

50.376
1970
N° d'ordre 215
159

50.376
1970
159

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

THESE

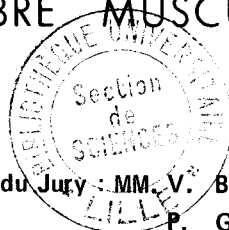
présentée à la
FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
pour obtenir
le titre de Docteur en Physiologie Animale
(3ème cycle)
par

Yvonne BEDOURA - MOUNIER

CONDUCTANCES IONIQUES

MEMBRANAIRES DE REPOS

DE LA FIBRE MUSCULAIRE DE CRABE



Membres du Jury : MM. V. BLOCH, Président
P. GUILBAULT, Examineur
S. BOUISSET, Examineur
RH. BENOIT, Invité

12
Soutenu le 5 Décembre 1970

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire de la Faculté des Sciences de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur GUILBAULT.

En guidant avec sûreté mes recherches, Monsieur le Professeur GUILBAULT a pu me faire profiter de sa grande érudition et de ses conseils éclairés. Sa présence constante, ses suggestions judicieuses, son esprit toujours tourné vers de nouvelles techniques m'ont permis de surmonter les moments difficiles, inévitables dans ce genre de travail. Sacrifiant son temps précieux et même sa santé, il a su insuffler à une équipe jeune sa propre fougue et créer le climat de confiance et d'échanges indispensables aux travaux de recherche et d'enseignement.

Je remercie Monsieur le Professeur BLOCH d'avoir bien voulu assurer la présidence de mon Jury. Qu'il veuille bien accepter ma reconnaissance pour l'appui constant et bienveillant qu'il m'a toujours apporté.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur BOUISSET, qui, après m'avoir aimablement offert l'hospitalité dans son Laboratoire pour mes premières recherches, a bien voulu aujourd'hui examiner mon travail.

Que Monsieur le Professeur BENOIT soit ici remercié d'avoir accepté, malgré ses nombreuses tâches, de juger mon travail. Son enseignement à la Faculté des Sciences d'Orsay est pour une grande part à l'origine de mon goût pour la Physiologie. Qu'il veuille bien trouver

dans ces lignes le témoignage de ma sincère gratitude et de ma respectueuse sympathie.

On ne peut travailler plusieurs années au sein d'une équipe sans contracter quelque obligation à l'égard de chacun de ses membres. Ce travail a été facilité par l'aide, les conseils ou simplement la sympathie de nombreux amis, chercheurs ou techniciens et en particulier :

- Monsieur Jean-Pierre VILAIN qui a su apporter une collaboration efficace et chaleureuse à ce travail. En effet, à aucun moment son appui et son aide amicale ne m'ont fait défaut.

- Monsieur Ghislain HAUDECOEUR qui m'a été d'un grand secours pour mon installation à mon arrivée à Lille. J'ai pu apprécier depuis lors sa gentillesse et son dévouement.

- Mademoiselle Josiane BREBION, Monsieur Georges ATTAGNANT et Monsieur René COISNE pour leur active participation technique.

- Madame Sylviane GARBE qui, en plus de son propre travail, a assuré avec beaucoup de serviabilité et de courage la dactylographie de cette thèse.

- Madame REMI du Laboratoire de Calcul Numérique qui a complaisamment accepté de se charger de la programmation de certains résultats.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

page 1

HISTORIQUE

page 4

- 1°) Caractéristiques membranaires
- 2°) Influence des ions monovalents sur le potentiel de repos et sur la résistance de membrane
- 3°) Influence des ions H^+ sur le potentiel de repos et la résistance de membrane

TECHNIQUES

page 17

- I°) Animaux
- II°) Dissection
- III°) Techniques électrophysiologiques
- IV°) Solutions
 - A. Solution normale
 - B. Solutions avec modifications des concentrations ioniques
 - a) Solutions avec modifications de la concentration potassique
 - milieux hypopotassiques
 - milieux hyperpotassiques
 - b) Solutions avec modifications de la concentration sodique
 - milieux hyposodiques
 - milieux hypersodiques
 - c) Solutions avec modifications de la concentration en chlore

- milieux hypoCl

- milieux hyperCl

C. Solutions à différents pH

RESULTATS

CHAPITRE I : Constantes électriques de la fibre musculaire

de crabe au repos

page 29

I°) Potentiel de repos

II°) Constante d'espace λ

III°) Résistance membranaire R_m

IV°) Capacité membranaire C_m

V°) Relation voltage-courant

VI°) Conclusion

CHAPITRE II : Etude des contributions ioniques au P.R.

et à la R_m

Influence des ions :

I°) Potassium

page 53

II°) Sodium

page 60

III°) Chlore

page 68

A. Influence de Cl^- en excès

B. Milieux appauvris en Cl^-

a) Remplacement de NaCl par du benzène
sulfonate de Na

b) Remplacement de NaCl par du propionate
de Na

- c) Influence de la concentration potassique externe en absence de chlore
- d) Remplacement de NaCl par du sulfate de sodium
- C. Courbes voltage-courant en milieu appauvri en chlore
- D. Conclusion

IV°) Hydrogène (Influence des pH acides)

page 87

- A. Variations du P.R. en fonction du pH
- B. Variations de la R_m en fonction du pH
- C. Détermination de la perméabilité modifiée à pH acide
 - a) Influence des variations de la concentration potassique externe
 - b) Influence des variations de la concentration en chlore externe
- D. Conclusion

CHAPITRE III : Evaluation des conductances ioniques membranaires de la fibre placée en conditions normales

page 98

- I°) Choix des valeurs des concentrations ioniques internes
- II°) Evaluations relatives de G_K et G_{Cl}
- III°) Vérification de la valeur expérimentale de R_m
Valeurs absolues de G_K et G_{Cl}

DISCUSSION ET CONCLUSION

page 111

RESUME

page 121

BIBLIOGRAPHIE

page 122

SOMMAIRE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma électrique de la membrane
- Figure 2 : Circuit électrique montrant la contribution des ions au potentiel de membrane
- Figure 3 : Musculature d'une patte de crabe
- Figure 4 : Schéma du montage électronique
- Figure 5 : Circuit électrique représentant les propriétés physiques passives de la membrane d'une fibre en un point
- Figure 6 : Enregistrement des potentiels électrotoniques recueillis sur la fibre musculaire de crabe
- Figure 7 : Détermination graphique de la constante d'espace λ
- Figure 8 : Détermination graphique de la constante de temps membranaire
- Figure 9 : Déplacements du P.R. pour des courants dépolarisants et hyperpolarisants
- Figure 10 : Courbe voltage-courant
- Figure 11 : Potentiel local
- Figure 12 : Durées de stabilisation des P.R. lors de l'application puis de retrait de solutions hyperpotassiques
- Figure 13 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[K]_e$ avec $[Cl]_e = 594 \text{ mEq/l}$

Figure 14 : Courbes voltage-courant pour une fibre placée en solution hyperpotassique.

Figure 15 : Amplitude du P.R. en fonction du log de Na_e

Figure 16 : Evolution du P.R. au cours du temps en milieu $Na_e = 0$

Figure 17 : Courbes voltage-courant pour une fibre placée dans un milieu sans sodium

Figure 18 : Variations de la R_m sous l'action d'un milieu hyperpotassique dépourvu de sodium

Figure 19 : Evolution du P.R. au cours du temps en solution enrichie en chlore ($Cl_e = 1107$ mEq/l)

Figure 20 : Action du benzène sulfonate de Na utilisé comme substitut du NaCl pour des milieux appauvris en Cl^- .

Figure 21 : Amplitude du P.R. en fonction du log de Cl_e

Figure 22 : Evolution du P.R. et de la R_m sous l'influence de solutions appauvries en chlore.

Figure 23 : Influence des milieux hyperpotassiques sur le P.R. en absence de chlore

Figure 24 : Amplitude du P.R. en fonction du log de K_e avec $Cl_e = 0$ mEq/l

Figure 25 : Courbes voltage-courant obtenues aux différentes phases de l'évolution du P.R. lorsque $Cl_e = 23,6$ mEq/l (courbes 2 et 3) au lieu de 594 (courbes 1 et 4)

Figure 26 : Evolution du P.R. en fonction du pH extracellulaire

Figure 27 : Variations de la résistance de membrane en fonction du pH

Figure 28 : Amplitude du P.R. en fonction du log de K_e à différents pH

Figure 29 : Variations du P.R. en fonction du log de Cl_e à pH 7,8
et 4,25

Figure 30 : Mise en évidence du blocage de la perméabilité potassique
à pH 4,25 en absence de chlore externe

Figure 31 : Schémas de membrane proposés par EISENBERG

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition des milieux hypopotassiques

Tableau 2 : Composition des milieux hyperpotassiques

Tableau 3 : Composition des milieux hyposodiques

Tableau 4 : Composition des milieux hypersodiques

Tableau 5 : Composition des milieux appauvris en chlore

Tableau 6 : Composition des mélanges tampons

Tableau 7 : Constantes électriques de la fibre musculaire de *Carcinus maenas*

Tableau 8 : Evolution du P.R. en fonction de la concentration potassique externe

Tableau 9 : Mesures relatives de R_m en fonction de K_e

Tableau 10 : Evolution du P.R. en fonction de la concentration sodique externe

Tableau 11 : Valeurs des P.R. obtenus pendant 45 mn d'imbibition d'une fibre dans une solution enrichie en chlore ($Cl_e = 1107 \text{ mEq/l}$)

Tableau 12 : Variations du P.R. en fonction de Cl_e lorsque NaCl est remplacé par du propionate de Na

Tableau 13 : Valeurs des P.R. obtenus pour différentes concentrations potassiques en absence de chlore

Tableau 14 : Comparaison des temps de stabilisation des P.R. en fonction de K_e et de Cl_e

Tableau 15 : Valeurs des P.R. initiaux, des P.R. à la fin de la repolarisation en solution sans chlore et des conductances ioniques.

Tableau 16 : Valeurs moyennes des P.R. en fonction du pH

Tableau 17 : Valeurs moyennes des P.R. en fonction de Cl_e à pH 4,25

Tableau 18 : Evaluation de T_K et T_{Cl} en conditions normales

INTRODUCTION

Il est bien connu que la résistance de membrane (R_m) des muscles de crustacés est très inférieure à celle des muscles de vertébrés alors que la capacité membranaire (C_m) apparaît plus forte. De nombreux travaux relatifs à l'ultrastructure de ces muscles mettent en évidence l'existence d'un important réseau interne de tubules résultant d'invaginations de la membrane externe et contribuant, de ce fait, aux propriétés électriques des fibres.

Les résultats concernant les valeurs des caractéristiques électrophysiologiques de la membrane de la fibre musculaire de crabe se révèlent très différents selon les auteurs. Ainsi, les valeurs obtenues peuvent être classées en deux catégories : la première donne une R_m de 100 à 300 Ωcm^2 et une capacité membranaire d'environ 40 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, la seconde montre que la R_m peut être beaucoup plus importante : 1000 à 2000 Ωcm^2 et la C_m plus faible : 1 à 10 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Ces dernières valeurs de R_m et C_m seraient proches de celles mesurées sur les fibres musculaires de grenouille.

Le fait qu'il existe deux valeurs possibles pour chaque caractéristique membranaire résulte de l'estimation faite de la surface membranaire. Cette surface dépend de l'étendue des invaginations à l'intérieur de la fibre et sa détermination est le facteur expliquant les deux groupes de mesures obtenues. En effet, certains auteurs ne considèrent que la portion de membrane en surface, d'autres, par contre, tiennent compte, au moyen de photographies de microscopie électronique, de son extension à l'intérieur de la fibre. C'est pourquoi nous avons évalué, dans une première partie, la résistance

de membrane et son inverse, la conductance (G_m), et enfin, la capacité membranaire d'une fibre au repos en "conditions normales" c'est-à-dire placée dans une solution physiologique de composition ionique appropriée, compte-tenu des concentrations ioniques internes de la fibre. Dans notre cas, une correction de la surface due aux invaginations n'a pu être faite, aussi avons-nous comparé nos résultats à ceux déjà obtenus dans des conditions identiques. Ces valeurs absolues de la résistance de membrane et de la conductance ont été réalisées afin de pouvoir préciser, à la fin de ce travail, l'importance quantitative de chaque conductance ionique.

Pour établir ces calculs, il convient de déterminer, dans une deuxième partie, quels ions sont responsables du potentiel de membrane et de la résistance électrique de la fibre. Ceci est possible en enregistrant les variations de ces deux dernières caractéristiques lors de modifications de la concentration de tel ou tel ion dans la solution externe. Connaissant alors la nature des ions participant au potentiel de membrane et à la conductance membranaire, nous avons pu évaluer la contribution de chacun à cette conductance.

Enfin, nous avons essayé de préciser les voies de passage de ces ions à travers la membrane. Il existe en effet deux possibilités, compte-tenu de l'ultrastructure de la fibre : un ion peut soit traverser la membrane au niveau sarcolemmique à la surface de la fibre, soit passer à travers la membrane du système tubulaire, en admettant que l'influx et l'efflux pour chaque ion puisse se situer à des niveaux différents. Le moyen d'investigation que nous avons

choisi est l'observation de l'influence sur les propriétés électriques de la fibre, des ions H^+ dont l'action sur des sites membranaires de surface a été démontrée. Cette étude s'est trouvée complétée, dans la discussion, par l'ensemble de nos résultats relatifs aux variations électrophysiologiques produites par des modifications des concentrations ioniques externes, et présentés sous forme de courbes voltage-courant montrant les propriétés rectificatrices de la membrane.

HISTORIQUE

1°) CARACTERISTIQUES MEMBRANAIRES

Les potentiels électriques cellulaires sont dus à l'existence de piles constituées par le système : milieu extracellulaire, membrane cellulaire, milieu intracellulaire. La membrane constitue donc un des éléments de ce système et est douée de perméabilité plus ou moins forte, voire sélective, vis à vis des substances susceptibles de la traverser et en particulier des ions. Ses propriétés électriques passives peuvent être représentées par le schéma suivant : (figure 1) :

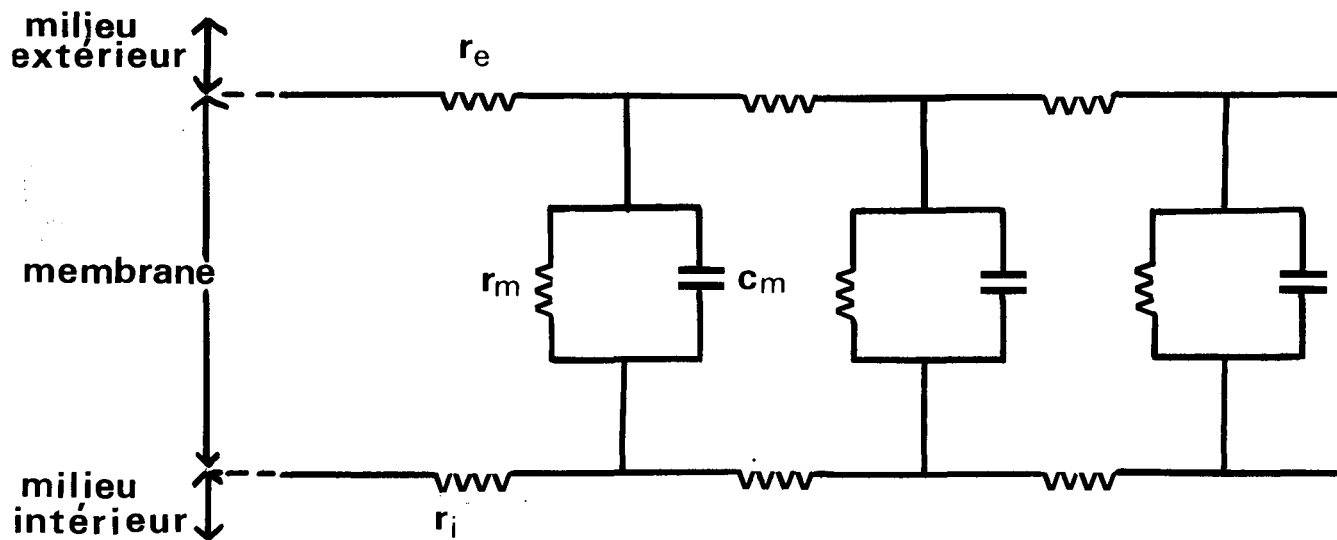


Figure 1 : Schéma électrique de la membrane

r_e, r_i : résistances extra et intracellulaires par unité de longueur

r_m, C_m : résistance et capacité de la membrane en un point.

Nous remarquons que la membrane présente une résistance

r_m en un point (ou R_m par unité de surface = résistance spécifique), capable de s'opposer au passage des substances ou au contraire de le faciliter.

De très nombreuses mesures de résistance de membrane ont été effectuées aussi bien sur les muscles de vertébrés que sur les muscles d'invertébrés. Deux types de résultats apparaissent à partir des différentes valeurs obtenues. La R_m des fibres d'invertébrés et notamment des crustacés est généralement considérée comme faible, de l'ordre de quelques centaines d'ohms cm^2 alors que la R_m relevée par exemple sur la fibre musculaire du couturier de grenouille est d'environ 2500 Ωcm^2 (JENERICK 1953) ou 2800 (ADRIAN et FREYGANG 1962 a) à 4000 Ωcm^2 (FATT et KATZ 1951). Pour les fibres musculaires de crustacés, FATT et KATZ (1953) trouvent 100 à 200 Ωcm^2 sur les fibres de *Carcinus maenas* et de *Portunus depurator* et HAYS, LANG et GAINER (1968) obtiennent $465 \pm 27 \Omega\text{cm}^2$ pour le crabe bleu *Callinectes sapidus*.

Inversement, la capacité membranaire de la fibre musculaire d'invertébrés est très élevée (FATT et KATZ 1953, ATWOOD 1963, FALK et FATT 1964). Ces auteurs donnent une valeur moyenne de 40 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ pour la fibre musculaire de crabe. HAYS, LANG et GAINER (1968) obtiennent une valeur identique ($36,9 \pm 8,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) c'est-à-dire environ 5 fois plus forte que celle mesurée sur la fibre musculaire du couturier de grenouille (FATT et KATZ 1951).

