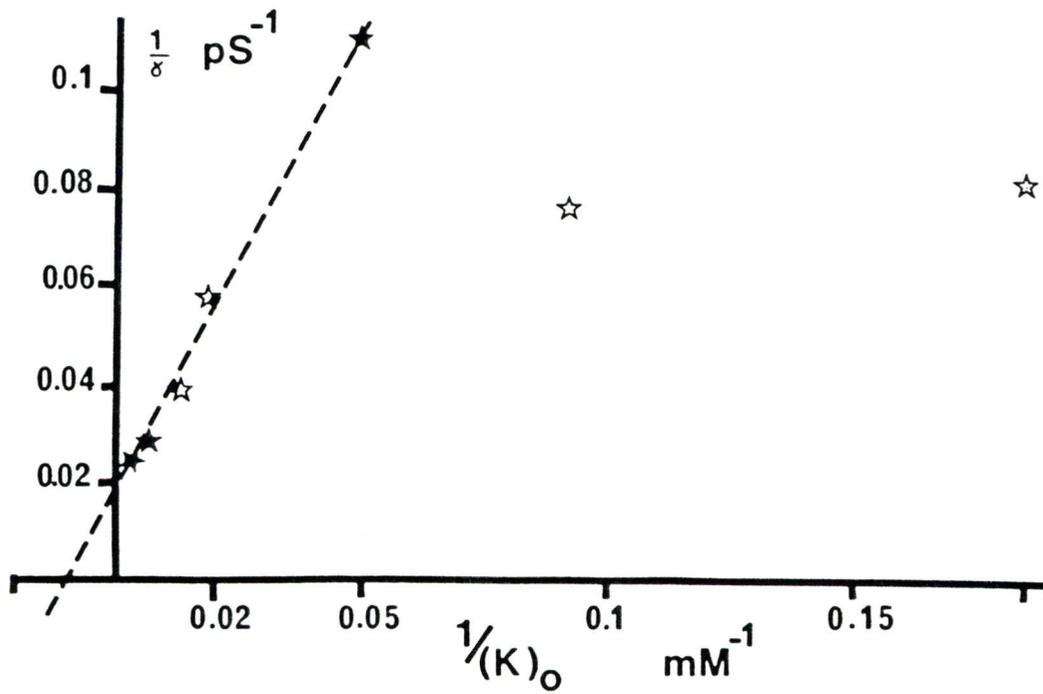
- $\gamma_{\max} \approx 50$ pS pour $[K]_o^{\infty} \approx 500$ mM

- K_D apparente = 100 mM.

A



B



γ_{\max} théorique a été évaluée à 50 pS. Par ailleurs, l'intersection de la droite en tirets avec l'axe des abscisses donne une valeur négative de -0.01 qui équivaut à: moins l'inverse de la constante de dissociation ($-\frac{1}{K_D}$). Ceci permet d'évaluer une constante de dissociation apparente de $K_D = 100$ mM.

Les valeurs expérimentales obtenues en présence de 75 mM et 50 mM de $[K]_o$ sont proches de la droite qui, dans l'absolu, doit être tracée en tenant compte uniquement des expériences où seule la concentration K^+ a été changée. Ce qui n'a pas été le cas dans nos expériences où la diminution de $[K]_o$ a été balancée par une augmentation de $[Na]_o$.

La variation concomitante des 2 agonistes éventuels explique certainement l'éloignement des 2 points à droite du graphique.

F. Discussion

Dans cette partie, nous avons tout d'abord montré que les patrons d'activité du canal de type I variaient en fonction du potentiel électrique et de la $[K]_o$:

Les courbes I/V de ce canal sont linéaires pour les potentiels inférieurs aux potentiels d'inversion qui, par ailleurs, sont dépendants de la $[K]_o$.

Cependant, ce type de canal potassique n'a pas un comportement ohmique sur toute la gamme de potentiels étudiés. En effet, il a été montré

qu'en 75 mM de KCl, le canal rectifie dans le sens entrant par les potentiels supérieurs au potentiel d'équilibre aux ions.

En 150 mM de KCl, la rectification du canal paraît plus drastique car aucun des sauts de courant sortant ne peut être détecté même lors des rampes de voltage, 60 mV plus positifs que le potentiel d'équilibre aux ions ($E_K = 0$ mV en 150 mM KCl). Cet argument permet de dire que, dans ces conditions, le canal ne conduit pratiquement pas.

Quant à la sélectivité du canal, étudiée à partir des potentiels d'inversion pour différentes $[K]_o$, elle montre que le canal est relativement bien sélectif au K^+ mais que les ions Na^+ peuvent également perméer. Le rapport de perméabilité optimum, calculé pour décrire les valeurs expérimentales par l'équation de (G.H.K.), est: $P_{Na}/P_K = 0.056$.

Nous avons également montré que les ions Na^+ pouvaient avoir un effet facilitateur sur la conductance unitaire du canal.

5. Etude des propriétés statistiques du canal

A. Introduction

La probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert (P_o) a été étudiée en fonction de $[K]_o$ et du potentiel.

Suite aux mesures de la conductance unitaire, la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert (P_o) est certainement le paramètre qui reflète le mieux le comportement d'un canal.

A un potentiel donné:

$$P_o = \frac{t_o}{t_{tot}} = \frac{t_o}{t_o + t_f}$$

t_o = temps passé dans l'état ouvert; t_{tot} = durée totale de l'enregistrement.
 t_f = temps passé dans l'état fermé

La probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert est le rapport entre le temps passé dans l'état ouvert sur le temps total de l'enregistrement. Et pour un canal, le courant moyen sera:

$$\langle i \rangle = P_o \cdot i \quad i = \text{courant "unitaire"}$$

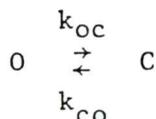
Quant au courant moyen macroscopique,

$$\langle i \rangle = N \cdot P_o \cdot i \quad N = \text{nombre de canaux.}$$

Dans cette étude, les P_o ont été calculés de façon semi-automatique par le programme "HISTO" qui permet de calculer les densités de probabilité des événements en fonction de leur amplitude (CHAP. III (4)).

L'analyse a été faite à partir d'enregistrements de 1 à 2 minutes et sans éliminer les périodes silencieuses, ce qui permet d'avoir une idée globale du comportement du canal. Mais cela ne permet pas de tirer de l'information sur les constantes d'équilibre à l'intérieur des "bursts" (METHFESSEL et BOHEIN, 1982; BECHEM et coll., 1983).

Pour un modèle simple à deux états:



$$K_{eq} = \frac{k_{co}}{k_{oc}} = \frac{\tau_o}{\tau_f} \approx \frac{P_o}{1-P_o}$$

τ_o et τ_f sont les temps moyens passé respectivement dans l'état ouvert et dans l'état fermé.

Dans le but de déterminer dans quelle mesure les conditions expérimentales modifient le comportement statistique du canal, la P_o a été évaluée en fonction du potentiel transmembranaire pour deux concentrations de KCl dans la micropipette.

B. Résultat

L'analyse des probabilités de trouver le canal dans l'état ouvert est réalisée en régime établi. C'est à dire qu'à voltage constant, la P_o ne dépend pas du temps.

La figure No 22A montre que la P_o augmente en fonction du potentiel, ce qui indique que le canal s'active quand la membrane se dépolarise.

Il faut noter la difficulté à détecter les transitions au voisinage du potentiel d'équilibre aux ions, l'amplitude des événements devenant trop faible. Il en va de même pour les potentiels positifs (> 0 mV) en 150 mM de KCl où l'étude des P_o devient très problématique.

Sur la même figure No 22A, il est possible de voir que pour chaque potentiel étudié, la P_o est augmentée en 150 mM de KCl par rapport aux valeurs rapportées en 75 mM.

FIGURE No 22

Effet du potentiel sur la P_o et sur le courant moyen à travers le canal en fonction de $[K]_o$.

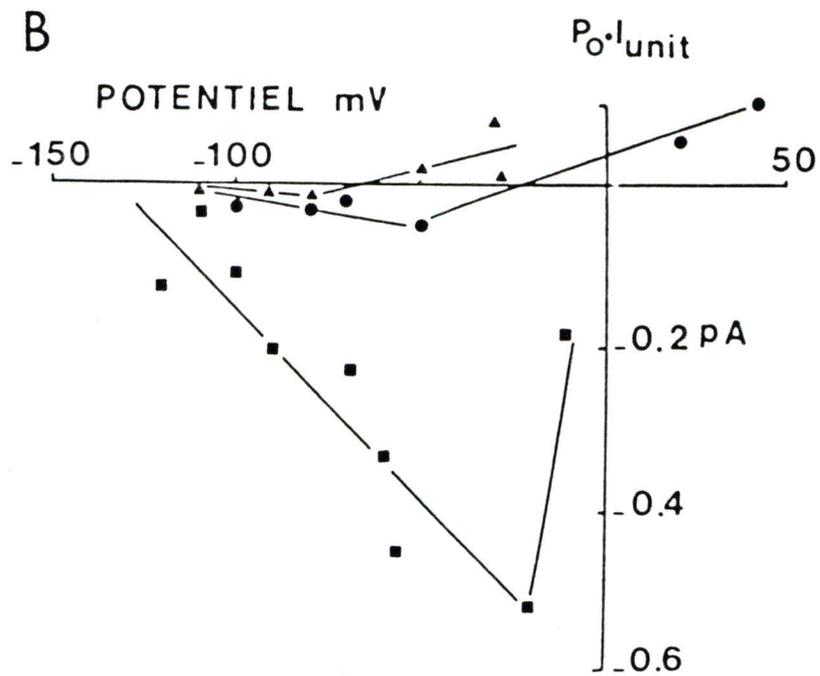
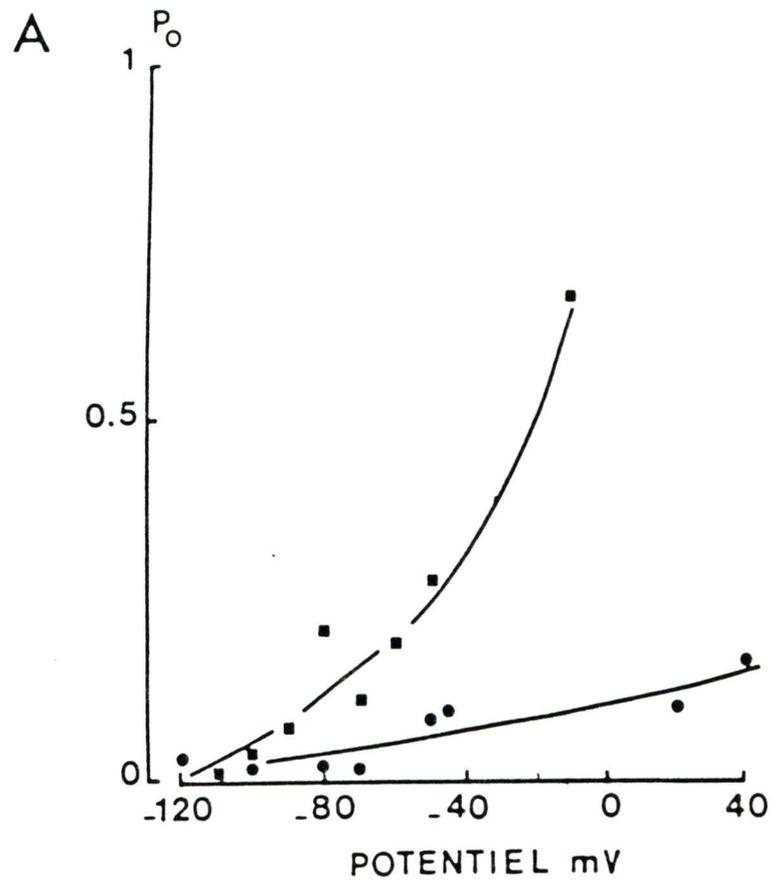
A) Les valeurs de la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert (P_o) ont été portées en fonction du potentiel pour deux valeurs de $[K]_o$:

(■) 150 mM de KCl et (●) 75 mM de KCl + 73 mM de NaCl.

L'évaluation des P_o a été faite à partir des histogrammes de densité de probabilité.

B) Calcul du courant moyen à l'état stable $P_o \times \Delta i$ en fonction du potentiel pour trois valeurs de $[K]_o$. (■) 150 mM de KCl, (●) 75 mM de KCl + 75 mM de NaCl, et (▲) 10 mM de KCl + 140 mM de NaCl.

Noter la forme des courbes qui peuvent être rapprochées de celle du courant macroscopique moyen mesuré à l'état stable (Figure No 11B).



Ces différentes observations montrent bien que le comportement du canal est dépendant à la fois du potentiel électrique transmembranaire, et de $[K]_o$.

Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que pour une $[K]_o$ considérée comme normale (5.4 mM), la P_o du canal soit relativement faible, de l'ordre de 0.05 à -80 mV, et de 0.08 à -30 mV.

Par ailleurs, les courbes I/V du courant moyen à travers le canal ont été reconstruites suivant:

$$\langle I \rangle = P_o \times i$$

pour chaque potentiel, le nombre de canaux est constant: $N = 1$.

Les résultats obtenus pour trois concentrations K^+ différentes (150, 75, 10.8 mM) sont représentés sur la figure No 22B. Les 3 courbes ont des formes en V caractéristiques. Le fait que le courant moyen diminue pour les fortes hyperpolarisations, doit être mis en rapport avec les valeurs très faibles de P_o pour ces potentiels. D'un point de vue théorique, ces valeurs de courant moyen peuvent être mises en relation avec ce que doivent être celles du courant macroscopique résultant.

De fait, la forme des courbes de la figure No 22B peut être rapprochée de l'allure de la courbe I/V du courant macroscopique obtenue en "steady state" pour des hyperpolarisations (Fig. No 11B, CHAP. IV (2)).

C. Discussion

Ces résultats montrent donc bien que la P_o de ce canal augmente quand la membrane est dépolarisée. Et que cette dépendance au potentiel est d'autant plus marquée que la $[K]_o$ est élevée. Ce type de dépendance de la P_o au potentiel transmembranaire est similaire à celle rapportée par SAKMANN et TRUBE (1984a,b) pour un canal du même type, étudié sur les cellules ventriculaires isolées du cobaye.

Par contre, elle ne correspond pas aux caractéristiques décrites classiquement pour les canaux de type "inward rectifier" pour lesquels la P_o augmente avec les potentiels hyperpolarisants (FUKUSHIMA, 1982; OHMORI, 1978). Un tel comportement a été décrit par BECHEM et coll. (1983) pour un canal potassique de type inward rectifier étudié sur les myocytes atriaux de cobaye.

Toutes les expériences sont réalisées dans la configuration "cell attached", donc dans des conditions où le milieu intracellulaire reste statistiquement le même. Le degré de désactivation observé pour différentes solutions dans la micropipette ne peut être attribué à un anion intracellulaire. Cependant, une éventuelle régulation de l'activité de ce canal par un métabolite intracellulaire ne peut être écartée à partir de ces expériences. TRUBE et HESCHELER (1984) ont récemment démontré l'influence du taux d'ATP sur l'activité de ce type de canal.

Par ailleurs, le même type de comportement général a été observé quelle que soit la concentration Na^+ dans la micropipette ($0 < [\text{Na}]_o < 114.6 \text{ mM}$). Pour les expériences réalisées en 150 mM de KCl , le Na^+ est absent mais la déactivation ne disparaît pas en hyperpolarisation contrairement à ce qui a été observé sur l'oeuf d'oursin (FUKUSHIMA, 1982).

Un mécanisme moléculaire plausible a été proposé par SAKMANN et TRUBE (1984) pour expliquer la dépendance de la P_o au voltage. Ils partent du principe que ce type de canal est complètement activé pour les potentiels de membrane positifs. Donc, que la P_o plus faible mesurée pour des potentiels de plus en plus hyperpolarisants est envisagée comme le résultat d'un processus d'inactivation dépendant strictement du voltage. En conséquence, plus le potentiel transmembranaire sera négatif, plus le taux d'inactivation sera grand. C'est l'effet combiné des processus d'activation et d'inactivation qui serait responsable des variations de la P_o .

Quant à la dépendance de la P_o aux variations de $[\text{K}]_o$, elle pourrait être attribuée au fait que le K^+ activerait le canal. Le K^+ ne peut que favoriser le processus de "gate", c'est à dire le nombre de passages vers l'état ouvert par unité de temps. Ce qui serait en accord avec ce qui est déjà connu pour les canaux K^+ activés soit par les neurotransmetteurs (MARCHAIS et MARTY, 1979), soit par ceux activés par le voltage (JUNGE, 1982; SWENSON et ARMSTRONG, 1981).

Par ailleurs, à partir de différents résultats obtenus lors de cette première partie, ($\langle I \rangle$, P_o , i) il est possible de faire une évaluation du nombre de canaux par cellules et de leur densité.

Le courant moyen macroscopique, $\langle I \rangle$, est exprimé par la relation suivante:

$$\langle I \rangle = N \cdot P_o \cdot i$$

(v) (v) (v)

N = nombre de canaux
 P_o = probabilité d'ouverture
 i = courant unitaire

$$N = \frac{\langle I \rangle}{P_o \cdot i}$$

Les valeurs des paramètres sont estimées à partir des résultats obtenus pour une concentration K normale [K]_o = 5.4 mM) et un potentiel transmembranaire égal à -120 mV.

$$\langle I \rangle \approx -65 \text{ pA} \quad (\text{figure No 11B})$$

$$i \approx -0.65 \text{ pA} \quad (\text{figure No 18})$$

$$P_o \approx 0.02 \quad P_{o_{-120 \text{ mV}}} < P_{o_{-80 \text{ mV}}} = 0.05$$

dans ces conditions, $N = \frac{65}{0.02 \times 0.65} \approx 575$ canaux par cellule.

En considérant que les cellules ont un diamètre moyen de 15 μm , et qu'elles sont sphériques, la surface cellulaire peut être évaluée à:

$$S = \pi \cdot D^2$$

$$S = 3.14 \cdot 15^2 = 706 \mu\text{m}^2$$

Ce qui reviendrait à évaluer la densité (D) des canaux par μm^2 de membrane à :

$$D = N/S = 0.8 \text{ canal}/\mu\text{m}^2$$

Ce qui tend bien à prouver que la densité de ces canaux est très faible, moins d'un canal par μm^2 , et confirme les spéculations faites sur la faible densité des canaux K, du fait de la grande quantité de "patch" silencieux lors de nos expériences. Cette densité semble bien inférieure à celle des canaux Na sur le même type de cellules (PAYET et MORIER).

Par contre, elle correspond à l'ordre de grandeur de la densité de canaux K du même type calculé d'une façon différente par SAKMANN et TRUBE (1984a). Ils ont évalué la densité de canaux à $1 < D < 1.8/\mu\text{m}^2$ à partir du nombre moyen de canaux présents lors des enregistrement multi-canaux.

6. Etude de la cinétique du canal

A. Introduction

Notre dispositif de mesure ne nous permet pas d'obtenir d'informations directes sur les processus moléculaires qui font passer le système d'un état dans un autre. S'il n'est pas possible d'avoir de l'information sur ce qui se passe pendant les transitions, il est cependant possible d'aller chercher de l'information sur les taux de transition d'un état à l'autre de façon indirecte, en étudiant la répartition des temps passés dans l'état ouvert et de ceux passés dans l'état fermé.

La fréquence de la durée des événements est généralement distribuée de façon poissonnienne. Mais il est conventionnel d'étudier la répartition de la durée des événements en histogrammes de probabilité cumulée. Ce qui permettra d'évaluer les temps moyens d'ouverture et les temps moyens de fermeture. En définitive, l'étude de la cinétique d'un canal va revenir à étudier les séries chronologiques de chaque état de façon statistique. Ceci a été réalisé à l'aide du programme "JUMPS" décrit au chapitre III (4) F.

Les temps moyens d'ouverture (τ_{op}) et de fermeture (τ_{cl}) seront étudiés en fonction du potentiel appliqué à la membrane pour deux concentrations potassiques différentes.

B. Résultats - Evaluation des constantes de temps

Pour les différents voltages étudiés, l'observation des histogrammes de probabilité cumulée révèle qu'en général, la répartition des temps d'ouverture est décrite par une seule exponentielle ce qui serait en faveur de l'existence d'un seul état ouvert (Fig. No 23A). Alors qu'il faut au moins deux exponentielles pour décrire la répartition des intervalles de temps fermés (Fig. No 23B). En effet, l'omission des intervalles de temps les plus courts (< 10 msec) permet d'éliminer les composantes cinétiques rapides (≈ 1 msec) qui sont cependant présentes mais qui compliquent l'analyse.

Les déterminations des valeurs moyennes des temps d'ouverture, " τ_{op} ", de temps de fermeture courts " τ_{clfast} ", et des temps de fermeture longs " τ_{clslow} ", ont été réalisées de façon systématique pour différents potentiels et pour deux concentrations potassiques.

Les courbes de la Figure No 24 montrent que les valeurs des constantes de temps d'ouverture et de fermeture dépendent du voltage. Les constantes de temps d'ouverture augmentent en dépolarisation, alors que les constantes de fermeture diminuent. Ce qui a pour conséquence que le canal est plus fréquemment, et pour plus longtemps, dans l'état ouvert. Ceci explique pourquoi la P_o augmente quand la membrane est dépolarisée. La dispersion des valeurs des intervalles de temps de fermeture de courte durée, " τ_{clfast} ", rend difficile la détermination de leur dépendance au voltage.

En comparant les résultats obtenus en 150 mM KCl (Fig. No 24A et B)

FIGURE No 23

Distribution des temps d'ouverture et de fermeture du canal de type I.

Ces deux histogrammes de probabilité cumulés ont été confectionnés à partir d'un enregistrement réalisé à -80 mV de potentiel transmembranaire avec 150 mM de KCl dans la pipette ($t_{\min} = 10$ msec).

A) Distribution des durées des temps d'ouverture selon une seule exponentielle: $\tau_{op} = 346$ msec.

B) Distribution des durées des temps de fermeture selon deux exponentielles:

$$\tau_{c.f.} = 140 \text{ msec}$$

(Valeurs des constantes de temps

$$\tau_{c.sl.} = 1.9 \text{ sec}$$

de chaque exponentielle.)

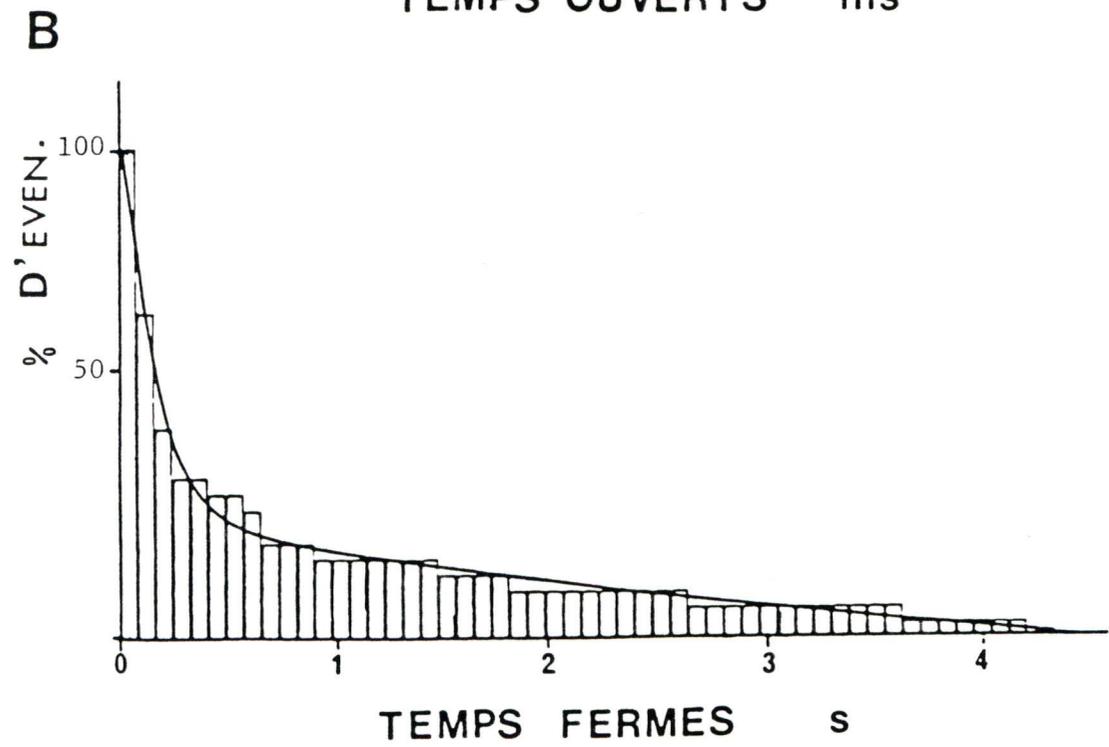
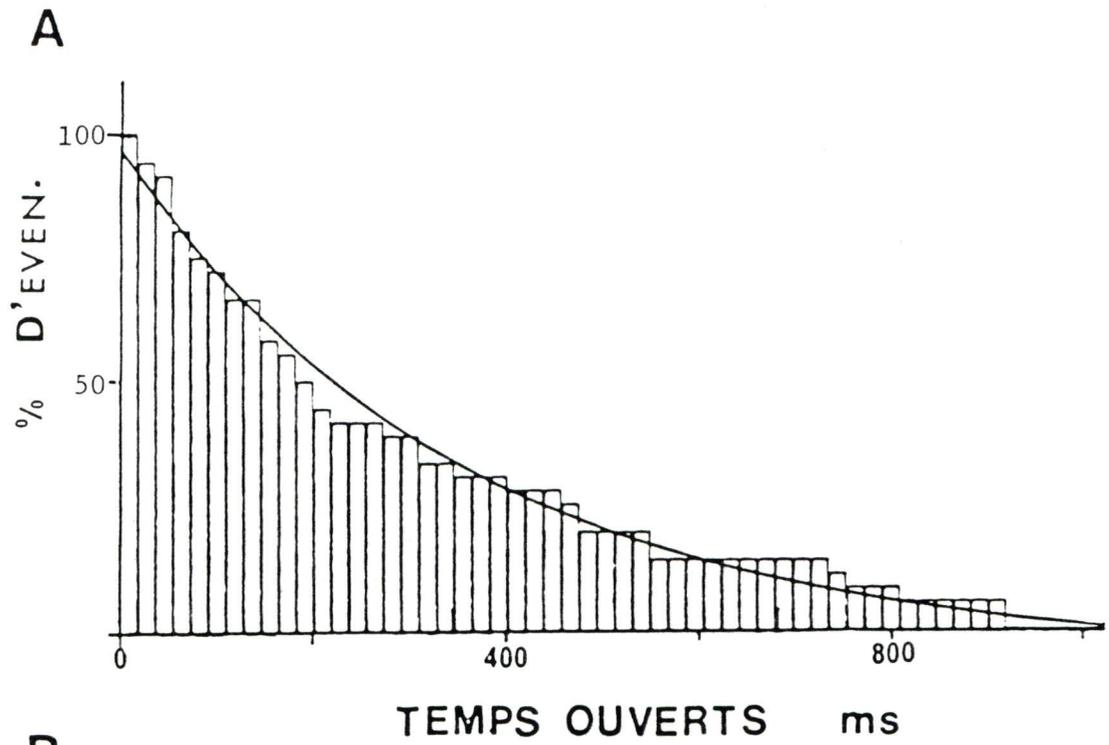


FIGURE No 24

Valeurs des constantes de temps en fonction du potentiel et de $[K]_o$.

