

N° D'ORDRE : 628

# THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

Diplôme National : Arrêté du 30 mars 1992

Spécialité : BIOMEMBRANES

(Option : Electrophysiologie et pharmacologie cellulaires)

présentée par

**Aklesso Piwelong MOUZOU**

Mise en évidence de l'intervention de protéines G dans les mécanismes de régulation du couplage excitation-contraction du muscle squelettique de batracien.

Directeur de thèse : Guy RAYMOND

Soutenue le 13 Juillet 1993, devant la Commission d'Examen

*JURY :*

M. J. LENFANT	Professeur, Université de Poitiers	Président
M. C. LEOTY	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. O. ROUGIER	Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur
M. G. RAYMOND	Directeur de Recherche CNRS, Université de Poitiers	Examineur
M. R. TRICOCHÉ,	Professeur, Université de Poitiers	Examineur

N° D'ORDRE : 628

# THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS**

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

Diplôme National : Arrêté du 30 mars 1992

**Spécialité : BIOMEMBRANES**

(Option : Electrophysiologie et pharmacologie cellulaires)

présentée par

**Aklesso Piwelong MOUZOU**

Mise en évidence de l'intervention de protéines G dans les mécanismes de régulation du couplage excitation-contraction du muscle squelettique de batracien.

Directeur de thèse : Guy RAYMOND

Soutenue le 13 Juillet 1993, devant la Commission d'Examen

*JURY :*

M. J. LENFANT	Professeur, Université de Poitiers	Président
M. C. LEOTY	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. O. ROUGIER	Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur
M. G. RAYMOND	Directeur de Recherche CNRS, Université de Poitiers	Examineur
M. R. TRICOCHÉ,	Professeur, Université de Poitiers	Examineur



Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Générale (URA CNRS 290), dirigé par Monsieur le Professeur **Jacques LENFANT** à qui je voudrais exprimer toute mon estime et toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour bien avoir voulu juger ce travail. Il m'a toujours rendu service de façon spontanée chaque fois que j'ai eu recours à sa compétence et à ses conseils.

La direction scientifique de ce travail a été assurée par le Docteur **Guy RAYMOND** Directeur de Recherche CNRS à qui je dois l'essentiel de ma formation. Sa rigueur scientifique m'a beaucoup appris et j'espère en jouir un jour. A côté de ce simple merci traditionnel, j'espère, dans l'avenir, avoir les moyens pouvant me permettre de lui exprimer toute ma vive reconnaissance.

Je remercie Messieurs, le Professeur **Claude LEOTY** de l'Université de Nantes, le Professeur **Oger ROUGIER** de l'Université Lyon I, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur **Robert TRICOCHÉ** pour avoir accepté de juger ce travail et également pour toute sa disponibilité permanente depuis mon arrivée en France. Je n'oublierai pas notre première rencontre (le 9 Novembre 1988) au cours de laquelle il m'avait déjà donné des conseils sur certaines difficultés éventuelles. Je m'en suis bien servi et une fois encore merci.

Je remercie les Docteurs, **Patrick BOIS** (le Bon sorcier), **Christian COGNARD** (dont j'admire la simplicité), **Daniel POTREAU** (qui m'a toujours servi chaque fois que je m'adresse à lui) et **Hélène SOUSTRE** pour leur disponibilité et leur aide.

Merci à Madame **J. BEAULIEU** pour ses multiples services.

Merci à Monsieur **J. ALIX** pour son entière disponibilité. Merci également à toute l'équipe technique pour son aide constante.

Merci à Madame et Monsieur **BEAUDIN**, Mesdames **C. BEZAGU**, **C. JOUGLA** pour leur disponibilité permanente.

Merci à **Bruno BASTIDE**, **Jocely BESCOND**, **Alexandre BOURON**, **Jean-Eric BRANKA**, **Laurence BULTEAU**, **Bruno CONSTANTIN**, **Nathalie DELPECH**, **Chantal GAUTHIER**, **Jean-Pierre GOMEZ**, **Nathalie IMBERT**, **Mohammad NASRI-SEBDANI**, **Jérôme PETIT-JACQUES**, **Michèle RIVET-BASTIDE** pour leur amitié et leur aide.

J'adresse mes remerciements au Ministère de l'Education Nationale du TOGO pour m'avoir accordé la bourse d'études pendant tout mon séjour en FRANCE.

à la mémoire de mon père  
à ma mère  
à mes frères  
à mes soeurs



## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
HISTORIQUE	3
CHAPITRE 1: ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE	3
A - LES SYSTEMES MEMBRANAIRES	3
I - La membrane de surface (sarcolemme)	3
II - Le système tubulaire transverse (tubule-T)	4
III - Le réticulum sarcoplasmique	4
IV - La triade	4
B - ORGANISATION DE L'APPAREIL CONTRACTILE	7
I - Structure des myofibrilles	7
II - Structure des myofilaments	8
CHAPITRE 2 : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	10
A - LES RECEPTEURS AUX DIHYDROPYRIDINES ET LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	12
I - Les récepteurs aux DHPs sont des canaux calciques	12
1 - Structure des récepteurs aux DHPs	12
2 - Rôle des canaux calciques L dans le couplage excitation-contraction	13
II - Les récepteurs aux DHPs constituent le "voltage sensor", du couplage excitation-contraction	15
1 - Effets des ions sur le "voltage sensor"	15
a - Le calcium extracellulaire	15
b - Effets des autres ions métalliques	16
c - Effets des anions	18
2 - Pharmacologie du "voltage sensor"	18
a - Les antagonistes calciques	18
b - Les agonistes calciques	19
c - Autres agents utilisés dans la pharmacologie du "voltage sensor"	21
3 - Modulation du "voltage sensor"	23
III - Les récepteurs DHPs ont-ils un double rôle dans le mécanisme de couplage excitation-contraction?	23
B - LES MOUVEMENTS DE CHARGE ET LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	26
I - Origine des mouvements de charge	26
II - Les différents types de mouvement de charge	26
1 - La charge 1	26
2 - La charge 2	28
3 - Interconversion charge 1/charge 2	30
4 - Le rôle des mouvements de charge dans le couplage excitation-contraction	30
C - HYPOTHESE DE COUPLAGE MECANIQUE	32
D - HYPOTHESE DE COUPLAGE BIOCHIMIQUE	34
E - AUTRES MECANISMES IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	36
I - mécanisme de "calcium induced calcium release" (CICR)	36
II - Mécanisme de "sodium induced calcium release"	37
III - L'échangeur Na/Ca	39
F - RESUME DES DIFFERENTS MECANISMES DE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	41
CHAPITRE 3 : LES PROTEINES MEMBRANAIRES LIANT LE GTP (LES PROTEINES G)	43

A - LES DIFFERENTS TYPES DE PROTEINES G	43
I - Les protéines G trimériques et leurs effecteurs	43
1 - La protéine Gs	45
2 - La protéine Gi	45
3 - La protéine Go	46
4 - La protéine Gp	46
5 - La transducine (Gt)	46
6 - Autres protéines G trimériques	49
II - Les protéines G monomériques	49
B - TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES PROTEINES G	52
I - Mécanisme général de transduction du signal	52
II - Les outils pharmacologiques utilisés dans l'étude des mécanismes de transduction du signal par les protéines G	53
1 - Les toxines	53
a - La toxine pertussique (PTX)	53
b - La toxine cholérique (CTX)	54
2 - Les analogues non hydrolysables du GTP	54
3 - Autres outils utilisés dans l'étude des mécanismes de transduction du signal par les protéines G	56
C - LES PROTEINES G DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE	58
D - INTERVENTION DES PROTEINES G DANS CERTAINES MALADIES	61
MATERIEL ET METHODE	62
A - LE MATERIEL BIOLOGIQUE	62
B - ENREGISTREMENT DES VARIATIONS DE POTENTIEL ET DE COURANT	62
I - Introduction	62
II - Principe de la méthode	62
III - La double séparation de mannitol	63
1 - La cuve expérimentale	63
2 - L'électrode au calomel	63
IV - Description du dispositif électronique	66
V - Les dispositifs annexes au circuit électronique	68
1 - Le générateur de tension	68
2 - L'oscilloscope	68
3 - Le système informatique	68
C - LES LIMITES DE LA TECHNIQUE	69
I - Les limites liées à la double séparation de mannitol	69
II - Les limites liées au circuit électronique	69
1 - Les propriétés de câble de la préparation	69
2 - Le potentiel imposé au niveau des tubules	69
3 - La résistance série	70
III - Limites liées aux préparations	70
D - ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE MECANIQUE	71
E - CONDITIONS EXPERIMENTALES	71
F - LES SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES	72
G - LES OUTILS UTILISES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL	74
RESULTATS	75
CHAPITRE 1 - LES EFFETS DE PTX SUR LA CONTRACTION DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE	75
A - EFFETS DE PTX SUR LES COURANTS SODIQUES ET CALCIQUE	75
B - LES EFFETS DE PTX SUR LA COMPOSANTE PHASIQUE DE LA CONTRACTION	77
I - Après blocage des canaux calciques	77
II - Les effets de PTX en Ringer normal contenant la forskoline	79
C - EFFETS DE PTX SUR LA COMPOSANTE TONIQUE DE LA CONTRACTION	83



I - En Ringer normal	83
II - Après blocage du courant calcique	83
III - En Ringer normal contenant la forskoline	85
D - EFFETS DE PTX SUR LA CONTRACTION PAR APPLICATION INTRACELLULAIRE	87
E - EFFETS DE PTX SUR L'INACTIVATION POTENTIEL-DEPENDANTE	
DE LA CONTRACTION	90
I - Effets de PTX sur l'inactivation de la contraction à HP de -90 mV	90
1 - Concentration calcique normale	90
2 - Concentration calcique élevée	91
II - Effets sur l'inactivation de la contraction à HP de -130 mV	97
1 - En CaCl <sub>2</sub> normal	97
2 - En CaCl <sub>2</sub> élevé	97
F - LES EFFETS DE PTX SUR LES MOUVEMENTS DE CHARGE ET LA CONTRACTION	100
CHAPITRE 2 : EFFETS DES ANALOGUES NON HYDROLYSABLES DU GTP	
ET DU GDP SUR L'ACTIVITE CONTRACTILE DU MUSCLE SQUELETTIQUE	105
A - LES EFFETS DU GTP $\gamma$ S	105
B - LES EFFETS DU GDP $\beta$ S	109
CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DE LA PROTEINE G IMPLIQUEE	
DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE CONTRACTILE	
DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE GRENOUILLE	111
A - LES EFFETS DU CHLORURE DE BENZALKONIUM (BAC)	111
I - Effets du chlorure de benzalkonium sur le courant sodique et calcique	111
II - Effets du chlorure de benzalkonium sur l'activité contractile en Ringer normal	113
III - Effets du chlorure de benzalkonium sur la composante phasique de la contraction	113
IV - Effets du chlorure de benzalkonium sur la contraction tonique de la contraction	115
B - EFFETS DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA SOUS-UNITE ALPHA	
DES PROTEINES Gi ET Go	120
I - L'anticorps anti $\alpha_{o1}$ , $\alpha_{o2}$	120
II - L'anticorps anti $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$	122
III - Les effets de l'anticorps anti $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ sur la contraction	
phasique de la contraction en présence de PTX	122
CHAPITRE 4 : INTERVENTION DE LA PROTEINE Gs DANS L'ACTIVITE CONTRACTILE	127
A - LES EFFETS DE CTX	127
I - Sur la composante phasique de la contraction	127
II - Sur la composante tonique de la contraction	129
1 - En Ringer normal	129
2 - Après blocage des canaux calciques	129
3 - En présence de la protéine kinase inhibitrice (PKI) AMPc dépendante	129
B - LES EFFETS DES ANTICORPS ANTI $\alpha_s$	135

CONCLUSION GENERALE 139

BIBLIOGRAPHIE 142

***INTRODUCTION GENERALE***



## **INTRODUCTION GENERALE**

La contraction est une fonction physiologique perceptible qui, très tôt, a intéressé les chercheurs qui voulaient comprendre les mécanismes cellulaires qui y sont impliqués. Le muscle squelettique fait partie des structures contractiles les plus étudiées. De nos jours, la fibre musculaire squelettique, sans être connue dans toutes ses fonctions reste largement explorée aussi bien sur le plan électrophysiologique que sur le plan biochimique. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons à l'aspect électrophysiologique en nous penchant essentiellement sur les mécanismes de couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille.

Par définition, le couplage excitation-contraction est le mécanisme par lequel la dépolarisation de la membrane tubulaire entraîne la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS). Le calcium ainsi libéré va se fixer sur la troponine, déplaçant la tropomyosine des sites de l'actine d'où l'interaction actine-myosine et contraction. Depuis l'introduction de cette notion par SANDOW en 1952, de nombreux travaux ont été réalisés dans cette optique afin de déterminer les principaux mécanismes impliqués dans ce phénomène physiologique. Loin de faire un éventail complet sur les mécanismes de couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique, nous évoquerons dans le chapitre 2 les principales hypothèses formulées jusqu'alors suite aux travaux divers effectués dans ce sens.

De nos jours, les données réunies sont nombreuses, certes, mais il existe des points sombres qui méritent d'être cernés pour faire plus de lumière sur les mécanismes de couplage excitation-contraction. L'un de ces points sombres est le rôle que pourraient jouer les protéines membranaires liant le GTP (les protéines G) dans cette machinerie complexe qu'est le couplage excitation-contraction. En effet le rôle des protéines G dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique a été évoqué pour la première fois par Di VIRGILIO et al. (1986).

Ces auteurs montrèrent que l'analogue non hydrolysable de la guanosine 5'trisphosphate (GTP $\gamma$ S) augmente la contraction de la fibre musculaire pelée et que le seuil d'activation de la contraction par le GTP $\gamma$ S était déplacé vers les concentrations plus élevées de GTP $\gamma$ S après une pré-incubation de la préparation en présence de la toxine d'une bactérie : *Bordetella pertussis* (PTX). Des résultats voisins sont rapportés par SOMASUNDARAM et al.(1991). VILLAZ et al. (1989) montrèrent que le GTP $\gamma$ S potentialise le phénomène de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique par le calcium et par la caféine mais que ce GTP $\gamma$ S n'est pas capable d'induire directement la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique. Leurs travaux montrèrent également que la PTX et un analogue non hydrolysable de la guanosine 5'diphosphate (GDP $\beta$ S) bloquent cette libération calcique. Ces résultats ont été obtenus sur des fibres pelées ou sur des vésicules membranaires dans des conditions physiologiques



## **INTRODUCTION GENERALE**

La contraction est une fonction physiologique perceptible qui, très tôt, a intéressé les chercheurs qui voulaient comprendre les mécanismes cellulaires qui y sont impliqués. Le muscle squelettique fait partie des structures contractiles les plus étudiées. De nos jours, la fibre musculaire squelettique, sans être connue dans toutes ses fonctions reste largement explorée aussi bien sur le plan électrophysiologique que sur le plan biochimique. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons à l'aspect électrophysiologique en nous penchant essentiellement sur les mécanismes de couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille.

Par définition, le couplage excitation-contraction est le mécanisme par lequel la dépolarisation de la membrane tubulaire entraîne la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS). Le calcium ainsi libéré va se fixer sur la troponine, déplaçant la tropomyosine des sites de l'actine d'où l'interaction actine-myosine et contraction. Depuis l'introduction de cette notion par SANDOW en 1952, de nombreux travaux ont été réalisés dans cette optique afin de déterminer les principaux mécanismes impliqués dans ce phénomène physiologique. Loin de faire un éventail complet sur les mécanismes de couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique, nous évoquerons dans le chapitre 2 les principales hypothèses formulées jusqu'alors suite aux travaux divers effectués dans ce sens.

De nos jours, les données réunies sont nombreuses, certes, mais il existe des points sombres qui méritent d'être cernés pour faire plus de lumière sur les mécanismes de couplage excitation-contraction. L'un de ces points sombres est le rôle que pourraient jouer les protéines membranaires liant le GTP (les protéines G) dans cette machinerie complexe qu'est le couplage excitation-contraction. En effet le rôle des protéines G dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique a été évoqué pour la première fois par Di VIRGILIO et al. (1986).

Ces auteurs montrèrent que l'analogue non hydrolysable de la guanosine 5'trisphosphate (GTP $\gamma$ S) augmente la contraction de la fibre musculaire pelée et que le seuil d'activation de la contraction par le GTP $\gamma$ S était déplacé vers les concentrations plus élevées de GTP $\gamma$ S après une pré-incubation de la préparation en présence de la toxine d'une bactérie : *Bordetella pertussis* (PTX). Des résultats voisins sont rapportés par SOMASUNDARAM et al. (1991). VILLAZ et al. (1989) montrèrent que le GTP $\gamma$ S potentialise le phénomène de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique par le calcium et par la caféine mais que ce GTP $\gamma$ S n'est pas capable d'induire directement la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique. Leurs travaux montrèrent également que la PTX et un analogue non hydrolysable de la guanosine 5'diphosphate (GDP $\beta$ S) bloquent cette libération calcique. Ces résultats ont été obtenus sur des fibres pelées ou sur des vésicules membranaires dans des conditions physiologiques

anormales. De plus l'hypothèse de couplage direct du récepteur aux dihydropyridines (DHPs: ligands voltage-dépendants des canaux calciques de type L) avec une protéine G sensible à la toxine cholérique (CTX) (YATANI et al., 1988a) et avec une protéine G sensible à la PTX (SOMASUNDARAM et al., 1991) a été émise.

Nous avons, pour cette raison, estimé nécessaire de mener notre travail dans un triple but:

- vérifier ces données sur fibres intactes et identifier la nature de la protéine G impliquée dans cette activité contractile étant donné que les analogues non hydrolysables du GTP ( $GTP\gamma S$ ) et du GDP ( $GDP\beta S$ ) agissent sur toutes les protéines G pour les activer ou les inhiber respectivement. De plus les protéines  $G_i$  et  $G_o$  identifiées au niveau du muscle squelettique (TOUTANT et al., 1988; 1990) sont toutes sensibles à la PTX,

- étudier le mode de couplage (direct ou indirect) du récepteur DHP avec les protéines  $G_i$ ,

- et en définitive établir les mécanismes de régulation possibles du récepteur DHP par les protéines G et resituer son rôle dans le couplage excitation-contraction de la fibre squelettique de grenouille.

Pour réaliser nos travaux, nous avons exploré les voies de transduction passant par la protéine  $G_s$  sensible à la CTX et celles passant par la protéine G sensible à la PTX ( $G_i$ ,  $G_o$ ) en utilisant les outils pharmacologiques qui agissent sur ces protéines ou sur chacune d'elles de manière spécifique.



## *HISTORIQUE*

## ***CHAPITRE 1 : ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE.***

Le muscle squelettique est un tissu composite où l'on trouve outre les fibres musculaires et les cellules satellites associées, des éléments conjonctifs, des vaisseaux et des nerfs.

La fibre musculaire squelettique est une cellule géante de forme cylindrique avec un cytoplasme multinucléé. Les fibres musculaires squelettiques ne présentent pas entre elles un contact de type "jonction gap" comme dans le cas du muscle cardiaque. Leur fonction est de développer une activité contractile en réponse à une stimulation électrique consécutive à la libération de l'acétylcholine (Ach) par les terminaisons nerveuses de la jonction neuromusculaire.

### ***A - LES SYSTEMES MEMBRANAIRES.***

Le terme "systèmes membranaires" au niveau de la fibre musculaire regroupe :

la membrane de surface ou sarcolemme

le système tubulaire transverse

la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) désignée souvent sous le terme de système membranaire interne

la triade qui est la zone de jonction entre la membrane du tubule-T et la membrane du réticulum sarcoplasmique.

#### ***I - La membrane de surface (sarcolemme).***

Le sarcolemme est constitué d'un réseau superficiel composé de fibres de collagène (tissu interstitiel) recouvrant une lame basale (Figure H1A). Celle-ci est en contact étroit avec le sarcolemme proprement dit (MAURO et ADAMS, 1961). Cette membrane de surface présente une homogénéité structurale sur toute sa longueur excepté la zone de jonction neuromusculaire et au niveau des insertions tendineuses. Elle est faite de replis ou "cavéoles" qui pourraient constituer une réserve de membrane et doubler la surface de cette membrane (MOBLEY et EISENBERG, 1975).

#### ***II - Le système tubulaire transverse (système T).***

Ce système tubulaire transverse constitue le réseau d'invagination tubulaire. Initialement considérés comme étant des invaginations de la portion de la membrane de surface déjà formée (ISHIKAWA, 1968), les tubules-T émanent des vésicules qui forment d'abord des cavéoles

puis par addition de nouvelles vésicules donnent des invaginations tubulaires. Ces observations relèvent des travaux de JORGENSEN et al. (1990) et de YUAN et al. (1990) qui, grâce à la mise en évidence de deux protéines (TS28 spécifique du tubule-T et SL50 spécifique du sarcolemme) ont suivi la mise en place du système-T grâce aux techniques d'immunofluorescence (Figure H1B). Ce réseau tubulaire peut être subdivisé en deux types de composantes :

Les tubules ayant un diamètre étroit et une section transversale circulaire qui ne participent pas aux jonctions avec le réticulum.

Les tubules aplatis et des citernes qui établissent les jonctions avec le réticulum (FRANZINI-ARMSTRONG et PEACHEY, 1981).

### *III - Le réticulum sarcoplasmique.*

Du point de vue structural, le réticulum sarcoplasmique constitue le réseau membranaire interne isolant un espace clos distinct du reste de l'espace intracellulaire. Ce réseau entoure les myofibrilles (actine et myosine). Il est formé à partir du réticulum endoplasmique rugueux.

Sur la base fonctionnelle, on distingue le réticulum jonctionnel (citermes terminales) et le réticulum libre (longitudinal) (PEACHEY et FRANZINI-ARMSTRONG, 1983 ; MARTONOSI, 1984). Le réticulum jonctionnel a une membrane riche en canaux calciques et pauvre en ATPase calcique (FLEISCHER et al., 1985). Sa lumière contient une protéine qui fixe le calcium avec une faible affinité : la calséquestrine (JORGENSEN et al., 1979 ; CAMPBELL et al., 1980). Le réticulum sarcoplasmique longitudinal a une membrane riche en ATPase calcique et pauvre en canaux calciques.

### *IV - La triade.*

La triade est la zone de jonction entre un tubule-T et deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique jonctionnel. L'espace entre les deux systèmes est caractérisé par un espace, "gap" jonctionnel de 10 à 20 nm qui est différent de celui permettant le couplage cellulaire (PEACHEY et FRANZINI, 1983). Cette structure triadique se retrouve chez les vertébrés supérieurs alors que chez les vertébrés inférieurs, l'association se fait entre un tubule-T et une citerne terminale : on parle de diade.

A travers cet espace jonctionnel, la membrane du tubule-T et celle du RS seraient réunies d'une part par les éléments périodiques ou pieds situés dans la membrane du RS et d'autre part par les récepteurs DHPs (ligands voltage-dépendants du canal calcique de type L) (FOSSET et al., 1983) situés dans la membrane tubulaire (BLOCK et al., 1988). Les pieds



### *Figure H1*

A - Diagramme indiquant les différentes couches qui constituent le sarcolemme du muscle squelettique. La couche superficielle (matrice extracellulaire) est constituée de fibre de collagène. Elle recouvre une lame basale formée de trois couches (reticular lamina, lamina densa, lamina lucida). La lame basale recouvre le sarcolemme proprement dit.

D'après GROUNDS, (1991)

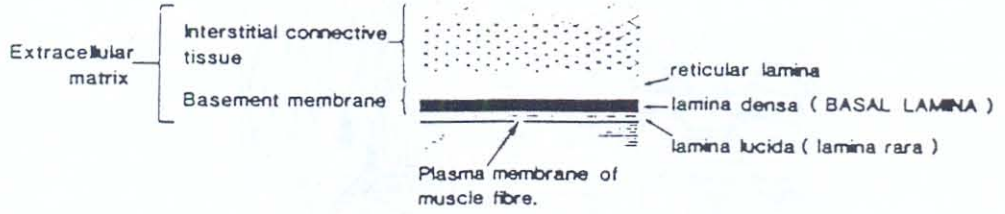
B - Schéma montrant la formation des systèmes tubulaires (tubule-T) dans la membrane du muscle squelettique au cours du développement. Les vésicules (1) forment des cavéoles (2) puis par addition de nouvelles vésicules (5,6,7,8) on arrive à des tubule-T (9,10).

D'après YUAN et al., (1990)

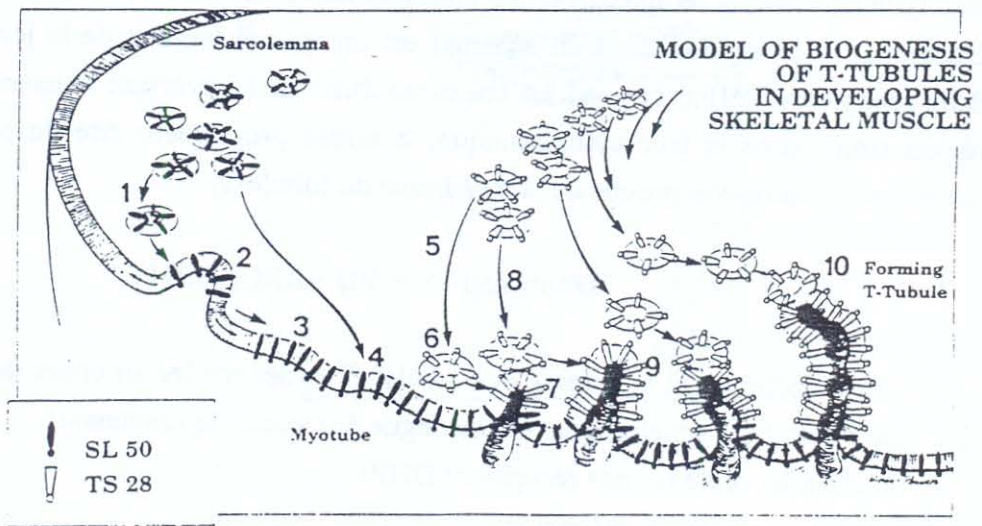
C - Diagramme montrant le pied qui s'échappe de la membrane du RS et portant à sa base le récepteur à la ryanodine qui serait le canal calcique par lequel le  $Ca^{2+}$  est libéré dans le myoplasme.

D'après MACLENNAN, (1990)

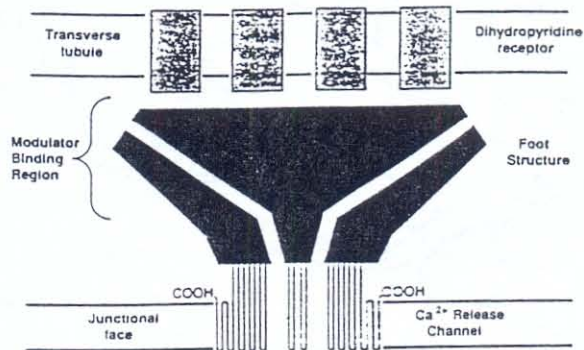
A



B



C



## *Figure H2*

A - Schéma montrant les différents éléments de la jonction entre tubule-T et le RS. On distingue les citernes terminales, le RS longitudinal, le tubule-T, les récepteurs DHPs, les pieds. L'encart (dans l'angle en haut du schéma) est un agrandissement de la jonction entre pied et deux récepteurs DHPs. Le pied est constitué d'un canal traversant la membrane du RS, d'une région située dans la face cytoplasmique, la masse proprement dite du pied avec plusieurs ouvertures et la région proche de la membrane du tubule-T.

D'après RIOS et PIZARRO, (1991).

B - Schéma montrant la biogenèse des tubules-T et des triades au cours du développement de la cellule musculaire squelettique. On distingue des vésicules contenant:

A la sous-unité  $\alpha_1$  des récepteurs DHPs.

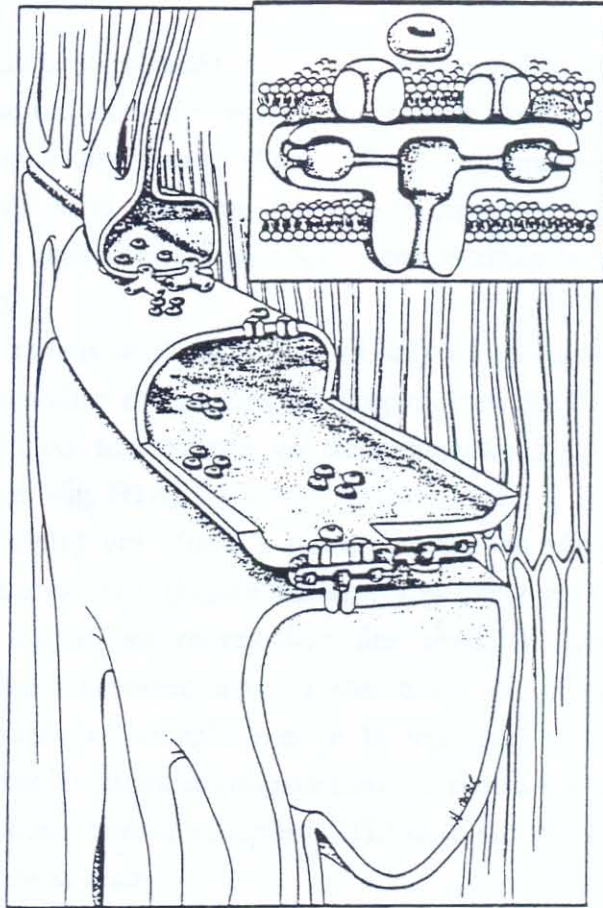
B le récepteur à la ryanodine.

C la protéine TS 28.

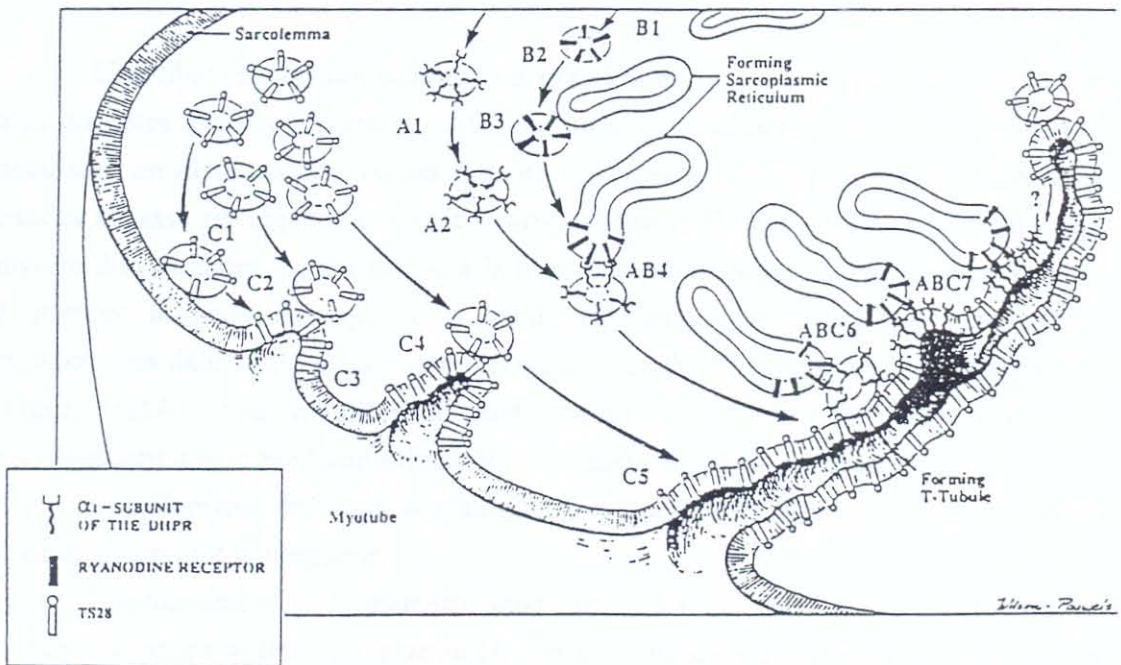
D'après YUAN et al., (1991).



A



B



sont constitués de quatre sous-unités organisées en tétramère et portant à leur base le récepteur à la ryanodine (un alcaloïde végétal) qui serait le canal calcique du RS par lequel le calcium est libéré dans le myoplasme (Figure H1C). A l'opposé de ces pieds, on a les récepteurs DHPs situés dans la membrane tubulaire et organisés également en tétramère. Ces récepteurs DHPs sont sensibles au voltage et semblent constituer le "voltage sensor" décrit par RIOS et BRUM (1987).

Se référant aux travaux de BLOCK et al. (1988) qui prévoient une interaction probable entre récepteurs à la ryanodine et ceux des dihydropyridines, RIOS et PIZARRO (1991) ont proposé une représentation schématique en trois dimensions de cette jonction tubule-T réticulum sarcoplasmique (Fig. H2A).

YUAN et al. (1991) ont réussi à suivre la mise en place des triades grâce aux techniques d'immunofluorescence (Figure H2B). Les récepteurs à la ryanodine et aux dihydropyridines sont d'abord incorporés dans des vésicules. Les vésicules contenant le récepteur à la ryanodine fusionnent avec la membrane du réticulum sarcoplasmique en formation puis il se forme un complexe entre le réticulum sarcoplasmique contenant le récepteur à la ryanodine et les vésicules contenant les récepteurs aux dihydropyridines.

Ainsi les interactions entre le récepteur DHP et le récepteur à la ryanodine semblent précéder l'établissement de la triade.

## ***B - ORGANISATION DE L'APPAREIL CONTRACTILE***

### ***I - Structure des myofibrilles***

Une fibre musculaire contient un grand nombre d'unités contractiles: les myofibrilles, d'un diamètre d'environ 1  $\mu\text{m}$ , accolées les unes aux autres dans l'axe longitudinal. En lumière polarisée, on distingue les bandes à haute réfringence qui sont anisotropes (bandes A) et les bandes à basse réfringence qui sont isotropes (bande I). Ces bandes s'alignent en phase entre myofibrilles voisines, ce qui donne à la fibre musculaire squelettique son aspect strié. La ligne Z partage la zone isotrope et la bande H partage la zone anisotrope. Deux lignes Z consécutives délimitent un sarcomère qui constitue l'unité fonctionnelle de l'appareil contractile (Figure H3A). Les myofibrilles sont constituées de myofilaments qui sont disposés parallèlement à leur axe longitudinal. Il existe deux sortes de myofilaments :

Les filaments épais qui ont un diamètre de 15 à 18 nm sont présents dans la bande A dont ils délimitent la longueur.

Les filaments fins de diamètre situé entre 5 à 6 nm s'étendent à partir de la ligne Z dans la bande I, jusqu'au bord de la zone H. Cette connaissance de l'organisation fine de l'appareil contractile résulte essentiellement des travaux de HUXLEY (1957, 1963, 1965).



Sur les fibres relaxées, seuls les filaments fins sont présents au niveau de la bande I et les filaments épais au niveau de la bande H. La contraction est le résultat du glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais ; la longueur de chaque type de filament ne change pas. Le glissement se fait par l'intermédiaire de ponts qui se forment cycliquement entre les deux types de filaments pendant la contraction.

## *II - Structure des myofilaments.*

Les filaments épais sont essentiellement constitués de myosine (HUXLEY, 1969). Cette protéine comprend 2 principales composantes : la méromyosine lourde (HMM) et la méromyosine légère (LMM). La molécule complète est asymétrique et se présente sous forme d'un bâtonnet de LMM surmonté à une extrémité par une masse globulaire de HMM. La méromyosine lourde est la fraction active de la myosine où se situe l'activité ATPasique.

Les filaments fins sont constitués de deux chaînes hélicoïdales d'actine polymérisée et d'un ensemble de protéines régulatrices (HANSON et LOWY, 1963). Celui-ci comprend la tropomyosine, disposée dans la gorge délimitée par deux chaînes d'actine et la troponine, disposée tous les 38,5 nm (Figure H3B).

Il y aurait 7 globules d'actine pour une tropomyosine et une troponine. La troponine représente un complexe de 3 sous-unités : la troponine C, la troponine I et la troponine T. La troponine T effectue la liaison entre tropomyosine et troponine. La troponine I est associée à la troponine C et à l'actine, elle inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine en absence de calcium.

La troponine C fixe le calcium. Elle présente deux domaines ayant une faible affinité pour le calcium (domaines I et II: domaines régulateurs) et deux domaines ayant une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  (domaines III et IV) (Figure H3C). Quand la concentration calcique intracellulaire augmente (environ  $10^{-8}$  à  $10^{-5}\text{M}$ ), la troponine C fixe le calcium, déplaçant la tropomyosine des sites de l'actine et entraîne l'interaction actine-myosine d'où la contraction (Figure H3D).

La contraction revient à sa valeur de repos suite au repompage actif du calcium par le RS longitudinal: c'est la relaxation. Cette relaxation pourrait dépendre également: du potentiel (CAPUTO et BOLANOS, 1979; LÜTTGAU et SPIEKER, 1979; CHUA et DULHUNTY, 1988), de la perte de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le "voltage sensor" (détails dans la partie couplage excitation-contraction) (FRANK, 1982; LÜTTGAU et al., 1987; BRUM et al., 1988a,b), de l'inactivation des canaux calciques du RS par le  $\text{Ca}^{2+}$  myoplasmique (SCHNEIDER et SIMON, 1988).



### ***Figure H3***

A - Diagramme représentant l'alternance des bandes anisotropes (bande A) et des bandes isotropes (bande I) au niveau du muscle squelettique de vertébrés. La ligne Z partage la zone isotrope et la bande H partage la zone anisotrope. Deux lignes Z consécutives délimitent un sarcomère.

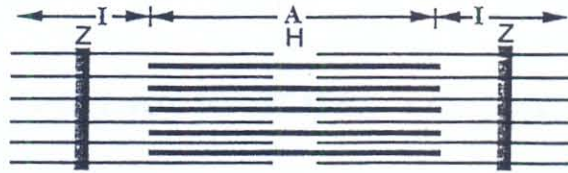
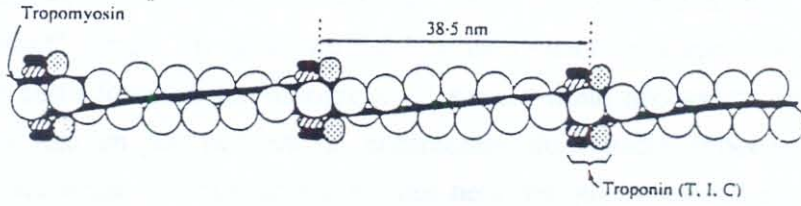
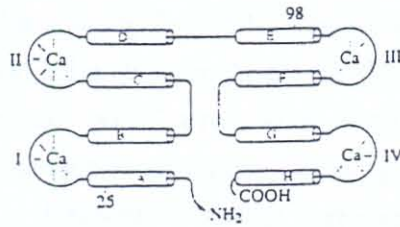
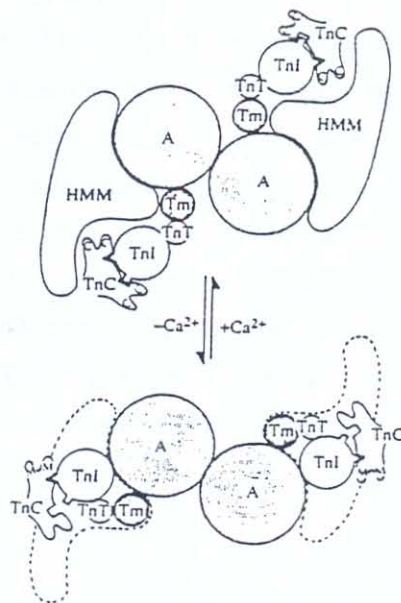
D'après FLUCHER et al., (1992).

B - Schéma montrant un filament d'actine vu longitudinalement. On distingue la tropomyosine disposée dans la gorge délimitée par deux chaînes d'actine et la troponine avec ses sous-unités (T, I, C) disposée toutes les 38,5 nm.

C - Diagramme représentant la structure de la troponine C avec deux domaines qui fixent le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une faible affinité (domaine I et II) et deux domaines qui fixent le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une forte affinité (domaine III et IV).

D - Structure de la troponine C réalisée grâce aux études aux rayons X et montrant ses changements de conformation en présence et en absence de des ions calcium.

D'après ASCHLEY, (1991).

**A****B****C****D**



## CHAPITRE 2 : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.

Le couplage excitation-contraction est le processus par lequel la dépolarisation de la membrane du tubule-T entraîne la libération du calcium stocké dans le RS, lequel se fixe sur les protéines contractiles et entraîne la contraction (Voir LÜTTGAU et STEPHENSON, 1986 ; FLEISCHER et INUI, 1989 ; RAYMOND, 1989; RIOS et PIZARRO, 1991). Cette définition "apparemment" simple du couplage est loin de fournir tous les renseignements susceptibles d'expliquer cette fonction physiologique. Il s'avère donc nécessaire de rappeler les différents événements mis en jeu pendant la contraction du muscle squelettique "in vivo". (i) La commande nerveuse centrale active le moto neurone qui transmet l'information sous forme de potentiels d'action. (ii) L'information arrive au niveau de la jonction neuromusculaire. (iii) Il y a libération d'un médiateur chimique (l'acétylcholine) qui active les récepteurs cholinergiques nicotiques post synaptiques. (iv) Cette activation de récepteurs nicotiques induit des potentiels d'action propagés portés essentiellement par les canaux sodiques et potassiques d'où dépolarisation membranaire. (v) Cette dépolarisation se propage du sarcolemme jusqu'au long de la membrane des tubules-T. (vi) La dépolarisation des tubules-T provoque la libération du calcium du RS. (vii) Le calcium libéré se fixe sur la troponine C d'où interaction actine-myosine et contraction. (viii) La relaxation survient suite au repompage actif du calcium par le réticulum sarcoplasmique longitudinal. Ces propos sont illustrés sur la (Figure H4).

Partant de différents résultats expérimentaux réalisés et de diverses hypothèses formulées dans cette optique, RIOS et PIZARRO (1991) résument les mécanismes du couplage excitation contraction en trois principaux processus.

La première étape est la détection de la variation du potentiel membranaire "voltage sensing process". Les premières données sur cette étape émanent des travaux de SCHNEIDER et CHANDLER (1973) qui ont mis en relation des mouvements de charges intramembranaires et le couplage excitation-contraction du muscle squelettique.

La deuxième étape est le processus de libération du  $Ca^{2+}$  du RS qui va se fixer sur les protéines contractiles et entraîner la contraction.

La troisième étape dite de transmission est celle qui permet à la première (détection de la variation de potentiel de membrane) de déclencher la seconde (libération du  $Ca^{2+}$  du RS).

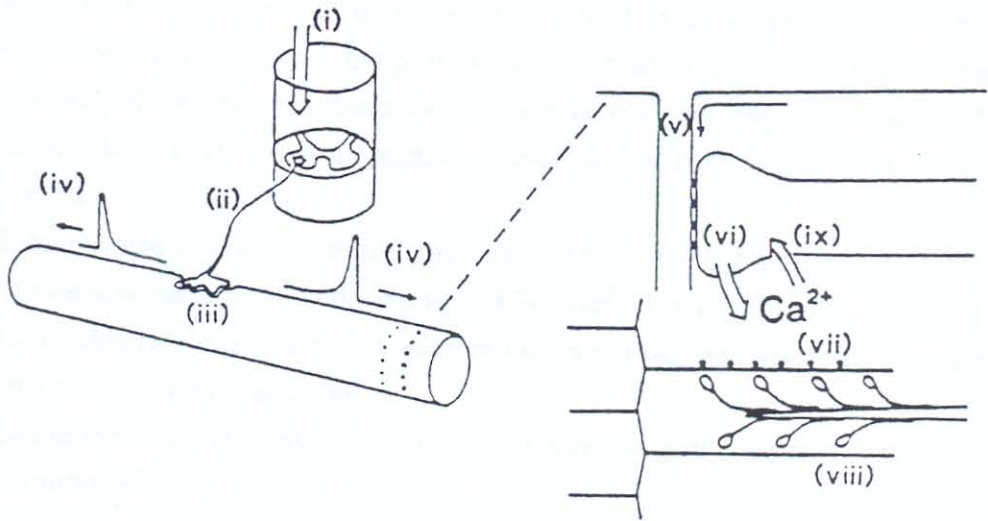
Nous nous efforcerons, pour une appréhension globale du problème de couplage de présenter dans les pages qui suivent l'essentiel des hypothèses formulées dans ce sens ainsi que les points obscurs qui méritent d'être disséqués.

**Figure H4**

Les différentes étapes conduisant à l'activation mécanique du muscle squelettique.

D'après WESTERBLAD et al., (1991).





## A - LES RECEPTEURS AUX DIHYDROPYRIDINES ET LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.

Les récepteurs aux dihydropyridines sont des structures protéïniques formées de 5 sous-unités et situées dans la membrane du tubule-T. Les dihydropyridines (DHPs) comme nous le verrons dans la partie traitant de la structure des récepteurs aux DHPs, sont des activateurs ou inhibiteurs des canaux calciques de type L. Les récepteurs présentent une grande analogie avec le canal calcique L qui porte le site de fixation de ces DHPs. Comme le souligne LAMB (1992), il s'avère nécessaire de clarifier le rôle des récepteurs aux DHPs dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique et faire ressortir les divers aspects qui restent confus:

L'écart entre le nombre relativement élevé des récepteurs DHPs (102 à 150/ $\mu\text{m}^2$ ) et le nombre de canaux calciques fonctionnels (34 à 76/ $\mu\text{m}^2$ ) (Pour revue voir LAMB, 1992).

Le double rôle possible des récepteurs DHPs qui peuvent fonctionner comme " voltage sensor" et comme canaux calciques.

Les effets disparates des DHPs sur les mouvements de charge, sur le courant calcique et sur la contraction.

### I - Les récepteurs aux DHPs sont des canaux calciques.

#### 1 - Structure des récepteurs aux DHPs.

Les dihydropyridines constituent une classe de molécules antagonistes (Nifédipine) ou agonistes (BAY K 8644) du canal calcique (pour revue voir JANIS et TRIGGLE, 1984). Ces molécules se fixent spécifiquement sur des récepteurs présents en grande densité au niveau de la membrane du tubule-T du muscle squelettique, ce qui a permis leur extraction et leur purification (FOSSET et al., 1983). Ces récepteurs sont formés de 5 sous-unités (CATTERALL, 1988).

La sous-unité  $\alpha 1$  (PM = 175 Kd). Elle est phosphorylable mais n'est pas glycosylée.

La sous-unité  $\alpha 2$  (PM = 165 à 220 Kd) qui ne possède pas de site de fixation des DHPs. Elle est glycosylée mais n'est pas phosphorylable.

La sous-unité  $\beta$  (PM = 52 à 65 Kd) est phosphorylable mais n'est pas glycosylée.

La sous-unité  $\gamma$  (PM = 32 Kd) est glycosylée mais non phosphorylée.

La sous-unité  $\delta$ , issue de la réduction des ponts disulfures de  $\alpha 2$  est glycosylée (figure H5A).

La sous-unité  $\alpha 1$  est la principale. Elle est composée de quatre motifs (I à IV) pratiquement homologues comportant chacun 6 domaines hélicoïdaux (1 à 6)



transmembranaires. Elle contient le site de fixation des dihydropyridines (DHPs) et d'autres classes de bloqueurs organiques de même que le pore constituant le canal calcique et donc indispensable pour le fonctionnement du canal calcique d'où la haute similitude entre le récepteur aux DHPs et le canal calcique. SPEDDING et KENNY (1992) proposent un schéma de cette sous unité  $\alpha 1$  montrant le domaine de fixation des DHPs et du calcium (Figure H5 B). TSIEN et al., (1991) avaient proposé une structure de cette sous-unité montrant des sites de phosphorylation et une large boucle cytoplasmique entre les motifs II et IV qui serait impliquée dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique (Figure H5C). Cette sous-unité  $\alpha 1$  serait régulée par la  $\beta$  comme le propose le schéma de LORY et al., (1991) (Figure H5D).

## ***2 - Rôle des canaux calciques L dans le couplage excitation-contraction.***

Les récepteurs aux DHPs considérés comme canaux calciques pourraient jouer un rôle dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique du moins pendant les réponses durables.

En effet, les travaux de POTREAU et RAYMOND (1980 a et b) ont montré qu'il existe une corrélation entre le courant calcique lent et la composante tonique de la contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille lorsque celle-ci est stimulée par une dépolarisation de longue durée. Ces résultats furent confirmés par ILDEFONSE et al. (1985) qui montrèrent que la deuxième composante de la contraction était augmentée ou diminuée par les dihydropyridines qui augmentent ou diminuent le courant calcique respectivement. Les résultats similaires sont rapportés par JACQUEMOND et ROUGIER (1990) qui montrent sur la fibre musculaire de grenouille une corrélation entre le courant calcique lent et la composante lente de la contraction. Sur le muscle squelettique de rat en culture, RIVET et al. (1989) ont montré que le courant calcique lent est responsable d'une partie de la contraction musculaire de ces cellules. COGNARD et al. (1992) ont montré que sur les myoballes du muscle squelettique de mammifère en culture, cette contraction courant-dépendante était régulée pendant le développement musculaire. De plus, comme le suggèrent les résultats de COGNARD et RAYMOND (1985) sur le muscle squelettique de grenouille; COGNARD et al. (1988), CONSTANTIN et al. (1993) sur le muscle de rat en culture, le courant calcique lent assurerait la charge en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

*Figure H5*

A - Modèle de la structure du canal calcique DHP avec ses différentes sous-unités dans la membrane.

D'après CATTERAL, (1988)

B - Structure de la sous-unité  $\alpha_1$  du canal calcique L. La structure comporte 4 motifs (I à IV) chacun composé de 6 segments hélicoïdaux (1 à 6) avec des sites probables de DHP et de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la partie C terminale.

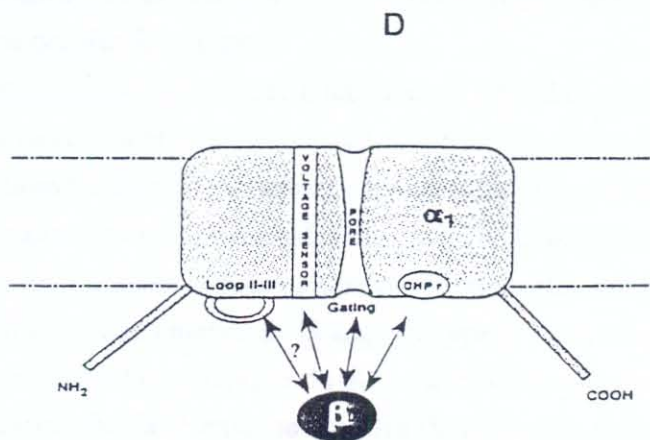
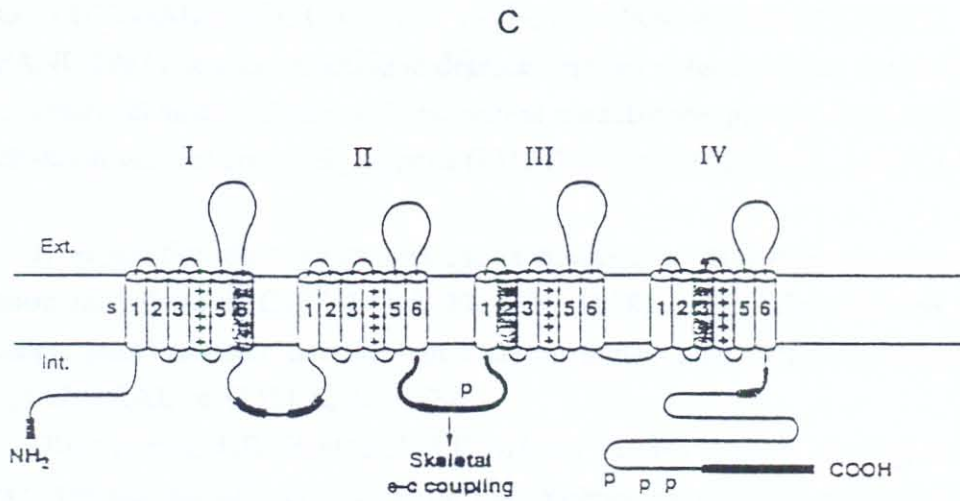
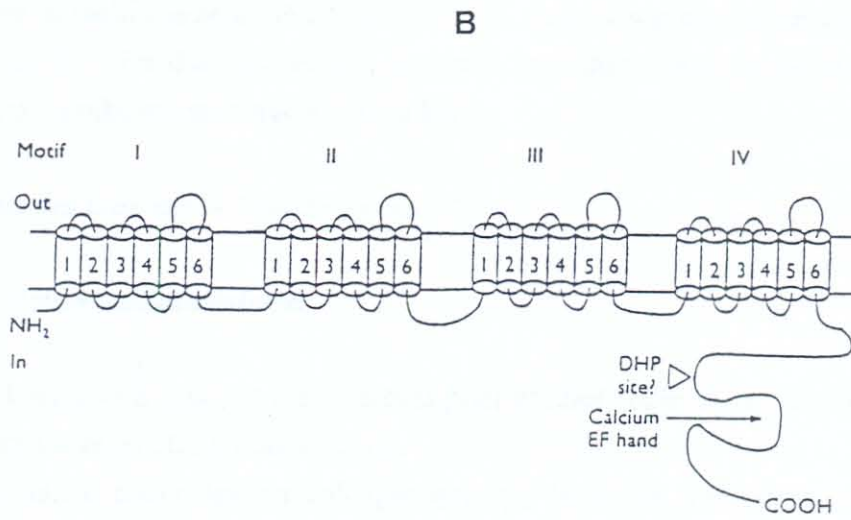
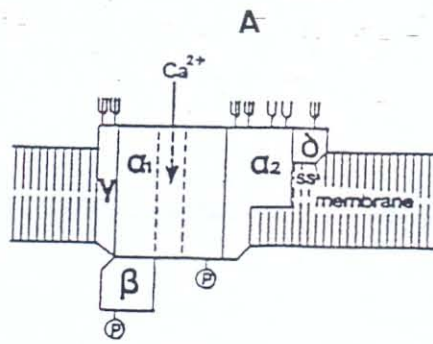
D'après SPEEDING et KENNY, (1992).

C - Autre représentation de cette structure de  $\alpha_1$  qui montre des zones pouvant varier selon les tissus (zone grise), des sites phosphorylables (P) et une large boucle intracellulaire probablement impliquée dans le mécanismes de couplage excitation-contraction.

D'après TSIEN et al., (1991)

D - Schéma montrant la régulation possible de la sous-unité  $\alpha$  par  $\beta$  et des zones représentant le pore (canal calcique) et le "voltage sensor".

D'après LORY et al., (1991)





## *II - Les récepteurs aux DHPs constituent le "voltage sensor", du couplage excitation-contraction.*

Le "voltage sensor" du couplage excitation-contraction du muscle squelettique représente la molécule sensible au potentiel qui, suite à son activation entraîne la libération du calcium du RS. En d'autres termes, il assure la transduction du signal électrique depuis la membrane du tubule transverse jusqu'au RS.

### *1 - Effets des ions sur le "voltage sensor."*

#### *a - Le calcium extracellulaire.*

Plusieurs travaux ont été effectués pour étudier l'effet et le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans le couplage excitation-contraction.

A faible concentration calcique externe, la durée des contractures potassiques est réduite (LÜTTGAU, 1963; CAPUTO, 1972 ; STEFANI et CHIARANDINI, 1973; COTA et STEFANI, 1981), le seuil mécanique déplacé vers les potentiels plus élevés (CHIARANDINI et al., 1980), et une tendance à l'inactivation caractérisée par un déplacement de la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs (LÜTTGAU et SPIECKER, 1979 ; LÜTTGAU et al., 1987).

L'explication de ces résultats par la suppression d'un influx calcique nécessaire à la libération secondaire de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS (FRANK, 1958) souffre d'insuffisance puisque l'activité mécanique peut subsister durablement dans un milieu sans calcium (ARMSTRONG et al., 1972 ; LÜTTGAU et SPIECKER, 1979).

D'autre part, GRAF et SCHATZMANN (1984) avaient observé une paralysie des contractures potassiques du muscle de mammifères quand celui-ci était maintenu dans un milieu sans calcium mais avec magnésium. Ces auteurs proposaient que le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur un site spécifique constitué de charges intramembranaires situées dans le "voltage sensor" et cette fixation rend ce dernier fonctionnel.