Ces résultats apparemment surprenants peuvent se comprendre si l'on considère que la membrane externe de ces fibres émet d'import-

tantes invaginations vers l'intérieur, formant un système complexe de canalicules ouverts sur le milieu extérieur. Cette structure, maintenant bien connue, a été décrite notamment à propos de la fibre musculaire de grenouille par PAGE (1964), HUXLEY (1964), PEACHEY (1965 a) et ENDO (1966). Si la fibre musculaire de crabe présente le même type de structure, des différences apparaissent dans l'abondance et la distribution des membranes. En effet, les invaginations de la membrane sont particulièrement développées et profondes comme l'ont observé PEACHEY et HUXLEY (1964), ATWOOD (1963-1965) et PEACHEY (1967). Ce dernier auteur démontre que les replis du sarcolemme de la fibre musculaire de *Carcinus maenas* sont très importants comparés à ceux de la fibre musculaire de grenouille et qu'il existe en outre deux systèmes séparés de structures tubulaires : Z et A ainsi appelés à cause de leur localisation respective près des lignes Z et à l'extrémité de chaque bande A. Seules, les invaginations A sont étroitement liées au réticulum sarcoplasmique formant ainsi une structure en diades déjà signalée par PEACHEY et HUXLEY (1964). Celle-ci se retrouve également chez les Arthropodes mais diffère des structures en triades, généralement rencontrées chez les vertébrés. En outre, les invaginations ne traverseraient pas seulement la fibre transversalement comme cela se produit pour le muscle squelettique de grenouille, mais bifurqueraient à angle droit, s'étendant longitudinalement, parallèlement aux myofibrilles (MELVIN et HESS 1967).

La corrélation entre cette abondante structure membranaire interne et les mesures des caractéristiques R_m et C_m de la membrane

apparaît de façon indéniable grâce aux travaux de SELVERSTON (1967) sur les fibres de *Balanus nubilus* et de *Carcinus maenas* et grâce aux travaux d'EISENBERG (1965) et de PEACHEY (1967) sur les fibres de ce dernier animal. Ces auteurs démontrent que les mesures de C_m varient considérablement si l'on considère que la surface de la membrane est représentée soit par la portion de membrane entourant la fibre, soit par cette même surface augmentée de la surface des invaginations internes. FALK et FATT (1964) estiment en effet que la plus grande partie de C_m est localisée au niveau des cloisons membranaires du système tubulaire transverse (STT). Ainsi, une relation existerait entre la quantité de membrane du STT et la valeur de la C_m totale. En faisant une estimation de l'augmentation de surface provenant des tubules, PEACHEY (1965 b) calcule que la valeur de C_m est voisine de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ et EISENBERG (1965) obtient $9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. SELVERSTON (1967) effectue une évaluation de C_m avant et après correction de la surface. (Cette correction est réalisée à partir de photographies de coupes transversales en microscope électronique). Il trouve alors respectivement 50 et $5,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Il semble donc important de remarquer que la détermination de caractéristiques membranaires est liée à l'ultrastructure de la fibre considérée et tout particulièrement à la quantité de membrane.

II°) INFLUENCE DES IONS MONOVALENTS (Na^+ , K^+ , Cl^-) SUR LE POTENTIEL DE REPOS ET LA RESISTANCE DE MEMBRANE

Nous avons signalé que la membrane est perméable à de

nombreuses substances. Ainsi, il existe une différence de potentiel de part et d'autre de cette membrane, c'est-à-dire entre le milieu extérieur à la fibre et son milieu intérieur, résultant de concentrations ioniques différentes. Cette différence est appelée potentiel de membrane (P.M.) correspondant, quand la fibre n'est pas excitée, au potentiel de repos (P.R.).

L'une des premières théories expliquant le mécanisme de la distribution des ions et du potentiel de membrane pour les fibres musculaires est la théorie de GIBBS-DONNAN présentée par BOYLE et CONWAY (1941). Ces auteurs démontrent que la distribution des ions K^+ et Cl^- de part et d'autre de la membrane suit l'équilibre de DONNAN.

Si le potassium et le chlore sont bien distribués passivement le potentiel de membrane V , dans les conditions d'équilibre, peut alors être représenté par l'équation de NERNST :

$$V = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[K]_i}{[K]_e} = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[Cl]_e}{[Cl]_i}$$

équation dans laquelle n , R , T , F , représentent respectivement la valence de l'ion, la constante des gaz parfaits, la température absolue et la valeur du Faraday. $[K]_e$ et $[K]_i$ sont les concentrations ou plus exactement les activités des ions K^+ à l'extérieur et à l'intérieur de la fibre, $[Cl]_e$ et $[Cl]_i$ celles des ions Cl^- à l'extérieur et à l'intérieur de la fibre.

HODGKIN et HOROWICZ (1959) démontrent, sur le couronnier de

grenouille, qu'il existe bien une telle relation linéaire entre l'amplitude du P.R. et le logarithme de la concentration extracellulaire du potassium et du chlore. Cette relation n'est plus linéaire pour les faibles concentrations potassiques externes, impliquant dans ces conditions la participation d'autres ions au P.R. et principalement du sodium (ADRIAN 1956 ; HODGKIN et HOROWICZ 1959). JENERICK (1953), ADRIAN (1959) et HODGKIN et HOROWICZ (1959) appliquent alors l'équation déduite de la théorie du champ constant (GOLDMAN 1943) aux fibres musculaires de grenouille. Cette équation rend parfaitement compte du potentiel de membrane même lorsque les concentrations des ions de part et d'autre de la membrane ne constituent plus un état d'équilibre.

La membrane peut à partir de ces considérations être représentée selon le schéma suivant : (figure 2).

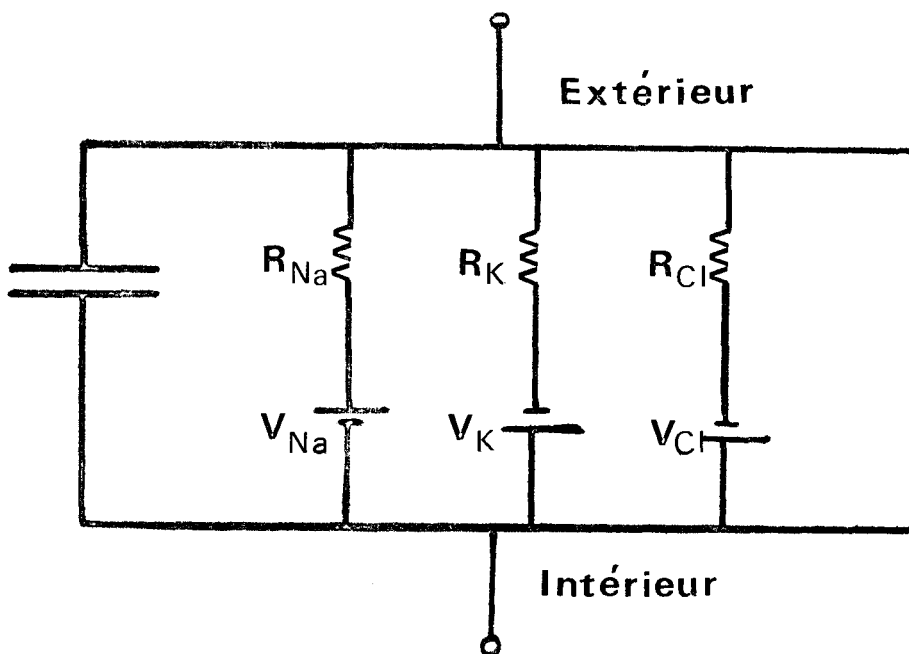


Figure 2 : Circuit électrique montrant la contribution des ions au potentiel de membrane.

La participation sodique au P.R. est néanmoins très faible et décelable, comme nous l'avons mentionné, uniquement lorsque $[K]_e$ est réduite. En outre, des variations de la concentration du chlore externe ne produisent un déplacement du P.R. que de façon passagère et le potentiel de repos est constamment contrôlé par le flux potassique. HODGKIN et HOROWICZ (1959) signalent en effet que le P.R. est le même après un certain délai, que $[Cl]_e$ soit normale ou nulle. Le P.R. résulterait essentiellement de la distribution des ions K^+ et Cl^- selon leur gradient électrochimique (HARRIS 1963) et l'étude de l'influence de ces ions sur le P.R. et la R_m montre qu'aucune modification ne se produit à la suite de transport actif (JENERICK 1953).

A propos des mouvements du sodium, la faible perméabilité de repos de la membrane du couturier de grenouille vis à vis de cet ion ne permet qu'un léger flux passif entrant d'ions Na^+ . Par contre, l'extrusion du Na serait, selon CALDWELL (1968) un processus actif, indépendant des autres flux ioniques actifs ou passifs et lié seulement à l'existence d'une barrière d'énergie suffisante pour permettre l'efflux sodique (CONWAY, KERNAN et ZADUNAISKY 1961). Selon d'autres auteurs, la sortie de Na^+ pourrait dépendre des mouvements de K^+ (ADRIAN et SLAYMAN 1966) ou bien même des mouvements de Cl^- (MULLINS et FRUMENTO 1963).

Enfin, HUTTER et NOBLE (1960), ADRIAN (1961) précisent, pour la fibre musculaire du couturier de grenouille, que le flux de potassium est insuffisant pour expliquer la valeur de la conductance membranaire et que des variations de concentration du chlore extra-

cellulaire ont plus d'effets que des variations équivalentes de $[K]_e$. La valeur de la conductance membranaire est liée à des courants de K^+ et Cl^- sensiblement égaux d'après JENERICK (1953). HUTTER et NOBLE (1960), ADRIAN et FREYGANG (1962 a) établissent que le flux de Cl^- rend compte des deux tiers de la conductance membranaire. En fait, les importances relatives de la conductance au chlore G_{Cl} et de la conductance potassique G_K dépendent de la fibre musculaire considérée. En effet, sur le muscle lisse de mammifère, la conductance membranaire résulte essentiellement du mouvement des ions Cl^- (BURNSTOCK et STRAUB 1958) alors que la membrane du tissu cardiaque a une conductance potassique supérieure à la conductance au chlore (HUTTER et NOBLE 1961). Des différences comparables sont relevées chez les animaux marins : le potentiel de repos des fibres musculaires d'Elasmobranches dépend principalement de la différence de concentrations des ions Cl^- entre l'intérieur et l'extérieur et la conductance membranaire de ces fibres est essentiellement représentée par G_{Cl} tandis que G_K est le facteur déterminant pour les fibres musculaires des poissons téléostéens (HAGIWARA et TAKAHASHI 1967).

En ce qui concerne la fibre musculaire de crabe, la même importance est généralement attribuée aux mouvements des ions K^+ dans le maintien du P.R. (SHAW 1955 a, b. — HAYS, LANG et GAINER 1968). Ces auteurs trouvent également une relation linéaire entre l'amplitude du P.R. et le logarithme de $[K]_e$ sauf pour les faibles concentrations potassiques externes. Ainsi les ions K^+ et Cl^- seraient,

pour les fibres musculaires de crustacés, comme pour la fibre musculaire de grenouille, distribués passivement. Ces mouvements ont été décrits notamment par SHAW (1955 a) pour la fibre musculaire du crabe *Carcinus maenas*, par RICHARDS (1969) pour la fibre du crabe *Maia squinado* et par GAINER et GRUNDFEST (1968) pour la fibre du homard *Homarus americanus*. Plus particulièrement sur la fibre musculaire de *Carcinus maenas*, SHAW (1955 a, b) considère comme valable le concept de l'équilibre de Donnan concernant la distribution des ions de part et d'autre de la membrane. Cependant cet auteur constate également que l'équation de Nernst ne s'applique pas quand la concentration externe de K^+ est faible. De même HAYS, LANG et GAINER (1968) sur la fibre du crabe *Callinectes sapidus* admettent que les valeurs du P.R. correspondant à différentes concentrations externes de sodium, chlore ou potassium (K^+ en excès) sont en accord avec les valeurs prévues par l'équation traduisant un équilibre de Donnan. La seule divergence intervient là encore lorsque les concentrations potassiques extracellulaires sont faibles. Le fait que l'équation de Nernst rende compte à elle seule de la valeur du P.R. dans la plupart des conditions expérimentales et que ce résultat soit conforme à celui de SHAW provient d'après HAYS et Coll. de ce que les fibres étudiées sont des fibres d'animaux vivant en eau saumâtre. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par REUBEN, GIRARDIER et GRUNDFEST (1964) sur les muscles d'écrevisse et par FATT et KATZ (1953) sur les muscles de *Carcinus*. Selon ces auteurs, la fibre ne se trouve pas, dans les conditions

normales, en équilibre thermodynamique avec le milieu extracellulaire. Elle ne peut donc constituer avec celui-ci une pile de concentration mais plutôt une pile de diffusion dont rend compte l'équation de GOLDMAN (1943) modifiée par HODGKIN et KATZ (1949) et qui fait intervenir l'activité des ions dans les milieux extra et intracellulaires ainsi que la perméabilité de la membrane à ces mêmes ions. Le potentiel de repos sera alors égal à :

$$P.R. = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{P_K [K]_i + P_{Cl} [Cl]_e + P_{Na} [Na]_i}{P_K [K]_e + P_{Cl} [Cl]_i + P_{Na} [Na]_e}$$

dans le cas où la membrane n'est perméable qu'aux seuls ions Na^+ , K^+ , et Cl^- . Ainsi, on conçoit aisément que la perméabilité même très faible, à un ion, (ce qui est le cas pour Na^+) ne peut faire négliger la participation de cet ion au potentiel de repos de la fibre, bien que HAYS et COLL. aient postulé que cette influence est nulle. Nous remarquons donc que deux théories peuvent rendre compte, selon les auteurs, de la valeur du potentiel de repos des fibres musculaires d'invertébrés alors que pour la fibre de vertébrés et notamment de grenouille tous les résultats concordent, comme nous l'avons signalé.

III°) INFLUENCE DES IONS H^+ SUR LE POTENTIEL DE REPOS ET LA RESISTANCE DE MEMBRANE

Les caractéristiques membranaires des fibres musculaires sont modifiées lorsque la concentration en ions H^+ de la solution

externe varie (MEVES et VÖLKNER 1958). De plus, les travaux effectués jusqu'alors mettent en évidence un comportement différent de la membrane vis à vis des ions H^+ selon qu'il s'agit des fibres musculaires de vertébrés ou d'invertébrés. Ainsi, sur le couturier de grenouille, BROOKS et HUTTER (1962), HUTTER et WARNER (1967 a) mentionnent une augmentation de la conductance au chlore à pH alcalin et une diminution à pH acide également observée par HARRIS (1965) et MAINWOOD et LEE (1968). De même SPURWAY (1965 a) signale une diminution de l'entrée de chlore dans la cellule en milieu acide. A pH élevé, un efflux important de ^{36}Cl se produit alors que l'efflux de ^{42}K n'est que très faiblement augmenté (HUTTER et WARNER 1967 b). MOORE (1969) estime également, à l'aide de traceurs radioactifs que les mouvements de Cl^- sont notablement réduits pour une faible valeur du pH et accrus, par contre, pour une valeur élevée. Enfin, BROOKS et HUTTER (1964) admettent que les ions Cl^- pénètrent à travers la membrane par un canal spécifique ouvert largement lorsque le milieu extracellulaire est alcalin et fermé lorsque ce milieu est acide.

Si les résultats des différents auteurs ayant étudié les effets du pH sur la conductance membranaire des fibres musculaires squelettiques de vertébrés s'accordent, il n'en est pas de même pour ceux obtenus sur les fibres musculaires d'invertébrés. En effet, la membrane de la fibre musculaire d'écrevisse *Astacus fluviatilis* est imperméable aux anions à pH élevé et la conductance au chlore est augmentée à pH acide, ce fait étant d'ailleurs inter-

prété comme une diminution de la perméabilité potassique P_K par DE MELLO et HUTTER (1966). Sur l'écrevisse également, REUBEN, GIRARDIER et GRUNDFEST (1962) observent une chute de G_{Cl} à pH 10 et admettent que le chlore pénètre dans la fibre par des sites chargés positivement dont la spécificité vis à vis du Cl^- diminue au fur et à mesure que la densité des charges positives est elle-même diminuée. HAGIWARA, GRUENER, HAYASHI, SAKATA et GRINNELL (1968), considèrent la membrane de balane (*Balanus nubilus*) comme une membrane amphotère chargée de groupements positifs et négatifs à constantes de dissociation variant suivant le pH. A pH inférieur à 5, la conductance au chlore est augmentée par suite de la prédominance des groupements positifs facilitant le passage des anions à travers la membrane ; pour des pH dont la valeur est comprise entre 5 et 10, les groupements négatifs sont les plus nombreux et les cations peuvent être déplacés plus facilement que les anions. Dans ce deuxième cas, c'est la conductance potassique qui est augmentée alors que la conductance au chlore demeure constante.

Les effets différents du pH suivant le type de fibre soumise à l'expérimentation peuvent cependant être expliqués en tenant compte des voies de passage des ions et du fait que les ions H^+ agissent sur des sites membranaires de surface comme l'ont montré BROOKS et HUTTER (1964), HUTTER et WARNER (1967 a) et SPURWAY (1965 b). Ainsi, pour la fibre musculaire de grenouille, les ions H^+ modifient la perméabilité au chlore et HUXLEY et TAYLOR (1958), HODGKIN et HOROWICZ (1960), ADRIAN et FREYGANG (1962 a, b) ont

précisément mis en évidence le passage de cet ion au niveau de la membrane sarcolemmique. Pour la fibre musculaire d'écrevisse, GIRARDIER, REUBEN, BRANDT et GRUNDFEST (1963) démontrent que l'efflux de chlore se produirait à travers la membrane du système tubulaire transverse et que seule la pénétration du chlore dans la cellule au niveau sarcolemmique serait influencée par des variations de pH (REUBEN, GIRARDIER et GRUNDFEST 1962). SELVERSTON (1967) admet également pour la fibre de crabe un passage du chlore en profondeur mais ce résultat n'a pas été étayé par l'étude de l'action des ions H^+ .