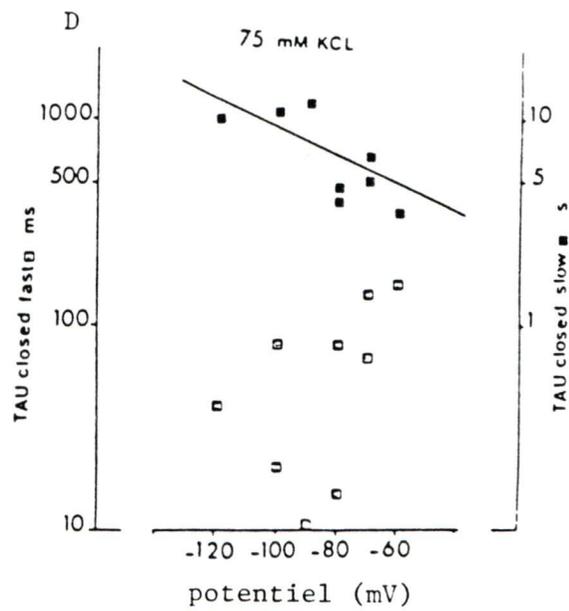
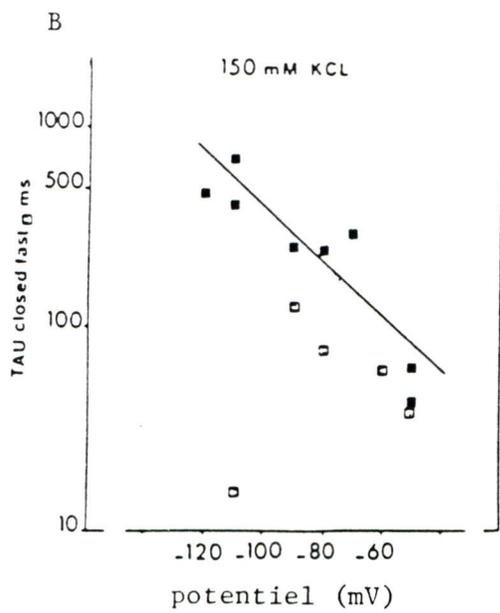
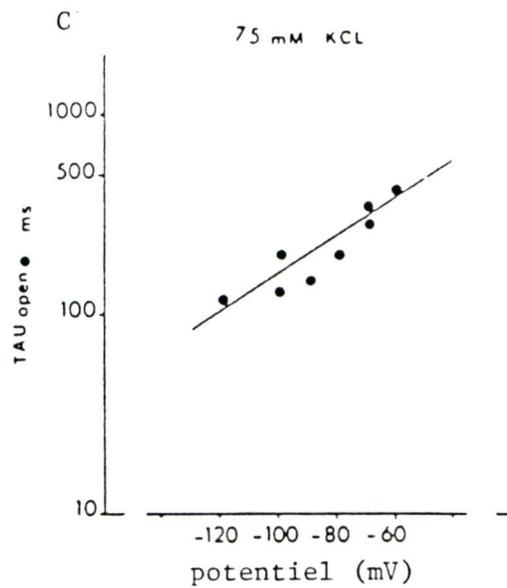
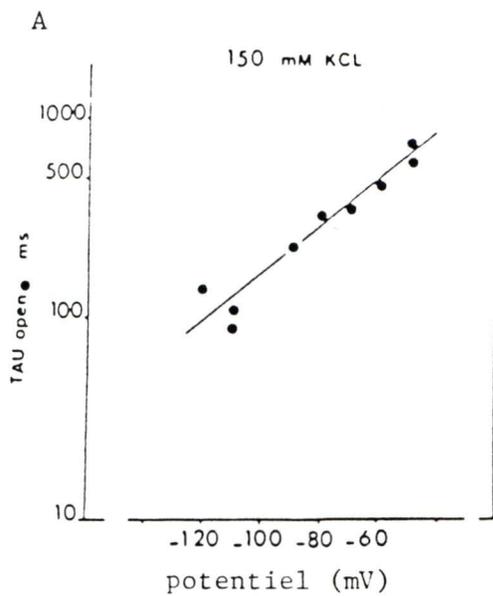
Partie de gauche:

Valeurs des constantes de temps d'ouverture (τ_{op}) et des constantes de fermetures rapides ($\tau_{closed\ fast}$), et lentes ($\tau_{closed\ slow}$) en fonction du potentiel avec 150 mM de KCl dans les pipettes.

Partie de droite:

Valeurs des constantes de temps d'ouvertures (τ_{open}) et des constantes de temps de fermetures, rapides ($\tau_{closed\ fast}$) et lentes ($\tau_{closed\ slow}$) en fonction du potentiel, avec 75 mM de KCl dans les pipettes.

Noter que les constantes de temps de fermetures rapides sont plus dispersées en 75 mM KCl.



(courbes de gauche) et ceux en 75 mM de KCl (Fig. No 24C et D) (courbes de droite), il est possible de constater que les constantes de temps d'ouverture (τ_{op}) ne sont pratiquement pas affectées par les changements de $[K]_o$.

L'effet des variations de $[K]_o$ porte principalement sur la valeur des constantes de temps de fermeture de longue durée (τ_{clslow}); les valeurs sont nettement plus élevées en 75 mM de KCl pour les potentiels dépolarisants, ce qui expliquerait la diminution de P_o déjà mentionnée dans ces conditions. D'autre part, la dépendance au potentiel est moindre en 75 mM de KCl, passant de 0.02 à 0.03.

Le fait de fixer un intervalle de temps minimum (t_{min}) lors de l'analyse des événements, bien qu'il conduise tout simplement à négliger les intervalles de temps les plus courts (SACHS et coll., 1982; METHFESSEL et BOHEIN, 1982), permet une analyse homogène des distributions des intervalles de temps.

Nous avons vu que les temps d'ouverture et de fermeture étaient, dans ces conditions, répartis respectivement suivant une ou deux exponentielles. Si la valeur de l'intervalle de temps minimum (t_{min}) est augmentée de 10 à 40 msec, par exemple, cela ne change pas le nombre d'exponentielles dans chacun des cas. Mais cela tend à augmenter la valeur de chaque constante de temps associée à chacune des exponentielles.

C. Résultats - Evaluation des constantes de vitesse

Les constantes de vitesse du schéma cinétique sont inversement

proportionnelles aux constantes de temps du système.

L'effet des variations du temps d'omission (t_{\min}) a dû être pris en considération pour calculer les constantes de vitesse de transition entre les états ouverts et fermés pour un modèle simple C-O-C, à partir des résultats expérimentaux.

ROUX et SAUVE, en 1985, ont proposé un formalisme mathématique pour évaluer les constantes de vitesse d'un modèle C-O-C.



$$\tilde{P}_O(\tau, t_{\min}) = -e^{\lambda_O \tau} \quad (1)$$

$$\lambda_O = k_2 e^{-k_1 t_{\min}} + k_3 e^{-k_4 t_{\min}} \quad (2)$$

où $\tilde{P}_O(\tau, t_{\min})$ est la probabilité d'avoir un intervalle de temps plus grand τ (c'est-à-dire quand il ne sera plus possible de définir τ).

Et k_1, k_2, k_3, k_4 , les valeurs obtenues pour rendre compte de l'équation (2) pour différentes valeurs de λ_O obtenues pour différents (t_{\min}) intervalles de temps minimum considérés (PAYET et coll., 1985, Fig. No 7).

Toujours suivant le formalisme de ROUX et SAUVE (1985), en considérant k_1 et $k_4 \ll 100$ et $k_2 + k_3 \ll 100$, l'effet de fixer l'intervalle de temps minimum à 10 msec devrait être négligeable sur $P_O(\tau, t_{\min})$ et $P_C(\tau, t_{\min})$.

FIGURE No 25

Valeurs des constantes de vitesses recalculées pour un modèle C-O-C en fonction du potentiel et de $[K]_O$.

Partie de gauche:

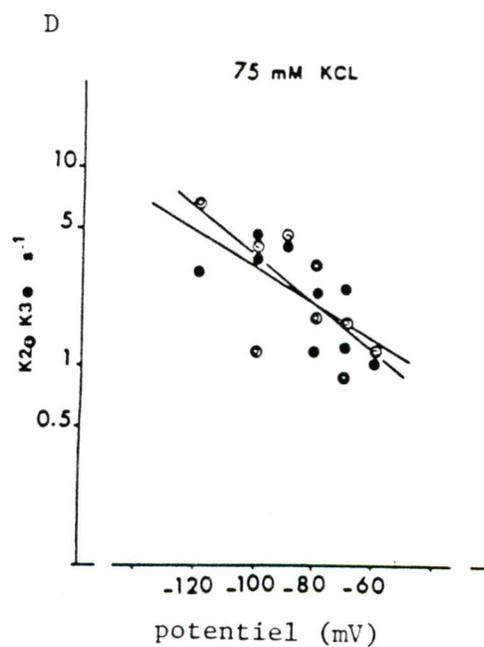
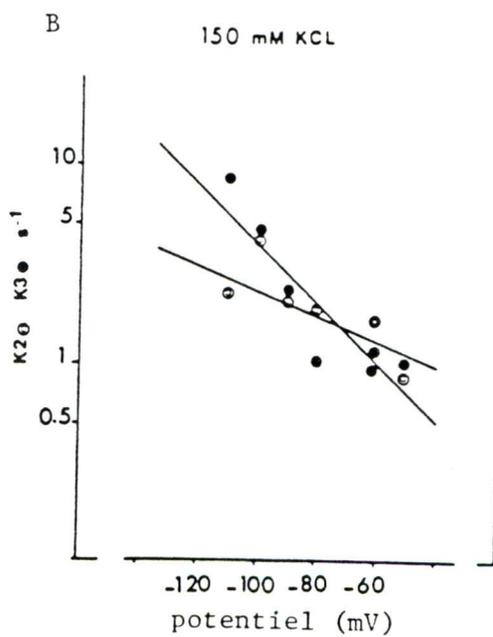
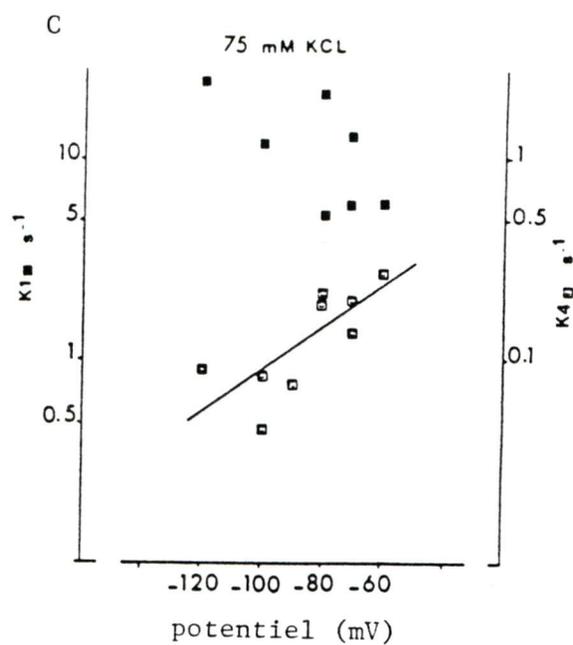
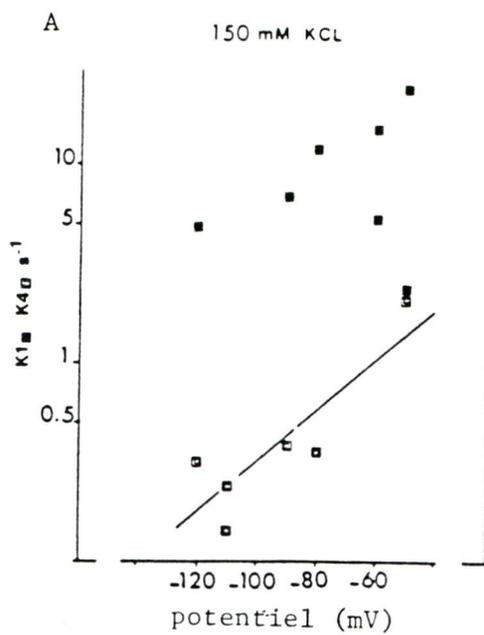
Valeur des constantes de vitesse calculées pour les expériences réalisées en 150 mM de KCl. k_1 et k_4 déterminent la durée des événements dans l'état fermé (en haut) alors que k_2 et k_3 (en bas) déterminent la durée des événements dans l'état ouvert.



Partie de droite:

Valeur des constantes de vitesse calculées pour les expériences réalisées en 75 mM de KCl. k_1 , k_4 et k_2 , k_3 ont les mêmes significations que précédemment.

Noter dans les deux cas la dispersion des points pour k_1 et l'échelle différente pour k_4 , en 75 mM de KCl.



Dans ces conditions, les valeurs de k_1 , k_2 , k_3 et k_4 peuvent être recalculées à partir de:

$$\begin{aligned} k_2 &= A_1 / \lambda_0 \\ k_3 &= A_2 / \lambda_0 \\ k_1 &= -\lambda_1 \\ k_4 &= -\lambda_2 \end{aligned} \quad \text{Avec } P_c(\tau) = A_1 e^{-\lambda_1 \tau} + A_2 e^{-\lambda_2 \tau}$$

La Figure No 25 montre que les constantes de vitesse k_2 , k_3 et k_4 varient en fonction du voltage. Avec la dépolarisation k_2 et k_3 , qui déterminent les temps d'ouverture, diminuent. k_4 , qui détermine les temps fermés longs, augmente.

Il ne semble pas y avoir d'effet appréciable de la concentration potassique sur les valeurs de k_2 et k_3 . Mais, malgré la dispersion des points sur les courbes du haut, et la différence d'échelle, la concentration potassique semble affecter les valeurs de k_4 qui sont bien plus faibles en 75 mM de KCl. Ceci contribue à l'augmentation des temps de fermeture de longue durée, ce qui se traduira par une diminution de P_o en 75 mM KCl par rapport aux P_o évaluées en 150 mM KCl.

D. Discussion

En définitive, l'analyse des données expérimentales simplifiées, en fonction du modèle C-O-C, a permis de montrer que la diminution des valeurs de la constante de vitesse k_4 en 75 mM KCl est responsable de l'effet de ion K^+ sur la cinétique du canal.

L'analyse des cinétiques des canaux faisant intervenir plus de 2

états distincts est toujours sujette à caution du fait de la difficulté à résoudre les états qui ont le même niveau de conduction. Dans notre cas, l'analyse cinétique à l'aide d'un modèle C-C-O a été entreprise à partir des mêmes données expérimentales, mais les valeurs des constantes de temps recalculées étaient plus dispersées que celles obtenues avec le modèle C-O-C présenté plus haut. Bien que cela ne permette pas d'écarter complètement le modèle C-C-O pour expliquer le comportement du canal.

L'analyse cinétique précise de ce type de canal est rendue difficile par le fait qu'il existe une grande disparité dans la répartition des temps fermés (τ_{c1}). Les états "fermés" non conducteurs de courte durée (de l'ordre de 1 msec) ne correspondent pas forcément aux états fermés de très longue durée (plusieurs dizaines de centaines de millisecondes).

D'autre part, le petit nombre d'événements enregistrés par minute, du fait de la cinétique lente, rend plus difficile l'évaluation statistique des signaux observés.

7. Etude du comportement du canal pendant des impulsions de voltage

A. Introduction

Après avoir étudié le comportement statistique et cinétique du canal de type I en "steady state", nous avons voulu préciser son comportement pendant des impulsions de voltage par une approche expérimentale. Cet aspect avait été abordé de façon purement théorique par DEFELICE et CLAY en 1983.

Dans cette partie nous montrerons que l'état dans lequel se trouve le canal n'est pas modifié instantanément lors de transitions de voltage rapides. Nous rapporterons également les résultats d'expériences réalisées dans le but de déterminer l'état du canal pour les potentiels positifs en 150 mM de KCl. Dans ce cas, le canal rectifie de façon drastique et il est pratiquement impossible de détecter des sauts de courant sortant alors que la P_o du canal semble élevée.

Différentes hypothèses seront envisagées et discutées en tenant compte de la propriétés de rectification du canal.

B. Résultats

La première série de résultats obtenus a pour but de montrer clairement comment le canal de type I se comporte pendant des impulsions tests. La figure No 26 montre des impulsions de différentes amplitudes appliquées à partir d'un potentiel transmembranaire de l'ordre de -80 mV (le voltage appliqué dans la micropipette était de +20 mV).

Le déclenchement de l'impulsion est intervenu lorsque le canal était dans l'état ouvert (Fig. No 26A et C) ou lorsque le canal était dans l'état fermé (Fig. No 26B et D). Dans tous les cas, et malgré la présence du courant capacitif résiduel, il est clair que l'amplitude du courant du canal unitaire varie instantanément en fonction du voltage appliqué.

Cependant ces enregistrements montrent qu'au déclenchement comme à

FIGURE No 26

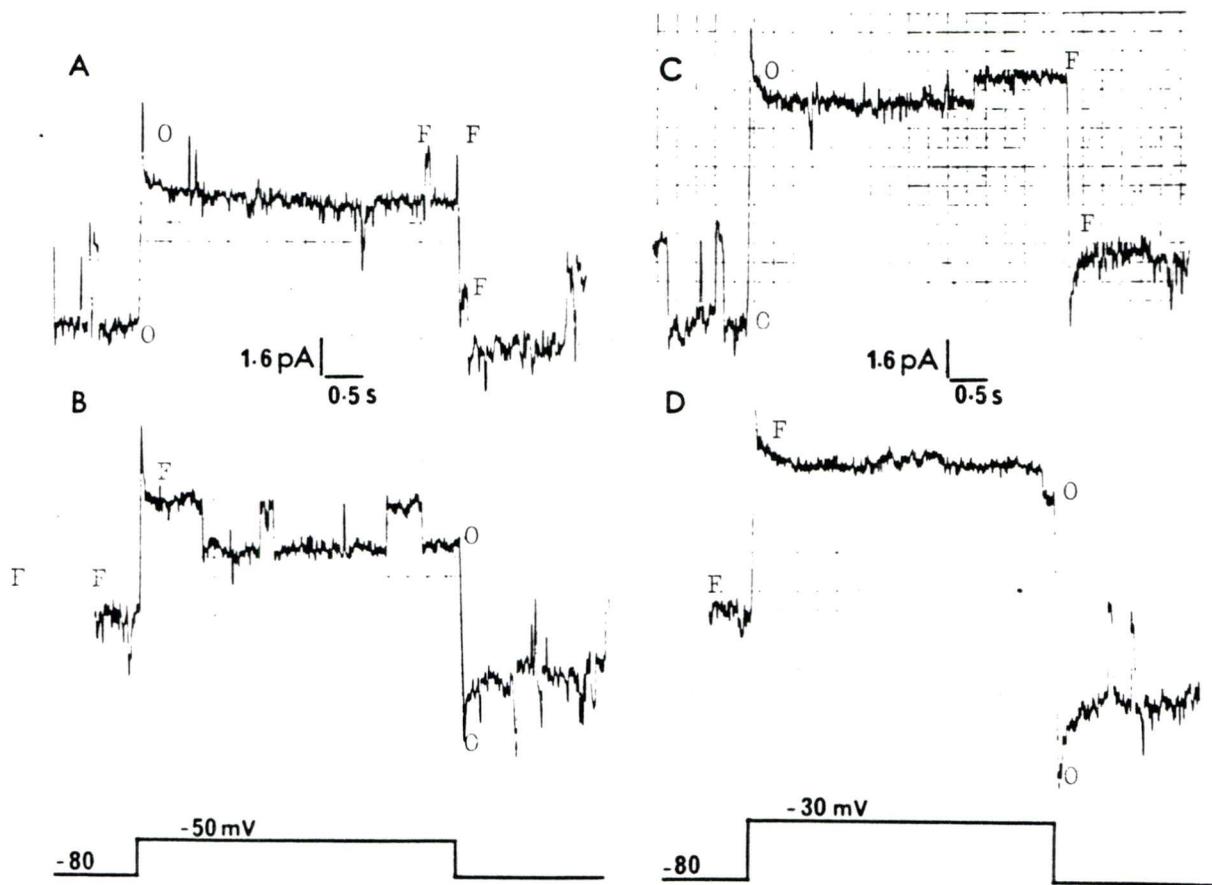
Comportement du canal pendant des variations de potentiel (en 150 mM de KCl)

Partie de gauche: le potentiel pendant les impulsions carrées de longue durée est de -50 mV.

- A) L'impulsion est déclenchée pendant un temps où le canal est dans l'état ouvert, et le canal reste dans l'état ouvert au nouveau niveau de potentiel. L'amplitude du courant est instantanément réduite en fonction de la courbe I/V pour un canal ayant une conductance unitaire de 37 pS. Pendant l'impulsion test, le canal fluctue selon les valeurs des constantes de vitesse à ce potentiel. La rupture de l'impulsion arrive au moment où le canal vient de passer dans l'état fermé, le canal est donc dans l'état fermé lors du retour au potentiel de maintien, puis par la suite il fluctue en fonction des constantes de vitesse du potentiel de référence (-80 mV).
- B) L'impulsion est déclenchée pendant un temps où le canal est dans l'état fermé et le canal reste dans l'état fermé au nouveau niveau de potentiel. Par la suite, il fluctue avec de nouvelles constantes de vitesse. A la fin de l'impulsion test, le canal est dans l'état ouvert et il reste dans cet état malgré la transition de potentiel. Tandis que l'amplitude du courant prend instantanément la valeur qu'elle avait avant l'impulsion pour un potentiel de -80 mV.

Partie de droite: Le potentiel pendant l'impulsion est de -30 mV (C et D).

Les tracés montrent un comportement du canal similaire à celui décrit précédemment pendant les transitions de potentiel. Cependant il faut noter que l'amplitude du courant pendant les impulsions est celui en accord avec la courbe I/V du canal.



O: ETAT OUVERT

F: ETAT FERME

la rupture de l'impulsion test, le canal ne change pas d'état instantanément.

Par exemple, si le canal est dans l'état ouvert au moment de la transition de potentiel (Fig. No 26A et C), le canal restera dans l'état ouvert au début de l'impulsion, quelle que soit la valeur du niveau de voltage appliquée.

Par la suite, le canal peut fluctuer, comme cela est illustré sur les mêmes enregistrements (Fig. No 26A et C).

Lors du retour au potentiel de maintien, le canal sera dans l'état fermé, si c'est cet état qui prévaut au moment précis de l'interruption de l'impulsion test.

De façon similaire, les figures No 26B et D montrent le comportement du canal lorsque celui-ci est dans l'état fermé au moment du déclenchement de l'impulsion et dans l'état ouvert à l'interruption de l'impulsion.

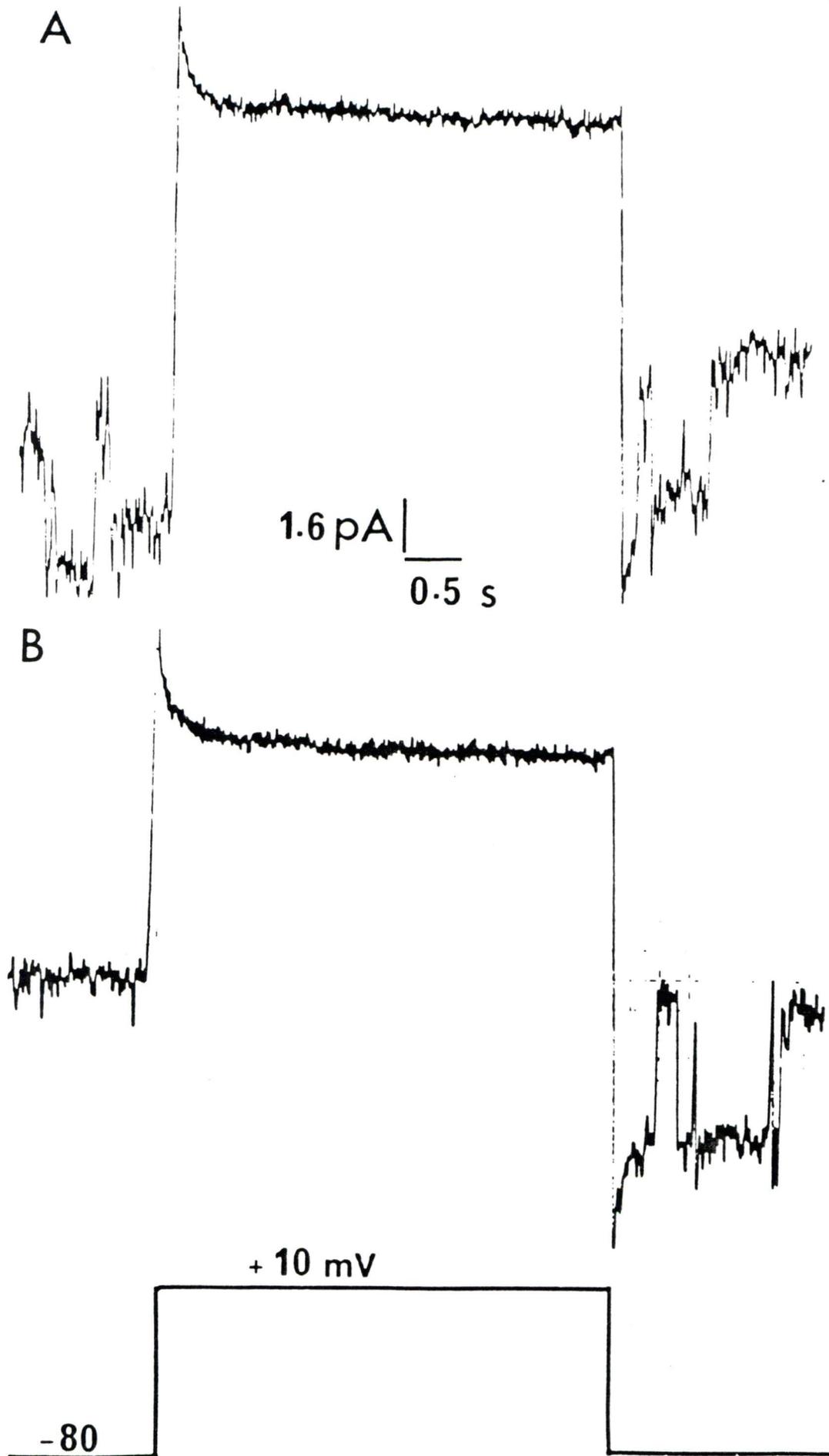
Ces résultats tendent donc à prouver que le comportement global du canal après une variation rapide de voltage, dépend à la fois de l'ancien et du nouveau potentiel.

