

CEA 1902 - GUINNEBAULT M.

UTILISATION DES INDICATEURS NUCLEAIRES DANS L'ETUDE DE LA
PERMEABILITE IONIQUE DU NERF (1961)

Sommaire. - L'utilisation des indicateurs radioactifs ^{24}Na et ^{42}K , et l'étude électrophysiologique fine réalisée sur des cellules nerveuses géantes de Céphalopodes a permis, depuis une dizaine d'années, d'étudier les rapports entre les phénomènes électriques observés lors de la propagation de l'influx nerveux et les mouvements ioniques qui s'effectuent au niveau de la membrane cellulaire entre milieux intracellulaire et extracellulaire. A l'état de repos, les fibres nerveuses possèdent pour le sodium et le potassium, une perméabilité qui permet le renouvellement, à partir du milieu extracellulaire des cations contenus dans le cytoplasme.

Au moment du passage de l'influx nerveux, on peut mettre en évidence une augmentation transitoire de la perméabilité au sodium, qui provoque l'entrée des ions Na^+ dans la fibre nerveuse, tandis que, quelques millisecondes plus tard, l'augmentation de la perméabilité au potassium provoque la sortie

.../...

CEA 1902 - GUINNEBAULT M.

THE USE OF TRACERS IN THE STUDY OF THE IONIC PERMEABILITY OF
THE NERVE (1961)

Summary. - The use of the radioactive tracers ^{24}Na and ^{42}K , and the electrophysiological fine study carried out on the giant Cephalopodes nervous cells have made it possible, during ten years, to study the relationships between the electrical phenomena observed during the propagation of the nervous impulse and the ionic movements which occur at the cell membrane between the intra - and extra - cellular media. In the state of rest, the nerve fibres present a certain permeability towards sodium and potassium, a permeability which allows the renewal, from the extra-cellular medium, of the cations contained in the cytoplasm.

At the moment of the passage of the nervous impulse, it is possible to demonstrate a temporary increase in the permeability towards the sodium which causes the entry of Na^+ ions into the nerve fibre, whilst, a few milliseconds later, the increase in the potassium permeability causes the departure

(suite du n° 1902)

d'une quantité équivalente d'ions K^+ . Une phase de restauration suit le passage de l'influx nerveux, au cours de laquelle les conditions ioniques initiales sont rétablies. Si les mouvements de potassium peuvent être considérés comme passifs, l'expulsion du Na^+ requiert, de la part de la cellule, l'utilisation d'une partie de l'énergie métabolique.

of an equivalent quantity of K^+ ions. A recovery phase follows the passage of the nervous impulse, during which the original ionic conditions are re-established. If the potassium movements can be considered as passive, the expulsion of Na^+ requires, on the part of the cell, the use of a part of the metabolic energy.

PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

UTILISATION DES INDICATEURS NUCLEAIRES
DANS L'ETUDE DE LA PERMEABILITE
IONIQUE DU NERF

par

Maxime GUINNEBAULT

Rapport CEA N° 1902

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY
SERVICE DE DOCUMENTATION
Boite postale n° 2 - Gif-sur-Yvette (S.-et-O.)

- Rapport C.E.A. n° 1902 -

Département de Biologie

**UTILISATION DES INDICATEURS NUCLEAIRES
DANS L'ETUDE DE LA PERMEABILITE IONIQUE DU NERF**

par

Maxime GUINNEBAULT

- 1961 -

**UTILISATION DES INDICATEURS NUCLEAIRES
DANS L'ETUDE DE LA PERMEABILITE IONIQUE DU NERF**

Depuis quinze ans, le développement des sciences nucléaires a ouvert aux biologistes une nouvelle voie de recherches. En effet, le progrès de la technologie des réacteurs nucléaires a permis l'obtention d'un nombre de plus en plus grand d'isotopes radioactifs des éléments qui entrent dans la constitution de la matière vivante. Il devient ainsi possible aux expérimentateurs de suivre, grâce à l'introduction dans un organisme vivant d'un certain nombre d'atomes ou de molécules "marqués", les modalités du renouvellement de la matière vivante. Dès le départ, deux grandes orientations se sont dessinées : l'une d'elles, marquée du sceau de la biochimie, a consisté à suivre, grâce aux isotopes radioactifs, la synthèse des molécules organiques complexes, lipides, glucides et protéines, dont sont constitués les organismes vivants. Ces études, commencées dès 1940 avec des isotopes stables lourds (deutérium ou ^{15}N) (et continuées depuis avec ^{14}C et ^3H en