TECHNIQUES

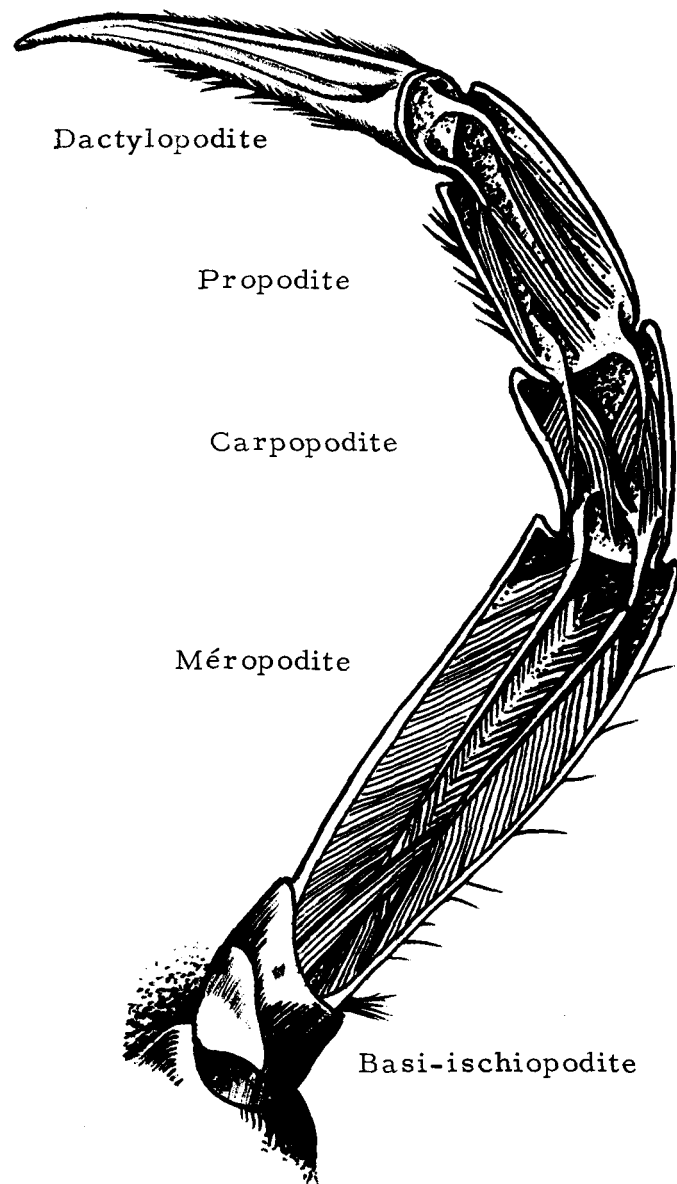
I°) ANIMAUX

Les crabes (*Carcinus maenas*) proviennent des côtes de la mer du Nord et nous ont été fournis par l'Institut de Biologie marine de Wimereux.

Il n'apparaît aucune différence électrophysiologique significative due à la saison ou au sexe des crabes. Ceux-ci sont conservés à 12° C dans des bacs alimentés en eau de mer constamment renouvelée et filtrée. Les muscles utilisés pour l'expérimentation sont disséqués dans une solution physiologique dont la température est de 15 à 18° C. Lors des expériences, les différentes solutions imbibant les fibres sont également à la même température.

II°) DISSECTION

Figure 3 :
Musculature d'une
patte de crabe.



Les muscles utilisés appartiennent au méropodite des pattes locomotrices du crabe. L'innervation musculaire est coupée et seul un faisceau d'une dizaine de fibres, au maximum, est conservé ; les autres fibres du segment sont enlevées. La préparation est ensuite placée dans la cuve expérimentale C (figure 4) remplie de solution physiologique et dont le volume est suffisamment grand (10 cm^3) par rapport au volume des fibres pour permettre l'étude de certaines caractéristiques membranaires. La solution physiologique est constamment renouvelée à raison de 3 à 5 ml/mn afin d'assurer une bonne imbibition de la préparation ainsi qu'un maintien rigoureux des concentrations ioniques extracellulaires.

III°) TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Deux microélectrodes de verre remplies d'une solution de KCl 3 M sont utilisées d'une part pour l'enregistrement intracellulaire et d'autre part pour l'application de courants polarisants à la membrane. Seules les microélectrodes, de 5 à 15 $M\Omega$ de résistance, testées à l'aide d'un générateur de courant constant, et présentant un potentiel de pointe inférieur à 5 mV, sont utilisées. Les microélectrodes de résistance inférieure à 5 $M\Omega$ ne permettent qu'un enregistrement moins ample du P.R. et des potentiels électrotoniques par suite d'une pénétration insuffisante correspondant à un écrasement de la surface de la fibre. Dans ce cas, une lésion survient plus ou moins rapidement, décelable par une opacité locale puis totale de la fibre et associée à une chute du P.R.. Par contre, à

L'aide de microélectrodes de résistance convenable, aucune différence dans la mesure du P.R. au cours du temps ne se produit selon que la microélectrode reste ou non implantée dans la fibre pendant toute la durée de l'expérience.

L'enregistrement du potentiel de repos est réalisé entre une microélectrode piquée dans la fibre sous contrôle binoculaire et une électrode diffuse constituée par un pont de KCl 3 M gélifié placé dans la solution. Ces deux électrodes sont connectées à des électrodes au calomel permettant la suppression des potentiels de jonction, elles-mêmes reliées à un changeur d'impédance (C.I. figure 4) dont le montage a été proposé par CHEVAL (1966). Cet appareil permet d'adapter la résistance élevée du circuit comprenant la microélectrode à l'impédance d'entrée de l'amplificateur de l'oscilloscope cathodique. La lecture du potentiel est effectuée sur l'une des voies d'un oscilloscope TEKTRONIX RM 564 (O.C. figure 4).

L'enregistrement des potentiels électrotoniques rendant compte de la valeur de la résistance de membrane de la fibre est effectué grâce au montage décrit ci-dessus. L'application des courants polarisants est réalisée par l'intermédiaire d'un générateur de courant constant (G figure 4) et d'une deuxième microélectrode implantée dans la fibre sous contrôle binoculaire à l'aide d'un deuxième micromanipulateur à une distance inférieure à 100μ de la pointe de la première microélectrode (montage schématisé figure 4). Les potentiels électrotoniques sont recueillis sur la première voie de l'oscilloscope (OC 1) en même temps que le potentiel de repos ;

la deuxième voie de l'oscilloscope (OC 2) permet d'enregistrer la valeur des courants appliqués, mesurée à partir d'une différence de potentiel apparaissant aux bornes d'une résistance de $10\text{ K}\Omega$. Les tracés enregistrés sont photographiés à l'aide d'une "caméra" TEKTRONIX.

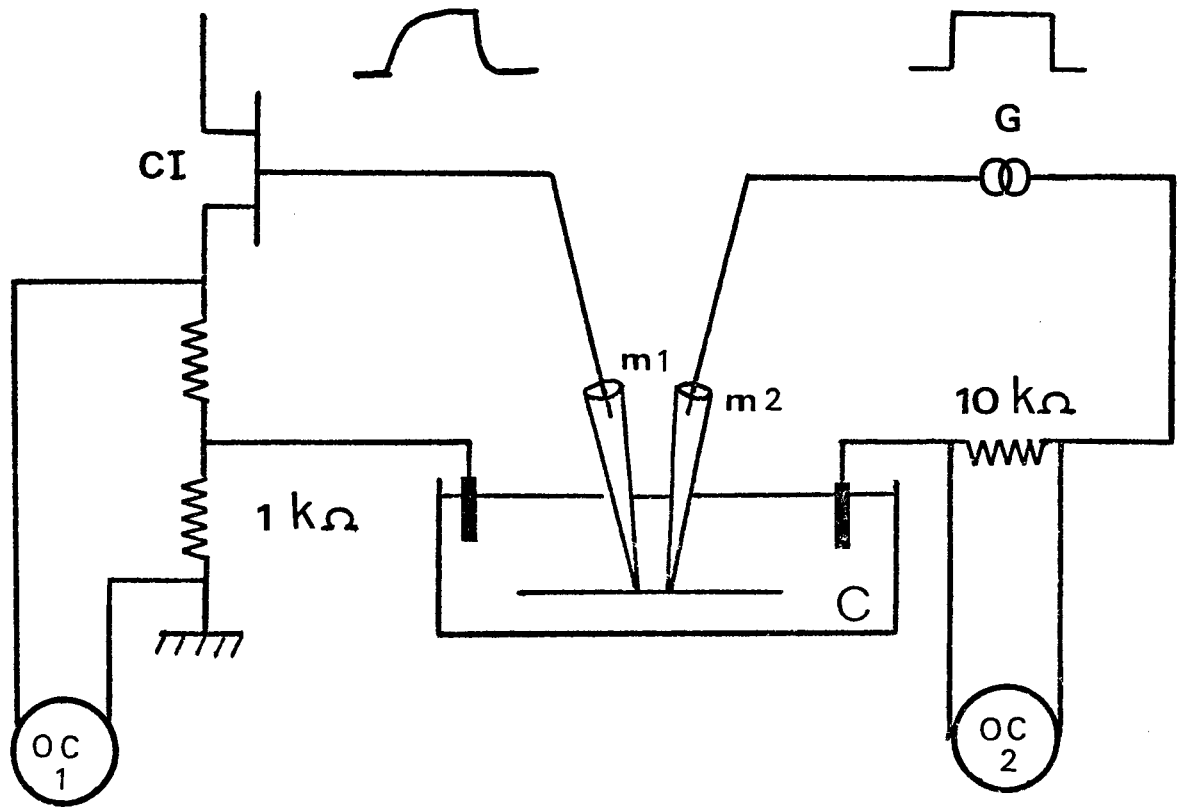


Figure 4 : Schéma du montage électronique utilisé pour l'enregistrement du potentiel de repos et de la résistance de membrane de la fibre musculaire de crabe.

m_1 : microélectrode d'enregistrement

m_2 : microélectrode de stimulation

C : cuve

G : générateur de courant constant

C. I. : changeur d'impédance

O. C. 1. : première voie de l'oscilloscope

O. C. 2. : deuxième voie de l'oscilloscope

IV°) SOLUTIONS

A) Solution "normale"

La solution physiologique considérée comme normale et permettant une survie satisfaisante des fibres musculaires est celle proposée par FATT et KATZ (1953) dont la composition est la suivante :

- NaCl : 513 mM/l
- KCl : 12,9 mM/l
- CaCl₂ : 11,8 mM/l
- MgCl₂ : 23,6 mM/l
- CO₃HNa : 2,6 mM/l

Le pH de cette solution est égal à 7,8.

B) Solutions avec modifications des concentrations ioniques

Pour certains milieux appauvris en ions devenant de ce fait hypotoniques, la pression osmotique a été rétablie en ajoutant une quantité convenable de saccharose. Pour les milieux rendus hypertoniques par excès d'ions par rapport à la solution normale, il s'est avéré inutile de corriger les valeurs de potentiel enregistrées. En effet, le P.R. reste stable lors de l'application de solutions de composition ionique normale dans lesquelles des quantités importantes de saccharose (jusqu'à 400 mM/l) ont été ajoutées. Nous n'avons pas retrouvé, même après deux heures d'application d'un tel milieu hypertonique, l'hyperpolarisation signalée dans des conditions identiques par LANG et GAINER (1969) sur le crabe bleu.

a) Solutions avec modifications de la concentration potassique

- milieux hypopotassiques (tableau 1)

La diminution de la concentration potassique en-deçà de 12,9 mEq/l est réalisée en réduisant la quantité de KCl de la solution externe. Il en résulte un appauvrissement en ions Cl^- , compensé de façon équimoléculaire par du chlorhydrate de choline.

MILIEUX	KCl mM/l	CHLORHYDRATE DE CHOLINE mM/l
Solution normale	12,9	-
Milieux hypok :		
$K_{en} \times 0,6 = 7,74 \text{ mEq/l}$	7,74	5,2
$K_{en} \times 0,3 = 3,87 \text{ mEq/l}$	3,87	9,1
$K_{en} \times 0,2 = 2,58 \text{ mEq/l}$	2,58	10,4
$K_{en} \times 0 = 0 \text{ mEq/l}$	0	12,9

Tableau 1 : Composition des milieux hypopotassiques utilisés

K_{en} = concentration potassique externe normale = 12,9 mEq/l

Tous les autres sels (NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 , CO_3Na) sont maintenus à leur concentration normale.

- milieux hyperpotassiques (tableau 2)

L'apport en ions K^+ est effectué par addition de sulfate de potassium à la solution normale, en tenant compte du fait qu'une mM de K_2SO_4 apporte deux mEq de K^+ .

MILIEUX	KCl mM/l	K ₂ SO ₄ mM/l
Solution normale	12,9	0
Milieux hyperK		
K _{en} x 2 = 25,8 mEq/l	12,9	6,45
K _{en} x 5 = 64,5 mEq/l	12,9	25,8
K _{en} x 8 = 130,2 mEq/l	12,9	45,15
K _{en} x 10 : 129 mEq/l	12,9	58,05

Tableau 2 : Composition des milieux hyperpotassiques utilisés

K_{en} = concentration potassique externe normale : 12,9 mEq/l
Tous les autres sels (NaCl, CaCl₂, MgCl₂, CO₃HNa) sont
maintenus à leur concentration normale.

b) Solutions avec modifications de la concentration sodique

- milieux hyposodiques (tableau 3)

La réduction ou l'absence de Na_e⁺ est provoquée par suppression d'une partie ou de la totalité du NaCl, [Cl]_e étant rétablie par du chlorhydrate de choline.

- milieux hypersodiques (tableau 4)

L'excès de Na⁺ est apporté sous forme de sulfate de sodium.

MILIEUX	NaCl mM/l	CHLORHYDRATE DE CHOLINE mM/l
Solution normale	513	0
Milieux hypoNa :		
Na _{en} × 0,3 = 153,9 mEq/l	153,9	359,1
Na _{en} × 0 = 0 mEq/l	0	513

Tableau 3 : Composition des milieux hyposodiques utilisés

MILIEUX	NaCl mM/l	Na ₂ SO ₄ mM/l
Solution normale	513	0
Milieux hyperNa :		
Na _{en} × 15 = 769,5 mEq/l	513	128
Na _{en} × 2 = 1026 mEq/l	513	256,5
Na _{en} × 4 = 2052 mEq/l	513	769,5

Tableau 4 : Composition des milieux hypersodiques utilisés

Na_{en} : concentration sodique externe normale : 513 mEq/l
 Tous les autres sels (KCl, CaCl₂, MgCl₂, CO₃HNa) sont
 maintenus à leur concentration normale.

c) Solutions avec modifications de la concentration externe en chlore

Cl ⁻ mEq/l	NaCl mM/l	KCl mM/l	CaCl ₂ mM/l	MgCl ₂ mM/l	Propionate de Na mM/l	Na ₂ SO ₄ mM/l	CH ₃ -SO ₄ -Na mM/l	Benzène sulfonate de Na mM/l	K ₂ SO ₄ mM/l	Propionate de Ca mM/l	MgSO ₄ mM/l
594 solution normale	513	12,9	11,8	23,6	-	-	-	-	-	-	-
340,2	256,5	12,9	11,8	23,6	256,5	-	-	-	-	-	-
83,7	-	12,9	11,8	23,6	-	-	513	-	-	-	-
23,6	-	-	11,8	-	513	-	-	-	6,45	-	23,6
23,6	-	-	11,8	-	-	256,5	-	-	6,45	-	23,6
23,6	-	-	11,8	-	-	-	513	-	6,45	-	23,6
0	-	-	-	-	513	-	-	-	6,45	11,8	23,6
0	-	-	-	-	-	256,5	-	-	6,45	11,8	23,6

Tableau 5 : Composition ionique des solutions appauvries en chlore
(toutes ces solutions sont tamponnées à l'aide de 2,6 mM/l de
CO₃HNa).

- Milieux hypoCl (tableau 5)

La composition des milieux appauvris en Cl^- est donnée dans le tableau 5 page 26 mentionnant les différents anions utilisés à la place du chlore.

- Milieux hyperCl

Un seul milieu a été utilisé, correspondant à un apport de 513 mM de chlorhydrate de choline amenant la concentration totale en Cl^- à 1107 mEq/l.

C) Solutions à différents pH

- Tampons utilisés (d'après GOMORI (1955) et CLARK et LUBS (1917)). Ceux-ci sont mentionnés au tableau 6.

pH	Solutions de base		Composition du mélange tampon
	A	B	
3,4	biphtalate de K 0,1M	HCl 0,1 N	50 ml A + 9,9 ml B
3,77	biphtalate de K 0,1M	HCl 0,1 N	50 ml A + 2,6 ml B
4,25	biphtalate de K 0,1M	NaOH 0,1 N	50 ml A + 0,4 ml B
5	biphtalate de K 0,1M	NaOH 0,1 N	50 ml A + 17,7 ml B
5,5	tris-maléate 0,2M	NaOH 0,2 N	25 ml A + 3,5 ml B
6,4	tris-maléate 0,2M	NaOH 0,2 N	25 ml A + 18,5 ml B

Tableau 6 : Composition des mélanges tampons utilisés

- Solutions externes à différents pH

Elles sont de même composition ionique que celles précédemment mentionnées et amenées au pH désiré à l'aide des tampons appropriés. Lors de l'utilisation de biphtalate de K ($[K^+] = 5 \text{ mEq/l}$), nous avons diminué d'autant la concentration du KCl de la solution physiologique afin de maintenir $[K]_e$ à sa valeur normale de 12,9 mEq/l.

RESULTATS

CHAPITRE I

CONSTANTES ELECTRIQUES DE LA FIBRE MUSCULAIRE DE CRABE AU REPOS

- I°) Potentiel de repos (P.R.)
- II°) Constante d'espace λ
- III°) Résistance membranaire R_m
- IV°) Capacité membranaire C_m
- V°) Relation voltage-courant
- VI°) Conclusion

I°) POTENTIEL DE REPOS (P.R.)

Le potentiel de repos de la fibre musculaire de *Carcinus maenas* se situe généralement entre 60 et 70 mV. Une moyenne établie à partir de 207 fibres donne une valeur de 65 mV ($\sigma = 4,4$). Nous n'avons enregistré que trois valeurs de P.R. nettement plus élevées : 80 - 86 - 102 mV et nous avons alors constaté qu'un milieu hyperpotassique n'entraîne pas de dépolarisation contrairement aux résultats habituels. La rareté de ce type de fibres ne nous a pas permis d'expliquer leur relative hyperpolarisation.

Les différences obtenues pour les mesures du P.R. ne résultent pas du fait que l'expérience est réalisée sur une fibre isolée ou sur un faisceau de fibres ou sur le muscle entier. En effet, des variations atteignant jusqu'à 8 mV se produisent pour une même fibre interrogée en différents points dans le sens longitudinal et surtout transversal.

La stabilité du P.R. dans les conditions normales est parfaite. Certaines expériences nécessitant des durées d'imbibition de la préparation d'environ une heure, nous avons testé au préalable l'évolution du potentiel au cours du temps : celle-ci est nulle ou négligeable (variation maximum de 2 mV après une heure).

II°) CONSTANTE D'ESPACE λ

λ : constante d'espace ou caractéristique de longueur de la fibre correspondant à une distance AB telle qu'un courant sous-limitaire appliqué à la membrane en un point A produit une diminution du potentiel de 63,2 % en B.