L'état du canal (ouvert ou fermé) immédiatement après la transition de voltage, quelle que soit la valeur et le sens de cette dernière, dépend uniquement de l'ancien voltage. Alors que l'amplitude et la durée de l'événement sont déterminées par le nouveau voltage, plus

FIGURE No 27

Comportement du canal pendant des impulsions dépolarisantes de grande amplitude.

Le potentiel pendant l'impulsion test est positif ($> 0 \text{ mV} \approx E_K$ en 150 mM de KCl). Quel que soit l'état dans lequel se trouve le canal au déclenchement de l'impulsion (ouvert en A, et fermé en B), aucun événement n'est détectable au cours de l'impulsion, mais le canal est toujours dans l'état ouvert à la rupture de chaque impulsion.



exactement par les constantes de vitesse qui lui sont associées. Ce comportement a été observé de façon non équivoque dans plus de 95% des cas, calcul fait sur plus de 200 transitions. Ce qui, dans une certaine mesure, confirme bien les prévisions théoriques proposées par DE FELICE et CLAY en 1983, à partir de leurs simulations sur ordinateur.

En se basant sur ces premières conclusions, qui attestent que l'état du canal immédiatement après une transition de voltage représente l'état dans lequel le canal était, juste avant cette transition, nous avons réalisé d'autres expériences pour déterminer expérimentalement et statistiquement l'état du canal en fin d'impulsion dépolarisante. Cette procédure paraissait adéquate pour évaluer probabilistiquement dans quel état est le canal pour des dépolarisations supérieures au potentiel de zéro courant en 150 mM de KCl quand aucun événement ne peut être détecté.

Ce dernier point est illustré par les deux enregistrements de la figure No 27A et B, qui ont été obtenus pendant des dépolarisations conditionnantes de +10 mV. Quel que soit l'état initial du canal au moment du déclenchement du pulse, ouvert (Fig. No 27A) ou fermé (Fig. No 27B), aucun événement n'est observé pendant la durée de l'impulsion. Lors de ces expériences, nous avons trouvé de façon cohérente, que le canal était dans l'état ouvert dans plus de 92% des cas, immédiatement après la transition de potentiel.

De façon statistique, ceci tendrait donc à prouver que le canal serait dans la configuration "ouverte" pendant les dépolarisations

FIGURE No 28

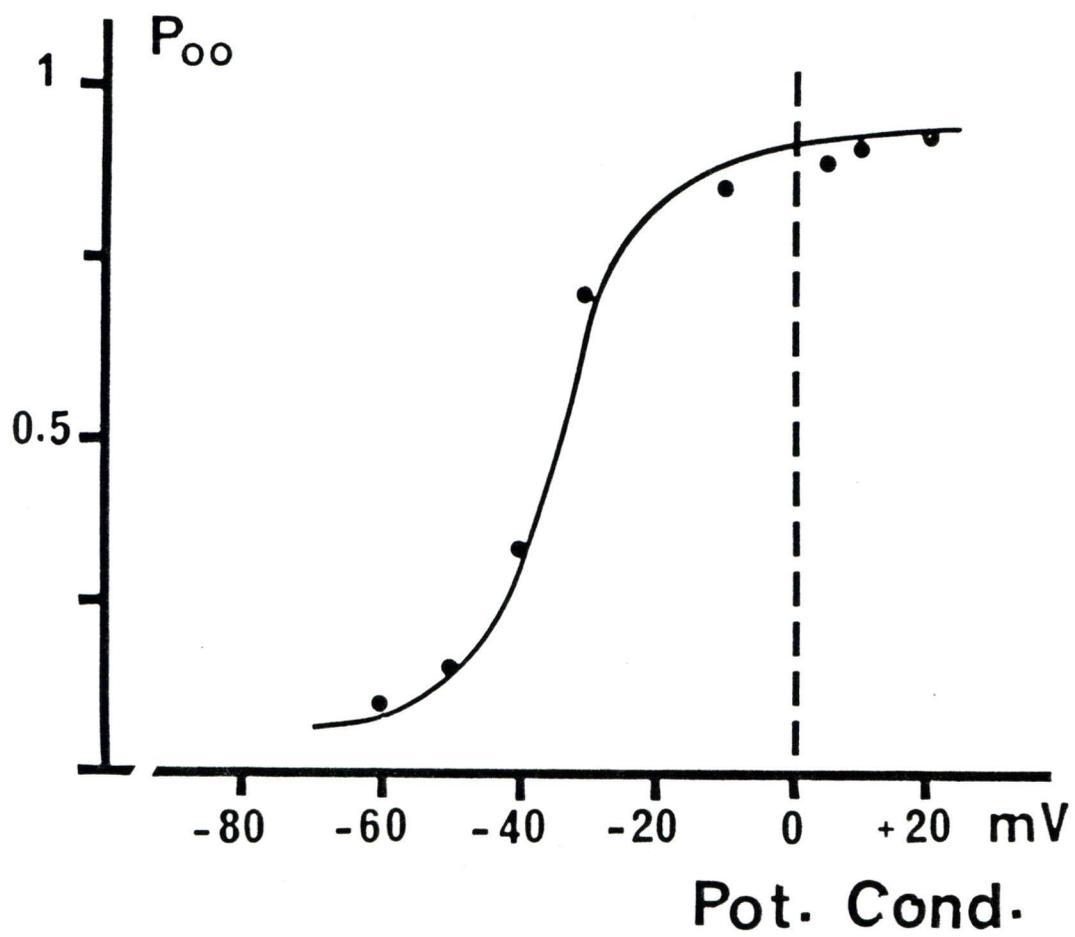
Probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert à la rupture des impulsions test en fonction du potentiel pendant ces impulsions (potentiel conditionnant).

P_{oo} représente la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert à la rupture de l'impulsion. (H.P. = -80 mV). Elle représente également la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert au cours de l'impulsion test, quel que soit le potentiel appliqué.

La probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert est faible pour les potentiels négatifs et elle augmente de façon sigmoïde avec le potentiel, pour se rapprocher d'une valeur de $P_{oo} \approx 1$ pour les potentiels positifs (0.94 à + 20 mV).

Pour chaque potentiel: $8 < n < 20$

La concentration de KCl dans la pipette était de 150 mM.



supérieures au potentiel d'inversion (0 mV en 150 mM de KCl). Ce test statistique simple, qui consiste à évaluer le rapport entre le nombre de fois où le canal est trouvé dans l'état ouvert après la transition de potentiel repolarisant sur le nombre total de transitions (ou essais), a été répété pour différentes valeurs de potentiel lors des impulsions conditionnantes.

De façon plus quantitative, la Figure No 28 montre comment évolue la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert à l'interruption des impulsions dépolarisantes (P_{oo}) en fonction de la valeur du potentiel transmembranaire pendant ces impulsions.

$$P_{oo} = \frac{\text{Nombre de transitions où le canal est dans l'état ouvert}}{\text{Nombre total de transitions}}$$

En d'autres termes, toujours suivant le concept que le canal ne change pas d'état instantanément lors d'une transition de voltage, cette courbe devrait représenter la probabilité d'être dans l'état ouvert à la fin des impulsions test à un voltage donné.

Les impulsions étant de longue durée (5 sec) et délivrées au hasard, l'évaluation de l'état du canal après la transition de voltage représente un test statistique valable pour connaître la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert pour une valeur de potentiel donné.

Comme il est possible de le constater sur la Figure No 28, cette probabilité est relativement faible à -60 mV, mais elle s'accroît de façon sigmoïdale en fonction du voltage des impulsions, pour atteindre des valeurs supérieures à 0.9 pour des potentiels positifs.

La partie gauche de cette courbe sigmoïde peut être comparée à la courbe de la figure No 22A qui traduit la P_o en fonction du voltage à l'état stable en 150 mM de KCl. De plus, la partie de droite de la courbe (sigmoïde) de la Fig. No 28 précise la valeur de la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert pour des potentiels positifs où les sauts de courant sont impossibles à détecter, du fait que le canal est peu ou pas conducteur.

C. Discussion

Nous avons donc montré expérimentalement que les transitions de voltage ne modifiaient pas instantanément l'état dans lequel se trouvait le canal avant la transition, quels que soit le sens et l'amplitude de cette dernière.

Par contre, l'amplitude du courant du canal unitaire, qui est sous la dépendance directe de la force électromotrice aux ions ("driving force"), varie instantanément en fonction du voltage. De la même façon, la durée de l'événement qui suit la transition devrait être conditionnée par les nouvelles valeurs des constantes d'équilibre qui, de façon théorique, varient instantanément avec le voltage appliqué à la membrane (DEFELICE et CLAY, 1983). L'étude des cinétiques après les transitions n'a pas été réalisée lors de nos expériences. Mais TANIGUCHI et NAKAMURA, (1984) ont récemment utilisé une méthode similaire à celle que nous proposons (ROUSSEAU et coll., 1984) pour évaluer la probabilité d'être dans l'état ouvert à la fin des impulsions test. Par ailleurs, ils ont étudié la cinétique des événements qui suivent

les repolarisations au potentiel de membrane après les impulsions test positives.

Ils montrent que la durée du premier événement après la transition repolarisante, est d'autant plus longue que la dépolarisation conditionnante a été forte. La durée moyenne de ces premiers événements a été comparée à la durée moyenne des événements suivants. Ils interprètent ce décalage systématique entre la durée moyenne du premier événement, et celles des événements suivants pour les fortes dépolarisations (> 0 mV en 140 mM KCl) comme la preuve d'un second état ouvert. La durée moyenne du second événement ne diffère pas selon eux de celle en "steady state". Dans des conditions similaires, nous avons observé que les événements suivant la transition repolarisante avaient une durée plus longue. Dans notre cas, le fait que dans les deux premières secondes suivant la repolarisation, la durée des événements paraissait plus longue (Fig. No 26B et D) avait été attribué à une relaxation de la P_o (en fonction du temps) quand la membrane passe d'un niveau très dépolarisé à P_o élevée, à un niveau de référence où la P_o est plus faible. Même si le voltage varie de façon pratiquement instantanée, et que les constantes d'équilibre sont voltage-dépendantes, il est vraisemblable que le système met quelques centaines de milli secondes à s'équilibrer (ALDRICH et YELLEN, 1983).

Ce phénomène de relaxation du courant est également traduit sur les enregistrements multi-canaux, lors d'hyperpolarisations à partir d'un potentiel positif, tel que l'ont montré SAKMANN et TRUBE en 1984b (sur leur figure No 1). Les constantes de relaxation du courant sont d'autant

plus rapides que le courant unitaire à une grande amplitude et que la P_o est faible au potentiel auquel la membrane a été amenée

Un autre argument tend à s'opposer à l'éventualité d'un second état "ouvert" qui apparaîtrait quand la membrane se dépolarise. C'est la distribution des intervalles de temps d'ouverture qui est mono-exponentielle pour des potentiels transmembranaires absolus de -20 mV où la probabilité d'ouverture est cependant très forte dans notre cas $0,6 < P_o < 0.8$

Enfin, il n'est pas nécessaire de postuler un second état ouvert pour simuler le comportement du canal pour des potentiels positifs. L'extrapolation pour des potentiels positifs des valeurs des constantes de temps à partir des valeurs calculées expérimentalement permettent de calculer que le canal aurait une $P_o = 0.96$ à +20 mV à partir d'un modèle



Avec les constantes de vitesse suivantes:

$$\begin{array}{ll}
 k_1 = 14.88 & k_3 = 0.06 \\
 k_2 = 0.41 & k_4 = 12.22
 \end{array}
 \quad \text{à } +20 \text{ mV}$$

$$P_o = \frac{1}{1 + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_4}} \approx 0.96$$

Cet argument théorique permet uniquement de prédire quelle est la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert pour des niveaux de potentiels positifs à partir des valeurs extrapolées des constantes de vitesse déterminées en "steady state" au paragraphe précédent.

Donc, force est de constater que cette valeur théorique est cependant très proche de la valeur déterminée expérimentalement par la technique des impulsions (Fig. No 28). L'état ouvert ($P_o = 0.92$) est donc l'état dans lequel doit se trouver le canal pour les potentiels positifs ($> 0m \approx E_K$, en 150 mM de KCl).

Mais pour ces potentiels, il semble impossible de mesurer des sauts de courant, ce qui prouverait que la rectification est une propriété du canal dans l'état ouvert comme cela avait été proposé par LEECH et STANFIELD (1981) à partir de l'étude des courants K du muscle squelettique.

Différentes hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer cette rectification.

CIANI et coll. (1978) avaient proposé un modèle dans lequel un canal était formé de plusieurs sous-unités chargées qui s'orienteraient pour former un canal physiquement perméant, donc capable de conduire les ions quand le potentiel transmembranaire est négatif. Cette structure "canal" serait stabilisée par les ions K^+ extracellulaires. Dans leur cas, la courbe d'activation aurait une valeur nulle pour des potentiels positifs (le "canal" ne serait pas formé), mais elle augmenterait au fur et à mesure que la membrane serait hyperpolarisée. Ce qui aug-

menterait la probabilité de formation "du canal" (P_0).

Nos expériences permettent d'écarter ce modèle pour le canal de type I car il a été clairement démontré que la courbe d'activation était proche de 1 pour les potentiels positifs, pour décroître progressivement à mesure que le potentiel de membrane devient négatif (Fig. No 28).

D'autre part, l'hypothèse que le canal soit toujours dans l'état ouvert conducteur sans jamais passer dans l'état fermé (pour des temps très courts inférieurs à 1 msec) pour des potentiels de membrane supérieurs à E_K en 150 mM de KCl, a pu également être écartée. En effet, nous avons précédemment montré que lors des rampes de voltage symétrique de part et d'autre de $E_K = 0$ en 150 mM de KCl (Fig. No 19A) le courant de fuite entrant pour les potentiels négatifs était égal au courant de fuite sortant pour les potentiels positifs dans la limite de détection de la technique.

D'autre part, sur la Figure No 19B, en 75 mM de KCl, il est clairement montré que la rectification est une caractéristique du canal dans l'état ouvert puisque l'amplitude du courant est progressivement affectée.

Quant à la rectification drastique observée en 150 mM de KCl, elle s'expliquerait plus facilement soit par une particule bloquante étrangère au canal (ARMSTRONG, 1971), soit par le basculement plus ou moins efficace d'un dipole qui viendrait modifier la topologie physique du canal pour, éventuellement annuler son aptitude à conduire les ions.

Quant à la nature du dipole, il pourrait s'agir d'une partie protéique à fort degré d'hélicité α . Ce type de structure secondaire est connu comme étant fortement polarisé (HOL, 1983) et donc susceptible d'être sensible aux variations de champs électrique qui accompagnent les variations de potentiel.

Récemment, GIRSCH et PERACCHIA (1985) ont montré que les degrés d'hélicité α d'une protéine canal variait lors des changements de conformation des protéines canal type "gap junction".

En définitive, le comportement de ce canal de type I pendant les impulsions s'expliquerait par les effets combinés de sa courbe d'activation qui a une valeur élevée (> 0.92) pour des potentiels positifs et par la propriété intrinsèque du canal à rectifier.

8. Mode d'inhibition fonctionnel du canal

A. Introduction

Dans le but de tester d'éventuels modes d'inhibition fonctionnelle de ce canal ionique qui est plutôt sélectif au K, les actions de la 4-amino-pyridine (4.A.P) et du chlorure de césium (CsCl) ont été explorées dans différentes conditions.

Au niveau des courants macroscopiques, la 4.A.P. est surtout connue pour inhiber les courants potassiques transitoires (I_A) qui s'activent et s'inactivent lors de dépolarisations comme cela a été montré sur les neurones de mollusque par THOMPSON (1977). Plus récemment sur

les macrophages, YPEY et CLAPHAM, (1984) ont montré que la 4.A.P. inhibe un courant K de type "delayed outward-rectifier". La 4.A.P. agirait de l'extérieur, mais son action sur les courants de type I_{K1} n'est pas connue (Voir Tableau I, Chap. II (1)).

Le CsCl est connu pour bloquer les courants K sortant lorsqu'il est placé du côté intracellulaire (BEZANILLA et ARMSTRONG, 1971; TRAUTMAN et MARTY, 1984). Alors qu'il est capable de bloquer les courants K entrant quand il est placé du côté extracellulaire (HAGIWARA et coll., 1976; CLEEMAN et MORAD, 1979).

Au niveau des canaux unitaires K des cellules cardiaques, aucun travail systématique n'avait été publié quand nous avons abordé cette étude.

Le mode d'action de ces deux agents a été étudié pour différentes concentrations dans la solution de remplissage de nos micropipettes, à partir des modifications du comportement du canal de type I.

Dans cette partie, nous rapporterons également quelques résultats d'expériences réalisées en présence de chlorure de baryum ($BaCl_2$), sur des tracés obtenus en "steady state". Comme dans les cas précédents, ils seront comparés aux tracés obtenus en conditions de références.

B. Etude du comportement du canal sous l'action de la 4.A.P.

La 4.A.P. est employée à différentes concentrations en présence de

FIGURE No 29

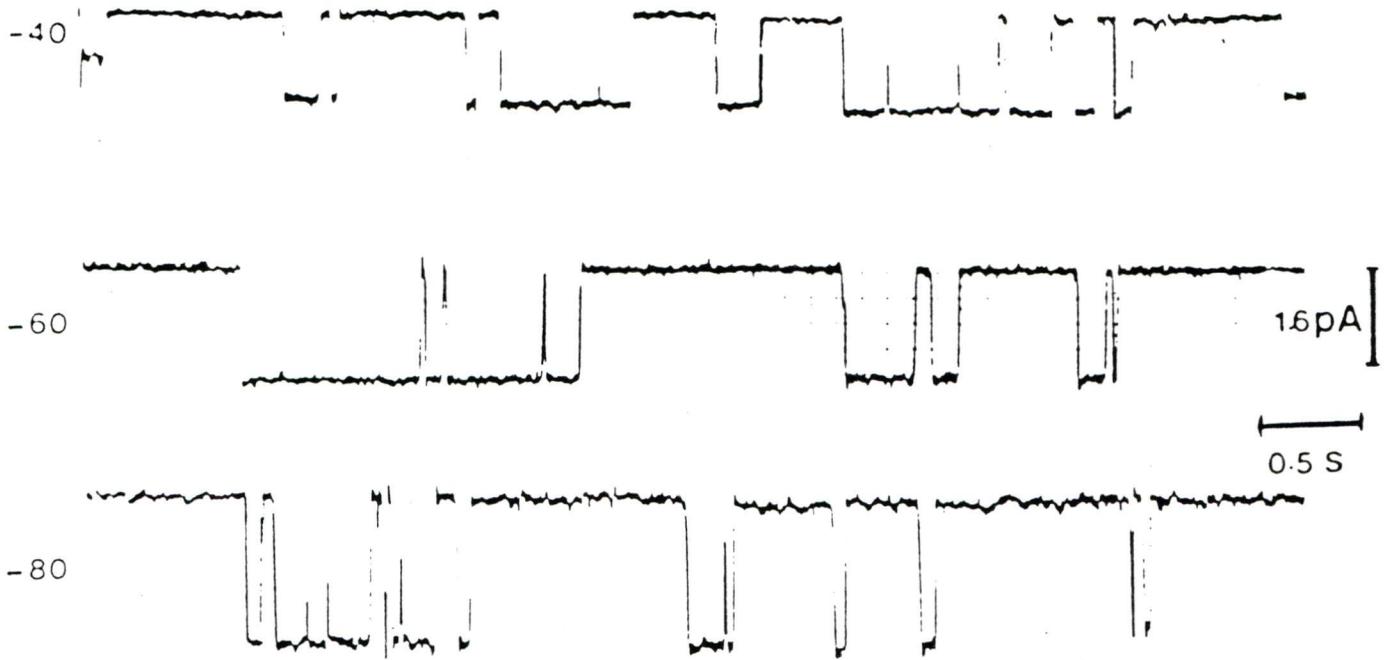
Enregistrement de l'activité du canal de type I sous l'action de la 4.A.P. pour différentes valeurs de potentiel transmembranaire (colonne de gauche).

A) Tracés obtenus en condition de référence 150 mM de KCl.

B) Tracés obtenus en présence de 4.A.P. ($5 \cdot 10^{-5}$ M).

A

150 mM KCl

**B**150 mM KCl + 4-AP ($5 \cdot 10^{-5}$ M)

150 mM de KCl dans les micropipettes en configuration "cell attached".

La figure No 29B montre le genre de tracés obtenus à différents potentiels en présence de 4.A.P. à $5 \cdot 10^{-5}$ M. Ils peuvent être comparés aux tracés en condition référence, c'est-à-dire en 150 mM de KCl (sans 4.A.P.), présentés sur la Figure No 29A.

En 4.A.P., le comportement général du canal n'est pas fondamentalement changé. L'amplitude des événements est toujours proportionnelle au potentiel électrique transmembranaire et la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert augmente quand la membrane est dépolarisée. Par contre, en première analyse, les durées moyennes des temps d'ouverture semblent plus courtes en 4.A.P. que lors des expériences qui servent de référence. En particulier sur la Figure No 29 à -40 mV en 4.A.P., de nombreuses ouvertures transitoires du canal peuvent être observées.

A plus forte concentration de 4.A.P. (10^{-4} M), dans trois expériences différentes, nous avons pu observer ce type d'ouvertures transitoires (< 10 msec) sur l'oscilloscope.

Alors que l'estimation des temps moyens d'ouverture en 4.A.P. à 10^{-5} M donne des valeurs supérieures à 12 msec comme cela est rapporté sur la Figure No 30B. Cette figure suggère également que les temps moyens d'ouverture sont beaucoup plus sensibles aux variations de concentrations de 4.A.P. que les temps moyens de fermeture.

L'analyse des courbes I/V (Figure No 30A) montre que la conductance

FIGURE No 30

Courbe I/V et temps moyens d'ouverture et de fermeture du canal en présence de 4.A.P.

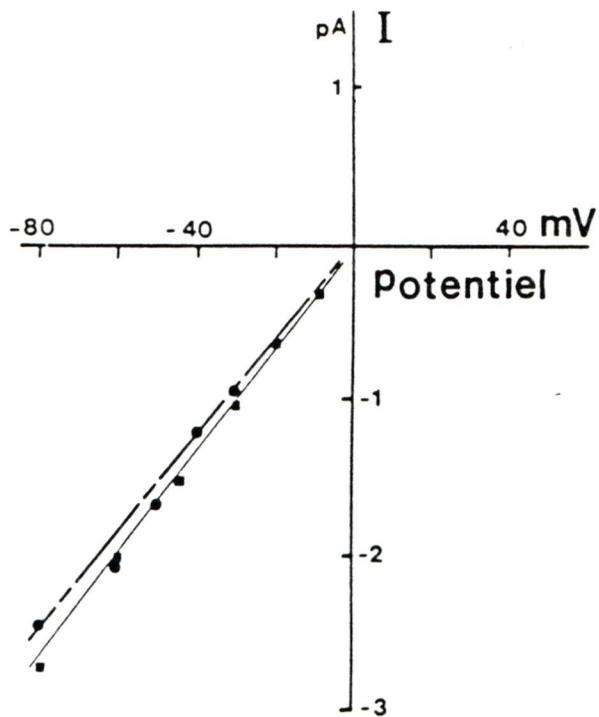
A) Courbe I/V en condition de références 150 mM de KCl (■)

$\gamma \approx 35$ pS et en 4.A.P. ($5 \cdot 10^{-5}$ M), (●) $\gamma \approx 34$ pS.

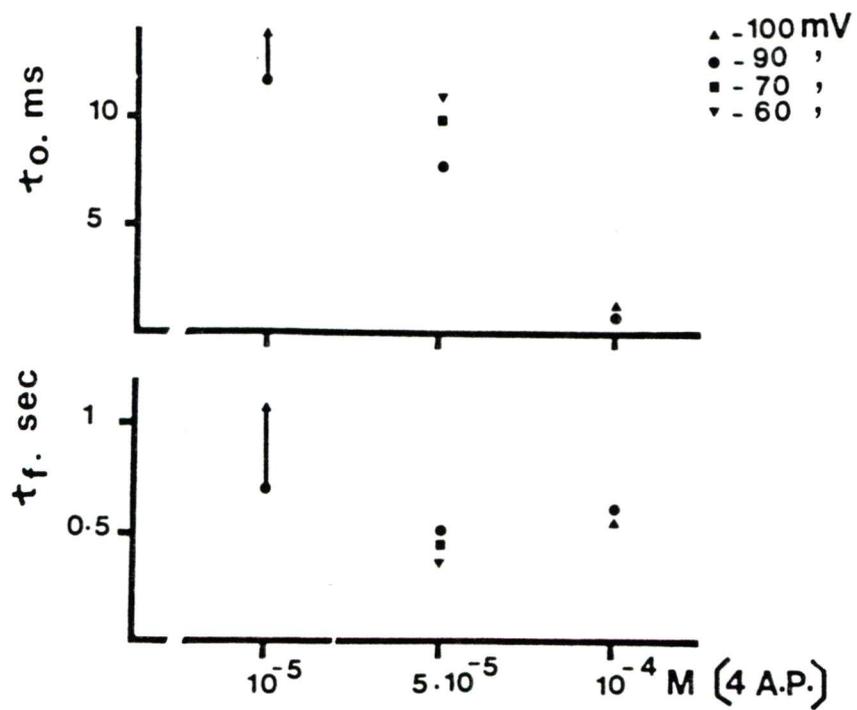
B) Temps moyen d'ouverture (\bar{t}_o) et de fermeture (\bar{t}_f) en fonction de la concentration de 4.A.P. pour différents potentiels transmembranaires.

