

ETUDE MORPHOMETRIQUE DU SYSTEME TUBULAIRE
TRANSVERSE DU MYOCARDE VENTRICULAIRE DE RAT

JEANNE PAGER. From the Laboratoire d'Electrophysiologie, 69-Lyon-7, France

INTRODUCTION

Des travaux récents ont permis de suggérer que le système tubulaire transverse de la fibre squelettique rapide de la grenouille pourrait être le siège de propriétés électrophysiologiques particulières comme la rectification anormale et retardée, pouvant être en rapport avec une accumulation de potassium à ce niveau (8). On peut alors se demander dans quelle mesure il faut attribuer ce fait à des propriétés spécifiques de la membrane tubulaire, ou aux caractéristiques topographiques de cette partie du compartiment extracellulaire. Des renseignements quantitatifs sur ce dernier point sont disponibles en ce qui concerne la fibre squelettique (3, 11), mais en dépit de l'intérêt que peut présenter la physiologie comparée des diverses fibres excitables, un tissu aussi communément étudié que le myocarde de rat est mal connu à cet égard. Une étude morphométrique du système T du myocarde ventriculaire de rat a donc été entreprise dans ce travail, en considérant particulièrement le volume relatif et la surface relative de ce système par rapport à la fibre elle-même, et le rapport de la surface au volume du système proprement dit. La complexité du système tubulaire "transverse" du myocarde des mammifères (4, 6), incite à utiliser un traceur diffusant dans tout l'espace extracellulaire, pour mettre en évidence l'ensemble du système T et réduire d'autant les risques de mésestimation de son volume. L'emploi du nitrate de lanthane choisi à cette fin est discuté plus loin. De plus, étant donné l'intérêt de la présence des glycoprotéines dans le système T du myocarde, cette étude morphométrique a été effectuée également sur des préparations les mettant en évidence.

MATERIAL AND METHODS

Les mesures ont été effectuées à partir d'échantillons prélevés parmi les trabécules cylindriques du myocarde ventriculaire droit de rats adultes de souche Wistar. Ces échantillons ont été préparés en vue de l'observation en microscopie électronique, après imprégnation par le nitrate de lanthane, d'une part, et après localisation des glycoprotéines, d'autre part, selon les techniques respectives de Revel et Karnovsky (13) et Rambourg (12).

La méthode de mesure que nous avons utilisée est inspirée des principes stéréologiques établis par Underwood (16), et calquée étroitement sur celle de Weibel et al. (18). Nous avons utilisé des micrographies au grossissement final de 40,000 obtenues après un échantillonnage systématique, et une grille similaire à celle qu'à décrite Weibel (17), de 8×8 cm, comportant 72 points distants de 1 cm les uns des autres délimitant 36 traits parallèles. Les calculs ont été effectués à l'aide des symboles suivants: Z , distance entre deux points voisins; P_t , nombre de points de la grille inclus dans le système T; P_c , nombre de points de la grille inclus dans le sarcoplasme; I_t , nombre de points d'intersection des points de la grille et de la surface tubulaire.

Les formules suivantes ont été appliquées: (a) densité de volume du système T par rapport au volume cellulaire (V_{vt}):

$$V_{vt} = \frac{P_t}{P_c}; \quad (1)$$

(b) densité de surface de ce système par rapport au volume cellulaire (S_{vt}):

$$S_{vt} = \frac{4I_t}{P_c Z} \text{ cm}^2/\text{cm}^3; \quad (2)$$

(c) rapport de la surface membranaire au volume

TABLEAU I

L'Effet du Lanthane Comparé à L'Effet des Glycoprotéines sur la Densité du Volume, la Densité de la Surface, et le Rapport de la Surface Membranaire au Volume du Système T du Rat

| Technique utilisée | No. de préparations | No. de mesures | Vvt | Svt | S/Vt |
|-------------------------------|---------------------|----------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | | % | cm ² /cm ³ | cm ² /cm ³ |
| Espace marqué par le lanthane | 29 | 232 | 1.06 ± 0.17 | 2450 ± 350 | 230,000 |
| Espace glycoprotéinique | 30 | 240 | 1.03 ± 0.14 | 3250 ± 350 | 315,000 |

du système T (S/Vt):

$$S/Vt = \frac{Svt}{Vvt} \quad (3)$$

Les résultats ont été traités conformément aux principes de calcul des probabilités.