particulier), ont permis de substituer à la notion formelle de fixité des constituants "plastiques" de la cellule, qui régnait jusqu'alors, la notion d'"équilibre dynamique" entre synthèse et destruction des constituants cellulaires, qui même au delà de la période de croissance des organismes où la synthèse l'emporte sur la destruction, sont perpétuellement soumis à un renouvellement qui permet le modelage et le remaniement incessant de constituants autrefois supposés inertes. Dès lors, au milieu de ce renouvellement continu de la matière vivante, se pose le problème de la réalisation et du maintien de la constance du milieu intérieur, qui caractérise les organismes supérieurs. En effet, entre les cellules, au sein desquelles s'effectuent ces transformations, et le milieu extérieur où elles puisent, en dernière analyse, les éléments indispensables à leurs synthèses et où elles rejettent les déchets de leur métabolisme, s'interpose le "milieu intérieur", par où les échanges de matière doivent nécessairement se faire et qui doit, de plus, par sa constance, assurer aux cellules les conditions optimales de fonctionnement. Alors la deuxième voie ouverte aux biologistes par les isotopes radioactifs s'est révélée un instrument efficace : l'étude du renouvellement par transport entre milieu extérieur, milieu intérieur et milieu intracellulaire.

De ce problème extrêmement vaste, et qui a suscité depuis vingt ans d'innombrables travaux, nous ne retiendrons

aujourd'hui que quelques aspects concernant la régulation de l'équilibre ionique entre cellules et milieu intérieur. Dans ce domaine en effet, l'utilisation des isotopes radioactifs du Na et du K, associée à d'autres techniques, biophysiques ou électrophysiologiques, de développement assez récent, a permis, sur des structures biologiques favorables, de dégager des processus généraux qui ont pu, après avoir été établis sur ces structures, être appliqués avec fruit à un grand nombre d'autres situations plus complexes, où la mesure des flux présentait des difficultés expérimentales.

La distribution du sodium et du potassium entre milieu intra et extracellulaire présente en effet une caractéristique remarquable et générale : le sodium constitue le cation essentiel du milieu intérieur, tandis que sa concentration intracellulaire est très faible. Au contraire, le potassium est très abondant dans les cellules, et n'est présent qu'en concentration très faible dans les liquides extracellulaires. Cette inégalité de répartition ionique est liée, de toute évidence, à la perméabilité de la paroi cellulaire, ainsi qu'aux phénomènes électriques dont elle est le siège : les membranes cellulaires présentent en effet une polarité négative vers l'intérieur et positive vers l'extérieur de l'ordre de 70 mV.

Dans le cas du potassium, gradient de concentration et gradient électrique entre les milieux intra et extracellulaire

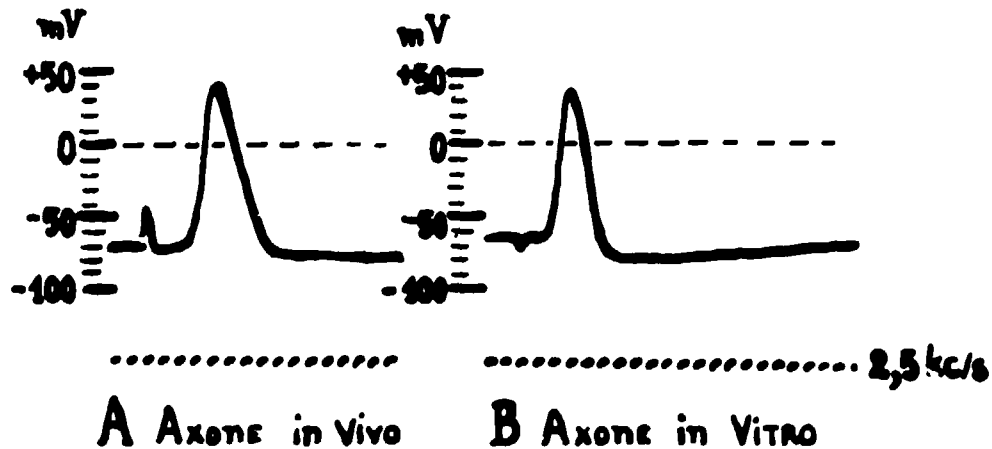
jouent donc en sens inverse, et l'inégalité de répartition entre ces deux phases peut résulter d'un simple équilibre de Donnan.