Les t_o diminuent quand la [4.A.P.] augmente, alors que t_f sont toujours du même ordre de grandeur.

A



B



du canal γ n'est pratiquement pas affectée en présence de 4.A.P. à 5.10^{-5} M (3 expériences) par rapport à la valeur de conductance moyenne en 150 mM de KCl (sans 4.A.P.) les valeurs de γ étant respectivement de 34 et 35 pS.

Par contre, si la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert, évaluée en "steady state" est portée en fonction du potentiel tel que cela est présenté sur la Figure No 31A, il est possible de constater que la 4.A.P. (5.10^{-5} M) diminue la P_o pour chaque potentiel testé, par rapport aux valeurs de P_o calculées en condition contrôle. Ce qui tend à confirmer les premières observations, que le canal passe globalement moins de temps dans l'état ouvert en présence de 4.A.P., quel que soit le potentiel considéré. Il était donc légitime de se demander si l'action de la 4.A.P. était voltage-dépendante. Le taux de modification de la P_o en fonction du voltage a été estimé sous la forme du rapport $P_{o(v)\text{control}}/P_{o(v)4.A.P.}$ (Fig. No 31B).

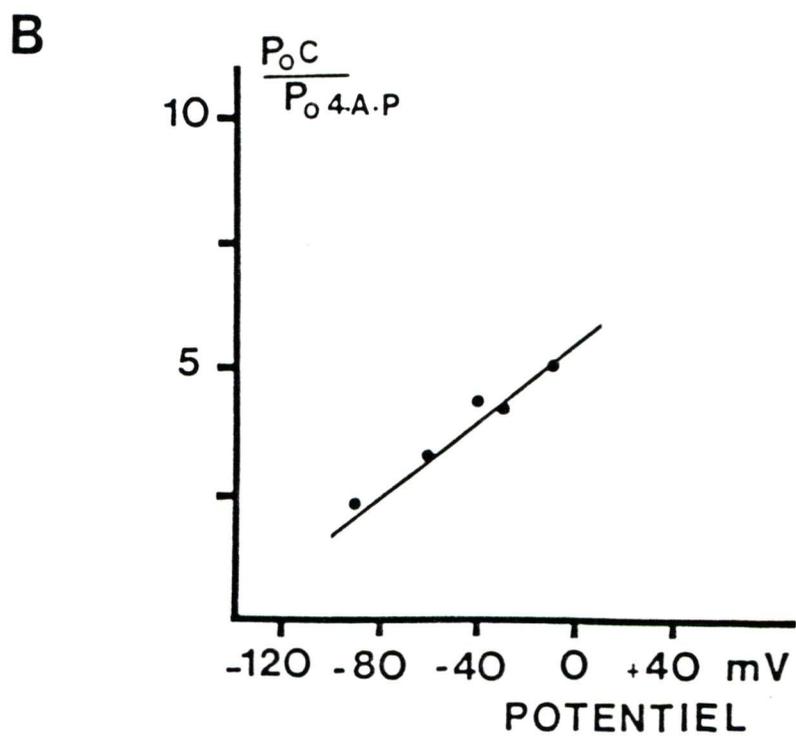
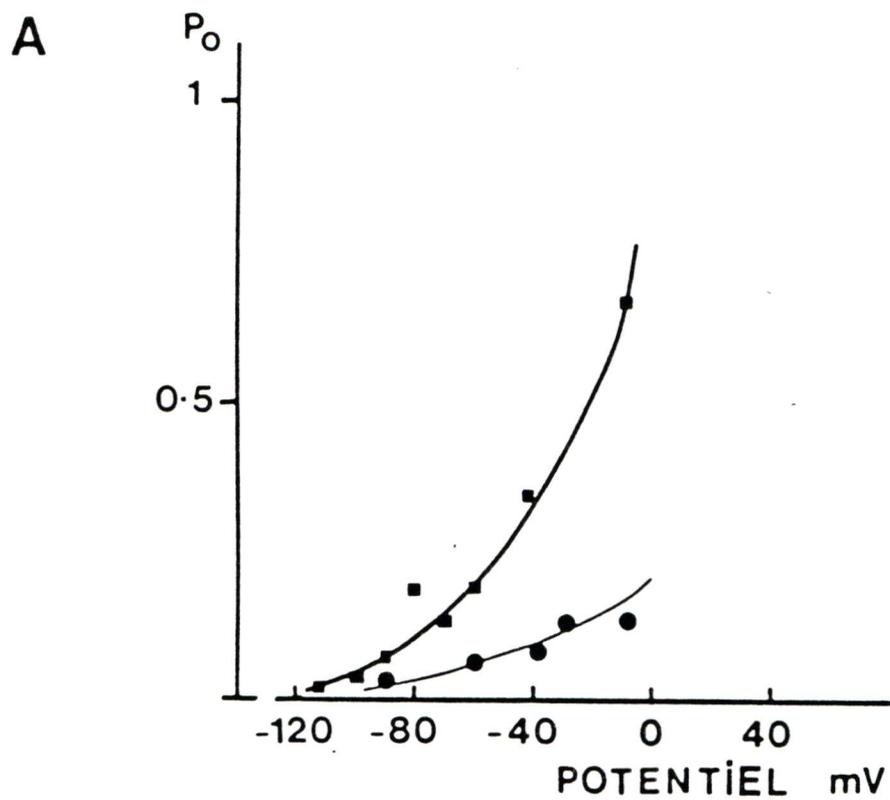
La courbe ainsi obtenue montre que le taux d'inhibition de la P_o du canal, en présence de 4.A.P., augmente en fonction du voltage. Ce qui signifie que plus la membrane est dépolarisée, plus la 4.A.P. semble capable de diminuer la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert.

Mais cette augmentation du taux d'inhibition de la P_o en fonction du voltage ne semble pas corrélérer à une diminution de la fréquence des ouvertures par unité de temps.

FIGURE No 31

Diminution de la P_o par la 4.A.P., et taux d'inhibition par la 4.A.P. en fonction du potentiel.

- A) P_o en fonction du potentiel en conditions de références (■)
150 mM de KCl et en présence de 4.A.P. (●) (5×10^{-5} M) + 150 mM
de KCl.
- B) Taux d'inhibition de la P_o par la 4.A.P. en fonction du
potentiel.



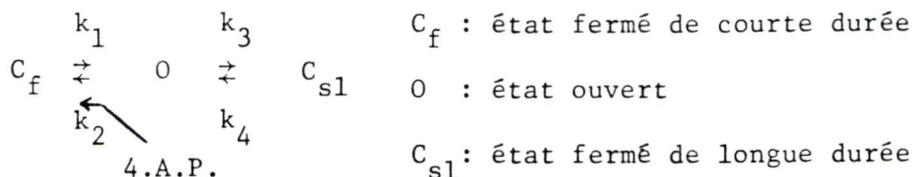
Au contraire, une observation attentive de différents enregistrements ainsi que le nombre d'événements détectés par le programme "JUMPS" montrent que le nombre d'ouvertures est augmenté en 4.A.P. par rapport au nombre d'événements détectés en contrôle au même potentiel pour des temps d'analyse de 1 minute.

Ce qui tend à prouver que la 4.A.P. n'empêche pas le canal de s'ouvrir. Mais la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert étant réellement diminuée, cela signifie que la 4.A.P. semble favoriser une hystérésis moléculaire qui ramènerait le canal vers un de ses états fermés. Nous avons montré sur la Figure No 30B, que les temps moyens de fermeture étaient moins sensibles aux variations de la [4.A.P.]_o.

Dans ces conditions, l'effet voltage-dépendant de l'action de la 4.A.P., établi sur la Figure No 31B, pourrait s'expliquer de façon indirecte. Dans la mesure où plus la membrane est dépolarisée, plus le canal a de chances de passer dans l'état ouvert comme nous l'avons établi précédemment. Et donc, dans ces conditions, plus la 4.A.P. aura de chances de ramener le canal dans un état fermé, en écourtant la durée des temps d'ouverture.

C'est le mécanisme d'action que nous postulons pour cette substance aux caractères amphiphiles qui semble apte à modifier la cinétique moléculaire du canal en fonction de la concentration utilisée. La structure chimique de la 4.A.P. lui permet peut-être de s'insérer soit dans la matrice lipidique, à proximité de la protéine canal, soit dans une partie hydrophobe de la protéine canal, bien qu'un effet direct

ou indirect soit difficile à démontrer. Il n'est pas inconcevable, dans ces conditions que la 4.A.P. puisse modifier une des constantes de vitesse du système



En présence de 4.A.P., tout se passe comme si la stabilisation du canal dans l'état ouvert était de plus en plus précaire quand la $[4.A.P.]_0$ augmente ou que la probabilité de passer dans l'état ouvert augmente.

Les modes d'interactions moléculaires évoquées pour expliquer les modifications de la cinétique canal de type I peuvent être rapprochés de ceux proposés pour expliquer le mode d'action des anesthésiques généraux (GAGE et HAMILL, 1974).

LECHLEITER et coll. (1984) ont étudié l'action de l'halothane. Ils ont montré que cet agent pharmacologique, qui est connu pour diminuer l'organisation des chaînes des lipides membranaires, ce qui augmente la fluidité des membranes, était également capable de modifier le "gating" des canaux sans modifier l'amplitude des courants unitaires à un voltage donné, donc sans modifier la conductance du canal unitaire, comme cela semble être le cas de la 4.A.P. à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Mais l'effet de la 4.A.P. n'est certainement pas uniquement un effet de membrane sur l'arrangement des lipides car dans ces conditions elle devrait également entraîner des modifications des autres

courants ioniques transmembranaires. Son action doit se situer, sur, ou à proximité de la protéine support du canal K de type I. D'ailleurs, son effet global au niveau unitaire est tout-à-fait comparable à celui d'un anesthésique local (QX 222, dérivé de la lignocaine) sur l'activité des canaux K activés par l'acétylcholine, tel qu'il a été décrit par NEHER (1983).

C. Bloquage du canal par le Cs

L'activité du canal de type I a été étudiée à plusieurs reprises en présence de Cs et dans différentes conditions expérimentales.

Une première série d'expériences fut réalisée en configuration "cell attached" en présence de 75 mM de KCl, 75 mM de NaCl, et 0.5 mM de CsCl dans les pipettes.

Nous avons montré qu'il était possible d'enregistrer des sauts de courant dans le sens entrant et dans le sens sortant dans ces conditions expérimentales, ce qui devait permettre de tester les effets du Cs en fonction du potentiel, mais également en fonction du sens du courant.

Le problème est qu'au cours de ces expériences réalisées en 0.5 mM (et même 1 mM) de CsCl, il n'a pas été possible de montrer l'effet de blocage escompté (Figure No 32).

L'effet de segmentation des tracés, comme il apparaît sur cette

FIGURE No 32

Enregistrement de l'activité du canal de type I en présence de 75 mM de KCl + 75 mM de NaCl + 0.5 mM de CsCl.

La présence d'événements nombreux pour des potentiels négatifs en 75 mM de KCl tend à prouver la présence de plusieurs canaux sous le "patch". Alors que le Cs ne semble pas induire de blocage dans ces conditions (expériences réalisées en cell-attached).

Ces tracés peuvent être rapprochés de ceux obtenus en conditions références (Figure No 16).

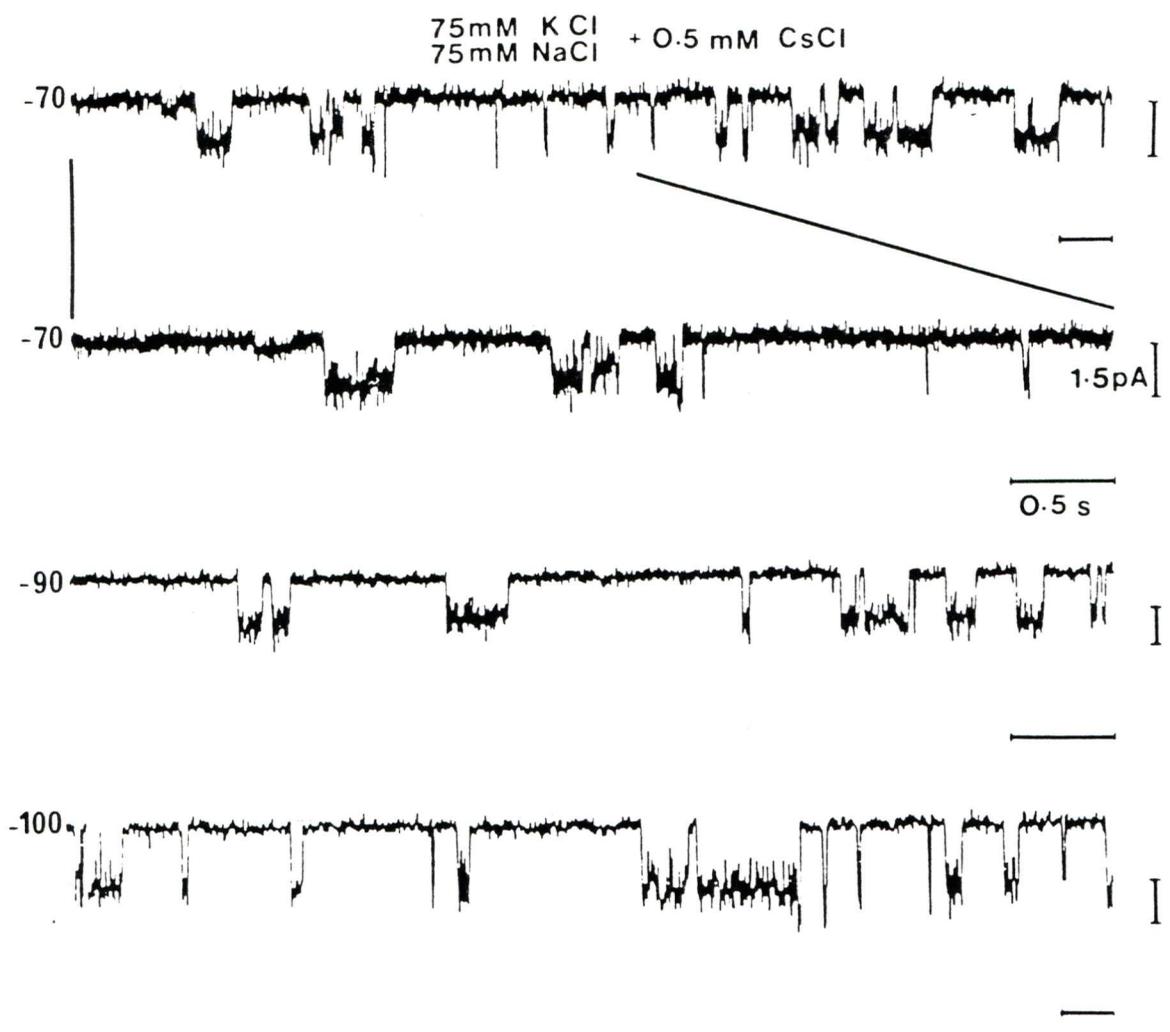
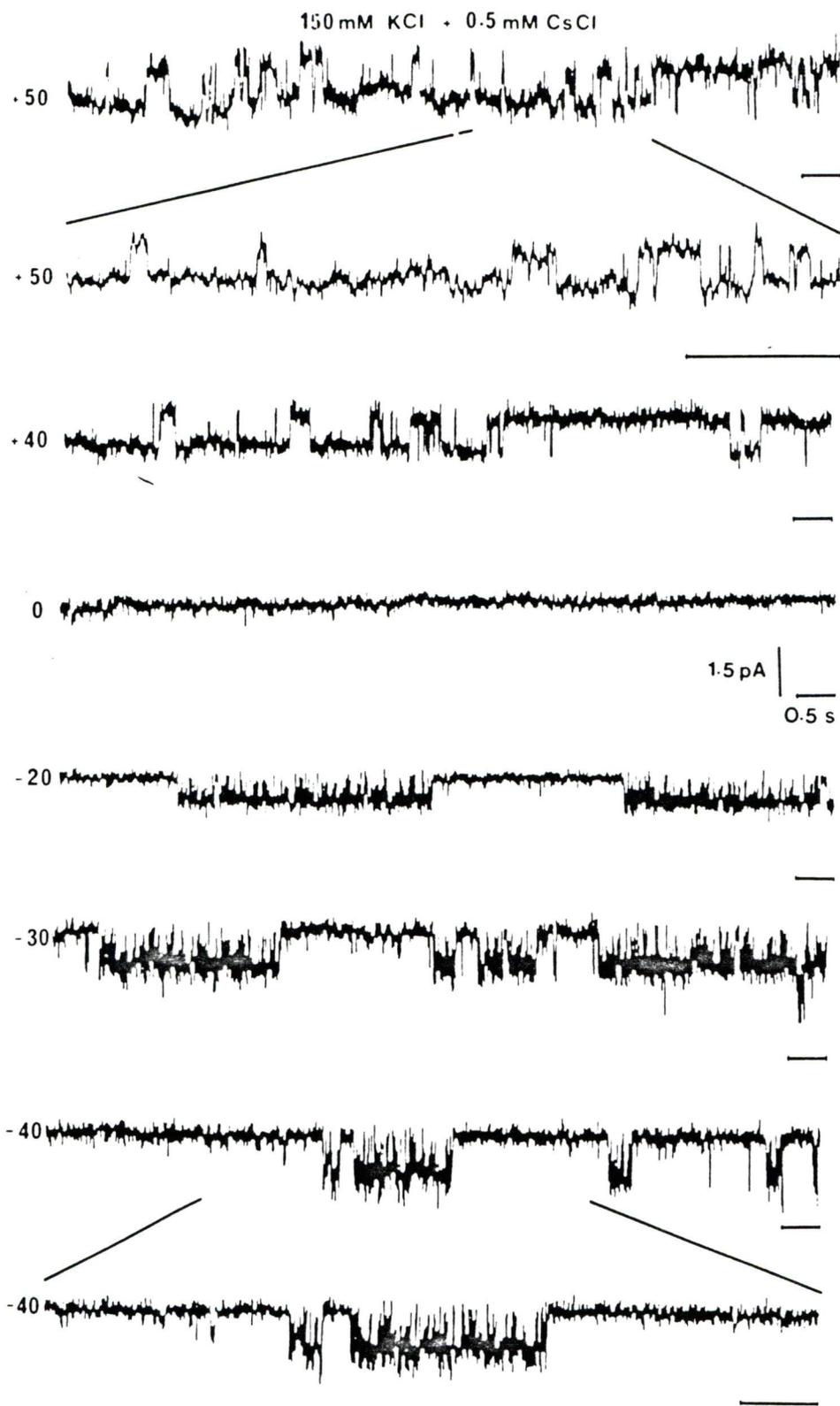


FIGURE No 33

Bloquage de l'activité du canal de type I par le Cs.

Enregistrements réalisés avec 150 mM de KCl + 0.5 mM CsCl dans la micropipette dans la configuration "inside-out patch", avec 4 mM d'ATP dans la solution baignant le côté intra-cellulaire pour maintenir le canal actif.

Le Cs semble capable de bloquer le canal pendant les temps d'ouverture quand le courant est dans le sens entrant (potentiels négatifs). Alors que les événements sortant pour les potentiels positifs ne semblent pas être bloqués.



figure, est plus certainement dû au fait que les enregistrements sont de type multi-canaux. Cet argument est également supporté par le fait que les valeurs des P_o calculées sur ce type d'enregistrement étaient plus, de deux à trois fois, supérieures à celles des valeurs calculées précédemment lors des expériences réalisées en présence de 75 mM de KCl et rapportées sur la Figure No 16, (Chap. IV).

Pour des potentiels plus dépolarisés (-30 mV) il a été possible d'observer des superpositions d'activité d'au moins deux canaux, ce qui est encore un argument pour dire que ces enregistrements sont de type multi-canaux.

Ces résultats paraissent quelque peu équivoque mais, jusqu'à maintenant, les seuls résultats qui montraient un effet du CsCl au niveau d'un canal unitaire K rectifiant dans le sens entrant, sont ceux de FUKUSHIMA (1982) et un enregistrement de SAKMANN et TRUBE (1984b). Dans ces deux cas, les solutions de remplissage des micropipettes ne contenaient pas de NaCl, mais uniquement du KCl (200 et 150 mM, respectivement). Une compétition entre les ions Na et les ions Cs pouvait être envisagée, à moins que les concentrations de Cs utilisées, 0,5 et 1 mM soient insuffisantes pour avoir un effet bloqueur.

Afin de pouvoir détecter un effet plus évident du CsCl, nous avons décidé de travailler à forte concentration de CsCl 10 mM + 140 mM de KCl dans la micropipette (sans NaCl).

Les résultats de 5 expériences nous ont seulement permis de constater

soit la présence de quelques événements de très courte durée (< 10 msec) pendant les 30 ou 45 premières secondes de nos enregistrements, soit aucun événement n'était décelable, même sur l'écran de l'oscilloscope.

Dans le premier cas, nous avons la preuve qu'il y avait au moins un canal sous le fragment de membrane. Mais que son activité paraissait rapidement et totalement inhibée, ou bloquée, dans la minute qui suivait la formation du joint tore-ionique. Ceci était certainement dû à la trop forte concentration de Cs dans les micropipettes.

Une solution de compromis a dû être adoptée. Elle consiste à travailler en présence de 150 mM de KCl + 0.5 mM de CsCl dans les micropipettes et dans la configuration "inside-out patch". Nous avons déjà remarqué au cours de nos expériences antérieures dans cette configuration, que le canal perdait sa propriété de rectification drastique en 150 mM de KCl.

Un tel comportement pose le problème du type de modification apporté au canal ou à son environnement. Cependant, il a l'avantage d'offrir la possibilité d'observer des événements unitaires dans les deux sens sur le même canal. Par ailleurs, le canal type I a été maintenu actif par addition d'ATP (4 mM) dans le bain (TRUBE et HESCHELER, 1984). Nous rapportons donc l'effet du Cs aux niveaux d'enregistrements unitaires dans ces conditions expérimentales.

La figure No 33 montre une série de tracés caractéristiques, obtenus en présence de Cs, pour différents potentiels transmembranaires. Il

FIGURE No 34

Aspects des enregistrements pendant les temps d'ouverture du canal en présence de Cs.

A) Détail de l'activité du canal sur différentes échelles à -20 mV.

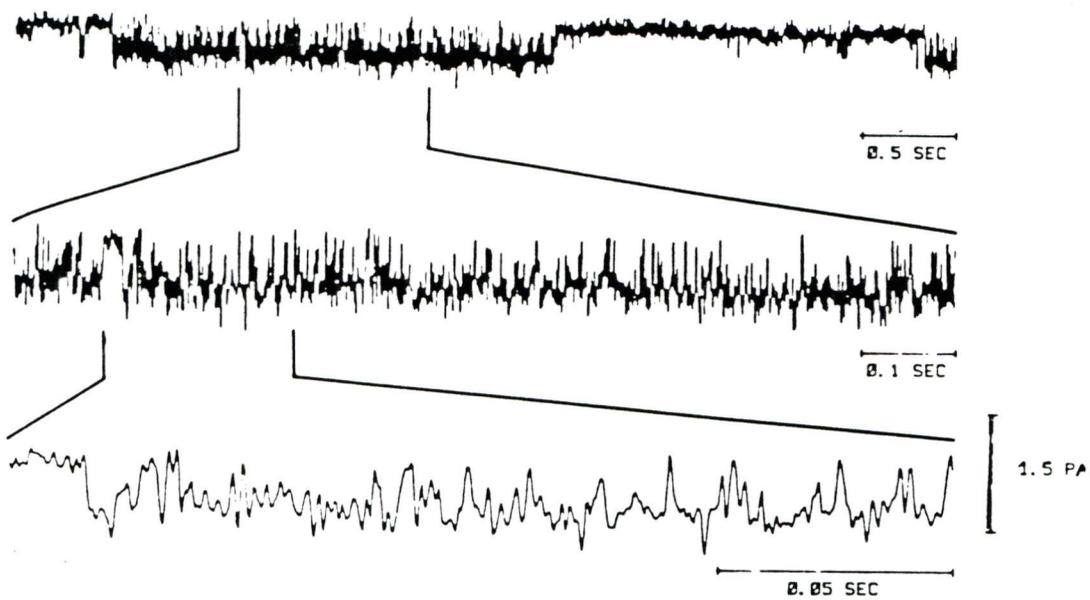
B) à -30 mV.

(Mêmes enregistrements que sur la figure précédente).

A

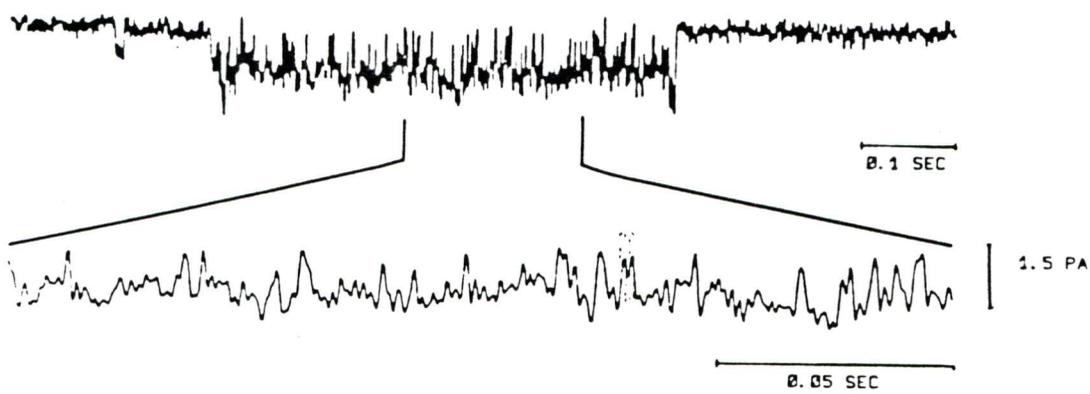
-20 mV

150 mM KCl + 0.5 mM CsCl



B

-30 mV



apparaît de façon non équivoque pour les potentiels négatifs que les événements entrant qui correspondent aux temps d'ouvertures, sont découpés par une multitude d'événements de courte durée, qui ramènent le canal dans un état non conducteur. Alors que pour les potentiels positifs, les événements ouverts sont orientés vers le haut. Le courant est sortant, et les temps d'ouverture ne sont apparemment pas entrecoupés par des événements non conducteurs de courte durée. Ce qui prouve que le Cs placé du côté extracellulaire a plutôt tendance à bloquer le canal quand le courant est dans le sens entrant, alors qu'il ne semble pas du tout avoir le même effet sur les événements pour lesquels le courant est dans le sens sortant (potentiels positifs).