RESULTS

Nous avons appliqué la méthode précédemment décrite à deux catégories de préparations: les unes, imprégnées par le nitrate de lanthane; les autres, traitées cytochimiquement selon les indications de Rambourg (12). Dans le premier cas, le système T est considéré comme sous-compartiment extracellulaire, et dans le second, comme espace glycoprotéinique. La description qualitative détaillée de ces résultats sera publiée ultérieurement.¹ Les résultats des mesures de densité de volume, de densité de surface, et du rapport de la surface membranaire au volume du système T dans les deux catégories de préparations sont regroupés dans le Tableau I.

La Densité de Volume du Système T par Rapport au Volume Cellulaire (Vvt)

Le volume tubulaire moyen pénétré par le lanthane représente 1.06 ± 0.17% du volume cellulaire, et l'espace tubulaire empli de glycoprotéines, 1.03 ± 14%. Il a été calculé que la différence entre ces deux valeurs était très probablement due au hasard $P = 90\%$. On peut donc considérer que le compartiment tubulaire accessible au lanthane a un volume identique à celui où sont accumulées les glycoprotéines. Ce volume représenterait 1% du volume cellulaire environ.

¹ Pager, J. 1971. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat* à paraître.

La Densité de Surface du Système T par Rapport au Volume Cellulaire (Svt)

La surface membranaire de l'espace tubulaire où diffuse le lanthane, rapportée au volume cellulaire, est de 2450 ± 350 cm²/cm³, celle de l'espace glycoprotéinique, 3250 ± 350 cm²/cm³. Dans ce cas, il y a à peine plus de 10 chances sur 100 pour qu'une telle différence soit due au hasard $P = 10\%$, ce qui mérite d'être discuté.

La Densité de Surface du Système T par Rapport au Volume de ce Système (S/Vt)

Les mesures de la surface membranaire des tubules rapportées aux mesures de volume du même compartiment tubulaire reflètent une différence non négligeable, ainsi qu'on pouvait s'y attendre en considérant le paramètre Svt: pour l'espace lanthane, S/Vt est de 230,000 cm²/cm³ avec une erreur relative de 30%, et pour l'espace glycoprotéines, de 315,000 cm²/cm³ avec une erreur relative de 25%. Il faut d'ailleurs noter que dans le premier cas, la corrélation entre les mesures et de surface est satisfaisante ($r = 0.91$), alors qu'elle l'est moins dans le second ($r = 0.52$).

DISCUSSION

Les mesures de volume et de surface du système T ont été effectuées sur des préparations soumises à deux types de techniques. Il convient d'examiner dans quelle mesure ces techniques mettent exactement en évidence le système T. L'emploi du lanthane comme traceur de diffusion a été discuté par Matter et al. (10), qui ont étudié les barrières de perméabilité entre l'espace de Disse, et les canalicules biliaires. Il ressort de ces travaux que le lanthane ne serait pas un traceur de diffusion parfait, eu égard surtout à sa triple charge élec-

trique, et qu'il provoquerait, du moins dans le foie, la rupture des complexes jonctionnels. Dans le myocarde du rat, la diffusion du lanthane dans le système T a permis d'obtenir des images morphologiquement identiques à celles que Forssmann et Girardier (7) ont obtenues avec la peroxydase, en particulier en ce qui concerne les ramifications longitudinales. Le lanthane peut donc être considéré comme un traceur convenable pour le but de cette étude. Il est à noter que la diffusion du lanthane s'arrête, sur toutes les préparations examinées ici, à 50 Å environ du feuillet externe de la membrane sarcoplasmique, déterminant ainsi un volume dont l'importance physiologique est probablement fondamentale, mais qui n'intervient pas ici quantitativement, étant donné sa petitesse par rapport à la précision des mesures. C'est pourquoi aucune différence statistique n'apparaît entre les mesures de volume obtenues à partir de l'espace lanthane et de l'espace glycoprotéines, bien que ces dernières occupent toute la lumière du système T, ainsi qu'il a été observé par ailleurs. Il n'est pas impossible, d'ailleurs, que la présence des glycoprotéines, chargées négativement, favorise la pénétration du lanthane. La concordance des images obtenues avec les diverses techniques est un argument en faveur de la bonne conservation des structures et du volume du système T lors des diverses étapes techniques de la préparation des échantillons.