Au contraire, dans le cas du sodium, la différence de potentiel observée et la différence des concentrations devraient concourir à favoriser la pénétration de cet ion dans le milieu intracellulaire. Nous allons voir comment, sur une structure biologique particulièrement favorable, les cellules nerveuses géantes de Céphalopodes (Calmars) l'utilisation simultanée des isotopes radioactifs et de techniques électrophysiologiques ont permis de renouveler nos concepts sur les conditions du renouvellement ionique des cellules.

Les cellules nerveuses, et en particulier leurs prolongements axoniques, le long desquels se transmet l'influx nerveux, présentent en effet, à l'état de repos comme toutes les cellules, une polarité négative à l'intérieur et positive à l'extérieur ; cependant le passage de l'influx nerveux le long des axones correspond à une onde de dépolarisation, qui aboutit même, comme l'ont montré les résultats obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires, à une inversion de la polarité de la membrane : le milieu intracellulaire passant de -70 mV à $+ 50$ mV par rapport au milieu extracellulaire. Cette inversion transitoire de la polarité ne dure qu'un très bref

instant (environ 1 milliseconde), et se propage le long de la membrane à une vitesse de l'ordre de 20 mètres par seconde.

Figure n° 1.



Potentiels d'action mesurée à l'aide de microélectrodes introduites dans un axone géant de Calmar.

A - L'électrode a été introduite et le potentiel d'action provoqué avant dissection de l'axone (le potentiel d'action a été provoqué par un choc mécanique appliqué sur l'axone en un lieu du point d'empalement).

B - Ce potentiel d'action a été obtenu à l'aide d'une électrode similaire, introduite sur un axone isolé provenant du même animal, après dissection et immersion dans l'eau de mer.

d'après HODGKIN A.L.

(Ionic Movements and electrical activity in giant nerve fibres. The Croonian Lecture 1957).

La membrane axonique passe ensuite par une phase d'inexcitabilité, d'environ 100 millisecondes, au bout de laquelle elle a récupéré ses propriétés excitables. La théorie, proposée par BERNSTEIN, au début de ce siècle, pour expliquer ce comportement reposait sur l'hypothèse que la membrane cellulaire était, à l'état de repos, imperméable au sodium, le potentiel observé correspondant alors à un potentiel de diffusion passif du potassium, donné par la formule de NERNST

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K_i]}{[K_e]}$$

où $[K_i]$ et $[K_e]$ représentent les concentrations respectives du potassium à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, et où R, T et F ont leur signification thermodynamique habituelle.

La découverte d'une innervation du manteau des céphalopodes par des axones géants, pouvant atteindre 1 millimètre de diamètre et jusqu'à 30 millimètres de long s'est révélé un matériel de choix pour les neurophysiologistes.

En effet, il est possible, sous contrôle microscopique, d'effectuer la dissection de ces fibres nerveuses sur une assez grande longueur, et de les étudier ensuite en survie dans l'eau de mer où elles conservent pendant plusieurs heures leur propriétés d'excitabilité. D'autre part, grâce à des microélectrodes et

à des micro-seringues que l'on peut insérer dans le cytoplasme, dans l'axe de la fibre de façon à laisser la membrane intacte, on peut suivre les variations du potentiel sous l'action de diverses substances.

