

Sommaire

Table des illustrations	p. 6
Introduction générale	p. 10
Matériels et méthodes	p. 21
1. Préparation du matériel biologique	p. 21
2. Mesure du contenu en eau (méthode du rapport eau sur poids sec)	p. 21
3. Mesure du contenu en potassium des cellules	p. 23
4. Mesure de flux isotopiques	p. 24
5. Mesure de la fragilité osmotique	p. 26
6. Patch-clamp	p. 27
6.1. Principe	p. 27
6.2. Enregistrement des courants et électronique du poste de « patch-clamp »	p. 30
6.3. Protocole	p. 32
6.4. Analyse des courants ioniques traversant un canal	p. 33
6.5. Analyse des caractéristiques électriques d'un canal en configuration « cell-attached » et « inside-out »	p. 35
6.6. Analyse des caractéristiques électriques de la membrane en « configuration « whole-cell »	p. 40
7. Présentation des données et analyse statistique des résultats	p. 40
8. Produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences	p. 41

Chapitre 1. Caractérisation des voies de conductance ioniques de la membrane des érythrocytes nucléés de truite

Introduction	p. 42
Résultats	p. 44
1. Mise en évidence en conditions isosmotiques d'une voie de conductance chlore en configuration « whole-cell »	p. 44
2. Enregistrement de l'activité isolée des canaux ioniques sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached »	p. 46
2.1. Enregistrement de l'activité d'un canal cationique non sélectif sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached »	p. 47
2.1.1. Détermination de la perméabilité aux cations et de la conductance du canal	p. 47
2.1.2. Essais de modulation de l'activité du canal cationique non sélectif (CNS) en configuration « cell-attached »	p. 49
2.1.3. Mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif	p. 50
2.2. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore à conductance linéaire sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached »	p. 51
2.3. Enregistrement de l'activité d'un canal cationique non sélectif sur la membrane des érythrocytes en configuration « inside-out »	p. 52
2.3.1. Détermination de la perméabilité aux cations et de la conductance du canal	p. 52
2.3.2. Analyse cinétique de l'activité du canal cationique non sélectif	p. 59
2.3.3. Mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif en configuration « inside-out »	p. 60
2.3.4. Action d'agents pharmacologiques inhibiteurs sur l'activité du canal cationique non sélectif	p. 61
2.4. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore à conductance linéaire sur la membrane des globules rouges en configuration « inside-out »	p. 66

2.4.1. Détermination de la perméabilité au chlore et de la conductance du canal	p. 66
2.4.2. Détermination de la sélectivité anionique du canal	p. 66
2.4.3. Fréquence d'occurrence du canal chlore à conductance linéaire et cinétique du canal	p. 68
2.4.4. Inhibiteurs du canal chlore à conductance linéaire	p. 69
2.5. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore rectifié sortant sur la membrane des globules rouges en configuration « inside-out »	p. 69
2.5.1. Détermination de la perméabilité aux ions chlore et de la conductance du canal	p. 70
2.5.2. Détermination de la sélectivité cationique et anionique du canal	p. 70
2.5.3. Analyse cinétique du canal chlore rectifié sortant	p. 72
2.5.4. Effets des inhibiteurs des canaux chlores sur l'activité du canal chlore rectifié sortant	p. 73
3. Mise en évidence de l'activation de voies de conductance lors d'un choc hyposmotique	p. 74
3.1. Mise en évidence de l'augmentation des courants membranaires globaux de l'érythrocyte de truite en conditions hyposmotiques	p. 74
3.2. Dépendance vis-à-vis des ions chlores et sensibilité au DIDS des courants globaux en conditions hyposmotiques	p. 75
3.3. Activation réversible des courants globaux par le choc osmotique	p. 77
4. Essai de caractérisation des voies de conductances impliquées dans l'augmentation de conductance membranaire observée en conditions hypotoniques en configuration « cell-attached »	p. 78
Discussion	p. 80

Chapitre 2. Implication des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes nucléés de truite dans les processus de régulation de volume faisant suite à un gonflement hypotonique

Introduction p. 103

Résultats p.105

Note préliminaire p. 105

1. Variation du volume des érythrocytes lors d'un choc hypotonique p. 107

2. Dépendance des processus de RVD à la suite d'un choc hypotonique vis-à-vis du potassium p. 110

3. Effet des inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique p. 114

3.1. Effet du baryum sur les processus de RVD en présence d'une solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF p. 115

3.2. Effet de la quinine sur les processus de RVD en présence d'une solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF p. 118

3.3. Effet d'autres inhibiteurs des transporteurs cationiques sur les processus de régulation de volume des érythrocytes en conditions hypotoniques Ringer MeSF p. 120

4. Effets des inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique p. 123

4.1. Effet du NPPB sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl^- et Ringer MeSF p. 124

4.2. Effet du DIDS sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl^- et MeSF p. 126

4.3. Effet de la glibenclamide sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl ⁻ et MeSF	p. 129
4.4. Effet d'autres inhibiteurs des canaux chlores sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF	p. 131
5. Effet des inhibiteurs de la bande 3 sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique	p. 133
6. Effet des antagonistes de la messagerie calcique (ou du complexe Ca ²⁺ -calmoduline) sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF	p. 135
7. Effet des antagonistes du métabolisme des éicosanoïdes sur les processus de RVD induits par un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF	p. 139
8. Effet des inhibiteurs des protéines kinases sur les processus de RVD induits par un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF	p. 141
Discussion	p. 144
Conclusion et perspectives	p. 169
Bibliographie	p. 174
Publications	p. 202

Table des illustrations

Figures

- Figure 1.** : Schéma du modèle de "pompes-fuites".
- Figure 2.** : Illustration des différents transporteurs mis en jeu dans les processus de RVD.
- Figure 3.** : Représentation schématique des processus de diffusion et de transport pour les gaz et les ions inorganiques à travers la membrane des érythrocytes.
- Figure 4.** : Modèles des transporteurs membranaires permettant d'accomplir les processus de RVD faisant suite à un gonflement dans les érythrocytes de poissons.
- Figure 5.** : Schéma des différentes configurations de "patch-clamp".
- Figure 6.** : Le poste de "patch-clamp".
- Figure 7.** : Sens des courants mesurés par la technique du "patch-clamp".
- Figure 8.** : Enregistrement de l'activité d'un canal unitaire.
- Figure 9.** : Caractérisation en configuration "whole-cell" de la conductance membranaire globale des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques.
- Figure 10.** : Caractérisation en configuration "whole-cell" d'une voie de conductance chlore en conditions isosmotiques.
- Figure 11.** : Caractérisation en configuration "cell-attached" du canal cationique non sélectif de la membrane des érythrocytes de truite.
- Figure 12.** : Détermination de la sélectivité cationique du canal cationique non sélectif en configuration "cell-attached".
- Figure 13.** : Caractérisation en configuration "cell-attached" de la mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif.
- Figure 14.** : Caractérisation en configuration "cell-attached" d'un canal chlore à conductance linéaire.
- Figure 15.** : Caractérisation en configuration "inside-out" du canal cationique non sélectif.
- Figure 16.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la sélectivité cationique et anionique du canal cationique non sélectif.
- Figure 17.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la sélectivité cationique du canal cationique non sélectif.
- Figure 18.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la sélectivité cationique du canal cationique non sélectif.
- Figure 19.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la cinétique d'activité du canal cationique non sélectif.

- Figure 20.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif.
- Figure 21.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de l'inhibition du canal cationique non sélectif par le Gd^{3+} .
- Figure 22.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de l'inhibition du canal cationique non sélectif par l'acide flufénamique.
- Figure 23.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de l'inhibition du canal cationique non sélectif par la quinine.
- Figure 24.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de l'inhibition du canal cationique non sélectif par le Ba^{2+} .
- Figure 25.** : Caractérisation en configuration "inside-out" du canal chlore à conductance linéaire.
- Figure 26.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la sélectivité cationique et anionique du canal chlore à conductance linéaire.
- Figure 27.** : Caractérisation en configuration "inside-out" du canal chlore rectifié sortant.
- Figure 28.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de la sélectivité cationique et anionique du canal chlore rectifié sortant.
- Figure 29.** : Caractérisation en configuration "inside-out" de l'inhibition du canal chlore rectifié sortant par le NPPB.
- Figure 30.** : Caractérisation en configuration "whole-cell" des conductances membranaires globales activées en conditions hyposmotiques.
- Figure 31.** : Caractérisation en configuration "whole-cell" de l'implication d'une voie de conductance chlore lors d'un choc hyposmotique.
- Figure 32.** : Caractérisation en configuration "whole-cell" de la réversibilité de l'activation des voies de conductance lors d'un choc hyposmotique.
- Figure 33.** : Caractérisation de la limite de fragilité osmotique des érythrocytes en fonction de la substitution anionique.
- Figure 34.** : Evolution du contenu en eau des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF.
- Figure 35.** : Dépendance des processus de RVD vis-à-vis de la sortie de K^{+} à la suite d'un choc hyposmotique.
- Figure 36.** : Caractérisation de la dépendance de la vitesse des processus de RVD vis-à-vis de la sortie de K^{+} .

- Figure 37.** : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant du Ba^{2+} .
- Figure 38.** : Comparaison des effets inhibiteurs du Ba^{2+} sur les processus de RVD en présence d'une solution de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF.
- Figure 39.** : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant de la quinine.
- Figure 40.** : Comparaison des effets inhibiteurs de la quinine sur les processus de RVD en présence d'une solution de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF.
- Figure 41.** : Effets de différents inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.
- Figure 42.** : Réversibilité de l'action inhibitrice du Ba^{2+} par la valinomycine.
- Figure 43.** : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant du NPPB.
- Figure 44.** : Comparaison des effets inhibiteurs du NPPB sur les processus de RVD en présence d'une solution de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF.
- Figure 45.** : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant du DIDS.
- Figure 46.** : Comparaison des effets inhibiteurs du DIDS sur les processus de RVD en présence d'une solution de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF.
- Figure 47.** : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant de la glibenclamide.
- Figure 48.** : Comparaison des effets inhibiteurs de la glibenclamide sur les processus de RVD en présence d'une solution de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF.
- Figure 49.** : Effets de différents inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.
- Figure 50.** : Evolution du contenu en eau des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant de l'acide flufénamique ou de l'acide niflumique.

Figure 51. : Effet de différents inhibiteurs de la bande 3 sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.

Figure 52. : Effet de différents antagonistes du Ca^{2+} ou du complexe Ca^{2+} -calmoduline sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.

Figure 53. : Effet de différents antagonistes du métabolisme des éicosanoïdes sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.

Figure 54. : Evolution du contenu en eau et en K^+ des érythrocytes lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl^- et Ringer MeSF contenant de la chébérythrine.

Figure 55. : Effet de différents inhibiteurs ou activateurs des protéines kinases sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.

Figure 56. : Modèle des processus de RVD de l'érythrocyte de truite après gonflement hypotonique faisant intervenir le cotransport KCl et les canaux ioniques de la membrane.

Tableaux

Tableau 1. : Exemples de transporteurs membranaires activés lors des processus de RVD dans différents types cellulaires.

Tableau 2. : Composition des solutions utilisées lors des expériences de régulation de volume.

Tableau 3. : Composition des solutions utilisées lors des expériences de "patch-clamp".

Tableau 4. : Liste des différents produits chimiques employés durant les expériences.

Tableau 5. : Pourcentage de retour au volume de contrôle suite à un choc hypotonique et pourcentage d'inhibition des processus de RVD en présence de différents inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires.

Tableau 6. : Pourcentage de retour au volume de contrôle suite à un choc hypotonique et pourcentage d'inhibition des processus de RVD en présence de différents inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires.

Tableau 7. : Pourcentage de retour au volume de contrôle suite à un choc hypotonique et pourcentage d'inhibition des processus de RVD en présence de différents inhibiteurs des voies métaboliques intracellulaires.

Introduction générale

Quoique certaines exceptions aient été signalées (Greger, 1985), les membranes des cellules animales sont de manière générale très perméables à l'eau (Colombe et Macey, 1974 ; Macknight, 1988). Dans un même temps, elles ne peuvent tolérer un gradient de pression hydrostatique et les mouvements d'eau à travers ces membranes sont en grande partie dictés par les gradients de pression osmotique (Graf *et al.*, 1988 ; Guharay et Sachs, 1984 ; Kelly et Macklem, 1991 ; Rand et Burton, 1964 ; Sackin, 1994). C'est pourquoi une quelconque modification de l'osmolarité intra- ou extracellulaire est immédiatement suivie de mouvements respectifs d'eau à travers la membrane et donc d'une altération du volume cellulaire. La cellule doit alors mettre en place des mécanismes de régulation du volume cellulaire, afin d'éviter des perturbations trop importantes qui pourraient non seulement altérer ses fonctions métaboliques, physiologiques ou biologiques, mais encore conduire à la lyse de la cellule. En effet, la constance du volume cellulaire garantit en partie l'homéostasie physico-chimique des cellules nécessaire au fonctionnement spécifique de chaque type cellulaire (pour revue Lang *et al.*, 1998), mais également le bon fonctionnement de processus primordiaux tels que la prolifération, la maturation et la différenciation cellulaire (Lang *et al.*, 1998).

La régulation du volume cellulaire a fait l'objet de nombreux travaux et les résultats obtenus sur les divers types cellulaires étudiés ont été regroupés dans diverses synthèses bibliographiques (Eveloff et Warnock, 1987 ; Hoffmann et Simonsen, 1989 ; Chamberlin et Strange, 1989 ; Hoffmann et Kolb, 1991 ; Sarkadi et Parker, 1991 ; Hoffmann et Ussing, 1992 ; Al-Habory, 1994 ; Parker, 1993 ; Cossins et Gibson, 1997 ; Lang *et al.*, 1998).

Les cellules animales régulent précisément leur volume : l'eau est en équilibre thermodynamique de part et d'autre de la membrane plasmique et, parce que le cytoplasme

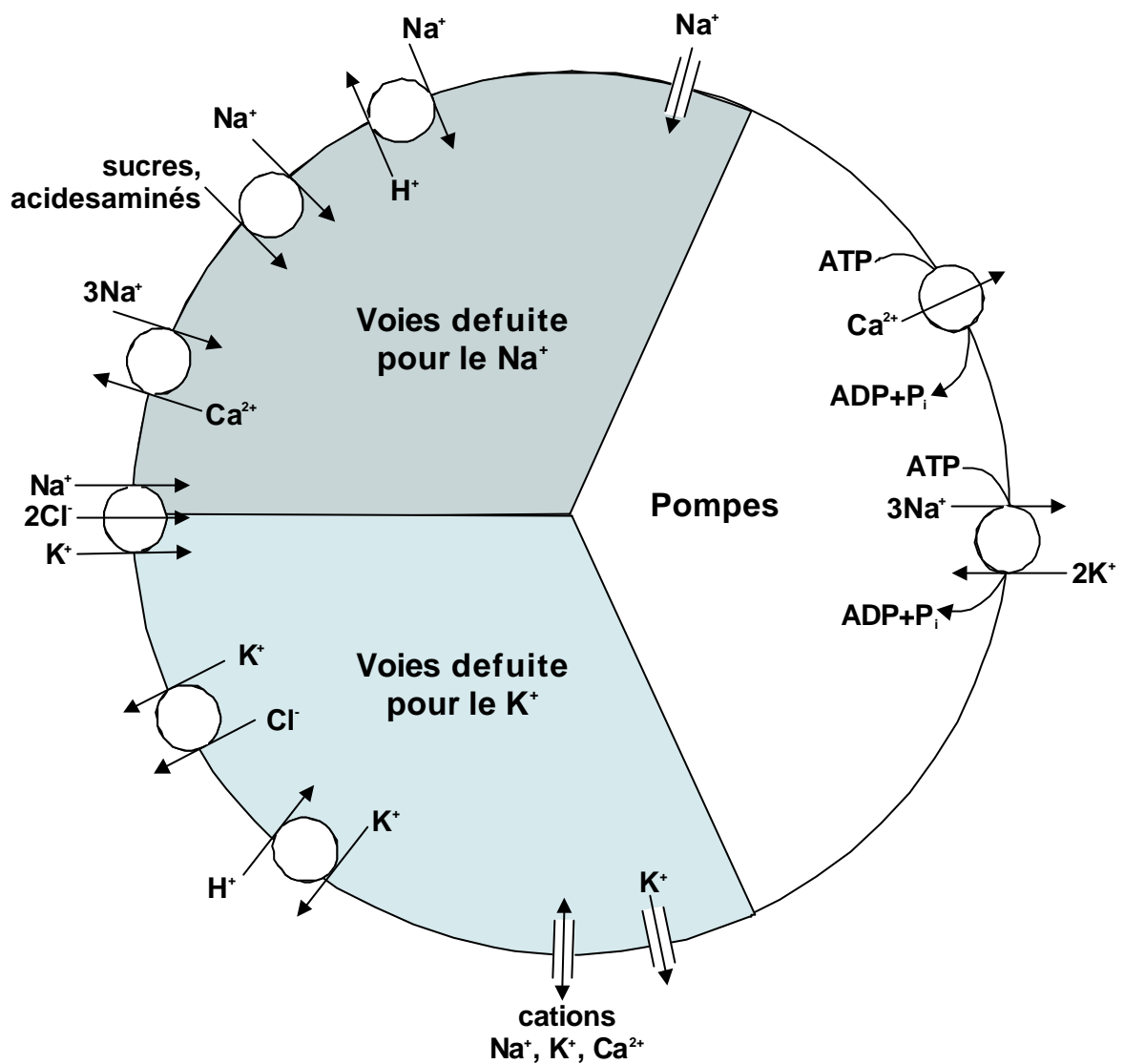


Figure 1: Modèle de régulation à long terme du volume cellulaire par les transporteurs actifs (pompes) et les transporteurs ioniques passifs (fuites) à l'état d'équilibre dynamique. Illustration de ce modèle (« Pump-Leak ») pour les ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} dans un type cellulaire typique (d'après Hallows et Knauf, 1994).

contient une plus forte concentration en solutés imperméants chargés que le fluide extracellulaire, il existe une différence de pression colloïdo-osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, qui pousse les petits solutés, les ions et l'eau vers l'intérieur de la cellule. Comme la membrane plasmique des cellules animales est facilement étirable et ne peut résister à un gradient de pression hydrostatique, il existe une nécessité de mécanismes qui s'opposent à la tendance des cellules à gonfler. Un modèle pour cette régulation à long terme du volume cellulaire à l'état d'équilibre dynamique (état stable) a été formulé pour la première fois par Davson en 1940 et développé par la suite par Leaf (1956) ; Ussing (1960) et par Tosteson et Hoffman (1960). Selon ce modèle, le maintien du volume cellulaire dépend de la balance entre le fonctionnement des « pompes », qui utilisent l'énergie métabolique pour transporter des solutés contre leur potentiel électrochimique, et les « fuites », résultat de l'activité des échangeurs, des cotransports et des canaux ioniques, par lesquelles les solutés franchissent de façon passive la barrière membranaire dans le sens du gradient électrochimique ([Fig.1.](#)).

Le concept de pompe-fuite (« pump-leak ») est toujours valable, bien qu'il ait été démontré que les voies de fuite passives ainsi que les pompes sont moins statiques que ce qui avait été initialement décrit. En effet, le volume des cellules est maintenu constant non seulement par l'ajustement de la vitesse de transfert des ions *via* les pompes, mais aussi, pour une large part, par des changements dynamiques et contrôlés des différentes voies de fuites (Macknight, 1987 ; Hoffmann et Ussing, 1992).

Aussi, bien que le volume à l'état stable soit déterminé par le contenu en solutés non diffusibles osmotiquement actifs, toute modification des processus de transport des solutés perméants ou de l'osmolarité du milieu extracellulaire modifiera ce volume. Toutefois, bien que la plupart des cellules ne soient jamais confrontées à une quelconque modification de l'osmolarité de leur environnement, celle-ci étant maintenue constante par les mécanismes complexes de l'homéostasie des fluides corporels, les cellules animales peuvent dans certains cas être exposées à des perturbations transitoires de leur environnement physico-chimique intra- ou extracellulaire, lesquelles peuvent influencer le volume d'équilibre

Mise en évidence de l'activation de canaux K^+ lors des processus de RVD

Cellules épithéliales de trachée	Butt <i>et al.</i> , 1990
Globules rouges de lamproie	Virkki et Nikinmaa, 1995
Globules rouges de grenouille	Hamill, 1983
Cellules épithéliales isolées de colon de tortue	Richards et Dawson, 1986
Cellules de tubules proximaux de <i>Necturus</i>	Sackin, 1989
Cellules rénales d'amphibiens en culture (A6)	Banderali et Ehrenfeld, 1996
Globules rouges de <i>Necturus maculosus</i>	Bergeron <i>et al.</i> , 1996

Mise en évidence de l'activation de canaux Cl^- lors des processus de RVD

Myocytes cardiaques	Coulombe et Coraboeuf, 1992 ; Tseng, 1992
Lymphocytes	Lewis <i>et al.</i> , 1993
Oufs de <i>Xenopus laevis</i>	Ackerman <i>et al.</i> , 1994
Cellules de côlon distal de rat	Diener <i>et al.</i> , 1992

Mise en évidence de l'activation de canaux K^+ et Cl^- lors des processus de RVD

Cellules tumorales d'Ehrlich	Hoffmann, 1978
Cellules rénales de chien en culture (MDCK)	Banderali et Roy, 1992
Entérocytes isolés des villosités du jéjunum	MacLeod et Hamilton, 1991
Cellules rénales d'opossum en culture	Uhl <i>et al.</i> , 1988

Mise en évidence de l'activation d'un canal cationique non sélectif lors des processus de RVD

Cellules d'amphibien en culture (A6)	De Smet <i>et al.</i> , 1998
--------------------------------------	------------------------------

Mise en évidence de l'activation d'un cotransport KCl lors des processus de RVD

Globules rouges de canard	MacMannus <i>et al.</i> , 1985
Globules rouges de mouton phénotype LK	Dunham et Ellory 1981
Globules rouges d' <i>Opsanus tau</i>	Lauf, 1982
Globules rouges de truite	Garcia-Romeu <i>et al.</i> , 1991
Hépatocytes de truite	Bianchini <i>et al.</i> , 1988

Mise en évidence de l'activation d'un cotransport KCl et de canaux K^+ lors des processus de RVD

Tubules proximaux isolés de rein de lapin	Beck et Potts, 1990
Cellules tumorales d'Ehrlich	Geck, 1990
Cellules épithéliales de vésicule biliaire	Larson et Spring, 1987
Cellules endothéliales d'aorte de bovin	Perry et O'Neill, 1993

Mise en évidence de l'activation d'échangeurs K^+H^+ et $Cl^-HCO_3^-$ lors des processus de RVD

Globules rouges d' <i>Amphiuma sp.</i>	Cala, 1980
--	------------

Tableau 1 : Liste non exhaustive des différents types cellulaires pour lesquels l'activation de transporteurs spécifiques lors des processus de « RVD » a été mise en évidence.

dynamique. Ces perturbations peuvent également résulter de l'accumulation de solutés organiques ou inorganiques, comme c'est le cas dans les cellules épithéliales lors de l'absorption des solutés, ou de certains stimuli qui peuvent affecter des transporteurs membranaires tels que les hormones, le pH, le potentiel de membrane, ou la messagerie cytoplasmique (pour revue Lang *et al.*, 1998).

Les cellules doivent donc être capables de réguler leur volume à court terme dans ces situations de déséquilibre. Lorsqu'elles sont exposées à un milieu anisosmotique, elles se comportent dans un premier temps comme de parfaits osmomètres, engendrant des variations de volume commandées par les mouvements passifs d'eau, dans le sens du gradient osmotique, à travers la membrane.

Ainsi, lorsque l'osmolarité du milieu diminue, le volume des cellules augmente dans un premier temps, puis les cellules dégonflent par perte d'osmolytes et d'eau osmotiquement liée. Cette diminution régulée du volume après gonflement, appelée RVD (Regulatory Volume Decrease), permet un retour complet ou quasi complet du volume à ce qu'il était avant perturbation anisosmotique. De même, lorsque l'osmolarité du milieu extracellulaire augmente et devient hyperosmotique, par rapport aux conditions isotoniques initiales, les cellules voient leur volume diminuer (« shrinkage ») puis, pour la majorité d'entre elles, un retour progressif au volume isotonique se met en place grâce à un gain de solutés et une entrée concomitante d'eau osmotiquement liée. Ce processus d'augmentation régulée du volume est appelé RVI (Regulatory Volume Increase). Cependant, si la grande majorité des cellules est capable de réguler son volume après gonflement cellulaire, de nombreux types cellulaires sont incapables de faire face à une diminution de volume ou ne peuvent le faire que dans des conditions expérimentales particulières (pour revue Hoffmann et Dunham, 1995).

Lors d'une stimulation hypotonique, les cellules de vertébrés régulent leur volume par perte d'osmolytes inorganiques tels que le K^+ , Cl^- , HCO_3^- , alors que les cellules d'invertébrés et des procaryotes procèdent généralement par une fuite d'osmolytes

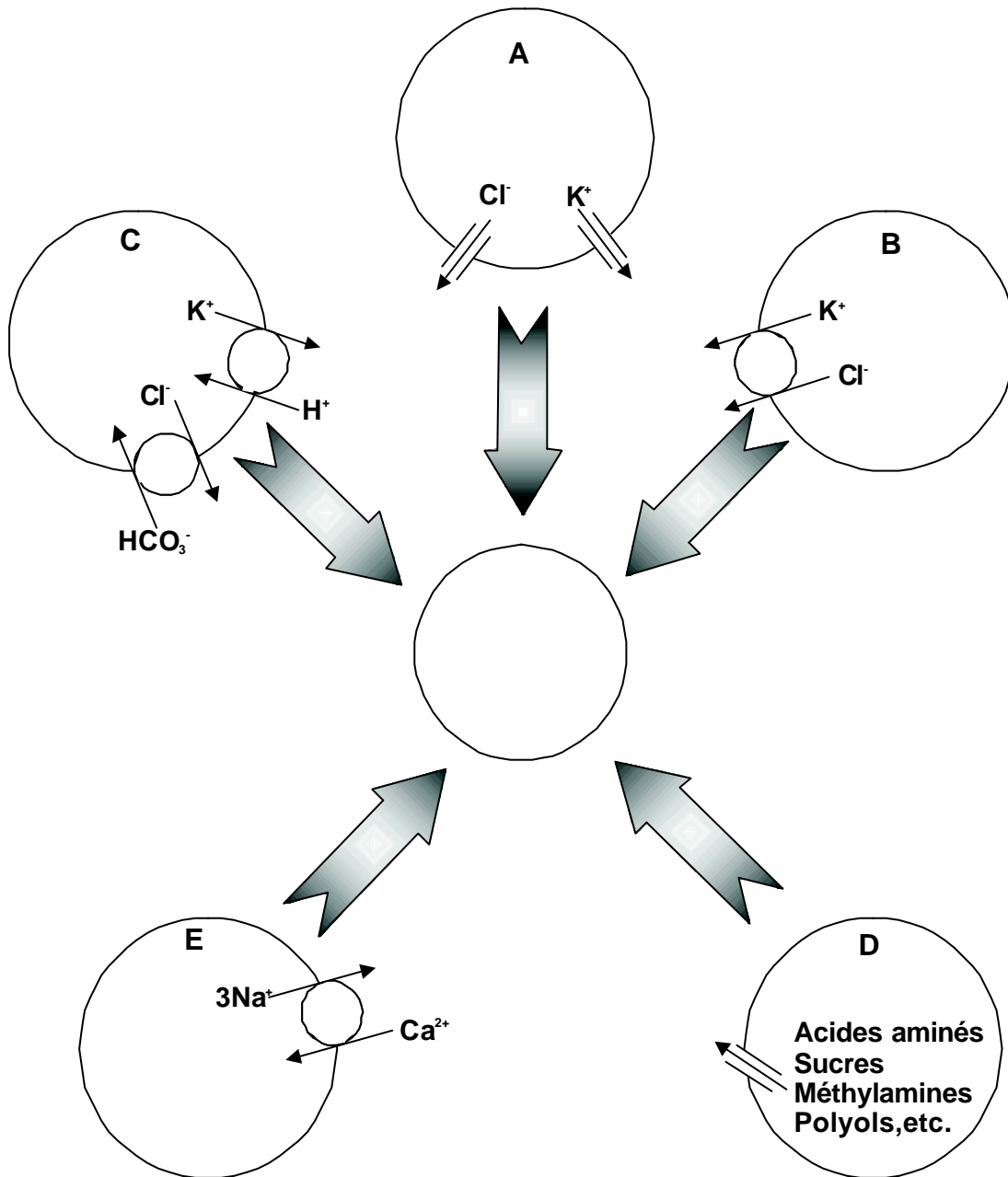


Figure 2 : Transporteurs membranaires permettant d'accomplir les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique.

A : sortie indépendante de K^+ et de Cl^- par des canaux ioniques. **B** : sortie dépendante de K^+ et de Cl^- par un cotransport KCl. **C** : sortie couplée de manière fonctionnelle de K^+ et de Cl^- par activation parallèle d'échangeurs K^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^- . **D** : sortie de solutés organiques. **E** : sortie de Na^+ par l'échangeur $3Na^+/Ca^{2+}$ (cas des cellules de mammifères carnivores, riches en Na^+).

organiques, tels qu'acides aminés (taurine, proline, GABA), méthylamines, sucres, polyols ou urée. Quoique caractéristique des cellules animales du bas de l'échelle évolutive, l'utilisation des acides aminés et notamment de la taurine comme osmolyte effecteur des processus de RVD a pu être observée, non seulement chez les vertébrés inférieurs comme les poissons (Thoared et Fugelli, 1994, Garcia-Romeu *et al.*, 1991 pour revue Kinne, 1993 ; Goldstein et Kleinzeller, 1987), mais aussi dans quelques types cellulaires de mammifères (Roy et Sauvé, 1987 ; Lambert et Hoffmann, 1994 ; Jackson *et al.*, 1994 ; pour revue : Kirk et Strange, 1998). Les études *in vitro* des processus de régulation de volume ont montré que cellules et tissus ont de grandes capacités de régulation de ce volume, mais ces études ont aussi montré que, suivant les types cellulaires étudiés, une grande variété de transporteurs membranaires pouvait être activée lors d'une modification du volume cellulaire.

Selon les types cellulaires, les voies de sortie pour les ions K^+ et Cl^- peuvent être découplées *via* l'activation de voies de conductance Cl^- et K^+ indépendantes, couplées par un cotransport KCl ou indépendantes mais couplées de manière fonctionnelle par l'activation concomitante d'échangeurs électroneutres K^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^- ([Tab. 1.](#) ; [Fig.2.](#)).

De plus, la famille des canaux mécanosensibles émerge dans la littérature comme étant fondamentale dans les processus de régulation de volume (pour revue Morris, 1990 ; Sackin, 1995). Ces canaux sont activés par déformation de la membrane et, selon le cas, peuvent être sélectifs pour le potassium, le Cl^- ou être non sélectifs pour les cations. Aussi, si les canaux mécanosensibles sélectifs pour le Cl^- ou le K^+ peuvent servir de voie d'efflux directe pour les ions durant les processus de RVD, les canaux cationiques non sélectifs activés par étirement membranaire permettraient une entrée de calcium, qui jouerait alors le rôle de second messenger cellulaire en activant divers processus de la messagerie intracellulaire. En effet, la plupart de ces canaux cationiques non sélectifs mécanosensibles présentent une perméabilité non négligeable pour le calcium, qui en entrant dans la cellule peut permettre la transduction du signal mécanique (gonflement) en message de régulation des transporteurs passifs effecteurs des processus de régulation de volume. Lorsqu'ils sont

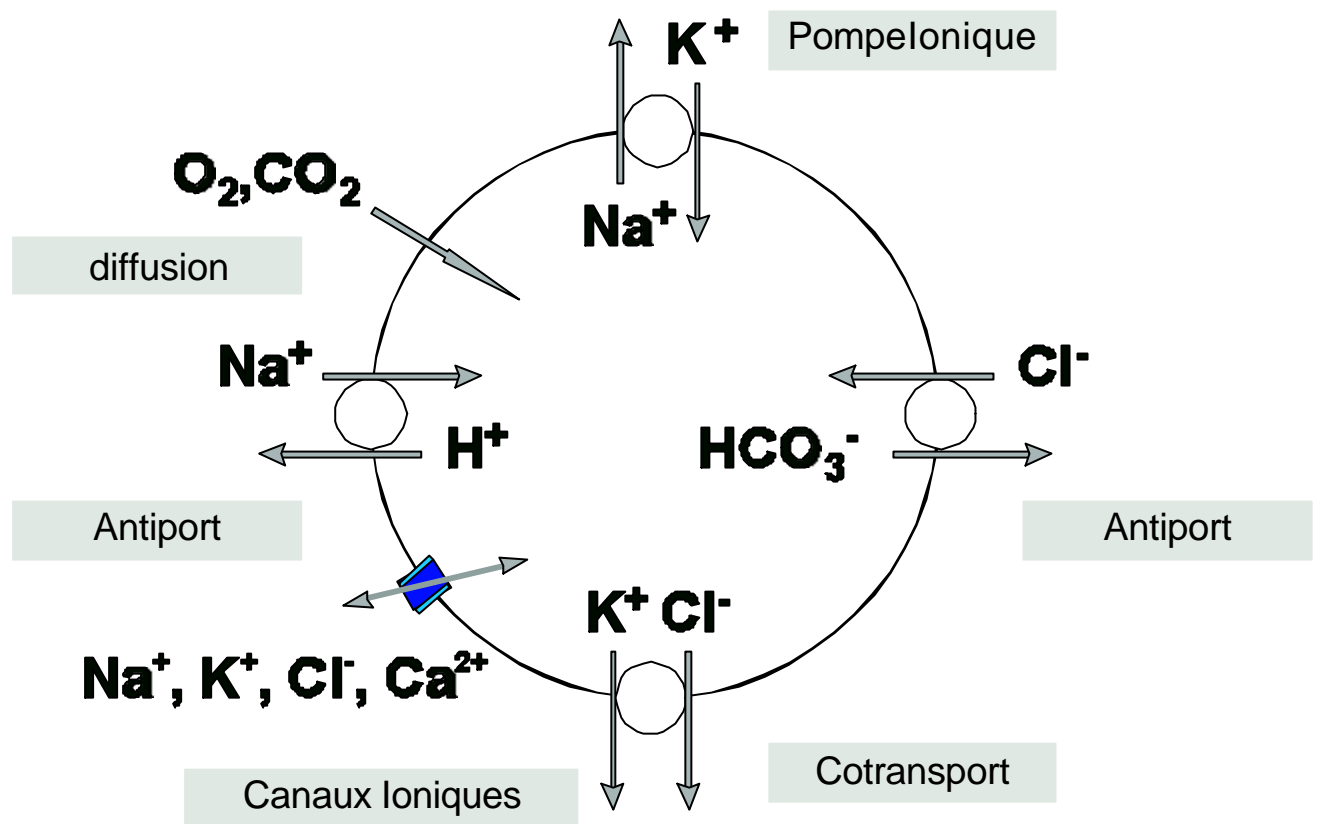


Figure 3 Représentation schématique des processus de diffusion et de transport pour les gaz et les ions inorganiques à travers la membrane des globules rouges.

activés, de tels canaux permettent toutefois non seulement les efflux de K^+ , mais également un influx de sodium, ce qui pose la question de l'efficacité d'un tel système (Sackin, 1995).

Cellules relativement simples, faciles à se procurer et permettant l'obtention de suspensions cellulaires relativement homogènes (Cossins et Gibson, 1997), les globules rouges de vertébrés ont été particulièrement importants pour caractériser cette réponse homéostatique de la régulation du volume cellulaire. Malgré cette simplicité, il apparaît qu'une surprenante variété de voies de transport membranaire est à l'œuvre dans ces cellules pour assurer le contrôle du volume cellulaire. Ces voies de transport peuvent en outre être modulées par d'autres stimuli physiologiques, tels que les stimulations hormonales ou la pression partielle en oxygène, la principale fonction physiologique des globules rouges de vertébrés étant en effet le transport de l'oxygène (O_2) et du dioxyde de carbone (CO_2). Toutefois, tandis que l' O_2 et le CO_2 sont capables de traverser la membrane cellulaire par un processus de solubilité/diffusion dicté par leur gradient de pression partielle, les substances organiques et inorganiques qui influencent l'état acide-base de la cellule diffusent très lentement à travers la bicouche lipidique et doivent de plus suivre des voies de transport spécifiques ([Fig.3.](#)).

Les érythrocytes de nombreuses espèces possèdent un cotransport KCl activé par le gonflement cellulaire (pour revue Lauf *et al.*, 1992 ; Cossins et Gibson, 1997), qui est caractérisé chez les mammifères par un haut degré de sélectivité ionique. En effet, ce transporteur membranaire permet le transport du K^+ mais non du Na^+ et transporte le Cl^- , le Brome (Br^-) mais non l'iode (I^-) ni les nitrates (NO_3^-) (Ellory et Hall, 1988 ; Lauf 1988). Il est de plus susceptible d'être activé à l'isotonie par le N-éthylmaleimide (NEM), un réactif des résidus sulfhydryl ($-SH$) des protéines membranaires.

Toutefois, les érythrocytes de la salamandre *Amphiuma sp.* régulent leur volume cellulaire après gonflement par l'activation d'un antiport K^+/H^+ , qui opère en parallèle avec l'échangeur Cl^-/HCO_3^- afin de fournir un efflux net de KCl ([Tab. 1.](#)) (Cala, 1980 ; Cala *et al.*, 1986 ; Maldonado et Cala, 1994). En revanche, les érythrocytes de la salamandre *Necturus*

maculosus (Bergeron *et al.*, 1996 , Light *et al.*, 1997) ainsi que ceux de la lamproie *Lampetra fluviatilis* (Virkki et Nikinmaa, 1995 ; 1998) ou ceux de la grenouille (Hamill, 1983) procèdent par l'activation d'une voie de conductance potassique et d'une voie de conductance Cl⁻ afin de réguler leur volume après gonflement ([Tab. 1.](#)).

Les érythrocytes de poissons ont quant à eux prouvé qu'ils étaient des modèles utiles pour cet aspect des processus de régulation de volume. En effet, les études portant sur le gonflement osmotique des érythrocytes de nombreuses espèces de poissons ont montré que les processus de RVD résultaient d'un efflux de KCl (Lauf, 1982 ; Bourne et Cossins, 1984 ; Dickman et Goldstein, 1990 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Nonnotte et Truchot, 1992 ; Jensen, 1995 ; Bursell et Kirk, 1996), ainsi que d'une perte de taurine (Fincham *et al.*, 1987 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Goldstein et Brill, 1991 ; Thoared et Fugelli, 1994, Lewis *et al.*, 1996).

De plus, les érythrocytes de truite présentent la particularité de subir un gonflement sous deux conditions physiologiques différentes, c'est-à-dire lors d'une diminution de l'osmolarité du milieu extracellulaire ou lors d'une stimulation hormonale.

En effet, lors d'une stimulation β -adrénergique *in vivo* (Thomas, 1982 ; Nikinmaa, 1982) ou *in vitro* (Bourne et Cossins, 1982 ; Baroin *et al.*, 1984), les globules rouges de truite gonflent sous l'action d'une augmentation brutale de la perméabilité membranaire au sodium. Cette entrée de sodium déclenchée à l'isotonie par les catécholamines se fait par un échangeur Na⁺/H⁺ normalement silencieux (Baroin *et al.*, 1984 ; Cossins et Richardson, 1985 ; Borgese *et al.*, 1986). Le rôle de l'antiport Na⁺/H⁺ de l'érythrocyte de truite diffère des fonctions qui lui sont généralement attribuées dans les autres types cellulaires, puisque ce transporteur est généralement impliqué dans les processus de régulation du volume cellulaire après diminution du volume (RVI) (Demaurex et Grinstein, 1994) ou dans les processus de régulation du pH intracellulaire. Dans les globules rouges de truite, cet antiport est peu ou pas stimulé lors d'une diminution du volume cellulaire (Gallardo-Romero *et al.*, 1995) ni lorsque le milieu intracellulaire s'acidifie (Malapert *et al.*, 1997). L'antiport Na⁺/H⁺ serait impliqué dans les adaptations des truites à l'hypoxie (Fiévet *et al.*, 1987 ; Fiévet et

Motais, 1991). En effet, un stress hypoxique provoque chez l'animal (*in vivo*) une libération de catécholamines qui active l'échangeur Na^+/H^+ (Fiévet *et al.*, 1987, 1988 ; Thomas *et al.*, 1988). Cette activation brutale provoque une alcalinisation intracellulaire, non perçue dans un premier temps par l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, qui induit une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l' O_2 , par effet Bohr (Claireaux *et al.*, 1988 ; Cossins et Richardson, 1985). Aussi, après activation de la bande 3 (échange d'un ion OH^- ou d'un ion HCO_3^- intracellulaire contre un ion Cl^- extracellulaire) due à l'alcalinisation intracellulaire il en résulte une entrée nette de NaCl et d'eau osmotiquement liée et donc un gonflement à l'isotonie. Cette augmentation de volume est alors régulée par une perte de KCl strictement couplée (voie de sortie Cl^- -dépendante des ions K^+) (Borgese *et al.*, 1987). Cet efflux de K^+ n'intervient en effet qu'en présence de Cl^- dans le milieu extracellulaire et est inactif lorsque le Cl^- est remplacé par du NO_3^- ou du SCN^- (Borgese *et al.*, 1987). En relation avec les données obtenues sur les mammifères (Dunham et Ellory, 1981), ce transport Cl^- -dépendant de K^+ a été identifié comme un cotransport KCl (Borgese *et al.*, 1987 ; Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993). Ce cotransport KCl est inhibé par le furosémide et les inhibiteurs de la bande 3 que sont le DIDS, le SITS et l'acide niflumique (Borgese *et al.*, 1987).

En revanche, lorsque les érythrocytes de poissons et notamment ceux de truite sont soumis à des conditions de gonflement, la régulation de volume qui s'en suit se fait par perte de KCl (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Nonnotte et Truchot, 1992 ; Bursell et Kirk, 1996 ; Jensen, 1995) et d'osmolytes organiques tels que la taurine (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Jensen, 1995 ; Kirk *et al.*, 1992, Lewis *et al.*, 1996). De plus, une entrée nette de sodium est également observée, et la membrane devient alors perméable à certains cations organiques tels que la choline (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Toutefois, l'efflux de K^+ est dans ce cas peu ou pas affecté par le remplacement du chlore extracellulaire par du NO_3^- . Cette voie de sortie pour le potassium est alors qualifiée de sortie de Cl^- -indépendante (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Nonnotte et Truchot, 1992 ; Jensen, 1995 ; Bursell et Kirk, 1996). Comme le flux Cl^- -dépendant de K^+ , cet efflux de Cl^-

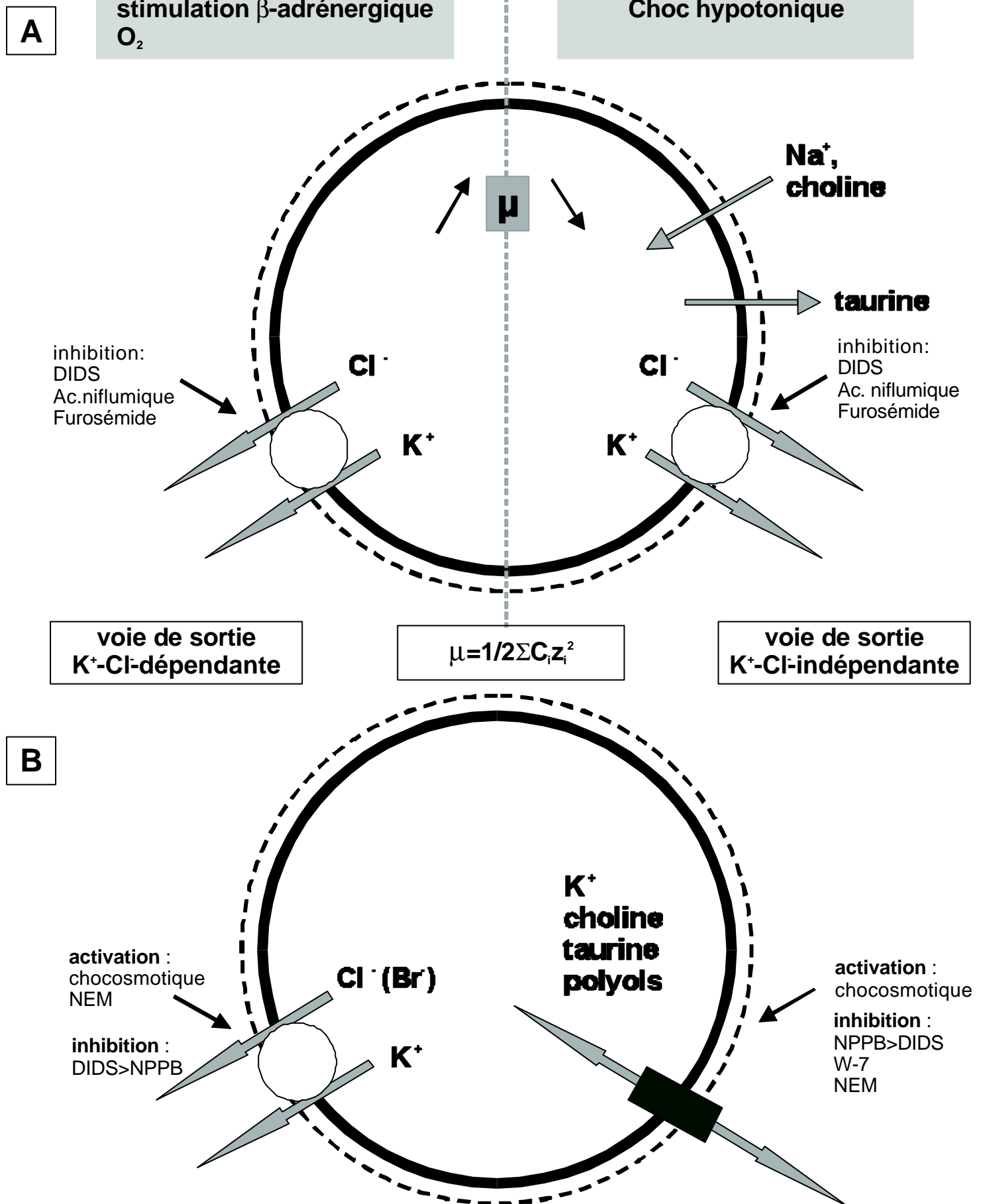


Figure 4 : Transporteurs membranaires permettant d'accomplir les processus de RVD faisant suite à un gonflement dans les érythrocytes de poissons.

A : Activation des voies de sortie de K^+ - Cl^- -dépendante et K^+ - Cl^- -indépendante en fonction du mode de gonflement. μ est la force ionique du cytoplasme.

B : Modèle pour les voies de sortie de K^+ - Cl^- -dépendante et K^+ - Cl^- -indépendante proposé pour les érythrocytes d'anguille d'après Bursell et Kirk (1996).

indépendant K^+ est également inhibé par les inhibiteurs de la bande 3 et le furosémide (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993).

Le flux de Cl^- -dépendant K^+ de l'érythrocyte de truite est désactivé à faible pression partielle d' O_2 (Borgese *et al.*, 1991, Nielsen *et al.*, 1992, Cossins *et al.*, 1994), et, dans ce cas, il n'est pas activé par un gonflement hypotonique. En revanche, ce même flux Cl^- -dépendant de K^+ est activé par une augmentation de la pression partielle d' O_2 et peut dans ce cas devenir sensible aux variations de volume induites par une diminution de l'osmolarité extracellulaire (Nielsen *et al.*, 1992 ; Berenbrink *et al.*, 1997, pour revue : Cossins et Gibson, 1997). Aussi, dans le but de définir un point commun entre ces deux types de régulation Motais *et al.* (1991) ont suggéré que la force ionique interne pourrait être le facteur clé ([Fig. 4. A.](#)). Selon cette hypothèse, la voie Cl^- -indépendante serait sélectionnée lorsque la force ionique intracellulaire diminue (cas d'un choc hypotonique), tandis que lorsque la force ionique interne est peu ou pas modifiée (cas d'un gonflement isosmotique par stimulation hormonale), la voie Cl^- -dépendante serait activée (Motais *et al.*, 1991). Dans les deux cas, le K^+ et le Cl^- utiliseraient le même transporteur membranaire, un cotransport K^+ -anion, dont la sélectivité anionique serait dictée par l'état ionique intracellulaire et le degré d'oxygénation de l'hémoglobine. Des études récentes tendent cependant à montrer que les mécanismes de régulation et d'activation des transporteurs sont plus complexes. En effet, si le flux de Cl^- -dépendant K^+ participe vraisemblablement aux processus de régulation de volume (Berenbrink *et al.*, 1997 ; Bursell et Kirk, 1996), le cotransport KCl pouvant même utiliser le NO_3^- comme substrat anionique accompagnateur lorsque la tonicité du milieu est diminuée à des valeurs extrêmes (Berenbrink *et al.*, 1997), la voie Cl^- -indépendante semble pharmacologiquement différente de la voie de transport de K^+ par le cotransport KCl (Bursell et Kirk, 1996). Ces derniers auteurs suggèrent en effet que la voie de sortie Cl^- -indépendante de K^+ qui est sensible aux inhibiteurs anioniques (tels que le NPPB ou DIDS) est indissociable de la voie de transport de solutés organiques activés lors d'un choc hypotonique dans les érythrocytes de poissons ([Fig. 4. B.](#)). Le transporteur présenterait alors des caractéristiques communes avec un canal anionique (Kirk *et al.*, 1992), dont la

sélectivité pour les substrats organiques activerait des interactions de type hydrophobe avec le canal (Kirk *et al.*, 1992). De plus, les courbes dose-réponse établies à partir de l'inhibition des flux d'osmolytes organiques ainsi que de potassium, en présence des inhibiteurs anioniques, présentent les mêmes caractéristiques de sensibilité vis-à-vis de ces agonistes (Bursell et Kirk, 1996 ; Lewis *et al.*, 1996), ce qui suggère que le flux de ces différents solutés pourrait être assuré par un seul et même transporteur, dont la sélectivité anionique et cationique serait assez faible (Bursell et Kirk, 1996). Cependant, le fait que les inhibiteurs de ces flux potassiques et de taurine osmotiquement activés soient les mêmes que ceux de la bande 3 a conduit différents auteurs à suggérer un rôle direct ou indirect de la bande 3.

En effet, la similarité de la sensibilité au DIDS des efflux de K^+ , de taurine et des influx de choline et de Na^+ activés par le gonflement hypotonique laisse supposer que les transporteurs impliqués sont sous la dépendance d'une unique protéine membranaire qui serait la bande 3 (Garcia-Romeu *et al.* 1991). Cette hypothèse est confortée par le fait que la bande 3 est directement reliée non seulement au cytosquelette, mais également à l'hémoglobine (Borgese *et al.*, 1987 ; Chetrite et Cassoly, 1985 ; Jensen, 1992), suggérant que la bande 3 pourrait agir comme détecteur et activateur des processus sous-jacents d'activation des transporteurs par l' O_2 *per se*, en percevant les changements de conformation de l'hémoglobine entre les états tendus et relâchés .

Toutefois, cette protéine pourrait également être directement impliquée dans les transports de solutés et notamment de taurine. En effet, la fonction canalaire de la bande 3 pourrait résulter de sa capacité à former des structures ressemblant à des canaux lorsque plusieurs monomères sont regroupés, et il a été observé que l'augmentation de volume des érythrocytes des sélaciens provoquait la formation de tétramères de bande 3 (Musch *et al.*, 1994). Une évaluation directe de cette hypothèse a été menée en comparant les propriétés fonctionnelles de l'échangeur Cl^-/HCO_3^- de truite et de souris dans l'œuf de Xénope. Lorsque la bande 3 de truite (tAE1) est exprimée dans l'œuf de xénope, elle se comporte comme une protéine bifonctionnelle permettant l'échange Cl^-/Cl^- , mais aussi le passage de taurine. Cette expression engendre l'apparition d'un courant généré par les ions Cl^- , corrélé de manière

non linéaire à la quantité de protéine exprimée. Les relations courant-voltage sont alors linéaires. L'expression de la bande 3 de souris, si elle permet d'induire une activité d'échange Cl^-/Cl^- , n'induit en revanche aucun courant Cl^- ni de passage de taurine. Ces observations suggèrent un rôle important de la bande 3 (Fiévet *et al.*, 1995). Toutefois, la question de l'action directe de la bande 3 sur les processus de RVD comme effecteur ou modulateur des processus reste en partie posée. Lors de ces expériences, l'efflux de taurine ainsi que les courants générés par le Cl^- sont en effet insensibles au DIDS, alors que celui-ci est un puissant inhibiteur de la bande 3 de poisson *in situ*. En revanche, ce flux de taurine, est inhibé par d'autres inhibiteurs anioniques tels que l'acide niflumique ou le NPPB. De plus, alors que seule la diminution de l'osmolarité extracellulaire permet l'activation de l'efflux de taurine dans l'érythrocyte de truite (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motaïs *et al.*, 1991), les flux de taurine générés par l'expression de la bande 3 de truite dans l'œuf de xénope ne s'expriment qu'en conditions isotoniques. L'exposition des œufs à des conditions hypotoniques n'induit en effet aucune modification du flux de taurine à travers la membrane, ni d'augmentation du courant chlore généré par l'expression de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

Le délai d'activation du cotransport KCl après gonflement et les effets variés des inhibiteurs des protéines kinases et phosphatases sont également source d'interrogation quant au rôle possible des phosphorylations dans l'activation et la désactivation du cotransport KCl et des autres transporteurs membranaires. En effet, si les inhibiteurs des protéines kinases sont de puissants activateurs du cotransport KCl (Cossins *et al.*, 1994 ; Jennings et Schulz., 1991), ces mêmes inhibiteurs s'avèrent être de puissants inhibiteurs de la voie de sortie d'osmolytes organiques activée par le gonflement hypotonique (Kießling *et al.*, 1997). Il apparaît que peu de choses sont connues sur la nature moléculaire de la voie de transport de K^+ activée par le choc osmotique Cl^- -indépendante, et il est tout à fait envisageable que les voies de sortie dites indépendantes soient de nature conductive.

La coexistence dans un même type cellulaire de cotransports électroneutres KCl et de canaux ioniques activés par choc osmotiques a pu en effet être démontrée, notamment dans les cellules tumorales d'Ehrlich dans certaines conditions physiologiques de pH (Geck,

1990), dans les cellules épithéliales de vésicule biliaire de *Necturus sp.* (Larson et Spring, 1987), dans les cellules endothéliales d'aorte de bovin (Perry et O'Neill, 1993) ou dans les tubules proximaux de rein de lapin (Beck et Potts, 1990).

Le travail présenté dans ce mémoire a eu pour objectif de démontrer l'existence de voies de conductance dans la membrane des érythrocytes nucléés de truite à l'aide de différentes approches électrophysiologiques. Dans un premier temps, une approche globale par la technique du «patch-clamp» en configuration «whole-cell» a été utilisée afin de déterminer la nature des ions générant les courants membranaires. Dans un deuxième temps, la mesure de l'activité isolée des canaux en configurations «cell-attached» et «inside-out» a permis de caractériser la nature des canaux responsables des courants membranaires globaux. Enfin, il convenait de déterminer quelle pouvait être l'implication des voies de conductance décrites par la technique de «patch-clamp» dans les processus de régulation de volume lorsque les cellules sont soumises à des conditions hypotoniques. Cette dernière approche a été réalisée en utilisant non seulement les techniques électrophysiologiques mais également des mesures de volume, de flux isotopiques et de l'évolution du contenu en ions des cellules lors de chocs hypotoniques.

	Ringer Cl ⁻ isotonique	Ringer Cl ⁻ hypotonique	Ringer NO ₃ ⁻ isotonique	Ringer NO ₃ ⁻ hypotonique	Ringer MeSF isotonique	Ringer MeSF hypotonique
NaCl	145	72.5			-	-
KCl	5	5			-	-
CaCl ₂	1.4	1.4			-	-
MgSO ₄	1	1	1	1	1	1
Hepes	15	15	15	15	15	15
D-Glucose	5	5	5	5	5	5
CaSO ₄	-	-	1.4	1.4	1.4	1.4
NaNO ₃	-	-	145	72.5		
KNO ₃	-	-	5	5		
MeSF Na ⁺	-	-			145	72.5
MeSF K ⁺	-	-			5	5
pH	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90
Osmolarité	320	215	320	215	320	215

Tableau 2. : Composition des solutions (mM) utilisées lors des expériences de régulation de volume (Rapport eau sur poids sec, fragilité osmotique, mesure de contenu en potassium et flux isotopiques)

Matériels et méthodes

1. Préparation du matériel biologique.

Les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) utilisées lors de cette étude proviennent de deux sources distinctes en fonction du protocole d'étude mis en œuvre.

- d'une pisciculture commerciale pour les poissons de 0.9 à 1.2 kg
- de la Salmoniculture Expérimentale du Drennec INRA (SEDI) pour les poissons de 0.1 kg.

Avant le début des expériences, les poissons sont maintenus une semaine au moins dans des aquariums en circulation semi-ouverte, dans une eau largement aérée. Les animaux sont nourris quotidiennement, à raison de 40g / kg de poids frais.

Le sang est obtenu par venipuncture caudale à l'aide d'une seringue au préalable héparinée (1mg.ml^{-1}). Les globules rouges et le plasma sont immédiatement séparés par centrifugation (3 mins, 1000 g). La suspension de globules rouges est ensuite rincée à trois reprises (3 mins, 2000 tr.mins⁻¹) à l'aide d'une solution saline de Ringer Cl⁻ oxygénée (**Tab. 2.**). Les érythrocytes sont alors incubés durant une nuit à 5°C, à 30 % d'hématocrite sans mélange, ceci afin d'assurer un contenu en eau et en ions normal avant les expériences (Bourne et Cossins, 1984 ; Nielsen, *et al.* 1992). Avant toute expérience, les globules rouges sont à nouveau rincés trois fois avec une solution saline Ringer Cl⁻ (320 mOsm, **Tab. 2.**).

2. Mesure du contenu en eau (méthode du rapport eau sur poids sec).

Après 12 heures à 5 °C, les globules rouges sont rincés trois fois à l'aide de l'une des solutions salines isotoniques correspondant à l'expérience (Ringer chlore, Ringer nitrate ou

Ringer methysulfonate, MeSF). L'ensemble des solutions utilisées est filtré à 0.2 μm (filtre 0.2 μm en cellulose, Millipore, France). La suspension de globules rouges, à un hématocrite de 30 %, est ensuite mise en équilibre avec l'air durant une période de 30 minutes avant le début des expériences.

Après équilibration à l'air, les globules rouges en suspension sont transférés dans les tubes expérimentaux. Pour soumettre les globules rouges à un choc hyposmotique (215 mOsm) et suivre les variations du contenu en eau des cellules, comme indicateur du volume cellulaire (Garcia-Romeu *et al.*, 1991), le protocole suivant a été utilisé pour l'ensemble des expériences.

Une partie de la suspension de globules rouges est utilisée comme témoins, c'est-à-dire :

- témoin hypotonique, lot de cellules soumises à un choc hypotonique sans ajout de drogue,
- témoin isotonique, lot de cellules maintenues en isotonie sans ajout de drogue.

Quelle que soit la drogue employée, une partie de la suspension d'érythrocytes est utilisée comme contrôle, c'est-à-dire un lot de cellules soumises à un « choc » isotonique avec ajout de drogue, à la même concentration que celle utilisée durant l'expérience.

Le choc hypotonique est réalisé par dilution de moitié de la solution de globules rouges placés en isotonie par une solution ne contenant pas de chlorure de sodium (64 mOsm, osmolarité finale 215 mOsm, **Tab. 2.**). Aussi, les lots de cellules servant de contrôles isotoniques subissent également une dilution de moitié par ajout de solution isotonique correspondante. Lorsque l'effet des différentes drogues est testé, les globules rouges sont incubés 10 minutes en isotonie en présence de l'inhibiteur, la concentration finale en drogue étant maintenue constante au moment du choc osmotique. Lorsque la drogue utilisée nécessite une préparation dans un solvant organique (éthanol ou DMSO), la concentration finale en solvant n'excède pas 0.025% vol/vol.

Pendant toute la durée des expériences, les suspensions de globules rouges sont agitées, et les expériences conduites à une température de 15 °C.

Trois échantillons de sang sont prélevés à intervalle régulier (t= 5 , 60 120 et 180 mins) et placés dans des tubes en plastiques de 400 µl (type Beckman, Polylabo, France). Après centrifugation (7 mins, 20000 g), le culot de globules rouges est séparé du surnageant en coupant le tube. Chaque cône ainsi obtenu est pesé sur une feuille de papier aluminium, elle-même pesée au préalable, le tout constituant ainsi le poids humide. L'ensemble culot+papier aluminium est alors séché à 90 °C pendant 24 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant, puis pesé à nouveau, ce qui permet de déterminer le poids sec, après pesée du cône plastique. Le contenu en eau (Rapport Eau sur Poids Sec : REPS) est alors obtenu avec l'équation 1 :

$$(1) \text{ REPS} = \frac{(\text{poids.humide} - \text{poids.cône}) - (\text{poids.sec} - \text{poids.cône})}{(\text{poids.sec} - \text{poids.cône})}$$

Le Rapport Eau sur Poids Sec est exprimé en g d'eau/g de matière sèche

3. Mesure du contenu en potassium des cellules.

Lorsqu'une mesure du contenu en potassium est effectuée en parallèle à la mesure du contenu en eau, deux réplicats supplémentaires sont prélevés aux mêmes intervalles de temps que lors de la mesure du rapport eau sur poids sec, centrifugés et pesés. Les culots de sang frais sont alors dissouts dans 5 ml d'une solution de lithium à 15 mEq.l⁻¹. Après dissolution complète du culot de globules rouges, 100 µl d'acide perchlorique sont ajoutés à la suspension, afin de précipiter les protéines. Après centrifugation (45 mins, 20000g), le surnageant est conservé pour l'analyse du contenu en cations (potassium). La mesure du

contenu en cations est effectuée à l'aide d'un photomètre de flamme (IL 243 -05, Instrumentation Laboratory, France). Le contenu en potassium est exprimé en $\mu\text{mole/g}$ de poids sec de globule et est donné par l'équation suivante :

$$(2) \quad K^+ = \frac{[K^+]_i * 0.0005 V_o}{100 P_s} 10^6$$

avec $[K^+]_i$, concentration mesurée après dilution, V_o volume de dilution, P_s poids sec calculé à partir du rapport eau sur poids sec déterminé sur le même lot d'échantillons et du poids humide de l'échantillon analysé.

Que ce soit pour la mesure du rapport eau sur poids sec ou pour la mesure du contenu en cations, aucune correction n'a été apportée quant à la quantité de fluide susceptible d'être piégée après centrifugation.

Lorsque le contenu en ions et les rapports eau sur poids sec sont mesurés sur les mêmes lots expérimentaux, ceux-ci contiennent de la ouabaïne ($100 \mu\text{M}$) en plus de la drogue utilisée, afin de s'affranchir de tout artefact dû à l'activité de la pompe Na/K ATPase. De plus, il convient de remarquer que l'addition de ouabaïne ne modifie pas le rapport eau sur poids sec des cellules, que ce soit à l'isotonie ou lors d'une stimulation hypotonique (Garcia-Romeu *et al.*, 1991).

4. Mesure de flux isotopiques.

Des mesures de flux isotopiques (influx de potassium) ont été réalisées afin de déterminer le flux de potassium à travers la membrane au cours du temps, suite à un choc hyposmotique. La mesure a été effectuée en influx, car la cinétique de l'influx de potassium est similaire à celle de l'efflux (Bourne et Cossins, 1984).

La suspension cellulaire (2 à 7 ml, 25 -30% d'hématocrite) est incubée dans des tonomètres (Eschweiler) à une température de 15 °C et équilibrée avec un mélange gazeux de 5:95 (vol/vol) air/azote, afin de s'assurer que le volume cellulaire est stable et que le cotransport K-Cl est désactivé. Le mélange gazeux est fourni par des pompes Wösthoff (Bochum) à 15°C et humidifié. 100µM de ouabaïne préparée en solution stock 0.1M dans du DMSO sont ajoutés 15 minutes avant le début des expériences. Les drogues utilisées lors de ces expériences sont ajoutées 10 minutes avant le choc osmotique (215 mOsm).

Le flux (influx) unidirectionnel de potassium est déterminé à 15°C en utilisant le $^{86}\text{Rb}^+$ comme traceur (Amersham International, Angleterre), comme il a été précédemment décrit par Garcia-Romeu *et al.* (1991) et Nielsen *et al.* (1992). Des aliquots (100 µl) de la suspension de cellules prééquilibrés sont prélevés à intervalles réguliers (5, 35, 70, 105 et 140 mins) et placés dans 0.9 ml de solution saline, prééquilibrée avec le même mélange gazeux, donnant ainsi un hématocrite final de 3%. La mesure de l'incorporation de $^{86}\text{Rb}^+$ est initialisée par l'addition de 20 µl de solution saline contenant le $^{86}\text{Rb}^+$ (0.3-0.5 µCi/ml en final). Après 5 minutes, durant lesquelles la suspension est toujours équilibrée avec le même mélange gazeux, trois aliquots sont prélevés et placés dans des tubes Eppendorf. Les aliquots sont rapidement lavés à trois reprises par centrifugation (microcentrifugeuse Eppendorf 5s, 10000 g) avec une solution froide de MgCl_2 /imidazole (100 mM/10mM) pH 7.90, 320 mOsm afin de stopper la réaction d'incorporation du traceur radioactif. Les culots de sang sont ensuite lysés avec 0.5 ml de Triton X 0.05% (vol/vol) et les protéines sont finalement précipitées avec 0.5 ml d'acide trichloroacétique 10% (masse/vol). L'ensemble est précipité par centrifugation (10 mins, 10000 g) et la radioactivité du surnageant est déterminée par comptage Cérenkov. Le taux d'incorporation du $^{86}\text{Rb}^+$ (équivalent à l'influx de K^+ insensible à la ouabaïne) durant la période de 5 minutes est calculé en $\text{mmol K}^+(\text{I paquet de cellules})^{-1}.\text{h}^{-1}$. Chaque valeur est la moyenne \pm l'écart type (SD) de trois réplicats. Le « paquet » de cellules est déterminé à partir de l'hématocrite de la suspension cellulaire.

5. Mesure de la fragilité osmotique.

Un des indices susceptibles d'être employés pour déterminer la capacité d'une cellule à résister à l'hémolyse à la suite d'un choc hyposmotique est de mesurer la fragilité osmotique des cellules. Trois types d'anions ayant été utilisés comme anion prépondérant dans les expériences de mesure de rapport eau sur poids sec, il convenait de déterminer si la substitution du chlore par du nitrate ou du méthylsulfonate induisait une modification de ce paramètre.

La limite de fragilité osmotique (f_o) en solution hypotonique est déterminée par l'osmolarité la plus faible que peuvent subir les érythrocytes sans subir d'hémolyse. La lyse cellulaire est déterminée en observant le décalage de turbidité qui intervient lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est compromise. Ceci est détecté à l'aide d'un spectrophotomètre 10 minutes après que les échantillons (100 μ l) ont été ajoutés aux solutions salines expérimentales (5 ml), aux différentes osmolarités et compositions. Les osmolarités testées sont 320,220,180,150,125,112,105,100,90,80,75,70 mOsm. Les expériences de spectrophotométrie sont conduites à 625 nm, cette longueur d'onde donnant la meilleure différence de densité optique (DO) entre les cellules intactes et les cellules lysées.

Les érythrocytes de poissons étant nucléés, et la lyse des cellules induisant une solution toujours turbide, 1 mM de NaHCO_3 est rajouté. La faible alcalinité produite permet d'éclaircir les solutions sans influencer les résultats expérimentaux (Bergeron *et al.*, 1996). La lyse cellulaire est également confirmée par observation microscopique. Les différentes osmolarités sont obtenues par mélange d'une solution isoosmotique (320 mOsm) avec une solution sans sodium (64 mOsm).

6. Patch-clamp.

6.1. Principe.

La technique du patch-clamp, mise au point par Neher et Sakman en 1976 et décrite par Hamill (Hamill *et al.*, 1981) permet l'enregistrement des sauts de courant transmembranaires survenant lorsque, à potentiel constant, l'état d'un canal ionique se modifie, passant d'un état non-conducteur (état fermé) à un état conducteur (état ouvert). Elle consiste à appliquer une électrode sur la membrane d'une cellule et à appliquer une légère succion afin d'accroître le contact avec la cellule. Il en résulte la formation d'un scellement de quelques gigaOhm (gigaseal), permettant l'isolation électrique du fragment de membrane (patch) ainsi isolé et donc la mesure d'un courant de faible amplitude (de l'ordre du picoAmpère) passant à travers ce canal. Quatre sources d'interactions pipette -membrane sont à l'origine de la formation du « seal » :

- les liaisons ioniques entre les charges positives de la surface membranaire et les charges négatives de la pipette.
- Les liaisons hydrogène entre les atomes d'azote et d'oxygène des phospholipides de la membrane d'une part, et les atomes d'oxygène du verre de la pipette d'autre part.
- Les liaisons possibles, sous forme de pont salins, entre des ions divalents tels que le calcium, les charges négatives du verre et la surface membranaire.
- Les liaisons dues à la force de Van der Waal's qui peuvent se créer compte tenu de la distance qui sépare la pipette de la membrane.

De la qualité du scellement dépend la qualité de l'enregistrement. Plus la résistance de fuite est élevée, moins le bruit de fond est important, et plus le rapport signal/bruit est élevé. Le scellement conditionne donc la qualité de l'isolation électrique du morceau de membrane, la stabilité mécanique du scellement, ainsi que la compartimentation de la préparation.

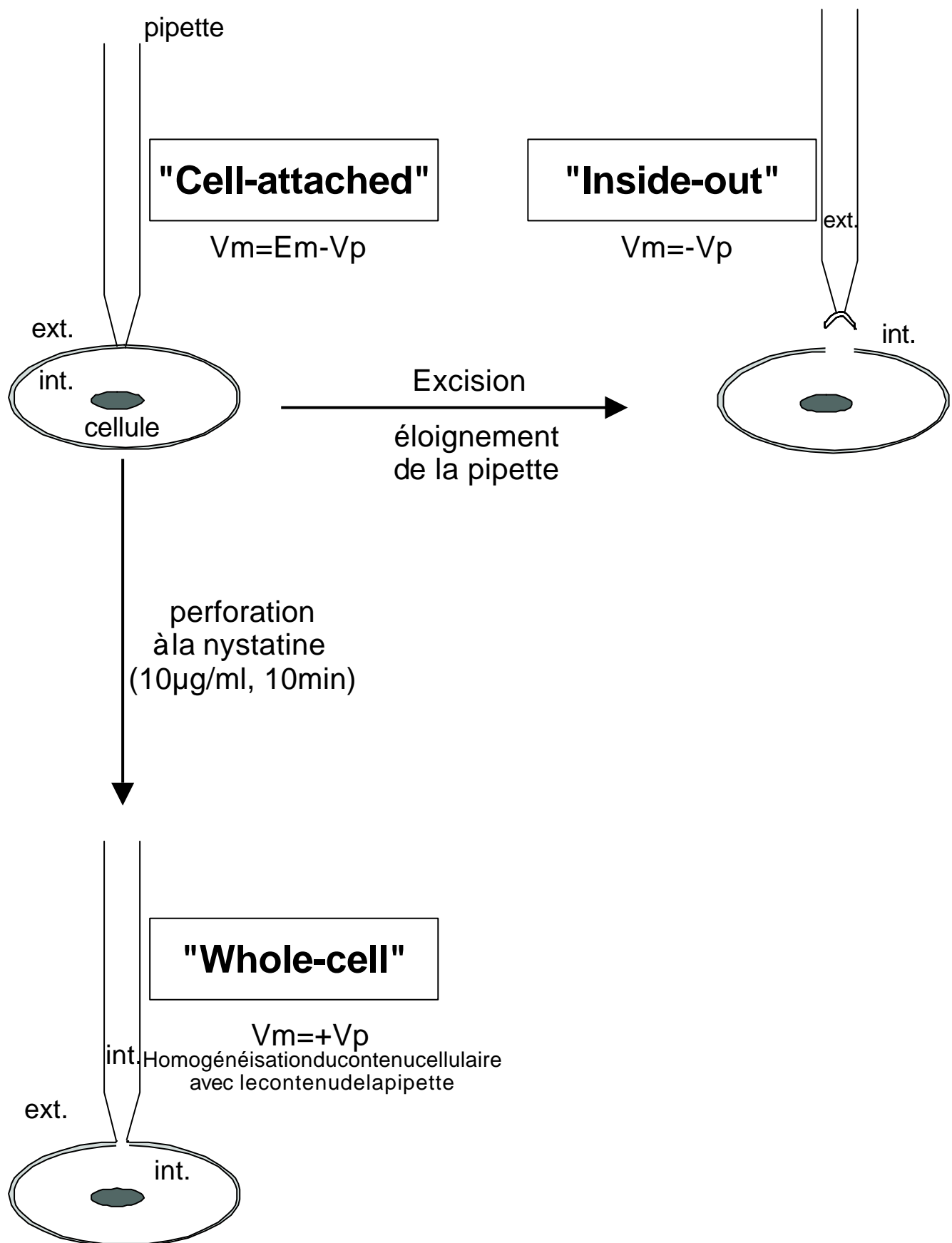


Figure 5 : Schéma des différentes configurations utilisées lors des expériences de « patch-clamp » d'après Hamill et al. (1981).

La formation du « giga seal », entraînant la stabilité mécanique de l'ensemble pipette/cellule, permet différentes approches expérimentales selon quatre configurations membranaires différentes. La membrane forme alors une barrière de diffusion élevée qui isole à chaque fois deux compartiments distincts, aux compositions ioniques et chimiques différentes.

Le mode d'utilisation le plus simple du patch-clamp est la configuration initiale dite du « **cell-attached** » (**Fig. 5.**), obtenue à la suite de la réalisation du « giga-seal ». Pour le morceau de membrane isolé, le milieu extracellulaire se trouve donc être le milieu de remplissage de la pipette. En revanche, le milieu intracellulaire reste quant à lui inchangé. Les courants ioniques passant à travers les canaux peuvent alors être enregistrés dans des conditions relativement physiologiques, l'intégrité de la cellule étant maintenue. Cette configuration permet notamment de connaître les fréquences d'ouverture des canaux au potentiel spontané de repos de la membrane, c'est-à-dire lorsqu'aucun potentiel n'est imposé à la cellule. Toutefois, des dépolarisations ou des hyperpolarisations peuvent être appliquées à la cellule. Le potentiel de membrane de la cellule V_m (en mV) est dans cette configuration défini par l'équation (3)

$$(3) \quad \boxed{V_m = E_m - V_p}$$

E_m : potentiel de membrane spontané de la cellule, en mV

V_p : potentiel appliqué à la pipette, en mV

Cependant, l'utilisation de la configuration « cell-attached » reste limitée puisqu'elle ne permet pas l'addition d'agonistes ou d'inhibiteurs directement sur la face cytoplasmique ou extracellulaire du canal pour en caractériser la pharmacologie. Aussi, après formation du scellement, il peut être pratiqué un retrait de la pipette qui entraîne ainsi le morceau de membrane collé à son extrémité. Dès lors, la face cytosolique de la membrane se retrouve

exposée à la solution de bain, permettant ainsi l'emploi d'agonistes agissant sur la face interne pour la caractérisation du canal, ainsi que l'étude de l'effet de seconds messagers intracellulaires sur le fonctionnement du canal. Dans cette configuration dite « **Inside-out** » (**Fig. 5.**) la valeur du potentiel de membrane V_m est fonction uniquement de la valeur du potentiel imposé à la pipette et est égale à :

$$(4) \quad \boxed{V_m = -V_p}$$

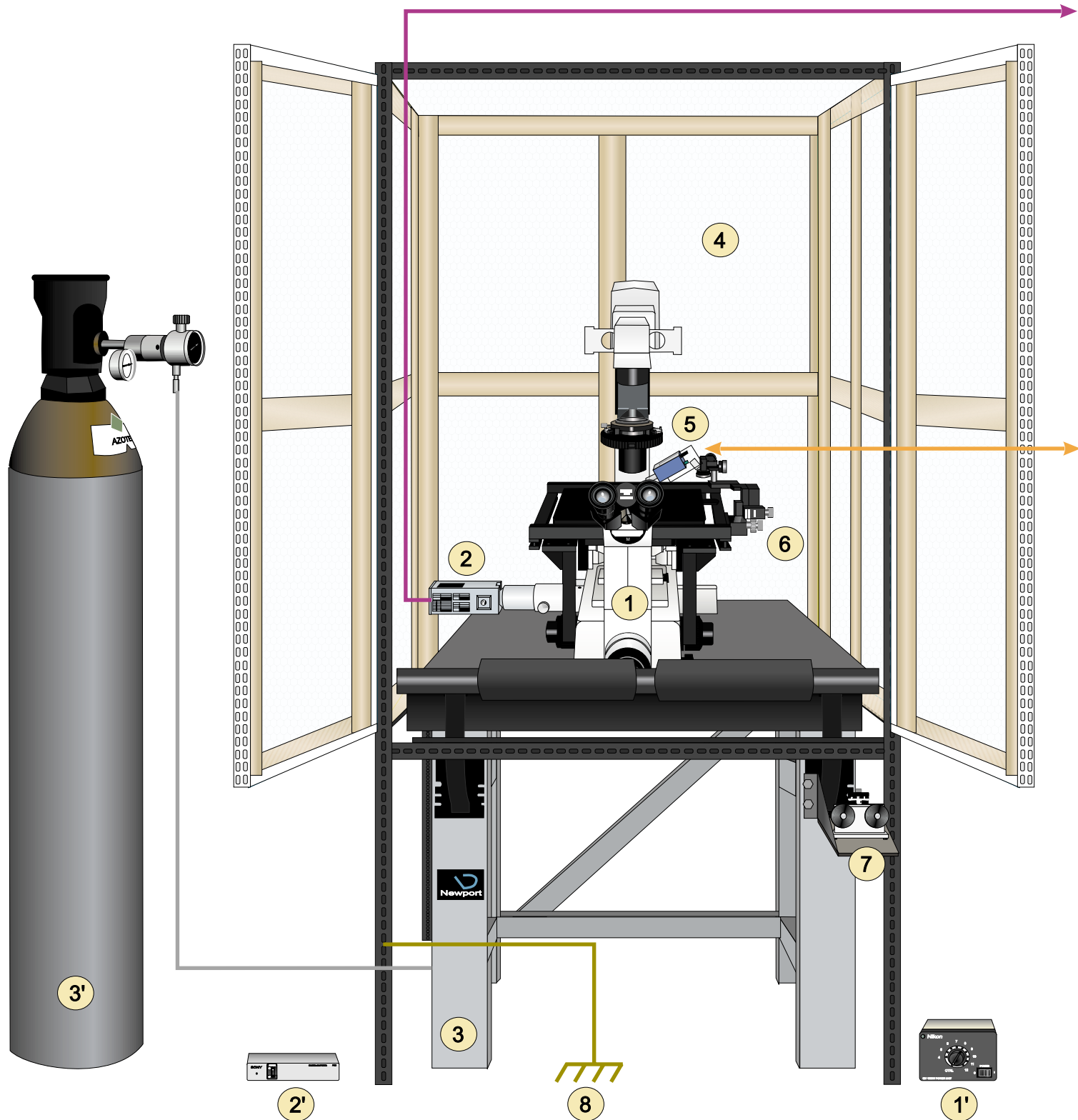
V_p : potentiel appliqué à la pipette, en mV

A partir de la configuration « cell-attached », la configuration « **Whole-cell** » (**Fig. 5.**) est obtenue après une forte aspiration à l'intérieur de la microélectrode, ou en ajoutant à la solution de remplissage de la pipette de la nystatine ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$). La solution remplissant la microélectrode s'équilibre avec le contenu intracellulaire ainsi contrôlé. Dans ce cas, il est possible d'observer l'activité électrique résultant du fonctionnement de la totalité des canaux de la membrane plasmique de la cellule. Le potentiel de membrane V_m est alors égal à :

$$(5) \quad \boxed{V_m = +V_p}$$

V_p : potentiel appliqué à la pipette, en mV

A partir de cette configuration, la configuration dite « **Outside-out** » peut être obtenue en écartant la pipette de la cellule. La face externe du fragment membranaire ainsi reconstitué se retrouve alors en contact avec la solution de bain. Cette dernière configuration n'a pas été utilisée lors de cette étude.



- 1 : Optique - Microscope inversé : Nikon Diaphot 300.
- 1' : Variateur pour l'éclairage.
- 2 : Caméra reliée au moniteur TV.
- 2' : Alimentation extérieure de la caméra.
- 3 : Table antivibration : isolation de tout mouvement extérieur.
- 3' : Bouteille d'azote: gaz utilisé pour la suspension de la table.
- 4 : Cage de Faraday : isolation de tout rayonnement électromagnétique extérieur.
- 5 : Tête de mesure (Headstage) : conversion courant/tension, amplification du signal.
- 6 : Macromanipulateur.
- 7 : Micromanipulateur.
- 8 : Masse de mesure haute qualité.

Fig. 6. Le poste de Patch-Clamp .Obtention et Analyse du signal.

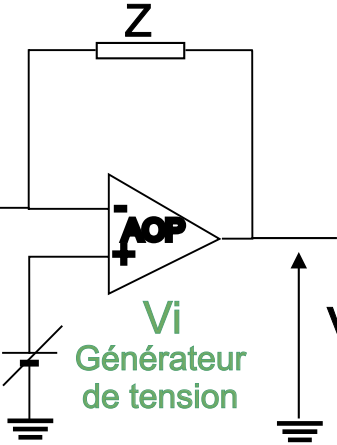
Ecran de visualisation



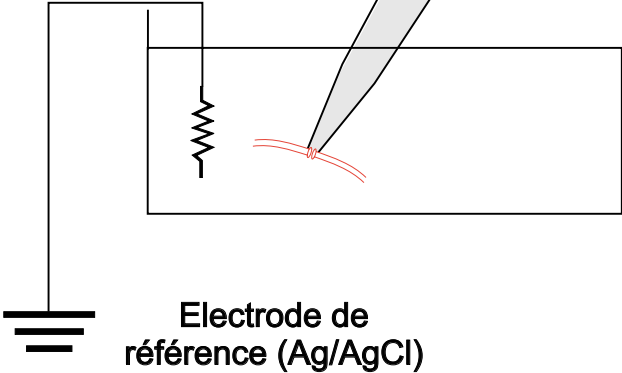
Convertisseur courant-tension et 1° unité d'amplification de la tête de mesure

Electrode de mesure (Ag/AgCl)

I_m

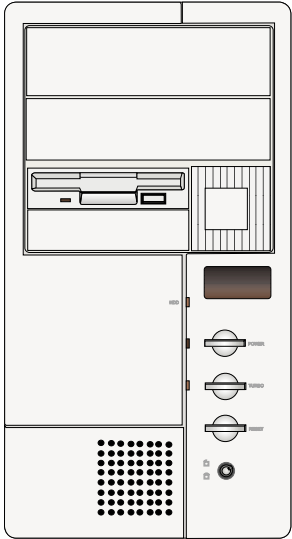
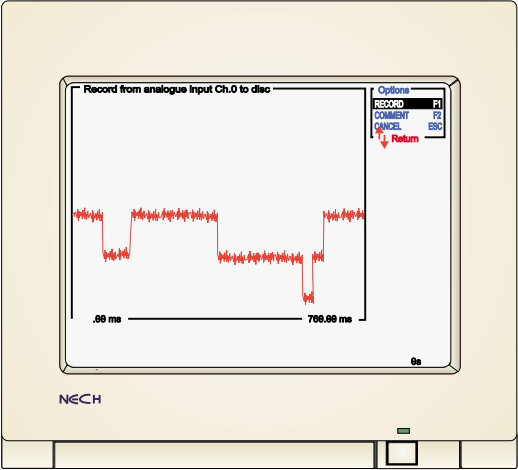


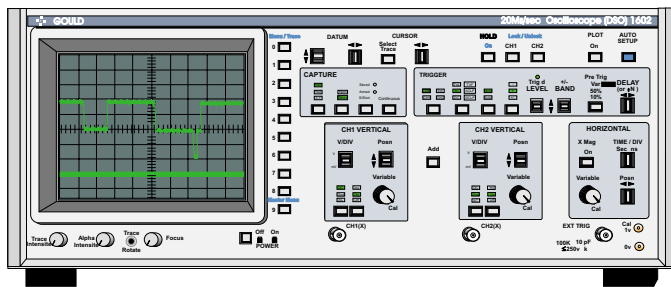
$$V = V_i - ZI$$



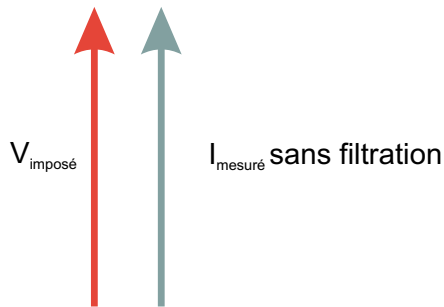
Electrode de référence (Ag/AgCl)

Ordinateur type PC stockage et analyse des données





Oscilloscope :
Visualisation du signal $I_{\text{mesuré}}$
sans filtration



Amplificateur RK-400 :
-compensation électrique
(capacitances, potentiels de jonction)
-étage d'amplification et de filtration



Enregistrement sur cassette DAT :
 $I_{\text{mesuré}}$, $V_{\text{imposé}}$, commentaires



Filtre Bessel :
Filtration de $I_{\text{mesuré}}$, enregistré sur DAT



Convertisseur Analogique/Digital :
Conversion des signaux digitaux
en signaux analogiques pour analyse informatique

6.2. Enregistrement des courants et électronique du poste de « patch-clamp ».

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires en verre borosilicate (GC 150F -10, Clark Electromedical Instrument) d'un diamètre externe de 1.5 mm et d'un diamètre interne de 0.86 mm, à l'aide d'une étireuse horizontale programmable (DMZ, Werner Zeitz, Augsburg, Allemagne). Après rodage, la résistance à la pointe de la pipette plongée dans du Ringer (**Tab.2.**) est de 5 à 8 MOhm. La réalisation du scellement s'effectue par succion (20 à 30 mbars de dépression sous contrôle d'un vacuomètre), sous un double contrôle optique et électrique. Des impulsions électriques carrées de 10 mV sont imposées lors du scellement afin de contrôler l'évolution de la résistance du système pipette/membrane jusqu'à l'obtention du « gigaseal ». De plus, un potentiel de -30 mV est imposé à la membrane durant toute la durée de formation du « seal ». Les scellements ainsi réalisés présentent une résistance d'environ 5 GOhm. Le potentiel imposé dans la pipette V_p se réfère à la masse constituée par une électrode de référence située dans le bain (**Fig. 6.**). Cette électrode de référence est constituée d'une électrode Ag/AgCl et d'un pont d'Agar (Agar à 3% dans du KCl 1M).