D'autres travaux réalisés par BRUM et al. (1988a), en mesurant simultanément le flux calcique et les mouvements de charge ont montré que: (i) La contribution de l'influx calcique dans l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  myoplasmique est inférieure à 5% et n'entraîne pas la diminution de la concentration calcique extracellulaire. (ii) De faibles concentrations calciques externes déplacent de façon parallèle la courbe d'inactivation du flux calcique à partir du RS et la courbe de disponibilité des mouvements de charge de type 1 mais sans changement significatif sur la courbe d'activation du flux calcique du RS. (iii) Durant des impulsions de longue durée, une faible concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  externe accélère l'inactivation de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  et entraîne



une disparition de la charge 1. (iv) En absence d'ions métalliques externes et en présence d'EGTA, de faibles concentrations calciques externes entraînent une réduction de la charge 1, une augmentation de la charge 2, et une disparition de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ .

A partir de ces observations (BRUM et al., 1988b; PIZARRO et al., 1988; RIOS et al., 1990) ont proposé un modèle de "voltage sensor" du couplage excitation-contraction avec des sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  externe (Figure H6A). Selon ce modèle le "voltage sensor" se présente sous quatre états (repos, activé, inactivé, inactivé paralysé). Le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur les sites de "priming" lorsque le "voltage sensor" se trouve dans son état de repos et dans son état activé et ceci évite qu'il évolue vers un état inactivé ou vers un état inactivé paralysé.

### *b - Effets des autres ions métalliques.*

Lorsqu'on remplace le  $\text{Ca}^{2+}$  par d'autres cations divalents, l'activité contractile est modifiée. Ainsi SANDOW et ISAACSON (1960) avaient démontré que l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  était potentialisé par ajout d'autres métaux lourds. DULHUNTY et GAGE (1989) ont montré que le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) et le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) diminuaient les "twitch" ainsi que les contractures tétoniques et potassiques. D'autres ions divalents comme le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) ont un effet similaire à celui du  $\text{Ca}^{2+}$  à faible concentration (1 mM) mais on arrivait à un effet inhibiteur à des concentrations plus élevées (OOTA et al., 1972; CHIARANDINI et STEFANI, 1973). Certains effets des cations métalliques observés en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  externe peuvent être compris comme une conséquence de la fixation de ces cations sur les sites "priming" du "voltage sensor". Les calculs effectués en se basant sur le fait que le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par le RS est proportionnel à l'affinité du cation sur le site "priming" ont permis d'établir l'affinité relative de ce site pour ces cations, avec la séquence suivante :  $\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Mg} > \text{Ba} \gg \text{Li} \gg \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$  (pour revue voir RIOS et PIZARRO, 1991).

L'effet inhibiteur de ces ions ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ne peut pas être interprété comme la conséquence de leur fixation sur le site "priming" du "voltage sensor" mais peut être attribué à la fixation sur des charges négatives proches. Ces ions ultérieurement pénètrent dans la cellule et diminuent les fonctions de recyclage et de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  expliquant l'effet inhibiteur observé. Ainsi il est signalé que le  $\text{Mg}^{2+}$ , à part cette capacité à se fixer sur le site "priming" du "voltage sensor", pénètre dans la cellule musculaire squelettique au repos et se fixe sur un site au niveau du canal calcique du RS et le bloque. Après activation du "voltage sensor" le  $\text{Mg}^{2+}$  se dissocie de ce site d'où levée d'inhibition et libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . (Figure H6B). Le magnésium jouerait donc un rôle vital dans les mécanismes de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le "voltage sensor" du muscle squelettique (LAMB et STEPHENSON, 1992).

### **Figure H6**

A - Modèle du "voltage sensor" présenté sous ses 4 états (repos, activé, inactivé, paralysé). Le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur un site "priming" lorsqu'il se trouve dans son état de repos "resting" et dans son état activé, ceci évite qu'il évolue vers son état inactivé. Les constantes  $K_1$  et  $K_2$  sont dépendantes du potentiel.

D'après PIZZARO et al., (1988).

B - Schéma montrant le rôle des ions  $\text{Mg}^{2+}$  dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique. Au repos, les ions  $\text{Mg}^{2+}$  se fixent sur un site au niveau du canal calcique du RS et l'inhibent. L'activation du "voltage sensor" lève cette inhibition en provoquant la dissociation des ions  $\text{Mg}^{2+}$  de leur site de fixation.

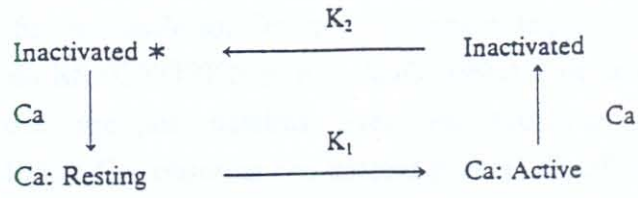
cercles vides: les ions calcium

cercles pleins: les ions magnésium

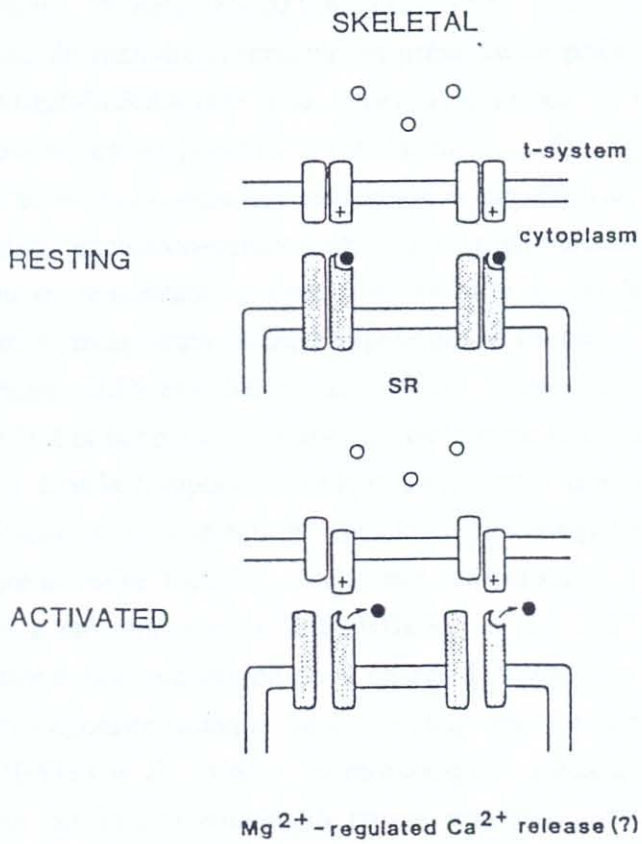
D'après LAMB et STEPHENSON, (1992).



# A



# B



### *c - Effets des anions.*

Les anions ont également des effets sur le "voltage sensor". Le perchlorate ( $\text{ClO}_4^-$ ) diminue le seuil d'activation des mouvements de charge et de la contraction (FELDMEYER et LÜTTGAU, 1988). Sur le muscle squelettique d'écrevisse, le perchlorate a un effet faible sur la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS (GYÖRKE et PALADE, 1992). Les anions agissent probablement par interférence des groupes polaires avec les protéines chargées (COLLINS et WASHABAUGH, 1985). Ces observations laissent prévoir un effet des anions sur le "voltage sensor".

## *2 - Pharmacologie du "voltage sensor".*

### *a - Les antagonistes calciques.*

Pour étudier les effets des antagonistes calciques sur le couplage excitation-contraction, plusieurs molécules ont été testées, les résultats paraissant parfois contradictoires.

Ainsi DORRSCHIEDT-KAFER (1977) et BONDI (1978) avaient observé une diminution de l'activité contractile en présence de phénylalkylamines (antagonistes calciques). GONZALEZ-SERRATOS et al. (1982) avaient quant à eux observé une faible potentialisation de la contraction en présence de diltiazem ( $1 \mu\text{M}$ ), une concentration qui bloque le courant calcique et avaient conclu que les canaux calciques n'ont pas un effet direct dans le mécanisme de couplage excitation-contraction. Par contre, McCLESKEY (1985) avait observé un effet inhibiteur sur le courant calcique et la contraction avec les concentrations élevées de nifédipine et de D600 (antagoniste calcique) appliquées à l'extérieur ou à l'intérieur de la fibre musculaire squelettique. ILDEFONSE et al. (1985) interprétaient ce blocage simultané du courant calcique lent et la composante tonique de la contraction comme preuve que le courant calcique intervient dans la composante tonique de la contraction. COGNARD et al., (1990) ont observé une inhibition de la contraction dépendante du voltage par la nifédipine sur les myoballes de rat en culture primaire: les effets similaires à ceux observés sur le muscle adulte.

Il a été rapporté par EISENBERG et al. (1983) que le D600 entraîne une paralysie musculaire et une élimination de la charge 1, fournissant ainsi la première indication d'un effet direct d'antagoniste calcique sur le couplage excitation-contraction. PIZARRO et al. (1988) et FELDMEYER et al., (1990) ont montré quant à eux que la paralysie musculaire par le D600 n'affectait pas les mouvements de charge mais changeait leur dépendance vis à vis du potentiel ( $Q(v)$ ), un effet similaire à l'effet inactivateur des dépolarisations de longues durées. De plus LAMB (1985, 1986b), RIOS et al. (1986), SHIMAHARA et al. (1992), STRUBE et al., (1992) ont observé une inhibition des mouvements de charge par la nifédipine sur la fibre



musculaire squelettique de mammifère. Les mêmes résultats avaient été obtenus par RIOS et BRUM (1987) sur la fibre squelettique d'amphibien. RIOS et al. (1986); RIOS et BRUM, (1987) ont montré que ce blocage des mouvements de charge était accompagné d'une réduction simultanée de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  et ont conclu que l'effet bloqueur de la nifédipine affectait précisément le "voltage sensor" impliqué dans la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle il y aurait une fixation préférentielle des antagonistes calciques sur les formes inactivées du "voltage sensor" (LÜTTGAU et al., 1986 ; BERWE et al., 1987 ; RIOS et BRUM, 1987 ; FILL et BEST, 1989). C'est à la lumière de ce raisonnement que PIZZARO et al. (1988) avaient proposé un modèle rendant compte de la fixation préférentielle des drogues (DHPs) sur des états inactivés du "voltage sensor" (Fig. H7A). Selon ce modèle, la fixation des drogues est antagonisée par toute action (hyperpolarisation ou élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  externe) susceptible d'éloigner le "voltage sensor" de son état d'inactivation.

LÜTTGAU et al. (1992) ont observé les effets de trois classes d'antagonistes calciques (dihydropyridines, phénylalkylamines, benzothiazépines) sur l'activité contractile de la fibre musculaire squelettique de grenouille. Ils observent une diminution de l'activité contractile en présence de ces antagonistes calciques et montrent qu'ils se fixent à des sites différents sur le "voltage sensor" par un changement de configuration allostérique avec le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de ces sites. Ils proposent un modèle montrant que les antagonistes calciques se fixent sur le "voltage sensor" lorsque celui-ci se trouve dans un état activé. Quand il se trouve dans son état de repos, le site spécifique fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une forte affinité. Une fois activé, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  se fait avec une faible affinité d'où dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$ , de son site. Ce processus va entraîner un changement allostérique du système et faciliter la fixation des DHPs. Le "voltage sensor" se trouve alors dans son état inactivé "primaire". La dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur le deuxième site va permettre aux phénylalkylamines (PAAs) et aux benzothiazépines (BTZs) de se fixer à des sites différents ce qui accélère la transition du système dans un état inactivé stable ou paralysé (ces propos sont illustrés sur la figure H7B). Les antagonistes calciques sont donc des drogues largement utilisées dans l'étude des mécanismes de couplage excitation-contraction.

### ***b - Les agonistes calciques.***

Les similitudes structurales entre "voltage sensor" et canaux calciques, l'augmentation de l'activité contractile par les agonistes calciques constituent les raisons qui ont amené les



### *Figure H7*

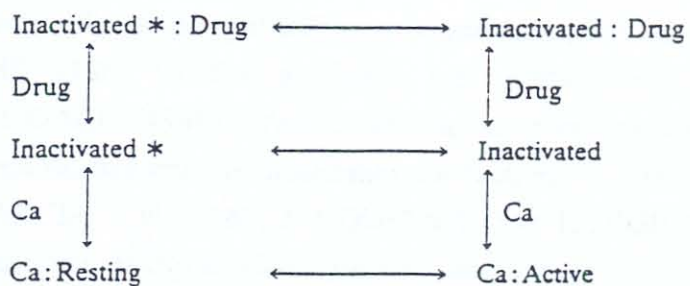
A - Modèle du "voltage sensor" montrant l'effet des drogues comme les DHPs. Ces drogues se fixent avec une forte affinité sur les états inactivés du "voltage sensor" et sont antagonisées par toute action (hyperpolarisation, concentration calcique externe élevée) visant à empêcher le système d'évoluer vers ses états inactivés.

D'après PIZZARO et al., (1988)

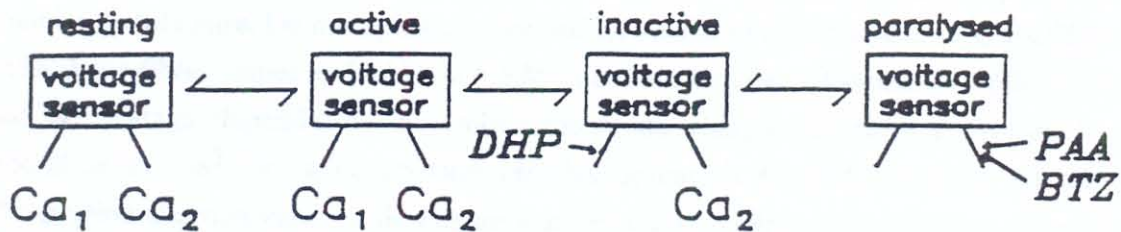
B - Autre modèle résumant les actions possibles des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et des antagonistes calciques sur le "voltage sensor". Les ions calcium se fixent préférentiellement sur les formes de repos et activée du "voltage sensor" et les drogues (dihydropyridine: DHP, phénylalkylamine: PAA, benzothiazépine: BTZ) sur les formes inactivée et paralysée du système.

D'après LÜTTGAU et al., (1992).

# A



# B



chercheurs à étudier les effets de ces agonistes calciques. Ainsi PIZARRO et al. (1988) sur des fibres coupées ont utilisé un agoniste calcique : (+) - 202-791, un énantiomère qui active le courant calcique cardiaque avec une forte affinité (KONGSAMUT et al., 1985) Ils montrent que cet agoniste n'a pas d'effet sur les mouvements de charge et sur la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, mais lorsque les fibres sont partiellement dépolarisées, il a un effet inhibiteur comme la nifédipine (LAMB, 1986b; RIOS et al., 1986). Les résultats similaires ont été rapportés par DULHUNTY et GAGE (1988). D'autres études réalisées par un autre agoniste calcique (BAYK 8644) ont montré une potentialisation de l'activité contractile de la fibre musculaire squelettique (GARCIA et al., 1989; JACQUEMOND et ROUGIER, 1990), effet attribué à l'activation du courant calcique. Contrairement aux antagonistes calciques, il n'a pas été démontré si cet effet activateur des agonistes calciques reflétait une action spécifique sur le "voltage sensor".

### *c - Autres agents utilisés dans la pharmacologie du "voltage sensor".*

D'autres outils pharmacologiques dont les effets sur le "voltage sensor" sont secondaires à l'effet direct sur les canaux calciques du RS sont utilisés pour activer ou bloquer ces canaux calciques avec des conséquences sur le couplage excitation-contraction:

La caféine est utilisée pour induire la libération du calcium du RS des fibres intactes ou pelées. Elle provoque une contracture sans changement du potentiel de membrane et à de faibles concentrations potentialise la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  induite par une dépolarisation de la membrane tubulaire. De multiples travaux ont été réalisés avec la caféine. KOVACS et SZÜCS (1983) sur fibre coupée et HUANG (1986) sur fibre intacte ont étudié les effets de la caféine sur la "voltage dépendance" des mouvements de charge. La caféine déplace le seuil de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  et la contraction vers les potentiels négatifs d'environ 10 mV, le seuil d'activation des mouvements de charge étant également déplacé de la même façon d'où l'idée que le courant de charge  $\gamma$  (qui sera détaillé dans le paragraphe sur les mouvements de charge) est une conséquence de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . SIMON et al. (1989) ont montré que l'arrêt de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  qui a lieu juste en fin de dépolarisation se fait de façon plus tardive en présence de 0,5 mM de caféine. Ceci signifie que le processus de libération du calcium du RS par le potentiel de membrane est dénaturé en présence de la caféine.

RIOS et PIZARRO (1991) résument en disant que les effets de la caféine sur le "voltage sensor" sont probablement secondaires à l'effet direct sur les canaux calciques du RS et que le mécanisme par lequel la caféine affecte le canal pendant une dépolarisation normale activant la contraction reste inconnu.



Les anesthésiques locaux, à part leur effet bloqueur sur les canaux sodiques et potassiques, sont connus comme pouvant affecter le mécanisme de couplage excitation-contraction.

La procaine sur les fibres coupées (GONZÁLEZ et al., 1991) et la tétracaïne sur les vésicules isolées de RS (OHNISHI, 1979) inhibent la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. De plus, la tétracaïne inhibe l'activité contractile des fibres musculaires intactes induite par la caféine ou par une dépolarisation (LÜTTGAU et OETLIKER, 1968). Ces effets furent par la suite étudiés sur les mouvements de charge par ALMERS et BEST (1976) qui n'ont observé aucun effet avec 2 mM appliqués sur fibre intacte. Par contre HUANG, (1980; 1981; 1982); VERGARA et CAPUTO (1983) et HUI (1983) signalent une réduction d'environ 20% de charge totale en présence de 4 mM de tétracaïne. Cet effet est interprété comme étant la conséquence du blocage de la charge  $Q_{\gamma}$  par la tétracaïne. D'autre part PIKE et al. (1989) ont travaillé sur des fibres musculaires pelées et ont démontré qu'en présence de faible concentration (0,5 mM) de tétracaïne et de procaine, il y avait inhibition de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  mais à de fortes doses, on observe plutôt une augmentation de celle-ci. Cette libération de calcium induite à de fortes concentrations n'est pas physiologique.

D'autre part la lidocaïne a été rapportée comme inhibant les composantes  $Q_{\beta}$  et  $Q_{\gamma}$  des mouvements de charge (détails sur  $Q_{\beta}$  et  $Q_{\gamma}$  dans la partie traitant des mouvements de charge) (HUANG, 1982). Ces études montrent que les anesthésiques locaux considérés comme agents agissant spécifiquement sur les canaux calciques du RS interviennent dans l'activité contractile d'où nécessité de réexaminer leur effet dans la régulation du voltage sensor.

La ryanodine (un alcaloïde végétal: substance naturelle longtemps utilisée comme insecticide) bloque la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS en se fixant spécifiquement sur son canal calcique (SUTKO et KENYOU, 1983; SUTKO et al., 1985; SMITH et al., 1988b). BAYLOR et al. (1989) en étudiant l'effet de cette drogue sur le canal calcique du RS ont observé l'effet sur les mouvements de charge de la fibre musculaire d'amphibien. Ils ont pu constater que l'effet de la ryanodine sur le canal du RS était accompagné d'un blocage des charges. Il a été montré récemment (GARCIA et STEFANI, MA et al., observations non publiées : voir revue RIOS et PIZARRO, 1991) que la ryanodine (100 nM à 10  $\mu\text{M}$ ) réduit la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et  $I_{\gamma}$  mais sans effet significatif sur  $Q_{\beta}$ .

Il existe d'autres outils censés agir spécifiquement au niveau des canaux calciques du RS (rouge de ruthénium, certains alcools) qui ne feront pas l'objet d'étude détaillée mais qui interviennent dans les mécanismes impliqués dans l'activité contractile. Si il est admis que les récepteurs DHPs sont à l'origine des mouvements de charge, au moins en partie, dans la cellule musculaire squelettique (RIOS et BRUM, 1987; ADAMS et al., 1990), alors il paraît évident que ces agents qui ont des effets sur les mouvements de charge affectent probablement le "voltage sensor".



En définitive, beaucoup de molécules ayant un effet direct (antagonistes calciques) ou indirect (agonistes calciques, la caféine, les anesthésiques locaux, la ryanodine) sont utilisées en ce moment par de nombreux spécialistes du couplage excitation-contraction dans l'espoir de dépouiller avec le maximum de détails, les mécanismes impliqués dans ce processus physiologique.

### **3 - Modulation du "voltage sensor".**

Comme nous l'avions souligné dans la partie structure des récepteurs aux DHPs, il y a bien une similitude structurelle entre le canal calcique de type L et les récepteurs aux DHPs et cette analogie a conduit différents chercheurs à penser à une modulation intrinsèque du voltage sensor. La phosphorylation des canaux calciques L et des récepteurs aux DHPs suggère une modulation du "voltage sensor" par les protéines G et les kinases. Ainsi DI VIRGILIO et al. (1986) ont été les premiers à suggérer l'intervention des protéines G dans le couplage excitation-contraction. Les observations similaires ont été faites par d'autres chercheurs (VILLAZ et al., 1989 ; GARCIA et al., 1990 ; SOMASUNDARAM et al., 1991).

Comme le soulignent RIOS et PIZARRO (1991), la modulation dans un cas pourrait résulter d'une interaction directe entre "voltage sensor" et protéine G mais peut dépendre également d'un processus de phosphorylation.

### **III - Les récepteurs DHPs ont-ils un double rôle dans le mécanisme de couplage excitation-contraction ?**

La question qui se pose est de savoir si c'est le même récepteur DHP qui joue le rôle de "voltage sensor" et de canal calcique ou si ce sont des molécules différentes mais voisines.

Les avis restent partagés sur ce point. Apparemment, le "voltage sensor" et les canaux calciques L sont codés par le même gène (TANABE et al., 1988). Ils ont la même structure primaire et jouent des rôles différents en fonction des interactions avec les autres protéines (pour revue, voir RIOS et PIZARRO, 1991).

Selon LÜTTGAU et al. (1992), le terme de récepteur aux DHPs regroupe les canaux calciques et le "voltage sensor" ce qui suppose deux molécules différentes sur le plan fonctionnel.

CATTERALL (1991) propose que seule la forme du récepteur présentant une séquence complète jouerait le rôle de canaux calciques alors que la forme tronquée jouerait le rôle du "voltage sensor". Pour répondre à cette question, BEAN et al. (1992) ont reconstitué



**Figure H8**

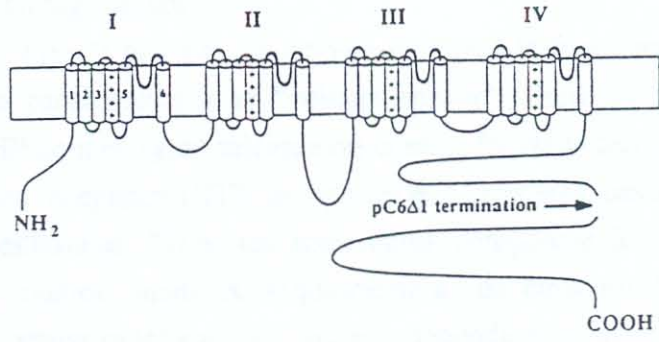
A - Schéma de la forme tronquée de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur DHP du muscle squelettique. L'ADN (pC6 $\Delta$ 1) qui code pour la forme tronquée de la sous-unité  $\alpha$  incorporé dans les plasmides permettent de reconstituer le récepteur DHP pouvant jouer simultanément le rôle de "voltage sensor" et de canal calcique.

D'après BEAM et al., (1992).

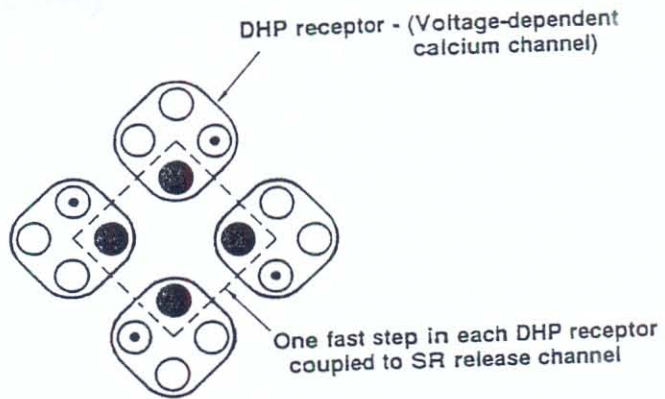
B - Modèle du récepteur DHP jouant simultanément ou non le rôle de canal calcique et de "voltage sensor". Un récepteur DHP (formé de 4 sous-unités) peut fonctionner comme canal calcique voltage-dépendant lorsque la sous-unité à cinétique lente est activée. Le "voltage sensor" qui assure la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS suite à une dépolarisation de la membrane tubulaire est fonctionnel lorsque 4 récepteurs couplés à un récepteur du RS mettent en activité chacun une sous-unité à cinétique rapide.

D'après LAMB, (1992).

A



B





un ADN complémentaire (pc 6  $\Delta 1$ ) correspondant à l'ADN qui code pour la séquence de la forme tronquée des récepteurs DHPs du muscle squelettique (Figure H8A). L'expression de cet ADN dans les myotubes dysgénétiques restaure aussi bien le "voltage sensor" que les canaux calciques d'où l'idée que ce sont les mêmes récepteurs DHPs qui jouent les deux rôles (canaux calciques et "voltage sensor").

Lamb (1992) propose un modèle montrant le fonctionnement simultané du récepteur DHP comme canal calcique et "voltage sensor". Dans ce modèle, le fonctionnement du récepteur DHP comme canal calcique ou comme "voltage sensor" dépend de la mise en jeu de sous-unités des récepteurs DHPs organisées en tétramères, ces sous-unités ayant des cinétiques d'activation différente. Parmi les sous-unités composant le récepteur DHP, trois ont une cinétique d'activation rapide et la quatrième a une cinétique lente. Un récepteur DHP peut fonctionner comme canal calcique voltage-dépendant lorsque la sous-unité à cinétique lente "Slow step" est activée. Le "voltage sensor" qui assure la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS suite à la dépolarisation de la membrane tubulaire est fonctionnel lorsque quatre récepteurs DHPs couplés à un récepteur du RS mettent en activité chacun une sous-unité à cinétique rapide "Fast step" (ces propos sont illustrés sur la figure H8B).

En dépit de ces multiples hypothèses, la question de savoir si le récepteur DHP joue le rôle de canal calcique et de "voltage sensor" reste posée car il est difficile d'expliquer pourquoi une partie de la contraction est due aux canaux calciques (POTREAU et RAYMOND, 1980a et b; ILDEFONSE et coll., 1985) et pourquoi la levée d'inhibition par lavage après la nifédipine (antagoniste calcique) était plus rapide pour la contraction que pour le courant calcique (COGNARD et al., 1990).

## **B - LES MOUVEMENTS DE CHARGE ET LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.**

### **I - Origine des mouvements de charge.**

Les mouvements de charge sont des signaux électriques engendrés par le déplacement intramembranaire de complexes chargés sous l'influence du potentiel. Ils sont asymétriques et reflètent le changement conformationnel des protéines associées à l'ouverture des canaux : gating current (AMSTRONG et BEZANILLA., 1973; ADAMS et GAGE, 1976) ou associées à la libération du calcium du RS (SCHNEIDER et CHANDLER, 1973).

Ce sont donc des molécules protéiniques chargées électriquement qui génèrent du courant sous l'effet du potentiel. La quantité de charge (Q) générée est fonction du potentiel et suit une distribution de BOLTZMAN:

$$Q = Q_{\max}/(1+e^{-(v-\bar{v})/k}), \text{ où:}$$

$Q_{\max}$  est la quantité maximale de charge

$\bar{v}$  est le potentiel de la demi-activation

$v$  est le potentiel imposé

$K$  est la valeur de la pente (mV)

Les mouvements de charge ont été établis sans équivoque quand ces courants asymétriques ont été restaurés par injection de l'ADN qui code pour le récepteur DHP dans le muscle dysgénique (ADAMS et al., 1990). Ils ont été enregistrés dans les conditions de voltage impose sur des préparations dont les perméabilités ioniques sont inhibées et les courants capacitifs supprimés par soustraction.

### **II - Les différents types de mouvement de charge.**

Il existe deux types de mouvement de charge (charge 1 et charge 2) différents en fonction de la gamme de potentiels dans lesquels ils s'activent.

#### **1 - La charge 1.**

La charge 1 s'active dans une gamme de potentiel située entre -90mV et 0mV dans une fibre polarisée normalement (SCHNEIDER et CHANDLER, 1973; CHANDLER et al., 1976a). Des expériences utilisant essentiellement le calcium comme cation divalent extracellulaire révèlent que la quantité maximale de charge ( $Q_{\max}$ ) de la charge 1 se situe entre 20 à 40 nC/ $\mu$ F, avec un potentiel de demi-activation ( $\bar{v}$ ) situé entre -50mV et -15mV et un



facteur de pente K entre 7 et 21,5 mV (Pour revue, voir RIOS et PIZARRO, 1991; RIOS et al., 1992). Il y aurait deux composantes cinétiquement distinctes au niveau de la charge:  $Q\beta$  et  $Q\gamma$  (ADRIAN et PERES, 1979). Une dépolarisation membranaire de -90 mV à -60 mV (potentiel seuil de la contraction) donne naissance à  $Q\beta$  à cinétique rapide et qui décroît de façon exponentielle. Quand l'amplitude de la dépolarisation augmente il se superpose une deuxième composante à cinétique lente appelée  $Q\gamma$ .  $Q\gamma$  se présente sous forme d'une bosse d'où le nom "hump" qu' on lui donne.  $Q\gamma$  apparaît donc au potentiel seuil de la contraction (HOROWICZ et SCHEIDER, 1981a,b; HUANG, 1981; LAMB, 1986). Il est bloqué comme la contraction par le dantrolène et la tétracaine (ALMERS et BEST, 1976; HUANG, 1981; HUI, 1983a,b). Il a été donc suggéré que  $Q\beta$  et  $Q\gamma$  sont différents,  $Q\beta$  serait situé dans le sarcolemme et  $Q\gamma$  dans la membrane tubulaire et serait directement couplé à la libération du  $Ca^{2+}$  du RS (ADRIAN et HUANG, 1984a,b; HUANG et PEAHEY, 1988). LAMB et WALSH, (1987) avaient quant à eux montré que  $Q\beta$  est d'origine tubulaire et se subdiviserait en deux sous-classes:  $Q\beta_i$  insensible à la nifédipine et  $Q\beta_s$  sensible à la nifédipine. D'autres résultats expérimentaux indiquent que  $Q\gamma$  ne serait pas une cause mais plutôt une conséquence de la libération du  $Ca^{2+}$  du RS (HOLLINGWORTH et MARSHALL, 1981; SIMON et BEAM, 1985). Un modèle fut proposé pour démontrer comment  $Q\gamma$  était généré par la libération du  $Ca^{2+}$  du RS (RIOS et PIZZARO, 1991). Dans ce modèle (Figure H9A), le "voltage sensor" est chargé négativement au niveau de la face cytoplasmique. Au repos ("voltage sensor" non activé) les canaux calciques du RS restent fermés (Figure H9Aa). La dépolarisation de la membrane jusqu'à une valeur de potentiel supérieure à la valeur seuil activant le "voltage sensor", génère le courant de charge ( $I\beta$ ) et libération du  $Ca^{2+}$  du RS, ceci entraîne une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Figure H9Ab). Ce  $Ca^{2+}$  va se fixer sur les sites chargés négativement au niveau de la face cytoplasmique du "voltage sensor", augmente la dépolarisation de la membrane tubulaire et déplace une quantité de charge supplémentaire ( $I\gamma$ ) (Figure H9Ac). Tout se passe comme si c'était un mécanisme de "feedback" positif. Il est cependant signalé que le pic de courant ( $I\gamma$ ) peut parfois précéder de plusieurs millisecondes celui du signal calcique (CSNERNOCH et al., 1988) ce qui est difficile à interpréter si l'on admet que  $I\gamma$  est une conséquence de la libération de  $Ca^{2+}$ . L'origine et le rôle de  $Q\beta$  et  $Q\gamma$  dans le processus d'activation de la contraction reste à résoudre.

## 2 - La charge 2 ( $Q\alpha$ ).

La charge 2 s'active dans une gamme de potentiel située entre -200mV et -90 mV dans une membrane maintenue dépolarisée (SCHNEIDER et CHANDLER, 1973; ADRIAN et ALMERS, 1976a,b; CHANDLER et al., 1976a,b). Son  $Q_{max}$  se situe autour 45 nC/ $\mu$ F, le potentiel de demi-activation autour de -100 mV et K variant entre 19 et 39 mV. Quand on maintient dépolarisée la préparation il y a une décroissance exponentielle de la charge 1 et disparition de la libération du  $Ca^{2+}$  du RS. La charge 1 et la contraction sont restaurées quand on revient à la polarisation normale de la membrane. Quand on maintient la préparation à la polarité normale, on diminue la charge 2. RIOS et al., (1989) ont montré que la charge 2 est diminuée de 30 à 60 % à un potentiel de membrane de -90mV.

La charge 2 reste difficile à mesurer compte tenu des difficultés à enregistrer les mouvements de charge à des potentiels très négatifs avec les techniques de double ou de triple sucrose gap (CHANDLER et HUI, 1991; RIOS et al., 1992).



### **Figure H9**

A - Schéma montrant la configuration des mouvements de charge dans la zone triadique (espace entre membrane tubulaire et membrane du RS) au repos "resting" et après dépolarisation de la membrane tubulaire qui génère  $I_{\beta}$  et  $I_{\gamma}$ .

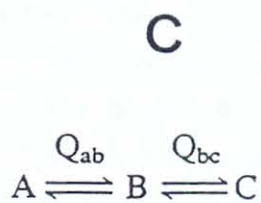
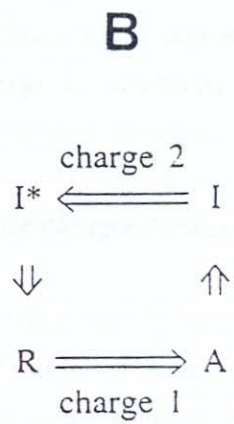
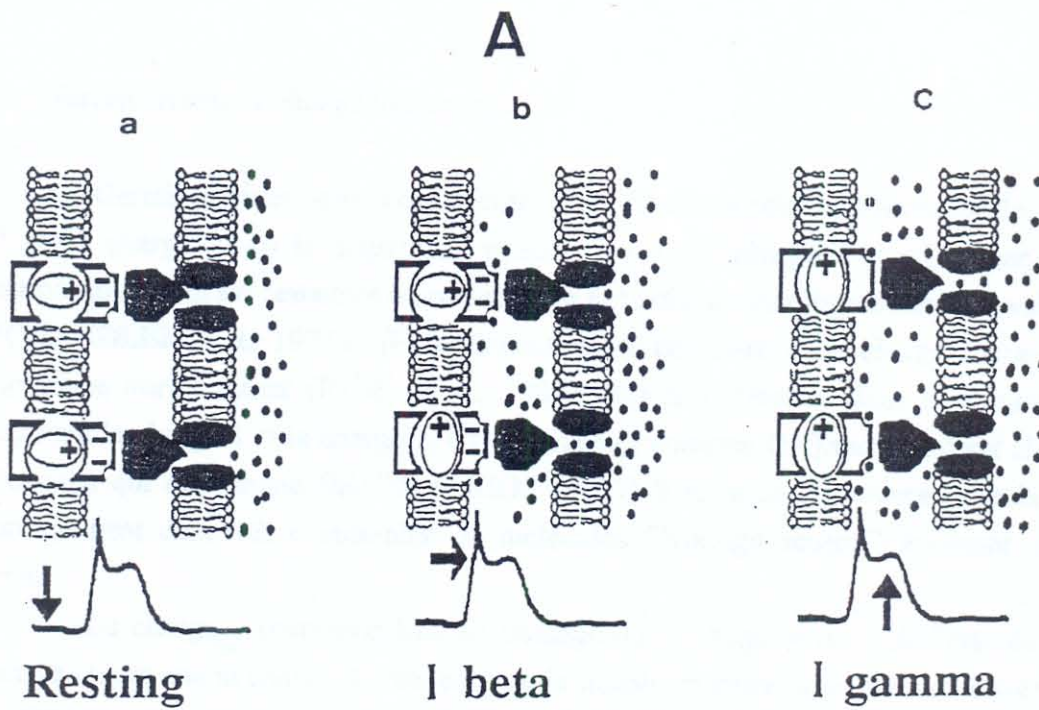
D'après RIOS et PIZARRO, (1991).

B - Diagramme montrant l'interconversion charge 1/charge 2. La charge 1 correspond au passage du "voltage sensor" de l'état de repos à l'état activé et la charge 2 au passage entre deux états inactivés. Les transitions horizontales sont dépendantes du potentiel alors que les verticales sont indépendantes du potentiel.

D'après BRUM et RIOS, (1987).

C - Modèle simple du "voltage sensor" à trois états (A,B,C). Les transitions  $Q_{ab}$  et  $Q_{bc}$  sont dépendantes du potentiel et rendent compte de la sensibilité du système au potentiel quelque soit l'état dans lequel il se trouve.

D'après MELZER et al., (1986).





### **3 - Interconversion charge1/charge2.**

Certaines observations ont permis d'imaginer une relation fonctionnelle entre la charge 1 et la charge 2: (i) la disparition progressive de la charge 1 pendant une dépolarisation maintenue et qui est restaurée en ramenant le potentiel de membrane vers des valeurs négatives (CHANDLER et al., 1976a); (ii) la diminution, au contraire, de la charge 2 quand la cellule est polarisée normalement (RIOS et al., 1989); (iii) la différence dans la gamme de potentiel activant la charge 1 et la charge 2, (iv) les valeurs voisines de  $Q_{max}$  des deux charges sont des données qui ont amené BRUM et RIOS (1987) à émettre l'hypothèse que la charge 1 et 2 proviennent d'un même ensemble de molécules ("voltage sensor") évoluant entre plusieurs états.

La charge 1 correspondrait au passage du "voltage sensor" de l'état de repos à l'état activé tandis que la charge 2 émanerait de la transition entre deux états inactivés. RIOS et al., (1992) illustrent ces propos sur la figure H9B. Dans ce modèle les transitions horizontales sont dépendantes du potentiel alors que les verticales sont indépendantes du potentiel. Quand on impose une dépolarisation de longue durée le "voltage sensor" passe dans l'état inactivé et les mouvements de charge qui initialement s'exprimaient comme des charges de type 1 présentent alors les propriétés de la charge 2 caractéristique de l'état d'inactivation. Ce phénomène est connu sous le nom de interconversion charge1/charge 2.

### **4 - Le rôle des mouvements de charge dans le couplage excitation-contraction.**

Les observations décrites précédemment semblent lier l'activation des mouvements de charge et la libération du  $Ca^{2+}$  du RS. L'établissement de ce lien a amené certains chercheurs à étudier simultanément l'activation des mouvements de charge et le flux calcique.

Ainsi KOVACS et al., (1979) mesurant simultanément les mouvements de charge et le signal calcique montrent qu'il y a déplacement d'une grande quantité de charge avant que le flux calcique n'atteigne son maximum.

RAKOWSKI et al., (1985) avaient quant à eux montré une correspondance étroite entre le maximum de flux calcique et la quantité de charge déplacée.

MELZER et al., (1986) ont montré une relation proportionnelle entre le pic du flux calcique et la quantité de charge déplacée par des impulsions de potentiel variable en amplitude et en durée. Ils interprètent ces observations par un modèle simple de "voltage sensor" à trois états dans lequel l'activation des mouvements de charge entraîne la libération du  $Ca^{2+}$  du RS (Figure H9C). Les transitions ( $Q_{ab}$  et  $Q_{bc}$ ) entre les états (A,B,C) sont dépendantes du potentiel et la probabilité d'ouverture du canal du RS et proportionnelles à l'activité de l'état C.

Ce modèle permet de montrer que le "voltage sensor" est sensible au voltage quel que soit l'état dans lequel il se trouve.

Les différentes revues et les multiples travaux semblent donc relier la libération du  $Ca^{2+}$  à la composante  $\gamma$  de la charge I mais il reste cependant difficile d'attribuer à chaque type de charge et à leurs différentes composantes des rôles précis dans le processus du couplage excitation-contraction.



### *C - HYPOTHESE DE COUPLAGE MECANIQUE.*

L'une des hypothèses permettant d'expliquer la libération du calcium du RS par la dépolarisation de la membrane tubulaire est celle du couplage mécanique formulée par CHANDLER et al., (1976a). Cette hypothèse prône l'existence d'une liaison mécanique entre les molécules sensibles au potentiel situées dans la membrane tubulaire ("voltage sensor") et les canaux calciques situés dans la membrane du RS. Cette liaison mécanique pourrait se faire directement ou via des molécules intermédiaires. Des apports expérimentaux réalisés par BRANDT et al., (1990) semblent confirmer cette hypothèse. Ainsi ces auteurs ont isolé, à partir des techniques de chromatographie et l'électrophorèse, une protéine de 95 Kd qui lierait les sous-unités  $\alpha_1$  et  $\beta$  des récepteurs DHPs à la membrane du RS (Figure H10A). Ces auteurs montrent également qu'il y aurait une jonction entre récepteur DHP et le RS par l'intermédiaire d'enzymes glycolytiques: l'aldolase et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). CASWELL et al., (1991) rapportent que cette molécule de 95 Kd lie les récepteurs DHPs aux récepteurs à la ryanodine au niveau du muscle squelettique. Ils ont donné à cette protéine le nom triadine. Ainsi lors de l'activation des récepteurs DHPs par le potentiel il pourrait y avoir un changement conformationnel dans la protéine. Ce changement pourrait, par l'intermédiaire de la molécule de 95 Kd libérer directement le calcium du RS, mais entraînerait également la libération de l'inositol trisphosphate (IP3) fixé à l'aldolase et l'ATP fixé à la GAPDH. Le  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ATP, l'IP3 tous connus pour activer le canal calcique du RS vont conjuguer leurs effets pour moduler la contraction rapide initiée par le "voltage sensor".

**Figure H10**

A - Modèle de couplage direct entre récepteur DHP et membrane du RS par l'intermédiaire d'une protéine de 95 Kd. Ce couplage pourrait se faire également par l'intermédiaire d'enzyme glycolytique: la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GADP).

**T-tubule: membrane tubulaire.**

$\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ : les sous-unités du récepteur DHP.

T.C: citerne terminale.

JFP: protéine du pied (canal calcique du RS).

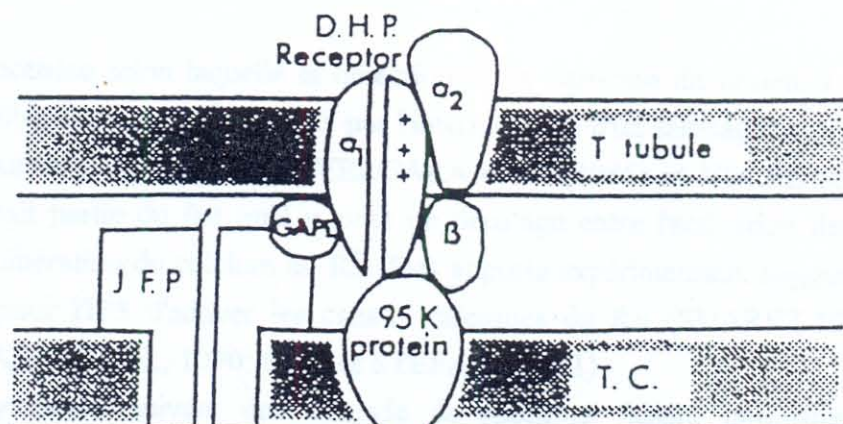
D'après BRANDT et al., (1990).

B - Schéma montrant la synthèse des messagers secondaires comme l'IP3 qui interviendrait dans le couplage biochimique.

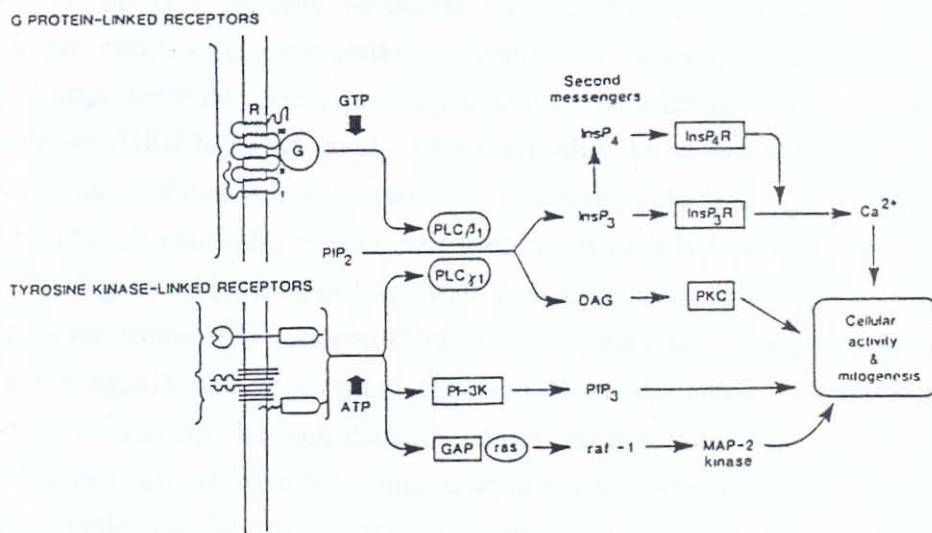
D'après BERRIDGE, (1993).



# A



# B



## **D - HYPOTHESE DE COUPLAGE BIOCHIMIQUE.**

L'hypothèse selon laquelle la détection de la variation de potentiel tubulaire pourrait induire une libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS par l'intermédiaire d'un messager secondaire (IP3) a été suggérée pour la première fois par VERGARA et al. (1985) et VOLPE et al. (1985). Cette hypothèse était partie du fait qu'il y avait un décalage entre l'activation des mouvements de charge et la libération du calcium du RS. Des apports expérimentaux suggèrent effectivement la capacité pour l'IP3 d'activer les canaux calciques du RS (SUAREZ-ISLA et al., 1988; ROJAS et JAIMOVICH., 1990; CHU et STEFANI, 1991).

L'IP3 est synthétisé suivant une cascade de réactions faisant intervenir l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3). Dans cette cascade, l'étape sensible à la variation du potentiel étant l'hydrolyse du phosphatidyl inositol diphosphate (PIP2) en DAG et en IP3 (VERGARA et al., 1985). BERRIDGE, (1993) a proposé un schéma montrant la synthèse possible de l'IP3 par un agoniste. L'agoniste se fixe sur son récepteur et active la phospholipase C- $\beta$ 1 qui par l'intermédiaire d'une protéine G entraîne la formation de l'IP3 et le DAG (Figure H10B).

Il a été signalé que le PIP2 est capable d'induire la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS dans le muscle squelettique. Le PIP2 activerait ces canaux calciques en augmentant leur probabilité d'ouverture (CHU et STEFANI, 1991).

Le rôle de l'IP3 comme messenger dans la transmission du couplage excitation-contraction est controversé par certains travaux. Sa concentration, y compris au repos, apparaît déjà importante de sorte qu'une augmentation significative durant une activité normale reste improbable (HEILMEYER et al., 1990). De plus, selon ces auteurs, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire inhiberait la formation des précurseurs de l'IP3 afin d'éviter une déplétion complète des phosphoinositides membranaires et favoriserait la formation de ces précurseurs à partir de l'IP3 (Figure H11). Le  $\text{Ca}^{2+}$  apparaît donc comme un régulateur du métabolisme des inositols et les variations de la concentration de l'IP3 comme la conséquence de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . Il a été signalé plus récemment (HANNON et al., 1992) que l'IP3 n'induit pas la contraction du muscle squelettique dans les conditions normales même à forte concentration mais il n'induit une activité contractile que lorsque la fibre est maintenue dans une solution de glycérol ou partiellement dépolarisée par une solution potassique (15 à 17 mM).

Il est donc difficile pour le moment de dire si l'IP3 pourrait jouer le rôle d'activateur dans le processus de couplage excitation-contraction du muscle squelettique.

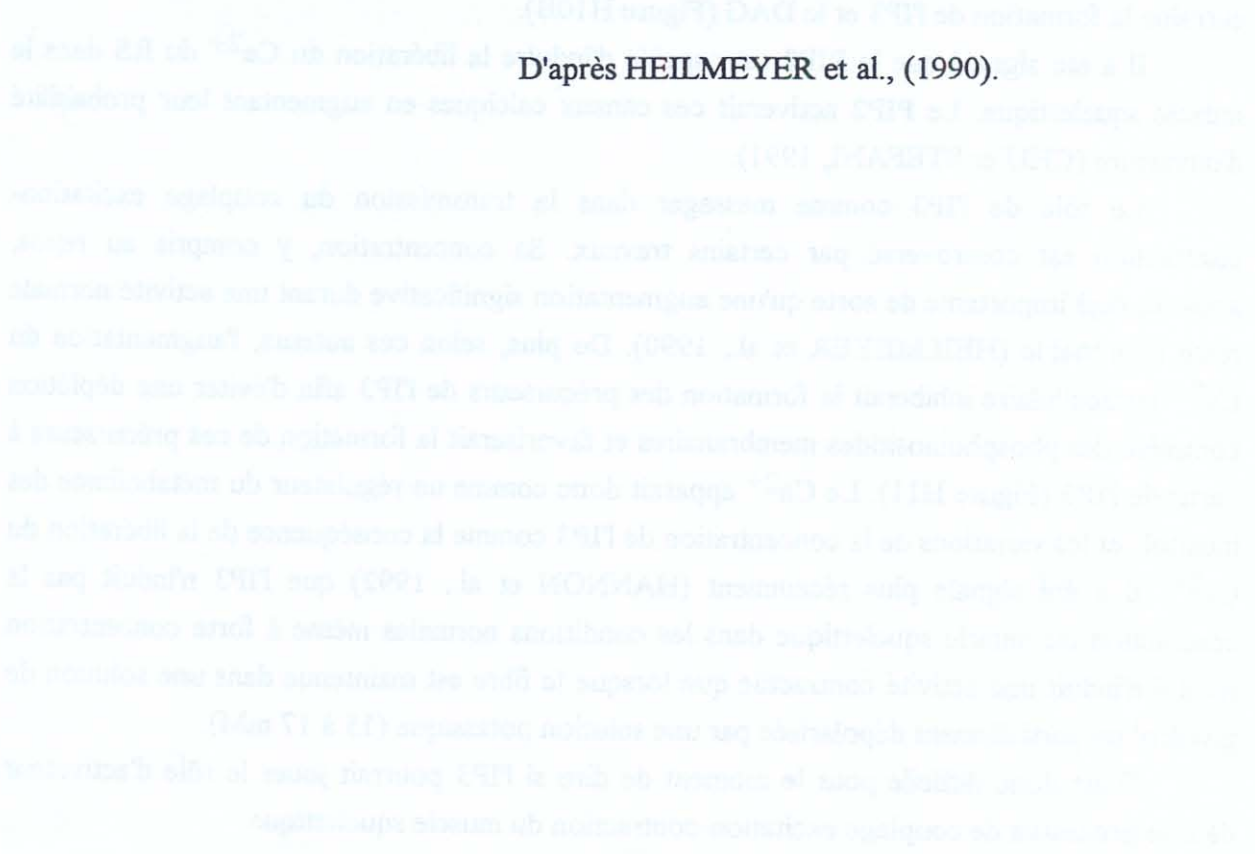


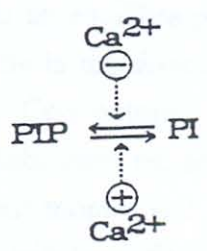
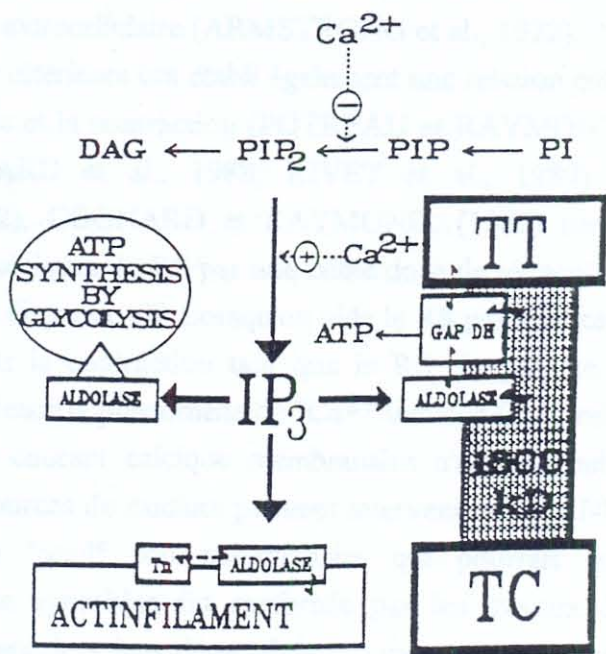
... la libération de  $Ca^{2+}$  du RS...  
... l'IP3...  
... la concentration de  $Ca^{2+}$ ...

**Figure H11**

Shéma montrant le rôle régulateur du  $Ca^{2+}$  dans le métabolisme des inositols et les molécules cibles de l'IP3 dans la zone triadique du muscle squelettique. La variation de la concentration de l'IP3 ne serait pas la cause mais la conséquence de la libération du  $Ca^{2+}$  du RS.

D'après HEILMEYER et al., (1990).







## ***E - AUTRES MECANISMES IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.***

### ***I - Mécanisme de "calcium induced calcium release" (CICR).***

C'est l'hypothèse selon laquelle le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule par les canaux calciques va déclencher la libération secondaire du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Cette hypothèse formulée par FRANK en 1958 ne pouvait guère expliquer le maintien de la contraction du muscle squelettique en absence de calcium extracellulaire (ARMSTRONG et al., 1972).

Des travaux ultérieurs ont établi également une relation entre l'entrée des ions divalents par le canal calcique et la contraction (POTREAU et RAYMOND, 1980a,b; ILDEFONSE et al., 1985; COGNARD et al., 1988; RIVET et al., 1989). De même POTREAU et RAYMOND, (1982), COGNARD et RAYMOND, (1985) ont montré que: (i) Lorsqu'on bloque les canaux calciques du RS par une faible dose de tétracaïne, la contraction dépendante du courant calcique disparaît. (ii) Lorsqu'on vide le RS par application de la caféine, le courant calcique n'induit pas la contraction tant que le RS n'a pas été rechargé. Ces observations mettent bien en évidence le phénomène de " $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release".

Même si le courant calcique membranaire n'est pas habituellement responsable du couplage d'autres sources de calcium peuvent intervenir et FRANK (1980) a émis l'hypothèse de l'existence d'un "pool" sous-membranaire qui pourrait être contrôlé par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Cette hypothèse fut renforcée par les travaux de LEOTY et NOIRAUD, (1987b) qui, sur le muscle soleus dénervé de rat, montrent qu'il existe du  $\text{Ca}^{2+}$  fixé à des sites intramembranaires. Ce pool calcique est maintenu en équilibre par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et par le potentiel de membrane. La dépolarisation de la membrane diminue l'affinité de ce site pour le  $\text{Ca}^{2+}$  qui est libéré dans le myoplasme. Ceci entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et induit une activité contractile probablement par le même mécanisme.

Des travaux réalisés dans cette optique ont montré que les canaux calciques du RS (récepteur à la ryanodine) réincorporés dans des vésicules étaient activables par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  eux-mêmes (ROUSSEAU et al., 1988; SMITH et al., 1988a,b). Comme viennent de démontrer VALDIVIA et al., (1992) il existe dans le RS jonctionnel du muscle squelettique de lapin un canal activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  et qui serait différent de celui activé par l'IP3. GARCIA et al., (1991b) ont pourtant montré qu'en présence d'une forte concentration d'EGTA intracellulaire le flux de libération calcique continuait d'avoir lieu. En fait plusieurs mécanismes pourraient être présents avec deux composantes de libération calcique: l'une dans le temps fait appel au "voltage sensor" et est déclenchée directement par la variation de potentiel de membrane, l'autre, transitoire, responsable du pic de calcium libéré, est contrôlé par un mécanisme de CICR où le calcium libéré par le mécanisme précédent vient activer une nouvelle libération. A l'appui de



cette idée JACQUEMOND et al., (1991) montrent que la libération de type transitoire peut être bloquée spécifiquement par le tampon calcique BAPTA injecté intracellulairement. Même si l'hypothèse de "calcium induced calcium release" semble être secondaire dans le mécanisme de couplage excitation-contraction, elle reste tout de même crédible et pourrait intervenir lors de réponses soutenues.

## *II - Mécanisme de "sodium induced calcium release".*

C'est l'hypothèse selon laquelle les ions sodium pénétrant dans la cellule par les canaux tubulaires vont induire la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Cette hypothèse émane des travaux de CAILLE et al., (1978) qui ont montré que le remplacement des ions sodium externes par le lithium diminue la contraction mais le décours et les conditions de déclenchement du potentiel d'action ne sont pas changés. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de POTREAU et RAYMOND, (1982) qui ont montré qu'en présence de 0  $\text{Ca}^{2+}$  externe l'entrée du sodium par un canal lent déclenche une activité contractile.