Cette mesure, ainsi que la détermination de la résistance de membrane (paragraphe suivant), sont basées sur le fait que la structure d'une fibre musculaire consiste schématiquement en un milieu intérieur entouré d'une fine membrane de surface ayant une faible résistance de fuite et une importante capacité. Le comportement passif d'une telle fibre est alors gouverné par la théorie du câble (RUSHTON 1934 - COLE et CURTIS 1938). La preuve expérimentale de cette théorie est apportée par le fait que les propriétés électriques déterminées par le passage d'un courant entre l'extérieur et l'intérieur de la fibre, sont distribuées tout le long de la fibre de telle sorte que ce courant appliqué en un point par une microélectrode provoque une chute de potentiel dans la résistance interne de la fibre et dans les connections d'éléments résistants entre l'intérieur et l'extérieur. Cette diminution du potentiel est d'autant plus forte que celui-ci est recueilli plus loin du point d'application du courant. Dans ces conditions, comme pour un câble, les caractéristiques quantitatives de la fibre sont alors déterminées par 4 constantes :

- la résistance électrique du liquide extracellulaire
- la résistance électrique du myoplasme
- la résistance électrique de la surface membranaire

- la capacité électrique de la membrane

Cette théorie est applicable à la fibre sous certaines conditions :

1 - Il ne doit pas y avoir de gradients de courant dans le milieu extracellulaire. Ceci est facilement réalisé si le volume du milieu conducteur baignant la fibre est important et présente de ce fait une faible résistance par rapport à l'intérieur. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le volume du liquide entourant la préparation est de 10 cm^3 , celui du faisceau de fibres est approximativement de 10^{-4} à 10^{-3} cm^3 . La résistance de la solution physiologique utilisée est très faible et toujours négligée devant la résistance interne de la fibre.

2 - Le courant passant dans la voie intérieur-extérieur doit être appliqué dans un plan perpendiculaire à l'axe de la fibre. (La fibre peut être représentée comme une succession de segments de longueur infinitésimale).

3 - Le myoplasme et le milieu extracellulaire doivent être considérés comme de pures résistances ohmiques.

4 - La résistance de la membrane doit rester constante pour des densités de courant la traversant suffisamment petites.

5 - La capacité membranaire doit se comporter comme un diélectrique pur sans fuite (ce qui n'est pas le cas pour une fibre).

6 - Le diamètre de la fibre doit être petit comparé à la constante d'espace λ . Cette condition n'est pas toujours respectée spécialement pour des fibres de très gros diamètre.

7 - Il convient enfin de comparer la longueur L de la fibre à la constante d'espace λ . En effet, la théorie du câble suppose $L \gg \lambda$. Pour la fibre musculaire du crabe, la longueur moyenne est de 8 mm et est, comme nous le verrons, supérieure à λ . Lorsque cette condition n'est pas réalisée, il est toutefois possible d'appliquer la théorie à un câble court, pour lequel on a $L \approx 2 \lambda$, en introduisant des facteurs de correction (STEFANI et STEINBACH 1969).

De nombreux auteurs et particulièrement HODGKIN et RUSHTON (1946), FALK et FATT (1964) démontrent que ces conditions sont toujours réalisées, le plus souvent grâce à des approximations, sans que toutefois d'erreurs sérieuses puissent en résulter.

L'application de cette théorie à la fibre musculaire nous permet d'établir les relations suivantes : le courant passant à travers la membrane détermine une d.d.p. dictée par la loi d'ohm,

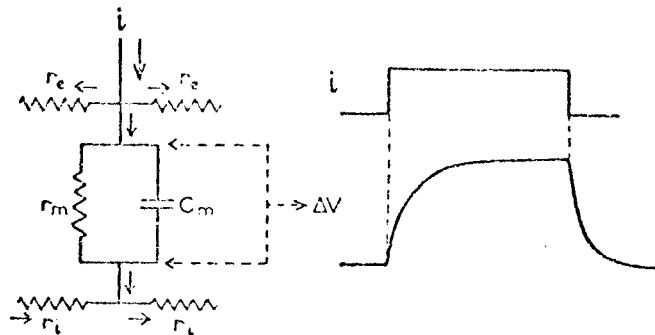


Figure 5 : Circuit électrique représentant les propriétés physiques passives de la membrane en un point

r_e, r_i : résistances extra et intracellulaires par unité de longueur

r_m, C_m : résistance et capacité de la membrane en un point.

où r_m désigne la résistance de membrane en un point et i_m l'intensité du courant traversant cette résistance. Ce potentiel s'ajoute algébriquement au potentiel de repos. C'est cette différence de potentiel ohmique qui est dérivée sous forme de potentiel électrotonique ΔV (figure 5).

Si le rapport entre la variation du P.R. et le courant total polarisant a les dimensions d'une résistance, il est également fonction de la distance séparant l'électrode recueillant la variation de potentiel de l'électrode électrotonisante.

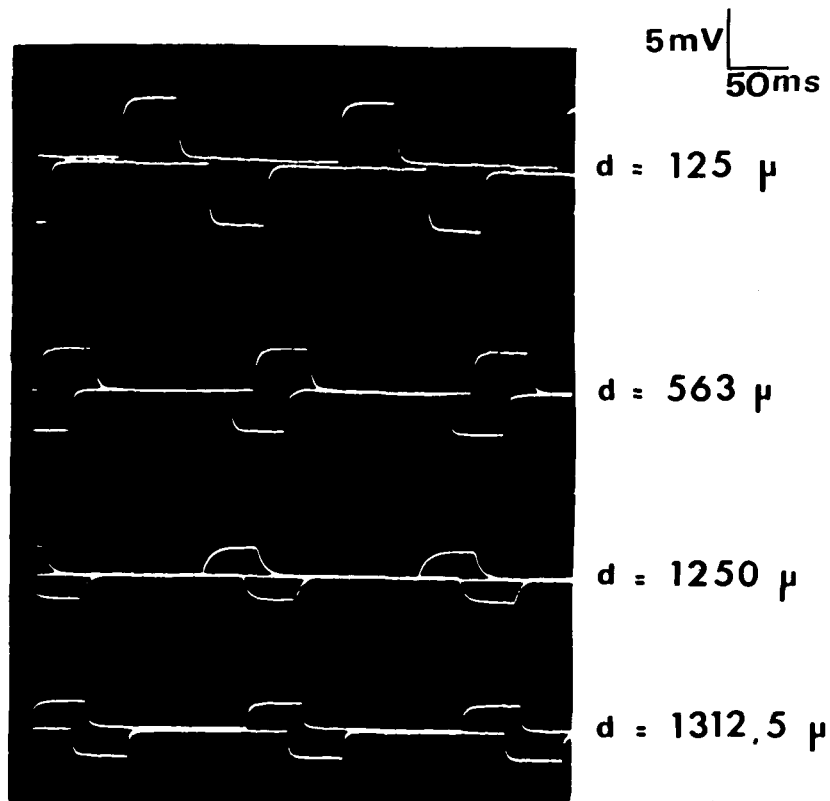


Figure 6 : Enregistrement des potentiels électrotoniques recueillis sur la fibre musculaire de crabe

d : distance séparant les deux microélectrodes

Courants rectangulaires électrotonisants : $0,4 \mu A - 50 ms$

Cette relation met en évidence le phénomène de propagation électrotonique, valable pour de faibles courants comme le montre la figure 6.

CALCUL DE λ

Définitions :

V : variation du P.R. due au courant polarisant à une distance x du point d'application de celui-ci.
(Volts)

V_0 : variation du P.R. due au courant polarisant à une distance $x = 0$
(Volts)

λ : constante d'espace calculée d'après la théorie du câble
(cm) égale à :

$$\lambda_{\text{cm}} = \sqrt{\frac{r_m}{r_i + r_e}}$$

r_i : résistance par unité de longueur du myoplasme
(ohm/cm)

r_e : résistance par unité de longueur du milieu extracellulaire, négligeable devant r_i .
(ohm/cm)

r_m : résistance par unité de longueur de la membrane
(ohm cm)

R_m : résistance spécifique de la membrane telle que
(ohm cm²)

$$r_m = \frac{R_m}{2 \pi a}$$

a : rayon de la fibre
(cm)

A partir de ces définitions et en admettant que la R_m demeure constante durant le passage du courant, la fibre musculaire peut être considérée comme un câble conducteur. Dans ces conditions V et V_0 sont reliées par la relation suivante :

$$V = V_0 e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

ou

$$\text{Log } V = \text{Log } V_0 - \frac{x}{\lambda} \text{Log } e$$

Le tracé des courbes en coordonnées semi-logarithmiques (figure 7) traduisant la valeur du potentiel V en fonction de la distance inter-électrode x nous a permis de déterminer V_0 puis une valeur V' telle que la distance x soit égale à la constante d'espace λ sachant que :

$$V' = 0,367 V_0 \text{ quand } x = \lambda$$
$$(e^{-1} = 0,367)$$

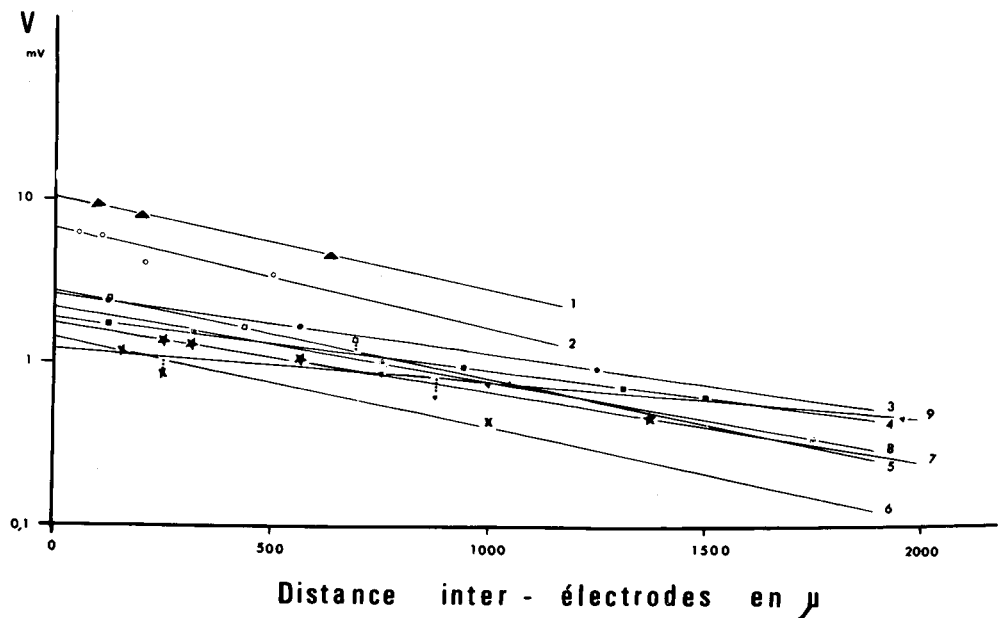


Figure 7 : Mise en évidence de la propagation électrotonique le long de la fibre musculaire de crabe.

Détermination graphique de la constante d'espace λ .

(Les chiffres mentionnés à l'extrémité des droites

correspondent aux références du tableau 7, colonne 1).

Nous constatons d'après ces courbes expérimentales que nous ne retrouvons pas l'absence de linéarité pour une distance inter-électrode inférieure à 250 μ , signalée par FATT et KATZ (1953). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous pouvons admettre que le décrétement spatial du potentiel électrotonique reste exponentiel même pour une faible distance entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode électrotonisante. La tableau 7 page 45 montre que λ est comprise entre 0,7 et 1,4 mm. Signalons également qu'aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les différents paramètres : P.R., diamè-

mètre, constante d'espace, de la fibre.

Si la détermination graphique de λ est entachée de l'imprécision de la lecture de la distance inter-électrode effectuée à l'aide d'un oculaire avec micromètre, cette technique nous a paru préférable à celle du calcul nécessitant la connaissance de r_m et de r_i d'après la relation $\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_e + r_i}}$, la mesure de r_m étant elle-même dépendante de r_i dont la détermination est particulièrement délicate. En effet, une valeur R_i = résistance spécifique du myoplasme peut être calculée en admettant que la résistance interne de la fibre constitue une des branches d'un pont de Wheastone. Toutefois sa valeur est faible et pour que la mesure soit suffisamment précise, il est alors nécessaire d'envoyer un courant très fort à travers cette résistance interne de la fibre. Nous nous sommes heurtés au problème de la polarisation des électrodes nous obligeant alors à appliquer de forts courants alternatifs. Cependant, cette solution n'a fait qu'accroître l'incertitude de nos mesures du fait de l'apparition de nombreux parasites, les microélectrodes ayant une forte impédance. Enfin, la structure même de la fibre musculaire de crabe explique la très importante incertitude résultant de cette mesure de R_i . En effet, la membrane sarcolemmique émet de nombreuses invaginations, le réticulum est particulièrement abondant et il s'avère difficile de considérer une valeur de R_i standard et constante pour une fibre entière.

III°) RESISTANCE MEMBRANAIRE R_m

Le calcul de R_m demande que soient définies au préalable les quantités suivantes : R_i = résistance spécifique du myoplasme (ohm cm) telle que :

$$r_i = \frac{R_i}{\pi a^2}$$

i_m : courant pénétrant dans la membrane à la distance x de son point d'application

I_0 : courant total passant à travers la membrane.

De la relation

$$V = V_0 e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

et d'après la loi d'ohm

$$V = r_m i_m$$

on peut alors déduire

$$i_m = \frac{V_0}{r_m} e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

par définition

$$I_0 = \int_{-\infty}^{+\infty} i_m dx = 2 \int_0^{+\infty} \frac{V_0}{r_m} e^{-\frac{x}{\lambda}} dx$$

$$I_0 = \frac{2 V_0}{r_m} \lambda$$

$$r_m = \frac{2 V_0}{I_0} \lambda = \frac{2 V_0}{I_0} \sqrt{\frac{r_m}{r_i + r_e}}$$
$$r_m = \left(\frac{V_0}{I_0} \right)^2 \frac{4}{r_i + r_e}$$

Sachant que $R_m = 2 \pi a r_m$

$$\text{et } R_i = r_i \pi a^2$$
$$R_m = \left(\frac{V_0}{I_0} \right)^2 \frac{8 \pi^2 a^3}{R_i}$$

Cette méthode de calcul de R_m déterminée par JENERICK (1953) nous a conduits à des résultats assez dispersés (tableau 7, colonne 5) provenant du fait que nous avons admis R_i égale à 50 Ωcm , valeur moyenne calculée par FATT et KATZ (1953). Dans ces conditions : R_m est égale à 174,7 Ωcm^2 ($\sigma = 117,4$). Par contre, si nous admettons que la détermination de λ est assez exacte, nous obtenons le résultat suivant : $R_m = 110,4 \Omega\text{cm}^2$ ($\sigma = 53,4$) (tableau 7, colonne 6) à partir de la relation :

$$R_m = 4 \pi a \frac{V_0}{I_0} \lambda$$

$$\text{Soit } G_m = \frac{1}{R_m} = 9090 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$$

Une source d'erreur provient de la détermination du diamètre de la

fibre que nous assimilons à un cylindre mais qui en fait, présente souvent une section elliptique.

Malgré l'imprécision des mesures de R_m , il est intéressant de constater que cette valeur est faible, comparée à la R_m de 2500 à 4000 Ωcm^2 obtenue pour la fibre musculaire de grenouille (JENERICK 1953 - ADRIAN et FREYGANG 1962 a - FATT et KATZ 1951).

IV°) CAPACITE MEMBRANAIRE C_m

Nos enregistrements (figure 6) montrent qu'un courant s'établissant instantanément produit un potentiel électrotonique qui d'abord varie rapidement puis rejoint progressivement un niveau constant. Pour expliquer ce fait, il faut faire appel à une autre caractéristique de la membrane : sa capacité électrique.

La membrane de la fibre est en effet constituée d'une double couche lipidique mauvaise conductrice des courants, séparant deux milieux bons conducteurs : le milieu extérieur et le myoplasme. Cette double couche constitue les armatures d'un condensateur et la forme des potentiels électrotoniques peut donc s'expliquer par la constitution physique de la membrane des fibres comprenant à la fois une résistance et une capacité.

Nous savons que dans un circuit R.C. (résistance - capacité) la constante de temps τ est égale à $R \times C$.

Ainsi pour la membrane musculaire :

$$\tau_m = R_m C_m$$

avec :

τ_m : constante de temps membranaire

R_m : résistance spécifique membranaire

C_m : capacité spécifique membranaire

L'évaluation de la constante τ_m peut être faite d'après la relation exprimant la variation du potentiel au cours du temps dans le cas d'un cable cylindrique soit pour un élément de membrane :

$$V = V_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

quand $t = \tau$

$$V_s = 0,63 V_0$$

On peut alors déterminer graphiquement (figure 8) la constante de temps τ_m correspondant au temps mis par V pour atteindre 63 % de la valeur V_0 obtenue pour une distance nulle entre l'électrode électrotonisante et l'électrode d'enregistrement.