Une autre assurance quant à la validité des mesures, peut découler de leur comparaison avec les résultats fournis par d'autres auteurs. Selon Fawcett et McNutt (5), le diamètre des tubules transverses est de quatre à cinq fois plus grand dans le myocarde d'un mammifère comme le chat, que dans le muscle squelettique du même animal. Le décours en est aussi plus complexe, et l'on peut s'attendre à ce que le volume en soit plusieurs fois supérieur. D'après les évaluations de Peachey (11), le volume relatif du système T est d'environ 0,3% dans la fibre squelettique de grenouille. La valeur de 1% que nous avons obtenue pour le myocarde serait donc vraisemblable.

En ce qui concerne l'évaluation de la densité de surface, les valeurs obtenues à partir des deux types de préparations diffèrent de façon assez significative. Pour éliminer les plus aberrantes, on a examiné leur corrélation avec les mesures de volume, considérées comme dignes de confiance. Le coefficient de corrélation calculé dans le cas du lanthane et atteignant 0,91, indique que les

mesures sont satisfaisantes à cet égard. Pour les préparations cytochimiques, par contre, la corrélation est nettement plus faible ($r = 0,52$), ce qui tend à nous faire suspecter les valeurs de densité de surface obtenues avec cette technique. La méthode de mesure utilisée ici est basée sur le comptage du nombre d'intersections des tracés membranaires avec les traits de la grille. L'inclusion dans le glycolméthacrylate provoque des distorsions qui, sans modifier le volume global des tubules, pourraient les déformer et modifier de ce fait le nombre des intersections. Il est remarquable aussi que les résultats cytochimiques obtenus sur ces préparations varient considérablement en fonction du temps de réactions, et qu'à une minute près, la localisation cesse d'être sélective. Il semble donc plus délicat d'effectuer une étude morphométrique à partir de telles préparations.

On peut donc admettre que dans le système T du myocarde ventriculaire de rat, la densité de surface est voisine de $2500 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. Une vérification des valeurs du volumes et de la surface peut d'ailleurs être faite en calculant le rapport V/St du volume V_{vt} des tubules transverses à la surface S_{vt} de leur membrane. Ce rapport est en effet proportionnel au diamètre des tubules (18). Étant donné la forme variable des ramifications du système T et les divers plans de coupe, on estime pour ce calcul que le diamètre, d , ou semi-distance moyenne les membranes, est compris entre $2 V/S$ et $4 V/S$. Dans le cas du lanthane, on obtient $800 \text{ Å} < d < 1600 \text{ Å}$. Ces dimensions correspondent tout à fait à celles que l'on peut mesurer directement à partir des micrographies, et qui sont également citées par ailleurs (1, 5, 15). Dans le cas de la révélation des glycoprotéines, l'accord entre les valeurs calculées et mesurées est aussi étroit, mais leur échelonnement va de 6000 à 12,000 Å, ce qui confirme l'hypothèse d'une importante distorsion des tubules. Les données obtenues après imprégnation par le nitrate de lanthane seront donc seules retenues dans la suite de la Discussion.

Il reste en effet à examiner la surface des tubules rapportée non plus au volume cellulaire, mais au volume de l'espace tubulaire: c'est la définition du paramètre S/Vt . Il n'a pas été tenu compte, dans les évaluations précédentes, de la sous-estimation découlant de la perte de profils membranaires due à l'épaisseur des coupes (effet Holmes). Cette sous-estimation devient probablement négligeable en ce qui concerne le rapport S/Vt : on peut en effet admettre que les profils

perdus ne sont pas susceptibles, soit quantitativement, soit qualitativement, de modifier notablement la valeur moyenne de S/Vt .