Du fait des compositions différentes des solutions de perfusion, des potentiels de jonction (LJP : Liquid Junction Potential) se produisent au niveau de l'électrode de référence. Ces potentiels sont définis comme étant la différence de potentiel entre la solution de bain prise comme référence, et la solution contenue dans la pipette (Barry & Lynch, 1991). Ces potentiels peuvent fausser l'interprétation des résultats obtenus car ils induisent une modification du potentiel membranaire (V_m). Il est donc nécessaire d'apporter une correction à la valeur de ce potentiel V_m . La valeur de cette correction est définie dans les équations suivantes d'après les équations de Henderson et calculée à l'aide du logiciel JPCalc (Barry 1994) :

en configuration « cell-attached » (6)

$$V_m = (E_m - V_{pip}) + LJP \quad (mV)$$

en configuration « inside-out » (7)

$$V_m = -V_{pip} + LJP \quad (mV)$$

avec pour deux solutions de bain (b) et de pipette (p) données et N espèces ioniques polyvalentes présentes dans ces solutions :

$$(8) \quad LJP = \frac{RT}{F} S_f \ln \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i C_{p,i}}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i C_{b,i}} \right\} \quad (mV)$$

$$(9) \quad S_f = \frac{\sum_{i=1}^N z_i u_i (C_{b,i} - C_{p,i})}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i (C_{b,i} - C_{p,i})}$$

Avec pour chaque espèce ionique (i) :

- u : mobilité ionique, C : concentration, z : valence
- p : solution contenue dans la pipette, b : milieu intracellulaire ou solution de bain
- T : température en Kelvin $T = 273.16 + T (^{\circ}C)$, R constante des gaz parfaits ($8.31 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
- F : constante de Faraday (96500 Cb)

L'électronique du poste de patch-clamp (**Fig. 6.**) s'articule autour d'un amplificateur (RK-400, Biologic, France), pièce centrale du dispositif. Il est constitué :

- d'un porte-électrode ou « head-stage » fixé au micromanipulateur. Ce porte-électrode contient un amplificateur opérationnel monté en convertisseur courant-tension dont la fonction est double : permettre une préamplification des courants provenant des cellules en transformant pour la mesure des picoAmpères (pA) en milliVolts (mV), mais également ajuster automatiquement le potentiel de la microélectrode à celui imposé par l'expérimentateur, puisque le RK-400 permet d'imposer des potentiels à la membrane isolée sous la pipette.

- d'une unité d'amplification supplémentaire permettant également de compenser les caractéristiques électriques de l'environnement pipette/cellule/solution de bain qui pourraient nuire à la mesure (potentiel de jonction, courants capacitifs, courants de fuite), ainsi qu'un étage de filtration.

	Rn Cl ⁻ Pca 3	Ringer sans Cl ⁻	K _{int} Pca 8	Na _{int} Pca 8	K _{int} Pca 8 1/2	K _{int} 1/4 Kglu Pca 8	K _{int} 1/2 X ⁺ Pca 8	NMDG Pca 8
NaCl	145	-	-	145	-	-	-	-
KCl	5	-	145	-	72.5	72.5	72.5	-
CaCl ₂	1.4	-	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
MgSO ₄	1	1	-	-	-	-	-	-
MgCl ₂	-	-	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
Hepes	10	10	-	-	-	-	-	-
Hepes/Tris	-	-	10	10	10	10	10	10
D-Glucose	10	10	10	10	10	10	10	10
CaSO ₄	-	1.4	-	-	-	-	-	-
X ⁺ Cl ⁻	-	-	-	-	-	-	72.5	-
Nagluconate	-	145	-	-	-	-	-	-
K gluconate	-	5	-	-	-	72.5	72.5	-
NMDG	-	-	-	-	-	-	-	145
EGTA	-	-	5	5	5	5	5	5
pH	7.90	7.90	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20
Osmolarité	320	320	320	320	320	320	320	320

	Pipette KCl	Pipette NaCl	Pipette CaCl ₂	Pipette Kgluc.	K _{int} -whole-cell Pca6
NaCl	-	145	-	-	-
KCl	145	-	-	-	117
MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2	4.29
CaCl ₂	1.2	1.2	72.5	1.2	1.03
K gluconate	-	-	-	145	-
Hepes/tris	10	10	10	10	10
D-glucose	10	10	10	10	-
pH	7.40	7.40	7.40	7.40	7.40

Tableau 3 : tableau (mM) des solutions de bain et de pipette utilisées lors des expériences de patch-clamp. X⁺, représente les cations de substitution pour la sélectivité (Cs⁺, Rb⁺, Li⁺).

A la sortie du RK-400, deux signaux sont disponibles : la tension V imposée à la membrane et le signal de mesure I_m , courant passant à travers le canal isolé sous la pipette. Ces deux signaux sont dirigés vers un DAT (DTR 1240 Biologic, France) où ils sont enregistrés sous forme brute digitalisée avec comme seule restriction l'étape de filtration sur le RK-400. Le DAT présente une conversion analogique/digitale avec une fréquence d'échantillonnage de 48 kHz, limitant ainsi l'enregistrement à des événements supérieurs à 50 μ s. Le DAT permet en outre l'enregistrement de commentaires lors de l'expérimentation. A la sortie du DAT, les deux signaux sont dirigés vers l'oscilloscope pour une visualisation brute des deux signaux V_m et I_m . Le signal I_m , quant à lui, est également dirigé vers un filtre Bessel passe bas variable (Kemo, France) puis vers un convertisseur analogique/digital (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Angleterre) pour une conversion numérique avant visualisation, enregistrement et analyse sur un micro-ordinateur type PC à l'aide du logiciel PAT V7.0m (John Dempster, university of Strathclyde, Ecosse).

6.3. Protocole.

Les cellules sont prélevées la veille de l'expérience puis rincées le jour même, comme lors des expériences de contenu en eau. Les cellules sont diluées jusqu'à obtention d'une densité d'environ 500-1000 cellules au millilitre. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de pétri modifiées de 0.4 ml, placées sur la platine d'un microscope inversé (Diaphot 300, Nikon) équipé d'un micromanipulateur Narishige (**Fig. 6.**). La composition des solutions utilisées pour les expériences réalisées en patch-clamp est présentée dans le **tableau 3**. Toutes les solutions sont filtrées sur des filtres en cellulose de 0.22 μ m. La concentration en calcium libre des solutions est calculée à l'aide du logiciel Calcium version 1.1 (Chang *et al*, 1988). Par convention, cette concentration sera exprimée par la valeur de pCa donnée par $pCa = -\log_{10}[Ca^{2+}]$. De plus, un système de perfusion par gravité (1 ml.min⁻¹) permet de changer rapidement les solutions de bain des cellules.

6.4. Analyse des courants ioniques traversant un canal.

Le flux de tout ion au travers d'un canal ionique membranaire est provoqué par le gradient électrochimique pour cet ion. Ce gradient est la résultante de deux effets :

- le gradient de potentiel (potentiel de membrane) d'une part
- le gradient de concentration de l'ion de part et d'autre de la membrane d'autre part.

Lorsque ces deux effets s'équilibrent, le gradient électrochimique pour l'ion est nul, ainsi que le courant net de l'ion à travers le canal. Le gradient de potentiel auquel cet équilibre est atteint est appelé potentiel d'équilibre pour l'ion. Il peut être calculé à partir de l'équation de Nernst (x).

$$(10) \quad V_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{\text{ext}}}{[X]_{\text{int}}}$$

Avec :

- V_x : potentiel d'équilibre de l'ion considéré
- z : valence de l'ion
- T : température en Kelvin $T = 273.16 + T (^{\circ}\text{C})$, R constante des gaz parfaits ($8.31 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
- F : constante de Faraday (96500 Cb)
- $[X]_{\text{ext}}$ et $[X]_{\text{int}}$ concentration extracellulaire et intracellulaire de l'ion considéré.

Ainsi, pour tout potentiel de membrane V_M , la force nette qui tend à refouler un type particulier d'ion hors de la cellule est proportionnelle à la différence entre V_M et le potentiel d'équilibre pour l'ion décrit par l'équation de Nernst. Le courant effectif de chaque type d'ion dépend non seulement de cette force motrice, mais encore de la facilité avec laquelle l'ion traverse les canaux membranaires, facilité qui est fonction de la conductance des canaux. A un potentiel donné, l'amplitude du courant est l'indice de la facilité avec laquelle un ion

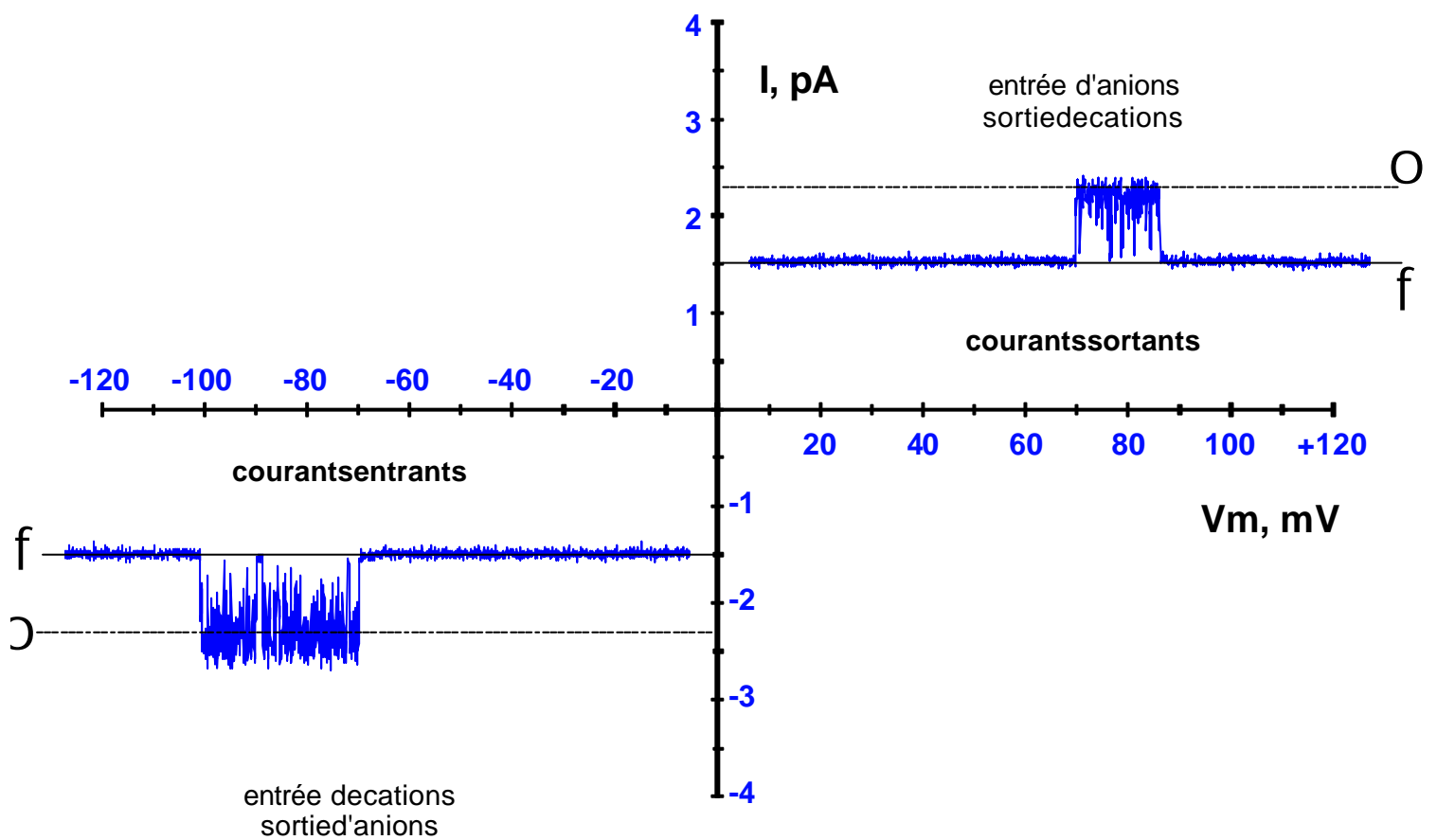


Figure 7: Sens des courants enregistrés et mouvements des cations et des anions à travers la membrane plasmique des cellules. o état ouvert du canal, f état fermé du canal.

perméant diffuse au travers du pore. Cette facilité croît lorsque le potentiel de membrane s'éloigne du potentiel d'équilibre. Ainsi d'après la loi d'Ohm, le courant I à travers la membrane est égal à (11) :

$$(11) \quad I = g_x (V_m - V_x)$$

où g_x est la conductance élémentaire du canal (exprimé en Siemens, S).

Les courbes courant/voltage (I/V) unissant le courant I traversant le canal à chacun des potentiels V_m permettent ainsi de déterminer la conductance élémentaire du canal isolé sous la pipette.

Toutefois, si la loi d'Ohm prédit une relation courant/voltage linéaire, ceci n'est pas une règle générale. En effet, les canaux peuvent présenter une rectification, tant dans le sens des courants entrants que dans le sens des courants sortants, le flux d'ions à travers la membrane étant plus facile au départ du compartiment ayant la plus forte concentration en cet ion perméant. L'équation de Goldman, Hodgkin et Katz (GHK) rend compte de cette rectification (12). Elle est dérivée de l'équation de Nernst, qui permet d'exprimer le potentiel membranaire en tenant compte de la perméabilité de cette membrane aux différents ions qui la traversent.

$$(12) \quad V_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{ext} + P_{Na} [Na^+]_{ext} + P_{Cl} [Cl^-]_{int}}{P_K [K^+]_{int} + P_{Na} [Na^+]_{int} + P_{Cl} [Cl^-]_{ext}}$$

avec :

- V_r , potentiel d'inversion de la membrane, c'est-à-dire potentiel auquel le courant change de sens
- P_x , perméabilité de la membrane à cet ion X.

Par convention, le sens des courants en électrophysiologie est donné par le sens de déplacement des charges positives. Ainsi, un courant entrant peut être aussi bien dû à une

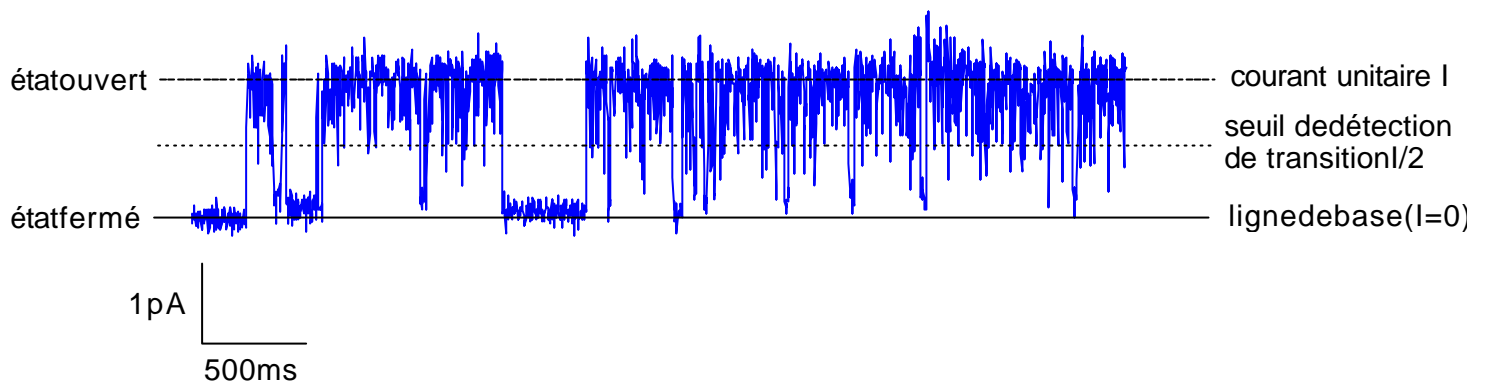


Figure 8 : Enregistrement de l'activité d'un canal unitaire. Détermination du courant unitaire I traversant ce canal et de ses états ouverts ou fermés à un potentiel donné V_m .

entrée de cations qu'à une sortie d'anions de la cellule. Dans les configurations expérimentales utilisées (« cell-attached » et « inside-out »), les courants sortants sont visualisés par une déflexion vers le haut par rapport à la ligne de base du courant (**Fig. 7.**).

6.5. Analyse des caractéristiques électriques d'un canal en configuration « cell-attached » et « inside-out ».

L'enregistrement des courants résultant de l'activité d'un canal consiste en une succession de signaux rectangulaires de durée aléatoire et d'amplitude fixe correspondant au courant unitaire I_0 . Cette activité électrique est constituée d'une suite de transitions entre l'état ouvert et l'état fermé du canal (**Fig. 8.**). L'analyse des enregistrements de l'activité des canaux ioniques nécessite donc dans un premier temps de déterminer la durée et l'amplitude de chacune de ces transitions. Pour un potentiel imposé V_M donné, l'amplitude du courant unitaire (I_0) correspondante est déterminée par la construction d'histogrammes d'amplitude du courant pour l'ensemble des données digitalisées lors de l'enregistrement pour ce voltage (V_M). Ces distributions peuvent être décrites par une somme de courbes de Gauss (une pour chaque état de conduction), à l'aide d'un algorithme itératif utilisant la méthode des moindres carrés tel que :

$$(13) \quad Y_{(i)} = \frac{Aw}{\sqrt{2\pi}s^2} \cdot e^{-\left(\frac{(I_i - I_{\text{moyen}})^2}{2s^2}\right)}$$

avec :

- $Y_{(i)}$: courbe d'ajustement gaussien
- A : aires fractionnées,
- I_i : le courant unitaire de l'événement i
- σ : l'écart-type du $i^{\text{ème}}$ composant de la Gaussienne,
- ω : largeur de l'événement i .

La qualité de l'ajustement est testée par une méthode dérivée de celle de Levenberg-Marquardt (Dempster, 1993).

Connaissant ainsi, pour un canal donné, la valeur du courant unitaire aux différents potentiels imposés à la membrane, il est possible d'établir la relation unissant la valeur du courant à celle du voltage imposé. La courbe courant/voltage (courbe I/V) obtenue constitue une caractéristique de ce canal pour les conditions de concentration des différentes espèces ioniques présentes de part et d'autre de la membrane. Il est alors possible de déterminer la conductance unitaire du canal à partir de l'équation (14)

$$(14) \quad g_X = \frac{I_x}{(V_M - V_X)}$$

La conductance est un indice de la facilité avec laquelle un ion traverse un canal ionique et constitue une grandeur caractéristique de ce canal. Elle est évaluée graphiquement sur les courbes courant/voltage en prenant la pente de la courbe au potentiel d'inversion E_r . La conductance est également établie pour les courants sortants (γ^+ , ou $\gamma[E_{rev}; +60]$) et les courants entrants (γ^- ou $\gamma[-60; E_{rev}]$) en calculant la pente de la courbe lorsque, dans ces deux régions, la courbe I/V peut être assimilée à une droite.

L'activité du canal est également caractérisée par sa probabilité d'ouverture (P_o). En effet, l'analyse des traces de courant qui représentent l'activité des canaux isolés montre que les canaux ioniques fluctuent entre différents états moléculaires (ouverts ou fermés). Ces transitions sont régies par des lois de nature probabiliste. Pour déterminer la probabilité d'ouverture, il convient de distinguer les états ouverts et les états fermés et d'en définir les durées respectives. La détection des transitions entre ces deux états est déterminée par le franchissement d'un seuil de détection fixé à 50 % correspondant à $I_o/2$ (**Fig. 8.**). Tout événement dont l'amplitude est supérieure à ce seuil est caractérisé comme étant un état

ouvert du canal ; dans le cas contraire il est considéré comme un état fermé. La probabilité d'ouverture selon l'équation :

$$(15) \quad P_o = \frac{T_{ouvert}}{T_{total}}$$

avec :

- T_{ouvert} , durée totale des états ouverts (sec),
- T_{total} , durée totale de l'enregistrement (sec).

La connaissance de la probabilité d'ouverture du canal ne donne cependant aucune indication quant à la cinétique de fonctionnement de ce canal. Il convient donc de déterminer des grandeurs caractérisant son mode de fonctionnement. Le courant enregistré à un potentiel donné est échantillonné, à partir des détections de transition décrites précédemment, en séquences élémentaires correspondant à la durée de chacun des états ouverts et fermés. Ces séquences sont stockées, puis classées selon leur durée. Ceci conduit à la construction d'histogrammes de distribution des temps d'ouverture et de fermeture. Quels que soient l'enregistrement et la configuration expérimentale utilisée, les distributions obtenues sont toutes de type exponentielle décroissante. Ces distributions peuvent être ajustées par une ou par la somme de plusieurs fonctions de densité de probabilité de type exponentielle, où la probabilité $P_{(t)}$ du temps de résidence du canal dans son état (ouvert ou fermé) t est donnée par :

$$(16) \quad P_{(t)} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-\left(\frac{t}{t_i}\right)}$$

avec :

- n nombre de sous-états du canal à l'état ouvert ou fermé,
- a_i fraction du nombre total d'événements dans l'état i

- τ_i le temps moyen de résidence pour cet état i.

Le meilleur ajustement est recherché par la méthode du maximum de vraisemblance. Ces distributions permettent donc de déterminer le temps moyen d'ouverture Γ_o ou de fermeture Γ_f , qui est la durée pour laquelle le canal a la probabilité maximale de rester à l'état ouvert (ou fermé).

Enfin, la caractérisation d'un canal nécessite de connaître la nature des ions qui le traversent et la facilité avec laquelle s'effectue ce passage. L'équation de Nernst (**équation 10**) permet de déterminer pour une espèce chimique donnée le potentiel d'équilibre en fonction des concentrations pour cet ion de part et d'autre de la membrane. Tout écart de E_r par rapport à un potentiel d'équilibre pour un ion signale une perméabilité non négligeable du canal pour un autre ion. En simplifiant l'équation de GHK (**équation 12**), en la ramenant à deux espèces chimiques (anions et cations), il est possible de déterminer la sélectivité relative d'un canal aux anions ou aux cations. Ainsi l'équation de GHK devient :

$$(17) \quad E_r = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{\text{cation}} [\text{cation}]_{\text{ext}} + P_{\text{anion}} [\text{anion}]_{\text{int}}}{P_{\text{cation}} [\text{cation}]_{\text{int}} + P_{\text{anion}} [\text{anion}]_{\text{ext}}} \right) \quad (\text{mV})$$

Ceci permet alors de calculer le rapport de sélectivité $P_{\text{cation}}/P_{\text{anion}}$ en utilisant l'équation suivante :

$$(18) \frac{P_{\text{cation}}}{P_{\text{anion}}} = \frac{[\text{anion}]_{\text{int}} - e^{\frac{E_r}{p}} [\text{anion}]_{\text{ext}}}{e^{\frac{E_r}{p}} [\text{cation}]_{\text{int}} - [\text{cation}]_{\text{ext}}} \quad \text{avec } p = \frac{RT}{F}$$

En outre, si un canal est plus perméant aux anions qu'aux cations ou inversement, il convient d'établir une séquence de sélectivité, ceci afin de déterminer quels ions sont les plus susceptibles de traverser le canal. Ainsi, à partir de l'équation de GHK simplifiée par exemple aux seuls cations, c'est-à-dire en supposant que la perméabilité anionique à travers le canal soit nulle, il est possible de déterminer une perméabilité relative pour l'ion X par rapport au potassium (P_K/P_X), dans le cas d'un canal cationique, grâce à l'équation :

$$(19) \frac{P_K}{P_X} = z_X \frac{[X^+]_{\text{ext}} - e^{\frac{E_r}{p}} [X^+]_{\text{int}}}{e^{\frac{E_r}{p}} [K^+]_{\text{int}} - [K^+]_{\text{ext}}}$$

avec :

$$-z_X \text{ valence de l'ion X, } p = \frac{RT}{F}$$

La détermination du courant unitaire ainsi que l'analyse des grandeurs cinétiques sont effectuées sur des enregistrements filtrés à 1kHz ou 300 Hz de durée supérieure à 60 secondes. De plus, sauf lorsque cela est précisé, cette analyse est effectuée sur des enregistrements ne contenant qu'un seul canal spontanément actif. D'autre part, ces enregistrements commencent par un état fermé et se finissent par un état ouvert du canal, ces deux événements n'étant jamais pris en compte pour l'analyse.

6.6. Analyse des caractéristiques électriques de la membrane en configuration « whole-cell ».

L'enregistrement des courants globaux en configuration «whole-cell» est effectué à l'aide de la technique du “patch perforé” à la nystatine. La résistance des pipettes est alors de 2 MOhm lorsque celles-ci sont remplies d'une solution mimant le contenu intracellulaire (K_{int} «whole-cell» pCa 6, **Tab. 3.**). Les pipettes sont pré-remplies par capillarité à la pointe avec une solution K_{int} «whole-cell» pCa 6 contenant de la nystatine (concentration finale 100 $\mu\text{g/ml}$). La nystatine est préparée en solution stock dans du DMSO (30 mg.ml^{-1}) et utilisée dans l'heure suivant sa préparation. Après obtention du Giga-seal (10-15 Gohm), le passage en configuration «whole-cell» est évalué par l'augmentation de la capacitance membranaire et la réduction de la résistance du scellement à 3 à 5 MOhm. Une perforation complète intervient généralement au bout de dix minutes. Les relations courant/voltage sont construites et analysées en utilisant le logiciel EPC (CED, Cambridge Electronic, Angleterre).

7. Présentation des données et analyse statistique des résultats.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes accompagnées de l'écart type ($\text{moy.} \pm \text{SD}$) ou sous la forme de moyennes accompagnées de la valeur de l'erreur standard à la moyenne ($\text{moy.} \pm \text{SEM}$). La comparaison des moyennes est effectuée par un test t de Student après analyse de la variance par un test F de Fischer. Le seuil de

Produit	Action	Concentration	Fournisseur	Solvant
Amiloride	inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ et des canaux Na^+ , et certains cationiques	1-100 μM	SIGMA	DMSO
9-AC	Inhibiteur des canaux Cl^-	50-100 μM	SIGMA	DMSO
Acetazolamide	inhibiteur de l'anhydrase carbonique	1 mM	SIGMA	DMSO
Apamine	Inhibiteur des canaux K^+ sensible au Ca^{2+} , de faible conductance	50 nM	Latoxan	Ringer
Acide arachidonique	Métabolite de la synthèse des eicosanoïdes et inhibiteur de certains canaux Cl^-	10 μM	SIGMA	Ringer
Acide flufenamique	Inhibiteur de la bande 3 et de certains cationiques non sélectifs	100 μM	SIGMA	DMSO
Acide niflumique	Inhibiteur de la bande 3 et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
8-Br-AMP _c (8-bromoadénosine 3'-5'-cyclic monophosphate)	Agoniste de l'AMP _c perméant	1 mM	SIGMA	Ringer
Barium	Inhibiteur des canaux K^+	1-10 mM	SIGMA	Ringer
Charybdotoxine	Inhibiteur des canaux K^+ sensible au Ca^{2+} , de forte conductance	50 nM	Latoxan	DMSO
Chelerythrine chloride	Inhibiteur des protéines kinase C	65 μM	SIGMA	DMSO
DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^- , de la bande 3, et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
DPC (diphenylamine-2-carboxylic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^-	50 μM	RBI	DMSO
ETYA (5,8,11,14-eicosatetraynoic acid)	Inhibiteur de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase	100 μM	SIGMA	Ethanol
EGTA	Chélateur du Ca^{2+}	5 mM	SIGMA	Ringer
Forskolin	Augmente la $[\text{AMP}_c]_{\text{intra}}$ par stimulation de l'adénylate cyclase	50 μM	SIGMA	DMSO
Furosemide	Inhibiteur du cotransport KCl et de la bande 3	500 μM	SIGMA	DMSO
Gadolinium	Inhibiteur des canaux cationiques non sélectifs	10-20 μM	SIGMA	Ringer
Genistein (4',5',7'-trihydroxyisoflavone)	Inhibiteur des protéine tyrosine kinase	30 μM	SIGMA	DMSO
Glibenclamide	Inhibiteur des canaux Cl^- de la famille des CFTR et des canaux K-ATP	100 μM	SIGMA	DMSO
Gramicidine S ou D	Ionophores potassiques	0.5 μM	SIGMA	Ringer
IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine)	Inhibiteur de la phosphodiesterase	1 mM	SIGMA	DMSO
Isoproterenol	Agoniste des récepteurs β -adrénergiques	0.55 μM	SIGMA	Ringer
Indomethacine	Inhibiteur de la cyclooxygénase	1 μM	SIGMA	DMSO
Lidocaïne	Inhibiteur de canaux K^+	100 μM	SIGMA	Ethanol
NDGA (8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)	Inhibiteur de la 5-lipoxygénase	10 μM	SIGMA	Ethanol
NEM (N-ethylmaleimide)		2 mM	SIGMA	DMSO
Nifédipine	Inhibiteur des canaux Ca^{2+}	10 μM	Biomol	DMSO
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate)	Inhibiteur des canaux Cl^-	50 μM	RBI	DMSO
Nystatine (mycostatine)	ionophore	100 $\mu\text{g/ml}$	SIGMA	DMSO
ouabaine	Inhibiteur de la pompe Na/K ATPase	100 μM	SIGMA	DMSO
PGE ₂ (prostaglandine E ₂)	Produit de la synthèse des eicosanoïdes	5 μM	Biomol	Ethanol
Pimozide	Inhibiteur du complexe calcium-calmoduline	10 μM	SIGMA	Ethanol
PMA (phorbol-12-myristate 13 acetate)	Activateur des protéines kinase C	13 μM	SIGMA	DMSO
Quinacrine	Inhibiteur de la phospholipase A ₂	10 μM	SIGMA	Ringer
quinine	Inhibiteur de canaux K^+ , de certains Cl^- et certains cationiques	0.01-1 mM	SIGMA	Ethanol
quinidine	Inhibiteur des canaux K^+ et du cotransport KCl à forte concentration	100 μM	SIGMA	Ethanol
SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^- , de la bande 3, et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
Staurosporine	Inhibiteur des protéines kinase dont PKA et PKC	40 μM	SIGMA	DMSO
TFP (trifluoperazine dihydrochloride)	Inhibiteur du complexe calcium-calmoduline	50 μM	SIGMA	Ringer
TMB-8 (3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester)	Antagoniste du calcium intracellulaire	10 μM	SIGMA	Ethanol
Valinomycine	Ionophore potassique	1 μM	SIGMA	DMSO
W-7 (N-(6-aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide)	Inhibe l'activité des enzyme régulée par la calcium-calmoduline	50 μM	Biomol	DMSO

Tableau 4. : Liste des différents produits employés durant les expériences.

significativité des tests, ainsi que le nombre d'expériences faisant l'objet du test sont précisés le cas échéant.

8. Produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences.

Les différents produits utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le **tableau 4**. Ce tableau précise leur provenance, leur solvant, leur site ou mode d'action ainsi que la concentration utilisée. Lorsque l'emploi d'un solvant organique (DMSO ou éthanol) est nécessaire à la préparation d'un produit, la concentration finale en solvant n'excède jamais 0.025% vol/vol.

Produit	Action	Concentration	Fournisseur	Solvant
Amiloride	inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ et des canaux Na^+ , et certains cationiques	1-100 μM	SIGMA	DMSO
9-AC	Inhibiteur des canaux Cl^-	50-100 μM	SIGMA	DMSO
Acetazolamide	inhibiteur de l'anhydrase carbonique	1 mM	SIGMA	DMSO
Apamine	Inhibiteur des canaux K^+ sensible au Ca^{2+} , de faible conductance	50 nM	Latoxan	Ringer
Acide arachidonique	Métabolite de la synthèse des eicosanoïdes et inhibiteur de certains canaux Cl^-	10 μM	SIGMA	Ringer
Acide flufenamique	Inhibiteur de la bande 3 et de certains cationiques non sélectifs	100 μM	SIGMA	DMSO
Acide niflumique	Inhibiteur de la bande 3 et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
8-Br-AMP _c (8-bromoadénosine 3'-5'-cyclic monophosphate)	Agoniste de l'AMP _c perméant	1 mM	SIGMA	Ringer
Barium	Inhibiteur des canaux K^+	1-10 mM	SIGMA	Ringer
Charybdotoxine	Inhibiteur des canaux K^+ sensible au Ca^{2+} , de forte conductance	50 nM	Latoxan	DMSO
Chelerythrine chloride	Inhibiteur des protéines kinase C	65 μM	SIGMA	DMSO
DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^- , de la bande 3, et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
DPC (diphenylamine-2-carboxylic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^-	50 μM	RBI	DMSO
ETYA (5,8,11,14-eicosatetraynoic acid)	Inhibiteur de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase	100 μM	SIGMA	Ethanol
EGTA	Chélateur du Ca^{2+}	5 mM	SIGMA	Ringer
Forskolin	Augmente la $[\text{AMP}_c]_{\text{intra}}$ par stimulation de l'adénylate cyclase	50 μM	SIGMA	DMSO
Furosemide	Inhibiteur du cotransport KCl et de la bande 3	500 μM	SIGMA	DMSO
Gadolinium	Inhibiteur des canaux cationiques non sélectifs	10-20 μM	SIGMA	Ringer
Genistein (4',5',7'-trihydroxyisoflavone)	Inhibiteur des protéine tyrosine kinase	30 μM	SIGMA	DMSO
Glibenclamide	Inhibiteur des canaux Cl^- de la famille des CFTR et des canaux K-ATP	100 μM	SIGMA	DMSO
Gramicidine S ou D	Ionophores potassiques	0.5 μM	SIGMA	Ringer
IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine)	Inhibiteur de la phosphodiesterase	1 mM	SIGMA	DMSO
Isoproterenol	Agoniste des récepteurs β -adrénergiques	0.55 μM	SIGMA	Ringer
Indomethacine	Inhibiteur de la cyclooxygénase	1 μM	SIGMA	DMSO
Lidocaïne	Inhibiteur de canaux K^+	100 μM	SIGMA	Ethanol
NDGA (8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)	Inhibiteur de la 5-lipoxygénase	10 μM	SIGMA	Ethanol
NEM (N-ethylmaleimide)		2 mM	SIGMA	DMSO
Nifédipine	Inhibiteur des canaux Ca^{2+}	10 μM	Biomol	DMSO
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate)	Inhibiteur des canaux Cl^-	50 μM	RBI	DMSO
Nystatine (mycostatine)	ionophore	100 $\mu\text{g/ml}$	SIGMA	DMSO
ouabaine	Inhibiteur de la pompe Na/K ATPase	100 μM	SIGMA	DMSO
PGE ₂ (prostaglandine E ₂)	Produit de la synthèse des eicosanoïdes	5 μM	Biomol	Ethanol
Pimozide	Inhibiteur du complexe calcium-calmoduline	10 μM	SIGMA	Ethanol
PMA (phorbol-12-myristate 13 acetate)	Activateur des protéines kinase C	13 μM	SIGMA	DMSO
Quinacrine	Inhibiteur de la phospholipase A ₂	10 μM	SIGMA	Ringer
quinine	Inhibiteur de canaux K^+ , de certains Cl^- et certains cationiques	0.01-1 mM	SIGMA	Ethanol
quinidine	Inhibiteur des canaux K^+ et du cotransport KCl à forte concentration	100 μM	SIGMA	Ethanol
SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid)	Inhibiteur des canaux Cl^- , de la bande 3, et du cotransport KCl	100 μM	SIGMA	DMSO
Staurosporine	Inhibiteur des protéines kinase dont PKA et PKC	40 μM	SIGMA	DMSO
TFP (trifluoperazine dihydrochloride)	Inhibiteur du complexe calcium-calmoduline	50 μM	SIGMA	Ringer
TMB-8 (3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester)	Antagoniste du calcium intracellulaire	10 μM	SIGMA	Ethanol
Valinomycine	Ionophore potassique	1 μM	SIGMA	DMSO
W-7 (N-(6-aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide)	Inhibe l'activité des enzyme régulée par la calcium-calmoduline	50 μM	Biomol	DMSO

Tableau 4. : Liste des différents produits employés durant les expériences.

Chapitre 1.

Caractérisation des voies de conductance ioniques de la membrane des érythrocytes nucléés de truite

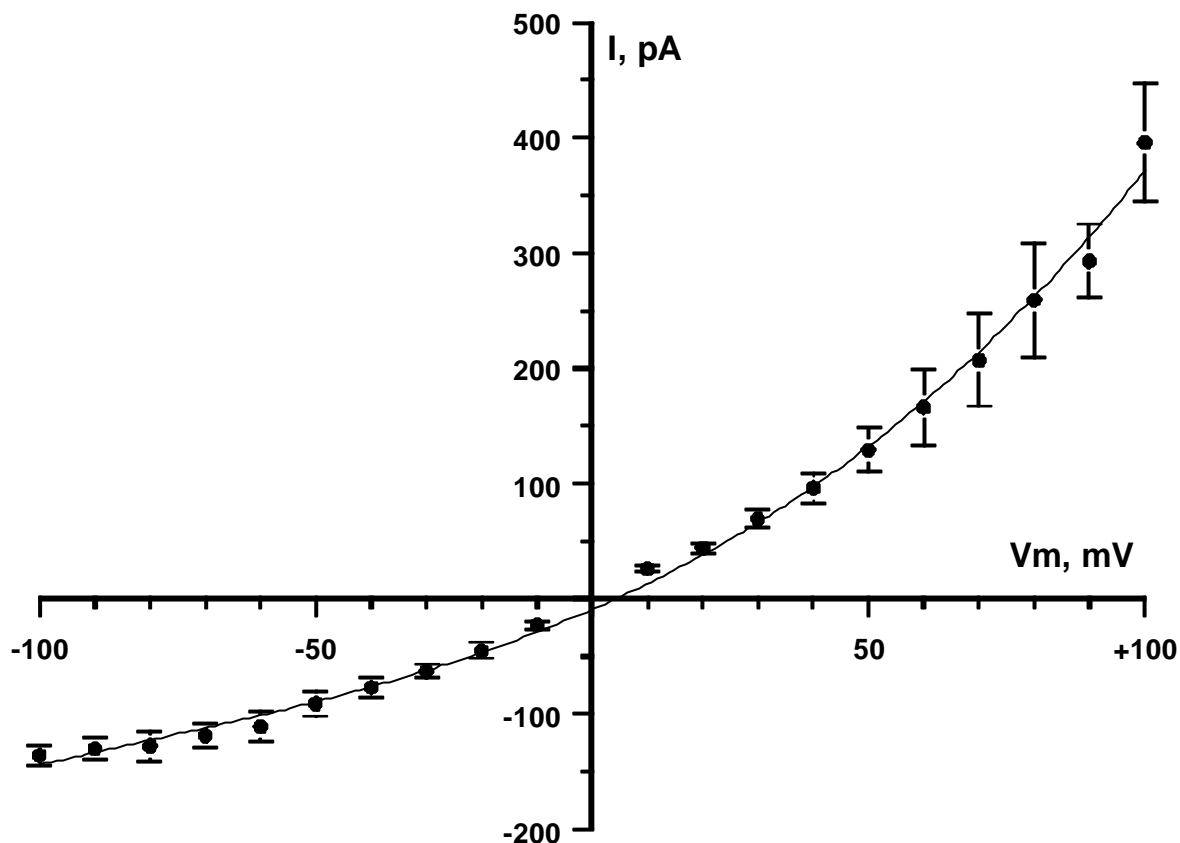
Introduction

Les propriétés de perméabilité de la membrane des globules rouges influencent directement l'état acido-basique et hydrominéral des cellules et donc le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone par le sang. Les substances organiques et inorganiques ne diffusent que très lentement à travers la bicouche lipidique et doivent donc emprunter des voies de transport spécifiques. Il n'existe qu'un nombre limité de transporteurs par lesquels les différents solutés peuvent traverser la membrane des globules rouges, au nombre desquels figurent les canaux ioniques, présents dans les globules rouges humains (Hamill, 1981) et d'amphibiens (Hamill, 1983 ; Bergeron *et al.*, 1996). Mais peu de choses sont connues sur les voies de conductance des érythrocytes en règle générale. Les premières études réalisées à l'aide de la technique de « patch-clamp » ont été menées par Hamill (1981), qui a montré l'apparition de courants générés par un canal K^+ après inhibition de l'efflux de Ca^{2+} par les traitements biochimiques précédemment décrits par Gardos (1958). Hamill a également mis en évidence dans les érythrocytes de grenouille l'existence de deux classes de canaux K^+ , ayant des sensibilités différentes vis-à-vis du Ca^{2+} , ainsi que l'existence d'une voie de conductance Cl^- (Hamill, 1983). Plus récemment, un canal K^+ rectifié entrant a pu être mis en évidence par l'analyse des courants globaux en configuration « whole-cell » dans les érythrocytes de lamproie (Virkki et Nikinmaa, 1996). Ce courant potassique est en fait généré par deux canaux K^+ distincts (Virkki et Nikinmaa, 1998).

Il n'existe pas à ce jour de données relatives à l'existence de canaux ioniques dans la membrane des globules rouges de poisson, et, par exemple, l'étude du rôle possible des canaux ioniques dans les processus de régulation du volume cellulaire n'a jamais été entreprise, bien que l'hypothèse d'une voie de conductance Cl^- dans les érythrocytes de truite ait été suggérée suite à l'observation par Fiévet *et al.* (1995) d'une voie de conductance Cl^- directement reliée à la bande 3, lorsque celle-ci est exprimée dans les œufs de xénope.

La présente étude avait pour but d'apporter les premières preuves de l'existence des canaux ioniques dans la membrane des globules rouges de téléostéens en utilisant les différentes configurations de la technique du « patch-clamp », afin de caractériser la nature des voies de conductance membranaires, ainsi que de déterminer l'implication éventuelle de ces canaux dans les processus de RVD.

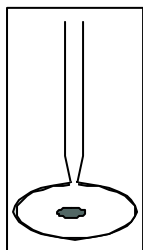
A



B

	$\gamma [-100 ; E_{rev}]$ (nS)	γE_{rev} (nS)	$\gamma [E_{rev} ; +100]$ (nS)	n
Contrôle	1.32 ± 0.19	1.68 ± 0.22	2.58 ± 0.59	18
Isotonique sans Cl^-	0.64 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.88 ± 0.06	18
Contrôle	1.38 ± 0.06	1.77 ± 0.07	2.38 ± 0.17	8
Isotonique + 50 μM DIDS	0.47 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.61 ± 0.04	8

Figure 9 : Caractérisation en configuration «whole-cell » de la conductance membranaire globale des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques.



A : Relation courant-voltage obtenue en configuration « whole-cell » (n=18), Ringer dans le bain et K_{int} « whole-cell » dans la pipette sur des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques (320 mOsm) . Les valeurs du courant I sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne).

B : Tableau récapitulatif des conductances membranaires calculées au potentiel d'inversion de la courbe E_{rev} , entre -100 et E_{rev} mV et entre E_{rev} et $+100$ mV. La valeur des conductances est la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n expériences séparées.

RESULTATS

1. Mise en évidence en conditions isosmotiques d'une conductance chlore en configuration « whole-cell ».

Lorsque la pipette est remplie d'une solution K_{int} « whole-cell » (**Tab. 3.**) contenant de la nystatine, seuls 15 % des essais aboutissent à la formation d'un « giga-seal ». Le passage en configuration « whole-cell » par perforation de la membrane sous l'action de la nystatine intervient généralement dans les 10 minutes.

La relation courant/voltage obtenue en conditions isosmotiques montre un potentiel d'inversion proche de zéro mV (5.4 ± 2.1 mV, $n=18$), ainsi qu'une forte rectification sortante (**Fig. 9.**). En effet, la conductance pour les courants sortants est de 2.58 ± 0.59 nS ($n=18$) pour des potentiels imposés entre E_{rev} et +100 mV, tandis qu'elle n'est que de 1.32 ± 0.19 nS ($n=18$) pour les courants entrants entre -100 et E_{rev} mV.

Etant donné les gradients de concentrations ioniques transmembranaires pour les différentes espèces chimiques, un potentiel d'inversion si proche de zéro mV suggère que les courants ioniques membranaires sont générés par le mouvement d'ions chlore ou par une voie de conductance cationique non sélective, capable de laisser passer aussi bien les ions potassiques que sodiques.

L'absence d'ions chlore dans le milieu extracellulaire provoque une réduction de la conductance membranaire globale (G_m). En effet, G_m diminue de plus de 50 % lorsque le chlore est remplacé dans le milieu extracellulaire par du gluconate, ce qui indique qu'en conditions isosmotiques, la membrane des globules rouges possède une importante conductance aux ions chlore. En effet, la conductance entre -100 et E_{rev} mV passe de $1.32 \pm$

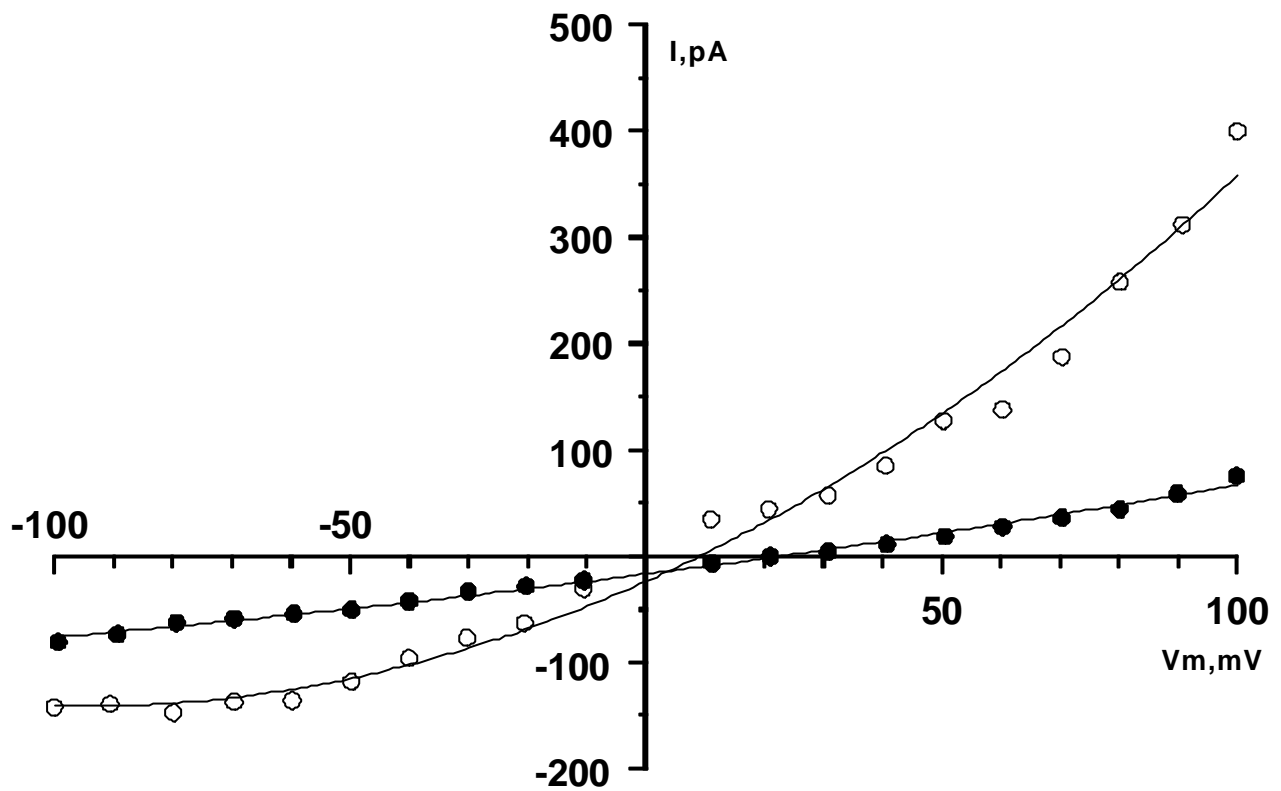
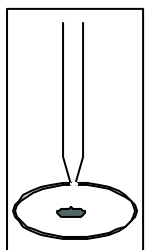
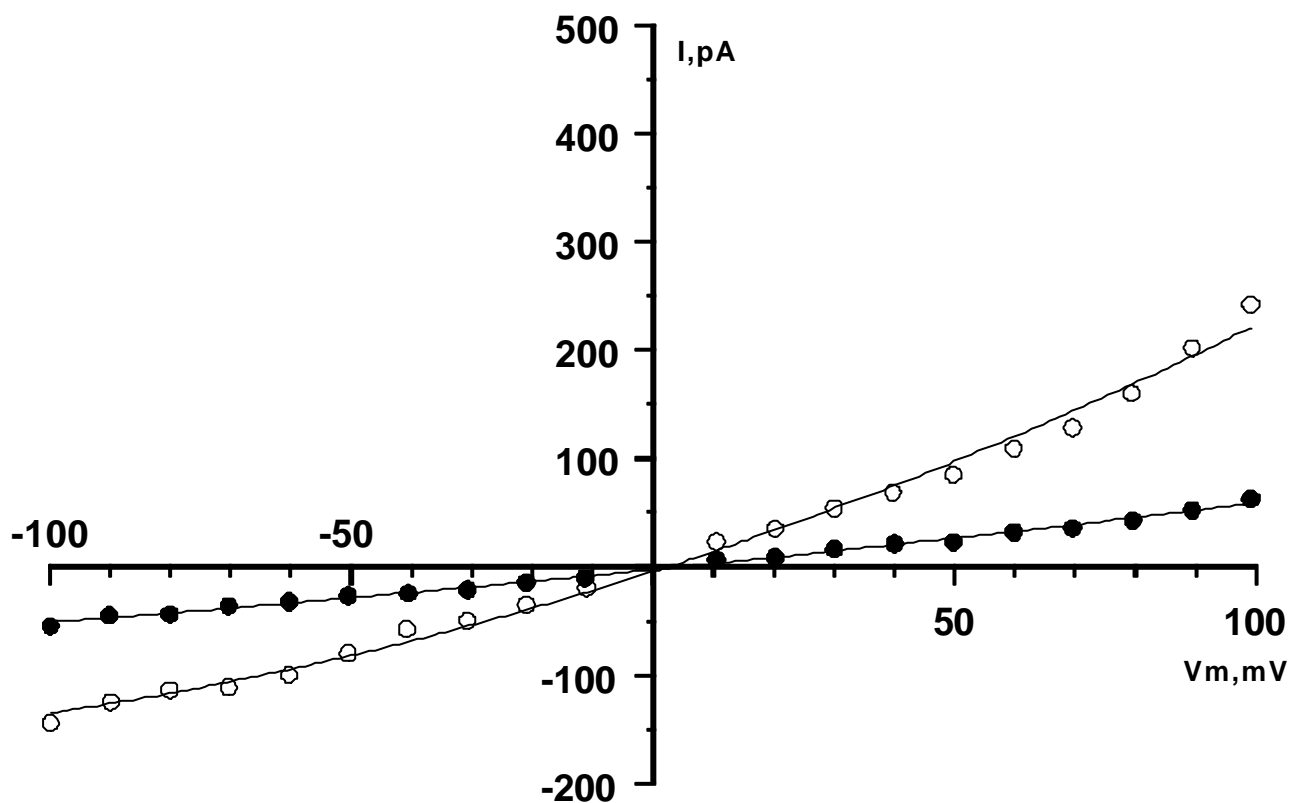
A**B**

Figure 10 : Caractérisation d'une conductance chlore en conditions isosmotiques.

A : Relation courant-voltage obtenue en configuration « whole-cell » sur des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques (320 mOsm) et après remplacement du chlore extracellulaire par du gluconate (320 mOsm). Courbes représentatives de 8 expériences différentes.

B : Relation courant-voltage obtenue en configuration « whole-cell » sur des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques (320 mOsm) et après addition dans le bain de DIDS (50 μ M). Courbes représentatives de 18 expériences différentes.

0.19 nS à 0.64 ± 0.02 nS et de la même manière, de E_{rev} à + 100 mV, elle passe de 2.58 ± 0.59 à 0.88 ± 0.06 . (n=18) (**Fig. 9. B. et Fig. 10. A.**). En outre, l'addition dans le milieu de bain de DIDS, un dérivé des stilbènes inhibiteur des canaux Cl^- (Kubo et Okada, 1992), à une concentration de 50 μ M provoque dans les cinq minutes qui suivent une réduction de la conductance membranaire évaluée à plus de 66 % pour les courants entrants et à 75 % pour les courants sortants (**Fig. 9. B. et Fig. 10. B.**). Ainsi, en présence de cet inhibiteur, la conductance des courants entrants n'est plus que de 0.47 ± 0.02 nS, alors que celle des courants sortants chute à 0.61 ± 0.04 nS (n=8). Une telle inhibition des courants Cl^- par le DIDS a été observée dans de nombreux cas (Kubo et Okada, 1992 ; Xu *et al.*, 1997, Nilius *et al.*, 1996). Cependant, il convient de noter que cette inhibition dépend généralement du voltage imposé à la membrane. En effet, les courants sortants sont le plus souvent davantage affectés par l'application extracellulaire de ce dérivé des stilbènes que les courants entrants, ceci étant attesté pour les myocytes cardiaques de cobaye (Xu *et al.*, 1997), pour les cellules intestines 407 (Kubo et Okada, 1992) ou encore pour les cellules M-1 des cellules du tube collecteur du rein de souris (Meyer et Korbmacher, 1996).

La **figure 10. (A et B)** montre également que dans ces deux situations (remplacement du chlore extracellulaire par un anion imperméant ou application d'un inhibiteur des transporteurs anioniques), la relation courant-voltage résiduelle perd sa rectification sortante et devient essentiellement linéaire. De plus, les potentiels d'inversion restent proches de zéro mV (**Fig. 10. A** 14.2 ± 3.5 mV, n=8 et **B** 7.3 ± 1.2 mV, n=18), indiquant que dans ces conditions, les courants ioniques transmembranaires sont probablement générés par une voie de conductance cationique non sélective. En effet, compte tenu des solutions de bain et de pipette utilisées, les cations se trouvent quasiment à l'équilibre chimique (**Tab. 3.**).

- La membrane des érythrocytes nucléés de truite possède une conductance chlore rectifiée sortante, observée en conditions isotoniques.
- Cette conductance est sensible au remplacement du chlore extracellulaire par l'anion imperméant gluconate.
- Cette conductance est inhibée par le dérivé du stilbène DIDS (50 μ M).
- La conductance résiduelle après inhibition de la conductance chlore rectifiée sortante reste essentiellement linéaire et est probablement due à une conductance cationique non sélective.

2. Enregistrement de l'activité isolée de canaux ioniques sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached ».

Les érythrocytes de truite présentent un diamètre suffisant (6 μ m) pour permettre l'accès à leur membrane à l'aide d'une pipette de « patch ». Aussi, sur les 942 essais de scellement réalisés sur ces cellules, un taux de 94 % de « giga-seal » a été obtenu.

Toutefois, du fait de l'extrême fragilité de la membrane plasmique, la durée des scellements n'excède pas 15 à 20 minutes en configuration « cell-attached », avant qu'une soudaine excision ne soit observée. Les enregistrements restent cependant possibles pendant une durée de 25 à 35 minutes en configuration « inside-out ».

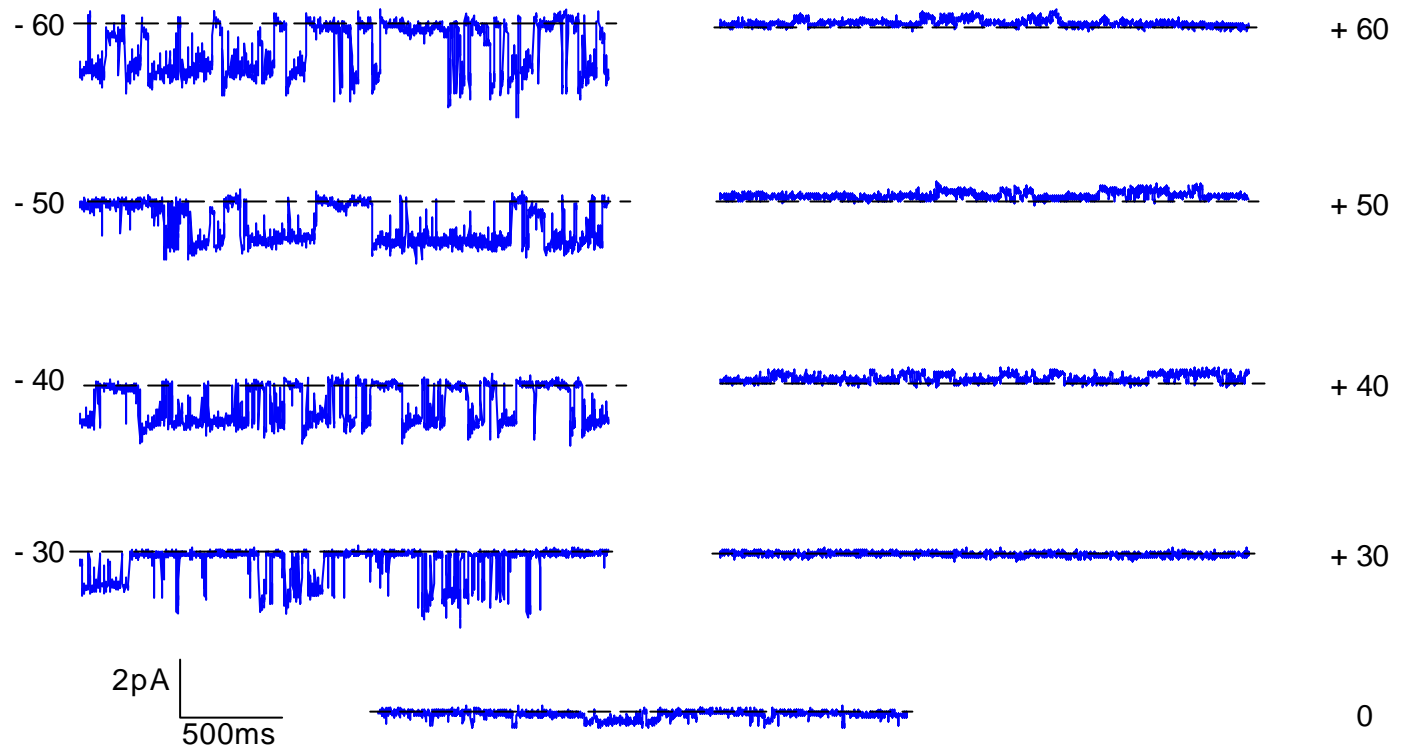
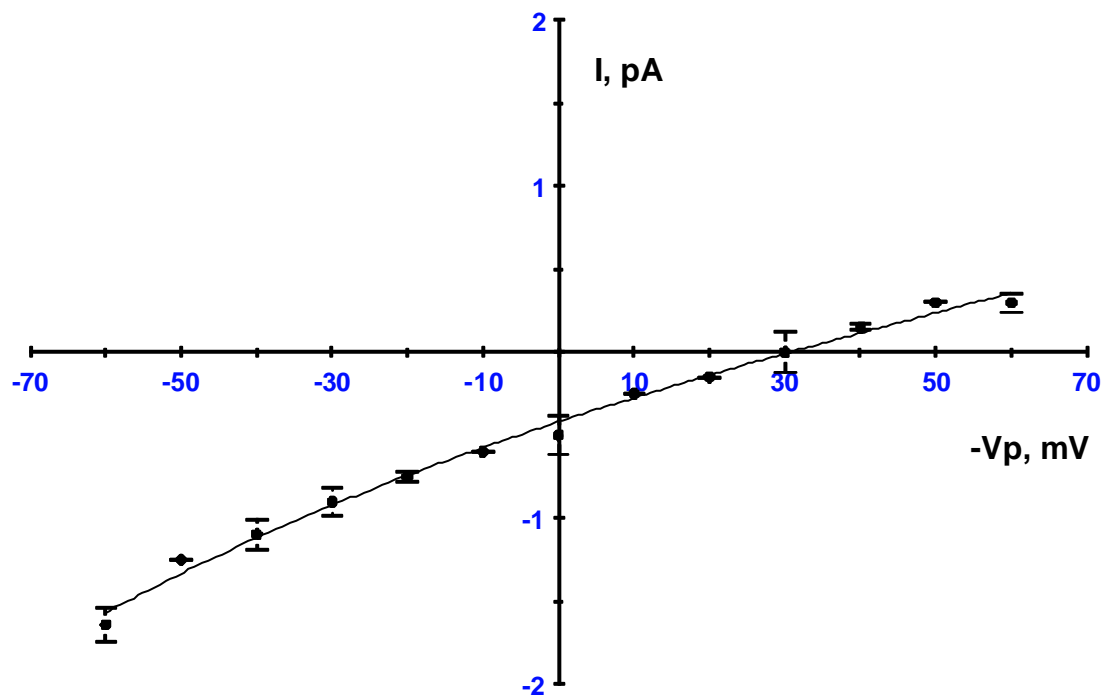
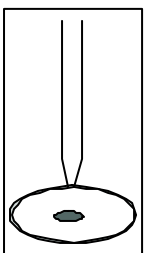
A $-V_p, \text{mV}$ $-V_p, \text{mV}$ **B**

Figure 11. : Caractérisation en configuration « cell-attached » du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite en présence de Ringer dans la pipette et de Ringer dans le bain.



A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal cationique non sélectif pour différents potentiels imposés ($-V_p$) à la membrane. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz ou 1 kHz.

B : Relation courant-voltage du canal cationique non sélectif obtenue dans ces conditions. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de 20 mesures réalisées dans cette configuration.

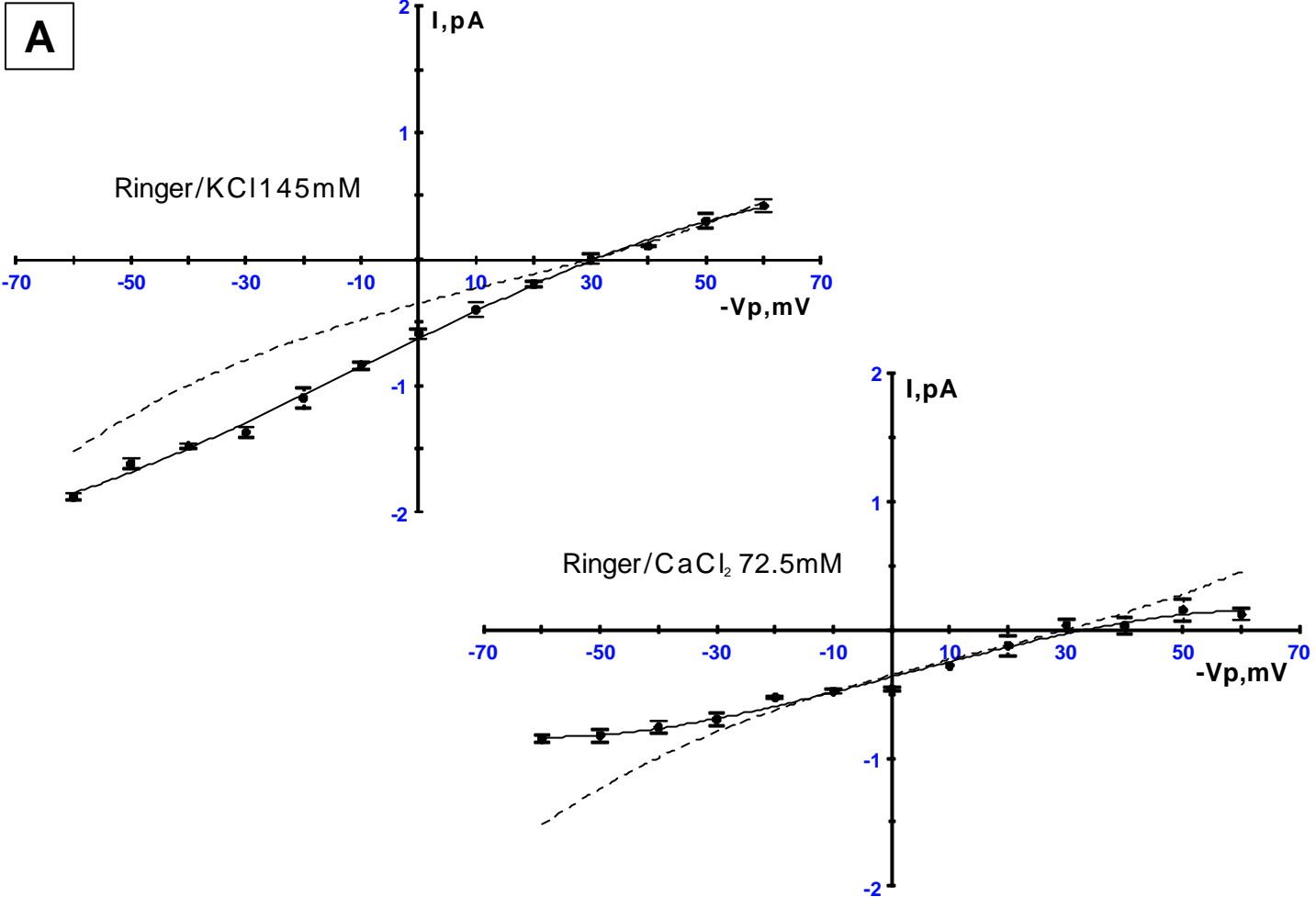
2.1. Enregistrement de l'activité d'un canal cationique non sélectif sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached ».

En configuration «cell-attached », l'activité de canaux ioniques a pu être observée sur la membrane des globules rouges. Sur l'ensemble des scellements obtenus, 121 enregistrements en configuration « cell-attached » ont été retenus. 91 % d'entre eux présentaient des canaux spontanément actifs sous la pipette de « patch », correspondant à l'activité d'un canal cationique non sélectif (CNS). Des enregistrements caractéristiques de l'activité de ce canal à différents potentiels imposés à la membrane ($-V_p$) sont présentés sur la **figure 11. A.** ; lorsque la cellule est baignée par du Ringer isosmotique (320 mOsm) et en présence de Ringer dans la pipette.

2.1.1. Détermination de la perméabilité aux cations et de la conductance du canal.

La relation courant-voltage (**Fig. 11. B.**) établie dans cette configuration montre que le potentiel d'inversion est proche de +30 mV ($-V_p = 30.4 \pm 2.8$ mV, $n=20$). Or, le potentiel de membrane des globules rouges de truite, mesuré à l'aide d'une microélectrode, est de -25 mV (Guizouarn *et al.*, 1993). Dans ces conditions expérimentales, le potentiel d'inversion de la relation courant-voltage est donc très proche du potentiel théorique d'équilibre des cations ($E_C^+ = +27$ mV), calculé pour une concentration intracellulaire en cations de 168 mM (Garcia-Romeu *et al.*, 1991) et en faisant l'hypothèse que le canal est uniquement sélectif aux cations. L'ensemble de ces observations permet de conclure quant à la sélectivité cationique de ce canal.

La relation courant-voltage montre que les courants entrants sont légèrement supérieurs aux courants sortants. Ainsi, pour les premiers, la conductance $\gamma_{[-60;E_{rev}]}$ calculée entre -60 mV et le potentiel d'inversion de la courbe (E_{rev}) est de 18.1 ± 1.2 pS ($n=20$), alors



	γ [-60 ; E_{rev}] (pS)	γ E_{rev} (pS)	γ [E_{rev} ; +60] (pS)	E_{rev} (mV)
Ringer / Ringer (n=20)	18.1 ± 1.2	15.0 ± 1.9	13.5 ± 0.8	30.4 ± 2.8
Ringer / KCl 145 mM (n=12)	20.7 ± 0.9	19.1 ± 1.5	16.9 ± 1.6	31.3 ± 3.0
Ringer / CaCl₂ 72.5 mM (n=9)	$8.1 \pm 0.7^*$	$11.9 \pm 0.9^*$	$9.9 \pm 0.7^*$	33.2 ± 3.5

Figure 12. : Caractérisation en configuration « cell-attached » du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.

A : Relations courant-voltage du canal cationique non sélectif en présence de différentes solutions de pipettes. Les courbes en pointillées représentent la relation courant-voltage établie en présence de Ringer dans le bain et de Ringer dans la pipette(n=20). Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n cellules obtenues dans cette configuration.

B : Tableau des conductances (γ) du canal mesurées dans les différentes configurations de pipette. γ [-60 ; E_{rev}] ; γ [E_{rev} ; +60] sont calculées dans chaque partie de la courbe correspondante. E_{rev} potentiel d'inversion calculé ; $\gamma_{E_{rev}}$ conductance calculée au potentiel d'inversion de la courbe. * indique une différence significative entre les moyennes ($p < 0.05$, testé par rapport à la configuration Ringer/Ringer à l'aide d'un test t de Student).

que, pour les seconds, la conductance, calculée entre E_{rev} et +60 mV $\gamma_{[E_{rev}; +60]}$, n'est que de 13.5 ± 0.8 pS (n=20). Au potentiel d'inversion, la conductance ($\gamma_{E_{rev}}$) est de 15.0 ± 1.9 pS (n=20) (**Fig. 11. B.**).

Par ailleurs, le remplacement du Ringer dans la pipette par une solution de remplissage à forte concentration en KCl (KCl 145 mM, **Tab. 3.**) ne modifie pas de manière significative ces valeurs (**Fig. 12. A. et B.**).

De plus, il était particulièrement intéressant de déterminer si ce canal cationique non sélectif était en mesure de laisser passer le calcium, nombre des canaux de ce type pouvant constituer une voie de passage à travers la membrane pour cet ion dans de nombreux types cellulaires (pour revue Morris, 1990).

Le remplacement de la solution de remplissage de la pipette par une solution contenant 72.5 mM de CaCl_2 permet d'enregistrer des courants unitaires sortants, dont la cinétique est comparable à celle observée avec des solutions de remplissage contenant du Ringer ou du KCl 145 mM.

Le potentiel d'inversion des relations courant-voltage établies dans ces conditions de remplissage de la pipette n'est pas significativement modifié par rapport aux conditions de référence, c'est-à-dire lorsque la pipette est remplie d'une solution normale de Ringer (**Fig. 12. A. et B.**), puisqu'il est de 33.2 ± 3.5 mV (n=9). Le canal présente donc également une perméabilité non négligeable aux ions calcium, comme l'indique la **figure 12.** En revanche, il est à noter que les conductances diminuent en présence de cet ion. Ainsi la conductance pour les courants entrants chute de 18.1 ± 1.2 pS (n=20) à 8.1 ± 0.6 pS (n=9), alors que pour les courants sortants, elle passe de 13.5 ± 0.8 pS (n=20) à 9.9 ± 0.7 pS (n=9). La conductance au potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage en présence de CaCl_2 72.5 mM dans la pipette est de 11.9 ± 0.9 pS (n=9).

De nombreux enregistrements présentaient plusieurs copies de ce canal, actives simultanément. Les enregistrements montrent que, si dans 64 % des cas, seul un canal était actif sous le « patch », dans 30 % des cas deux copies étaient actives, et dans respectivement 4 % et 2% des enregistrements 3 ou plus de 4 canaux étaient simultanément actifs. Le nombre de canaux spontanément actifs ne peut être lié au potentiel imposé à la membrane, puisqu'aucune relation n'a pu être établie entre le produit du nombre de canaux simultanément actifs par la probabilité d'ouverture (NPo) et le voltage imposé à la membrane.

2.1.2. Essais de modulation de l'activité du canal cationique non sélectif (CNS) en configuration « cell-attached ».

Au vu de la forte fréquence d'occurrence du canal cationique non sélectif, il convenait de déterminer si cette importante activité ne pouvait être modulée par un composant cytosolique. En effet, il a été observé dans les cellules pancréatiques β (Sturgess *et al.* 1987) ou dans les cellules striales de gerbille en culture (Yeh *et al.*, 1995), que l'activité des canaux cationiques non sélectifs pouvait être modulée par les nucléotides intracellulaires, tels que l'AMP_c. Dans ces deux types cellulaires, l'activité des canaux cationiques non sélectifs, c'est-à-dire leur probabilité d'ouverture, est réduite par l'AMP_c intracellulaire. Afin d'augmenter le taux d'AMP_c intracellulaire, les érythrocytes de truite ont été exposés à 10 μ M de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase. L'addition de ce sécrétagogue n'a pas permis de révéler une quelconque modification de l'activité du CNS dans ces conditions (n=6).

L'addition de 8Br-AMP_c, un analogue non métabolisable et perméant de l'AMP_c, à la concentration de 1 mM, n'a pas non plus permis de mettre en évidence un rôle modulateur de ce nucléotide (n=6).

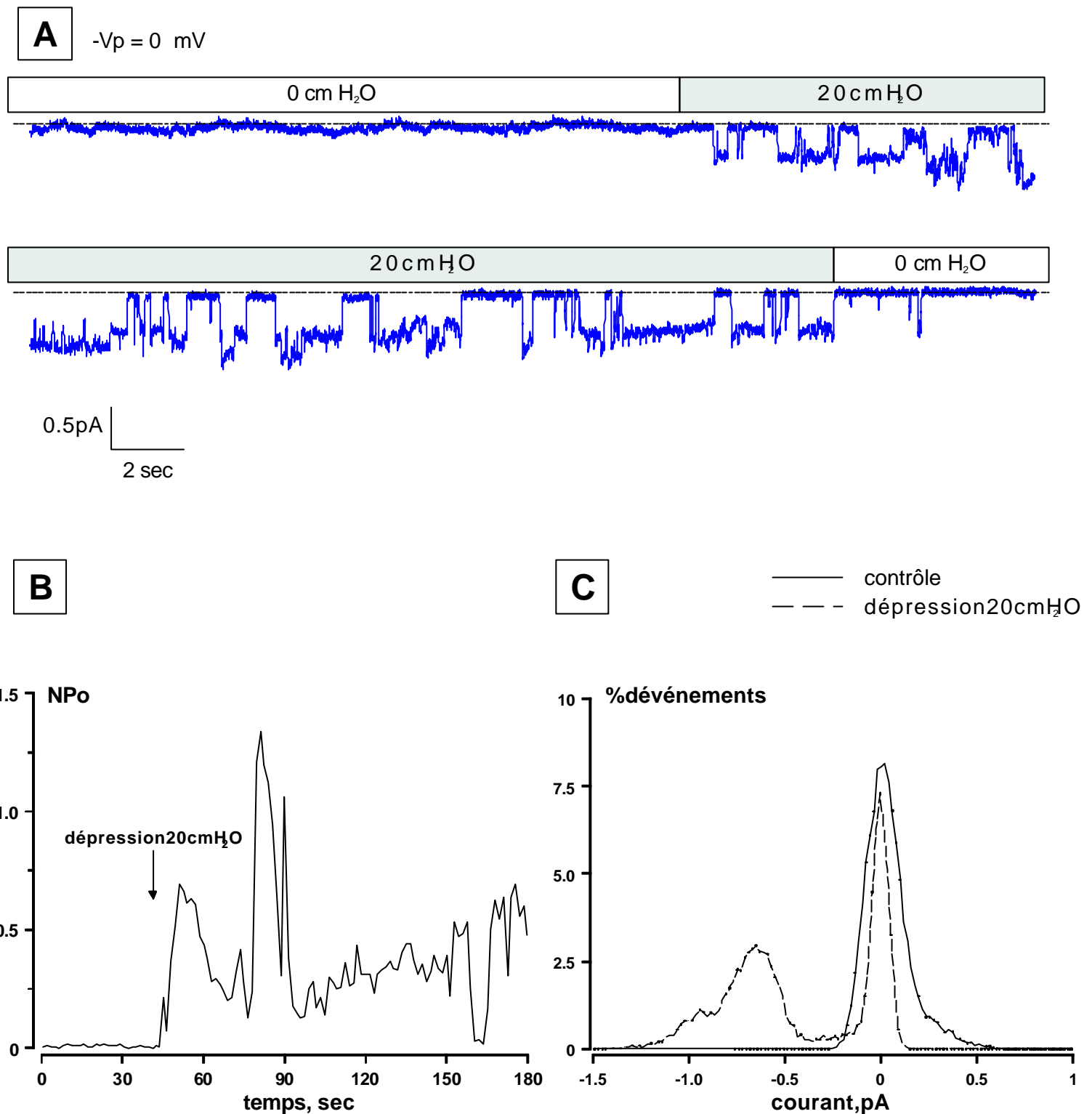
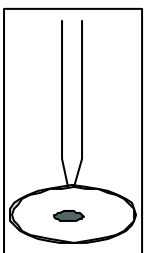


Figure 13. : Caractérisation de la mécano-sensibilité en configuration « cell-attached » du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite, en présence de Ringer dans la pipette et Ringer dans le bain.

A : Enregistrement caractéristique de l'activité du canal cationique ($n=12$) non sélectif induite par une dépression sub-atmosphérique (20 cm H₂O) lorsque celui-ci était quiescent sous la pipette de patch. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz, ($-V_p = 0 \text{ mV}$).

B : Evolution de l'activité du canal cationique non sélectif (NPo) avant et après dépression dans la pipette (20 cm H₂O). Courbe représentative de 12 expériences différentes.

C : Histogramme d'amplitude des courants traversant le « patch » avant dépression (contrôle) et après application d'une dépression sub-atmosphérique (« stretch », 20 cm H₂O), courbe représentative de 12 expériences séparées. $-V_p = 0 \text{ mV}$.



De la même manière, l'incubation des cellules avec de l'isoprotérenol ($5.5 \cdot 10^{-7}$ M), un agoniste des récepteurs β -adrénergiques qui déclenche chez l'érythrocyte de truite l'activation rapide et très importante d'un antiport sodium/proton normalement silencieux (Baroin *et al.*, 1984 , Cossins et Richardson, 1985), *via* l'activation de l'augmentation de l'AMP_c intracellulaire, ne modifie pas non plus la cinétique du canal cationique non sélectif.

L'addition d'IBMX (1 mM) qui, en inhibant la dégradation de l'AMP_c par la phosphodiesterase induit une augmentation progressive de la concentration du nucléotide dans la cellule (Guizouarn *et al.*, 1990), ne provoque pas de modification du mode de fonctionnement du canal dans ces conditions.

2.1.3. Mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif.

Si le canal cationique présente une très forte fréquence d'occurrence d'activité spontanée (91 % des scellements), il est toutefois possible, dans un tiers au moins des 9 % restants qui ne présentent pas de canaux cationiques non sélectifs spontanément actifs, d'activer un exemplaire de ce canal en appliquant une dépression sub-atmosphérique dans la pipette. La **figure 13.** montre un exemple d'activation du canal cationique non sélectif en configuration « cell-attached » par une dépression de 20 cm d'H₂O. Toutefois, compte tenu de la fragilité des scellements en configuration « cell-attached », il n'a pas été possible d'établir une relation liant la probabilité d'ouverture des canaux présents sous le « patch » à l'amplitude de la dépression appliquée à la membrane. Bien qu'il n'ait pas été possible d'enregistrer l'activité de ce canal induite par la dépression sur des temps suffisamment longs pour permettre une analyse cinétique du fonctionnement du canal, il semble que l'augmentation de la probabilité d'ouverture qui apparaît suite à la succion soit due à l'augmentation du temps moyen d'ouverture. De plus, il convient de noter que, la plupart du temps, le canal activé par une dépression restait actif alors que celle-ci était relâchée.

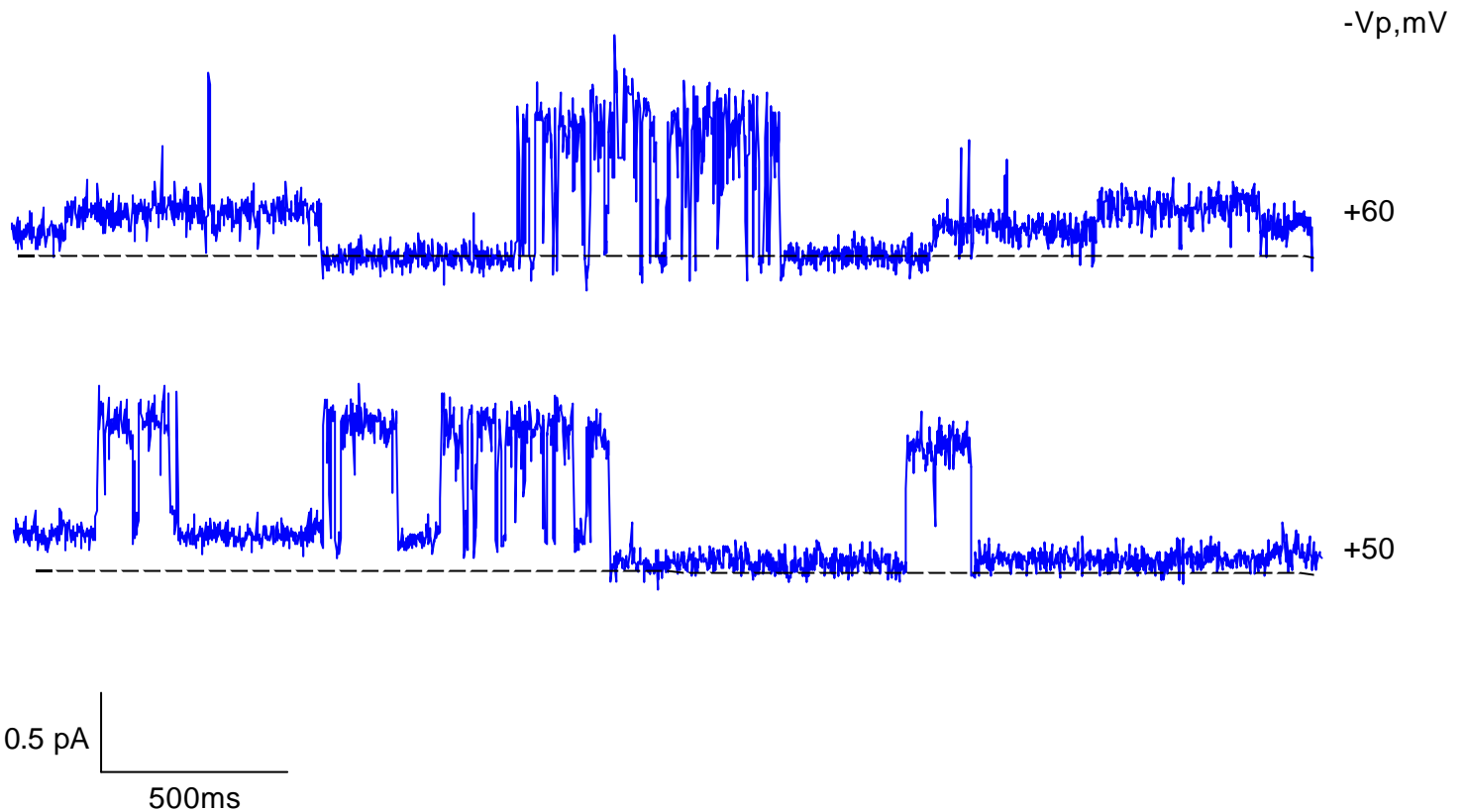
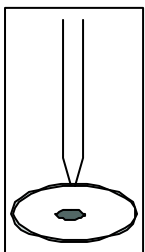
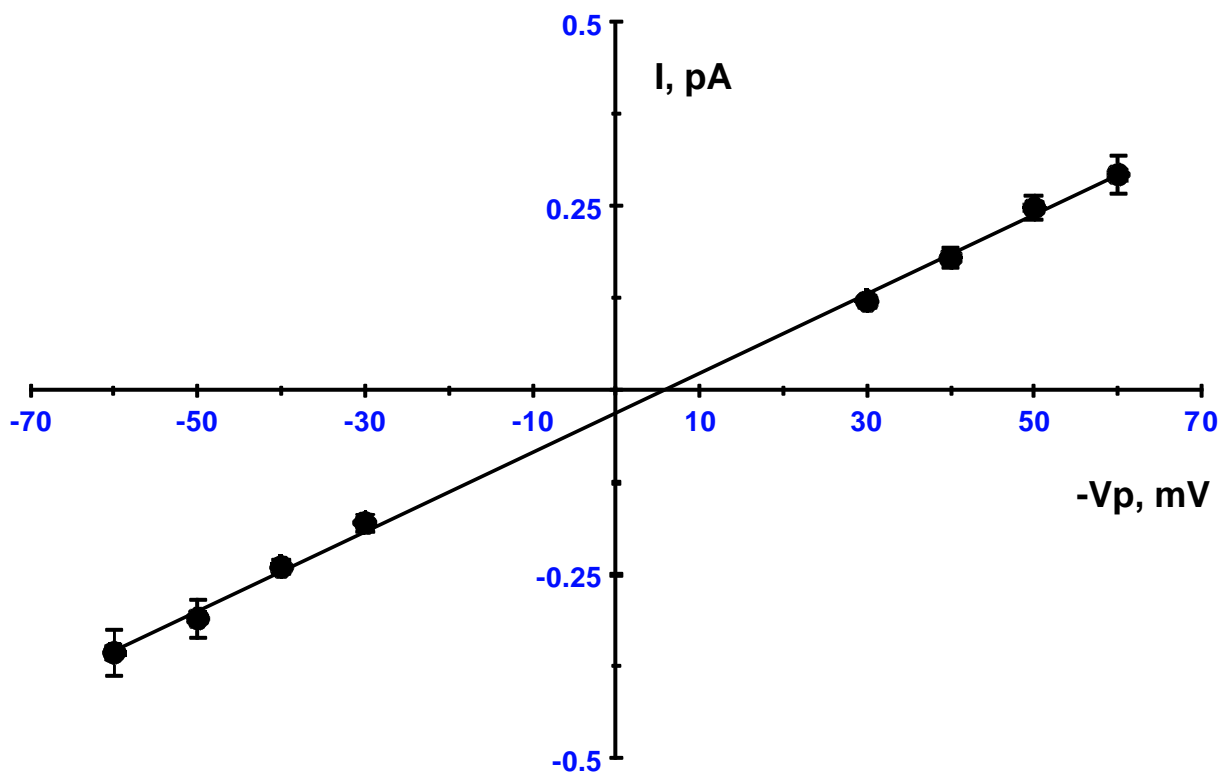
A**B**

Figure 14. : Caractérisation en configuration « cell-attached » du « petit » canal chlore à conductance linéaire (Small Chloride Conductance : SCC) de l'érythrocyte nucléé de truite en présence KCl 145 mM dans la pipette et de Ringer dans le bain.

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité de ce canal chlore pour différents potentiels imposés à la membrane (-Vp). La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz.

B : Relation courant-voltage correspondante du « petit » canal chlore dans cette configuration. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de 24 enregistrements réalisés dans cette configuration.