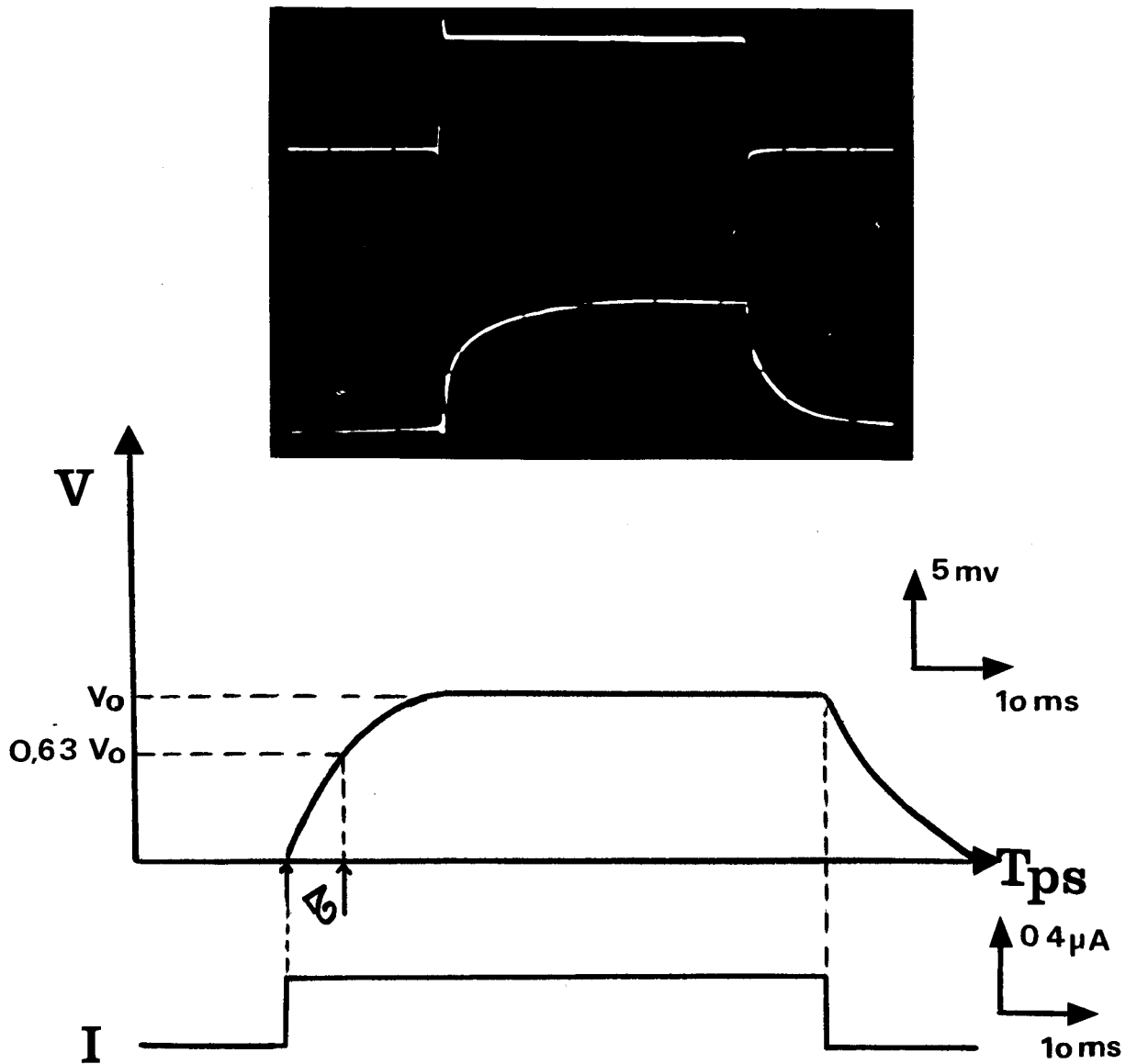


Figure 8 : Détermination graphique de la constante de temps membranaire

La mesure de τ_m donne une valeur moyenne de 2,86 ms ($\sigma = 1,2$). Les valeurs déduites pour C_m se situent entre 20 et 64 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (tableau 7) moyenne : 35,5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($\sigma = 18,5$). Ces valeurs sont sensiblement identiques à celles obtenues également sur le crabe par FATT et KATZ (1953) : C_m comprise entre 24 et 83 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ et par ATWOOD (1963) : C_m moyenne de 36 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ou de 54,5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ selon le type de fibre. Par contre, les mesures sont nettement supérieures à celles calculées pour la fibre musculaire de grenouille (1 à 6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) ou bien même pour la fibre musculaire de crabe par d'autres auteurs. Nous avons en effet signalé que des valeurs de C_m comprises entre 1 et 9 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ peuvent être obtenues en tenant compte de la surface des invaginations (PEACHEY 1965 b - EISENBERG 1965 - SELVERSTON 1967) à partir de la même technique de la propagation électrotonique des courants faibles. Dans notre cas, C_m a été surestimée dans la mesure où nous n'avons pu réaliser aucune correction de la surface membranaire.

Référence	P.R. mV	Diamètre μ	λ μ	$R_m \Omega \text{cm}^2$ avec $R_i = 50 \Omega \text{cm}$	$R_m \Omega \text{cm}^2$ avec $\lambda \text{ cm}$	τ_m ms	C_m μF
1	70	255	775				
2	64	230	690	264	161,36	3,35	20,8
3	66	312,5	1270	312,4	179,7	4,8	26,6
4	70	437,5	1430	88,6	94,32		
5	62	312,5	820	383,7	128,5		
6	73	344	820	63	33,2	2,10	63,6
7	66	282	1050	104,4	90,32		
8	60	500	1015	150,6	78,7	1,70	21,5
9	64	500,5	2290	148	175		
-	65	188	670	58,3	52,6	2,38	45,2

Tableau 7 :
Constantes électriques de la fibre musculaire de
Carcinus maenas

V°) RELATION VOLTAGE-COURANT

Nous avons vu que les courants utilisés pour la mesure des constantes électriques de la fibre doivent être faibles, aussi avons nous appliqué à la membrane des courants inférieurs à $1 \mu\text{A}$ d'une durée de 50 ms déplaçant au maximum le P.R. de 5 à 10 mV. Une augmentation des courants (de 0 à $1 \mu\text{A}$) provoque donc des déplacements du P.R. qui restent égaux pour des courants entrants ou sortants pourvu que ceux-ci soient suffisamment faibles (figure 9 a).

Avec des courants sortants plus forts (jusqu'à $8 \mu\text{A}$), la relation voltage-courant (figure 10) demeure linéaire entraînant une hyperpolarisation maximale de 40 mV. Par contre, pour des courants dépolarisants supérieurs à $1 \mu\text{A}$ nous constatons (figure 9 b, c, c') une augmentation de la variation du potentiel supérieure à celle mesurée pour des courants hyperpolarisants égaux. La relation voltage-courant présente le phénomène de rectification défini par KATZ (1949) comme le reflet d'une diminution de la perméabilité potassique pour les fibres musculaires squelettiques.

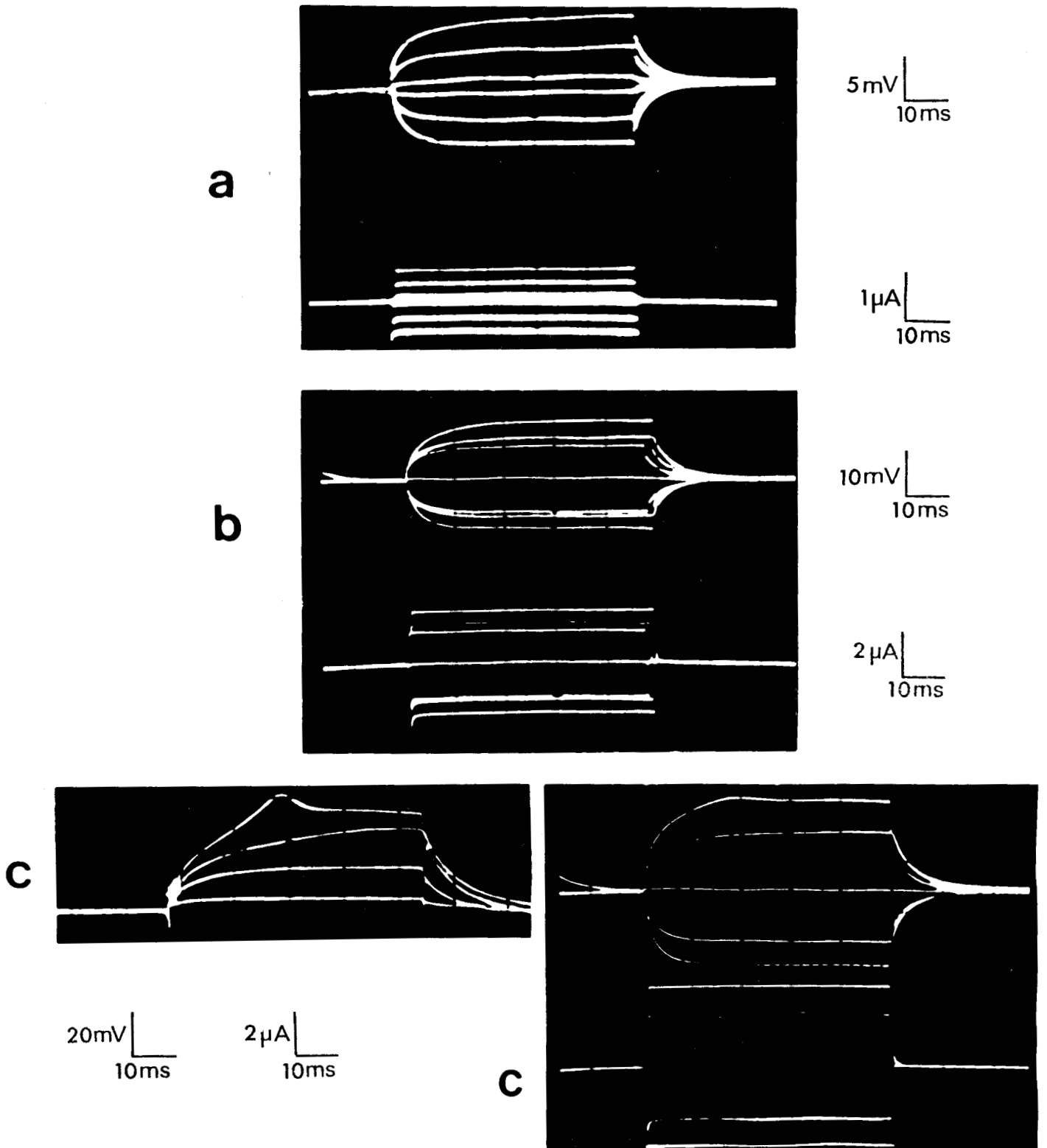


Figure 9 : Déplacements du P.R. pour des courants dépolarisants (vers le haut) et hyperpolarisants (vers le bas). Les photos a, b, c, correspondent à des enregistrements obtenus sur une même fibre. La photo c' montre l'action de courants dépolarisants sur une autre fibre.

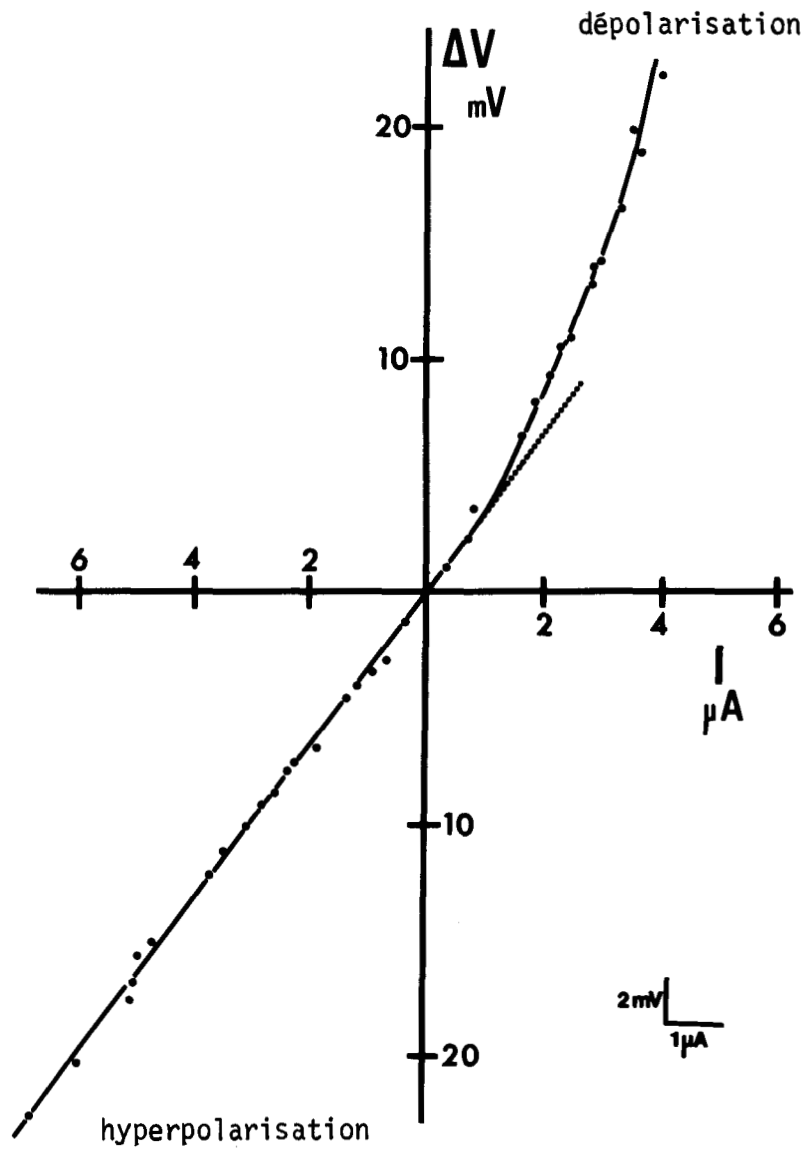


Figure 10 : Courbe voltage-courant pour une fibre placée en solution normale.

Les points expérimentaux correspondent aux potentiels mesurés à la fin du choc électrotonisant (50 ms)

Lorsque le déplacement du P.R. dans le sens d'une dépola-

risation atteint 20 mV c'est-à-dire pour des P.M. voisins de 40 mV, nous constatons très fréquemment le déclenchement de potentiels d'action locaux. (figure 11).

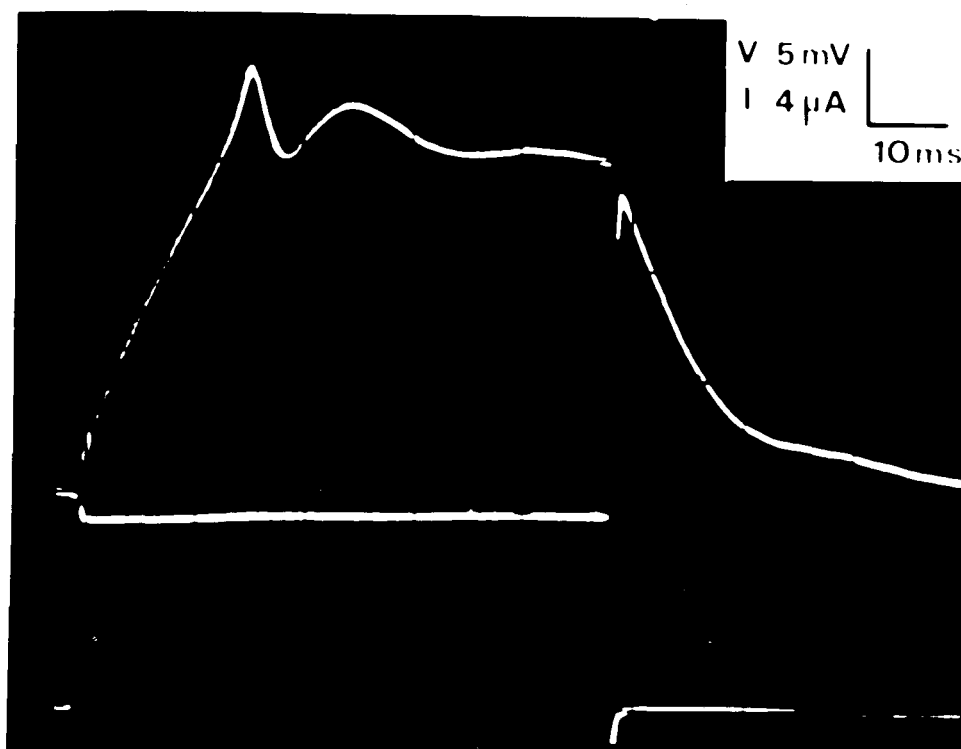


Figure 11 : Potentiel local

Cette relation courant-voltage étant réalisée sur une fibre immergée dans la solution normale, il ne nous est pas possible pour l'instant de déterminer quel ion peut être responsable de ce phénomène de rectification. En outre, certaines fibres placées également en solution normale ne présentent pas de rectification et la relation voltage-courant est linéaire. Ce problème sera envisagé dans

Le chapitre suivant lors de l'étude de l'influence des différents ions monovalents sur le potentiel de repos et sur la résistance de membrane.

VI°) CONCLUSION

Nos mesures concernant les constantes électriques de la fibre musculaire de crabe se révèlent comparables à celles obtenues par de nombreux auteurs. Ainsi, l'étude des contributions ioniques membranaires de repos que nous allons entreprendre (chapitre suivant) peut être faite en tenant compte de l'ensemble de ces résultats. Ceux-ci nous permettront de déterminer avec une relative précision la participation de chaque ion à la conductance membranaire.

CHAPITRE II

ETUDE DES CONTRIBUTIONS IONIQUES AU P.R. ET A LA R_m

Influence des ions :

- I°) Potassium K⁺
- II°) Sodium Na⁺
- III°) Chlore Cl⁻
- IV°) Hydrogène H⁺

N.B.

Il est important de signaler que :

- Les durées d'action des différentes solutions étudiées correspondent à des temps nécessaires pour obtenir un P.R. stable sur un faisceau d'une dizaine de fibres.
- Etant donnée l'importante variabilité des mesures de R_m , toutes les études sont faites de manière relative en comparant le potentiel électrotonique recueilli lors de l'application d'une solution "anormale" au potentiel électronique recueilli au préalable sur la même fibre lors du passage de la solution normale.

I°) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION POTASSIQUE EXTERNE SUR LE P.R. ET

LA R_m

La concentration potassique externe est réduite en deça de 12,9 mEq/l (valeur normale) en diminuant la concentration du KCl du milieu de FATT et KATZ (tableau 1 - Techniques). L'augmentation de K_e est réalisée par addition de K₂SO₄ (tableau 2 - Techniques).

Le tableau 8 illustre les effets des variations de K_e sur le potentiel de repos, les concentrations des autres ions restent inchangées, en particulier Cl_e = 594 mEq/l et Na_e = 413 mEq/l.

K _e x 12,9 mEq/l	P.R. mV	Nombre d'expériences	V _K mV (1)	V _K mV (2)
1	66,3 ± 4	173	56,1	67,3
0	67,5 ± 9,6	20	120,5	131,6
0,2	68 ± 10	10	96,7	107,8
0,3	68,6 ± 9,9	10	86,4	97,4
0,6	67,7 ± 5,7	10	69,07	80,0
2	55,1 ± 2,2	11	38,7	49,8
5	38,5 ± 1,7	10	15,7	27,0
8	31,3 ± 2,4	6	3,8	15,0
10	29,5 ± 3,5	15	0,2	9,48

Tableau 8 : Evolution du P.R. en fonction de la concentration potassique externe K_e

(1) : V_K calculés en admettant K_i = 120 mEq/l (SHAW 1955 a)

(2) : V_K calculés en admettant K_i = 188 mEq/l (HAYS et coll. 1968).

Les valeurs obtenues indiquent que les milieux hypopotassiques n'entraînent qu'une faible hyperpolarisation, maximale lorsque $[K]_e = 3,87 \text{ mEq/l}$. Par contre, les milieux hyperpotassiques provoquent des dépolarisations très nettes et d'autant plus importantes que $[K]_e$ est plus forte. Les P.R. obtenus pour les différentes $[K]_e$ se fixent à un niveau stable, plus ou moins rapidement, généralement en une dizaine de minutes.