Parallèlement aux canaux calciques, le RS possède des canaux potassiques, anioniques (HALS et al., 1989) et protoniques (MEISSNER et YOUNG, 1980). Les canaux potassiques également perméables aux ions sodium paraissent localisée, pour une grande part, au niveau des citernes terminales (GARCIA et MILLER, 1984) et joueraient le rôle de canaux de contre-ion (assurant l'équilibre de charges de part et d'autre de la membrane du RS après largage du  $\text{Ca}^{2+}$ ) associé à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Ainsi ABRAMCHECK et BEST (1989) ont montré sur fibre pelée de grenouille le rôle fondamental de la concentration intracellulaire en ions monovalents dans le contrôle de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. De plus les travaux de ALLARD et ROUGIER (1992) montrent que l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans la cellule amplifie la contraction tétranique alors que si on remplace  $\text{Na}^+$  par  $\text{Li}^+$ , il y a une diminution de l'amplitude du plateau de la contraction tétranique, l'effet étant réversible. Les ions  $\text{Na}^+$  intracellulaires (aux voisinages des citernes terminales) peuvent contribuer au flux de contre-ion associé à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, ce qui expliquerait le mécanisme de " $\text{Na}^+$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release" intervenant dans le couplage excitation-contraction. Ces propos sont illustrés sur la figure H12.

### ***Figure H12***

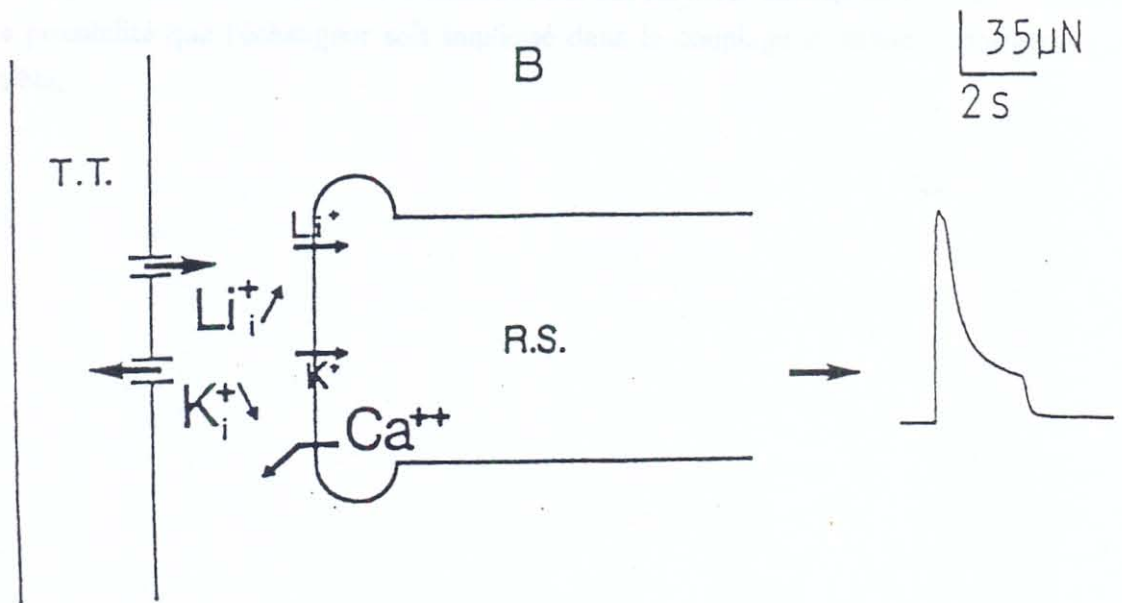
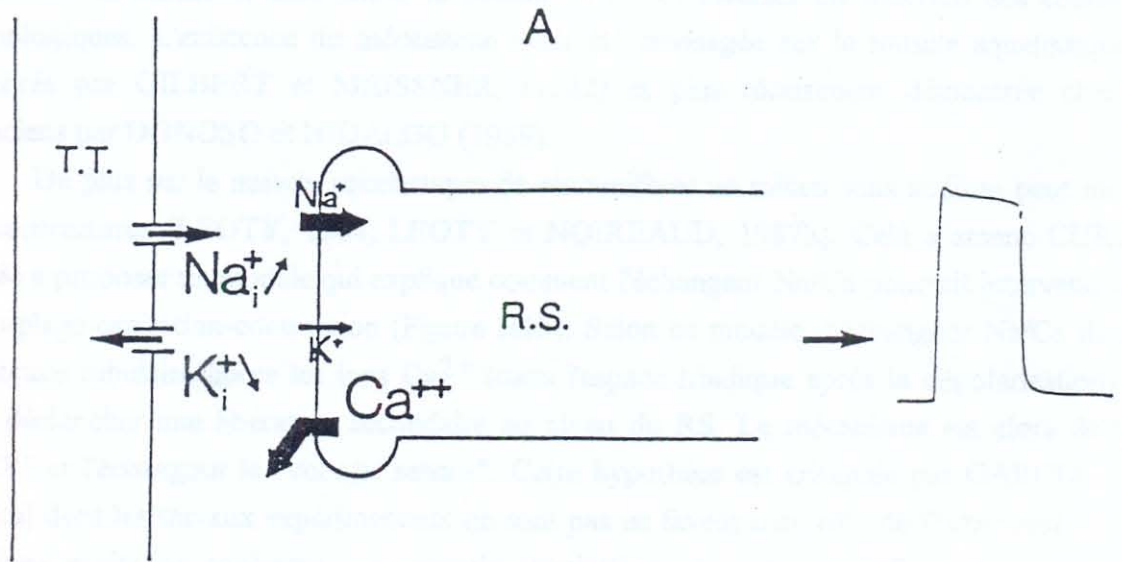
Schéma montrant l'hypothèse de " $\text{Na}^+$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release" dans le muscle squelettique.

A: L'augmentation de  $\text{Na}^+$  dans l'espace triadique dans les situations de téтанos physiologiques entraîne son entrée dans le RS par le canal de contre-ion et provoque parallèlement la libération du calcium. La contraction qui en résulte présente un plateau ample.

B: La faible perméance du  $\text{Li}^{2+}$  à travers le canal de contre-ion entraîne une libération restreinte de  $\text{Ca}^{2+}$  et une activité contractile qui présente un plateau réduit.

D'après ALLARD et ROUGIER, (1992).





### *III - L'échangeur Na/Ca.*

C'est un système de régulation de l'homéostasie calcique qui fonctionne pour sortir le calcium de la cellule et faire entrer le sodium et peut s'inverser en fonction des conditions physiologiques. L'existence du mécanisme avait été envisagée sur le muscle squelettique de vertébrés par GILBERT et MEISSNER, (1982) et plus récemment démontrée chez les batraciens par DONOSO et HIDALGO (1989).

De plus sur le muscle squelettique de mammifères un milieu sans sodium peut induire des contractures (LEOTY, 1984; LEOTY et NOIREAUD, 1987a). Cela a amené CURTIS, (1988) à proposer un modèle qui explique comment l'échangeur Na/Ca pourrait intervenir dans le couplage excitation-contraction (Figure H13). Selon ce modèle, l'échangeur Na/Ca dans la membrane tubulaire libère les ions  $Ca^{2+}$  (dans l'espace triadique après la dépolarisation) qui vont déclencher une libération secondaire au niveau du RS. Le mécanisme est alors de type "CICR" et l'échangeur le "voltage sensor". Cette hypothèse est critiquée par GARCIA et al. (1992a) dont les travaux expérimentaux ne sont pas en faveur d'un rôle de l'échangeur dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique de grenouille. En effet ces auteurs montrent que le  $Na^+$  extracellulaire n'a aucun effet sur les mouvements de charge et ils pensent que la possibilité que l'échangeur soit impliqué dans le couplage excitation-contraction reste très faible.

**Figure H13**

Modèle de l'échangeur Na/Ca intervenant dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique.

A: Repos musculaire, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont fixés à un site extracellulaire et  $\text{Na}^+$  se fixe à ce même site au niveau intracellulaire dans la membrane tubulaire.

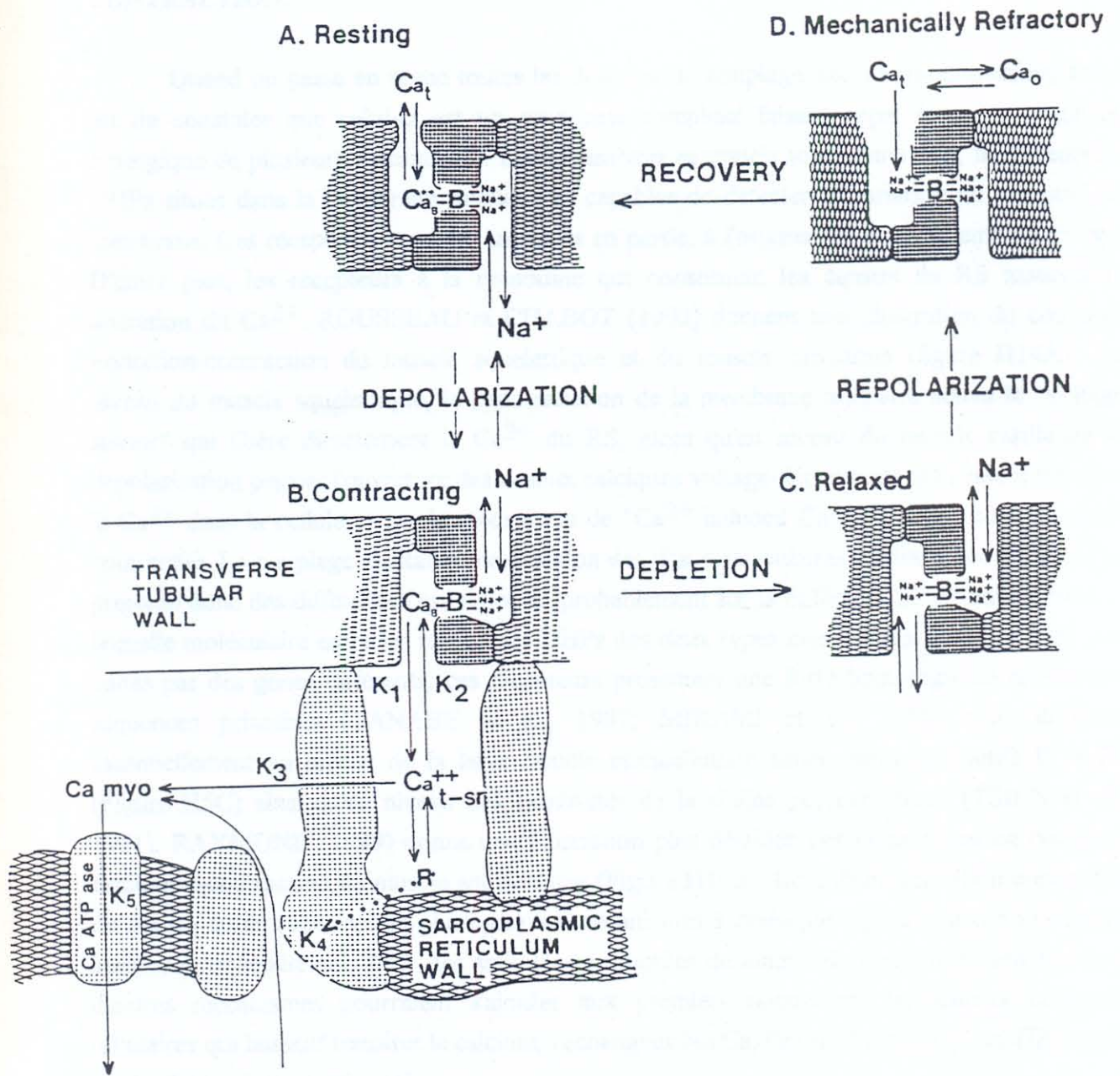
B: La dépolarisation de la membrane tubulaire entraîne une orientation du site de  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'intérieur et le site de  $\text{Na}^+$  vers l'extérieur. Ainsi le  $\text{Ca}^{2+}$  sera libéré dans l'espace triadique et entraîner le mécanisme de " $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release" et activation de la contraction.

C: Une dépolarisation prolongée entraîne une déplétion de  $\text{Ca}^{2+}$  conduisant à la relaxation de la contraction.

D: La repolarisation musculaire remet le système d'échangeur dans son état initial avec le site calcique extracellulaire et le sodique en intracellulaire.

D'après CURTIS, (1988).





## **F - RESUME DES DIFFERENTS MECANISMES DE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.**

Quand on passe en revue toutes les données du couplage excitation-contraction, force est de constater que celui-ci est un processus complexe faisant appel à une conjugaison synergique de plusieurs mécanismes. Les paramètres essentiels sont, d'une part, les récepteurs DHPs situés dans la membrane tubulaire et capables de détecter la variation du potentiel de membrane. Ces récepteurs seraient, au moins en partie, à l'origine des mouvements de charge. D'autre part, les récepteurs à la ryanodine qui constituent les canaux du RS assurent la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ . ROUSSEAU et CHABOT (1992) donnent une illustration du couplage excitation-contraction du muscle squelettique et du muscle cardiaque (figure H14A). Au niveau du muscle squelettique, la dépolarisation de la membrane tubulaire active le "voltage sensor" qui libère directement le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, alors qu'au niveau du muscle cardiaque la dépolarisation permet l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants qui laissent transiter le  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et par le mécanisme de " $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release" induit l'activité contractile. Le couplage excitation-contraction des tissus musculaires cardiaque et squelettique présente donc des différences qui reposent probablement sur la différence structurale existant à l'échelle moléculaire entre les récepteurs DHPs des deux types musculaires. En effet, bien que codés par des gènes différents, ces récepteurs présentent une forte homologie au niveau des séquences primaires (TANABE et al., 1987; MIKAMI et al., 1989) mais diffèrent essentiellement au niveau de la large boucle intracellulaire située entre les motifs II et III (Figure H5C) ainsi qu'au niveau des extrémités de la chaîne polypeptidique (TSIEN et al., 1991). RAYMOND (1989) donne une illustration plus détaillée des mécanismes de couplage excitation-contraction du muscle squelettique (Figure H14B). Lors d'une activation contractile de courte durée (contraction phasique) les mécanismes à cinétique rapide (comme le voltage sensor) interviendraient. Pour des activités contractiles de longue durée (contraction tonique) d'autres mécanismes pourraient s'ajouter aux premiers notamment les canaux calciques tubulaires qui laissent transiter le calcium, l'échangeur Na/Ca, l'inositol trisphosphate (IP3) et le pool calcique intramembranaire.

Qu'il nous soit donc permis de conclure que le couplage excitation-contraction reste un problème encore partiellement résolu et que des travaux supplémentaires méritent d'être réalisés pour définir avec certitude les mécanismes intervenant dans la contraction du muscle squelettique dans les conditions physiologiques. C'est aussi le cas du couplage excitation-contraction du muscle cardiaque où plusieurs hypothèses sont actuellement formulées dont celle du couplage direct entre récepteur DHP et canal calcique du RS (Pour revue voir CALLEWAERT, 1992).



### **Figure H14**

A: Schéma montrant le mode de couplage excitation-contraction au niveau du muscle squelettique (a) et au niveau du muscle cardiaque (b).

Au niveau du muscle squelettique, la dépolarisation du système T induit un changement de conformation du récepteur au dihydropiridine (DHP-R) qui serait communiqué au canal calcique du RS par l'intermédiaire de la triadine.

Au niveau du muscle cardiaque, le récepteur au DHP serait un canal calcique activé par la dépolarisation. Il permettrait l'entrée de  $Ca^{2+}$  et l'activation du canal calcique du RS. La présence de triadine est encore hypothétique au niveau du muscle cardiaque.

ST: membrane tubulaire transverse

MS: membrane de surface

RSL: réticulum sarcoplasmique longitudinal

RSJ: réticulum sarcoplasmique jonctionnel

CAL: calséquestrine

$\Delta V$ : variation de potentiel membranaire

Tr: triadine

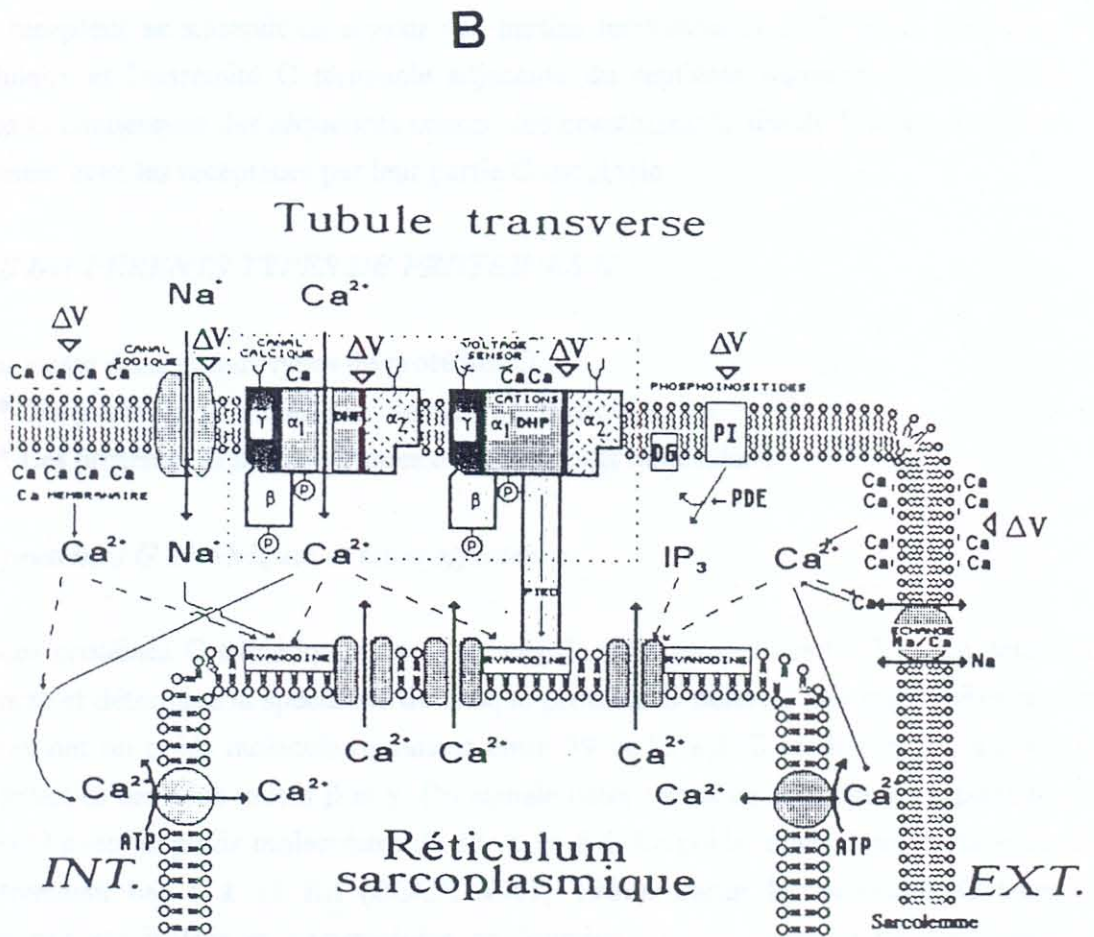
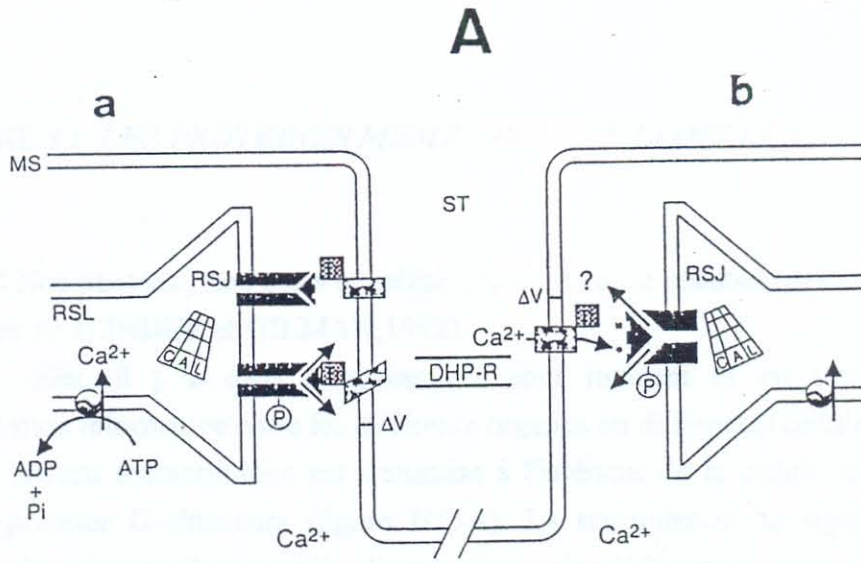
P-: site de phosphorylation

D'après ROUSSEAU et CHABOT, (1992).

B: Les différents mécanismes intervenant dans le couplage excitation-contraction. En trait plein: mécanismes intervenant pour des secousses isolées; en pointillé: mécanismes additionnels mis en jeu pendant les réponses contractiles de longue durée.

D'après RAYMOND, (1989).





### **CHAPITRE 3 : LES PROTEINES MEMBRANAIRES LIANT LE GTP (LES PROTEINES G).**

<< Nos pensées , nos actes et même notre existence résultent des communications entre nos cellules >> (LINDER et GILMAN,1992).

En effet, il y a dans l'organisme à tout moment et en tout lieu une certaine communication informative entre les différents organes ou différentes cellules. Cette information perçue au niveau extracellulaire est transmise à l'intérieur de la cellule suivant une cascade : récepteur-protéine G-effecteurs (figure H15A). La transmission du signal transmembranaire nécessitant la présence d'une protéine liant la Guanosine 5' 3' triphosphate (GTP) a été suggérée pour la première fois par RODBELL et al. (1971). Dès lors, de multiples travaux ont été entrepris pour acquérir plus de connaissances sur le sujet. Il en ressort aujourd'hui que les récepteurs couplés aux protéines G qui ont été clônés, constituent une grande famille de protéines contenant sept segments hydrophobes transmembranaires. La liaison entre la protéine G et le récepteur se situerait au niveau des parties terminales N et C de la troisième boucle intracellulaire et l'extrémité C terminale adjacente du septième segment (Figure H15B). Les protéines G contiennent des séquences conservées constituant le site de fixation du GTP et elles interagissent avec les récepteurs par leur partie C terminale.

#### **A - LES DIFFERENTS TYPES DE PROTEINES G.**

Il existe deux grands types de protéines G:

- \* Les protéines G trimériques de haut poids moléculaire.
- \* Les protéines G monomériques de faible poids moléculaire.

##### **I- Les protéines G trimériques et leurs effecteurs.**

Les protéines G trimériques sont formées de trois sous-unités ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). La sous-unité  $\alpha$  est distincte et détermine la spécificité de chaque protéine G donnée. Les sous-unités  $\alpha$  connues jusqu'alors ont un poids moléculaire variant entre 39 et 52 Kd. Il semble qu'il y ait une moins grande diversité des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . On signale deux sortes de sous-unités  $\beta$  pour toutes les protéines G avec un poids moléculaire de 35 et 36 Kd. Le poids moléculaire de la sous-unité  $\gamma$  est relativement bas 5 à 11 Kd (BOCKAERT, 1989). Parmi les protéines G trimériques, plusieurs ont été isolées et caractérisées en fonction de leur poids moléculaire et de leur sensibilité vis à vis des toxines.

**Figure H15**

**A - Schéma montrant le transfert d'information entre récepteur, protéine G et effecteur.**

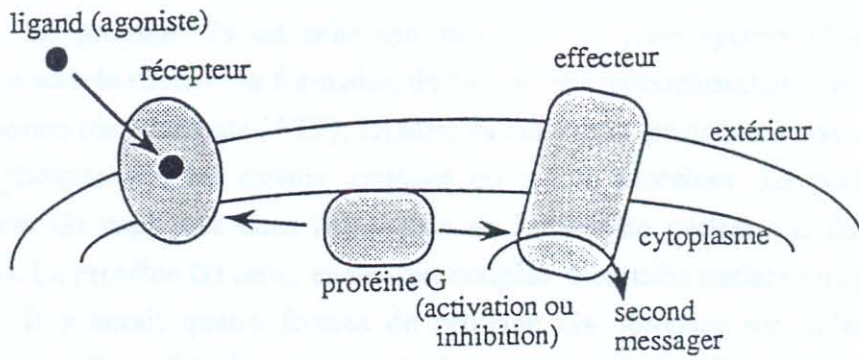
D'après SHECHTER, (1990).

**B - Schéma montrant les zones d'interaction entre récepteur membranaire et protéine G.**

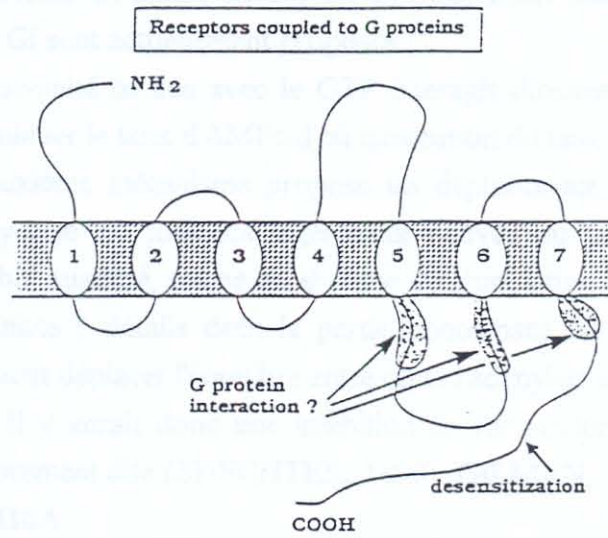
D'après BOCKAERT, (1989).



A



B



## 1- La protéine Gs

La protéine Gs est celle qui stimule l'adénylate cyclase (Figure H16A). L'adénylate cyclase activée catalyse la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine trisphosphate (ATP); l'AMPc va activer les protéines kinases AMPc-dépendantes qui vont phosphoryler les canaux ioniques ou autres protéines. La purification complète de la protéine Gs impliquée dans l'activation de l'adénylate cyclase est due à NORTHROP et al. (1983). La protéine Gs serait également couplée à certains canaux ioniques (voir tableau 1).

Il y aurait quatre formes de protéine Gs obtenues par clonage d'un seul messenger précurseur. Toutefois il n'a pas été signalé si les quatre formes différentes présentaient une diversité fonctionnelle et si il y avait une spécificité tissulaire. La protéine Gs est sensible à la toxine cholérique (CTX) de *Vibrio cholerae* et se retrouve dans la plupart des tissus ou organes cellulaires.

## 2 - La protéine Gi

La protéine Gi inhibe l'adénylate cyclase. Deux mécanismes d'inhibition de l'adénylate cyclase par la Gi sont actuellement proposés :

La sous-unité  $\alpha$  liée avec le GTP interagit directement avec l'adénylate cyclase pour l'inhiber et diminuer le taux d'AMPc d'où diminution du taux de phosphorylation des protéines.

Le deuxième mécanisme propose un déplacement d'équilibre par les sous-unités  $\beta\gamma$ . L'adénylate cyclase est toujours légèrement activée du fait d'une interaction avec  $\alpha$ s(GTP) présent en faible quantité, même en absence de stimulation hormonale. Quand  $\alpha$  se sépare des autres sous-unités (détails dans la partie concernant les mécanismes de transduction), le complexe  $\beta\gamma$  peut déplacer l'équilibre entre  $\alpha$ s et l'adénylate cyclase formant un complexe inactif  $\alpha$ s(GDP)- $\beta\gamma$ . Il y aurait donc une inhibition de l'activation basale par  $\alpha$ (GTP) plutôt qu'une inhibition proprement dite (SHECHTER, 1990). GILMAN, (1987) illustre ces deux mécanismes sur la figure H16A.

La protéine Gi fut d'abord purifiée à partir du foie et des érythrocytes. Sa concentration dans les membranes semble être environ 10 fois plus importante que celle de Gs (HAMMOND et TRITSCH, 1990). A côté de l'action inhibitrice sur l'adénylate cyclase, la Gi serait couplée directement à certains canaux ioniques (voir tableau 1). Il y aurait trois formes de Gi (1,2,3) dont la différence fonctionnelle n'est pas encore bien connue quand bien même le tableau 1 montre des protéines Gi couplées à des canaux potassiques de conductance différente. On ignore si il y a spécificité tissulaire. La protéine Gi est sensible à la toxine pertussique (PTX) de *Bordetella pertussis*, elle a été identifiée dans plusieurs organes cellulaires.



### 3 - La protéine Go.

Cette protéine a été découverte pendant la purification de Gi à partir du foie de boeuf. La protéine Go modulerait les canaux ioniques (voir tableau 1) sans qu'il y ait intervention d'un second messenger (HAMMOND et TRITSCH, 1990). Il existerait deux types de protéine Go (1, 2) sans différence clairement établie. La protéine Go est sensible à la PTX et a été mise en évidence dans plusieurs organes ou tissus cellulaires.

### 4 - La protéine Gp.

La protéine Gp est couplée à la phospholipase C et donc impliquée dans le système de transduction des phosphoinositides conduisant à la formation de l'inositol trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). STERWEIS et SMRKA, (1992) signalent qu'au niveau des lignées cellulaires HL60 il existerait des formes de phospholipase C spécifique des phosphoinositides qui peuvent être régulées aussi bien par la sous-unité  $\alpha$  que par le complexe  $\beta\gamma$  de la protéine G. Ils ont ainsi proposé un schéma de cette régulation basé sur trois mécanismes:

(a) La sous-unité  $\alpha$  liée au GTP pourrait activer directement la phospholipase C et entraîner la formation de l'IP3 et du diacylglycérol (DAG) à partir de l'inositol diphosphate (PIP2),

(b) les sous-unités  $\beta\gamma$  peuvent réguler directement la phospholipase C,

(c) ou  $\alpha$ GTP ne se dissocie pas de  $\beta\gamma$  et le complexe  $\alpha$ GTP( $\beta\gamma$ ) régulerait la phospholipase C. Ces propos sont illustrés sur la figure H17.

Selon les travaux de MARTIN et al. (1991) sur les vésicules de cerveau de bovin, la phospholipase C serait couplée à deux protéines Gp : Gps qui stimule la phospholipase C est insensible à la PTX, Gpi qui inhibe la phospholipase C est sensible à la PTX. Certains auteurs utilisent l'appellation Gq pour désigner les protéines G impliquées dans la régulation de la phospholipase C (WU et al., 1992; HARDEN, 1992).

### 5 - La transducine (Gt).

C'est la protéine G assurant la photo excitation au niveau de la rétine. Les techniques de clonage de l'ADN ont permis de mettre en évidence deux transducines différentes dans la rétine du boeuf : une transducine dont la sous-unité  $\alpha$ t formée de 350 acides aminés, est présente dans les bâtonnets tandis que la transducine dont la sous-unité  $\alpha$ t formée de 354 acides aminés, est présente dans les cônes (HAMMOND et TRITSCH, 1990). Comme effecteur, la transducine est couplée à la phosphodiesterase, l'enzyme qui hydrolyse la guanosine monophosphate cyclique



**Figure H16**

A - Cycles régulateurs assurant le double contrôle (stimulation-inhibition) de l'activité de l'adénylate cyclase.

H: hormone

R: récepteur

G: protéine G

AC: adénylate cyclase.

D'après GILMAN, (1987).

B - Mécanisme de transduction du signal par les protéines G.

(a): état basal, récepteur (R) non activé

(b): activation du récepteur (R) par l'hormone (H)

(c): dissociation du complexe  $\alpha_{GTP}$  de  $\beta\gamma$

(d): activation des effecteurs ( $E_1$ ) et ( $E_2$ ) et conversion du substrat (S) en un produit

(P)

(e): hydrolyse du GTP en GDP + phosphore inorganique ( $P_i$ ) par la GTPase

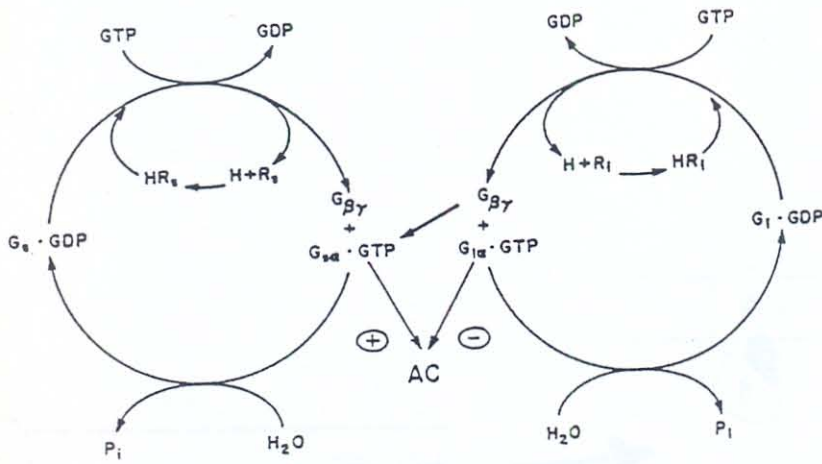
$\alpha, \beta, \gamma$  sont les sous-unités de la protéine G

GTP: guanosine trisphosphate

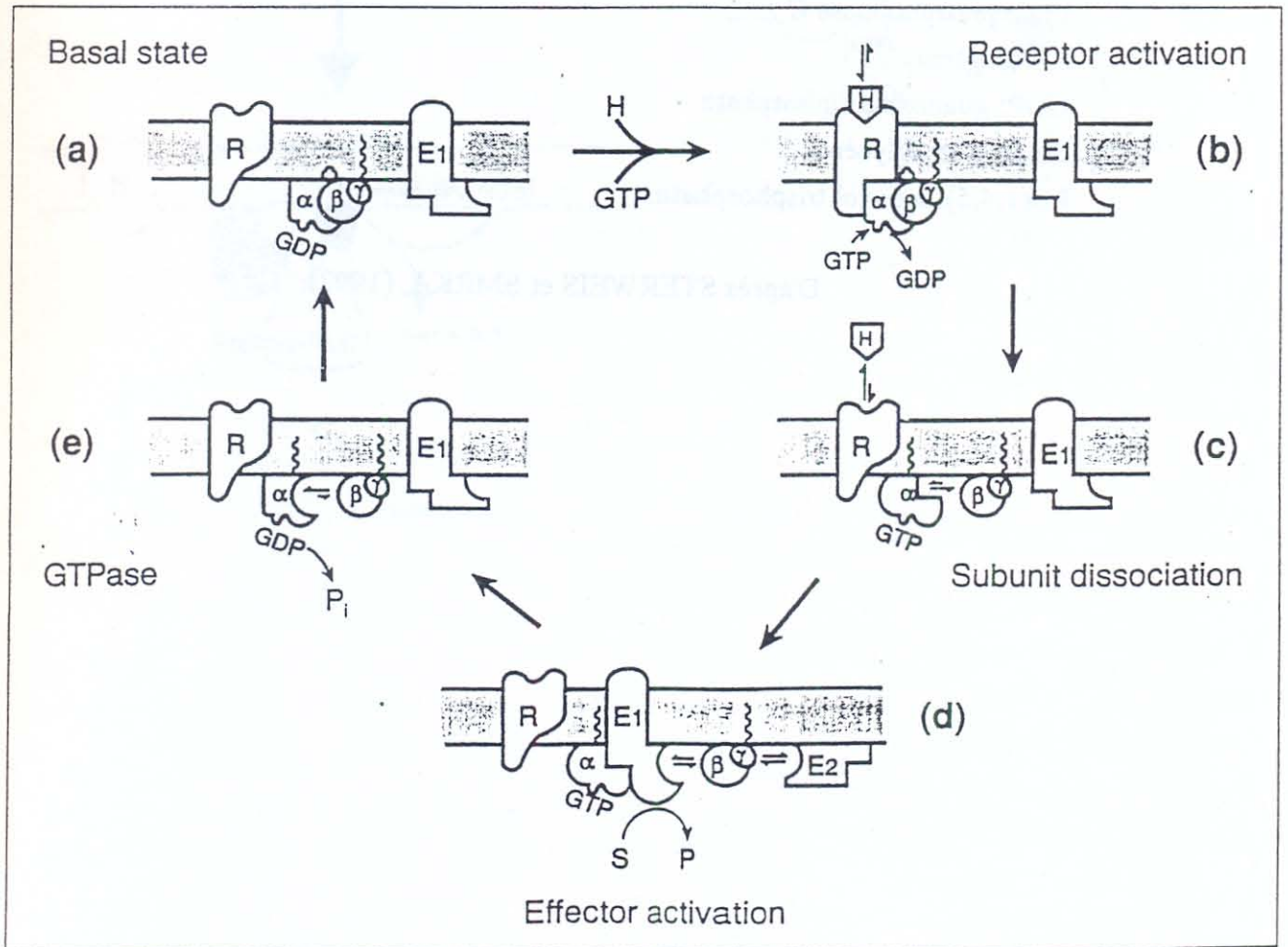
GDP: guanosine diphosphate.

D'après HEPLER et GILMAN, (1992).

A



B



**Figure H17**

Schéma montrant la régulation de la phospholipase C par les sous-unités  $\alpha$  (a),  $\beta\gamma$  (b) des protéines G ou par le complexe  $\alpha$ GTP $\beta\gamma$  (c).

Ptdins: phosphoinositides

PLC: phospholipase C

R: récepteur

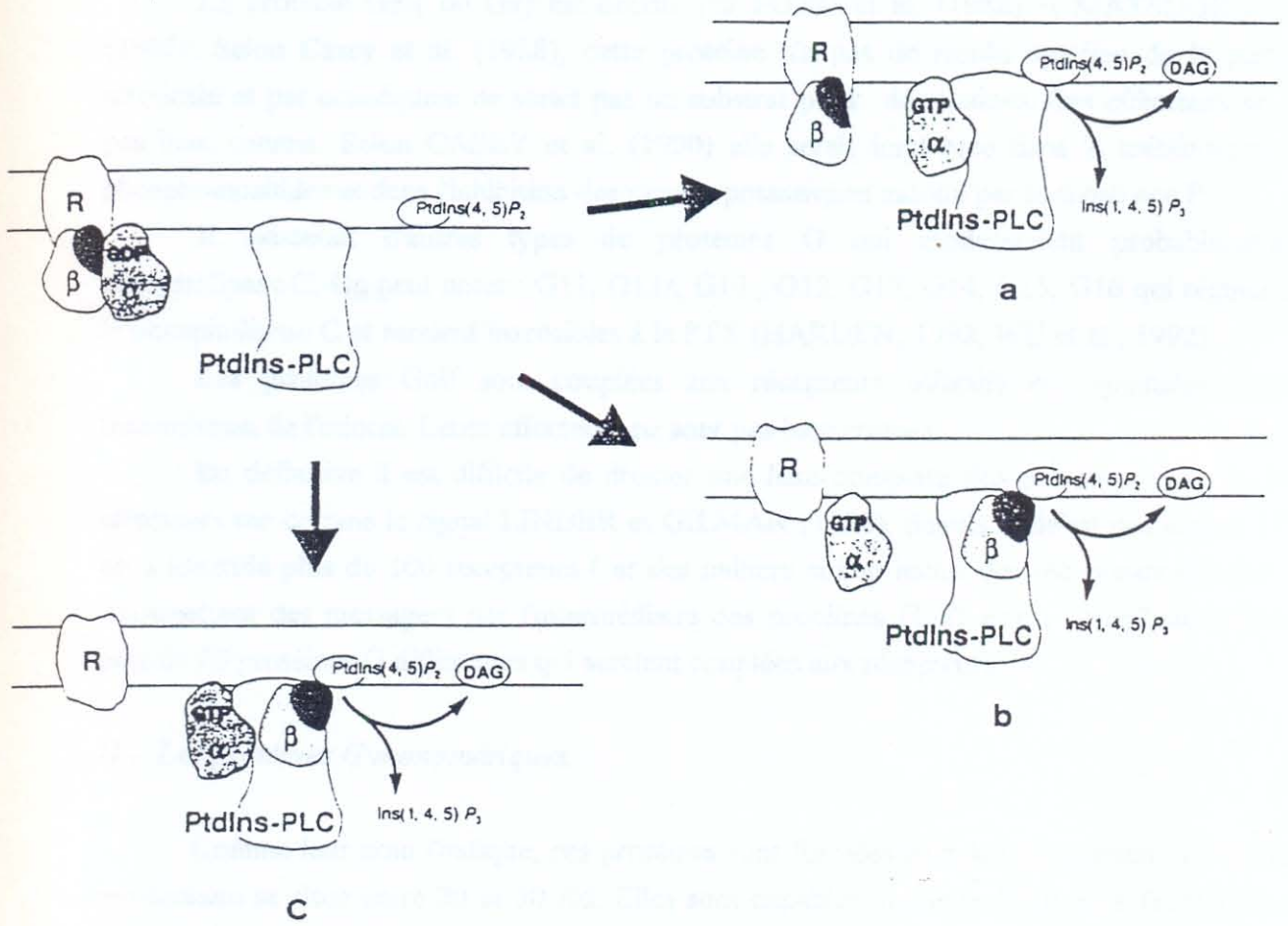
GDP: guanosine diphosphate

DAG: diacylglycérol

Ins(1,4,5): inositol trisphosphate.

D'après STERWEIS et SMRKA, (1992).





(GMPc) en guanosine monophosphate (5'-GMP). La transducine est sensible à la CTX et la PTX et n'est pas liée à la membrane comme la Gs et la Gi.

#### *6 - Autres protéines G trimériques.*

La protéine Gz ( ou Gx) est décrite par FONG et al. (1988) et MATSUOKA et al. (1988). Selon Casey et al. (1988), cette protéine n'a pas de résidu cystéine de la partie C terminale et par conséquent ne serait pas un substrat pour des toxines. Ses effecteurs ne sont pas bien connus. Selon CASEY et al. (1990) elle serait impliquée dans le métabolisme des phosphoinositides et dans l'inhibition des canaux potassiques induite par la substance P.

Il existerait d'autres types de protéines G qui moduleraient probablement la phospholipase C. On peut noter : G11, G12z, G10 , G12, G13, G14, G15, G16 qui réguleraient la phospholipase C et seraient insensibles à la PTX (HARDEN, 1992; WU et al., 1992).

Les protéines Golf sont couplées aux récepteurs olfactifs et impliquées dans la transmission de l'odorat. Leurs effecteurs ne sont pas bien connus.

En définitive il est difficile de dresser une liste complète des protéines G et de leurs effecteurs car comme le signal LINDER et GILMAN (1992), depuis le début des années 1980, on a identifié plus de 100 récepteurs ( et des milliers si l'on inclut des récepteurs olfactifs qui transmettent des messages par l'intermédiaire des protéines Golf) et on connaît actuellement plus de 20 protéines G différentes qui seraient couplées aux récepteurs.

#### *II - Les protéines G monomériques.*

Comme leur nom l'indique, ces protéines sont formées d'un seul monomère. Leur masse moléculaire se situe entre 20 et 30 Kd. Elles sont capables de lier le GDP et le GTP avec une forte affinité et possèdent une faible activité GTPasique. Elles présentent entre elles d'importantes homologues de séquence qui traduisent une organisation similaire de ces protéines en domaines structuraux et fonctionnels. Nous ne signalerons que quelques familles de ces protéines G monomériques.

La famille ras comprend notamment les protéines H-ras, K-ras, N-ras qui sont probablement impliquées dans la prolifération cellulaire (HALL, 1990). Il existe également la rasp21 impliquée dans l'inhibition du courant potassique muscarinique au niveau atrial (MARTIN et al. 1992). Il a été démontré aussi que la famille ras pouvait activer les canaux calciques au niveau du neurone (HESCHELER et al., 1991). Dans cette famille il y a aussi les protéines rap dont la fonction est encore inconnue.

La famille rho comprend les protéines rhoA, rhoB et rhoC qui semblent jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette, notamment du réseau constitué par les filaments d'actine.



Certaines protéines de cette famille (rac1, rac2) participent directement au contrôle de l'activité de la nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase: enzyme responsable de la production d'ions peroxydase.

La famille rab compte actuellement une trentaine de membres dont les protéines Ypt1, Sec4 qui jouent un rôle dans le processus de sécrétion chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Il existe deux autres familles de protéines de masse moléculaire voisine, également capables de lier et d'hydrolyser le GTP, et présentant des caractéristiques relativement différentes des protéines ras et rab, il s'agit de:

La protéine ran/Tc4 localisée dans le noyau des cellules serait impliquée dans le mécanisme de condensation de la chromatine (BISCHOFF et PONSTINGL, 1991).

Les protéines AFR, constituants majeurs du manteau des vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi, joueraient un rôle important dans la formation des vésicules de transport (Pour revue voir GUNZBURG, 1992).

Les petites protéines G constituent une classe d'au moins 50 familles et donc des travaux très importants pourront, être effectués pour les déterminer et comprendre au niveau cellulaire leur rôle régulateur dans la physiologie cellulaire. Il serait également intéressant de voir si ces petites protéines G constituent le substrat de certaines toxines.



**Ionic Channels Gated Directly by Proteins**

G $\alpha$ protein	Channel	Receptor	Tissue	References
$\alpha_i$ -3	K <sup>+</sup> , 40 pS, IR	M <sub>2</sub> , (ACh)	Atrium	Yatani et al., 1987a Codina et al., 1987b Mattera et al., 1989b Yatani et al., 1988
$\alpha_i$ -3	K <sup>+</sup> , 55 pS, ?R	M <sub>2</sub> , (ACh), SS	GH <sub>3</sub>	Codina et al., 1987a Yatani et al., 1987c
$\alpha_o$	K <sup>+</sup> , 55 pS, NR	Unknown	Hippocampus	VanDongen et al., 1988
	K <sup>+</sup> , 38 pS, NR	Unknown	Hippocampus	VanDongen et al., 1988
	K <sup>+</sup> , 38 pS, IR	5-HT1A	Hippocampus	VanDongen et al., 1988
	K <sup>+</sup> , 13 pS, NR	Unknown	Hippocampus	VanDongen et al., 1988
$\alpha_i$ -1	K <sup>+</sup> , 40 pS, IR	M <sub>2</sub> , (ACh)	Atrium	Yatani et al., 1988
$\alpha_i$ -2	K <sup>+</sup> , 40 pS, IR	M <sub>2</sub> , (ACh)	Atrium	Yatani et al., 1988
$\alpha_s$	Ca <sup>2+</sup> , DHP-sensitive, 25 pS	$\beta$ -AR	Atrium, ventricle	Yatani et al., 1987b Imoto et al., 1988
Splice variants of $\alpha_s$	Ca <sup>2+</sup> , DHP-sensitive, 10 pS	$\beta$ -AR	Skeletal muscle	Yatani et al., 1988
$\alpha_s$	Na <sup>+</sup> , TTX-sensitive	$\beta$ -AR	Atrium, ventricle	Schubert et al., 1989b
$\alpha_i$ -3	Epithelial Na <sup>+</sup>	Unknown	A6 cells	Light et al., 1989
$\alpha_i$ -3	Cation channel	Unknown	Kidney	Schwiebert et al., 1989 Cantiello et al., 1989
$\alpha_i$ -3	K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Unknown	RIN	Eddlestone et al., 1989
$\alpha_o$	K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Unknown	Skeletal muscle	Parent and Coronado, 1989
$\alpha_i$ -3	Cl <sup>-</sup>	Unknown	Kidney	Schwiebert et al., 1989 Cantiello et al., 1989
Unknown	K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub> , 260 pS	$\beta$ -AR	Myometrium	Ramos-Franco et al., 1989
Unknown	Ca <sup>2+</sup> , T-type	Unknown	Dorsal root ganglion	Ma and Coronado, 1988

IR, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel; NR, normal outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel; SS, somatostatin;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenoreceptor; RIN, rat insulinoma.

**TABLEAU 1:** D'après NATHANSON et HARDEN, (1989)

## B - TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES PROTEINES G.

### I - Mécanisme général de transduction du signal.

Les protéines G qui participent à la transmission transmembranaire des informations sont liées à la face interne de la membrane plasmique. Comme signalé précédemment, elles sont constituées de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . La transduction du signal, caractérisée par un cycle d'activation-inactivation des protéines G passe par une cascade de réactions:

(a) Au repos les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  forment un complexe lié au GDP par la sous-unité  $\alpha$ .

(b) Quand un agoniste se lie à son récepteur, il induit un changement de conformation de celui-ci et provoque sa liaison avec la protéine G.

(c) L'affinité de  $\alpha$  pour le GDP diminue et l'affinité pour le GTP augmente. Le GDP initialement lié à  $\alpha$  est libéré et le GTP va occuper les sites libérés par le GDP, en d'autres termes il y a transfert du GDP en GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$  (étape qui nécessite la présence des ions  $Mg^{2+}$ ). Ce transfert est catalysé par les nucléosides diphosphate kinase (NDPK) (KIKKAWA et al., 1990; SPIEGEL et al., 1992). Ceci provoque une dissociation entre  $\alpha$ GTP et  $\beta\gamma$ , dépendante de la température. La sous-unité  $\alpha$  activée peut rester liée au complexe  $\beta\gamma$  si la température se situe à 4°C, la dissociation nécessite une température de 30°C (BROWN et BIRNBAUMER, 1988). Il faut signaler que le récepteur activé agit comme un catalyseur: après avoir activé la protéine G, il reste activé et donc capable d'interagir avec une autre protéine G.

(d) Une fois activée et séparé de  $\beta\gamma$ ,  $\alpha$ GTP migre sur la face interne de la membrane plasmique jusqu'à ce qu'elle s'associe à un effecteur (enzyme ou canal). Dans certains systèmes, le complexe  $\beta\gamma$  peut interagir directement avec le même effecteur que celui de  $\alpha$  ou interagir avec un effecteur différent. L'effecteur (exemple de l'adénylate cyclase) activé par  $\alpha$ GTP va entraîner la formation d'un produit P(AMPC) à partir d'un substrat S (ATP).

(e) La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPasique intrinsèque ce qui permet l'hydrolyse de GTP en GDP (en présence du  $Mg^{2+}$ ). Cette hydrolyse permet à la sous-unité  $\alpha$  de retourner à son état inactivé et d'augmenter son affinité pour  $\beta\gamma$ . Il faut noter que l'activité GTPasique de  $\alpha$  est en général relativement lente et donc permet à  $\alpha$ GTP d'activer l'effecteur avant que l'hydrolyse n'ait lieu.

Le système retourne dans son état de repos quand  $\alpha$ GDP s'associe avec  $\beta\gamma$  et tout le complexe va se fixer sur la membrane. Ceci est illustré sur la figure H16B. Les protéines G servent donc d'interrupteurs et de minuteurs, déterminant à quel moment les voies de transmission de l'information doivent être ouvertes ou fermées, et pour combien de temps. Elles jouent également le rôle d'amplificateurs car un récepteur activé peut interagir quasi simultanément avec plus de 500 protéines G (exemple de la rhodopsine qui peut interagir avec



plus de 500 transducines). La régulation possible de ces protéines par les seconds messagers n'est pas encore bien établie. Toutefois, il a été rapporté que  $G_i$  était phosphorylable par la protéine kinase C (KATADA et al., 1985) mais les protéines  $G_i$  et  $G_o$  (sensibles à la PTX) et la protéine  $G_z$  (insensible à la PTX) ne seraient pas phosphorylables par les protéines kinases GMPc et AMPc-dépendantes (LINCOLN, 1991).

## ***II - Les outils pharmacologiques utilisés dans l'étude des mécanismes de transduction du signal par les protéines G.***

Afin de comprendre les mécanismes de transduction du signal par les protéines G, plusieurs outils pharmacologiques ont été utilisés, outils qui agissent à des niveaux différents du cycle d'activation-inactivation de ces protéines.

### ***1 - Les toxines.***

#### ***a - La toxine pertussique (PTX).***

La toxine de pertussis (toxine de la coqueluche) est synthétisée par une bactérie: *Bordetella pertussis*. C'est une exotoxine formée de deux protomères A et B. Le protomère A possède une activité enzymatique (HAUSMAN et BURNS, 1993). Il est constitué d'un seul polypeptide (S1) alors que le protomère B serait constitué de 5 polypeptides (S2, S3, 2S4, S5). La fixation de la toxine sur la membrane cellulaire se fait par l'intermédiaire des polypeptides S2, S3 ou S3, S4 du protomère B. Une fois la fixation faite, la toxine pénètre dans la cellule. Des nucléotides tels que l'ATP se fixent sur le protomère B et entraînent la libération du protomère A (KASLOW et BURNS, 1992) (Figure 18A). La sous-unité S1 (protomère A) va alors catalyser une réaction de ADPribosylation de la sous-unité  $\alpha_i$  de la protéine  $G_i$ . Cette réaction consiste à un transfert d'une ADP-ribose du NAD (nicotinamide adénine) à un résidu arginine de la sous-unité  $\alpha_i$  et empêche l'échange du GDP contre le GTP ce qui bloque la protéine sous sa forme inactive  $\alpha_i(\text{GDP})-\beta\gamma$ , la rendant incapable de répondre par une dissociation à l'activation du récepteur. Il y a donc levée de l'inhibition au niveau de l'adénylate cyclase (Figure H19A). Cette réaction d'ADPribosylation est similaire au niveau des protéines  $G_o$  et  $G_t$ .



### ***b - La toxine cholérique (CTX).***

Cette toxine est extraite d'une bactérie *Vibrio cholerae*. Elle est également formée de deux protomères A et B et comme dans le cas de la PTX, c'est le protomère B qui se fixe sur la surface de la membrane et la toxine pénètre dans la cellule par un phénomène d'endocytose (JANICOT et al., 1991) (Figure H18B). D'autres travaux rapportent que la CTX peut pénétrer directement dans la cellule sans passer par le phénomène d'endocytose (RIBI et al., 1988; FISHMAN, 1982). La sous-unité A de la CTX va catalyser le transfert d'une ADPribose du NAD sur la sous-unité  $\alpha$ s de la protéine Gs. Cette ADPriboseylation qui nécessite la présence d'un cofacteur AFR (une protéine G monomérique) (KAHN et GILMAN, 1986) inhibe l'activité GTPasique intrinsèque de  $\alpha$ s qui reste continuellement activée, stimulant en permanence l'adénylate cyclase d'où une augmentation importante du taux d'AMPc intracellulaire (Figure H19A).

### ***2 - Les analogues non hydrolysables du GTP.***

Comme nous l'avons déjà vu, la sous-unité  $\alpha$  des protéines G, une fois activée, ne retrouve son état inactivé qu'après hydrolyse du GTP par la GTPase. Il existe des analogues non hydrolysables du GTP ou du GDP qui une fois fixés sur  $\alpha$  ne peuvent pas être hydrolysés. Dans ce cas  $\alpha$  reste toujours activée ou inhibée selon la nature de l'analogue non hydrolysable. On peut citer:

Le  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (guanosine(3'-0-thio) triphosphate) et le  $\text{GppNHp}$  (5' guanilylimidodiphosphate) se fixent sur la sous-unité  $\alpha$  des protéines G et l'activent de manière continue car l'échange  $\text{GDP}-\text{GTP}\gamma\text{S}$  ou le  $\text{GDP}-\text{GppNHp}$  ne peut se faire. Il faut noter qu'il n'y a pas de spécificité car toutes les protéines G sont activées par ces analogues.

Le  $\text{GDP}\beta\text{S}$  se fixe sur la sous-unité  $\alpha$  des protéines G et les maintient dans leur état inactivé car l'échange  $\text{GDP}\beta\text{S}-\text{GTP}$  ne peut se faire. Dans ce cas, toutes les protéines G sont également concernées.

**Figure H18**

A - Schéma montrant la fixation de la Pertussis toxine sur la bicouche lipidique, sa pénétration et sa dissociation en protomères A et B. Le protomère A va catalyser le transfert d'une ADBribose du nicotinamide adénine (NAD) sur la protéine G (G).

S1: protomère A

S2, S3, S4, S5 protomère B

S-S: pont disulfure

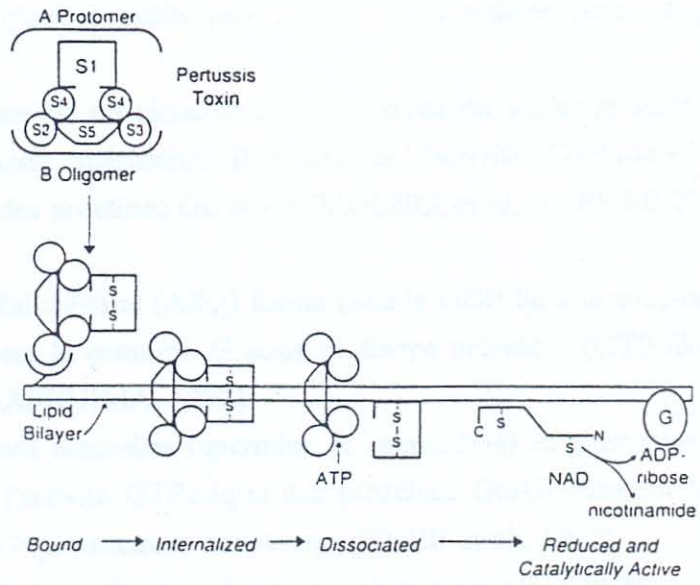
D'après KASLOW et BURNS, (1992).