- La membrane du globule rouge possède un canal cationique non sélectif perméant aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} .
- Ce canal est observé en conditions isotoniques en configuration « cell-attached ».
- L'activité de ce canal n'est pas modulée par l'augmentation de la concentration intracellulaire d' AMP_c .
- Le canal cationique non sélectif présente des caractéristiques de mécanosensibilité.

2.2. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore à conductance linéaire sur la membrane des globules rouges en configuration « cell-attached ».

La **figure 14. A.** présente un exemple de la conductance chlore de faible conductance (« Small Chloride Conductance » : SCC) surimposée à celle du canal cationique non sélectif. Comme le montre la relation courant-voltage présentée sur la **figure 14. B.**, ce petit canal chlore présente une relation courant-voltage linéaire avec une conductance de 5.3 ± 0.7 pS ($n=24$) et un potentiel de réversion de 5.1 ± 0.8 mV ($n=24$) lorsque les cellules sont baignées dans du Ringer et que la pipette contient du KCl 145 mM. Le canal présentant une faible conductance, il n'a pas été possible d'en mesurer l'activité aux potentiels compris entre -20 et $+20$ mV. Cependant, un potentiel de réversion si proche du potentiel spontané de membrane ($V_p=0$ mV) en configuration « cell-attached » indique une perméabilité anionique. En effet, au potentiel de membrane $V_m=-25$ mV, les ions chlore sont à l'équilibre (Guizouarn *et al.*, 1993) et la valeur de potentiel d'inversion des courbes courant-voltage obtenues dans cette configuration est donc très proche du potentiel d'équilibre théorique pour le chlore ($E_{\text{Cl}} = -24$ mV).

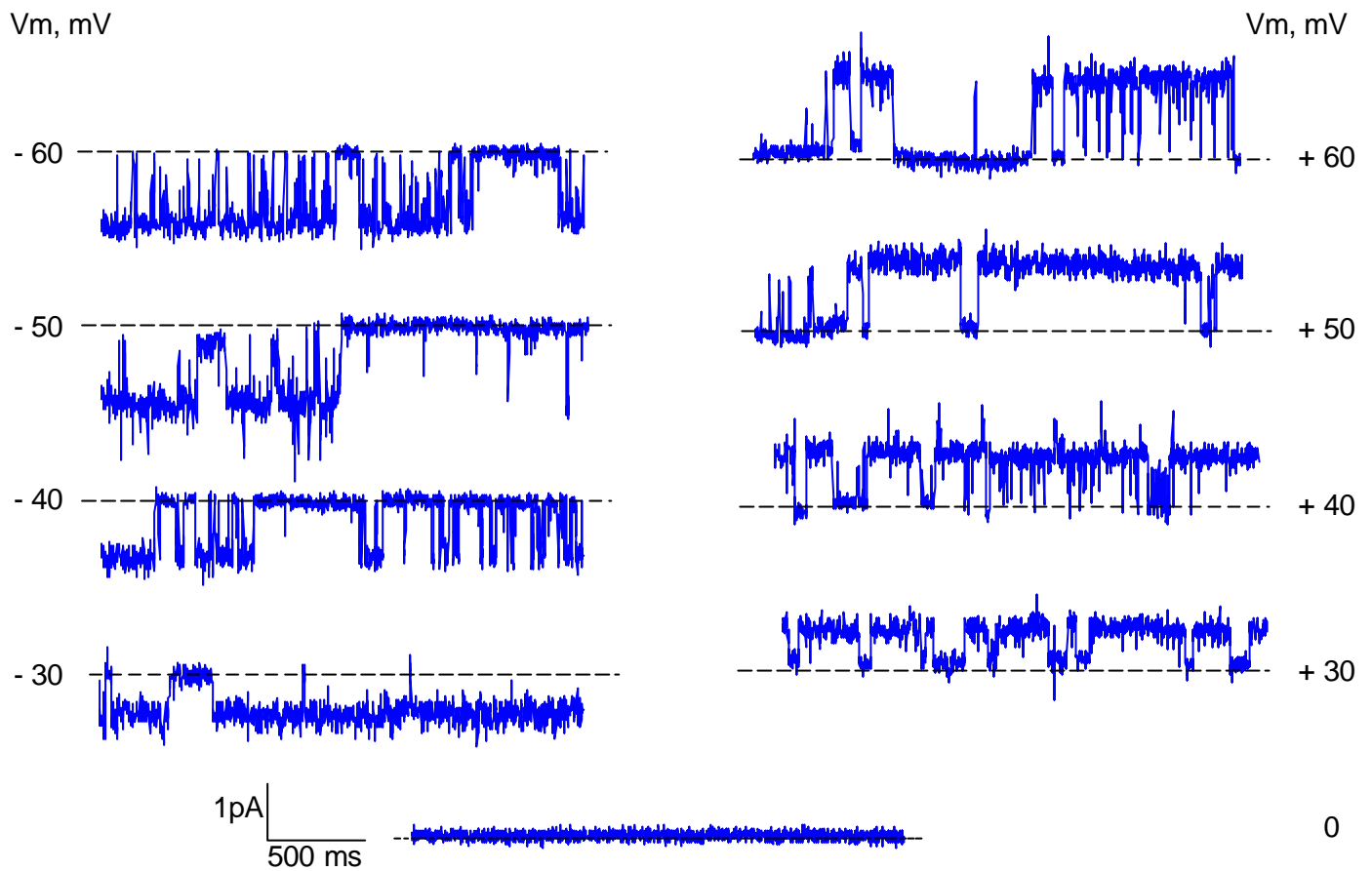
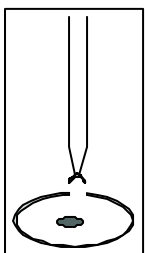
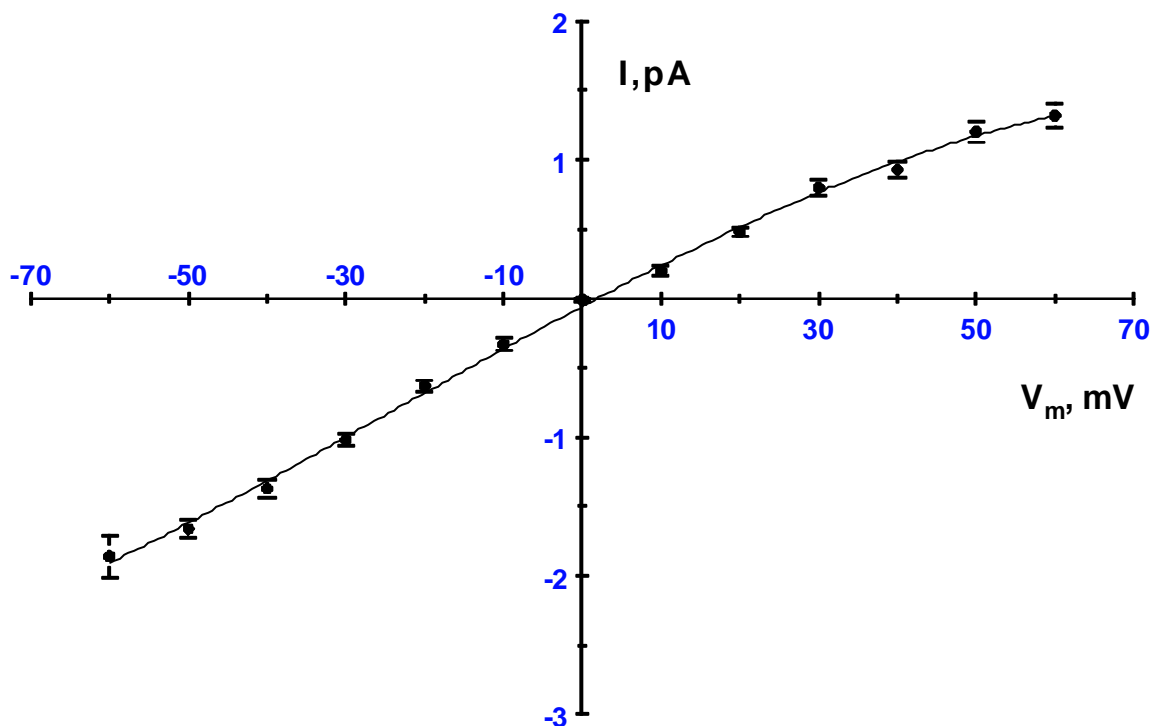
A**B**

Figure 15. : Caractérisation en configuration «inside-out » du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.

KCl 145 mM dans la pipette et K_{int} pCa 8 dans le bain.

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal pour différents potentiels de membrane (V_m). La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz ou 1kHz.

B : Relation courant-voltage correspondante du canal cationique non sélectif. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de 52 enregistrements réalisés dans cette configuration.

De plus, le remplacement de la solution de remplissage de la pipette par du Ringer ou une solution de NaCl ne modifie ni la conductance, ni le potentiel de réversion du canal. En effet, les conductances sont de 5.8 ± 0.2 pS ($n=5$) lorsque la pipette contient une solution NaCl 145 mM et de 5.1 ± 0.4 pS ($n=7$) lorsque celle-ci contient du Ringer. Ces expériences de substitution confirment donc la nature anionique de ce canal.

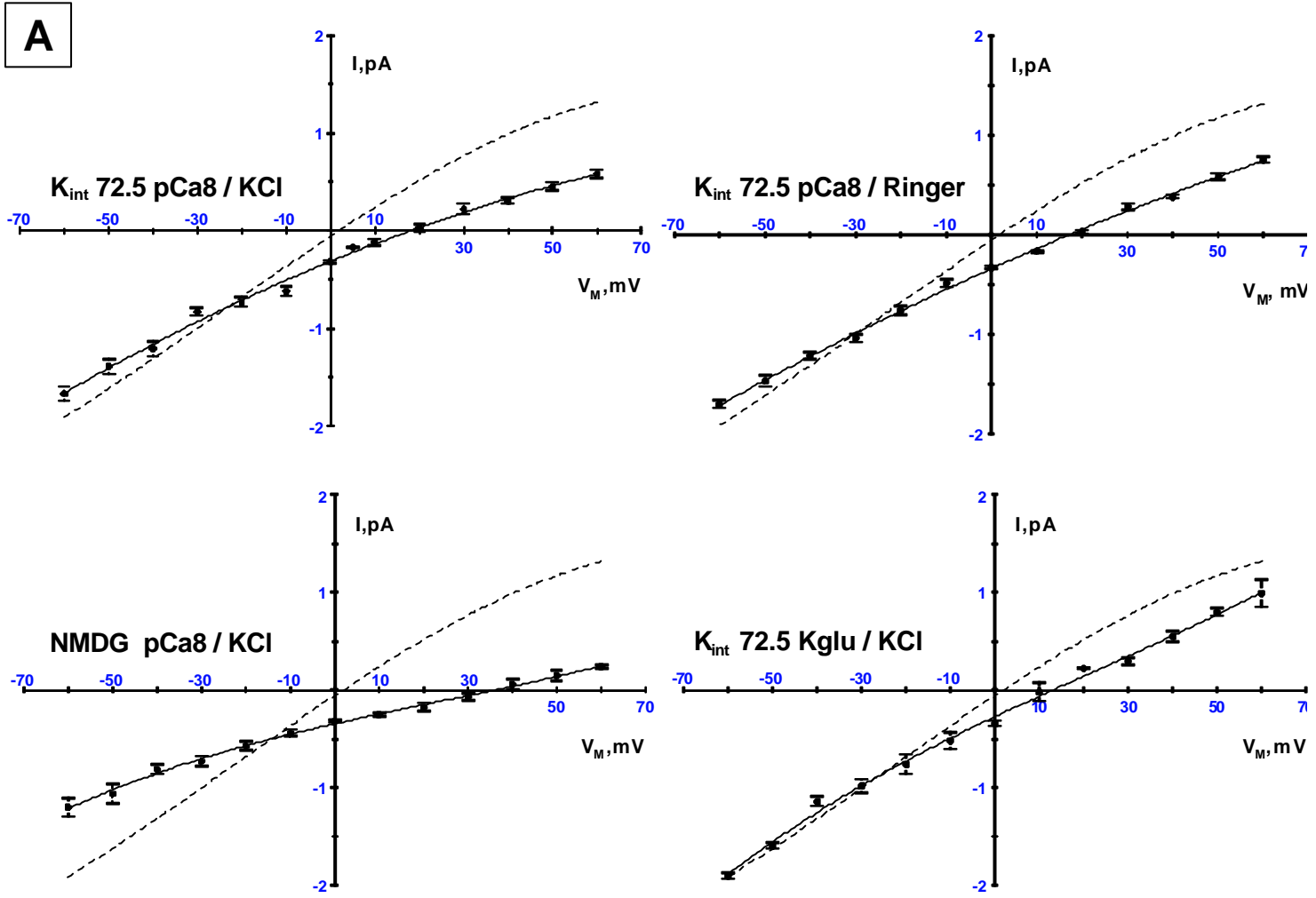
- La membrane du globule rouge de truite possède donc un canal chlore à conductance linéaire de 5.3 pS.

2.3. Enregistrement de l'activité d'un canal cationique non sélectif sur la membrane des érythrocytes en configuration « inside-out ».

Si un canal cationique non sélectif est spontanément actif en configuration « cell-attached », il demeure actif après excision du fragment de membrane contenu sous la pipette de « patch ».

2.3.1. Détermination de la perméabilité aux cations et de la conductance du canal.

Des enregistrements caractéristiques de l'activité du canal cationique non sélectif en configuration « inside-out » à différents potentiels de membrane sont présentés sur la **figure 15. A.** Dans cette configuration, en présence de K_{int} pCa 8 sur la face cytosolique et de KCl 145 mM (pCa 3) dans la pipette, la relation courant-voltage obtenue (**Fig. 15. B.** et **Fig. 16. B.**) présente un potentiel d'inversion de 5.4 ± 1.3 mV ($n=52$). La relation courant-voltage présente également une légère rectification dans le sens des courants entrants (**Fig. 15.B.**). En effet, la conductance pour les courants entrants ($\gamma_{[-60;E_{rev}]}$) entre -60 mV et E_{rev} est de



30.0 ± 1.6 pS (n=52) alors qu'elle n'est que de 18.0 ± 1.1 pS (n=52) entre E_{rev} et + 60 mV pour les courants sortants. La conductance au potentiel d'inversion ($\gamma_{E_{rev}}$) est pour sa part de 27.6 ± 1.3 pS (n=52, **Fig. 15. B.** et **Fig. 16. B.**).

La sélectivité du canal cationique non sélectif vis-à-vis des cations et des anions a été déterminée en prenant la valeur du potentiel d'inversion (E_{rev}) mesurée sur la courbe courant-voltage lorsque la solution de bain K_{int} pCa 8 est remplacée par une solution dite K_{int} $\frac{1}{2}$ pCa 8, dans laquelle les concentrations en Cl^- et K^+ sont diminuées de moitié (72.5 mM). La valeur de E_{rev} , permet alors, d'après l'**équation 18**, dérivée de l'équation de GHK, de déterminer le rapport apparent de sélectivité P_{cation}/P_{anion} . Dans ces conditions de substitution, le potentiel d'inversion est de 17.2 ± 0.7 mV (n=18), comme le montre la **figure 16.** Cette valeur est très proche de la valeur théorique du potentiel d'équilibre de Nernst calculé pour les cations dans ces conditions (+17.5 mV) et est significativement différente ($p < 0.05$) de la valeur obtenue en condition K_{int} pCa 8 dans le bain et KCl 145 mM dans la pipette (5.4 ± 1.3 mV, n=52). La valeur du rapport de perméabilité relative P_{cation}/P_{anion} est alors de 76.4 ± 12.3 (n=18).

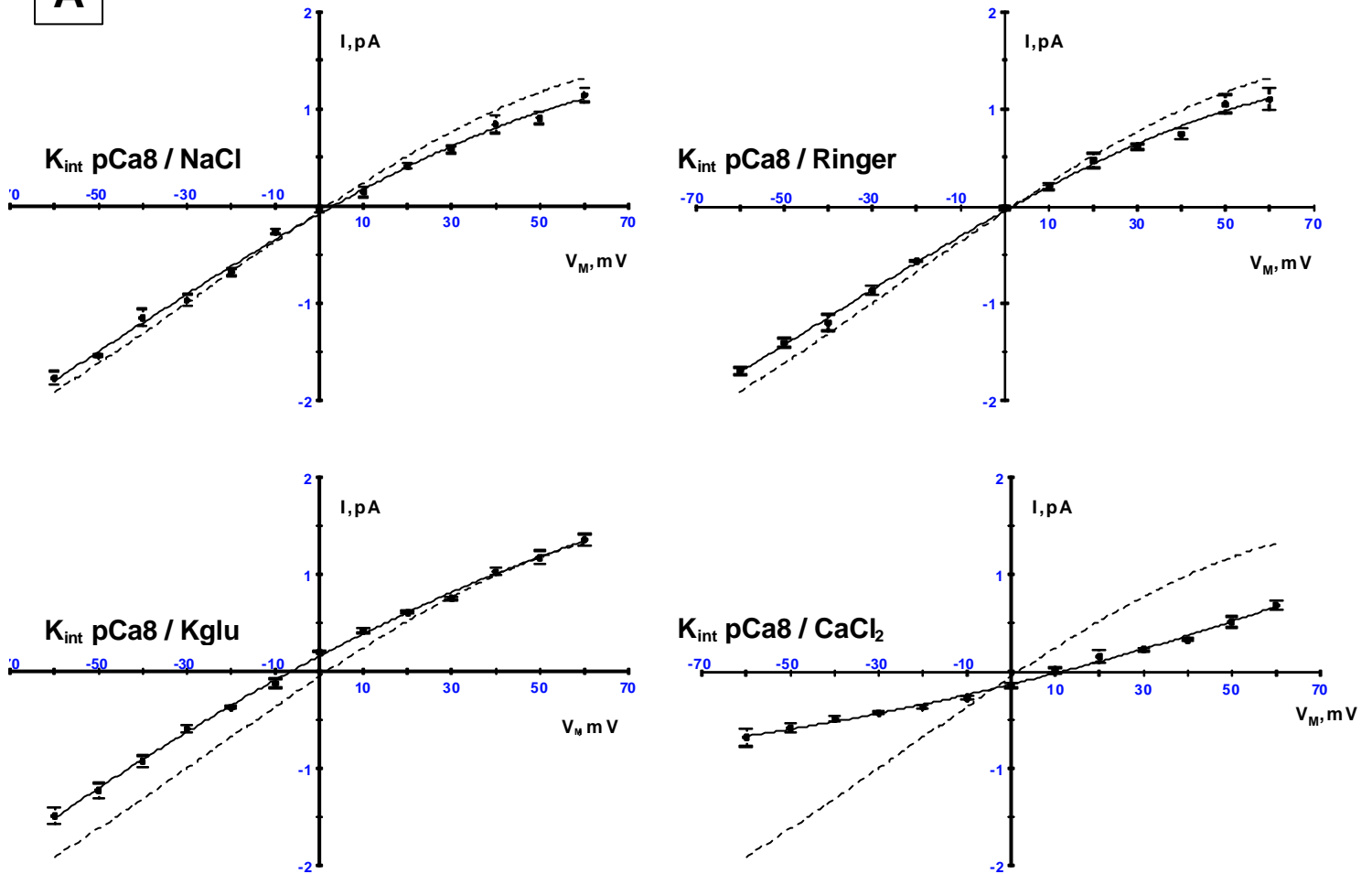
Ce rapport de perméabilité relative n'est pas modifié lorsque la solution de remplissage de la pipette (KCl 145 mM) est remplacée par du Ringer. En effet, le potentiel de réversion est alors de 17.8 ± 0.5 mV (n=12), et le rapport de sélectivité relative P_{cation}/P_{anion} de 73.6 ± 0.8 (n=12). Les conductances pour les courants entrants et sortants sont similaires à celles observées en condition K_{int} $\frac{1}{2}$ KCl 145 mM, puisqu'elles sont respectivement de 22.0 ± 0.8 pS et 18.1 ± 1.1 pS (n=12). En conditions K_{int} $\frac{1}{2}$ KCl 145 mM, la conductance pour les courants entrants est de 21.3 ± 1.1 pS (n=18), et les conductances pour les courants sortants et au potentiel d'inversion sont de 14.2 ± 0.7 pS et 18.8 ± 1.5 pS respectivement (n=18). Toutefois, il convient de noter que ces conductances mesurées après diminution de la concentration en KCl, sont légèrement inférieures à celles obtenues en configuration K_{int} pCa 8 / KCl. Cette diminution de la conductance est attribuable au

décalage de la courbe, ainsi qu'à la diminution de l'activité des ions par réduction de leur concentration.

Le remplacement de la solution de bain par une solution de N-méthyl-D-glucamine pCa 8 (**Tab. 3.**) confirme la nature cationique de ce canal (**Fig. 16.**). En effet, dans ces conditions expérimentales, le potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage est décalé vers des potentiels plus positifs, à une valeur de 42.5 ± 3.0 mV (n=17), attestant que ce cation est incapable de traverser le canal. Le canal présente de ce fait un rapport apparent de perméabilité P_K/P_{NMDG} (calculé à partir de l'équation 18) de 7.75 ± 0.56 (n=17). Les conductances des courants entrants et sortants sont également diminuées de manière significative ($p < 0.05$) par rapport aux conditions de contrôle K_{int} pCa 8/KCl 145 mM dans ces conditions expérimentales. En effet, la conductance pour les courants entrants n'est plus que de 13.6 ± 1.0 pS (n=17, $p < 0.05$), alors que pour les courants sortants, elle n'est plus que de 09.9 ± 1.2 pS (n=17, $p < 0.05$). Cette diminution de conductance peut une fois encore être attribuée au décalage de la relation courant-voltage.

De plus, le remplacement de 50 % des ions Cl⁻ baignant la face cytosolique de la membrane par du gluconate de potassium (K_{int} 72.5 Kglu, **Tab. 3.**) ne modifie pas les grandeurs électriques caractéristiques de la relation courant-voltage obtenue dans ces nouvelles conditions expérimentales par rapport aux conditions K_{int} pCa 8/KCl 145 mM (**Fig. 16.**). Les conductances ne sont pas modifiées de manière significative, et le potentiel d'inversion de la courbe, bien que décalé à $+10.3 \pm 2.0$ mV (n=6 **Fig. 16.**), ne subit pas de variation significative imputable aux modifications du milieu de bain. Ce décalage de E_{rev} est en effet attribuable à l'apparition des potentiels de jonction non corrigibles qui apparaissent avec le gluconate, mais également au fait que l'activité du potassium est diminuée lorsque celui-ci est accompagné d'un sel comme le gluconate.

A



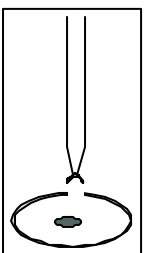
B

	γ [-60 ; E_{rev}] (pS)	γ E_{rev} (pS)	γ [E_{rev} ; +60] (pS)	E_{rev} (mV)
K_{int} pCa8 / NaCl 145 mM (n=12)	29.9 ± 2.5	25.2 ± 1.3	19.6 ± 1.4	2.6 ± 0.4
K_{int} pCa8 / Ringer (n=8)	28.0 ± 0.9	24.5 ± 1.0	19.5 ± 0.8	1.2 ± 0.5
K_{int} pCa8 / Kglu 145 mM (n=15)	28.3 ± 1.2	22.5 ± 0.9	18.5 ± 0.7	-7.6 ± 0.8*
K_{int} pCa8 / CaCl₂ 72.5 mM (n=13)	9.2 ± 0.8*	10.8 ± 1.4*	12.7 ± 0.7*	9.9 ± 1.5*

Figure 17. : Caractérisation en configuration « inside-out » de la sélectivité du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain.

A : Relations courant-voltage du canal obtenues en présence de différentes solutions de pipette. Les courbes en pointillés représentent la relation courant-voltage établie en présence de KCl 145 mM dans la pipette et de K_{int} pCa 8 dans le bain. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne ± SEM (Erreur standard à la moyenne) de n enregistrements réalisés dans chacune des configurations.

B : Tableau des conductances (γ) du canal dans les différentes configurations de bain et de pipette. γ [-60 ; E_{rev}] ; γ [E_{rev} ; +60] sont calculées dans chaque partie de la courbe correspondante, E_{rev} potentiel d'inversion calculé, γE_{rev} conductance calculée au potentiel d'inversion de la courbe. * indique une différence significative entre les moyennes ($p < 0.05$), testé par rapport à la configuration K_{int} pCa 8/KCl à l'aide d'un test t de Student.



Le remplacement du KCl 145 mM dans la pipette par du NaCl 145 mM ou du Ringer (**Tab. 3.**) ne modifie pas la conductance du canal, que ce soit pour les courants entrants ou les courants sortants. En effet, lorsque la pipette contient du NaCl, la conductance pour les courants entrants est de 29.9 ± 2.5 pS ($n=12$) et de 19.6 ± 1.4 pS ($n=12$) pour les courants sortants (**Fig. 17. A. et B.**). De la même manière, lorsque la pipette est remplie d'une solution de Ringer, les conductances pour les courants entrants et sortants sont respectivement de 28.0 ± 0.9 pS ($n=8$) et 19.5 ± 0.8 pS ($n=8$) (**Fig. 17. A. et B.**). Les potentiels d'inversions obtenus dans ces deux dernières configurations ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus lorsque la pipette contient du KCl 145 mM. Ils sont en effet de 2.6 ± 0.4 mV ($n=12$) lorsque la pipette est remplie d'une solution de NaCl 145 mM et de 1.2 ± 0.5 mV ($n=8$) lorsqu'elle contient une solution de Ringer (**Fig. 17. A. et B.**), ceci indiquant que le canal cationique non sélectif est capable de laisser passer avec autant de facilité le sodium et le potassium. En effet, les potentiels d'inversion observés dans ces différentes conditions sont très proches du potentiel d'équilibre des cations calculé dans ces conditions (0 mV). Le calcul des rapports de sélectivité relative, établis à partir de l'équation de GHK, donne un rapport P_K^+/P_{Na}^+ de 0.92 ± 0.02 ($n=12$), lorsque la pipette contient du NaCl 145 mM et la solution de bain du K_{int} pCa 8.

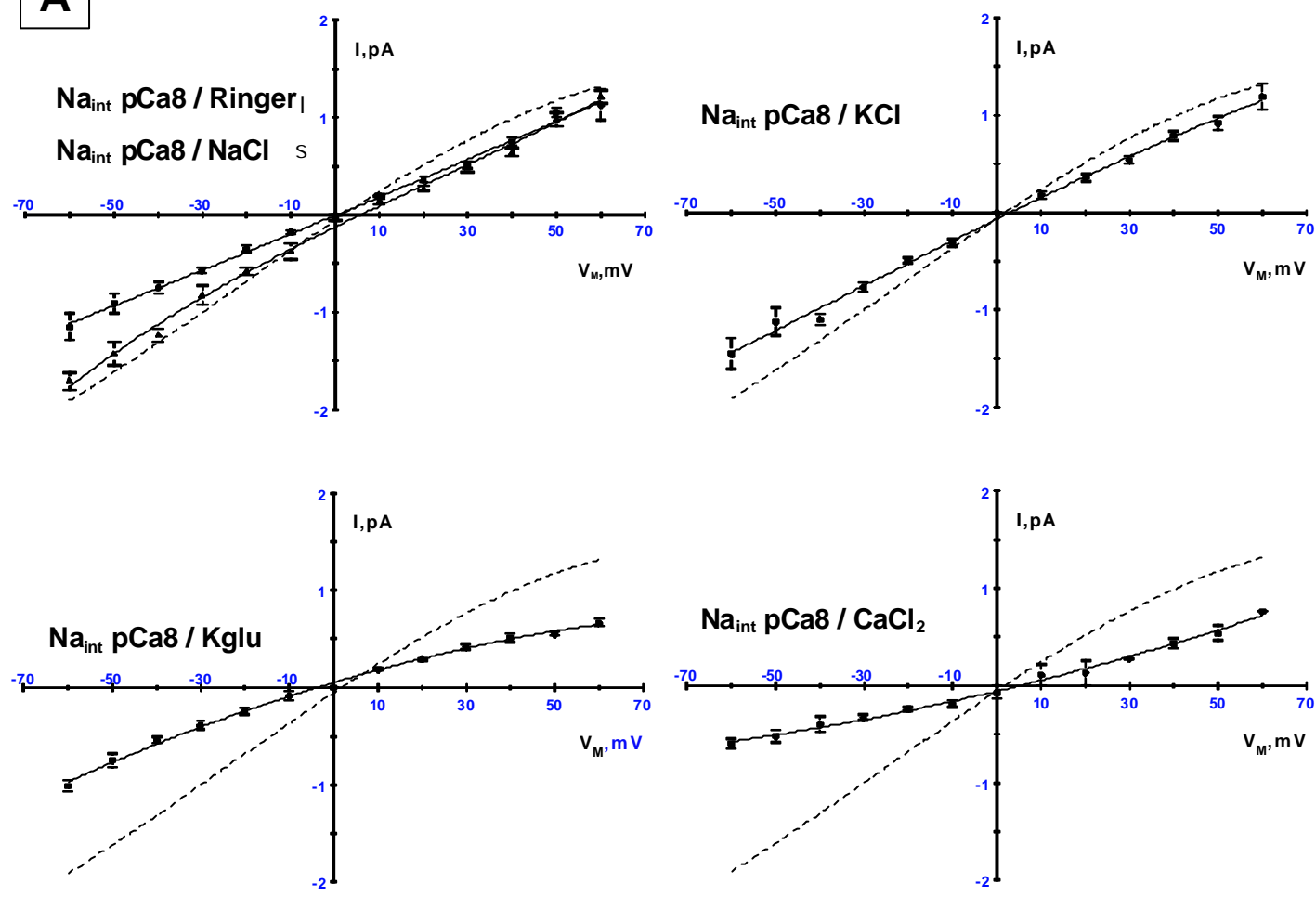
Lorsque la solution de remplissage de la pipette est constituée de gluconate de potassium (**Tab. 3.**), aucune modification significative de la conductance n'est observée. En effet, la conductance pour les courants entrants est alors de 28.3 ± 1.2 pS ($n=15$) et de 18.5 ± 0.7 pS ($n=15$) pour les courants sortants (**Fig. 17.**). En revanche, le potentiel d'inversion (E_{rev}) de la courbe courant-voltage obtenu dans ces conditions est significativement différent de celui obtenu en configuration K_{int} pCa 8 dans le bain et KCl 145 mM dans la pipette. Alors que le potentiel d'inversion obtenu en configuration K_{int} pCa 8/ KCl est de 5.4 ± 1.3 mV ($n=52$), il est de -7.6 ± 0.8 mV ($n=15$) lorsque le KCl de la pipette est remplacé par du gluconate de potassium (Kglu, $p<0.05$). Si le canal présentait effectivement une perméabilité anionique non négligeable, il serait logique d'observer un décalage opposé de la relation

courant-voltage. Selon toute vraisemblance, cette variation de E_{rev} peut être expliquée par l'apparition de potentiels de jonction non corrigibles durant l'expérience. Elle confirme cependant la sélectivité aux cations du canal.

L'analyse des courants en configuration « cell-attached » a permis de démontrer une perméabilité non négligeable du canal au calcium. Ainsi, la substitution dans la pipette d'une solution de CaCl_2 72.5 mM (**Tab. 3.**) à la place du KCl 145 mM, permet de mettre en évidence que ce canal est perméable au calcium (**Fig. 17. A. et B.**). Toutefois, en comparaison des valeurs obtenues lorsque la pipette contient du KCl 145 mM, les conductances sont significativement diminuées, tant pour les courants entrants que sortants. En effet, la conductance pour les premiers est de 9.2 ± 0.8 pS ($n=13$, $p<0.05$) au lieu de 30.0 ± 1.6 pS ($n=52$) tandis que, pour les seconds, elle chute de 18.0 ± 1.1 pS ($n=52$) à 12.7 ± 0.7 pS ($n=13$, $p<0.05$). La conductance au potentiel d'inversion (E_{rev}) diminue de plus de 50 %, passant de 27.6 ± 1.3 pS ($n=52$) à 10.8 ± 1.4 pS ($n=13$). Une telle diminution de la conductance est généralement observée pour les canaux cationiques non sélectifs lorsque le Ca^{2+} est utilisé comme substituant au potassium ou au sodium (Christensen et Hoffmann, 1992, Yeh *et al.*, 1997). Toutefois, le calcul du rapport de sélectivité relative P_K^+/P_{Ca}^{2+} calculé dans ces conditions à partir de la valeur des potentiels de réversion, donne un rapport de sélectivité de 0.61 ± 0.07 ($n=13$), suggérant que le calcium est plus perméant à travers le canal que le potassium.

Le remplacement de la solution K_{int} pCa 8 baignant la face cytosolique par une solution Na_{int} pCa 8 (**Fig. 18.**) indique que le remplacement du potassium par du sodium sur la face cytosolique ne modifie en rien les caractéristiques électriques de transport du canal. Aussi les conductances pour les courants entrants et sortants ne sont-elles pas modifiées par rapport aux conditions de référence établies en conditions K_{int} pCa 8/KCl 145 mM. Elles sont en effet pour les courants entrants de 29.8 ± 2.1 pS ($n=27$), et de 30.1 ± 2.0 pS ($n=8$)

A



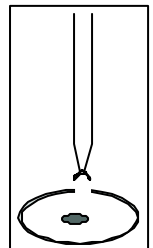
B

	$\gamma [-60 ; E_{rev}]$ (pS)	γE_{rev} (pS)	$\gamma [E_{rev} ; +60]$ (pS)	E_{rev} (mV)
Na_{int} pCa8 / KCl 145 mM (n=27)	29.8 ± 2.1	22.5 ± 1.5	17.3 ± 1.1	2.5 ± 0.6
Na_{int} pCa8 / NaCl 145 mM (n=8)	30.1 ± 2.0	24.0 ± 1.0	19.6 ± 0.8	4.6 ± 1.1
Na_{int} pCa8 / Ringer (n=8)	23.2 ± 1.4	19.0 ± 1.2	19.4 ± 2.3	0.2 ± 0.5
Na_{int} pCa8 / Kglu 145 mM (n=12)	17.7 ± 1.3*	12.6 ± 0.8*	13.3 ± 0.7*	-2.5 ± 1.5*
Na_{int} pCa8 / CaCl₂ 72.5 mM (n=8)	8.3 ± 0.6*	10.6 ± 1.4*	10.2 ± 0.1*	4.6 ± 0.3*

Figure 18. : Caractérisation en configuration « inside-out » de la sélectivité du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite en présence de Na_{int} pCa 8 dans le bain.

A : Relations courant-voltage du canal en présence de différentes solutions de pipette. Les courbes en pointillés représentent la relation courant-voltage établie en présence de K_{int} pCa 8 / KCl 145 mM. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne ± SEM (Erreur standard à la moyenne) de n enregistrements réalisés dans chacune des configurations.

B : Tableau des conductances (γ) du canal dans les différentes configurations de bain et de pipette. $\gamma [-60 ; E_{rev}]$; $\gamma [E_{rev} ; +60]$ sont calculées dans chaque partie de la courbe correspondante, E_{rev} potentiel d'inversion calculé, γE_{rev} conductance calculée au potentiel d'inversion de la courbe. * indique une différence significative entre les moyennes ($p < 0.05$, testé par rapport à la configuration K_{int} pCa 8/KCl à l'aide d'un test t de Student).



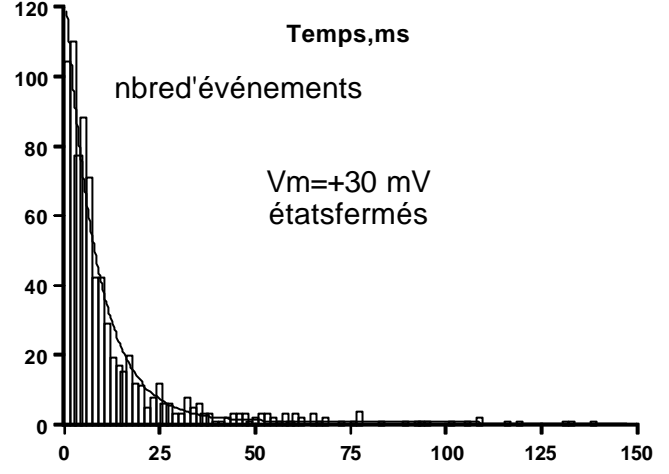
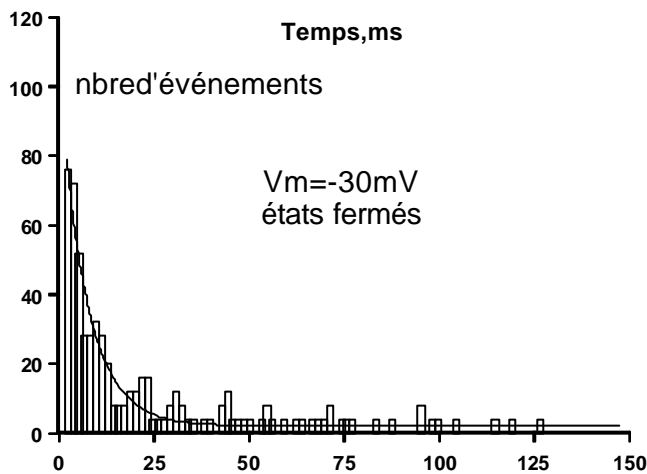
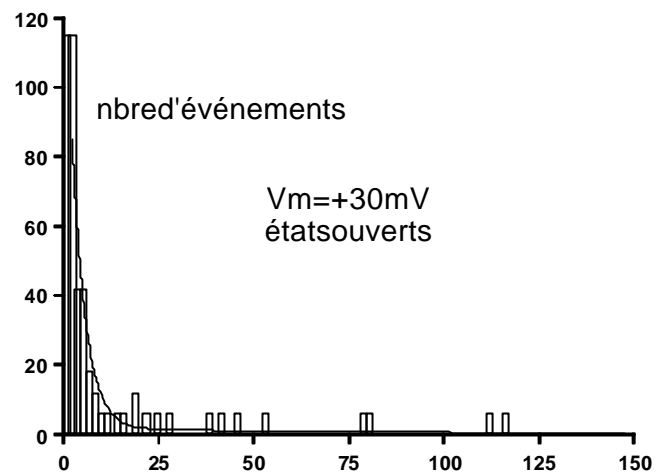
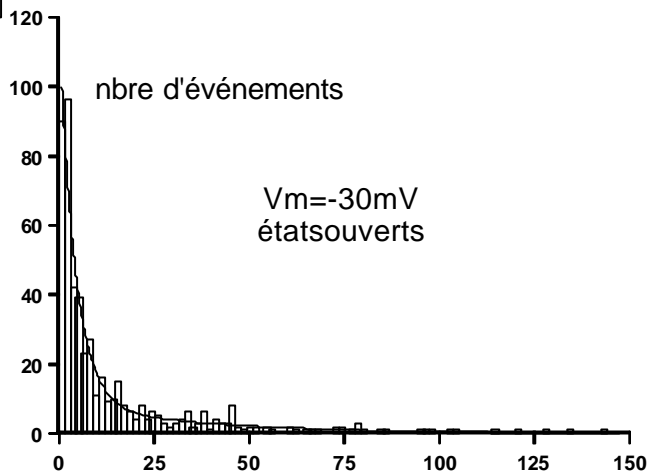
lorsque les pipettes contiennent respectivement du KCl 145 mM ou du NaCl 145 mM (**Fig. 18.**). De même, les conductances pour les courants sortants demeurent inchangées après remplacement de la solution cytosolique par une solution Na_{int} . La conductance entre E_{rev} et +60 mV est en effet de 17.3 ± 1.1 pS ($n=27$) lorsque la pipette contient une solution KCl 145 mM et de 19.6 ± 0.8 pS ($n=8$) lorsqu'elle est remplie d'une solution NaCl 145 mM. Les potentiels d'inversion dans ces deux dernières conditions sont très proches du potentiel d'équilibre de Nernst théorique pour les cations, puisqu'ils sont de $+2.5 \pm 0.6$ mV ($n=27$, pipette KCl) et de $+4.6 \pm 1.1$ mV ($n=8$, pipette NaCl), ce qui confirme que le canal ne présente pas de différence de sélectivité vis-à-vis du potassium et du sodium, même lorsque ce dernier est présent sur la face cytosolique de la membrane. Un résultat similaire est obtenu lorsque la solution de pipette contient du Ringer ($n=8$, **Fig. 18. A. et B.**), bien que la conductance pour les courants entrants (c'est-à-dire le passage des cations de la solution de pipette vers le bain) soit diminuée par rapport à celle obtenue lorsque les pipettes contiennent des solutions de KCl 145 mM ou de NaCl 145 mM. Toutefois, cette différence de conductance pour les courants entrants n'est pas significative.

Par ailleurs, en présence de Na_{int} pCa 8 dans le bain, le remplacement dans la pipette du chlore (KCl 145 mM) par du gluconate (KGlu 145 mM) produit une diminution des courants entrants et sortants nettement supérieure à celle observée lorsque la solution de bain est constituée de K_{int} pCa 8. En effet, les conductances observées pour les courants entrants et sortants sont significativement différentes de celles observées, non seulement en présence d'une solution K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette ($p<0.05$), mais encore de celles observées en présence de K_{int} PCa 8 dans le bain et de K-gluconate 145 mM dans la pipette ($p<0.05$). En effet, la conductance pour les courants entrants, qui est dans ces conditions de 17.7 ± 1.3 pS ($n=12$), est diminuée de $41 \% \pm 3$ par rapport à la condition de référence K_{int} pCa 8/KCl (30.0 ± 1.6 pS, $n=52$, $p<0.05$) et de $38 \% \pm 2$ par rapport aux conditions K_{int} pCa 8 /K-gluconate (28.3 ± 1.2 pS, $n=15$, $p<0.05$). Cette

diminution de la conductance dans le sens des courants entrants résulte vraisemblablement de la diminution de l'activité des ions sodium en solution avec du gluconate.

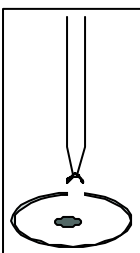
En outre, dans ces conditions de solution baignant la face cytosolique (Na_{int} pCa 8), le canal reste perméable au calcium, comme le montre la **figure 18**. Toutefois, la même diminution des conductances est observée, tant dans le sens des courants entrants ou sortants, que lorsque la solution de bain est constituée de K_{int} pCa 8. De plus, le calcul du rapport de sélectivité relatif, calculé à partir des potentiels d'inversion des courbes courant - voltage entre le sodium et le calcium, donne un ratio apparent de 0.83 ± 0.08 ($n=8$), ce dernier résultat confirmant que le canal est plus perméant aux ions Ca^{2+} qu'aux ions Na^+ et K^+ .

- Un canal cationique non sélectif (CNS), identique à celui observé en configuration « cell-attached » et présentant une légère rectification entrante est enregistré en configuration « inside-out » sur la membrane des érythrocytes de truite.
- Ce canal présente une très forte perméabilité aux cations par rapport aux anions, avec un rapport de sélectivité apparent de $P_{\text{cation}}/P_{\text{anion}}$ de 76 ± 12 ($n=18$).
- Le canal cationique non sélectif est perméant au K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Il présente un rapport de perméabilité relative par rapport au K^+ de $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}/P_{\text{Ca}}$: $1/0.92/0.62$.
- En revanche, le canal est imperméant au cation NMDG et le remplacement du chlore par du gluconate ne modifie pas les caractéristiques électriques du canal.

A**B**

	τ_{o1} (ms)	τ_{o2} (ms)	τ_{c1} (ms)	τ_{c2} (ms)
$V_m = -30 \text{ mV}$ (n=21)	6.2 ± 0.8	74.1 ± 9.4	3.9 ± 0.4	79.2 ± 9.1
$V_m = +30 \text{ mV}$ (n=21)	4.4 ± 0.6	60.7 ± 7.2	6.3 ± 1.0	81.3 ± 10.8

Figure 19. : Caractérisation en configuration « inside-out », de la cinétique de l'activité du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.



A : Histogramme des temps de résidence du canal dans chaque état (ouvert ou fermé) aux potentiels de membrane $V_M = -30 \text{ mV}$ et $V_M = +30 \text{ mV}$. Courbe représentative de 21 enregistrements réalisés en configuration $K_{int} \text{ pCa } 8 / \text{KCl } 145 \text{ mM}$.

B : Tableau récapitulatif des constantes d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c). Les valeurs des différentes constantes sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) des valeurs obtenues à partir de n enregistrements de l'activité du canal dans ces conditions.

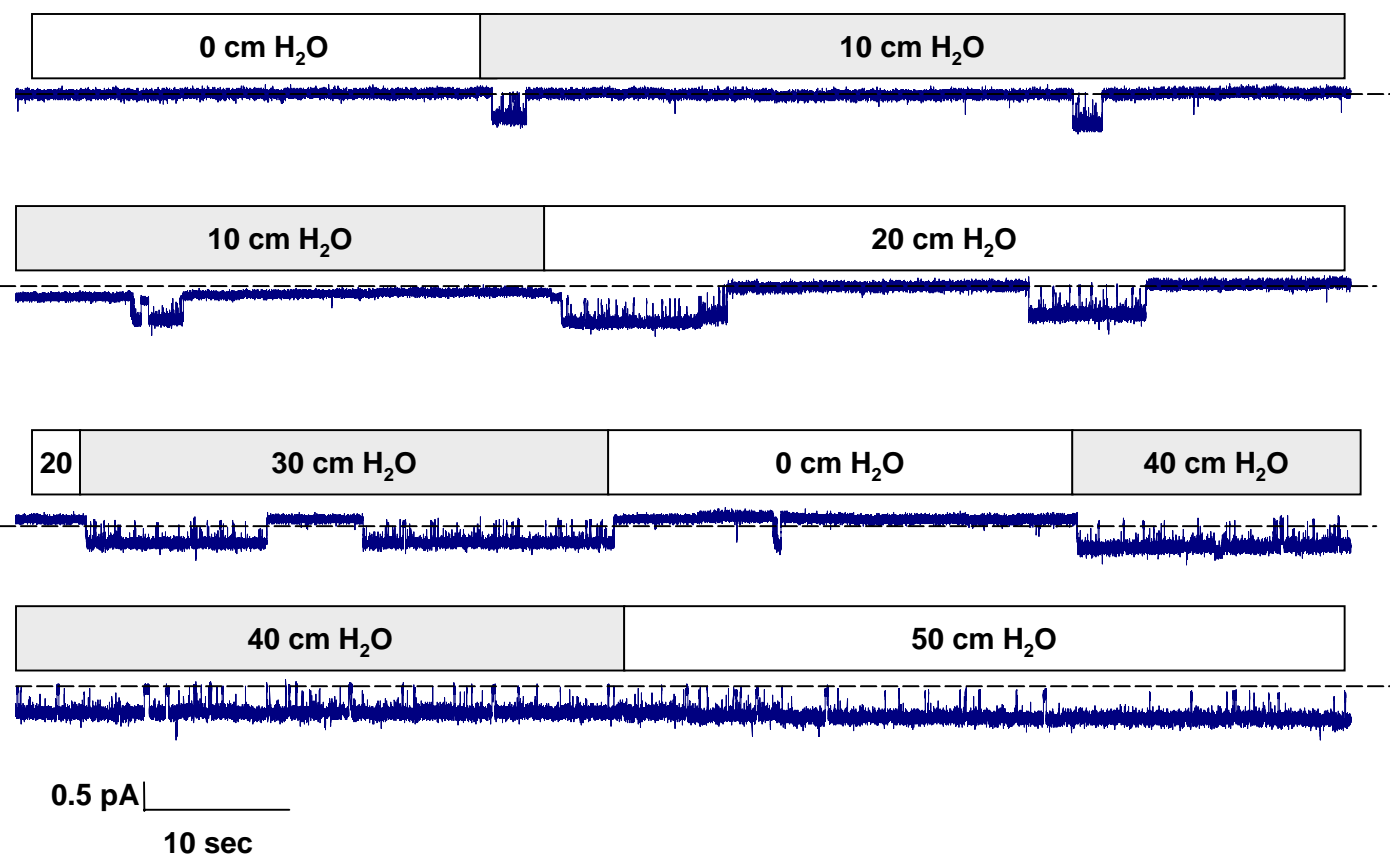
2.3.2. Analyse cinétique de l'activité du canal cationique non sélectif.

Les enregistrements retenus pour l'analyse de la cinétique de l'activité du canal cationique non sélectif ont été obtenus en configuration K_{int} pCa 8 sur la face cytosolique de la membrane et KCl 145 mM dans la pipette. L'analyse des enregistrements a été effectuée à +30 et -30 mV. Tous ces enregistrements ne comportaient qu'une seule copie du canal cationique non sélectif spontanément active. Les valeurs de ces constantes de temps sont présentées dans la **figure 19.**, ainsi qu'un histogramme du temps de résidence du canal dans chaque état, ouvert ou fermé, pour chaque voltage choisi. L'activité du canal est caractérisée par deux constantes de temps d'ouverture et de fermeture, que ce soit lorsque la membrane est dépolarisée ou lorsqu'elle est hyperpolarisée. Toutefois, il apparaît sur la majorité des enregistrements une troisième constante, tant d'ouverture que de fermeture, supérieure à 150 ms, et ce quel que soit le voltage imposé. Cependant, il n'a pas été possible d'analyser cette constante dans le cadre de cette étude, puisqu'aucune moyenne chiffrable ne se dégageait des enregistrements. De plus, ces longues périodes d'ouverture et de fermeture ne sont jamais entrecoupées de changements d'états de conduction du canal. En effet, le seuil d'exclusion de transition retenu est de 0.15 ms et aucun événement supérieur à cette limite ne vient interrompre ces ouvertures ou fermetures supérieures à 150 ms.

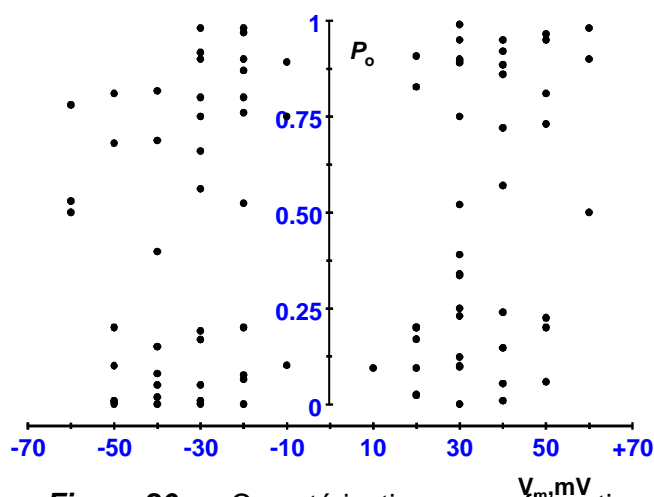
En outre, plusieurs copies du canal étaient fréquemment actives simultanément sous la pipette de « patch ». En effet, sur les 801 cellules qui présentaient une activité typique du canal cationique non sélectif (soit 85 % des scellements réussis), 62% présentaient un canal actif, 32 % deux canaux actifs, 4 % trois canaux et 2 % quatre et plus. Le nombre de canaux simultanément actifs est indépendant du potentiel imposé à la membrane.

- La cinétique de l'activité du canal cationique non sélectif peut être décrite par deux constantes d'ouverture et deux constantes de fermeture quel que soit le potentiel de membrane ($V_m = \pm 30$ mV).

A



B



C

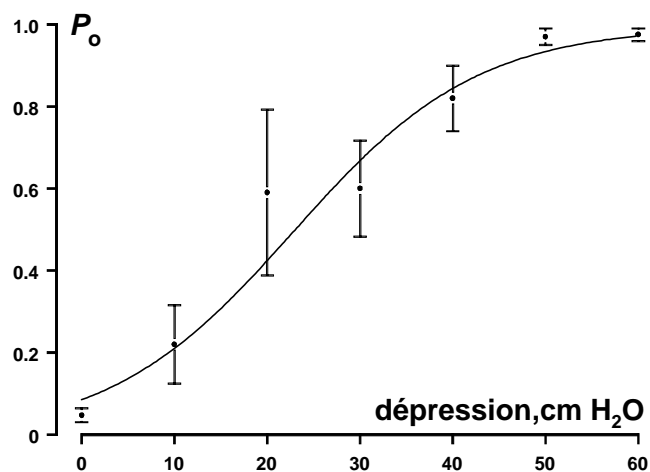


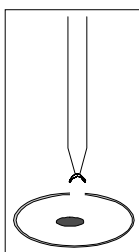
Figure 20. : Caractérisation en configuration « inside-out » du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.

Effet de la déformation de la membrane (« stretch ») sur l'activité du canal cationique non sélectif.

A : Enregistrement caractéristique de l' effet de la dépression dans la pipette sur l'activité du canal cationique non sélectif. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Configuration « inside-out » ($V_m = -20 \text{ mV}$) K_{int} PCA 8 dans le bain, KCl 145 mM dans la pipette.

B : Relation probabilité d'ouverture du canal cationique non sélectif en fonction du potentiel de membrane.

C : Relation probabilité d'ouverture en fonction de la dépression, établie lorsque le canal cationique non sélectif n'était pas spontanément actif (10 % des cas).



2.3.3. mécano-sensibilité du canal cationique non sélectif en configuration « inside-out ».

Un des facteurs susceptibles de modifier l'activité du canal cationique est vraisemblablement la déformation de la membrane qui fait suite à l'application d'une succion dans la pipette.

Dans 90 % des « seals » présentant une activité typique du canal cationique non sélectif, ce dernier était spontanément actif. Toutefois, dans 10 % des cas restants, cette activité pouvait être induite par l'application d'une dépression sub-atmosphérique appliquée à la pipette de « patch ».

La **figure 20.** illustre la sensibilité à la dépression du canal cationique non sélectif ($V_m = -20$ mV). Alors que les dépressions inférieures à 10 cm d'eau ne suffisent pas à provoquer une quelconque modification de la probabilité d'ouverture du canal, lorsque celui-ci est quiescent sous la pipette de patch, les dépressions supérieures à cette valeur induisent une augmentation progressive de l'activité du canal. Cette augmentation de la probabilité d'ouverture du canal est alors fonction de la dépression appliquée à la pipette (**Fig. 20.C.**). De plus, dans la majorité des cas (67 %), le relâchement de la dépression induit une baisse de l'activité du canal. Ces résultats suggèrent, selon la définition de Sackin (1995), que ce canal appartient à la famille des canaux « stretch-activés ». En revanche, la probabilité d'ouverture ne peut être liée au voltage imposé à la membrane (**Fig. 20. B.**), et ce quelles que soient les configurations de bain et de pipette utilisées.

- La probabilité d'ouverture du canal cationique non sélectif n'est pas dépendante du potentiel de membrane.
- La probabilité d'ouverture du canal peut être modulée par un étirement provoqué de la membrane.

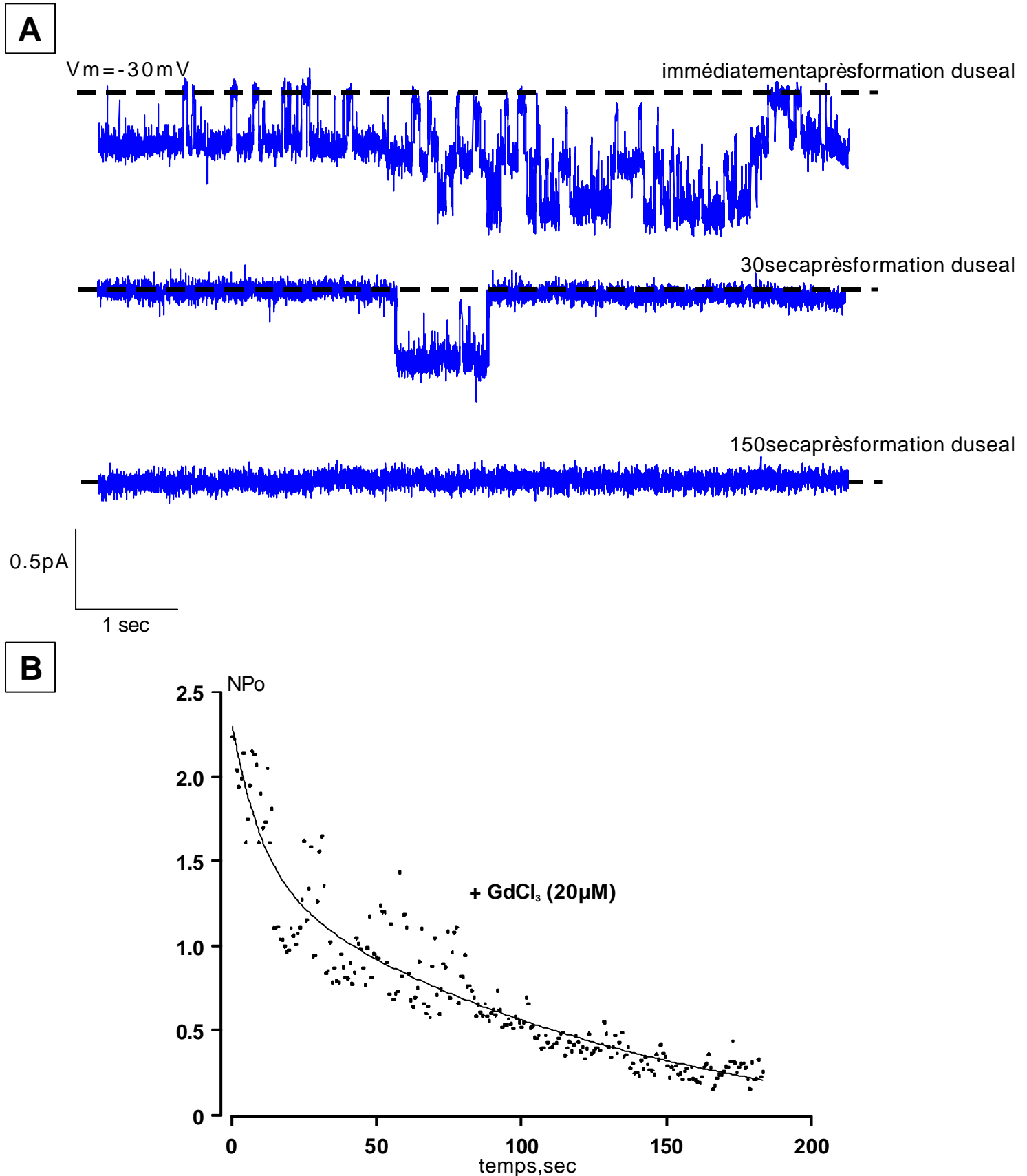
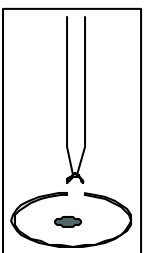


Figure 21. : Caractérisation de l'inhibition du canal cationique non sélectif (CNS) par le gadolinium (GdCl_3) extracellulaire (20 μM) en configuration « inside-out ».

A : Enregistrement caractéristique de l'action du GdCl_3 (20 μM dans la pipette) sur l'activité du canal. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. K_{int} pCa 8 dans le bain, KCl 145 mM dans la pipette, $V_m = -30 \text{ mV}$, traces représentatives de 8 enregistrements différents.

B : Evolution de l'activité du canal cationique non sélectif (NPo) après formation du seal en présence de 20 μM de gadolinium dans la pipette. Courbe représentative de 8 expériences séparées.



2.3.4. Action d'agents pharmacologiques inhibiteurs sur l'activité du canal cationique non sélectif.

Une des caractéristiques communes à de nombreux canaux cationiques non sélectifs de la famille des « stretch-activés » est d'être sensibles au gadolinium lorsque celui-ci est appliqué sur la face externe de la membrane cytoplasmique.

En effet, depuis le premier rapport sur l'effet inhibiteur de cet ion de la série des Lanthanides sur le canal cationique non sélectif « stretch-activé » de l'ovocyte de xénope (Yang et Sachs, 1989), nombre de canaux de ce type dans différents types cellulaires se sont révélés sensibles à cet agent. Ceci a notamment été décrit pour les canaux CNS « stretch-activés » des cellules des tubules proximaux de rein de *Necturus maculosus* (Filipovic et Sackin, 1991), des cellules de la membrane apicale de la membrane de Reissner du gerbille (cellules de l'oreille interne) (Yeh *et al.*, 1997) et de bien d'autres types cellulaires (pour revue : Hamill et McBride, 1996).

De manière générale, le gadolinium (Gd^{3+}) bloque les canaux mécanosensibles dans une gamme de concentration allant de 1 à 100 μM , en agissant sur l'activité de ces derniers indépendamment d'une action sur le courant unitaire ou sur la sélectivité du canal (Hamill et McBride, 1996).

L'application de cet inhibiteur sur la face cytosolique du morceau de membrane contenant le canal ne modifie ni la cinétique, ni la probabilité d'ouverture, ni la conductance du canal ($n=6$).

En revanche, l'ajout de Gd^{3+} (20 μM) dans la pipette provoque une diminution progressive de la probabilité d'ouverture du canal après formation du scellement. L'extinction complète de l'activité du canal intervient au bout de 177 ± 53 s ($n=8$), lorsque le potentiel imposé à la membrane (V_m) est de -30 mV (**Fig. 21.**).

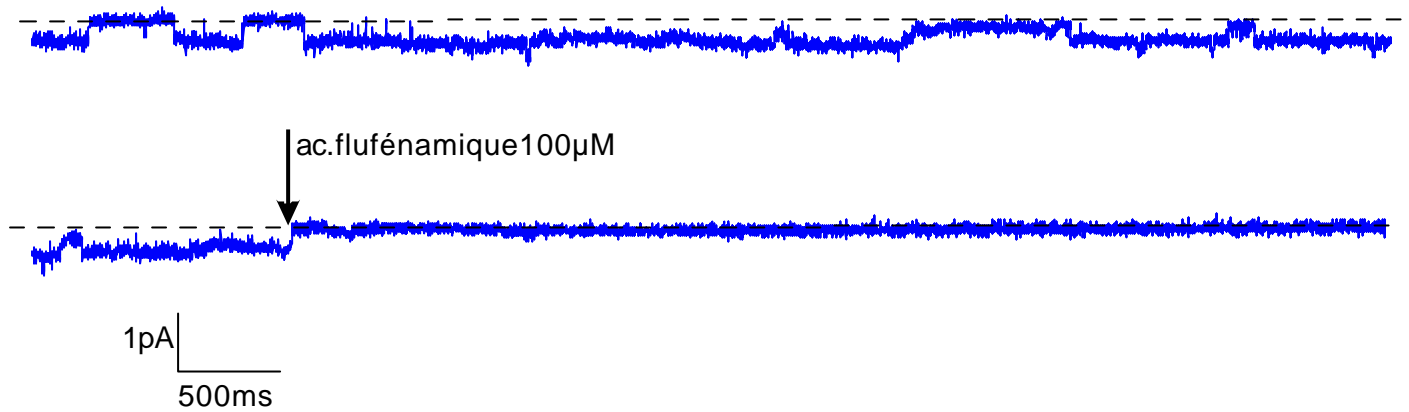
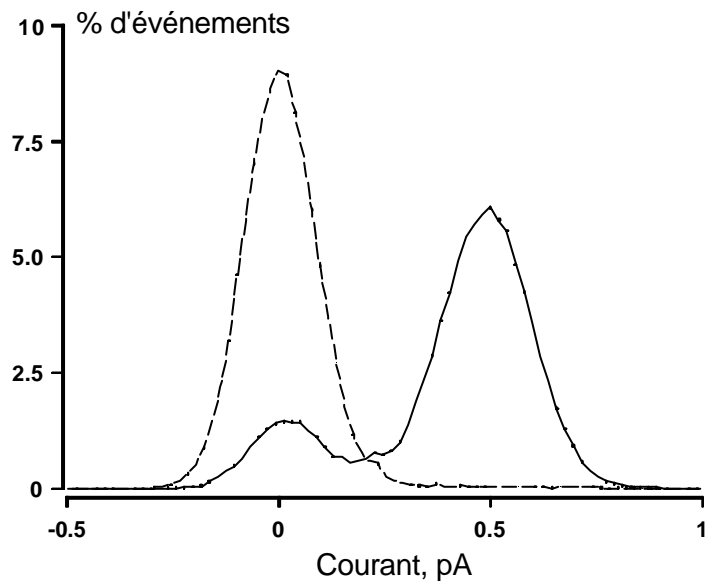
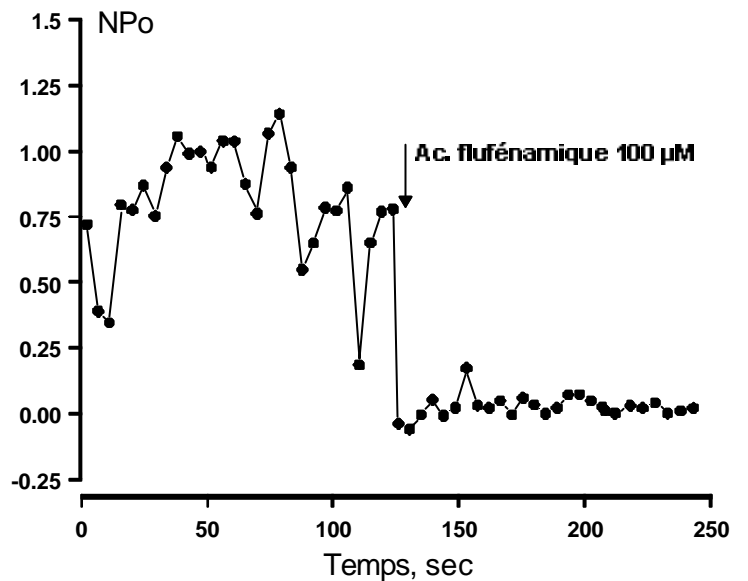
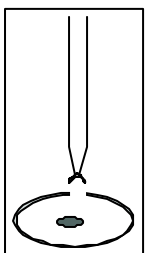
A $V_m = -20 \text{ mV}$ **B**— avant ac. flufenamique 100 μM - - - après ac. flufenamique 100 μM **C**

Figure 22. : Caractérisation en configuration « inside-out » de l'inhibition du canal cationique non sélectif par l'acide flufenamique (100 μM), en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain, KCl 145 mM dans la pipette.



A : Enregistrement caractéristique de l'action de l'acide flufenamique additionnée sur la face cytoplasmique (100 μM) sur l'activité du canal. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal, $V_m = -20 \text{ mV}$, $n=6$.

B : Histogramme d'amplitude des courants correspondants, en absence ou présence d'acide flufenamique (100 μM). Histogrammes représentatifs de 6 expériences réalisées dans ces conditions.

C : Evolution de l'activité du canal (NPo) avant et après ajout d'acide flufenamique (100 μM). Courbe représentative des 6 expériences réalisées dans ces conditions.

Cependant, cette inhibition dépend du potentiel de membrane. En effet, après blocage de l'activité du canal à $V_m = -30$ mV, cette inhibition est levée lorsque la membrane est dépolarisée. Une reprise d'activité est alors observée lorsque des potentiels de membrane positifs (V_m) sont appliqués à la membrane.

L'acide flufénamique (un dérivé du diphénylamine-2-carboxylate, DPC), généralement utilisé comme inhibiteur des transporteurs impliquant le chlore (Bande 3, canaux chlore, cotransport KCl, Cabantchik et Greger, 1992), est également signalé dans la littérature comme inhibiteur potentiel des canaux cationiques non sélectifs. Il provoque ainsi une diminution de la probabilité d'ouverture dans les cellules striales marginales en culture de gerbille (Yeh *et al.*, 1995), mais également dans les cellules de pancréas exocrines du rat (Gögelein *et al.*, 1990). Cependant, les canaux cationiques non sélectifs sur lesquels un tel effet inhibiteur est observé sont des canaux activés par l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et sensibles à l'augmentation de la concentration intracellulaire en nucléotides (canaux de type CAN), mais qui ne sont pas mécano-sensibles.

L'application de 100 μ M d'acide flufénamique sur la face cytosolique de la membrane en configuration «inside-out » provoque, dans 50 % des cas ($n=12$), une diminution de l'activité du canal, laquelle se traduit par une diminution de la probabilité d'ouverture sans modification du courant unitaire. La probabilité d'ouverture chute en effet de 89 ± 17 % ($n=6$).

La **figure 22.** présente un exemple des six expériences pour lesquelles l'inhibition a été effective ($n=12$). Cet exemple montre, en configuration « inside-out » en présence de K_{int} pCa 8 et de KCl 145 mM dans la pipette, la chute brutale de l'activité du canal après ajout de 100 μ M d'acide flufénamique. La **figure 22. C.** présente l'évolution du produit NPo après ajout de cet inhibiteur, montrant que l'inhibition est généralement totale. De plus, cette inhibition est irréversible et ne peut être levée par rinçage de la solution de bain par une

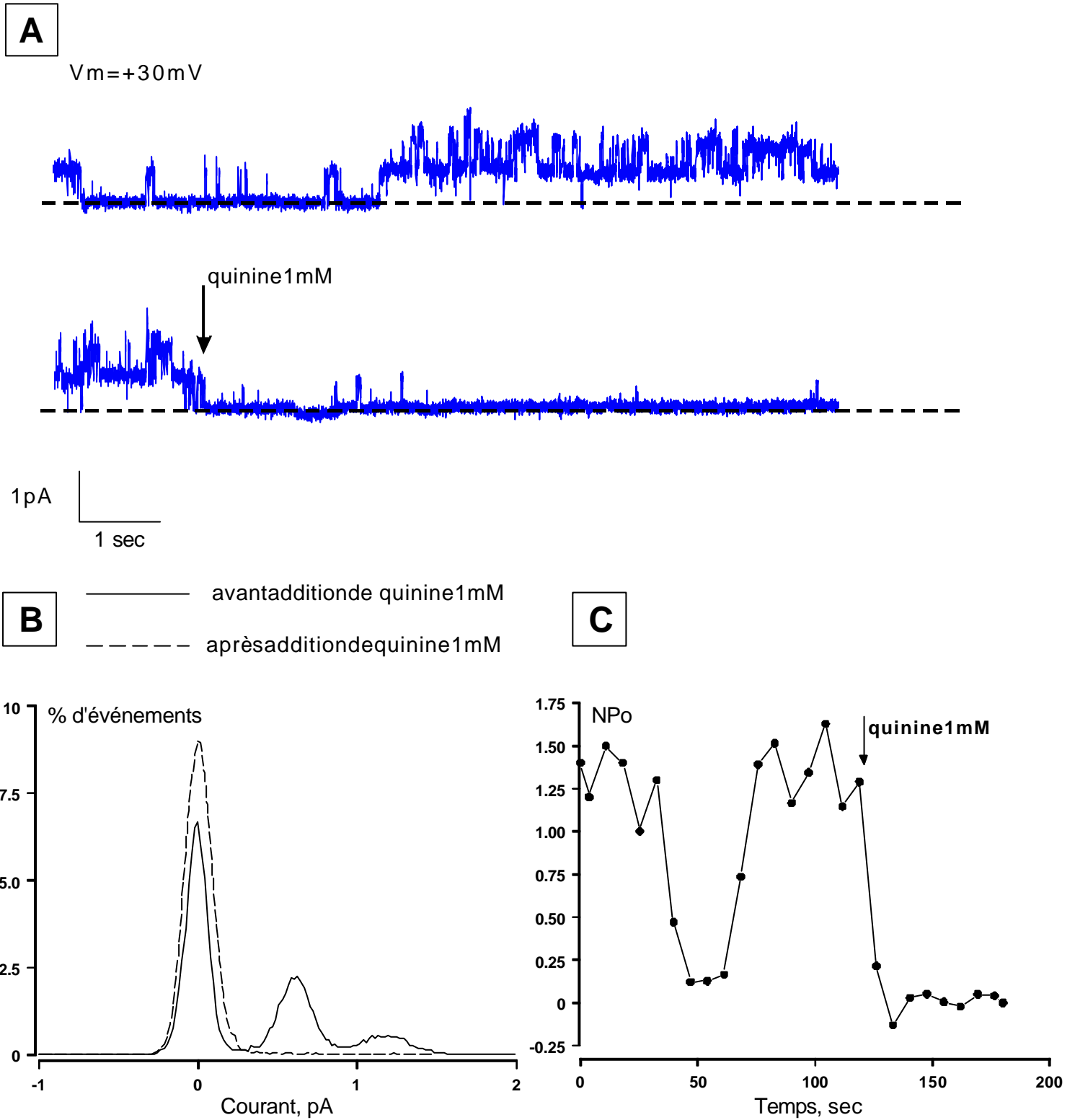
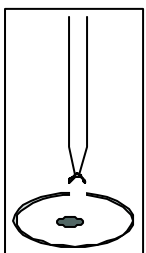


Figure 23. : Caractérisation en configuration « inside-out » de l'inhibition par la quinine (1 mM) du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.



A : Enregistrement caractéristique à $V_m = +30 \text{ mV}$ de l'action de la quinine (1 mM) sur l'activité du canal en présence de $K_{int} \text{ pCa } 8$ dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette. ($n=6$). La ligne pointillée indique l'état fermé du canal.

B : Histogramme d'amplitude des courants correspondants, en absence ou présence de quinine (1 mM). Courbe représentative de 6 expériences séparées.

C : Evolution de l'activité du canal cationique non sélectif (NPo) avant et après ajout de quinine (1 mM) sur la face cytoplasmique. Courbe représentative de 6 expériences séparées.

solution K_{int} pCa 8 dépourvue de l'inhibiteur. Le pourcentage de restauration de l'activité est alors de $7 \% \pm 6$ (n=4)

La quinine est un alcaloïde connu pour son effet inhibiteur sur les canaux potassiques, notamment les canaux K^+ de type Gardos (Armando-Hardy *et al.*, 1975). Toutefois, la quinine se révèle peu spécifique, compte tenu du fait que cette drogue est capable d'induire un effet inhibiteur sur de nombreux autres transporteurs, dont les canaux chlore rectifiés sortants (Gögelein et Capek, 1990), ou sur des canaux cationiques non sélectifs, dans la gamme du millimolaire. En effet, la quinine bloque les canaux cationiques non sélectifs des cellules isolées de côlon de rat (Gögelein et Capek, 1990), en induisant des transitions rapides entre l'état ouvert et l'état fermé du canal (inhibition de type « flicker block »), réduisant ainsi la probabilité d'ouverture de ce dernier.

Un tel effet inhibiteur, de type « flicker block », n'est pas observé dans le cas du canal cationique non sélectif de l'érythrocyte de truite, comme le montre l'enregistrement présenté sur la **figure 23.** En effet, l'inhibition par la quinine (1 mM) observée dans ce cas induit une diminution brutale de la probabilité d'ouverture (**Fig. 23. B et C.**), lorsque cet agent est appliqué sur la face cytosolique du canal à la concentration de 1 mM (n=6).

Toutefois, cette inhibition n'a été observée que dans 48 % des cas (n=14). La diminution de la probabilité d'ouverture est alors de $92 \pm 15 \%$. Il faut remarquer que l'inhibition par la quinine a toujours été signalée dans le cas de canaux cationiques non sélectifs activés par le calcium intracellulaire (Gögelein et Capek, 1990), ceci pouvant vraisemblablement expliquer l'absence d'inhibition de type « flicker block » observée dans le cas de l'érythrocyte de truite. Dans le cas des canaux de type CAN, l'induction d'états fermés brefs s'explique par la fixation directe de la drogue sur la protéine canalaire au niveau du site impliqué dans le mécanisme d'ouverture du canal (Gögelein et Capek, 1990). La différence du mode d'action de l'inhibition observée dans le cas de l'érythrocyte de truite serait certainement due à l'existence d'un autre site d'action de cette molécule.

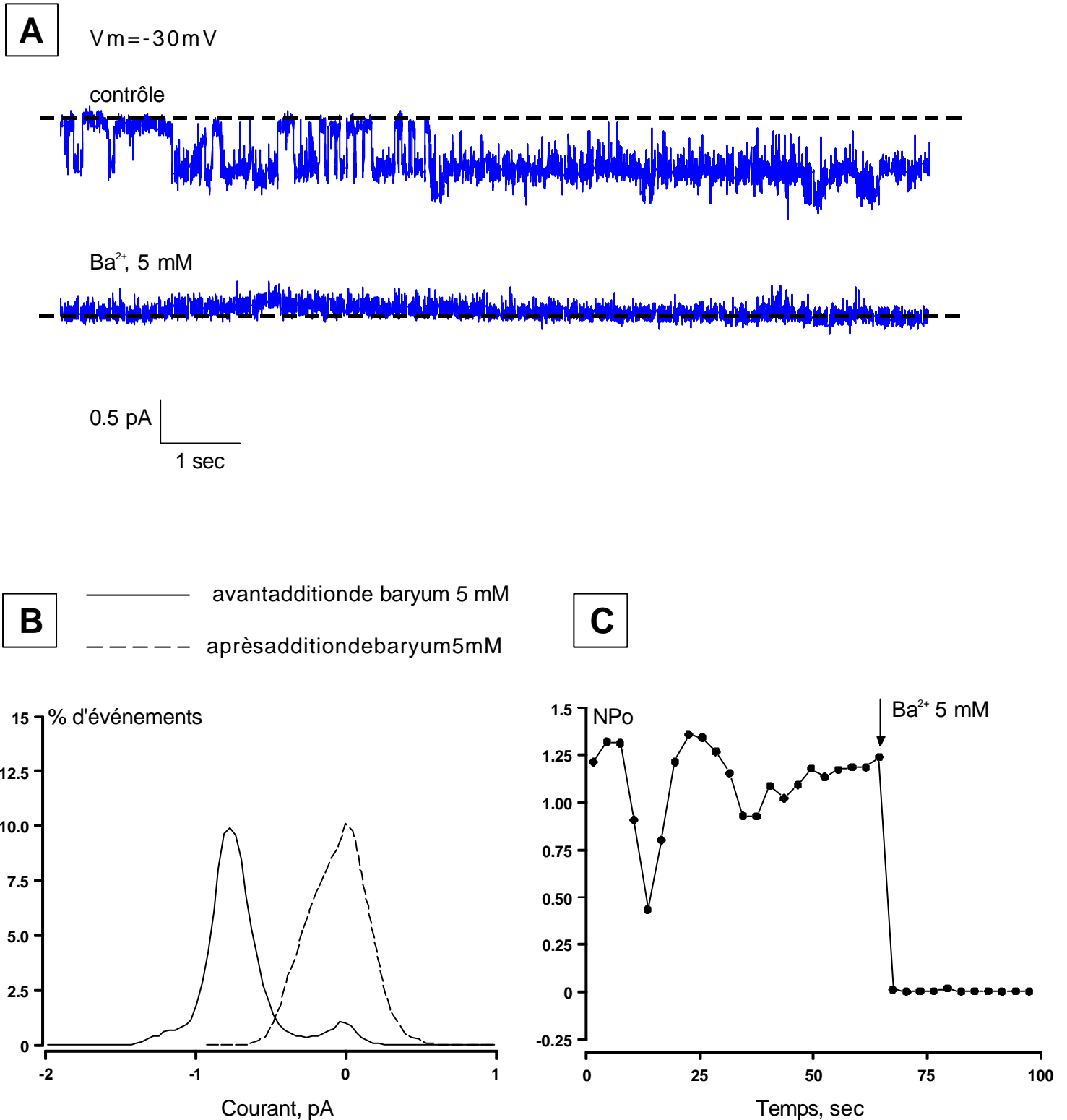
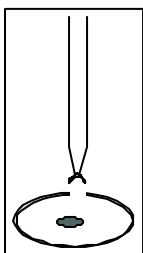


Figure 24. : Caractérisation en configuration « inside-out » de l'inhibition par le baryum (Ba^{2+} , 5 mM) du canal cationique non sélectif (CNS) de l'érythrocyte nucléé de truite.



A : Enregistrement caractéristique à $V_m = -30 \text{ mV}$ de l'action du baryum (5 mM) sur l'activité du canal cationique non sélectif en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain, KCl 145 mM dans la pipette. ($n=15$). La ligne pointillée indique l'état fermé du canal.

B : Histogramme d'amplitude des courants correspondants, en absence ou présence de baryum (5 mM). Courbe représentative de 15 expériences séparées.

C : Evolution de l'activité du canal cationique non sélectif (NPo) avant et après ajout de baryum (5 mM) sur la face cytoplasmique. Courbe représentative de 15 expériences séparées.

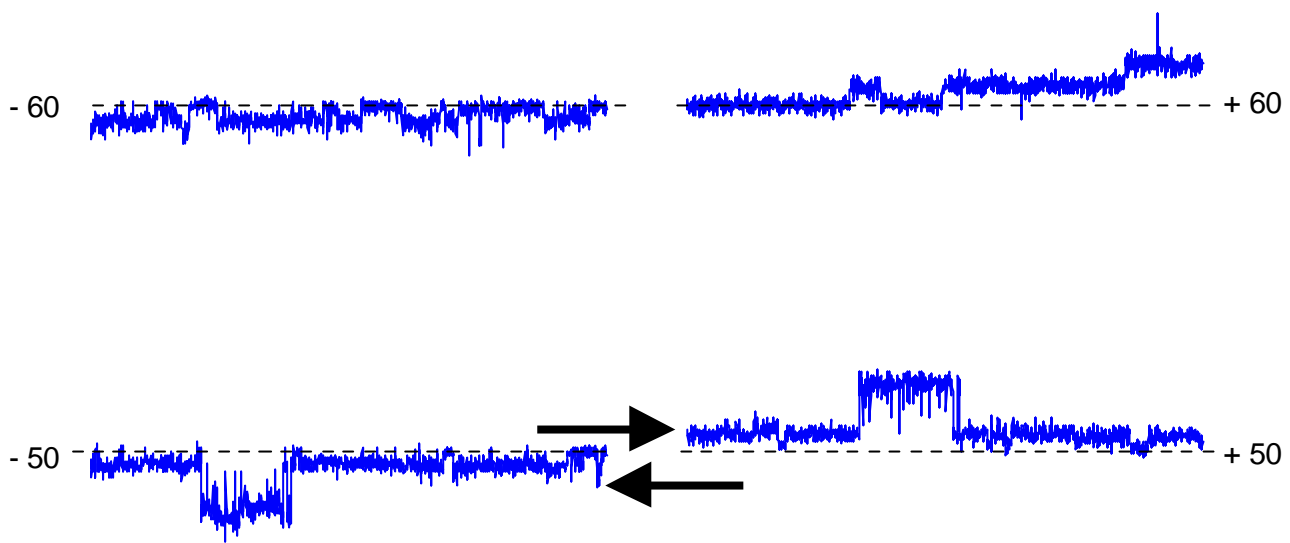
Le baryum (Ba^{2+}) est généralement utilisé afin d'étudier la perméabilité aux ions divalents des canaux « stretch-activés » (Christensen et Hoffmann, 1992, Filipovic et Sackin, 1991). Toutefois, dans le cas de l'érythrocyte de truite, l'application de 5 mM de Ba^{2+} sur la face cytosolique de la membrane provoque l'inhibition rapide et complète de l'activité du canal. Un exemple de l'effet du baryum sur l'activité du canal cationique non sélectif est présenté sur la **figure 24.** Cet inhibiteur agit sur l'activité du canal plutôt que sur la conductance de celui-ci. En effet, dans les secondes qui suivent l'application de cette drogue (3.7 ± 1.8 s, $n=15$), le produit NPo diminue de 98 ± 7 % ($n=15$). Il convient également de noter qu'après ajout de cette drogue, le niveau de bruit du « zéro courant » est augmenté, comme le montre la **figure 24. A.**, ainsi que l'histogramme d'amplitude des courants avant et après ajout de baryum (**Fig. 24.B.**).

L'inhibition par le baryum observée dans cette étude peut vraisemblablement être expliquée par la taille et l'énergie de déhydratation de cet ion. En effet, le baryum possède une énergie de déhydratation inférieure à celle du calcium (Hille, 1992), ce qui lui confère une plus grande affinité pour les sites anioniques du canal que les ions calciques. En revanche, le Ba^{2+} possède un rayon plus important que le calcium (Hille, 1992), déterminant ainsi l'effet inhibiteur observé par blocage physique du canal. De plus, l'inhibition d'un canal cationique non sélectif par le baryum a été récemment reportée dans les cellules des tubules proximaux de rein de grenouille (Robson et Hunter, 1997).

En revanche, l'ajout d'amiloride 100 μM ($n=7$) sur la face cytosolique du fragment de membrane ne modifie ni l'activité ni la conductance du canal cationique non sélectif. Or, un tel effet inhibiteur a pu être observé sur des canaux cationiques non sélectifs lorsque l'amiloride était appliqué sur la face extracellulaire de la membrane (pour revue Hamill et McBride, 1996). Aussi, l'absence d'effet inhibiteur de l'amiloride pourrait s'expliquer par un site d'action uniquement extracellulaire, cette configuration n'ayant pas été utilisée dans cette étude.

De même, les inhibiteurs habituels des canaux potassiques que sont le TEA (5 mM, n=6) et la charybdotoxine (10 nM, n=8) ne présentent aucun effet inhibiteur sur l'activité du canal cationique non sélectif.

- Le canal cationique non sélectif est inhibé par le gadolinium (20 μ M) lorsque celui-ci est appliqué sur la face extracellulaire de la membrane.
- Ce canal est inhibé par l'acide flufénamique (100 μ M) et la quinine (1 mM) lorsque ces deux inhibiteurs sont appliqués sur la face cytosolique de la membrane.
- Le canal est également inhibé par l'application de 5 mM de baryum sur la face cytosolique de la membrane.
- En revanche, le canal est insensible à l'amiloride (100 μ M), au TEA (5 mM) et à la charybdotoxine (50 nM) lorsque ces inhibiteurs sont appliqués sur la face cytoplasmique de la membrane.