Les tracés de la Figure No 34A et B montrent le type d'activités pendant les temps d'ouverture du canal à -20 et -30 mV sur des échelles différentes. Ce qui illustre bien le phénomène particulier de "bloquage" induit vraisemblablement par la présence de Cs dans le canal quand ce dernier est passé dans l'état ouvert.

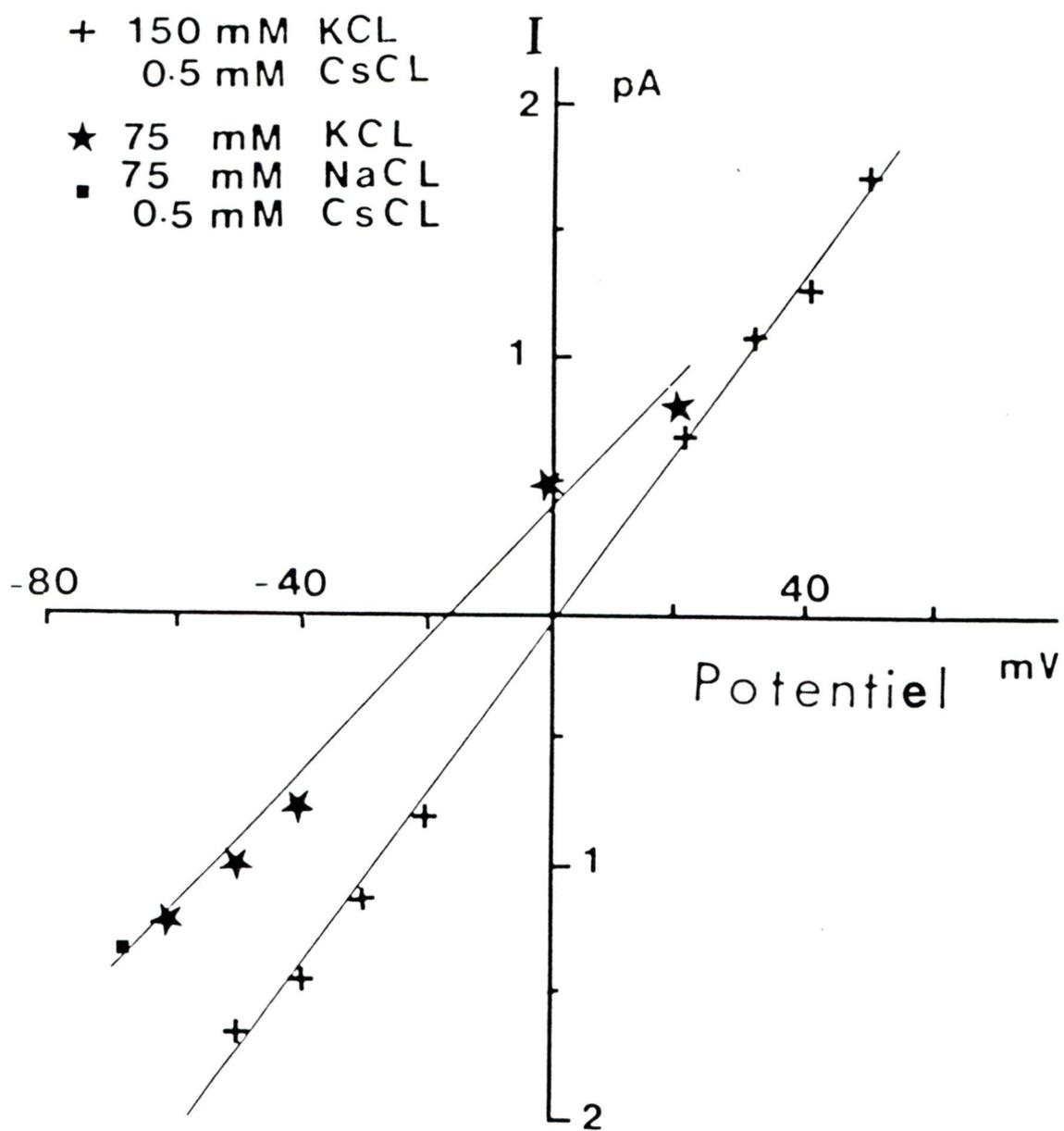
Les 2 courbes I/V de la figure No 35 permettent de calculer les valeurs de la conductance intrinsèque du canal pour deux concentrations potassiques différentes en présence de faibles quantités de CsCl. Elles sont respectivement de 27 pS en 75 mM de KCl + 0.5 mM de CsCl et de 36 pS en 150 mM de KCl + 0.5 mM CsCl). Ces valeurs de conductance ne diffèrent pratiquement pas de celles obtenues précédemment en conditions références, c'est-à-dire sans CsCl dans la pipette.

La présence du Cs⁺ à faible concentration, à proximité du canal ne

FIGURE No 35

Courbe I/V en présence de Cs.

Courbe I/V à partir des valeurs de l'expérience réalisée en 150 mM de KCl + 0.5 mM CsCl en configuration "inside out" présenté précédemment $\gamma \approx 36$ pS, et à partir de 2 expériences réalisées en 75 mM de KCl + 75 mM de NaCl + 0.5 mM CsCl $\gamma \approx 26$ pS.



modifierait apparemment pas son aptitude à conduire les ions K^+ . La topologie du canal doit être inchangée. Par contre, en termes d'inhibition par blocage, la présence du Cs dans le canal, quand celui-ci vient de passer à l'état ouvert, semble entraîner ce dernier vers un état non conducteur de courte durée qui disparaît quand le Cs est expulsé. Quant à la présence de Cs dans le canal, quand le canal est dans l'état ouvert et que le courant ionique est dans le sens sortant, elle est beaucoup moins favorable du fait que les ions Cs placés du côté extracellulaire, ont peu de chance de venir interagir dans le "canal".

Par contre, quand le courant est entrant, la probabilité des ions Cesium d'entrer dans le canal est forte. Ils doivent pouvoir interagir avec l'un des sites du canal.

Mais l'interaction du Cs avec cette zone de la protéine doit être quelque peu différente de celle du K.

Il est possible d'évoquer les rayons différents des deux cations. Suivant PAULING (1960) $r = 1.33 \text{ \AA}$ pour K^+ et $r = 1.69 \text{ \AA}$ pour le Cs^+ , ce qui fait une différence de 21% qui est peut-être suffisante pour expliquer d'éventuelles modifications d'interactions stéréochimiques à faible distance. Mais les ions passant le canal vraisemblablement à l'état partiellement déshydraté, il est probable que la plus faible énergie de déshydratation du Cs, en rapport inverse avec son rayon, pourrait favoriser l'interaction de cet ion avec un ou deux radicaux partiellement électro-négatifs portés par des résidus d'A.A. ($-C \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} -$).

Les molécules d'eau qui ont une constante diélectrique élevée, ont tendance à créer un masque à l'effet de la charge portée par les ions. Dans ces conditions, il est envisageable qu'un ion de plus grand rayon soit partiellement, mais plus facilement déshydraté, et que son effet de charge soit plus efficace.

Dans le but de préciser le mode d'inhibition fonctionnelle par le Cs^+ , l'analyse de la répartition des temps d'ouverture et de fermeture (en plus de blocage) a été réalisée pendant les périodes de cinétique rapide ou "bursts". D'un point de vue pratique, l'analyse a été conduite de façon à éliminer les grands temps de fermeture qui arrivent entre les "bursts". Ceci est possible en fixant, dans le programme "JUMPS", une durée maximale au temps passé dans l'état non conducteur. Par exemple, $t_{\text{max}} = 200 \text{ msec}$).

La durée minimale (ou temps d'omission) a été fixée dans ce cas à 0.8 msec. C'est-à-dire à deux fois la durée entre chaque point digitalisé qui est de 400 μsec pour $\approx f_{\text{dig}} = 2500 \text{ Hz}$.

L'analyse de la répartition des temps ouverts a été réalisée avec le même temps minimum ($t_{\text{min}} = 0.8 \text{ msec}$) mais avec un temps maximum de 2 à 5 sec qui n'est pas réellement limitatif. Dans ces conditions, la répartition des temps ouverts a pu être décrite par une seule exponentielle comme cela est illustré sur la Figure No 36A pour l'un des potentiels négatifs (-30 mV). Alors que la répartition des temps pendant lesquels le canal est dans un état non conducteur pendant les "bursts" a systématiquement été décrit par la somme de deux exponentielles (Fig. No 36 B).

FIGURE No 36

Distribution des temps d'ouverture et des temps de fermeture en présence de Cs versus le pourcentage d'événements.

A) $\tau_o = 3.4$ msec.

B) Dans ce cas, les temps de fermeture de longue durée ont été éliminés en fixant les temps maximums à prendre en considération à $t_{\max} = 100$ msec, et $t_{\min} = 0.8$ msec.

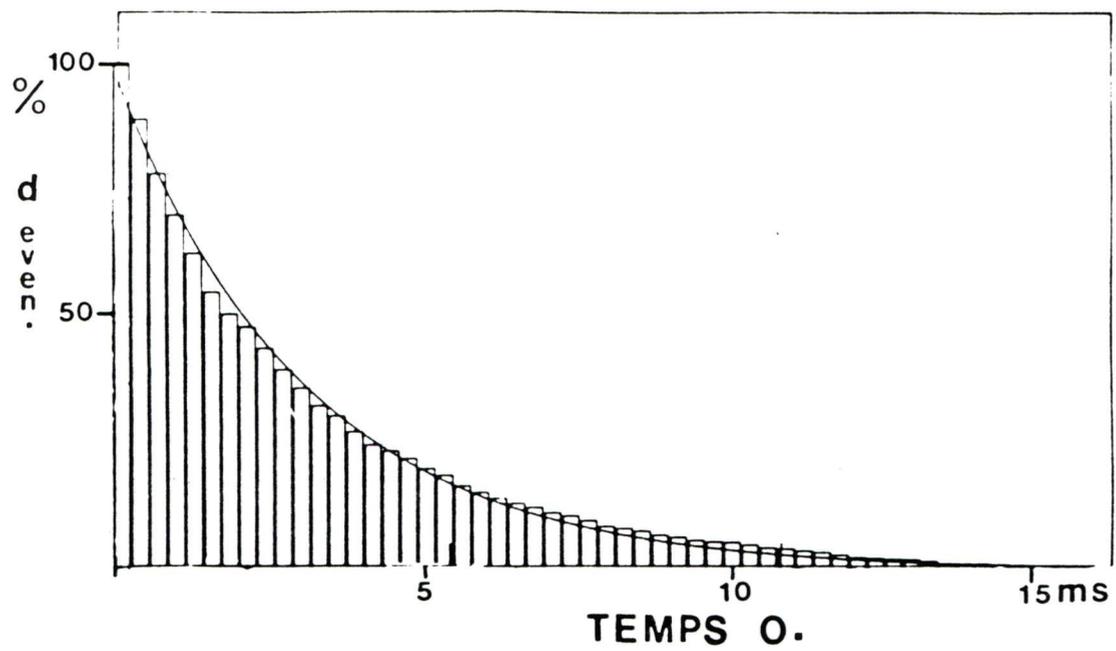
Ce qui revient à analyser le comportement du canal pendant les périodes de cinétiques rapides qui correspondent aux périodes de blocage du canal par le Cs.

A -30 mV, $\tau_{fr} = 3.4$ msec

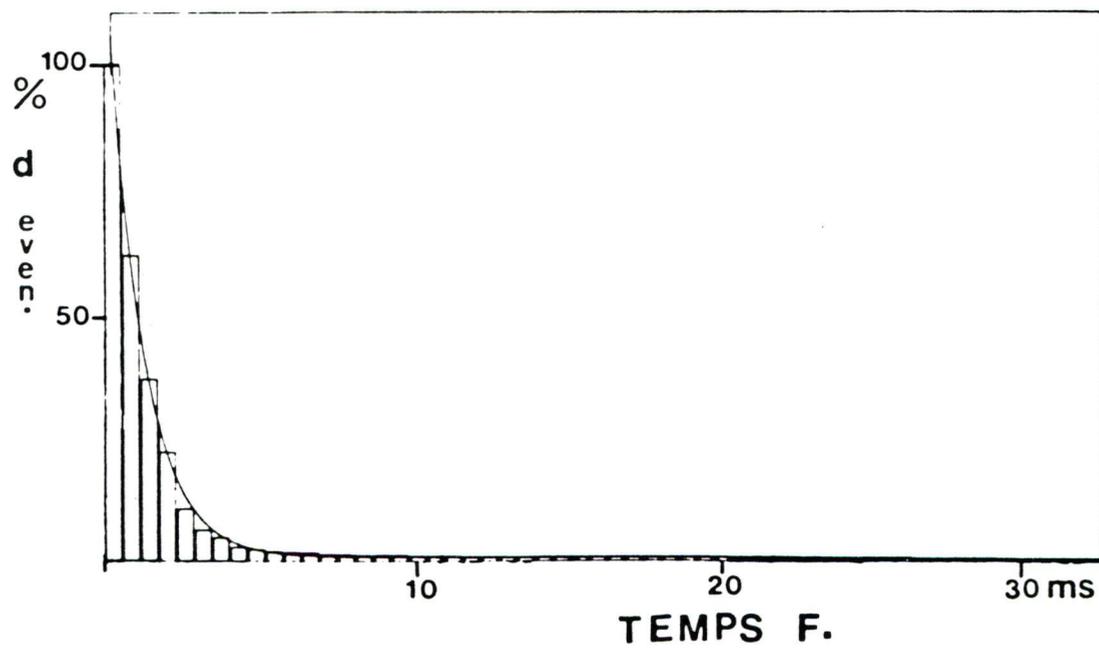
$\tau_{fl} = 15$ msec

A (-30 mV)

150 mM KCL + 0.5 mM CsCL



B



Par ailleurs, il est possible de faire remarquer que sur les enregistrements (Figure No 33), la durée totale d'un "burst" est du même ordre de grandeur que la durée des temps moyens d'ouverture pour un même potentiel lors des expériences réalisées en 150 mM de KCl (sans CsCl) (Figure No 17).

Les courbes de la figure No 37A et B montrent que les valeurs des différentes constantes de temps varient en fonction du potentiel. Les constantes de temps d'ouverture (en A) augmentent quand la membrane est dépolarisée. De façon concomitante, les constantes de temps des états non conducteurs augmentent quand la membrane est hyperpolarisée (en B). Ceci prouve donc que le mode d'inhibition par le Cs est dépendant du voltage. Les temps moyens d'ouverture varient peu ($2.8 < \tau_o < 5.5$ msec). Ils semblent être moins sensibles au voltage que les 2 constantes de temps moyen "fermées" (canal dans l'état bloqué). Quant à la signification de ces différentes constantes, elle peut être interprétée de différentes façons.

Soit les deux constantes de temps calculées, la lente ($\tau_{f.l.}$) et la rapide ($\tau_{f.r.}$), correspondent à des états bloqués du canal. Dans ce cas, il faudra envisager les modèles suivants pour expliquer l'action du CsCl

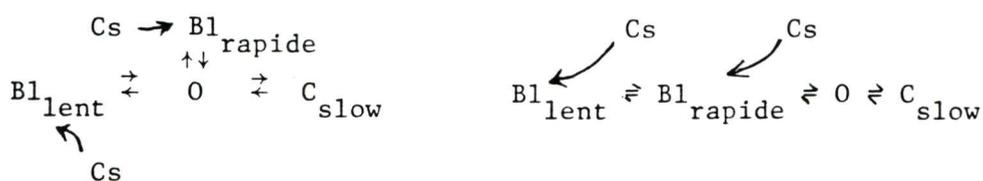


FIGURE No 37

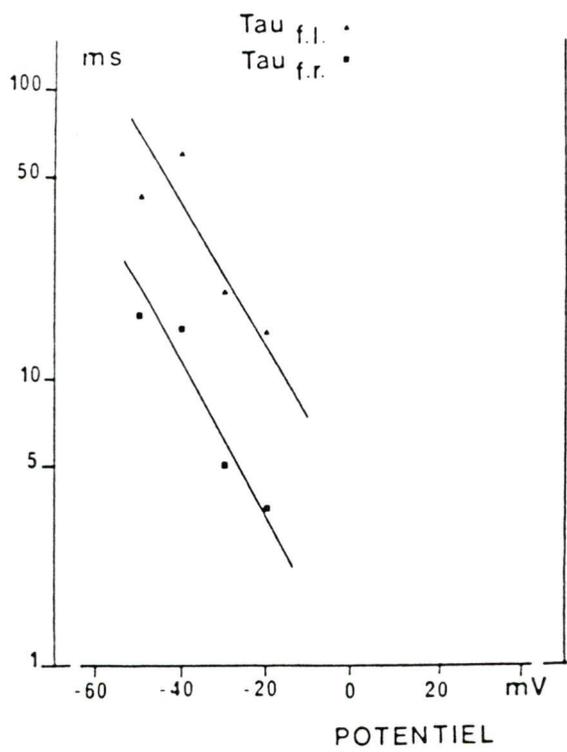
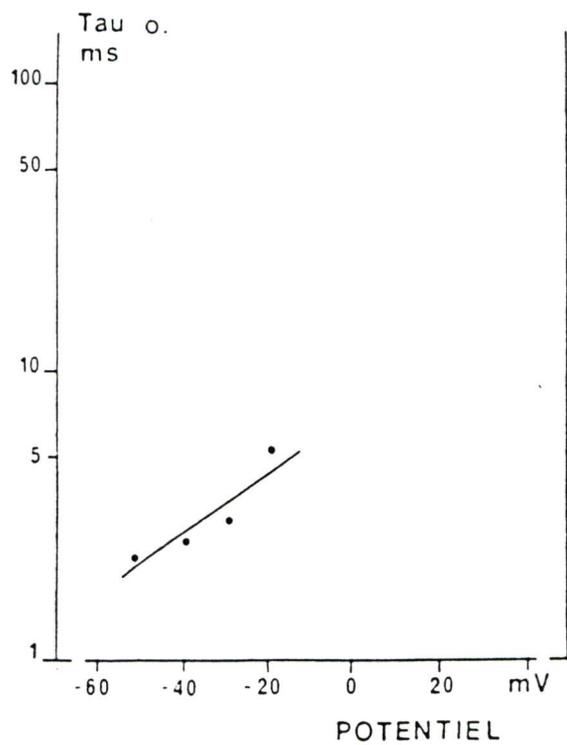
Valeur des constantes de temps déterminées lors de l'action du cesium en fonction du potentiel.

Les constantes de temps ont été déterminées pour les différents potentiels négatifs pour lesquels le courant est dans le sens entrant.

τ_o = constante de temps d'ouverture

τ_{f1} = constante de temps de fermeture "lente"

τ_{fr} = constante de temps de fermeture "rapide"

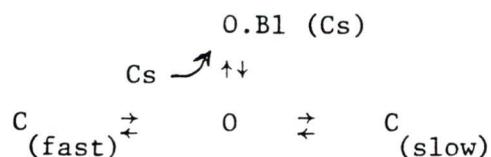


Il faut noter que les temps moyens fermés de longue durée tels qu'ils ont été définis précédemment dans l'analyse cinétique et représentés par $\tau_{cl.slow}$, existent toujours comme il est possible de le constater sur les enregistrements. Mais ces temps fermés de longue durée ont été écartés lors de l'analyse en CsCl ($t_{max} = 200$ msec).

Une autre façon d'interpréter l'existence des deux constantes pendant l'analyse des "bursts" en présence de CsCl, c'est d'assumer que la plus lente des deux ($\tau_{f.l.}$), ne correspondrait pas à un état bloqué du canal mais aux états fermés de courte durée, tels qu'ils ont été définis par $\tau_{cl.fast}$, lors de l'analyse cinétique en 150 KCl. Ce qui est plausible, car premièrement, leurs valeurs trouvées en présence de CsCl ($12 < \tau_{f.l.} < 60$ msec) correspondent à l'ordre de grandeur des valeurs de " $\tau_{cl.fast}$ " extrapolées pour les mêmes potentiels lors de l'analyse cinétique réalisée en 150 mM de KCl (Fig. No 25).

Deuxièmement, si l'analyse des temps passés dans l'état non conducteur pendant les "bursts" est reprise avec un t_{min} égal à 2 à 3 fois les valeurs de $\tau_{f.r.}$, c'est à dire en éliminant tous les temps "fermés" de très courte durée (état bloqué) et en conservant le même t_{max} , une seule exponentielle suffit à décrire les "temps fermés lents" restant pendant les "bursts", mais un nombre important d'événements sont perdus.

Ceci conduirait à proposer un modèle du type:



- C_{slow} = correspondrait aux temps fermés de longue durée (> 200 msec)
(existants, mais soustraits à l'analyse).
- O = correspondrait aux temps ouverts courts (déterminés en
présence de Cs).
- C_{fast} = correspondrait aux temps fermés de courte durée (< 100 msec)
et représentés à $\tau_{f.1.}$ en présence de CsCl.
- O.B1. = correspondrait aux temps de très courte durée (< 15 msec),
non conducteurs qui représenteraient un état bloqué du
canal par le césium.

L'analyse des modifications de la cinétique des canaux unitaires induite par le Cs permet donc de proposer un schéma cinétique qui prend en compte à la fois l'effet du Cs et le type de cinétique décrit précédemment.

D'autre part, ces résultats et leur analyse semblent confirmer les observations et les propositions avancées par FUKUSHIMA (1982) pour expliquer le mode de blocage du Cs au niveau d'un canal unitaire K^+ de l'oeuf de *Tunicea*. Comme nous venons de le démontrer sur le canal de type I de la membrane des cellules cardiaques, le phénomène de blocage par le Cs qu'il observait, est d'autant plus marqué que la membrane est hyperpolarisée.

Par ailleurs, à faible concentration, le Cs ne semble pas avoir d'effet sur la conductance du canal unitaire, les pentes des courbes I/V en 75 et 150 mM de KCl ayant sensiblement les mêmes valeurs que lors des expériences sans Cs. SAKMANN et TRUBE (1984b) ont fait la même

proposition à partir de leurs résultats préliminaires obtenus en présence de 0.1 mM de CsCl + 145 mM de KCl.

D. Influence du barium sur l'activité du canal de type I

L'action globale du $BaCl_2$ est de diminuer l'amplitude des courants K macroscopiques rectifiant dans le sens entrant. Cela a été montré sur la fibre myélinisée (HILLE, 1983), le muscle squelettique (GAY et STANFIELD, 1977) sur le coeur (NOBLE, 1979) et sur les oeufs d'étoile de mer (HAGIWARA et coll., 1978).

Il existe peu de données sur l'action de ce cation divalent au niveau des canaux unitaires K qui ont la propriété de rectifier dans le sens entrant.

Nous rapportons ici les résultats de deux expériences réalisées à différents niveaux de voltage en "steady state" avec 150 mM de KCl + 0.1 mM de $BaCl_2$ dans les pipettes.

D'autres expériences ont montré un effet similaire du Ba^{2+} sur l'activité des courants entrant. Mais ces expériences ont été conduites lors d'impulsions de voltage très dépolarisantes pour le fragment de membrane. Elles avaient été envisagées pour essayer de démontrer l'hypothèse selon laquelle le canal était toujours dans un état ouvert et conducteur pour les potentiels positifs.

Cette hypothèse de travail n'a pas pu être démontrée et a finalement été écartée par des arguments différents de ceux qui auraient

éventuellement pu être apportés par les expériences réalisées en Ba^{2+} pour des potentiels très positifs.

Les enregistrements de la figure No 38 montrent qu'en présence de Ba^{2+} (à 0.1 mM), la durée des événements dans l'état ouvert, ainsi que leur fréquence d'apparition est fortement diminuée. Ces différents enregistrements peuvent être comparés aux tracés de la figure No 17 qui ont été obtenus en présence de 150 KCl (sans $BaCl_2$). Plus les potentiels sont négatifs plus le Ba^{2+} semble avoir d'effet. Par exemple, à -60 mV en présence de Ba^{2+} , seuls des événements de courte durée sont décelables, alors qu'en condition normale, des événements de plusieurs centaines de milli-secondes peuvent être observés.

Le barium semble donc induire une nette diminution de la probabilité de trouver le canal dans l'état ouvert. D'ailleurs, l'absence de superposition des événements pour les potentiels les plus dépolarisés (-20, -30 mV) et l'absence de salves d'événements dans l'état ouvert (à -60 mV) en sont des preuves indirectes supplémentaires.

L'analyse de la distribution des temps d'ouverture et de fermeture n'a pas été faite pour ces enregistrements obtenus sous l'action du $BaCl_2$ à cause du petit nombre de transitions et de la durée des enregistrements à chaque potentiel.