B - Modèle montrant la fixation et la pénétration de la toxine cholérique à travers une membrane plasmique.

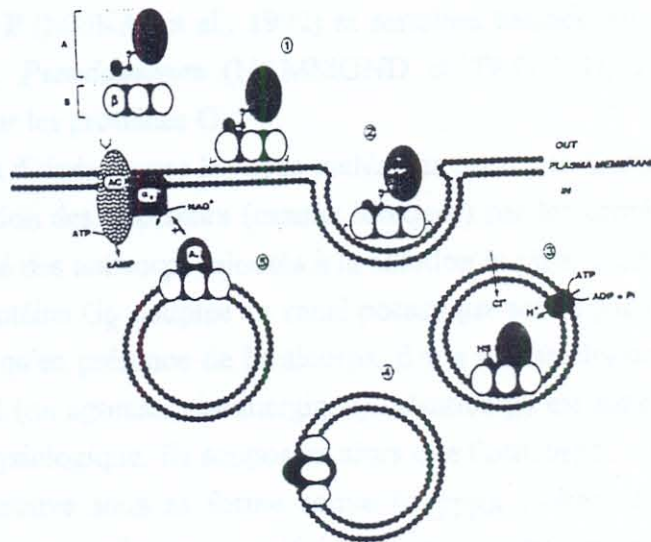
D'après JANICOT et al., (1991).



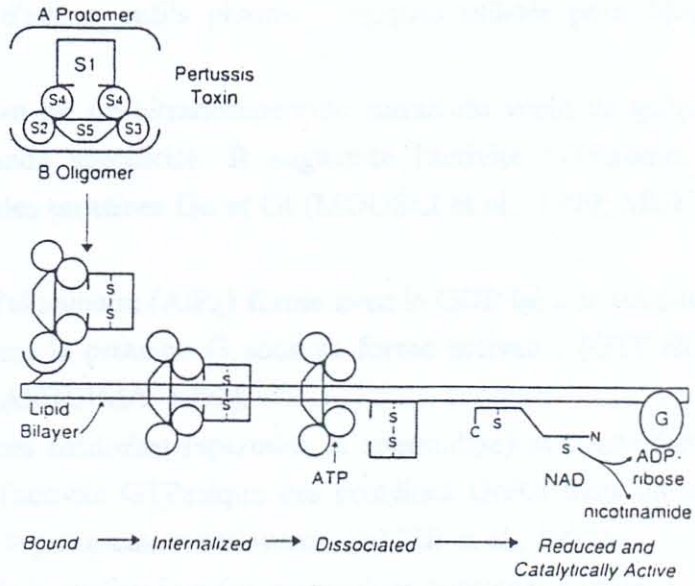
# A



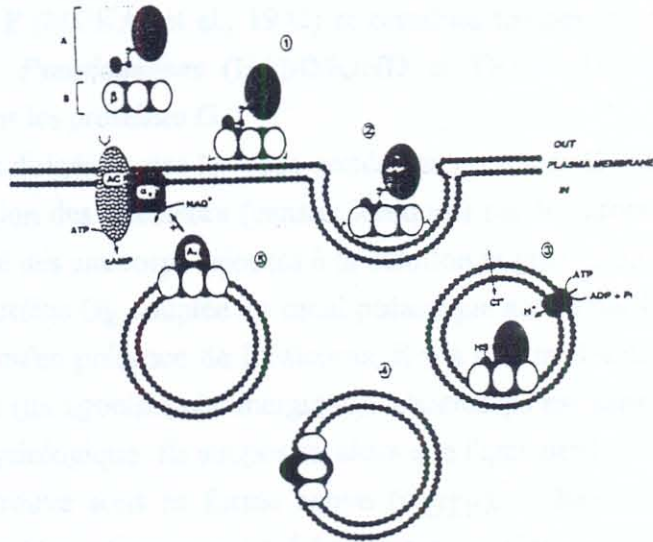
# B



# A



# B





### 3- Autres outils utilisés dans l'étude des mécanismes de transduction du signal par les protéines G.

Il existe bien d'autres outils pharmacologiques utilisés pour bloquer ou inhiber les protéines G.

\* Le mastoparan est un tétradécapeptide extrait du venin de guêpe qui stimulerait les protéines G sans grande spécificité. Il augmente l'activité GTPasique et la fixation des nucléotides au niveau des protéines  $G_o$  et  $G_t$  (MOUSLI et al., 1990; MUKAI, 1992; WINTER et al., 1992).

\* Le fluorure d'aluminium ( $AlF_4$ ) forme avec le GDP lié à la sous-unité  $\alpha$ , un complexe  $GDP-AlF_4$  qui maintient la protéine G sous sa forme activée : (GTP-like) (HAMMOND et TRITSCH, 1990; HIGASHIJIMA, 1992).

\* Les polyamines naturelles (spermine et spermidine) et biosynthétiques (putrescine et cadaverine) stimulent l'activité GTPasique des protéines  $G_o/G_i$  dans un ordre de puissance : spermine > spermidine > putrescine = cadaverine (BUEB et al., 1992).

\* Le chlorure de benzalkonium (un ammonium quaternaire utilisé comme antiseptique et désinfectant) a un effet inhibiteur sur la protéine  $G_i$  et un effet activateur sur la protéine  $G_o$ . Il antagonise de façon compétitive la stimulation de  $G_i$  par le mastoparan et favorise l'échange de nucléotides (GDP en GTP) sur la sous-unité  $\alpha$  de  $G_o$  (HIGASHIMA et al., 1990; BUEB et al., 1992).

\* La substance P (MUKAI et al., 1992) et certaines toxines telles que les exotoxines de *C. diphtheria*, *E. coli*, *Pseudomonas* (HAMMOND et TRITSCH, 1990) ont été signalées comme pouvant agir sur les protéines G.

\* Les anticorps dirigés contre les sous-unités des protéines G sont utilisés comme outils dans l'étude de régulation des effecteurs (canaux ioniques) par les protéines G. Ainsi YATANI et al., (1988) ont utilisé des anticorps (ajoutés à la solution la pipette du patch) dirigés contre la sous-unité  $\alpha_k$  de la protéine  $G_k$  couplée au canal potassique activé par l'acetylcholine au niveau atrial. Ils ont observé qu'en présence de l'anticorps, il y a une inhibition du courant potassique activé par le carbachol (un agoniste cholinergique). L'anticorps est sans effet lorsqu'on retire le GTP de la solution physiologique. Ils supposent alors que l'anticorps se fixe sur  $\alpha$  de la protéine G quand celle-ci se trouve sous sa forme active ( $\alpha_{GTP}$ ), l'inhibe et empêche le carbachol d'exercer son effet. D'autres anticorps ont été également utilisés: anticorps anti  $\alpha_t$  (transducine) (PINES et al., 1985); anticorps anti  $\gamma$  de la protéine G (KLEUSS et al., 1992).

\* Des mutations induites au niveau de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G sont également utilisées comme outils pour l'étude du cycle d'activation-inactivation de ces protéines (SPIEGEL et al., 1992) (Figure H19A). Cette initiative provient du fait que certaines maladies ont été identifiées comme étant des conséquences de mutations nées au niveau des sous-unités  $\alpha$  des

protéines G. Ainsi la substitution du résidu Arg<sup>201</sup> par la Cys ou par l'His ou la substitution de Gln<sup>227</sup> par l'Arg (Activating G $\alpha$  mutations) inhibe l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine ras et entraîne une élévation du taux d'AMPc en absence de stimulation hormonale (LANDIS et al., 1989), effet similaire à celui de la CTX. De même la substitution de l'Arg<sup>389</sup> par la Pro au niveau de  $\alpha$  de Gs (unc mutation) entraîne un découplage entre Gs et ses récepteurs (SULLIVAN et al., 1987; RALL et HARRIS, 1987), effet similaire à celui de la PTX. La substitution de la Gly<sup>226</sup> par l'Ala (H21 a mutation) empêche  $\alpha$ sGTP qui est sous sa forme active d'activer son effecteur (MILLER et al., 1988; LEE et al., 1992). Les résultats de ces expériences de biologie moléculaire peuvent permettre ainsi de comprendre certaines pathologies.

Cette liste non exhaustive des outils utilisés dans l'étude des mécanismes de transduction des protéines G reflète la variabilité fonctionnelle de ces protéines ainsi que leur diversité.



### **C- LES PROTEINES G DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE**

Des chercheurs se sont intéressés à la mise en évidence des protéines G dans le muscle squelettique et les résultats révèlent bien l'existence de ces protéines G (trimériques et monomériques).

Cet axe de recherche a été initié à la suite des travaux de Di VIRGILIO et al. (1986) qui ont montré que les analogues non hydrolysables du GTP ( $GTP\gamma S$ ) ou certaines toxines (PTX) avaient un effet sur la tension mécanique de fibres pelées, ce qui est rapporté également par VILLAZ et al. (1989). TOUTANT et al. (1988) ont déterminé par des techniques immunologiques la présence de deux substrats de la PTX dans la membrane du tubule-t. Les travaux ultérieurs ont confirmé ces résultats : ces deux substrats de la PTX sont les protéines  $G_i$  et  $G_o$  (TOUTANT et al. 1990; DOUCET et TUANA, 1991). Il existe d'autres protéines G trimériques dans le muscle squelettique :  $G_s$  (SCHERER et al. 1987),  $G_p$  (LAUFER et CHANGEAUX, 1989) (Pour revue voir BIRNBAUMER et al., 1990). Il a été signalé également la présence de protéines G sensibles à la PTX dans la membrane du RS (SCHERER et al., 1987; TOUTANT et al., 1990).

DOUCET et TUANA (1991) par des techniques immunologiques ont montré également qu'il existe dans le muscle squelettique des protéines G de faible poids moléculaire (protéines G monomériques). Ces protéines se situeraient dans la membrane du tubule-t et au niveau de la triade où elles seraient associées à l'aldolase et à la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Ces auteurs pensent qu'elles pourraient intervenir dans la transmission du signal au niveau de la jonction triadique.

La nature du couplage (direct ou indirect) entre le récepteur DHP et la protéine G a été envisagée sur le muscle squelettique. Ainsi YATANI et al., (1988a) ont isolé les canaux calciques DHPs de la membrane tubulaire et ils ont incorporé dans des bicouches lipidiques. Ils ont alors observé qu'en absence d'agoniste, le  $GTP\gamma S$  et la CTX augmentent la probabilité d'ouverture de ces canaux, l'expérience étant réalisée en absence d'ATP dans le milieu physiologique utilisé. Ils concluent qu'il y aurait une interaction directe de  $G_s$  avec les canaux calciques DHPs dans la membrane tubulaire. MATTERA et al., (1989) ont rapporté des résultats similaires. YATANI et al., (1988) ont proposé alors un schéma (Figure H19B) montrant la double action de  $G_s$  sur l'adénylate cyclase et sur les canaux calciques.  $G_s$  stimule l'adénylate cyclase qui hydrolyse l'ATP en AMPc, connu comme second messenger capable d'activer les protéines kinases AMPc-dépendantes permettant la phosphorylation des canaux calciques. En plus la  $G_s$  pourrait stimuler directement les canaux calciques sans l'intermédiaire d'un second messenger. GARCIA et al., (1990) ont rapporté également que le  $GTP\gamma S$  entraîne une augmentation des mouvements de charge et du courant calcique. La sous-unité catalytique de la protéine kinase A augmente le courant calcique mais sans effet sur les mouvements de



charge. Le dibutiryl-cAMP (db-cAMP), un activateur des protéines kinases AMPc-dépendante, n'a pas d'effet sur les mouvements de charge ni sur le courant calcique. Ils expliquent cette absence d'effet par une déplétion d'activité enzymatique due à la coupure de la fibre d'où l'hypothèse que la protéine G activée par le GTP $\gamma$ S serait couplée directement aux canaux calciques, rejoignant ainsi l'hypothèse de YATANI et al., (1988).

SOMASUNDARAM et al., (1991) ont montré que sur les fibres pelées de grenouille, le GTP $\gamma$ S (150 à 200  $\mu$ M) induit une activité contractile mais lorsque les préparations sont préalablement incubées en présence de PTX, une forte concentration de GTP $\gamma$ S (500  $\mu$ M) n'induit plus l'activité contractile. De plus lorsque les canaux calciques sont bloqués par un antagoniste calcique (D-600 ou nicardipine), le GTP $\gamma$ S n'induit pas d'activité contractile. Ils émettent alors l'hypothèse de l'existence d'une protéine G sensible à la PTX qui serait couplée directement au canal calcique DHP, ce qui expliquerait qu'en présence de GTP $\gamma$ S il y ait une activité contractile par un mécanisme de CICR suite à l'activation des canaux calciques par le complexe  $\alpha$ (GTP $\gamma$ S). En présence de PTX, cette protéine G serait inhibée et donc incapable de répondre à la stimulation par le GTP $\gamma$ S. Ces propos sont illustrés sur la figure H19C.

### **Figure H19**

A - Cycle d'activation-inactivation de l'effecteur par les protéines G avec les niveaux où interviendraient les toxines cholérique (CTX) et pertussique (PTX) ou certaines mutations "activating G $\alpha$  mutations, unc mutation, H21a mutation".

d'après SPIEGEL et al., (1992).

B - Schéma montrant l'activation directe et indirecte des canaux calciques par la protéine Gs. La fixation de l'hormone (H) sur le récepteur (R) active Gs qui peut activer directement le canal calcique ou activer l'adénylate cyclase entraînant la formation de l'AMPc et phosphorylation des canaux.

D'après YATANI et al., (1987).

C - Schéma montrant la régulation directe du récepteur DHP par une protéine G dans la membrane tubulaire du muscle squelettique.

G: protéine G

DHPr: récepteur aux dihydropyridines

GTP $\gamma$ S: l'analogue non hydrolysable du GTP

RYr: récepteur à la ryanodine

SR: réticulum sarcoplasmique

D'après SOMASUNDARAM et al., (1991).





## ***D - INTERVENTION DES PROTEINES G DANS CERTAINES MALADIES.***

Des perturbations dans le fonctionnement de ces protéines sont à la base de certaines physiopathologies. Là aussi nous allons présenter une liste non exhaustive de certaines maladies liées à ces dysfonctionnement.

La diarrhée cholérique caractérisée par des selles diffuses est due à la toxine de *Vibrio cholerae* qui pénètre dans les cellules de la muqueuse intestinale. Elle va ADPribosyler la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gs et inhiber l'activité GTPasique de celle-ci. Ceci conduit à une activation continue de l'adénylate cyclase et à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire qui stimule de nombreux transports ioniques (canaux sodiques), d'où efflux d'eau par phénomène d'osmose. La conséquence en est la déshydratation très importante pouvant conduire rapidement à la mort.

La coqueluche caractérisée par des quintes de toux est due à la PTX. La toxine perturbe le fonctionnement de nombreux types de cellules, contribuant apparemment à l'immunodéficience qui accompagne les toux convulsives.

Il existe des maladies liées à un dysfonctionnement du système endocrinien dont la cause est attribuée aux protéines G. C'est l'exemple de l'hypothyroïdie (MALBON et GILL, 1979; MILLIGAN et al., 1987), d'une forme de diabète, de certaines tumeurs, de certaines anomalies cardio-vasculaires (Pour revue voir SPIEGEL et al., 1992).

Les protéines G sont également impliquées dans certaines anomalies psychiatriques telles que: les troubles de comportement liés à l'alcoolisme, la schizophrénie, le désordre affectif, la maladie de HUNTINGTON's, la maladie de ALZHEIMER (Pour revue voir MANJI, 1992).

Certaines tumeurs cancéreuses semblent être causées par une mutation au niveau du gène codant la sous-unité  $\alpha$ s de la protéine Gs (BOURNE et al., 1991).

En conclusion sur cette partie relative aux protéines G, nous pouvons dire que le travail à faire reste encore très vaste dans ce domaine. Parce que les protéines G règlent les fonctions spécialisées de la plupart des cellules, on recherche aujourd'hui leur intervention dans toutes les physiopathologies. Quand les mécanismes seront bien cernés, la pharmacologie pourra permettre de développer des médicaments qui agiront sélectivement sur certaines d'entre elles.



# RESUME

## 1. INTRODUCTION

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés mécaniques et physiques de différents matériaux. Les essais effectués sont les suivants : traction, compression, torsion, etc. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

## MATERIEL ET METHODE

Les échantillons ont été préparés à l'aide d'une machine à usiner. Les dimensions des échantillons sont indiquées dans le schéma ci-dessous.

Les essais ont été effectués à l'aide d'une machine de traction. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous. Les courbes de contrainte-déformation ont été tracées à l'aide d'un logiciel de traitement de données.

## 2. RESULTATS

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous. Les courbes de contrainte-déformation ont été tracées à l'aide d'un logiciel de traitement de données.

Si la résistance externe  $R_e$  est largement supérieure à la résistance interne  $R_i$ , le rapport  $R_e/R_e + R_i$  traduisant le facteur de court-circuit, tend vers l'unité d'où:

$E_x = E_{MI} - E_{MII}$  et le potentiel mesuré  $E_x$  est peu différent du potentiel réel existant entre les deux points I et II.

Dans la pratique, cette condition est réalisée lorsque  $R_e$  est 10 à 1000 fois supérieure à  $R_i$  (STAMPFLI, 1964). Pour augmenter la résistance  $R_e$ , on procède à un lavage de la portion de membrane par une solution de haute résistance constituée de mannitol.

### *III- La double séparation de mannitol.*

#### *1- La cuve expérimentale.*

Elle est identique à celle mise au point par LEOTY et ALIX (1976). Elle est faite de plexiglass et comporte 5 compartiments (Figure M1B). Les compartiments 1 et 5 sont remplis de Ringer normal dans lequel plongent deux électrodes  $E_g$  (électrode gauche) et  $E_d$  (électrode droite). Dans les compartiments 2 et 4 (largeur = 200  $\mu\text{m}$ ) s'écoule la solution de mannitol de haute résistance. Le compartiment 3 (central) dans lequel plonge l'électrode central ( $E_c$ ) a une largeur inférieure ou égale à 150  $\mu\text{m}$ , ce qui permet d'assurer l'homogénéité du courant sur la surface de la membrane étudiée (Figure M2A). La perfusion se fait au niveau du compartiment central (compartiment test) grâce à un perfuseur (BRAUN). Les compartiments sont rendus étanches, après l'installation de la fibre, par les cloisons de vaseline de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les changements rapides de solutions au niveau du compartiment central sont réalisés grâce à un robinet à quatre voies (rb) placé à l'entrée du compartiment central.

#### *2- L'électrode au calomel.*

Les électrodes placées dans les compartiments 1, 3, 5 sont de type impolarisable, au calomel (LEOTY et ALIX, 1976). Elles ont la particularité de ne présenter entre elles que peu de différence de potentiel (0,20 mV), d'être peu résistantes (20  $\Omega$ ) et très stables dans le temps (Figure M2B). Elles sont conservées dans du KCL 3M.



**Figure M1**

A - Mesure de la différence de potentiel existant entre deux points I et II d'une structure excitable à l'aide d'électrodes extracellulaires.

Ex: différence de potentiel entre I et II

EmI et EmII: potentiels de membrane aux points I et II

Re et Ri: résistance des milieux externe et interne respectivement

Re/Re + Ri: facteur de court-circuit.

D'après ROUGIER, (1968).

B - Schéma de la cuve expérimentale.

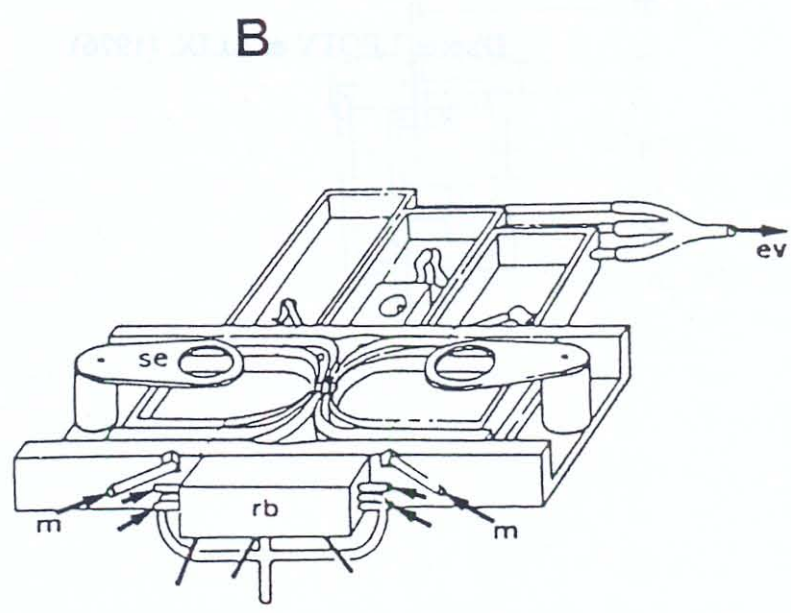
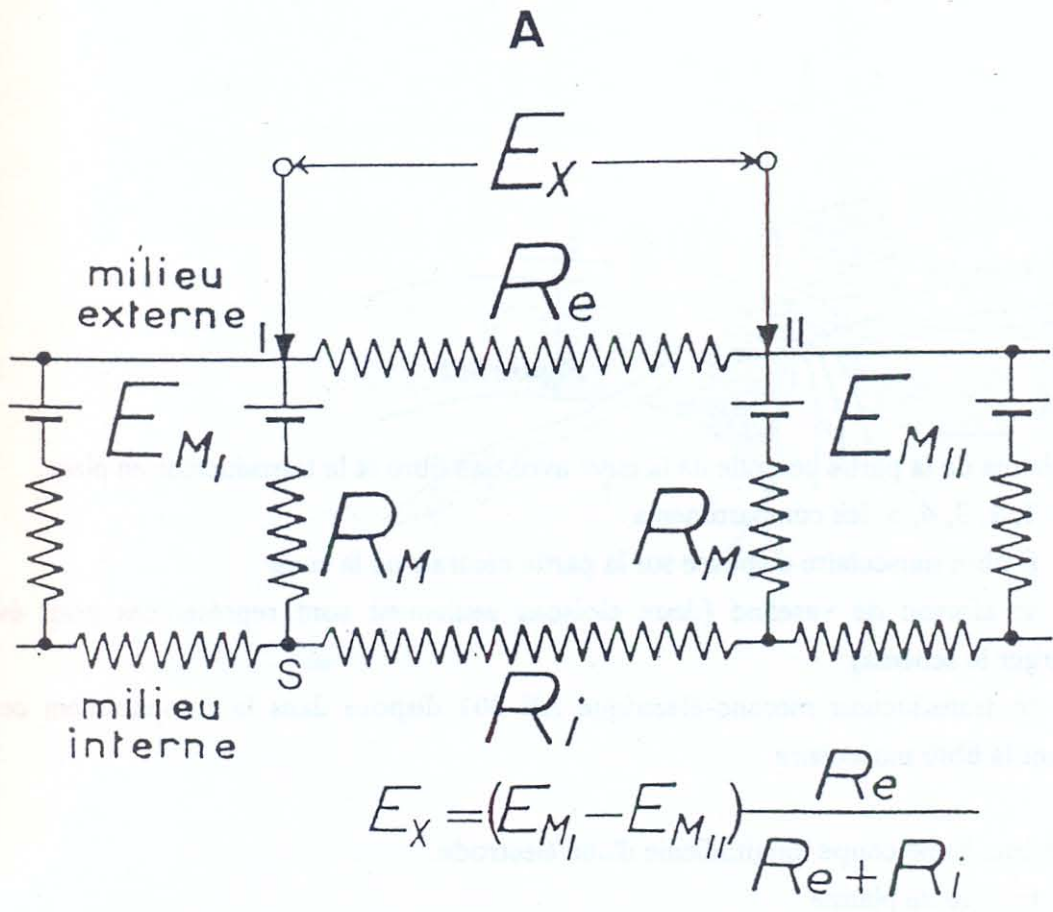
rb: robinet à 4 voies

m: arrivée de mannitol

se: support d'électrodes

ev: évacuation des liquides physiologiques.

D'après LEOTY et ALIX (1976).



*Figure M2*

A - Schéma de la partie centrale de la cuve avec une fibre et le transducteur en place.

1, 2, 3, 4, 5: les compartiments

f: fibre musculaire disposée sur la partie centrale de la cuve

v: cloison de vaseline (deux cloisons seulement sont représentées pour éviter de surcharger le schéma)

tr: transducteur mécano-électrique AE 801 disposé dans le compartiment central et touchant la fibre musculaire.

B - Schéma d'une coupe longitudinale d'une électrode.

tp: tige de platine

el: élastomère assurant l'étanchéité des couvercles

c: couvercle

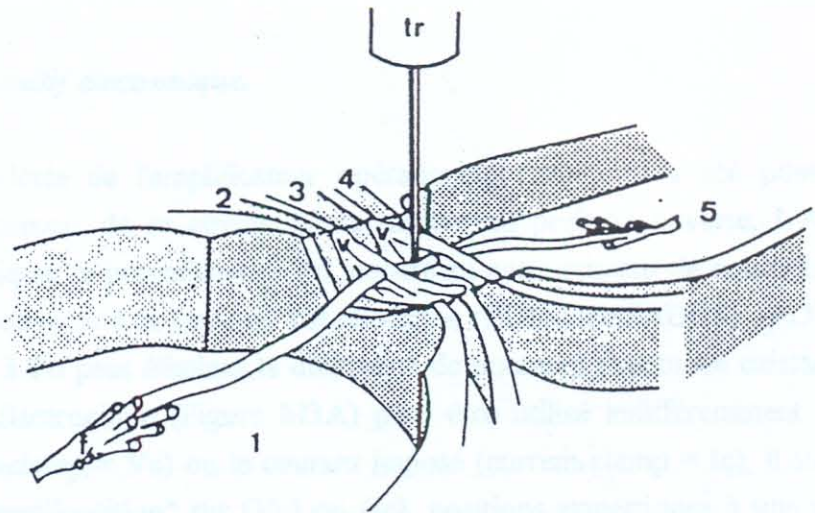
cc: coton chirurgical

Ag.KCl 3M: Agar Agar + KCl 3M.

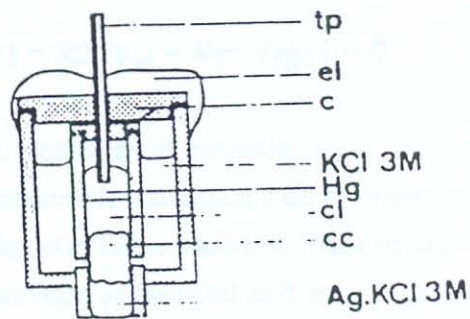
D'après LEOTY et ALIX, (1976).



**A**



**B**



#### IV- Description du dispositif électronique.

Grâce aux propriétés de l'amplificateur opérationnel (AOP), il a été possible de comprendre le fonctionnement de ce circuit. L'interrupteur en position ouverte, L'AOP est exclu du circuit électronique, le potentiomètre Po associé au convertisseur de courant-tension (CIV) est directement connecté à la terre de l'oscilloscope (POINDESSAULT, 1973). Ainsi l'expérimentateur, grâce à Po peut éliminer la différence de potentiel éventuelle existant entre  $E_D$  et  $E_G$ . Ce circuit électronique (Figure M3A) peut être utilisé indifféremment pour le voltage imposé (voltage-clamp =  $V_c$ ) ou le courant imposé (current-clamp =  $I_c$ ), il suffira de déplacer l'interrupteur "multiposition" sur ( $V_c$ ) ou ( $I_c$ ), positions symétriques à une position neutre "unclamp". Dans les présentes conditions expérimentales nous n'avons utilisé que le voltage imposé.

#### Le voltage imposé.

La différence de potentiel à l'entrée de l'AOP étant nulle, son gain égal à l'unité, l'électrode gauche est maintenue à un potentiel de référence de même que S (voir figure M3A). Pour la même raison ( $e_{AOP} = 0$ ), le point S' est considéré comme une terre virtuelle, ainsi la tension aux bornes du circuit allant du système de stimulation au point F est telle que:

$$V_{st} - V_F = R_1 - R_2$$

Sachant que  $R_1 = R_2$ ,  $V_{st} = V_F$ ;  $V_{SDT} = 0$ .

L'électrode D et le point S sont portés à un potentiel  $V_{ST}$  imposé par le système de stimulation. Toute variation de l'AOP entraîne la naissance d'un courant qui impose aux bornes de Rig un potentiel égal, mais inverse de cette faible variation, maintenant S au potentiel  $V_{ST}$ . Ainsi l'AOP en association avec SDT (suiveur de tension) agit en comparateur et en contrôleur du potentiel en S.

En réponse à ce potentiel imposé, la conductance de la membrane varie, il naît un potentiel qui est appliqué à l'entrée du CIV grâce à l'électrode centrale ( $E_c$ ), il en ressort un potentiel directement proportionnel au courant qui est appliqué en H, le potentiel au point J est tel que:

$$V_J / I_m R = -R^0 / R \quad V_J = -R^0 / R \cdot I_m R^*$$

$$\text{ou encore } V_J = -K I_m \quad (K = R^0 \cdot R^* / R).$$

**Figure M3**

**A - Schéma général du circuit utilisé pour les mesures de l'activité électrique des fibres musculaires squelettiques de grenouille.**

Partie gauche: fibre musculaire placée dans la cuve

Partie centrale: dispositif CL 79-1 et ses 4 amplificateurs opérationnels

Partie droite: entrées de l'oscilloscope, des modules de stimulation 555V2 et DM3-0 et le système informatique.

D'après COGNARD, (1983)

(modifié).

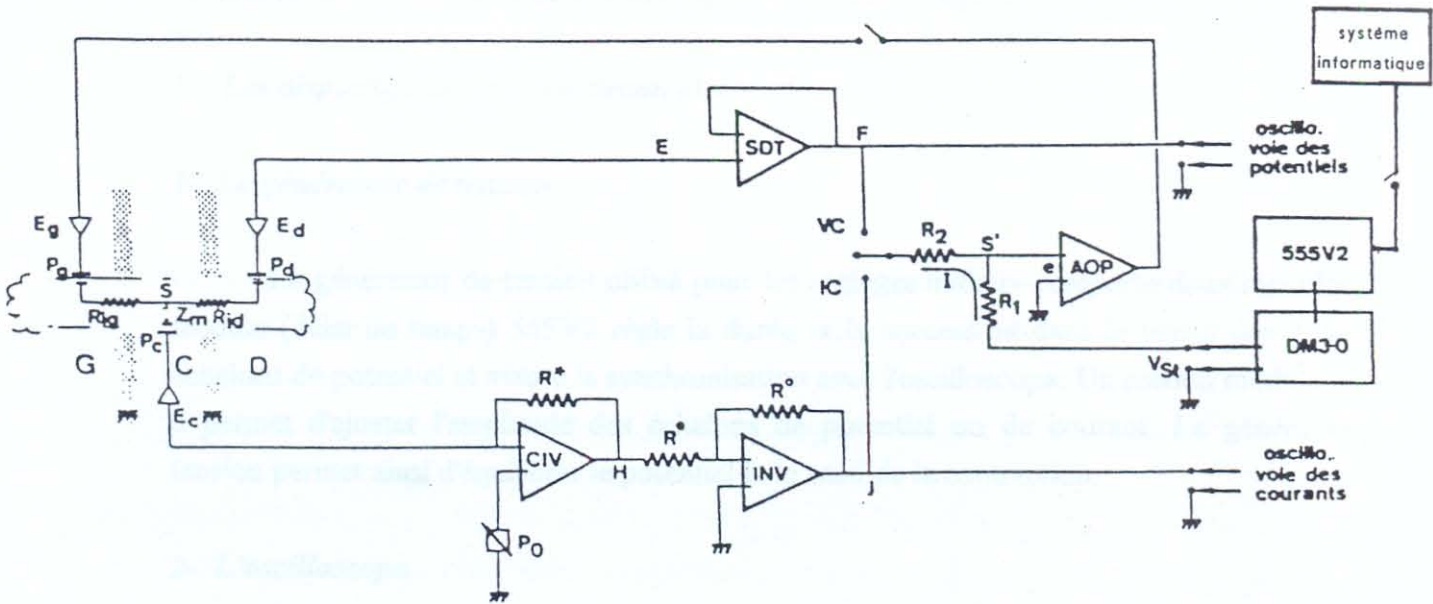
**B - Schéma du transducteur AE 801.**

La flèche symbolise une force sur l'aiguille du transducteur.

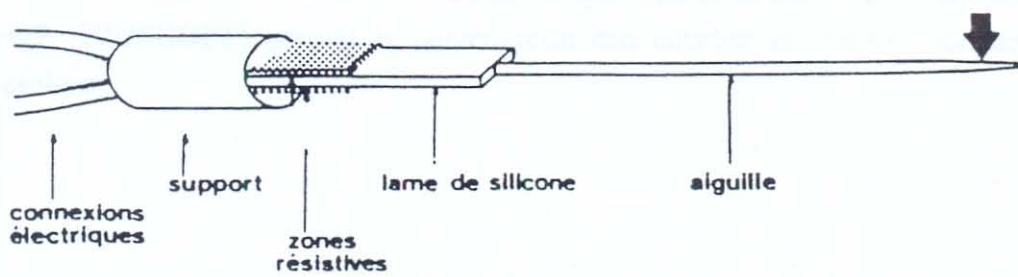
D'après COGNARD, (1983).



# A



# B



Les résistances ( $R^{\circ}$ ,  $R^*$  et  $R$ ) sont choisies de sorte qu'un courant de  $1\mu\text{A}$  se traduise par une différence de potentiel en  $J$  de  $100\text{ mV}$  (gain de l'inverseur égal à  $-10$ ).

#### *V- Les dispositifs annexes au circuit électronique.*

##### *1- Le générateur de tension.*

Le générateur de tension utilisé pour les réglages initiaux comporte deux modules. Un module (délai de temps) 555V2 règle la durée et la succession dans le temps des différents échelons de potentiel et assure la synchronisation avec l'oscilloscope. Un second module DM3-0 permet d'ajuster l'amplitude des échelons de potentiel ou de courant. Le générateur de tension permet ainsi d'équilibrer le potentiel et le seuil de la contraction.

##### *2- L'oscilloscope.*

L'ensemble des phénomènes sont visualisés sur deux oscilloscopes pendant les réglages initiaux: l'un TEKTRONIX 5115 à mémoire qui permet de visualiser le potentiel entre les électrodes et l'autre H.M205-3 pour la contraction et le courant.

##### *3- Le système informatique.*

Après visualisation et équilibrage du potentiel et de la contraction, un système mis au point par J. P. POINDESSAULT permet de basculer vers le pilotage du système électronique par le micro-ordinateur IBM PCXT 286 (IBM-France) muni d'un système d'exploitation PC DOS version 505 et d'une carte de conversion A/D et D/A Teckmar TM40. Les programmes Clampex, Clampan, et Clampfit du logiciel Pclamp (Axon Instruments, Foxter City, USA) permettent les fonctions de stimulations, d'acquisition et de traitement des données. Le logiciel FigP (BIOSCOFT) permet la construction des courbes et d'autres formes d'analyses des résultats.

## **C- LES LIMITES DE LA TECHNIQUE.**

### **I- Les limites liées à la double séparation de mannitol.**

Les cloisons faites avec la vaseline pour séparer la solution test (solution physiologique) des solutions de mannitol doivent être bien étanches pour qu'il n'y ait pas de contact entre la solution de mannitol (non chargée) et la solution test (chargée) et créer des potentiels de jonctions, qui tendent à linéariser les courbes I-V. Une faible partie du courant de contre-réaction s'écoule dans les compartiments de mannitol car le facteur de court-circuit  $R_e/R_e + R_i$  est toujours inférieur à l'unité.

### **II- Les limites liées au circuit électronique.**

#### **1- Les propriétés de câble de la préparation.**

Dans des conditions de potentiel imposé, le courant de contrôle injecté par l'AOP en Ed pour maintenir Ec au potentiel de commande,  $V_{ST}$  entraîne une chute de tension sur  $R_i$ . Cette chute de tension est responsable d'une inhomogénéité spatiale du potentiel dans le compartiment test. Des études parallèles réalisées grâce à des microélectrodes montrent que de la droite vers la gauche de ce compartiment  $V_{ST}$  diminue progressivement. Cependant, cette erreur de quelques mV est négligeable, si le compartiment central a une largeur inférieure à 150  $\mu\text{m}$  (DUVAL et LEOTY, 1978).

#### **2- Le potentiel imposé au niveau des tubules.**

L'étroite lumière des tubules-T laisse supposer l'existence d'une résistance d'accès à des invaginations membranaires, ceci remet en doute le contrôle du potentiel tubulaire dont la conséquence est le ralentissement de la cinétique des courants et la diminution de leur amplitude (ADRIAN et PEACHEY, 1973). Mais des arguments structuraux dus à FRANZINI-AMSTRONG, (1975) indiquent que l'ouverture des tubules ne semble pas devoir offrir une grande entrave à la diffusion des ions et que la présence d'une résistance d'accès est discutable. Il montre en effet que le courant sodique tubulaire est un courant distinct et de caractéristiques différentes du courant de surface et pas un courant identique au courant de surface "déformé" par le mauvais contrôle du potentiel tubulaire. Des résultats récents qui montrent que les canaux sodiques du système-T et du sarcolemme sont codés par des gènes différents (YANG et al., 1991) vont dans le même sens.



### **3- La résistance série.**

L'étroitesse du compartiment central, entraîne une augmentation de la résistance du liquide compris entre l'électrode et la membrane cellulaire. Ainsi, le potentiel mesuré est lié au potentiel de membrane ( $E_m$ ), au courant membranaire ( $I_m$ ) et à la résistance série ( $R_s$ ) (liquide + électrode centrale) par la relation:

$$V = E_m + I_m.R_s$$

Le courant entrant étant négatif,  $E_m$  est sous-estimé ( $V > V_m$ ), par contre le courant sortant étant positif,  $E_m$  est surestimé ( $V < V_m$ ). Par une géométrie particulière de la cuve  $R_s$  peut être diminuée (LEOTY et ALIX, 1976), cependant une trop faible résistance série induit des oscillations sur les enregistrements, aussi une boîte de résistance réglable connectée entre l'électrode centrale et le CIV permet d'augmenter cette résistance série si la nécessité s'impose.

### **III - Limites liées aux préparations.**

Lors d'une variation rectangulaire du potentiel, la décharge capacitive de la membrane ne serait pas exponentielle, mais montrerait au moins deux à trois constantes de temps (JACKOBSON et al., 1975). Les espaces intercellulaires ou clefts provoquent aussi un mauvais contact électrique entre les membranes et le liquide physiologique. La fibre musculaire squelettique étant une seule cellule sans jonctions gap, les problèmes liés à l'espace intercellulaire ne se pose pas et par conséquent elle se prête bien à cette technique.

#### ***D- ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE MECANIQUE.***

Dans le dispositif de double séparation de mannitol, la contraction des fibres musculaires squelettiques est enregistrée au niveau du compartiment central grâce à un transducteur mécano-électrique de type ACKERS AE 801 (Figure M3B). L'extrémité de la sonde est prolongée par une aiguille effilée dont l'extrémité est placée en contact avec la préparation (Figure M2A). La lame de silicone du transducteur comporte sur chacune de ses faces une résistance diffuse. Ces résistances, égales entre elles, associées à deux résistances externes constituent un pont de Wheastone équilibré grâce à un potentiomètre et relié à un amplificateur différentiel. Le signal est filtré à 100 Hz. L'amplificateur différentiel est également relié au système informatique, ce qui permet l'enregistrement et le traitement des activités contractiles grâce aux programmes du logiciel Pclamp.

#### ***E- CONDITIONS EXPERIMENTALES.***

Etant donné que la méthode de double séparation de mannitol ne permet pas de déterminer la valeur absolue du potentiel de membrane, le potentiel de référence (holding potentiel ou HP) est choisi de façon à ce que le courant entrant sodique soit maximum ( $h_{\infty} = 1$ ). Dans la pratique, le potentiel de référence (dans les conditions physiologiques) est considéré comme égal à -90 mV (potentiel de repos) lorsque le pic de la courbe courant/voltage se situe à + 50 mV par rapport à ce potentiel et lorsque le seuil mécanique se situe à + 40 mV pour une stimulation de durée égale à 100 ms (BEZANILLA et al., 1971; CAPUTO et al., 1984). Toutes les applications de potentiel (en mV) sont faites à partir de ce potentiel de référence. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{N}$  pour la contraction, en  $\mu\text{A}$  pour les courants et en  $\text{nC}/\mu\text{F}$  pour les mouvements de charge. Les données statistiques sont exprimées par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne.

Cette technique présente l'intérêt de pouvoir faire l'étude du couplage excitation-contraction du muscle squelettique adulte.



## ***F- LES SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES.***

La solution de mannitol qui permet l'isolement de la portion de membrane à étudier est une solution isotonique de concentration égale à 43.7 g/l.

\* La solution physiologique standard est le Ringer normal (solution 1, tableau 2). Les fibres sont disséquées et montées dans cette solution de Ringer.

\* Dans le cas où les fibres sont coupées au niveau des compartiments latéraux, une solution interne de composition physiologique proche de celle du milieu intracellulaire est mise dans ces compartiments latéraux (solution 2, tableau 2).

\* Pour l'étude des mouvements de charge, deux solutions: interne et externe sont préparées. Dans la solution externe (solution 3, tableau 2) le NaCl est remplacé par le tétraéthylammonium Acétate (TEA acétate) ce qui bloque le courant potassique sortant lent et également le courant sodique. L'acétate est l'anion imperméant qui remplace le Cl<sup>-</sup>. Le 3-4 diaminopyridine (3-4 DAP) sert à bloquer le courant potassique sortant rapide, le CoCl<sub>2</sub> inhibe le courant calcique et la TTX inhibe le courant sodique sarcolemmien. La solution interne (solution 4, tableau 2) contient du césium qui bloque les canaux potassiques à la face interne de la membrane. L'EGTA n'a pas été ajouté pour éviter tout effet éventuel sur la contraction étant donné que l'essentiel du sujet traite du couplage excitation-contraction. Les solutions 3 et 4 sont tirées de celles de GARCIA et al., (1990).

\* Pour l'étude du courant calcique couplé à la contraction, la solution externe (solution 5, tableau 2) contient 9 mM de CaCl<sub>2</sub> pour amplifier le courant calcique de type L qui est faible à cause de son origine tubulaire.



Solutions Composition (mM)	1	2	3	4	5
NaCl	115				
KCl	2,5	108			
MgCl <sub>2</sub>	2	6,9	1		1
CaCl <sub>2</sub>	1,8		1,8		9
HEPES	5	5	10	5	10
Na <sub>2</sub> ATP		13,8		8	
Glucose	5,6	5,6		5	5,6
CoCl <sub>2</sub>			8		8
3,4DAP			5		5
TEA Acétate			115		115
TTX			0,001		0,001
Cs Acétate				50	
Na Acétate				20	
Na Phospho.				5	
PH	7,40	7,20	7,60	7,20	7,60

*TABLEAU 2: Les différentes solutions physiologiques utilisées.*

## ***G- LES OUTILS UTILISES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL.***

La toxine pertussique (PTX) est fournie par (SIGMA). Elle est ensuite utilisée à 10 ng/ml après une activation préalable à 37°C pendant une heure dans la solution physiologique.

\* La toxine cholérique (CTX) est fournie par (SIGMA). Elle est utilisée à 10 µg/ml, également contenue dans la solution physiologique et préalablement activée à 37°C pendant 30 minutes.

\* La forskoline a été utilisée à  $5 \cdot 10^{-6}$ M. Elle est dissoute dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans ce cas le DMSO est ajouté à la solution contrôle à raison de 0,1% (produit SIGMA).

\* La protéine kinase inhibitrice (PKI): "rabbit sequence" est utilisée à  $10^{-6}$ M (produit SIGMA).

\* Les analogues non hydrolysables du GTP (GTP $\gamma$ S) et du GDP (GDP $\beta$ S) sont utilisés à 500µM (produits SIGMA).

\* Les anticorps utilisés à des dilutions variables nous ont été fournis par le laboratoire Gramsch en Allemagne. Les indications qui accompagnaient les anticorps concernent les dilutions et non des concentrations et pour ce fait les détails sur les dilutions seront donnés dans le chapitre qui traite des anticorps.

\* Le chlorure de benzalkonium est utilisé à 5µg/ml préalablement dissous dans l'eau désionisée (produit SIGMA).

The first part of the chapter discusses the current state of the nation, including the economy, social issues, and the environment. It provides a comprehensive overview of the challenges and opportunities facing the country.

### RESULTS

The results of the study are presented in this section, showing the impact of the various factors discussed in the previous chapters. The findings indicate that there is a strong correlation between the variables studied.

### CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

The conclusions drawn from the study are that the current state of the nation is complex and requires a multi-faceted approach to address the various issues. Recommendations are provided for policymakers and the general public.

The study also highlights the need for further research in certain areas, particularly in the field of social policy and environmental management. It is hoped that these findings will contribute to a better understanding of the nation's current state and future prospects.

In conclusion, the state of the nation is a topic of great importance and complexity. This study has sought to provide a clear and concise analysis of the current situation, along with practical recommendations for improvement.

The author wishes to thank the many individuals and organizations that supported this research. It is a testament to their belief in the importance of understanding and improving the state of the nation.



## **CHAPITRE 1: LES EFFETS DE PTX SUR LA CONTRACTION DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE.**

Comme cela a déjà été dit, l'intervention des protéines membranaires liant le GTP (les protéines G) dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique a été évoquée pour la première fois par Di VIRGILIO et al. (1986). Des résultats similaires furent rapportés ultérieurement (VILLAZ et al., 1989; SOMASUNDARAM et al. 1991) sur fibres pelées et GARCIA et al., (1990) sur fibre coupée.

Nous avons, pour étudier le rôle que pourraient jouer les protéines G dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire intacte, testé la PTX sur la composante phasique (première composante) et sur la composante tonique (deuxième composante) de la contraction. Des protéines G sensibles à la PTX avaient en effet été identifiées au niveau des systèmes tubulaires transverses (TOUTANT et al., 1988; 1990) et au niveau du RS (SCHERER et al., 1987; TOUTANT et al.; 1990) du muscle squelettique.

### **A - EFFETS DE PTX SUR LES COURANTS SODIQUE ET CALCIQUE.**

Nous avons testé les effets de PTX sur les courants transmembranaires (sodique et calcique) susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de régulation du couplage excitation-contraction.

La PTX a été préparée à une concentration de 1 µg/ml dans l'eau désionisée et les aliquotes sont conservées au congélateur. Elle est utilisée à 10 ng/ml après une activation préalable à 37°C pendant une heure dans la solution physiologique à utiliser. La PTX à cette concentration est capable d'ADPribosyler les protéines G car comme le montre UI, (1986), la PTX à une concentration de 0,1 à 2,5 ng/ml ADPribosyle la protéine Gi au niveau des cellules mastocytes de rat, avec un effet maximal à 0,5 ng/ml.

Toutefois nous n'avons pas d'arguments pour expliquer le rôle de la préactivation mais on pourrait penser que le protomère A, qui catalyse les réactions d'ADPribosylation, possède une activité enzymatique (HAUSMAN et BURNS, 1993) et par conséquent une préactivation stimulerait cette activité enzymatique.

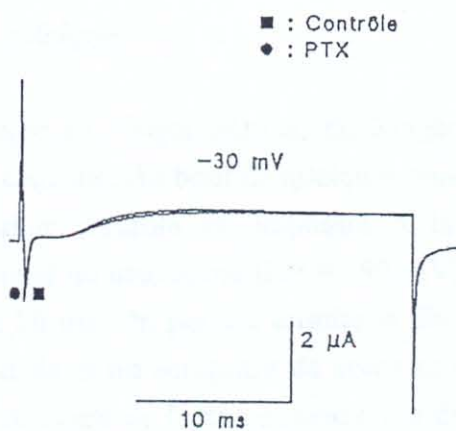
La figure R1 montre l'exemple d'enregistrement du courant sodique (A) et du courant calcique (B) en contrôle (carré plein) et 10 minutes après passage en PTX (cercle plein). Pour l'enregistrement du courant sodique, un potentiel de 60 mV et d'une durée de 26 ms est imposé à partir de HP = -90 mV, toutes les 40 secondes (la solution externe est le Ringer normal + CoCl<sub>2</sub>) et pour le courant calcique, un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s est imposé à partir du même HP, toutes les 90 secondes (la solution externe est 5, tableau 2). On

**Figure R1**

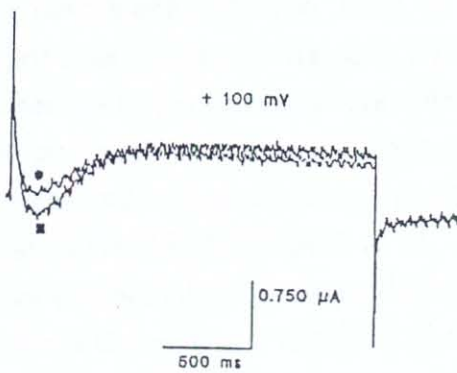
A - Enregistrement du courant sodique activé par une dépolarisation de 60 mV d'une durée de 26 ms imposée à partir de HP = -90 mV, en contrôle (Ringer normal + CoCl<sub>2</sub>) et en présence de PTX. On n'observe aucune variation du courant en présence de PTX (n = 6).

B - Enregistrement du courant calcique activé par une dépolarisation de 100 mV et d'une durée de 2 s à partir de HP = -90 mV, en contrôle (solution 5, tableau 2) et en présence de PTX. Par rapport au contrôle (carré plein) la PTX diminue le courant calcique d'environ 35 % (cercle plein) (n= 5).

A



B





n'observe aucune variation du courant sodique, par contre le courant calcique est diminué d'environ 30% par rapport au contrôle.

## **B - LES EFFETS DE PTX SUR LA COMPOSANTE PHASIQUE DE LA CONTRACTION.**

### **I - Après blocage du courant calcique.**

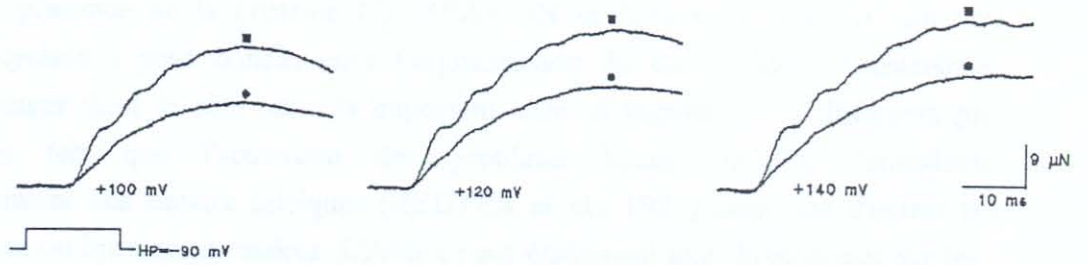
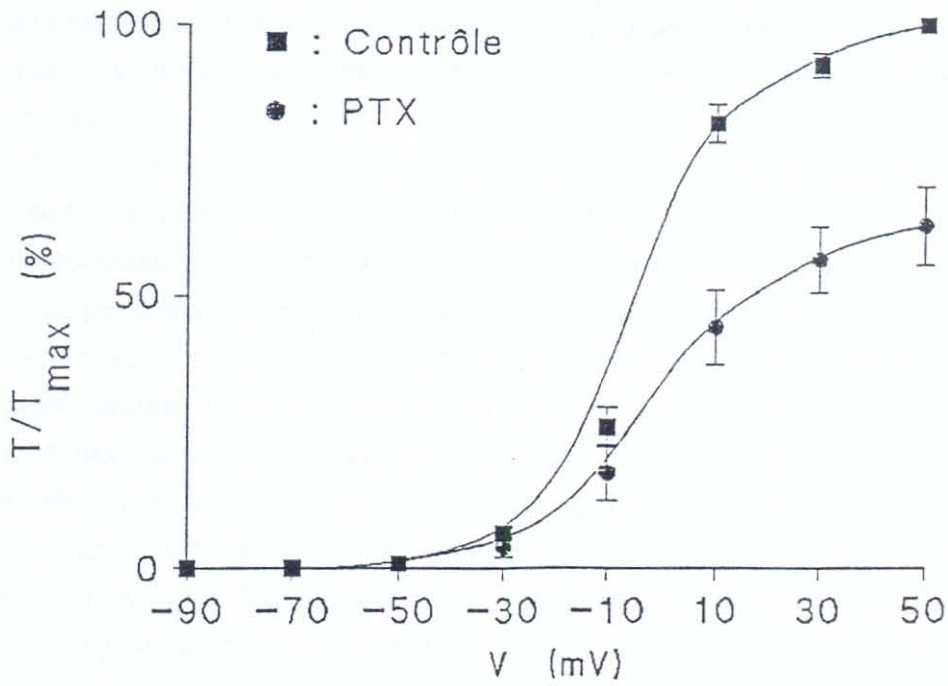
La fibre une fois montée en Ringer normal, du Ringer normal contenant  $\text{Co}^{2+}$  est utilisé pour inhiber le courant calcique. Au bout de quelques minutes la contraction se stabilise et on enregistre la contraction contrôle en imposant à la préparation, des potentiels dépolarisants à partir du potentiel de membrane ( $\text{HP} = -90 \text{ mV}$ ), par incrément de 20 mV et d'une durée de stimulation de 26 ms. On perfuse ensuite la fibre pendant 10 minutes avec la solution contenant la PTX activée et on enregistre de nouveau la contraction. La figure R2A montre des exemples d'enregistrement de l'activité contractile dans les conditions de contrôle (Ringer normal +  $\text{Co}^{2+}$ ) et 10 minutes après perfusion avec la PTX. Les trois enregistrements obtenus aux potentiels de 100, 120, et 140 mV imposés à partir de HP montrent une diminution de la contraction en présence de PTX. La figure R2B montre la courbe d'activation de la contraction en fonction du potentiel. Cette courbe moyennée montre une inhibition de la contraction par la PTX à près de  $35 \pm 7\%$  ( $n = 12$ ), l'effet est significatif à 99% près ( $p < 0.01$ ). Le seuil d'activation de la contraction n'est pas déplacé et cette inhibition est plus importante à des potentiels élevés.

On peut, à partir de ces résultats conclure que la PTX diminue l'amplitude de la contraction phasique de la fibre musculaire squelettique de grenouille indépendamment du courant sodique et du courant calcique. La PTX inhibe les protéines G sensibles et cette inhibition entraîne celle de la contraction phasique. Dans la mesure où cet effet semble spécifique, il existe des(une) protéine(s) G sensible(s) à la PTX qui serait(ent) impliquée(s) dans la régulation des mécanismes mis en jeu dans l'activation de la composante phasique de la contraction. Ceci expliquerait pourquoi en inhibant celle(s)-ci, on diminue cette activité contractile. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur fibres pelées (Di VIRGILIO et al., 1986; VILLAZ et al., 1989; SOMASUNDARAM et al., 1991). Toutefois il n'est pas possible à partir de ces données de déterminer la nature de la protéine G impliquée dans la mesure où au moins deux protéines G sensibles à la PTX ( $G_i$ ,  $G_o$ ) ont été identifiées dans le muscle squelettique. Il est également difficile à partir de ces résultats de déterminer le mécanisme qui est touché mais on peut penser au "voltage sensor" ou à la protéine de 95 Kd (triadine connue comme protéine intervenant dans le couplage mécanique) compte tenu de la durée de stimulation (26 ms) et du blocage du courant calcique.

### **Figure R2**

A - Exemples d'enregistrements de l'activité contractile induite par des dépolarisations de courte durée (26 ms) à partir du potentiel de repos (HP = -90 mV) en contrôle (Ringer normal + CoCl<sub>2</sub>) et 10 minutes après perfusion externe de PTX. La valeur de potentiel imposé est indiquée au niveau de chaque enregistrement. On observe une diminution de l'amplitude de la contraction en présence de PTX.

B - Courbes moyennes d'activation de la contraction en fonction du potentiel de membrane avant et après perfusion de la préparation avec PTX. Les conditions expérimentales sont identiques qu'en A. Par rapport au contrôle (carrés pleins) la contraction diminue de 35% en présence de PTX (cercles pleins) (n = 12).

