

TER de physiologie

Travaux pratiques

étude du couplage stimulation adrénergique- contraction d'anneaux isolés d'aorte de rats

introduction	2
Le couplage électromécanique	2
Le couplage pharmacomécanique	2
principe et déroulement du TP	3
principe	3
déroulement	3
compte-rendu	5

introduction

La contraction du muscle lisse vasculaire est contrôlé par de nombreux messagers extracellulaires grâce à une interaction spécifique avec des récepteurs présents sur la membrane plasmique de la cellule musculaire lisse. La transduction du message extracellulaire responsable de la contraction aboutit à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium, elle-même responsable de l'activation de l'appareil contractile et par conséquent de la contraction du muscle lisse. L'ensemble de ces phénomènes constitue le couplage excitation-contraction.

Les muscles lisses comme celui présent dans l'aorte présentent globalement 2 types de couplage excitation-contraction :

un **couplage électromécanique** et un **couplage pharmacomécanique**.

Le couplage électromécanique

Il fait intervenir une dépolarisation membranaire responsable de la contraction. En effet, cette dépolarisation, liée à l'ouverture de canaux ioniques, active les canaux calciques dépendants du potentiel (VOC voltage-operated channels) présents sur le sarcolemme. L'ouverture de ces canaux induit directement une augmentation de la concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_i$). Cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ peut être amplifiée par l'ouverture de canaux calciques du réticulum sarcoplasmique sensibles au calcium, les récepteurs-canaux à la ryanodine (RyR) (phénomène de libération autocatalytique de Ca^{2+} ou Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release).

Expérimentalement, le couplage électromécanique peut être mis en évidence en dépolarisant la membrane plasmique avec une solution extracellulaire hyperpotassique.

Le couplage pharmacomécanique

Le couplage pharmacomécanique – appelé aussi couplage chimio-mécanique – ne fait pas nécessairement intervenir de dépolarisation préalable. En effet, la liaison d'un agoniste avec son récepteur membranaire peut entraîner une série de réactions enzymatiques aboutissant à une augmentation $[Ca^{2+}]_i$ sans dépolarisation. Ce type de couplage passe principalement par l'activation d'une PLC et la production d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3). L' IP_3 , en agissant sur les récepteurs-canaux à l' IP_3 , entraîne la libération de calcium du RS et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$.

Par exemple, la vasoconstriction induite par l'angiotensine 2 ou l'endothéline fait intervenir la production d' IP_3 .

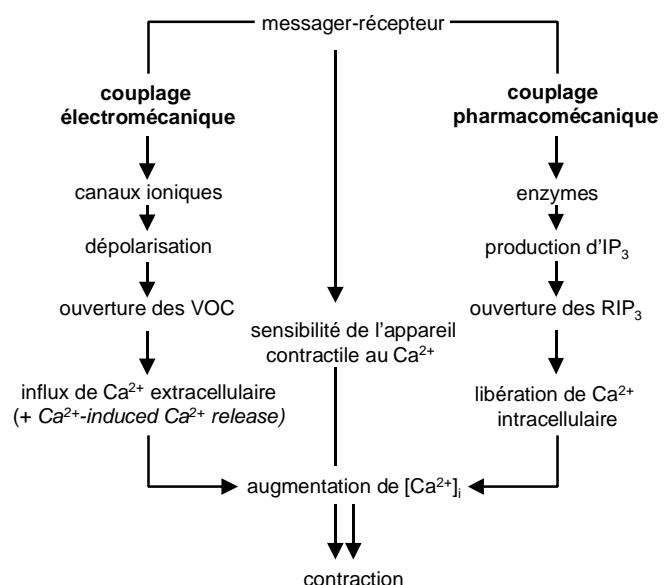


figure 1 : mécanismes d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ impliqués dans les couplages électromécanique et pharmacomécanique

L'action vasoconstrictrice directe de l'acétylcholine (ACh) sur la cellule musculaire lisse fait également intervenir le couplage pharmacomécanique.

En fait, dans la plupart des cas, les 2 types de couplage sont associés à une stimulation. Un des moyens expérimentaux permettant de voir si, en plus d' un couplage électromécanique, un couplage pharmacomécanique existe, consiste à bloquer les canaux calciques dépendants du potentiel. Dans ces conditions, toute contraction induite par une stimulation n'est due qu' à un couplage pharmacomécanique.

De plus, un agoniste contractant peut également induire une augmentation de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} . Pour une valeur de $[Ca^{2+}]_i$ donnée, l'intensité de la contraction sera augmentée.

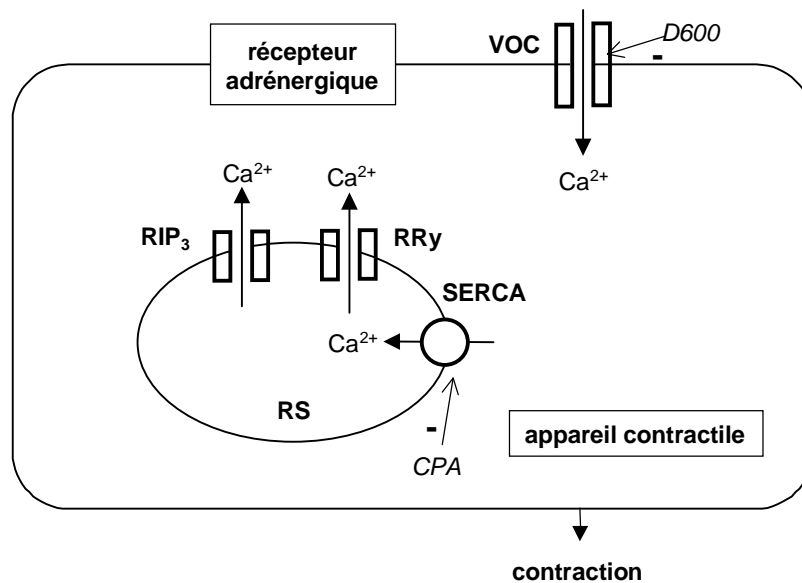


figure 2 : schéma simplifié d'une cellule musculaire lisse vasculaire et des structures potentiellement impliquées dans la réponse à la stimulation adrénergique