La détermination de la concentration du sodium et du potassium intracellulaire a pu être faite, d'une part directement par spectrophotométrie de flamme sur le contenu cytoplasmique de ces fibres géantes, d'autre part grâce à la technique d'analyse par activation, qui a trouvé là, l'une de ses applications biologiques. L'irradiation de telles fibres géantes a été réalisée dans un réacteur, et l'analyse par spectrométrie γ des composés radioactifs formés a permis, par comparaison avec l'activation de solutions de NaCl et de KCl dans des tubes capillaires irradiés dans les mêmes conditions que les fibres, la détermination de la quantité de Na et de K présents dans les fibres.

Le principal résultat de ces déterminations a été la mise en évidence de l'augmentation de la concentration du Na dans les fibres soumises avant l'analyse, à des excitations allant jusqu'à 75 itérations par seconde. En même temps la concentration du K dans ces fibres diminuait d'une quantité comparable à la quantité de sodium gagnée. Ainsi se trouvait

confirmée une partie de la théorie de BERNSTEIN : le potentiel d'action s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité au sodium qui peut remplacer en partie le potassium dans la cellule nerveuse au cours du potentiel d'action.

Mais cette méthode ne donne que le bilan global de l'activité, sans que l'on puisse mesurer les flux unidirectionnels.

Or, la détermination des flux unidirectionnels du sodium et du potassium peut être effectuée de façon très aisée sur cette préparation : il suffit de plonger la fibre géante dans une eau de mer "marquée" par l'introduction d'une petite quantité de ^{24}Na ou de ^{42}K , puis, à des temps donnés, de mesurer la radioactivité gagnée par le nerf. Il suffit en effet, après un rinçage rapide dans une eau de mer non marquée, de placer le nerf dans un récipient situé au front d'un compteur de Geiger Muller et d'effectuer une mesure de la radioactivité contenue dans la fibre, avant de le replacer pour une nouvelle période dans l'eau de mer radioactive.

La courbe de "charge" que l'on obtient est de type exponentiel $\text{Na}_i^* = \text{Na}_{i \text{ max}}^* (1 - e^{-\alpha t})$ où α indique la fraction du Na interne renouvelée par unité de temps.

La détermination de la radioactivité spécifique du sodium de l'eau de mer, nécessaire pour calculer le flux entrant de sodium, se réalise en remplaçant, à la fin des mesures, la fibre nerveuse par un tube capillaire de même diamètre rempli de l'eau de mer qui a servi à l'expérience.

Lorsque la radioactivité spécifique du Na de la fibre nerveuse est en équilibre avec celle de l'eau de mer, on peut mesurer sur cette fibre "chargée" le flux sortant du sodium, en mesurant par exemple la diminution de la radioactivité contenue dans la fibre lorsqu'elle est continuellement rincée par un courant d'eau de mer non marquée ; la courbe de décharge est, là encore une exponentielle

$$Na_i^* = Na_{i_{max}}^* e^{-\alpha t}$$

d'où l'on peut déduire la fraction renouvelée, donc le flux sortant du sodium.