**A****B**



## II- Les effets de PTX en Ringer normal contenant la forskoline

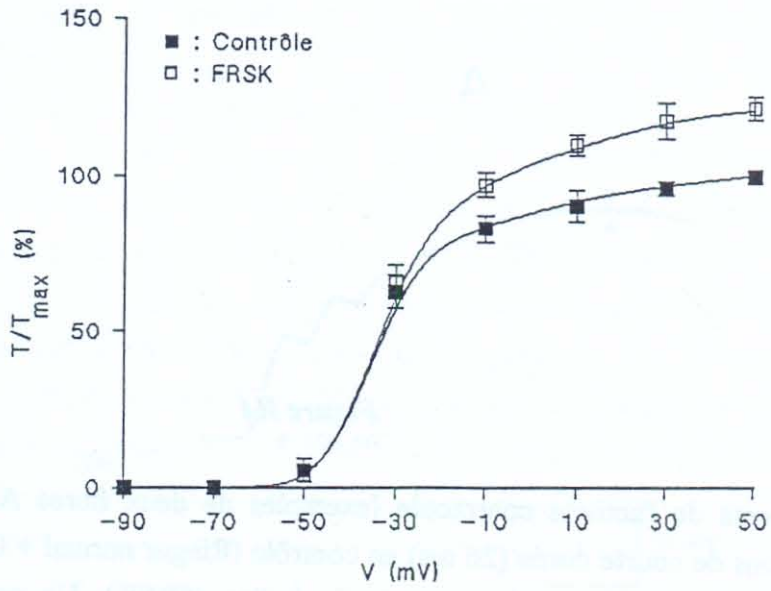
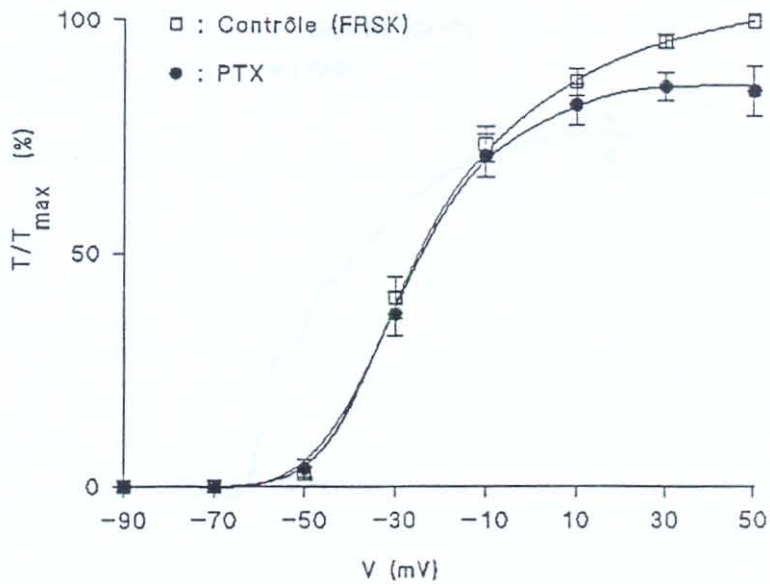
La forskoline est un diterpène isolé d'une plante *Coleus forskohlii* (Labiée) (BHAT et al., 1977). Elle peut activer directement la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase sans passer par la protéine Gs mais la stimulation maximale de l'adénylate cyclase par la forskoline nécessite la présence de la protéine Gs (SEAMON et DALY, 1986). La stimulation de l'adénylate cyclase a pour conséquence l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire: un second messenger dont le rôle est très important dans la régulation de différents processus métaboliques tels que l'activation des protéines kinases AMPc dépendantes qui phosphoryleraient des canaux calciques (REUTER et al., 1987) ainsi que d'autres protéines intracellulaires ou intramembranaires. L'AMPc peut également agir directement sur les canaux ioniques sans passer par l'intermédiaire de phosphorylation: l'activation directe du courant de pacemaker ( $I_f$ ) par l'AMPc au niveau du coeur (DIFRANCESCO et TORTORA, 1991) en est un exemple. La forskoline a été dissoute dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$  M et les aliquotes conservées au congélateur. Elle est ensuite ajoutée à la solution de Ringer normal au moment de l'utilisation à une concentration de  $5 \cdot 10^{-6}$  M; dans ces conditions le DMSO est ajouté à la solution contrôle (à la même concentration: 0,1%). L'objectif est de voir si l'inhibition de la composante phasique de la contraction par la PTX fait intervenir un mécanisme passant par la cascade: adénylate cyclase-AMPc en le contrebalançant.

La figure R3A montre l'effet de la forskoline sur la composante phasique de la contraction. Par rapport au contrôle (Ringer normal), la forskoline augmente l'amplitude de cette composante de  $21 \pm 5\%$  à des potentiels élevés (10 à 50 mV) ( $n = 6$ ) après 5 à 10 minutes de perfusion externe. En effet il a été montré qu' au niveau du muscle squelettique de rat et de grenouille, la sous-unité catalytique de la protéine kinase A entraîne une augmentation du courant calcique (GARCIA et al., 1990). L'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline provoque une augmentation du taux d'AMPc qui active les protéines kinases AMPc-dépendantes (dont la protéine kinase A) susceptibles de phosphoryler les canaux calciques et augmenter leur activité ionique et par conséquent une augmentation du taux basal de calcium: ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'activité contractile. La figure R4 montre l'exemple de deux enregistrements de l'activité contractile en contrôle (Ringer normal +  $\text{Cd}^{2+}$ ) et après passage en Ringer contenant la forskoline et  $\text{Cd}^{2+}$  (2 mM) pour bloquer les canaux calciques (un potentiel de 100 mV est imposé à partir de HP = -90 mV). En effet on n'observe pas une augmentation de la contraction en présence de forskoline dans ces conditions expérimentales où le courant calcique est bloqué. S'il est admis que le courant calcique n'intervient pas dans la composante phasique de la contraction du muscle

### **Figure R3**

A - Courbes moyennes montrant les effets de la forskoline (FRSK) sur la contraction phasique induite par des dépolarisations de courte durée (26 ms), contrôle = Ringer normal et 5 à 10 minutes après perfusion de la préparation avec la forskoline. Par rapport au contrôle (carrés pleins) l'activité contractile augmente de 21% en présence de forskoline (carrés vides) (n = 6)

B - Courbes moyennes montrant les effets de PTX sur la contraction phasique après perfusion préalable de la préparation avec la forskoline. Par rapport au contrôle (carrés vides) la PTX entraîne une diminution de l'activité contractile (cercles pleins) de 15% en présence de la forskoline (FRSK) (n = 7).

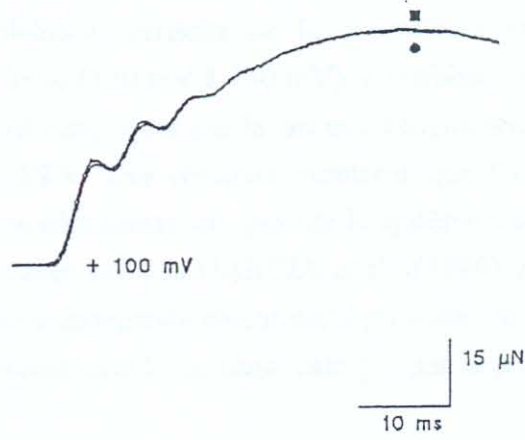
**A****B**



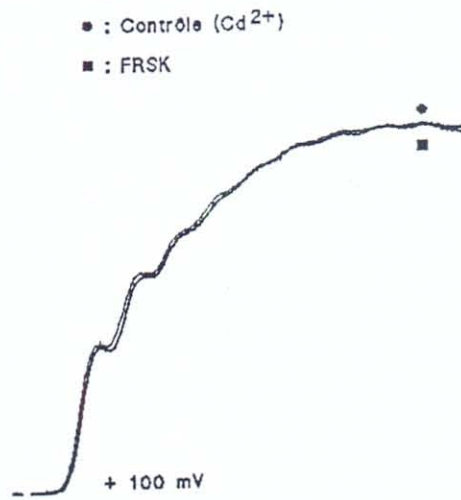
*Figure R4*

Enregistrements de l'activité contractile (exemples de deux fibres A et B) induite par des dépolarisations de courte durée (26 ms) en contrôle (Ringer normal +  $\text{Cd}^{2+}$ ) et 5 à 10 minutes après perfusion de la préparation avec la forskoline (FRSK). Un potentiel de 100 mV est imposé à partir de HP = -90 mV. Lorsque le courant calcique est bloqué par le cadmium (cercle plein), la FRSK n'entraîne pas une augmentation de la contraction (carré plein).

A



B



squelettique (voir revue, RAYMOND, 1989) une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  de base n'est pas sans effet sur celle-ci car ces résultats obtenus avec  $\text{Cd}^{2+}$  montrent bien que l'augmentation de la composante phasique était due à l'activation des canaux calciques.

Après action de la forskoline, on fait agir la PTX. La figure R3B montre deux courbes: contrôle (Ringer normal + forskoline) et après action de la PTX (Ringer normal + forskoline + PTX). On observe une inhibition partielle de la contraction phasique par la PTX mais seulement à des potentiels élevés (120 mV à 140 mV). L'inhibition est de  $15 \pm 5\%$  ( $n = 7$ ) et la levée partielle de celle-ci peut s'expliquer par le fait que l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire antagonise les effets de la PTX. Ces résultats montrent que l'inhibition de la composante phasique par la PTX ne passe nécessairement pas par le système d'adénylate cyclase-AMPC. Ils ne sont pas en contradiction avec ceux de GARCIA et al., (1990) qui ont montré que le GTP $\gamma$ S augmente le courant calcique indépendamment de la protéine kinase A. Ils avaient à cet effet émis l'hypothèse d'une activation directe du canal calcique par la protéine G rejoignant celle de YATANI et al., (1988a).



## ***C- EFFETS DE PTX SUR LA COMPOSANTE TONIQUE DE LA CONTRACTION.***

### ***I- En Ringer normal.***

Les effets de PTX ont été testés sur la composante tonique de la contraction en Ringer normal. Des potentiels dépolarisants de 20 mV d'incrément et d'une durée de stimulation de 2 s sont imposés à partir de HP = -90 mV. Dans ces conditions il se développe une composante tonique qui apparaît après la phasique. La figure R5A montre un exemple d'enregistrement de l'activité contractile en contrôle (Ringer normal) et 10 minutes après perfusion de PTX au niveau du compartiment central. On observe en présence de PTX une diminution de la contraction tonique. La mesure de l'amplitude de la contraction se fait à 500 ms pour éviter de tomber dans la zone d'inactivation contractile. La figure R5B montre deux courbes tension-potentiel moyennées, réalisées dans les mêmes conditions expérimentales qu'en A. On observe en présence de PTX une diminution de la contraction tonique de  $26 \pm 3\%$  ( $n = 9$ ). On peut dire à partir de ces résultats que la PTX inhibe une(les) protéine(s) G et induit une diminution de la contraction tonique.

### ***II- Après blocage du courant calcique.***

Les effets de PTX ont été étudiés sur la composante tonique de la contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille en présence de  $\text{CoCl}_2$  (8 mM) pour s'affranchir du courant calcique qui est connu pour intervenir dans la composante tonique de la contraction du muscle squelettique (POTREAU et RAYMOND, 1980a,b; ILDEFONSE et al., 1985; RIVET et al, 1989; JACQUEMONT et ROUGIER, 1990; COGNARD et al., 1992; CONSTANTIN et al., 1993). La fibre est montée dans le Ringer normal et on passe ensuite au Ringer contenant  $\text{CoCl}_2$ . Dès que la contraction se stabilise on enregistre la contraction contrôle et on passe en PTX. La figure R6 montre deux courbes moyennées de l'activité contractile en contrôle (Ringer normal +  $\text{CoCl}_2$ ) et après perfusion de PTX au niveau du compartiment central. On note en présence de PTX une diminution de la contraction tonique de  $15 \pm 4\%$  ( $n = 8$ ) (effet significatif à 95% près:  $p < 0.05$ ) contre  $26 \pm 3\%$  dans le cas où le courant calcique n'est pas inhibé. Donc l'inhibition de la contraction tonique par la PTX passe en partie par les canaux calciques. Puisque la PTX inhibe partiellement le courant calcique (inhibition d'environ 35%,  $n = 5$ ) comme le montre la figure R1B (la contraction est inhibée parallèlement, enregistrement non illustré).

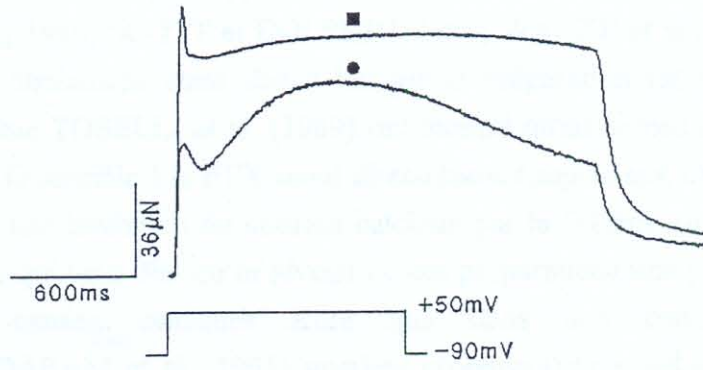
Ces résultats montrent que l'inhibition de la composante tonique par la PTX ne peut pas être attribuée uniquement à un effet sur les canaux calciques comme le pensaient SOMASUNDARAM et al., (1991). Selon ces auteurs une protéine G sensible à la PTX et

**Figure R5**

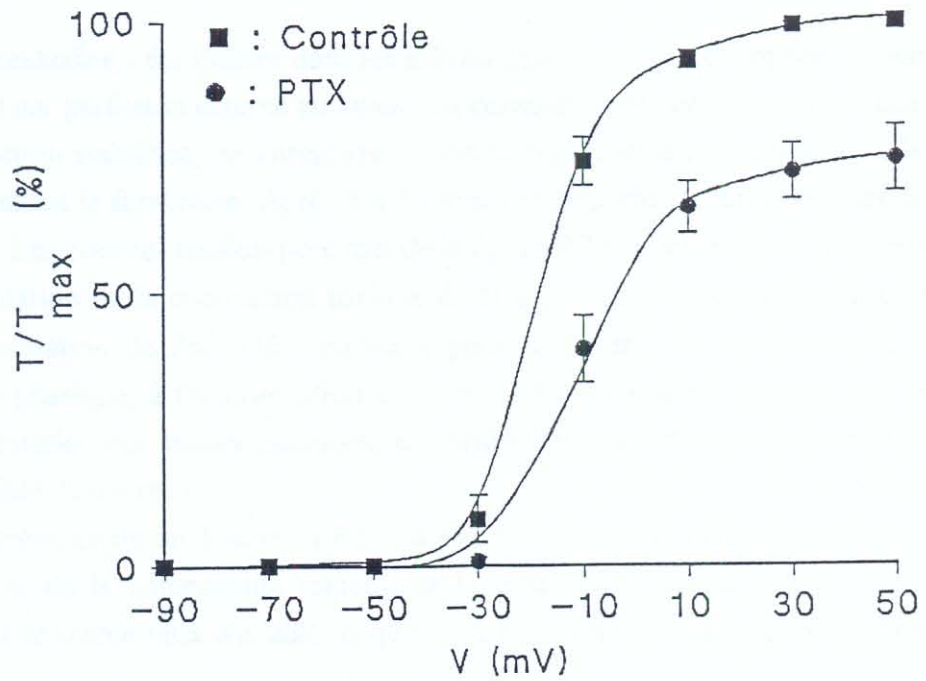
A - Enregistrement de l'activité contractile induite par une dépolarisation de 140 mV et de longue durée (2 s) à partir de HP = -90 mV, en contrôle (Ringer normal) et en présence de PTX. On observe deux composantes de la contraction: la première dite phasique suivie de la deuxième dite tonique. On observe une diminution de l'amplitude des deux composantes en présence de PTX.

B - Courbes d'activation de la contraction tonique (courbes moyennées) réalisées dans les mêmes conditions expérimentales qu'en A. L'amplitude de la composante tonique est mesurée à 500 ms. Par rapport au contrôle (carrés pleins) la PTX entraîne une diminution de la contraction de 26% (cercles pleins) (n = 9).

A



B





située dans la membrane du tubule-T activerait directement les canaux calciques DHPs et cette activation laisse transiter le  $\text{Ca}^{2+}$  qui va libérer celui du RS par le phénomène de " $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release"

Ces effets de PTX sur le courant calcique ne concordent pas avec ceux réalisés sur le neurone, qui montrent que l'application intracellulaire de  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  diminue le courant calcique (HOLZ et al., 1986; SCOTT et DOLPHIN, 1986; WANKE et al., 1987; HESCHELER et al., 1987), cette diminution étant abolie lorsque la préparation est préalablement traitée par la PTX. De même TOSELLI et al. (1989) ont montré qu'au niveau du neurone de l'hypocampe, une protéine G sensible à la PTX serait directement couplée aux canaux calciques de type L et ceci entraîne une inhibition du courant calcique par le  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  sans l'intervention d'un second messenger. Ce qui veut dire qu'au niveau de ces préparations une protéine G sensible à la PTX inhibe les canaux calciques alors que dans nos conditions (en accord avec SOMASUNDARAM et al., 1991) une(les) protéine(s) G sensible(s) à la PTX aurai(en)t un effet activateur sur ce courant. Il faudrait donc penser à un mécanisme différent de régulation des canaux calciques DHPs par les protéines G dans le muscle squelettique et dans d'autres structures comme le neurone.

### *III- En Ringer normal contenant la forskoline.*

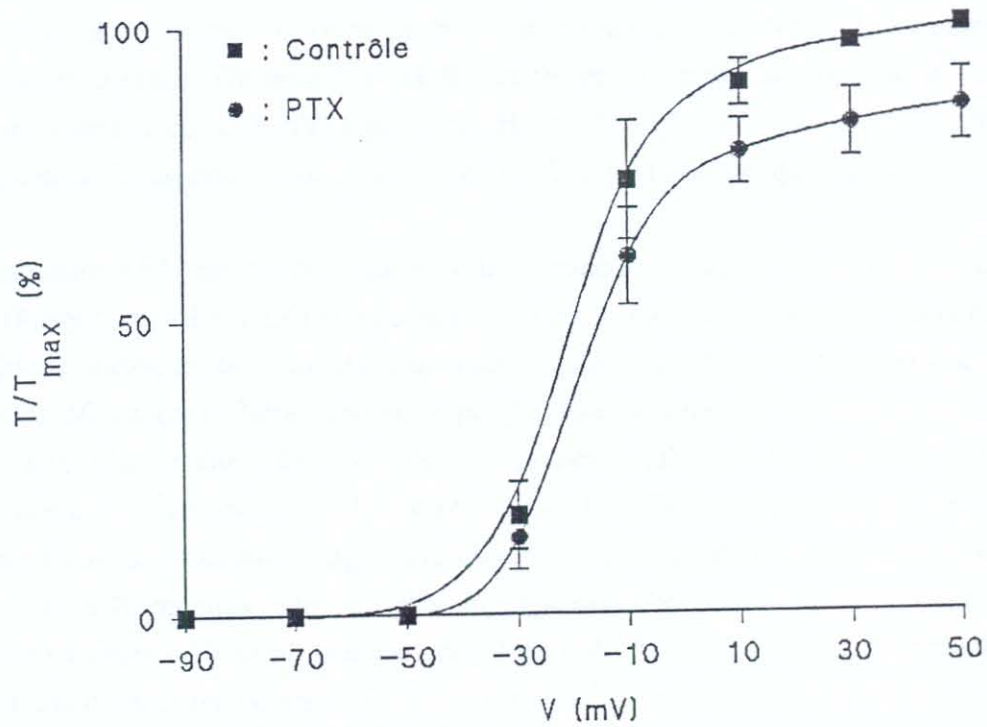
La forskoline a été utilisée dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites (à  $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ) par perfusion externe au niveau du compartiment central. La fibre une fois montée et la contraction stabilisée, on enregistre la contraction contrôle et on passe à la solution de Ringer contenant la forskoline. Après 5 à 10 minutes de perfusion on enregistre de nouveau la contraction. Les courbes tension-potentiel de la figure R7A montrent que la forskoline entraîne une augmentation de la contraction tonique de la fibre musculaire squelettique de  $20 \pm 5\%$ . Cette augmentation de l'activité contractile peut être attribuée, comme dans le cas de la composante phasique, à l'augmentation du taux d'AMPC intracellulaire qui, par le mécanisme de phosphorylation des canaux calciques, augmente le nombre de canaux fonctionnels ainsi que leur probabilité d'ouverture.

En présence de forskoline, la PTX, après 10 minutes de perfusion, (Figure R7B) induit une inhibition de la composante tonique de la contraction de  $18 \pm 6\%$ . On obtient donc sensiblement le même taux d'inhibition que dans le cas où les canaux calciques sont bloqués (15%).

Ces résultats montrent que lorsque le courant calcique est inhibé ou activé, la PTX a un effet inhibiteur sur la contraction tonique et cette inhibition ne passe probablement pas par la cascade: adénylate cyclase-AMPC.

**Figure R6**

**Courbes d'activation de la contraction tonique en contrôle (Ringer normal +  $\text{CoCl}_2$ ) et en présence de PTX. Lorsque les canaux calciques sont bloqués (carrés pleins), la PTX induit une inhibition de la contraction tonique de 15 % (cercles pleins) (n = 8).**





## ***D - EFFET DE PTX SUR LA CONTRACTION PAR APPLICATION INTRACELLULAIRE.***

L'application intracellulaire de PTX a été réalisée sur les fibres coupées dans le but de voir si elle a les mêmes effets qu'en application externe. La fibre intacte est montée avec du Ringer normal dans les compartiments central et latéraux. Après vérification de la bonne qualité du voltage, à l'aide d'une micro pipette on vide le Ringer normal dans les compartiments latéraux et on le remplace par la solution interne (solution 2, tableau 2). Quand la solution interne est mise en place on coupe la fibre au niveau de ses extrémités situées dans les compartiments latéraux. On équilibre les électrodes et on vérifie de nouveau le "clamp". On impose un potentiel de 100 mV à partir de HP = -90 mV et d'une durée de 26 ms pour l'enregistrement de la composante phasique, de 2 s pour la tonique et ceci toutes les 10 minutes.

La figure R8A montre l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en contrôle (Ringer normal + TTX) et en présence de PTX dans les compartiments latéraux. Dans les conditions normales, la contraction diminue régulièrement pour tendre vers la stabilité au bout de 40 à 60 minutes. Cette diminution progressive qui atteint  $38 \pm 6\%$  ( $n = 10$ ) peut être attribuée aux phénomènes de "run down" pouvant affecter les différents mécanismes métaboliques qui y sont impliqués. Lorsqu'on ajoute la PTX dans les compartiments latéraux, on remarque que la diminution progressive observée dans les conditions de contrôle s'accélère au bout de 15 à 20 minutes pour être plus importante au bout de 40 à 60 minutes. Quand on considère les valeurs à 50 ou 60 minutes après l'ajout de PTX dans les compartiments latéraux, on obtient une diminution d'environ 75 % par rapport à la valeur initiale ( $n = 10$ ).

La figure R8B montre l'évolution de la contraction tonique dans les mêmes conditions expérimentales. En conditions "contrôle" on observe également une diminution progressive de la contraction qui atteint  $30 \pm 7\%$  ( $n = 7$ ) au bout de 60 minutes avec une stabilité entre 40 à 60 minutes. Comme dans le cas de la composante phasique cette diminution peut être attribuée au "run down" des mécanismes métaboliques. Lorsqu'on met la PTX dans les compartiments latéraux, on observe une accélération du phénomène après 15 à 20 minutes. Par rapport au contrôle l'inhibition atteint près de 60% au bout de 50 à 60 minutes.

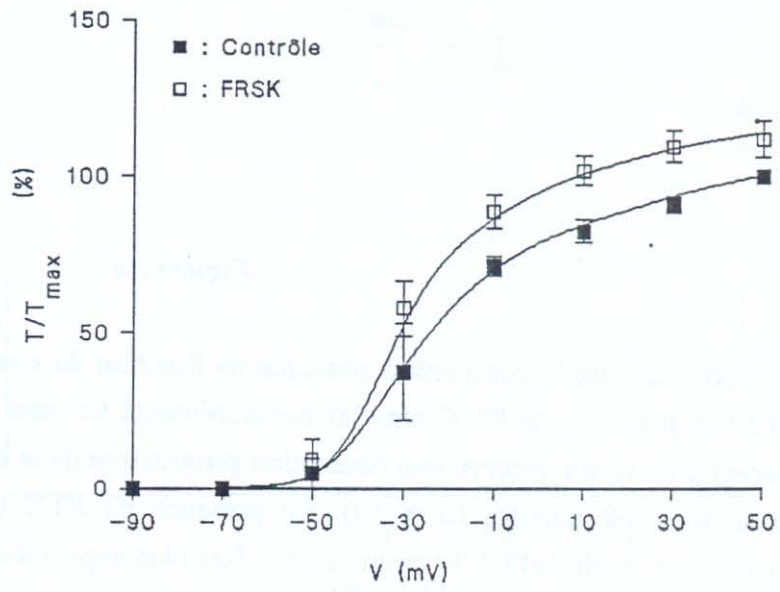
Ces résultats montrent que la PTX appliquée en intracellulaire induit un effet inhibiteur sur l'activité contractile. Dans ce cas, le pourcentage d'inhibition est plus important par rapport à la perfusion externe de PTX sur fibres non coupées. Cette différence d'inhibition est pour le moment difficile à interpréter. On peut supposer que la PTX intracellulaire interfère avec plus de mécanismes impliqués dans l'activation de la contraction ou qu'elle peut

**Figure R7**

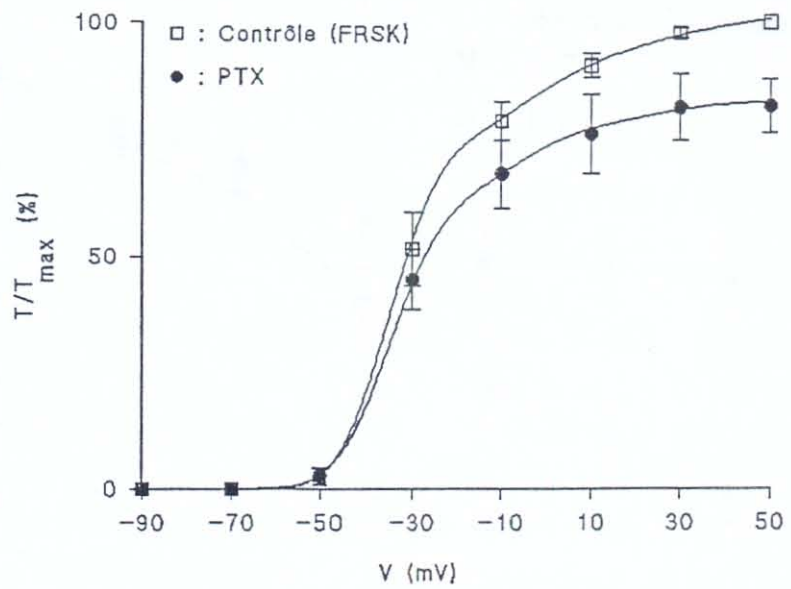
A - courbes montrant les effets de la forskoline (FRSK) sur la composante tonique de la contraction. Par rapport au contrôle (Ringer normal, carrés pleins), la FRSK entraîne une augmentation de la contraction tonique de 12% (carrés vides) (n = 7).

B - Courbes montrant les effets de PTX sur la contraction tonique après perfusion préalable de la préparation avec la FRSK. Par rapport au contrôle (carrés vides) la PTX diminue la contraction de 18% (cercles pleins) (n = 6).

# A



# B



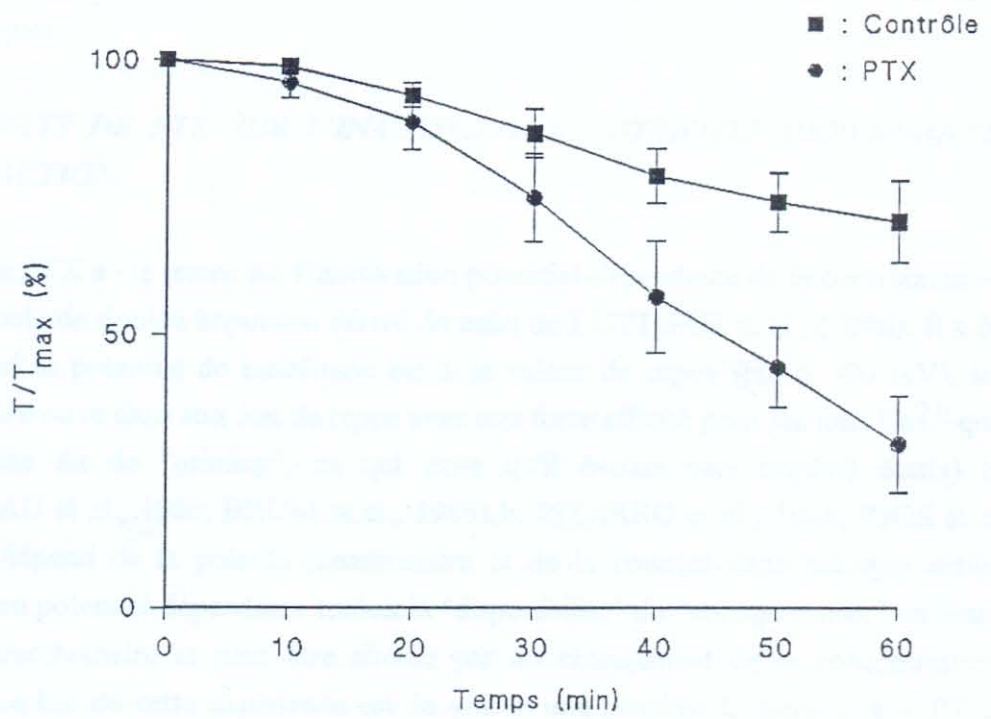


*Figure R8*

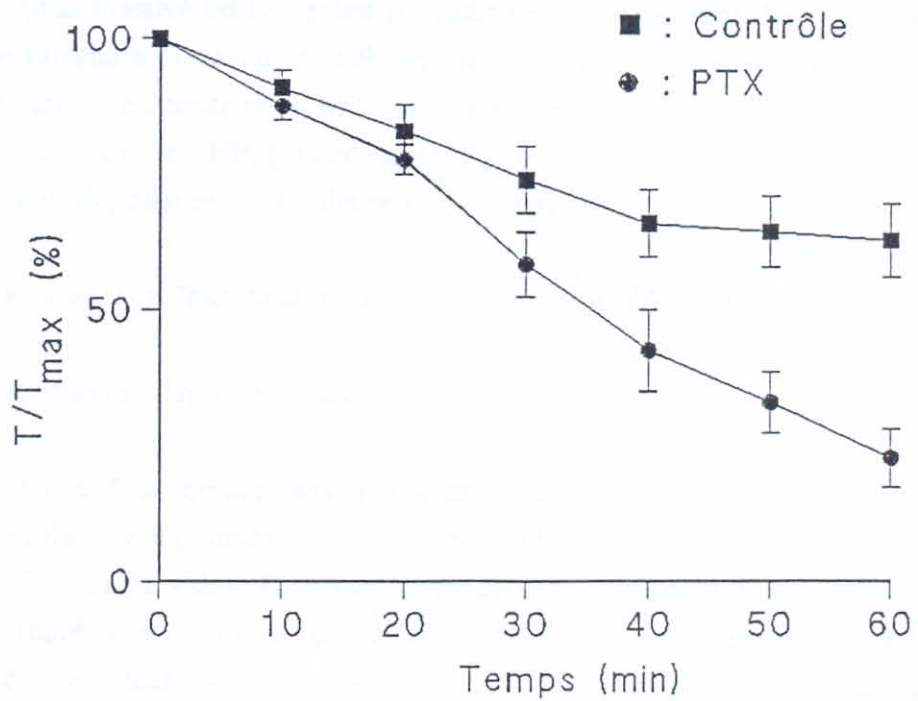
A - Evolution de la contraction phasique en fonction du temps en contrôle (Ringer normal + TTX) et présence de PTX dans les compartiments latéraux. Dans les conditions de contrôle (carrés pleins), on observe une diminution progressive de la contraction qui tend à se stabiliser entre 40 à 60 minutes (n = 10). En présence de PTX (cercles pleins), cette diminution s'accélère à partir de 15 à 20 minutes pour être plus importante au bout de 50 à 60 minutes. Par rapport au contrôle, la PTX entraîne une diminution d' environ 75% (n = 10). Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 26 ms est imposé à partir de HP = -90 mV et ceci toutes les 10 minutes.

B - Evolution de la contraction tonique en fonction du temps dans les mêmes conditions qu'en A. Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s est imposé. La PTX entraîne une diminution d' environ 60% (n = 6).

**A**



**B**



également augmenter les phénomènes de "run down" par interaction avec les processus métaboliques.

### ***E- EFFETS DE PTX SUR L'INACTIVATION POTENTIEL-DEPENDANTE DE LA CONTRACTION.***

La PTX a été testée sur l'inactivation potentiel-dépendante de la contraction en utilisant un protocole de double impulsion dérivé de celui de LÜTTGAU et al., (1986). Il a été montré que quand le potentiel de membrane est à sa valeur de repos (HP = -90 mV), le "voltage sensor" se trouve dans son état de repos avec une forte affinité pour les ions  $Ca^{2+}$  qui se fixent sur un site dit de "priming", ce qui évite qu'il évolue vers un(des) état(s) inactivé(s) (LÜTTGAU et al., 1986; BRUM et al., 1988a,b; PIZARRO et al., 1988; RIOS et al., 1990). Cet état dépend de la polarité membranaire et de la concentration calcique externe. Cette inactivation potentiel-dépendante traduit la "disponibilité" du "voltage sensor" en fonction de la polarité membranaire et peut être altérée par un changement de la concentration calcique externe. Le but de cette expérience est de voir si une protéine G sensible à la PTX interagit avec le "voltage sensor" comme cela a été évoqué précédemment, dans ce cas il est probable qu'elle modifiera la disponibilité du "voltage sensor" et que les effets de PTX seront modifiés par la concentration calcique externe.

Ainsi, à partir du HP (dont la valeur sera précisée dans chaque cas), on impose à la préparation une pré-impulsion conditionnante (pendant 4 minutes) d'amplitude variable (0 à 100 mV par incrément de 10 mV), durée au cours de laquelle le "voltage sensor" reste dans un état donné (état inactivé ou non selon la valeur de pré-impulsion). Le potentiel de membrane est ensuite ramené à la valeur du HP pendant 10 s pour permettre de restaurer l'activation contractile sans que l'inactivation ne le soit sensiblement avant d'imposer un potentiel test de 100 mV pendant 15 s. Le HP, pendant environ 5 minutes, est maintenu à sa valeur initiale entre chaque série de dépolarisation. La figure R9A illustre ce protocole.

#### ***I - Effets de PTX sur l'inactivation de la contraction à HP de -90 mV.***

##### ***1 - Concentration calcique normale.***

La figure R9B montre l'exemple d'enregistrements de la contraction en imposant un potentiel test de 100 mV pendant 15 s à partir de HP de -90 mV (carré plein), -40 mV (cercle plein), 0 mV (cercle vide). L'activité contractile enregistrée à HP = -90 mV (sans pré-impulsion) représente la contraction contrôle ou contraction maximale à partir de laquelle toutes les autres valeurs seront normalisées. Pour s'affranchir des canaux calciques (pouvant



intervenir compte tenu de la durée de stimulation, 15 s), 8 mM de  $\text{CoCl}_2$  sont ajoutés au Ringer normal.

La figure R9C montre deux courbes d'inactivation de la contraction en fonction de la valeur du pré-potentiel en contrôle (carrés pleins) et en présence de PTX (cercles pleins). En contrôle, la contraction est maximale (pas d'inactivation) à -90 mV et à -80 mV. Une légère inactivation commence à partir de -70 mV pour être complète vers 0 mV avec une valeur de demi-inactivation située autour de -42 mV. Cette courbe est légèrement différente de celle de LÜTTGAU et al., (1986) qui ont utilisé des solutions physiologiques différentes de la nôtre (le NaCl étant remplacé par le TEA sulfate). Elle montre que plus la valeur du pré-potentiel est élevée, plus l'inactivation est prononcée. En présence de PTX, l'inactivation est facilitée avec la demi-inactivation à -72 mV et l'inactivation complète vers -42 mV, soit un déplacement de 30 mV de la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs.

A partir de l'équation de BOLZTMAN:  $Y = m \cdot \{1 + (\exp((x-x_{0.5})/p))\}^{-1}$  où:

$m$  = valeur de normalisation (100 dans notre exemple)

$x$  = valeur de potentiel imposé

$x_{0.5}$  = valeur de potentiel à la demi-inactivation

$p$  = facteur qui détermine la pente au point d'inflexion de la courbe

il a été possible de déterminer  $p$  qui est de 11,32 pour la courbe contrôle et de 7,11 en présence de PTX. La dérivée de cette équation (qui détermine la valeur de pente) au point  $x_{0.5}$  est:  $Y' = -100/4p$  et en remplaçant  $p$  par sa valeur, on trouve une valeur de pente égale à 22%/10 mV en contrôle et de 35%/10 mV en PTX. Nous pouvons dire à partir de ces résultats qu'il y a "shift" de la courbe et augmentation de la vitesse d'inactivation en présence de PTX. Ce qui signifie qu'il pourrait y avoir probablement au moins deux mécanismes touchés.

## 2- Concentration calcique élevée.

Le même protocole d'inactivation est utilisé pour étudier les effets de PTX sur l'inactivation de la contraction en présence de 9 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  externe (concentration calcique normale x 5). La figure R10 montre les effets de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  externe sur la courbe de disponibilité de la contraction. L'inactivation est sensiblement retardée puisque lorsque la concentration calcique normale (1,8 mM) est multipliée par 5, un déplacement d'environ 20 mV de la courbe vers les potentiels positifs est observé. Ceci confirme que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  stabilisent le "voltage sensor" et contribue à compléter les résultats de LÜTTGAU et al., (1986) qui ont montré qu'en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  externe, la courbe d'inactivation est déplacée vers les potentiels négatifs, et ceux de GARCIA et al., (1992b) qui ont montré que le passage

de 2 mM à 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  externe entraîne un "shift" de 18 mV de la courbe d'activation des mouvements de charge vers les potentiels positifs. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle le  $\text{Ca}^{2+}$  se fixe sur un site spécifique sur le "voltage sensor" et empêche celui-ci d'évoluer vers son état inactivé.

S'il est admis que les mouvements de charge sont, en partie, l'expression des signaux électriques engendrés par le "voltage sensor" (RIOS et BRUM., 1987; ADAMS et al., 1990), l'augmentation de la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  externes entraîne une augmentation de l'état d'activité du "voltage sensor" par augmentation de la quantité maximale de charge déplacée ( $Q_{\text{max}}$ ) (GARCIA et al., 1992b) d'où l'inactivation retardée que rapportent nos résultats. De plus le facteur de pente  $p$  est de 10.05 soit une valeur de pente de 24%/10 mV (contre 22%/10 mV en calcium normal). Il n'y a pas une différence significative entre ces deux valeurs de pente, ce qui nous permet de dire que l'augmentation de la concentration calcique externe agit sur un seul mécanisme, ce qui se traduit par le déplacement de la courbe mais sans effet sur la vitesse de la pente.

Dans ces conditions de concentration calcique élevée (9 mM) et en présence de PTX, le potentiel de demi-inactivation se situe autour de -32 mV (contre -22 mV sans PTX), comme le montre la figure R11. Le déplacement de la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs est donc moindre lorsque la concentration calcique externe est élevée puisque la courbe était "shiftée" de 30 mV en 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  contre 10 mV dans le cas présent. De même, on a une levée partielle de l'effet de PTX sur la vitesse de la pente (25%/10 mV en contrôle et 20%/10 mV en PTX). La figure R12 montre la valeur des "shifts" induits par la PTX en  $\text{Ca}^{2+}$  normal et en  $\text{Ca}^{2+}$  élevé. L'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire contrebalance les effets de PTX. Nous pouvons considérer que l'une des cibles est le "voltage sensor" à cause de l'effet de  $\text{Ca}^{2+}$  externe, mais la deuxième cible reste difficile à déterminer car, dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  externe n'influe pas sur les mécanismes intracellulaires et par conséquent, un mécanisme interne n'est pas envisageable.



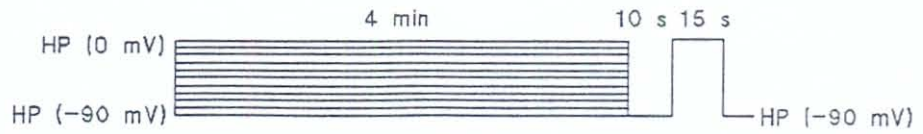
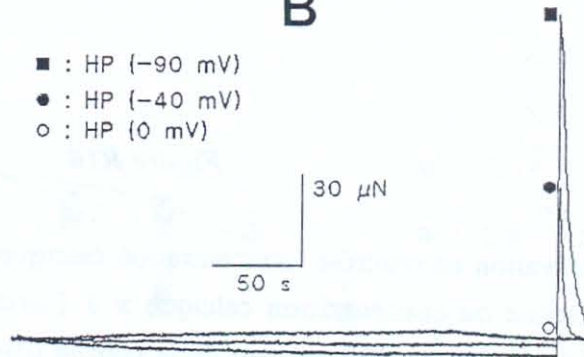
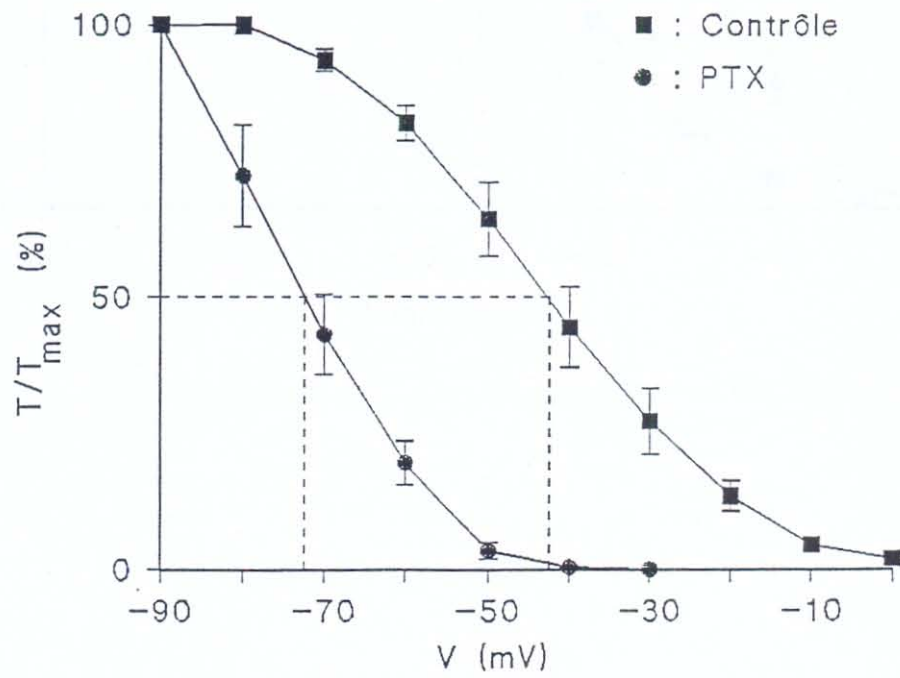
### *Figure R9*

A - Protocole d'étude de l'inactivation voltage-dépendante de la contraction. On fait varier le HP par incrément de 10 mV pendant 4 minutes, on revient au HP initial pendant 10 s avant d'imposer un potentiel test de 100 mV (à + 10 mV) pendant 15 s (les différentes durées sont indiquées sur la figure).

B - Exemples d'enregistrements de l'activité contractile induite par un potentiel test de 100 mV et d'une durée de 15 s en fonction de HP (-90, -40 et 0 mV). A -90 mV la contraction est maximale (valeur à partir de laquelle les autres seront normalisés), elle est de moitié à -40 mV et devient nulle à 0 mV.

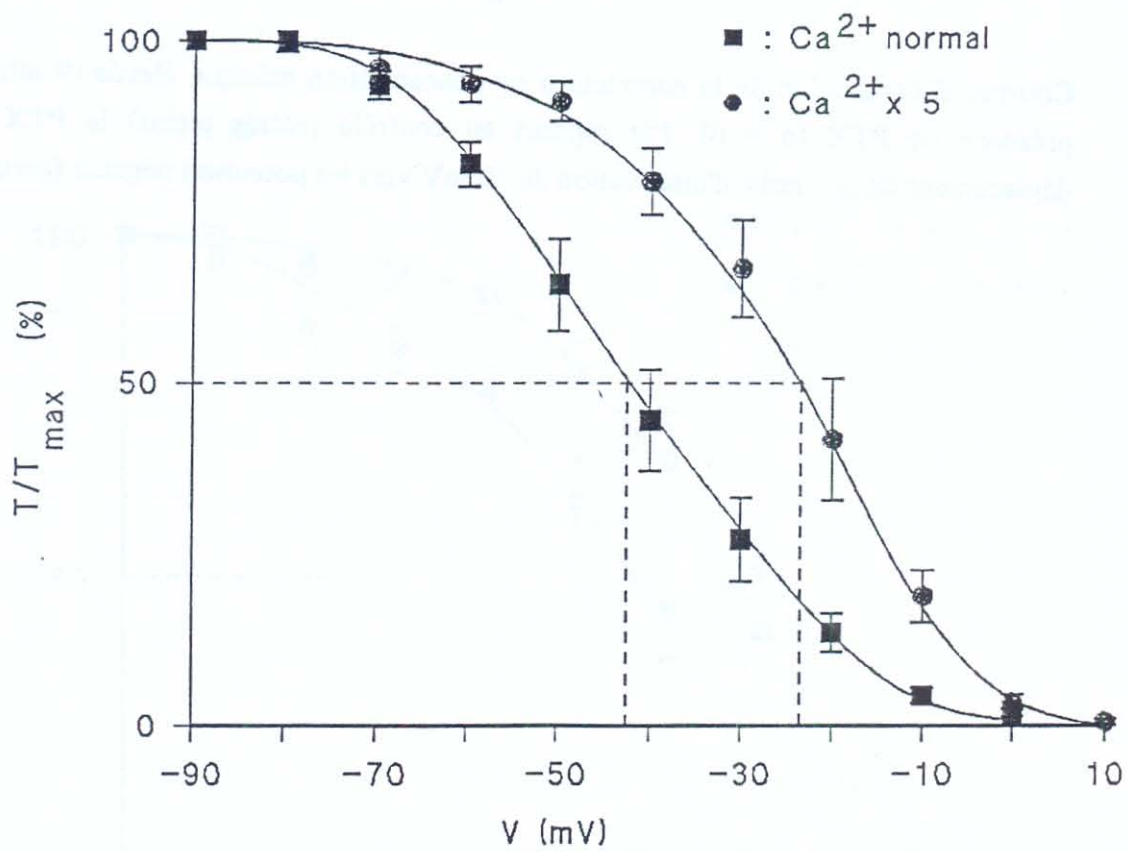
C - Courbes d'inactivation de la contraction en contrôle (Ringer normal +  $\text{Co}^{2+}$ ) ( $n = 12$ ) et en présence de PTX ( $n = 6$ ). Par rapport au contrôle (carrés pleins) on observe un "shift" de la courbe de 30 mV vers les potentiels négatifs en présence de la toxine (cercles pleins).



**A****B****C**

**Figure R10**

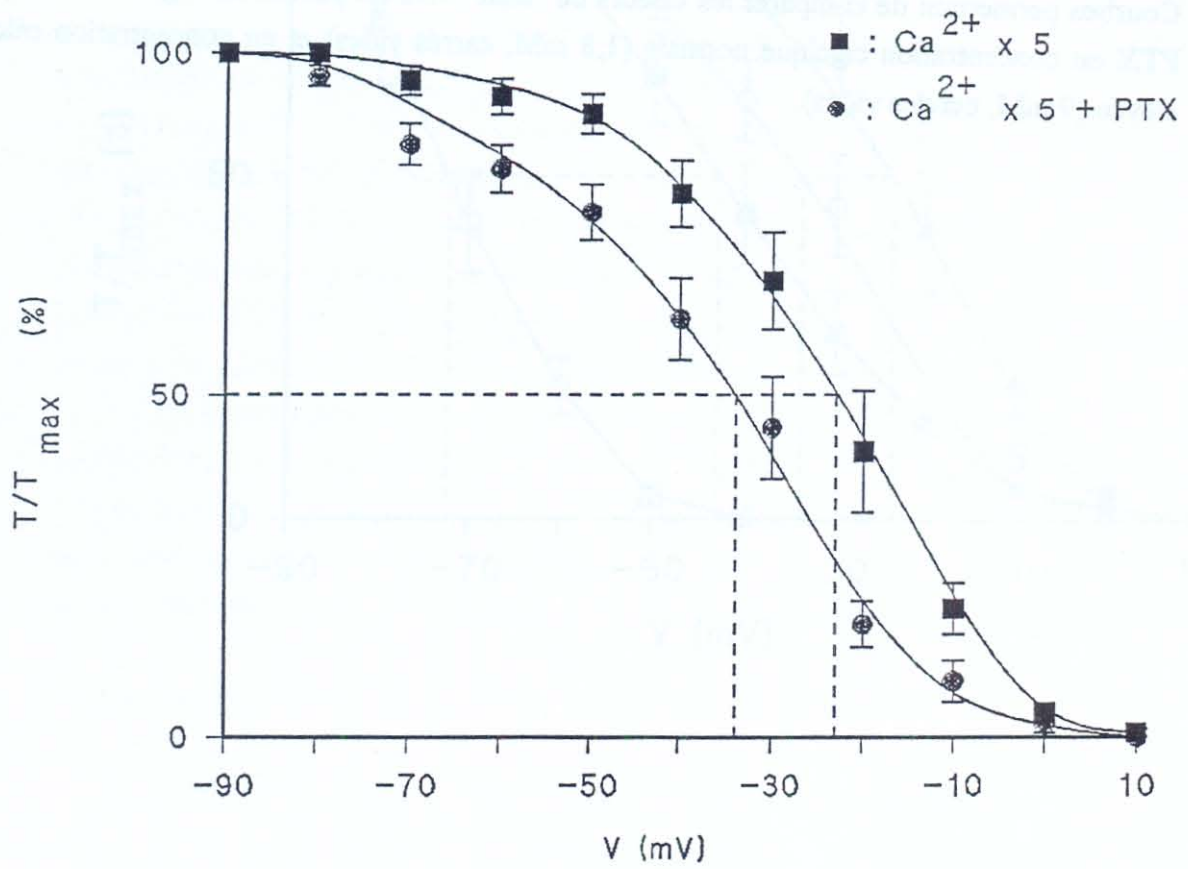
Courbes d'inactivation en contrôle (concentration calcique normale +  $\text{Co}^{2+}$ , carrés pleins, n = 12) et en présence de concentration calcique x 5 (cercles pleins, n= 9). La concentration calcique élevée entraîne un déplacement de la courbe d'inactivation d'environ 20 mV vers les potentiels positifs.





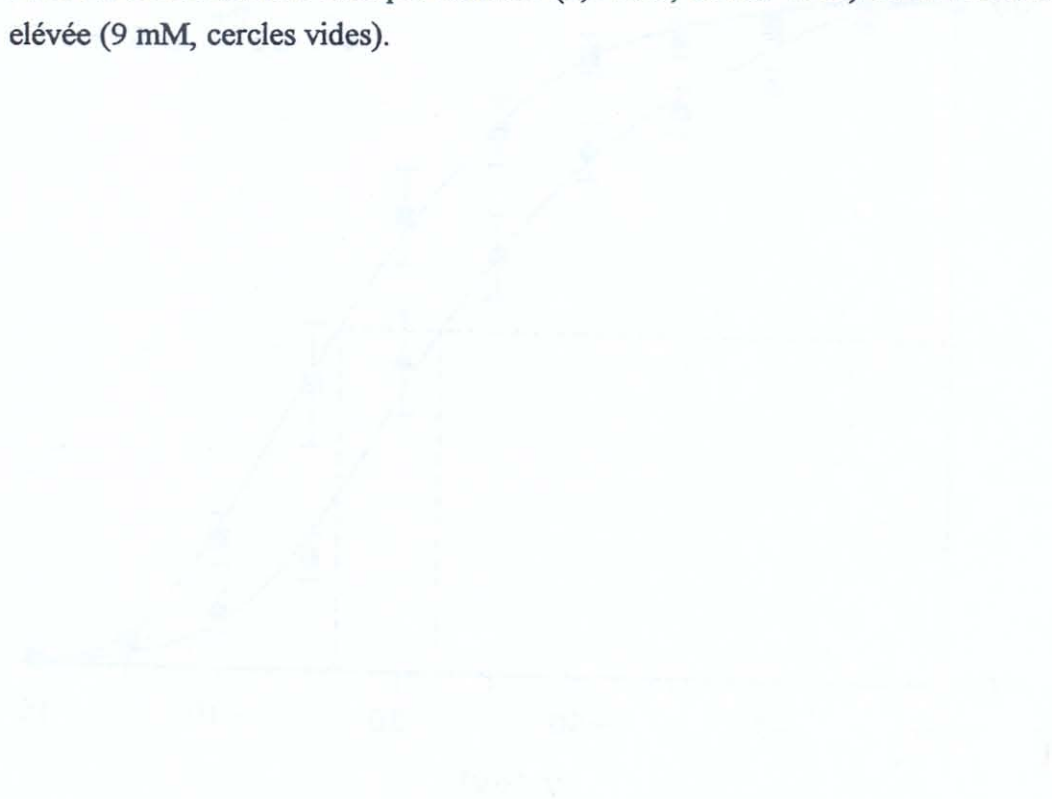
**Figure R11**

Courbes d'inactivation de la contraction en concentration calcique élevée (9 mM) ( $n = 9$ ) et présence de PTX ( $n = 6$ ). Par rapport au contrôle (carrés pleins) la PTX entraîne un déplacement de la courbe d'inactivation de 10 mV vers les potentiels négatifs (cercles pleins).

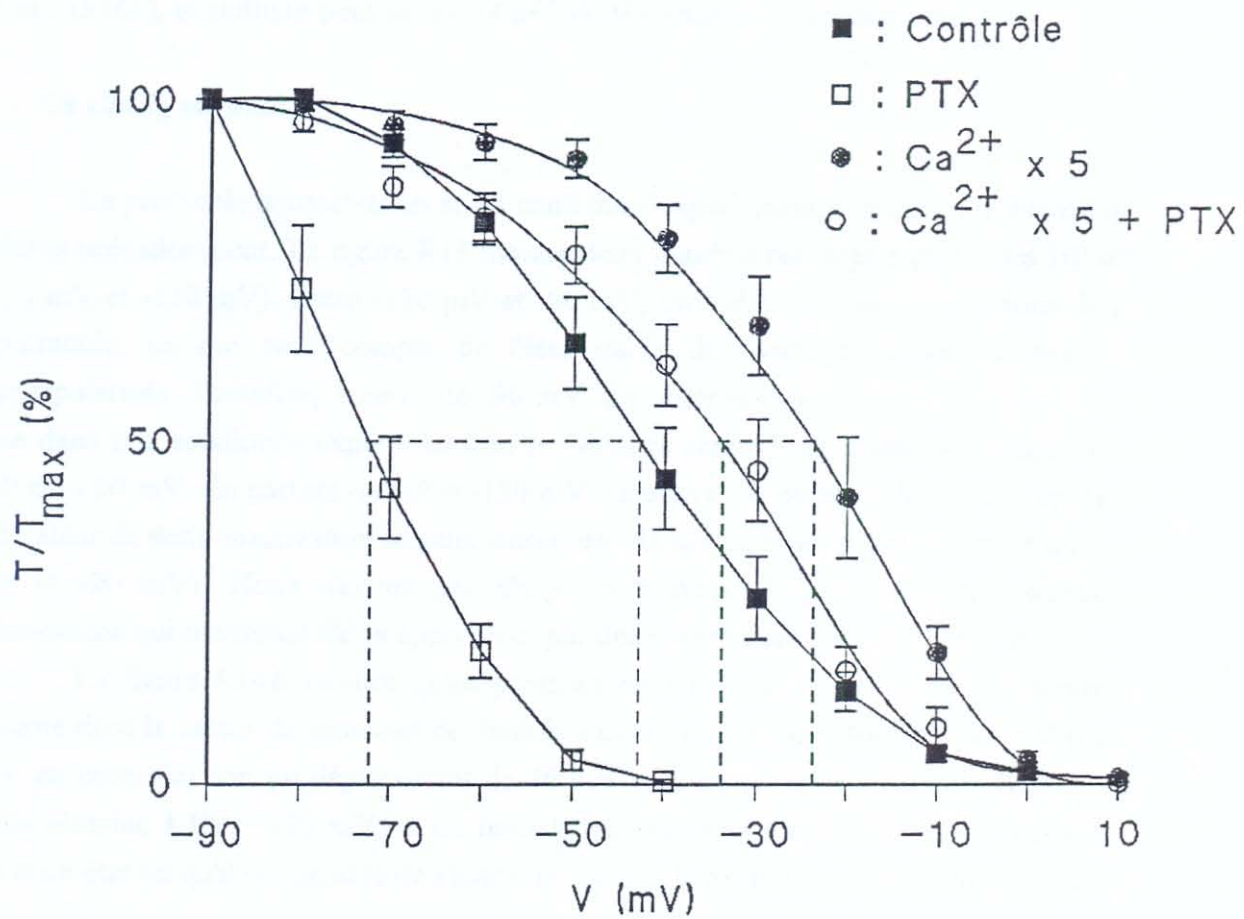


**Figure R12**

Courbes permettant de comparer les valeurs de "shift" vers les potentiels négatifs induit par la PTX en concentration calcique normale (1,8 mM, carrés vides) et en concentration calcique élevée (9 mM, cercles vides).