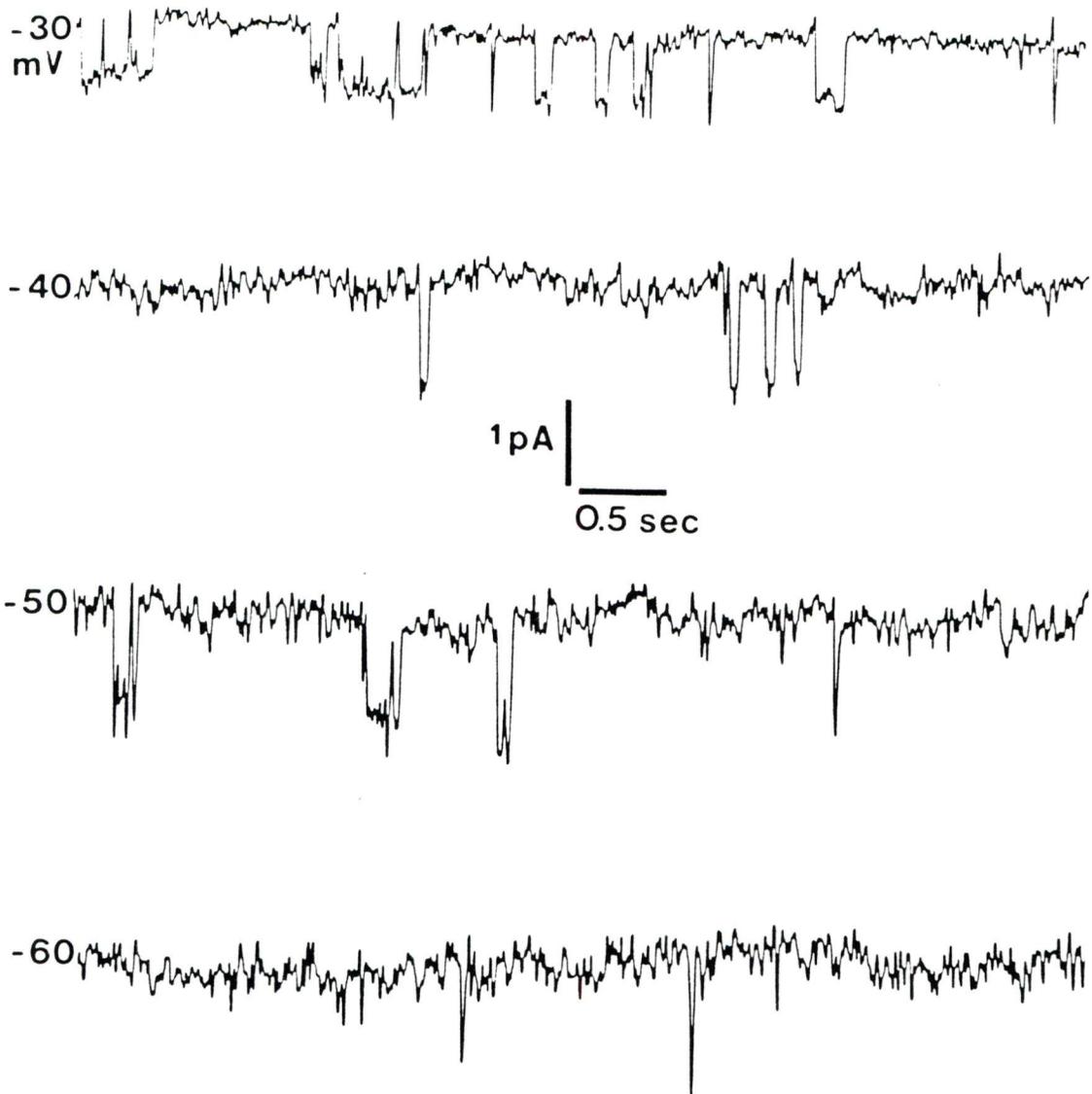
Néanmoins, il est clair que le mécanisme de "gate" du canal de type I est effectué par le Ba placé du côté extracellulaire à la concentration de 0.1 mM.

FIGURE No 38

Enregistrement de l'activité du canal en présence de barium.

Patrons d'activité enregistrés pour différents niveau de potentiel. Si ces tracés sont comparés à ceux obtenus en 150 mM de KCl (Fig. No 17), à -40 et à -60 mV, le Ba semble avoir un effet bloqueur important en diminuant la durée et la fréquence d'apparition des événements pour lesquels le canal est conducteur.

150 mM KCl + 0.1 mM BaCl₂



SAKMANN et TRUBE (1984b) rapportent une diminution de la durée des temps moyens d'ouverture de 150 msec en contrôle, à 8 msec en présence de 0.5 mM de Ba à -80 mV.

Quant à la conductance du canal, la présence de Ba calculée à partir des valeurs de la courbe courant/voltage de la figure No 39A, elle donne une valeur qui serait de 27 pS. Cette valeur de conductance est nettement inférieure à la valeur moyenne calculée en 150 mM de KCl (sans Ba²⁺) qui est de 35 pS.

Cette diminution apparente de la conductance du canal en présence de Ba (0.1 mM) est éventuellement discutable. Dans la mesure où une telle diminution n'a pas été observée par SAKMANN et TRUBE (1984b) sur un type de canal identique et pour une concentration de Ba supérieure (0.5 mM).

Par ailleurs, les différentes équipes qui ont testé l'action du Ba à différentes concentrations, sur l'activité des canaux K activés par le Ca, ne rapportent pas de diminution de la conductance unitaire, sauf pour des concentrations de Ba²⁺ supérieures à 5 mM (VERGARA et LATORRE, 1983; BENHAM et coll., 1984).

L'évaluation de l'amplitude exacte des événements de courte durée (< 1 msec) est toujours difficile, car généralement les événements sont tronqués par le filtrage et la digitalisation. Ce problème a été discuté et illustré par COLQUHOUN et SIGWORTH (1983).

Dans notre cas il pourrait y avoir éventuellement une sous-estimation de l'amplitude des événements de courte durée pour les potentiels les plus négatifs en particulier lors de la restitution des enregistrements sur le papier.

En définitive, si l'action du Ba sur la conductance, en fonction de sa concentration externe, reste à clarifier au niveau des canaux de type "inward rectifier", il semble acquis que le mécanisme de "gating" apparent du canal soit déjà fortement affecté pour des concentrations de l'ordre de 0.1 mM de Ba^{2+} agissant du côté extracellulaire.

Mais le mode de blocage par le barium semble être très différent de celui proposé pour le Cs. Pour ce dernier, les constantes de vitesse de blocage et de déblocage sont plus rapides que les constantes de vitesse de fermeture et d'ouverture du canal. Alors que cela ne semble pas être le cas pour le Ba^{2+} .

L'effet bloqueur important du Ba^{2+} sur les canaux K a été attribué à la disposition des sites de sélectivité du canal du fait de la similitude de rayon ionique de ces deux ions (STANDEN et STANFIELD, 1978; ARMSTRONG et TAYLOR, 1980). ARMSTRONG et coll. (1982) ont postulé l'existence de charges négatives rapprochées dans le canal pour expliquer les longs temps d'action du Ba^{2+} qui bloquerait le canal dans un état non conducteur de longue durée, difficile à discriminer des états fermés.

FIGURE No 39

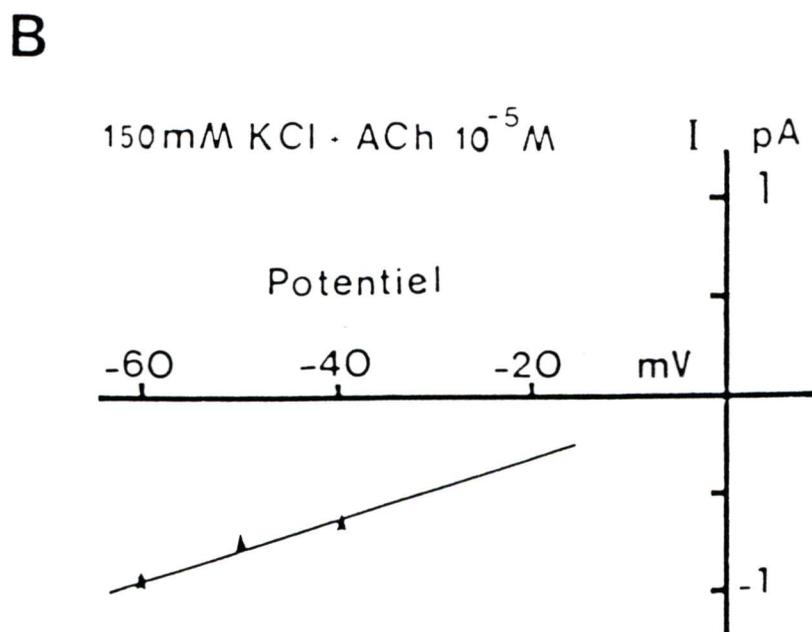
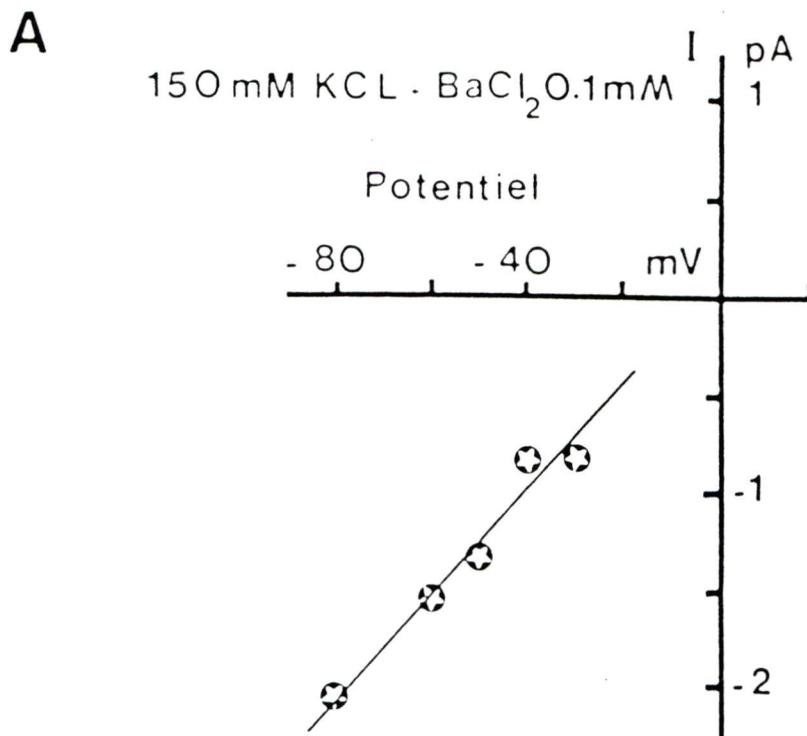
Courbe I/V en Ba et en Ach.

A) Courbe I/V du canal de type I en présence de 150 mM de KCl +
0.1 mM de BaCl₂

$\gamma = 27$ pS.

B) Courbe I/V du "petit" canal de cinétique rapide activé en
présence d'Ach (10^{-5} M).

$\gamma = 15$ pS.



9. Essais de l'acetylcholine pendant les enregistrements unitaires

A. Introduction

L'utilisation de l'acetylcholine (Ach) pour faciliter l'enregistrement de l'activité des canaux ioniques unitaires des membranes biologiques a une valeur historique et scientifique.

En effet, les premiers enregistrements de l'activité de canaux ioniques unitaires furent réalisés en présence d'Ach, au niveau des plaques motrices des fibres musculaires (NEHER et coll., 1976, 1978).

Par la suite, l'Ach fut employée pour stimuler l'activité des canaux ioniques unitaires de différentes structures biologiques (FENWICK et coll., 1982; TRAUTMAN et SIEGELBAUM, 1983), mais peu de travaux ont été conduits sur l'effet de l'Ach sur l'activité des canaux unitaires des structures cardiaques.

GARNIER et coll. (1978) avaient montré que l'Ach activait une composante du courant de backgrounds macroscopiques, sur les fibres auriculaires de grenouille. MOMOSE et coll. (1984) montraient que l'Ach augmentait le courant macroscopique de type I_{K1} , dont la courbe courant/voltage rectifie dans le sens entrant, sur des cellules d'oreillette de coeur de batracien.

Sur le même type de préparation biologique, ils ont également montré que la présence d'Ach (à 10^{-5} M) dans les pipettes de "patch", utilisées en configuration "cell attached", permettait d'activer un

canal unitaire sélectif au K. Ce canal unitaire dont l'activité paraissait directement dépendante de l'activation d'un récepteur muscarinique, avait comme caractéristique une courbe I/V qui rectifiait dans le sens entrant, alors que sa P_o augmentait quand la membrane était dépolarisée.

Des propriétés intrinsèques qui s'apparentaient à celles du canal de type I que nous venons de décrire. Nous avons par ailleurs remarqué que le canal de type I que nous étions en train d'étudier avait une conductance moyenne de 35 pS en 150 mM de KCl, similaire à celles évaluées pour les canaux unitaires K^+ activés par l'Ach sur les fibres musculaires de rats (HAMILL et SAKMANN, 1981).

Dans le but de démasquer une éventuelle sensibilité du canal de type I aux agents muscariniques et dans l'espoir de réduire la quantité de nos "patches" silencieux, nous avons employé l'Ach dans nos micro-pipettes au cours de quelques expériences (n = 6).

B. Résultats

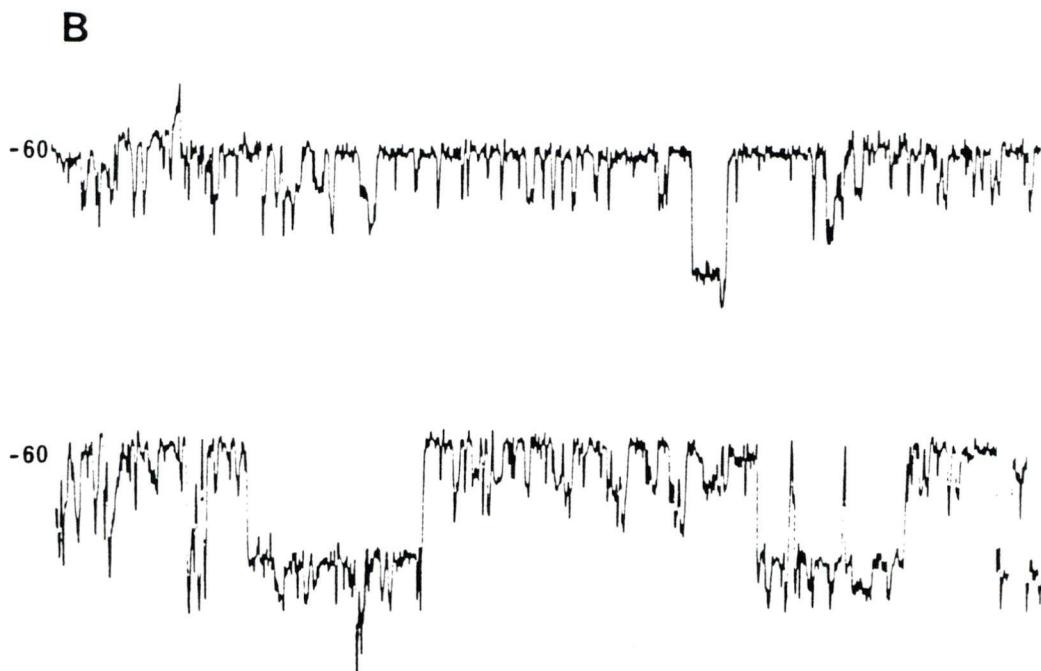
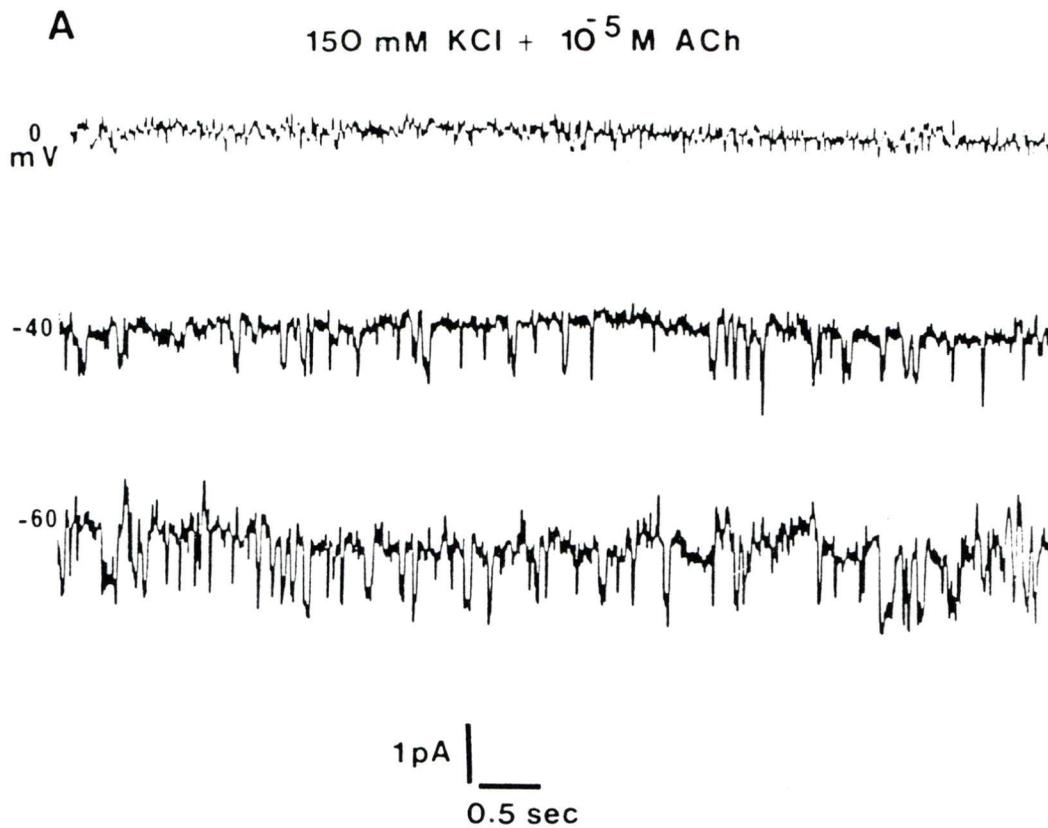
Dans quatre de ces expériences réalisées en présence de 150 mM de KCl + 10^{-5} M d'Ach, il a été possible d'activer un canal unitaire particulier comme le montre la figure No 40A. Ce canal est de faible amplitude et de cinétique plutôt rapide si elle est comparée à celle observée et décrite précédemment pour le canal de type I.

Ce "petit" canal, apparemment activé par l'Ach, a une conductance faible de 15 pS et son potentiel d'inversion, dans les conditions

FIGURE No 40

Activité unitaire induite par l'acetylcholine.

- A) Enregistrement de l'activité d'un "petit" canal observé en présence d'Ach observé dans 4 cas sur 6. Expériences réalisées en configuration "cell attached" avec 150 mM de KCl + 10^{-5} M d'Ach.
- B) Illustration d'un patron d'activité observé au cours d'une seule expérience. Les événements de faibles amplitudes et de cinétique rapide qui appartiennent au petit canal activé selon toute vraisemblance par l'Ach se superposent aux événements de plus grande amplitude ($\gamma = 30$ pA) et de cinétique plus lente, caractéristiques du canal de type I.



décrites ci-dessus, est comparé entre 0 et +10 mV (Fig. No 39B), ce qui serait un argument en faveur de sa sélectivité aux ions K^+ .

Quant à la figure No 40B, elle montre que l'activité de ce "petit" canal activé par l'Ach pouvait se superposer à l'activité du canal de type I (1 expérience). Mais dans ce cas, l'activité du canal de type I ne semble pas modifiée par la présence d'Ach dans la pipette. En effet, les événements assimilables à ceux de l'activité d'un canal de type I, ont une amplitude de 2 pA à -60 mV en 150 mM de KCl, ce qui correspond à une conductance unitaire de l'ordre de 33 pS. Par ailleurs les temps moyens d'ouverture ne semblent pas avoir été modifiés de façon drastique si nous comparons les enregistrements de la Figure No 40B à ceux en référence (150 mM de KCl, sans Ach) (Figure No 17) pour des potentiels analogues.

C. Conclusions

Donc, selon toute vraisemblance, l'utilisation de l'Ach à 10^{-5} M, lors d'enregistrements au niveau unitaire sur des cellules ventriculaires en culture, a permis d'activer un canal de faible conductance (≈ 15 pS) et de cinétique rapide, ce qui n'avait jamais été mentionné auparavant dans la littérature.

D'autre part, les résultats de ces quelques expériences en présence d'Ach, où il a été possible d'observer dans 4 cas sur 6, l'activité du petit canal, sans modifier les chances de succès d'observer le canal de type I; le fait que l'activité du canal de type I n'ait été observée

qu'au cours d'une seule expérience, de façon simultanée à l'activité du petit canal, tend donc à démontrer que l'Ach n'a pas augmenté la probabilité d'observer le canal de type I.

Par ailleurs, l'activité du canal de type I, quand elle est observable (Figure No 40B) ne paraît pas modifiée par la présence d'Ach qui a cependant, et de façon simultanée, activé le "petit" canal de cinétique rapide.

Ce dernier ressemble de façon surprenante au courant unitaire de faible conductance et de cinétique rapide enregistré en milieu hyperosmotique 300 mM de KCl et déjà illustré sur la Figure No 12D.

Citation

"Analyse terminée, analyse interminable."

T. FREUD

C H A P I T R E V

CHAPITRE V

DISCUSSION GENERALE

Après avoir mis au point une méthode d'isolement et de culture de cellules cardiaques de mammifère, l'essentiel de ce travail a été orienté vers l'étude du mode de fonctionnement d'un canal K. Ce canal a été arbitrairement appelé "de type I" au début de notre étude pour le différencier des autres types de canaux K présents à la surface des cellules ventriculaires de rat nouveau-nés en culture primaire.

Nous avons évoqué successivement un certain nombre de problèmes inhérents au mode d'enregistrement et à l'analyse des signaux unitaires observés. Mais les problèmes posés par la convolution et la déconvolution des signaux, n'ont pas été étudiés en détails dans cette étude. Bien qu'au cours de l'analyse des signaux, telle que nous l'avons faite, nous avons dû tenir compte d'un certain nombre de paramètres qui ont été systématiquement évalués avec un certain pourcentage d'erreur. Les publications spécialisées qui traitent des problèmes d'enregistrement et d'analyse des signaux unitaires ont été mentionnés à différentes reprises dans ce mémoire.

Par la suite, plusieurs séries d'expériences ont été menées pour déterminer les caractéristiques et le mode de fonctionnement du canal de type I dans différentes conditions: tout d'abord, l'analyse détaillée des courbes I/V obtenues pour

différentes $[K]_o$ a permis d'évaluer les modifications de paramètres tels que la conductance et les potentiels d'inversion. Pour les $[K]_o$ élevées les valeurs des potentiels d'inversion sont en accord avec une bonne sélectivité du canal aux ions K du fait de la similitude entre les valeurs des potentiels d'inversion et des potentiels d'équilibre aux ions recalculée par l'équation de Nernst.

Si les valeurs des potentiels d'inversion sont portés en fonction de $[K]_o$, il est possible de décrire les points expérimentaux par une courbe décrite par l'équation de G-H-K qui prend en considération le rapport de perméabilité P_{Na}/P_K . Pour le canal de type I, ce rapport a été évalué à $P_{Na}/P_K = 0.056$. Ce rapport est supérieur à celui calculé par HAGIWARA et TAKAHASHI (1974) qui, sur les oeufs d'étoile de mer, évaluaient le rapport $P_{Na}/P_K = 0.03$.

Nous avons également montré que les valeurs de conductance unitaire du canal de type I sont très dépendantes de la $[K]_o$; elles varient de 12 à 35 pS quand $[K]_o$ passe de 5.4 à 150 mM de KCl. La relation entre les valeurs de ces deux paramètres, portés en coordonnées logarithmiques, a permis de calculer un coefficient de proportionnalité de 0.46 (Figure No 20B). Cette valeur est très proche de la valeur théorique de 0.5 si la conductance unitaire, γ était proportionnelle à $\sqrt{[K]_o}$.

Le processus de conduction des ions à travers ce canal est un phénomène saturable comme cela a été montré sur la Figure No 21A. Les valeurs de conductance, c'est-à-dire du taux de passage des ions par unité de temps, atteignent un plateau pour les $[K]_o \geq 150$ mM. Ce phénomène de

saturation fait donc penser à ce qui est observé pour les vitesses de réaction des systèmes enzymatiques et conduit à penser que le passage des ions est assujéti à des sites d'interactions.

L'analyse de ces deux paramètres en graphe de LINEWEAVER-BURK ($1/\gamma = f 1/[K]_o$) a permis de calculer une valeur de constante de dissociation apparente de $K_D = 100$ mM. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle calculée par VERGARA et coll. (1984) $K_D = 90$ mM, pour les canaux K activés par le Ca. Par ailleurs, suite à l'emploi du K-acetate, il a été possible de montrer que la qualité des anions ne semblait affecter ni la conductance ni la perméabilité du canal de type I. Par contre, le Na aurait un effet facilitateur sur la conductance du canal aux ions K malgré un faible rapport de P_{Na}/P_K .

Cet effet facilitateur du Na pourrait être expliqué par un processus de "multi ions single file diffusion", tel que proposé par HILLE et SCHWARZ en 1978. Dans ce cas, si un ion Na vient à interagir avec l'un des sites du canal normalement occupé par un ion K, il peut favoriser le déplacement ou la translocation des ions K en interaction avec les autres sites.

Ceci n'est qu'une formulation différente de ce que proposait FUKUSHIMA (1982) quand il postulait que l'effet facilitateur du Na sur la conductance K était dû à l'interaction d'un ion sodium sur un site externe du canal. Une interaction qui aurait pour effet de faciliter l'expulsion du K d'un site du canal du côté intracellulaire.

Enfin, le dernier enseignement tiré de l'observation des courbes I/V

est qu'elles ne sont pas linéaires sur toute la gamme de voltages étudiés. Le canal semble perdre son caractère ohmique, en particulier pour les potentiels supérieurs à E_K . Pour les $[K]_o$ élevées, le canal rectifie dans le sens entrant. Cette propriété permettrait de classer le canal de type I parmi les "inward-rectifiers", bien que son comportement cinétique en fonction du potentiel soit différent de celui des "inwards rectifiers" classiques décrits par OHMORI (1978) et FUKUSHIMA (1981-82).

Nous avons montré que la P_o du canal de type I augmentait avec la dépolarisation. La dépendance de P_o du canal que nous avons montré est similaire à celle décrite par BENHAM et BOLTON (1983, 1985) pour des canaux K activés par le Ca^{2+} sur les cellules musculaires lisses. D'autre part, elle est identique à celle décrite par SAKMANN et TRUBE (1984) sur les cellules ventriculaires de cobaye et par JOSEPHSON et BROWN (1984) sur les cardiocytes de rats nouveau-nés, et plus récemment par TANIGUCHI et NAKAMURA (1984).

Cependant, BECHEM et coll. (1985) ont trouvé une P_o qui avait une dépendance inverse au potentiel; elle augmentait en hyperpolarisation sur les cellules atriales fraîchement isolées. Les résultats de leur travail doivent être rapprochés de ceux obtenus sur les canaux rectifiant dans le sens entrant décrits sur les oeufs d'invertébrés (FUKUSHIMA, 1982).