A partir du volume relatif V_{vt} supposé de 1%, et de la surface relative S_{vt} supposée de $2500 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$, on obtient une valeur S/Vt est l'égal de $250,000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. A titre comparatif, une évaluation de ce paramètre dans la fibre squelettique de grenouille peut être effectuée à partir des données de la littérature. Selon Peachey, la surface membranaire des tubules transverses de la fibre squelettique de grenouille est égale à sept fois celle de la membrane plasmique externe, alors que le volume relatif est de 0.3%. Le rapport S/V de ces tubules est donc environ égal à 2300 fois celui de la fibre cylindrique. D'après Bianchi et Shanes (3), les mêmes fibres ont une surface relative de $300 \text{ cm}^2/\text{g}$, et un volume relatif de $0.81 \text{ cm}^3/\text{g}$, ce qui donne un rapport S/V de $370 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. Le rapport S/Vt des tubules transverses du sartorius de grenouille serait donc de $850,000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. Le résultat obtenu dans cette étude est du même ordre de grandeur. L'écart observé peut s'expliquer au moins en partie par des différences spécifiques entre les deux types de fibres. On peut en effet constater, en calculant la surface relative de divers tissus à partir des données réunies par Bianchi (2), que les résultats sont très variables: on obtient $14,074 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ pour le ventricule de grenouille, $6600 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ pour le taenia coli du cobaye, et $1235 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ pour l'oreillette du même animal. En considérant que ce dernier tissu présente un développement relatif du système T intermédiaire entre celui du muscle squelettique de grenouille et celui du myocarde ventriculaire de rat, soit 0.5%, on obtient pour S/Vt la valeur de 247,000, très voisine de celle qui est indiquée plus haut. Il est d'ailleurs possible qu'une étude morphométrique systématique de ces paramètres dans diverses fibres excitables mette en évidence une relation quantitative constante entre la surface effective des fibres et leur volume, le développement des tubules ou de la pinocytose (7) pouvant compenser la petitesse du rapport S/V de certaines fibres, dans des conditions physiologiques comparables.

Il faut aussi envisager que l'écart entre les valeurs obtenues à partir des diverses sources doit tenir également aux différences entre les techniques d'évaluation, et aux distorsions et erreurs inhérentes à chacune d'elles. On peut constater que la morphométrie appliquée aux préparations

utilisées ici fournit des valeurs très dispersées autour de leur moyenne. Les formules utilisées, en effet, ont été calculées en admettant que la distribution des éléments intracellulaires était parfaitement isotrope alors qu'elle présente dans la fibre musculaire striée une périodicité pseudocristalline. Cette anisotropie serait statistiquement éliminée si l'angle formé par le plan de coupe et l'axe longitudinal des fibres était quelconque. Ce qui n'est pas le cas, les fibres tendant à s'orienter dans la résine en fonction de leur grand axe. Cette constatation impose soit le calcul d'un coefficient qui tienne compte de cet angle préférentiel (14), soit l'utilisation d'une technique d'inclusion qui permette aux faisceaux d'être orientés tout à fait au hasard. Il est donc possible que le rapport S/Vt soit sous-estimé, une grande partie du système T se trouvant dans un plan fréquemment perpendiculaire au plan de coupe. Ce rapport pourrait être utilisé, cependant, comparativement à d'autres paramètres calculés à partir des mêmes préparations. Le paramètre S/Vt représentant le rapport d'une surface membranaire tubulaire à un volume extracellulaire, il serait intéressant de calculer le rapport de la surface membranaire périphérique des fibres à l'espace extracellulaire global moins l'espace T, par les mêmes méthodes. Certaines propriétés du système T, comme l'effet d'accumulation du potassium (9), pourraient ne pas être étrangères à la plus grande valeur de S/V à ce niveau.