## *II - Effets sur l'inactivation potentiel-dépendante de la contraction à HP de -130 mV.*

Pour voir si les effets de PTX sur l'inactivation contractile sont dépendants du voltage, nous avons choisi d'étudier ses effets en partant d'un HP de -130 mV (40 mV plus hyperpolarisé qu'en condition contrôle). A ce potentiel le "voltage sensor" serait plus stable puisque les mouvements de charge 1 qui disparaissent sous l'effet d'une dépolarisation maintenue sont restaurés quand on ramène le potentiel à des valeurs négatives (CHANDLER et al., 1976a), et l'affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  du site cationique est supérieure.

### *1 - En $\text{CaCl}_2$ normal.*

Le protocole d'inactivation et les conditions expérimentales restent les mêmes que ceux décrits précédemment. La figure R13 montre deux courbes réalisées à partir des HP différents (-90 mV et -130 mV). Entre -130 mV et -90 mV, on n'observe pas de variations de l'activité contractile, ce qui rend compte de l'état stable du "voltage sensor" à des potentiels hyperpolarisés. Toutefois, à partir de -90 mV, on observe l'inactivation. Ceci indique de plus que dans nos conditions expérimentales, le "voltage sensor" est totalement disponible dès le HP de -90 mV. En partant de HP = -130 mV, l'inactivation semble plus rapide après -90 mV (la valeur de demi-inactivation se situe autour de -62 mV contre -42 mV lorsque qu'on part de HP = -90 mV). Nous n'avons pas d'arguments pouvant nous permettre d'expliquer ce phénomène qui mériterait d'être approfondi par des expériences plus nombreuses.

La figure R14A montre qu'en présence de PTX, on observe une accélération de la courbe dont la valeur de potentiel de demi-inactivation se situe autour de -98 mV (contre -62 mV en contrôle) soit un déplacement de 36 mV vers les potentiels négatifs (valeur voisine à celle obtenue à HP = -90 mV). Ceci nous laisse penser que la PTX met le "voltage sensor" dans un état tel qu'il est capable de s'inactiver lorsque la membrane est très hyperpolarisée.

### *2 - En $\text{CaCl}_2$ élevé.*

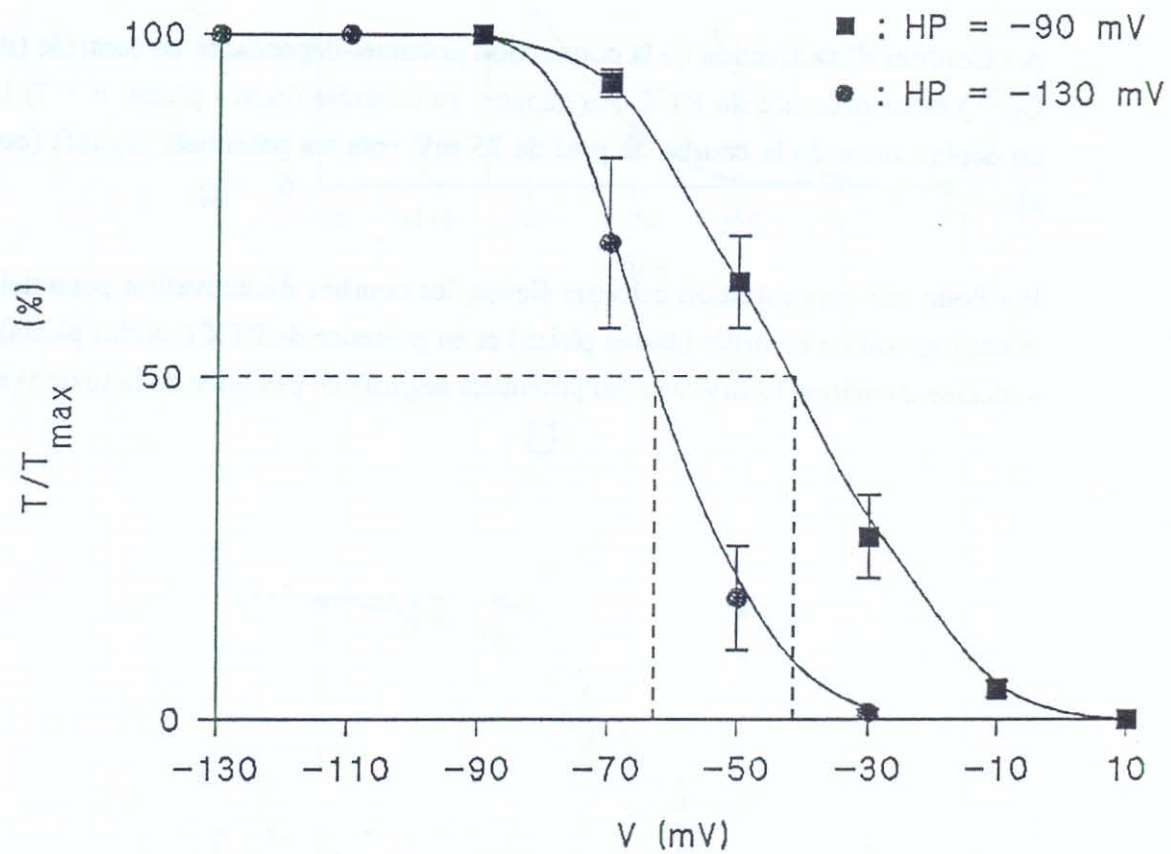
Lorsqu'on augmente la concentration calcique externe (9 mM) on obtient une levée partielle de l'effet de la PTX comme le montre la figure R14B. Le déplacement de la courbe vers les potentiels négatifs par la PTX est de 10 mV comme ce qui était observé à HP = -90 mV.

Ces résultats nous permettent de dire que la PTX a des effets sur le "voltage sensor" quand celui-ci se trouve dans son état de repos et par conséquent, ses effets ne sont pas voltage-dépendants. De plus, il n'y a pas d'antagonisme avec le  $\text{Ca}^{2+}$  sur le site cationique car

**Figure R13**

Courbes d'inactivation potentiel-dépendante réalisées à partir de deux valeurs de HP (-90 et -130 mV). En partant de HP = -90 mV (carrés pleins), la demi-inactivation se situe à -42 mV (n = 12), elle est de -62 mV à HP = -130 mV (cercles pleins) (n = 7).



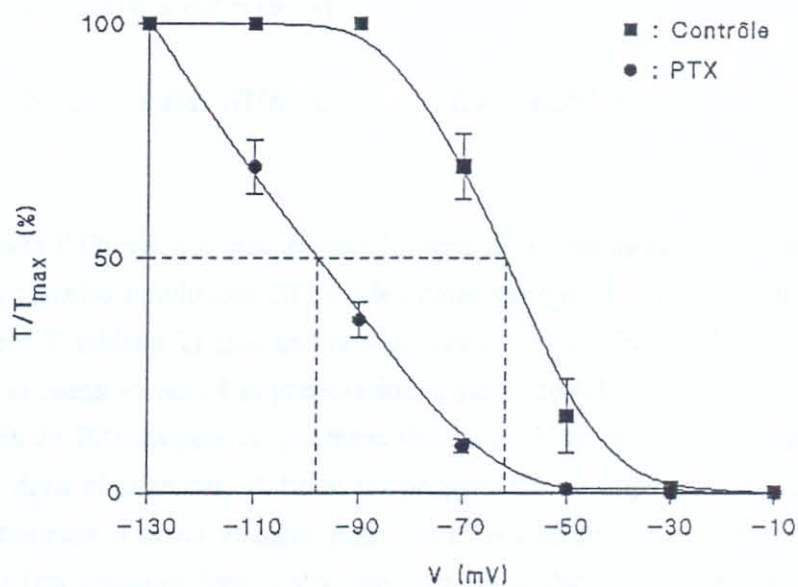


**Figure R14**

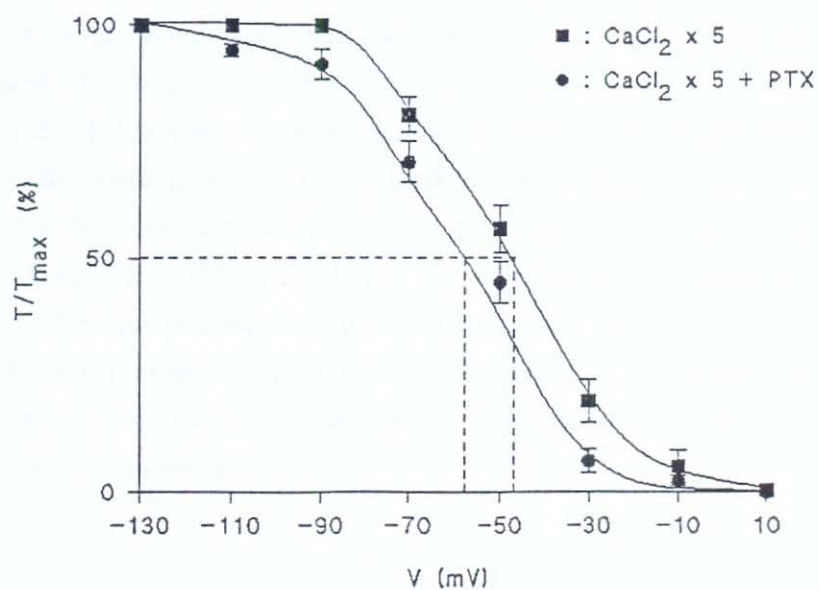
A - Courbes d'inactivation de la contraction potentiel-dépendante en contrôle (Ringer normal +  $\text{Co}^{2+}$ ) et en présence de PTX. Par rapport au contrôle (carrés pleins,  $n = 7$ ) la PTX entraîne un déplacement de la courbe de près de 35 mV vers les potentiels négatifs (cercles pleins,  $n = 8$ ).

B - Pour une concentration calcique élevée, les courbes d'inactivation potentiel-dépendante de la contraction en contrôle (carrés pleins) et en présence de PTX (cercles pleins). La courbe est déplacée d'environ 10 mV vers les potentiels négatifs en présence de la toxine ( $n = 6$ ).

# A



# B





à -130 mV l'affinité du  $\text{Ca}^{2+}$  pour ce site est supérieure donc la levée de l'effet de PTX devrait être supérieure à celle obtenue à HP = -90 mV.

#### ***F- LES EFFETS DE PTX SUR LES MOUVEMENTS DE CHARGE ET LA CONTRACTION.***

Les effets de la PTX ont été étudiés simultanément sur les mouvements de charge et sur l'activité contractile dans les conditions où tous les courants dynamiques sont bloqués (solution externe = 3, interne = 4, tableau 2) sans que la contraction ne le soit.

On impose successivement à la préparation à partir de HP = -90 mV un potentiel de +120 mV, d'une durée de 100 ms puis un potentiel de -120 mV et de même durée. On réalise 10 épisodes successifs dans chaque cas. A l'aide du programme Clampan du logiciel Pclamp, les traces des enregistrements sont moyennées pour avoir une seule trace en dépolarisation et en hyperpolarisation et l'on soustrait l'enregistrement obtenu en hyperpolarisation de celui obtenu en dépolarisation. On obtient alors une trace résultante qui représente les mouvements de charge qui s'activent en dépolarisation.

La figure R15 montre des enregistrements simultanés des mouvements de charge et de la contraction pour deux fibres différentes. La quantité de charge  $Q(\text{on})$  exprimée en  $\text{nC}/\mu\text{F}$  a été obtenue par intégration de sa surface à l'aide du programme Pclamp et rapportée à la capacité membranaire calculée pour un potentiel de 10 mV. En condition contrôle, la quantité de charge est de  $16.8 \text{ nC}/\mu\text{F}$  pour la dépolarisation à +120 mV. En présence de PTX, elle tombe à  $8 \text{ nC}/\mu\text{F}$  soit une diminution d'environ 50% qui est parallèle à la diminution de l'activité contractile (49%). On peut supposer que la PTX inhibe une(les) protéine(s) G qui serai(en)t couplée(s) directement au récepteur DHP dans sa fonction de "voltage sensor" puisqu'il est admis que les mouvements de charge proviennent, du moins en partie, des récepteurs DHPs (BRUM et al, 1988b; ADAMS et al., 1990). Ces résultats confirment de plus le lien étroit existant entre mouvement de charge et contraction dans les présentes conditions expérimentales où tous les courants dynamiques sont bloqués. Toutefois, il est difficile d'expliquer le pourcentage disparate d'inhibition de l'activité contractile par la PTX observée dans les différentes conditions expérimentales.

### **Figure R15**

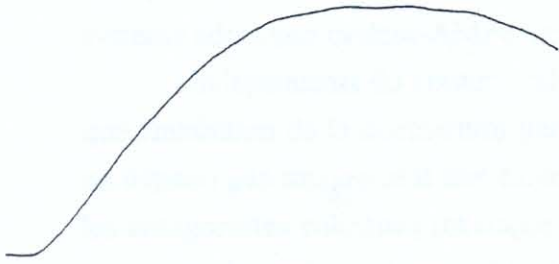
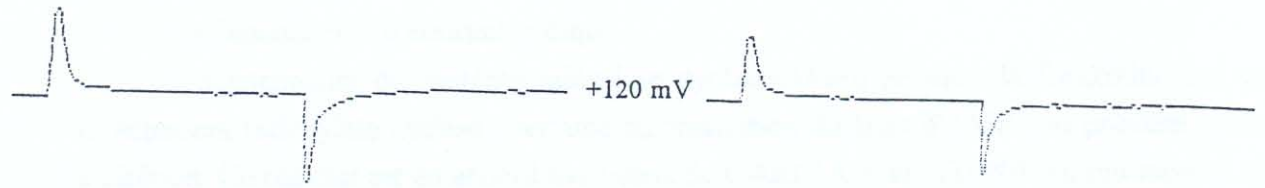
Enregistrement simultané des mouvements de charge et de la contraction en contrôle (solution externe = 3, solution interne = 4, tableau 2) et en présence de PTX sur deux fibres différentes (A et B). Un potentiel de +120 mV est imposé à partir de HP = -90 mV puis de -120 mV à partir du même potentiel. La trace des mouvements de charge représente la résultante entre la somme des traces en dépolarisation moins celle en hyperpolarisation. La contraction est la moyenne des traces obtenues en dépolarisation.

On observe une diminution de la quantité de charge et de la contraction par la toxine (n = 6).

A

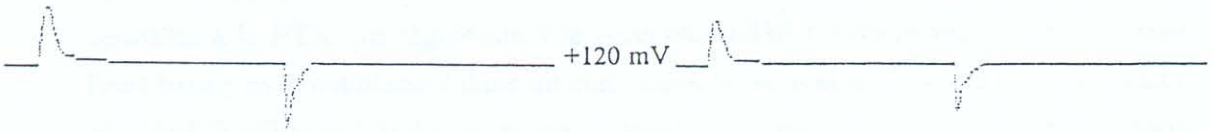
Contrôle

PTX



B

30  $\mu$ N | 0.2  $\mu$ A/ $\mu$ F  
28 ms





### *Discussion sur les effets de PTX sur l'activité contractile.*

Les effets de PTX sur l'activité contractile semblent donc:

-indépendants du courant sodique.

-indépendants du système adénylate cyclase-AMPC puisque la forskoline qui active directement l'adénylate cyclase avec une augmentation du taux d'AMPC ne prévient pas cette inhibition. Ce résultat est en accord avec ceux de GARCIA et al., (1990) qui ont montré que le GTP $\gamma$ S augmente le courant calcique et les mouvements de charge indépendamment du système adénylate cyclase-AMPC dans le muscle squelettique de grenouille.

-indépendants du courant calcique lorsqu'il est bloqué par le Co<sup>2+</sup>. Ceci permet de dire que l'inhibition de la contraction par la PTX observée par SOMASUNDARAM et al., (1991) ne dépend pas uniquement des canaux calciques comme ces auteurs l'avaient affirmé. De plus les antagonistes calciques (exemple de D-600 et nifédipine qu'ils ont utilisés pour bloquer le courant calcique) paraissent ubiquistes (AGNEW, 1987; LÜTTGAU et al., 1992) et sont capables de bloquer également l'activité contractile potentiel-dépendante (BERWE et al., 1987; RIOS et BRUM, 1987; JACQUEMOND et ROUGIER, 1988; COGNARD et al., 1990).

Ils sont partiellement levés par une augmentation de la concentration calcique externe comme le montrent les courbes d'inactivation de la contraction dépendante du potentiel de membrane, en accord avec les résultats de GARCIA et al., (1992) qui ont montré que le passage d'une concentration calcique externe de 2 à 10 mM facilite l'activation des mouvements de charge.

Nous pouvons, à partir de ces résultats, considérer le "voltage sensor" comme cible dans cette diminution de l'activité contractile par la PTX et supposer l'existence de protéines G sensibles à la PTX qui réguleraient le récepteur DHP fonctionnant comme "voltage sensor" à l'état basal, en le maintenant dans un état activé ou activable. Selon le modèle de LÜTTGAU et al., (1987) (Figure R16A) au repos le système se trouve dans son état de repos (R); sous l'influence de la dépolarisation, il passe dans l'état activé (A) pendant lequel il y'a libération du calcium du RS, puis dans son état inactivé (I) pendant lequel la libération du calcium est bloquée. La dissociation du calcium du coupleur entraîne le passage du système dans son état paralysé (Io). On peut supposer selon ce modèle que la PTX en inhibant une(les) protéine(s) G sensible(s) permet le passage du "voltage sensor" dans un état partiellement inactivé ou paralysé sans passer par l'état activé (nous avons schématisé ce mécanisme probable par des flèches en pointillés). De même selon le modèle de PIZARRO et al., (1988) (Figure R16B) la dépolarisation de la membrane permet le passage du système de son état de repos "resting" à son état activé: transition au cours de laquelle les mouvements de charge de type 1 (qui seraient à l'origine de la libération du calcium du RS, CSNERNOCH et al., 1991; GARCIA et al., 1991a,b) s'activent. La transition entre l'état inactivé et paralysé est également potentiel-

dépendante et génère les mouvements de charge de type 2. Les transitions verticales (entre repos-paralysé et activé-inactivé) ne dépendent pas directement du potentiel. On pourrait également à partir de ce modèle supposer un mécanisme de PTX similaire au précédent (schématisé par les flèches en pointillés).

Cette régulation basale du "voltage sensor" par une(les) protéine(s) G serait(ent) directe et ne fait pas intervenir nécessairement un second messager, contrairement aux résultats de GARCIA et al., (1990) qui n'ont observé aucun effet en présence du GDP $\beta$ S (détail dans le chapitre sur les analogues non hydrolysables du GTP et du GDP).

Nous ne pouvons pas exclure un effet éventuel sur les protéines G sensibles à la PTX qui réguleraient la phospholipase C (pour revue, voir BIRNBAUMER et al., 1990) quand bien même le rôle de l'IP3 dans le couplage excitation-contraction est contesté (HEILMEYER et al., 1990; HANNON et al., 1992), ni sur les protéines G sensibles de la membrane du RS (SCHERER et al., 1987; TOUTANT et al., 1990), cependant elles ne devraient pas être sensibles au Ca<sup>2+</sup> externe. Il faudrait également considérer les protéines G monomériques qui sont associées à la triade et qui seraient impliquées dans les mécanismes de couplage excitation-contraction (DOUCET et TUANA, 1991), dont on ignore si elles sont sensibles à la PTX ou non.

La question qui reste posée est la nature de la protéine G qui serait impliquée dans ce couplage excitation-contraction puisque au moins deux types de protéines G sensibles à la PTX ont été identifiées dans le muscle squelettique (TOUTANT et al., 1988; 1990).



**Figure R16**

A - Modèle (modifié) montrant les différents états du "voltage sensor". Au repos (R) le système est au repos, la dépolarisation de la membrane met le système dans un état activé (A) pendant lequel le calcium est libéré du RS puis passe ensuite dans un état inactivé (I) pendant lequel la libération du calcium est bloquée. La dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  du système met le "voltage sensor" dans un état paralysé (Io). Les flèches en pointillées représentent les mécanismes d'action possible de la PTX sur le "voltage sensor".

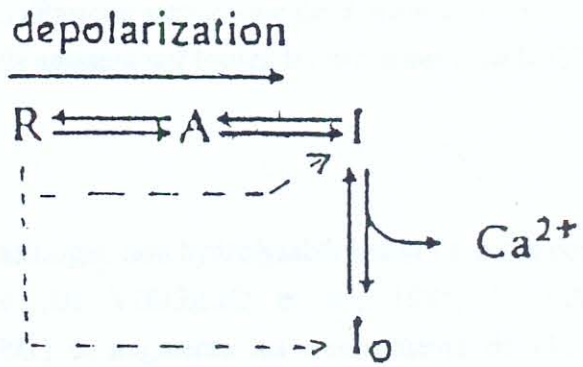
D'après LÜTTGAU et al., (1987).

B - Modèle (modifié) du "voltage sensor" similaire à celui en A. Les transitions horizontales sont directement dépendantes du potentiel alors que les verticales ne sont pas directement liées au potentiel. Les flèches en pointillées illustrent le mécanisme possible de PTX.

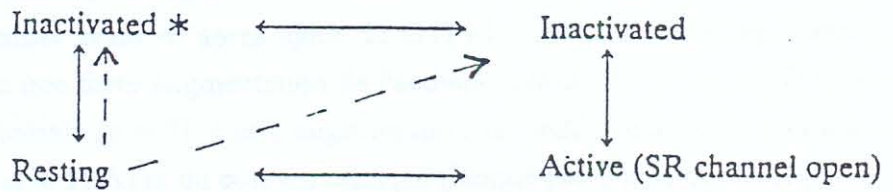
D'après PIZARRO et al., (1988).



A



B



## **CHAPITRE 2: EFFETS DES ANALOGUES NON HYDROLYSABLES DU GTP ET DU GDP SUR L'ACTIVITE CONTRACTILE DU MUSCLE SQUELETTIQUE.**

Les analogues non hydrolysables du GTP (GTP $\gamma$ S) et du GDP (GDP $\beta$ S) se fixent sur la sous-unité  $\alpha$  des protéines G pour les activer ou les inhiber respectivement. Ces analogues sont non hydrolysables par l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$ . Ils ont donc un effet permanent mais non sélectif car ils agissent sur toutes les protéines liant le GTP.

### **A- LES EFFETS DU GTP $\gamma$ S.**

Il a été rapporté que cet analogue non hydrolysable induit l'activité contractile des fibres pelées du muscle squelettique (DI VIRGILIO et al., 1986; VILLAZ et al., 1989; SOMASUNDARAM et al., 1991) et augmente les mouvements de charge et le courant calcique de la fibre coupée du muscle squelettique de grenouille indépendamment du système adénylate cyclase AMPc (GARCIA et al., 1990).

Nous avons, pour notre part, voulu vérifier ces données sur fibre coupée en étudiant les effets de cet analogue sur l'activité contractile et sur les mouvements de charge dans des conditions physiologiques permettant de bloquer toutes les conductances dynamiques. Comme précédemment la solution externe est la solution 3 et la solution interne est la solution 4 (tableau2). A partir de HP = -90 mV, des potentiels dépolarisants d'une durée de 100 ms sont imposés par incrément de 20 mV. Le GTP $\gamma$ S est appliqué dans les compartiments latéraux afin qu'il diffuse dans le cytoplasme des fibres coupées au préalable, les mesures sont réalisées après un délai de 20 à 25 minutes. La figure R17A montre les courbes d'activation de la contraction en fonction du potentiel avant et après ajout de GTP $\gamma$ S (500  $\mu$ M) dans les compartiments latéraux. On observe une forte augmentation de l'activité contractile qui se stabilise à environ 180% de sa valeur initiale (n = 7). Cette augmentation est indépendante du courant sodique (bloqué par la TTX et le TEA) et du courant calcique (bloqué par 8 mM de CoCl<sub>2</sub>).

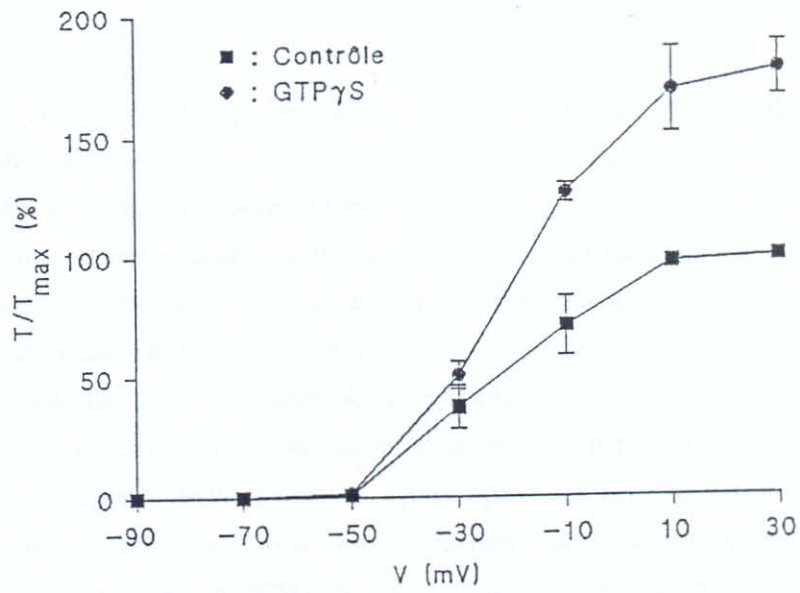
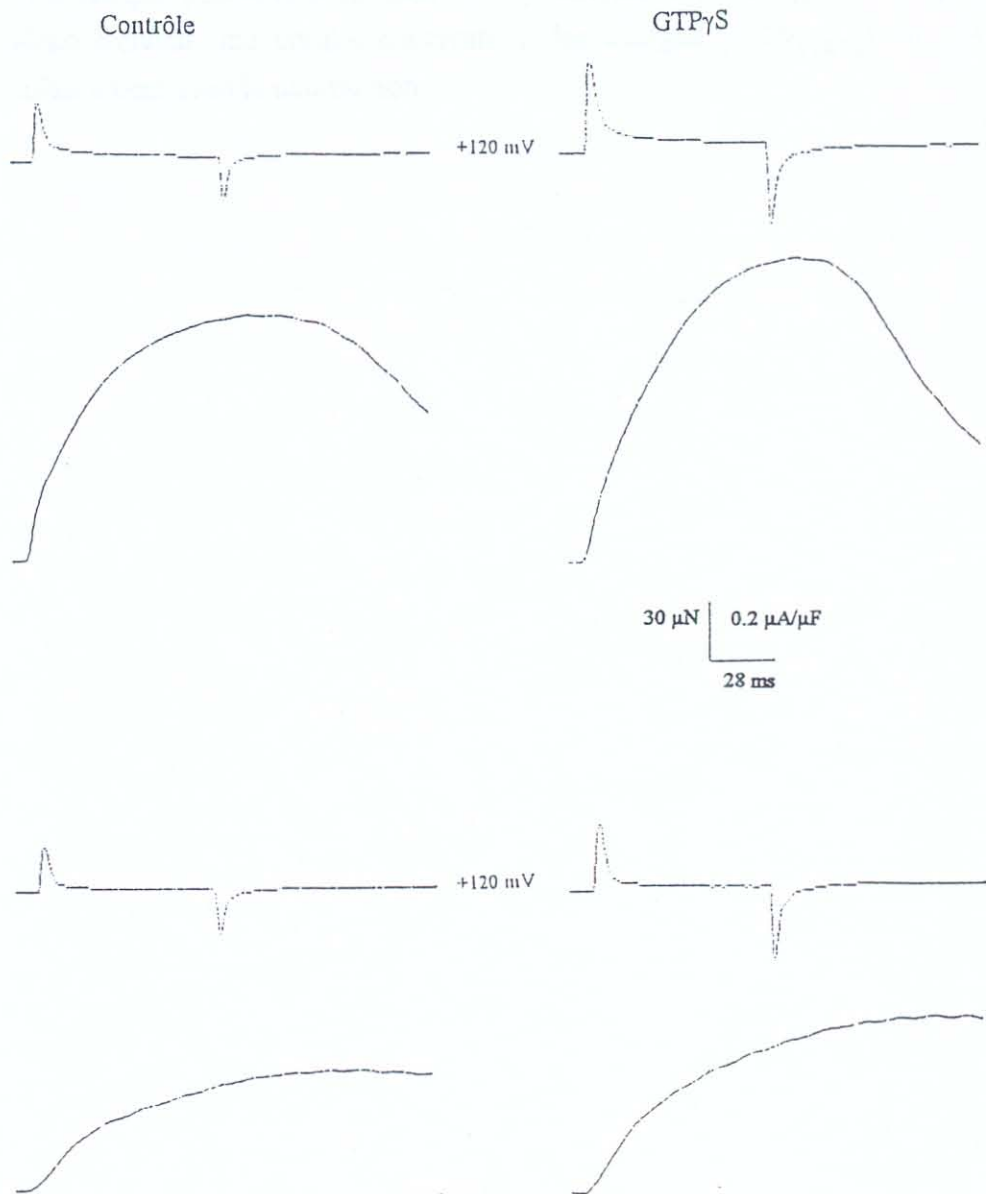
Ces résultats sont en accord avec ceux de DI VIRGILIO et al., (1986), de VILLAZ et al., (1989) et de SOMASUNDARAM et al., (1991). Cependant pour ces derniers auteurs l'effet du GTP $\gamma$ S disparaît lorsque le courant calcique est bloqué par les antagonistes organiques (D-600, nifédipine) ce qui les avait conduit à émettre l'hypothèse d'un couplage direct entre récepteur DHP fonctionnant comme canal calcique et une protéine G. Nos résultats sont différents dans la mesure où l'activité contractile est augmentée par le GTP $\gamma$ S malgré le blocage du courant calcique par CoCl<sub>2</sub>. Etant donné que les bloqueurs calciques utilisés par SOMASUNDARAM et al., sont ubiquistes (AGNEW, 1987; LÜTTGAU et al., 1992) et bloquent également l'activité contractile dépendante du potentiel (BERWE et al.,

**Figure R17**

A - Courbes moyennes d'activation de la contraction phasique en fonction du potentiel de membrane en contrôle (carrés pleins) et en présence de  $GTP\gamma S$  dans les compartiments latéraux (cercles pleins). Un potentiel dépolarisant de 20 mV d'incrément, d'une durée de 100 ms est imposé à partir de  $HP = -90$  mV. On observe en présence de  $GTP\gamma S$  une augmentation de l'activité contractile de près de 180% par rapport au contrôle (n = 7).

B - Enregistrements des mouvements de charge et de la contraction en absence et en présence de  $GTP\gamma S$  pour un potentiel de + 120 mV, d'une durée de 100 ms imposé à partir de  $HP = -90$  mV. On observe une augmentation des mouvements de charge (environ 40%) et de l'activité contractile (+ de 50%) en présence de  $GTP\gamma S$  (n = 7).



**A****B**

1987; RIOS et BRUM, 1987; JACQUEMOND et ROUGIER, 1988; ERDMAN et LÜTTGAU, 1989; COGNARD et al., 1990), l'absence d'effets en GTP $\gamma$ S est explicable. Cependant LAMB et STEPHENSON, (1991) n'observent pas d'effets de GTP $\gamma$ S sur l'activité contractile des fibres pelées et coupées du muscle squelettique de mammifère et d'amphibien.

Nous avons, d'autre part, enregistré l'activité contractile et les mouvements de charge sur fibre coupée en présence de GTP $\gamma$ S en imposant un potentiel de 120 mV à partir de HP = -90 mV. Les mouvements de charge sont obtenus après sommation et soustraction des signaux obtenus à +120 mV et à -120 mV comme nous l'avons décrit précédemment. La figure R17B montre quelques enregistrements avant et après ajout de GTP $\gamma$ S dans les compartiments latéraux. Dans ces conditions nous avons obtenu une augmentation simultanée des mouvements de charge (environ 40%) et de l'activité contractile (+ de 50%) (n = 7). Ces résultats sont en accord avec ceux de GARCIA et al., (1990) qui avaient déjà observé une augmentation des mouvements de charge mais sans avoir enregistré simultanément l'activité contractile. Signalons que l'enregistrement des mouvements de charge nécessite plusieurs épisodes (10) à chaque potentiel aussi bien en dépolarisation qu'en hyperpolarisation ce qui nous a empêché d'établir une courbe d'activation des charges ( $Q/Q_{(max)}$ ) en fonction du potentiel simultanément avec la contraction.

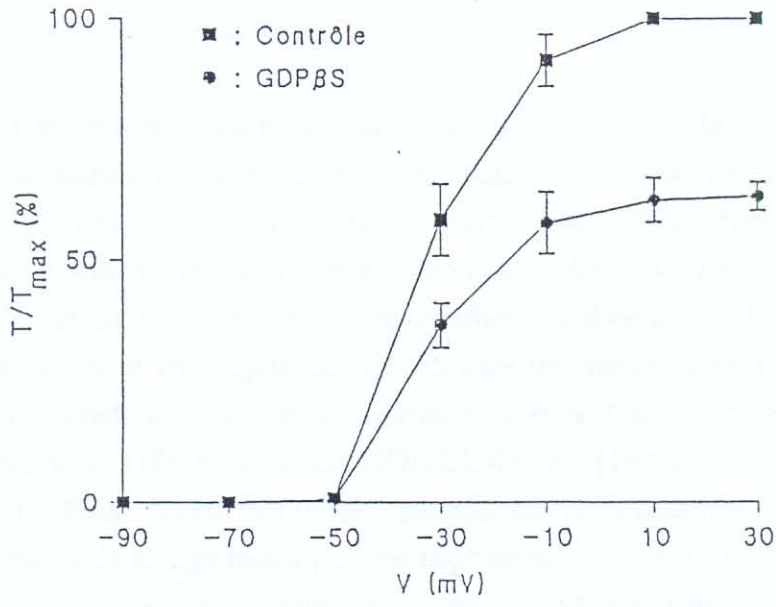
**Figure R18**

A - Courbes moyennes d'activation de la contraction phasique en fonction du potentiel de membrane en absence (carrés pleins) et en présence de GDP $\beta$ S dans les compartiments latéraux (cercle pleins). On observe une diminution de l'activité contractile (environ 40%) en présence de cet analogue non hydrolysable du GDP (n = 8).

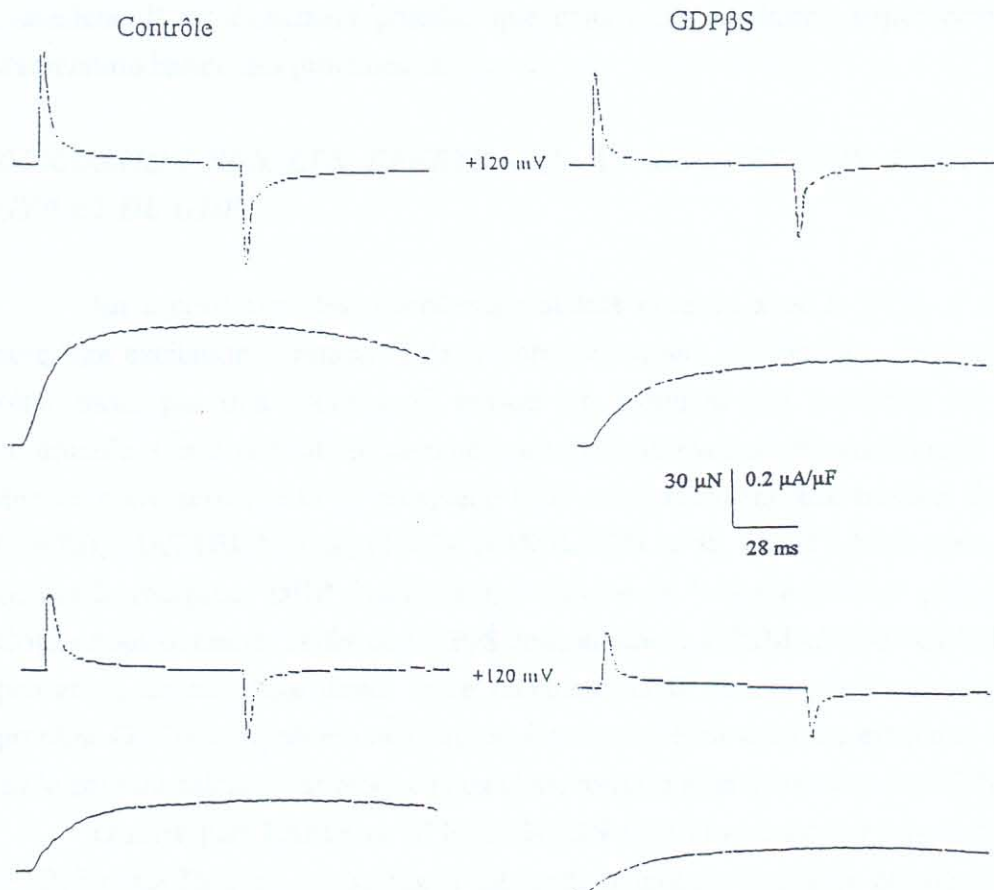
B - Enregistrements des mouvements de charge et de la contraction en absence et en présence de GDP $\beta$ S pour un potentiel de + 120 mV, d'une durée de 100 ms imposé à partir de HP = -90 mV. On observe une diminution des mouvements de charge (36%) et de la contraction (35%) en présence de GDP $\beta$ S (n = 8).



# A



# B



## ***B- LES EFFETS DU GDP $\beta$ S.***

Cet analogue non hydrolysable du GDP se fixe sur la sous-unité  $\alpha$  des protéines G et inhibe la fixation du GTP. Il est connu pour induire une diminution de l'activité contractile (VILLAZ et al., 1989; SOMASUNDARAM et al., 1991). Nous avons étudié son effet sur l'activité contractile et les mouvements de charge dans les mêmes conditions que celles du GTP $\gamma$ S et la figure R18A montrent les courbes d'activation de la contraction en fonction du potentiel avant et après ajout de GDP $\beta$ S dans les compartiments latéraux. On observe dans ce cas une diminution de la contraction d'environ 40%. Ces résultats sont en accord avec ceux de VILLAZ et al., (1989), SOMASUNDARAM et al., (1991).

La figure R18B montre des enregistrements simultanés de l'activité contractile et des mouvements de charge induit par une dépolarisation de + 120 mV. On observe également une diminution moyenne de l'activité contractile (35%) et des mouvements de charge (36%) (n = 8). GARCIA et al., (1990) n'avaient observé aucun effet du GDP $\beta$ S alors qu'ils avaient obtenu une augmentation des mouvements de charge en GTP $\gamma$ S. Cette observation pour laquelle ils n'avançaient pas d'explications est difficilement explicable si l'on implique les protéines liant le GTP dans les mécanismes de régulation de l'activité contractile, à moins que dans leurs conditions expérimentales ces effets des différentes protéines G bloquées par GDP $\beta$ S ne s'annulent. Il est également possible que dans leurs conditions expérimentales il n'y ait pas d'activation basale des protéines G.

## ***DISCUSSION SUR LES EFFETS DES ANALOGUES NON HYDROLYSABLES DU GTP ET DU GDP.***

En accord avec les précédents résultats obtenus avec la PTX, il se confirme que le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille est régulé à l'état basal par une protéine G puisqu' en bloquant ces protéines on diminue l'activité contractile. Cette régulation, comme nous l'avions évoqué précédemment, se ferait de façon directe entre protéine G et récepteur DHP conformément aux travaux de YATANI et al., (1988a); MATTERA et al., (1989); HAMILTON et al., (1991). Mais nous pensons que dans ce cas le récepteur DHP fonctionnerait comme le "voltage sensor" puisqu' en présence de CoCl<sub>2</sub> nous obtenons l'effet de GTP $\gamma$ S contrairement à SOMASUNDARAM et al., (1991) qui pensent à un couplage direct entre récepteur DHP fonctionnant comme canal calcique et protéine G. Cette hypothèse ne peut pas être exclue mais toujours est-il que dans les conditions où le courant calcique est bloqué nous observons un effet aussi bien du GTP $\gamma$ S que de GDP $\beta$ S.

D'autre part LAMB et STEPHENSON (1991) n'observent pas d'effet en présence du GTP $\gamma$ S ni sur l'activité contractile ni sur les mouvements de charge des fibres pelées et coupées



d'amphibien et de mammifère. De même, ils n'observent aucun effet de GDP $\beta$ S sur l'activité contractile. Ces résultats contraires aux nôtres pourraient dépendre de la différence dans les conditions expérimentales. Il est possible que le traitement subi par la fibre pelée puisse altérer les mécanismes de modulation de la contraction par les protéines G. De plus la stimulation de l'activité contractile par substitution ionique n'est pas forcément identique à celle déclenchée par des dépolarisations par la technique de "voltage clamp" sur fibre intacte où les mécanismes de couplage seraient plus conservés. Il est important de souligner que ces auteurs ont utilisé de l'EGTA (50  $\mu$ M) alors que nous n'avons pas utilisé ce chélateur calcique pour éviter toute influence probable sur l'activité contractile. Il faut également noter que ces auteurs ont utilisé une solution hypertonique (295 mosmol/Kg) due à la concentration élevée d'HEPES (30 mM) et comme le signale HUANG, (1992) une solution hypertonique peut bloquer Q $\gamma$ . En outre, il est possible que dans nos conditions expérimentales, le RS soit suffisamment chargé en Ca<sup>2+</sup> car comme le soulignent ces auteurs, 50% des fibres répondent au GTP $\gamma$ S si le RS a été préalablement chargé en Ca<sup>2+</sup>. On pourrait également supposer que la quantité de charge mobilisée dans nos conditions de contrôle est faible et par conséquent il y aurait une quantité importante de charge encore disponible et donc activable par le GTP $\gamma$ S.

Ces analogues non hydrolysables restent un outil limité car ils ne permettent pas, comme dans le cas de la PTX, de déterminer la nature de la protéine G impliquée, et le mécanisme qui est exactement touché. Il faut en effet prendre en compte toutes les protéines G, y compris celles de la membrane du RS et celles de faible poids moléculaire dont on sait qu'elles sont capables de fixer le GTP et le GDP (pour revue, voir GUNZBURG, 1992).



### **CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DE LA PROTEINE G IMPLIQUEE DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE CONTRACTILE DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE GRENOUILLE.**

En vue de déterminer la nature de la protéine G qui est impliquée dans la régulation de l'activité contractile du muscle squelettique, nous avons utilisé un outil pharmacologique, le chlorure de benzalkonium qui stimule la protéine Go et inhibe Gi. Dans un deuxième temps des anticorps dirigés spécifiquement contre la sous-unité  $\alpha$  des protéines G ont été également utilisés.

#### **A - LES EFFETS DU CHLORURE DE BENZALKONIUM (BAC).**

Le chlorure de benzalkonium est un ammonium quaternaire utilisé comme antiseptique et désinfectant. C'est un agent cationique de surface qui stimule la protéine Go par échange de nucléotide sur la sous-unité  $\alpha$  et inhibe Gi (HIGASHIMA et al., 1990; BUEB et al., 1992). Il inhiberait aussi partiellement la phospholipase C (READ et KIEFER, 1979). Ces effets inverses (inhibiteurs sur Gi mais activateur sur Go) ont amené HIGASHIJIMA et al., à suggérer que le BAC est un régulateur cationique spécifique des protéines G avec un site de fixation sélectif au niveau de ces protéines. Etant donné que les protéines Gi et Go sont toutes deux présentes dans le muscle squelettique (TOUTANT et al., 1988, 1990), en inhibant l'une (Gi) et en stimulant l'autre (Go), l'effet obtenu pourrait donner des indications sur la nature de celle qui est impliquée dans la régulation de l'activité contractile.

#### **I- Effets du chlorure de benzalkonium sur le courant sodique et calcique.**

Le BAC étant un agent cationique susceptible d'altérer les propriétés électriques de la membrane, nous avons avant toute chose, testé ses effets sur les courants transmembranaires (courants sodique et calcique) susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de couplage excitation-contraction. Le BAC a été dissous dans l'eau désionisée et utilisé à une concentration finale de 5  $\mu\text{g/ml}$  dans la solution de Ringer normal. BUEB et al., (1992) qui ont étudié l'effet inhibiteur de cet outil sur la libération de l'histamine par les cellules mastocytes de rat ont signalé une toxicité cellulaire à une concentration supérieure à 3  $\mu\text{g/ml}$ . Pour notre part, nous avons testé quatre concentrations différentes sur fibres intactes afin de choisir celle qui donne les meilleurs effets. A 2  $\mu\text{g/ml}$  il n'y a aucun effet, 3  $\mu\text{g/ml}$  induit une légère augmentation de l'activité contractile, 5  $\mu\text{g/ml}$  augmente de 16% la contraction et 10  $\mu\text{g/ml}$  induit une augmentation contractile de 20% mais cette concentration s'est avérée

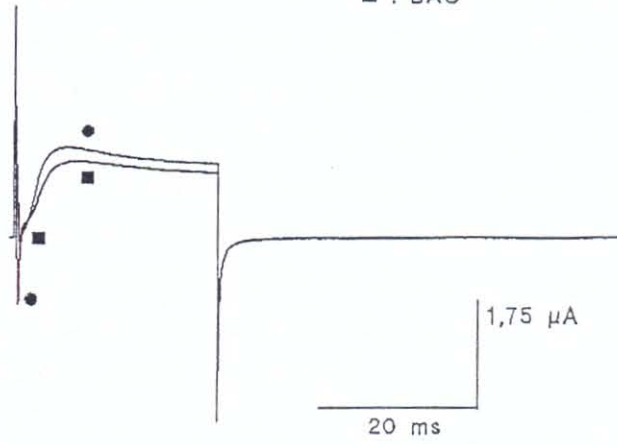
**Figure R19**

A - Exemple d'enregistrements du courant sodique en absence (cercle plein) et en présence de BAC (carré plein) pour un potentiel de + 60 mV, d'une durée de 26 ms imposé à partir de HP = -90 mV. On observe une inhibition du courant sodique (de plus de 90%) et du courant sortant rapide (n = 5).

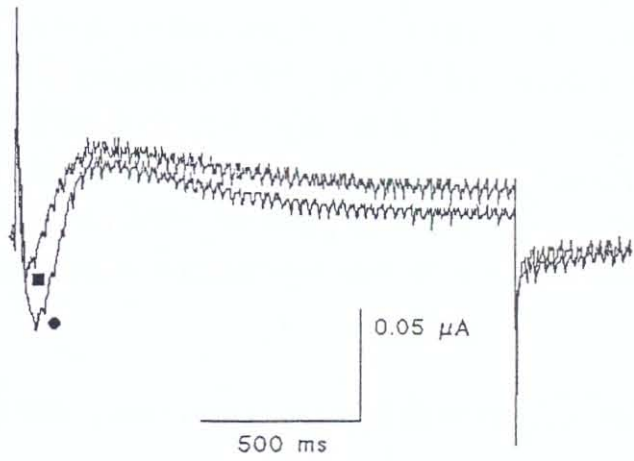
B - Enregistrement du calcique en absence et en présence de BAC pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. On observe une diminution du courant calcique (d'environ 30%) en présence du BAC (n = 5).

# A

● : Contrôle  
■ : BAC



# B





toxique et a induit la mort de certaines fibres. Nous avons alors choisi de travailler avec une concentration de 5  $\mu\text{g/ml}$  et tous les résultats qui suivent ont été obtenus à cette concentration.

La figure R19A montre l'effet de BAC sur le courant sodique activé par un potentiel de 60 mV et d'une durée de 26 ms imposé à partir de HP = -90 mV. Par rapport au contrôle (RN), le BAC entraîne une inhibition presque complète (90% d'inhibition) du courant sodique (n = 5). On observe également une diminution du courant sortant transitoire.

La figure R19B montre les effets du BAC sur le courant calcique activé par un potentiel de 100 mV et d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. Par rapport au contrôle (solution externe = 3, et solution interne = 4, tableau 2), le BAC entraîne une diminution du courant calcique (d'environ 30%) au bout d'une dizaine de minutes (n = 5).

Ces résultats montrent que le BAC en plus de son effet sur les protéines G altère les propriétés électriques de la membrane du muscle squelettique.

## *II- Effets du BAC sur l'activité contractile en Ringer normal.*

La figure R20A montre l'exemple d'enregistrements de l'activité contractile obtenue en contrôle (RN) et quelques minutes après passage en Ringer contenant le BAC. Par rapport au contrôle (cercle plein), on observe en présence du BAC une augmentation de la contraction au bout de 3 minutes (cercle vide) qui continue à augmenter pour être plus importante à 18 minutes (carré vide).

La figure R20B montre la courbe moyenne illustrant cette augmentation progressive de la contraction en présence du BAC (n = 6). La fibre est montée en Ringer normal et dès que la contraction se stabilise on enregistre le contrôle (t = 0) et on perfuse la solution contenant le BAC. La dépolarisation de 100 mV d'amplitude et d'une durée de 200 ms est imposée à partir de HP = -90 mV et ceci toutes les trois minutes. Au bout de trois minutes, l'activité contractile a déjà augmenté de 5% pour atteindre  $16 \pm 5\%$  au bout de 15 à 18 minutes avec une tendance à la stabilisation autour de 15 minutes. Nous avons pu observer une réversibilité de ces effets par retour en Ringer normal.

## *III- Effets du chlorure de benzalkonium sur la composante phasique de la contraction.*

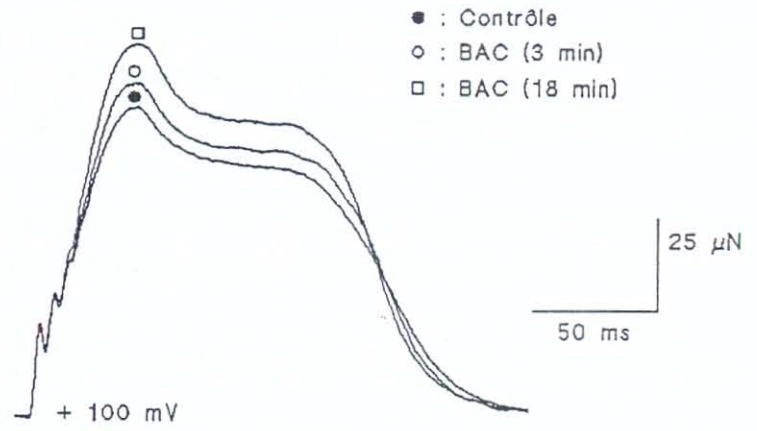
Nous avons étudié les effets du BAC sur la composante phasique de la contraction en imposant des potentiels de courte durée (18 ms) et en bloquant les canaux calciques par 8 mM de  $\text{CoCl}_2$ . Par rapport au contrôle, le BAC induit après 15 minutes une augmentation de la contraction phasique de  $13\% \pm 5$ . Des résultats obtenus sur 6 fibres sont représentés sur la figure R21 qui montre les courbes d'activation de la contraction en fonction du potentiel de

### **Figure R20**

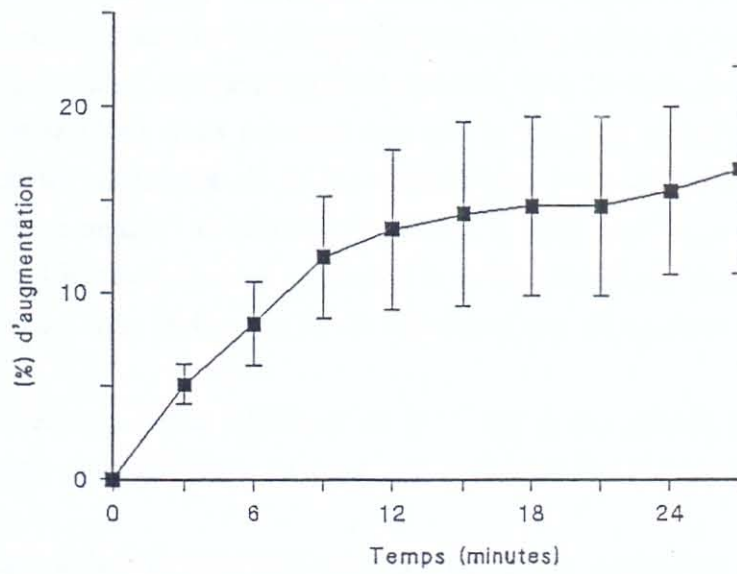
A - Enregistrements de l'activité contractile en absence et en présence de BAC. Par rapport au contrôle (cercle plein) le BAC entraîne après 3 minutes une augmentation de l'activité contractile (cercle vide) qui devient plus importante après 18 minutes (carré vide). Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 200 ms est imposé à partir de  $HP = -90$  mV.

B - Courbe moyenne des enregistrements obtenus en A montrant le pourcentage d'augmentation de l'activité contraction en fonction du temps par le BAC. A  $t = 0$ , on a la contraction témoin et on passe en solution contenant le BAC. On observe une augmentation progressive de la contraction en fonction du temps qui tend à se stabiliser au bout de 15 minutes environ ( $n = 6$ ).

# A



# B





membrane. Le test t de "student" a révélé que l'effet est significatif à 99% près ( $p < 0.01$ ) à +10 et +30 mV.

Pour vérifier si l'effet du BAC passe effectivement par une (des) protéine(s) G sensible(s) à la PTX, nous avons inhiber celle(s)-ci en perfusant au préalable la préparation avec la PTX. La figure R22 montre des exemples d'enregistrements de l'activité contractile de deux fibres (A et B) en contrôle (RN + PTX) et en présence du BAC. On n'observe aucune variation de la contraction par le BAC après une dizaine de minutes ( $n = 5$ ). Ce qui confirme que l'effet du BAC passe par une(des) protéine(s) G sensibles à la PTX.

Cette augmentation est indépendante du courant calcique qui est bloqué par 8 mM de  $\text{CoCl}_2$ .

De plus compte tenu de la durée de stimulation (18 ms) on peut supposer que le BAC en stimulant la protéine  $G_o$  stimule le "voltage sensor" qui libère le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

#### *IV - Effets du chlorure de benzalkonium sur la contraction tonique de la contraction.*

Nous avons testé les effets du BAC sur la contraction tonique, ceci dans le but de voir si l'effet est différent de celui obtenu sur la composante phasique. La solution externe est la solution 5, tableau 2. La figure R23 montre le pourcentage d'augmentation de la contraction tonique en fonction du temps. Un potentiel de 100 mV et d'une durée de 2 s est imposé après toutes les trois minutes. A l'instant  $t = 0$  minute nous avons la stabilité de la contraction. Au bout de trois minutes nous obtenons 4% d'augmentation de la contraction et après 9 minutes on observe 10% d'augmentation avec une stabilité autour de 12 à 15 minutes ( $n = 6$ ).