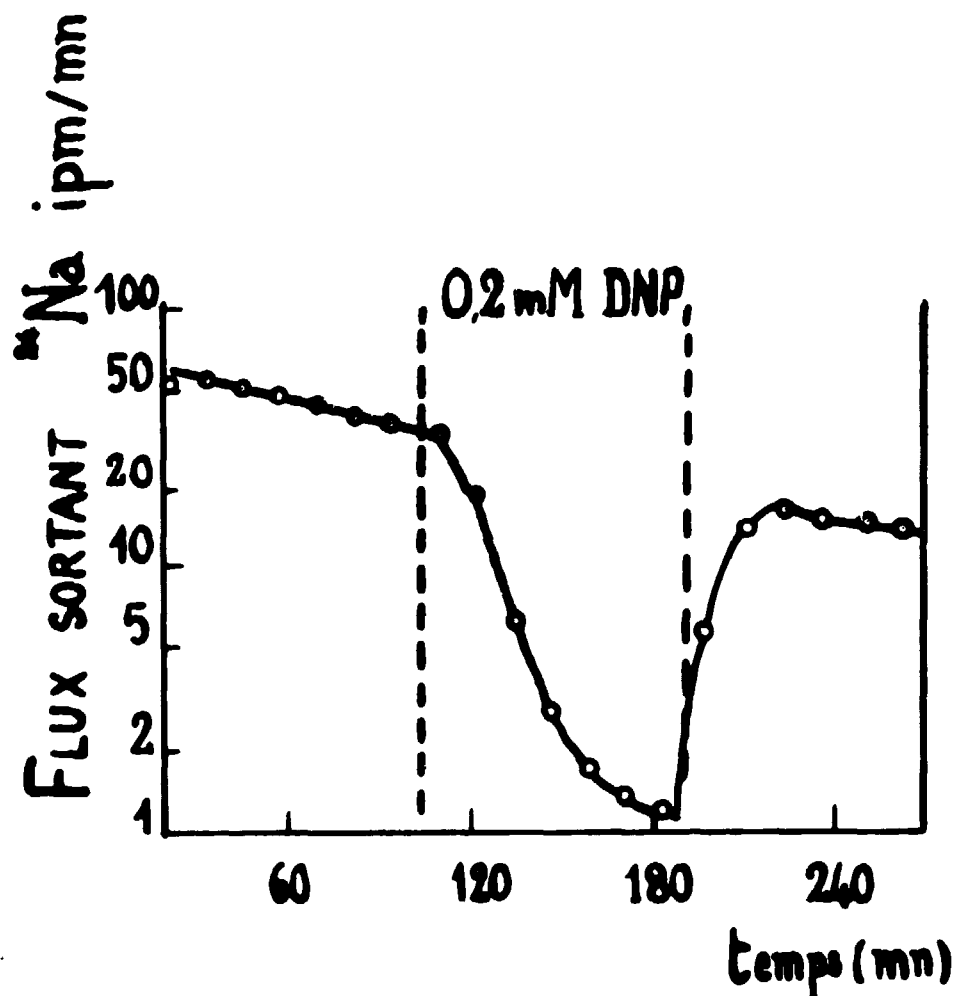
Les flux entrant et sortant de potassium ont été mesurés de la même façon, dans des conditions où la fibre nerveuse est au repos et lorsqu'elle est soumise à des excitations de fréquence connue.

Ces expériences, dont la plupart ont été réalisées par les neurophysiologistes de Cambridge, Keynes et Hodgkin,

ont mis en évidence le fait que, même à l'état de repos, l'axone géant de Calmar possède une perméabilité au Na importante. Compte tenu des différences de concentration entre Na et K dans le cytoplasme (50 mM contre 350 mM) le Na intracellulaire se renouvelle même plus vite que le potassium.

La théorie de BERNSTEIN, qui postulait l'imperméabilité au sodium des nerfs à l'état de repos, a donc été infirmée par ces études de flux, qui ont montré que le sodium peut pénétrer dans les fibres nerveuses. Il faut donc admettre que la faible concentration du sodium intracellulaire résulte de l'activité de la cellule, qui "expulse" continuellement le sodium qui pénètre par suite du gradient électrochimique. Dans les conditions normales, en effet, flux entrant et flux sortant sont identiques pour un ion donné, ce qui assure la constance de la composition ionique du cytoplasme. Cette expulsion de sodium présente toutes les caractéristiques d'un "transport actif" tel qu'il peut être défini en se fondant sur des critères thermodynamiques. C'est en effet un transport ionique qui s'effectue contre un gradient de concentration (le milieu extracellulaire, chez les Céphalopodes, a la même composition ionique que l'eau de mer où ils vivent), et contre un gradient électrique. Cette réaction, endothermique, doit nécessiter de la part de la cellule l'utilisation d'une source d'énergie, qu'elle puise dans son métabolisme.

Figure n° 2.



Inhibition du flux sortant de Na par un poison métabolique.

Le flux sortant de sodium est mesuré, par rinçage de l'axone avec une eau de mer inactive, après une période de "charge" dans une eau de mer contenant ^{24}Na .

L'addition au milieu de rinçage de 0,2 mM de DNP (dinitrophénol) provoque une diminution - réversible - du flux sortant de Na.

d'après HODGKIN A.L. et KEYNES R.D.