A V_m , mV V_m , mV

1 pA
500 ms

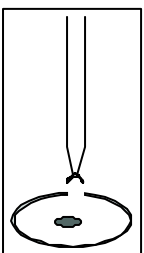
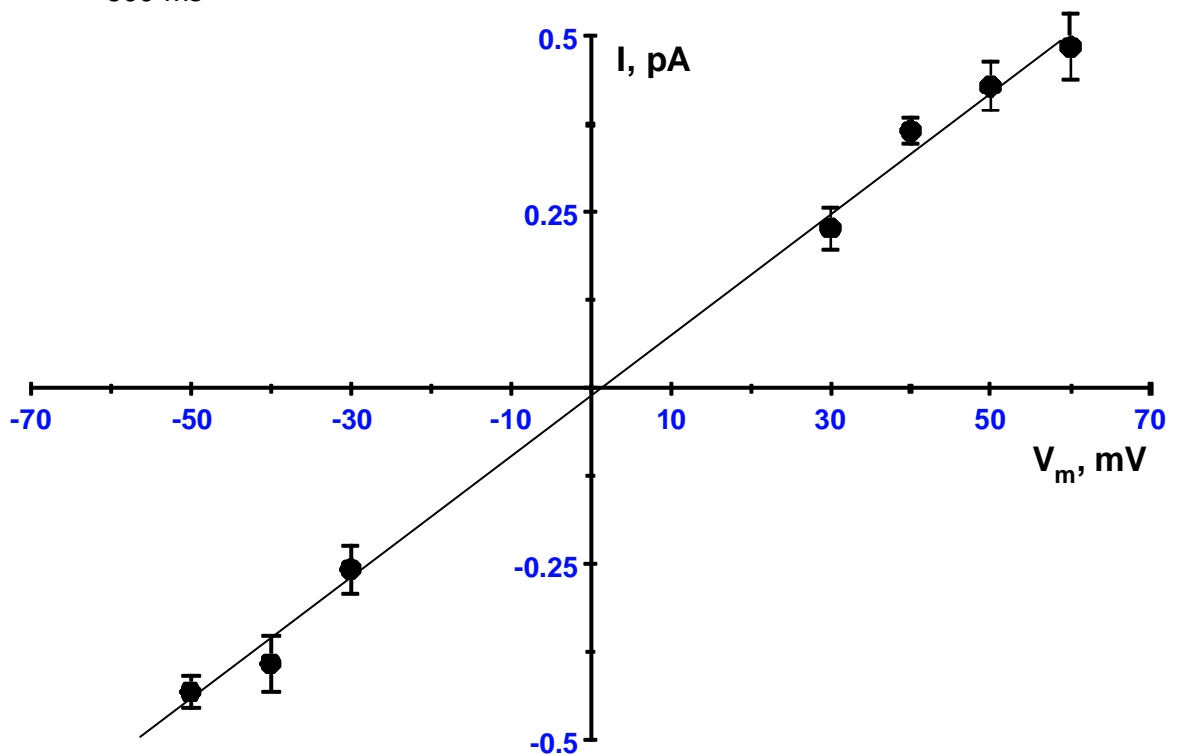
B

Figure 25. : Caractérisation en configuration « inside-out » du « petit » canal chlore à conductance linéaire de l'érythrocyte nucléé de truite (SCC).

KCl 145 mM dans la pipette et K_{int} pCa 8 dans le bain.

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal chlore à conductance linéaire pour différents potentiels de membrane (V_m). La ligne en pointillés indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz .

B : Relation courant-voltage du canal. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de 12 enregistrements obtenus dans cette configuration.

2.4. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore à conductance linéaire sur la membrane des globules rouges en configuration « inside-out ».

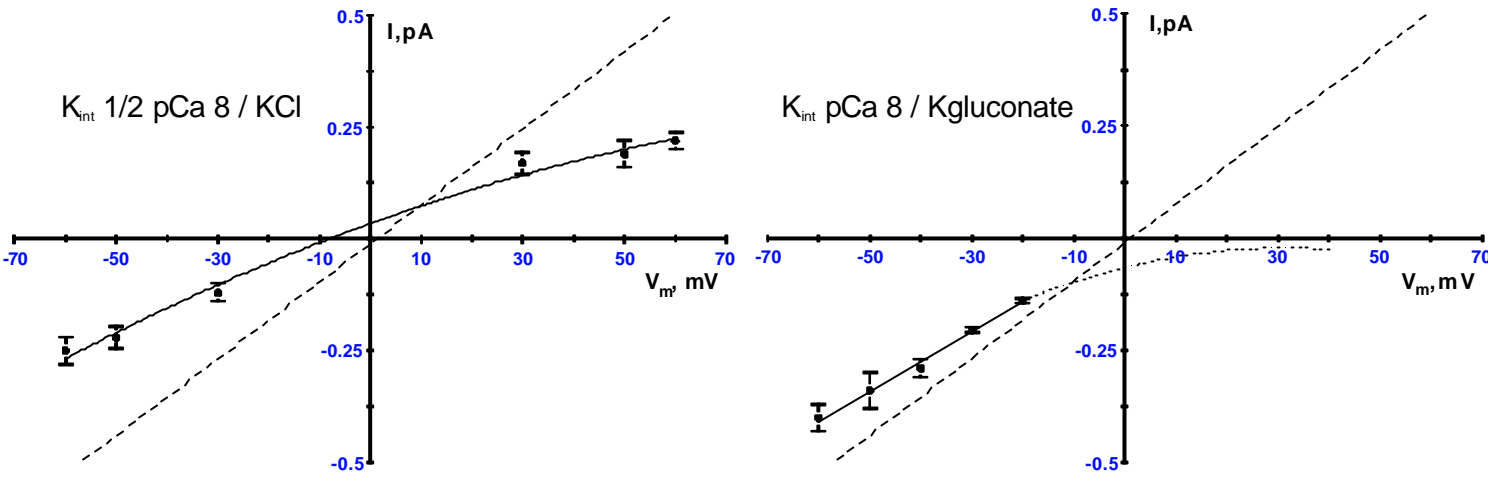
2.4.1. Détermination de la perméabilité au chlore et de la conductance du canal.

Des enregistrements caractéristiques de l'activité du canal en configuration « inside-out » à différents potentiels de membrane ($-V_m$) sont présentés sur la **figure 25. A.** Dans cette configuration, en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette, la relation courant-voltage unissant le courant unitaire (I) traversant le canal au potentiel imposé à la membrane (**Fig. 25. B.**) montre un potentiel d'inversion de 5.1 ± 1.3 mV ($n=12$). Ce potentiel d'inversion de la courbe est alors très proche du potentiel d'équilibre calculé pour le chlore dans ces conditions ($E_{Cl}=0$ mV). Cependant, il convient de remarquer que le potentiel d'inversion obtenu est le résultat d'un calcul effectué par extrapolation linéaire car l'amplitude des courants unitaires pour des potentiels imposés entre -30 et $+30$ mV est trop faible pour être détectée. La relation courant-voltage est linéaire et présente une conductance de 8.6 ± 0.8 pS ($n=12$).

2.4.2. Détermination de la sélectivité anionique du canal.

La sélectivité du canal chlore vis-à-vis des anions et des cations a été déterminée en mesurant la valeur du potentiel d'inversion (E_{rev}) de la courbe courant-voltage lorsque la solution de bain K_{int} pCa 8 est remplacée par une solution K_{int} 1pCa8, dans laquelle les concentrations en Cl^- et K^+ sont de 72.5 mM. Dans ces conditions de substitution, la valeur de E_{rev} est de -9.1 ± 1.6 mV ($n=5$), comme le montre la **figure 26.** Cette valeur est proche de la valeur théorique du potentiel d'équilibre de Nernst pour les anions dans ces conditions (-17.5 mV) et est significativement différente de la valeur obtenue en présence de K_{int} pCa 8

A



B

	$\gamma [-60 ; E_{rev}]$ (pS)	γE_{rev} (pS)	$\gamma [E_{rev} ; +60]$ (pS)	E_{rev} (mV)
K_{int} pCa8 / KCl 145 mM (n=12)	8.6 ± 0.8	8.6 ± 0.8	8.6 ± 0.8	5.1 ± 1.3
K_{int} 1/2pCa8 / KCl 145 mM (n=5)	6.1 ± 1.4	6.1 ± 1.4	6.1 ± 1.4	$-9.1 \pm 1.6^*$
K_{int} pCa8 / Kglu 145 mM (n=6)	6.7 ± 1.2	-	-	-*

C

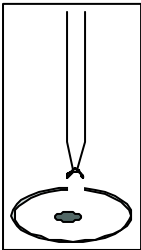
	τ_o (ms)	τ_c (ms)
$V_m = -60$ mV (n=6)	7.8 ± 0.8	3.9 ± 1.1
$V_m = +60$ mV (n=6)	7.5 ± 1.2	2.7 ± 0.2

Figure 26. : Caractérisation en configuration « inside-out » du « petit » canal chlore à conductance linéaire (SCC) de l'érythrocyte nucléé de truite.

A : Relations courant-voltage du canal chlore (SCC) en présence de différentes solutions de bains et de pipettes. La courbe en pointillés représente la relation courant-voltage établie en présence de K_{int} pCa 8/ KCl 145 mM dans la pipette. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n cellules dans cette configuration.

B : Tableau des conductances (γ) du canal dans les différentes configurations de bain et de pipette. $\gamma [-60 ; E_{rev}]$; $\gamma [E_{rev} ; +60]$; sont calculées dans chaque partie de la courbe correspondante, E_{rev} potentiel d'inversion calculé, γE_{rev} conductance calculée au potentiel d'inversion de la courbe. * indique une différence significative entre les moyennes ($p < 0.05$, testé par rapport à la configuration K_{int} pCa 8/KCl à l'aide d'un test t de Student).

C : Tableau récapitulatif des constantes d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c) du canal en configuration « inside-out » K_{int} pCa 8 / KCl. Les valeurs des différentes constantes sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) des valeurs obtenues à partir de n enregistrements de l'activité du canal.



dans le bain (5.1 ± 1.3 mV, $n=12$, $p<0.05$). La valeur du rapport de perméabilité relative calculée dans ces conditions $P_{\text{anion}}/P_{\text{cation}}$ est alors de 3.3 ± 0.2 ($n=5$).

En présence d'une solution équimolaire de gluconate de potassium (KGlu 145 mM) dans la pipette, les courants sortants de la relation courant-voltage (c'est-à-dire les courants entrants d'anions) sont abolis, comme le montre la **figure 26**.. Aucun courant sortant n'est détecté, même lorsque la membrane est fortement dépolarisée. En outre, la conductance des courants entrants n'est pas significativement diminuée dans cette configuration par rapport aux conditions de contrôle K_{int} pCa 8 dans le bain et KCl 145 mM dans la pipette, puisqu'elle est de 6.7 ± 1.2 pS ($n=6$) entre -60 mV et -20 mV (contrôle : 8.6 ± 0.8 , $n=12$, $p<0.05$).

- Un canal chlore de faible conductance (« Small Chloride Conductance » : SCC), présentant une relation courant-voltage linéaire est enregistré en configuration « inside-out » sur la membrane des globules rouges de truite.
- Ce canal est sélectif aux anions et présente un rapport de sélectivité anionique de $P_{\text{anion}}/P_{\text{cation}}=3.3 \pm 0.2$ et est imperméant au gluconate.

2.4.3. Fréquence d'occurrence du canal chlore à conductance linéaire et cinétique du canal.

Le canal chlore à conductance linéaire était présent dans au moins 432 enregistrements sur les 860 réalisés. De plus, il était fréquemment présent en plusieurs exemplaires sous la pipette de « patch ». Cependant, la fréquence d'occurrence du canal est vraisemblablement sous-estimée, du fait que l'amplitude des courants enregistrés se situait à la limite du seuil de détection déterminé par le rapport signal/bruit de l'enregistrement.

L'analyse cinétique du canal a pu être effectuée sur six enregistrements réalisés en configuration « inside-out », en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette. Dans ces six enregistrements d'une part le canal SCC était présent à un seul exemplaire et d'autre part le canal cationique non sélectif n'était pas actif. Cette analyse a été effectuée à des potentiels de membrane de +60 et -60 mV.

Le canal présente une constante de temps d'ouverture et une constante de fermeture quel que soit le potentiel imposé à la membrane, comme le montre le tableau récapitulatif de la **figure 26.C.**. L'activité du canal est caractérisée par des ouvertures et des fermetures brèves. En effet, les constantes d'ouverture sont $\tau_0 = 7.8 \pm 0.8$ ms (n=6) et $\tau_0 = 7.5 \pm 1.2$ ms (n=6), pour des potentiels de membrane de -60 et +60 mV respectivement. De même, les constantes de fermeture sont rapides, puisqu'à -60 mV, $\tau_c = 3.9 \pm 1.1$ ms (n=6) et à +60 mV, $\tau_c = 2.7 \pm 0.2$ ms (n=6).

- Le canal chlore à conductance linéaire (SCC) est présent dans 62 % des enregistrements effectués en configuration « inside-out ».
- La cinétique de l'activité du canal peut être décrite par une seule constante d'ouverture et de fermeture quel que soit le potentiel de membrane ($V_m = \pm 60$ mV).

2.4.4. Inhibiteurs du canal chlore à conductance linéaire.

L'emploi d'agents pharmacologiques spécifiques des transporteurs anioniques tels que le DIDS et le NPPB révèle que, si le DIDS (50 μM dans la pipette ou 100 μM sur la face cytoplasmique) est incapable d'inhiber le canal, l'absence systématique d'activité du canal dans les enregistrements effectués en présence de NPPB (50 μM) permet en revanche de supposer que ce canal est sensible au NPPB.

- Le canal SCC est insensible au DIDS (100 μM) mais semble sensible au NPPB (50 μM) lorsque ces inhibiteurs sont appliqués sur la face cytoplasmique.
- Le canal SCC est insensible au DIDS extracellulaire (50 μM).

2.5. Enregistrement de l'activité d'un canal chlore rectifié sortant sur la membrane des globules rouges en configuration « inside-out ».

Le passage en configuration excisée a permis de mettre en évidence un troisième type de canal observé dans seulement 5 % des 860 enregistrements effectués sur la membrane des globules rouges de truite. L'activité de ce canal n'a pu être observée qu'après excision, au terme d'une attente d'une vingtaine de minutes et après application de dépolarisations et d'hyperpolarisations de la membrane à des potentiels de $\pm 60 \text{ mV}$.

A

Vm, mV

Vm, mV

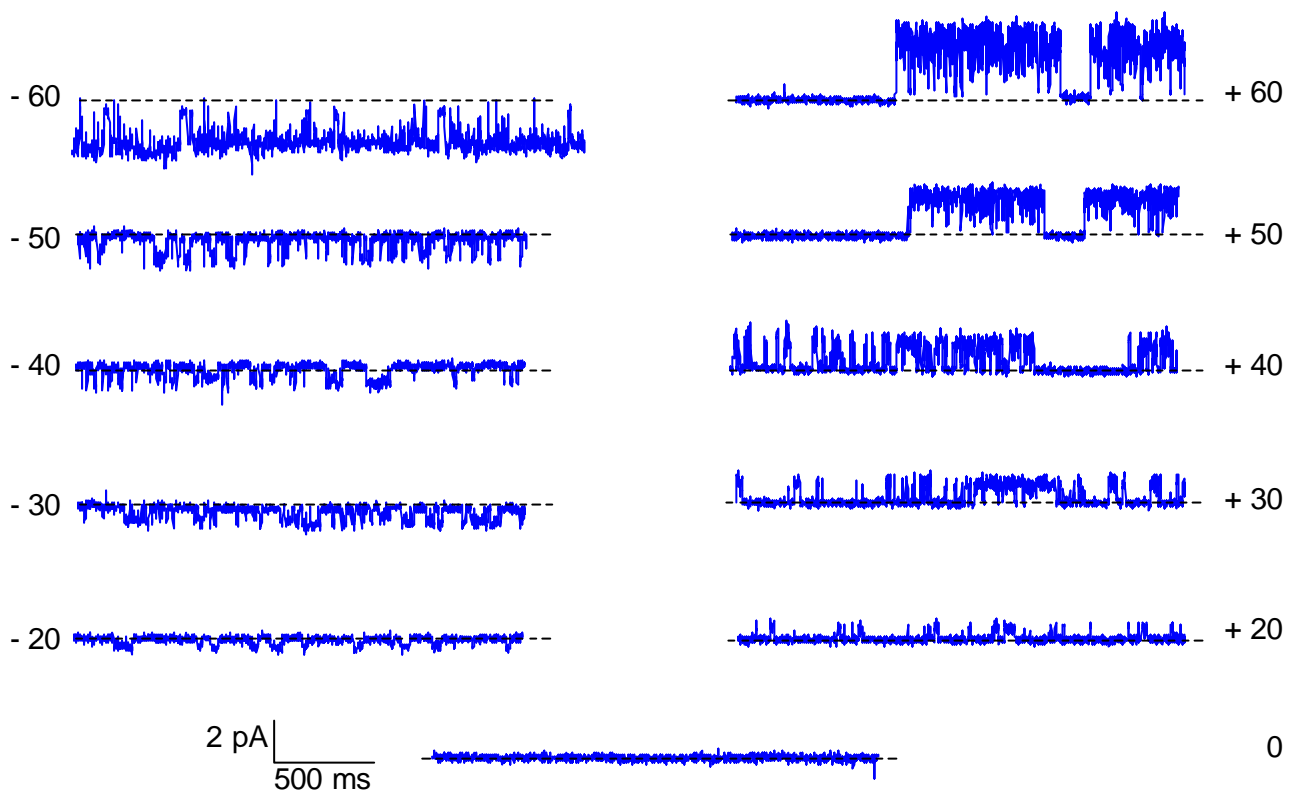
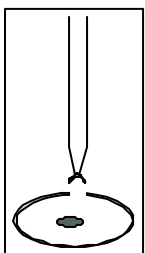
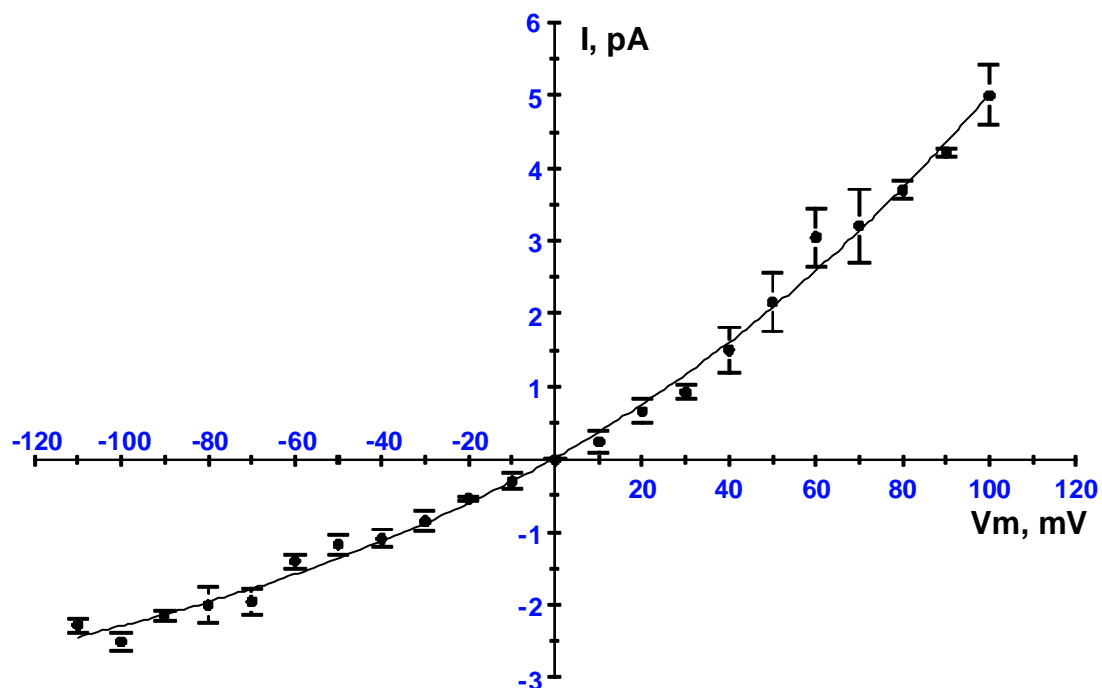
**B**

Figure 27.: Caractérisation en configuration «inside-out» du canal chlore rectifié sortant (ORCC) de l'érythrocyte nucléé de truite.

KCl 145 mM dans la pipette et K_{int} pCa 8 dans le bain.

A : Enregistrements caractéristiques de l'activité du canal chlore rectifié sortant pour différents potentiels de membrane (Vm). La ligne pointillée indique l'état fermé du canal. Filtration 300 Hz ou 1kHz.

B : Relation courant-voltage du canal chlore rectifié sortant (ORCC). Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de 14 enregistrements réalisés dans cette configuration.

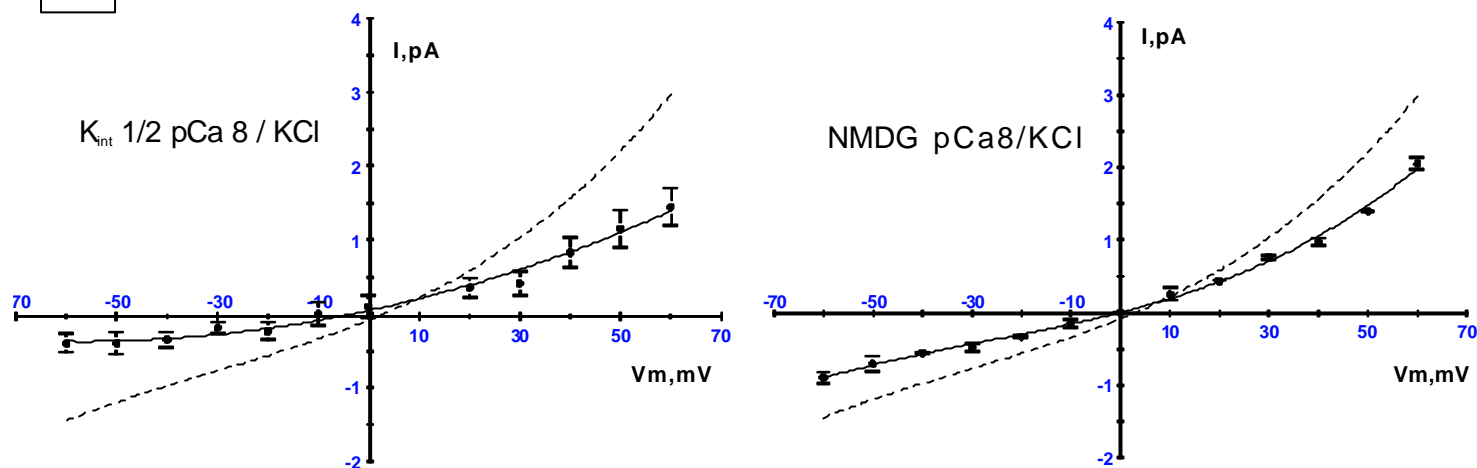
2.5.1. Détermination de la perméabilité aux ions chlore et de la conductance du canal.

Des enregistrements caractéristiques de l'activité du canal en configuration « inside-out » à différents potentiels de membrane sont présentés sur la **figure 27. A.** Dans cette configuration, en présence de K_{int} pCa 8 sur la face cytoplasmique et de KCl 145 mM dans la pipette, la relation courant-voltage présente un potentiel d'inversion de 0.3 ± 1.3 mV ($n=6$). Cette valeur de potentiel d'inversion est très proche de la valeur théorique calculée du chlore ($E_{Cl}=0$ mV) calculée d'après l'**équation 12.** dans ces conditions. De plus, le canal présente dans ces conditions une forte rectification dans le sens des courants sortants (**figure 27.B.**). En effet, la conductance du canal pour les courants entrants entre -60 mV et E_{rev} est de 24.3 ± 1.3 pS ($n=6$), et de 54.5 ± 1.1 pS ($n=6$) pour les courants sortants entrants entre E_{rev} et +60 mV. La conductance du canal au potentiel d'inversion est de 33.8 ± 5.2 ($n=6$)pS.

2.5.2. Détermination de la sélectivité cationique et anionique du canal.

La sélectivité du canal chlore rectifié sortant vis-à-vis des cations et des anions a été déterminée en mesurant la valeur du potentiel d'inversion (E_{rev}) de la courbe courant-voltage lorsque la solution de bain K_{int} pCa 8 (145 mM KCl) est remplacée par une solution K_{int} où les concentrations de KCl sont diminuées de moitié. Dans ces conditions, le potentiel d'inversion de la courbe est décalé à -10.2 ± 2.3 mV ($n=4$). Cette valeur est proche du potentiel d'équilibre théorique du chlore calculé dans ces conditions d'après l'**équation 18.**

A



B

	γ [-60 ; E_{rev}] (pS)	γ E_{rev} (pS)	γ [E_{rev} ; +60] (pS)	E_{rev} (mV)
K_{int} pCa8 / KCl 145 mM (n=6)	24.3 ± 1.3	33.8 ± 5.2	54.5 ± 1.1	0.3 ± 1.3
K_{int} 1/2 pCa8 / KCl 145 mM (n=4)	$10.9 \pm 4.5^*$	$11.4 \pm 3.6^*$	$36.3 \pm 2.7^*$	$-10.2 \pm 2.3^*$
NMDG pCa8 / KCl 145 mM (n=2)	$13.3 \pm 0.7^*$	$17.7 \pm 3.9^*$	52.1 ± 1.6	0.0 ± 0.5

C

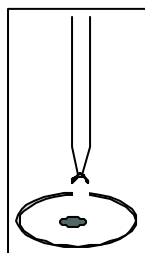
	τ_{o1} (ms)	τ_{o2} (ms)	τ_{c1} (ms)
$V_m = -30$ mV (n=6)	4.2 ± 1.16	52.9 ± 8.07	5.2 ± 1.1
$V_m = +30$ mV (n=6)	10.3 ± 2.3	-	7.4 ± 2.6

Figure 28. : Caractérisation en configuration «inside-out » du canal chlore rectifié sortant (ORCC) de l'érythrocyte nucléé de truite.

A : Relations courant-voltage du canal en présence de différentes solutions de bains. La courbe en pointillés représente la relation courant-voltage établie en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette. Les valeurs du courant (I) sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n enregistrements obtenus dans cette configuration.

B : Tableau des conductances (γ) du canal dans les différentes configurations de bain et de pipette. γ [-60 ; E_{rev}] ; γ [E_{rev} ; +60] ; sont calculées dans chaque partie de la courbe correspondante, E_{rev} potentiel d'inversion calculé, $\gamma_{E_{rev}}$ conductance calculée au potentiel d'inversion de la courbe. * indique une différence significative entre les moyennes ($p < 0.05$, testé par rapport à la configuration K_{int} pCa 8/KCl à l'aide d'un test t de Student).

C : Tableau récapitulatif des constantes d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_c) du canal en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl dans la pipette. Les valeurs des différentes constantes sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) des valeurs déterminées à partir de n enregistrements de l'activité du canal.



(-17.5 mV), et est significativement différente de celle mesurée en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain (0.3 ± 1.3 mV, $n=6$, $p<0.05$).

En outre, la diminution de la concentration en KCl sur la face cytoplasmique induit une diminution significative de la conductance, tant pour les courants entrants que sortants ($p<0.05$, $n=4$). En effet, la conductance pour les courants entrants chute à 10.9 ± 4.5 pS ($n=4$) et, pour les courants sortants, la conductance diminue à 36.3 ± 2.7 pS ($n=4$) (**Fig. 28. A et B.**), cette différence pouvant être expliquée par la diminution de l'activité des ions K^+ et Cl^- lors de la diminution de concentration.

Le rapport de sélectivité anionique, calculé à partir de l' **équation 18.** et des potentiels d'inversion des relations courant-voltage obtenus en configuration K_{int} pCa 8 dans le bain et KCl 145 mM dans la pipette est $P_{anion}/P_{cation} = 3.7 \pm 0.1$ ($n=4$).

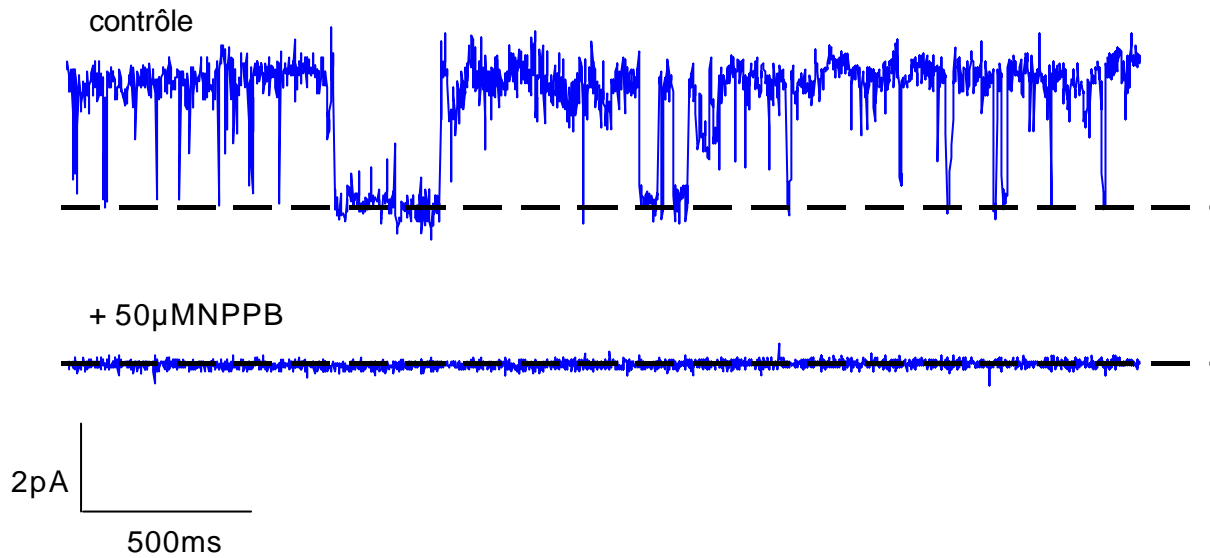
En revanche, le remplacement de la solution de bain par une solution NMDG-Cl pCa 8 145 mM, ne modifie pas de manière significative le potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage. Toutefois, il convient de remarquer que la conductance des courants entrants est diminuée, ainsi que la conductance au potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage. Dans cette configuration, la conductance pour les courants entrants est alors de 13.3 ± 0.7 pS ($n=2$) et de 17.7 ± 3.9 pS ($n=2$) au potentiel d'inversion. Cette diminution de la conductance pour les courants entrants (c'est-à-dire sortants d'anions) est certainement attribuable à la diminution d'activité des ions chlore lorsque ceux-ci sont associés à un ion tel que le N-méthyl-D-glucamine (NMDG). Cependant, les expériences conduites en présence de NMDG 145 mM dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette confirment la nature anionique de ce canal.

- Un canal rectifié sortant, sélectif pour les ions Cl^- , est enregistré en configuration « inside-out », sur la membrane des érythrocytes de truite.
- Ce canal n'est jamais présent en configuration « cell-attached ».
- Ce canal n'est observé que dans 3 % des scellements et n'est actif qu'après une période d'attente et de fortes dépolarisations et hyperpolarisations.
- Ce canal présente un rapport de sélectivité anionique de $P_{\text{anion}}/P_{\text{cation}} = 3.7 \pm 0.1$ (n=4).

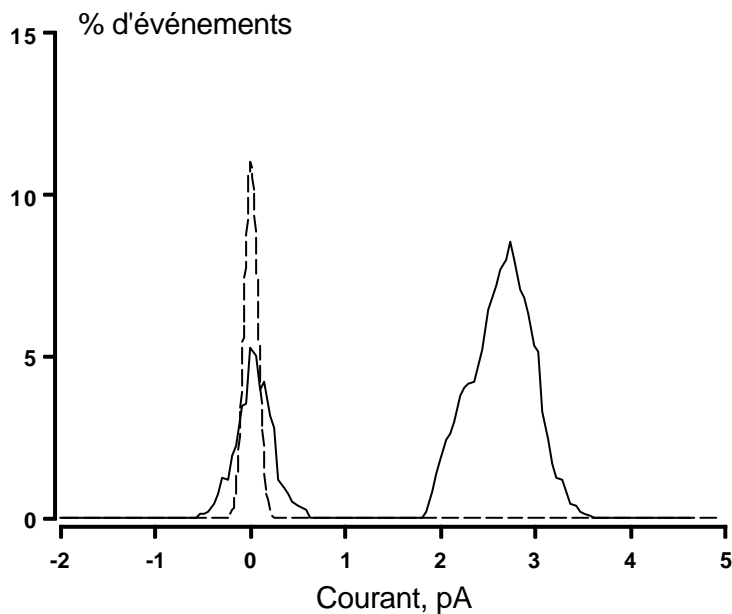
2.5.3. Analyse cinétique du canal chlore rectifié sortant.

Les constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture du canal (τ_c) ont été déterminées à partir d'enregistrements obtenus en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain et de KCl 145 mM dans la pipette, pour des potentiels de membrane de -30 et $+30$ mV, lorsqu'un seul canal était actif sous la pipette de « patch ». L'ensemble des valeurs de ces différentes constantes est présenté dans le tableau de la **figure 28. C.** Il apparaît que, quel que soit le potentiel de membrane ($V_m = \pm 30$ mV), le canal présente une seule constante de temps de fermeture. L'ajustement des temps de résidence du canal à l'état ouvert montre que, si pour des potentiel de membrane de $+30$ mV (dépolarisation de la membrane), le meilleur ajustement est obtenu avec une seule constante de temps d'ouverture, l'ajustement des temps de résidence lorsque la membrane est hyperpolarisée ($V_m = -30$ mV) est en revanche mieux exprimé par la somme de deux fonctions exponentielles, ce qui démontre l'existence de deux constantes de temps d'ouverture à ce potentiel. Cette deuxième constante de temps ($\tau_{o2} = 52.9 \pm 8.07$, n=6) exprime le mode de fonctionnement en « burst » (salve) du canal, lorsque la membrane est hyperpolarisée.

A $V_m = +60 \text{ mV}$



B ——— avant addition NPPB 50 µM
 - - - - - après addition NPPB 50 µM



C

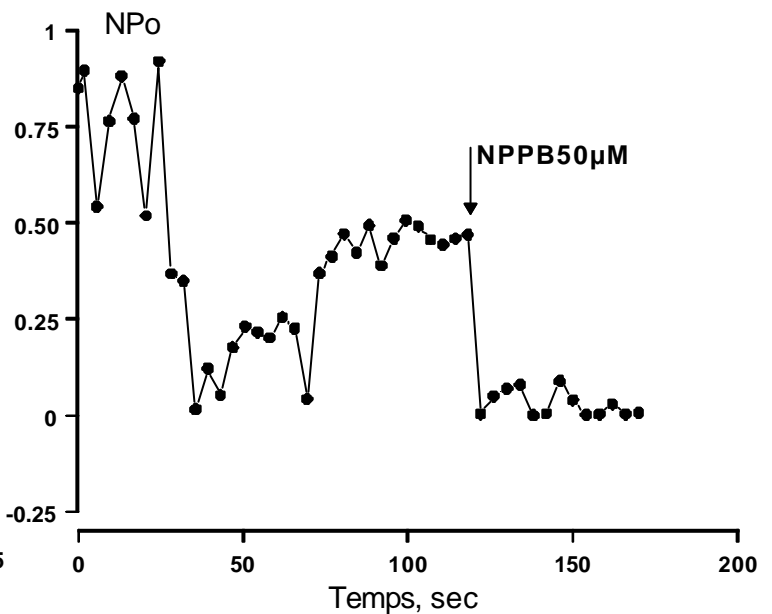
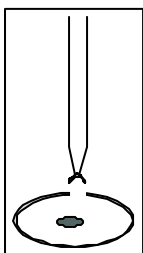


Figure 29. : Caractérisation en configuration « inside-out » de l'inhibition par le NPPB (50 µM) du canal chlore rectifié sortant (ORCC) de l'érythrocyte nucléé de truite.



A : Enregistrement caractéristique à $V_m = +60 \text{ mV}$ de l'action du NPPB (50 µM) sur l'activité du canal chlore rectifié sortant en présence de K_{int} pCa 8 dans le bain, KCl 145 mM dans la pipette ($n = 4$), filtre 1 kHz. La ligne pointillée indique l'état fermé du canal.

B : Histogramme d'amplitude des courants correspondant, en absence ou en présence de NPPB (50 µM). Courbe représentative de 4 expériences différentes.

C : Evolution de l'activité du canal chlore rectifié sortant (NPo) avant et après ajout de NPPB (50 µM) sur la face cytoplasmique. Courbe représentative de 4 expériences différentes.

- La cinétique de l'activité du canal chlore rectifié sortant peut être décrite par une seule constante de temps de fermeture à $V_m = \pm 30$ mV, mais par une constante d'ouverture lorsque la membrane est dépolarisée ($V_m = +30$ mV) et deux constantes de temps d'ouverture lorsque la membrane est hyperpolarisée ($V_m = -30$ mV).

2.5.4. Effet des inhibiteurs des canaux chlore sur l'activité du canal chlore rectifié sortant.

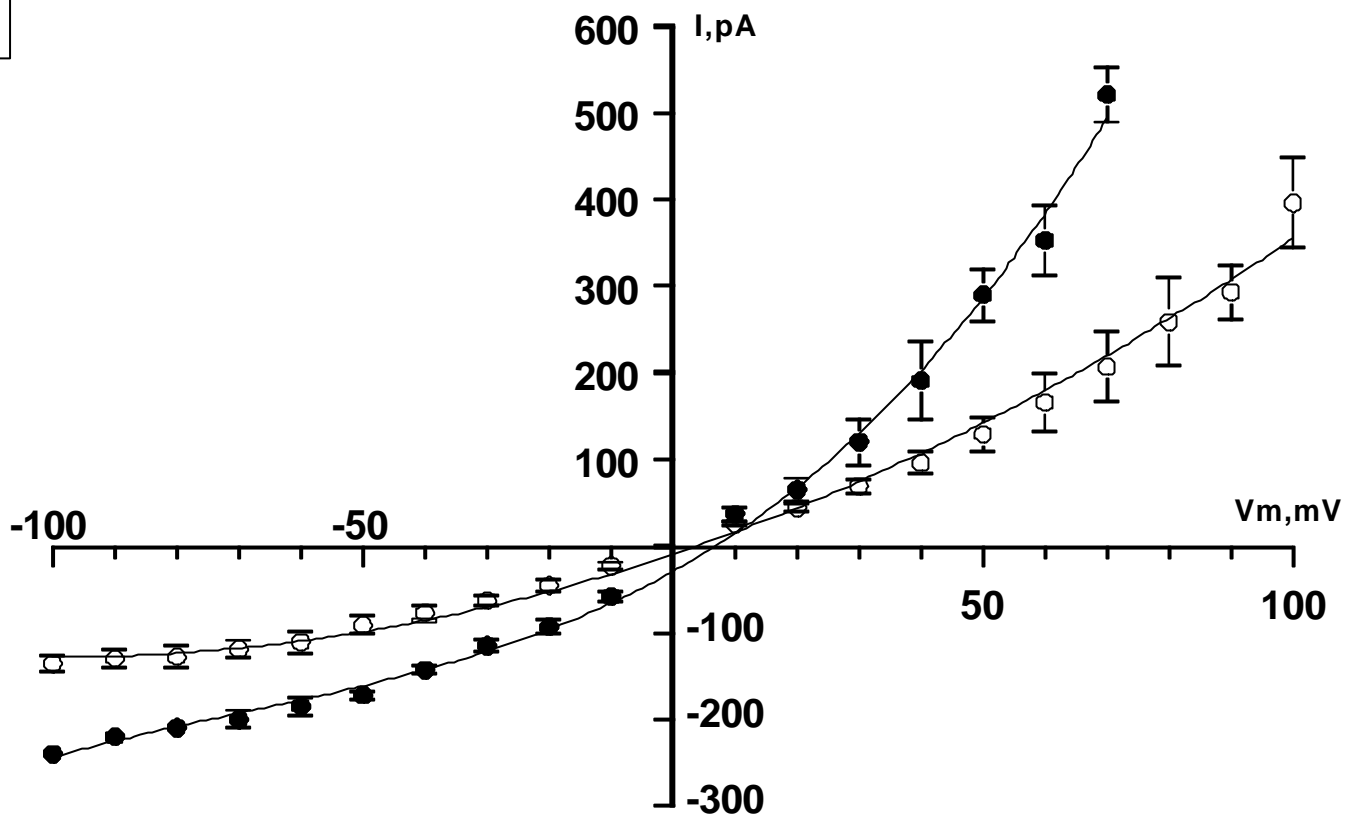
Le dérivé des aryl-aminobenzoates qu'est le NPPB est généralement employé comme un inhibiteur des canaux chlore, notamment des canaux chlore rectifiés sortants (Wangemann *et al.*, 1986, Kubo et Okada, 1992 ; Monaghan *et al.*, 1997 ; Gosling *et al.*, 1995).

En présence de NPPB (50 μ M) sur la face cytoplasmique de la membrane, l'activité du canal est diminuée immédiatement après application de la drogue ($n=6$). Un exemple de cette inhibition obtenue en configuration « inside-out » K_{int} pCa 8 / KCl 145 mM est présenté sur la **figure 29. A.**

De plus, comme le montrent les **figures 29.B.** et **29.C.**, l'inhibition par le NPPB (50 μ M) est totale, par diminution du produit NPo. En effet, le produit NPo diminue de 97 ± 9 % ($n=6$) après application du NPPB sur la face cytoplasmique de la membrane.

Cette inhibition n'est pas dépendante du potentiel imposé à la membrane, puisque l'inhibition est effective à la fois lorsque la membrane est dépolarisée et lorsqu'elle est

A



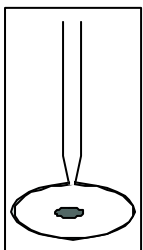
B

	$\gamma [-100 ; E_{rev}]$ (nS)	γE_{rev} (nS)	$\gamma [E_{rev} ; +100]$ (nS)	n
Contrôle	1.25 ± 0.15	1.84 ± 0.24	2.24 ± 0.18	8
Hyposmotique	$2.29 \pm 0.23^*$	$4.42 \pm 0.39^*$	$5.77 \pm 0.76^*$	8
Hyposmotique Ringer sans Cl ⁻	$1.28 \pm 0.07^{**}$	$0.8 \pm 0.09^{**}$	$1.44 \pm 0.06^{**}$	8
Contrôle	1.25 ± 0.16	2.72 ± 0.26	2.99 ± 0.39	7
Hyposmotique	$2.32 \pm 0.35^*$	$4.84 \pm 0.46^*$	$6.81 \pm 0.90^*$	7
Hyposmotique + 50 μ M DIDS	$0.75 \pm 0.35^{**}$	$1.14 \pm 0.08^{**}$	$1.23 \pm 0.12^{**}$	7

Figure 30. : Caractérisation en configuration « whole-cell » des conductances membranaires globales des érythrocytes de truite activées en conditions hyposmotiques.

A : Relation courant-voltage obtenue en configuration « whole-cell » (n=18) sur des érythrocytes de truite en conditions isosmotiques (320 mOsm) ○ et après gonflement lors d'un choc hyposmotique (215 mOsm) ● (n=8). Les valeurs du courant I sont la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne), des n expériences réalisées dans ces conditions.

B : Tableau récapitulatif des conductances membranaires calculées au potentiel d'inversion de la courbe E_{rev} , entre -100 et mV et entre E_{rev} et +100 mV. La valeur des conductances est la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n expériences séparées. * indique une différence significative entre les moyennes observées en conditions hypotoniques et celles observées en conditions de contrôle. ** indique une différence significative entre les moyennes observées en conditions hypotoniques et celles observées en conditions isotoniques avec les mêmes solutions de bain (Fig. 9.).



hyperpolarisée, les pourcentages d'inhibition étant respectivement de $95 \pm 4 \%$ (n=6) à $V_m = -30$ mV et $98 \pm 3 \%$ (n=6) à $V_m = +30$ mV.

En outre, l'addition de DIDS 100 μ M sur la face cytoplasmique de la membrane inhibe l'activité du canal (Po) de $90 \pm 4 \%$ (n=6).

- Le canal ORCC est sensible aux inhibiteurs des canaux Cl^- (NPPB, DIDS) appliqués sur la face cytoplasmique.

3. Mise en évidence de l'activation de voies de conductance lors d'un choc hyposmotique.

Entre autres fonctions, les canaux chlore ont celle d'être impliqués dans les processus de régulation du volume cellulaire et le maintien d'un potentiel membranaire de repos stable (pour revue Nilius *et al.*, 1996, Pusch et Jentsch, 1994).

3.1. Mise en évidence de l'augmentation des courants membranaires globaux de l'érythrocyte de truite en conditions hyposmotiques.

L'exposition des érythrocytes de truite à un milieu hyposmotique provoque un gonflement rapide (voir Chap.2.) des cellules, associé à une augmentation de la conductance membranaire des globules rouges.

En effet, la conductance membranaire est alors multipliée par deux, puisque la conductance des courants entrants est de 2.29 ± 0.23 nS (n=8) et celle des courants sortants de 5.77 ± 0.76 nS (n=8) (**figure 30. A. et B.**), alors que les valeurs de contrôle sont respectivement pour les courants entrants et sortants de 1.25 ± 0.15 nS et 2.24 ± 0.18 (n=8). Ainsi augmentée, la conductance est significativement différente des conductances

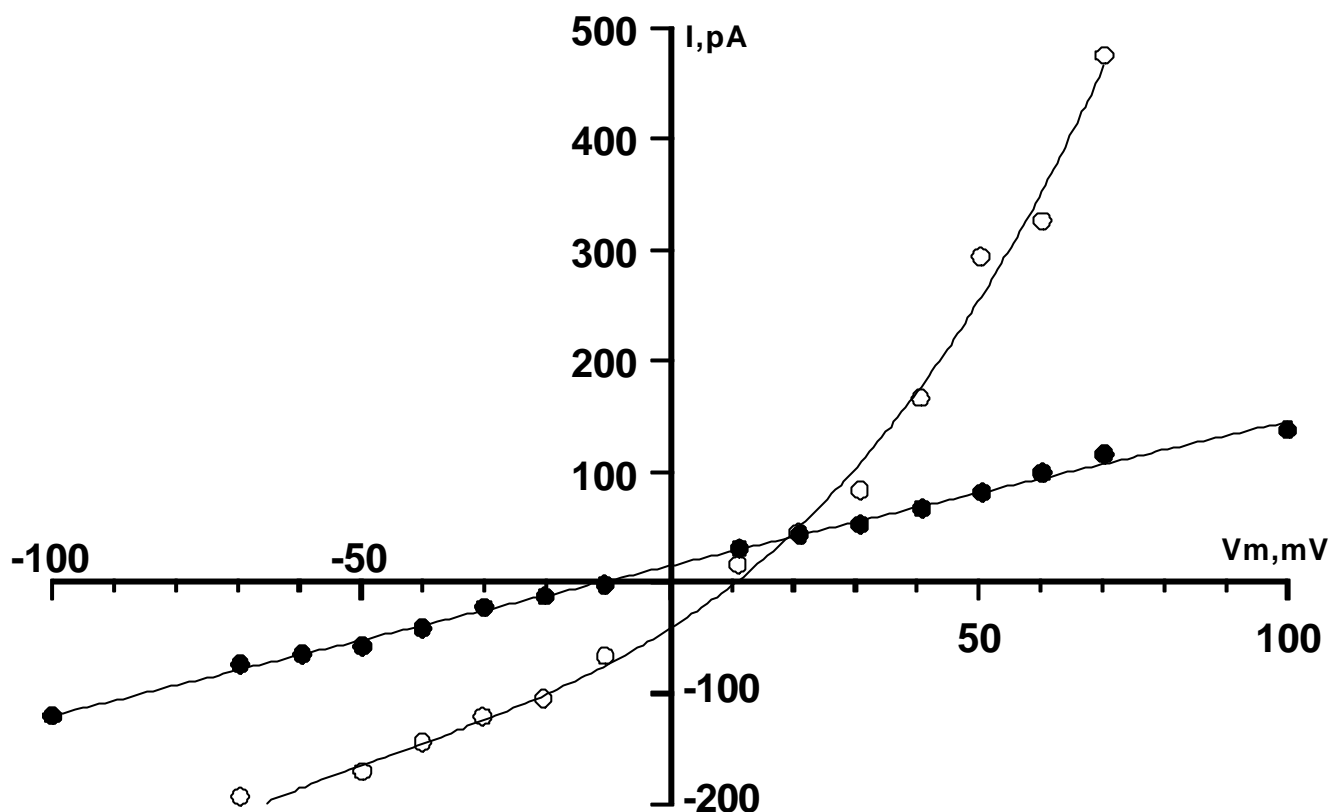
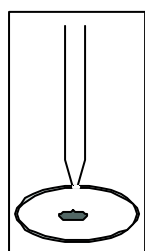
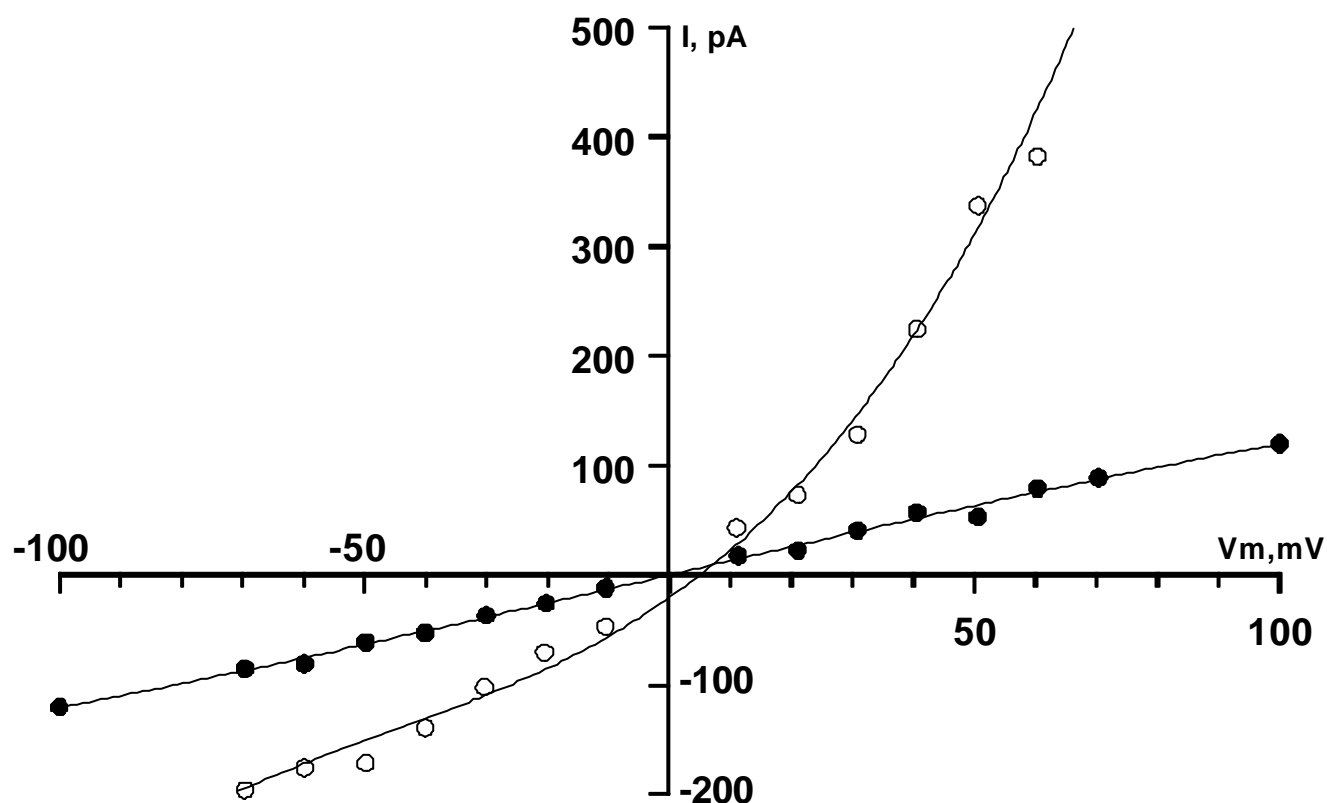
A**B**

Figure 31. : Caractérisation en configuration « whole-cell » de l'implication d'une conductance chlore lors d'un choc hyposmotique.

A : Relation courant-voltage obtenue en conditions hyposmotiques ○ (215 mOsm) et après remplacement du chlore extracellulaire par du gluconate ● . Courbe représentative de 8 expériences différentes.

B : Relation courant-voltage obtenue en conditions hyposmotiques ○ (215 mOsm) et après addition de DIDS (50 μ M) ● . Courbe représentative de 7 expériences différentes.

observées en conditions isotoniques ($p < 0.05$, $n=8$). L'augmentation de conductance peut donc être reliée au gonflement cellulaire.

En outre, il convient de remarquer que en conditions hypotoniques aucune modification du potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage n'est observée.

3.2. Dépendance vis à vis des ions chlore et sensibilité au DIDS des courants globaux en conditions hyposmotiques.

La relation courant-voltage obtenue présente une forte rectification sortante (**Fig. 30. A et B.**) ce qui suggère l'activation des voies de conductance chlore déterminée en conditions isotoniques (**Fig.9.**)

Le remplacement de la solution hyposmotique (215 mOsm) par une solution hypotonique sans chlore provoque une diminution de la conductance par rapport à celle obtenue en présence de chlore ($p < 0.05$, $n=8$) (**Fig. 31. A.**).

En effet, la conductance pour les courants entrants et sortants n'est plus que de 1.28 ± 0.07 nS ($n=8$) et 1.44 ± 0.06 nS ($n=8$) respectivement. La conductance pour les courants entrants ne représente alors plus que 55 % de la conductance obtenue en conditions hyposmotiques, en présence de chlore extracellulaire. La diminution de conductance observée pour les courants sortants en l'absence de chlore extracellulaire est plus importante encore, puisqu'elle est de 76 % par rapport aux conditions hyposmotiques.

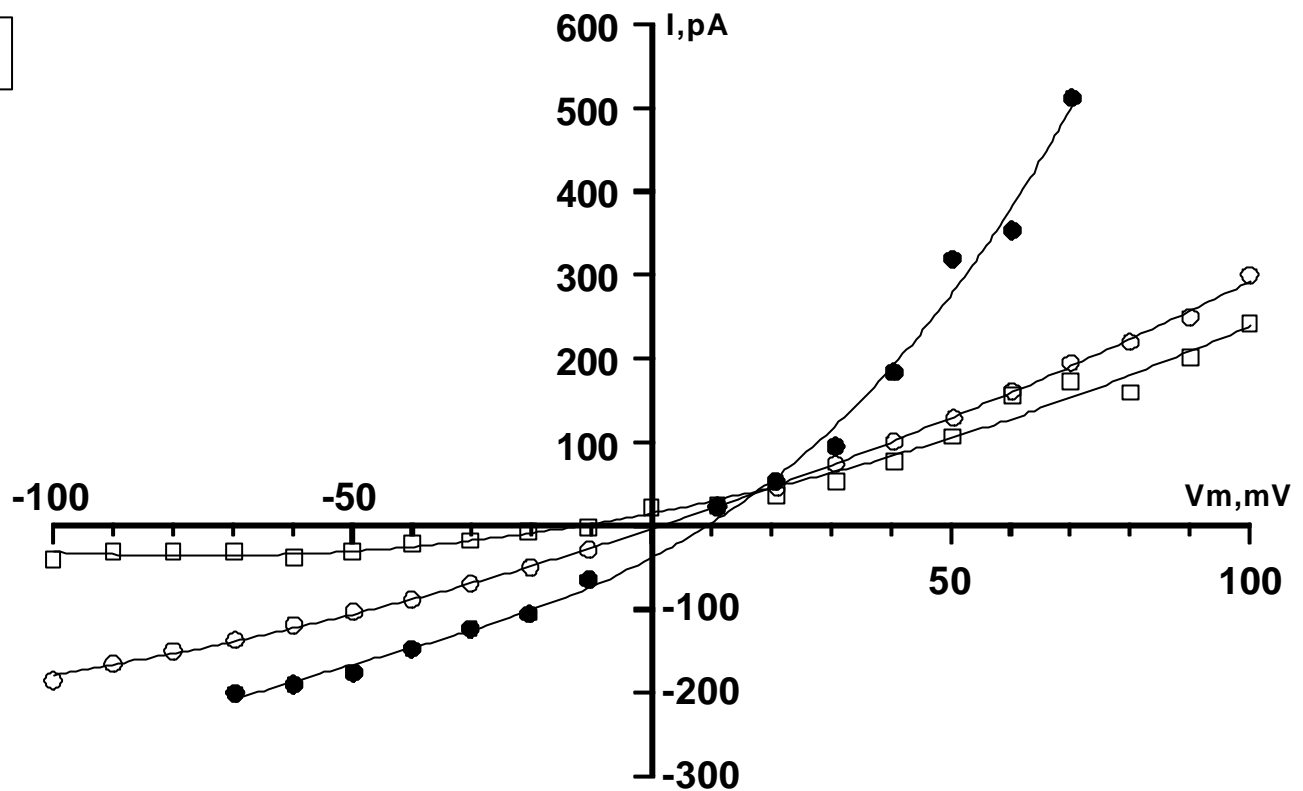
La diminution de la conductance membranaire activée en conditions hyposmotiques en absence de chlore extracellulaire suggère que l'augmentation des courants globaux lors du choc hyposmotique en présence de chlore extracellulaire est vraisemblablement et majoritairement due à l'activation de la conductance chlore rectifiée sortante décrite lors des enregistrements en configuration « whole-cell » en conditions isosmotiques (**Fig. 9.** et **Fig. 10.**).

De plus, l'addition de DIDS (50 μ M) dans le bain lors du choc hyposmotique provoque une diminution des courants globaux comparable à celle observée en l'absence de chlore extracellulaire (**Fig. 31. B.**).

En effet, les conductances pour les courants entrants et sortants sont respectivement dans ces conditions de 0.75 ± 0.35 (n=7) et de 1.23 ± 0.12 (n=7), soit une diminution de 68% pour les courants entrants et une diminution de 82 % pour les courants sortants. Cette dernière expérience confirme l'implication d'une voie de conductance chlore dans l'augmentation de la conductance membranaire lors d'un choc osmotique.

Cependant, il convient de remarquer que, bien que la conductance membranaire observée en conditions hyposmotiques en l'absence de chlore extracellulaire (**Fig. 31. A.**) ou en présence de DIDS (50 μ M) (**Fig. 31. B.**) soit inférieure à celle observée en conditions isosmotiques (**Fig. 9. A.**), la conductance résiduelle observée dans ces deux conditions expérimentales (sans chlore extracellulaire ou en présence de DIDS) est supérieure à celle observée en conditions isosmotiques, dans les mêmes conditions de remplacement du chlore extracellulaire ou d'inhibition par le DIDS (**Fig. 9.B, Fig. 10. A et B.**). En effet, alors que les conductances pour les courants entrants, en absence de chlore extracellulaire et en présence de DIDS (50 μ M), sont respectivement de 0.64 ± 0.02 nS (n=18) et de 0.47 ± 0.02 nS (n=8) en conditions isotoniques, elles sont de 1.28 ± 0.07 nS (n=8) et de 0.75 ± 0.35 nS (n=7) dans les mêmes conditions de bain (absence de chlore ou DIDS respectivement) lors d'un choc osmotique. La conductance résiduelle pour les courants sortants présente une augmentation similaire, que ce soit en l'absence de chlore extracellulaire ou en présence de DIDS (50 μ M) dans le bain. En effet, en l'absence de chlore, la conductance pour les courants sortants est alors de 1.44 ± 0.06 nS (n=8, isotonie gluconate = 0.88 ± 0.06 , n=18 nS) et, en présence de DIDS, la conductance pour les courants sortants augmente à 1.23 ± 0.12 nS (n=7, isotonie DIDS= 0.61 ± 0.04 nS n=8). Ces derniers résultats suggèrent

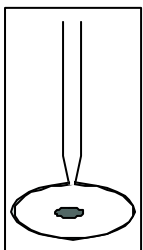
A



B

	$\gamma [-100 ; E_{rev}]$ (nS)	γE_{rev} (nS)	$\gamma [E_{rev} ; +100]$ (nS)	n
Contrôle	1.80 ± 0.05	2.34 ± 0.07	2.91 ± 0.07	8
Hyposmotique	2.44 ± 0.24	4.71 ± 0.41	6.28 ± 0.81	8
Retour isosmotique	0.59 ± 0.08	1.41 ± 0.14	2.31 ± 0.26	8

Figure 32. : Caractérisation en configuration « whole-cell » de la conductance membranaire globale des érythrocytes de truite en conditions hyposmotiques.



A : Relation courant-voltage obtenue en configuration « whole-cell » (n=8), en conditions isosmotiques (320 mOsm) ○ , lors d'un choc hyposmotique ● et 10 minutes après retour en conditions isosmotiques □ . Courbes représentatives de 8 expériences séparées.

B : Tableau récapitulatif des conductances membranaires calculées au potentiel d'inversion de la courbe E_{rev} , entre -100 et E_{rev} mV et entre E_{rev} et $+100$ mV. La valeur des conductances est la moyenne \pm SEM (Erreur standard à la moyenne) de n expériences séparées.

l'implication non négligeable d'une autre conductance dans l'augmentation de conductance observée dans les conditions hyposmotiques. De plus, les courants observés au potentiel théorique de membrane, -25 mV (Guizouarn *et al.*, 1993), sont des courants sortants.

- L'exposition des érythrocytes de truite à un milieu hypotonique provoque une augmentation de la conductance membranaire des globules rouges.
- La conductance observée lors du choc osmotique présente une forte rectification sortante.
- Cette augmentation de conductance est diminuée lors du remplacement du chlore extracellulaire par du gluconate ou en présence de DIDS dans le milieu de bain, suggérant l'activation d'une conductance Cl^- lors d'un choc hyposmotique.
- Dans ces dernières conditions expérimentales, la conductance résiduelle est significativement supérieure à celle obtenue en conditions isotoniques après inhibition de la conductance chlore. Ces résultats suggèrent la participation d'une autre voie de conductance lors des processus de gonflement suite à un choc hypotonique.

3.3. Activation réversible des courants globaux par le choc osmotique.

La **figure 32.** démontre que l'effet du choc osmotique sur l'activation des courants globaux membranaires est réversible. En effet, si la conductance moyenne au potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage augmente de 2.34 ± 0.07 nS ($n=8$) à 4.71 ± 0.41 nS ($n=8$) (**Fig. 32. A et B.**) à la suite d'un choc hypotonique, la conductance moyenne n'est plus que de 1.41 ± 0.14 nS ($n=8$) après retour aux conditions isosmotiques.

De plus, cette valeur est inférieure à la valeur observée en conditions de contrôle isosmotiques et correspond à une situation de « shrink » pour les cellules qui se trouvent confrontées à milieu extracellulaire désormais hypertonique pour elles (voir chap. 2).

Toutefois, ce dernier résultat suggère que les conductances qui sont normalement présentes à l'état stable, ou qui sont activées lors du gonflement cellulaire faisant suite à un choc hyposmotique sont inhibées durant le « shrink ».

- Le retour aux conditions isotoniques après un choc hypotonique (« RVI after RVD protocol ») provoque une chute rapide de la conductance membranaire, suggérant que les conductances activées lors d'un choc hypotonique sont inhibées durant le « shrink ».

4. Essai de caractérisation des voies de conductance impliquées dans l'augmentation de conductance membranaire observée en conditions hypotoniques en configuration « cell-attached ».

Les expériences en configuration « whole-cell » ayant permis de mettre en évidence l'activation de voies de conductance lors d'un choc hypotonique, il convenait de tenter de caractériser ces voies de conductance en configuration « cell-attached », afin de déterminer si un ou plusieurs des canaux décrits en conditions isotoniques pouvait être impliqué dans ces processus.

Après réalisation du scellement, la solution de bain isosmotique (Ringer 320 mOsm, pipette Ringer : isotonique) est remplacée par un milieu hypotonique (Ringer 215 mOsm).

Cependant, il s'avère très difficile de conserver la configuration « cell-attached » durant le gonflement des cellules. Toutefois, dans 26 des 67 expériences réalisées dans ces conditions, l'enregistrement de l'activité électrique membranaire avant et après perfusion de la solution hypotonique a pu être réalisé.

Cependant, aucune expérience n'a permis de démontrer une modification de l'activité des canaux mis en évidence lors des expériences en conditions isotoniques. En effet, le canal cationique non sélectif présente dans ces conditions la même fréquence d'occurrence que lors des expériences réalisées en conditions isotoniques, et le canal chlore à conductance linéaire n'a pu être observé dans ces conditions, puisque son amplitude à 0 mV ($-V_p$) n'est pas détectable. Un des candidats les plus prometteurs aurait pu être le canal chlore rectifié sortant dont la fréquence d'occurrence aurait pu être augmentée en présence de conditions hyposmotiques. Cependant aucune des expériences réalisées en conditions hypotoniques n'a permis de mettre en évidence une quelconque activité de ce canal. En outre, aucune des expériences réalisées en conditions hypotoniques n'a permis, après excision, de mettre en évidence la présence du canal chlore rectifié sortant sous la pipette de « patch ».

Discussion

La plupart des informations disponibles sur les mouvements d'ions de la membrane des érythrocytes ont été obtenues à l'aide de techniques de flux isotopiques et la technique du « patch-clamp » n'avait jamais été employée sur les érythrocytes de poissons.

Peu de choses étaient connues jusqu'à présent sur les voies de conductance ioniques dans les érythrocytes. Les premières études conduites en « patch-clamp » sur les globules rouges humains (Hamill, 1981) avaient permis de décrire un courant potassique activé lors de l'inhibition de l'efflux de Ca^{2+} par des traitements biochimiques, comme il avait été précédemment démontré par Gardos (1958), par déplétion de l'ATP intracellulaire. Ce canal Gardos est un canal potassique de conductance intermédiaire (20-25 pS) (Hamill, 1981 ; Grycorczyk *et al.*, 1984 ; Christophersen, 1991). Ce canal demeure toutefois relativement peu exploré en raison de la difficulté inhérente à l'étude des érythrocytes humains par la technique du « patch-clamp ». En outre, un deuxième type de canal à sélectivité cationique a pu être mis en évidence dans les érythrocytes humains. Il s'agit d'un canal cationique non sélectif activé par le potentiel membranaire qui est déclenché dans des cellules intactes lorsque ces dernières sont baignées dans un milieu dépolarisant, c'est-à-dire riche en potassium (500 mM K^+) (Christophersen et Benekou, 1991). Hamill (1983) a également démontré l'existence de canaux K^+ et Cl^- dans les érythrocytes de grenouille, susceptibles d'être activés lors du gonflement des cellules consécutif à l'exposition à un milieu hyposmotique. Récemment, Bergeron et ses collaborateurs (Bergeron *et al.*, 1996) ont montré chez un autre amphibien, *Necturus maculosus*, l'activation d'un canal potassique sensible au calcium intracellulaire lors d'un choc osmotique. Ces observations renforcent l'hypothèse de la participation des voies de conductance dans les processus de régulation de volume suite à un gonflement osmotique (RVD : « Regulatory Volume Decrease) dans ce type cellulaire. De plus, l'existence de canaux ioniques participant à la régulation de volume a également été démontrée chez un représentant du plus ancien groupe de vertébrés que sont les agnathes. Ainsi, dans les globules rouges de *Lampetra fluviatilis*, pour lesquels le

cotransport KCl (Kirk, 1991b) ne semble pas être activé lors de l'exposition à des conditions hypotoniques, des canaux K^+ participent au processus de RVD (Virkki et Nikinmaa, 1995, 1998). Toutefois, bien que l'existence de canaux ioniques dans les érythrocytes nucléés de poissons ait été suggérée par des expériences en flux isotopiques réalisées sur les globules rouges de *Ctenopharyngodon idella* (Marino *et al.*, 1981), aucune étude n'a permis à ce jour de décrire directement, à l'aide de la technique du « patch-clamp », l'existence de canaux ioniques dans les érythrocytes de cet embranchement, ni l'activation de voies de conductance lors d'un choc hyposmotique.

Le but du présent travail était de tester l'hypothèse de l'existence de voies de conductance ioniques dans la membrane du globule rouge de truite et de caractériser la nature et le rôle physiologique des canaux éventuellement présents dans cette membrane. L'utilisation de la configuration « whole-cell » par perforation de la membrane à la nystatine a permis de démontrer pour la première fois que la conductance membranaire est due à deux composantes principales : une voie de conductance Cl^- rectifiée sortante et sensible au DIDS, qui correspond à 50 % de la conductance membranaire totale, et une voie de conductance cationique non sélective correspondant également à 50 % de la conductance membranaire totale. Ces conductances ont pu être observées aussi bien en conditions isotoniques qu'en situation de choc hypotonique. L'utilisation de la technique de « single channel recording » pour l'enregistrement unitaire de l'activité des canaux a ensuite permis d'étudier les canaux ioniques des globules rouges en conditions normoxiques et normocapniques en l'absence de stimulation hormonale et en situation d'isotonie. Pour des raisons techniques, il n'a pu être possible de procéder à l'enregistrement des courants unitaires en conditions de choc hypotonique, les quelques essais réalisés ayant en effet démontré une trop grande fragilité des scellements en configuration « cell-attached ». Compte tenu du grand nombre de cellules utilisées au cours de cette étude, il est très probable que les trois types de canaux décrits sont les principales voies de conductance

impliquées dans le maintien de l'homéostasie acido-basique et hydrominérale de l'érythrocyte de truite.

L'enregistrement des courants globaux à travers la membrane des érythrocytes nucléés de truite en configuration « whole-cell » a permis de mettre en évidence le fait qu'en conditions isotoniques, la conductance membranaire est majoritairement dominée par une voie de conductance chlore rectifiée sortante, sensible au DIDS (50 μ M). En effet, le remplacement du chlore extracellulaire par l'anion imperméant gluconate et l'application extracellulaire du DIDS diminuent de plus de 50 % la conductance globale. Une telle voie de conductance chlore rectifiée sortante sensible au DIDS a été identifiée dans de nombreux types cellulaires, tels que les cellules d'acinis de glande parotide de rat (Arreola *et al.*, 1995), les ostéoclastes de lapin (Kelly *et al.*, 1994), les myocytes cardiaques de cobaye (Xu *et al.*, 1997) ou encore dans les cellules embryonnaires intestinales Intestine 407 (Kubo et Okada, 1992). Cependant, il convient de remarquer que l'inhibition par le DIDS (50 μ M) observée sur les courants membranaires de l'érythrocyte de truite n'est pas dépendante du voltage imposé à la membrane, contrairement à ce qui a pu être observé dans de nombreux types cellulaires. En effet, les courants sortants sont généralement plus affectés par cet inhibiteur que les courants entrants (Xu *et al.*, 1997 ; Gossling *et al.*, 1995 ; Meyer et Korbmacher, 1996).

L'inhibition de la conductance chlore par le DIDS ou en présence de gluconate, révèle que la conductance résiduelle est essentiellement linéaire et insensible au DIDS. Le potentiel d'inversion des courbes courant-voltage obtenues dans ces conditions suggère que le courant résiduel est dû au passage de cations à travers une voie de conductance cationique non sélective.

L'existence d'une telle voie de conductance chlore était envisageable pour les érythrocytes de truite, puisque le potentiel de membrane des globules rouges est de -25 mV

(Guizouarn *et al.*, 1993), soit un potentiel très proche du potentiel d'équilibre théorique du chlore ($E_{Cl} = -24$ mV), ceci reflétant une très forte perméabilité de la membrane au chlore, comme c'est le cas pour la majorité des globules rouges de vertébrés (Passow, 1964). A l'état d'équilibre, la membrane des globules rouges est considérée comme relativement peu perméable aux cations, alors qu'elle l'est aux anions (pour revue Cossins et Gibson, 1997). De plus, il a été démontré dans le globule rouge humain que les mouvements de chlore se font par deux voies de transport membranaires apparemment différentes : d'une part par le transport électroneutre que constitue l'échangeur Cl^-/HCO_3^- (capable d'échanger des ions Cl^-/Cl^-), dont le rôle fondamental est de permettre le transport du CO_2 dans le sang sous forme d'ions HCO_3^- (Gunn *et al.*, 1973), et d'autre part par un mécanisme apparent de voie de conductance chlore, qui détermine normalement le potentiel de repos des globules rouges (Hunter, 1971). Par ailleurs, les premières études réalisées à l'aide de la technique du patch-clamp en configuration «whole cell » sur des globules rouges de grenouille ont montré l'existence d'une voie de conductance chlore (Hamill, 1983). Cette conductance chlore dans les érythrocytes de grenouille permettrait de fixer le potentiel de membrane des globules rouges à une valeur proche du potentiel d'équilibre du chlore (E_{Cl}), afin qu'il n'y ait pas de gradient chimique pour les anions de part et d'autre de la membrane, ce qui permettrait d'optimiser le rôle d'échange de la bande 3 (Hamill, 1983). Cependant, cette voie de conductance Cl^- ne présente pas le caractère rectificateur marqué observé en « whole cell » dans les globules rouges de truite.

Dans les érythrocytes de truite, l'existence d'une conductance chlore a été récemment suggérée par l'observation d'une conductance chlore directement reliée à la bande 3 du globule rouge lorsque cette protéine est exprimée dans l'ovocyte de xénope (Fiévet *et al.*, 1995). En effet, l'expression de la bande 3 de truite dans les ovocytes de Xenope produit une activité d'échange anionique, ainsi que l'apparition d'un courant généré par les ions Cl^- , ce qui est inattendu de la part d'un échange considéré comme électroneutre. Cette conductance aux ions Cl^- a une relation courant-voltage quasi-linéaire et n'est pas activée par la dépolarisation de la membrane. De plus, l'amplitude de cette voie de

conductance aux ions Cl^- est directement liée à la quantité de protéine exprimée dans l'œuf, mais de façon non linéaire. Aussi, la voie de conductance chlore déterminée en configuration « whole-cell » en conditions isotoniques dans le présent travail pourrait jouer un rôle important dans la détermination du potentiel de membrane du globule rouge de truite. Associée à la voie de conductance cationique non sélective, elle pourrait également jouer un rôle important dans les processus de RVD en permettant des voies de sortie parallèles pour les ions K^+ et Cl^- .

A la suite du travail réalisé en configuration « whole-cell », il convenait de caractériser au niveau unitaire les canaux ioniques impliqués dans les deux voies de conductance décrites ci-dessus. L'utilisation de la technique du « patch » isolée a permis de démontrer l'existence de trois canaux ioniques différents en conditions isotoniques.

En configuration « cell-attached », deux types de canaux ont pu être décrits. Un canal cationique non sélectif (CNS), présent dans 91 % des scellements réalisés, et un canal chlore de faible conductance linéaire (SCC), détecté pour sa part dans 62 % des enregistrements.

Le canal cationique non sélectif (CNS)

Le canal cationique non sélectif présente en configuration « cell-attached » une conductance de 15.0 ± 1.9 pS au potentiel d'inversion, qui est de +30.4 mV. Cette valeur de potentiel d'inversion de la courbe courant-voltage établie en configuration « cell-attached », avec du Ringer comme solution de bain et de pipette, est tout à fait compatible avec l'idée d'un canal cationique non sélectif. Dans ces conditions, les cations sont à l'équilibre chimique de part et d'autre de la membrane du globule rouge, puisque la concentration en cations du Ringer est de 160 mM, et la concentration intracellulaire en cations a été mesurée à 168 mM (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Par ailleurs, le potentiel de repos membranaire du globule rouge étant de -25 mV (Guizouarn *et al.*, 1993) à l'état stationnaire, il existe donc

une « driving force » suffisante pour créer un courant entrant spontané de cations au travers de la membrane. En conséquence, il convient d'imposer un potentiel de dépolarisation de +25 à +30 mV (-Vp), afin d'annuler le gradient électrochimique pour les cations, et donc les courants générés par les cations.

Ce canal présente une légère rectification entrante lorsque la pipette et le bain contiennent du Ringer. En effet, les courants entrants sont légèrement supérieurs aux courants sortants (18.1 pS pour les courants entrants contre 13.5 pS pour les courants sortants). La conductance de ce canal est compatible avec celle de la majorité des canaux décrits dans la littérature. De telles valeurs de conductance ont pu être déterminées pour les tubules proximaux de rein de salamandre (Filipovic et Sackin, 1991), les cellules de côlon distal de rat (Gögelein et Capek, 1990), la vessie urinaire de poissons téléostéens (Chang et Loretz, 1991), les ovocytes d'ascidies (Moody et Bosma, 1989), les cellules de rein d'opossum (Uhl *et al.*, 1988), les cellules épithéliales de la membrane de Reissner (Yeh *et al.*, 1997), les cellules tumorales d'Ehrlich (Christensen et Hoffmann, 1992), ou encore pour les cellules de foie de rat (Bear, 1990).

L'analyse des courbes courant-voltage (I/V) obtenues lors des expériences de remplacement du Ringer par du KCl 145 mM démontre qu'en configuration « cell-attached », le canal ne distingue que très faiblement entre potassium et sodium. De plus, le remplacement du Ringer contenu dans la pipette par une solution de CaCl_2 72.5 mM démontre la perméabilité de ce canal pour le calcium. Cependant, une très nette diminution de la conductance est alors observée, sans que le potentiel d'inversion de la relation courant-voltage en soit modifié. La conductance est ainsi diminuée de 21 % au potentiel d'inversion de la courbe I/V. Une telle diminution de la conductance lors des expériences de remplacement par le Ca^{2+} est généralement observée pour les canaux cationiques non sélectifs perméants au calcium. Une diminution de l'amplitude des courants sortants et entrants a ainsi pu être observée dans les cellules de foie de rat (Bear, 1990), dans les cellules épithéliales de plexus choroïdien de salamandre (Christensen, 1987), dans les

cellules tumorales d'Ehrlich (Christensen et Hoffmann, 1992) ou dans les cellules épithéliales de la membrane de Reissner (Yeh *et al.*, 1997 ; Yeh *et al.*, 1998).

L'analyse des courbes courant-voltage obtenues en configuration « inside-out » lors des expériences de substitution anionique et cationique montre que ce canal est d'une part imperméant aux anions et, d'autre part peu sélectif pour les différents cations. En effet, le rapport de perméabilité relative $P_{\text{cation}}/P_{\text{anion}}$ est de 76 à la substitution, tant sur la face cytoplasmique que sur la face extracellulaire du chlore par l'anion imperméant gluconate, ne modifie pas les grandeurs électriques (E_{rev} , et conductances) des relations courant-voltage obtenues. Cette valeur de perméabilité relative $P_{\text{cation}}/P_{\text{anion}}$ est tout à fait comparable à celles des autres canaux cationiques non sélectifs décrits dans la littérature (Yeh *et al.*, 1997, 1998 ; Marchenko et Sage, 1997 ; Korbmacher *et al.*, 1995 ; Yang et Sachs, 1989, Hamill et McBride, 1993). Bien que peu sélectifs aux différents cations, les canaux de ce type sont généralement très imperméants aux anions.

Les expériences de substitution des différentes espèces cationiques font apparaître que le canal est incapable d'opérer une distinction entre les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Les rapports de sélectivité cationiques calculés à partir des potentiels d'inversion des courbes courant-voltage font apparaître que le calcium est l'ion le plus perméant à travers le canal. En revanche, le canal est imperméant au N-méthyl-D-glucamine (NMDG). La séquence de sélectivité établie à partir des rapports $P_{K^+}/P_{\text{cation}}$ est la suivante : Ca^{2+} (0.63) > Na^+ (0.99) $\geq K^+$ (1) >> NMDG (7.75).

Cette séquence de sélectivité du canal CNS est représentative de la majorité des séquences observées dans la littérature pour les canaux cationiques non sélectifs perméants au Ca^{2+} (Yeh *et al.*, 1997 ; Lansman *et al.*, 1987 ; Christensen et Hoffmann, 1992).

De plus, les conductances observées en configuration excisée montrent que le canal présente une légère rectification entrante, comme c'est le cas en configuration « cell-

attached », lorsque le cation prépondérant dans la solution de pipette est le sodium ou le potassium. Cette légère rectification entrante est une caractéristique commune à de nombreux canaux cationiques non sélectifs décrits dans la littérature. Ainsi, une rectification entrante est observée pour les canaux cationiques non sélectifs en configuration excisée dans les cellules de la surface endothéliale d'aorte de rat (Marchenko et Sage, 1997), dans les cellules endothéliales isolées de capillaire sanguin du cerveau de porc (Popp *et al.*, 1992), dans les cellules intestinales de téléostéens (Chang et Loretz, 1992), dans les cellules isolées de foie de rat (Bear, 1990) ou dans les ovocytes d'ascidie (Moody et Bosma, 1989).

En revanche, la rectification entrante disparaît lorsque la pipette est remplie d'une solution contenant 72.5 mM de CaCl_2 , comme lors des expériences en configuration « cell-attached ». Les conductances, tant pour les courants sortants que pour les courants entrants, sont significativement diminuées dans ces conditions. Cette observation est également souvent faite pour les canaux de type CNS perméants au Ca^{2+} . Ainsi, une diminution des courants sortants et entrants a pu être observée pour les canaux décrits en configuration excisée dans les cellules tumorales d'Ehrlich (Christensen et Hoffmann, 1992) ou les cellules de la membrane apicale des cellules épithéliales de la membrane de Reissner de cobaye (Yeh *et al.*, 1997).

Mécanosensibilité du canal CNS

Une caractéristique commune à de nombreux canaux cationiques non sélectifs perméants au calcium est leur sensibilité à l'étirement de la membrane (« stretch ») (Lansman *et al.*, 1987 ; Christensen, 1987 ; Yang et Sachs, 1989 ; Filipovic et Sackin, 1991 ; Yeh *et al.* 1997,1998). La définition d'un canal mécanosensible, ou « stretch-activé », se réfère aux canaux qui répondent au stress de déformation de la membrane par un changement de leur probabilité d'ouverture (Sackin, 1995 ; Hamill et McBride, 1997). Par

ailleurs, ces canaux redeviennent inactifs lorsque la déformation membranaire cesse (Hamill et McBride, 1997).

Dans la présente étude, les CNS présents sous la pipette de « patch » sont spontanément actifs dans 90 % des enregistrements et leur probabilité d'ouverture ne varie plus lorsqu'une dépression est appliquée à la membrane par succion. A première vue, les CNS ne répondent donc pas à la définition d'un canal « stretch-activé ». Cependant, il a été possible de démontrer que, dans les 10 % d'enregistrements où aucun canal n'était spontanément actif en configuration « cell-attached » ou en configuration « inside-out », une dépression sub-atmosphérique dans la pipette de patch pouvait provoquer l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs capables de revenir, dans une partie des enregistrements, à un état quiescent après retour à la pression initiale. Comme les canaux présentaient une conductance tout à fait identique à celle enregistrée lorsque le canal était spontanément actif, il s'agissait manifestement du même canal, et il convient donc de se demander pourquoi 90 % de ces canaux étaient spontanément actifs.

D'après une récente revue de Hamill et McBride (1997), il apparaît que les canaux mécanosensibles peuvent présenter une hypo- ou une hyper-mécanosensibilité dépendant du stress mécanique associé à la formation du scellement. Aussi, il est fort probable que l'importante activité spontanée du canal observée lors de cette étude peut résulter de la procédure de formation du scellement. En effet, lors de la formation du scellement, une dépression de 10 à 25 cm d'eau est appliquée à la membrane jusqu'à obtention du scellement, qui intervient généralement dans un délai de 20 secondes. Or, les globules rouges sont un type cellulaire extrêmement déformable (Nishiguchi *et al.*, 1995) et les canaux sensibles à la déformation membranaire possèdent des liens très étroits avec la bicouche lipidique de la membrane, ainsi qu'avec le cytosquelette. Ces liens leur confèrent leurs propriétés de mécano-sensibilité. La tension appliquée à la membrane durant la formation du scellement peut donc provoquer d'une part la formation d'un « bleb », qui augmente la tension de la bicouche lipidique, et d'autre part une destruction locale du réseau

de soutien de la membrane que constitue le cytosquelette. La surstimulation mécanique durant l'enregistrement de «patch-clamp» peut alors résulter d'un découplage ou d'une rupture des interactions membrane/cytosquelette. L'absence de lien avec le cytosquelette peut alors être responsable de l'ouverture directe et durable du canal du fait de la tension développée dans la bicouche lipidique (Hamill et McBride, 1997).

L'analyse cinétique de l'activité du canal en configuration «inside-out» confirme l'appartenance de ce canal à la famille des canaux cationiques non sélectifs perméants aux ions calciques. En effet, la cinétique de l'activité du canal peut être ajustée par deux constantes de temps d'ouverture ou de fermeture relativement rapides (<100 ms), et ce quel que soit le potentiel de membrane ($V_m = \pm 30$ mV). Une telle description de l'activité des canaux de types CNS a été faite dans les cellules embryonnaires en culture de muscle squelettique de poulet (Guharay et Sachs, 1984), dans les cellules de vessie urinaire de téléostéens (Chang et Loretz, 1991) ou dans les ovocytes d'ascidie (Moody et Bosma, 1989). Toutefois, une troisième constante d'ouverture ou de fermeture supérieure à 150 ms peut être déterminée, bien qu'elle n'ait pas été chiffrée dans cette étude.

L'existence de cette troisième constante de temps doit être liée au caractère mécanosensible du canal cationique non sélectif décrit dans cette étude. En effet, lorsque le canal cationique non sélectif a pu être activé par une dépression sub-atmosphérique dans la pipette, l'activité du canal a augmenté avec l'intensité de la dépression (**Fig. 20.**). Cette augmentation de la probabilité d'ouverture semble liée à l'augmentation du temps moyen d'ouverture, c'est-à-dire la constante de temps d'ouverture supérieure à 150 ms. Aussi une étude plus approfondie de cette troisième constante de temps devrait permettre la détermination d'une relation entre la valeur de cette constante et l'activité du canal cationique non sélectif lorsque celui-ci est activé par une dépression calibrée.

L'analyse de la cinétique révèle également que l'activité du canal CNS observée sur la membrane de l'érythrocyte de truite, caractérisée par le produit $INPo$ (Amplitude du

courant*Nombre de canaux* probabilité d'ouverture), est indépendante du potentiel de membrane. Ceci est contraire à ce qui a pu être décrit pour les canaux CNS des cellules de vessie urinaire de téléostéens (Chang et Loretz, 1991), des ovocytes de Xénope (Yang et Sachs, 1989) ou des cellules de tubules proximaux de rein de salamandre (Filipovic et Sackin, 1991). Dans ces différents types cellulaires, une dépolarisation membranaire provoque en effet une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux préactivés par une dépression exercée dans la pipette.

Le classement du canal cationique non sélectif dans la famille des canaux mécanosensibles est conforté par l'observation de la sensibilité de ce dernier au gadolinium (Gd^{3+} , 20 μM) extracellulaire. Cet ion de la série des Lanthanides se révèle être un inhibiteur puissant des canaux « stretch-activés », depuis la première description de son effet inhibiteur sur les canaux mécanosensibles des ovocytes de xénope (Yang et Sachs, 1989).