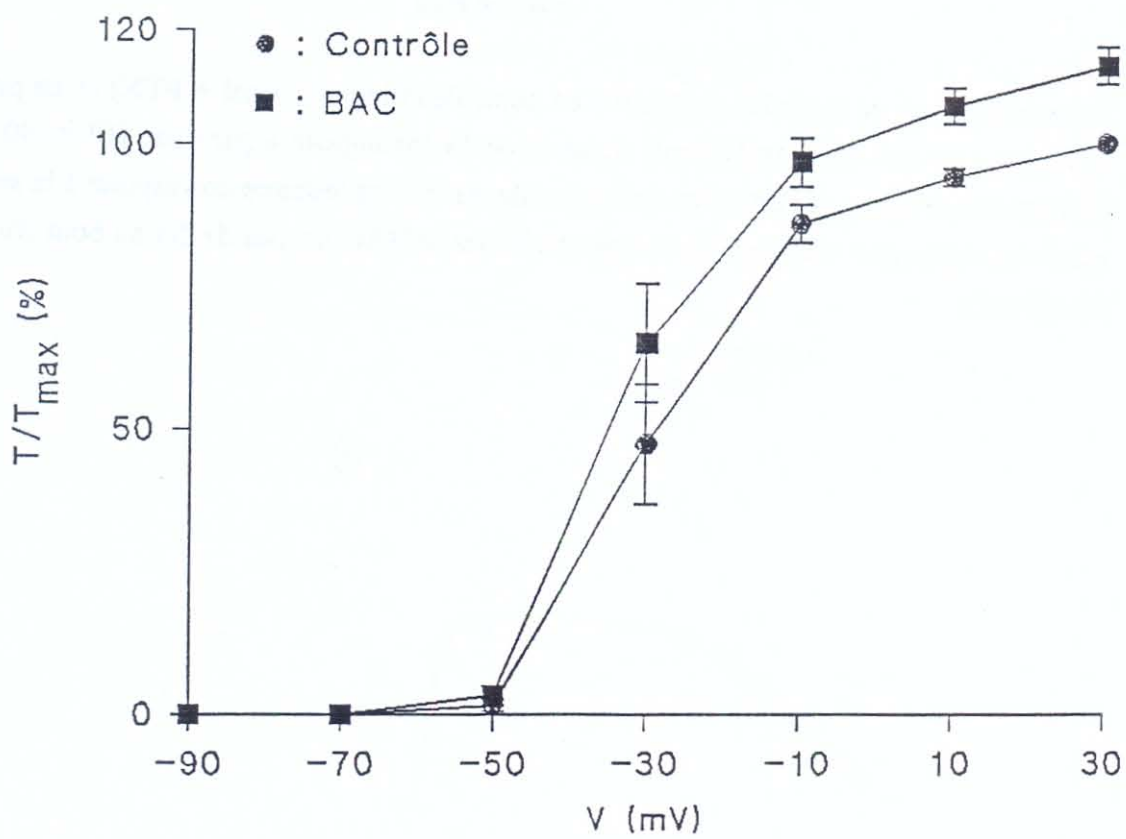
A partir de ces résultats nous pouvons dire que le BAC en stimulant  $G_o$  induit une augmentation de l'activité contractile de la fibre musculaire squelettique de grenouille.  $G_o$  serait couplé au "voltage sensor" et stimulerait celui-ci à l'état basal comme nous l'avions évoqué précédemment. Ces résultats sont en accord avec les précédents puisque la PTX et le  $\text{GDP}\beta\text{S}$  qui inhibent aussi bien la  $G_o$  que la  $G_i$  entraînent une diminution de la contraction phasique.

Nous pouvons exclure l'effet inhibiteur du BAC sur la phospholipase C (READ ET KIEFER, 1979) puisque cette inhibition ne peut pas permettre d'expliquer l'augmentation de l'activité contractile.

Nous avons essayé de voir si le BAC avait des effets par application intracellulaire sur fibre coupée. Pour ce faire, avons ajouté dans le milieu interne (solution 2, tableau 2) le BAC après avoir coupé la fibre. Nous n'avons observé aucun effet au bout de 20 à 25 minutes après ajout du BAC (enregistrement non illustré) donc le BAC agit préférentiellement au niveau extracellulaire.

**Figure R21**

Courbes moyennes d'activation de la contraction phasique en fonction du potentiel de membrane en contrôle (Ringer normal +  $\text{CoCl}_2$ ) et présence de BAC. Un potentiel de 20 mV d'incrément, d'une durée de 18 ms est imposé à partir de  $\text{HP} = -90$  mV. Par rapport au contrôle (cercles pleins), on observe une augmentation de la contraction (de 13%) en présence de BAC (carrés pleins). Le test t de "student" a révélé que l'effet est significatif 99% près ( $n = 6$ ).

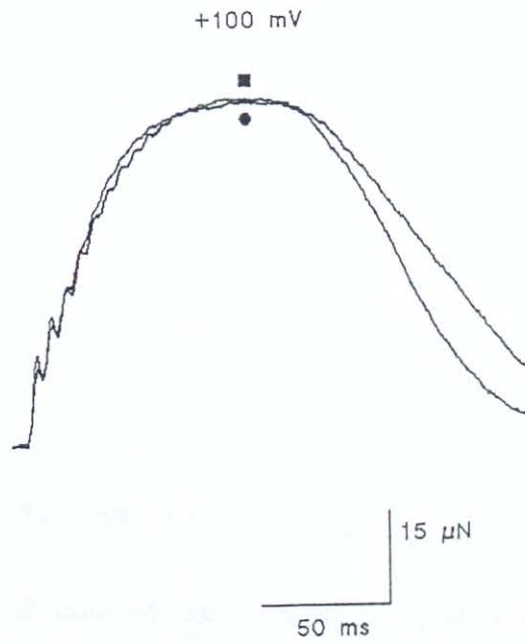




*Figure R22*

Enregistrements de l'activité contractile en contrôle (Ringer normal + PTX) et en présence de BAC pour un potentiel de 100 mV d'une durée 18 ms imposé à partir de HP = -90 mV (NB, l'échelle des temps a été divisé en deux et celle qui est représentée correspond à la seconde qui est d'une durée plus longue ). Dans ces conditions le BAC n'a pas d'effet au bout d'une dizaine de minutes.

A



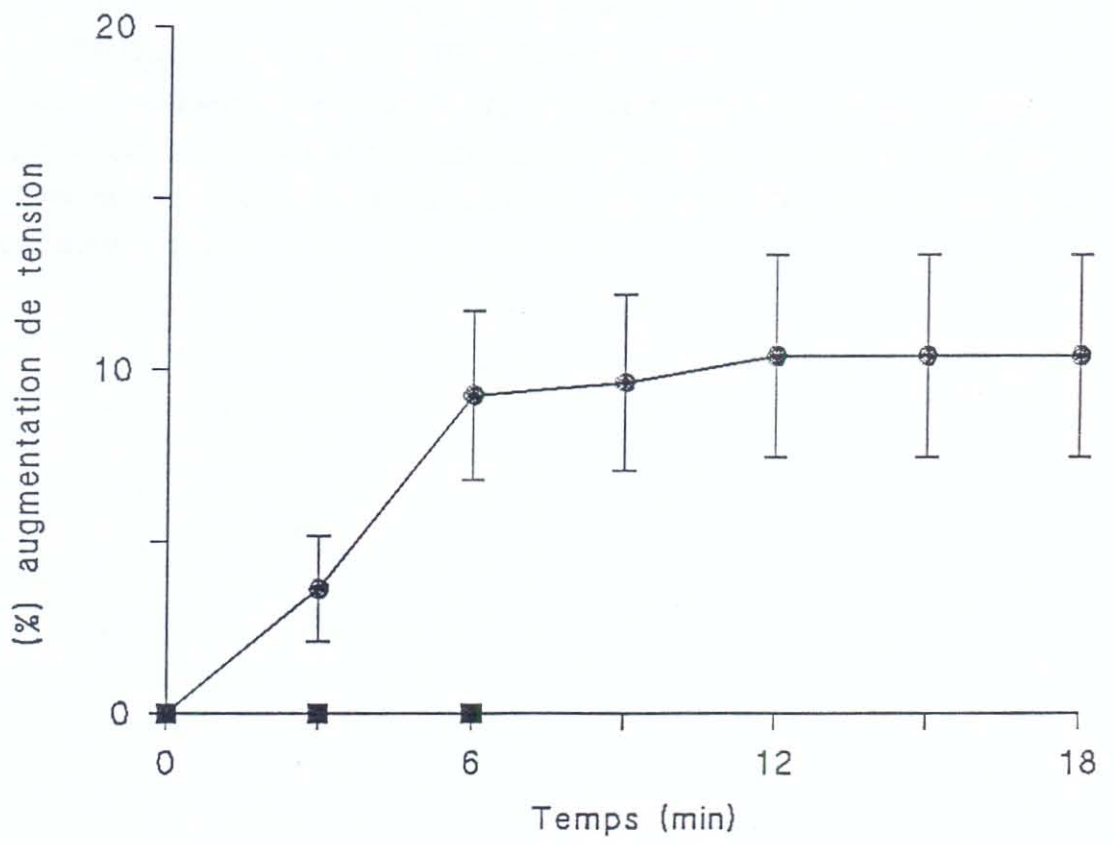
B



*Figure R23*

Courbe moyenne de pourcentage d'augmentation de la contraction tonique en fonction du temps par BAC. A  $t = 0$ , on enregistre la contraction témoin et on passe en BAC. Un potentiel de 100 mV d'une durée de 2 s est imposé toutes les 3 minutes à partir de  $HP = -90$  mV. On observe au bout de 3 minutes une légère augmentation de la contraction qui atteint plus de 10% au bout de 18 minutes ( $n = 6$ ).





Toutefois il serait intéressant de voir si l'effet du BAC passe par l'adénylate cyclase ou non. Dans ce cas l'utilisation de l'adénylylimidophosphate (AMP-PNP) par application intracellulaire pourrait donner des indications car cet analogue non hydrolysable de l'ATP se lie au site actif de la protéine kinase activatrice (PKA) et provoque la formation d'un complexe inactif (PKA-AMP-PNP), ce qui empêche l'hydrolyse de l'ATP en AMPc par l'adénylate cyclase (WHITEHOUSE et al., 1983; PELZER et al., 1990).

De même il serait intéressant de voir si l'effet de BAC est voltage-dépendant, pour ce faire, l'étude de l'inactivation de la contraction dépendante du potentiel de membrane à partir de différentes valeurs de HP (exemples de -60, -90, -130 mV), pourrait donner quelques éléments d'information.

## ***B- EFFETS DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA SOUS-UNITE ALPHA DES PROTEINE Gi ET Go.***

Il est démontré que chacune des sous-unités des protéines G peut avoir une action propre dans la régulation des effecteurs. Ainsi les anticorps dirigés contre les sous-unités  $\alpha, \beta, \gamma$  des protéines G sont des outils qui sont de plus en plus utilisés dans l'étude des mécanismes de régulation des phénomènes physiologiques par ces protéines. Il a été rapporté que l'anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_k$  bloque l'activation muscarinique des canaux potassiques au niveau atrial (YATANI et al., 1988b). L'anticorps anti  $\gamma$  a été utilisé par KLEUSS et al., (1993) pour étudier la régulation du courant calcique voltage-dépendant par la somatostatine et le carbachol sur les cellules pituitaires de rat.

Pour notre part nous avons utilisé les anticorps dirigés contre  $\alpha_0$  et  $\alpha_i$  pour apporter des informations supplémentaires sur la nature de la protéine G impliquée dans la régulation du couplage excitation-contraction.

### ***I- L'anticorps anti $\alpha_{01}, \alpha_{02}$ .***

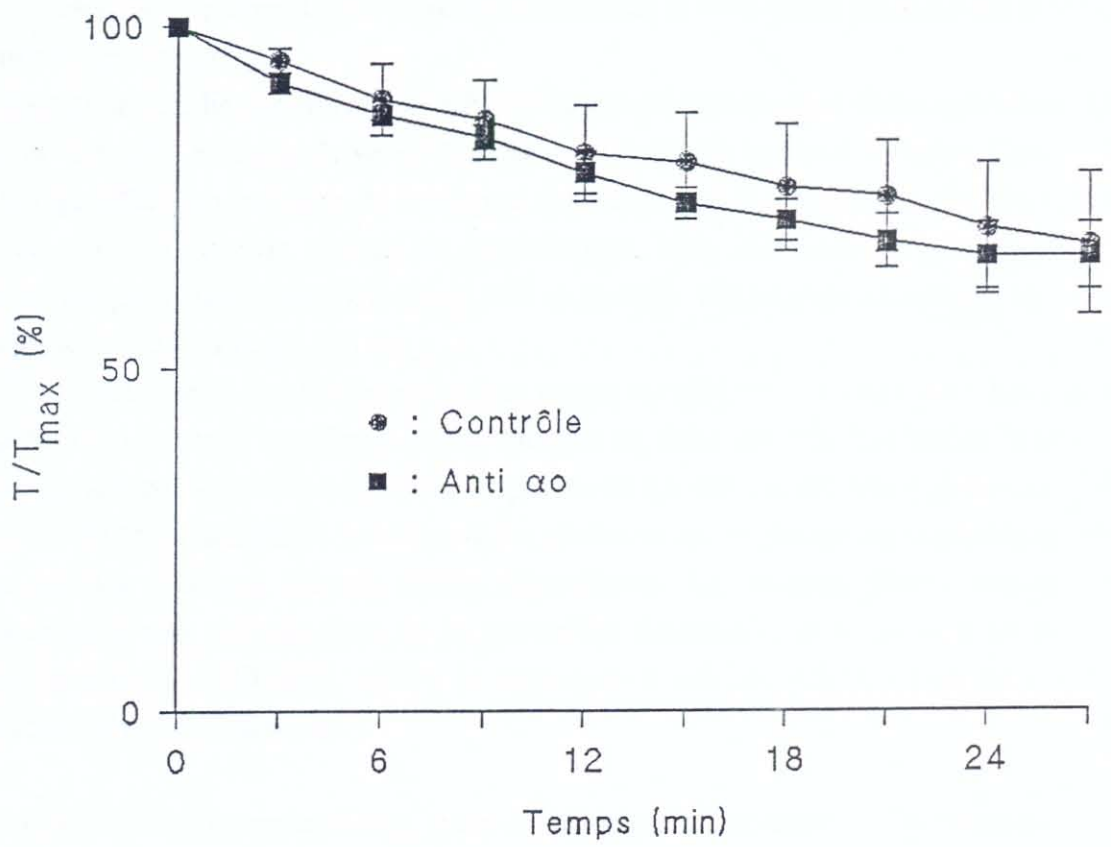
Le sérum contenant ces anticorps a été fourni par le laboratoire Gramsch en Allemagne. Avec un volume de 20  $\mu$ l, il était conseillé de l'utiliser à une dilution finale de 1/5000 dans le cas de l'incubation des cellules. Pour minimiser les phénomènes de diffusion, nous l'avons utilisé à une dilution finale de 1/2500, l'anticorps était ajouté à la solution interne (solution 2, tableau 2) dans les compartiments latéraux. De plus il a été signalé que les anticorps se fixent sur les sous-unités lorsque celles-ci sont dissociées les unes des autres selon YATANI et al., (1988) qui ajoutaient à leur milieu 100  $\mu$ M de GTP. Nous avons, pour cette raison, ajouté 50  $\mu$ M de GTP à la solution interne, une concentration plus faible pour éviter une activation trop importante des protéines G.

La figure R24 montre l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en absence et en présence de l'anticorps dans les compartiments latéraux (potentiel de 100 mV, d'une durée de 18 ms, imposé toutes les trois minutes). A partir de 15 minutes, on observe une faible diminution de la contraction qui n'est cependant pas statistiquement significative ( $n = 6$ ). Cet effet faible oblige à se poser la question de la non spécificité de l'anticorps, ou bien la protéine concernée n'est pas  $G_o$ . Cet anticorps est également sans effet sur la composante tonique.



**Figure 24**

Courbes moyennes de l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en contrôle (cercles pleins) et en présence de l'anticorps anti  $\alpha_0$  dans les compartiments latéraux (carrés pleins). Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 18 ms est imposé toutes les 3 minutes. On observe au bout de 15 minutes un effet non statistiquement significatif de l'anticorps (n = 6).



## ***II- L'anticorps anti $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ .***

Nous avons testé dans les mêmes conditions l'effet des anticorps dirigés contre les sous-unités  $\alpha_i$  des protéines G. La dilution finale conseillée est de 1/8000 et nous l'avons, comme dans le cas précédent, utilisé deux fois plus concentré (1/4000).

La figure R25 montre que l'anticorps anti  $\alpha_i$  n'a aucun effet ( $n = 5$ ). Ce qui laisse penser que la protéine  $G_i$  n'est pas impliquée dans la régulation de la contraction phasique ou bien que l'anticorps n'est pas spécifique.

Nous avons étudié également son effet sur la composante tonique de la contraction. Un potentiel de 100 mV et d'une durée de 2 s est imposé toutes les trois minutes. Comme le montre la figure R26, en présence de l'anticorps (carrés pleins) le phénomène de "run down" observé en contrôle (cercles pleins) est partiellement levé. Au bout de 30 minutes, la contraction tonique a diminué de  $22 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ) en contrôle alors qu'elle ne diminue que de  $2 \pm 4\%$  en présence de l'anticorps anti  $\alpha_{i1,2}$ .

Ce résultat montre que l'anticorps anti  $\alpha_i$  exerce un effet sur la composante tonique de la contraction qui pourrait s'expliquer par le fait que  $\alpha_i$  étant inhibée, l'activation basale de l'adénylate cyclase par la protéine  $G_s$  serait amplifiée, ce qui entraînerait une augmentation du taux basal d'AMPC intracellulaire provoquant les phénomènes de phosphorylation des canaux calciques par les protéines kinases AMPC dépendantes. La phosphorylation des canaux calciques entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture et le nombre de canaux calciques fonctionnels (REUTER, 1987), la conséquence est une augmentation du courant calcique et de l'activité contractile.

## ***III- Les effets de l'anticorps anti $\alpha_{i1, 2}$ sur la composante phasique de la contraction en présence de PTX.***

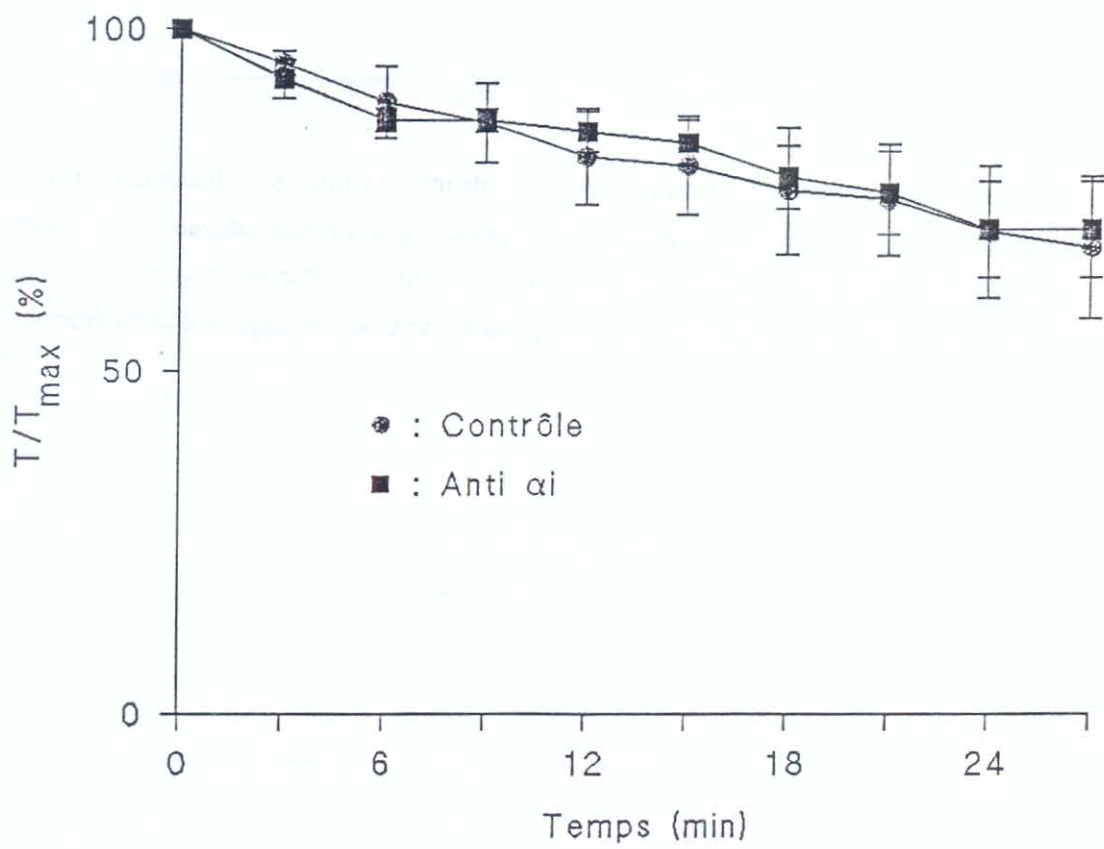
L'effet obtenu avec l'anticorps anti  $\alpha_i$  sur la composante tonique de la contraction nous a conduit à vérifier de façon indirecte l'intervention de la protéine  $G_o$  dans la régulation de la composante phasique, en bloquant  $G_i$  avec l'anticorps et en perfusant avec la PTX. La figure R27 montre l'exemple d'enregistrements de la contraction phasique (de deux fibres A et B) en contrôle (cercle plein, 25 à 30 minutes après ajout de l'anticorps dans les compartiments latéraux) et en présence de PTX en perfusion externe. On observe une diminution de 25 à 35 % de la contraction en présence de PTX ( $n = 7$ ).

Ce résultat apporte un argument de plus, montrant que l'inhibition de la contraction phasique par la PTX est due à  $G_o$  et non à  $G_i$  qui est bloquée par l'anticorps.



**Figure 25**

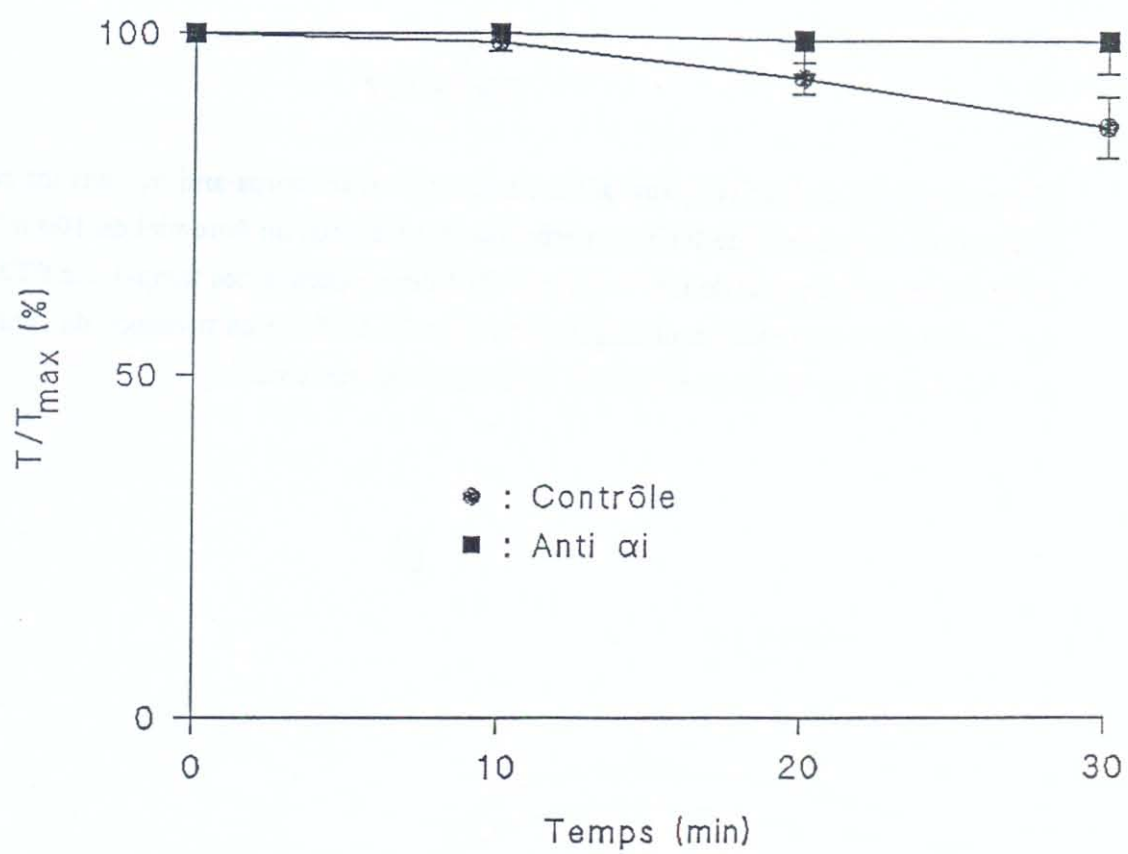
Courbes moyennes de l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en absence (cercles pleins) et en présence de l'anticorps anti  $\alpha_1$  dans les compartiments latéraux (carrés pleins). Un potentiel de 100 mV d'une durée de 18 ms est imposé toutes les 3 minutes. On n'observe aucun effet significatif de l'anticorps au de 27 minutes ( $n = 5$ ).



**Figure R26**

Courbes moyennes de l'évolution de la contraction tonique en fonction du temps en absence et en présence de l'anticorps anti  $\alpha_1$  dans les compartiments latéraux. Un potentiel de 100 mV d'une durée de 2 s est imposé toutes les 10 minutes. Par rapport au contrôle (cercles pleins) l'anticorps entraîne une augmentation de la contraction tonique de 20% (carrés pleins) ( $n = 7$ ).

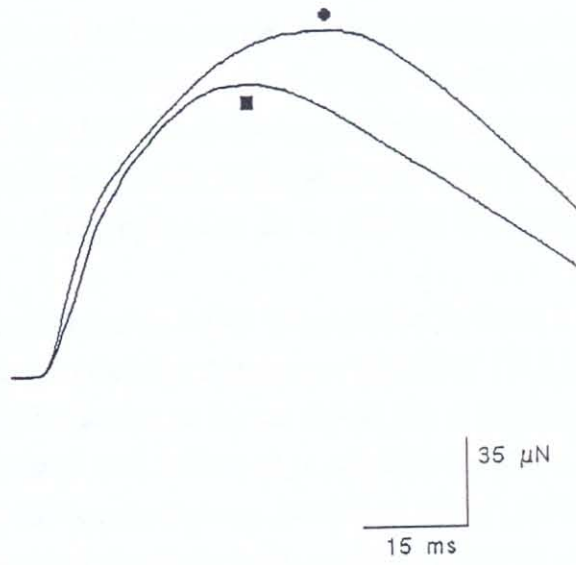




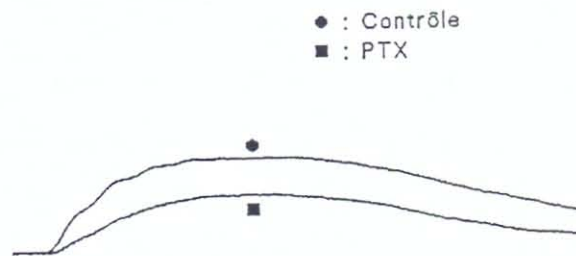
**Figure R27**

Enregistrements de l'activité contractile en contrôle (l'anticorps anti  $\alpha_1$  dans les compartiments latéraux) et en présence de PTX en perfusion externe pour un potentiel de 100 mV d'une durée de 18 ms imposé à partir de HP = -90 mV (NB deux échelles des temps). La PTX entraîne une diminution de la contraction phasique (d'environ 25 à 35 %) en présence de l'anticorps anti  $\alpha_1$  (n = 7). A et B représentent l'exemple de deux enregistrements.

A



B





*Discussion des résultats sur l'identification de la nature de la protéine G impliquée dans la régulation de l'activité contractile.*

Les résultats obtenus avec le BAC nous a permis de conclure que la protéine Go serait celle qui est couplée directement au "voltage sensor" et qui entraîne l'inhibition de l'activité contractile en présence de PTX et du GDP $\beta$ S et son augmentation en présence de GTP $\gamma$ S et de BAC. L'utilisation de l'anticorps anti  $\alpha_i$  suivie de la perfusion de la PTX nous a apporté un argument de plus pour soutenir cette implication de la protéine Go dans la régulation de la contraction phasique.

Il est fort possible que la faiblesse de l'effet obtenu avec l'anticorps anti  $\alpha_o$  serait due à la quantité importante de protéine Go dans les membranes tubulaires (TOUTANT et al., 1990). Etant donné que l'application de l'anticorps se fait au niveau des compartiments latéraux, il se fixe aux protéines au fur et à mesure qu'il diffuse et la quantité qui arrive jusqu'au niveau du compartiment central serait trop faible pour pouvoir induire un effet significatif.

Nos résultats montrent que si Gi n'intervient pas dans la composante phasique de la contraction, elle intervient dans la tonique. Si l'inhibition de Gi entraîne l'augmentation de la contraction tonique, alors la diminution de cette composante obtenue en présence de PTX et de CoCl<sub>2</sub> serait due à l'effet sur le "voltage sensor" via Go.

## **CHAPITRE 4 : INTERVENTION DE LA PROTEINE G<sub>s</sub> DANS L'ACTIVITE CONTRACTILE.**

La toxine cholérique inhibe l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha_s$  de la protéine G<sub>s</sub> et cette inhibition empêche l'hydrolyse du GTP en GDP. Le complexe  $\alpha_{GTP}$  active aussi longtemps que possible l'adénylate cyclase entraînant une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire (GREENOUGH et al., 1970; SCHAFER et al., 1970; DONTA et al., 1973; BOYLE et GARDNER, 1974; GILL et KING, 1975). L'AMPc en activant les protéines kinases A (AMPc dépendantes) qui phosphorylent les canaux calciques, entraîne une augmentation de la probabilité et le temps d'ouverture de ceux-ci d'où l'élévation de l'entrée de calcium intracellulaire (REUTER et al., 1987). Comme la protéine G<sub>s</sub> existe dans le muscle squelettique où elle régulerait directement ou indirectement les canaux calciques voltage-dépendants (YATANI et al., 1988a; MATERRA et al., 1989; HAMILTON et al., 1991) nous avons recherché son rôle éventuel dans les mécanismes de couplage excitation-contraction et si elle est couplée directement ou indirectement aux récepteurs DHPs. Nous avons pour cela testé les effets de CTX puis d'anticorps dirigé spécifiquement contre la sous-unité  $\alpha_s$  de la protéine G<sub>s</sub>.

### **A - LES EFFETS DE CTX**

La CTX a été préalablement activée à 37°C pendant 30 minutes et utilisée à une concentration finale de 10 µg/ml.

#### **I - Sur la composante phasique de la contraction.**

Pour s'affranchir de l'intervention possible des canaux calciques et sodiques dans l'activité contractile, nous avons ajouté au Ringer normal de CoCl<sub>2</sub> (8 mM) et de la TTX (0.001 mM) et utilisé une impulsion de courte durée (18 ms), imposée à partir de HP = -90 mV par incrément de 20 mV. La figure R28A montre quelques exemples d'enregistrements avant et 10 minutes après passage en CTX. On n'observe alors aucun effet de la CTX, les enregistrements étant superposables. Cette absence d'effet se retrouve sur les courbes moyennes d'activation de la contraction en fonction du potentiel, représentées sur la figure R28B. Même après un temps d'action plus long il n'y a pas d'effet significatif de la toxine, les deux courbes étant similaires. La protéine G<sub>s</sub> activée par la CTX n'a pas d'effets sur la composante phasique de la contraction.

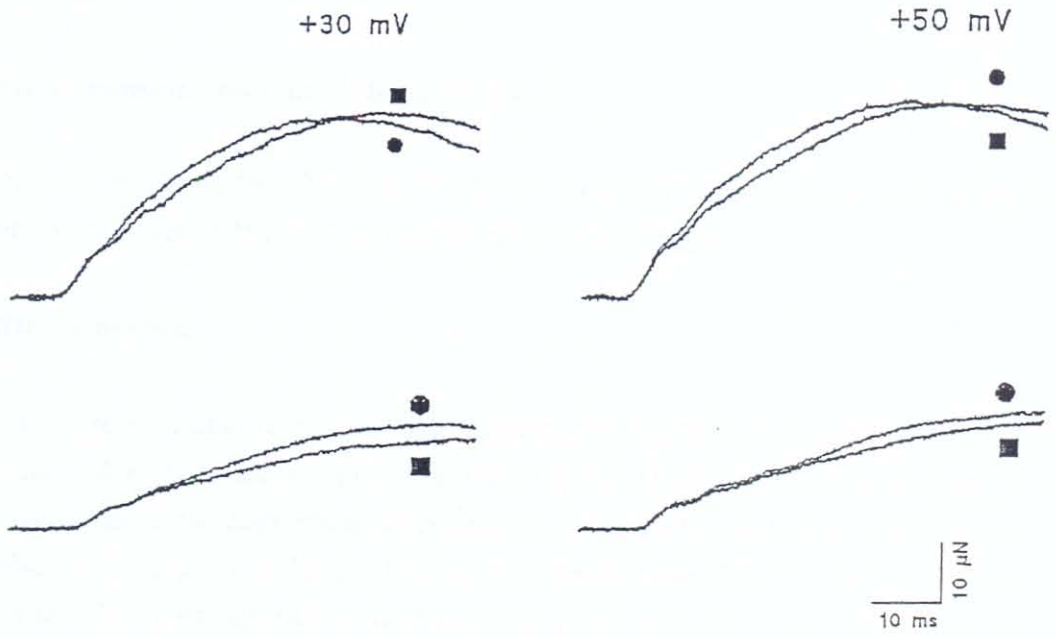
**Figure R28**

A - Exemples d'enregistrements de la contraction phasique en contrôle (Ringer normal + TTX +  $\text{CoCl}_2$ , cercles pleins) et après passage en CTX en perfusion externe (carrés pleins) pour des potentiels de + 120 et de + 140 mV, d'une durée de 26 ms imposés à partir de HP = -90 mV. On n'observe pas de variation significative de l'activité contractile en présence de CTX.

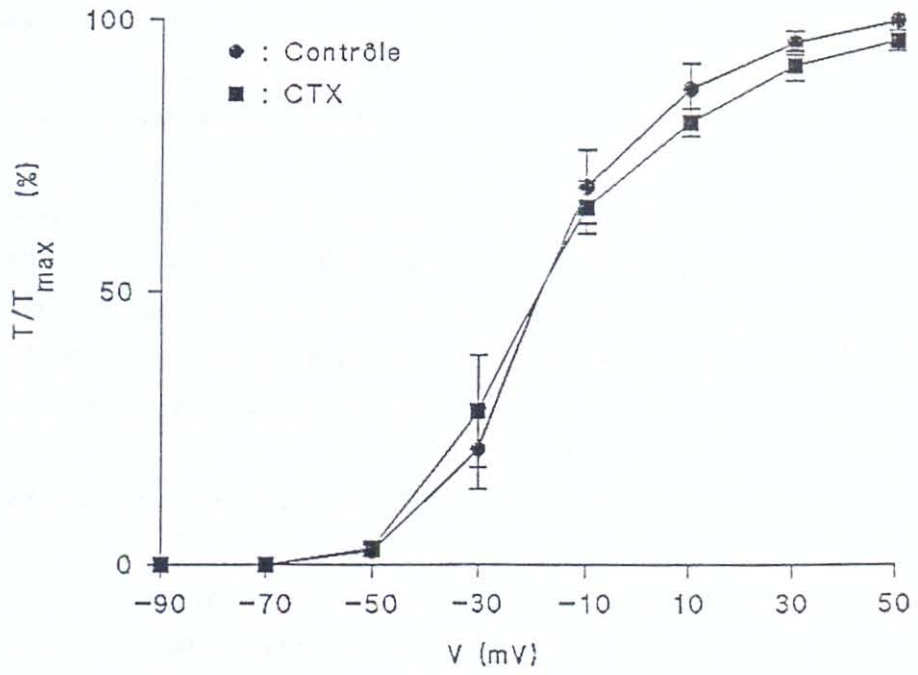
B - Courbes moyennes d'activation de la contraction phasique en fonction du potentiel de membrane réalisées à partir des enregistrements en A. On n'observe pas de différence significative entre la courbe de contrôle (cercles pleins) et celle obtenue en présence de CTX (carrés pleins) (n = 7).



# A



# B



Compte tenu de la durée de stimulation et du blocage des perméabilités calcique et sodique, on peut dire que Gs ne régule pas directement le récepteur DHP jouant le rôle de "voltage sensor".

## ***II - Sur la composante tonique de la contraction.***

Nous avons testé les effets de la CTX sur la composante tonique de la contraction en imposant un potentiel de 100 mV et d'une durée de 2 secondes.

### ***1 - En Ringer normal.***

La figure R29 montre des exemples d'enregistrements de l'activité contractile (exemple de deux fibres A et B) avant et après passage en CTX. L'amplitude de la contraction tonique est mesurée, comme précédemment, à 500 ms. En A, la contraction a une amplitude de 52  $\mu$ N en contrôle et de 69  $\mu$ N en CTX, soit une augmentation de 32%. En B, la contraction a une amplitude de 53  $\mu$ N en contrôle et de 61  $\mu$ N en CTX, soit une augmentation de 15 %. Ces deux exemples représentent les valeurs maximale et minimale obtenues sur une dizaine de fibres.

Ces résultats suggèrent donc que Gs pourrait intervenir dans la régulation de la contraction tonique.

### ***2 - Après blocage des canaux calciques.***

Pour déterminer si l'augmentation de la contraction tonique par la CTX passe par une augmentation d'activité des canaux calciques, nous avons bloqué ceux-ci avec 8 mM de  $\text{CoCl}_2$ . La figure R30 montre sur deux exemples qu'il n'y a dans ce cas aucun effet de la CTX. Ainsi la protéine Gs intervient par l'intermédiaire des mécanismes sans doute via la cascade adénylate cyclase-AMPC-activation des canaux calciques.

### ***3 - En présence de la protéine kinase inhibitrice (PKI) AMPC dépendante.***

Nous avons donc voulu voir si en bloquant la cascade adénylate cyclase-AMPC-phosphorylation des canaux calciques par ajout de la PKI dans le milieu interne on pourrait annuler l'effet de la CTX. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps enregistrer simultanément le courant calcique et la contraction en absence et en présence de la CTX.

La figure R31 montre en Aa,b des exemples d'enregistrements du courant calcique et en Ba,b la contraction correspondante, pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s

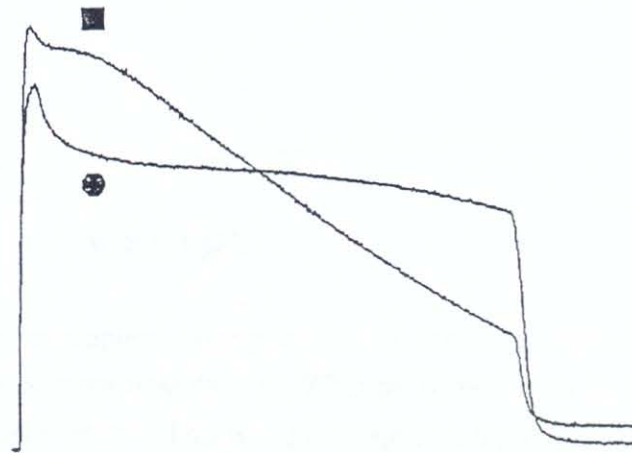
**Figure R29**

Exemples d'enregistrements de la contraction tonique (de deux fibres A et B) en absence (cercle plein) et en présence de CTX (carré plein) en perfusion externe (dans le Ringer noraml). Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s est imposé à partir de HP = -90 mV. On observe en présence de CTX une augmentation moyenne de la contraction d'environ 25% (n = 10).



A

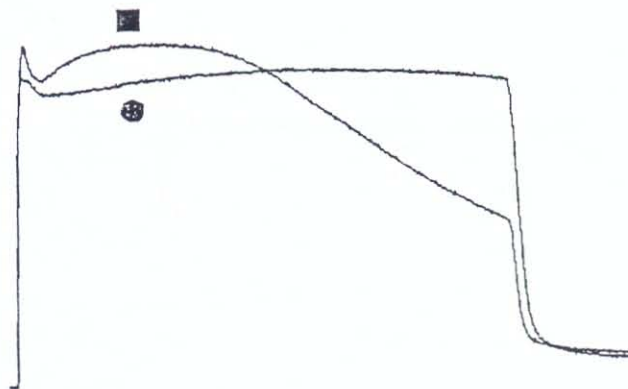
+10 mV



● : Contrôle  
■ : CTX

20  $\mu$ N  
500 ms

B



**Figure R30**

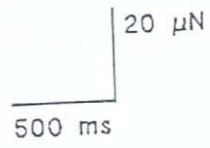
Exemples d'enregistrements de la contraction tonique en contrôle (Ringer normal +  $\text{CoCl}_2$ , cercle plein) et en présence de CTX en perfusion externe (carré plein), pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. En présence de  $\text{CoCl}_2$  qui bloque les canaux calciques, la CTX n'a aucun effet sur la contraction tonique (n = 5).

A

+10 mV



● : Contrôle  
■ : CTX



B



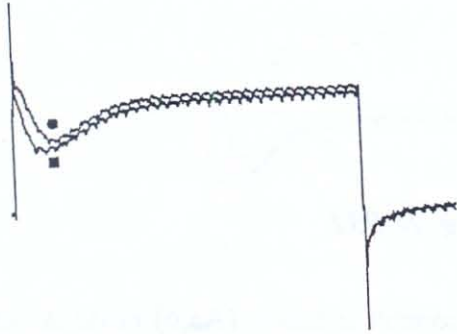


**Figure R31**

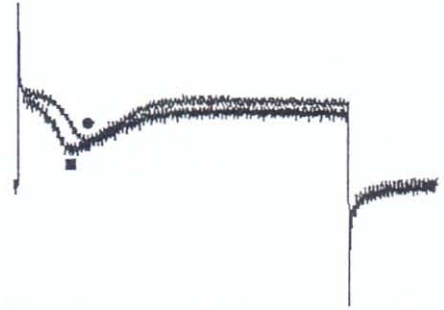
Exemples d'enregistrements simultanés du courant calcique (Aa,b) et de la contraction (Ba,b) en absence (cercles pleins) et en présence de CTX (carrés pleins) pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. On observe une augmentation du courant calcique et de la contraction d'environ 25% (n = 5).

A

a



b

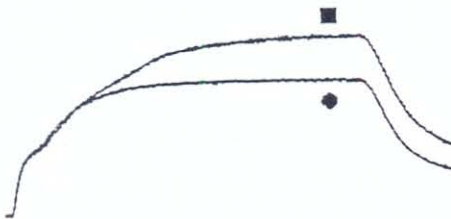


● : Contrôle  
■ : CTX

20  $\mu$ N  
125 nA  
500 ms

B

a



b

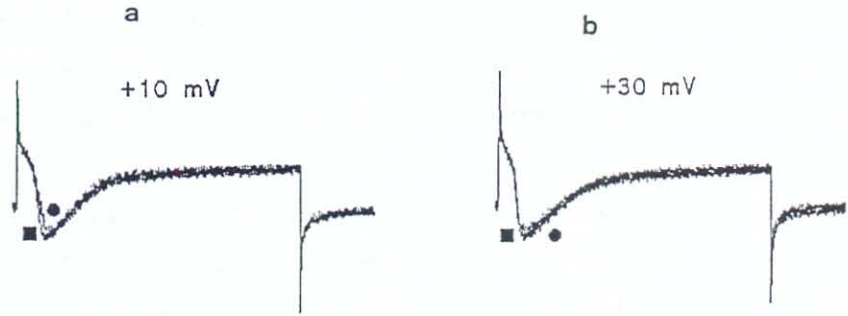


*Figure R32*

Exemples d'enregistrements simultanés du courant calcique (Aa,b) et de la contraction (Ba,b) en absence (cercles pleins) et présence de CTX (carrés pleins, 25 à 30 minutes après ajout de PKI dans les compartiments latéraux) pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. On n'observe pas dans ces conditions ni la variation du courant calcique, ni celle de la contraction (n = 5).



# A



● : Contrôle  
■ : CTX

20  $\mu$ N  
125 nA  
500 ms

# B



imposé à partir de  $HP = -90$  mV. L'augmentation du courant calcique en présence de CTX n'étant pas très nette sur tous les enregistrements, nous avons préféré mesurer la densité du courant en intégrant la surface à l'aide du programme Clampan du logiciel Pclamp. En Aa cette surface est de  $111 \mu\text{A}\cdot\text{ms}$  dans les conditions de contrôle et de  $136 \mu\text{A}$  après passage en CTX, soit une augmentation de 22%, l'activité contractile correspondante (Ba) augmente de 27%. En Ab, la quantité de courant en contrôle est de  $72 \mu\text{A}\cdot\text{ms}$  et de  $85 \mu\text{A}\cdot\text{ms}$  après passage en CTX, soit une augmentation de 25%, l'activité contractile correspondante (Bb) augmente aussi de 25%.

Ces résultats confirment donc les précédents et montrent que l'augmentation du courant calcique par la CTX induit une augmentation de la contraction tonique.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons ajouté à la solution interne  $5 \mu\text{M}$  de PKI qui inhibe les protéines kinases A AMPc-dépendante 25 à 30 minutes après ajout de la PKI dans les compartiments latéraux, on enregistre la contraction témoin puis on perfuse avec la CTX pendant 10 minutes. La figure R32 montre que dans ce cas, on n'observe aucune variation du courant et de la contraction ce qui confirme que l'augmentation de l'activité contractile par la CTX passe par la cascade adénylate-cyclase-AMPc-activité des canaux calciques.

## ***B - LES EFFETS DES ANTICORPS ANTI $\alpha_s$ .***

Pour apporter d'avantage d'éléments d'information sur le rôle de la protéine G<sub>s</sub>, nous avons testé l'anticorps anti  $\alpha_s$  sur les composantes phasique et tonique de la contraction.

La figure R33 montre l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en contrôle (solution externe: Ringer normal; solution interne: 2, tableau 2) et en présence d'anticorps dans le milieu interne pour permettre une libre diffusion. Un potentiel de 100 mV et d'une durée de 18 ms est imposé toutes les trois minutes. On n'observe aucun effet significatif de l'anticorps pendant 27 minutes. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec la CTX sur la même composante.

La figure R34 montre l'évolution de la contraction tonique en fonction du temps avant et après l'introduction de l'anticorps dans les compartiments latéraux, pour une dépolarisation de 100 mV, d'une durée de 2s, imposée à partir de HP = -90 mV. La courbe contrôle montre une diminution progressive de la contraction jusqu'à 14% au bout de 30 minutes, diminution due aux phénomènes de "run down". En présence de l'anticorps, on observe après 10 minutes que la diminution s'accélère pour atteindre 45% au bout de 30 minutes, soit une diminution d'environ 30% par rapport au contrôle.

Ces résultats montrent que l'anticorps, en bloquant  $\alpha_s$ , induit un effet inhibiteur sur la composante tonique de la contraction et confirment l'intervention de la protéine G<sub>s</sub> dans la régulation de cette composante.

### ***Discussion sur les effets de CTX et de l'anticorps anti $\alpha_s$ sur l'activité contractile.***

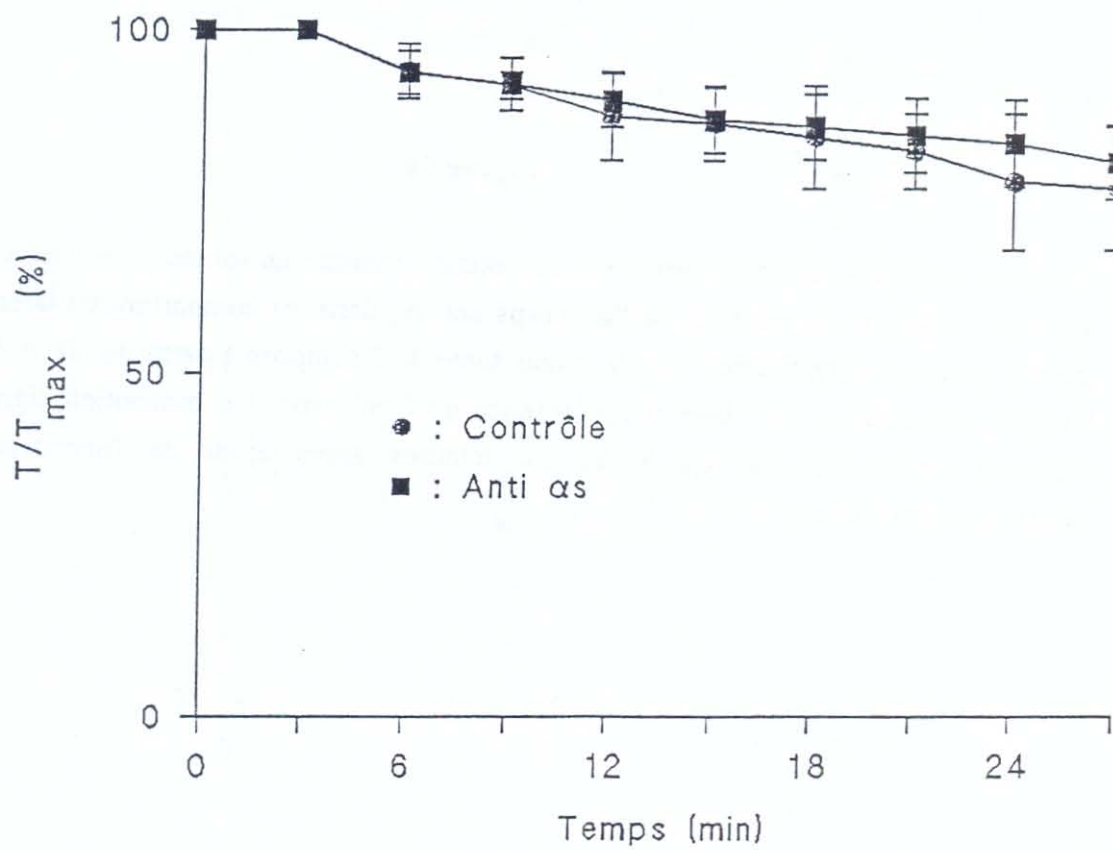
Ces résultats montrent que la protéine G<sub>s</sub> ne serait pas impliquée directement dans la régulation de la contraction phasique, car son activation par la CTX et son inhibition par l'anticorps anti  $\alpha_s$  n'ont aucun effet sur cette composante phasique.

G<sub>s</sub> intervient via la régulation des canaux calciques puisque la CTX qui augmente le courant calcique (résultats conformes à ceux de YATANI et al., 1988a) augmente également cette composante tonique. Ceci confirme l'intervention du courant calcique dans la contraction tonique (POTREAU et RAYMOND, 1980 a et b; ILDEFONSE et al., 1985; RIVET et al., 1989; JACQUEMOND et ROUGIER, 1990; COGNARD et al., 1992). Mais cette régulation du récepteur DHP (jouant le rôle de canal calcique) par G<sub>s</sub> ne se ferait pas de façon directe, contrairement aux conclusions de YATANI et al., (1988); MATTERA et al., (1989); HAMILTON et al., (1991); MURPHY et McDERMOTT, (1991) qui pensaient à un couplage direct entre G<sub>s</sub> et canaux calciques. En effet en présence de PKI, la CTX n'a aucun effet. Le mécanisme passerait donc par la cascade adénylate cyclase-AMPC, résultats



**Figure R33**

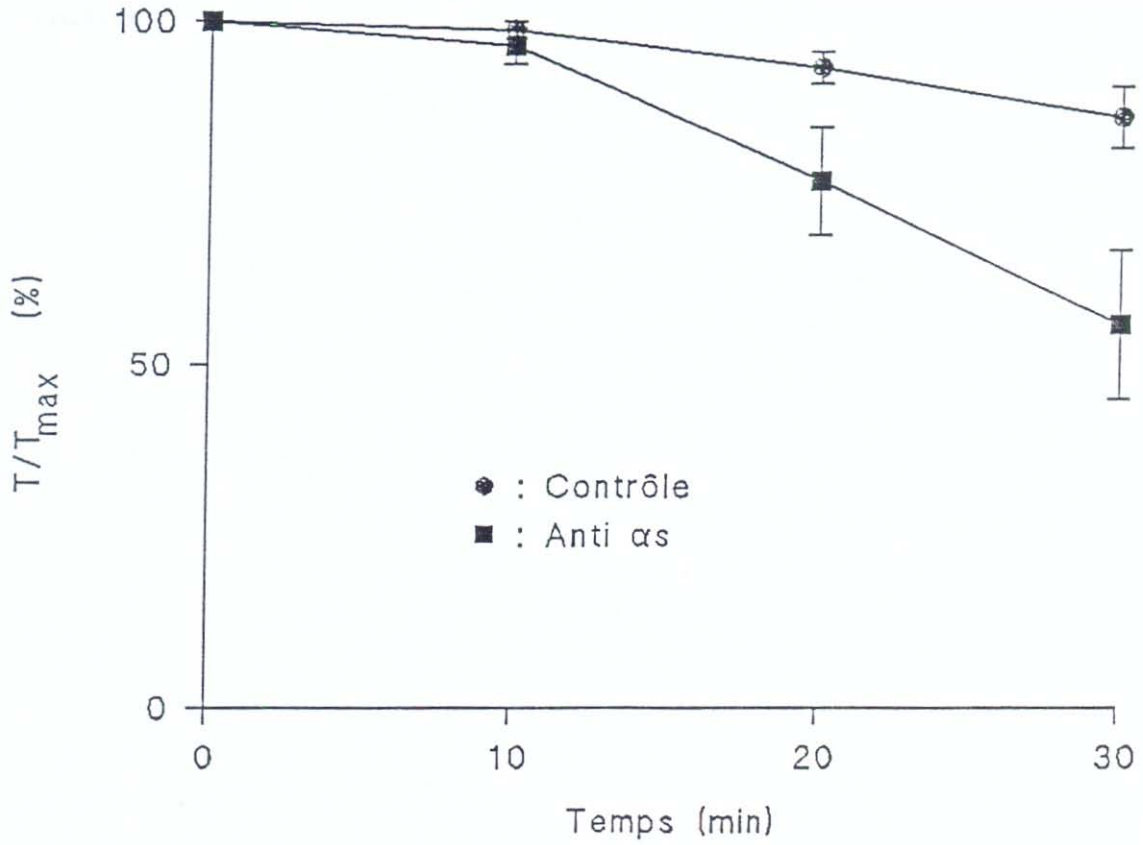
Courbes moyennes de l'évolution de la contraction phasique en fonction du temps en absence (cercles pleins) et en présence de l'anticorps anti  $\alpha_s$  dans les compartiments latéraux (carrés pleins). Un potentiel de 100 mV, d'une durée de 18 ms est imposé à partir de HP = -90 mV. En présence de l'anticorps, on n'observe pas une variation sensible de la contraction au bout de 27 minutes (n = 5).



*Figure 34*

Courbes moyennes de l'évolution de la contraction tonique en fonction du temps en absence (cercles pleins) et en présence de l'anticorps anti  $\alpha_3$  dans les compartiments latéraux (carrés pleins), pour un potentiel de 100 mV, d'une durée de 2 s imposé à partir de HP = -90 mV. Par rapport au contrôle, on observe en présence de l'anticorps une diminution significative de l'activité contractile (environ 30%), 30 minutes après ajout de l'anticorps dans les compartiments latéraux (n = 5).





similaires à ceux obtenus sur le muscle cardiaque (HERTZELL et al., 1991; HUGUET et al., 1992).

La différence entre nos résultats et ceux de YATANI et al., peut s'expliquer par la différence au niveau expérimental, ces auteurs ont travaillé sur des vésicules ou sur canaux incorporés dans les bicouches lipidiques et par conséquent les résultats peuvent différer de ceux obtenus sur matériel biologique intact où les mécanismes de régulation sont en partie conservés.

## CONCLUSION GENERALE



## *CONCLUSION GENERALE.*

Les expériences réalisées dans le cadre de ce travail montrent qu'il existe au niveau du muscle squelettique de grenouille des protéines G impliquées dans les mécanismes de régulation du couplage excitation-contraction, résultats similaires à ceux rapportés par différents auteurs: Di VIRGILIO et al., (1986); VILLAZ et al., (1989); SOMASUNDARAM et al., (1991). Ces protéines interviennent dans les mécanismes de régulation de la composante phasique et tonique de la contraction puisque toutes deux sont inhibées par la PTX.

L'inhibition de la composante phasique permet de supposer que la cible serait le "voltage sensor" qui est connu pour télécommander la libération du  $Ca^{2+}$  du RS et activer la contraction phasique du muscle squelettique. Il est évident qu'on ne peut pas exclure l'action possible sur d'autres protéines impliquées telles que la triadine considérée comme molécule clé dans le processus de couplage mécanique (BRANDT et al., 1990; CASWELL et al., 1991), étant donné que les mécanismes d'action de cette protéine ne sont pas encore cernés.

L'inhibition de la composante tonique est en partie dépendante de celle du courant calcique. En effet, en présence de PTX, on observe une diminution simultanée du courant calcique et de la contraction tonique. Mais lorsqu'on bloque les canaux calciques par  $CoCl_2$  la toxine a toujours un effet inhibiteur sur la contraction tonique (16% contre 26% dans le cas où les canaux calciques ne sont pas bloqués). Ceci permet de supposer que l'effet inhibiteur de PTX sur l'activité contractile ne passe pas uniquement par l'inhibition des canaux calciques contrairement à l'hypothèse de SOMASUNDARAM et al., (1991). A côté de l'effet inhibiteur de PTX sur le courant calcique, l'inhibition de la composante tonique obtenue après blocage du courant calcique peut être attribuée en partie à celle du "voltage sensor".