La réversibilité du phénomène n'est obtenue qu'après un temps compris entre 10 et 40 minutes ; celle-ci est d'autant plus longue que le faisceau de fibres a subi l'action d'un milieu plus hyperpotassique (figure 12).

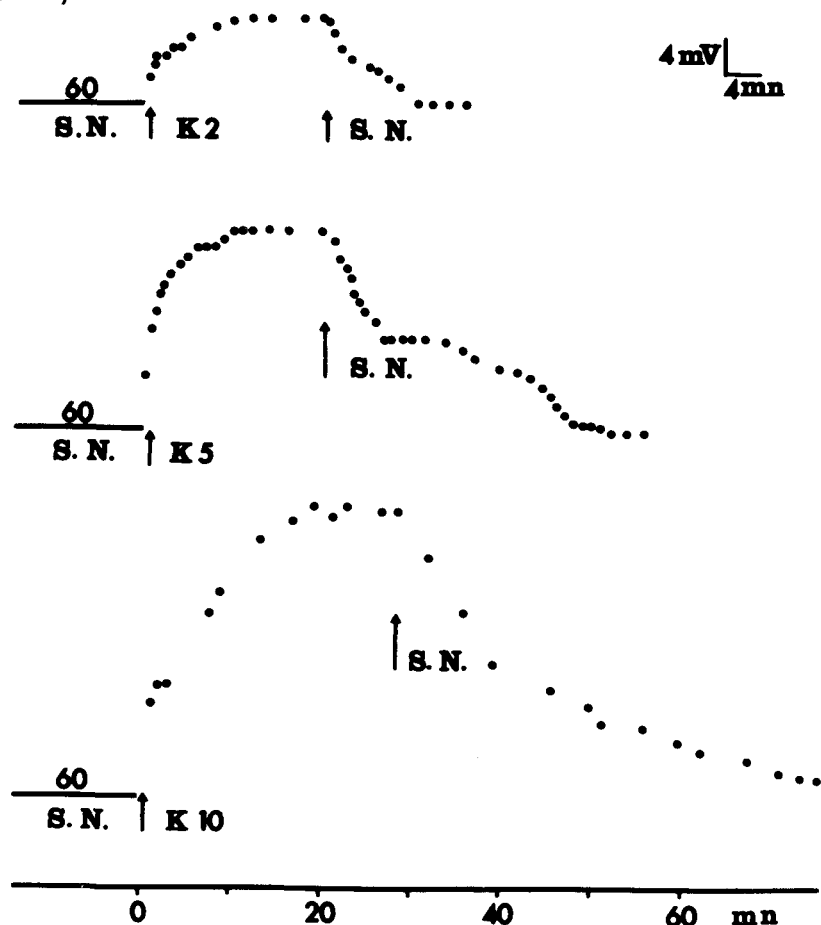


Figure 12 : Durées de stabilisation des P.R. lors de l'application puis du retrait de solutions hyperpotassiques. ($K_2 = 25,8 \text{ mEq/l}$ de K^+ ; $K_5 = 64,5 \text{ mEq/l}$; $K_{10} = 129 \text{ mEq/l}$) (S.N. = solution normale).

La même dissymétrie concernant le temps d'action du milieu anormal et le temps nécessaire pour obtenir la réversibilité a également été observée sur le muscle entier de grenouille par SANDOW et MANDEL (1951) puis par CSAPO et WILKIE (1956) et sur la fibre isolée du couturier par HODGKIN et HOROWICZ (1960).

La récupération lente du P.R. initial est d'ailleurs à associer à la variation de la R_m en fonction de K_e (tableau 9). Les résultats sont exprimés sous forme de rapport entre la nouvelle valeur de R_m enregistrée pour une K_e anormale et la valeur de R_m mesurée au préalable pour la même fibre en milieu normal.

K_e mEq/l	R_m/R_m normale
0	1,6
12,9	1
25,8	1,2
64,5	0,8
129	0,3

Tableau 9 : Mesures relatives de R_m en fonction de K_e
(R_m en milieu normal = 1 pour $K_e = 12,9$ mEq/l)

Ces résultats nous laissent donc entrevoir que le système membranaire responsable des mouvements du potassium peut produire un fort courant, puisque les R_m sont faibles, pour des concentrations potassiques externes suffisamment élevées. Par contre, la R_m plus

forte lors de l'action de milieux hypopotassiques ou légèrement hyperpotassiques ne permet qu'un faible mouvement des ions K^+ . Lors du retour à K_e normale = 12,9 mEq/l après l'action d'un milieu hyperpotassique, nous avons constaté que la R_m augmente jusqu'à reprendre sa valeur initiale. Ce phénomène d'augmentation progressive de la R_m explique la durée importante de la repolarisation.

La figure 13 indique que la relation P.R. = f (log K_e) est linéaire lorsque K_e est supérieure à 12,9 mEq/l. Lorsque K_e est inférieure à cette concentration, le P.R. ne varie que très faiblement et ceci peut s'expliquer par une contribution relativement plus importante des autres ions au potentiel de repos, résultant d'une diminution de la conductance potassique corroborée par les augmentations de la R_m .

La pente de la courbe (figure 13) est de 37 mV lorsque K_e varie d'un facteur x 10. Ce fait nous oblige à considérer le potentiel de repos, non comme un potentiel de pile de concentration, mais comme un potentiel de diffusion dans lequel les ions K^+ interviennent certes de façon notable mais non exclusive. D'ailleurs, les potentiels obtenus pour les différentes concentrations potassiques ne correspondent pas à des potentiels d'équilibre potassique V_K calculés d'après l'équation de Nernst (tableau 8)

$$V_K = 58 \log \frac{K_i}{K_e}$$

que l'on admette $K_i = 120$ mEq/l, (d'après SHAW 1955 au niveau des pattes locomotrices de *Carcinus maenas*) ou $K_i = 188$ mEq/l (d'après

HAYS, LANG et GAINER 1968 pour le crabe bleu *Callinectes sapidus*).

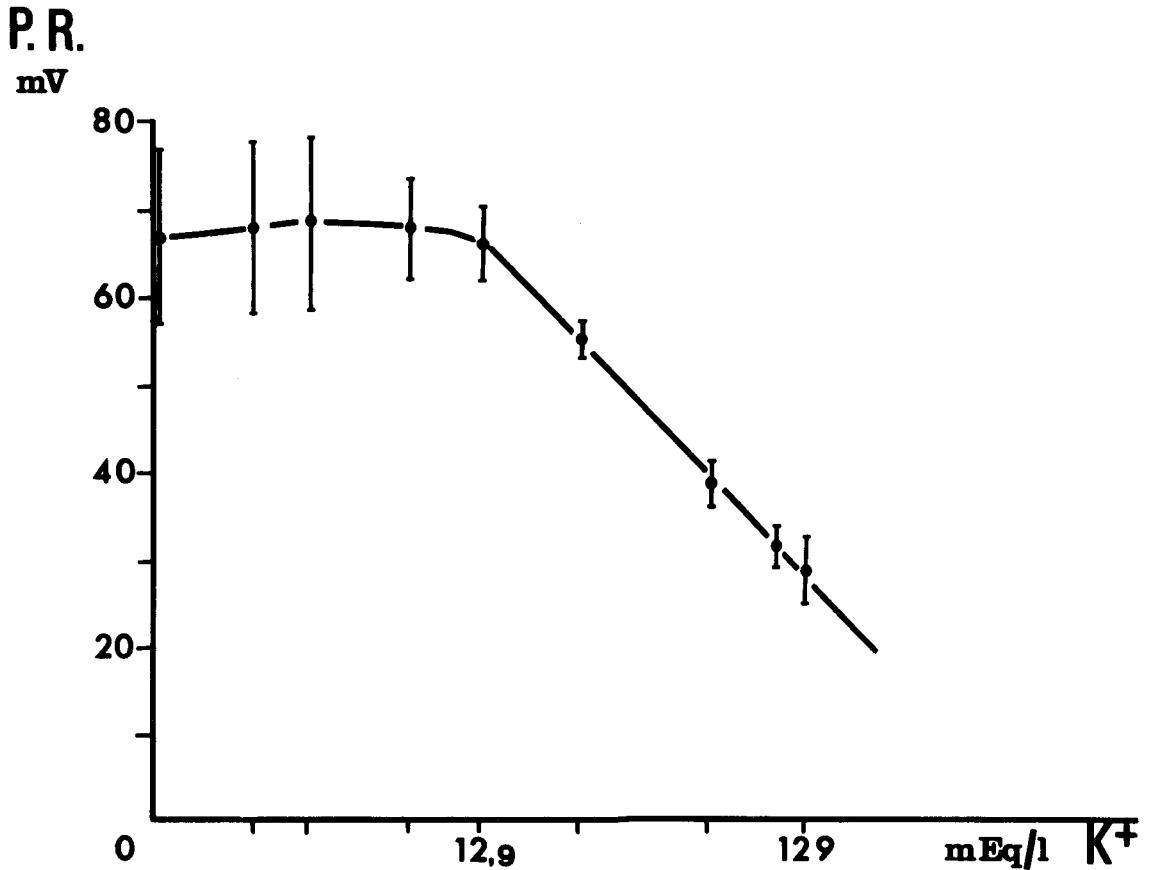


Figure 13 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[K^+]_e$
($[Cl^-]_e = c^{ste} = 594 \text{ mEq/l}$)

Enfin, la figure 14 donne les décours des courbes voltage-courant obtenues pour une fibre placée en solution normale puis en solution hyperpotassique. ($[K^+]_e = 129 \text{ mEq/l}$). Nous constatons, en accord avec les travaux de JENERICK (1959), sur le couturier de grenouille, la disparition et même l'inversion de la rectification pour de faibles courants dépolarisants. Puis, lorsque ces courants dépolarisants deviennent plus forts, le mécanisme provoquant l'inversion de

la rectification semble s'inactiver. Signalons qu'un tel phénomène d'inactivation a déjà été observé sur le couturier de grenouille par NAKAJIMA, IWASAKI et OBATA (1962).

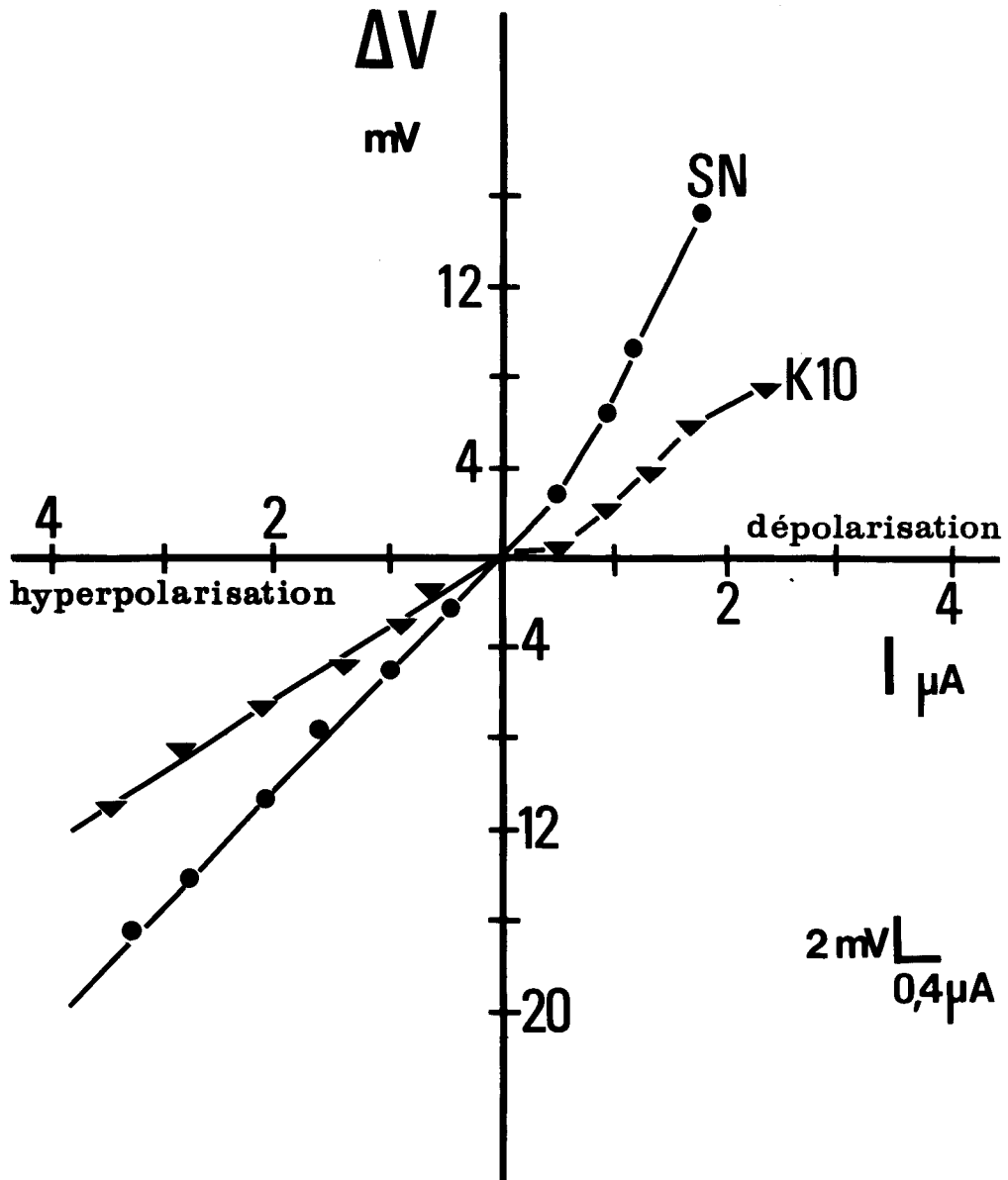


Figure 14 : Courbes voltage-courant pour une fibre placée en solution normale (S.N.) puis en solution hyperpotassique $[K]_e = 12.9 \text{ mEq/l}$ (K 10)

En conclusion, pour la fibre musculaire de crabe, à l'inverse de nombreuses autres structures, le potentiel de repos correspond à un potentiel de diffusion même lorsque \bar{K}_e est forte. Cependant, il faut remarquer que V s'éloigne encore plus de V_K pour les milieux hypopotassiques et il y aurait donc dans ces conditions une contribution encore plus importante des autres ions.

II°) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SODIQUE EXTERNE SUR LE P.R. ET LA R_m

De nombreuses expériences réalisées sur le couturier de grenouille démontrent la faible contribution sodique dans le maintien du P.R.. En effet, HODGKIN et HOROWICZ (1959) calculent le rapport des perméabilités au Na et au K soit $\frac{P_{Na}}{P_K}$ et le trouvent égal à 0,01 ; la pente de la droite correspondant à la relation entre le P.R. et le logarithme des concentrations potassiques externes est de 58 mV. Dans des conditions expérimentales identiques nous avons vu (figure 13) que cette pente est de 37 mV pour la fibre musculaire de crabe. Nous nous sommes alors demandé si le sodium dont la participation est généralement considérée comme négligeable au repos n'intervient pas de façon sensible dans le maintien du P.R.

Les milieux hyposodiques résultent de la diminution de la concentration du NaCl, Cl_e étant maintenue constante par apport de Cl^- sous forme de chlorhydrate de choline (tableau 3 - Techniques). Les milieux hypersodiques sont réalisés en ajoutant du sulfate de sodium à la solution normale (tableau 4 - Techniques).

Le tableau 10 mentionne les valeurs du P.R. en fonction des différentes concentrations sodiques externes. L'action de ces milieux entraîne une modification faible du P.R.. L'absence totale de Na ne provoque qu'une hyperpolarisation d'environ 7 mV.

Na_e $\times 513$ mM	P.R. (σ) mV	Nombre de fibres testées	temps d'action
1	66,5 ($\sigma = 2,1$)	42	-
0	73,0 ($\sigma = 2,0$)	10	10 à 15'
0,3	66,6 ($\sigma = 3,2$)	10	9'
1,5	64,3 ($\sigma = 1,6$)	7	1' à 4'
2	64,5 ($\sigma = 1,5$)	8	2 à 5'
4	59,0 ($\sigma = 2,2$)	7	6 à 9'

Tableau 10 : Evolution du P.R. en fonction de la concentration sodique externe

En extrapolant la courbe P.R. = f (log $[\text{Na}]_e$) (figure 15) nous trouvons une pente de 10 mV pour une variation de concentration de 1 (513 mEq/l) à 10 (5130 mEq/l).

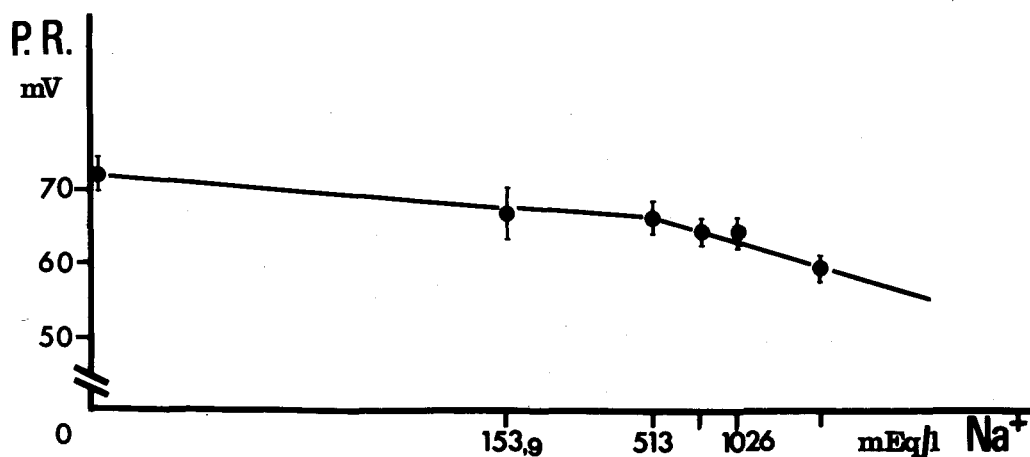


Figure 15 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[\text{Na}]_e$

Cet effet hyperpolarisant des milieux hyposodiques a également été observé par HAYS, LANG et GAINER (1968) sur le crabe bleu et ces auteurs signalent, en outre, une action toxique à long terme de la choline. De même, RENKIN (1961) démontre à l'aide de choline marquée au ^{14}C une accumulation de celle-ci à l'intérieur de la cellule. Sa pénétration se ferait à la même vitesse que celle du Na mais sa sortie serait beaucoup plus lente, à cause de la sélectivité de la pompe sodique. OCHS (1966) signale pour le couturier de grenouille un effet dépolarisant des milieux dépourvus de Na par action propre de la choline. Toutefois, la présence de choline dans nos milieux hyposodiques (sauf pour $[\text{Na}]_e$ nulle) ne nous a pas permis de supposer une pénétration de cette dernière ni de constater de toxicité, les P.R. devenant rapidement stables. Il faut noter que nous avons parfois observé un phénomène différent lorsque le sodium externe est totalement remplacé par de la choline. En effet, pour certaines fibres, l'hyperpolarisation est suivie d'une phase de retour du P.R. vers sa valeur initiale (figure 16).