Le Gd^{3+} est un ion trivalent en solution aqueuse, qui présente de remarquables similarités avec le calcium en terme de taille (0.99 Å) et de fixation sur les sites à calcium (Evans, 1990). L'effet du gadolinium sur les canaux mécanosensibles a été reporté dans l'ensemble des règnes vivants. Ainsi, cet ion bloque les canaux mécanosensibles perméants au calcium chez les plantes (Millet et Pickard, 1988), mais également les canaux mécanosensibles des procaryotes (Berrier *et al.*, 1992). Dans les cellules eucaryotes animales, de nombreuses études ont démontré l'effet inhibiteur du gadolinium sur cette famille de canaux. Ainsi, une telle inhibition des canaux CNS par le gadolinium extracellulaire a pu être observée dans les cellules de tubules proximaux de salamandre (Filipovic et Sackin, 1991), dans les cellules endothéliales d'aorte de rat (Marchenko et Sage, 1997 ; Hoyer *et al.*, 1997), dans les myocytes ventriculaires de lapin (Clemo et Baumgarten, 1997 ; Clemo *et al.*, 1998) ou dans les ovocytes de xénope (Taglietti et Toselli, 1988).

En revanche, de façon surprenante, le canal CNS de l'érythrocyte de truite est inhibé par l'addition sur la face cytosolique d'acide flufénamique (100 μ M) ou de quinine (1 mM). Or, ces deux inhibiteurs sont décrits dans la littérature comme étant des inhibiteurs des canaux cationiques non sélectifs, insensibles à la déformation de la membrane mais activés par l'augmentation intracellulaire de la concentration en calcium et sensibles à l'augmentation intracellulaire en nucléotides (canaux de type CAN). Ainsi, l'action inhibitrice de l'acide flufénamique ajouté sur la face cytosolique des canaux cationiques non sélectifs de type CAN a été démontrée dans les cellules de l'anse ascendante de Henle du rein de souris (Paulais et Teulon, 1989), dans les cellules exocrines de pancréas de rat (Gögelein *et al.*, 1990), dans les cellules de l'oreille externe de cobaye (Van den Abbeele *et al.*, 1994) ou dans les cellules striales en culture de gerbille (Yeh *et al.*, 1995). De façon identique, l'action inhibitrice de la quinine sur les canaux cationiques de types CAN des cellules isolées de côlon de rat (Gögelein et Capek, 1990) a été décrite. Toutefois, pour ce type cellulaire, l'addition de quinine sur la face cytosolique de la membrane induit une diminution de la probabilité d'ouverture du canal par un blocage de type « flicker block ». Un tel effet n'a pu être observé dans les expériences conduites en présence de cet inhibiteur pour le canal cationique non sélectif décrit dans l'érythrocyte nucléé de truite.

L'analyse du canal en configuration « cell-attached » a permis de parvenir à la conclusion que l'augmentation de la concentration intracellulaire en nucléotide par l'ajout d'agents pharmacologiques ne provoque aucune modification de l'activité du canal, ceci confirmant que ce canal est de la famille des « stretch-activés ». En effet, Yeh *et al.* (1998) suggèrent que ce protocole permet d'opérer la distinction entre les canaux cationiques non sélectifs « stretch-activés » et les canaux cationiques non sélectifs de type « CAN », activés par l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium.

Enfin, l'activité du canal cationique non sélectif décrit ici se révèle sensible à l'addition de baryum (5 mM) sur la face cytosolique, ce qui peut sembler surprenant. Cet ion

est généralement utilisé comme substituant de l'ion Ca^{2+} afin de démontrer la perméabilité d'un canal à cet ion. Ainsi, les canaux mécano-sensibles perméants au calcium des cellules tumorales d'Ehrlich (Christensen et Hoffmann, 1992), des myocytes cardiaques ventriculaires de rat (Lefevre *et al.*, 1995), des cellules endothéliales d'aorte de rat (Hoyer *et al.*, 1997), des hépatocytes de rat (Bear, 1990) ou de la membrane apicale des cellules épithéliales de la membrane de Reissner de cobaye (Yeh *et al.*, 1997) se révèlent perméants au Ba^{2+} . En outre, les séquences de sélectivité généralement établies pour ces différents types cellulaires font apparaître que l'ion Ba^{2+} est plus perméant que le calcium à travers le canal ionique. Cependant, Robson et Hunter (1997) ont récemment décrit un canal cationique non sélectif inhibé par le gadolinium ainsi que par le baryum dans les cellules isolées de la membrane basolatérale de tubules proximaux de rein de grenouille.

L'effet inhibiteur de cet ion divalent sur le canal cationique non sélectif peut vraisemblablement s'expliquer par la taille de cet ion, qui présente en effet un rayon de 1.35 Å, alors que le calcium possède pour sa part un rayon de 0.99 Å. D'autre part, cet ion possède une énergie de déhydratation ($\Delta H^\circ_{\text{hydratation}} = -397 \text{ kcal/mol}$) plus faible que celle du sodium ($\Delta H^\circ_{\text{hydratation}} = -105 \text{ kcal/mol}$), du potassium ($\Delta H^\circ_{\text{hydratation}} = -85 \text{ kcal/mol}$) ou du calcium ($\Delta H^\circ_{\text{hydratation}} = -328 \text{ kcal/mol}$), ce qui lui confère une affinité plus grande pour les sites de fixation négatifs du canal (Hille, 1992). Ces différences chimiques pourraient expliquer d'une part la plus grande facilité d'accès au canal pour cet ion, et donc la rapidité de l'inhibition observée, et d'autre part le fait que l'ion une fois fixé ne progresse plus dans la protéine canal en raison de son rayon.

L'effet inhibiteur de l'amiloride sur de nombreux canaux cationiques non sélectifs décrits dans la littérature n'a pas été observé dans le cadre de cette étude. L'amiloride semble agir directement et rapidement en bloquant l'entrée des canaux mécano-sensibles (Hamill et McBride, 1996). Ainsi, dans l'ovocyte de xénope, l'addition d'amiloride sur la face

externe de la membrane inhibe l'activité du canal cationique non sélectif (Hamill *et al.*, 1992). Selon toute vraisemblance, l'absence d'effet observée dans cette étude peut être liée à l'application de cet agent pharmacologique sur la face interne de la membrane. Il est en effet impossible de réaliser une configuration « outside-out » sur le globule rouge de truite, ce qui interdit l'emploi d'agents inhibiteurs à action rapide sur la face externe.

Cependant, si l'activation de nombreux canaux cationiques non sélectifs observés dans cette étude peut être expliquée par la procédure de scellement, le fait qu'en configuration « whole-cell » 50 % de la conductance en conditions isotoniques soit due à un canal cationique non sélectif démontre que ce canal est probablement une voie de conductance importante dans les conditions d'équilibre de la membrane du globule rouge. Ceci n'est pas nécessairement en contradiction avec l'activation du canal par une déformation de la membrane, puisqu'il est envisageable que la technique de « whole-cell » elle-même induise une déformation membranaire (Hamill et McBride, 1997)

Compte tenu de la fréquence d'observation du canal CNS en configuration « cell-attached », et en estimant la surface du fragment de membrane sous la pipette de « patch » à $2.5\text{-}3.5\ \mu\text{m}^2$ et la surface calculée des globules rouges à $300\ \mu\text{m}^2$, le nombre de copies du canal cationique non sélectif peut être estimé à 100 par globule rouge.

Rôle physiologique du canal CNS

Le rôle physiologique du canal cationique non sélectif paraît peu clair, dans la mesure où, dans les conditions physiologiques, il permet un influx de sodium aussi bien qu'un efflux de potassium. En effet, au potentiel spontané de membrane ($-25\ \text{mV}$), le gradient électrochimique pour les cations est entrant et pourrait donner un flux entrant permanent de sodium dans la cellule. Il en résulterait un gain important de sodium que la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ devrait compenser par une déperdition continue d'énergie pour la cellule. Comme il est établi que l'échangeur sodium/proton de la membrane des globules rouges de truite ne

peut être activé que par stimulation β -adrénergique (Baroin *et al.*, 1984, Gallardo Romero *et al.*, 1996), en l'absence d'activité du canal cationique non sélectif décrit dans cette étude, la membrane du globule rouge peut être considérée comme imperméante aux cations et plus particulièrement au sodium.

Aussi le caractère mécano-sensible du canal cationique non sélectif pourrait rendre compte de l'absence de perméabilité cationique déjà observée dans les globules rouges de truite (Cossins et Gibson, 1997).

En outre, le canal cationique non sélectif est perméant au calcium et pourrait donc représenter une voie d'entrée pour cet ion lors de processus physiologiques tels que la régulation de volume cellulaire faisant suite à un gonflement. En effet, ce rôle est souvent prêté aux canaux cationiques non sélectifs de nombreux types cellulaires (Falke et Misler, 1989 ; Christensen, 1987 ; Bear, 1990).

Christensen (1987) a en effet montré que les cellules de plexus choroïdien d'amphibiens contenaient des canaux dits « stretch-activés » (SAC, c'est-à-dire activés lors de l'application d'une dépression dans la pipette) qui pouvaient permettre une entrée de Ca^{2+} dans la cellule, mais il a aussi souligné le fait que cet influx de calcium dans la cellule représentait une quantité suffisante pour permettre l'activation d'un canal potassique dépendant du calcium (K_{Ca}). Ce canal K_{Ca} est de plus le canal potassique activé lors d'un choc osmotique (Christensen, 1987). Il conclut alors que les canaux « stretch-activés » sont déclenchés pendant la phase de gonflement de la cellule, par déformation de la membrane due à la tension, causant ainsi un influx de calcium permettant l'activation d'un canal potassique qui représente l'effecteur de l'efflux de K^+ régulateur du volume cellulaire.

De même, l'activation de canaux SAC durant un gonflement cellulaire faisant suite à un choc hypotonique a pu être démontrée dans les cellules de rein d'opossum (Ubl *et al.*, 1988) ou dans les neuroblastomes (Falke et Misler, 1989). Dans ces conditions, les canaux NSC pourraient représenter une voie de sortie pour les ions K^+ durant les processus de RVD. Cette hypothèse semble d'autant plus intéressante que le canal CNS présente des caractéristiques pharmacologiques communes avec le canal cationique non sélectif de la

membrane basolatérale des cellules A6, qui est directement impliqué dans l'efflux potassique durant le RVD (De Smet *et al.*, 1998).

Le canal chlore à faible conductance (SCC)

Le deuxième type de canal observé dans cette étude en configuration « cell-attached » et en configuration « inside-out » est un canal chlore à conductance linéaire. La conductance de ce canal en configuration « cell-attached » est de 5.3 pS, avec un potentiel d'inversion de la relation courant-voltage de 5 mV. La faible amplitude des courants enregistrés n'a pas permis une analyse plus fine de ce canal en configuration « cell-attached ». Il est cependant vraisemblable que ce canal joue un rôle fondamental dans le maintien du potentiel de repos, compte tenu de sa très forte fréquence d'apparition (62 %) et de son potentiel d'inversion dans ces conditions.

Ce petit canal chlore présente en configuration « inside-out » une conductance linéaire en conditions symétriques de KCl.

Il présente une forte sélectivité anionique ($P_{\text{anion}}/P_{\text{cation}} = 3.3$) et se révèle imperméant au gluconate. Il est en outre insensible au DIDS (100 μM intracellulaire) mais est inhibé par le NPBB (50 μM).

Une telle conductance chlore insensible au DIDS a été récemment mise en évidence dans le globule rouge humain (Freedman *et al.*, 1994 ; Freedman et Novak, 1997). Ces auteurs démontrent en effet que le prétraitement des globules rouges avec 10 μM de DIDS ou 100 μM de SITS pendant 30 mins à 23 °C inhibe les mouvements de chlore de seulement 59 à 67 %. Cette observation d'une inhibition partielle laisse présumer l'existence de deux voies de conductance au chlore dans les globules rouges humains. La première correspondrait à une voie de transport sensible au DIDS, qui serait la bande 3, et la seconde une voie insensible au DIDS, qui présenterait les caractéristiques d'une voie de conductance répondant au modèle d'électrodiffusion simple (Freedman et Novak, 1997).

Rôle physiologique du canal SCC

Le rôle physiologique du canal chlore à conductance linéaire décrit dans cette étude semble être la régulation du potentiel de membrane du globule rouge. En effet, à l'état d'équilibre, les protons et les ions Cl^- sont distribués passivement de part et d'autre de la membrane. En accord avec un équilibre de Donnan, la concentration intraérythrocytaire en protons résulte d'un équilibre physico-chimique où les mouvements de Na^+ et de K^+ à travers la membrane du globule rouge sont extrêmement lents et les mouvements de Cl^- et de HCO_3^- approximativement un million de fois plus rapides. Dans ces conditions, la signification fonctionnelle du canal SCC serait de fixer le potentiel de membrane au potentiel d'équilibre du chlore, afin d'annuler le gradient électrochimique pour des mouvements conductifs de chlore. Cette fixation du potentiel de membrane au potentiel d'équilibre du chlore permet ainsi de conférer une efficacité maximale à l'échangeur chlore/bicarbonate dans sa fonction respiratoire. Il a été établi que les valeurs de pH intracellulaire mesurées par microélectrode intracellulaire (Guizouarn *et al.*, 1993) ou par la méthode de congélation-décongélation (Motais *et al.*, 1989) sont en accord avec la théorie qui veut que les valeurs physiologiques de $\text{pH}_{\text{ext}} = 7.90$, $\text{pH}_{\text{intra}} = 7.43$, $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}} = 120 \text{ mM}$ et $[\text{Cl}^-]_{\text{intra}} = 45 \text{ mM}$ correspondent à un ratio $[\text{H}^+]_{\text{ext}}/[\text{H}^+]_{\text{intra}} = 0.34$ et $[\text{Cl}^-]_{\text{intra}}/[\text{Cl}^-]_{\text{ext}} = 0.37$. De plus, les valeurs de concentrations intraérythrocytaires et plasmatiques pour les ions K^+ , Na^+ et Cl^- données par Fiévet *et al.* (1988) et par Motais *et al.*, (1989) donnent un potentiel d'équilibre du Cl^- à -24 mV . Or un potentiel de membrane de -25 mV a pu être mesuré par microélectrode dans les érythrocytes de truite (Guizouarn *et al.*, 1993), ce qui confirme que le potentiel de membrane des globules rouges est certainement fixé par une voie de conductance pour les ions chlore.

Le canal ORCC

Le canal SCC ne peut rendre compte de la voie de conductance chlore rectifiée sortante sensible au DIDS observée en conditions isotoniques, en configuration «whole-cell ». Un canal chlore DIDS-sensible devrait donc exister. Or, un troisième type de canal a en effet pu être observé dans cette étude.

Ce canal n'a jamais été observé en conditions « cell-attached » et n'a pu être enregistré en configuration «inside-out » que dans 5 % des scellements réalisés. L'activité de ce canal n'a pu être détectée qu'après une attente de 15 à 20 minutes associée à une procédure de «pulse » de dépolarisation de la membrane ($V_p = -60$ mV). Ces conditions représentent des conditions critiques pour l'étude des globules rouges de truite par la technique du « patch-clamp ». En effet, du fait de l'extrême fragilité de la membrane plasmique de ces cellules, une telle procédure conduit généralement à la perte des caractéristiques du scellement (diminution de la résistance et augmentation des courants de fuite).

Malgré le faible nombre d'observations de ce canal ($n=23$), en comparaison des deux autres voies de conductances décrites dans cette étude, il a pu être défini comme étant un Canal Chlore Rectifié Sortant (Outwardly Rectifying Chloride Channel : ORCC). En conditions symétriques de KCl ce canal présente en effet une forte rectification sortante, puisque la conductance pour les courants sortants est de 55 pS, alors qu'elle n'est que de 24 pS pour les courants entrants.

Bien qu'une fréquente activité spontanée des canaux ORCC ait pu être mise en évidence dans quelques rares types cellulaires tels que les cellules de surface de l'épithélium de côlon de rat (Diener *et al.*, 1989) ou les entérocytes isolés de poulet (Fischer *et al.*, 1991), la plupart des rapports de la littérature font état de l'observation de l'activation des canaux de type ORCC uniquement après excision et de fortes dépolarisations. Ainsi, une activation similaire a pu être observée pour les canaux de cette famille décrits dans les cellules fœtales

de pancréas humain (Gray *et al.*, 1989), dans la membrane apicale des cellules de côlon (Halm *et al.*, 1988), dans les entérocytes isolés de cobaye (Monaghan *et al.*, 1997), dans la membrane apicale des cellules de poumon humain (Li *et al.*, 1988 ; Welsh et Liedtke, 1986) ou sur la membrane basolatérale des cellules de cryptes isolées de côlon distal de souris (Mignen *et al.*, 1997).

Différents auteurs estiment en effet que l'absence d'activité des canaux de cette famille en configuration « cell-attached » doit être liée à l'existence d'un composé cytosolique qui aurait un effet inhibiteur sur le canal (Disser et Frömter, 1993 ; Kunzelmann *et al.*, 1991). Ces auteurs ont démontré que l'application d'extrait cytoplasmique sur la face interne de la membrane réduit de manière significative la probabilité d'ouverture du canal. De plus, le poids moléculaire de ce facteur est inférieur à un kDa. Toutefois, il a également été démontré que lorsque la température de la solution baignant la face cytosolique de la membrane est augmentée (37°C), les canaux de type ORCC s'activent immédiatement après excision, sans qu'il ait été nécessaire d'imposer à la membrane un protocole de dépolarisation répété (Disser et Frömter, 1993 ; Kunzelmann *et al.*, 1991). La dépendance de l'activité du canal chlore rectifié sortant vis-à-vis de la température n'a pas été testée dans cette étude du fait de la nature du type cellulaire ($T^{\circ}=15^{\circ}\text{C}$) et pourrait faire l'objet d'une étude plus approfondie. D'autres facteurs intracellulaires tels que l'AMPc, les protéines kinases ou le Ca^{2+} intracellulaires sont susceptibles de permettre une régulation de l'activité de ce type de canal (Halm *et al.*, 1988 ; Xu et Lu, 1994), mais n'ont pas fait l'objet d'études lors de ce travail.

Le canal chlore rectifié sortant observé dans cette étude présente des conductances similaires à de nombreux canaux Cl^{-} de cette famille observés dans la littérature. En effet, l'existence de canaux Cl^{-} rectifiés sortants présentant des conductances similaires a été démontrée dans les cellules de rein de chien en culture MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) par Banderali et Roy (1992), dans les cellules en culture hématopoïétiques myéloblastiques humaines (Xu et Lu, 1994), dans la lignée de cellules pulmonaires

humaines 9HTEo⁻ (Schwiebert *et al.*, 1995), dans la membrane apicale des cellules de trachée de bovin (Ismailov *et al.*, 1996) ou encore dans la lignée cellulaire de la glande submandibulaire humaine HSG (Ishikawa et Cook, 1993).

Ce canal chlore rectifié sortant observé en configuration « inside-out » pourrait rendre compte de la conductance rectifiée sortante observée en conditions isosmotiques en configuration « whole-cell ».

La sélectivité anionique du canal, testée par diminution de la concentration en KCl du milieu de bain par remplacement de la solution K_{int} par une solution $K_{int} \frac{1}{2}$ donne un rapport de sélectivité anionique P_{anion}/P_{cation} de 3.7. De plus, le remplacement de la solution de bain par une solution contenant le cation imperméant NMDG ne modifie pas de manière significative les potentiels d'inversion des relations courant-voltage obtenues, démontrant que ce canal est sélectif aux anions.

L'analyse de la cinétique d'activité du canal révèle son activité en « burst ». En effet, l'ajustement des histogrammes des temps de résidence des états ouverts du canal fait apparaître des constantes d'ouverture relativement courtes, caractérisant une cinétique rapide d'ouverture et de fermeture du canal. Ce mode de fonctionnement a déjà été démontré dans plusieurs études portant sur des ORCC (Xu et Lu, 1994 ; Yeh *et al.*, 1995).

La caractérisation pharmacologique du canal fait apparaître qu'il est sensible au NPPB et au DIDS, comme de nombreux autres canaux de type ORCC. En effet, les canaux chlore rectifiés sortants sont en général bloqués de façon relativement spécifique par le NPPB (Tilman *et al.*, 1991). Lors de ces expériences, le NPPB provoque une brutale réduction de la probabilité d'ouverture. En revanche, contrairement aux inhibitions reportées dans de nombreuses études (Monaghan *et al.*, 1997 ; Ishikawa et Cook, 1993 ; Yeh *et al.*, 1995), cet inhibiteur ne provoque pas de blocage de type « flicker block » sur le canal ORCC des érythrocytes de truite. De plus, bien que pratiquée sur la face intracellulaire, l'addition de DIDS (100 μ M) provoque une inhibition comparable à celle observée sur les cellules hématopoïétiques humaines ML-1 (Xu et Lu, 1994).

Rôle physiologique du canal ORCC

Le canal chlore rectifié sortant observé dans cette étude pourrait, quant à lui, rendre compte de l'augmentation de conductance faisant suite à un choc osmotique. En effet, les canaux Cl^- rectifiés sortants dont l'activité est déclenchée par un gonflement des cellules ont été décrits dans de très nombreux types cellulaires, comme les cellules épithéliales intestinales en culture (Kubo et Okada, 1992 ; Solc et Wine, 1991). Bien que la plupart de ces conductances Cl^- rectifiés sortantes aient été mises en évidence par la technique du « whole-cell », quelques études ont permis de caractériser en configuration « cell-attached » leur activité isolée (Kelly *et al.*, 1994 ; Solc et Wine, 1991 ; Banderalli et Roy, 1992).

L'enregistrement des courants globaux transmembranaires en configuration « whole-cell » montre une augmentation de conductance lorsque les érythrocytes sont soumis à un choc hyposmotique, mettant ainsi en évidence l'activation de voies de conductance lors d'une stimulation hypotonique. Cette augmentation de conductance est réduite lorsque la solution de bain contient l'anion imperméant gluconate à la place des ions Cl^- , ou en présence de DIDS (50 μM) dans le milieu de bain. Ces résultats permettent alors d'associer l'augmentation de conductance en conditions hyposmotiques à l'augmentation d'une voie de conductance au Cl^- . De plus, en conditions hypotoniques, les relations courant-voltage établies en configuration « whole-cell » présentent le caractère rectificateur sortant observé en conditions isosmotiques. Ce résultat laisse supposer l'implication de la même voie de conductance chlore lors de la diminution de l'osmolarité que celle décrite en conditions isotoniques

Les voies de conductance Cl^- rectifiées sortantes sont souvent associées à l'augmentation de volume des cellules, et donc aux processus de régulation du volume cellulaire suite au gonflement qui s'en suit (RVD). Cependant, bien que la plupart des études reportent l'activation d'un tel courant chlore ($I_{\text{Cl, swell}}$) uniquement après un choc hypotonique (Meyer et Korbmacher, 1996 ; Kubo et Okada, 1992 ; Robson et Hunter, 1994),

l'enregistrement d'un courant chlore rectifié sortant en conditions isotoniques en configuration « whole-cell » a quelquefois pu être enregistré (Kelly *et al.*, 1994 ; Botchkin et Matthews, 1993 ; Tseng, 1992). Ces courants, générés par des ions Cl⁻, en conditions isosmotiques seraient vraisemblablement dus à un déséquilibre ionique qui intervient au moment du passage en configuration « whole-cell » durant l'équilibration du contenu de la pipette avec le contenu intracellulaire (Kelly *et al.*, 1994 ; Worrell *et al.*, 1989 ; Botchkin et Matthews, 1993). Par ailleurs, la conductance chlore activée par un gonflement cellulaire présente dans nombre de types cellulaires une rectification sortante et une sensibilité aux dérivés des stilbènes identique à celle observée dans cette étude (Mc Cann *et al.*, 1989 ; Solc et Wine, 1991 ; Kubo et Okada, 1992).

Aussi, du fait de la rectification sortante des courants observés lors du choc osmotique en configuration « whole-cell », il est fort probable que le canal ORCC décrit en configuration « inside-out » dans cette étude soit responsable de ce courant. En effet, l'identification au niveau unitaire des canaux ioniques responsables d'un tel courant global fait apparaître l'implication d'un canal ORCC dans les quelques types cellulaires où l'activation en conditions hypotoniques en configuration « cell-attached » a pu être observée (Solc et Wine, 1991 ; Banderali et Roy, 1992).

L'augmentation de courant observée lors des expériences de chocs osmotiques en configuration « whole-cell » correspondant à la conductance résiduelle insensible au DIDS extracellulaire pourrait résulter de l'augmentation de l'activité du canal cationique non sélectif décrit dans cette étude. En effet, lors de ces expériences, la conductance résiduelle est augmentée de plus de 50 % par rapport aux conditions isotoniques. Aussi, des expériences en configuration « cell-attached » devraient permettre de connaître plus précisément la nature de ces courants même si, à ce jour, les tentatives se sont révélées infructueuses. Il serait en effet intéressant de savoir si l'activation de ce canal est nécessaire afin d'assurer l'électroneutralité des efflux de solutés lors des processus de régulation de volume, comme il a été mesuré par Guizouarn *et al.* (1993), ou si ce canal, du fait de sa perméabilité calcique, ne représente pas une voie d'entrée pour le Ca²⁺, ce qui ferait de lui un second messager

intracellulaire comme il a été largement décrit dans la littérature (pour revue Sackin, 1995). Cependant, cette deuxième hypothèse semble peu vraisemblable dans la mesure où, à ce jour, aucune étude ne révèle un quelconque rôle joué par le calcium dans les érythrocytes nucléés de téléostéens lors des processus de RVD (Garcia-Romeu *et al.*, 1991).

Chapitre 2.

Implication des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes nucléés de truite dans les processus de régulation de volume faisant suite à un gonflement hypotonique.

Introduction

Lorsqu'ils sont soumis à des conditions hypotoniques, les globules rouges de truite gonflent dans un premier temps, puis mettent en place des mécanismes de régulation de volume (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Ces érythrocytes possèdent deux voies de flux pour le K^+ , qui sont identifiées par leur dépendance vis-à-vis du Cl^- (voie de sortie de Cl^- -dépendante ou Cl^- -indépendante) mais qui sont toutes deux sensibles aux variations du volume cellulaire (Bourne et Cossins, 1984 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1991). La relation entre ces deux voies de transport est le sujet de nombreux débats et la question demeure de savoir si elles sont l'expression d'un même transporteur (Motais *et al.*, 1991) ou si leur sensibilité aux variations de volume est l'expression d'un mécanisme de régulation commun (Berenbrink *et al.*, 1997). Ces deux voies de transport sont sensibles aux inhibiteurs de la bande 3. Motais et ses collaborateurs (Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993) ont suggéré que ces deux flux de K^+ sont réalisés par un même transporteur dont la sélectivité anionique est dictée par la force ionique interne, différente selon le mode de gonflement (isotonique ou hypotonique).

Le gonflement hypotonique provoque également l'activation d'une voie de transport pour la taurine indépendante du Na^+ (Garcia-Romeu *et al.*, 1991) et il semble que cette voie de transport soit capable de transporter une large gamme de solutés, qui peut inclure le passage de la paire K^+ -anion (Lewis *et al.*, 1996). Ces auteurs ont récemment démontré qu'il existait des similarités pharmacologiques entre la voie de sortie pour les solutés organiques et la voie de sortie Cl^- -indépendante de K^+ (Bursell et Kirk, 1996 ; Lewis *et al.*, 1996), suggérant que les différents solutés sont transportés à travers la membrane par une même protéine possédant une très faible sélectivité vis-à-vis des différents substrats.

Or, l'étude des voies de conductance de la membrane des érythrocytes de truite a montré que les courants membranaires globaux étaient dominés pour 50% par une voie de conductance Cl^- rectifiée sortante sensible au DIDS, et pour 50 % par une voie de conductance cationique non sélective (Chap. 1.) Cette étude a également permis de

démontrer que les courants membranaires sont stimulés de manière réversible par le gonflement hypotonique. L'existence de trois types différents de canaux ioniques responsables de ces courants membranaires a été démontrée en utilisant les configurations « cell-attached » et « inside-out » de la technique du « patch-clamp ».

Ces trois types de canaux sont : un canal cationique non sélectif (CNS) inhibé par l'acide flufénamique (100 μ M), la quinine (1 mM), le Ba^{2+} (5 mM) et le Gd^{3+} (20 μ M), présent dans 85 % des enregistrements et présentant une conductance intermédiaire (25-30 pS), un petit canal Cl^- (SCC) inhibé par le NPPB et insensible au DIDS, présent dans 62 % des cellules testées, ainsi qu'un canal chlore rectifié sortant (ORCC) sensible au NPPB (50 μ M) observé dans 5 % des cellules étudiées.

Afin de déterminer si ces canaux pouvaient être impliqués dans les processus de régulation du volume cellulaire après exposition à des conditions hypotoniques, l'évolution du RVD estimée par mesure du contenu en eau et en potassium des cellules en présence de solution de Ringer Cl^- et MeSF, en conditions normoxiques et normocapniques a été suivie en présence des inhibiteurs précédemment cités. Les effets inhibiteurs des différents agonistes ont été comparés selon que le choc hypotonique était réalisé en présence de Ringer Cl^- ou de Ringer MeSF, le MeSF représentant en effet un substituant anionique garantissant l'inhibition fonctionnelle de la voie de sortie Cl^- -dépendante de K^+ (Berenbrink *et al.*, 1997 ; Armsby *et al.*, 1995).

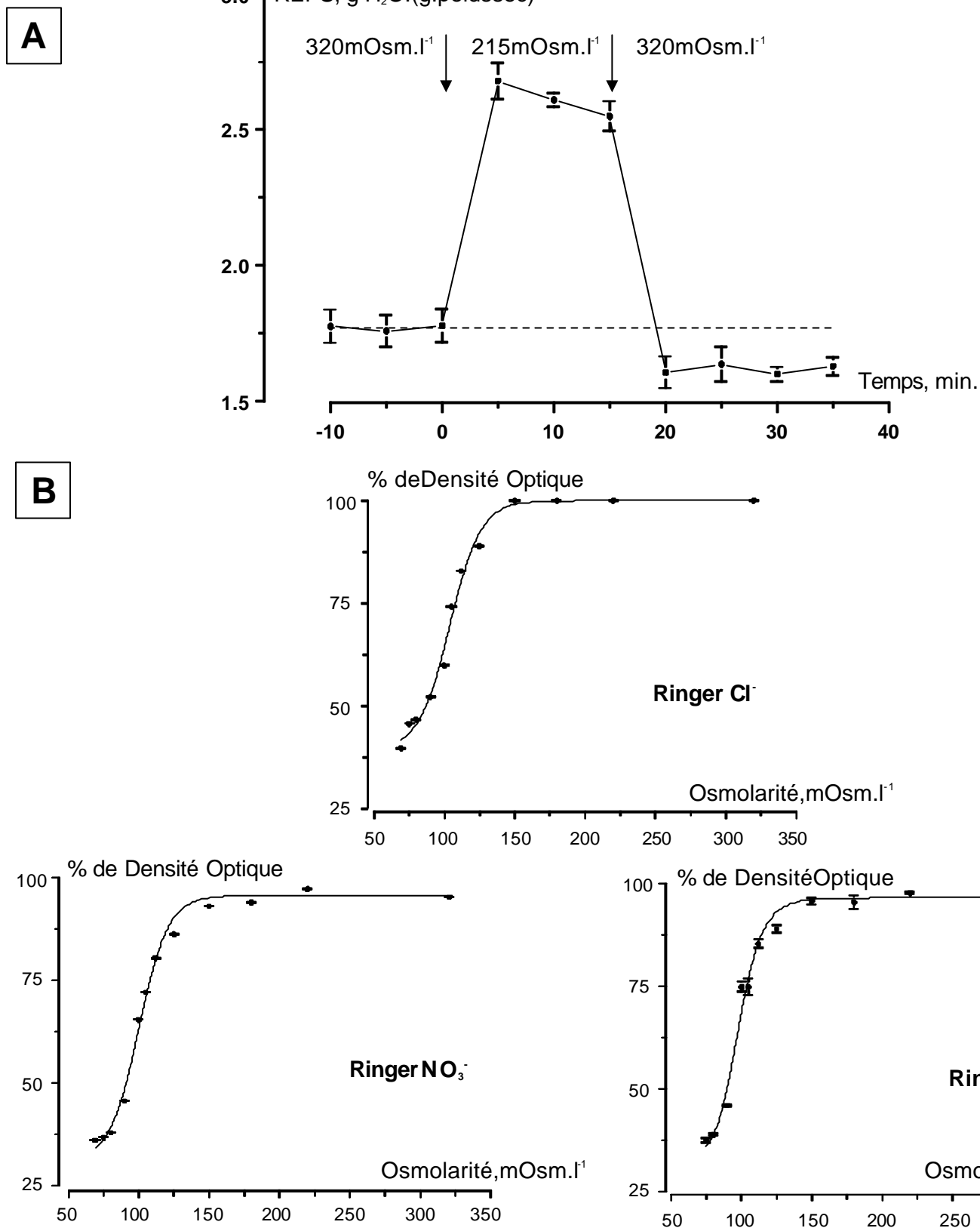


Figure 3:

A : Evolution du volume cellulaire, estimé à partir du contenu en eau (REPS : rapport eau sur poids sec) des globules rouges par gramme de poids sec, avant, pendant un choc osmotique (15 min., 215 mOsm.l⁻¹) et après retour en solution isosmotique (20 min., 320 mOsm.l⁻¹). Les flèches indiquent le moment où les solutions sont changées. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de 6 expériences. La ligne pointillée indique le REPS obtenu en isotonie.

B : Evolution du pourcentage de densité optique des suspensions de globules rouges par rapport à la densité optique d'une solution de globule rouge à 320 mOsm.l⁻¹ (à 625 nm) en fonction de la décroissance de l'osmolarité du milieu, en solution Ringer Cl⁻ (n=10), en solution Ringer NO₃⁻ (n=5) et en solution Ringer MeSF (n=12). La limite de fragilité osmotique est déterminée pour une valeur de 50 % de la densité optique obtenue en conditions isosmotiques. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

RESULTATS

Note préliminaire.

Lorsque les érythrocytes de truite sont maintenus dans un Ringer Cl⁻ isotonique (320 mOsm.l⁻¹, **Tab. 2.**), leur contenu en eau (REPS : Rapport Eau sur Poids Sec), utilisé comme indice du volume cellulaire, est de 1.74 ± 0.03 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=31) (**Fig. 33. A.** et **Fig. 34. A.** et **B.**), cette valeur étant tout à fait comparable à celles observées dans la littérature (Borgese *et al.*, 1987 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1991, Cossins *et al.*, 1994) pour ces cellules.

Le passage d'un milieu isotonique (Ringer isotonique 320 mOsm.l⁻¹) à un milieu hypotonique (Ringer hypotonique 215 mOsm.l⁻¹) conduit rapidement (t<5 min.) à une augmentation du contenu en eau des cellules. Ainsi, ce rapport eau sur poids sec est de 2.60 ± 0.03 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=31) 5 minutes après le passage en conditions hypotoniques. L'augmentation du volume cellulaire est immédiatement suivie d'une diminution du volume pendant les 15 minutes d'exposition à la solution hypotonique, ce qui permet une restauration partielle du contenu en eau des globules rouges (**Fig. 33. A.**). En revanche, lorsque la suspension de globules rouges est à nouveau exposée à une solution isotonique, une diminution brutale du contenu en eau se produit (**Fig. 33. A.**), celui-ci atteignant alors une valeur significativement inférieure à celle mesurée en contrôle isotonique (1.61 ± 0.05 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹, n=6, p<0.05). Le contenu en eau se maintient à cette valeur durant les 20 minutes faisant suite au retour à la solution isotonique. Ce phénomène est souvent observé lorsque les cellules soumises à un stress hypotonique sont transférées dans un milieu isosmotique. Dans ce cas, la nouvelle solution isotonique devient hypertonique pour la suspension de cellules. Cette situation expérimentale est connue sous le nom « RVI-after-RVD protocol » (Hoffmann et Dunham, 1995). Toutefois,

l'absence de retour au volume normal après la diminution de volume des cellules peut être expliquée par l'incapacité des globules rouges de truite à restaurer leur volume cellulaire lorsqu'ils sont exposés à des conditions hypertoniques (Gallardo Romero *et al.*, 1996), compte tenu du fait que l'échangeur sodium proton de truite est strictement dépendant d'une stimulation β -adrénergique (Gallardo Romero *et al.*, 1996 ; Malapert *et al.*, 1997).

Les globules rouges étant capables de réguler leur volume après un gonflement cellulaire induit par un choc hypotonique, il était intéressant de déterminer l'osmolarité la plus faible que les suspensions cellulaires pouvaient supporter avant hémolyse. Bien que la limite de fragilité osmotique (FO) dépende de plusieurs facteurs, de la température notamment (Bergeron *et al.*, 1996), elle constitue un indice de la capacité des cellules à tolérer l'exposition à une solution hypotonique donnée et à réguler leur volume en présence de cette solution (Bergeron *et al.*, 1996 ; Light *et al.*, 1997). Au vu de la forme sigmoïde des courbes obtenues, la valeur correspondant à 50 % de la valeur de la densité optique des suspensions de globules rouges en isotonie (320 mOsm.l^{-1}) a été retenue pour caractériser cette limite de fragilité osmotique. Ainsi, la limite de fragilité osmotique d'une suspension de globules rouges en présence d'une solution Ringer Cl⁻ est-elle de $103.97 \pm 3.6 \text{ mOsm.l}^{-1}$ (n=10). La substitution du nitrate (NO₃⁻, Ringer NO₃⁻ : **Tab. 2.**) ou du méthylsulfonate (MeSF, Ringer MeSF : **Tab. 2.**) au chlore comme anion prépondérant dans la solution saline ne modifie pas significativement cette limite de fragilité osmotique, puisque celle-ci est en effet respectivement de $100.24 \pm 2.7 \text{ mOsm.l}^{-1}$ (n=5) et de $97.99 \pm 4.2 \text{ mOsm.l}^{-1}$ (n=12) en solution Ringer NO₃⁻ et Ringer MeSF (**Fig. 33. B.**). Ces résultats confirment la capacité des globules rouges de truite à réguler leur volume à la suite d'un choc hypotonique, même lorsque le chlore est remplacé par un autre anion (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Nielsen *et al.*, 1992 ; Berenbrink *et al.*, 1997), les globules rouges de truite se distinguant sur ce point des érythrocytes de mammifères (Dunham et Ellory, 1981, Flatman, 1983 ; Ellory *et al.*, 1985).

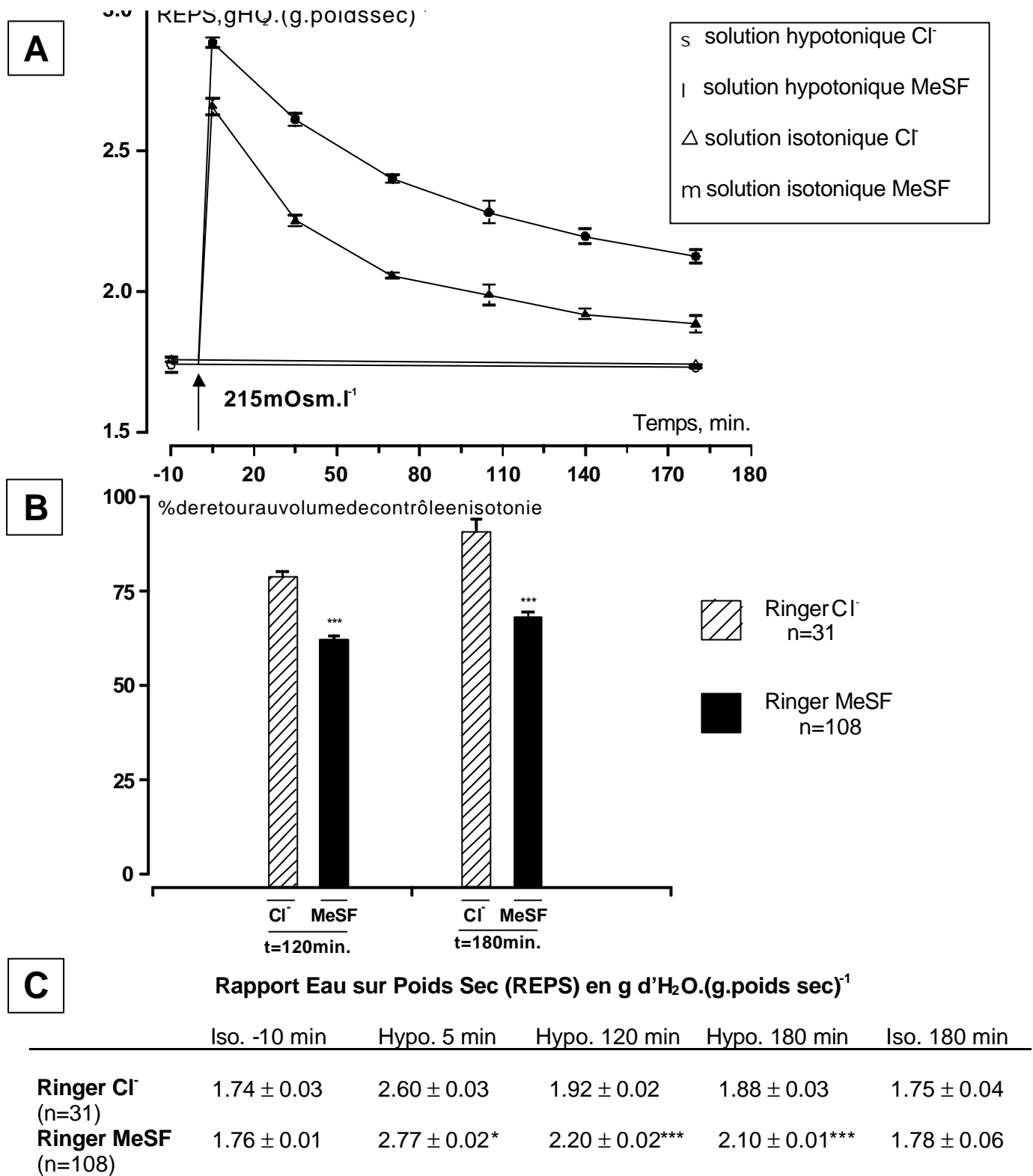


Figure 34. : Effet d'un choc hyposmotique (215 mOsm.l⁻¹) sur le contenu en eau (Rapport Eau sur Poids Sec : REPS) des érythrocytes nucléés de truite.

A : Evolution du contenu en eau des érythrocytes lors d'un choc hyposmotique (215 mOsm.l⁻¹), en solution Ringer Chlore (, n=31) ou en solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, , n=108). Ringer Chlore isotonique (Δ, n=31) et Ringer MeSF isotonique (, n=108). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

B : Histogrammes des pourcentages de retour au contenu en eau mesuré en conditions de contrôle (isotonie) à t=120 min. et t=180 min. après le choc osmotique en solution chlore (n=31) et en solution MeSF (n=108). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences. **C** : Tableau récapitulatif de la valeur du contenu en eau des érythrocytes avant et au cours du choc osmotique (Iso. : Solution Isotonique, Hypo. : Solution Hypotonique). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student :(*) p<0.05, (***) p<0.001.

Pour les expériences de choc hypotonique, une osmolarité de 215 mOsm.l⁻¹ a été choisie. Aucune lyse de cellule n'est observée (**Fig. 33. B.**) pour cette d'osmolarité quel que soit l'anion prépondérant dans les solutions utilisées. De plus, seules des expériences en présence de Ringer Cl⁻ et de Ringer MeSF ont été conduites, puisque ce dernier anion apparaît dans la littérature comme étant le meilleur substituant aux ions Cl⁻ afin d'étudier les voies de régulation du volume cellulaire Cl⁻-indépendantes (Payne *et al.*, 1990 ; Armsby *et al.*, 1995 ; Berenbrink *et al.*, 1997).

1. Variation du volume des érythrocytes lors d'un choc hypotonique.

Le contenu en eau des érythrocytes en conditions isosmotiques est de 1.74 ± 0.03 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=31) en présence d'une solution Ringer Cl⁻, et de 1.76 ± 0.01 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=108) en présence d'une solution Ringer MeSF, ces valeurs étant tout à fait comparables à celles déjà obtenues par différents auteurs (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Berenbrink *et al.*, 1997). Il n'y a pas de différence statistique significative entre ces deux valeurs, ce qui indique que le remplacement du Cl⁻ extracellulaire par du MeSF en conditions isotoniques ne modifie pas le contenu en eau des érythrocytes. De plus, aucune modification du volume cellulaire n'est observée durant les trois heures de suivi du volume cellulaire en isotonie (**Fig. 34. A.**), ni en présence de Cl⁻ extracellulaire, ni lorsque celui-ci est remplacé par du MeSF.

Lorsque les globules rouges sont soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹), leur rapport eau sur poids sec augmente dans les deux solutions, atteignant une valeur de contenu en eau respectivement de 2.60 ± 0.03 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=31) et de 2.77 ± 0.02 g d'H₂O.(g. poids sec)⁻¹ (n=108) en solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF (**Fig. 34. A. et 34. C.**). Les gonflements sont significativement différents (p<0.001) dans ces deux conditions hypotoniques, comme cela a déjà pu être observé dans d'autres expériences de substitution décrites dans la littérature (Berenbrink *et al.*, 1997 ; Bursell et Kirk, 1996). Le

suivi du contenu en eau des érythrocytes dans le temps montre que, quel que soit l'anion prépondérant dans le milieu extracellulaire (Cl⁻ ou MeSF), le retour au volume de contrôle isotonique n'est pas accompli au bout de trois heures. En effet, les courbes de l'évolution du REPS au cours du temps montrent une phase asymptotique dans la dernière partie des courbes. Celle-ci peut être attribuée au retour à un nouvel état d'équilibre du contenu en eau, en accord avec un nouvel état d'équilibre entre les faces intra- et extracellulaire de la membrane, mais également au gain de Na⁺ des cellules lors des processus de RVD (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Alors qu'en présence d'une solution chlore $78.6 \pm 1.4 \%$ (n=31) et $90.3 \pm 3.4 \%$ (n=31) de retour au volume de contrôle sont obtenus respectivement à t=120 min. et t=180 min., le pourcentage de retour au volume de contrôle en présence d'une solution MeSF n'est que de $61.8 \pm 1.1 \%$ (n=108) et de $67.7 \pm 1.5 \%$ (n=108) à t=120 min. et t=180 min. respectivement. La comparaison des pourcentages de retour au volume de contrôle (**Fig. 34. B.**) obtenus en présence de Ringer chlore et de Ringer MeSF montre que les processus de RVD sont significativement diminués en présence d'une solution MeSF par rapport à ceux observés en présence Ringer chlore, que ce soit à t=120 min. ou t=180 min. ($p < 0.0001$). Ce dernier résultat suggère qu'en présence d'une solution méthylsulfonate, les processus de retour au volume de contrôle mesuré en isotonie sont en dessous des conditions maximales d'efficacité qui sont observées en conditions physiologiques (Ringer Cl⁻), même si les érythrocytes tendent à réguler leur volume cellulaire après un gonflement induit par un choc hyposmotique.

Un tel gonflement, suivi d'un retour au volume initial (ou proche de celui-ci), a été démontré lors d'un choc hypotonique dans de très nombreuses cellules, et notamment dans les globules rouges de différentes espèces de tous les embranchements de vertébrés (pour revue : Cossins et Gibson, 1997 ; Hoffmann et Dunham, 1995 ; Sarkadi et Parker, 1991).

La valeur du contenu en eau des globules rouges à t= 180 min. étant supérieure à celle mesurée en contrôle isotonique, deux grandeurs ont été systématiquement calculées

dans la suite de cette étude, afin de décrire les processus de régulation du volume dans les différentes conditions expérimentales retenues:

- le pourcentage de retour au volume de contrôle ($\%_{\text{retour}}$) défini par l'équation suivante :

$$\%_{\text{retour}} = \frac{\text{REPS}_{\text{gonf. 180min.}}}{\text{REPS}_{\text{contrôle. 180min.}}} * 100$$

avec $\text{REPS}_{\text{gonf. 180 min.}}$ valeur du contenu en eau des érythrocytes soumis à un gonflement en présence ou non d'un inhibiteur à $t=180$ min.

$\text{REPS}_{\text{contrôle. 180 min.}}$ valeur du contenu en eau des érythrocytes maintenus en isotonie à $t=180$ min.

- le pourcentage d'inhibition du RVD ($\%_{\text{inhibition}}$), calculé afin de quantifier l'effet des différentes drogues sur les processus de régulation du volume lorsqu'une drogue est testée, définie par l'équation suivante :

$$\%_{\text{inhibition}} = \frac{\text{REPS}_{\text{gonf. 180min. + drogue}}}{\text{REPS}_{\text{gonf. 180min. sans.drogue}}} * 100$$

avec $\text{REPS}_{\text{gonf. 180 min. + drogue}}$: valeur du contenu en eau des érythrocytes soumis à un gonflement en présence d'un inhibiteur à $t=180$ min.

$\text{REPS}_{\text{gonf. 180 min. sans drogue}}$: valeur du contenu en eau à $t=180$ min des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en absence de drogue (contrôle hypotonique).

- Les érythrocytes de truite maintenus dans des conditions hypotoniques mettent en place des processus de régulation de volume (RVD).
- La limite de fragilité osmotique des cellules n'est pas modifiée lors du remplacement du Cl^- extracellulaire par du NO_3^- ou du méthylsulfonate (MeSF).
- Le retour au volume de contrôle, mesuré en isotonie, n'est pas atteint au bout de trois heures quel que soit l'anion de la solution hypotonique.
- Le remplacement du Cl^- extracellulaire par du MeSF dans la solution hypotonique induit une diminution de la restauration du volume cellulaire.

2. Dépendance des processus de RVD à la suite d'un choc hypotonique vis-à-vis du potassium.

Dans les érythrocytes de truite, la perte d'eau qui permet le retour au volume normal de la cellule suite à un gonflement induit par un choc hypotonique, réalisé dans des milieux contenant du Cl^- ou du NO_3^- , se fait par perte d'ions K^+ et Cl^- et d'osmolytes organiques tels que la taurine et de l'eau qui leur est osmotiquement liée (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). De plus, la perte d'ions K^+ osmotiquement active a été définie comme Cl^- -indépendante, car elle n'est que peu, voire pas affectée par le remplacement du Cl^- par le NO_3^- (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Aussi, il convenait de déterminer le rôle joué par le potassium lors des processus de RVD en milieu MeSF et de comparer ce rôle à celui que joue le potassium en solution Cl^- .

La régulation du volume cellulaire a été suivie après exposition des cellules à un stress osmotique (215 mOsm.l^{-1}) en présence de milieux MeSF dont la concentration en potassium était augmentée. Le remplacement d'une partie du sodium extracellulaire par du potassium conduit à une inhibition significative et graduée du processus de RVD. Ainsi, alors que le pourcentage de retour au volume de contrôle en conditions normales de potassium

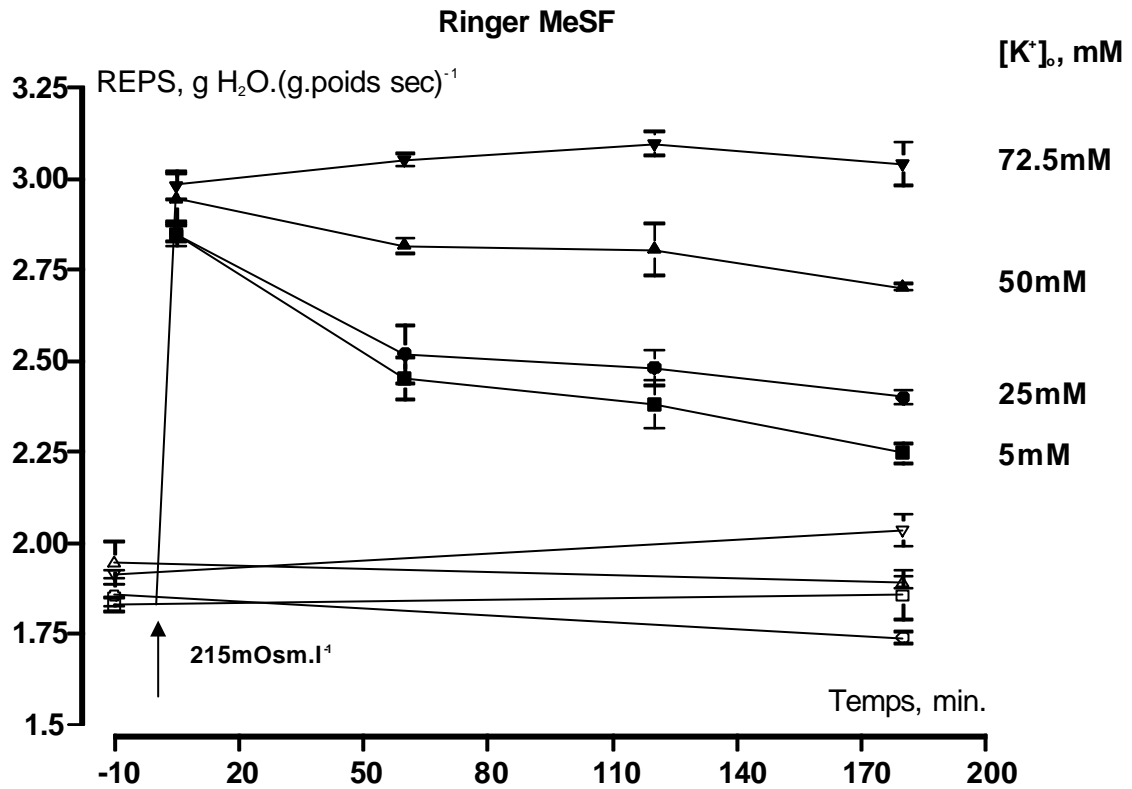
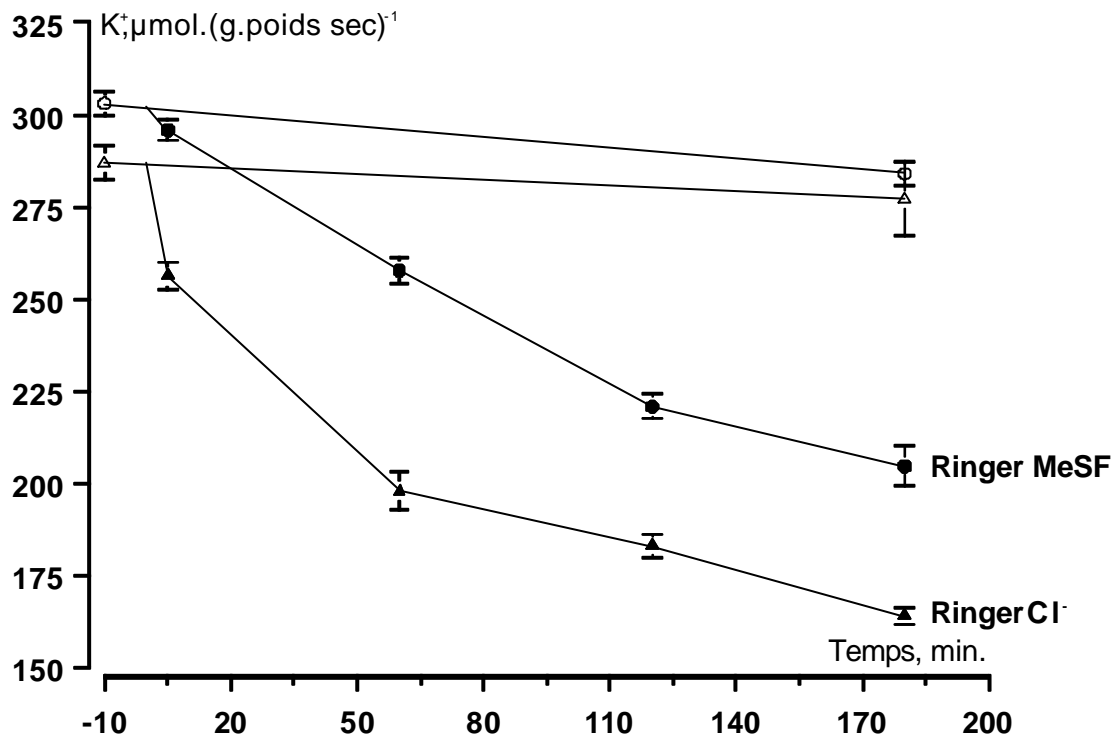
A**B**

Figure 35. : Rôle du potassium comme osmolyte inorganique effecteur de la régulation de volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A : Effet de la concentration extracellulaire en K⁺ ([K⁺]_o) sur le RVD lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) en solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF). Les symboles ouverts représentent les conditions isotoniques tandis que les symboles pleins représentent les conditions hypotoniques. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 5 expériences.

B : Evolution du contenu en K⁺ des érythrocytes soumis à un choc hypotonique à t = 0 min. , en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (▲ , n=10) ou de Ringer MeSF (● , n=25). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Chlore et Ringer MeSF respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

extracellulaire (5 mM) est de $66.3 \pm 2.4 \%$ (n=5), il n'est plus que de $49.1 \pm 3.2 \%$ (n=5) et de $16.2 \pm 7.2 \%$ (n=5) lorsque la solution de bain contient respectivement 25 mM et 50 mM de K^+ (**Fig. 35. A.**). Comparées deux à deux, ces trois valeurs de pourcentages de retour au volume de contrôle sont significativement différentes les unes des autres ($p < 0.05$), démontrant que la régulation de volume est sous le contrôle d'un efflux de potassium en présence d'une solution MeSF, comme cela a pu être mis en évidence en présence d'une solution contenant des ions Cl^- ou NO_3^- (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). De plus, ces résultats démontrent qu'en présence d'une solution MeSF, l'efflux de potassium nécessite un gradient chimique favorable à la sortie de potassium. Par ailleurs, lorsque l'intégralité du Na^+ est remplacée par du K^+ ($[K^+]_0 = 72.5 \text{ mM}$) dans la solution hypotonique, aucune diminution du contenu en eau n'est observée à la suite du gonflement cellulaire, et le volume augmente même de manière significative ($9.1 \pm 1.3 \%$, $p < 0.05$) (**Fig. 35. A.**). La même observation est faite pour les cellules placées en isotonie dans une solution à 150 mM de potassium extracellulaire. En effet, le volume des cellules augmente alors de $12.2 \pm 5.2 \%$ (n=5, $p < 0.05$) par rapport aux cellules placées en isotonie dans une solution contenant 5 mM de K^+ (**Fig. 35. A.**).

Bien que la valeur du contenu en potassium en présence d'une solution Ringer MeSF isotonique soit légèrement supérieure à celle obtenue en présence de Cl^- extracellulaire en conditions isotoniques, ces deux valeurs ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre. En effet, si le contenu en potassium des globules rouges est de $287.2 \pm 4.6 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ en présence d'une solution Cl^- , il est de $302.9 \pm 3.2 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ en présence d'une solution MeSF (**Fig. 35. B.**).

Le suivi de l'évolution du contenu en potassium des érythrocytes, maintenus pendant trois heures en présence de solutions isotoniques Cl^- et MeSF, en présence de 100 μM de ouabaïne, (**Fig. 35. B.**), indique que la fuite de potassium à travers la membrane des globules rouges est très faible. En effet, la variation du contenu en potassium (ΔK^+ définis par $K^+_{-10\text{min}} - K^+_{180\text{min}}$) est de $24.5 \pm 1.6 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=10) en présence d'une

solution chlore et de $19.2 \pm 2.4 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=25$) en présence d'une solution MeSF. Comme cela a été précédemment décrit dans la littérature (pour revue Cossins et Gibson, 1997), ces résultats indiquent que le flux de cations à travers la membrane à l'état de repos est extrêmement faible.

En revanche, lorsque les érythrocytes sont soumis à un stress hyposmotique (215 mOsm.l^{-1}), le contenu en K^+ des cellules diminue fortement pendant les trois heures d'exposition aux conditions hypotoniques, tant en présence de Cl^- extracellulaire qu'en présence de MeSF (**Fig. 35. B.**). Ainsi, en présence d'une solution hypotonique d'une part Cl^- et d'une solution hypotonique MeSF d'autre part, le contenu en potassium des cellules n'est plus au bout de trois heures que de $164.7 \pm 9.51 \mu\text{mol. (g ; poids sec)}^{-1}$ et de $204.7 \pm 5.4 \mu\text{mol. (g ; poids sec)}^{-1}$ respectivement. Ces diminutions représentent une variation du contenu en potassium (ΔK^+) de $122.3 \pm 4.6 \mu\text{mol. (g ; poids sec)}^{-1}$ et de $98.3 \pm 5.4 \mu\text{mol. (g ; poids sec)}^{-1}$ en présence de solutions Cl^- et MeSF respectivement. Ces variations de contenu en K^+ diffèrent significativement l'une de l'autre ($p<0.005$) et peuvent vraisemblablement expliquer le ralentissement du processus de RVD observé lors de la mesure du rapport eau sur poids sec en présence d'une solution MeSF, par rapport aux conditions hypotoniques en présence d'une solution Cl^- .

La mesure de la cinétique de l'influx de potassium au cours d'un choc hypotonique concorde avec les résultats précédents et avec ceux obtenus par Berenbrink et ses collaborateurs (Berenbrink *et al.*, 1997). En effet, si en présence d'une solution Ringer MeSF, l'influx de potassium en isotonie n'est pas différent de celui mesuré en présence d'une solution Cl^- (**Fig. 36. A.**), lorsque les cellules sont soumises à un choc hypotonique, l'influx de potassium est en revanche 1.4 fois plus important lorsque le milieu extracellulaire contient du Cl^- que lorsque ce dernier est remplacé par du MeSF. En effet, alors que l'influx de K^+ ($\Delta t = 5 \text{ min.}$) est de $4.02 \pm 0.05 \text{ mmol/l de cellule/h}$ en présence de Ringer Cl^- , il n'est que de $2.91 \pm 0.09 \text{ mmol/l de cellule/h}$ lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du

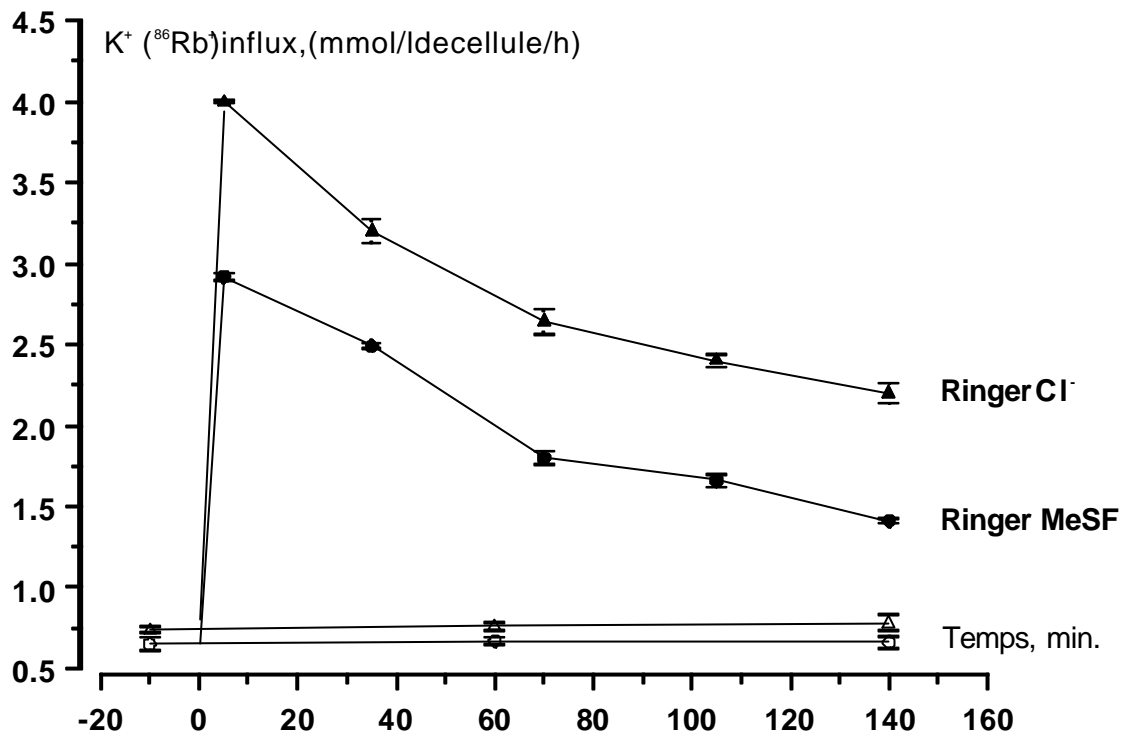
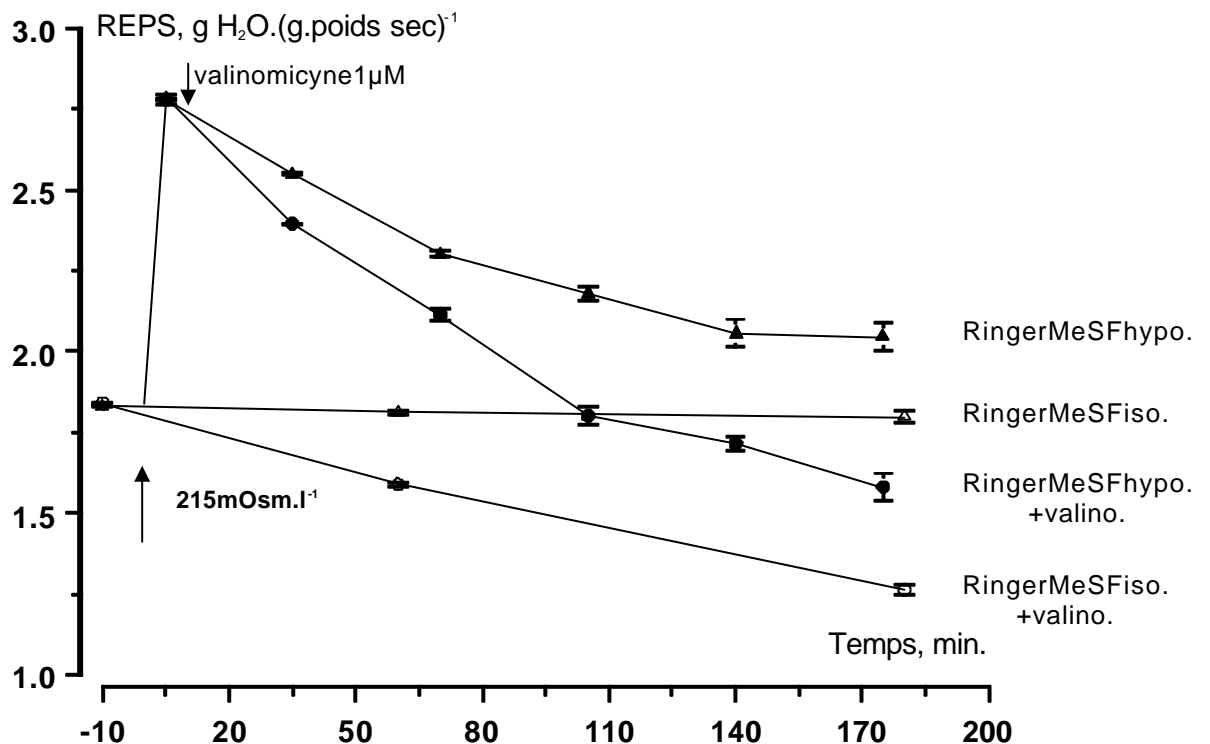
A**B**

Figure 36. : Rôle du potassium comme osmolyte inorganique effecteur de la régulation de volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l $^{-1}$).

A : Evolution de l'influx de potassium ($^{86}Rb^+$) lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l $^{-1}$), à $t = 0$ min., en solution Ringer Cl^- (\blacktriangle , $n=5$) et en solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, \bullet , $n=6$). Ringer Cl^- isotonique (Δ , $n=5$) et Ringer MeSF isotonique (\circ , $n=6$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF (\blacktriangle , $n=5$) et après ajout à $t=7$ min de 1 μM du ionophore valinomycine (\bullet , $n=5$). Ringer MeSF isotonique (Δ , $n=5$) et Ringer MeSF isotonique + 1 μM valinomycine (\circ , $n=5$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de 5 expériences.

MeSF. Cette différence d'influx entre les deux conditions anioniques extracellulaires au cours du temps ($p < 0.005$) est maintenue pendant toute la durée (3 h) de l'exposition des cellules aux conditions hypotoniques. Ces résultats confirment une nouvelle fois que, si un flux potassique est bien activé lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF, ce flux est inférieur à celui mesuré en présence des conditions plus physiologiques que représentent les conditions hypotoniques en solutions Cl⁻.

La dépendance et la limitation des processus de RVD, en présence d'une solution MeSF, vis-à-vis de la sortie de potassium sont confirmées par les expériences menées en présence d'un ionophore potassique. En effet, l'ajout de valinomycine (1 μ M) après le gonflement maximal des cellules (à $t = 7$ min.) provoque une accélération significative du retour aux valeurs initiales de REPS des cellules ($p < 0.05$, $n = 5$, **Fig. 36. B.**). En outre, il convient de remarquer que l'addition de valinomycine (1 μ M) à la suspension de globules maintenue en isotonie provoque également une diminution significative du contenu en eau des globules rouges (**Fig. 36. B.**, $p < 0.005$, $n = 5$). Cette expérience confirme donc le rôle de facteur limitant des ions K⁺ dans les processus de régulation du volume cellulaire après gonflement des érythrocytes de truite, lorsque ceux-ci sont soumis à un choc hypotonique en solution MeSF.

- Les processus de RVD mis en jeu en présence d'une solution Ringer MeSF dépendent du gradient chimique pour le potassium.
- Alors que la membrane des globules rouges est peu perméante au K⁺ en conditions isotoniques, une sortie d'ions K⁺ est activée lorsque les globules rouges sont soumis à des conditions hypotoniques en milieu Cl⁻ ou MeSF.
- La sortie d'ions K⁺ (ainsi que les influx de K⁺ (⁸⁶Rb⁺)) activée par le gonflement hypotonique peut être considérée comme Cl⁻-indépendante, bien qu'elle soit diminuée lors des expériences de substitution (MeSF) par rapport aux conditions Ringer Cl⁻.
- Les processus de RVD mis en place lors d'un choc hypotonique en présence de Ringer MeSF sont limités par les efflux de K⁺.

3. Effet des inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique.

Bien qu'une partie du flux sortant de potassium activé par le gonflement cellulaire soit inhibée par le remplacement du Cl⁻ extracellulaire par l'anion MeSF, la cinétique de l'efflux de K⁺ (**Fig. 35. B.** et **Fig. 36. A.**) suit une cinétique identique à celle de l'évolution du contenu en eau des cellules (**Fig. 34. A.**) observée dans ces conditions. Cette absence d'inhibition du RVD lors du remplacement du Cl⁻ extracellulaire par un autre anion semble être une caractéristique commune des érythrocytes de téléostéens et a conduit les différents auteurs à définir cette voie de sortie du potassium comme une voie Cl⁻-indépendante.

En effet, cette absence d'effet du remplacement du Cl⁻ sur la régulation du volume des érythrocytes a pu être observée également chez l'anguille (Bursell et Kirk, 1996), chez le flet (Fincham *et al.*, 1987 ; Nonnotte et Truchot, 1992), ou chez la truite (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993 ; Berenbrink *et al.*, 1997 ; pour revue : Cossins et Gibson, 1997). Cependant, la nature moléculaire du transporteur responsable de cet efflux de potassium Cl⁻-indépendant demeure inconnue. Motais et ses collaborateurs (Motais *et al.*, 1991) ont avancé l'hypothèse que la dépendance de l'efflux de potassium vis-à-vis du chlore serait liée à la valeur de la force ionique interne qui existe selon le mode de gonflement des érythrocytes, cette dépendance vis-à-vis du chlore reflétant alors l'activité d'un même transporteur dont la sélectivité serait uniquement fonction du mode de gonflement (Motais *et al.*, 1991). Cependant, l'étude des voies de conductance de la membrane des globules rouges de truite, par la technique du patch-clamp en configuration « whole-cell », ou l'enregistrement de l'activité des canaux isolés en configuration « cell-attached » ou « inside-out » a montré que, d'une part la membrane de l'érythrocyte de truite possède une voie de conductance chlore sensible au DIDS et une voie de conductance

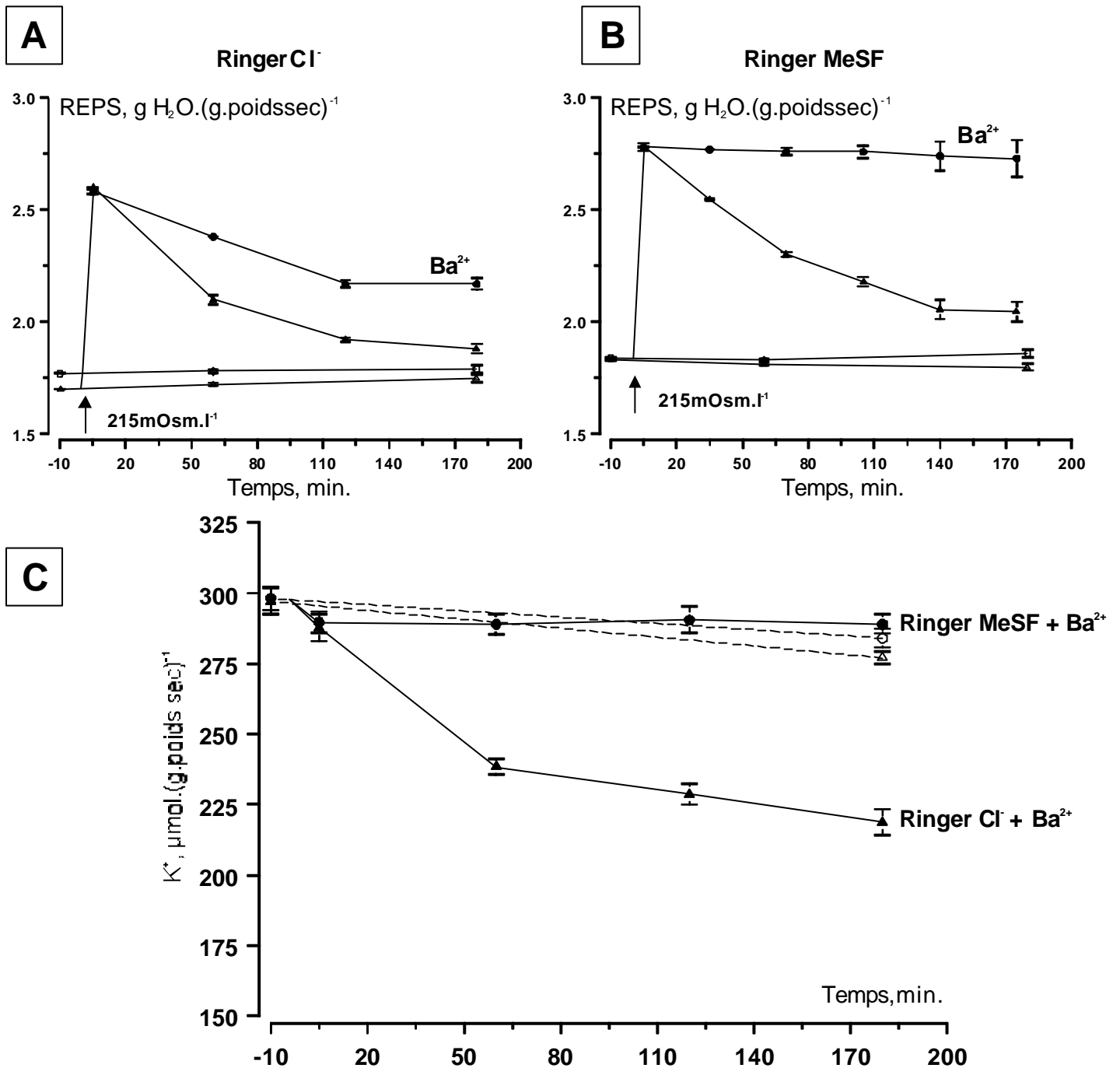


Figure 37. : Effet du baryum (10 mM) sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹), à t= 0 min., en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (▲ , n=11) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 10 mM Ba²⁺ (● , n=11). Ringer Cl⁻ isotonique (Δ, n=11) et Ringer Cl⁻ isotonique +10 mM Ba²⁺ (○ , n=11). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹), à t= 0 min., en présence d'une solution de Ringer MeSF (▲ , n=23) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 10 mM Ba²⁺ (● , n=23). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=23) et Ringer MeSF isotonique +10 mM Ba²⁺ (○ , n=23). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

C : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique , à t=0 min., en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 10 mM Ba²⁺ (▲ , n=6) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 10 mM Ba²⁺ (● , n=12). Ringer Cl⁻ isotonique +10 mM Ba²⁺ (Δ, n=6) et Ringer MeSF isotonique +10 mM Ba²⁺ (○ , n=12). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

cationique non sélective, identifiée comme un canal cationique non sélectif sensible au Ba^{2+} et que, d'autre part, ces conductances sont augmentées en conditions hypotoniques.

3.1. Effet du Baryum sur les processus de RVD en présence d'une solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF.

Le baryum (Ba^{2+}) est un ion divalent généralement employé comme inhibiteur des canaux potassiques (pour revue Latorre et Miller, 1983), également reporté comme inhibiteur des processus de RVD dans l'érythrocyte de lamproie (*Lampetra fluviatilis*) (Kirk, 1991a ; Virkki et Nikinmaa, 1995, 1998).

L'ajout de Ba^{2+} (10 mM) à la suspension de globules rouges soumise à un choc hypotonique en présence d'une solution Cl^- provoque une diminution significative du retour au volume initial des cellules ($p < 0.0001$). En effet, alors que le pourcentage de retour au volume de contrôle en solution chlore est de $82.3 \pm 2.4 \%$ ($n=11$), il n'est plus que de $51.8 \pm 3.4 \%$ ($n=11$) en présence de Ba^{2+} (10 mM) (**Fig. 37. A.**, **38. A.**, **38. B.** et **Tab. 5.**). Ainsi, l'action du Ba^{2+} se traduit par une inhibition des processus de RVD de $35.3 \pm 3.8 \%$ ($n=11$, **Fig. 38. B.** et **Tab. 5.**) par rapport au contrôle. Un pourcentage d'inhibition similaire du RVD (43 %) a été observé dans les érythrocytes de flet (Nonnotte et Truchot, 1992).

En revanche, lorsque le Ba^{2+} est employé à cette concentration de 10 mM, il provoque une inhibition totale du retour au volume de contrôle ($90.5 \pm 2.4 \%$, $n=23$) lorsque la suspension de globules rouges est soumise à un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF. En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique n'est alors que de $6.3 \pm 1.6 \%$ ($n=23$), alors qu'en absence de cet inhibiteur, le retour au volume des érythrocytes en isotonie est de $68.3 \pm 1.9 \%$ ($n=23$) (**Fig. 37. A.** et **38. B.**). Comparés deux à deux, ces pourcentages de retour au volume de contrôle en absence ou en présence de Ba^{2+} sont significativement différents ($p < 0.0001$, $n=23$). De plus, la comparaison de l'effet inhibiteur du Ba^{2+} en présence de Ringer Cl^- et en présence de Ringer MeSF, montre

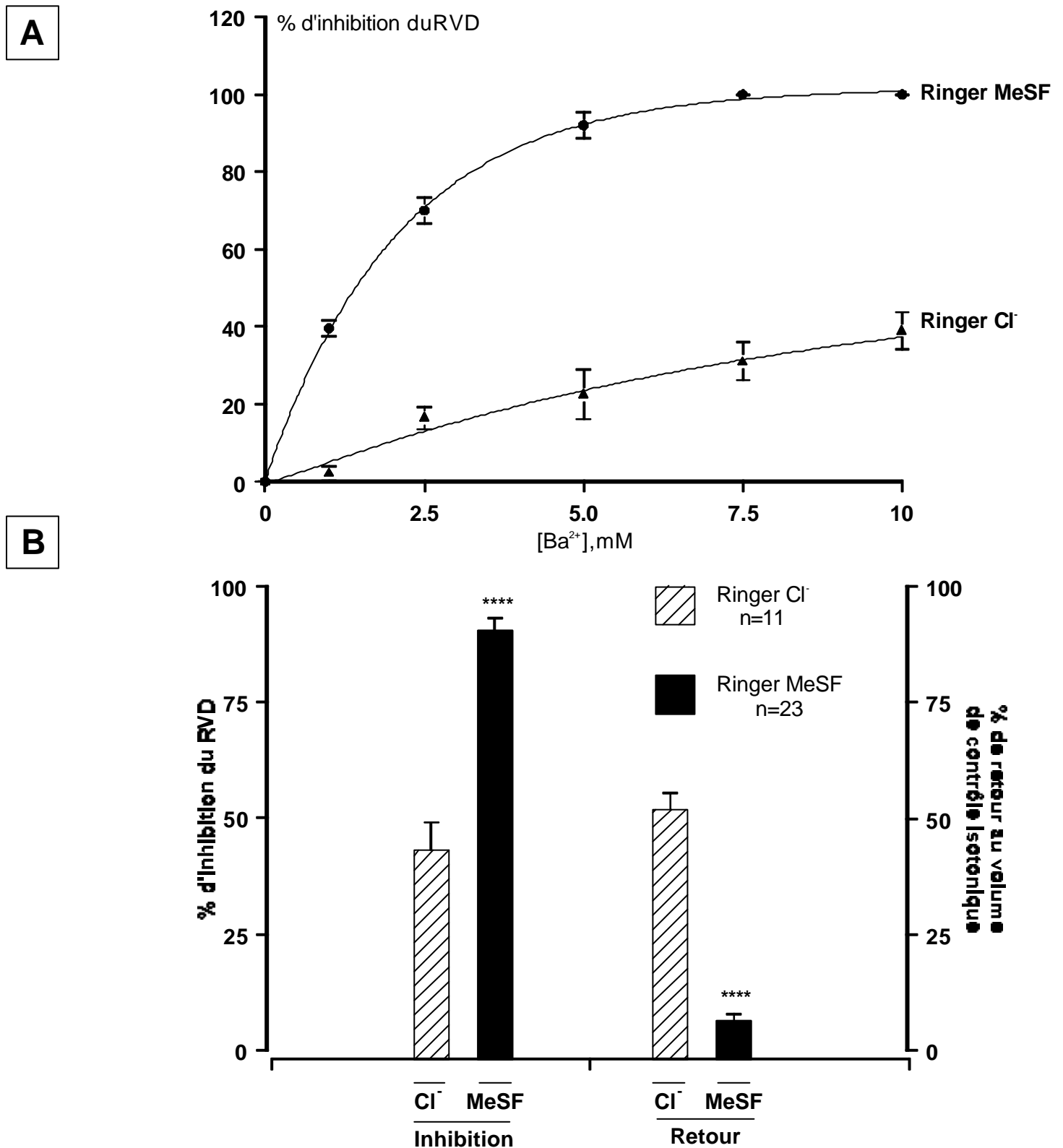


Figure 38. : Effet du baryum sur la régulation du volume cellulaire suite à un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A : Courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) par le Ba²⁺ en présence d'une solution Ringer Cl⁻ (▲, n=5) et en présence d'une solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, ●, n=5). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

B : Comparaison du pourcentage d'inhibition du RVD et du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ +10 mM Ba²⁺ (n=11) ou d'une solution de Ringer MeSF +10 mM Ba²⁺ (n=23). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student : **** p<0.0001.

que l'action de cet inhibiteur est significativement différente dans ces deux conditions de stress osmotique, tant pour les pourcentages d'inhibition ($p < 0.0001$) que pour les pourcentages de retour au volume de contrôle ($p < 0.0001$) (**Fig. 38. B.**).

De plus, le suivi de l'évolution du contenu en potassium des érythrocytes, en présence de solution Cl⁻ et MeSF contenant toutes deux du Ba²⁺ (**Fig. 37. B.**), montre une parfaite corrélation entre le pourcentage d'inhibition de la régulation du volume cellulaire et l'efflux de potassium. En effet, la variation du contenu en potassium (ΔK^+) au bout de trois heures et en présence de 10 mM Ba²⁺ est alors de $72.1 \pm 10.9 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=6$) en présence de Ringer Cl⁻ et $20.3 \pm 11.06 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=12$) lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du MeSF. Ces valeurs sont significativement différentes de celles obtenues en absence de Ba²⁺, en présence d'une solution Ringer Cl⁻ ($p < 0.05$) ou Ringer MeSF ($p < 0.0001$) et représentent alors un pourcentage d'inhibition de l'efflux de potassium de $41.3 \pm 4.2 \%$ en solution chlore ($n=6$) et de $81.76 \pm 5.2 \%$ ($n=12$) en solution MeSF. En outre, la comparaison de l'effet inhibiteur du Ba²⁺ sur l'efflux de potassium en présence d'une solution Cl⁻ et MeSF démontre une sensibilité différente de cette sortie vis-à-vis du Ba²⁺ selon les conditions anioniques extracellulaires. En effet, les pourcentages d'inhibition de l'efflux de potassium sont significativement différents ($p < 0.05$) selon la nature de l'anion prépondérant dans la solution hypotonique (Cl⁻ ou MeSF) et suggèrent qu'en présence d'une solution MeSF, la sortie de potassium est sous la dépendance quasi-totale d'un processus ou d'un transporteur sensible au Ba²⁺ (10 mM), tandis qu'en solution Cl⁻, bien que participant à l'efflux de K⁺, cette voie sensible au Ba²⁺, ne représenterait que 50 % du processus de RVD observé.

Les courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD par des concentrations croissantes de Ba²⁺, construites à partir des pourcentages d'inhibition du RVD à $t=180$ min. pour chaque concentration testée et en présence de solutions Cl⁻ et MeSF, démontrent l'importance d'une voie de transport sensible à cet agent lorsque les cellules sont soumises à un choc

hypotonique en solution MeSF (**Fig. 38. A.**). En effet, si une concentration de 10 mM ne produit qu'une faible inhibition en présence d'une solution chlore, la courbe dose-réponse établie en présence d'une solution MeSF montre en revanche que le Ba^{2+} inhibe le RVD de manière significative, à des concentrations relativement faibles, puisque 75 % d'inhibition du RVD sont obtenus pour une concentration de 2.5 mM, alors que, pour la même concentration, le RVD est peu ou pas affecté en solution Cl⁻ (17 %). La courbe dose-réponse établie en solution MeSF montre alors une IC_{50} de 1.4 mM.

Ces résultats obtenus en présence de Ba^{2+} semblent indiquer que la voie de sortie de K^{+} dite Cl⁻-indépendante étudiée lors des expériences de substitution (par exemple en présence de MeSF) est pharmacologiquement différente de la voie dite Cl⁻-dépendante, active en solution Cl⁻, notamment du point de vue de sa sensibilité au baryum. De plus, ces différences concernant l'action du Ba^{2+} suggèrent que les deux voies sont impliquées de manière concomitante lors des processus de RVD en solution Cl⁻.