L'effet inhibiteur de PTX sur l'activité contractile est indépendant du système adénylate cyclase-AMPC. En effet, lorsque celui-ci est contrebalancé par ajout de la forskoline qui stimule directement l'adénylate cyclase, la toxine exerce toujours ses effets. Ces résultats confirment ceux de GARCIA et al., (1990).

La PTX accélère l'inactivation voltage-dépendante de la contraction en déplaçant la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs, ce qui laisse penser que la toxine en inhibant les protéines G entraîne le passage du "voltage sensor" dans un état inactivé ou paralysé selon le modèle de LÜTTGAU et al., (1986); PIZARRO et al., (1988). Cette accélération de l'inactivation par la PTX persiste lorsque la membrane est hyperpolarisée (HP = -130 mV). Ces



résultats permettent de supposer que l'effet de PTX n'est pas potentiel dépendant et que les protéines G, dans les conditions de repos, réguleraient le "voltage sensor".

L'élévation de la concentration calcique externe lève partiellement l'effet de PTX sur l'inactivation contractile aussi bien à HP = -90 mV qu'à HP = -130 mV. Dans ces conditions de concentration calcique élevée, la PTX entraîne un déplacement de la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs de 10 mV à HP = -90 mV et à HP = -130 mV. Ceci laisse supposer que l'effet compétitif entre calcium externe et la PTX ne se situe pas au niveau du site cationique dit de "priming" puisqu'à -130 mV l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est supérieure et par conséquent la levée de l'inhibition à ce potentiel devrait être supérieure à celle obtenue à HP = -90 mV. Puisqu'il est admis que les mouvements de charge proviennent en partie du "voltage sensor" (BRUM et al., 1988a,b; ADAMS et al., 1990), l'augmentation calcique externe stimulant ces mouvements de charge (GARCIA et al., 1992) met le système dans un état activé et contrebalance les effets de PTX sans que l'on puisse déterminer le site d'action.

Additionnellement il peut être noté que les mouvements de charge sont inhibés simultanément par la PTX avec la contraction. Ces résultats confirment le lien étroit existant entre mouvements de charge et la contraction phasique dans ces conditions expérimentales où tous les courants dynamiques sont bloqués.

L'analogue non hydrolysable du GTP ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) active la contraction et les mouvements de charge et celui du GDP ( $\text{GDP}\beta\text{S}$ ) les inhibe dans les conditions où toutes les perméabilités ioniques sont également bloquées. Ces résultats permettent de soutenir l'hypothèse de couplage direct entre récepteur DHP et protéine G. Puisque le  $\text{GDP}\beta\text{S}$  inhibe l'activité contractile (résultats similaires à ceux de VILLAZ et al., 1989) ceci laisse supposer que les protéines G réguleraient le récepteur DHP à l'état basal contrairement à l'hypothèse de GARCIA et al., (1990). Dans nos conditions où les canaux calciques sont bloqués la PTX ainsi que ces analogues non hydrolysables ont toujours des effets sur la contraction ce qui signifie que le récepteur DHP, dans ce cas, fonctionnerait comme "voltage sensor", contrairement à SOMASUNDARAM et al., 1991 qui pensent à un couplage direct entre protéine G et récepteur DHP fonctionnant comme canal calcique voltage-dépendant.

L'utilisation d'outils comme le BAC (qui active  $\text{G}_o$ ), l'anticorps dirigé contre les sous-unités  $\alpha$  des protéines G a permis d'identifier la protéine  $\text{G}_o$  comme celle qui serait probablement couplée au récepteur DHP.  $\text{G}_o$  serait donc impliqué dans la régulation des mécanismes de couplage excitation-contraction dans les conditions basales; son inhibition et son activation inhibe ou augmente l'activité contractile respectivement.

Les résultats obtenus avec l'anticorps anti  $\alpha_s$ , la CTX et la PKI montrent que la protéine Gs régulerait également les récepteurs DHPs fonctionnant comme canaux calciques. Cependant contrairement à Go, l'intervention de Gs sur les récepteurs DHPs ne serait pas directe mais ferait intervenir la cascade adénylate cyclase-AMPC-phosphorylation des canaux calciques. L'hypothèse de YATANI et al., (1988a) qui pensaient à un couplage direct entre Gs et ces canaux n'est pas confirmée.

Gs ne semble pas intervenir directement dans la régulation de la composante phasique, mais elle interviendrait dans la composante tonique par l'intermédiaire des canaux calciques. Ceci est parfaitement en accord avec les nombreux résultats montrant la non-intervention des canaux calciques dans la composante phasique de la contraction.

Dans une perspective générale, il serait intéressant de voir si, à part les récepteurs DHPs et les récepteurs  $\beta$  adrénergiques qui sont couplés aux protéines G (Voir YATANI et al., 1988), il existe d'autres types de récepteurs qui seraient également couplés à ces protéines G. Nous n'avons pas connaissance de référence bibliographique faisant mention de l'existence de couplage d'autres récepteurs avec les protéines G et les mécanismes possibles de régulation dans le muscle squelettique.

De même l'existence de petites protéines G associées à la triade dans le muscle squelettique a été évoquée (DOUCET et TUANA, 1991). Ces auteurs signalent qu'elles interviendraient dans le couplage excitation-contraction sans précision sur les mécanismes d'action et ce point mérite d'être abordé avec plus de détails. Ces petites protéines fixent le GTP et le GDP (pour revue, voir GUNZBURG, 1992) mais on ignore si elles sont sensibles aux toxines ou pas.

Dans cette même optique, il serait intéressant d'étudier le rôle des protéines G dans la membrane du RS dont l'existence a été évoquée par SCHERER et al., (1987); TOUTANT et al., (1991). Il est fort probable qu'elles interviennent dans le repompage ou dans le largage du  $Ca^{2+}$  dans le myoplasme par le RS.

En tout état de cause, il semble que plusieurs des voies impliquées dans la régulation du couplage excitation-contraction puissent être régulées par des protéines G dont on est encore loin de connaître toute la diversité et la signification fonctionnelle.



## **BIBLIOGRAPHIE**

- ABRAMCHECK, C.W. & BEST, P.M. (1989). Physiological role and selectivity of the in situ potassium channel of the sarcoplasmic reticulum in skinned frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 93:1-21.
- ADAMS, B., TANABE, T., MIKAMI, A., NUMA, S. & BEAN, K. (1990). Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor complementary DNAs. *Nature, Lond.*, 346:569-572.
- ADAMS, D.J. & GAGE, P.W. (1976). Gating currents associated with sodium and calcium currents in a aplysia neuron. *Science*, 192:783-784.
- ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1976a). The voltage dependence of membrane capacity. *J. Physiol., Lond.*, 254:317-338.
- ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1976b). Charge movement in the membrane of striated muscle. *J. Physiol., Lond.*, 254:339-360.
- ADRIAN, R.H. & HUANG, C.L.-H (1984a). Charge movements near the mechanical threshold in skeletal muscle of *Rana temporaria*. *J. Physiol., Lond.*, 349:483-500.
- ADRIAN, R.H. & HUANG, C.L.-H. (1984b). Experimental analysis of the relationship between charge movement components in skeletal muscle of *Rana temporaria*. *J. Physiol., Lond.*, 353:419-434.
- ADRIAN, R.H. & PEACHEY, L.D. (1973). Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle. *J. Physiol., Lond.*, 235:103-131.
- ADRIAN, R.H. & PERES, A. (1979). Charge movement and membrane capacity in frog muscle. *J. Physiol., Lond.*, 83-97.
- AGNEW, W.S. (1987). Proteins that bridge the gap. *Nature*, 334:299-300.
- ALLARD, B. & ROUGIER, O. (1992). Reappraisal of the role of sodium ions in excitation-contraction coupling in frog twitch muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 13:117-125.
- ALMERS, W. & BEST, P. (1976). Effects of tetracain on displacement currents and contraction of frog skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 262:583-611.
- ANDERSON, N.C. (1969). Voltage clamp studies on uterine smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 54:145-165.
- ARMSTRONG, C.M. & BEZANILLA, G.F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of sodium channels. *Nature*, 242:459-461.
- ARMSTRONG, C.M., BEZANILLA, F. & HOROWICZ, P. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis (beta-amino-ethylether)-N,N'-tetraacetic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, 267:605-608.
- BAYLOR, S.M., HOLLINGWORTH, S. & MARSHALL, W.M. (1989). Effects of intracellular Ruthenium Red on excitation-contraction coupling in intact frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol., Lond.*, 408:617-635.
- BEAM, K.G., ADAMS, B.A., NIIDOME, T., NUMA, S. & TANABE, T. (1992). Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature*, 360:169-171.
- BERRIDGE, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325.
- BERWE, D., GOTTSCHALK, G. & LÜTTGAU, H.C. (1987). The effects of the Ca-antagonist gallopamil (D600) upon excitation-contraction coupling in the toe muscle of the frog. *J. Physiol., Lond.*, 385:693-708.



- BEZANILLA, F., CAPUTO, C. & HOROWICZ, P. (1971). Voltage clamp activation of contraction in short striated muscle fibers of the frog. *Acta Cient. Venez.*, 22 (suppl. 2) : 72-74.
- BHAT, S.V., BAJWA, B.S., DORNAUER, H. & De SOUZA, N.J. (1977). Structure and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *coleus forskohlii* brig. *Tetradron Lett.*, 19:1669-1672.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J. & BROWN, A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 1031:163-224.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J., YATANI, A., OKABI, K., MATTERA, R., GRAF, R., SANFORD, J., CODINA, J. & BROWN, A.M. (1990). Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Biochem. Mol. Biol.*, 25:225-244.
- BISCHOFF, F.R. & PONSTINGL, H. (1991). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:10830-10834.
- BLOCK, B.A., IMAGAWA, T., CAMPBELL, K.P. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 107:2587-2600.
- BOCKAERT, J. (1989). Les protéines G étendent leur pouvoir sur les canaux ioniques. *m/s*, 5:562-569.
- BONDI, A. (1978). A effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 205:49-57.
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., Mc CORMICK, F. (1991). The GTPase-superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349:117.
- BOYLE, J.M. & GARDNER, J. (1974). Sequence of events mediating the effect of cholera toxin on rat thymocytes. *J. Clin. Invest.*, 53:1149-
- BRANDT, N.R., CASWELL, A.H., WEN, S.R. & TALVENHEIMO, J.A. (1990). Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.*, 113:237-251.
- BROWN, A.M. & BIRNBAUMER, L. (1988). Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.*, 254:H401-H410.
- BRUM, G. & RIOS, E. (1987). Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2. *J. Physiol.*, 387:489-517.
- BRUN, G., RIOS, E. & STEFANI, E. (1988a). Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.*, 398:441-473.
- BRUM, G., FITTS, R., PIZZARO, G., RIOS, E. (1988b). Voltage sensor of the frog muscle membranes requires calcium to function in excitation-contraction coupling. *J. Physiol. Lond.*, 398: 475-505.
- BUEB, J.L., DA SILVA, A., MOUSLI, M. & LANDRY, Y. (1992). Natural polyamines stimulate G-proteins. *Biochem. J.*, 282:545-550.
- CAILLE, J., ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1978). Existence of a sodium current in the tubular membrane of frog twitch muscle fibres, its possible role in the activation of the contraction. *Pflügers Arch.*, 374:167-177.
- CALLEWAERT, G. (1992). Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovascular Res.*, 26:923-932.



CAMPBELL, K.P., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & SHAMOO, A.E. (1980). Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 602:57-116.

CAPUTO, C. & BALAMOS, P.F. (1979). Membrane potential, contractile activation and relaxation rates in voltage clamped short muscle fibres of the frog. *J. Physiol., Lond.*, 289:175-189.

CAPUTO, C. (1972). The effect of slow temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibers. *J. Physiol. Lond.*, 223:461-482.

CAPUTO, C., BEZANILLA, F. & HOROWICZ, P. (1984). Depolarization-contraction coupling in short frog muscle fibers. A voltage clamp study. *J. Gen. Physiol.*, 84:133-154.

CASEY, P.J., FONG, H.K.W., SIMON, M.I. & GILMAN, A.G. (1990). G, a guanine nucleotide binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.*, 265:2383-2390.

CASEY, P.J., GRAZIANO, M.P., GREISSMUTH, M. & GILMAN, A.G. (1988). Role of G protein in transmembrane signaling. *Cold. Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 3:203-208.

CASWELL, A.H., BRANDT, N.R., BRUNSCHWIG, J.P. & PURKERSON, S. (1991). Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95000 protein (triadine) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry*, 30:7507-7513.

CATTERAL, W.A. (1991). *Cell*, 64:871-874.

CATTERAL, W.A., SEAGAR, M. & TAKAHASHI, M. (1988). Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 263:3535-3538.

CHANDLER, W.K. & HUI, C.S. (1991). Membrane capacitance in frog cut twitch fibers mounted in double vaseline-gap chamber. *J. Gen. Physiol.*, 96:225-256.

CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, R.F., SCHNEIDER, M.F. (1976a). Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol.*, 254:285-316.

CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, F.R. & SCHNEIDER, M.F. (1976b). A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 254:245-283.

CHARIANDINI, D.J., SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1980). Effect of calcium with drawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol., Lond.*, 303:153-163.

CHIARANDINI, D.J. & STEFANI, E. (1973). Effects of manganese on the electrical and mechanical properties of frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. Lond.*, 232:129-147.

CHU, A. & STEFANI, E. (1991). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum cisternal membranes. *J. Biol. Chem.*, 266:7699-7705.

CHUA, M. & DULHUNTY, A.F. (1988). Inactivation of excitation-contraction coupling in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *J. Gen. Physiol.*, 91:737-757.

COGNARD, C. & RAYMOND, G. (1985). The strontium-induced calcium release process and its implication in contractility of skeletal muscle of *Rana Ridibunda*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 224:489-509.

COGNARD, C., RAYMOND, G. & RIVET, M. (1988). On the role of calcium current in the develop of contraction of patch clamped rat skeletal muscle cells in culture. *J. Physiol.*, 406:104P.

COGNARD, C., RIVET, M. & RAYMOND, G. (1990). The blockade of excitation-contraction coupling by nifedipine in patch-clamped rat skeletal muscle cells in culture. *Pflügers Arch.*, 416:98-105.



- COGNARD, C., RIVET-BASTIDE, M., CONSTANTIN, B. & RAYMOND, G. (1992). Progressive predominance of skeletal versus cardiac types of excitation-contraction coupling during *in vitro* skeletal myogenesis. *Pflügers Arch.*, 422: 207-209.
- COLLINS, K.D. & WASKABOURGH, M. (1985). The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.*, 18:323-422.
- CONSTANTIN, B., COGNARD, C., RIVET-BASTIDE, M. & RAYMOND, G. (1993). Calcium current-dependent staircase in rat myotubes and myoballs developing in culture. *Cell calcium*, 14:135-144.
- COTA, G. & STEFANI, E. (1981). Effects of external calcium reduction on the kinetics of potassium contractures in frog twitch muscle fibres. *J. Physiol., Lond.*, 317:303-316.
- CSERNOCH, L., HUANG, C.L., SZÜCS, G., KOVACS, L. (1988). Differential effects of tetracaine on charge movements and Ca<sup>2+</sup> signals in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 92:601-612.
- CNERNOCH, L., PIZARRO, G., URIBE, I., RODRIGUEZ, M., RIOS, E. (1991). Interfering with calcium release suppresses I<sub>T</sub>, the delayed component of intramembrane charge movement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 97:845-884.
- CURTIS, B.A. (1988). Na/Ca exchange and excitation-contraction coupling in frog fast fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 9:415-427.
- DIFRANCESCO, D. & TORTORA, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351:145-147.
- DiVIRGILIO, F., SALVIATA, G., POZZAN, T. & VOLPE, P. (1986). Is a guanine nucleotide-binding protein involved in excitation-contraction coupling in skeletal muscle? *Embo J.* 5:259-262.
- DONOSO, P. & HIDALGO, C. (1989). Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 978:8-16.
- DONTA, S.T., KING, M. & SLOPER, K. (1973). Induction of steroidogenesis in tissue culture by cholera enterotoxin. *Nature (London), New Biol.* 243:246.
- DORRSCHIEDT-KAFER, M. (1977). The action of D600 on frog skeletal muscle : facilitation of excitation-contraction coupling. *Pflügers Arch.*, 369:259-267.
- DOUCET, J.P. & TUANA, B.S. (1991). Identification of low molecular weight GTP-binding proteins and their sites of interaction in subcellular fractions from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 266:17613-17620.
- DULHUNTY, A.F. & GAGE, P.W. (1989). Effects of cobalt, magnesium and cadmium on contraction of rat soleus muscle. *Biophys. J.* 56:1-14.
- DULHUNTY, A.F. & GAGE, P.W. (1988). Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle *J. Physiol. Lond.* 399:63-80.
- DUVAL, A. & LEOTY, C. (1978). Ionic currents in mammalian fast skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 278:403-423.
- EISENBERG, R.S., McCARTHY, R.T., MILTON, R.L. (1983). Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium antagonist D600. *J. Physiol.*, 341:495-505.
- ERDMANN, R. & LÜTTGAU, H.C. (1989). The effect of the phenylalkylamine derivative D888 (devapamil) on force and Ca<sup>2+</sup> current in isolated frog skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.* 413:521-541.

- FELDMEYER, D., LÜTTGAU, H.C. (1988). The effect of perchlorate on Ca currents and mechanical force in skeletal muscle fibres (abstract). *Pflügers Arch.*, 411:R190.
- FELDMEYER, D., MELZER, D.W., POHL, B. (1950). Effects of gallopamil on calcium release and intramembrane charge movements in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol., Lond.*, 421:343-362.
- FILL, M.D. & BEST, P. (1989). Block of contraction in skinned frog skeletal muscle fibres by calcium antagonists. *J. Gen. Physiol.*, 93:429-449.
- FISHMAN, P.H. (1982). *J. Cell. Biol.*, 93:860-865.
- FLEISCHER, S. & INUI, M. (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 18:333-364.
- FLEISCHER, S., OGUNBUNMI, E.M.; DIXON, M.C., FLEER, A.M. (1985). Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Acad. Sci., USA*, 82:7256-7259.
- FONG, H.K.W., YOSHIMOTO, K.K., EVERSOLE-CIRI, P., SIMON, M.I. (1988). Identification of a GTP-binding protein  $\alpha$  subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:3066-3070.
- FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E., LADZUNSKI, M. (1983). [3H]-nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 258:6086-6092.
- FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E., LAZDUNSKI, M. (1983). [3H]-nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 258:6086-6092.
- FRANK, G.B. (1958). Inward movement of Ca<sup>2+</sup> as a link between electrical and mechanical events in contraction. *Nature*, 182:1800-1801.
- FRANK, G.B. (1980). The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *Biochem. Pharmacol.*, 29:2399-2406.
- FRANK, G.B. (1982). The effects of reducing the extracellular calcium concentration on the twitch in isolated frog's skeletal muscle fibres. *Jap. J. Physiol.*, 32:589-608.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PEACHEY, L.D. (1981). Striated muscle : contractile and control mechanisms. *J. Cell. Biol.*, 91:166-186.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1975). Membrane particles and transmission at the triade. *Fed. Proc.*, 34:1382-1389.
- GARCIA, A.M. & MILLER, C. (1984). Channel mediated monovalent cation fluxes in isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Gen. Physiol.*, 83:819-840.
- GARCIA, J., AMADOR, E. & STEFANI, E. (1989). Relationship between myoplasmic Ca transients and Ca current in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 94:973-986.
- GARCIA, J., GAMBOA-ALDECO, R. & STEFANI, E. (1990). Charge movement and calcium currents in skeletal muscle fibers are enhanced by GTP $\gamma$ S. *Pflügers Arch.*, 417:114-116.
- GARCIA, J., GAMBOA-ALDECO, R., STEFANI, E., (1991a). Differential effects of ryanodine and tétrocaine on charge movement and calcium transients in frog skeletal muscle. *J., Physiol.*, 440:403-417.



- GARCIA, J., PIZARRO, G., RIOS, E., STEFANI, E. (1991b). Effect of the calcium buffer EGTA on the delayed charge of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 97:885-896.
- GARCIA, M.C., DIAZ, A.F., GODINEZ, R., SANCHEZ, J.A. (1992a). Effect of sodium deprivation on contractile and charge movement in frog skeletal fibres. *J. A. M. A.*, 262:1819-1828.
- GARCIA, J., MCKINLEY, K., APPEL, S.H., STEFANI, E. (1992b). Ca<sup>2+</sup> current and charge movement in adult single human skeletal fibres. *J. Physiol.*, 454:183-196.
- GILBERT, J.R. & MEISSNER, G. (1982). Sodium-calcium ion exchange in skeletal sarcolemmal vesicles. *J. Memb. Biol.*, 69:77-84.
- GILL, D.M. & KING, C.A. (1975). The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J. Biol. Chem.*, 250:6424.
- GILMAN, A.G. (1987). G protein and regulation of adenylate cyclase. *J. A. M. A.*, 262:1819-1925.
- GONZALEZ, S., BRUN, G. & PIZARRO, G. (1991). Effects of procaine on Ca release in cut skeletal muscle fibers (abstract). *Biophys. J.*, 59:62a.
- GONZALEZ-SERRATOS, H.R., VALLE-AGUILERA, D.A., LATHROP, D.A. & GARCIA, M.C. (1982). Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. *Nature, Lond.*, 298:292-294.
- GRAF, F. & SCHATZMANN, J.J. (1984). Some effects of removal of external calcium on pig striated muscle. *J. Physiol.*, 349:1-13.
- GREENOUGH, W.B., PIERCE, N.F., VAUGHAN, M. (1970). Titration of cholera enterotoxin and antitoxin in isolated fat cells. *J. Infect. Dis.*, 121:S111.
- GROUNDS, M.D. (1991). Towards Understanding skeletal muscle regeneration. *Path. Res. Pract.*, 187:1-22.
- de GUNZBURG, J. (1992). Les petites protéines G. *M/S*, 8:322-323.
- GYÖRKE, S. & PALADE, P. (1992). Effects of perchlorate on excitation-contraction coupling in frog and crayfish skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 456:443-451.
- HALL, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, 249:640.
- HALS, G.D., STEIN, P.G., PALADE, P.T. (1989). Single channel characteristics of a high conductance anion channel in "sarcoballs". *J. Gen. Physiol.*, 93:385-410.
- HAMILTON, S. L., CODINA, J., HAWKES, M. J., YATANI, A., SAWADA, T., STRICKLAND, F. M., FROEHER, S. C., SPIEGEL, A. M., TORO, L., STEFANI, E., BIRNBAUMER, L., BROWN, A., M. (1991). Evidence for direct interaction of G $\alpha$  with the channel of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 266:19528-19535.
- HAMMOND, C. & TRITSCH, D. (1990). Les différentes protéines G et leurs fonctions. Dans "Neurobiologie Cellulaire : canaux ioniques et transmission synaptique" pp. 473.
- HANNON, J.D., LEE, N.K.M., YANDONG, C. & BLINKS, J.R. (1992). Inositol trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) causes contraction in skeletal muscle only under artificial conditions: evidence that Ca<sup>2+</sup> release can result from depolarization of T-tubules. *J. Muscle Res. Cell. Motility*, 13:447-456.
- HANSON, J. & LOW, J. (1963). The structure of F-actin and actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.*, 6:46-60.

HARDEN, T.K. (1992). G-protein regulated phospholipase C. Identification of component proteins. *Advances in Second Messenger and phosphoprotein Research* : 26: ed. J.W. Putney, Jr, Raven Press, Ltd, New York.

HARTZELL, H.C., MERY, P.F., FISCHMEISTER, R. & SZABO, G. (1991). Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature*, 351:573-576.

HAUSMAN, S.Z. & BURNS, D.L. (1993). Binding of Pertussis toxin to lipid vesicles containing glycolipids. *Infection and Immunity*, 61:335-337.

HEILMEYER, L.M.G., HAN, J.W., THIELECZEK, R., VARSANYI, M. & MAYER, G.W. (1990). Relation of phosphatidylinositol metabolism to glycolytic pathway in skeletal muscle membranes. *Molec. Cell. Biochem.*, 99:111-116.

HESCHELER, J., KINZ, F.J., SCHULTZ, G. & WITTINGHOFFER, A. (1991). Ras proteins activate calcium channels in neuronal cells. *Cellular Signaling*, 3:127-133.

HESCHELER, J., ROSENTHAL, W., TRAUTWEIN, W. & SCHULZ, G. (1987). The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature*, 325:445-447.

HIGASHIJIMA, T. (1992). Effects of chloride ion on the activation of G proteins. *Folia Pharmacol. Japan*, 99:267-274.

HIGASHIJIMA, T., BURNIER, J. & ROSS, E.M. (1990). Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.*, 265:14176-14186.

HOLLINGWORTH, S. & MARSHALL, M.W. (1981). A comparative study of charge movement in rat and frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 321:583-602.

HOLZ, G.G.I.W., RANE, S.G. & DUNLOP, K. (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 319:670-672.

HOROWICZ, P. & SCHNEIDER, M.F. (1981a). Membrane charge movement in contracting and non-contracting skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 314:565-593.

HOROWICZ, P. & SCHNEIDER, M.F. (1981b). Membrane charge moved at contraction thresholds in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 314:595-633.

HUANG, C.L.H. & PEACHEY, L.D. (1988). The distribution of charge movement components in surface and T-tubules membranes of frog skeletal muscle fibres. *Biophys. J.*, 53:604a (abstr.).

HUANG, C.L.H. (1980). Charge movement components in skeletal muscle (abstract). *J. Physiol. Lond.*, 304:31-32.

HUANG, C.L.H. (1981). Effects of local anaesthetics on the relation-ship between charge movements and contractile thresholds in frog skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.*, 320:381-391.

HUANG, C.L.H. (1986). The differential effects of twitch potentiators on charge movements in frog skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 380:17-33.

HUANG, C.L.H. (1992). Frog skeletal muscle in strongly hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.*, 99:531-544.

HUANG, L.L.H. (1982). Pharmacological separation of charge movement components in frog skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.*, 324:375-387.

HUGUET, F., BRISAE, A.M., ROCH, A. & DUBRAY, C. (1992). Absence of a direct coupling of a G protein to dihydropridine binding sites in rat heart. *Biochem. Pharmacol.*, 44:1680-1682.



- HUI, C.S. (1983). Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.*, 337:509-529.
- HUI, C.S. (1983a). Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 337:509-529.
- HUI, C.S. (1983b). Differential properties of two charge components in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 337:531-552.
- HUXLEY, H.E. (1957). The double array of filaments in striated muscle. *J. Physiol., London*, 136:16-17P.
- HUXLEY, H.E. (1963). Electron microscope studies of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Molec. Biol.*, 7:281-308.
- HUXLEY, H.E. (1965). The fine structure of striated muscle and its functional significance. *Harvey Lect.*, 60:85.
- HUXLEY, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164:1366.
- ILDEFONSE, M., JACQUEMOND, V., ROUGIER, O., RENAUD, J.F., FOSSET, M. & LAZDUNSKI, M. (1985). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle : evidence for a role of slow Ca<sup>2+</sup> channels using Ca<sup>2+</sup> channel activators and inhibitors in the dihydropyridine series. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129:904-909.
- ISHIKAWA, H. (1968). Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J. Cell. Biol.*, 38:51-66.
- JACKOBSSON, E., BARR, L. & CONNOR, J.A. (1975). An equivalent circuit for small atrial trabeculae of frog. *Biophys. J.*, 15:1068-1085.
- JACQUEMOND, V. & ROUGIER, O. (1988). Nifedipine and Bay K inhibit contraction independently from their action on calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152:1002-1007.
- JACQUEMOND, V. & ROUGIER, O. (1990). Role of slow inward calcium current in excitation-contraction coupling. In : *Transduction in Biological Systems*, edited by Hidalgo, C., Bacigalup, J., Jaimovich, E., and Vergara, J. New York : Plenum, p. 321-338.
- JANICOT, M. FOUQUE, F. & DESBUQUOIS, B. (1991). Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *J. Biol. Chem.*, 266:12858-12865.
- JANIS, R.A. & TRIGGLE, D.J. (1984). 1,4-dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel antagonists and activators : a comparison of binding characteristics with pharmacology. *Durg Dev. Res.*, 4:257-274.
- JORGENSEN, A.O., ARNOLD, W., SHEN, A.C.Y., YUAN, S. & GAVER, M. (1990). Identification of novel proteins unique to either transverse tubules (TS288) or the sarcolemma (SL50) in rabbit skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 110:1173-1185.
- JORGENSEN, A.O., KLANINS, V. & Mac LENNAN, D.H. (1979). Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. *J. Cell. Biol.*, 80:372-384.
- KAHN, R.A. & GILMAN, A.G. (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.*, 261:7906-7911.
- KASLOW, H.R. & BURNS, D.L. (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells : binding, entry, and activation. *FASEB J.*, 6:2684-2690.
- KATADA, T., GILMAN, A.G., WATANABE, Y., BAUER, S., & JAKOBS, K.H. (1985). *Eur. J. Biochem.*, 151:431-437.



- KIKKAWA, S., TAKAHASHI, K., SHIMADA, N., VI, M., KIMURA, N. & KATADA, T. (1990). Conversion of GDP into GTP by nucleoside diphosphate kinase on the GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 265:21536.
- KLEUSS, C., SCHERÜBL, H., HESCHELER, J., SCHULTZ, G. & WITTIG, B. (1993). Selectivity in Signal transduction determined by  $\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins. *Science*, 259:832-834.
- KONGSAMUT, S., KAMP, T.J., MILLER, R.J. & SANGUINETTI, M.C. (1985). Calcium channel agonist and antagonist effects of the stereoisomers of the dihydropyridines 202-791. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130:141-148.
- KOVACS, L. & SZÜCS, G. (1983). Effect of caffeine on intramembrane charge movement and calcium transients in cut skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol., Lond.*, 341:559-578.
- KOVACS, L., RIOS, E. & SCHNEIDER, M.F. (1979). Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibres. *Nature*, 279:391-396.
- LAMB, G.D. & STEPHENSON, D.G. (1992). Importance of  $Mg^{2+}$  in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *NIPS*, 7:270-274.
- LAMB, G.D. & STEPHENSON, D.G.H. (1991). Excitation contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad in the presence of GTP $\gamma$ S. *J. Physiol.*, 444:65-84.
- LAMB, G.D. & WALSH, T. (1987). Calcium currents, charge movement and dihydropyridine binding in fast and slow twitch muscles of rat and rabbit. *J. Physiol.*, 393:595-617.
- LAMB, G.D. (1985). The effect of nifedipine on asymmetric charge movement in rabbit muscle (abstract). *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.*, 16:2P.
- LAMB, G.D., (1986a). Asymmetric charge movement in contracting muscle fibres in the rabbit. *J. Physiol., Lond.*, 376:63-83.
- LAMB, G. D. (1986b). Component of charge movement in rabbit skeletal muscle. The effects of tetracaine and nifedipine. *J. Physiol. Lond.*, 376: 85-100.
- LAMB, G.D. (1992). DHP receptors and excitation-contraction coupling. *J. of Muscle Research and Cell Motility*, 13:394-405.
- LANDIS, C.A., MASTERS, S.B., SPADA, A., PACE, A.M., BOURNE, H.R. & VALLAR, L. (1989). GTPase inhibiting mutations activate the  $\alpha$  chain of Gs and stimulate adenyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*, 340:692.
- LAUFER, R. & CHANGEAUX, J.P. (1989). Calcitonin related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle. Interaction between two second messenger systems. *J. Biol. Chem.* 264:2683.
- LEE, E., TAUSSIG, R. & GILMAN, A.G. (1992). The G226A mutant of  $G_{s\alpha}$  highlights the requirement for dissociation of G protein subunits. *J. Biol. Chem.*, 267:1212.
- LEOTY, C. & ALIX, J. (1976). Some technical improvements for the voltage clamp with the double sucrose gap. *Pflügers Arch.*, 365:95-97.
- LEOTY, C. & NOIREAUD, J. (1987a). Effects of external cations and calcium channels blockers on the depolarization-contraction coupling in denervated rat twitch skeletal muscle. *Pflügers Arch.*, 408:146-152.
- LEOTY, C. & NOIREAUD, J. (1987b). Membrane  $Ca^{2+}$  interactions and contraction in denervated rat soleus muscle. *Pflügers Arch.*, 408:153-159.

- LEOTY, C. (1984). Sodium withdrawal contractures in rat slow twitch skeletal muscle. *Gen. Physiol. Biophys.*, 5:413-429.
- LINCOLN, T.M. (1991). Pertussis toxin sensitive and insensitive guanine nucleotide binding proteins (G-proteins) are not phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Second Messengers and Phosphoproteins*, 13:99-109.
- LINDER, M. & GILMAN, A. (1992). Les protéines G. *Pour la Science*, 179:60-67.
- LORY, P., VARADI, G. & SCHWARTZ, A. (1991). Molecular insights into regulation of L-type Ca channel function. *NIPS*, 6:277-281.
- LÜTTGAU, H.C. & OETLIKER, H. (1968). The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. *J. Physiol. Lond.*, 194:51-74.
- LÜTTGAU, H.C. & SPIECKER, W. (1979). The effects of Ca<sup>2+</sup> deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol., Lond.*, 296:411-429.
- LÜTTGAU, H.C. & STEPHENSON, G.D. (1986). Ion movements in skeletal muscle in relation to the activation of contraction. In: *Physiology of membrane disorders*; eds Th Andreoli, J.F. Hoffman, D.A. Fanestil, S.G. Schultz; Plenum Press Corp., pp. 449-468.
- LÜTTGAU, H.C. (1963). The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. *J. Physiol., Lond.*, 168:679-697.
- LÜTTGAU, H.C., BÖHLE, T. & SCHNIER, A. (1992). Ca<sup>2+</sup> antagonists as tools in the analysis of excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. In press in: *Excitation-contraction coupling in skeletal, cardiac and smooth muscle*; eds G.B. Frank, C.P. Bianchi & H. Ter Keurs, Plenum Press, N.Y.
- LÜTTGAU, H.C., GOTTSCHALK, G. & BERWE, D. (1986). The role of Ca in inactivation and paralysis of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Prog. Zool.*, 33:195-203.
- LÜTTGAU, H.C., GOTTSCHALK, G. & BERWE, D. (1987). The effect of calcium and Ca antagonists upon excitation-contraction coupling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65:717-723.
- MACLENNAN, D.H. (1990). Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys. J.*, 58:1355-1365.
- MALBON, C.C., GILL, D. M. (1979). ADP-ribosylation of membrane proteins and activation of adenylate cyclase by cholera toxin in fat cell ghosts from euthyroid and hypothyroid rats. *Biochem. Biophys. Acta*, 586:518.
- MALBON, C.C., GRAZIANO, M.P. & JOHNSON, G.L. (1984). Fat cell  $\beta$  adrenergic receptor in the hypothyroid rat. Impaired interaction with the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 259:3254.
- MANJI, H.K. (1992). G proteins : implications for psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 149:746-760.
- MARTIN, A.G., YATANI, A., CLARK, R., CONRAY, L., POLAKIS, P., BROWN, A.M. & Mc CORMICK, F. (1992). GAP domains responsible for Ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K<sup>+</sup> channel currents. *Science*, 255:192-194.
- MARTIN, M., ROS, M., GONZALEZ-CALERO, G. & CUBERO, A., (1991). Presence of phospholipase C in coated vesicles bovine brain dual regulatory effects of GTP-analogs. *FEBS*, 290:22-26.
- MARTONOSI, A.N. (1984). Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, 64:1240-1320.



- MATSUOKA, M., ITOH, H., KOZASA, T. & KAZIRO, Y. (1988). Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:5384-5388.
- MATTERA, R., GRAZIANO, M.P., YATANI, A., THAN, T., GRAF, R., CODINA, J., BIRNBAUMER, L., GILMAN, A.G. & BROWN, A.M. (1989). Splice variants of the  $\alpha$  subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science*, 243:804-807.
- MAURO, A., & ADAMS, W.R. (1961). The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fibre. *J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl.* 10:177-185.
- McCLESKY, E.W. (1985). Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 361:231-249.
- MEISSNER, G. & YOUNG, R.C. (1980). Proton permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.*, 255:6814-6819.
- MELZER, W., SCHNEIDER, M.F., SIMON, B. & SZÜCS, G. (1986). Intramembrane charge movement and Ca release in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 373-511.
- MIKAMI, A., IMOTO, K., TANABE, T., NIIDOME, T., MORI, Y., TAKESHIMA, H., NARUMIYA, S. & NUMA, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel. *Nature*, 340:230-233.
- MILLER, R.T., MASTERS, S.B., SULLIVAN, K.A., BEIDERMAN, B. & BOURNE, H.R. (1988). A mutation that prevents GTP-dependent activation of the  $\alpha$  chain of Gs. *Nature*, 334:712.
- MILLIGAN, G., SPIEGEL, A.M., UNSON, C.G. & SAGGERSON, E.D. (1987). Chemically induced hypothyroidism produces elevated amounts of the  $\alpha$  subunit of the inhibitory guanine nucleotide binding protein (Gi) and the  $\beta$  subunit common to all G-proteins. *Biochem. J.*, 247:223.
- MIRONNEAU, J. & LENFANT, J. (1971). Analyse des réponses électriques de la fibre musculaire lisse d'utérus de rate : mise en évidence d'un courant lent calcico-sodique. *C.R. Acad. Sci.*, 272:436-439.
- MOBLEY, B.A. & EISENBERG, B.R. (1975). Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.*, 66:31-45.
- MOUSLI, M., BUEB, J.L., BRONNER, C., ROUOT, B. & LANDRY, Y. (1990). G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *TIPS*, 11:358-362.
- MUKAI, H., MUNEKATA, E. & HIGASHIJIMA, T. (1992). G proteins antagonists. *J. Biol. Chem.*, 267:16237-16243.
- MURPHY, M.P. & McDERMOTT, D. (1992). The guanine nucleotide binding protein Gs activates a novel calcium transporter in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267:883-888.
- NATHANSON, N.M. & HARDEN, T.K. (1989). Direct G protein regulation of ionic channels. In : "G protein and Signal transduction" pp. 5.
- NORTHRUP, J.K., SMIGEL, M.D., STERNWEIS, P.C. & al. (1983). The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylyl cyclase : resolution of the activated 45:k-dalton ( $\alpha$ ) subunit. *J. Biol. Chem.*, 258:11369-11376.
- OHNISHI, T.S. (1979). Calcium induced calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem. Tokyo*, 86:1147-1150.



- OOTA, I., TAKAUJI, M. & NAGAI, T. (1972). Effects of manganese ions on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *Jpn. J. Physiol.*, 22:379-392.
- PEACHEY, L.D. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1983). Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In : "Handbook of physiology", Section 10: Skeletal muscle. Eds. Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R., pp. 23-71. Am. Physiol. Soc., Bethesda, Maryland.
- PELZER, S., SHUBA, Y.M., ASAI, T., CODINA, J., BIRNBAUMER, L., McDONALD, T. F., PELZER, D., (1990). Membrane-delimited stimulation of heart cell calcium current by  $\beta$ -adrenergic signal-transducing Gs protein. *Am. J. Physiol.*, 259: H264-H267.
- PIKE, G.K., ABRAMSON, J.J. & SALAMA, G. (1989). Effects of tetracaine and procaine on skinned muscle fibres depend on free calcium. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 10:337-349.
- PINES, M., GIERSCHIK, P., MILLIGAN, G., KLEE, W. & SPIEGEL, A. (1985). Antibodies against the carboxyl-terminal 5-kD a peptide of the  $\alpha$  subunit of transducin crossreact with the 40-kDa but not the 39-kDa guanine nucleotide binding protein from brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:4095-4099.
- PIZARRO, G., FITTS, R., RODRIGUEZ, M., URIBE, I. & RIOS, E. (1988). The voltage sensor of skeletal muscle excitation-contraction coupling : a comparison with  $Ca^{2+}$  channels. In : the calcium channel, structure, function, and implications, ed. Morad, M., Nayler, W., Kazda, S., SCHRAMM, M., 138-158.
- POINDESSAULT, J.P.(1973). Etude par la méthode du "double sucrose gap", des propriétés membranaires. Théorie générale de la mesure. Publication du laboratoire, Université de Poitiers, 1-17.
- POTREAU, D. & RAYMOND, G. (1980a). Calcium-dependent electrical activity and contraction of voltage-clamped frog single muscle fibres. *J. Physiol.*, 307:9-22.
- POTREAU, D. & RAYMOND, G. (1980b). Slow inward barium current and contraction on frog single muscle fibres. *J. Physiol.*, 303:91-109./
- POTREAU, D. & RAYMOND, G. (1982). Existence of a sodium-induced calcium release mechanism on frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol., Lond.*, 333:463-480.
- RAKOWSKI, R.F., BEST, P.M. & JAMES-KRACKE, M.R. (1985). Voltage dependence of membrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 6:403-433.
- RALL, T. & HARIS, B.A. (1987). Identification of the lesion in the stimulatory GTP-binding protein of the uncoupled S49 Lymphoma. *FEBS Lett.*, 224:365.
- RAYMOND, G. (1989). Les mécanismes de couplage entre excitation et libération du calcium du muscle squelettique des vertébrés. *Arch. Int. Physiol., Biochem.*, 97:A79-A95.
- READ, G.W. & KIEFFER, E.F. (1979). Benzathonium chloride : selective inhibitor of histamine release induced by compound 48/80 and other polyamines. *Exp. Ther.*, 211:711-715.
- REUTER, H. (1987). Modulation of ion channels by phosphorylation and second messengers. *NIPS*, 2:168-171.
- RIBI, H.O., LUDWIG, D.S., MERCER, K.L., SCHOOLNIK, G.K. & KORNBERG, R.K. (1988). *Science*, 239:1272-1276.
- RIOS, E. & BRUM, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, 325:717-720.



- RIOS, E., & PIZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, 71:849-908.
- RIOS, E., FITTS, R., URIBE, I., PIZARRO, G. & BRUN, G. (1990). A third role for calcium in excitation-contraction coupling transduction in Biological systems, Ed. Hidalgo, C., Bacigalupo, J., Jaimovich, E., Vergara, J., 385-400.
- RIOS, E., PIZARRO, G. & BRUM, G. (1989). A four gap voltage clamp improves measurements of EC coupling events in frog skeletal muscle. *Biophys. J.*, 55:237A.
- RIOS, E., PIZARRO, G. & STEFANI, E. (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.*, 54:109-133.
- RIOS, E.G., BRUN, G. & STEFANI, E. (1986). Excitation contraction coupling effects of interventions that reduce slow Ca current suggest a role of T-tubule Ca channels in skeletal muscle function (abstract). *Biophys. J.*, 49:13a.
- RIVET, M., COGNARD, C. & RAYMOND, G. (1989). The slow inward current is responsible for a part of the contraction of patch clamped rat myoballs. *Pflügers Arch.*, 413:316-318.
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHT, S.L. & KRANS, M.J. (1971). The glucagon sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *JH. Biol. Chem.*, 246:1877-1882.
- ROJAS, C. & JAIMOVICH, E. (1990). Calcium release modulated by inositol trisphosphate in rupture fibers from frog skeletal muscle. *Pflügers Arch.*, 416:296-304.
- ROUGIER, O. (1964). Mesure de la résistance membranaire de la fibre musculaire squelettique. Etude à l'aide de la méthode dite du "sucrose-gap". *C.R. Soc. Biol., Paris*, 158:343-347.
- ROUGIER, O., ILDEFONSE, M. & GARGOUÏL, Y.M. (1966). Application de la technique du double "sucrose gap" à l'étude électrophysiologique du muscle cardiaque. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 263:1482-1485.
- ROUSSEAU, E. & CHABOT, H. (1992). Identification fonctionnelle du canal calcique du réticulum sarcoplasmique. *M/S*, 8:950-957.
- ROUSSEAU, E., LADINE, J., LIU, Q.Y. & MEISSNER, G. (1988). Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267:75-86.
- SANDOW, A. (1952). Excitation contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.*, 25:176-201.
- SANDOW, A., & ISAACSON, A. (1960). Topochemical factors in potentiation of contraction by heavy metal cations. *J. Gen. Physiol.*, 49:937-962.
- SCHAFFER, D.E., LUST, W.D., SIREAR, B., GOLDBERG, N.D. (1970). Elevated concentration of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in intestinal mucosa after treatment with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 67:851.
- SCHERER, N.M., TORO, M.J., ENTMAN, M.L. & BIRNBAUMER, L. (1987). G-protein distribution in canine cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemma : comparison to rabbit skeletal muscle membranes and to brain and erythrocytes G-proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:431-440.
- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973). Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature. Lond.*, 242:244-246.



- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973). Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*, 242:244-246.
- SCHNEIDER, M.F. & SIMON, B.J. (1988). Inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J. Physiol., Lond.*, 405:727-745.
- SCOTT, R.H. & DOLPHIN, A.C. (1986). Regulation of calcium currents by a GTP analogue : potentiation of (-) balofen-mediated inhibition. *Neurosci. Lett.*, 69:59-64.
- SEAMON, K.B. & DALY, J.W. (1986). Forskolin : its biological and chemical properties. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, 20:1-150.
- SHECHTER, E. (1990). Différents types de protéines G. Dans "Biochimie et Biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels". Masson pp. 312.
- SHIMAHARA, T., BOURNAUD, R., INOUE, I., STRUBE, C. (1992). Charge movement and Ca<sup>2+</sup> release in normal and dysgenic foetal myotubes. *J. Physiol.*, 86:117-121.
- SIMON, B.J. & BEAM, K.G. (1985). Slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 85:1-19.
- SIMON, B.J., KLEIN, M.G., SCHNEIDER, M.F. (1989). Caffeine slows turn-off of calcium release in voltage clamped skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 55:793-797.
- SMITH, J.S., CORONADO, R., MEISSNER, G. (1988a). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca<sup>2+</sup>, ATP and modulation by Mg<sup>2+</sup>. *J. Gen. Physiol.*, 88:573-588.
- SMITH, J.S., IMAGAWA, T., MA, J., FILL, M., CAMPBELL, P.K. & CORONADO, R. (1988b). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 92:1-26.
- SMITH, J.S.T., IMAGAWA, T., MA, J., FILL, M., CAMPBELL, K.P. & CORONADO, R. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 92:1-26.
- SOMASUNDARAM, B., TREGGAR, R.T. & TRENTHAM, R. (1991). GTPγS causes contraction of skinned frog skeletal muscle via the DHP-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels of sealed T-tubules. *Pflügers Arch.*, 418:137-143.
- SPEEDING, M. & KENNY, B. (1992). Voltage dependent calcium channels : structures and drug binding sites. *Biochemical Society Transactions*, 20:147-153.
- SPIEGEL, A.M., SHENKER, A. & WEINSTEIN, L.S. (1992). Receptor-effector coupling by G proteins : Implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Rev.*, 13:536-565.
- STAMPFLI, R. (1954). A new method for measuring membrane with external electrodes. *Experientia*, 10:508-509.
- STAMPFLI, R. (1964). Développement de méthodes pour mesurer les propriétés électriques de la membrane à l'aide d'électrodes extracellulaires. *Actual. Neurophysiol.*, 5:1-13.
- STEFANI, E. & CHIARANDINI, D.J. (1973). Skeletal muscle : dependence of potassium contractures on extracellular calcium. *Pflügers Arch.*, 343:143-150.
- STERWEIS, C.P. & SMRKA, A. (1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *TIBS*, 17:502-506.



- STRUBE, C., BOURNAUD, R., INOUE, I., SHIMAHARA, T. (1992). Intramembrane charge movement in developing skeletal muscle cells from fetal mice. *Pflügers Arch.*, 421:572-577.
- SUAREZ-ISLA, B.A., IRRIBARRA, V., OBERHAUSER, A., LARALDE, L. & BULL, R. (1988). Inositol (1,4,5)-triphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.*, 54:737-741.
- SULLIVAN, K.A., MILLER, R.T., MASTERS, S.B., BEIDERMAN, B., HEIDMAN, W. & BOURNE, H.R. (1987). Identification of receptor contact site involved in receptor G protein coupling. *Nature*, 330:758.
- SUTKO, J.L. & KENYON, J.L. (1983). Ryanodine modification of cardiac muscle responses to potassium-free solutions. Evidence for inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium release. *J. Gen. Physiol.*, 82:385-404.
- SUTKO, J.L., ITO, K. & KENYON, L.J. (1985). Ryanodine : a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle. *Fed. Proc.*, 44:2984-2988.
- TANABE, T., BEAM, K.G., POWELL, J.A. & NUMA, S. (1988). Restoration of excitation contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*, 336:134-139.
- TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, W., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. & NUMA, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328:313-318.
- TOSELLI, M., LANG, J., COSTA, T., LUX, H.D. (1989). Direct modulation of voltage dependent calcium channels by muscarinic activation of a pertussis toxin sensitive G protein in hippocampal neurons. *Pflügers Arch.*, 415:255-261.
- TOUTANT, M., BARKANIN, J., BOCKAERT, J., & ROUOT, B. (1988). G-proteins in skeletal muscle. Evidence for a 40 kDa pertussis toxin substrate in purified transverse tubules. *Biochem. J.*, 254:405-409.
- TOUTANT, M., GABRION, J., VANDACLE, S., PERALDI-ROUX, S., BARHANIN, J., BOCKAERT, J. & ROUOT, B. (1990). Cellular distribution and biochemical characterization of G-proteins in skeletal muscle : comparative location with voltage dependent calcium channels. *EMBO J.*, 9:363-369.
- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T. & HORNE, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Trends in Physiol. Sci.*, 12:349-354.
- UI, M. (1986). Pertussis toxin as a probe of receptor coupling to inositol lipid metabolism. In "Phosphoinositides and receptor mechanisms : receptor biochemistry and methodology". Ed. Venter, C.J., Harrison, L.C., 7:163-195.
- VALDIVIA, C., VAUGHAN, D., MOTTER, B.V.L. & CORONADO, R. (1992). Fast release of  $45Ca^{2+}$  induced by inositol 1,4,5-triphosphate and  $Ca^{2+}$  in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle : evidence for two types of  $Ca^{2+}$  release channels. *Biophys. J.*, 61:1184-1193.
- VERGARA, J. & CAPUTO, C. (1983). Effects of tetracaine on charge movements and calcium signals in frog skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1477-1481.
- VERGARA, J., TSIEN, R.Y. & DEBAY, M. (1985). Inositol (1,4,5)-triphosphate : a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82:6352-6356.
- VILLAZ, M., ROBERT, M., CARRIER, L., BEELER, T., ROUOT, B., TOUTANT, M. & DUPONT, Y. (1989). G-protein dependent potentiation of calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Cellular Signalling*, 1:493-506.
- VOLPE, P., SALVIATI, G., DiVIRGILIO, F. & POZZAN, T. (1985). Inositol (1,4,5)-triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature*, 316:347-349.

- WANKE, E., FERRONI, A., MALGAROLI, A., AMBROSINI, A., POZZAN, T. & MELDOLESI, J. (1987). Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca current in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:4313-4317.
- WESTERBLAD, H., LEE, J.A., LÄNNERGRÉN, J., ALLEN, D.G. (1991). Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 261:C195-C209.
- WHITEHOUSE, S., FERAMISCO, J.R., CASNELLIA, J.E., KREBS, E.G., WALSH, DA, (1983). Studies on the kinetic mechanism of the catalytic of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 258: 3693-3701.
- WINTER, M.C., CARSON, M.R., SHELDON, A.R. & SHASBY, M. (1992). Mastoparan activates apical chloride and potassium conductances, decreases cell volume, and increases permeability of cultured epithelial cell monolayers. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 6:583-593.
- WU, D., LEE, C.H., RHEE, S.G. & SIMON, M.L. (1992). Activation of phospholipase C by the  $\alpha$  subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J. Biol. Chem.*, 267:1811-1817.
- YANG, J.S.J., SLADKY, J.T., KALLEN, R.G. & BARCHI, R.L. (1991). TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation. *Neuron*, 7:421-427.
- YATANI, A., CODINA, J., IMOTO, Y., REEVES, J.P., BIRNBAUMER, L. & BROWN, A.M. (1987). A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science*, 238:1288-1292.
- YATANI, A., HAMM, H., CODINA, J., MAZZONI, M.R., BIRNBAUMER, L., BROWN, A.M. (1988). A monoclonal antibody to the  $\alpha$  subunit of GK blocks muscarinic activation of atrial K<sup>+</sup> channels. *Science*, 241:828-831.
- YUAN, S., ARNOLD, W. & JORGENSEN, A.O. (1990). Biogenesis of transverse tubules : immunocytochemical localization of a transverse tubular protein (TS28) and a sarcolemmal protein (SL 50) in rabbit skeletal muscle developing in vitro. *J. Cell. Biol.*, 110:1187-1198.
- YUAN, S., ARNOLD, W. & JORGENSEN, A.O. (1991). Biogenesis of transverse tubules and triads : immunolocalization of the 1,4-dihydropyridine receptor, TS28, and the ryanodine receptor in rabbit skeletal muscle developing in situ. *J. Cell. Biol.*, 112:289-301.



## RESUME

En utilisant la technique de potentiel-imposé par double séparation de mannitol, nous avons recherché l'intervention possible des protéines G dans les mécanismes de régulation du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique adulte de batracien.

La toxine pertussique (PTX) qui inhibe les protéines  $G_i$  et  $G_o$  entraîne une diminution de la contraction phasique et tonique de la fibre musculaire squelettique. Cette inhibition de l'activité contractile par la PTX s'observe aussi bien en application extracellulaire qu'en intracellulaire et serait indépendante:

\* du courant sodique qui n'est pas touché en présence de la toxine,

\* du système adénylate cyclase AMPc. Lorsque celui-ci est contrebalancé par ajout de forskoline (FRSK) on observe toujours l'effet inhibiteur de PTX.

Elle est en partie dépendante du courant calcique. En effet la PTX inhibe partiellement le courant calcique de type L parallèlement avec la contraction. Mais lorsque le courant calcique est bloqué par  $CoCl_2$ , la toxine exerce toujours un effet inhibiteur sur la contraction tonique.

La PTX a été testée sur l'inactivation potentiel-dépendante de la contraction qui traduit la disponibilité du "voltage sensor" en fonction de la polarité membranaire. On observe en présence de la toxine, un déplacement de la courbe d'inactivation vers les potentiels négatifs lorsque le HP est à -90 mV ou à -130 mV, ce qui traduit une facilitation de l'inactivation contractile.

L'élévation de la concentration calcique externe lève partiellement les effets de PTX. Cette levée partielle reste identique lorsque que la membrane est à son potentiel de repos (HP = -90 mV) ou lorsqu'elle est hyperpolarisée (HP = -130 mV). Ce qui suggère une non compétition entre PTX et les ions  $Ca^{2+}$  au niveau du site cationique du "voltage sensor".

Les analogues non hydrolysables du GTP ( $GTP\gamma S$ ) et du GDP ( $GDP\beta S$ ) activent ou inhibent respectivement les mouvements de charge et l'activité contractile.

Le chlorure de benzalkonium (BAC) qui active la protéine  $G_o$  entraîne une augmentation de l'activité contractile, mais celui-ci est sans effet lorsque la préparation a été préalablement perfusée avec la PTX.

L'anticorps dirigé contre la sous-unité  $\alpha_o$  de  $G_o$  tend à diminuer la contraction.

La toxine cholérique (CTX) qui active  $\alpha_s$  de la protéine  $G_s$  n'a pas d'effet direct sur la contraction phasique, mais induit une augmentation du courant calcique de type L et de la contraction tonique. Cette augmentation disparaît lorsqu'on ajoute la protéine kinase inhibitrice AMPc-dépendante (PKI) dans le milieu intracellulaire.

L'anticorps dirigé contre  $\alpha_s$  de la protéine  $G_s$  n'a pas d'effet sur la contraction phasique mais diminue la tonique.

L'anticorps dirigé contre la sous-unité  $\alpha_i$  de la protéine  $G_i$  n'a pas d'effet sur la contraction phasique mais induit une augmentation de la tonique.

**En conclusion**, la protéine  $G_o$  située dans le membrane tubulaire serait couplée directement au "voltage sensor" et régulerait celui-ci à l'état basal dans le sens d'une activation. Lorsque  $G_o$  est inhibée, elle permettrait le passage du "voltage sensor" dans un état inactivé ou paralysé. Les protéines  $G_i$  et  $G_s$  n'interviendraient pas directement dans la régulation de la contraction phasique mais réguleraient la contraction tonique via la cascade adénylate cyclase-AMPc-phosphorylation des canaux calciques.

**MOTS CLES:** muscle squelettique, voltage-clamp, protéine G, "voltage sensor" couplage excitation-contraction, PTX, CTX, BAC, anticorps.