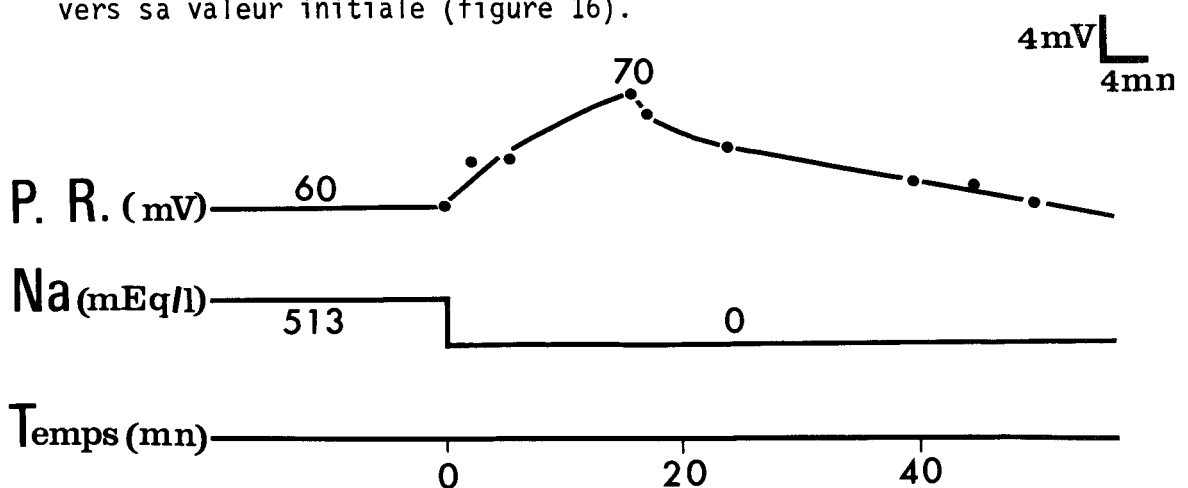


Figure 16 : Evolution du P.R. au cours du temps en milieu $[\text{Na}]_e = 0$

D'autres fibres présentent par contre une hyperpolarisation durable nous laissant alors supposer en accord avec de nombreux auteurs (NASTUK et HODGKIN 1950 - NAKAJIMA et Coll 1962 - HODGKIN et HOROWICZ 1959) que la choline pourrait être considérée comme un cation imperméant. Aussi, ne nous est-il pas possible, à la seule vue de ces résultats, de préciser un effet propre de la choline.

L'absence de sodium dans la solution externe provoque également une variation de la résistance de membrane, plus marquée que la variation du P.R.. La R_m augmente en moyenne de 30 %. Cette augmentation s'établit progressivement, au fur et à mesure que le P.R. croît (figure 17 a, b). Dans certains cas, le maximum d'augmentation de la R_m se produit même lorsque le P.R. revient vers sa valeur initiale après l'hyperpolarisation, bien que le milieu soit toujours dépourvu de sodium. L'explication de ce phénomène peut résider dans le fait que l'absence de sodium entraîne une diminution de la conductance potassique. En effet DYDYNKA et HARRIS (1966) établissent une relation entre les mouvements de Na et de K : lorsque le sodium sort de la cellule, autant de potassium entre. Ainsi, CROSS, KEYNES et RYBOVÁ (1965), FRUMENTO (1965) montrent sur le couturier de grenouille, que durant le remplacement du Na^+ intracellulaire par le K^+ , le potentiel interne de la cellule devient suffisamment négatif par rapport au potentiel électrochimique potassique pour qu'un mouvement net entrant de K^+ puisse se produire. Si l'extrusion du sodium est bien admise comme un processus actif requérant de l'énergie provenant du métabolisme (STEINBACH 1951 - DESMEDT 1953) la nature du flux

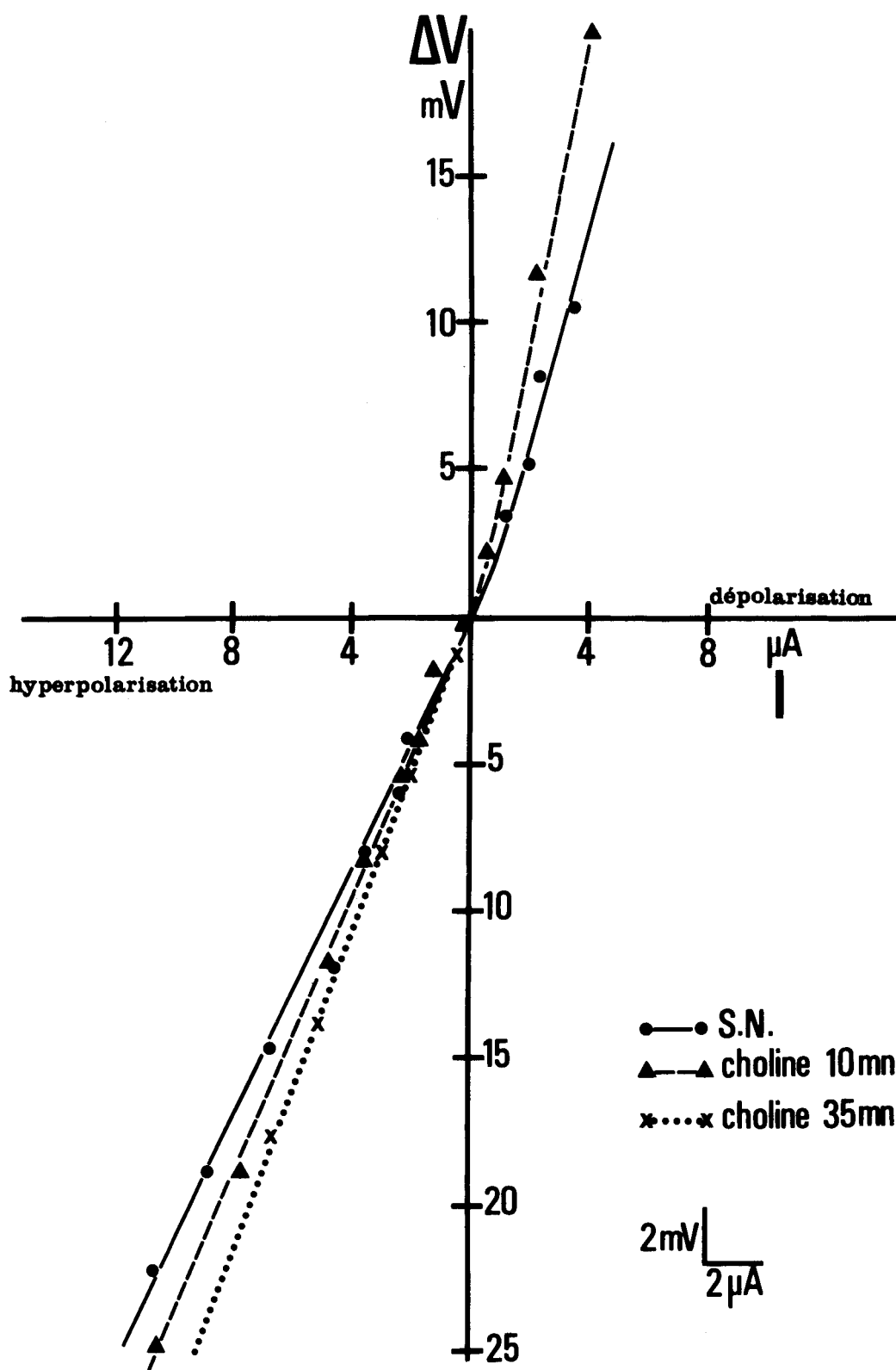


Figure 17 : Courbes voltage-courant pour une fibre placée en solution normale (S.N. ●—●) puis dans un milieu sans sodium (choline ▲--▲ : après 10 mn, X...X : après 35 mn)

potassique est encore très discutée. HARRIS et OCHS (1966) considèrent que ce flux est passif ; de même CONWAY (1964) suggère que seule la pompe sodique est électrogénique et que le mouvement du potassium est uniquement passif. Par contre ADRIAN et SLAYMAN (1966) envisagent la possibilité d'un transport actif de K^+ couplé au mécanisme de transport de Na^+ .

Pour notre préparation, il se pourrait donc que l'effet hyperpolarisant transitoire du milieu totalement dépourvu de sodium ainsi que l'augmentation sensible de la résistance de membrane correspondent à un flux net entrant passif de K^+ dû à la fuite du Na_i . Cependant nous avons également signalé la possibilité d'une pénétration de la choline et nos résultats ne nous permettent pas de choisir entre l'une ou l'autre hypothèse, les deux étant d'ailleurs compatibles. Néanmoins, il apparaît que l'effet propre du sodium sur le P.R. et la R_m est faible.

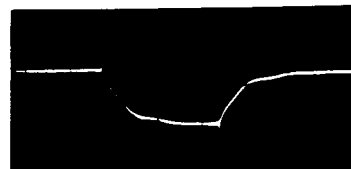
Ceci est d'ailleurs confirmé par l'étude de l'influence d'un milieu hyperpotassique ($[K]_e = 129$ mEq/l) dépourvu de sodium (figure 18).

Ce milieu entraîne la même variation de la R_m qu'un milieu hyperpotassique ($[K]_e = 129$ mEq/l) avec $[Na]_e$ normale = 513 mEq/l. La contribution sodique à la conductance membranaire devient donc négligeable lorsque la concentration potassique externe est forte.

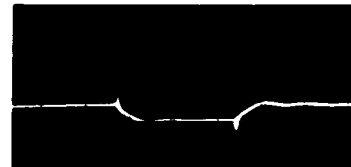
Solution normale



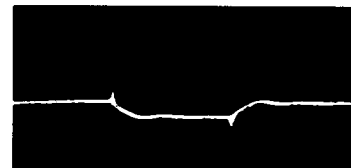
Choline $Na_e=0$



$K_e=129$; $Na_e=594$



$K_e=129$; $Na_e=0$



5mV |
20ms

Figure 18 : Variations de la R_m sous l'action d'un milieu hyperpotassique ($[K]_e = 129$ mEq/l) dépourvu de sodium (figure c)

Chocs rectangulaires hyperpolarisants de 50 ms et $0,8 \mu A$.

En conclusion, bien que l'influence sodique sur le P.R. et la R_m soit faible pour une fibre placée dans les conditions normales, les mouvements des ions Na^+ ne doivent toutefois pas être négligés dans l'évaluation du potentiel de repos contrairement à l'hypothèse de SHAW (1955 a, b) et HAYS et Coll. (1968).

III°) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CHLORE EXTERNE SUR LE P.R.
ET LA R_m

La faible participation du sodium et celle importante mais non exclusive du potassium au potentiel de repos nous obligent à envisager l'intervention d'autres ions pour rendre compte de la valeur du P.R.. Les milieux pauvres en Ca^{++} et Mg^{++} n'entraînant aucune modification du P.R., nous avons été amenés à étudier l'influence des ions Cl^- .

A) Influence de Cl^- en excès

Un milieu contenant 1107 mEq/l de Cl^- est réalisé en ajoutant du chlorhydrate de choline à la solution normale. La stabilité du P.R. n'a jamais été obtenue lors de l'application de cette solution (tableau 11, figure 19). Une hyperpolarisation maximale de 7,4 mV est observée après 20 mn attribuable peut-être à l'influence propre du Cl^- en excès, bien que cet effet hyperpolarisant ne dure pas et que le P.R. tende à revenir vers sa valeur initiale.

Temps mn	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
P.R. mV	64	69,4	69,8	71,4	71,4	68,9	68,9	67,3	65,7	64,9
σ	2,2	2,6	1,9	3,1	5,1	4,3	3,2	2,3	1,9	3,0

Tableau 11 : Valeurs des P.R. obtenus pendant 45' d'imbibition d'une fibre dans une solution enrichie en chlore ($Cl_e = 1107 \text{ mEq/l}$)

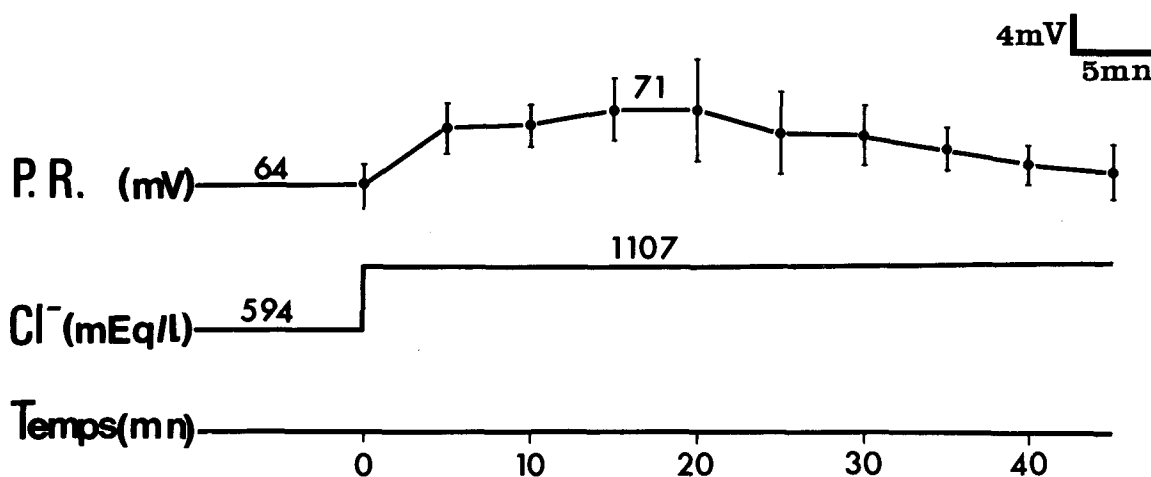


Figure 19 : Evolution du P.R. au cours du temps en solution enrichie en choline ($[Cl]_e = 1107 \text{ mEq/l}$).

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cet effet transitoire :

- soit la choline traverse la membrane (RENKIN 1961), hypothèse que nous avons déjà émise sans pouvoir la confirmer. Ce phénomène se produirait peut-être lors d'actions très longues de solutions contenant une quantité importante de choline.

- soit le potentiel de repos est essentiellement contrôlé par les mouvements de K^+ ramenant celui-ci vers la valeur de V_K ou plus précisément vers $V_K + Na$.

B) Evolution du P.R. et de la R_m sous l'action de milieux appauvris en Cl^-

a) Remplacement de NaCl par du benzène sulfonate de Na

Lors d'expériences préliminaires nous avons testé l'action d'une solution contenant 83,7 mEq de Cl^- au lieu de 594. La concentration potassique est normale et la concentration sodique est rétablie à sa valeur normale en remplaçant NaCl par du benzène sulfonate de sodium (tableau 5 - Techniques).

L'absence de Cl_e entraîne une dépolarisation importante et continue (figure 20).

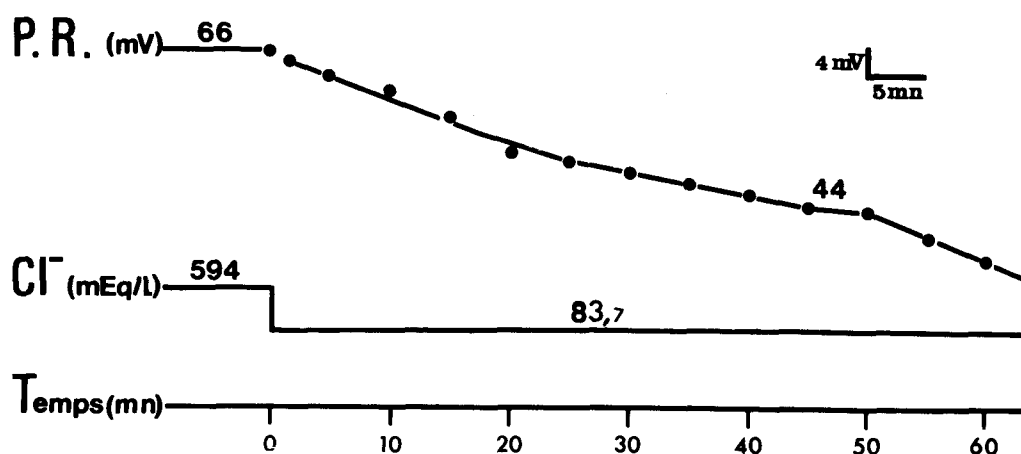


Figure 20 : Action du benzène sulfonate de Na^+ utilisé comme substitut de NaCl ($[\text{Cl}]_e = 83,7 \text{ mEq/l}$)

Le P.R. ne se stabilise pas et décroît continuellement au cours du temps. Cette absence de stabilité du P.R., même après 50 minutes, pouvant être attribuée à un effet toxique du benzène sulfonate, nous avons alors utilisé un autre anion en remplacement de Cl^- : le propionate.

b) Remplacement du NaCl par du propionate de Na (concentration potassique maintenue normale : 12,9 mEq/l)

L'étude de l'évolution du P.R. en fonction de $[Cl]_e$ est réalisée en appauvrissant la solution externe en Cl^- par substitution du NaCl par du propionate de Na (tableau 5 - Techniques), le propionate étant connu pour ne pas traverser la membrane. (REUBEN, GIRARDIER et GRUNDFEST 1964).

Le tableau 12 mentionne les valeurs des P.R. obtenus pour les différentes concentrations en Cl^- étudiées.

$[Cl]_e$ mEq/l	P.R. mV (σ)	Nombre de fibres testées	Temps d'action
340,2	56,0 ($\sigma = 3$)	8	10'
23,6	46,8 ($\sigma = 4,4$)	19	8'
0	46,75 ($\sigma = 4,8$)	12	8'

Tableau 12 : Variations du P.R. en fonction de $[Cl]_e$ lorsque NaCl est remplacé par du propionate de Na

La figure 21 rend compte de l'évolution du P.R. en fonction du logarithme de $[Cl]_e$ pour les différentes concentrations de Cl^- étudiées : 1107, 594, 340, 83,7, 23,6 et 0 mEq/l.