- Les processus de RVD sont inhibés en présence de Ba^{2+} (10 mM) par le blocage de la sortie d'ions K^{+} .
- Cette inhibition est incomplète en présence d'un milieu hypotonique Ringer Cl⁻, mais est totale lors de la substitution du MeSF au Cl⁻ extracellulaire, suggérant la diversité des voies de transport mises en jeu lors d'une stimulation hypotonique dans un milieu contenant du Cl⁻.
- Les courbes dose-réponse de l'effet du Ba^{2+} sur la restauration du volume cellulaire montrent la spécificité du Ba^{2+} pour la voie de sortie de K^{+} -Cl⁻-indépendante (IC_{50} : 1.4 mM).

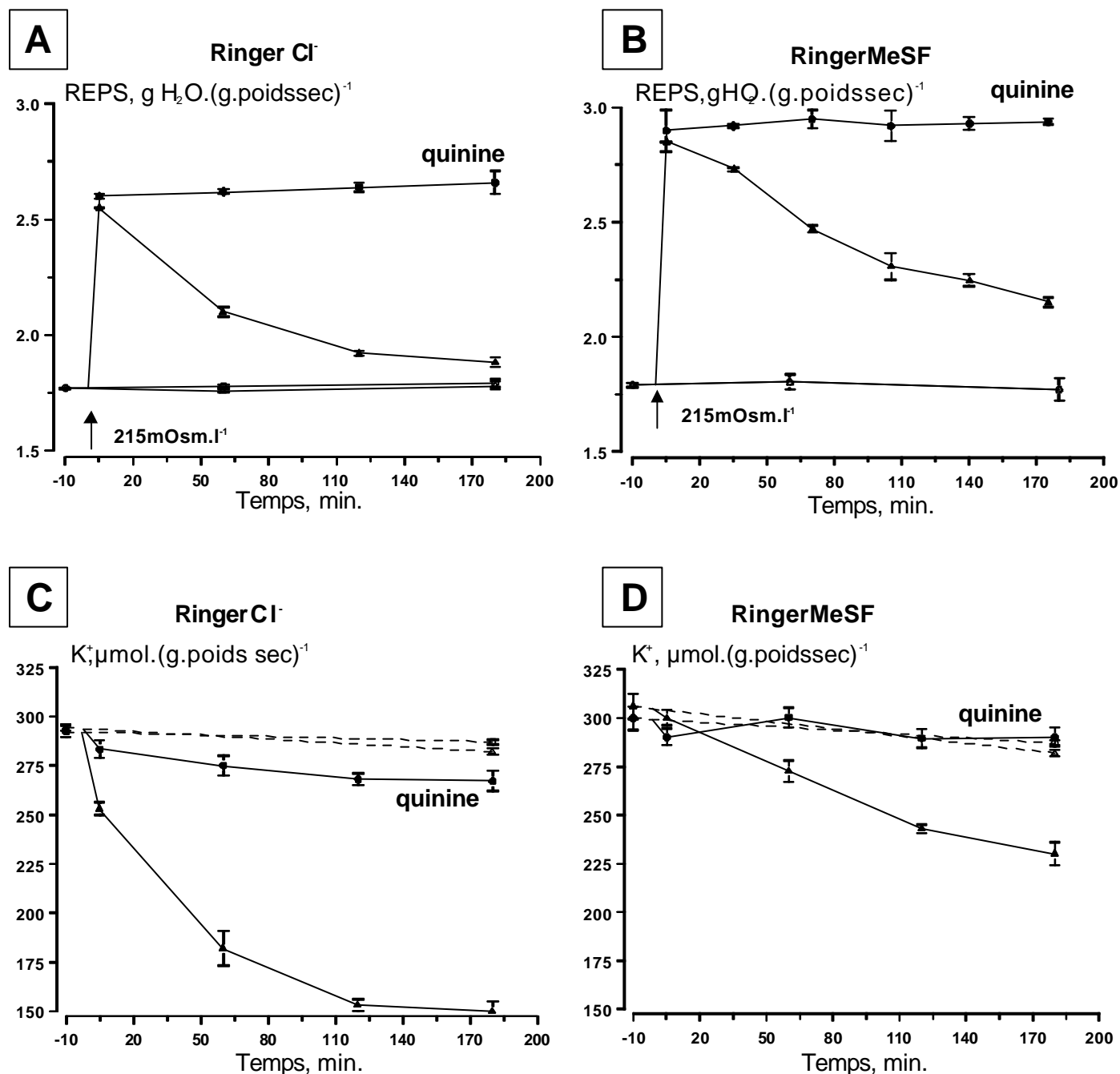


Figure 39. : Effet de la quinine 1 mM sur la régulation du volume cellulaire suite à un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A et B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t = 0 min.) en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**A** : ▲ , n=6) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 1 mM quinine (**A** : ● , n=6) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**B** : ▲ , n=12) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 1 mM quinine (**B** : ● , n=12). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) et Ringer Cl⁻ + 1 mM quinine (**A**) ou Ringer MeSF +1 mM quinine (**B**) respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

C et D : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique, à t = 0 min., en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**C** : ▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 1 mM quinine (**C** : ● , n=3) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**D** : ▲ , n=4) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 1 mM quinine (**D** : ● , n=4). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**C**) ou Ringer MeSF (**D**) et Ringer Cl⁻ + 1 mM quinine (**C**) ou Ringer MeSF +1 mM quinine (**D**) respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

3.2. Effet de la quinine sur les processus de RVD en présence de solutions Ringer Chlore et Ringer MeSF.

La quinine est un alcaloïde généralement utilisé comme inhibiteur des voies de conductance potassiques (Latorre et Miller, 1983). Cependant, le spectre d'inhibition de cette drogue semble plus large que celui initialement proposé. En effet, bien que décrit comme inhibiteur spécifique du canal Gardos dans l'érythrocyte humain (Armando-Hardy *et al.*, 1975), du canal potassique de la lamproie *Lampetra fluviatilis* (Gussev *et al.*, 1992) ou du canal potassique (K_{Ca}) de la salamandre *Necturus maculosus* (Bergeron *et al.*, 1996), la quinine se révèle être à même d'inhiber certains canaux Cl^- de type ORCC (Gögelein et Capek, 1990), certains canaux cationiques non sélectifs (Gögelein et Capek, 1990) et, utilisée à forte dose ($>3\text{mM}$), le cotransport KCl de l'érythrocyte à faible concentration interne en K^+ (phénotype LK) de mouton (Adragna et Lauf, 1994).

L'effet de la quinine sur les processus de RVD des érythrocytes de truite soumis à un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl^- et Ringer MeSF a été testé à la concentration de 1 mM.

L'ajout de quinine (1 mM) dans la solution hypotonique provoque une inhibition totale du RVD tant en présence de Ringer Cl^- qu'en présence de Ringer MeSF (**Fig. 39. A.**, **40. B.** et **Tab. 5.**). En effet, en présence de cet inhibiteur, le pourcentage de retour au volume de contrôle des érythrocytes en présence d'une solution chlore est de $16.4 \pm 5.7 \%$ ($n=5$) et en présence d'une solution MeSF de $3.7 \pm 1.6 \%$ ($n=9$). Ces valeurs du pourcentage de retour au volume de contrôle sont significativement différentes de celles obtenues pour les suspensions de globules rouges soumises à un choc hypotonique sans ajout de drogue, que ce soit en présence de Cl^- extracellulaire ($p < 0.0001$) ou lorsque ce dernier est remplacé par du MeSF ($p < 0.0001$). Les pourcentages d'inhibition du RVD sont alors respectivement de $70.9 \pm 10.3 \%$ ($n=5$) et $94.3 \pm 2.4 \%$ ($n=9$) en présence d'une solution Cl^- et MeSF (**Fig. 40.**

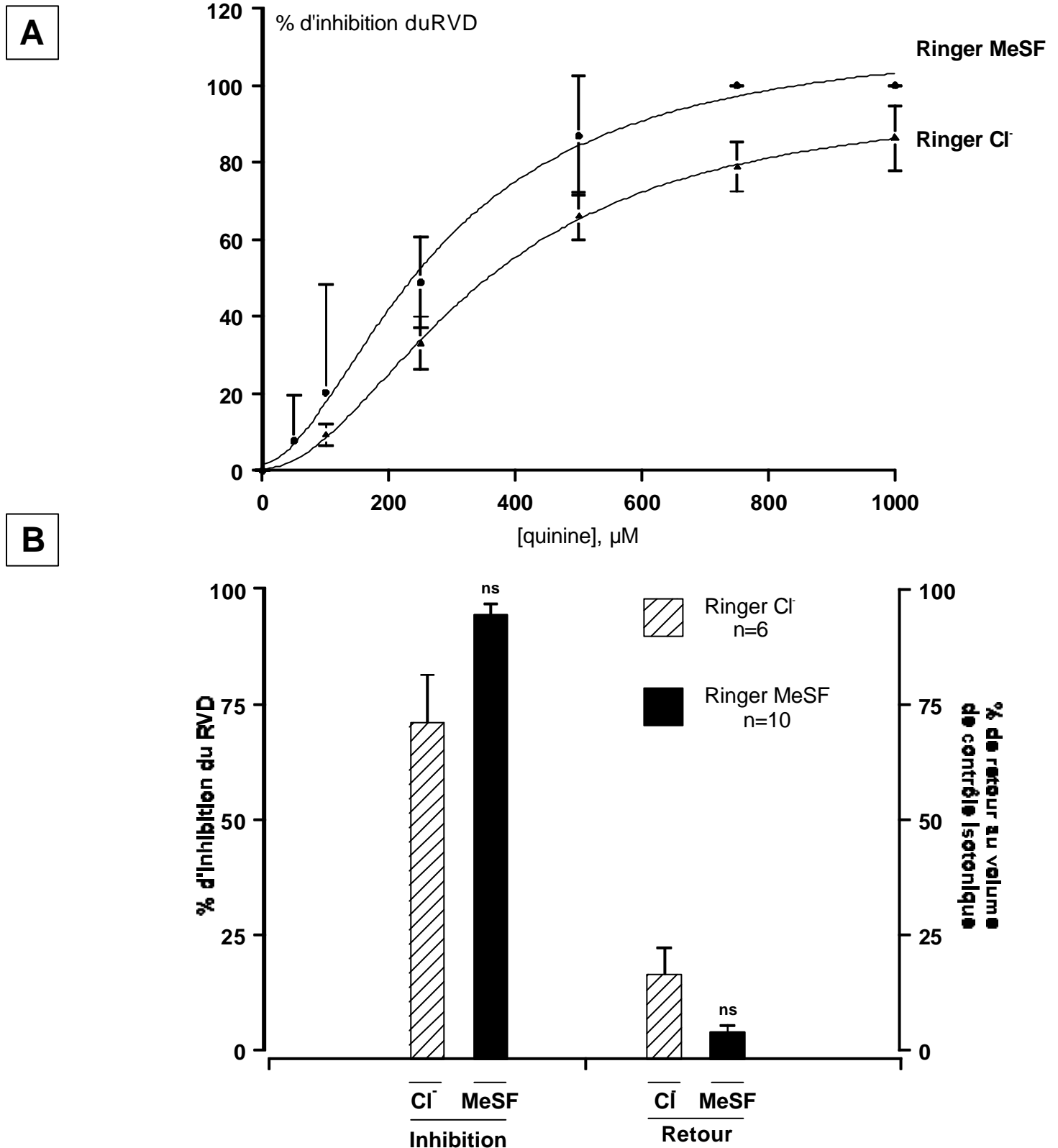


Figure 40. : Effet de la quinine sur la régulation du volume cellulaire suite à un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}).

A : Courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD après un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}) par la quinine en présence d'une solution Ringer Cl⁻ (\blacktriangle , $n=3$) et en présence d'une solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, \bullet , $n=3$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

B : Comparaison du pourcentage d'inhibition du RVD et du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 1 mM quinine ($n=6$) ou d'une solution de Ringer MeSF + 1 mM quinine ($n=10$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student : ns, non significatif.

B.). De plus, bien que l'effet de la quinine soit plus prononcé en présence de MeSF extracellulaire, les pourcentages d'inhibition du RVD et les pourcentages de retour au volume de contrôle obtenus en présence de Ringer MeSF ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus en présence de Cl⁻ dans le milieu hypotonique (**Fig. 40. B.**).

Cette absence de différence significative entre les effets de la quinine en solution Ringer Cl⁻ et ses effets en présence d'une solution MeSF est confirmée par les expériences qui ont permis la construction de courbes dose-réponse de l'effet de la quinine sur les processus de RVD en présence de solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF (**Fig. 40. A.**). En effet, bien que l'IC₅₀ de l'inhibition en présence d'une solution MeSF soit inférieure (235 µM) à celle obtenue en solution Ringer Cl⁻ (356 µM), les deux valeurs ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre.

L'étude de l'effet de la quinine (1 mM) sur la cinétique de l'efflux de K⁺ lors d'un choc hypotonique montre que, si en conditions isotoniques, le contenu en potassium n'est pas modifié par la présence de 1 mM de quinine, en présence de solutions Ringer Cl⁻ ou Ringer MeSF (**Fig. 39. B.**), l'ajout de quinine (1 mM) dans les solutions hypotoniques provoque en revanche une inhibition totale de l'efflux de potassium dans les deux conditions expérimentales (Ringer Cl⁻ ou MeSF). En effet, la variation de contenu en potassium (ΔK^+) n'est plus que de $17.5 \pm 7.5 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=3) en présence d'une solution chlore et de $13.5 \pm 7.7 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=4) en présence d'une solution Ringer MeSF (**Fig. 39. B.**). Ces valeurs de ΔK^+ sont significativement différentes de celles obtenues en conditions hypotoniques sans ajout de quinine, que ce soit en milieu hypotonique Ringer Cl⁻ (p<0.002) ou lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du MeSF (p<0.001). De plus, il n'y a pas de différence significative entre ces deux valeurs de ΔK^+ obtenues en présence de Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF, ce qui indique qu'à cette concentration, la quinine présente le même

effet inhibiteur, non seulement sur le RVD, mais également sur la sortie de potassium suite à un choc hypotonique.

De plus, les expériences conduites en flux isotopiques montrent qu'en présence d'une solution MeSF, l'influx de potassium suite à un choc hypotonique est totalement inhibé en présence de quinine (1 mM) (**Fig. 41. A.**). En effet, en présence de cette drogue, l'influx de potassium est identique à celui obtenu pour les suspensions de globules rouges maintenues en isotonie. Ces résultats indiquent que la quinine agit sur un transporteur du K^+ , capable de faire passer le potassium à travers la membrane dans le sens de l'efflux ou de l'influx.

- La quinine (1 mM) affecte la sortie de K^+ et d'eau osmotiquement liée dans les mêmes proportions quel que soit l'anion prépondérant dans le milieu extracellulaire.
- Les courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD établies dans les deux conditions anioniques extracellulaires (Cl^- et MeSF) présentent des IC_{50} similaires, ce qui suggère que les cibles de cet agent sont multiples.

3.3. Effet d'autres inhibiteurs des transporteurs cationiques sur les processus de régulation de volume des érythrocytes en conditions hypotoniques Ringer MeSF.

Dans diverses études sur la régulation de volume d'autres inhibiteurs des canaux K^+ , tels que le TEA, la charybdotoxine, l'apamine ou la lidocaïne sont utilisés pour démontrer l'activation de voies de conductance potassiques (ou sélectives au K^+) lors des processus de RVD (Macleod, 1994 ; Grinstein et Smith, 1990 ; Passantes-Morales *et al.*, 1994).

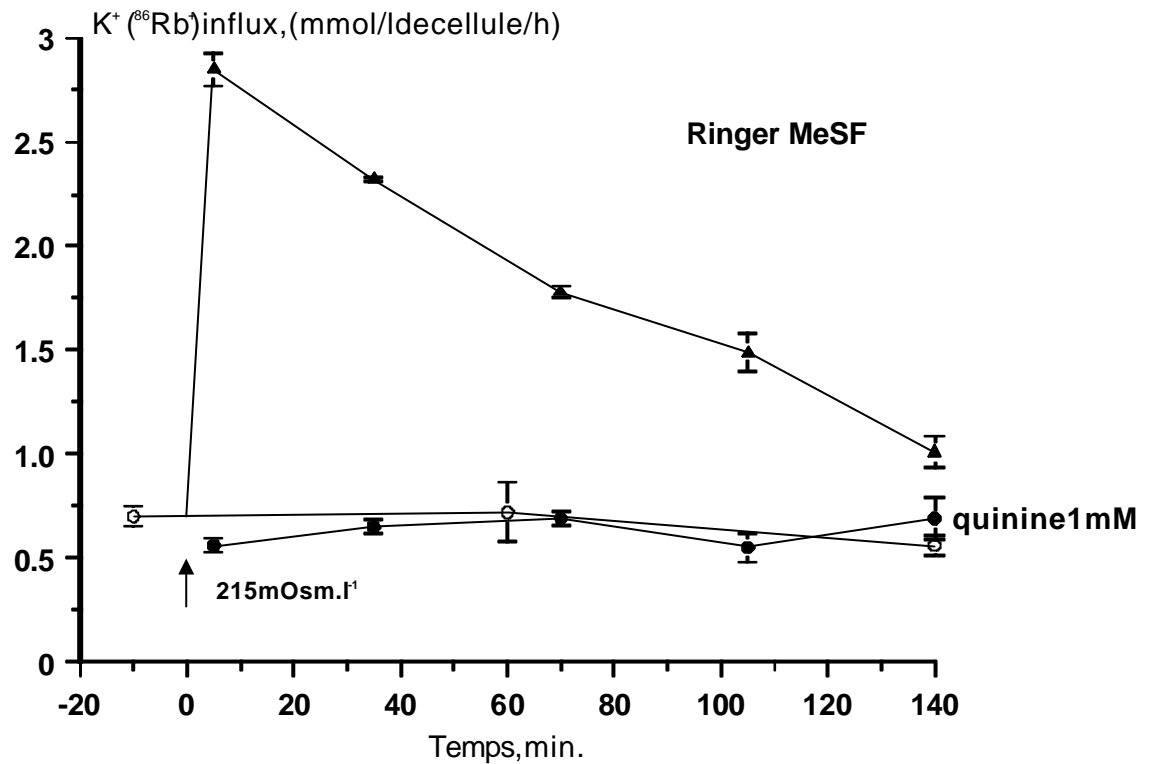
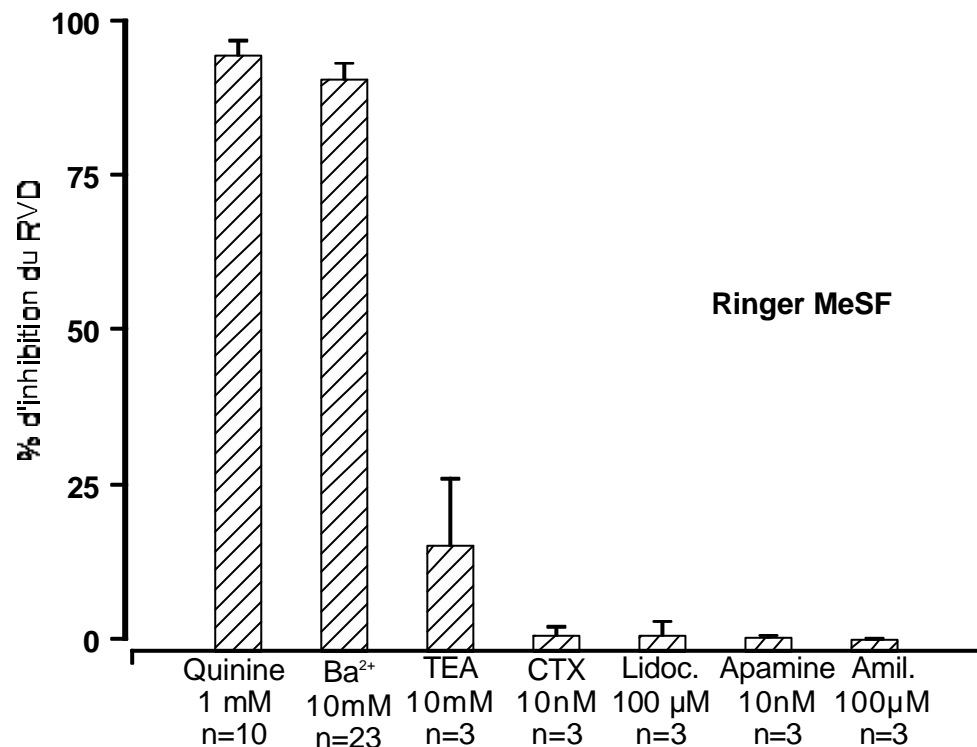
A**B**

Figure 41 : Effet de différents inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) en solution Ringer MeSF.

A : Evolution de l'influx de potassium ($^{86}\text{Rb}^+$) lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) en solution Ringer MeSF (▲ , n=3) et en solution Ringer Méthylsulfonate + 1 mM quinine (● , n=3). ○ symbole de la courbe contrôle en isotonie Ringer MeSF. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences.

B : Pourcentage d'inhibition du RVD en présence de différents inhibiteurs de voies de transport cationiques membranaires. Quinine : 1 mM (n=10), Baryum (Ba^{2+}) : 10 mM (n=23), TEA : 10 mM (n=3), Charybdotoxine (CTX) : 10 nM (n=3), Lidocaïne (Lidoc.) : 100 μM (n=3), Apamine : 10 nM (n=3), Amiloride (Amil.) : 100 μM (n=3). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

L'étude de l'action de ces inhibiteurs sur les processus de régulation du volume cellulaire lors d'un gonflement des érythrocytes de truite, en présence d'une solution Ringer MeSF, montre qu'aucun d'entre eux n'a d'effet significatif sur le pourcentage de retour au volume de contrôle suite à un gonflement induit par un choc hypotonique (**Fig. 41. B** et **Tab. 5.**). En effet, bien que le TEA (10 mM, n=3) ait un effet inhibiteur ($15.0 \pm 10.9 \%$, n=3) sur les processus de RVD en solution MeSF, celui-ci se révèle non significatif par rapport à ce qui est observé en l'absence de cette drogue. De même, la lidocaïne (100 μ M, n=3), la Charybdotoxine (10 nM, n=4) et l'apamine (10 nM, n=3) ne provoquent aucune inhibition significative des processus de RVD en présence d'une solution hypotonique MeSF.

La quinidine induit quant à elle une forte inhibition des processus de RVD. En effet, utilisée à une concentration de 1 mM, cette drogue provoque une inhibition complète des processus du RVD et de retour au volume de contrôle (**Tab.5.**). Malgré cet effet prononcé, les résultats semblent devoir être nuancés en raison de la concentration utilisée. En effet, la quinidine se révèle un inhibiteur puissant de certains canaux K^+ (Bergeron *et al.*, 1996 ; Latorre et Miller, 1983) et est fréquemment utilisée à cette même concentration de 1 mM (Bergeron *et al.*, 1996), mais certains auteurs critiquent cette concentration et lui préfèrent des concentrations de l'ordre du micromolaire (Richards et Dawson, 1986). L'emploi de la quinidine à la concentration de 10 μ M ne provoque aucune inhibition, ni du retour au volume de contrôle mesuré en isotonie en solution MeSF, ni de l'efflux de potassium suite à un choc hypotonique (non montré).

L'amiloride est un inhibiteur de l'échangeur sodium-proton de l'érythrocyte de truite (Baroin *et al.*, 1984 ; Borgese *et al.*, 1987), mais également de certains canaux cationiques non sélectifs, mécanosensibles (Hamill et McBride, 1996). Utilisée à la concentration de 100 μ M, l'amiloride ne provoque aucune modification des processus de RVD en présence d'une solution hypotonique Ringer MeSF (**Fig. 41. B.**).

A

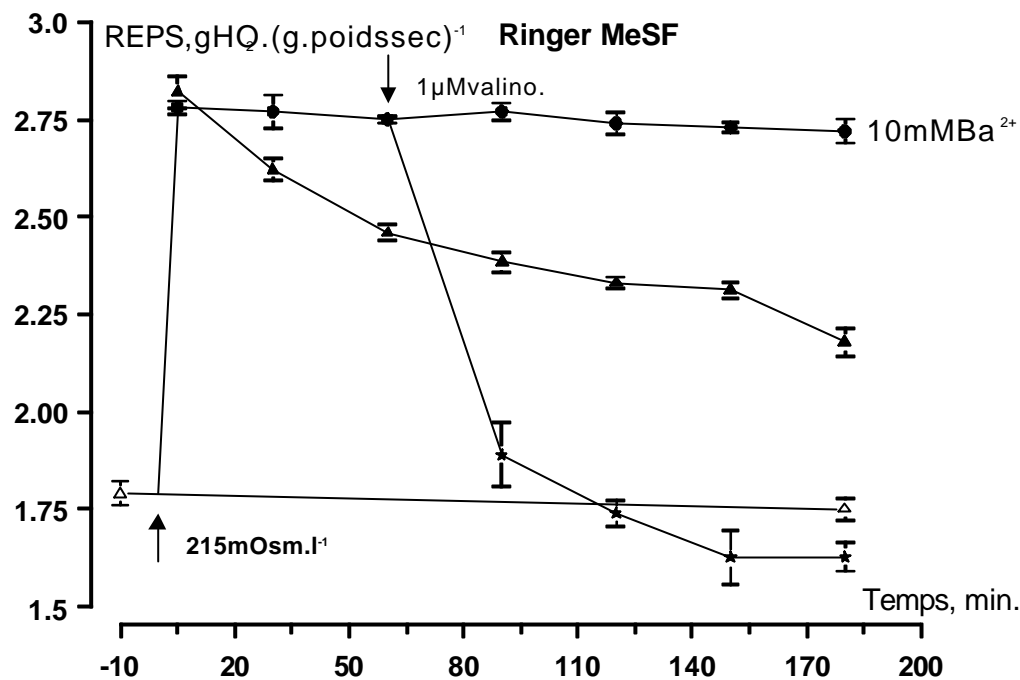


Figure 42. : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t=0 min.) en présence de d'une solution Ringer MeSF (▲, n=5) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 10 mM Ba²⁺ (●, n=5). A t=60 min. le lot expérimental où du Ba²⁺ est présent est divisé en deux groupes dans un desquels est rajouté 1 µM de valinomycine (★, n=5). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 5 expériences. Contrôle isotonique MeSF (△, n=5).

	Ringer Cl			Ringer MeSF		
	% inh	% retour	n	% inh	% retour	n
<i>Effet d'un choc osmotique</i>	-	90.4 ± 3.4	31	-	67.7 ± 1.5	108
<i>Effet des inhibiteurs des transporteurs cationiques</i>						
Ba ²⁺ , 10mM	43.1 ± 5.9	51.9 ± 3.4 ^{****}	11	90.5 ± 2.4 ^{****}	6.3 ± 1.6 ^{****}	23
Quinine, 1 mM	70.9 ± 10.3	16.4 ± 5.7 ^{****}	5	94.3 ± 2.4 ^{ns}	3.7 ± 1.6 ^{****}	9
Quinidine, 1 mM	-	-		100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^{****}	3
Quinidine, 10 µM	-	-		0.2 ± 0.4	67.4 ± 1.5 ^{ns}	3
Lidocaine, 100 µM	-	-		0.5 ± 2.3	66.9 ± 2.1 ^{ns}	3
Amiloride, 100 µM	-	-		0.0 ± 0.0	68.3 ± 0.5 ^{ns}	3
Charybdotoxine, 10 nM	-	-		0.7 ± 1.2	69.3 ± 1.0 ^{ns}	4
Apamine, 10 nM	-	-		0.1 ± 0.4	68.3 ± 4.1 ^{ns}	3
TEA, 10 mM	-	-		15.0 ± 10.9	58.3 ± 9.2 ^{ns}	3

Tableau 5. : Pourcentage de retour au volume de contrôle (% de retour) suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de solution Ringer Cl⁻ ou Ringer MeSF en présence de différents inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées par rapport au contrôle à l'aide du test t de student.

(****) p<<0.0001, (ns) non significatif.

Pourcentage d'inhibition du RVD (% inh) suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de différents inhibiteurs des transporteurs cationiques membranaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les résultats obtenus en solution Ringer Cl⁻ ou Ringer MeSF à l'aide du test t de Student.

(****) p<<0.0001, (ns) non significatif.

L'idée selon laquelle l'action du Ba^{2+} , comme inhibiteur des processus de RVD, se fait par une action directe sur un transporteur cationique est renforcée par l'observation que la valinomycine (1 μM), en induisant une augmentation de la perméabilité potassique, annule les effets inhibiteurs du Ba^{2+} (**Fig.42.**).

- Les inhibiteurs des canaux potassiques (TEA (10 mM), Charybdotoxine (10 nM), apamine (10 nM), Lidocaïne (100 μM) quinidine (10 μM)) n'affectent pas les processus de RVD lorsque les globules rouges sont soumis à des conditions hypotoniques en présence d'un milieu Ringer MeSF.
- Les voies de sortie d'ions K^+ activées lors d'un choc hypotonique réalisé en conditions Ringer MeSF, ne sont pas sous la dépendance d'un canal potassique, mais vraisemblablement d'une voie de conductance cationique non sélective.
- L'hypothèse d'une voie de conductance cationique non sélective semble être confirmée par la réversibilité de l'inhibition par le Ba^{2+} en présence de valinomycine.

4. Effet des inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique.

Le gonflement cellulaire des érythrocytes de poissons induit par un choc hypotonique provoque une sortie de K^+ et d'eau osmotiquement liée, mais également de Cl^- et d'osmolytes organiques tels que la taurine (Garcia-Romeu *et al.*, 1991) permettant le retour partiel au volume en isotonie des cellules.

Les propriétés cinétiques et pharmacologiques du transport de Cl^- et de taurine activé par le gonflement dans les érythrocytes de poissons sont très similaires à celles du canal sensible au volume et sélectif pour les anions dénommé VSOAC : Volume Sensitive Organic Anion Channel (Jackson et Strange, 1993 ; Kirk *et al.*, 1992 ; Goldstein et Davis, 1994). La littérature fournit de nombreux exemples d'études conduites sur des cellules de mammifères en culture, qui ont permis de mettre en évidence le fait que ce type de transporteur permet bien entendu le transport de Cl^- mais aussi l'efflux de taurine et de petites molécules organiques. Ce type de transporteur est sensible aux inhibiteurs des transporteurs anioniques (Roy et Malo, 1992 ; Banderali et Roy, 1992 ; Strange *et al.*, 1993 ; Jackson et Strange, 1993 ; Kirk et Kirk, 1993 ; Jackson *et al.*, 1994 ; Kirk et Kirk, 1994). En outre, bien que cette voie de transport membranaire ait été démontrée dans les érythrocytes de poissons comme perméable à divers substrats organiques électroneutres (Kirk *et al.*, 1992), peu de choses sont connues quant à sa sélectivité. Cependant, les données actuelles s'accordent avec le fait que ce transporteur possède une perméabilité non négligeable aux cations monovalents tel que la choline (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Joyner et Kirk, 1994) et au K^+ , mesuré à partir des flux de $^{86}Rb^+$ comme traceur radioactif, (Bursell et Kirk, 1996).

C'est pourquoi l'effet des inhibiteurs des canaux Cl^- a été testé sur les processus de RVD et sur l'efflux de K^+ des érythrocytes de truite suite à un choc hypotonique en solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF.

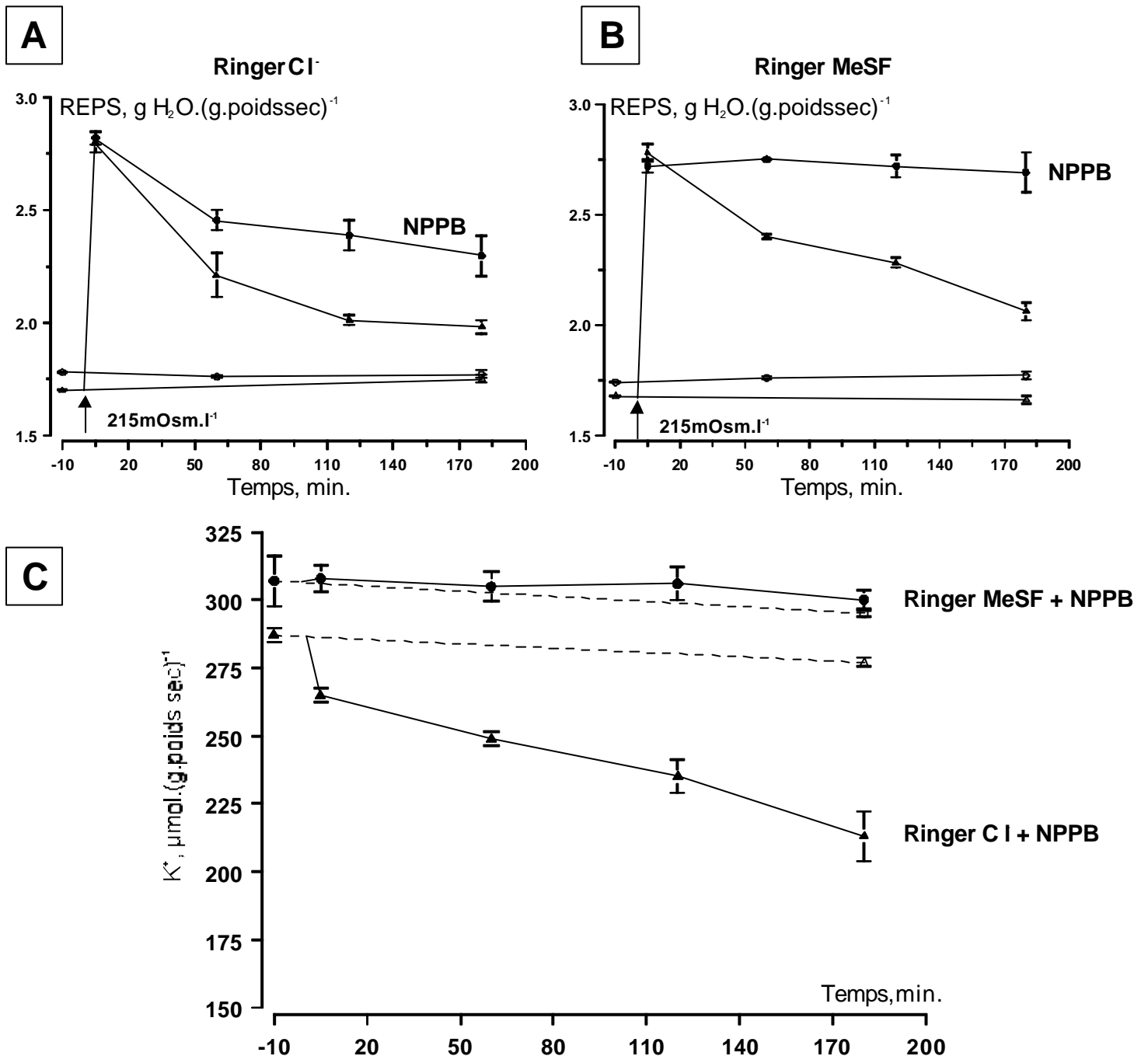


Figure 43. : Effet du NPPB 50 μM sur la régulation du volume cellulaire suite à un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}).

A : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l^{-1}), à $t = 0 \text{ min.}$, en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (\blacktriangle , $n=8$) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\bullet , $n=8$). Ringer Cl⁻ isotonique (Δ , $n=8$) et Ringer Cl⁻ isotonique + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\circ , $n=8$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l^{-1}), à $t = 0 \text{ min.}$, en présence d'une solution de Ringer MeSF (\blacktriangle , $n=12$) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\bullet , $n=12$). Ringer MeSF isotonique (Δ , $n=12$) et Ringer MeSF isotonique + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\circ , $n=12$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

C : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique à $t = 0 \text{ min.}$ en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\blacktriangle , $n=6$) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\bullet , $n=12$). Ringer Cl⁻ isotonique + $50 \mu\text{M}$ NPPB (Δ , $n=6$) et Ringer MeSF isotonique + $50 \mu\text{M}$ NPPB (\circ , $n=12$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

4.1. Effet du NPPB sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF

Le NPPB est un inhibiteur spécifique des canaux Cl⁻ (Tilman *et al.*, 1991). En présence de NPPB, 50 µM, (**Fig. 43. A.**), les processus de RVD sont significativement diminués lorsque les cellules sont soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution Cl⁻. En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle est alors significativement diminué par rapport aux conditions expérimentales en l'absence de NPPB ($p < 0.0001$), et il est alors de $36.5 \pm 4.5 \%$ ($n=8$) (**Fig. 43. A.** et **Fig. 44. B.**). L'inhibition des processus de RVD est alors de $58.0 \pm 5.0 \%$ ($n=8$) (**Fig. 43. A.**, **44. B.** et **Tab. 6.**). En revanche, à cette même concentration de 50 µM, une inhibition totale du RVD est observée lorsque la suspension de globules rouges est soumise à un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF. En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle est alors de $1.1 \pm 1.1 \%$ ($n=12$), soit une inhibition de $96.0 \pm 3.9 \%$ ($n=12$) du retour au volume de contrôle (**Fig. 44. B.**). Cet effet du NPPB en présence d'une solution MeSF est hautement significatif par rapport aux suspensions de globules rouges soumises à un choc hyposmotique en absence de NPPB ($p < 0.0001$). Les comparaisons deux à deux des pourcentages d'inhibition du RVD et des pourcentages de retour au volume de contrôle obtenus en présence d'une solution Chlore et d'une solution MeSF montrent que, quelle que soit la grandeur considérée, l'effet du NPBB (50 µM) sur la régulation du volume des érythrocytes diffère de manière significative selon que l'expérience est conduite en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ ou de Ringer MeSF (**Fig. 44. B.**), ($p < 0.0001$ dans les deux cas).

L'évolution du contenu en potassium des érythrocytes, soumis à un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF contenant du NPPB (50 µM), montre que la sortie de K⁺ est affectée de manière différente en fonction de l'anion prépondérant

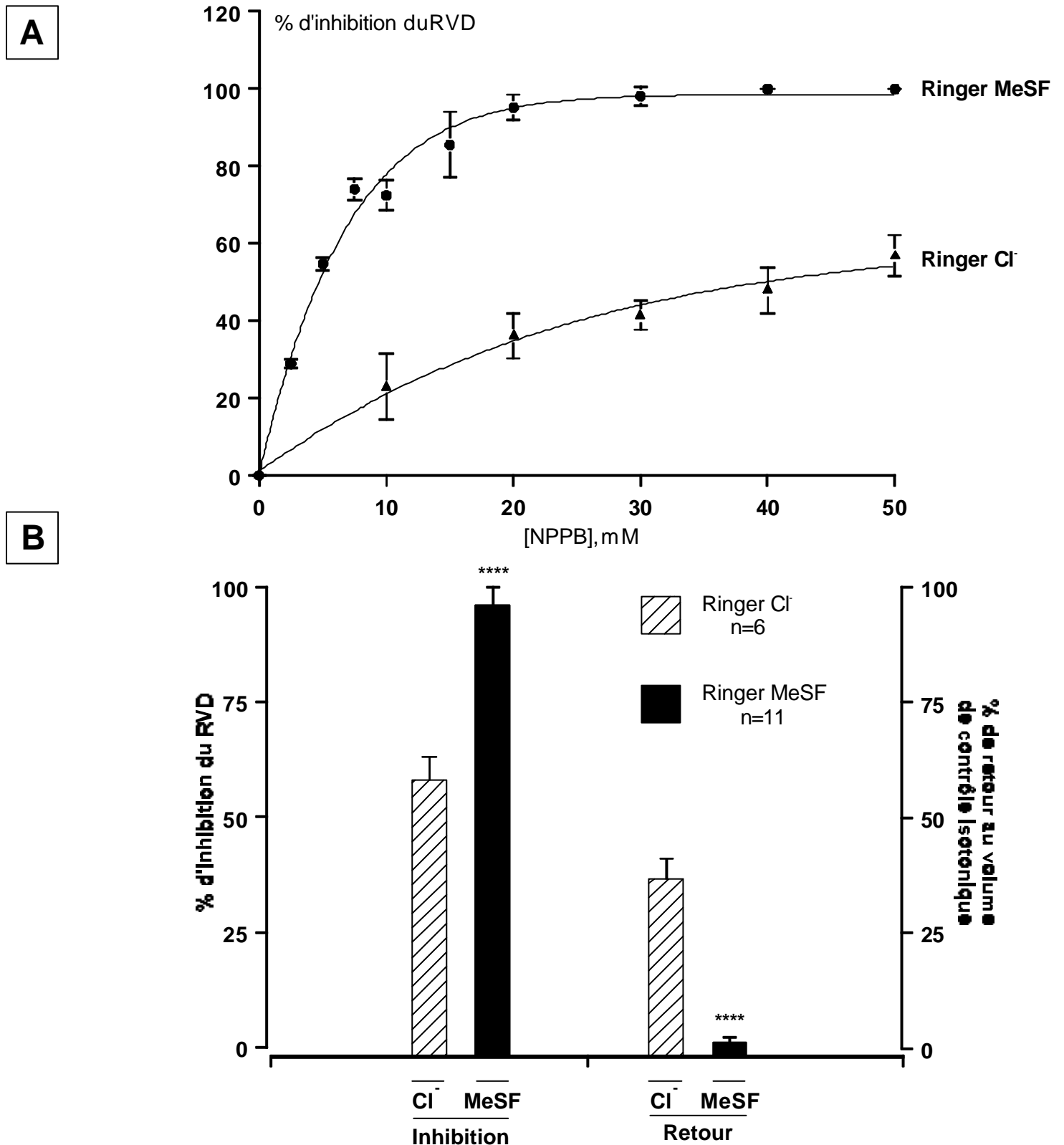


Figure 44. : Effet du NPPB sur la régulation du volume cellulaire suite à un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A : Courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD après un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) par le NPPB en présence d'une solution Ringer Cl⁻ (▲ , n=4) et en présence d'une solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, ● , n=5). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

B : Comparaison du pourcentage d'inhibition du RVD et du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 50 µM NPPB (n=6) ou d'une solution de Ringer MeSF + 50 µM NPPB (n=11). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student : **** p<0.0001.

dans la solution hypotonique (**Fig. 43. B.**). En effet, la variation du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence d'une solution Cl⁻ contenant du NPPB est de $77.5 \pm 12.5 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=6) et est significativement différente de celle obtenue pour les suspensions de globules rouges mises en présence de la même solution hypotonique sans NPPB (p<0.05). Cette valeur de ΔK^{+} représente un pourcentage d'inhibition de la sortie de K^{+} de $41.1 \pm 6.2 \%$ (n=6) par rapport aux conditions hypotoniques sans ajout de drogue. Par ailleurs, lorsque les cellules sont soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF contenant la même concentration de NPPB, la variation de contenu en K^{+} des érythrocytes est réduite à une valeur de $7.2 \pm 2.5 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=12). Cette variation du contenu en potassium des érythrocytes en solution MeSF après stimulation hypotonique est significativement différente de celle obtenue pour les suspensions de globules rouges placées dans les mêmes conditions de gonflement, mais en l'absence de NPPB (p<0.001). Cette diminution de la sortie de potassium représente alors une inhibition du flux sortant de potassium de $93.5 \pm 3.2 \%$ (n=12) par rapport aux conditions de contrôle. En outre, la comparaison de l'effet inhibiteur du NPPB (50 μM) en présence d'une solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF montre que celui-ci est différent selon l'anion présent dans le milieu extracellulaire (p<<0.0001).

Les courbes dose-réponse de l'inhibition du retour au volume de contrôle par le NPPB en présence de solutions Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF confirment les différences d'effet observées, tant pour la diminution du contenu en eau des cellules que pour la sortie de K^{+} après gonflement hypotonique des érythrocytes, en présence d'une concentration de 50 μM de cet agent. En effet, en présence d'une solution Ringer MeSF, la courbe dose-réponse établie montre une inhibition rapide du RVD, puisque pour des concentrations supérieures à 20 μM , le RVD est totalement inhibé (n=5), alors que pour cette même concentration de 20 μM , le retour au contenu en eau isotonique des cellules est peu inhibé en présence d'une solution Cl⁻ (37.2 %, n=4). L' IC_{50} obtenue en condition Ringer MeSF est de 4.5 μM . En

revanche, l'inhibition obtenue par le NPPB du RVD en solution chlore pour cette concentration de 4.5 μM n'est que de 11.1 %.

- Les processus de RVD de l'érythrocyte de truite sont sensibles au NPPB (50 μM).
- L'inhibition totale en présence d'une solution Ringer MeSF rend compte de la sensibilité directe ou indirecte des voies de sortie K^+ - Cl^- -indépendante au NPPB.
- L'inhibition partielle observée en présence de conditions physiologiques de Cl^- extracellulaire montre que les processus de RVD procèdent par une voie sensible au NPPB et une voie insensible à cet agent, qui est vraisemblablement le cotransport KCl.

4.2. Effet du DIDS sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl^- et MeSF.

Le DIDS est connu pour être un puissant inhibiteur des processus de RVD des érythrocytes en règle générale et des érythrocytes de téléostéens en particulier (pour revue : Cossins et Gibson, 1997 ; Motais *et al.*, 1997 ; Lauf *et al.*, 1992).

L'utilisation du DIDS (100 μM) lors des chocs hypotoniques en présence de solutions Cl^- et MeSF provoque une inhibition complète du retour au contenu en eau des érythrocytes, mesuré en isotonie. En effet, le pourcentage de retour au contenu en eau de contrôle des cellules est alors de $14.7 \pm 9.3 \%$ (n=6) (**Fig. 45. A.** et **46. B.**) lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer Cl^- , et de $8.5 \pm 2.6 \%$ (n=8) lorsque le choc osmotique se

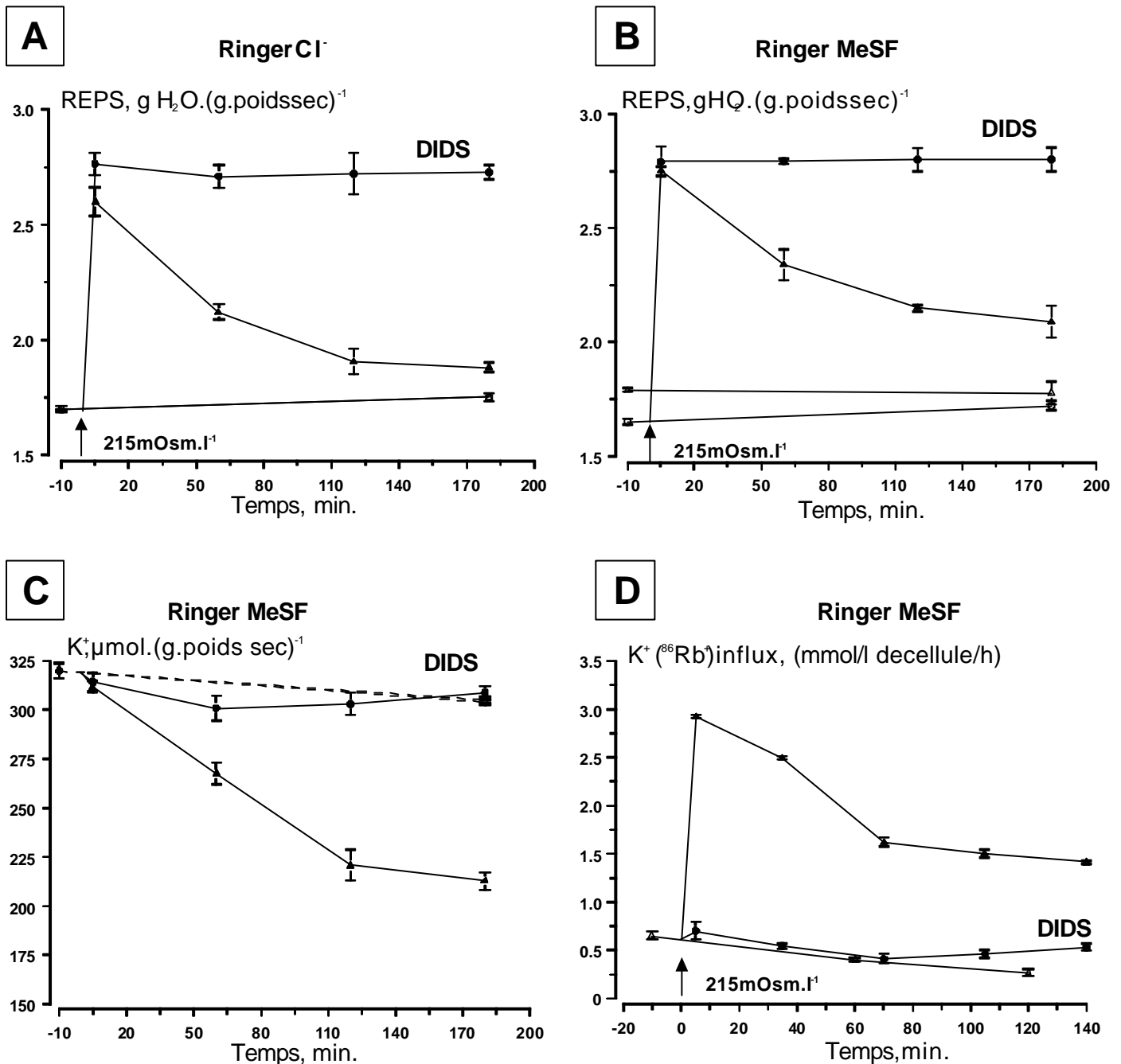


Figure 45. : Effet du DIDS 100 μM sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A et B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹), à t = 0 min., en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**A** : ▲ , n=6) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 100 μM DIDS (**A** : ● , n=6) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**B** : ▲ , n=8) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 100 μM DIDS (**B** : ● , n=8). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) et Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) + 100 μM DIDS respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

C : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF (▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 100 μM DIDS (● , n=3). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=3) et Ringer MeSF isotonique + 100 μM DIDS (○ , n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences

D : Evolution de l'influx de potassium (⁸⁶Rb⁺) après un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) en présence d'une solution Ringer MeSF⁻ (▲ , n=3) et en présence d'une solution Ringer Méthylsulfonate + 100 μM DIDS (● , n=3). Ringer MeSF isotonique (○ , n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

produit en présence d'un Ringer MeSF (**Fig. 45. A. et 46. B.**). Ces valeurs de pourcentage de retour au volume de contrôle sont significativement différentes de celles obtenues en l'absence de DIDS, que ce soit en présence de Cl⁻ extracellulaire ($p < 0.0001$) ou en présence d'une solution Ringer MeSF ($p < 0.0001$). Les pourcentages d'inhibition des processus de RVD sont alors de $75.3 \pm 13.7 \%$ ($n=6$) et $86.6 \pm 5.7 \%$ ($n=8$) en présence d'une solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF respectivement. Bien que le pourcentage moyen d'inhibition en présence d'une solution Ringer MeSF soit plus élevé que celui obtenu en présence de Ringer Cl⁻, il n'y a pas de différence significative entre les deux pourcentages d'inhibition obtenus (**Fig. 46. B.**) dans ces deux conditions de solutions hypotoniques (Cl⁻ et MeSF).

Les études menées précédemment sur l'effet de ce dérivé des stilbènes sur la sortie de K⁺ durant le RVD des érythrocytes de truite faisant suite à un choc hyposmotique ont montré qu'à une concentration de 100 μM , cette drogue inhibe complètement cette sortie (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du MeSF, le suivi de la sortie de potassium suite à un choc hypotonique montre que cet agent pharmacologique bloque complètement la sortie de K⁺ (**Fig. 45.C.**, $p < 0.0001$ par rapport au contrôle hypotonique). En effet, au bout de trois heures d'exposition à la solution hypotonique, la variation du contenu en potassium n'est que de $4.3 \pm 2.3 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=3$) comparée à la variation du contenu en potassium des érythrocytes soumis aux mêmes condition hypotoniques sans DIDS $112.1 \pm 2.1 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=3$). Le DIDS se révèle être un puissant inhibiteur des processus de RVD et de la sortie de potassium lors du remplacement du Cl⁻ par du MeSF. Ce résultat est confirmé par le fait qu'à la même concentration, le DIDS inhibe également l'influx de K⁺ ($^{86}\text{Rb}^{+}$). En effet, lors de l'ajout de DIDS (100 μM) à la solution hypotonique, durant les 140 minutes d'exposition aux conditions hypotoniques, l'influx de K⁺ (**Fig. 45.D.**) est alors similaire à celui obtenu en conditions contrôle isotoniques.

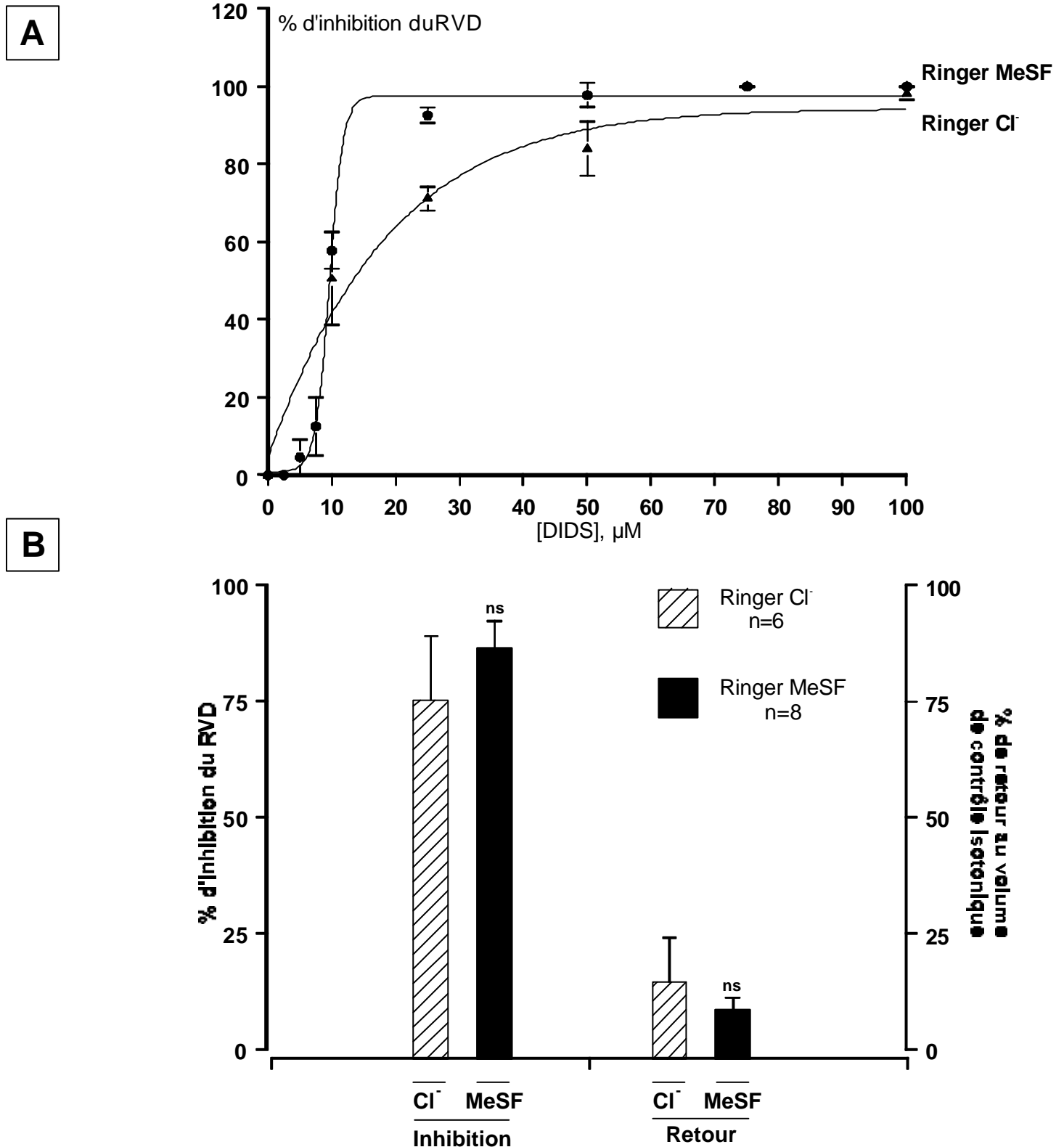


Figure 46 : Effet du DIDS sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}).

A : Courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD après un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}) par le DIDS en présence d'une solution Ringer Cl⁻ (\blacktriangle , n=3) et en présence d'une solution Ringer Méthylsulfonate (MeSF, \bullet , n=3). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

B : Comparaison du pourcentage d'inhibition du RVD et du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ +100 μM DIDS (n=6) ou d'une solution de Ringer MeSF +100 μM DIDS (n=8). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student : ns : non significatif.

Les courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD par le DIDS, obtenues en présence de solutions Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF, montrent une remarquable similarité. En effet, l'IC₅₀ de l'inhibition du RVD en présence d'une solution Cl⁻ est de 14 µM et de 11 µM en présence d'une solution MeSF (**Fig. 46. A.**). Ces résultats démontrent donc que le DIDS est un inhibiteur puissant du RVD mais que les cibles de cet agent sont vraisemblablement multiples ou que les flux de potassium sont sous la dépendance d'un transporteur ou d'un mécanisme sensible au DIDS. En effet, le DIDS est également un inhibiteur puissant de l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ (Bande 3), protéine fondamentale de l'intégrité physiologique des globules rouges.

- L'action du DIDS (100 µM) sur les processus de RVD en présence de conditions hypotoniques en milieu Cl⁻ et MeSF est identique quel que soit l'anion prépondérant dans le milieu extracellulaire.
- Le DIDS inhibe donc les voies de transport de K⁺ Cl⁻-indépendante et Cl⁻-dépendante par action directe ou indirecte sur les transporteurs, suggérant l'implication d'un mécanisme ou d'un transporteur sensible au DIDS régulant ces processus de RVD.

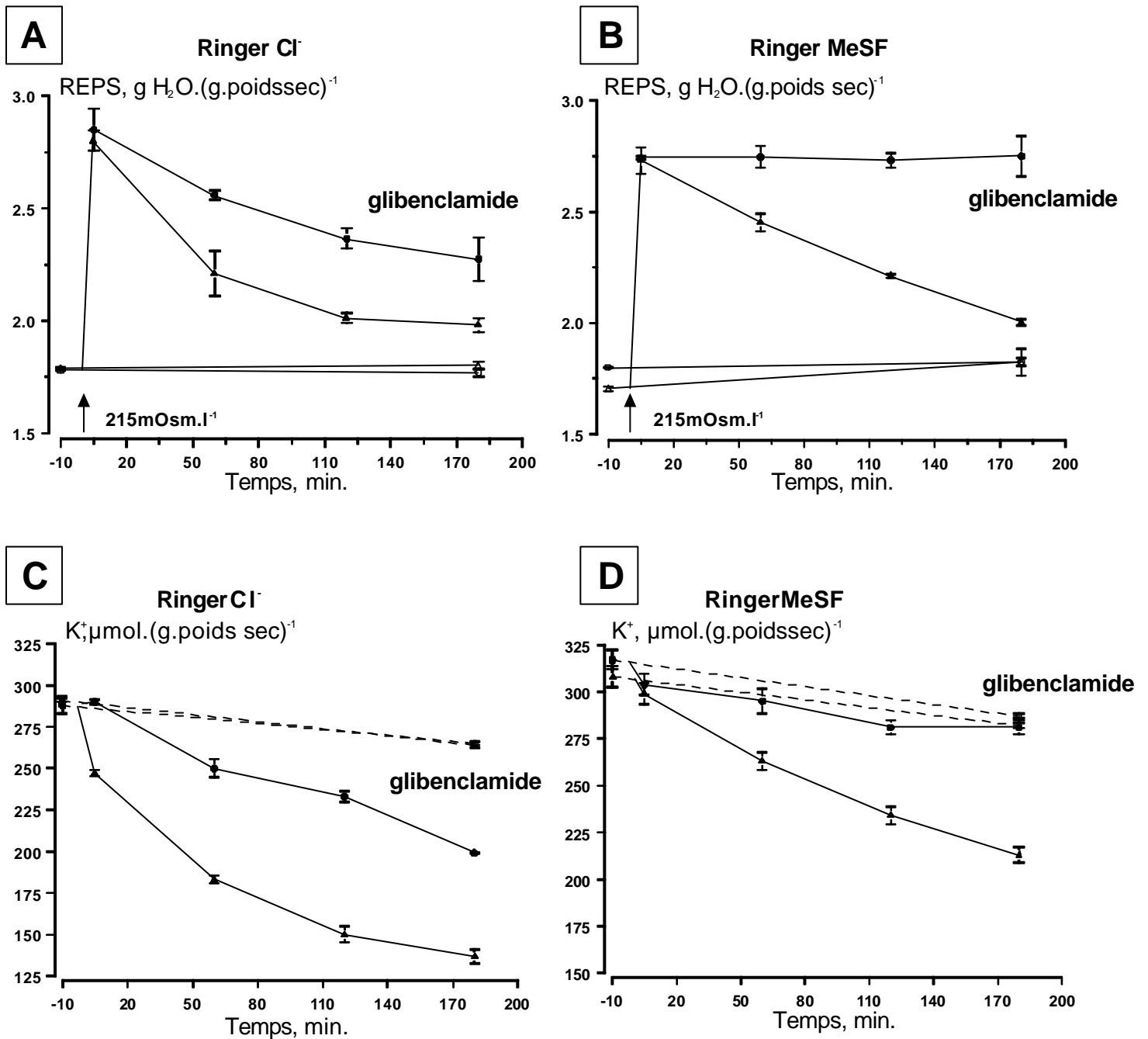


Figure 47. : Effet de la glibenclamide 100 μM sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}).

A et B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l^{-1} , à $t=0 \text{ min.}$) en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**A** : \blacktriangle , $n=6$) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 100 μM glibenclamide (**A** : \bullet , $n=6$) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**B** : \blacktriangle , $n=6$) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 100 μM glibenclamide (**B** : \bullet , $n=6$). Δ et \circ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) et Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF +100 μM glibenclamide (**B**) respectivement. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

C et D : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique à $t=0 \text{ min.}$, en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**C** : \blacktriangle , $n=3$) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 100 μM glibenclamide (**C** : \bullet , $n=3$) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**D** : \blacktriangle , $n=3$) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 100 μM glibenclamide (**D** : \bullet , $n=3$). Δ et \circ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**C**) ou Ringer MeSF (**D**) et Ringer Cl⁻ (**C**) ou Ringer MeSF +100 μM glibenclamide (**D**) respectivement. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

4.3. Effet de la glibenclamide sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence de solutions Ringer Cl⁻ et MeSF.

La glibenclamide est un inhibiteur bien connu des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Noma et Takano, 1991) mais elle est également connue pour inhiber les canaux chlore de type CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) (Foskett, 1998).

L'ajout de glibenclamide (100 μ M) à la suspension de globules rouges soumise à une solution Cl⁻ hypotonique provoque une diminution significative du pourcentage de retour au volume de contrôle ($p < 0.0001$). En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle dans ces conditions est de 54.4 ± 4.7 % ($n=4$) (**Fig. 47. A.** et **Fig. 48.**), ce qui représente un pourcentage d'inhibition du RVD de 35.9 ± 4.3 % ($n=6$). En revanche, la même concentration de 100 μ M provoque une diminution brutale du pourcentage de retour au volume de contrôle, puisque celui-ci n'est plus que de 12.3 ± 2.2 % ($n=6$). Cette valeur est alors significativement différente de la valeur obtenue en conditions de contrôle hypotonique MeSF ($p < 0.0001$). Le pourcentage d'inhibition du RVD dans ces conditions est alors de 81.5 ± 3.0 % ($n=6$).

Les comparaisons des pourcentages d'inhibition du RVD et des pourcentages de retour au volume de contrôle obtenus en solutions Cl⁻ et MeSF (**Fig. 48.**), en présence de cet agent pharmacologique, montrent une différence significative de l'effet de la glibenclamide sur les processus de RVD induits par un choc hypotonique ($p < 0.0001$) selon l'emploi de l'une ou l'autre des conditions anioniques extracellulaires (Cl⁻ ou MeSF). La glibenclamide (100 μ M) se révèle être un inhibiteur plus puissant de ces processus lorsque les cellules sont exposées à des conditions hypotoniques en solution MeSF.

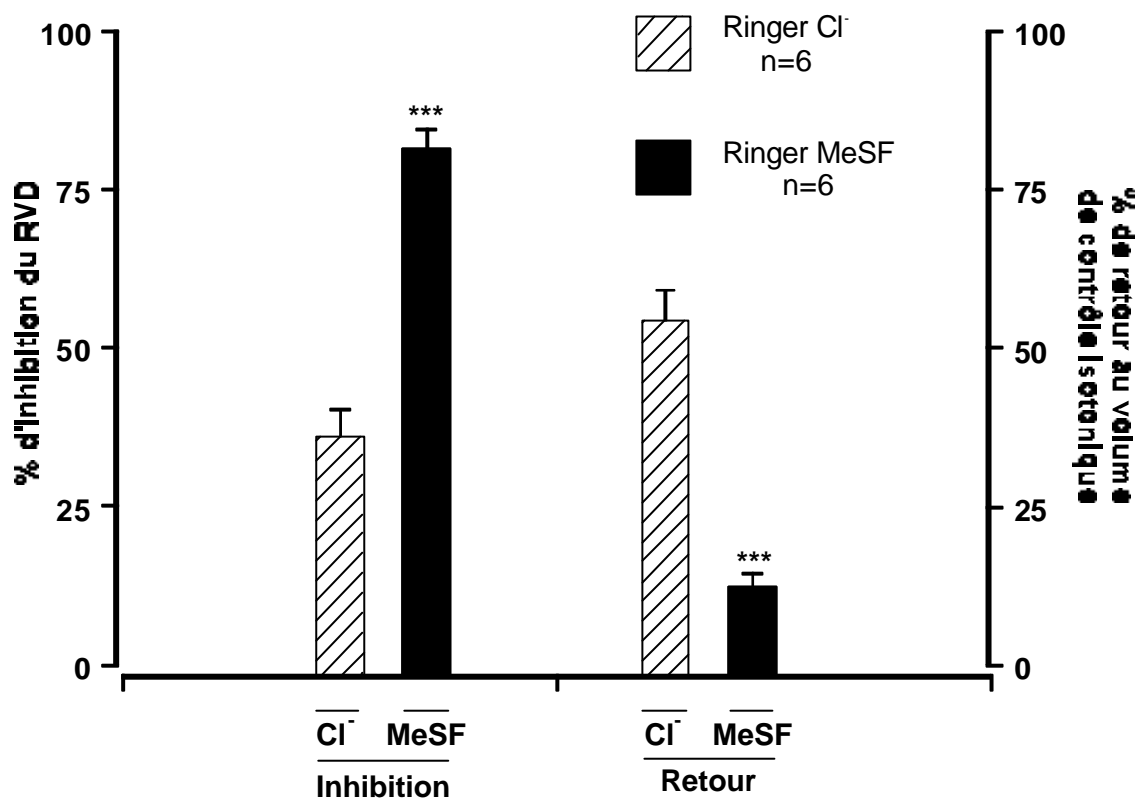


Figure 48. : Comparaison du pourcentage d'inhibition du RVD et du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 100 μ M glibenclamide (n=6) ou d'une solution de Ringer MeSF + 100 μ M glibenclamide (n=6). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences. Les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les expériences réalisées en solution Cl⁻ et celles réalisées en solutions MeSF à l'aide d'un test t de Student : ***, $p < 0.001$.

Les **figures 47. C.** et **47. D.** présentent l'évolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence de solutions chlore et MeSF respectivement. L'ajout de glibenclamide (100 μM) à la suspension de globules rouges lors de l'exposition à une solution chlore hypotonique provoque une diminution significative de la variation du contenu en potassium des cellules par rapport aux conditions hypotoniques sans drogue ($p < 0.02$). En effet, la variation du contenu en potassium des cellules au bout des 3 heures d'exposition aux conditions hyposmotiques est de $91.0 \pm 1.0 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=3$). Cette diminution de la variation du contenu en K^+ des érythrocytes représente une inhibition de $34.1 \pm 2.4 \%$ ($n=3$) du flux sortant de potassium, en comparaison de la variation mesurée en conditions hypotoniques en l'absence de glibenclamide ($\Delta\text{K}^+ = 148.4 \pm 5.2 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$, $n=3$) . En revanche, lorsque les globules rouges sont soumis à des conditions hypotoniques durant trois heures en Ringer MeSF, le ΔK^+ est alors de $19.75 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ ($n=3$), soit une valeur significativement inférieure à celle obtenue pour les suspensions de globules rouges soumises à des conditions hypotoniques sans drogue (113.7 ± 1.2 , $n=3$, $p < 0.002$). Dans ces conditions (MeSF), la glibenclamide inhibe donc l'efflux de potassium de $82.3 \pm 4.3 \%$ ($n=3$).

La comparaison des effets de la glibenclamide selon que le choc hypotonique est réalisé en présence d'une solution Cl⁻ ou d'une solution MeSF montre que ceux-ci sont significativement différents tant sur les processus de RVD (**Fig. 48.**, $p < 0.0001$) que sur la sortie de K^+ activée par le choc hypotonique ($p < 0.0001$).

- La glibenclamide (100 μM) inhibe la sortie d'ions K^+ et d'eau osmotiquement liée des érythrocytes soumis à des conditions hypotoniques en présence d'une solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF.
- L'effet de la glibenclamide observé dans les deux conditions anioniques extracellulaires est différent, ce qui suggère que le dégonflement cellulaire en conditions physiologiques de Cl^- extracellulaire est sous la dépendance de plusieurs transporteurs responsables de l'efflux de K^+ .
- La glibenclamide étant un inhibiteur des canaux Cl^- , la sortie Cl^- -indépendante de K^+ est soit sensible à cet agent, soit sous la dépendance d'un efflux anionique, sensible à la glibenclamide, en accord avec les lois de l'électroneutralité.

4.4. Effet d'autres inhibiteurs des canaux chlore sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF.

Le SITS est un autre dérivé des stilbènes, également connu pour son effet inhibiteur sur les processus de RVD des érythrocytes de truite lorsque ceux-ci sont soumis à un choc hypotonique en présence de solutions chlore ou nitrate (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Aussi, lorsqu'une suspension de globules rouges est exposée à des conditions hypotoniques en Ringer MeSF en présence de cet agent, les processus de RVD sont inhibés de 54.9 ± 10.3 % (n=4) (**Fig. 49.** et **Tab. 6.**). En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle des globules rouges est significativement différent des valeurs obtenues en l'absence de cette drogue ($p < 0.005$), et il est alors de 30.8 ± 7.3 % (n=4) (**Tab. 6.**).

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé issu de la transformation de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) par la phospholipase A_2 ,

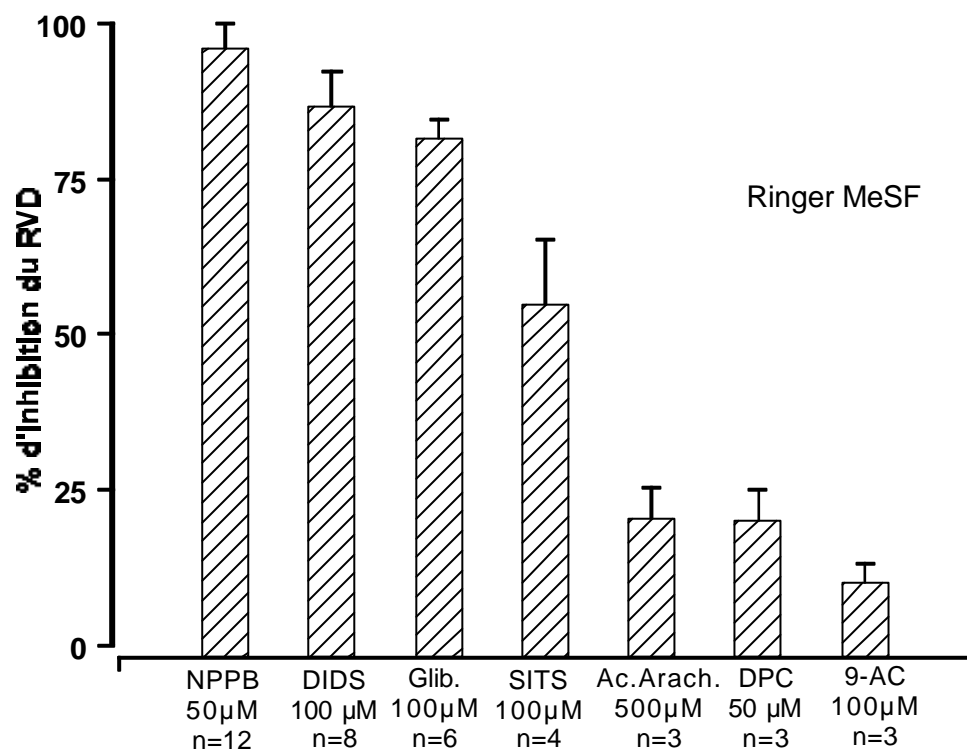


Figure 49. : Effet de différents inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹) en présence d'une solution Ringer MeSF.

Pourcentage d'inhibition du RVD, en solution Ringer MeSF, en présence de différents inhibiteurs de voies de transport anioniques membranaires. NPPB : 50 μM (n=12), DIDS : 100 μM (n=8), Glibenclamide (Glib.) : 100 μM (n=6), SITS : 100 μM (n=4), Acide arachidonique (Ac. Arach.) : 500 μM (n=3), DPC : 50 μM (n=3), 9-AC : 100 μM (n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

ou du clivage du diacylglycerol (DAG), libéré sous l'action de la phospholipase C (Force et Bonventre, 1994 ; Lambert, 1994 ; Light *et al.*, 1997). L'acide arachidonique est connu pour inhiber les courants chlore ($I_{Cl, \text{swell}}$) activés par le gonflement cellulaire (pour revue : Nilius *et al.*, 1996).

L'ajout d'acide arachidonique (500 μM) aux suspensions de globules rouges soumises à une solution Ringer MeSF hypotonique induit une diminution du pourcentage de retour au volume de contrôle isotonique ($51.9 \pm 2.7 \%$, $n=3$). Cependant, cette inhibition des processus de RVD n'est pas significative par rapport aux conditions de contrôle hypotoniques, et ne représente qu'une inhibition du RVD de $20.4 \pm 5.0 \%$, $n=3$ (**Fig. 49.** et **Tab. 6**).

Le DPC et le 9-AC sont également deux inhibiteurs des canaux Cl^- (pour revue Nilius, 1996). Ces deux composés n'affectent pas de manière significative les processus de RVD (**Fig. 49.** et **Tab. 6**). En effet, les pourcentages d'inhibition obtenus en présence de ces agents lors d'un choc hypotonique imposé en présence d'une solution MeSF sont respectivement de $20.0 \pm 4.9 \%$ ($n=3$) et $10.1 \pm 3.1 \%$, $n=3$ pour le DPC (50 μM) et le 9-AC (100 μM). L'effet du DPC observé dans ces conditions diffère de l'effet observé sur les processus de RVD en solution chlore chez le flet (Nonnotte et Truchot, 1992), ces auteurs ayant en effet observé une inhibition de 74 % des processus de RVD en présence de DPC.

En conclusion, il apparaît qu'en condition de substitution du MeSF au chlore extracellulaire, la séquence d'inhibition des processus de RVD et de la sortie de K^+ des cellules établie avec les inhibiteurs des canaux chlore est la suivante $\text{NPPB} \geq \text{DIDS} \geq \text{glibenclamide} > \text{SITS} >> \text{Acide arachidonique} \cong \text{DPC} \cong \text{9-AC}$.

- Les processus de RVD en présence d'une solution MeSF sont insensibles aux inhibiteurs des canaux Cl^- que sont le 9-AC (50 μM), le DPC(50 μM) et l'acide arachidonique (100 μM)

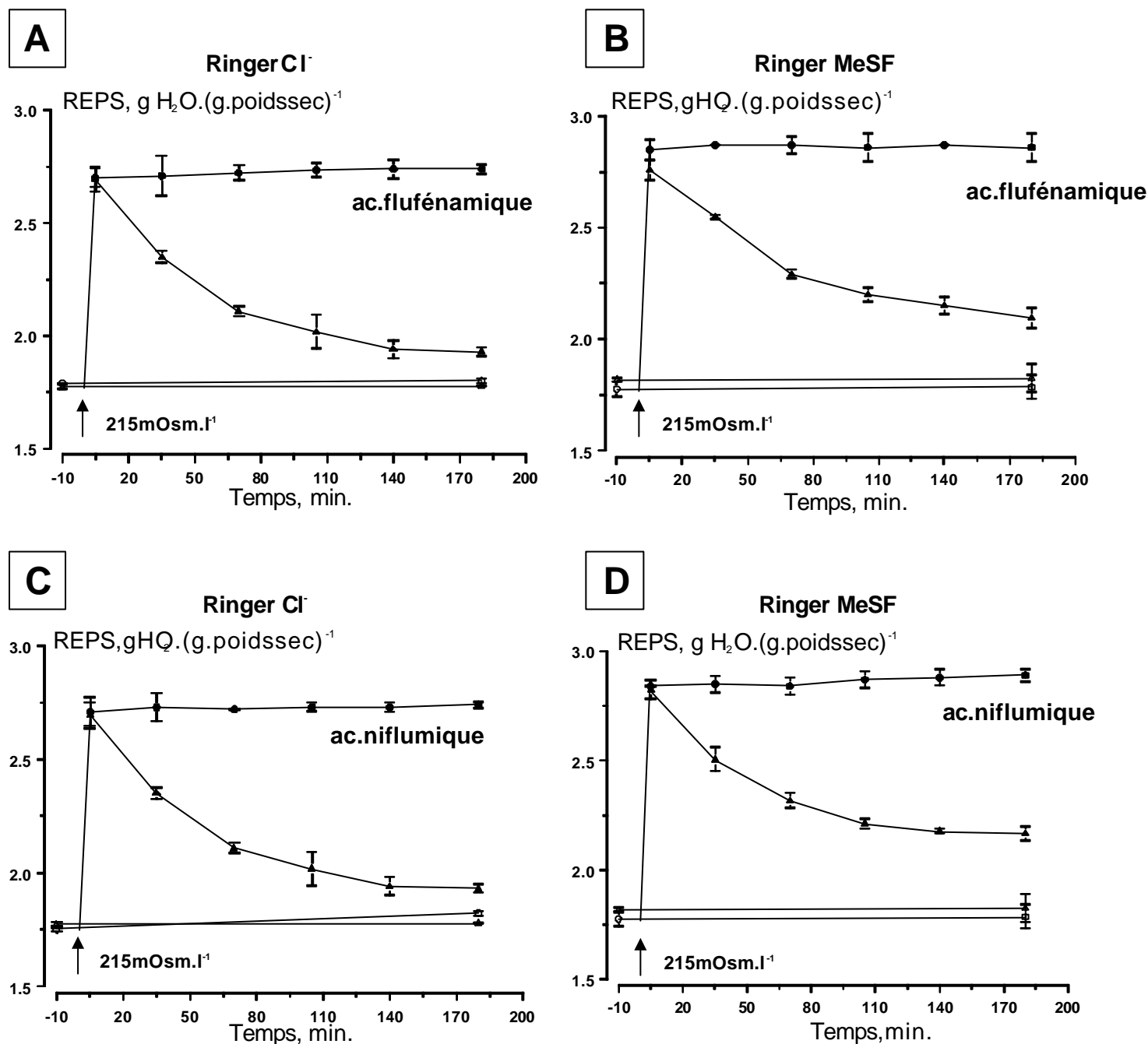


Figure 50 : Effet des inhibiteurs de la Bande 3 sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A et B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t= 0min.) en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**A** : ▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 500 µM d'acide flufénamique (**A** : ● , n=3) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**B** : ▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 500 µM d'acide flufénamique (**B** : ● , n=3). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) et Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) + 500 µM d'acide flufénamique respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

C et D : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t= 0min.) en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**C** : ▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 1 mM d'acide niflumique (**C** : ● , n=3) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**D** : ▲ , n=10) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 1 mM d'acide niflumique (**D** : ● , n=3). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**C**) ou Ringer MeSF (**D**) et Ringer Cl⁻ (**C**) ou Ringer MeSF (**D**) + 1 mM d'acide niflumique respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

5. Effet des inhibiteurs de la Bande 3 sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique.

Les inhibiteurs de la bande 3 sont de puissants inhibiteurs des processus de RVD des globules rouges exposés à une solution hypotonique (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; pour revue Lauf *et al.*, 1992,).

Aussi, les effets de différents inhibiteurs de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ont-ils été testés et comparés lorsque les cellules ont été exposées à des conditions hypotoniques en solution Ringer Cl^- et Ringer MeSF. Les effets du DIDS et du SITS ayant été précédemment commentés, ils ne seront pas développés dans cette partie.

L'acide flufénamique, l'acide niflumique et le furosémide sont des inhibiteurs puissants de la bande 3 des érythrocytes de truite (Cousin et Motais, 1976 ; Motais *et al.*, 1991 ; Cabantchik et Greger, 1992)

L'ajout d'acide flufénamique (500 μM) à la suspension de globules rouges exposée à des conditions hypotoniques en présence de Ringer Cl^- provoque une inhibition complète du RVD (**Fig. 50. A.**), comme cela avait été précédemment décrit dans la littérature (Guizouarn, 1992). Le pourcentage de retour au volume de contrôle est alors de 4.9 ± 2.1 (n=3). De plus, une inhibition comparable est observée lorsque cet agent pharmacologique est employé lors des chocs hypotoniques réalisés en présence d'une solution hypotonique MeSF (**Fig. 50. B.**). Dans ces conditions, le pourcentage de retour au volume de contrôle est de 0.0 ± 0.0 (n=3). Les effets produits par l'acide flufénamique sur l'évolution du contenu en eau des érythrocytes lors d'un gonflement osmotique ne diffèrent pas significativement selon que le milieu hypotonique contient du Cl^- ou du MeSF.

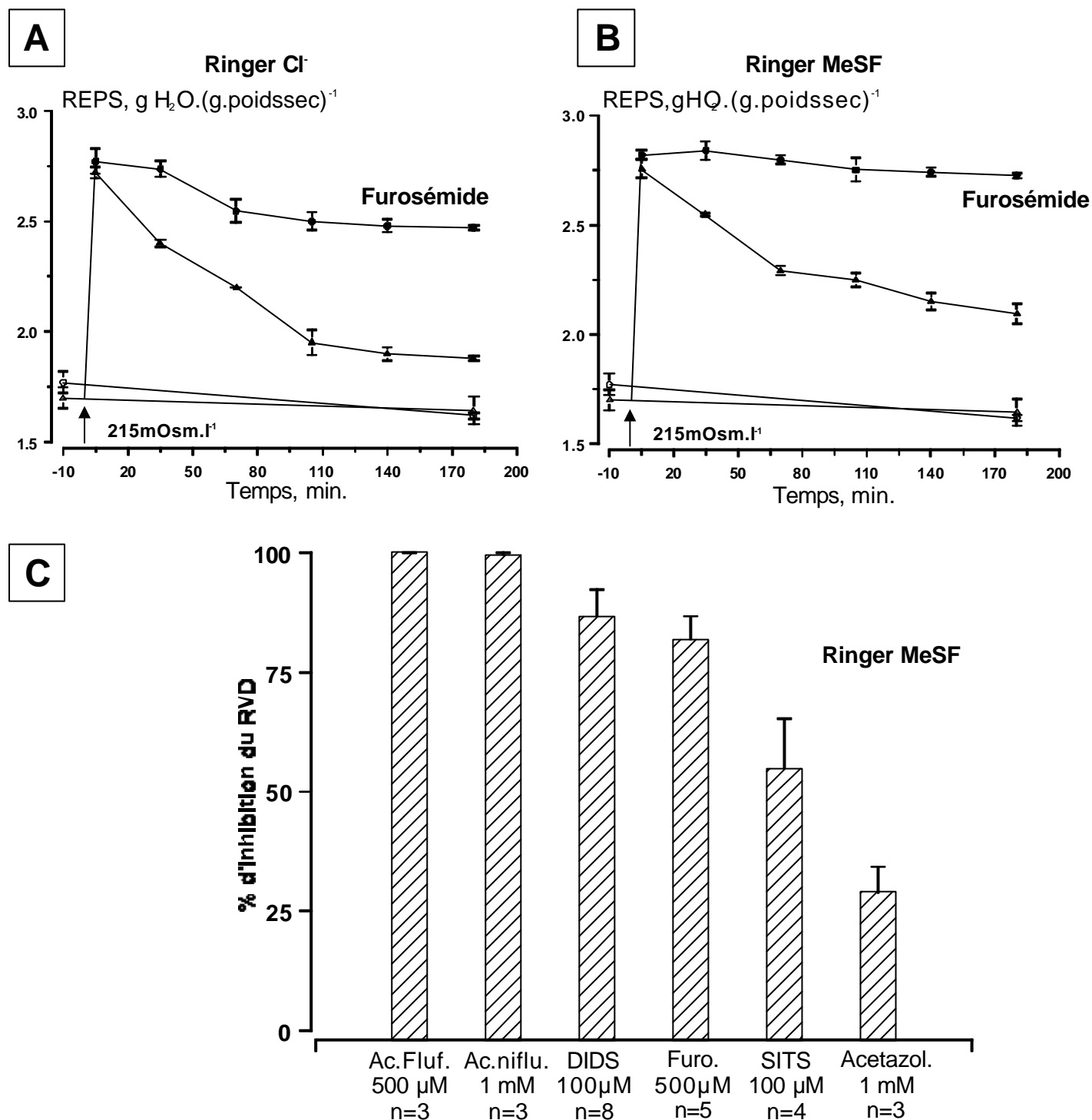


Figure 51 : Effet des inhibiteurs de la Bande 3 sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A et B : Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t= 0 min.) en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ (**A** : ▲ , n=3) ou en présence d'une solution de Ringer Cl⁻ + 500 μM furosémide (**A** : ● , n=3) et en présence d'une solution de Ringer MeSF (**B** : ▲ , n=5) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 500 μM furosémide (**B** : ● , n=5). Δ et ○ symboles des courbes contrôles en isotonie en Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) et Ringer Cl⁻ (**A**) ou Ringer MeSF (**B**) + 500 μM furosémide respectivement. Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

C : Pourcentage d'inhibition du RVD, en solution Ringer MeSF, en présence de différents inhibiteurs de la Bande 3. Acide Flufenamique (Ac. Fluf.) : 500 μM (n=3), Acide Niflumique (Ac. Niflu.) : 1 mM (n=3), DIDS : 100 μM (n=8), Furosémide (Furo.) : 500 μM (n=5), SITS : 100 μM (n=4), Acétazolamide (Acetazol.) : 1 mM (n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

Des résultats identiques sont obtenus lors des expériences conduites en présence d'acide niflumique (1 mM) (**Fig. 50. C. et 50. D.**). Les pourcentages d'inhibition du RVD et les pourcentages de retour au volume de contrôle mesurés en présence de solutions Cl⁻ et MeSF ne diffèrent pas de manière significative. Les pourcentages d'inhibition du RVD sont en effet de 94.8 ± 0.7 (n=3) et 99.4 ± 0.6 (n=3) en solutions Cl⁻ et MeSF respectivement (**Tab. 6.**).