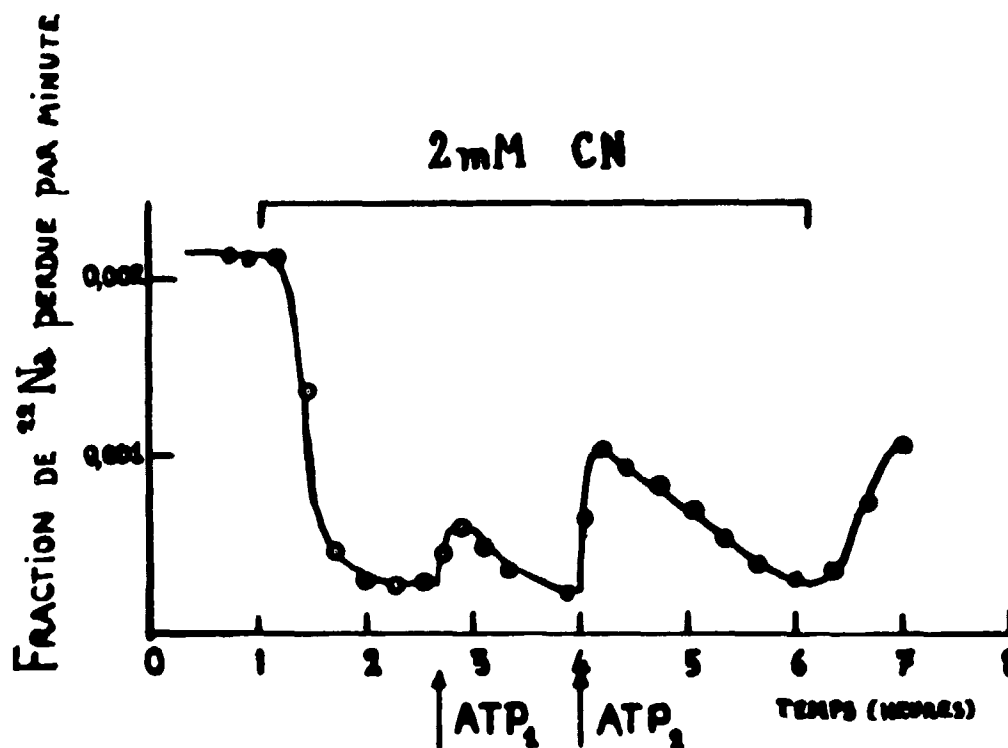
Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol., 128, 28, 1955.

Ceci a pu être démontré par l'étude des modifications du flux sortant de sodium, sur des fibres préalablement "chargées" en ^{24}Na , sous l'action d'inhibiteur du métabolisme comme le cyanure de potassium ou le dinitrophénol (DNP), dont l'action sur la formation des composés phosphorés riches en énergie contenus dans la cellule est bien connue (fig. n° 2).

Dans ces conditions, on constate une diminution progressive du flux de sortie du sodium, tandis que les dosages chimiques effectués sur le contenu des fibres montrent l'épuisement progressif de composés riches en énergie, ATP et phosphoarginine. L'utilisation directe de ces composés pour le transport actif du sodium a été très élégamment démontrée par l'injection, grâce à des microseringues placées dans la fibre nerveuse, d'ATP ou d'autres composés phosphorés, qui, sur une fibre préalablement traitée au DNP, rétablissent le flux de sortie du sodium à un niveau normal (fig. n° 3).

Durant l'activité nerveuse, l'augmentation transitoire de la perméabilité au sodium est fort importante (environ trente fois). L'accroissement du flux entrant de sodium qui en résulte ne peut plus être compensé, dans ces conditions, par l'expulsion active dont nous venons de parler.

Figure n° 3.



Action de l'ATP sur le flux sortant de Na mesuré sur un axone soumis à l'action d'un poison métabolique.

Le flux sortant du Na - mesuré dans des conditions comparables à celles de la figure n° 2 - inhibé par l'addition au milieu de rinçage de 1 mM de cyanure.

L'injection intra-axonale de petites quantités d'ATP (adénosine-triphosphate : $\text{ATP}_1 = 5,9 \mu\text{ moles}$, $\text{ATP}_2 = 31 \mu\text{ moles}$) produit une augmentation temporaire du flux sortant de Na, inhibé par le cyanure.

d'après CALDWELL P.C., HODGKIN A.L., KEYNES R.D.

et SHAW T.I.