SUMMARY

A morphometric study of the transverse tubular system was performed on rat ventricular myocardial fibers. The T system and its ramifications were pointed out by means of a lanthanum compound used as an extracellular marker, and of a phosphotungstic acid staining of the glycoproteinaceous material enclosed in the tubules. The volumetric density of the tubules per unit cell volume (V_{vt}) was estimated to be 1%. The tubular membrane density expressed per unit cell volume (S_{vt}) was found to be about $2500 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$. The ratio of the tubular membrane area to the tubule volume was calculated ($S/Vt = 250,000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$) and compared to the known values for other kinds of muscular fibers. The measurement safety is discussed considering the systematic errors attributable to the cytological methods and sectioning planes. It is concluded that topographical parameters could partly explain some electrophysiological properties of the T system.

Nous remercions très vivement Monsieur le Professeur Weibel et Monsieur le Professeur Pavans de Ceccatty de leurs obligeantes critiques et suggestions.

Travail réalisé dans le cadre du programme de l'équipe de recherche associée au C.N.R.S. No. 111 Laboratoire de Physiologie Animale Poitiers.

Received for publication 14 October 1970, and in revised form 5 February 1971.

REFERENCES

1. BASKIN, R. J., and D. W. BEAMER. 1969. Comparative ultrastructure and calcium transport in heart and skeletal muscle microsomes. *J. Cell Biol.* 43:610.
2. BIANCHI, C. P. 1969. Pharmacology of excitation-contraction coupling. Introduction: statement of the problem. *Fed. Proc.* 28:1624.
3. BIANCHI, C. P., and A. M. SHANES. 1959. Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture. *J. Gen. Physiol.* 42:803.
4. EPLING, G. P. 1964. Electron microscopy of bovine cardiac muscle: the transverse sarco-tubular system. *Amer. J. Vet. Res.* 26:224.
5. FAWCETT, D. W., and N. S. Mc NUTT. 1969. The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J. Cell Biol.* 42:1.
6. FORSMANN, W. G., and L. GIRARDIER. 1966. Untersuchungen zur Ultrastruktur des Rattenherzmuskels mit besonderer Berücksichtigung des sarcoplasmatischen Reticulums. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 72:249.
7. FORSMANN, W. G., and L. GIRARDIER. 1970. A study of the T system in rat heart. *J. Cell Biol.* 44:1.
8. ILDEFONSE, M., J. PAGER, and O. ROUGIER. 1969. Analyse des propriétés de rectification de la fibre musculaire squelettique rapide après traitement au glycerol. *C. R. Acad. Sci. Ser. B.* 268:2783.
9. ILDEFONSE, M., and O. ROUGIER. 1968. Activation et inactivation du courant potassium de la fibre musculaire squelettique. *C. R. Acad. Sci. Ser. B.* 267:2344.
10. MATTER, A., L. ORCI, and C. ROUILLER. 1969. A study on the permeability barriers between Disse's space and the bile canaliculus. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* 11.
11. PEACHEY, L. D. 1965. Sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog sartorius. *J. Cell Biol.* 25:209.
12. RAMBOURG, A. 1967. Détection des glycoprotéines en microscopie électronique: coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. *C. R. Acad. Sci. Ser. B.* 265:1426.
13. REVEL, J. P., and M. J. KARNOVSKY. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33:C7.
14. SCHOEK, G. 1962. Correlation between dislocation length and density. *J. Appl. Phys.* 33:1745.
15. SIMPSON, F. O. 1965. The transverse tubular system in mammalian myocardial cells. *Amer. J. Anat.* 117:1.
16. UNDERWOOD, E. E. 1969. Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures. *J. Microsc.* 89:161.
17. WEIBEL, E. R. 1968. Etudes morphométriques du poumon. Leur méthodologie et leurs applications. *Rev. Tuberc. Pneumol.* 32:185.
18. WEIBEL, E. R., W. STAUBLI, H. R. GNAGI, and F. A. HESS. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.* 42:68.