principe et déroulement du TP

principe

Le but de ce TP est de déterminer le(s) type(s) de couplage impliqué(s) dans la réponse de l'aorte à la noradrénaline. Pour cela, on va mesurer la contraction isométrique de 2 anneaux isolés d'aorte de rat montés dans des cuves à organes isolés. Une série d'expériences sera réalisée sur l'anneau 1, et une autre sur l'anneau 2.

déroulement

calibrage et réglage de l'appareil

Le capteur de tension génère une variation de potentiel proportionnelle à la tension à laquelle il est soumis. La première opération à effectuer est de calibrer le capteur de tension afin d' exprimer la contraction en grammes. Pour faire ceci, vous devez prendre des masses et les accrocher au capteur. Faites ceci avec 2 masses différentes (2 et 4 g). Notez la valeur de potentiel correspondant aux poids, et déterminez la relation poids-voltage (de l' ordre de 400 mV par gramme).

montage des anneaux

Après anesthésie de l'animal, l'aorte sera prélevée par un enseignant. Les anneaux préparés seront montés par les étudiants dans les cuves à organes isolés.

Les cuves devront être préalablement remplies (10 mL) de solution physiologique (Krebs Hepes-Bicarbonate).

Attention : les capteurs de force sont très fragiles – et très onéreux. Il est impératif d'effectuer le montage des anneaux avec la plus grande précaution, et d'éviter toute surcharge aux capteurs de force.

Pour obtenir une contraction suffisamment importante (cf. courbe tension-longueur), il est tout d'abord nécessaire de précharger la préparation par un étirement raisonnable (sous contrôle d'un enseignant). Cette précharge (3 g environ) va entraîner dans un premier temps une forte augmentation de la force développée (étirement instantané des éléments élastiques) suivie d'un allongement, beaucoup plus lent, des fibres musculaires lisses de la paroi (relaxation de contrainte). Il est donc nécessaire d'attendre environ 1 heure avant de commencer les expériences proprement dites.

Calcul et préparation des solutions

Vous aurez à utiliser les produits suivants aux concentrations suivantes (concentration finale dans cuve) en injectant à chaque fois **100 µL de solution-mère**.

produits	concentration finale (volume final : 10 mL)
noradrénaline	10^{-6} M
D-600	10^{-5} M

Pendant la stabilisation, déterminez les concentrations des solutions-mères à utiliser au cours du TP, et préparez-les.

D'autre part, la première expérience consistera à dépolariser le tissu avec une solution extracellulaire hyperpotassique de 80 mM de potassium. Sachant que la concentration intracellulaire de potassium est d'environ 130 mM, calculez la valeur approximative de la dépolarisation provoquée par la solution hyperpotassique.

expériences sur l'anneau 1

stimulation par une solution de KCl 80 mM

Remplissez la cuve avec une solution contenant 80 mM de KCl. Qu'observez-vous ?

Effet du D-600 sur la contraction induite par le KCl 80 mM

Lorsque l'état stable est atteint, appliquez 1 ml d'une solution-mère de D-600 de façon à avoir une concentration finale dans la cuve de 10^{-5} M. (Le D-600 est un bloqueur des canaux calciques activés par le voltage). Qu'observez-vous ?

Lavez et rincez 1 fois. Attendez ½ heure avant d'entamer l'expérience suivante.

Effet de l'acide cyclopiazonique (CPA) et de l'absence de Ca^{2+} extracellulaire sur la contraction à la NA

Remplissez les cuves avec une solution sans Ca^{2+} extracellulaire et contenant 0,5 mM d'EGTA (l'EGTA est un chélateur du Ca^{2+}).

Injecter 10^{-6} M (concentration finale dans la cuve) de CPA (le CPA est un inhibiteur des SERCA. Son application entraîne une vidange progressive des réservoirs calciques intracellulaires). Attendez ¼ d'heure.

Appliquez 10^{-6} M (concentration finale dans la cuve) de noradrénaline. Qu'observez-vous ?

expériences sur l'anneau 2

stimulation par la noradrénaline

Appliquez 10^{-6} M (concentration finale dans la cuve) de noradrénaline. Qu'observez-vous ?

Lavez et rincez 1 fois. Attendez ½ heure avant d'entamer l'expérience suivante.

Effet du D-600 sur la contraction isométrique à la noradrénaline

Injectez 10^{-5} M (concentration finale dans la cuve) de D-600. Attendez 5 minutes puis appliquez 10^{-6} M (concentration finale dans la cuve) de NA. Qu'observez-vous ?

Démontage des anneaux et rinçage des installations

À la fin des expériences, vous devez démonter **délicatement** les anneaux en faisant attention à **ne pas abîmer les capteurs de force**, et vous devez rincer les cuves à l'eau bi-distillée.

compte-rendu

A partir de toutes ces expériences, rédigez un compte-rendu contenant les paragraphes suivants :

§ Introduction

vous décrivez succinctement et clairement le problème posé.

§ Matériels et méthodes

(préparation, étirement, etc.)

§ résultats et conclusion

À l'aide de **schémas**, présentez vos résultats, et conclusions que vous en tirez, et expliquez par quel(s) mécanisme(s) la NA et KCl ont induit la contraction.