Bien que le pourcentage d'inhibition du RVD par le furosémide (500 μ M) soit supérieur en présence d'une solution Ringer MeSF par rapport à celui mesuré en présence d'une solution Ringer Cl⁻, ces pourcentages ne diffèrent pas significativement l'un de l'autre (**Fig. 51. A et 51. B., Tab. 6.**). Les pourcentages d'inhibition du RVD sont en effet de 66.8 ± 3.4 % (n=3) en présence d'une solution Cl⁻, et de 81.8 ± 4.8 % (n=5) en présence de MeSF extracellulaire.

L'acétazolamide est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, qui, dans les conditions expérimentales utilisées ici (absence de bicarbonate dans le milieu) bloque la bande 3 de manière fonctionnelle (Guizouarn, 1992). La présence d'acétazolamide (1 mM) dans la suspension de globules rouges provoque une inhibition faible mais significative ($p < 0.05$) du retour au contenu en eau de contrôle des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF. Le pourcentage de retour au volume normal des cellules est dans ces conditions de 56.7 ± 4.3 % (n=3, **Tab. 6.**), ce qui représente un pourcentage d'inhibition du processus de RVD de 29.0 ± 5.3 % (n=3), comme le montre la **figure 51. B.**

Ces différentes expériences conduites en présence des antagonistes de l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ montrent qu'ils constituent une puissante famille d'agents inhibiteurs des processus de RVD, tant en présence de Ringer Cl⁻ qu'en présence de Ringer MeSF. Toutefois, compte tenu de la cible principale de ces agents, la question demeure de savoir si

	Ringer Cl			Ringer MeSF		
	% inh	% retour	n	% inh	% retour	n
<i>Effet d'un choc osmotique</i>	-	90.4 ± 3.4	31	-	67.7 ± 1.5	108
<i>Effet des inhibiteurs des transporteurs anioniques</i>						
NPPB, 50 µM	58.0 ± 5.0	36.5 ± 4.5 ^{*****}	6	96.0 ± 3.9 ^{*****}	1.1 ± 1.1 ^{*****}	12
DIDS, 100 µM	75.3 ± 13.7	14.7 ± 9.3 ^{*****}	6	86.6 ± 5.7 ^{ns}	8.5 ± 2.6 ^{*****}	8
Glibenclamide, 100 µM	35.9 ± 4.3	54.4 ± 4.7 ^{****}	6	81.5 ± 3.0 ^{*****}	12.3 ± 2.2 ^{*****}	6
Ac. Flufénamique, 500 µM	93.6 ± 2.6	4.9 ± 2.1 ^{*****}	3	100.0 ± 0.0 ^{ns}	0.0 ± 0.0 ^{*****}	3
Ac. Niflumique, 1 mM	94.8 ± 0.7	4.1 ± 0.7 ^{*****}	3	99.4 ± 0.6 ^{ns}	0.1 ± 0.1 ^{*****}	3
DPC, 50 µM	-	-		20.0 ± 4.9	55.5 ± 0.9 ^{ns}	3
9-AC, 100 µM	-	-		10.1 ± 3.1	59.3 ± 2.7 ^{ns}	3
Furosemide, 500 µM	66.8 ± 3.4	15.1 ± 6.0 ^{*****}	3	81.8 ± 4.87 ^{ns}	12.1 ± 2.2 ^{*****}	5
Ac. Arachidonique, 500 µM	-	-		20.4 ± 5.0	51.9 ± 2.7 ^{ns}	3
SITS, 100 µM	-	-		54.9 ± 10.3	30.8 ± 7.3	4
Acétazolamide, 1 mM	-	-		29.0 ± 5.3	56.7 ± 4.3 [*]	3

Tableau 6. : Pourcentage de retour (% retour) au volume de contrôle suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de solutions Ringer Cl⁻ ou Ringer MeSF en présence de différents inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées par rapport au contrôle à l'aide du test t de Student.

(*****) p<<0.0001, (****) p<0.0001, (***) p<0.005, (ns) non significatif.

Pourcentage d'inhibition du RVD (%inh) suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de différents inhibiteurs des transporteurs anioniques membranaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les résultats obtenus en solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF à l'aide du test t de Student.

(*****) p<<0.0001, (****) p<0.0001, (*) p<0.05, (ns) non significatif.

ces bloqueurs agissent par une action directe sur un transporteur impliqué dans les processus de régulation de volume ou si ces molécules agissent sur une protéine comme la bande 3, qui pourrait alors jouer le rôle de régulateur membranaire de ces processus. Toutefois, la similarité des effets obtenus en solution Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF suggère que l'action prépondérante de ces inhibiteurs se situerait au niveau de la Bande 3.

- Les processus de RVD sont sensibles aux inhibiteurs de la bande 3 (DIDS, SITS, acide flufénamique, acide niflumique, furosémide et acétazolamide).
- Les sorties Cl⁻-dépendante et Cl⁻-indépendante de K⁺ et d'eau osmotiquement liée semblent donc régulées par cette protéine membranaire.

6. Effet des antagonistes de la messagerie calcique (ou du complexe Ca²⁺-calmoduline) sur les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique en présence d'une solution de Ringer MeSF.

Dans de nombreux types cellulaires, les mécanismes impliqués dans le RVD dépendent du calcium intracellulaire (pour revue Foskett, 1994 ; Pierce et Politis, 1990 ; Hoffmann et Dunham, 1995). Toutefois, les processus de régulation de volume des érythrocytes ne semblent pas impliquer de régulation par le métabolisme du calcium, sauf exception. En effet, l'activation par le gonflement de l'échangeur K⁺/H⁺ des érythrocytes de la salamandre *Amphiuma sp.* a pu être décrite comme dépendant de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (Cala *et al.*, 1986). De plus, Bergeron et ses collaborateurs (1996) ont récemment montré chez une autre espèce de salamandre (*Necturus maculosus*), d'une part que la régulation de volume procédait par activation de voies de conductance potassiques

	Ringer Cl			Ringer MeSF		
	% inh	% retour	n	% inh	% retour	n
<i>Effet d'un choc osmotique</i>						
	-	90.4 ± 3.4	31	-	67.7 ± 1.5	108
<i>Effet des antagonistes du Ca²⁺ et du complexe Ca²⁺-camoduline</i>						
Gadolinium, 20 µM	-	-		28.6 ± 11.0	49.9 ± 7.7 ^{ns}	5
Gadolinium, 500 µM	-	-		32.2 ± 4.5	47.1 ± 3.2 ^{***}	2
Nifédipine, 100 µM	-	-		7.9 ± 3.6	56.1 ± 1.6 ^{ns}	3
Pimozide, 10 µM	-	-		23.8 ± 7.2	45.1 ± 6.4 ^{ns}	5
TMB-8, 10 µM	-	-		1.0 ± 0.9	66.2 ± 2.9 ^{ns}	3
TFP, 50 µM	-	-		0.0 ± 0.0	67.2 ± 0.7 ^{ns}	3
W-7	-	-		0.0 ± 0.0	73.1 ± 5.4 ^{ns}	3
<i>Effet des inhibiteurs du métabolisme des éicosanoïdes</i>						
ETYA, 100 µM	-	-		60.5 ± 3.2	21.6 ± 2.4 ^{*****}	6
Indométhacine, 10 µM	-	-		23.5 ± 10.5	57.6 ± 7.0 ^{ns}	4
NDGA, 10 µM	-	-		21.2 ± 8.0	58.2 ± 6.6 ^{ns}	3
Quinacrine, 10 µM	-	-		12.2 ± 1.8	63.8 ± 0.9 ^{ns}	2
<i>Effet des inhibiteurs ou des activateurs des protéines kinases</i>						
Chélérythrine, 65 µM	-	-		77.8 ± 4.6	10.6 ± 3.1 ^{*****}	6
Staurosporine, 40 µM	-	-		4.1 ± 1.7	63.5 ± 1.5 ^{ns}	3
Génistein, 30 µM	-	-		23.9 ± 4.6	40.2 ± 7.9 ^{ns}	3
NEM, 2 mM	56.1 ± 2.2	34.4 ± 2.0 ^{****}	5	83.3 ± 6.1 ^{****}	17.8 ± 4.1 ^{*****}	10
PMA, 13 µM	-	-		6.3 ± 3.0	65.8 ± 2.3 ^{ns}	3

Tableau 7. : Pourcentage de retour (% retour) au volume de contrôle suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de solutions Ringer Cl ou Ringer MeSF en présence de différents inhibiteurs des voies métaboliques intracellulaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées par rapport au contrôle à l'aide du test t de Student.

(*****) p<<0.0001, (****) p<0.0001, (***) p<0.005, (ns) non significatif.

Pourcentage d'inhibition du RVD (% inh) suite à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹) en présence de différents inhibiteurs des voies métaboliques intracellulaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM et les comparaisons des moyennes sont effectuées entre les résultats obtenus en solution Ringer Cl et Ringer MeSF à l'aide du test t de Student.

(*****) p<<0.0001, (****) p<0.0001, (***) p<0.005, (ns) non significatif.

dépendant non seulement de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , mais aussi du complexe Ca^{2+} -calmoduline, et d'autre part que l'influx de Ca^{2+} nécessaire à l'activation de cette voie de conductance potassique était inhibé par le Gd^{3+} . De plus, sans toutefois avoir été encore formellement identifiée, une part non négligeable des efflux potassiques déclenchés lors des processus de RVD dans le globule rouge d'anguille est sensible aux inhibiteurs du complexe Ca^{2+} -calmoduline (Bursell et Kirk, 1996). Par ailleurs, les enregistrements par la technique de « patch-clamp » de l'activité des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes de truite en conditions isotoniques réalisés dans cette étude ont démontré l'existence d'un canal cationique non sélectif sensible au Gd^{3+} . Cependant, les précédentes études menées sur les processus de RVD dans l'érythrocyte de truite en solution Ringer Cl^- ou NO_3^- démontrent l'absence d'un quelconque rôle du Ca^{2+} (Garcia-Romeu *et al.*, 1991).

Aussi, afin de déterminer quel pouvait être le rôle joué par le Ca^{2+} dans les processus de RVD déclenchés par un gonflement osmotique en présence d'une solution MeSF, différents antagonistes de la messagerie calcique ou du complexe Ca^{2+} -calmoduline ont été utilisés.

Utilisé à la concentration de 20 μM , le Gd^{3+} a été décrit lors des expériences conduites à l'aide de la technique du « patch-clamp » comme un inhibiteur potentiel du canal cationique non sélectif (CNS) de la membrane des érythrocytes de truite (Chap. 1). Cependant, le suivi de l'évolution du contenu en eau des cellules soumises à un choc hypotonique, en présence d'une solution MeSF contenant du gadolinium à la même concentration de 20 μM (**Fig. 52. B.**), montre que cet ion provoque une inhibition des processus de RVD de $28.6 \pm 11.0 \%$ ($n=5$). La comparaison des pourcentages de retour au volume de contrôle en présence de gadolinium et en l'absence de cette drogue montre que l'effet du gadolinium sur la restauration du volume cellulaire est non significatif à cette concentration (**Tab. 7.**), ce qui peut avoir plusieurs origines. En effet, d'une part, les

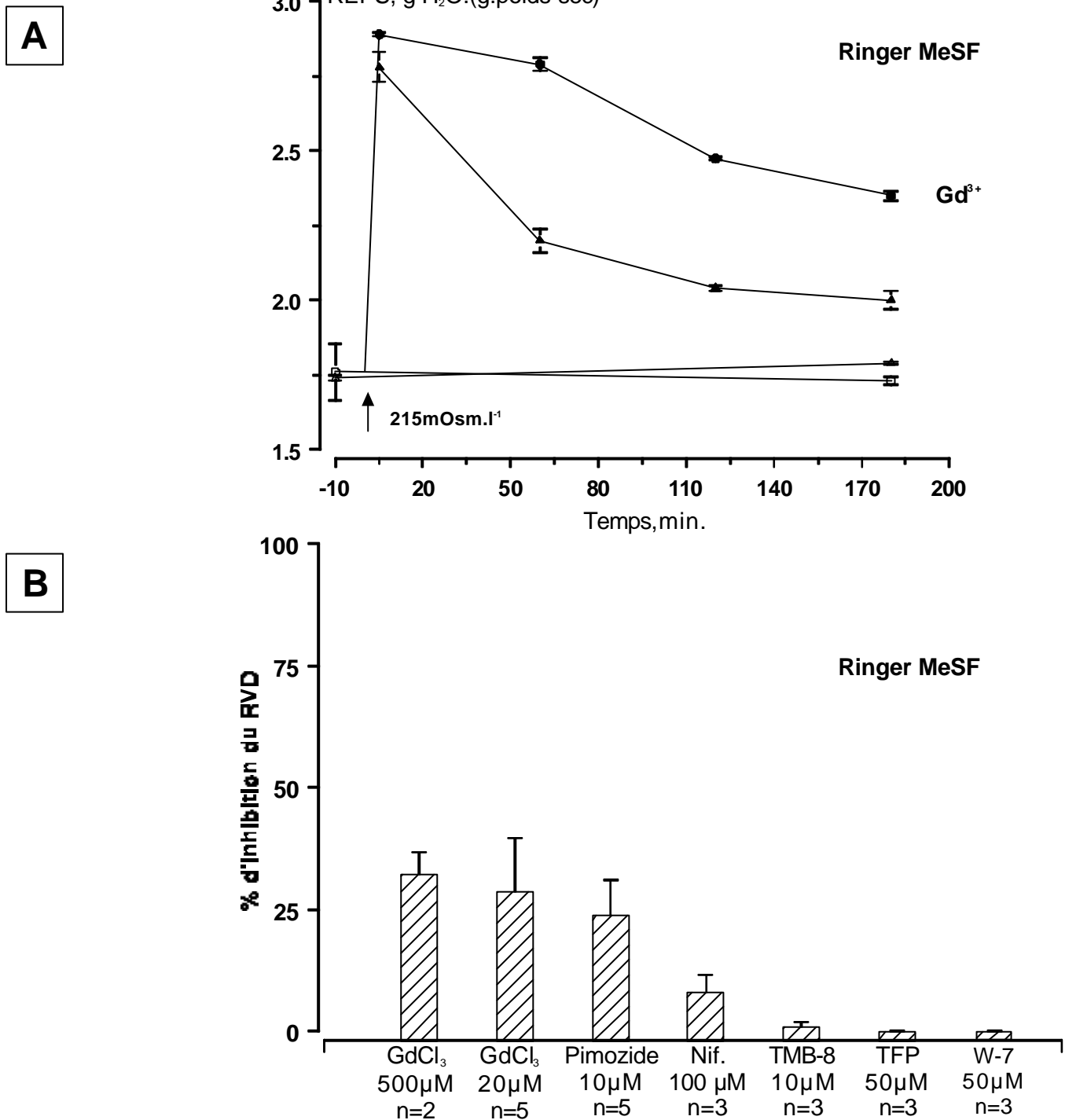


Figure 52. : Effet des antagonistes du Ca²⁺ ou du complexe Ca²⁺-calmoduline sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A: Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t=0 min.) en présence d'une solution Ringer MeSF (▲ , n=2) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 500 μM Gd³⁺ (● , n=2). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=2) et Ringer MeSF isotonique + 500 μM Gd³⁺ (○ , n=2). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 2 expériences.

B : Pourcentage d'inhibition du RVD, en présence d'une solution Ringer MeSF, en présence de différents antagonistes du Ca²⁺ ou du complexe Ca²⁺-calmoduline. Gadolinium (GdCl₃) : 500 μM (n=2), Gadolinium (GdCl₃) : 20 μM (n=5), Pimozide : 10 μM (n=5), Nifédipine (Nif.) : 100 μM (n=3), TMB-8 : 10 μM (n=3), TFP : 50 μM (n=3), W-7 : 50 μM (n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

différentes expériences ont montré une grande variabilité des pourcentages d'inhibition obtenus et d'autre part, l'inhibition observée sur le canal CNS est une inhibition dépendant du voltage

L'utilisation de concentrations plus élevées de gadolinium (500 μM) a permis de mettre en évidence l'inhibition d'une voie de sortie de potassium activée lors d'un choc osmotique dans les cellules de rein d'amphibien en culture (lignée A6) (DeSmet *et al.*, 1998). Aussi, des concentrations plus fortes de cet ions ont-elles été utilisées.

L'exposition d'une suspension de globules rouges à des conditions hypotoniques en présence de Gd^{3+} (500 μM) provoque une inhibition similaire $32.2 \pm 4.5 \%$ ($n=2$) à celle observée à la concentration de 20 μM (**Fig. 52. A.**, **52. B.** et **Tab. 7.**). Cette inhibition des processus de RVD est significative ($p<0.005$), contrairement à celle obtenue en présence de 20 μM . En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle est alors de $47.1 \pm 3.2 \%$ ($n=2$), et la significativité de la différence observée avec les contrôles hypotoniques est vraisemblablement imputable à la diminution de la variabilité des pourcentages d'inhibition obtenus.

En revanche, la nifédipine (100 μM), inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Hosey et Ladzunski, 1988) ne provoque aucune inhibition significative du retour au volume des cellules mesuré en conditions isotoniques, après un choc hypotonique, en présence de Ringer MeSF (**Fig. 52. B** et **Tab. 7.**).

L'utilisation de TMB-8, inhibiteur de la libération des stocks calciques intracellulaires (McCarty et O'Neil, 1991) n'induit aucune modification significative des processus de RVD lorsque les cellules sont soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF contenant cet agoniste (**Fig. 52. B.** et **Tab. 7.**).

Le complexe Ca^{2+} -calmoduline peut également représenter une voie de régulation des processus de RVD impliquant le calcium intracellulaire (pour revue Hoffmann et Dunham, 1995).

L'exposition des suspensions de globules rouges à des conditions hypotoniques (MeSF) en présence de TFP (trifluopérazine, 50 μ M), inhibiteur spécifique de ce complexe Ca^{2+} -calmoduline (Foskett et Spring, 1985), montre que cet agent est sans effet significatif sur le retour au volume de contrôle des érythrocytes (**Fig. 52. B.** et **Tab. 7.**).

Contrairement à ce qui a pu être observé pour l'érythrocyte d'anguille (Bursell et Kirk, 1996) le W-7, un inhibiteur du complexe Ca^{2+} -calmoduline, ne provoque aucune modification du retour au volume de contrôle des érythrocytes (**Fig. 52. B.** et **Tab. 7.**).

Le pimozide (10 μ M) est également décrit comme un inhibiteur spécifique de ce complexe Ca^{2+} -calmoduline (Hoffmann et Dunham, 1995 ; Bergeron *et al.*, 1996). Il provoque une inhibition du RVD de 23.8 ± 7.2 % ($n=5$) lorsque les globules rouges sont soumis à des conditions hypotoniques (MeSF). Toutefois, ce pourcentage d'inhibition est non significatif (**Fig. 52. B.** et **Tab. 7.**).

Ces résultats tendent à démontrer que le calcium intracellulaire et le complexe Ca^{2+} -calmoduline ne participent pas à la mise en place des processus de régulation du volume des érythrocytes de truite exposés à des conditions hypotoniques (MeSF).

- Les processus de RVD en présence de conditions hypotoniques en milieu MeSF ne sont pas sous la dépendance du métabolisme calcique intracellulaire ni du complexe Ca^{2+} -calmoduline.
- A forte concentration (500 μ M) le Gd^{3+} diminue la régulation de volume cellulaire vraisemblablement par un blocage du transporteur responsable de l'efflux potassique.

7. Effet des antagonistes du métabolisme des éicosanoïdes sur les processus de RVD induits par un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF.

L'implication des éicosanoïdes, tels que les leucotriènes D_4 (LTD_4) et les prostaglandines E_2 (PGE_2) dans les processus de régulation du volume lors d'un choc hypotonique a été établie dans divers types cellulaires tels que les cellules tumorales d'Ehrlich (pour revue : Hoffmann et Dunham, 1995) ou les globules rouges de salamandre (Light *et al.*, 1997).

Les leucotriènes et les prostaglandines sont des éicosanoïdes issus du métabolisme de l'acide arachidonique, qui est libéré à partir des lipides membranaires, selon deux voies de synthèse principales. L'acide arachidonique peut être issu de la transformation de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) par la phospholipase A_2 , ou du clivage du diacylglycerol (DAG) (Force et Bonventre, 1994 ; Light *et al.*, 1997).

Le blocage de la production d'acide arachidonique par la phospholipase A_2 en présence de quinacrine (10 μM), un inhibiteur spécifique de cette enzyme, n'induit pas de modification significative du retour au volume de contrôle des cellules soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF (**Fig. 53. B.**). Ce résultat diffère de ce qui est observé dans les cellules tumorales d'Ehrlich (Lambert et Hoffmann, 1994) ou dans les érythrocytes de salamandre (Light *et al.*, 1997), lorsque les cellules sont soumises à des conditions hypotoniques en présence de cet agoniste de la phospholipase A_2 .

Deux voies distinctes du métabolisme des éicosanoïdes aboutissent à la formation des prostaglandines ou des leucotriènes. La voie de la cyclo-oxygénase catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine, et la voie de la 5-lipooxygénase, en insérant un atome d'oxygène sur le carbone 5 de l'acide arachidonique, permet la synthèse des leucotriènes.

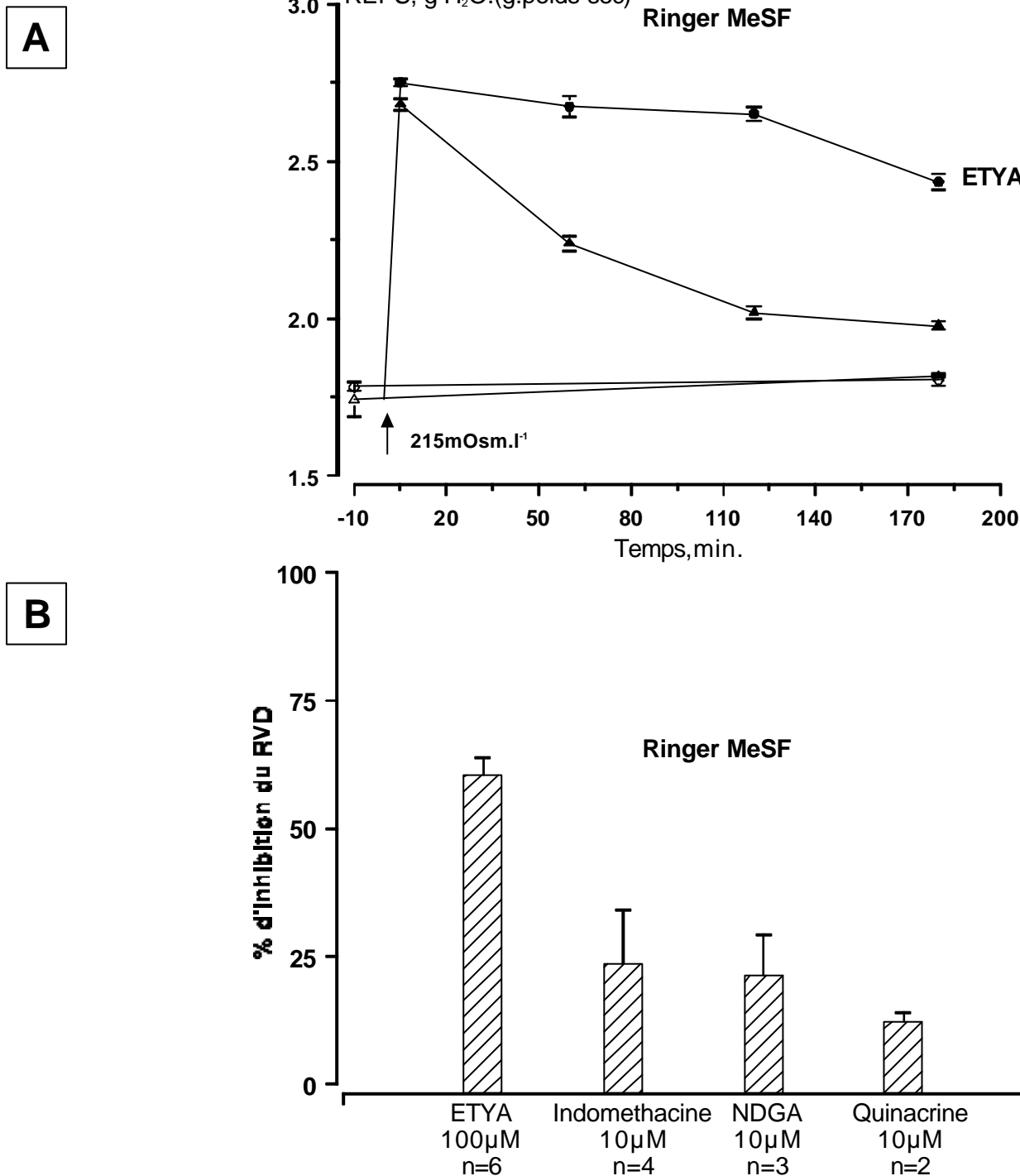


Figure 53. : Effet des antagonistes du métabolisme des éicosanoïdes sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A: Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t=0 min.) en présence d'une solution Ringer MeSF (▲, n=6) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 100 μM ETYA (●, n=6). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=6) et Ringer MeSF isotonique + 100 μM ETYA (○, n=6). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 6 expériences.

B : Pourcentage d'inhibition du RVD, en solution Ringer MeSF, en présence de différents antagonistes du métabolisme des éicosanoïdes. ETYA: 100 μM (n=6), Indométhacine : 10 μM (n=4), NDGA : 10 μM (n=3), Quinacrine : 10 μM (n=2). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de n expériences.

L'ETYA, un inhibiteur commun de ces deux enzymes (cyclo-oxygénase et 5-lipooxygénase) provoque une diminution significative du retour au volume de contrôle des érythrocytes soumis à un choc hypotonique en présence d'un milieu MeSF (**Fig. 53. A.**, **53. B.** et **Tab. 7.**). En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle des globules est de $21.6 \pm 2.4 \%$ ($n=6$, $p < 0.0001$), ce qui représente un pourcentage d'inhibition des processus de RVD de $60.5 \pm 3.2 \%$ ($n=6$). Ce résultat est tout à fait comparable à celui obtenu sur les érythrocytes de salamandre (Light *et al.*, 1997). Cependant, l'ETYA est un inhibiteur non spécifique, comme cela a été précisé précédemment. Aussi des inhibiteurs plus spécifiques de l'une ou l'autre des voies de synthèse des prostaglandines ou des leucotriènes ont été testés.

En inhibant la cyclo-oxygénase, l'indométhacine bloque la synthèse des prostaglandines (Lambert et Hoffmann 1994 ; Light *et al.*, 1997). L'addition d'indométhacine ($10 \mu\text{M}$) à la suspension de globules rouges exposée à des conditions hypotoniques (Ringer MeSF) ne provoque aucune modification du retour au volume de contrôle isotonique (**Fig. 53. B.**). Ces expériences suggèrent donc que dans l'érythrocyte de truite, les processus de RVD ne sont pas sous la dépendance de la synthèse des prostaglandines. Contrairement à ce qui a été décrit pour les érythrocytes de salamandre (Light *et al.*, 1997), l'inhibition de la synthèse des leucotriènes par le NDGA ($10 \mu\text{M}$), un inhibiteur spécifique de la 5-lipo-oxygénase, ne produit pas d'effet significatif sur la régulation de volume des globules rouges soumis à un choc hypotonique en présence d'une solution MeSF (**Fig. 53. B.** et **Tab. 7.**). Ce dernier résultat tend à suggérer que les effets de l'ETYA observés lors de cette étude proviendraient de l'interaction avec une autre voie métabolique, ou que la synthèse des LTD_4 ou des PGE_2 ne serait pas strictement nécessaire aux processus de RVD.

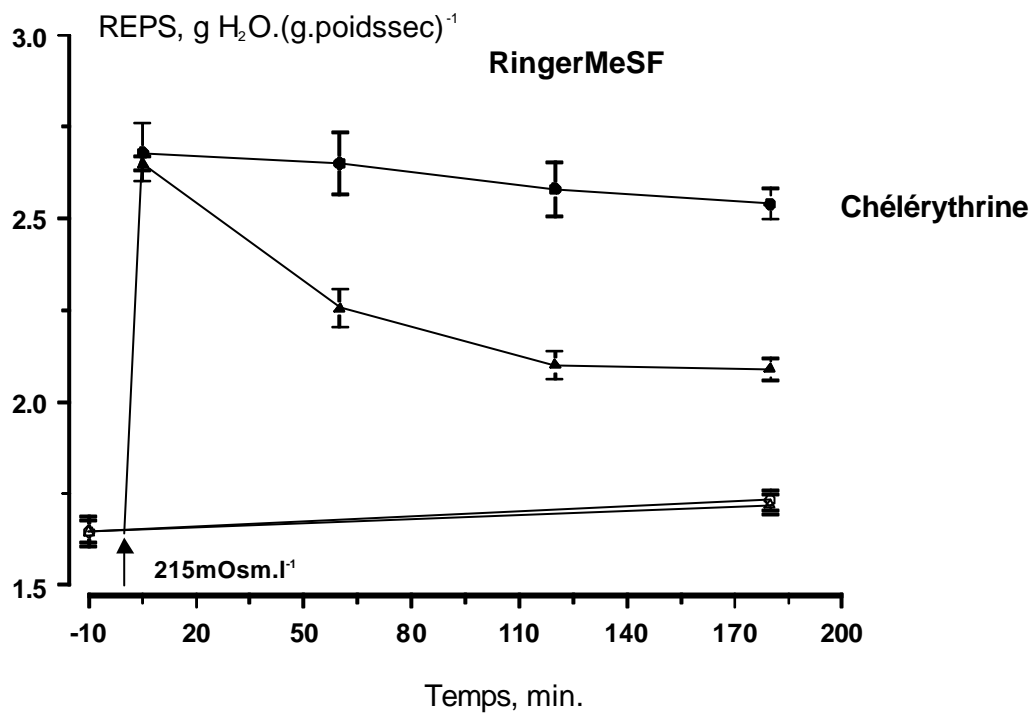
- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Les processus de régulation de volume de l'érythrocyte de truite ne sont pas sous la dépendance du métabolisme des éicosanoïdes. |
|--|

8. Effet des inhibiteurs des protéines kinases sur les processus de RVD induits par un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF.

Les études précédentes sur la régulation des transporteurs membranaires des érythrocytes de truite et de mammifères ont montré la dépendance de leur régulation vis-à-vis des protéines phosphatases et kinases (pour revue Parker, 1993 ; Cossins et Gibson, 1997). En effet, les inhibiteurs des protéines phosphatases agissant au niveau des résidus sérines/thréonines tels que l'acide okadaï que ou la calyculine A se sont récemment révélés être de puissants inhibiteurs du cotransport KCl (c'est-à-dire la voie de flux de K^+ -Cl⁻ dépendante), notamment dans les érythrocytes humains (Kaji et Tsukitani, 1991), de lapin (Jennings et Schulz, 1991) ou de truite (Cossins *et al.*, 1994). Or, les kinases et les phosphatases inhibent des réactions opposées sur des résidus spécifiques. Ceci a conduit à rechercher un inhibiteur des protéines kinases capable de modifier l'activité du cotransport KCl. Bize et Dunham (1994) et Cossins *et al.* (1994) ont démontré dans les érythrocytes humains pour les premiers et dans les érythrocytes de truite pour les seconds, que le blocage des protéines kinases par la staurosporine provoque l'activation du cotransport KCl en isotonie. De plus, alors que la calyculine A inhibe les flux de potassium Cl⁻-dépendants activés par l'oxygénation *per se* à des concentrations sub-nanomolaires, elle ne modifie pas les flux de potassium Cl⁻-indépendants activés par un choc hypotonique (en solution NO₃⁻ ou MeSF) chez la truite, même à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Cossins *et al.*, 1994 ; Berenbrink *et al.*, 1997).

Aussi, il convenait de déterminer si les processus de RVD activés par un choc hypotonique impliquant la voie de sortie Cl⁻-indépendante de K^+ pouvaient être sous la dépendance d'une phosphorylation par une protéine kinase.

A



B

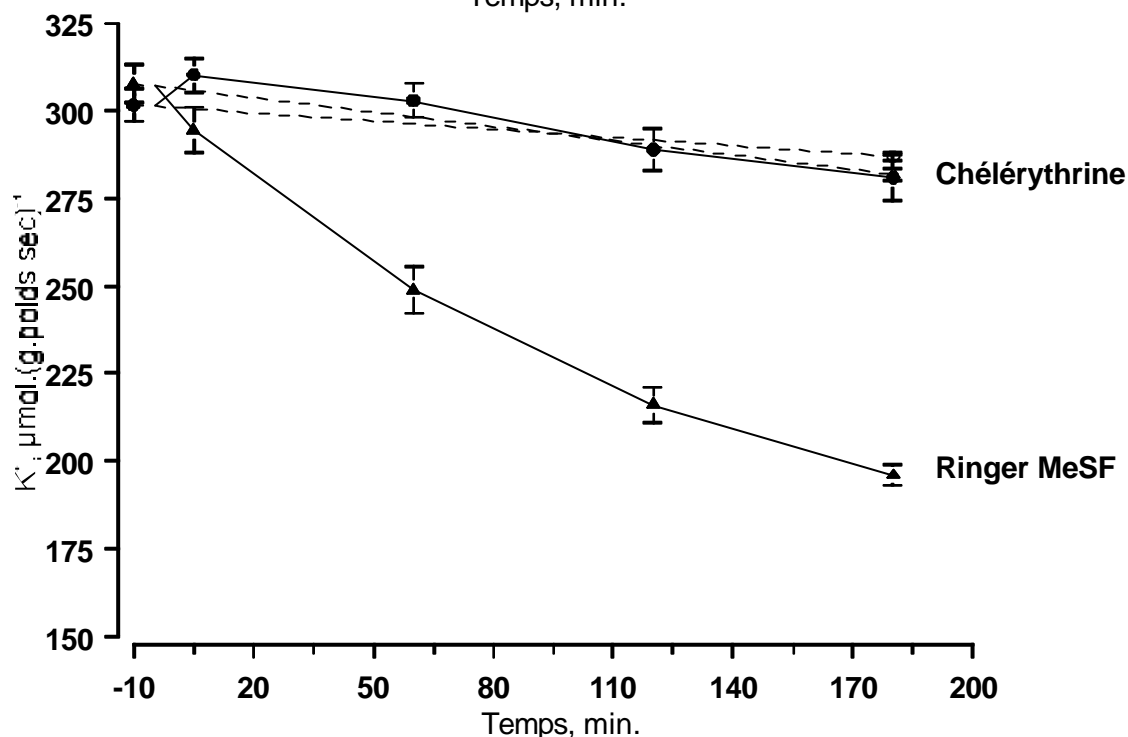


Figure 54. : Effet d'un inhibiteur des protéines kinases sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l⁻¹).

A: Evolution du contenu en eau des érythrocytes soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹, à t=0 min.) en présence d'une solution Ringer MeSF (▲, n=6) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 65 μM Chélérythrine (●, n=6). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=6) et Ringer MeSF isotonique + 65 μM Chélérythrine (○, n=6). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 6 expériences.

B : Evolution du contenu en potassium des érythrocytes soumis à un choc hypotonique, à t=0 min. en présence d'une solution de Ringer MeSF (▲, n=3) ou en présence d'une solution de Ringer MeSF + 65 μM Chélérythrine (●, n=3). Ringer MeSF isotonique (Δ, n=3) et Ringer MeSF isotonique + 65 μM Chélérythrine (○, n=3). Les valeurs sont la moyenne ± SEM de 3 expériences.

La chélérythrine, un inhibiteur spécifique des protéines kinases C, provoque également une activation forte et progressive de la voie Cl⁻-dépendante de K⁺ en isotonie. Cette activation du flux de potassium est alors plus importante que celle obtenue par oxygénation lorsque des concentrations de 65 µM de cette drogue sont utilisées (Cossins *et al.*, 1994). Aussi les effets de l'ajout chélérythrine (65 µM) aux suspensions de globules rouges exposées à une solution MeSF hypotonique ont été testés. Cet inhibiteur des protéines kinases induit une forte inhibition des processus de RVD (**Fig. 54. A., Tab. 7.**). En effet, le pourcentage de retour au volume de contrôle en présence de chélérythrine n'est plus que de $10.6 \pm 3.1 \%$ (n=6). Cette valeur est significativement différente du pourcentage de retour au volume de contrôle des lots de cellules soumises à un choc hypotonique en l'absence de cette drogue ($p < 0.0001$), et représente un pourcentage d'inhibition du RVD de $77.8 \pm 4.6 \%$ (n=6).

L'évolution du contenu en potassium des cellules, lorsque celles-ci sont soumises à des conditions hypotoniques en présence d'une solution MeSF contenant de la chélérythrine (65 µM), montre que cet agent provoque une inhibition importante de l'efflux de potassium activé par le gonflement cellulaire (**Fig. 54. B.**). En effet, la variation du contenu en potassium des cellules est significativement inférieure à celle obtenue pour les cellules contrôle. Cette variation du contenu en potassium n'est alors que de $8.50 \pm 3.75 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=3) ($\Delta K^+ = 106.7 \pm 4.2 \mu\text{mol. (g. poids sec)}^{-1}$ (n=3), hypotonie sans drogue, $p < 0.0001$).

En revanche, le genistein, un autre inhibiteur des protéines kinases agissant sur les résidus tyrosines (Akiyama *et al.*, 1987 ; Weaver et Cossins, 1996) utilisé à la concentration de 30 µM ne provoque qu'une faible inhibition non significative des processus de RVD. En effet, le pourcentage de retour au volume normal est alors de $39.5 \pm 7.8 \%$ (n=3), ce qui représente un pourcentage d'inhibition du RVD de $23.9 \pm 4.6 \%$ (n=3) (**Fig. 55. et Tab. 7.**).

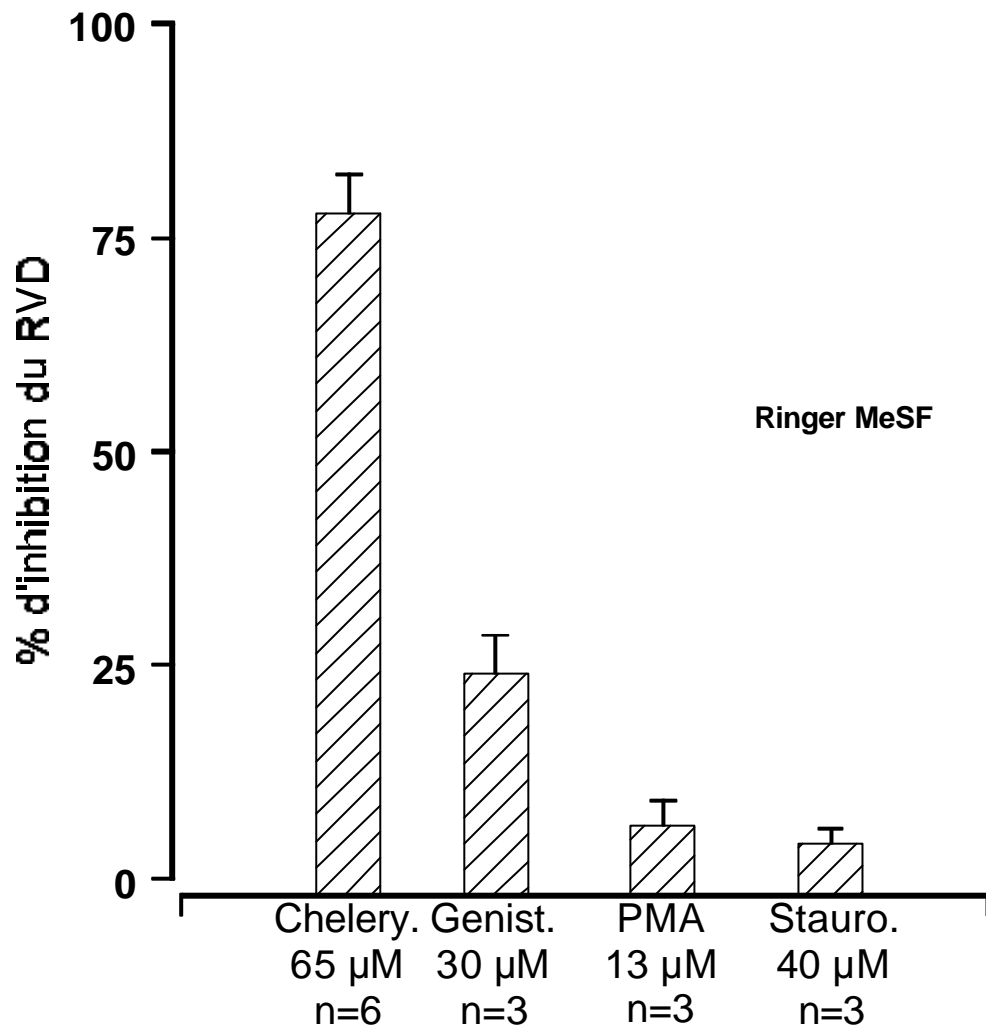


Figure 55. : Effet de différents inhibiteurs ou activateurs des protéines kinases sur la régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique (215 mOsm.l^{-1}) en présence de solutions Ringer Cl^- ou Ringer MeSF.

Pourcentage d'inhibition du RVD, en milieu Ringer MeSF, en présence de différents inhibiteurs ou activateurs des protéines kinases. Chélerythrine (Chelery.) : 65 µM ($n=6$), Génistein (Genist.) : 30 µM ($n=3$), PMA : 13 µM ($n=3$), Staurosporine (Stauro.) : 40 µM ($n=3$). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de n expériences.

De la même manière, l'activateur du cotransport KCl que représente la staurosporine (40 μM) ne modifie pas de manière significative le retour au volume de contrôle mesuré en isotonie lorsque les érythrocytes sont soumis à des conditions hypotoniques en présence d'une solution Ringer MeSF (**Fig. 55.**) Le PMA (13 μM), un activateur des protéines kinases C, ne produit pas d'inhibition ou d'activation des processus de RVD (**Fig. 55.** et **Tab. 7.**)

- Les efflux Cl^- -indépendant de K^+ et d'eau osmotiquement liée semblent être sous la dépendance d'un processus de phosphorylation d'un transporteur ou d'une protéine par une protéine kinase C.

Discussion

Comme cela a été précédemment décrit dans la littérature (Garcia-Romeu *et al.*, 1991), lorsque les érythrocytes de truites sont soumis à un choc hypotonique (215 mOsm.l⁻¹), leur contenu en eau est subitement augmenté ($t < 5$ min.), puis se mettent en place des processus de retour du volume cellulaire à des valeurs qui tendent vers celles mesurées à l'isotonie.

En effet, placés dans des conditions hypotoniques, les érythrocytes de la majorité des vertébrés démontrent une remarquable capacité à réguler leur volume cellulaire (pour revue : Cossins et Gibson, 1997). Les érythrocytes de téléostéens se sont révélés être des modèles importants pour l'étude des différents aspects de la régulation du volume cellulaire. L'exposition des érythrocytes de différentes espèces de poisson à des conditions hypotoniques a montré que la régulation du volume cellulaire induite par un gonflement hypotonique (RVD : Regulatory Volume Decrease) résultait d'une perte de KCl (Lauf, 1982 ; Bourne et Cossins, 1984 ; Dickman et Goldstein, 1990, Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Jensen, 1995 ; Bursell et Kirk, 1996) ainsi que d'une perte d'acides aminés tels que la taurine (Fincham *et al.*, 1987 ; Golstein et Brill, 1991 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Thoared et Fugelli, 1994 ; Lewis *et al.*, 1996).

L'existence d'un cotransport KCl activé par le gonflement cellulaire, caractérisé par un très haut degré de sélectivité, a été mise en évidence chez les mammifères (pour revue : Lauf *et al.*, 1992 ; Cossins et Gibson, 1997). Ce cotransport KCl peut transporter le K⁺ mais non le Na⁺, transporte le Cl⁻ et le Br⁻ mais se révèle très sélectif vis-à-vis de NO₃⁻ et de I⁻ (Ellory et Hall, 1988 ; Lauf, 1988). A l'isotonie, il est en outre susceptible d'être activé par le N-éthylmaleimide (NEM), un réactif des résidus sulfhydryl, (Lauf *et al.*, 1992). L'existence d'un tel cotransport KCl, présentant les mêmes caractéristiques de sélectivité vis-à-vis du NO₃⁻ et d'activation par le NEM a été également démontrée dans les érythrocytes de téléostéens (Borgese *et al.*, 1987 ; Bourne et Cossins, 1984 ; Bursell et Kirk, 1996). Cependant,

contrairement aux expériences menées sur les érythrocytes de mammifères, les processus de RVD mis en place à la suite d'un choc hypotonique, et donc les efflux de K^+ et d'eau osmotiquement liée, sont peu ou pas affectés par le remplacement du chlore extracellulaire par du NO_3^- (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Nonnotte et Truchot, 1992 ; Bursell et Kirk, 1996 ; Berenbrink *et al.*, 1997). Ces observations ont conduit les différents auteurs à qualifier cette voie de perméation potassique de voie de sortie Cl^- -indépendante de K^+ , par opposition à la voie dite Cl^- -dépendante, généralement associée au cotransport KCl, largement décrit chez les mammifères (pour revue Lauf, 1992). Si la voie de sortie Cl^- -dépendante de K^+ est formellement identifiée (Borgese *et al.*, 1987 ; Motais *et al.*, 1991), la nature de la voie de sortie Cl^- -indépendante de K^+ reste en revanche indéterminée. L'indépendance des processus de RVD vis-à-vis de la présence d'ions Cl^- dans le milieu extracellulaire a été observée lors de la présente étude. La mesure de la limite de fragilité osmotique indique en effet que le remplacement du chlore extracellulaire par du NO_3^- ou du méthylsulfonate ne modifie pas la capacité des cellules à résister à la lyse cellulaire lors de la diminution de l'osmolarité extracellulaire. Cependant, il apparaît que pour les expériences de remplacement anionique extracellulaire, le MeSF constitue le meilleur substituant au Cl^- . En effet, Payne et ses collaborateurs (1990) ont observé des changements du volume cellulaire et du pH intracellulaire pour les érythrocytes humains en suspension dans une solution isotonique de Ringer NO_3^- , changements qui ne se produisent pas lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du MeSF. De plus, les études menées sur l'implication du cotransport KCl dans les processus de RVD de l'érythrocyte de souris démontrent que le remplacement du Cl^- par du NO_3^- ne produit qu'une inhibition partielle (60 %) des flux de potassium par ce cotransport KCl (Armsby *et al.*, 1995). Ces études démontrent que le remplacement du Cl^- par le MeSF produit en revanche une inhibition totale des processus d'efflux de KCl *via* le cotransport (Armsby *et al.*, 1995, 1996). Les études récentes conduites sur la truite (Berenbrink *et al.*, 1997) afin de définir la sensibilité des différentes voies de transport du K^+ aux modifications du volume cellulaire ont montré, non seulement que les érythrocytes de truites possèdent différentes voies de perméation potassiques

intrinsèquement liées, mais encore que le remplacement du Cl⁻ par le MeSF est un outil puissant pour l'étude des voies de transport Cl⁻-indépendantes de K⁺. Le MeSF bloquant de manière fonctionnelle le cotransport KCl, ce remplacement anionique permet de s'affranchir d'une possible sortie de K⁺ par le cotransport KCl lorsque les ions Cl⁻ sont remplacés par du NO₃⁻ (Berenbrink *et al.*, 1997). Aussi, afin de comparer les différentes voies de régulation du volume cellulaire mises en jeu lors d'un choc osmotique, seules les conditions Ringer Cl⁻ et Ringer MeSF ont été retenues pour cette étude.

Comme il a pu être précédemment décrit (Payne *et al.*, 1990 ; Berenbrink *et al.*, 1997), le maintien des érythrocytes dans une solution isotonique dans laquelle les ions Cl⁻ ont été remplacés par du MeSF ne modifie pas le volume cellulaire des érythrocytes pendant une durée d'au moins trois heures.

Le suivi du contenu en eau (utilisé comme un indice du volume cellulaire) en présence d'une solution hypotonique Ringer Chlore (215 mOsm.l⁻¹) pendant une durée de trois heures montre que le volume de contrôle mesuré en isotonie n'est pas rétabli à la fin de cette période. Cette absence de retour au volume de contrôle est généralement expliquée par l'entrée de sodium qui est observée lorsque les globules rouges de truite sont soumis à des conditions hypotoniques (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Les expériences de substitution en présence d'une solution Ringer MeSF montrent qu'un choc osmotique de même amplitude (215 mOsm.l⁻¹) produit un gonflement légèrement mais significativement supérieur à celui observé en présence d'ion Cl⁻ extracellulaire, mais aussi que le pourcentage de retour au volume de contrôle en isotonie (67.7 % à t=180 min) est significativement inférieur à celui mesuré en présence d'une solution Ringer Chlore (90.3 % à t= 180). Ce résultat suggère donc que les érythrocytes de truite sont non seulement capables de réguler leur volume dans des conditions strictement Cl⁻-indépendantes, mais encore que, dans ces conditions de remplacement anionique, les processus de RVD sont en dessous de leur efficacité maximale, ce qui suggère une implication des voies Cl⁻-dépendantes dans ces processus.

Comme ceci a été précédemment décrit, les processus de RVD après un choc hypotonique en solution Ringer Cl⁻ ou Ringer NO₃⁻ sont sous la dépendance de l'efflux de

potassium comme osmolyte inorganique effecteur (Garcia-Romeu *et al.*, 1991). Cette même dépendance vis-à-vis du gradient potassique est observée lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence d'une solution Ringer MeSF. En effet, lorsque la concentration extracellulaire en K^+ est augmentée, le RVD est ralenti, voire totalement inhibé lorsque l'intégralité du sodium extracellulaire est remplacée par du K^+ . De plus, l'hypothèse selon laquelle la vitesse des processus de RVD est limitée par les efflux de K^+ est confirmée par l'accélération du RVD observée en présence de valinomicyne (1 μM), un ionophore pour le potassium, indiquant la nécessité d'un gradient favorable à la sortie de K^+ dans ces conditions de remplacement anionique. Des observations similaires concluant que l'efficacité maximale du RVD est limitée par les efflux de K^+ ont été faites en présence de valinomycine ou de gramicidine dans les cellules tumorales d'Ehrlich (Hoffmann *et al.*, 1984), dans les entérocytes isolés de cobaye (MacLeod et Hamilton, 1991) ou encore dans les érythrocytes de la salamandre *Necturus maculosus* (Bergeron *et al.*, 1996). La mesure de la cinétique de l'influx de potassium, mesuré par son congénère $^{86}Rb^+$, montre également que le ralentissement des processus de RVD observé lorsque les cellules sont soumises à un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF est en partie imputable à la diminution du flux potassique à travers la membrane. En effet, ces flux potassiques sont 1.4 fois moins importants à $t=5$ min. que ceux obtenus en présence d'une solution Ringer Cl⁻. Ces résultats peuvent donc expliquer la diminution de la vitesse des processus de RVD, notamment dans les premières minutes suivant le gonflement induit par le choc osmotique, et sont tout à fait comparables à ceux déjà obtenus sur la truite pour une même osmolarité de 215 mOsm.l⁻¹ par Berenbrink *et al.* (1997). Le suivi de l'évolution du contenu en potassium des érythrocytes en présence d'une solution Ringer MeSF confirme que le remplacement du chlore extracellulaire par le MeSF ne modifie pas le contenu en potassium des cellules maintenues en isotonie, et que la cinétique de la sortie de potassium par les voies de fuite à l'état stable (19.2 $\mu mol/g$ poids sec) est comparable à celle obtenue en présence d'une solution isotonique chlore (24.5 $\mu mol/g$ poids sec). Ce dernier résultat conforte donc le choix du MeSF comme substituant au chlore et confirme qu'en conditions isotoniques, la

membrane des globules rouges possède une perméabilité cationique extrêmement faible, comme cela a déjà pu être démontré dans la majorité des érythrocytes de vertébrés (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Ellory *et al.*, 1985 ; Lauf *et al.*, 1992).

Lorsque les cellules sont soumises à un stress osmotique en présence d'une solution chlore ou d'une solution MeSF, le contenu en potassium des globules rouges diminue de manière significative pendant la durée de l'exposition aux conditions hypotoniques. De plus, la variation du contenu en potassium des cellules en présence d'une solution hypotonique MeSF est alors significativement inférieure à celle obtenue en présence d'une solution chlore de même osmolarité. Cette différence explique la diminution d'efficacité des processus de RVD observée à l'aide des rapports eau sur poids sec en présence de MeSF dans le milieu extracellulaire.

Compte tenu du fait que la sortie d'ions K^+ s'effectue en présence d'une solution chlore ou en présence d'une solution MeSF, il apparaît qu'il existe une voie de sortie de K^+ strictement Cl^- -indépendante. Toutefois, ces efflux de K^+ étant diminués en présence d'une solution MeSF, il est vraisemblable que le cotransport KCl *stricto sensu*, c'est-à-dire le flux Cl^- -dépendant de K^+ , participe également aux processus de RVD en présence d'une solution Ringer Cl^- normoxique, comme cela a été récemment suggéré (Bursell et Kirk, 1996 ; Berenbrink *et al.*, 1997). Toutefois, la caractérisation du transporteur membranaire responsable de l'efflux Cl^- -indépendant de K^+ n'a pas encore été formellement établie et est le sujet de nombreux débats. Motais *et al.* (1991) ont suggéré que l'efflux Cl^- -dépendant et Cl^- -indépendant de K^+ serait l'expression d'un même transporteur, dont la sélectivité vis-à-vis du Cl^- et du NO_3^- serait gouvernée par la force ionique interne. En effet, lors d'un gonflement isotonique, via la stimulation des récepteurs β -adrénergiques et l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ ou lors de la mise en suspension dans une solution NH_4^+ , la force ionique interne n'est que peu ou pas modifiée et les processus de RVD s'effectuent par une voie de sortie de KCl strictement Cl^- -dépendante (Motais *et al.*, 1991 ; Borgese *et al.*, 1987 ; Guizouarn *et al.*, 1993). En revanche, lorsque le gonflement des cellules est stimulé par une diminution de l'osmolarité externe, la force ionique interne diminue et les processus de RVD procèdent par

une voie de sortie de K^+ (et d'anions) indépendante de la présence du Cl^- et de taurine (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993). De plus, la sensibilité commune de ces deux voies de sortie potassiques aux inhibiteurs de l'échangeur Cl^-/HCO_3^- a conduit les différents auteurs à conclure que les flux de K^+ relevaient de l'activité d'un seul et même transporteur (Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993).

Cependant, de récentes expériences menées en parallèle sur la truite et sur l'anguille tendent à prouver que les deux voies de transport Cl^- -dépendante et Cl^- -indépendante de K^+ sont non seulement pharmacologiquement distinctes (Bursell et Kirk, 1996), mais encore que les processus de régulation intracellulaires de ces voies de transport potassiques sont elles aussi différentes (Cossins *et al.*, 1994 ; Berenbrink *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'activation d'une voie de conductance Cl^- sensible au DIDS, ainsi que l'augmentation d'une voie de conductance cationique non sélective ont pu être décrites lors d'un choc hypotonique dans les érythrocytes de truite dans le présent travail, et les enregistrements de l'activité unitaire des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes de truite ont permis de mettre en évidence l'existence d'un canal cationique non sélectif inhibé par le Baryum (5 mM), ainsi que l'existence de deux types de canaux Cl^- . Ces trois types de canaux représentent alors des candidats potentiels susceptibles de rendre compte de l'indépendance des flux anioniques et cationiques au travers de la membrane des érythrocytes lors d'une stimulation hypotonique.

Lorsque les érythrocytes sont soumis à un choc hypotonique en présence de Ringer Cl^- contenant du Ba^{2+} (un inhibiteur du canal CNS de la membrane des érythrocytes de truite), à la concentration de 10 mM, les processus de RVD sont significativement inhibés (35.3 %), et le suivi de la cinétique de l'efflux de K^+ lors du RVD met en évidence une inhibition de 41.3 % de la sortie de potassium en présence de 10 mM Ba^{2+} . Ces résultats démontrent qu'au moins une partie des flux de potassium activés lors du choc osmotique en présence de Cl^- extracellulaire est sous la dépendance d'un transporteur directement ou

indirectement inhibé par le Ba^{2+} , utilisé à cette concentration. En revanche, lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par le MeSF, les processus de RVD, ainsi que la sortie de potassium sont totalement inhibés. Ceci démontre que l'efflux de potassium responsable du RVD observé en solution MeSF est sous l'entière dépendance d'un transporteur membranaire, d'un mécanisme ou d'un ensemble de transporteurs sensibles au Ba^{2+} . De plus, les courbes dose-réponse de l'inhibition du RVD par cet ion montrent que, si seulement environ 50 % d'inhibition sont obtenus avec la dose maximale en présence d'une solution Ringer Cl^- , 75% d'inhibition du RVD sont obtenus avec des concentrations de 25 mM lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de MeSF, ce qui indique un haut degré de spécificité de cet agent pharmacologique pour la voie de transport du potassium dans ces conditions de remplacement du chlore extracellulaire.

Or, le Ba^{2+} est généralement utilisé comme un inhibiteur spécifique des canaux potassiques (pour revue Latorre et Miller, 1983), et son action inhibitrice sur les processus de RVD ou sur la composante potassique de ces processus a été en outre démontrée dans de nombreux types cellulaires. Ainsi, cet ion inhibe les processus de RVD mis en place à la suite d'un choc hypotonique par les entérocytes isolés de cobaye (MacLeod et Hamilton, 1991) ; les cellules de rein en culture A6 d'amphibien (De Smet *et al.*, 1998), les cellules de l'intestin de *Necturus* (Lau *et al.*, 1984), les cellules tumorales d'Ehrlich (Hoffmann *et al.*, 1986). Il inhibe également le canal Gardos des érythrocytes humains (Grygorczyk et Schwarz, 1983), le canal potassique présent dans l'érythrocyte de lamproie *Lampetra fluviatilis* (Kirk, 1991a ; Virkki et Nikinmaa, 1995, 1996, 1998), ainsi que celui de *Petromyzon marinus* (Egée *et al.*, observations non publiées). Par ailleurs, l'effet observé sur les processus de RVD des érythrocytes de truite soumis à des conditions hypotoniques en présence d'une solution Cl^- contenant du Ba^{2+} (10 mM) est tout à fait similaire à celui observé dans les mêmes conditions sur les érythrocytes de flet (Nonnotte et Truchot, 1992). En revanche, utilisé à cette concentration de 10 mM, le Ba^{2+} n'affecte pas les mouvements Cl^- -indépendants de K^+ activés par un choc hypotonique de l'érythrocyte d'anguille (Bursell et Kirk, 1996). Il semble toutefois peu vraisemblable que le flux potassique inhibé par le Ba^{2+}

s'effectue *via* un canal potassique sélectif dans les globules rouges de truite, puisque, ni la mesure des conductances globales des érythrocytes de truite, ni la caractérisation des canaux ioniques au niveau unitaire n'ont permis de mettre en évidence l'existence d'un tel canal potassique. Le seul transporteur membranaire de l'érythrocyte de truite décrit comme sensible au Ba^{2+} est le canal cationique non sélectif (CNS) de cette membrane. Aussi, il est très vraisemblable que l'inhibition observée en présence de Ba^{2+} soit due au blocage de ce canal, qui serait alors responsable d'une partie des efflux potassiques lorsque le choc hyposmotique est réalisé en présence de Cl^- extracellulaire, et de la totalité de la sortie de K^+ lors des chocs hypotoniques réalisés en présence de MeSF.

Cette dernière hypothèse est confirmée par l'emploi d'inhibiteurs plus spécifiques des canaux potassiques que sont la charybdotoxine (CTX), l'apamine, la lidocaïne et le TEA. En effet, la Charybdotoxine est une toxine peptidique considérée comme un inhibiteur puissant et spécifique des canaux K^+ sensibles au calcium de type Gardos (Miller *et al.*, 1985, Ellory *et al.*, 1992, Brugnara *et al.*, 1995). Les expériences menées ont révélé que cet agent pharmacologique ne produit aucun effet inhibiteur sur les processus de RVD lors d'un choc hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF.

L'apamine est également un peptide inhibiteur des canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} intracellulaire (K_{Ca}) (Latorre et Miller, 1983) et se révèle de plus être un inhibiteur spécifique du canal Gardos de l'érythrocyte humain et du canal potassique K_{Ca} des hépatocytes de mammifère (Burgess *et al.*, 1981). Néanmoins, aucune action inhibitrice de ce composé sur les processus de RVD en présence d'une solution MeSF n'a pu être observée. Le TEA et la lidocaïne, deux autres inhibiteurs des canaux K^+ susceptibles d'être impliqués dans les processus de régulation de volume (Richards et Dawson, 1986 ; Harvey, 1995), sont eux aussi sans effet.

En revanche, utilisée à une concentration de 1 mM la quinine produit une inhibition complète des processus de RVD, quel que soit l'anion prépondérant dans la solution

hypotonique (Cl^- ou MeSF). Bien que considérée comme un inhibiteur des canaux potassiques (Latorre et Miller, 1983 ; Hoffmann et Dunham, 1995 ; Bergeron *et al.*, 1996) la quinine se révèle être cependant assez peu spécifique des canaux K^+ , puisque cet alcaloïde peut aussi inhiber certains canaux chlore rectifiés sortants (ORCC) (Gögelein et Capek, 1990) et certains canaux cationiques non sélectifs (Gögelein et Capek, 1990). Cet agoniste est également un inhibiteur du canal cationique non sélectif de la membrane des érythrocytes de truite (Chap. 1.). De plus, à forte concentration ($>3\text{mM}$), cet agent pharmacologique se révèle être également un inhibiteur du flux de K^+ via le cotransport KCl dans les érythrocytes de mouton à faible concentration intracellulaire en K^+ (phénotype LK) (Adragna et Lauf, 1994), cette inhibition n'excédant cependant pas 70 % du flux total de K^+ . Les IC_{50} obtenues en présence d'une solution hypotonique Ringer Cl^- ou Ringer MeSF ne sont pas différentes, ceci suggère donc que la quinine agit sur une ou plusieurs cibles similaires lors des processus de RVD induits par un choc osmotique en présence d'une solution Ringer Cl^- ou Ringer MeSF. Cette hypothèse est également confirmée par le fait qu'à cette concentration de 1 mM, la quinine inhibe la sortie de potassium (ainsi que l'influx de $^{86}\text{Rb}^+$) dans les mêmes proportions, quel que soit l'anion prépondérant dans les solutions hypotoniques.

Cette hypothèse de la multiplicité des cibles est renforcée par le fait que la quinine bloque les efflux de taurine activés par les chocs osmotiques dans l'érythrocyte d'anguille (Lewis *et al.*, 1996) mais également dans les cellules C6 (Strange *et al.*, 1996) et les cellules cancéreuses HeLa (Hall *et al.*, 1996).

De plus, la quinidine, un dérivé de la quinine utilisée à la concentration de 1 mM, inhibe complètement les processus de RVD en présence d'une solution Ringer MeSF. Bien que l'action de la quinidine sur les canaux sélectifs au K^+ soit reconnue (Hoffmann et Dunham, 1995 ; Bergeron *et al.*, 1996), certains auteurs ne considèrent l'action de cette drogue comme spécifique qu'à des concentrations plus faibles (Richards et Dawson, 1986). Lorsque les érythrocytes de truite ont été soumis à des conditions hypotoniques en présence d'une solution Ringer MeSF contenant 10 μM de quinidine, aucun effet significatif sur les

processus de RVD n'a pu être observé, ni sur le retour du volume aux valeurs de contrôle mesurées en isotonie ni sur la sortie de potassium. Il est donc vraisemblable, comme cela a été précisé précédemment, que l'action de la quinidine, tout comme celle du Ba^{2+} ou de la quinine, s'effectue sur un ou plusieurs transporteurs autres qu'un canal potassique. Compte tenu du profil pharmacologique des inhibitions obtenues en présence des inhibiteurs des transporteurs membranaires cationiques, la cible la plus probable des antagonistes utilisés est certainement le canal cationique non sélectif décrit dans la membrane des érythrocytes de truite par les techniques électrophysiologiques. En effet, bien que la quinidine n'ait pas été testée lors des expériences de caractérisation du canal CNS de la membrane de l'érythrocyte de truite, la quinine et le Ba^{2+} se sont avérés être deux puissants inhibiteurs de ce canal.

Ceci est en partie confirmé par l'absence d'effet inhibiteur de l'amiloride lors d'un choc hypotonique, lorsque le chlore extracellulaire est remplacée par du MeSF. En effet, l'amiloride, connu pour inhiber l'échangeur Na^+/H^+ (Baroin *et al.*, 1984 ; Borgese *et al.*, 1987 ; Gallardo Romero *et al.*, 1996), est un inhibiteur puissant de certains canaux cationiques non sélectifs mécanosensibles perméants au Ca^{2+} (pour revue Hamill et McBride, 1996). Or, l'amiloride n'affecte pas les processus de RVD mis en œuvre par les érythrocytes de truite lorsqu'ils sont exposés à des conditions hypotoniques en présence d'une solution Ringer MeSF. Ce résultat est en accord avec l'observation de l'insensibilité du canal cationique non sélectif de la membrane de l'érythrocyte de truite à ce composé.

Enfin, l'action du Gd^{3+} sur les processus de RVD de l'érythrocyte de truite renforce l'idée que le canal CNS de la membrane des érythrocytes participe aux processus de RVD. Cet ion de la série des Lanthanides est en effet un inhibiteur du canal cationique non sélectif mécanosensible décrit lors de la caractérisation de ce canal. Si l'application de Gd^{3+} à une concentration de 20 μM produit une inhibition partielle mais non significative des processus de RVD du fait de la grande variabilité de cet effet, à une concentration plus élevée (500 μM) cet ion produit en revanche une inhibition de même amplitude mais significative. Plusieurs

phénomènes sont susceptibles d'entrer en jeu afin d'expliquer ces observations. En premier lieu, l'inhibition reportée sur le canal cationique non sélectif de l'érythrocyte de truite est dépendante du voltage imposé à la membrane, puisqu'il faut imposer un gradient électrique favorable à l'entrée de l'ion Gd^{3+} dans le canal. De plus, les expériences ayant été réalisées en présence de Ringer MeSF, il est possible qu'une partie des ions Gd^{3+} ait été chélatée par cet anion, réduisant ainsi la quantité d'ions libres dans le milieu, cette chélation pouvant être également amplifiée par la présence d'Hepes et de SO_4^{2-} dans le milieu (Caldwell *et al.*, 1998). L'inhibition des processus de RVD observée en conditions hypotoniques Ringer MeSF contenant du Gd^{3+} montre que le canal cationique non sélectif est le transporteur responsable d'une partie des efflux de solutés permettant le retour au volume normal après gonflement.

Cette hypothèse se trouve confortée par des observations récentes faites sur les cellules A6. En effet, dans ces cellules, un choc hypotonique active une sortie de K^+ *via* un canal cationique non sélectif situé sur la membrane basolatérale, sensible au Ba^{2+} , mais également au Gd^{3+} (500 μM) (De Smet *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1998). De plus, cette voie de perméation potassique des cellules A6 est perméable aux cations volumineux tels que le méthylammonium et le guanidium (Li *et al.*, 1998). Or, une telle perméabilité de la membrane des érythrocytes de truite au méthylammonium a pu être démontrée lors de leur stimulation par un choc hypotonique (Garcia-Romeu *et al.*, 1991).

La réversibilité de l'action inhibitrice du Ba^{2+} observée en présence d'une solution Ringer MeSF après ajout de valinomycine confirme que les inhibiteurs cationiques (Ba^{2+} , quinine et Gd^{3+}) employés agissent directement sur la voie de transport Cl^- -indépendante de K^+ , et donc sur le canal cationique non sélectif. En effet, ce type de réversibilité, en offrant une autre voie de sortie au K^+ dont le transporteur est au préalable bloqué, a pu être mis en évidence dans de nombreux types cellulaires tels que les globules rouges de salamandre (Bergeron *et al.*, 1996), les entérocytes isolés d'intestin de cobaye (MacLeod et Hamilton, 1991) ou les cellules tumorales d'Ehrlich (Hoffmann et Dunham, 1995).

Si la voie de perméation Cl⁻-indépendante de K⁺ démontrée ci-dessus est de nature conductive, selon les lois de l'électroneutralité (Geck, 1990), une voie de perméation membranaire parallèle et non électroneutre doit nécessairement rendre compte de la sortie des anions lors des processus de RVD. Bien que la mesure de la sortie de chlore durant les processus de RVD faisant suite à un choc hypotonique n'ait pas été effectuée lors de cette étude, l'effet d'inhibiteurs des canaux chlore a été testé sur l'évolution du contenu en eau et en K⁺ des cellules lors d'une stimulation hypotonique en présence de solution Ringer Cl⁻ ou Ringer MeSF.

Le NPPB a été utilisé dans de nombreuses études comme antagoniste spécifique des transporteurs anioniques et plus spécifiquement des canaux Cl⁻ lorsqu'il est employé dans des gammes de concentrations inférieures à 100 µM (pour revue Cabantchik et Greger, 1992).

L'utilisation du NPPB, à la concentration de 50 µM, montre que ce dérivé des arylaminobenzoates est un puissant inhibiteur des processus de RVD de l'érythrocyte de truite. Toutefois, si à cette concentration de 50 µM, le NPPB provoque une inhibition complète de la restauration du volume cellulaire après gonflement hypotonique en présence d'une solution MeSF, il n'induit qu'une inhibition partielle du retour au volume de contrôle (58%) lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de Ringer Cl⁻. Dans ces conditions expérimentales d'inhibition par le NPPB, le suivi de l'évolution du contenu en potassium des érythrocytes de truite soumis à des conditions hypotoniques en présence ou non de Cl⁻ extracellulaire, montre à nouveau une corrélation parfaite avec les mesures de l'évolution du contenu en eau. En effet, alors que le NPPB provoque une inhibition complète de l'efflux de K⁺ activé par le gonflement cellulaire lorsque celui-ci est réalisé en présence de Ringer MeSF, seule une diminution de 41.1 % de la variation de contenu en potassium est observée lorsque les cellules sont soumises à un gonflement osmotique en présence d'une solution Ringer Cl⁻. Toutefois, l'identité du transporteur membranaire bloqué par le NPPB ne

peut être totalement définie dans cette étude. Néanmoins, un canal chlore de la famille des ORCC sensibles au NPPB a pu être mis en évidence lors de l'étude des enregistrements de l'activité isolée des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes de truite réalisée dans le présent travail. Par ailleurs le canal cationique non sélectif décrit dans la membrane du globule rouge de truite se révèle insensible au NPPB. A cette concentration de 50 μM , le NPPB inhibe également le flux Cl^- -indépendant de K^+ activé par le gonflement de l'érythrocyte d'anguille (Bursell et Kirk, 1996) ainsi que l'efflux de Cl^- et de taurine activé par le gonflement dans cette même espèce (Lewis *et al.*, 1996). C'est pourquoi, compte tenu des grandeurs mesurées (REPS et contenu en K^+ des cellules), il est impossible de définir si le NPPB agit directement sur la voie de sortie Cl^- -indépendante de K^+ ou si l'effet inhibiteur observé n'est qu'une conséquence des lois de l'électroneutralité par le blocage d'une voie de sortie pour le Cl^- , qui pourrait dans ce cas être le canal chlore de la famille des ORCC décrits dans la membrane des globules rouges.

L'hypothèse selon laquelle les canaux Cl^- décrits par les méthodes électrophysiologiques seraient les cibles privilégiées du NPPB est en partie confirmée par les courbes dose-réponse du pourcentage d'inhibition du RVD établies en présence de concentrations croissantes de NPPB, que ce soit en conditions hypotoniques Ringer Cl^- ou Ringer MeSF. En effet, lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence d'ion Cl^- dans le milieu extracellulaire, la courbe dose-réponse démontre que l'inhibition du RVD ne dépasse pas 50%. Deux hypothèses peuvent alors expliquer ce résultat. Soit les processus de RVD en présence de Cl^- extracellulaire procèdent par un seul transporteur, dont la sensibilité au NPPB est faible, soit au moins deux transporteurs distincts, de sensibilité différente, sont impliqués dans les efflux de solutés responsables de la diminution de volume après gonflement hypotonique. Cette deuxième hypothèse semble devoir être privilégiée. La courbe dose-réponse établie en conditions hypotoniques Ringer MeSF montre que l'inhibition atteint cette fois la valeur de 100%, avec une IC_{50} de 4.5 μM , ce qui démontre la grande sensibilité à cet antagoniste du transporteur membranaire autre que le cotransport lorsque le Cl^- extracellulaire est remplacé par du MeSF. Ces résultats indiquent donc qu'en

conditions hypotoniques Ringer Cl⁻ normoxiques, la diminution de volume observée après gonflement implique le cotransport KCl, qui n'est pas sensible au NPPB aux doses utilisées dans la présente étude (Bursell et Kirk, 1996), ainsi qu'une composante très sensible au NPPB. Aussi, l'inhibition observée lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de conditions physiologiques de Cl⁻ extracellulaire peut être vraisemblablement expliquée par une inhibition des flux de taurine et des flux de Cl⁻ non couplés au K⁺ par un transporteur de type canal, qui ne serait autre que le canal Cl⁻ de la famille des ORCC décrit dans la membrane des érythrocytes de truite.

L'utilisation de la glibenclamide (100 µM) lors des expériences de choc hypotonique confirme l'hypothèse de l'implication des canaux Cl⁻ dans les processus de RVD tant en présence de Cl⁻ extracellulaire que lorsque celui-ci est remplacé par du MeSF. En effet, ce dérivé des sulfonyles initialement décrit comme inhibiteur spécifique des canaux K⁺ sensibles à l'ATP intracellulaire (Ashcroft, 1988), est connu depuis pour inhiber les canaux Cl⁻ de la famille des CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator ») activés par l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc (Foskett, 1998). De plus, les études électrophysiologiques globales ont montré que les courants chlore rectifiés sortants activés lors d'un choc hyposmotique dans les cellules M-1 des tubes collecteurs de souris (Meyer et Korbmacher, 1996) ou des myocytes cardiaques de cobaye (Yamazaki et Hume, 1997) sont sensibles à cet agoniste.

Le retour au volume de contrôle des érythrocytes après gonflement, ainsi que la sortie de K⁺ activée par le choc hypotonique sont inhibés en présence de cette drogue. Comme lors des expériences réalisées en présence de NPPB, que ce soit pour la diminution du contenu en eau des cellules ou pour la sortie de K⁺, les pourcentages d'inhibition observés lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de Ringer Cl⁻ sont significativement inférieurs à ceux observés lorsque le choc osmotique est réalisé en présence de Ringer MeSF.

Les effets inhibiteurs de la glibenclamide sur les processus de RVD sont comparables à ceux observés en présence de Ba²⁺ ou de NPPB, non seulement en

présence de Ringer MeSF, où l'inhibition des grandeurs mesurées est totale, mais aussi en présence de Ringer Cl⁻, l'inhibition n'étant alors que de 50 %. Cette dernière observation confirme donc que, lors du choc hypotonique en présence de Ringer Cl⁻ normoxique, le cotransport KCl est responsable d'une partie des efflux de K⁺ observés, mais également que, dans ces conditions, la moitié de ces efflux est due à une voie de transport directement ou indirectement sensible à la glibenclamide. Il est donc concevable que cet effet inhibiteur ait pour cible un transporteur membranaire de nature conductive. En effet, s'il est vrai que la glibenclamide est un inhibiteur relativement sélectif pour les canaux Cl⁻ de faible conductance (Foskett, 1998) pouvant être activés dans certains types cellulaires lors d'un gonflement après stimulation hypotonique (Liu *et al.*, 1998), cet agent se révèle être un inhibiteur des courants $I_{Cl, \text{swell}}$ des myocytes cardiaques de cobaye (Sakaguchi *et al.*, 1997), des cellules M-1 du tube collecteur de souris (Meyer et Korbmacher, 1996) et des cellules intestinales de la lignée Intestine 407 (Liu *et al.*, 1998). Deux études, portant l'une sur les cellules M-1 des tube collecteurs de souris (Volk *et al.*, 1995) et l'autre sur la lignée cellulaire intestinale HT-29 (Rabe *et al.*, 1995) décrivent également la glibenclamide comme un inhibiteur potentiel des canaux Cl⁻ de la famille des ORCC. Ces différents résultats tendent à prouver que deux cibles potentielles directes existent dans la membrane des érythrocytes de truite. En effet, bien que l'effet inhibiteur de la glibenclamide n'ait pas été testé dans les études menées lors de la caractérisation des canaux ioniques par la technique du « patch-clamp », l'existence de deux types différents de canaux chlore, présentant pour l'un des caractéristiques de conductance comparables à un canal type CFTR et pour l'autre des caractéristiques de canaux de type ORCC, suggère que ces deux canaux pourraient être les cibles de la glibenclamide. Toutefois, selon que le canal inhibé par la glibenclamide est le canal chlore à conductance linéaire ou le canal de type ORCC, la cause de l'inhibition des processus de RVD sera différente. En effet, si le canal chlore à conductance linéaire est inhibé par la glibenclamide, les effets produits sur les processus de RVD seraient selon toute vraisemblance attribuables à une destruction du potentiel de membrane conduisant à une déstructuration des gradients électrochimiques nécessaires à l'activation des voies de

conductance. En revanche, si l'absence de retour au volume de contrôle après gonflement hypotonique en présence de glibenclamide est due à l'inhibition du canal de type ORCC, cette inhibition s'expliquerait par un blocage de la voie de transport anionique de ces processus de RVD et donc par l'absence de « driving force » pour les flux potassiques.

L'utilisation du DPC et du 9-AC lors des expériences de chocs hypotoniques réalisés en présence d'une solution Ringer MeSF montre que les processus de RVD, et donc les transporteurs membranaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire, ne sont pas sensibles à ces agents. Cependant, l'absence d'effet inhibiteur du DPC comparée à l'effet observé sur l'érythrocyte de flet (Nonnotte et Truchot, 1992) peut être expliquée par la concentration utilisée par ces auteurs, qui est double de celle utilisée ici.

En conclusion, l'emploi d'inhibiteurs spécifiques des voies de conductance tels que le Ba^{2+} , le Gd^{3+} , le NPPB et la glibenclamide a permis de mettre en évidence le fait que l'efflux potassique rendant compte d'une partie du dégonflement cellulaire lorsque les cellules sont soumises à un choc osmotique en présence de Ringer Cl⁻ en conditions normoxiques est sous la dépendance d'au moins deux transporteurs pharmacologiquement différents, c'est-à-dire le cotransport KCl et une voie de sortie Cl⁻-indépendante de K^{+} . De plus, les expériences conduites en présence de Ringer MeSF montrent que cette voie de sortie de K^{+} procède d'un seul transporteur sensible au Ba^{2+} et au Gd^{3+} , ce transporteur étant probablement le canal cationique non sélectif décrit dans la membrane des érythrocytes.

Cependant, la question reste de savoir où agissent réellement les antagonistes des canaux Cl⁻ que sont le NPPB et la glibenclamide. En effet, seule l'évolution du contenu en K^{+} ayant été mesurée durant les chocs hypotoniques, tout laisse à penser dans un premier temps que ces agents agissent sur le transporteur membranaire responsable de l'efflux de K^{+} , comme cela a récemment été suggéré pour les globules rouges d'anguille par Bursell et Kirk (1996). Il est cependant plus vraisemblable que les effets observés sur l'efflux de K^{+} marquent la dépendance de cet efflux non pas vis-à-vis du chlore, mais vis-à-vis d'une sortie anionique au sens large, afin de respecter les lois de l'électroneutralité. En effet, les mesures

en microélectrodes effectuées sur les érythrocytes de truite lors d'un choc hypotonique montrent que les sorties d'osmolytes inorganiques ne provoquent aucune modification du potentiel de membrane (Guizouarn *et al.*, 1993). Dans ce cas, les voies de conductance anioniques et cationiques agiraient en parallèle.

La sensibilité aux inhibiteurs de la bande 3 (DIDS, SITS, flufénamate, niflumate et furosémide) des processus de RVD des érythrocytes de truite (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Motais *et al.*, 1991 ; Guizouarn *et al.*, 1993), et des érythrocytes d'autres espèces de sélaciens et de téléostéens (Goldstein et Brill, 1991 ; Lewis *et al.*, 1996 ; Nonnotte et Truchot, 1992), a conduit les différents auteurs à suggérer que l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ joue un rôle de protéine régulatrice de ces processus (Garcia-Romeu *et al.*, 1991) ou de protéine membranaire capable de servir d'effecteur à ces processus par changement de conformation (Fiévet *et al.*, 1995, 1998 ; Garcia-Romeu *et al.*, 1996, Motais *et al.*, 1997).

Le SITS, l'acide niflumique, l'acide flufénamique et le furosémide affectent en effet dans la présente étude les processus de RVD mis en œuvre lors d'une stimulation hypotonique en présence d'une solution Ringer Cl^- , comme précédemment décrit dans la littérature (Garcia-Romeu *et al.*, 1991 ; Guizouarn, 1992), mais aussi lorsque le Cl^- extracellulaire est remplacé par du MeSF. Cependant, aux concentrations utilisées dans le présent travail, ces agonistes de la bande 3 sont susceptibles de bloquer d'autres transporteurs anioniques, notamment la majorité des canaux Cl^- activés par le gonflement (Nilius *et al.*, 1996 ; Cabantchik et Greger, 1992), ainsi que ceux qui sont impliqués dans les efflux d'osmolytes organiques (Strange *et al.*, 1996 ; Kirk et Strange, 1998) et le cotransport KCl (Motais *et al.*, 1991 ; pour revue Lauf *et al.*, 1992).

Les expériences de chocs hypotoniques menées dans ce travail en présence de Ringer Cl^- ou de Ringer MeSF contenant du DIDS tendent à confirmer l'importance régulatrice de la bande 3 dans les processus de RVD.

Au cours de cette étude, le DIDS est apparu comme un inhibiteur puissant des processus de RVD. En effet, à la concentration de 100 μM , le retour au volume de contrôle

ainsi que la sortie de K^+ activée par le choc hypotonique sont totalement inhibés, quel que soit l'anion prépondérant dans la solution hypotonique. De plus, la courbe dose-réponse de l'inhibition du RVD établie en présence de conditions hypotoniques Ringer Cl^- et de concentrations croissantes de DIDS montre une remarquable similarité avec celle obtenue en présence de Ringer MeSF. Les IC_{50} obtenues dans ces différentes conditions sont identiques, puisqu'elles sont respectivement de 14 μM et 11 μM en présence de Ringer Cl^- et de Ringer MeSF. Ce dernier résultat suggère deux hypothèses : soit les transporteurs membranaires bloqués par le DIDS sont multiples, soit les efflux de composés inorganiques et organiques activés par le gonflement sont sous la dépendance régulatrice d'un et d'un seul transporteur sensible au DIDS. Ces deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement et peuvent être liées aux données récentes de la littérature.

Lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence d'ions Cl^- extracellulaires et en conditions normoxiques, le cotransport KCl participe au processus de RVD, comme le confirment les expériences précédentes réalisées dans ce travail. Or, le cotransport KCl présente une très forte sensibilité au DIDS, puisque des IC_{50} de 9 μM ont été observées pour les flux Cl^- -dépendant de K^+ de l'érythrocyte d'anguille (Bursell et Kirk, 1996) ainsi que pour les érythrocytes de mammifère (Lauf *et al.*, 1992). Il est donc concevable qu'une part de l'inhibition décrite en présence de Ringer Cl^- se fasse *via* l'inhibition du cotransport KCl .

L'observation d'une IC_{50} similaire en présence de Ringer MeSF hypotonique suggère que le ou les transporteurs affectés par le DIDS sont fonctionnels dans les deux conditions anioniques extracellulaires, ce qui n'est pas le cas du cotransport KCl . Or, le canal Cl^- de la famille des ORCC est sensible au DIDS et rend compte de la voie de conductance Cl^- sensible au DIDS de la membrane des globules rouges de truite activée en conditions hypotoniques. Il est donc vraisemblable qu'une des cibles privilégiées du DIDS dans le présent travail soit le canal Cl^- rectifié sortant décrit par les méthodes électrophysiologiques, ainsi que la bande 3 qui gouvernerait alors les processus de RVD. En effet la régulation des processus de RVD par la bande 3 est suggérée par le fait que les flux de taurine et de cations sont inhibés de manière similaire dans l'érythrocyte de truite. Les IC_{50} mesurées de

ces flux sont en effet de 55 μM (Garcia-Romeu *et al.*, 1991), soit nettement supérieures à celles mesurées sur l'inhibition du retour au contenu en eau des cellules (11 μM) dans le présent travail. Ceci suggère que les processus de RVD sont sous la dépendance d'un transporteur plus sensible au DIDS que ne le sont les transporteurs responsables de la sortie de taurine et de K^+ activés par le choc osmotique. Ce transporteur serait alors la bande 3. Cette hypothèse du rôle régulateur de la bande 3 est confirmée par les récentes études menées sur l'anguille et la truite.

Le DIDS exerce son effet inhibiteur sur l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ par une liaison covalente irréversible. Aussi, si chez l'anguille l'incubation des érythrocytes en présence de DIDS inhibe de plus de 85 %, le flux de SO_4^{2-} (un des substrats de la bande 3) par l'intermédiaire de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ même après lavage des cellules, le même protocole d'incubation n'affecte en revanche que très marginalement les flux de K^+ et de taurine activés par le choc osmotique (Lewis *et al.*, 1996), alors que ceux-ci sont inhibés en présence de DIDS lors du choc osmotique. Ceci indique donc que l'inhibition des flux anioniques observée se fait alors par une interaction différente de l'inhibiteur avec le transporteur (Lewis *et al.*, 1996) et donc que ce transporteur, différent de la bande 3, qui présente les caractéristiques pharmacologiques d'un canal anionique (Kirk *et al.*, 1992, Lewis *et al.*, 1996) est responsable des efflux observés. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la bande 3 bloque les processus de RVD par un blocage de sa fonction régulatrice, hypothèse en outre confirmée par les récentes études menées sur l'érythrocyte de truite, au cours desquelles un protocole d'inhibition covalente de la bande 3, similaire à celui utilisé par Lewis et ses collaborateurs, a conduit à une inhibition des flux Cl^- indépendant de K^+ , confirmant alors cette fonction régulatrice de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Garcia-Romeu *et al.*, 1996 ; Motaïs *et al.*, 1997).