L'analyse cinétique simplifiée, discutée au chapitre IV, 6, a permis de décrire le comportement cinétique du canal à partir d'un modèle à

trois états de type C-O-C. Les raisons du choix de ce modèle étaient conditionnées par le nombre de constantes de temps déterminées pour chaque état. Une seule constante de temps permettait de décrire la distribution des durées des temps d'ouverture alors que la distribution des durées de temps de fermeture était décrite par au moins deux exponentielles. Ce qui conduisait à la conclusion de l'existence d'une seule population d'événements dans l'état ouvert et deux populations d'événements dans l'état fermé.

Bien que l'éventualité du fonctionnement cinétique du canal suivant un modèle à trois états de type C-C-O ne peut être totalement écartée (SAKMANN et TRUBE, 1984b), l'évaluation des constantes de vitesse, à partir du modèle C-O-C, donne des résultats plus cohérents dans la gamme de potentiels étudiés et pour les deux $[K]_0$ employées (PAYET et coll., 1985).

La constante de vitesse, k_4 , est la plus affectée par la variation $[K]_0$ dans la gamme de potentiels étudiés.



La diminution des valeurs de cette constante de vitesse (k_4) en 75 mM de KCl (Fig. No 25), contribue donc directement à l'augmentation de la durée des temps de fermeture de longue durée. Alors que les valeurs de k_2 et k_3 qui conditionnent la durée moyenne des temps d'ouverture ne sont pas affectées par les variations de $[K]_0$.

Tout se passe comme si l'augmentation de $[K]_o$ rendait plus instable la configuration du canal dans l'état fermé de longue durée. Ce qui confère au K extracellulaire la propriété d'avoir une rétro-inhibition positive sur le mécanisme de "gating" du canal. JUNGE (1982) avait déjà proposé un tel mécanisme uniquement à partir des observations faites sur la dépendance des courants K globaux de neurones d'escargots lors des variations de $[K]_o$.

Le fait que l'ion perméant à travers une protéine-canal puisse contrôler sa propre perméabilité en modifiant la cinétique de cette dernière, semble être un phénomène assez général pour expliquer le mode de fonctionnement des canaux ioniques unitaires.

Il est connu, par exemple, que l'augmentation de Ca intracellulaire favorise l'inactivation des canaux calciques (MITCHELL et coll., 1983).

Une contribution originale de ce travail est d'avoir étudié le comportement du canal de type I pendant des impulsions de potentiel. Nous avons tout d'abord montré qu'une transition de voltage pratiquement instantanée ne changeait pas l'état dans lequel se trouvait le canal au moment de la transition et ceci, quel que soit le sens et l'amplitude de cette dernière.

Par contre, l'amplitude du courant est affectée instantanément par le changement de potentiel. Pendant l'impulsion, le canal fluctue selon les constantes de vitesse associées à ce niveau de voltage. Selon DEFELICE et CLAY (1983), les valeurs des constantes de vitesse varient

instantanément en fonction du voltage. Elles déterminent la durée de l'événement après la transition de voltage.

Le comportement global du canal lors d'une transition est donc conditionné par l'ancien et le nouveau voltage.

Après avoir montré que l'état du canal n'est jamais modifié par une variation de voltage instantanée, nous avons construit un test statistique pour déterminer quel était l'état du canal le plus probable au cours de séries d'impulsions tests, en particulier pour les niveaux de potentiel où l'amplitude des événements est impossible à résoudre du fait, probablement, de la limite de résolution de notre système.

Dans ces conditions, nous avons montré que le P_{oo} du canal augmente en fonction du voltage de façon comparable à ce qui avait été établi lors des expériences réalisées en "steady state". De plus, nous avons montré que le canal était pratiquement toujours dans l'état ouvert pour les potentiels positifs ($P_{oo} > 0.92$). Ces résultats ont dernièrement été confirmés par les travaux de TANIGUSHI et NAKAMURA, 1984).

Par ailleurs, ces résultats tendent à prouver que la rectification est bien une propriété du canal dans l'état ouvert. En effet, malgré la forte probabilité que le canal a d'être dans l'état ouvert pour les potentiels positifs ($> E_K$ en 15 mM de KCl), les observations faites lors de l'application des rampes de voltages et sur les courbes I/V montrent qu'il est impossible de mesurer un courant sortant.

Bien que le mécanisme moléculaire qui sous-tend la propriété de rectification du canal soit difficile à démontrer, nous avons pu établir que ce mécanisme était instantanément réversible, en changeant la polarité appliquée aux bornes du canal.

Il s'agit vraisemblablement d'une modification du "tractus conducteur" de la protéine canal, bien que le principe de la particule bloquante, "foot in the door", proposé par ARMSTRONG (1969) reste une éventualité plausible. D'autant plus que lors des expériences réalisées en "inside-out", nous avons constaté que le canal de type I perdait sa propriété de rectification. Ce qui serait un argument supplémentaire pour dire que la rectification serait en rapport avec un composant intracellulaire.

Car il s'agit bien du même canal qui acquiert la propriété de conduire dans le sens entrant et dans le sens sortant. Comme l'application d'impulsions permettant d'inverser la polarité imposée au fragment de membrane isolée ont permis de le constater dans certaines de nos expériences.

La partie de ce travail consacrée à l'étude des modifications du comportement du canal de type I en présence d'inhibiteurs organiques ou ioniques a permis de montrer différentes modes d'inhibition.

En présence de 4 A.P. à différentes concentrations, ce sont avant tout les temps moyens d'ouverture qui sont raccourcis, alors que le nombre d'ouvertures par unité de temps ainsi que les temps moyens de

fermeture ne sont pas, ou peu affectés. La 4.A.P. n'empêcherait donc pas le canal de passer dans l'état ouvert, mais elle favoriserait son retour vers un état non conducteur. En modifiant l'une des constantes de vitesse du système (k_2), la 4.A.P. pourrait favoriser le retour vers un état fermé de courte durée défini lors de l'étude cinétique du canal. Eventuellement d'un état "bloqué long" pourrait être envisagé comme cela a été proposé pour certaines substances telles que les anesthésiques locaux qui ont globalement le même type d'effet (NEHER, 1983). Bien que pour ces substances, leur effet est plus marqué en hyperpolarisation.

En présence de 4.A.P., nous avons montré que le taux d'inhibition de la P_o du canal était d'autant plus important que le canal avait de chances de passer dans l'état ouvert lors de dépolarisations. L'effet voltage-dépendant de la 4.A.P. serait un effet indirect dans la mesure où le canal doit passer dans l'état ouvert avant de pouvoir être ramené dans un état non conducteur. Cependant, la 4.A.P. n'affecte pas la conductance intrinsèque du canal.

Le comportement du canal sous l'action du Cs, à faible concentration, dans les conditions où nous l'avons décrit, a permis de démontrer que le Cs placé à l'extérieur, bloque sélectivement le canal quand le courant est dans le sens entrant. Cet effet peut s'expliquer par le fait que les ions Cs ont une probabilité beaucoup plus forte de pouvoir interagir avec l'intérieur du canal quand les charges se déplacent de l'extérieur vers l'intérieur. Alors que cette probabilité est très faible quand les mouvements de charge sont dans le sens opposé (courant sortant).

Cet effet serait donc le premier argument pour dire que le (ou les) site(s) d'interaction du Cs serai(en)t à l'intérieur du "tractus conducteur" de la protéine-canal.

D'autre part, il a été montré que le Cs pouvait induire un processus de blocage et de déblocage rapide du canal de type I dans l'état ouvert. Ce processus viendrait s'ajouter aux mécanismes de "gate" déjà existants. Quand à l'effet voltage dépendant du blocage par le Cs, mis en évidence à partir de l'étude de la cinétique pendant les "bursts", il peut être interprété comme une augmentation de la probabilité que le canal puisse être bloqué par le Cs qui tente de franchir le canal. Cette augmentation de probabilités est proportionnelle au nombre de charges passant à travers le canal, qui augmente avec l'amplitude du courant et donc avec la différence de potentiel.

La présence de Cs dans le milieu extérieur ne modifie pas la conductance intrinsèque du canal ce qui tend à prouver que la topologie du canal n'est pas modifiée. Par contre, quand du Cs est "trappé" dans le canal, il entraîne instantanément la protéine vers un état bloqué. Cet effet de blocage est un phénomène dynamique et réversible.

Quand aux modifications apportées au comportement du canal par la présence d'une faible $[Ba^{2+}]_o$, elles se traduisent par une raréfaction et une diminution de la durée des événements dans l'état ouvert, de façon concomitante à un allongement de la durée des temps passés dans un état non conducteur (fermé ou bloqué). C'est donc une modification du "gating" apparent du canal qui est observée. Le Ba semble capable

de stabiliser la protéine dans un état non conducteur. Mais cet effet, obtenu pour de faibles concentrations de Ba^{2+} ne paraît pas lié à la neutralisation des charges de surface. De plus, une diminution de la conductance unitaire du canal a été observée, ce qui tend à démontrer que le Ba^{2+} est capable de modifier la topologie du canal en agissant directement sur la protéine. Bien que ce dernier résultat soit controversé, SAKMANN et TRUBE (1984b) n'observaient pas de diminution de la conductance unitaire en présence de Ba^{2+} sur le même type de canal. Et l'action du Ba qui est mieux connue sur l'activité des canaux K activés par le Ca, ne passe pas par une diminution de la conductance de ce type de canaux (BENHAM et coll., 1985; VERGARA et LATORRE, 1983).

L'action du Ba^{2+} semble être un mode de blocage de type lent du fait de l'augmentation des temps passés par le canal dans l'état fermé (ou bloqué) et de la diminution du nombre de charges pouvant être transportées par unité de temps à un potentiel donné.

Si en première approximation, l'effet global de ces trois types d'inhibiteurs, la 4.A.P., le Cs et le Ba^{2+} conduit à une diminution nette de la P_o du canal, le mode d'inhibition fonctionnelle du canal de type I est différent pour chacun d'entre eux.

CONCLUSION

Il est possible de dégager quelques perspectives vers lesquelles pourrait être orientée une suite à donner à ce travail à partir des différentes conclusions, probablement temporaires, tirées des résultats présentés dans ce mémoire, et de différents travaux publiés récemment dans le domaine.

Plusieurs paramètres physico-chimiques, tels que les variations de pH, de la température, ou la neutralisation des charges de surface, pourraient être également testés pour mieux cerner le mode de fonctionnement de ces canaux.

Une autre approche, qui n'a pas du tout été abordée dans le cadre de ce mémoire, est l'analyse du signal en fréquence. Elle peut se faire sur le signal global enregistré en W.C.R., mais elle pourrait également être envisagée au niveau unitaire, du fait de la cinétique lente des canaux de type I, pendant les temps d'ouverture et de fermeture (SIGWORTH, 1985).

La composition en fréquence des différentes portions des signaux unitaires est certainement liée à des modes de vibration caractéristiques des protéines.

Quant à l'étude de l'influence des modifications des interactions protéines-lipides, elle peut être envisagée en essayant de modifier la composition des membranes biologiques. KIYOSUE et coll. (1984) ont

récemment montré une diminution importante de la conductance de ce type de canal après incorporation de lysophosphatidylcholine sans modification drastique de la cinétique du canal. Dans cette optique, la réincorporation des canaux à des bicouches lipidiques, planes, et si possible, asymétriques, constitue sans aucun doute, une voie d'avenir prometteuse.

D'un point de vue biochimique, il serait certainement pertinent d'étudier la dépendance de l'activité de ce type de canaux à différents facteurs métaboliques intracellulaires. Les nucléotides tris-phosphates sont déjà des agents mis en cause par les expériences de NOMA (1983), et celles de TRUBE et HESCHELER (1984).

Le marquage sélectif de certains types de résidus d'acides aminés, porteurs de groupements carboxyliques pourrait être une voie vers l'identification des AA ou des séquences d'AA, constituant les sites de reconnaissance aux ions K.

B I B L I O G R A P H I E

BIBLIOGRAPHIE

- ADRIAN, R. 1969. Rectification in muscle membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 19, 340-369.
- ALDRICH, R. et YELLEN, G. 1983. Analysis of non-stationary channel kinetics. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds): *Single channel recording*. Plenum Press, New York. Chap. 13.
- ARMSTRONG, C. 1969. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injected in squid axons. *J. Gen. Physiol.*, 54, 553-575.
- ARMSTRONG, C. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J. Gen. Physiol.*, 58, 413-437.
- ARMSTRONG, C. et TAYLOR, S. 1980. Block of the squid axon K^+ channels by internally and externally Ba^{2+} ions. *J. Gen. Physiol.*, 80, 663-682.
- ARMSTRONG, C., et TAYLOR, S. 1980. Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.*, 30, 373-488.
- AUERBACH, A. et SACHS, F. 1984. Patch clamp studies of single ionic channels. *Ann. Rev. Biophys. Bioengn.*, 13, 269-302.
- BARRETT, J. , MAGLEBY, K. et PALLOTA, B. 1982. Properties of single calcium activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.*, 331, 211-230.
- BARROS, F., KATZ, M., KACZOROWSKI, G. et collaborateurs. 1985. Calcium currents in GH_3 cultured pituitary cells under whole-cell voltage-clamp: inhibition by voltage-dependent potassium currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1108-1112.
- BAUMANN, G. et EASTON, G. 1982. Modelling state dependent sodium conductance data by a memoryless random process. *Mathem. Biosciences* 60, 265-276.
- BEAM, K., CALDWELL, J. et CAMPBELL, D. 1985. Na channels in skeletal muscle concentrated near the neuromuscular function. *Nature*, 313, 588-590.
- BECHEM, M., GLITSCH, H. et POTT, L. 1983. Properties of an inward rectifying K channel in the membrane of guinea pig atrial cardioballs. *Pflugers Arch.*, 399, 186-193.
- BEELEER, G. et McGUIGAN, T. 1978. Voltage clamping of multicellular cardiac preparations: capabilities and limitations of existing methods. *Prog. Biophys.*, 34, 219-254.

- BEELER, G. et REUTER, H. 1970a. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.*, 207, 165-190.
- BEELER, G. et REUTER, H. 1970b. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.*, 207, 191-209.
- BEELER, G. et REUTER, H. 1970c. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207, 211-229.
- BELL, J. et MILLER, C. 1984. Effects of phospholipid surface charge on ion conduction in the K^+ channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biophys.*, 45, 279.
- BENHAM, C., BOLTON, T., LANG, R. et TAKEWAKI, T. 1985. The mechanism of action of Ca^{2+} activated K channels in arterial and intestinal smooth muscle cell membranes. *Pflugers Arch.*, 403, 120-124.
- BERNSTEIN, J. 1902. Untersuchungen zur thermodynamik des bioelektrischen strome. Erster. Theirl. *Pflugers Arch.*, 82, 521-562.
- BERTELOOT, A. 1984. Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *B.B.A.*, 775, 129-140.
- BEZANILLA, F. et ARMSTRONG, C. 1971. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.*, 60, 588-608.
- BLATZ, A. 1984. Asymmetrical proton block of inward rectifier K channels in skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, 401, 402-407.
- BRENNECKE, R. et LINDEMANN, B. 1974. Design of fast voltage clamp for biological membrane using discontinuous feedback. *Rev. Sci. Instrument.* 45, 656-661.
- BRENNECKE, R. et LINDEMANN, B. 1974. Theory of membrane voltage clamp with discontinuous feedback through a pulsed current clamp. *Rev. Sci. Instrument.*, 45, 184-188.
- CACHELIN, A., DE PEYER, J., KOKUBUN, S. et REUTER, H. 1983. Sodium channels in cultured cardiac cells. *J. Physiol.*, 340, 389-401.
- CARMELIET, E. 1961. Chloride ions and the membrane potential of Purkinje fibres. *J. Physiol.*, 156, 375-388.
- CARMELIET, E. 1977. Repolarization and frequency in cardiac cells. *J. Physiol. (Paris)*, 73, 903-923.
- CARMELIET, E. et RAMON, J. 1980. Effect of acetylcholine on time independent current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Archiv.*, 387, 207-216.

- CARMELIET, E. 1982. Induction and removal of inward going rectification in sheep cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, 347, 285-308.
- CIANI, S., KRASNE, S., MIYAZAKI, S. et HAGIWARA, S. 1978. A model for anomalous rectification: electrochemical potential dependent gating of membrane channels. *J. Membr. Biol.*, 44, 103-134.
- CLAPHAM, D., DEFELICE, L. 1982. Small signal impedance of heart cell membranes. *J. Membr. Biol.*, 67, 63-71.
- CLAPHAM, D. et DEFELICE, L. 1984. Voltage activated K channels in embryonic chick heart. *Biophys. J.*, 45, 40.
- CLEEMANN, L. et MORAD, M. 1979. Potassium currents in frog ventricular muscle: evidence from voltage clamp currents and extracellular K accumulation. *J. Physiol.*, 286, 113-143.
- COLE, K. 1949. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archs. Sci. Physiol.*, 3, 253-258.
- COLQUHOUN, D. et HAWKES, A. 1983. The principles of the stochastic interpretation of ion channel mechanisms. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds): *Single-channel recording*. Plenum Press, New York. Chap. 9.
- COLQUHOUN, D., NEHER, E., REUTER, H. et STEWENS, C. 1981. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, 294, 752-754.
- COLQUHOUN, D. et SIGWORTH, F. 1983. Fitting and statistical analysis of single channel records. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds): *Single channel recording*. Plenum Press, New York, Chap. 11.
- COHEN, I., FALK, R. et MULRINE, N. 1983. Action of barium and rubidium on membrane currents in canine Purkinje fibers. *J. Physiol.*, 338, 589-612.
- COOK, D., IKEUCHI, M. et FUJIMOTO, W. 1984. Lowering of pH, inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311, 269.
- CONNOR, T. et STEVENS, C. 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol. (Lond.)* 213, 21-30 [5].
- CONTI, F. et NEHER, E. 1980. Single channel recording of K⁺ currents in squid axons. *Nature* 285, 140-143.
- CORABOEUF, E. et VASSORT, G. 1968. Effects of some inhibitors of ionic permeability on ventricular action potential and contraction of rat and guinea pig heart. *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 15(2), 40.

- CORONADO, R., LATORRE, R. et MAUTNER, H. 1984. Single potassium channels with delayed rectifier behavior from lobster axon membranes. *Biophys. J.*, 45(1), 289.
- COULOMBE, A. et DUCLOHIER, H. 1984. A large unit conductance channel permeable to chloride ions in cultured rat heart cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 350, 59.
- CULL-CANDY, S., MILEDI, R. et PARKER, I. 1980. Single glutamate activated channels recorded from locust muscle fibres with perfused patch clamp electrodes. *J. Physiol.*, 321, 195-210.
- CULL-CANDY, S. et PARKER, I. 1982. Rapid kinetics of single glutamate receptor channels. *Nature* 295, 410-412.
- CULL-CANDY, S. et PARKER, I. 1984. Experimental approaches used to examine single glutamate receptor ion channels in locust muscle fibers. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds): *Single channel recording*. Plenum Press, New York. Chap. 19.
- DANIELLI, J.F. et DAVSON, H. 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 4-495.
- DECK, K., KERN, R. et TRAUTWEIN, W. 1964. Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibres. *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, 280, 50-62.
- DECOURSEY, T., CHANDY, G., GUPTA, S. et CAHALAN, M. 1984. Voltage gated K^+ channel in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*, 307, 465-468.
- DEFELICE, L. et CLAY, J.R. 1983. Membrane current and membrane potential from single-channel kinetics. Dans E. Neher et B. Sakmann (eds): *Single Channel recording*. Chap. 15. Plenum Press, New York.
- DIFRANCESCO, D. et OJEDA, C. 1980. Properties of the pacemaker current, I_f , in the sinoatrial node of the rabbit, a comparison with IK_2 in Purkinje fibers. *J. Physiol.*, 308, 331-351.
- DIFRANCESCO, D. 1981. A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibers. *J. Physiol.*, 314, 359-376.
- DIONNE, V. et LEIBOWITZ, M. 1982. Acetylcholine receptor kinetics. A description from single channel currents at snake neuromuscular junctions. *Biophys. J.*, 39, 253-261.
- DUBOIS, J.M. 1981. Evidence for the existence of three types of potassium channels in frog Ranvier node membrane. *J. Physiol.*, 318, 297-316.
- EHRENSTEIN, G., BLUMENTAL, R., LATORRE, R. et LECAR, R. 1974. Kinetics of the opening and closing of individual excitability inducing material channels in a lipid bilayer. *J. Gen. Physiol.*, 63, 707-721.

- EISENMAN, G. et HORN, R. 1983. Ionic selectivity revisited: The role of kinetics and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J. Membr. Biol.*, 76, 197-225.
- EISENMAN, G. et SANDBLOM, J.P. 1984. Modeling the gramicidin channel. *Biophys. J.*, 45, 88-90.
- FERMINI, B., SCHANNE, O. et HUGON, J. 1985. Influence of explantation procedure on the electrical and morphological properties of cultured neonatal rat ventricle cells. Dans N.S. Dhalla, D.J. Hearse (eds): *Advances in Myocardiology*, Vol. 6. Plenum Publ. Corp., New York, pp. 25-36.
- FENWICK, E., MARTY, A. et NEHER, E. 1982a. A patch-clamp study of Bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.*, 331, 577-597.
- FENWICK, E., MARTY, A. et NEHER, E. 1982b. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, 331, 599-635.
- FINK, R. et WETTWER, . 1978. Modified K channel gating by exhaustion and the block by internally applied TEA and 4.A.P. in muscle. *Pflügers Archiv.*, 374, 289-292.
- FINKEL, A. et REDMAN, S. 1983. A shielded microelectrode suitable for single electrode voltage clamping. *J. Neurosci. Methods*, 9, 23-29.
- FISCHMEISTER, R., DEFELICE, L., AYER, R., LEVI, R. et DEHAAN, R. 1984. Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. *Biophys. J.*, 45, 134a.
- FRELAND, E. 1979. Theory of transport noise in membrane channel with open closed kinetics. *Biophys. Struct. Mechanism.*, 5, 91-106.
- FRELAND, E. 1980. Non equilibrium ion transport through pores. The influence of barrier structures on current fluctuation transient phenomena and admittance. *Biophys. Struct. Mechanism*, 7, 1-16.
- FUKUSHIMA, Y. 1981. Single channel potassium currents of the anomalous rectifier. *Nature* 294, 100.
- FUKUSHIMA, Y. 1982. Blocking kinetics of the anomalous potassium rectifier of tunicate egg studied by single channel recording. *J. Physiol.*, 331, 311-331.
- GAGE, P. et HAMILL, O. 1975. General anesthetics synaptic depression consistent with increased membrane fluidity. *Neuroscience Lett.*, 1, 61-65.
- GALVANI, A. 1752. *De Viribus Electricitatis. In: Motu Musculari Dissertatione et Notis.*

- GARNIER, D., NARJEOT, J., OJEDA, C. et ROUGIER, O. 1978. The action of acetylcholine on background conductance in frog atrial trabeculae. *J. Physiol. (Lond.)*, 274, 381-396.
- GAY, L. et STANFIELD, P. 1977. Cs causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal muscle fibers. *Nature*, 267, 169-170.
- GILBERT, S. et MIGEON, B. 1975. D-valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell*, 5, 11-17.
- GIRSCH, S. et PERACCHIA, C. 1985. Lens cell-to-cell channel protein: I. Self-assembly into liposomes and permeability regulation by calmodulin. *J. Membr. Biol.*, 83, 217-225.
- GIRSCH, S. et PERACCHIA, C. 1985. Lens cell-to-cell channel protein: II. Conformational change in the presence of calmodulin. *J. Membr. Biol.*, 83, 227-233.
- GLICK, M., BURNS, A. et REDDY, W. 1974. Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart. *Analyt. Biochem.*, 61, 32-42.
- HAGIWARA, S. et TAKAHASHI, K. 1974. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J. Membr. Biol.*, 18, 61-80.
- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S. et ROSENTHAL, N. 1976. Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membranes of a starfish. *J. Gen. Physiol.*, 67, 621-638.
- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., MOODY, W. et PATLAK, J. 1978. Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J. Physiol.*, 279, 167-185.
- HAGIWARA, S. et YOSHII, M. 1979. Effects of internal K and Na on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. *J. Physiol.*, 292, 251-265.
- HALL, J., VODYANOY, I., BALASUBRAMANIA, T. et MARHSALL, G. 1984. Model channels. Alamethicin. A rich model for channel behavior. *Biophys. J.*, 45, 233.
- HAMILL, O., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. et SIGWORTH, F.J. 1981. Improved patch clamp techniques high resolution currents recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv.*, 391, 85-100.
- HAMILL, O. et SAKMANN, B. 1981. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature*, 294, 402-404.
- HECKMANN, K. 1972. Single file diffusion. *Biomembranes*, 3, 127-133.

- HESCHELER, J., PELZER, D., TRUBE, G. et TRAUTWEIN, W. 1982. Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflugers Archiv.*, 393, 287-291.
- HEWETT, K., LEGATO, M., DANILLO, P. et ROBINSON, R. 1983. Isolated myocytes from adult canine left ventricle Ca^{2+} tolerance, electrophysiology and ultrastructure. *Amer. J. Physiol.*, 245, 830-839.
- HILLE, B. 1978. Ionic channels in excitable membranes (Current problems and biophysical approaches). *Biophys. J.*, 22, 283-294.
- HILLE, B. 1984. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer (ed.). Sunderland, Massachusetts.
- HILLE, B. et SCHWARZ, W. 1978. Potassium channel as multi ion single-file pores. *J. Gen. Physiol.*, 72, 409-442.
- HODGKIN, A. 1951. The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. *Biol. Rev.*, 26, 339-409.
- HODGKIN, A. et HUXLEY, A. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117, 500-544.
- HOFFMAN, J. 1966. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am. J. Med.*, 41, 666.
- HOL, W. 1985. The role of a helix dipole in protein function and structure. *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, 45, 149-196.
- HORN, R. et PATLAK, J. 1980. Single channel currents from excised patches muscles membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (11), 6930-6934.
- HUGUES, M., DUVAL, D., KITABGI, P., LAZDUNSKI, M. et VINCENT, J.P. 1982a. Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 257, 2762-2769 [5].
- HUGUES, M., ROMÉY, G., DUVAL, D., VINCENT, J.P. et LAZDUNSKI, M. 1982b. Apamin as a selective blocker of the calcium dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1308-1312 [5].
- INOUE, D., HACHISU, M., et PAPPANO, A. 1983. Acetylcholine increases resting membrane potassium conductance in atrial but not in ventricular muscle during muscarinic inhibition of Ca^{++} dependent action potentials in chick heart. *Circ. Res.*, 53, 158-167.
- JACKSON, M., WONG, B., MORRIS, C., LECAR, H. et CHRISTIAN, C. 1983. Successive openings of the same acetylcholine receptor channel are correlated in open time. *Biophys. J.*, 42, 109-114.