The effects of injecting "energy rich" phosphate compounds on the active transport of ions on the giant axons of Loligo. J. Physiol., 152, 561, 1960.

Il existe alors un flux net de sodium, dirigé de l'extérieur vers l'intérieur que l'on a pu évaluer, grâce à l'utilisation du ^{24}Na , à 4 à 5 $\mu\text{moles/cm}^2/\text{impulsion}$. Cet afflux de charges positives à l'intérieur de la fibre nerveuse rend compte des variations de potentiel observées durant le passage de l'influx.

Quelques millisecondes plus tard, alors que la perméabilité au sodium revient à sa valeur d'équilibre, c'est la perméabilité au potassium qui augmente, déterminant alors un flux net de potassium dirigé vers l'extérieur, puisqu'à ce moment, l'inversion de la différence de potentiel favorise, de même que le gradient de concentration, la sortie de cet ion. Ce flux net de potassium rétablit l'équilibre des charges électriques, un instant compromis par l'entrée du sodium.

A la fin du potentiel d'action, le bilan de ces mouvements ioniques est donc conforme à celui que les analyses ont révélé : une partie du potassium intracellulaire a été remplacée par du sodium. L'activité métabolique de la cellule, au cours de la phase d'inexcitabilité qui suit le potentiel d'action, a pour résultat le rétablissement des conditions ioniques initiales. Le système de transport de sodium élimine

l'excès d'ions Na^+ présents dans la fibre, tandis que, corrélativement, le flux entrant du potassium va compenser la perte subie dans la deuxième phase du potentiel d'action. Lorsque la période réfractaire est terminée, les perturbations créées par le potentiel d'action sont séparées, et le nerf peut à nouveau assurer son rôle de transmission.

Nous avons montré, sur un exemple précis, celui de l'axone géant des céphalopodes, comment l'utilisation d'indicateurs nucléaires, associé à des techniques d'électrophysiologie fine, a permis de préciser nos connaissances sur les mécanismes intimes qui président à la transmission de l'influx nerveux.

Mais, si ces changements brusques de perméabilité ionique rendent complexe l'analyse des transports ioniques liés à l'activité nerveuse, de très nombreuses études, effectuées sur des substrats biologiques aussi variés que la muqueuse intestinale, les hématies, le tubule rénal, ont confirmé le caractère général de l'expulsion de Na par les cellules.

Les isotopes radioactifs ont rendu possible la plupart de ces études et contribuent ainsi à notre connaissance

sur les problèmes de perméabilité des membranes cellulaires, dont nous venons de voir sur l'exemple de la fibre nerveuse, toute l'importance dans les manifestations vitales des organismes.

RESUME

L'utilisation des indicateurs radioactifs ^{24}Na et ^{42}K , et l'étude électrophysiologique fine réalisée sur des cellules nerveuses géantes de Céphalopodes a permis, depuis une dizaine d'années, d'étudier les rapports entre les phénomènes électriques observés lors de la propagation de l'influx nerveux et les mouvements ioniques qui s'effectuent au niveau de la membrane cellulaire entre milieux intracellulaire et extracellulaire. A l'état de repos, les fibres nerveuses possèdent pour le sodium et le potassium, une perméabilité qui permet le renouvellement, à partir du milieu extracellulaire des cations contenus dans le cytoplasme.

Au moment du passage de l'influx nerveux, on peut mettre en évidence une augmentation transitoire de la perméabilité au sodium, qui provoque l'entrée des ions Na^+ dans la

fibres nerveuses, tandis que, quelques millisecondes plus tard, l'augmentation de la perméabilité au potassium provoque la sortie d'une quantité équivalente d'ions K^+ . Une phase de restauration suit le passage de l'influx nerveux, au cours de laquelle les conditions ioniques initiales sont rétablies. Si les mouvements de potassium peuvent être considérés comme passifs, l'expulsion du Na^+ requiert, de la part de la cellule, l'utilisation d'une partie de l'énergie métabolique.

Manuscrit reçu le 15 mars 1961.

FIN