L'inhibition des processus de RVD observée dans le présent travail sur les érythrocytes de truite en présence de DIDS procède donc par le blocage de plusieurs transporteurs de la membrane. Ces transporteurs sont le cotransport KCl lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence d'ions Cl^- extracellulaires, le canal chlore rectifié sortant,

qui, dans les conditions de remplacement anionique en présence de MeSF doit rendre compte des efflux anioniques et d'une partie de ces efflux en conditions Ringer Cl⁻ hypotonique, et enfin la bande 3, qui pourrait alors être le coordinateur membranaire des processus de régulation de volume quel que soit l'anion prépondérant dans la solution hypotonique.

L'utilisation des antagonistes des canaux ioniques et des transporteurs membranaires de l'érythrocyte de truite permet de conclure que, si le cotransport KCl est responsable d'une partie des processus de RVD lorsque les cellules sont soumises à des conditions hypotoniques en présence de Cl⁻ extracellulaire, les canaux ioniques jouent eux aussi un rôle non négligeable dans ces processus de régulation et rendent même compte de la totalité de la régulation de volume en conditions de substitution anionique. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer quels sont les processus de régulation intracellulaire qui sous-tendent l'activation de tels canaux.

Dans de nombreux types cellulaires, le calcium joue un rôle primordial dans les processus de la régulation du volume. Cette dépendance des processus de RVD vis-à-vis du Ca²⁺ a notamment été mise en évidence dans nombre de cellules épithéliales (pour revue Foskett, 1994) mais aussi dans les érythrocytes de la salamandre *Amphiuma sp.* (Cala *et al.*, 1986), ainsi que ceux de *Necturus maculosus* (Bergeron *et al.*, 1996).

Cependant, ni l'emploi d'un antagoniste des canaux calciques dépendant du voltage de type L, la nifédipine, ni l'emploi d'un inhibiteur du relargage des stocks calciques, le TMB-8, n'ont permis de mettre en évidence un quelconque rôle du calcium intracellulaire dans la mise en place des processus de RVD. Cette absence de rôle du calcium est en outre confirmée par l'emploi des inhibiteurs du complexe Ca²⁺-calmoduline. En effet, contrairement à ce qui a pu être décrit pour les érythrocytes d'anguille (Bursell et Kirk, 1996) ou les érythrocytes de salamandre (Bergeron *et al.*, 1996), ni le W-7, ni le pimozide, deux antagonistes de ce complexe, ne produisent d'effet inhibiteur significatif sur les processus de

RVD, ce qui permet de conclure que, dans l'érythrocyte de truite, les processus de RVD mis en jeu sont indépendants de l'activation de ce complexe. L'absence d'effet du TFP, un autre inhibiteur de ce complexe Ca^{2+} -calmoduline (Foskett et Spring, 1985), renforce elle aussi cette conclusion.

La voie de synthèse des éicosanoïdes constitue une autre voie du métabolisme susceptible de réguler les processus de RVD observés lors de ce travail. De nombreuses études ont montré l'implication du métabolisme des éicosanoïdes dans la régulation des voies de sortie des osmolytes organiques et inorganiques impliqués dans les processus de régulation du volume cellulaire (pour revue Lambert, 1994). En effet, bien que le rôle physiologique des éicosanoïdes chez les vertébrés inférieurs soit encore mal connu, de nombreux tissus de poissons, dont les globules rouges, synthétisent des éicosanoïdes (Mustafa et Srivastava, 1989 ; Mustafa et Jensen, 1992).

Alors que la diminution du contenu en eau des érythrocytes n'est pas affectée par la quinacrine, inhibiteur de la synthèse de l'acide arachidonique par la phospholipase A₂, l'ETYA induit en revanche une puissante inhibition du retour au volume de contrôle mesuré en isotonie. Or, l'ETYA est un antagoniste générique du métabolisme de l'acide arachidonique, puisqu'il agit à la fois sur la cyclooxygénase, qui transforme l'acide arachidonique en PGE₂, et sur la 5-lipoxygénase, qui transforme cet acide gras en LTD₄ (Force et Bonventre, 1994 ; Lambert, 1994). L'inhibition produite par l'ETYA sur les processus de régulation de volume des érythrocytes de truite lors d'un choc hypotonique est tout à fait comparable à celle observée sur les érythrocytes de salamandre lorsque ceux-ci sont soumis à des conditions hypotoniques (Light *et al.*, 1997).

Or, il a été montré dans les cellules tumorales d'Ehrlich, que lors d'un choc hypotonique, la synthèse de leucotriène D₄ était augmentée alors que celle des prostaglandines était diminuée (Lambert, 1994). Toutefois, dans les expériences de chocs hypotoniques conduites en présence de Ringer MeSF, ni le blocage de la synthèse des

PGE₂ par l'indométhacine, ni celui de la synthèse des leucotriènes par le NDGA, n'affectent de manière significative les processus de RVD. Ce résultat est quelque peu surprenant comparé à celui obtenu dans les érythrocytes de salamandre (Light *et al.*, 1997) ou les cellules tumorales d'Ehrlich (Jorgensen *et al.*, 1996) puisque, dans ces deux types cellulaires, l'utilisation du NDGA conduit à une inhibition importante des efflux des solutés responsables des processus de RVD. Aussi, il convient de s'interroger sur les effets de l'ETYA, observés dans les expériences réalisées sur les globules rouges de truite, sur les processus de retour au volume de contrôle lors d'une stimulation hypotonique. Il paraît en effet peu vraisemblable que l'inhibition observée soit une conséquence de l'inhibition de la synthèse des éicosanoïdes (et plus particulièrement des LTD₄), mais il n'est pas exclu que l'ETYA agisse sur d'autres processus métaboliques dans les érythrocytes de truite.

Les récentes études menées pour comprendre les mécanismes d'activation et de régulation du cotransport KCl ont conduit les différents auteurs à attribuer un rôle majeur à l'inter-relation des protéines kinases et phosphatases dans le contrôle de ces mécanismes. En effet, les études réalisées, tant sur les mammifères (Kaji et Tsukitani, 1991 ; Jennings et Schulz, 1991) que sur la truite (Cossins *et al.*, 1994 ; Weaver et Cossins, 1996) ont montré que l'activation du cotransport KCl est sous la dépendance de la déphosphorylation d'une protéine encore non définie à ce jour, ou du cotransport KCl lui-même (Cossins *et al.*, 1994 ; Jennings et Schulz, 1991). En effet, l'acide okadaï que ou la calyculine A, deux antagonistes des protéines phosphatases de type 1 et 2A, inhibent le cotransport KCl, alors que la staurosporine et la chélérythrine, en bloquant une protéine kinase qui agit de manière opposée, activent ce cotransport KCl. Toutefois, le schéma est plus complexe, puisque le genistein, un inhibiteur des protéines kinases agissant sur les résidus tyrosil des protéines, inhibe également le cotransport KCl lorsque ce dernier est activé par l'oxygénation ou les catécholamines (Weaver et Cossins, 1996). En revanche, la genistein n'induit aucune

inactivation des flux potassiques lorsque ceux-ci sont activés par la staurosporine ou le NEM. Ces derniers résultats indiquent donc que, dans le globule rouge de truite, le schéma de régulation des flux potassiques par le cotransport KCl procède par un mécanisme de plusieurs phosphorylations ou déphosphorylations par des protéines kinases et phosphatases. Toutefois, à l'inverse des flux Cl⁻-dépendants de K⁺, les flux Cl⁻-indépendants de K⁺ se révèlent être insensibles à la calyculine A, même utilisée à des concentrations de l'ordre du micromolaire, ce qui suggère que ces derniers relèvent d'une voie de transport différente de la voie de sortie Cl⁻-dépendante de K⁺ (Cossins *et al.*, 1994 ; Berenbrink *et al.*, 1997). Cependant il n'était pas exclu que les voies de régulation dites Cl⁻-indépendantes soient activées par une protéine kinase. En effet, de nombreuses études montrent une activation des transporteurs impliqués dans les mécanismes de régulation du volume cellulaire, et notamment des canaux Cl⁻, par les protéines kinases. De telles observations ont pu être faites pour les cellules Intestine 407 (Tilly *et al.*, 1993) ou les tubules proximaux de grenouille (Robson et Hunter, 1994).

Lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de Ringer MeSF contenant de la staurosporine, aucune inhibition ni accélération des processus de retour au volume de contrôle n'est observée. Ce résultat confirme donc l'hypothèse selon laquelle le cotransport KCl n'est pas impliqué dans les efflux de K⁺ qui rendent compte du retour au volume de contrôle lorsque le choc hypotonique est réalisé en présence de Ringer MeSF. Cependant, ceci soulève certaines interrogations. En effet, ce composé inhibe les flux de taurine activés lorsque les globules rouges de truite sont exposés à des conditions hypotoniques (Kiessling *et al.*, 1997). Au moins deux hypothèses peuvent rendre compte de l'absence d'effet de la staurosporine observée lors de la stimulation hypotonique en présence d'une solution Ringer MeSF. Il est possible que les efflux de taurine ne soient pas activés lorsque le chlore extracellulaire est remplacé par du MeSF. Ceci paraît toutefois peu vraisemblable, compte tenu que l'efflux de taurine est présent lorsque le Cl⁻ est remplacé par du NO₃⁻ (Garcia-Romeu *et al.*, 1991) ou lorsque le méthylsulfate est substitué au chlore, que ce soit pour les expériences conduites chez l'anguille ou chez le flet (Fincham *et al.*, 1987). Aussi,

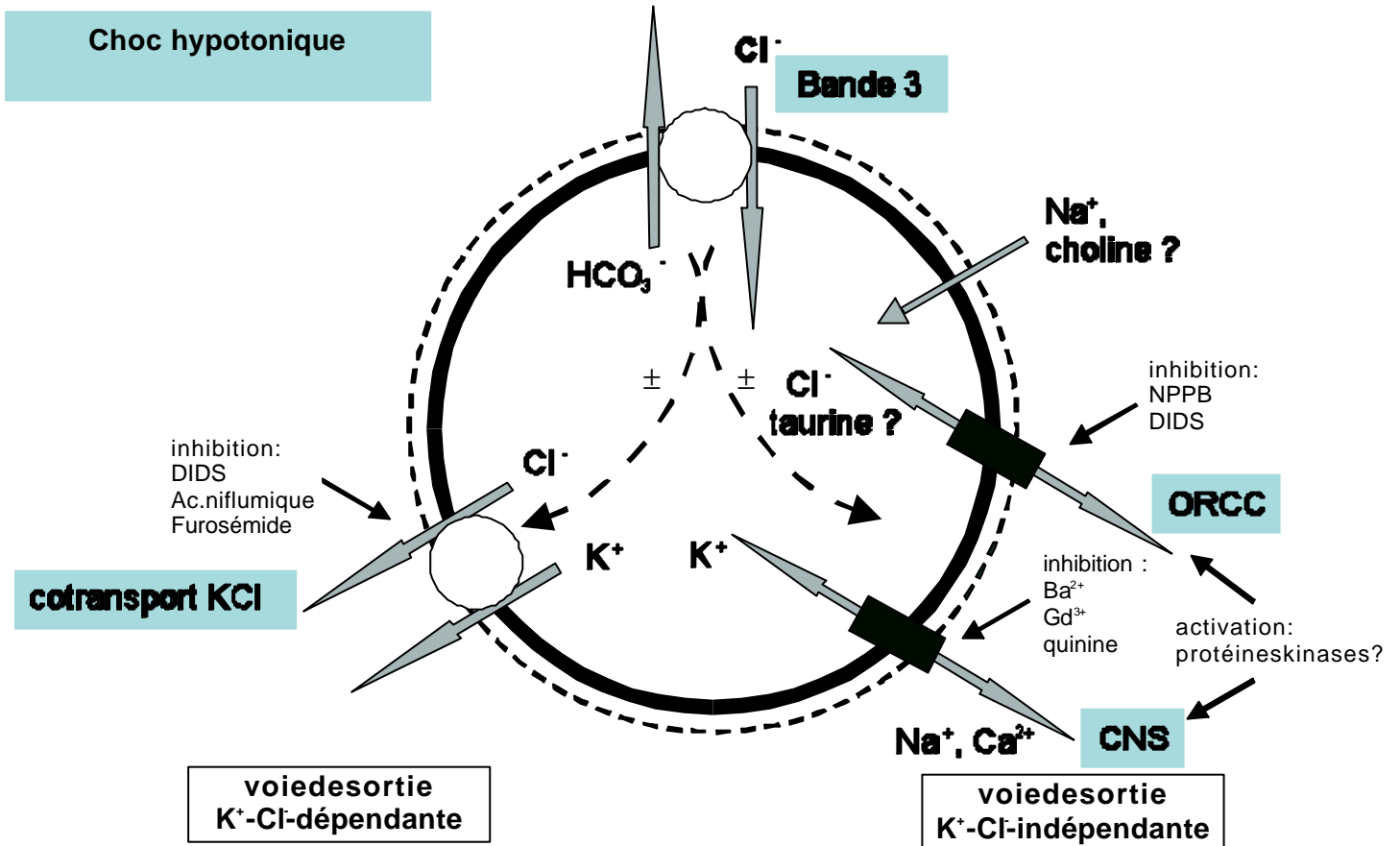


Figure 56.: Modèle des processus de régulation de volume de l'érythrocyte de truite après gonflement hypotonique faisant intervenir le cotransport KCl et les canaux ioniques de la membrane. \pm régulation positive ou négative sur les processus.

l'hypothèse la plus vraisemblable serait que les efflux de solutés autres que les acides aminés ne sont pas sous la dépendance d'une phosphorylation inhibée par la staurosporine mais rendent même compte à eux seuls de la totalité du retour au volume de contrôle lorsque l'efflux de taurine est inhibé.

Aussi un inhibiteur plus spécifique des protéines kinases qui phosphorylent les résidus tyrosyl a été utilisé. L'addition de génistein à la suspension de globules rouges soumis à un choc hypotonique en présence de Ringer MeSF induit une inhibition partielle des processus de RVD (23.9 %). Cependant, cette inhibition est non significative, ce résultat pouvant certainement être expliqué par la concentration utilisée. En effet, la dose d'agoniste utilisée (30 μ M) correspond à celle utilisée par Weaver et Cossins (1996) afin d'inhiber le cotransport KCl activé par l'oxygénation ou les catécholamines. Or, le génistein induit également une inhibition des flux de taurine activés par le choc osmotique, mais avec une IC_{50} de 44.4 μ M (Kießling *et al.*, 1997) ceci suggérant que la concentration utilisée lors de cette étude est insuffisante pour affecter les transporteurs activés par le choc osmotique. Cette hypothèse est confirmée par l'emploi de la chébérythrine. En effet, cet inhibiteur des protéines kinases C induit une importante inhibition, non seulement de l'efflux potassique Cl⁻ indépendant mais également du retour au volume de contrôle, ce qui suggère que les transporteurs activés par un choc osmotique sont sous le contrôle d'une phosphorylation.

En conclusion, l'utilisation des inhibiteurs des canaux ioniques de la membrane des érythrocytes de truite lors des processus de RVD induits par un gonflement hypotonique montre que ces canaux participent à la régulation de volume cellulaire. Cependant, la comparaison des inhibitions obtenues lorsque les chocs hypotoniques sont réalisés en présence de Cl⁻ extracellulaire ou lors de son remplacement par du MeSF, montre que ces processus de régulation de volume procèdent par un schéma complexe dans lequel interviennent le cotransport KCl et les canaux ioniques (**Fig. 56.**). Aussi, compte tenu des données pharmacologiques obtenues, il est vraisemblable que la voie de sortie Cl⁻ indépendante de K⁺ soit l'expression du canal cationique non sélectif opérant en parallèle

avec le canal chlore rectifié sortant, afin d'assurer l'électroneutralité des efflux de solutés. Ce canal de la famille ORCC représente également un candidat pour les efflux de taurine généralement associés aux processus de RVD dans l'érythrocyte de truite. De plus, si les expériences conduites en présence des inhibiteurs de la bande 3 suggèrent très fortement un rôle majeur de régulation par cette protéine membranaire, les processus de RVD impliqués dans les voies de sortie dites Cl⁻-indépendantes semblent être sous le contrôle de l'activation par une protéine kinase C.

Conclusions et Perspectives

Ce travail réalisé sur les érythrocytes nucléés de truite a permis, par la technique électrophysiologique de « patch-clamp », de mettre en évidence l'existence de canaux ioniques pour la première fois dans la membrane des érythrocytes nucléés d'un poisson (*Oncorhynchus mykiss*).

La conductance membranaire globale des érythrocytes de truite est dominée par une voie de conductance Cl⁻ rectifiée sortante sensible au DIDS, ainsi que par une voie de conductance cationique non sélective. Ces voies de conductance sont activées de manière réversible lors de l'exposition des globules rouges à des conditions hypotoniques. La caractérisation au niveau unitaire des canaux ioniques responsables de ces courants globaux membranaires montre l'existence d'au moins trois types différents de canaux ioniques dans la membrane des globules rouges de truite : un canal cationique non sélectif (CNS), un canal Cl⁻ de faible conductance (SCC) et un canal Cl⁻ rectifié sortant (ORCC).

Le canal cationique non sélectif est présent dans 91 % des enregistrements effectués en configuration « cell-attached » ou « inside-out ». Ce canal est perméant aux ions K⁺, Na⁺, Ca²⁺, mais est imperméant aux anions et au NMDG. Les relations courant-voltage montrent une conductance de l'ordre de 25-30 pS, avec une légère rectification entrante. Ce canal est sensible au Ba²⁺, au Gd³⁺, à la quinine et à l'acide flufénamique. Il présente également des caractéristiques de mécano-sensibilité, mais ne répond pas complètement à la définition des canaux « stretch-activés » donnée par Sackin (1995). En effet, ce canal CNS est spontanément actif dans 90 % des enregistrements, mais est activable par une dépression sub-atmosphérique dans la pipette dans 10 % des cas. Lorsque le canal est activé par succion, la probabilité d'ouverture du canal devient alors une fonction de la dépression appliquée. Cependant, une partie des canaux activés par cette dépression ne redevient pas inactif une fois la pression relâchée. Aussi, il conviendra de déterminer si les caractéristiques de mécano-sensibilité du canal CNS sont une propriété intrinsèque de la protéine canal ou si

elles résultent des interactions cytosquelette-canal et de la procédure de scellement, qui selon Hamill et McBride (1996), peuvent induire une hyper-mécano-sensibilité des canaux. Aussi, la solubilisation et la reconstitution des protéines membranaires des globules rouges de truite dans des protéoliposomes permettraient de s'affranchir de toute relation avec les éléments du cytosquelette et donc d'étudier les propriétés de mécano-sensibilité du canal CNS.

Le deuxième canal mis en évidence lors de cette étude est un canal Cl^- observé dans 62 % des enregistrements, tant en configuration « cell-attached » qu'en configuration « inside-out ». Ce canal SCC présente une conductance linéaire (7-9 pS) et est inhibé par le NPPB, mais est insensible au DIDS. La forte fréquence d'occurrence de ce canal suggère que sa fonction serait de fixer le potentiel de membrane au potentiel d'équilibre du Cl^- , afin d'annuler tout gradient de Cl^- de part et d'autre de la membrane plasmique et d'assurer ainsi des conditions optimales de fonctionnement à l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Afin de vérifier totalement cette hypothèse, des mesures de variation du potentiel de membrane par la technique de microélectrode intracellulaire seront nécessaires.

Un troisième type de canal a pu être observé lors des enregistrements de l'activité unitaire des canaux ioniques de la membrane des globules rouges. Ce canal est un canal Cl^- présentant une rectification sortante. Il n'est jamais observé en configuration « cell-attached » et n'est activable en configuration « inside-out » qu'après attente. Ce canal de la famille des ORCC n'a pu être observé que dans 5 % des enregistrements et devra faire l'objet d'une étude plus approfondie. En effet, bien que peu caractérisé dans la présente étude, ce canal ORCC présente des similarités avec les canaux Cl^- perméants aux osmolytes organiques (pour revue : Kirk et Strange, 1998). En effet, ces canaux dénommés VSOAC (« Volume Sensitive Organic/Osmolyte Anion Channel ») sont des canaux Cl^- qui présentent une rectification sortante comparable à celle du canal ORCC de la membrane des globules rouges de truite (55 pS). Les VSOAC présentent une forte sensibilité au DIDS et au NPBB, caractéristiques que partage le canal Cl^- de la présente étude. Aussi, afin de déterminer si ce canal répond aux critères de définition des canaux de type VSOAC, il

conviendra de définir la séquence de sélectivité du canal, puisque les canaux de la famille des VSOAC présentent une séquence de sélectivité de type Eisenman I. Il faudra également déterminer la sensibilité de ce canal aux nucléotides (autre caractéristique des canaux VSOAC) et bien entendu s'interroger sur sa perméabilité à la taurine.

Par ailleurs, l'étude approfondie de ce canal pourrait donner des éléments de réponse essentiels quant aux mécanismes d'activation des processus de RVD induits par un gonflement hypotonique. En effet, l'activation des canaux de type VSOAC semble gouvernée par la force ionique interne (Cannon *et al.*, 1998), or celle-ci détermine la configuration Cl^- -dépendante ou Cl^- -indépendante des efflux des ions K^+ , Cl^- et de taurine dans le globule rouge de truite (Motais *et al.*, 1991). De plus, si ce canal présente toutes les caractéristiques précédemment décrites, il pourrait représenter un objet d'étude unique permettant de comprendre le fonctionnement du canal à osmolytes organiques apparaissant lors de l'infection des globules rouges par le *Plasmodium falciparum*. En effet, après l'infection des globules rouges humains par ce parasite, il apparaît une augmentation de la perméabilité de la membrane pour un grand nombre de substrats tant organiques qu'inorganiques (Kirk *et al.*, 1994). Ces études montrent que le passage de solutés s'effectue par un transporteur de type canal à sélectivité anionique. Ce canal est inhibé par les inhibiteurs des canaux Cl^- tels que le NPPB, le niflumate, la glibenclamide, le MK-196, le furosémide et la quinine (pour revue : Ginsburg, 1994 ; Kirk et Strange, 1998). Toutefois, les caractéristiques électrophysiologiques de ce transporteur restent totalement indéterminées.

Le présent travail a également permis de démontrer que les canaux ioniques décrits par les techniques électrophysiologiques participent aux processus de régulation de volume cellulaire faisant suite à un choc hypotonique. En effet, l'utilisation des inhibiteurs des trois types de canaux ioniques décrits a permis de montrer qu'en conditions normoxiques, les processus de RVD de l'érythrocyte de truite procédaient par l'activation de plusieurs voies de sortie de solutés. Bien que l'étude menée dans ce travail n'ait porté que sur la mesure de la restauration du volume cellulaire et de la sortie de K^+ lors d'un choc hypotonique, elle démontre que le cotransport KCl participe aux efflux de K^+ et de Cl^- , mais également que les

canaux ioniques décrits lors des études conduites à l'aide de la technique de « patch-clamp » sont des transporteurs membranaires impliqués dans ces processus.

Les profils pharmacologiques établis par comparaison des processus de RVD en présence de Ringer Cl⁻ hypotonique ou de Ringer MeSF hypotonique (ces dernières conditions permettant de s'affranchir d'un éventuel rôle du cotransport KCl), démontrent que la voie de sortie Cl⁻-indépendante de K⁺ procède par une seule voie de transport sensible au Ba²⁺ (IC₅₀=1.4 mM), indiquant que cette voie de perméation est probablement le canal cationique non sélectif. De plus, l'utilisation du NPPB, qui est un inhibiteur du canal ORCC, montre une très forte sensibilité des processus de RVD à cet agent. Toutefois, l'inhibition observée de la sortie Cl⁻-indépendante de K⁺ en présence de NPPB et des autres inhibiteurs des canaux Cl⁻ provient certainement de l'interdépendance des voies de sortie parallèles anioniques et cationiques afin de satisfaire aux lois de l'électroneutralité.

Comme il a déjà été démontré (Borgese *et al.*, 1987 ; Motais *et al.*, 1991 Fiévet *et al.*, 1995, 1998 ; Motais *et al.*, 1997), les puissants effets inhibiteurs observés en présence des antagonistes de la bande 3 sous-tendent que cet échangeur fondamental pour le rôle respiratoire du globule rouge est une protéine clé de ces processus de régulation de volume, et nécessitera donc une étude plus approfondie. Aussi, afin de s'affranchir du rôle régulateur de la bande 3 dans les processus de RVD, une étude comparative pourrait être menée sur les érythrocytes d'Agnathes. En effet, ces représentants des vertébrés inférieurs sont virtuellement dépourvus d'échangeurs Cl⁻/HCO₃⁻ (Nikinmaa et Railo, 1987 ; Ellory *et al.*, 1987 ; Tufts et Boutillier, 1989). Or, s'il est vrai que les globules rouges de myxines ne présentent pas de capacité à réguler leur volume cellulaire, les érythrocytes des deux espèces de lamproies connues *Lampetra fluviatilis* et *Petromyzon marinus* démontrent des capacités à réguler leur volume cellulaire. Ces deux espèces possèdent des canaux K⁺ visiblement impliqués dans les processus de RVD (Virkki et Nikinmaa, 1998 ; Egée *et al.*, observations non publiées) alors qu'elles possèdent un cotransport KCl (Kirk, 1991b). Ces animaux représentent donc une opportunité unique pour comparer, d'un point de vue fonctionnel mais également phylogénétique, le rôle des différents transporteurs dans les

processus de RVD en absence de toute régulation possible par la bande 3. Par ailleurs, la sensibilité de ces processus de régulation de volume aux inhibiteurs des protéines kinases soulève d'intéressantes questions quant aux relations qui peuvent exister entre les processus de régulation et d'activation du cotransport KCl et des canaux ioniques.

Bibliographie.

Bibliographie

Ackerman, M.J.; Wickman, K.D. ; Clapham, D.E. Hypotonicity activate a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103:153-179; **1994**.

Adragna, N.C. & Lauf, P.K. Quinine and quinidine inhibit and reveal heterogeneity of KCl cotransport in low K sheep erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 142:195-207; **1994**.

Akiyama, T.; Ishida, J. ; Nakagawa, S.; Ogarawa, H.; Watanabe, S.;Itoh, N. ; Shibuya, M. ; Fukima, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262 : 5592-5595 ; **1987**.

Al-Habori, M. Cell volume and ion transport regulation. *Int. J. Biochem.* 26:319-334; **1994**.

Armando-Hardy, M.; Ellory, J.C.; Ferreira, H.G.; Fleminger, S. Inhibition of the calcium-induced increase in the potassium permeability of human red blood cells by quinine. *J. Physiol. (Lond.)* 250:32-33; **1975**.

Armsby, C.C.; Brugnara, C. ; Alper, S.L. Cation transport in mouse erythrocytes: role of K⁺-Cl⁻ cotransport in regulatory volume decrease. *Am. J. Physiol.* 268:C894-C902; **1995**.

Armsby, C.C.; Stuart-Tilley, A.K.; Alper, S.L. ; Brugnara, C. Resistance to osmotic lysis in BDX-31 mouse erythrocytes: association with upregulated K-Cl cotransport. *Am. J. Physiol.* 270:C866-C877; **1996**.

Arreola, J.; Melvin, J.E.; Begenisich, T. Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells. *J. Physiol.* 484:677-687; **1995**.

Ashroft, F.M. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 11:97-118; **1988**.

Banderali, U. & Ehrenfeld, J. Heterogeneity of volume-sensitive chloride channels in basolateral membranes of A6 epithelial cells in culture. *J. Membrane Biol.* 154:23-33; **1996**.

Banderali, U. & Roy, G. Activation of K⁺ and Cl⁻ channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media. *J. Membrane Biol.* 126:219-234; **1992**.

Baroin, A.; Garcia-Romeu, F.; Lamarre, T.; Motaïs, R. A transient sodium-hydrogen exchange system induced by catecholamines in erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Physiol.* 356:21-31; **1984**.

Barry, P.H. JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J. Neurosc. Meths.* 51:107-116; **1994**.

Barry, P.H. & Lynch, J.W. Liquid junction potentials and small effects in patch-clamp analysis. *J. Membrane Biol.* 12:101-117; **1991**.

Bear, C.E. A non selective cation channel in rat liver cells is activated by membrane stretch. *Am. J. Physiol.* 27:C421-C428; **1990**.

Beck, J.S. & Potts, D.J. cell swelling, co-transport activation and potassium conductance in isolated perfused rabbit kidney proximal tubules. *J. Physiol.* 425:369-378; **1990**.

Berenbrik, M.; Weaver, Y.R.; Cossins, A.R. Defining the volume dependence of multiple K flux pathways of trout red blood cells. *Am. J. Physiol.* 272:C1099-C1111; **1997**.

Bergeron, L.J.; Stever, A.J.; Light, D.B. Potassium conductance activated during regulatory volume decrease by mudpuppy red blood cells. *Am. J. Physiol.* 270:R801-R810; **1996**.

Berrier, C.; Coulombe, A.; Szabo, I.; Zoratti, M.; Ghazi, A. Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* 206:559-565; **1992**.

Bianchini, L.; Fossat, B.; Portthé-Nibelle, J.; Ellory, J.C.; Lahlou, B. Effect of hyposmotic shock on ion fluxes in isolated trout hepatocytes. *J. Exp. Biol.* 137:303-318; **1988**.

Bize, I. & Dunham, P.B. Staurosporine, a protein kinase inhibitor, activates K-Cl cotransport in LK sheep erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 266 : C759-C770 ; **1994**.

Borgese, F.; Garcia-Romeu, F.; Motais, R. Catecholamine-induced transport systems in trout erythrocyte. Na⁺/H⁺ countertransport or NaCl cotransport?. *J. Gen. Physiol.* 87:551-556; **1986**.

Borgese, F.; Garcia-Romeu, F.; Motais, R. Control of cell volume and ion transport by β -adrenergic catecholamines in erythrocytes of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Gen. Physiol.* 382:123-144; **1987**.

Borgese, F.; Motais, R.; Garcia-Romeu, F. Regulation of Cl-dependant K transport by oxy-deoxyhemoglobin transitions in trout red cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1066:252-256; **1991**.

Botchkin, L.M. & Matthews, G. Chloride current activated by swelling in retinal pigment epithelium cells *Am. J. Physiol.* 265:C1037-C1045; **1993**.

Bourne, P.K. & Cossins, A.R. On the instability of K⁺ influx in erythrocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and the role of catecholamine hormones in maintaining *in vivo* influx activity. *J. Exp. Biol.* 101:93-104; **1982**.

Bourne, P.K. & Cossins, A.R. Sodium and potassium transport in trout (*Salmo gairdneri*) erythrocytes. *J. Physiol.* 347:361-375; **1984**.

Brugnara, C.; Armsby, C.C.; De Franceschi, L.; Crest, M.; Martin Euclaire, M-F.; Alper, S.L. Ca²⁺ activated K⁺ channels of human and rabbit erythrocytes display distinctive patterns of inhibition by venom peptide toxins. *J. Membrane Biol.* 147:71-82; **1995**.

Burgess, G.M.; Claret, M.; Jenkinson, D.H. Effects of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells. *J. Physiol. (Lond.)* 317:67-90; **1981**.

Bursell, J.D.H. & Kirk, K. Swelling-activated K⁺ transport via two functionally distinct pathways in eel erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 270:R61-R70; **1996**.

Butt, A.G.; Clapp, W.L.; Frizzell, R.A. Potassium conductances in tracheal epithelium activated by secretion and cell swelling. *Am. J. Physiol.* 258:C630-C638; **1990**.

Cabantchik, Z.I. & Greger, R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* 262:C803-C827; **1992**.

Cala, P.M. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells :the membrane potential and its implication regarding the nature of the ion-flux pathways. *J. Gen. Physiol.* 76:683-708; **1980**.

Cala, P.M.; Mandel, L.J.; Murphy, E. Volume regulation by *Amphiuma* red blood cells: cytosolic free Ca²⁺ and alkali metal-H exchange. *Am. J. Physiol.* 250:C423-C429; **1986**.

Caldwell, R.A.; Clemo, H.F.; Baumgarten, C.M. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical consideration. *Am. J. Physiol.* 275:C619-C621; **1998**.

Cannon, C.L.; Basavappa, S.; Strange, K. Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am. J. Physiol.* 275:C416-C422; **1998**.

Chamberlin, M.E. & Strange, K. Anisosmotic cell volume regulation : a comparative view. *Am. J. Physiol.* 257:C159-C173; **1989**.

Chang, D.; Hsieh, P.S.; Dawson, D.C. Calcium: a program in BASIC for calculating the composition of solutions with specified free concentrations of calcium, magnesium and other divalent cations. *Comput. Biol. Med.* 18:351-366; **1988**.

Chang, W. & Loretz, C.A. Activation by membrane stretch and depolarization of an epithelial monovalent cation channel from teleost intestine. *J. Exp. Biol.* 169:87-104; **1992**.

Chang, W. & Loretz, C.A. Identification of a stretch-activated monovalent cation channel from Teleost urinary bladder cells. *J. Exp. Zool.* 259:304-315; **1991**.

Chetrite, G. & Cassoly, R. Affinity of haemoglobin for the cytoplasmic fragment of human erythrocyte membrane bande 3. Equilibrium measurments at physiological pH using matrix-bound proteins: the effects of ionic strength, deoxygenation and of 2,3-diphosphoglycerate. *J. Mol. Biol.* 185:639-644; **1985**.

Christensen, O. Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx trough stretch-activated channels. *Nature* 330:66-68; **1987**.

Christensen, O. & Hoffmann, E.K. Cell swelling activates K^+ and Cl^- channels as well as nonselective, stretch-activated cation channels in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 129:13-36; **1992**.

Christophersen, P. Ca^{2+} -activated K^+ channel from human erythrocytes membranes: single channel rectification and selectivity. *J. Membrane Biol.* 119:75-83; **1991**.

Christophersen, P. & Bennekou, P. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1065:103-106; **1991**.

Claireaux, G.; Thomas, S.; Fiévet, B.; Motais, R. Adaptative respiratory responses of trout to acute hypoxia. II. Blood oxygen carryng properties during hypoxia. *Respir. Physiol.* 74:91-98; **1988**.

Clemo, H.F. & Baumgarten, C.M. Swelling-activated Gd^{3+} -sensitive cation current and cell volume regulation in rabbit Ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 110:297-312; **1997**.

Clemo, H.F.; Stambler, B.S.; Baumgarten, C.M. Persistent activation of a swelling-activated cation current in ventricular myocytes from dogs with tachycardia-induced congestive heart failure. *Circ. Res.* 83:147-157; **1998**.

Colombe, B.W. & Macey, R.Y. Effect of calcium on potassium and water transport in human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta.* 363:226-239; **1974**.

Cossins, A.R. & Gibson, J.S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J. Exp. Biol.* 200:343-352; **1997**.

Cossins, A.R. & Richardson, P.A. Adrenalin-induced Na^+/H^+ exchange in trout erythrocytes and its effects upon oxygen-carrying capacity. *J. Exp. Biol.* 118:229-246; **1985**.

Cossins, A.R.; Weaver, Y.R.; Lykkeboe, G.; Nielsen, O.B. Role of protein phosphorylation in control of flux pathways of trout red blood cells. *Am. J. Physiol.* 267:c1641-c1650; **1994**.

Coulombe, A. & Coraboeuf, E. Large conductance chloride channels of newborn rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media. *Pflügers Arch.* 422:143-150; **1992**.

Cousin, J.L.; Motais, R. The role of carbonic anhydrase inhibitors on anion permeability into ox red blood cells. *J. Physiol.* 256:61-80; **1976**.

Davson, H. The permeability of the erythrocytes to cations. Cold Spring Harbour Symposium *Quantitative Biology* 8:255-268; **1940**.

De Smet, P.; Li, J.; Van Driessche, W. Hypotonicity activates a lanthanide-sensitive pathway for K^+ release in A6 epithelia. *Am. J. Physiol.* 275:C189-C199; **1998**.

Demaurex, N. & Grinstein, S. Na^+/H^+ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *J. Exp. Biol.* 196:389-404; **1994**.

Dempster, J. Computer Analysis of Electrophysiological Signals. Biological techniques Series, Academic Press; **1993**.

Dickman, K.G. & Goldstein, L. Cell volume regulation by skate erythrocytes : role of potassium. *Am. J. Physiol.* 258:R1217-R1223; **1990**.

Diener, M. , Rummel, W. , Mestres, P. & Lindemann, B. Single chloride channels in colon mucosa and isolated colonic enterocytes of the rat. *J. Membrane Biol.* 108, 21-30. **1989**.

Diener, M.; Nobles, M.; Rummel, W. Activation of basolateral Cl⁻ channels in the rat colonic epithelium during volume decrease. *Pflügers Arch.* 421:530-538; **1992**.

Disser, J. & Frömter, E. Intracellular regulation of the outwardly rectifying intermediate conductance Cl⁻ channel in epithelial cell membrane. In Isotonic Transport in Leaky Epithelia, eds. Ussing, H.H., Fishbarg, J., Sten-Knudsen, O., Larsen, E. H. & Willumsen, N. pp. 147-156. Copenhagen : Munksgaard. **1993**.

Dunham, P.B. & Ellory, J.C. Passive potassium transport in low Potassium sheep red cells : dependence upon cell volume and chloride. *J. Physiol. (Lond)* 318:511-530; **1981**.

Ellory, J.C. & Hall, A.C. Human red cell volume regulation in hypotonic media. *Comp. Biochem. Physiol. A* 90:533-537; **1988**.

Ellory, J.C.; Hall, A.C.; Stewart, G.W. Volume sensitive cation fluxes in mammalian red cells. *Mol. Physiol.* 8:235-246; **1985**.

Ellory, J.C.; Kirk, K.; Culliford, S.J.; Nash, G.B.; Stuart, J. Nitrendipine is a potent inhibitor of the Ca²⁺-activated K⁺ channel of human erythrocytes. *FEBS* 296:219-221; **1992**.

Ellory, J.C.; Wolowyk, M.W.; Young, J.D. Hagfish (*Eptatretus stouti*) erythrocytes show minimal chloride transport activity. *J. Exp. Biol.* 129:377-383; **1987**.

Evans, C.H. Biochemistry of the Lanthanides. New York: Plenum Press; **1990**:1-444.

Eveloff, J.L. & Warnock, D.G. Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 252:F1-F10; **1987**.

Falke, L.C.; Missler, S. Activity of ions channels during volume regulation by clonal N1E115 Neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3919-3923; **1989**.

Fiévet, B.; Claireaux, G.; Thomas, S.; Motais, R. Adaptative respiratory response of trout to acute hypoxia.III. Ion movements and pH changes in the red blood cell. *Respir. Physiol.* 74:99-114; **1988**.

Fiévet, B.; Gabillat, N.; Borgese, F.; Motais, R. Expression of band 3 anion exchanger induces chloride current and taurine transport: structure-function analysis. *EMBO J.* 14:5158-5169; **1995**.

Fiévet, B. & Motais, R. Na⁺/H⁺ exchanges and red blood cell functions in fish. In: Gilles, R., ed. *Advances in Comparatives and Environmental Physiology*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; **1991**:79-104.

Fiévet, B.; Motais, R.; Thomas, S. Role of adrenergic-dependent H⁺ release from red cells in acidosis induced by hypoxia in trout. *Am. J. Physiol.* 252:R269-R275; **1987**.

Fiévet, B.; Perset, F.; Gabillat, N.; Guizouarn, H.; Borgese, F.; Ripoche, P.; Motais, R. Transport of uncharged organic solutes in *Xenopus* oocytes expressing red cell anion exchangers (AE1s). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10996-11001; **1998**.

Filipovic, D. & Sackin, H. A calcium-permeable stretch-activated cation channel in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 260:F119-F129; **1991**.

Fincham, D.A.; Wolowyk, M.W.; Young, J.D. Volume-sensitive taurine transport in fish erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 96:45-56; **1987**.

Fischer, H.; Kromer, W.; Clauss, W. Two types of chloride channels in hen colon epithelial cells identified by patch-clamp experiments. *J. Comp. Physiol. B* 161:333-338; **1991**.

Flatman, P.W. Sodium and potassium transport in ferret red cells. *J. Physiol.* 341: 545-557; **1983**.

Force, T. & Bonventre, J. V.. Cellular signal transduction mechanisms. In *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*, ed. Strange, K. , pp. 147-180. Boca Raton: CRC Press, Inc.. **1994**.

Foskett, J. K. & Spring, K. R. Involvement of calcium and cytoskeleton in gallbladder epithelial cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* 248, C27-C36. **1985**.

Foskett, J. K. The role of calcium in the control of regulatory transport pathways. In *Cellular and molecular physiology of cell volume control*, ed. Strange, K. , pp. 259-277. Boca Raton: CRC Press, Inc.. **1994**.

Foskett, J.K. CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* 60:689-717; **1998**.

Freedman, J.C. & Novak, T.S. Electrodifusion, barrier, and gating analysis of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin. *J. Gen. Physiol.* 109:201-216; **1997**.

Freedman, J.C.; Novak, T.S.; Bisognano, J.D.; Pratap, P.R. Voltage dependence of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin. *J. Gen. Physiol.* 104:961-983; **1994**.

Gallardo Romero, M; Guizouarn, H.; Pellissier, B.; Garcia-Romeu, F.; Motaïs, R. The erythrocyte Na⁺/H⁺ exchangers of eel (*Anguilla anguilla*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a comparative study. *J. Exp. Biol.* 199:415-426; **1996**.

Garcia-Romeu, F.; Borgese, F.; Fiévet, B.; Motais, R. A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell. mol. Biol.* 42:985-994; **1996**.

Garcia-Romeu, F.; Cossins, A.R.; Motais, R. Cell volume regulation by trout erythrocytes: characteristics of the transport systems activated by hypotonic swelling. *J.Physiol.* 440:547-567; **1991**.

Gardos, G. The permeability of human erythrocytes to potassium. *Acta Physiologica* 4:184-189; 1958.

Geck, P. Volume regulation in Ehrlich cells. In: Beyenbach, K.W., ed. *Cell Volume Regulation*. Basel: Karger; **1990** :27-58.

Ginsburg, H. Transport pathways in the malaria-infected erythrocyte. Their characterization and their use as potential target for chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1847-1856; **1994**

Gögelein, H. & Capek, K. Quinine inhibits chloride and nonselective cations channels in isolated rat distal colon cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1027:191-198; **1990**.

Gögelein, H.; Dahlem, D.; Englert, H.V.; Lang, H.J. Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Lett.* 268:79-82; **1990**.

Goldstein, L. & Brill, S.R. Volume-activated taurine efflux from skate erythrocytes: possible band 3 involvement. *Am. J. Physiol.* 260:R1014-R1020; **1991**.

Goldstein, L.; Brill, S.R.; Freund, E.V. Activation of taurine efflux in hypotonically stressed elasmobranch cells: inhibition by stilbene disulfonates. *J. Exp. Zool.* 254:114-118; **1990**.

Goldstein, L. & Davis, E.M. Taurine, betaine, and inositol share a volume sensitive transporter in skate erythrocyte cell membrane. *Am. J. Physiol.* 267:R426-R431; **1994**.

Goldstein, L. & Kleinzeller, A. Cell volume regulation in lower vertebrates. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:181-204; **1987**.

Gosling, M.; Smith, J.W.; Poyner, D.R. Characterization of a volume-sensitive chloride current in rat osteoblast-like (ROS 17/2.8) cells. *J. Physiol.* 485:671-682; **1995**.

Graf, J.; Haddad, P.; Haeussinger, D.; Lang, F. Cell volume regulation in liver. *Rev. Physiol. Biochem.* 11:202-220; **1988**.

Gray, M.A.; Harris, A.; Coleman, L.; Greenwell, J.R.; Argent, B.E. Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am. J. Physiol.* 257:C240-C251; **1989**.

Greger, R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol. Rev.* 65:760-797; **1985**.

Grinstein, S. & Smith, J. D. Calcium-independent cell volume regulation in human lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 95, 97-120. **1990**.

Grygorczyk, R.; Schwarz, R.; Passow, H. Ca^{2+} activated K^{+} channels in human red cells. Comparison of single channel current with ion fluxes. *Biophys. J.* 45:693-698; **1984**.

Grygorczyk, R. & Schwarz, W. Properties of the Ca^{2+} -activated K^{+} conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium* 4:499-510; **1983**.

Guharay, F. & Sachs, F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.* 352:685-701; **1984**.

Guizouarn, H. Caractérisation et contrôle des transporteurs membranaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire du globule rouge nucléé. *NICE*: **1992**:1-7

Guizouarn, H.; Harvey, B.J.; Borgese, F.; Gabillat, N.; Garcia-Romeu, F.; Motaïs, R. Volume-activated Cl⁻-independent and Cl⁻-dependent K⁺ pathways in trout red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)* 462:609-626; **1993**.

Guizouarn, H.; Scheuring, U.; Borgese, F.; Motaïs, R.; Garcia-Romeu, F. Effects of anions on Na⁺/H⁺ exchange of trout red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)* 428:78-94; **1990**.

Gunn, R.B.; Dalmark, M.; Tosteson, D.C.; Wieth, J.O. Characteristics of chloride transport in human red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 61:185-206; **1973**.

Gussev, G.P.; Sherstobitov, A.O.; Skulskii, I.A. Potassium transport in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) erythrocytes: evidence for K⁺ channels. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A:569-572; **1992**.

Hall, J.A.; Kirk, J.; Potts, J.R.; Rae, C.; Kirk, K. Anion channel blockers inhibit swelling-activated anion, cation, and nonelectrolyte transport in HeLa cells. *Am. J. Physiol.* 271:C579-C588; **1996**.

Hallows, K.R. & Knauf, P.A. Principles of cell volume regulation. In: Strange, K., ed. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Boca Raton: CRC Press Inc.; **1994**:3-29.

Halm, D.R.; Rechkemmer, G.R.; Schoumacher, R.A.; Fritzzell, R.A. Apical membrane chloride channels in a colonic cell line activated by secretory agonists. *Am. J. Physiol.* 254:C505-C511; **1988**.

Hamill, O.P. Potassium and chloride channels in red blood cells. In: Sackman, N.; Neher, E., eds. Single channels recording. New-York: Plenum; **1983**:451-47

Hamill, O.P. Potassium channel currents in human red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)* 319:97-98; **1981**.

Hamill, O.P.; Lane, J.W.; McBride, D.W.J. Amiloride: a molecular probe for mechanosensitive channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:373-376; **1992**.

Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100; **1981**.

Hamill, O.P. & McBride, D.W.J. Induced membrane hypo/hyper-mechanosensitivity: a limitation of patch-clamp recording. *Annu. Rev. Physiol.* 59:621-631; **1997**.

Hamill, O.P. & McBride, D.W.J. Patch and whole-cell MG currents recorded from BC₃H-1 muscle cells. *Biophys. J.* 64:A93 **1993**.

Hamill, O.P. & McBride, D.W.J. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* 48:231-252; **1996**.

Harvey, B.J. Cross-talk between sodium and potassium channels in tight epithelia. *Kidney Int.* 48:1191-1199; **1995**.

Hille, B. Elementary properties of ions in solution. In: Hille, B., ed. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.; **1992**:261-290.

Hoffmann, E.K. Regulation of cell volume by selective changes in leak permeabilities of Ehrlich ascites tumor cells. In: Jorgensen, C.B.; Skadhauge, E., eds. *Osmotic and Volume Regulation*. Alfred Benzon Symp. XI. Copenhagen: Munksgaard: **1978**:397-417.

Hoffmann, E.K. & Dunham, P.B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int. Rev. of Cytol.* 161:173-262; **1995**.

Hoffmann, E.K. & Kolb, H.A. Mechanisms of activation of regulatory volume responses after swelling. In: Gilles, R.; Hoffmann, E.K.; Bolis, L., eds. Volume and Osmolality Control in Animal Cells. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; **1991**:140-185.

Hoffmann, E.K.; Lambert, I.H.; Simonsen, L.O. Separate Ca^{2+} -activated K^+ and Cl^- transport pathways in Ehrlich Ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 91:227-244; **1986**.

Hoffmann, E.K. & Simonsen, L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol. Rev.* 69:315-382; **1989**.

Hoffmann, E.K.; Simonsen, L.O.; Lambert, I.H. Volume-induced increase of K^+ and Cl^- permeabilities in Ehrlich Ascites tumor cells. Role of internal Ca^{2+} . *J. Membrane Biol.* 78:211-222; **1984**.

Hoffmann, E.K. & Ussing, H.H. Membrane mechanisms in volume regulation in vertebrate cells and epithelia. In: Giebisch, G.H.; Schafer, J.A.; Ussing, H.H.; Kristensen, P., eds. Membrane transport in biology. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; **1992**:317-399.

Hosey, M. M. & Lazdunski, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membrane Biol.* 104, 81-105. **1988**.

Hoyer, J.; Kohler, R.; Distler, A. Mechanosensitive cation channel in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 30:112-119; **1997**.

Hunter, M.J. A quantitative estimate of the non-exchange-restricted chloride permeability of the human red cell. *J. Physiol.* 218:49P **1971**.

Ishikawa, T. & Cook, D.I. Characterization of an outwardly rectifying chloride channel in a human submandibular gland duct cell line (HSG). *Pflügers Arch.* 427:203-209; **1993**.

Ismailov, I.I.; Jovov, B.; Fuller, C.M.; Berdiev, B.K.; Keeton, D.A. ; Benos, D.J. G-protein regulation of outwardly rectified epithelial chloride channels incorporated into planar bilayer membrane. *J. Biol. Chem.* 271:4776-4780; **1996**.

Jackson, P. S. & Strange, K. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. physiol.* C265, 1489-1500. **1993**

Jackson, P.S.; Morrison, R.; Strange, K. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by non hydrolytic ATP binding. *Am. J. Physiol.* 267:C1203-C1209; **1994**.

Jennings, M.L. & Schulz, R.K. Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide. *J. Gen. Physiol* 97:799-818; **1991**.

Jensen, F.B. Influence of haemoglobin conformation, nitrite and eicosanoids on K⁺ transport across the carp red blood cell membrane. *J. Exp. Biol.* 171:349-371; **1992**.

Jensen, F.B. Regulatory volume decrease in carp red blood cells : mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport. *J. Exp. Biol.* 198:155-165; **1995**.

Jorgensen, N.K.; Lambert, I.H.; Hoffmann, E.K. Role of LTD₄ in the regulatory volume decrease response in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 151:159-173; **1996**.

Joyner, S.E. & Kirk, K. Two pathways for choline transport in eel erythrocytes: a saturable carrier and a volume-activated channel. *Am. J. Physiol.* 267:R773-R779; **1994**.

Kaji, D.M. & Tsukitani, Y. Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 260: C176-C180; **1991**.

Kelly, M.E.; Dixon, S.J.; Simms, S.M. Outwardly rectifying chloride current in rabbit osteoclasts is activated by hyposmotic stimulation. *J. Physiol.* 475:377-389; **1994**.

Kelly, S.M. & Macklem, P.T. Direct measurement of intracellular pressure. *Am. J. Physiol.* 260:C652-C657; **1991**.

Kiessling, K.; Cossins, A.R.; Ellory, J.C. Characterization of the volume-sensitive taurine transport pathway in trout red blood cells using protein kinase and phosphatase inhibitors. *J. Physiol.* 499P:24P **1997**.

Kinne, R.K.H. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. *J. Exp. Zool.* 265:346-355; **1993**.

Kirk, J. & Kirk, K. Inhibition of volume-activated I⁻ and taurine efflux from HeLa cells by P-glycoprotein blockers correlates with calmodulin inhibition. *J. Biol. Chem.* 269:29389-29394; **1994**.

Kirk, K. K⁺ transport across the lamprey erythrocyte membrane: characteristics of a Ba²⁺- and amiloride-sensitive pathway. *J. Exp. Biol.* 159:303-324; **1991a**.

Kirk, K. The effect of N-ethylmaleimide on K⁺ and Cl⁻ transport pathways in the lamprey erythrocyte membrane: activation of K⁺/Cl⁻ cotransport. *J. Exp. Biol.* 159:325-334; **1991b**.

Kirk, K.; Ellory, J.C.; Young, J.D. Transport of organic substrates via a volume-activated channel. *J. Biol. Chem.* 267:23475-23478; **1992**.

Kirk, K.; Horner, H.A.; Elford, B.C.; Ellory, J.C.; Newbold, C.I. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J. Biol. Chem.* 269:3339-3347; **1994**.

Kirk, K.; Kirk, J. Volume regulatory taurine release from a human lung cancer cell line: evidence for amino acid transport via a volume-activated chloride channel. *FEBS Lett.* 336:153-158; **1993**.

Kirk, K. & Strange, K. Functional properties and physiological roles of organic solute channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60:719-739; **1998**.

Korbmacher, C.; Volk, T.; Segal, A.S.; Boulpaep, E.L.; Fromter, E. A calcium-activated and nucleotide-activated nonselective cation channel in M1 mouse cortical collecting duct cells. *J. Membrane Biol.* 146:29-45; **1995**.

Kubo, M. & Okada, Y. Volume-regulatory Cl⁻ channel currents in cultured human epithelial cells. *J. Physiol.* 456:351-371; **1992**.

Kunzelmann, K.; Pavenstadt, H.; Greger, R. Properties and regulation of chloride channels in cystic fibrosis and normal airway cells. *Pflügers Arch.* 415:172-182; **1989**.

Kunzelmann, K.; Tilmann, M.; Hansen, C. P.; Greger, R. Inhibition of epithelial chloride channels by cytosol. *Pflügers Arch.* 418: 479-490 ; **1991**.

Lambert, I. H. Eicosanoids and cell volume regulation. In *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*, ed. Strange, K. , pp. 279-298. Boca Raton: CRC Press, Inc.. **1994**.

Lambert, I.H.; Hoffmann, E.K. Cell swelling activates taurine and chloride channels in Ehrlich mause ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 142:289-298; **1994**.

Lang, F.; Busch, G.L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. Functional significance of cell volume Regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78:247-306; **1998**.

Lang, F.; Oberleithner, H.; Kolb, H.A.; Paulmich, M.; Völkl, H.; Wang, W. Interaction of intracellular pH and cell membrane potential. In: Häussinger, D., ed. pH and Homeostasis: Mechanisms and control. San Diego: CA: Academic; **1988**:27-42.

Lansman, J.B.; Hallam, T.J.; Rink, T.J. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325:811-813; **1987**.

Larson, M. & Spring, K.R. Volume regulation in epithelia. *Curr. Top. Membr. Transp.* 30:105-123; **1987**.

Latorre, R. & Miller, C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membrane Biol.* 71:11-30; **1983**.

Lau, K.R.; Hudson, R.L.; Schultz, S.G. Cell swelling induces a barium-inhibitable potassium conductance in the basolateral membrane of *Necturus maculosus* small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3591-3594; **1984**.

Lauf, P.K. Evidence for chloride dependent potassium and water transport induced by hyposmotic stress in erythrocytes of the teleost, *Opsanus tau*. *J. Comp. Physiol.* 146:9-16; **1982**.

Lauf, P.K. Volume and anion dependency of ouabain-resistant K-Rb fluxes in sheep red blood cells. *Am. J. Physiol.* 255:331-339; **1988**.

Lauf, P.K.; Bauer, K.J.; Adragna, N.C.; Fujise, H.; Zade-Oppen, A.M.M.; Ryu, K.H.; Delpire, E. Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am. J. Physiol.* 263:C917-C932; **1992**.

Leaf, A. On the mechanisms of fluid exchange of tissues in vitro. *Biochem. J.* 62:241-248; **1956**.

Lefevre, T.; Coraboeuf, E.; Ghazi, A.; Coulombe, A. Divalent cation channels activated by phethiazines in membrane of rat ventricular myocytes. *J. Membrane Biol.* 147:147-158; **1995**.

Lewis, R.A.; Bursell, J.D.H.; Kirk, K. Anion-selectivity of the swelling-activated osmolyte channel in eel erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 149:103-111; **1996**.

Lewis, R.S.; Ross, P.E.; Cahalan, M.D. Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 101:821-826; **1993**.

Li, J.; De Smet, P.; Jans, D.; Simaels, J.; Van Driessche, W. Swelling-activated cation-selective channel in A6 epithelia are permeable to large cations. *Am. J. Physiol.* 275:C358-C366; **1998**.

Li, M.; McCann, J.D.; Liedtke, C.M.; Nairn, A.C.; Greengard, P.; Welsh, M.J. Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature* 330:752-754; **1988**.

Light, D.B.; Mertins, T.M.; Belongia, J.A.; Witt, C.A. 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid regulate volume decrease by mudpuppy red blood cells. *J. Membrane Biol.* 158:229-239; **1997**.

Liu, Y.; Oiki, S.; Tsumura, T.; Shimizu, T.; Okada, Y. Glibenclamide blocks volume-sensitive Cl⁻ channels by dual mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275:C343-C351; **1998**.

MacKnight, A.D.C. Principles of cell volume regulation. *Renal Physiol. Biochem.* 11:114-141; **1988**.

MacKnight, A.D.C. Volume maintenance in isosmotic conditions. In: Kleinzeller, A., ed. *Current Topics in Membranes and Transport. Cell Volume Control: Fundamental and comparative Aspects in Animal Cells*. New York: Academic Press; **1987**.

MacLeod, R. J. How an epithelial cell swells is a determinant of the signalling pathway that activate RVD. In *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*, ed. Strange, K., pp. 191-200. Boca Raton: CRC Press, Inc.. **1994**.

MacLeod, R.J. & Hamilton, J.R. Separate K⁺ and Cl⁻ transport pathways are activated for regulatory volume decrease in jejunal villus cells. *Am. J. Physiol.* 260:G405-G415; **1991**.

Malapert, M.; Guizouarn, H.; Fiévet, B.; Jahns, R.; Garcia-Romeu, F.; Motais, R.; Borgese, F. Regulation of Na⁺/H⁺ antiporter in trout red blood cells. *J. Exp. Biol.* 200:353-360; **1997**.

Maldonado, H.M.; Cala, P.M. Labeling of the *Amphiuma* erythrocyte K^+/H^+ exchanger with H_2DIDS . *Am. J. Physiol.* 267:C1002-C1012; **1994**.

Marchenko, S.M. & Sage, S.O. A novel mechanosensitive cationic channel from the endothelium of rat aorta. *J. Physiol. (London)* 498:419-425; **1997**.

Marino, D.; Sarkadi, B.; Gardos, G.; Bolis, L. Calcium-induced alkali cation transport in nucleated red cells. *Mol. Physiol.* 1:295-300; **1981**.

Mc Manus, T.J.; Haas, M.; Starke, L.C.; Lytle, C.Y. The duck red cell model of volume-sensitive chloride-dependent cation transport. *Ann. NY. Acad. Sci.* 456:183-186; **1985**.

McCann, J.D.; Li, M.; Welsh, M.J. Identification and regulation of whole-cell chloride currents in airway epithelium. *J. Gen. Physiol.* 94:1015-1036; **1989**.

McCarty, N. A. & O'Neil, R. G. Calcium-dependent control of volume regulation in renal proximal tubule cells: I. Swelling-activated Ca^{2+} entry and release. *J. Membrane Biol.* 123, 149-160. **1991**.

Meyer, K. & Korbmacher, C. Cell swelling activates ATP-dependent voltage-gated chloride channels in M-1 mouse cortical collecting duct cells. . *J. Gen. Physiol* 108:177-193; **1996**.

Mignen, O.; Egée, S.; Pennec, J.P.; Harvey, B.J.; Thomas, S. Outward rectifier chloride channels in the basolateral membrane of crypts isolated from mouse distal colon. *J. Physiol.* 499.P.:30P. **1997**.

Miller, C.; Moczydlowski, E.; Latorre, R.; Phillips, M. Charybdotoxine, a protein inhibitors of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318; **1985**.

Millet, B. & Pickard, B.G. Gadolinium ion is the inhibitor suitable for testing the putative role of stretch-activated ion channels in geotropism and thigmotropism. *Biophys. J.* 53:155a **1988**.

Monaghan, A.S.; Mintenig, G.M.; Sepulveda, F.V. Outwardly rectifying Cl^- channel in guinea pig small intestinal villus enterocytes: effect of inhibitors. *Am. J. Physiol.* 273:G1141-G1152; **1997**.

Moody, W.J. & Bosma, M.M. A nonselective cation channel activated by membrane deformation in oocytes of the Ascidian *Boltenia villosa*. *J. Membrane Biol.* 107:179-188; **1989**.

Morris, C.E. Mechanosensitive ion channels. *J. Membrane Biol.* 113:93-107; **1990**.

Morris, C.E. & Sigurdson, W.J. stretch-inactivated ion channels coexist with stretch-activated ion channels. *Science* 243:807-809; **1989**.

Motais, R.; Fiévet, B.; Borgese, F.; Garcia-Romeu, F. Association of the band 3 protein with a volume-activated, anion and amino acid channel: a molecular approach. *J. Exp. Biol.* 200:361-367; **1997**.

Motais, R.; Fiévet, B.; Garcia-Romeu, F.; Thomas, S. Na^+/H^+ exchange and pH regulation in red blood cells: Role of uncatalyzed H_2CO_3 dehydration. *Am. J. Physiol.* 256:c728-c735; **1989**.

Motais, R.; Guizouarn, H.; Garcia-Romeu, F. Red cell volume regulation : the pivotal role of ionic strength in controlling swelling-dependent transport systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075:169-180; **1991**.

Musch, M.W.; Leffingwell, T.R.; Goldstein, L. Band 3 modulation and hypotonic-stimulated taurine efflux in skate erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 266:R65-R74; **1994**.

Mustafa, T. & Jensen, F.B. Effect of hypoxia on *in vivo* thromboxane and prostacyclin level in arterial blood of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 40:303-306; **1992**.

Mustafa, T. & Srivastava, K.C. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. In: Gilles, R., ed. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Berlin: Springer-Verlag; **1989**:157-207.

Nielsen, O.B. & Lykkeboe, G. In vitro effects of pH and hemoglobin-oxygen saturation on plasma and erythrocyte K⁺ levels in blood from trout. *Am. J. Physiol.* 72(4):1291-1296; **1992**.

Nielsen, O.B.; Lykkeboe, G.; Cossins, A.R. Oxygenation-activated K fluxes in trout red blood cells. *Am. J. Physiol.* 263:C1057-C1064; **1992**.

Nikinmaa, M. The effects of adrenaline on the oxygen transport properties of *salmo gaidneri* blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 71:353-356; **1982**.

Nikinmaa, M. & Railo, E. Anion movements across lamprey (*Lampetra fluviatilis*) red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 899:134-136; **1987**.

Nilius, B.; Eggermont, J.; Voets, T.; Droogmans, G. Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen. Pharmac.* 27:1131-1140; **1996**.

Nishiguchi, E.; Hamada, N.; Shindo, J. Lidocaine action and conformational changes in cytoskeletal protein network in human red blood cells. *Eur. J. Pharmacol.* 286:1-8; **1995**.

Noma, A. & Takano, M. The ATP-sensitive K⁺ channel. *Jap. J. physiol.* 41:177-187; **1991**.

Nonnotte, G. & Truchot, J.P. Cell volume regulation by erythrocytes of the euryhaline fish, *Platichthys flesus*, after hyposmotic stress in bicarbonate/carbon-dioxide-buffered medium. *Cell. Physiol. Biochem.* 2:336-348; **1992**.

Parker, J.C. In defense of cell volume? *Am. J. Physiol.* 265:C1191-C1200; **1993**.

Pasantes-Morales, H. , Muray, R. A., Lilja, L. & Moran, J. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am. J. Physiol.* C266, 165-171. **1994**.

Passow, H. Ion and water permeability of the red blood cell. In: Bishop, C.; Surgenor, D., eds. *The Red Blood Cell*. New York: Academic Press; **1964**:71-145.

Paulais, M. & Teulon, J. A cation channel in the thick ascending limb of Henle's loop of the mouse kidney: inhibition by adenine nucleotides. *J. Physiol. (Lond)* 413:315-327; **1989**.

Payne, J.A.; Lytle, C.; McManus, T.J. Foreign anion substitution for chloride in human red blood cells: effect on ionic and osmotic equilibria. *Am. J. Physiol.* 259:C819-C827; **1990**.

Perlman, D.F.; Musch, M.W.; Goldstein, L. band 3 in cell volume regulation in fish erythrocytes. *Cell. mol. Biol.* 42:975-984; **1996**.

Perry, P.B. & O'Neill, W.C. Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am. J. Physiol.* 265:C763-C769; **1993**.

Pierce, S. K. & Politis, A. D. Ca^{2+} -activated cell volume recovery mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* 52, 27-42. **1990**.

Popp, R.; Hoyer, J.; Meyer, J.; Galla, H.J.; Gögelein, H. Stretch-activated non-selective cation channels in the antiluminal membrane of porcine cerebral capillaries. *J. Physiol. (Lond.)* 454:435-449; **1992**.

Pusch, M. & Jentsch, T.J. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol. Rev.* 74:813-827; **1994**.

Rabe, A.; Disser, J.; Frömter, E. Cl^- channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl^- channel. *Pflügers Arch.* 429:659-662; **1995**.

Rand, R.P. & Burton, A.C. Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. *Biophys. J.* 4:115-135; **1964**.

Richards, N.W. & Dawson, D.C. Single potassium channels blocked by lidocaine and quinidine in isolated turtle colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 251:C85-C89; **1986**.

Robson, L. & Hunter, M. Identification of a cation non-selective channel in the basolateral membrane of single proximal tubule cells isolated from frog kidney. *J. Physiol.* 499.P.:56P **1997**.

Robson, L. & Hunter, M. Role of cell volume and protein kinase C in regulation of a Cl⁻ conductance in single proximal tubule cells of *Rana temporaria*. *J. Physiol.* 480:1-7; **1994**.

Roy, G. & Malo, C. Activation of amino acid diffusion by a volume increase in cultured kidney (MDCK) cells. *J. Membrane Biol.* 130:83-90; **1992**.

Roy, G.; Sauvé, R. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membrane Biol.* 100:83-96; **1987**.

Sackin, H. A stretch-activated K⁺ channel sensitive to cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1731-1735; **1989**.

Sackin, H. Mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Physiol* 57:333-353; **1995**.

Sackin, H. Stretch-activated ion channels. In: Strange, K., ed. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume regulation. Boca Raton, : CRC Press Inc.; **1994**:215-240.

Sakaguchi, M.; Matsuura, H.; Ehara, T. Swelling-induced Cl⁻ current in guinea-pig atrial myocytes: inhibition by glibenclamide. *J. Physiol. (Lond.)* 505.1:41-52; **1997**.

Sakaguchi, M.; Matsuura, H.; Ehara, T. Swelling-induced Cl⁻ current in guinea-pig atrial myocytes: inhibition by glibenclamide. *J. Physiol. (Lond.)* 505.1:41-52; **1997**.

Sarkadi, B. & Parker, J.C. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071:407-427; **1991**.

Schwiebert, E.M.; Gruenert, D.C.; Guggino, W.B.; Stanton, B.A. G protein G i-2 inhibits outwardly rectifying chloride channels in human airway apithelial cells. *Am. J. Physiol.* 269:C451-C456; **1995**.

Solc, C. & Wine, J.J. Swelling-induced and depolarisation-induced Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 261:C658-C674; **1991**.

Strange, K.; Emma, F.; Jackson, P.S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.* 270:C711-C730; **1996**.

Strange, K.; Morrison, R.; Shrode, L.; Putnam, R. Mechanism and regulation of swelling-activated inositol efflux in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 265:C244-C256; **1993**.

Sturgess, N.C.; Hales, C.N.; Ashford, M.L.J. Calcium and ATP regulate the activity of a non selective cation channel in a rat insulinoma cell line. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 409:607-615; **1987**.

Taglietti, V. & Toselli, M. A study of stretch-activated channels in the membrane of frog oocytes: interactions with Ca²⁺ ions. *J. Physiol. (Lond.)* 407:311-328; **1988**.

Thomas, S. Variations des caractéristiques acido-basiques du compartiment extracellulaire plasmatique chez un organisme à rpiration aquatique : Etude chez *Salmo gairdneri* R des modifications apportées par le changement de certaines caractéristiques du milieu extérieur (PwO₂, PwCO₂, pH et composition ionique). **1982**:

Thomas, S.; Fiévet, B.; Claireaux, G.; Motais, R. Adaptative respiratory responses of trout acute hypoxia. I. Effects of water ionic composition on blood acid-base status response and gill morphology. *Respir. Physiol.* 74:77-90; **1988**.

Thoroed, S.M. & Fugelli, K. Free amino compound and cell volume regulation in erythrocytes from different marine fish species under hypoosmotic conditions : the role of a taurine channel. *J. Comp. Physiol. B.* 164:1-10; **1994**.

Tilly, B.C.; van den Berghes, N.; Tertoolen, L.G.J.; Edixhoven, M.J.; De Jonge, H.R. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J. Biol. Chem.* 268:19919-19922; **1993**.

Tilman, M.; Kunzelmann, K.; Frobe, U.; Cabantchik, Z.I.; Lang, H.J.; Englert, H.C.; Greger, R. Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Pflügers Arch.* 418:556-563; **1991**.

Tosteson, D.C. & Hoffman, J.F. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* 44:169-194; **1960**.

Tseng, G. Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells : evidence for a volume-sensitive Cl channel. *Am. J. Physiol.* 262:C1056-C1068; **1992**.

Tufts, B.L. & Boutilier, R.G. The absence of rapid chloride/ bicarbonate exchange in lamprey erythrocytes: implications for CO₂ transport and ion distributions between plasma and erythrocytes in the blood of *Petromyzon marinus*. *J. Exp. Biol.* 144:565-576; **1989**.

Uhl, J.; Murer, H.; Kolb, H.A. Hypotonic shock evokes opening of Ca²⁺-activated K channels in opossum kidney cells. *Pflügers Arch.* 412:551-553; **1988**.

Ussing, H.H. Active and passive transport of the alkali metal ions. In: Ussing, H.H.; Kruhoffer, P.; Hess, J.; Thorn, N.A., eds. *The Alkali Metal Ions in biology*. Berlin: Springer-Verlag; **1960**:45-143.

Van den Abbeele, T.; Tran Ba Huy, P.; Teulon, J. A calcium-activated nonselective cationic channel in the basolateral membrane of outer hair cells of the guinea-pig cochlea. *Pflügers Arch.* 417:56-63; **1994**.

Virkki, L. & Nikinmaa, M. Two distinct K⁺ channels in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) erythrocyte membrane characterized by single channel patch clamp. *J. Membrane Biol.* 163:47-53; **1998**.

Virkki, L.V. & Nikinmaa, M. Conductive ion transport across the erythrocyte membrane of lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in isotonic conditions is mainly via an inwardly rectifying K⁺ channel. *Comp. Biochem. Physiol.* 115:169-176; **1996**.

Virkki, L.V.; Nikinmaa, M. Regulatory volume decrease in lamprey erythrocytes: mechanisms of K⁺ and Cl⁻ loss. *Am. J. Physiol.* 268:R590-R597; **1995**.

Volk, T.; Rabe, A.; Korbmacher, C. Glibenclamide inhibits an outwardly rectifying chloride channel in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 5:222-231; **1995**.

Wangemann, P.; Wittner, M.; Di Stefano, A.; Englert, H. C.; Lang, H. J.; S.; Schlatter, E. & Greger, R. Cl⁻-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship. *Pflügers Arch.* 407S2: 128-141; **1986**.

Weaver, Y.R. & Cossins, A.R. Protein tyrosine phosphorylation and the regulation of KCl cotransport in trout erythrocytes. *Pflügers Arch.* 432: 727-734 ; **1996**.

Welsh, M.J. & Liedtke, C.M. Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia. *Nature* 332:467-470; **1986**.

Worrell, R.T.; Butt, A.G.; Cliff, W.H.; Fritzzell, R.A. A volume-sensitive chloride conductance in human colonic cell line T-84. *Am. J. physiol.* 256:C1111-C1119; **1989**.

Xu, B. & Lu, L. Protein Kinase A-regulated Cl⁻ channel in ML-1 human hematopoietic myeloblasts. *J. Membrane Biol.* 142:65-75; **1994**.

Xu, W.X.; Kim, S.J.; Kang, T.M.; Rhee, J.C.; Kim, K.W. Volume-sensitive chloride current activated by hyposmotic swelling in antral gastric myocytes of the guinea-pig. *Pfugers Arch.* 435:9-19; **1997**.

Yamazaki, J. & Hume, J.R. Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regularor, swelling-activated, and Ca^{2+} -activated Cl^- channels in mammalian cardiac myocytes. *Circ. Res.* 81:101-109; **1997**.

Yang, X. & Sachs, F. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243:1068-1071; **1989**.

Yeh, T.; Van den Abbeele, T.; Marianovski, R.; Herman, P.; Tran Ba Huy, P. Luminal non selective cation and outwardly rectifying chloride channels in cultured stria marginal cells from gerbil. *Hear. Res.* 90:79-88; **1995**.

Yeh, T.H.; Herman, P.; Tsai, M.C.; Tran Ba Huy, P.; Van den Abbeele, T. a cationic nonselective stretch-activated channel in the Reissner's membrane of the guinea pig cochlea. *Am. J. Physiol.* 274:C566-C576; **1998**.

Yeh, T.H.; Tsai, M.C.; Lee, S.Y.; Hsu, M.M.; Tra Ba Huy, P. Stretch-activated nonselective cation, Cl^- and K^+ channels in apical membrane of epithelial cells of Reissner's membrane. *Hear. Res.*109:1-10; **1997**.

PUBLICATIONS



Fish Red Blood Cells: Characteristics and Physiological Role of the Membrane Ion Transporters

Serge Thomas and Stéphane Egée

C.N.R.S., UNITÉ DE RECHERCHE EN PHYSIOLOGIE CELLULAIRE, UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE,
BREST, FRANCE

ABSTRACT. Several membrane ion transporters playing a role in gas transport and exchanges, cell volume regulation and intracellular acid-base regulation have been identified in fish red blood cells (RBCs). This short review focuses on Na^+/K^+ ATPase and its role in establishing the ionic gradients across the membrane, on the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and its key role in respiration and possibly in inducing a chloride conductance, on the Na^+/H^+ exchanger and the recent advances on its molecular mechanisms of activation and regulation, on the different types of K-Cl cotransports, the different hypotheses and suggested models and their role in cell volume regulation. There is no evidence in the literature for ionic channels in fish RBCs. We present original data obtained with the patch-clamp technique that shows for the first time the existence of a DIDS-sensitive chloride anionic conductance measured in whole cell configuration and the presence of a stretch-activated non-selective cationic channel recorded in cell-attached and excised inside-out configuration. The part played by these ionic conductances is discussed in relation with their possible involvement in volume regulation. COMP BIOCHEM PHYSIOL 119A;1:79–86, 1998. © 1998 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS. Fish, red blood cells, Na^+/K^+ ATPase, Na^+/H^+ exchanger, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanger, KCl cotransporter, chloride current, cationic channels, cell volume

INTRODUCTION

The transport of oxygen (O_2) and carbon dioxide (CO_2) within the blood are intricately related to the electrolytes and acid-base status of the red blood cells (RBCs), which are themselves strongly dependent on the permeability properties of the membrane. Indeed, whereas O_2 and CO_2 are able to cross the cell membranes by solubility/diffusion processes according to their gradients of partial pressure, the organic and inorganic substances influencing the electrolytes and acid-base status diffuse very slowly across the lipid bilayer of the membrane and therefore must follow specific pathways. There is eventually a limited range of means by which solutes move across the RBC membrane and thus influence the gaseous exchanges (Fig. 1). This article exclusively focuses on ionic movements, underlines the main characteristics of their transporters or conductive pathways in fish RBC and addresses some of the more controversial and poorly understood aspects of their regulation and physiological role. These aspects are considered from the double standpoint of the implication of ionic movements in upholding the electrolytic and acid-base steady state corresponding to intracellular homeostasis and of their participa-

tion in the processes of regulation activated as soon as this steady state is disrupted.

Among the different types of ion transports known in animal cells, those documented up to now in fish RBCs result from the activity of transporters belonging to two major families: primary active and energy-consuming Na^+/K^+ ATPase and the secondary active transporters, labeled as exchangers (or antiports) and cotransports (or symports) according to the relative direction of the solutes. Na^+/K^+ ATPase is an electrogenic pump, whereas the transport processes of the second family (Na^+/H^+ exchanger, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger and K^+-Cl^- cotransporters) are electrically silent. There is no evidence in the literature for ionic channels in fish RBCs. Most of the abovementioned ion pathways have been observed in other vertebrates with few exceptions and are shared by both anucleated and nucleated RBCs. However, many other ion pathways exist and have been described in other vertebrates; ionic channels in particular are present in human and frog RBCs.

The information available today about ion movements in fish RBCs was provided mostly by tracer flux studies and therefore did not give much detail on the nature of the ion pathways. The technique of extracellular patch-clamp has never been used in fish RBCs, even though the pioneer works of Hamill (25) have shown that its high temporal and spatial resolution provide a unique opportunity to extend the knowledge of RBC permeabilities to the molecular level.

Address reprint requests to: S. Thomas, U.R.P.C., U.F.R. des Sciences et Techniques, B.P. 809, 29285 Brest cedex, France. Tel. (33) 298-01-62-63; Fax (33) 298-01-67-85; E-mail: serge.thomas@univ-brest.fr.

Received 25 June 1996; accepted 19 November 1996.

Volume-activated DIDS-sensitive whole-cell chloride currents in trout red blood cells

Stéphane Egée*, Brian J. Harvey† and Serge Thomas*‡

*CNRS, Unité de Recherche en Physiologie Cellulaire, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France and †Cellular Physiology Research Unit, University College Cork, Cork, Eire

1. The nystatin-perforated whole-cell recording mode of the patch-clamp technique was used to investigate the membrane conductance of trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells in the steady state, 5 min after exposure to hyposmotic medium and 10 min after return to normal isosmotic medium.
2. Whole-cell I - V relations showed outward rectification when red blood cells were bathed in isosmotic (320 mosmol l^{-1}) saline solution and the patch pipette was filled with 117 mM KCl. The membrane conductance was 2.58 ± 0.59 nS (number of experiments, $n = 18$) between 0 and 100 mV and 1.32 ± 0.19 nS ($n = 18$) between 0 and -100 mV. Removal of Cl^{-} from the extracellular side or incubation with the Cl^{-} channel blocker DIDS caused a reduction in whole-cell membrane conductance by more than 50%, indicating that the membrane current was generated by Cl^{-} ions. The remaining conductance was voltage independent and probably due to non-selective cation conductance.
3. The membrane conductance increased approximately 2-fold after cell swelling induced by exposure to hyposmotic saline solution (215 mosmol l^{-1}). This effect was abolished in Cl^{-} -free hyposmotic medium or in the presence of DIDS.
4. The return to isosmotic solution produced a fall in membrane conductance to, or below, control values.
5. We conclude that trout red blood cells possess a significant Cl^{-} conductance in the steady state which is reversibly activated during cell swelling and contributes to volume recovery.

Trout red blood cells (RBCs) regulate their volume after swelling by rapidly losing internal osmolytes accompanied by water. Swelling may result from water movement into the cell after exposure to hyposmotic medium or it can be initiated following addition of catecholamine to the cell suspension (Borgese, Garcia-Romeu & Motais, 1987). In the latter case swelling results from the net influx of NaCl due to β -adrenergic stimulation of Na^{+} - H^{+} exchange and associated activation of Cl^{-} - HCO_3^{-} exchange (Baroin, Garcia-Romeu, Lamarre & Motais, 1984; Cossins & Richardson, 1985). In the case of hyposmotic swelling, recovery of normal cell volume (regulatory volume decrease, RVD) is dependent on the efflux of K^{+} and Cl^{-} . In this case, the K^{+} movement is not affected by replacement of Cl^{-} by NO_3^{-} (Garcia-Romeu, Cossins & Motais, 1991). On the contrary, the K^{+} loss resulting from the activation of the Na^{+} - H^{+} exchanger is Cl^{-} dependent and replacement of Cl^{-} by NO_3^{-} reduces the K^{+} loss (Borgese *et al.* 1987). Guizouarn, Harvey, Borgese, Gabillat, Garcia-Romeu & Motais (1993) have proposed that both pathways are mediated by coupled K^{+} and anion transport and microelectrode measurements before and after hyposmotic cell swelling have shown that

the membrane potential remains unchanged. To account for this finding, either the Cl^{-} independent K^{+} loss occurs via electroneutral K^{+} - Cl^{-} cotransport pathways, or via K^{+} - H^{+} and Cl^{-} - HCO_3^{-} exchange. It may also be possible for KCl loss to occur via K^{+} and Cl^{-} conductive pathways without changing membrane potential, given the influence of the Donnan effect to impose the membrane potential (E_m) close to Cl^{-} equilibrium potential (E_{Cl}). Cotransport pathways have been shown in bird (Kregenow, 1971, 1981; McManus & Schmidt, 1978), in fish (Lauf, 1982; Bourne & Cossins, 1984) and mammalian (Dunham & Ellory, 1981; Kaji, 1986) erythrocytes (for review see Lauf *et al.* 1992). These cotransporters are inhibited by the loop diuretics bumetanide and furosemide (frusemide) and by the stilbene derivatives SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene) and DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid). Cell swelling has been shown simultaneously to activate K^{+} - H^{+} and Cl^{-} - HCO_3^{-} exchangers in *Amphiuma* red blood cells (Cala, 1983, 1986). In contrast to these electroneutral mechanisms, very little is known about the involvement of conductive pathways in volume regulation in erythrocytes. Patch-clamp studies in frog erythrocyte

‡To whom correspondence should be addressed.

Chloride and non-selective cation channels in unstimulated trout red blood cells

Stéphane Egée, Olivier Mignen, Brian J. Harvey* and Serge Thomas

*CNRS, Unité de Recherche en Physiologie Cellulaire, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France and *Cellular Physiology Research Unit, University College Cork, Cork, Ireland*

(Received 6 October 1997; accepted after revision 19 May 1998)

1. The cell-attached and excised inside-out configurations of the patch-clamp technique were used to demonstrate the presence of two different types of ion channels in the membrane of trout red blood cells under isotonic and normoxic conditions, in the absence of hormonal stimulation. The large majority (93 %) of successful membrane seals allowed observation of at least one channel type.
2. In the cell-attached mode with Ringer solution in the bath and Ringer solution, 145 mM KCl or 145 NaCl in the pipette, a channel of intermediate conductance (15–25 pS at clamped voltage, $V_p = 0$ mV) was present in 85 % of cells. The single channel activity reversed between 5 and 7 mV positive to the spontaneous membrane potential. A small conductance channel of 5–6 pS and +5 mV reversal potential was also present in 62 % of cells.
3. After excision into the inside-out configuration (with 145 mM KCl or NaCl, pCa 8 in the bath, 145 mM KCl or NaCl, pCa 3 in the pipette) the intermediate conductance channel was present in 439 out of 452 successful seals. This channel was spontaneously active in 90 % of patches and in the other 10 % of patches the channel was activated by suction. The current–voltage relationship showed slight inward rectification. The channel conductance was in the range 15–20 pS between –60 and 0 mV and increased to 25–30 pS between 0 and 60 mV, with a reversal potential close to zero. Substitution of K^+ for Na^+ in the pipette or in the bath did not significantly change the single channel conductance. Dilution of the bathing solution KCl concentration shifted the reversal potential towards the Nernst equilibrium for cations. Substitution of *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) for K^+ or Na^+ in the bath almost abolished the outward current whilst the divalent cation Ca^{2+} permeated the channel with a higher permeability than K^+ and Na^+ . Inhibition of channel openings was obtained with flufenamic acid, quinine, gadolinium or barium. Taken together these data demonstrate that the intermediate conductance channel belongs to a class of non-selective cation (NSC) channels.
4. In excised patches, under the same control conditions, the conductance of the small conductance non-rectifying channel was 8.6 ± 0.8 pS ($n = 12$) between –60 and +60 mV and the reversal potential was close to 0 mV. This channel could be blocked by 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB) but not by flufenamic acid, DIDS, barium or gadolinium. Selectivity and substitution experiments made it possible to identify this channel as a non-rectifying small conductance chloride (SCC) channel.

The permeability properties of the red blood cell (RBC) membrane govern its electrolyte and acid/base status and directly influence the transport of oxygen and carbon dioxide within the blood. The organic and inorganic substances influencing the electrolyte and acid/base status diffuse very slowly across the lipid bilayer of the membrane and must therefore follow specific pathways. There are a limited range of transporters by which solutes move across the red blood cell membrane. Among them, ionic channels are present in

human and frog RBCs, but very little is known about conductive pathways in erythrocytes in general. The first patch-clamp study of human RBCs was made by Hamill (1981) who showed the appearance of a K^+ current following inhibition of Ca^{2+} efflux by biochemical treatments previously described by Gardos (1958). Evidence for K^+ and Cl^- channels in the frog erythrocyte was also given by Hamill (1983), indicating two classes of K^+ channels with different Ca^{2+} sensitivities and a Cl^- channel. More recently, an

**OUTWARD RECTIFIER CHLORIDE CHANNEL
IN TROUT RED BLOOD CELL MEMBRANE**

STÉPHANE EGEE, OLIVIER MIGNEN and SERGE L.Y. THOMAS

Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 9042,
Station Biologique, Place G.Teissier, B.P.74, 29682 ROSCOFF cedex FRANCE

SOUMIS

Address all correspondence to S.Thomas:
U.R.P.C.
Station Biologique, Place G.Teissier,
B.P.74, 29682 ROSCOFF cedex FRANCE
Tel: (33) 298 01 62 63
Fax: (33) 298 01 67 85
E-mail: serge.thomas@univ-brest.fr

Key Words: Red Blood Cells, Ionic Channels,

Running Title: CHLORIDE CHANNELS IN TROUT RED BLOOD CELLS

SUMMARY

- 1- The excised inside-out configuration of the patch-clamp technique was used to demonstrate the presence of DIDS- and NPPB-sensitive chloride channels in the membrane of trout red blood cells.
- 2- After excision into the inside-out configuration (with 145 mM KCl or NaCl, pCa 8 in the bath, 145 mM KCl in the pipette) the channel was not spontaneously active. It was identified in 5% of the patches but only after a lag period of 10-20 min and application of depolarizing voltage steps of -60 mV.
- 3- The channel slope conductance was 24.3 ± 1.3 pS (n=6) between -60 mV and E_r and it was 54.5 ± 1.1 pS (n=6) for positive membrane potential between E_r and +60 mV; near zero the slope conductance was 33.8 ± 5.2 pS (n=6).
- 4- Substitution of K^+ for Na^+ in the bath did not significantly change the single channel conductance, but dilution of the bathing solution KCl concentration shifted the reversion potential towards the calculated Nernst equilibrium for Cl^- . The channel was anion selective with a permeability ratio P_{cl}/P_{cation} of 3.7 ± 0.1 (n=6).
- 5- In the excised inside-out configuration, the channel was inhibited by Cl^- channel blockers: 50 μ M 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate (NPPB), and 100 μ M 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in the bathing solution.
- 6- The present data are sufficient to denote this channel as an outward rectifier chloride channel (ORCC).