- JACKSON, M., STEPHENS, C.L. et LECAR, M. 1981. Single channel currents induced by complement in antibody-coated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (10), 6421-6425.
- JACOBSON, S. 1977. Culture of spontaneously contracting myocardial cell from adult rats. *Cell. Struct. Funct.*, 2, 1-9.
- JOHNSON, E., et LIEBERMAN, M. 1971. Heart excitation and contraction. *Am. Rev. Physiol.*, 33, 479-532.
- JONGSMA, H., GINNEKEN, A., et MEERWIJK, W. 1984. The membrane potential of single isolated cells. *Biophys. J.*, 45, 53A.
- JOSEPHSON, I. et BROWN, A. 1984. Conductance and kinetics of elementary inwardly rectifying K^+ currents in ventricular myocytes. *Biophys. J.*, 45, 50.
- JOSEPHSON, I., SANCHEZ-CHAPULA, J. et BROWN, A. 1984. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ. Res.*, 54, 157-162.
- JOSEPHSON, I., SANCHEZ-CHAPULA, J. et BROWN, A. 1984. A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ. Res.*, 54, 149-156.
- JUNGE, D. 1982. External K^+ ions increase rate of opening of outward current channels in snail neurons. *Pflugers Archiv.*, 394, 94-97.
- KATZ, B. 1949. Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.*, 3, 285-300.
- KENYON, J. et GIBBONS, W. 1977. Effects of low chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.*, 70, 635-660.
- KENYON, J. et GIBBONS, W. 1979. 4 amino pyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. 73, 139-157.
- KIYOSUE, T., AOMINE, M. et ARITA, M. 1984. Lysophosphatidylcholine decreases single channel conductance of inward rectifier K channel in mammalian ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 34, 361-373.
- LATORRE, R. et MILLER, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biol.*, 71, 11-30.
- LATORRE, R., VERGARA, C. et HIDALGO, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca-dependent K channel from transverse tubule membrane isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 49, 805-809.
- LANGENTHAL, I. 1982. Correlation and probability analysis. *Saico-Signals*, 1-14.

- LAÜGER, P. 1983. Conformational transition of ionic channels in single channel recording. In B. Sakmann and E. Neher (eds.). Plenum Press, New York. Chap. 10.
- LAZDUNSKI, M. et RENAUD, J.F. 1982. The action of cardiotoxins on cardiac plasma membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 44, 463-473.
- LEICHLITER, J., MOFFET, S. et GRUENER, R. 1984. Effects of halotane on the acetylcholine receptor channel in cultured *Xenopus* myocytes. *Biophys. J.*, 45, 15.
- LEE, K., AKAIKE, N., et BROWN, A. 1978. Properties of internally perfused, voltage-clamped, isolated nerve cell bodies. *J. Gen. Physiol.*, 71, 489-509, 1978.
- LEECH, C. et STANFIELD, P. 1981. Inward rectification in frog skeletal muscle fibres and its dependence on membrane potentials and external potassium. *J. Physiol.*, 319, 295-209.
- LENFANT, J., MIRONNEAU, J. et AKA, J. 1972. Activité de la fibre sino-auriculaire de grenouille: analyse des courants membranaires responsables de l'automatisme cardiaque. *J. Physiol. Paris*, 64, 5-18.
- LIEBOVITCH, L. et FISCHBARG, J. 1983. Determining the kinetics of membrane force from patch clamp data without measuring the open and closed times. *B.B.A.* 813, 132-136.
- LINEWEAVER, H. et BURK, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658.
- McALLISTER, H. et NOBLE, D. 1966. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.*, 186, 632-662.
- MAGLEBY, K. et PALLOTA, B. 1983. Burst kinetics of single calcium-activated potassium channel in cultured rat muscle. *J. Physiol.*, 344, 605-623.
- MAGLEBY, K. et PALLOTA, B. 1983. Calcium dependence of open and shut interval distributions from calcium activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.*, 344, 585-604.
- MARCHAIS, D. et MARTY, A. 1979. Interaction of permanent ions with channels activated by acetylcholine in *Aphysia* neurones. *J. Physiol.*, 297, 9-45.
- MARMONT, G. 1949. Studies on the axon membrane, a new method. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 34, 351-382.
- MARTY, A. 1981. Ca dependent K channel with large unitary conductions in chromaffin cell membranes. *Nature*, 291, 497-500.

- MARTY, A., TAN, Y. et TRAUTMANN, A. 1984. Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *J. Physiol.*, 357, 293-325.
- MASSON-PEVET, M., JONGSMA, M. et DE BRUIJNE, J. 1976. Collagenase and trypsin dissociated heart cells. A comparative ultrastructural study. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 8, 747-757.
- MATTESON, D. et DEUTSCH, C. 1983. K. channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature*, 307, 468-471.
- MAZET, J., ANDERSEN, O. et KOEPP, R. 1984. Single-channel studies on linear gramicidins with altered amino acid sequences. A comparison of phenylalanine, tryptophane, and tyroxine substitutions at positions 1 and 11. *Biophys. J.*, 45, 263.
- MEECH, R. et STANDEN, N. 1975. Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: A component mediated by calcium influx. *J. Physiol. (Lond.)*, 249, 211-239 [5].
- METHFESSEL, C. et BOHEIN, G. 1982. The gating of single calcium dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanisms. *Biophys. Struct. Mech.*, 9, 35-60.
- MIRONNEAU, J. et LENFANT, J. 1971. Analyse des réponses électriques de la fibre musculaire d'utérus de rate: mise en évidence d'un courant lent calcico-sodique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 272, 436-439.
- MITCHELL, M., POWELL, T., TERRAR, D. et TWIST, V. 1983. Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc. Roy. Soc. (Lond.)* 219, 447-449.
- MOHAMED, S., HOLMES, R. et HARTZELL, C. 1983. A serum-free chemically defined medium for function and growth of primary neonatal rat heart cell cultures. *In Vitro* 19 (6), 471-478.
- MOMOSE, Y., GILES, W. et SZABO, G. 1984. Acetylcholine-induced K^+ current in amphibian atrial cells. *Biophys. J.*, 45, 2022.
- MONTAL, M., LABARCA, P., FREDKIN, D., SUAREZ-ISLA, B. et LINDSTROM, J. 1984. Channel properties of the purified acetylcholine receptors from *Torpedo Californica* reconstituted in planar lipid bilayers membranes. *Biophys. J.*, 45, 165.
- MULLINS, L. 1959. The penetration of some cations into muscle. *J. Gen. Physiol.*, 42, 817-829.
- MURPHY, E., AITON, J., HORRES, R. et LIEBERMAN, M. 1983. Calcium elevation in cultured heart cells: its role in cell injury. *Am. J. Physiol.*, 245 (Cell Physiol.), C316-C321.

- NEHER, E. et SAKMANN, B. 1976. Single channel currents recorded from membrane of denervated muscle fibres. *Nature*, 260, 779-802.
- NEHER, E., SAKMANN, B. et STEINBACH, C. 1978. The extracellular patch clamp. A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv.*, 375, 219-228.
- NEHER, E. et STEVENS, C. 1977. Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioengn.*, 6, 345-381.
- NEHER, E. et STEINBACH, C. 1978. Local anesthetics transiently block currents through single acetylcholine receptor channels. *J. Physiol. (Lond.)*, 277, 153-176.
- NEHER, E. 1983. The charge carried by single-channel currents of rat cultured muscle in presence of local anesthetics. *J. Physiol.*, 339, 663-678.
- NOBLE, D. 1979. *The initiation of the heartbeat*. Clarendon Press, Oxford.
- NOMA, A. et IRISAWA, H. 1976a. Membrane currents in rabbit sino-atrial node cells as studied by the double microelectrode methods. *Pflügers Archiv.*, 364, 45-52.
- NOMA, A. et IRISAWA, H. 1976b. A time and voltage-dependent potassium current in the rabbit sino-atrial node cell. *Pflügers Archiv.* 366, 251-258.
- NOMA, A. 1983. ATP regulated K channel on cardiac muscle. *Nature*, 305, 147.
- OHMORI, H. 1978. Inactivation kinetics and steady-state current noise in anomalous rectifier of tunicate egg cell membrane. *J. Physiol.*, 281, 77-99.
- OHMORI, H., YOSHIDA, S. et HAGIWARA, S. 1981. Single K⁺ channel currents of anomalous rectification in cultured rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4960-4964.
- OHMORI, H. 1984. Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. *J. Physiol.* 350, 561-581.
- PAPPONE, P. et CAHALAN, M. 1985. Chemical modification of potassium channels in myelinated nerve fibers TMBS or high pH causes resistance to block by 4.A.P. *Biophys. J.*, 45, 62-64.
- PALLOTA, B., MAGLEBY, K. et BARRETT, J. 1981. Single channel recording of Ca²⁺ activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature*, 293, 471-474.

- PATLAK, J. et ORTIZ, M. 1985. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J. Gen. Physiol.*, 86, 89-104.
- PAULING, L. 1960. Nature of the chemical bond and structure of molecules and crystals. 3rd Ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 7, 664.
- PAYET, M.D., BKAILY, G., SCHANNE, O. et RUIZ-CERETTI, E. 1980. Influence of streptomycin on spontaneous activity of clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 58, 433-435.
- PAYET, M.D., SCHANNE, O., RUIZ-CERETTI, E. et DEMERS, J.M. 1978. Slow inward and outward currents of rat ventricular. *J. Physiol. (Paris)*, 74, 31-35.
- PAYET, M.D., ROUSSEAU, E. et SAUVE, R. 1985. Single channel analysis of a potassium inward rectifier in myocytes of newborn rat. *J. Membr. Biol.*, 86, 79-88.
- POWELL, T., TERRAR, D. et TWIST, V. 1982. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J. Physiol. (Lond.)*, 302, 131-153.
- RAMACHADRAN, J., RAO, A. et LILES, S. 1977. Studies of the trophic action of ACTH. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 287, 336-348.
- REUTER, H., STEVENS, C., TSIEN, R. et YELLEN, G. 1982. Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature*, 297, 501-504.
- REUTER, H. 1984. Ionic channels in cardiac cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 46, 473-484.
- RINGER, S. 1983. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on contraction of the heart. *J. Physiol.*, 4, 29-42.
- ROUGIER, O., GARNIER, D., GARGOUIL, Y. et CORABOEUF, E. 1969. Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Archiv.*, 308, 91-110.
- ROUSSEAU, E. 1984. "Patch clamp", l'aube d'une technologie nouvelle pour l'étude des canaux ioniques unitaires. Vidéo - Université de Sherbrooke.
- ROUSSEAU, E., PAYET, M.D. et SAUVE, R. 1984. Single K^+ channels behaviour during voltage steps. *Biophys. J.*, 45, 306a.
- ROUX, B. 1984. Méthode générale d'analyse des signaux de "patch clamp". Thèse de maîtrise de physique, Université de Montréal.

- ROUX, B. et SAUVE, R. 1985. A general solution to the time interval omission problem applied to single channel analysis. *Biophys. J.*, 48, 149.
- SACHS, F. 1976. Electrophysiological properties of tissue cultured heart cells grown in a linear array. *J. Membr. Biol.*, 28, 373-399.
- SACHS, F., NEIL, J. et BARKAKATI, N. 1982. The automated analysis of data from single ionic channels. *Pflugers Archiv.*, 395, 331-340.
- SACHS, F. 1983. Is the acetylcholine receptor a unit-conductance channel? In B. Sakmann et E. Neher (eds.): *Single channel recording*. Chap. 17. Plenum Press, New York.
- SACHS, F. 1983. Automated analysis of single-channel records. In B. Sakmann and E. Neher (eds.): *Single channel recording*. Plenum Press, New York. Chap. 12.
- SAKMANN, B., PATLAK, J. et NEHER, E. 1980. Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentration of agonist. *Nature* 286, 71-77.
- SAKMANN, B., NOMA, A. et TRAUTWEIN, W. 1983. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of mammalian hearts. *Nature (Lond.)*, 303, 250-253.
- SAKMANN, B. et TRUBE, G. 1984a. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.*, 347, 641-657.
- SAKMANN, B. et TRUBE, G. 1984b. Voltage-dependent inactivation of inward rectifying single-channel current in the guinea pig heart cell membrane. *J. Physiol.*, 347, 659-683.
- SAUVE, R., BEDFER, G. et ROY, G. 1984. Single Ca^{++} dependent K^+ currents in HeLa cancer cells. *Biophys. J.*, 45, 66.
- SAUVE, R., ROY, G., et PAYET, M.D. 1983. Single channel K^+ currents from HeLa cells. *J. Membr. Biol.*, 74, 41-49.
- SAUVE, R., SIMONNEAU, C., BEDFER, G. et ROY, G. 1985. Single-channel analysis of the K^+ permeability in HeLa cancer cells. *J. Membr. Biol.* (Soumis).
- SCHANNE, O., ST-VINCENT, M. et BKAILY, G. 1983. Electrogenesis of freshly explanted spontaneously active clusters of neonatal rat ventricle cells. *Rev. Can. Biol.*, 42, 199-202.
- SCHROEDER, J., HEDRICH, R. et FERNANDEZ, J. 1984. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 312, 361-362.

- SHRIER, A., et CLAY, J. 1982. Comparison to the pacemaker properties of chick embryonic atrial and ventricular heart cells. *J. Membr. Biol.*, 69, 4956.
- SINGER, S. et NICOLSON, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720.
- SIGWORTH, F.J. et NEHER, E. 1980. Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature*, 287, 447-449.
- SIGWORTH, F.J. 1985. Open channel noise. *Biophys. J.* 47, 709-720.
- SPERELAKIS, N. 1978. Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology environment. *Health Perspect.*, 26, 243-267.
- SPERELAKIS, N. 1982. Cultured heart cell reaggregate model for studying problems in cardiac toxicology. *Cardiovasc. Toxicol.*, 1, 57-108.
- STAMPFLI, P. 1954. A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. *Experientia*, 10, 508-509.
- STANDEN, N. et STANFIELD, P. 1978. A potential and time dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle by barium and strontium ions. *J. Physiol. (Lond.)* 280, 169-191.
- STEFANI, E. et CHIARANDINI, D. 1982. Ionic channel in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 44, 357-372.
- STEWENS, C. 1972. Inferences about membrane properties from electrical noise measurements. *Biophys. J.*, 12, 1028-1047.
- STUHMER, W., ROBERT, W. et ALMER, W. 1983. The loose patch clamp single channel recording. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds), Plenum Press, New York. Chap. 8.
- SWENSON, R. et ARMSTRONG, C. 1981. K channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺. *Nature*, 291, 427-429.
- SZABO, G. 1981. Structural aspects of ionophore function. *Fed. Proc.*, 40, 2196-2201.
- TANIGUCHI, J. et NAKAMURA, J. 1984. Transient kinetics of an inward rectifier K⁺ channel in the myocardial cell membrane. *Jap. J. Physiol.*, 34, 1123-1127.
- TANK, D., MILLER, C. et WEBB, W. 1982. Isolated patch recording from lysosomes containing junctionally reconstituted chloride channel from *Torpedo* electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7749-7753.
- TAUPIGNON, A., SAUVIGNON, M. et LENFANT, J. 1983. The effect of external potassium on the blockage of the inward going rectification by cesium ions in frog atrial trabeculae. *J. Physiol. (Paris)* 78, 803-808.

- THOMPSON, S. 1977. Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol.*, 265, 465-488.
- TRAUTMANN, A. (1982). Curare can open and block ionic channels associated with cholinergic receptors. *Nature*, 298, 272-275.
- TRAUTMANN, A. et SIEGELBAUMS, A. 1983. The influence of membrane patch isolated on single acetylcholine-channel current in rat myotubes. Dans B. Sakmann et E. Neher (eds.): *Single channel recording*, Chap. 25, Plenum Press, New York.
- TRUBE, G. et HESCHELER, J. 1984. Inward rectifying channel in isolated patches of heart cell membrane ATP dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Archiv.*, 401, 178-184.
- ULBRICHT, W. et WAGNER, H. 1976. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4 A.P. and its partial removal on depolarization. *Pflugers Archiv.*, 367, 77-87.
- VITALY, V. et RANDALL, M. 1983. Single channel fluctuation in biomolecular lipid membranes induced by rat refractory epithelia homogenates. *Science* 200, 717-719.
- VERGARA, C. et LATORRE, R. 1983. Kinetics of Ca^{2+} activated K channel from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. *J. Gen. Physiol.*, 82, 543-568.
- VERGARA, C., MOCZYDLOWSKI, E. et LATORRE, R. 1984. Conduction, blockade and gating in a Ca^{+} activated K^{+} channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biophys. J.*, 45, 73-76.
- WEIDMAN, S. 1956. *Elektrophysiologie der herz muskel faser*. Ed. Huber, Bern.
- YELLEN, G. 1982. Single Ca^{2+} activated non selective cation channels in neuroblastoma. *Nature*, 296, 357-359.
- YOUNG, J., UNKELESS, J., YOUNGTSEN, M., MAURO, A. et COHN, Z. 1983. Role for mouse macrophage IgG Fc receptor as ligand-dependent ion channel. *Nature*, 306, 186-189.
- YPEY, D. et CLAPHAM, D. 1984. Development of a delayed outward-rectifying K^{+} conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3083-3087.

ADDENDUM

- LEBRUN, P., ATWATER, I., CLARET, M., MALAISSE, W. et HERCHUELZ, A. 1983. Resistance to apamin of Ca^{++} activated K^{+} permeability in pancreatic Beta cells. *FEBS* 161, 41-44.

ANNEXE 1

MODEL 8900 PATCH CLAMP/WHOLE CELL CLAMP

Quick Reference

| | |
|--------------------|---|
| OFF | Turns off power to monitor only |
| I _{OUT} * | Voltage proportional to pipette current (± 1999 mV range) scaling is a function of probe and GAIN. |
| V _{HLD} | Holding potential scaled up by +10 (inside-out). (A reading of +1999 equals +199.9 mV holding potential at the cell) |
| V _{REF} | Bath Reference Input voltage, scaled up by +100 (a reading of +1999 equals +19.99 mV) |
| V _{COM} * | Command Input Voltage before scaling down (± 1999 mV range) |
| V _{TOT} * | Sum of all command and correction potentials scaled up by -10 (inside-out) or +10 (outside-out). (A reading of -1999 equals +199.9 mV of command) |
| V _{MEM} * | Membrane potential in current clamp mode, scaled up by -10 (outside-out). (A reading of -1999 equals +199.9 mV membrane potential) |

* Same signal as seen at BNC connector with same name.

INPUT/OUTPUT MONITOR

| | |
|---------------------|--|
| GAIN | (10, 20, 50, 100, 500, 1000 mV/pA ranges) Selects scaling of the current OUTPUT (I _{OUT}) (calibrated for the 8930 probe). |
| FILTER | (1 kHz, 10 kHz, and WideBand ranges) Selects the cutoff frequency of the internal filter for the I _{OUT} signal. |
| I _{OUT} | A voltage proportional to pipette current scaled by the GAIN switch and filtered at a frequency selected by the FILTER switch. |
| TRAN IN | Transient subtraction input (before GAIN amplification) |
| -10V _{TOT} | The sum of all command and correction potentials scaled up by -10. Useful for monitoring drift in junction or bath reference potentials. |

OUTPUT

| | |
|------------------------|--|
| SERIES RESISTANCE Dial | (0 to 100 megohms) Corrects for the voltage drop caused by the current flow throughout the pipette resistance. |
| DYNAMIC | A separate phase control to decrease settling time. |

SERIES RESISTANCE



DAGAN CORPORATION
 2855 Park Avenue
 Minneapolis, MN 55407-1305
 (612) 827-5959

ANNEXE 1 (suite)

COMMAND INPUT (COMMD) This is the command input for both voltage clamp and current clamp modes of operation. In the voltage clamp mode, the input is scaled by negative 0.1 or negative 0.05 depending on the V_{COM} switch position before it is applied to the pipette (i.e., -1.00 volt at INPUT equals +100 mV or +50 mV at pipette relative to bath). In the current clamp mode, a command of positive 1 mV will correspond to a clamp current of positive 1 pA with the switch in the 10:1 position (i.e., +10 mV at INPUT equals +10 pA or +5 pA).

+200 mV HOLDING POTENTIAL This control and switch allows setting and previewing the pipette holding potential (up to +200 mV in the voltage clamp mode) and the holding current (up to +2000 pA in the current clamp mode).

VTEST A separate command input with 10,000:1 scaling (-10 volts equals +1 mV in voltage clamp; +10 volts equals +10 pA in current clamp.) Used for external test pulse input.

TEST PULSE Internal test pulse generator. Use 0.2 mV (LOW) for watching seal formation and 20 mV (HIGH) for measuring the seal resistance and for nulling the capacity transient.

$$R = \frac{\text{VOLTAGE}}{\text{CURRENT}}$$

| CURRENT at I_{OUT} | RESISTANCE | |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| | LOW TEST (0.2 mV) | HIGH TEST (20 mV) |
| 100 pA | 2 Meg | 200 Meg |
| 50 pA | 4 Meg | 400 Meg |
| 20 pA | 10 Meg | 1.0 Gig |
| 10 pA | 20 Meg | 2.0 Gig |
| 5 pA | 40 Meg | 4.0 Gig |
| 2 pA | 100 Meg | 10 Gig |
| 1 pA | 200 Meg | 20 Gig |
| 0.5 pA | 400 Meg | 40 Gig |

SPEED TEST Used to trim frequency response of probes. Input a 100 Hz triangle wave.

————— **COMMD-HOLDING POTENTIAL-TEST** —————

JUNCTION Used to null junction potentials between bath ground and bath and between pipette holder electrode and pipette internal solution. Do before formation of a seal with the pipette tip in the bath. Adjust to bring I_{OUT} to zero.

AUTO SEARCH Same function as JUNCTION above, but does this automatically when the push button is depressed. This potential is held until the ON/OFF switch below the push button is turned OFF which resets it to zero.

————— **ZERO** —————

ANNEXE 1 (suite)

ON/OFF Turning off the High Frequency Boost is useful in compensating the capacitance as it produces a slower, more visible current.

HIGH FREQUENCY BOOST

VOLTAGE CLAMP/CURRENT This switch selects either the voltage clamp mode (probe monitors currents) or the current clamp mode (probe monitors cell voltages).

$10 V_{MEM}$ This is the potential inside the pipette, scaled up by a factor of -10 when in the current clamp mode.

MODE

These controls are used to null the capacitive current that flows when the command voltage is stepped. (It is important to reduce pipette capacitance by syringing pipettes.) The FAST controls (Magnitude and Time constant) are intended to cancel the pipette capacitance (0 to 5 usec time constant). The MEDIUM and SLOW controls are intended to cancel slower capacity current components associated with a water film on the pipette. (Medium = 0 to 2 msec; Slow = 0 to 10 msec) Start out with all three MAG (magnitude) controls at minimum and the T (time constant) controls at mid range. After seal is achieved, but before rupturing cell, with GAIN at 100 or lower and TEST PULSE at HIGH (20 mV), adjust FAST MAG to eliminate fast component. Adjust MEDIUM MAG and T to eliminate slower components. Finally (but rarely needed), adjust SLOW MAG and T. Then go back and adjust FAST T to eliminate biphasic transient.

CAPACITY COMPENSATION

PROBE SELECT SWITCH Set the switch to the corresponding probe used (10G - 8930 probe, 1G - 8920 probe, 0.1G - 8910 probe).

GROUNDING AMP/LINE With the strap in place, the power line ground and cabinet ground (LINE) are connected the circuit (AMP) ground. If ground loop develops, remove this strap; circuit ground is now floating with respect to power or room ground. You should then establish the ground at a piece of equipment other than the 8900.

BATH REF Use with 8950 BATH REFERENCE AMPLIFIER to null out changes in bath potential when solutions are changed or if not using a good bath ground connection.

PROBES

PROBE SETUP Probe case is a driven shield and must not be grounded. Insulated screw on back of probe is electrical GROUND. Use the AMP 5-way binding post on the front panel to ground the Faraday cage and the microscope. Poor grounding increases noise.

Be sure all parts of microscope are electrically continuous and not floating. Also shield power cable to microscope lamp.

ANNEXE 1 (suite)

BATH ELECTRODE Connect a silver-silver chloride pellet or wire to the GROUND screw on the probe. For solutions without chloride, use an agar bridge.

BATH REFERENCE AMPLIFIER Connect a 3M KCl microelectrode to the input, and connect the BATH GROUND pin to the GROUND screw on the probe.

8900 MEMBRANE POLARITY CONVENTIONS Signal polarities are correct for cell-attached and inside-out patches. That is, using the electrophysiology convention that "currents going outward through the membrane are positive", an outward current results in a positive voltage at the I_{OUT} connector.

For whole cell recording and outside-out patch, the cytoplasmic membrane surface faces the pipette and, thus, by the "outward current is positive" convention, outward currents in these two configurations result in negative voltages at the I_{OUT} connector.

| Configuration | Description | Outward Membrane Current | Membrane Voltage |
|---|----------------------|---|--|
|  | Cell attached patch | + at Current Monitor I _{OUT} connector | equal to Command Voltage; ± 10 or 20 |
|  | Inside-out patch | + at Current Monitor I _{OUT} connector | equal to Command Voltage; ± 10 or 20 |
|  | Whole Cell recording | - at Current Monitor I _{OUT} connector | equal to - Command Voltage; ± 10 or 20 *(In Current Clamp, scaled up by - 10 at 10V _{MEM} connector) |
|  | Outside-out patch | - at Current Monitor I _{OUT} connector | equal to - Command Voltage; ± 10 or 20 |

* Note that Current Clamp is only used with whole cell clamp

Citation

"Le Ph.D.? C'est un nouveau groupe sanguin ça!

Ghyslaine

20 avril 1985