Nous constatons que la relation n'est linéaire que pour des concentrations en Cl^- externe supérieures à 300 mEq/l. En deçà le

P.R. devient à peu près insensible aux variations de $[Cl]_e$, de façon particulièrement nette pour les faibles concentrations. La portion linéaire de la courbe correspondant aux fortes $[Cl]_e$ a une pente de 33 mV.

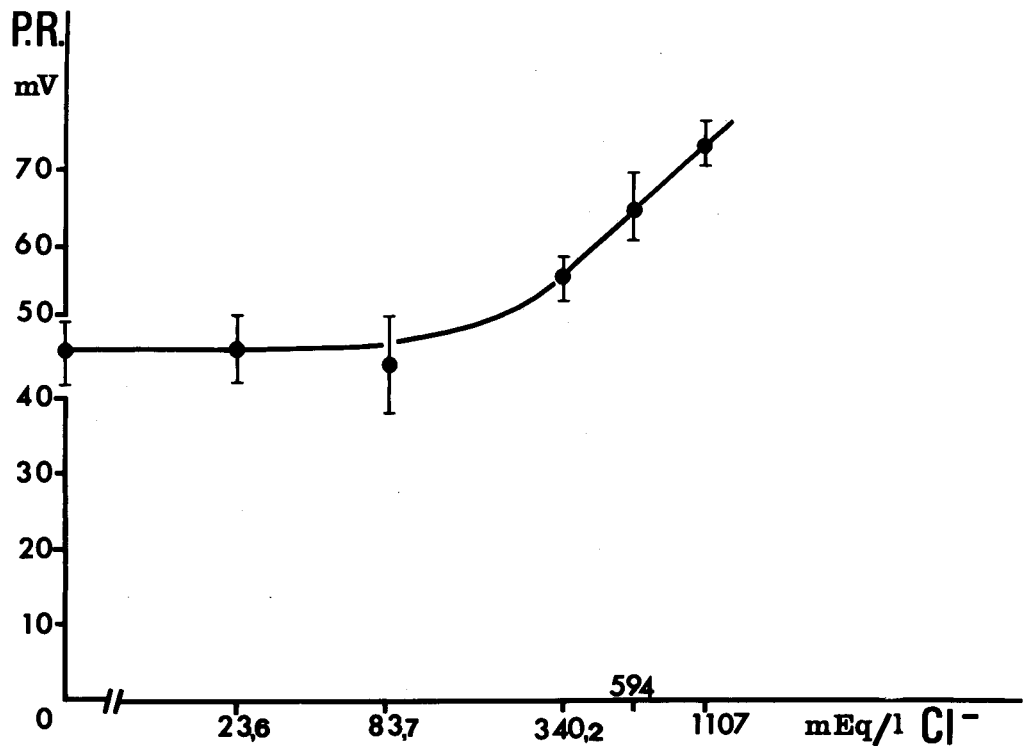


Figure 21 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[Cl]_e$

Les valeurs des P.R. relevées lors de la réduction de $[Cl]_e$ par le propionate ne correspondent qu'à des variations transitoires du potentiel initial. En effet, dès l'application de la solution la fibre se dépolarise et présente une importante activité mécanique lorsque $[Cl]_e$ est faible. Nous observons alors de violentes contractions et contractures des fibres pendant 1 à 2 minutes, déjà signalées par FOULKS, PACEY et PERRY (1965) et SANDOW (1965) sur les fibres de grenouille et par DÜDEL et RUDEL (1969) sur les fibres d'écrevisse.

Le P.R. initial de 67 mV de la fibre (figure 22) passe à une valeur de 56 mV lorsque $[Cl]_e = 340,2$ mEq/l et de 46 mV lorsque $[Cl]_e = 23,6$ mEq/l. L'amplitude de la dépolarisation correspondant à cette dernière concentration est toujours voisine de 20 mV et seul le P.R. atteint est fonction du P.R. initial.

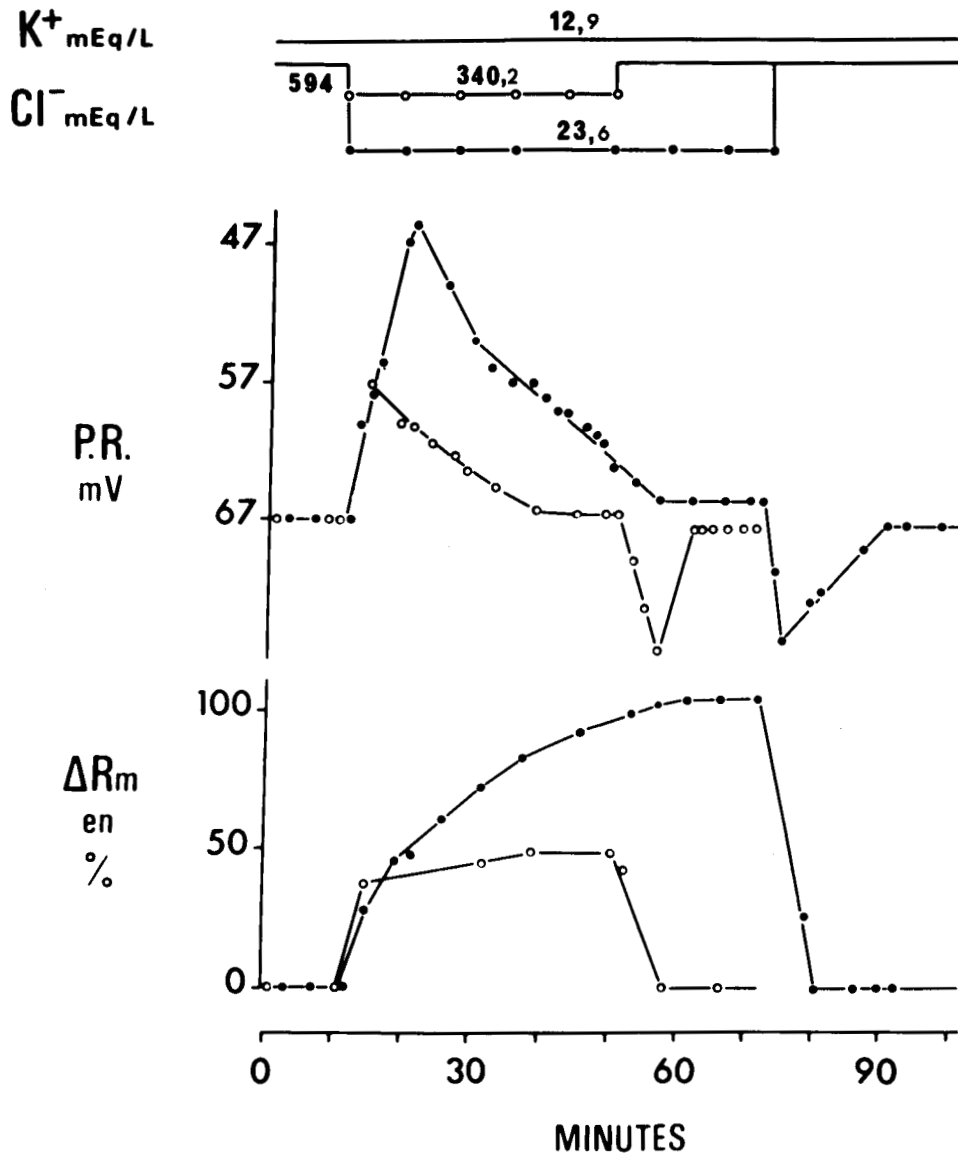


Figure 22 : Evolution du P.R. et de la R_m sous l'influence de solutions appauvries en chlore.

Un potentiel moyen de 46,8 mV ($\sigma = 4,4$) établi à partir de 19 fibres dont le P.R. initial moyen est de 65,4 mV est atteint quand $[Cl^-]_e = 23,6$ mEq/l. Un potentiel identique : 46,75 mV ($\sigma = 4,8$) est obtenu lorsque $[Cl^-]_e = 0$ mEq/l. Enfin, un potentiel de 56 mV ($\sigma = 3,0$) calculé sur 8 fibres correspond à $[Cl^-]_e = 340$ mEq/l.

Ainsi, le P.R. atteint lors de la dépolarisation, se fixe à une valeur intermédiaire entre le nouveau potentiel d'équilibre au Cl^- et le potentiel d'équilibre au K^+ . En effet, la diminution du gradient de concentration (pour $[Cl^-]_e = 340$ mEq/l) et son inversion (pour $[Cl^-]_e = 23,6$ mEq/l) se traduisent dans le premier cas par un influx moindre d'ions Cl^- et dans le second cas par un efflux de Cl^- associé à un efflux accru de K^+ résultant de l'augmentation de la driving-force potassique ($E_m - E_K$). Ces mouvements simultanés de K^+ et de Cl^- à travers la membrane produisent une sortie de KCl qui serait couplée à un efflux d'eau entraînant le gonflement du système tubulaire transverse comme l'ont signalé GIRARDIER, REUBEN, BRANDT et GRUNDFEST (1963), HAGIWARA et TAKAHASHI (1967), SELVERSTON (1967). Cet efflux d'eau permettrait le maintien de l'équilibre osmotique. (HODGKIN et HOROWICZ 1959 - HAYS, LANG et GAINER 1968).

Le fait que les ions K^+ tendent à freiner la dépolarisation provoquée par la diminution de $[Cl^-]_e$ se traduit dans une deuxième phase par une lente repolarisation de la fibre bien que les concentrations du potassium et du chlore externes demeurent inchangées ($[K^+]_e = 12,9$ mEq/l, $[Cl^-]_e = 340, 23,6$ ou 0 mEq/l).

En ce qui concerne l'évolution de la R_m , une augmentation continue se manifeste pendant l'imbibition de la fibre dans la

solution propionate (figure 22). Ainsi, si le P.R. est constamment contrôlé par le potassium, la résistance membranaire, elle, est affectée par la diminution de \overline{Cl}_e et augmente au fur et à mesure que G_{Cl} diminue, pendant la dépolarisation (50 p. 100 d'augmentation de R_m au maximum de dépolarisation) puis lors de la repolarisation de la fibre (augmentation de 150 p. 100 de la R_m à la fin de la repolarisation lorsque $\overline{Cl}_e = 23,6$ mEq/l). La résistance membranaire devenant très élevée et stable à ce dernier stade, il faut alors envisager le fait que G_{Cl} a cessé de contribuer à la conductance membranaire totale.

En outre, nous constatons que le niveau de potentiel atteint diffère le plus souvent de quelques mV du potentiel initial, la différence pouvant être plus nette dans le cas de fibres à fort potentiel en conditions normales (tableau 15 récapitulatif page 82). Le potentiel final moyen est de 62 mV ($\sigma = 2,7$) pour 18 fibres et nous avons vu que Cl^- a alors cessé d'influer sur le P.R. et la R_m . La différence entre ce potentiel et le P.R. initial pourrait donc s'interpréter en admettant que certaines fibres ont, dans les conditions normales, un P.R. plus influencé par le chlore externe que d'autres. Il semble, qu'à la fin de la repolarisation, la fibre se trouve dans un état d'équilibre tel que $\overline{K}_i \times \overline{Cl}_i = \overline{K}_e \times \overline{Cl}_e$. \overline{Cl}_e étant fixe et considérablement diminuée, \overline{Cl}_i sera affectée et l'équilibre ne sera respecté que par un efflux d'eau. En considérant que \overline{K}_i n'est pas modifiée comme l'ont démontré HODGKIN et HOROWICZ (1959) sur la fibre squelettique de grenouille et HAYS, LANG et GAINER (1968) sur le

crabe Callinectes, Cl_i devient alors égale à environ 2 mEq/l alors que Cl_i en conditions normales est de 62 mEq/l (chapitre III 1°). La quasi-totalité du chlore interne a donc traversé la membrane, cet efflux cessant à la fin de la repolarisation. A ce stade, le chlore n'affecte plus le P.R. et ne contribue plus au courant membranaire. Le potentiel moyen de 62 mV peut alors être considéré comme un potentiel d'équilibre potassique non corrigé de la faible participation sodique.

Inversement, lors du retour aux conditions normales après l'application de la solution propionate (figure 22) la fibre s'hyperpolarise rapidement, mais plus faiblement qu'elle ne s'était dépolarisée sous l'action du milieu propionate. Le P.R. revient ensuite progressivement à sa valeur de départ. A l'hyperpolarisation est associée une brusque diminution de la R_m résultant vraisemblablement du rétablissement de G_{Cl} par suite de l'entrée d'ions Cl^- dans la fibre. La R_m reprend ensuite sa valeur initiale dès que le P.R. se rapproche du P.R. de départ. A nouveau donc, nous observons une variation soudaine et transitoire du P.R. consécutive à une modification de $[Cl]_e$, suivie d'un retour vers le P.R. normal sous l'influence des mouvements du K^+ .

Si, comme nous venons de l'admettre, le potassium semble constamment responsable du maintien du P.R., le potentiel atteint à la fin de la repolarisation en absence de $[Cl]_e$ doit alors correspondre à un potentiel de pile de concentration aux ions K^+ ou plus exactement à un potentiel de diffusion aux ions K^+ et Na^+ . Dans ces

conditions, l'action de milieux hyperpotassiques doit se traduire par une courbe P.R. = f ($\log \bar{K}_e$) de pente supérieure à 37 mV valeur obtenue dans les conditions normales c'est-à-dire lorsque $\bar{Cl}_e = 594$ mEq/l et que les ions Cl^- contribuent au P.R..

c) Influence de la concentration potassique externe en absence de chlore

Les milieux sans chlore et enrichis en K^+ par du sulfate de potassium sont appliqués à la fin de la repolarisation après l'action du milieu propionate ($\bar{Cl}_e = 0$, $\bar{K}_e = 12,9$ mEq/l) (figure 23). Ainsi, les potentiels de 51, 29 et 16 mV sont obtenus pour des \bar{K}_e respectivement égales à 25,8 - 64,5 - 129 mEq/l sur une fibre dont le P.R. initial est de 67 mV.

Le tableau 13 récapitule les P.R. moyens obtenus sur 6 fibres pour différentes concentrations potassiques.

\bar{K}_e mEq/l	P.R. mV
0	81,2 ($\sigma = 3,5$)
3,87	74,5 ($\sigma = 2,4$)
12,9	63 ($\sigma = 2,5$)
25,8	52,1 ($\sigma = 2,0$)
64,5	33,75 ($\sigma = 3,6$)
129	16,75 ($\sigma = 3,0$)

Tableau 13 : Valeurs des P.R. obtenus pour différentes concentrations potassiques en absence de chlore.

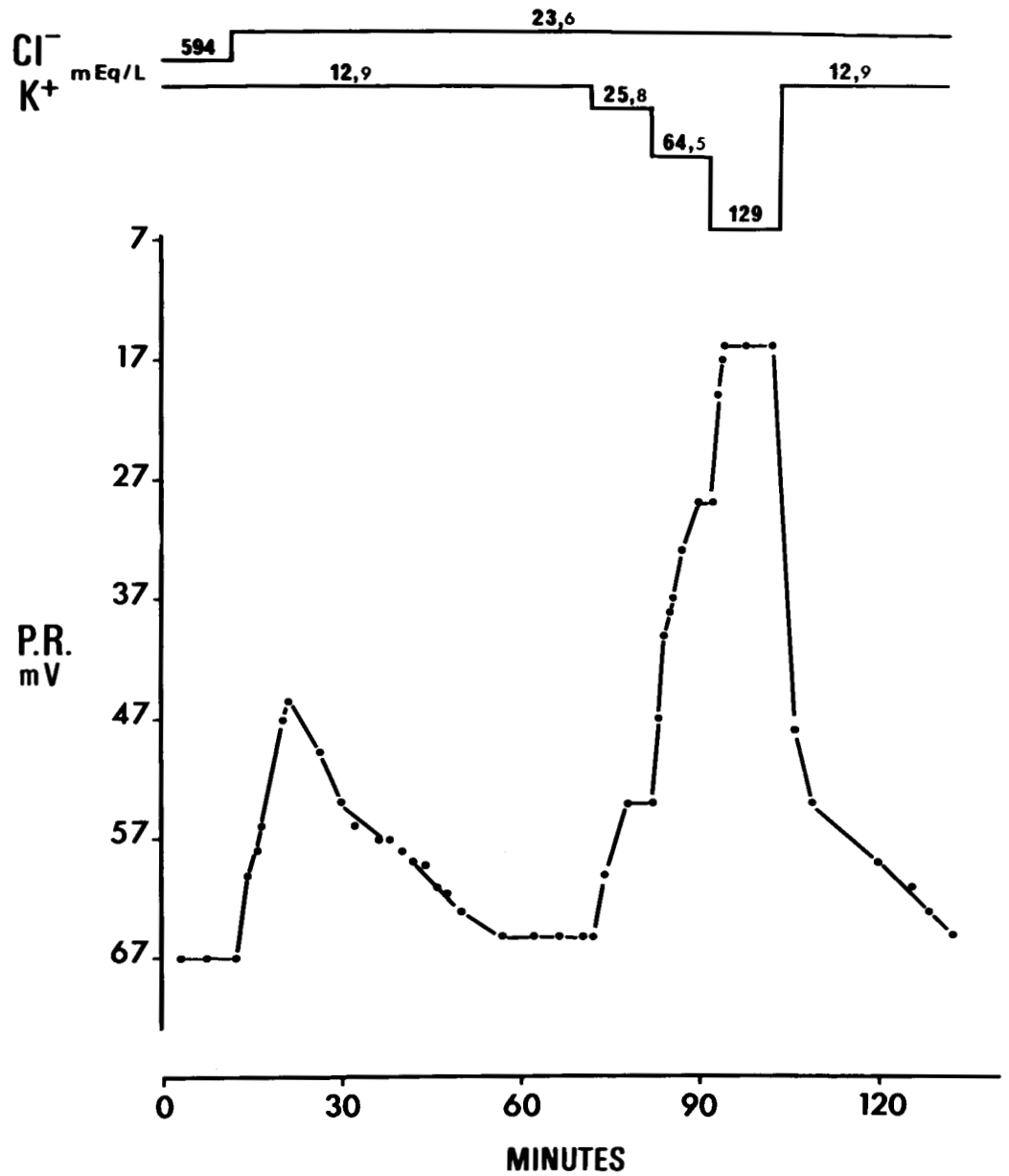


Figure 23 : Influence des milieux hyperpotassiques sur le P. R. en absence de chlore (toutes les mesures sont effectuées sur une même fibre)

La traduction de ces résultats par la courbe représentant les variations du P.R. en fonction du logarithme de $[K]_e$ (figure 24)

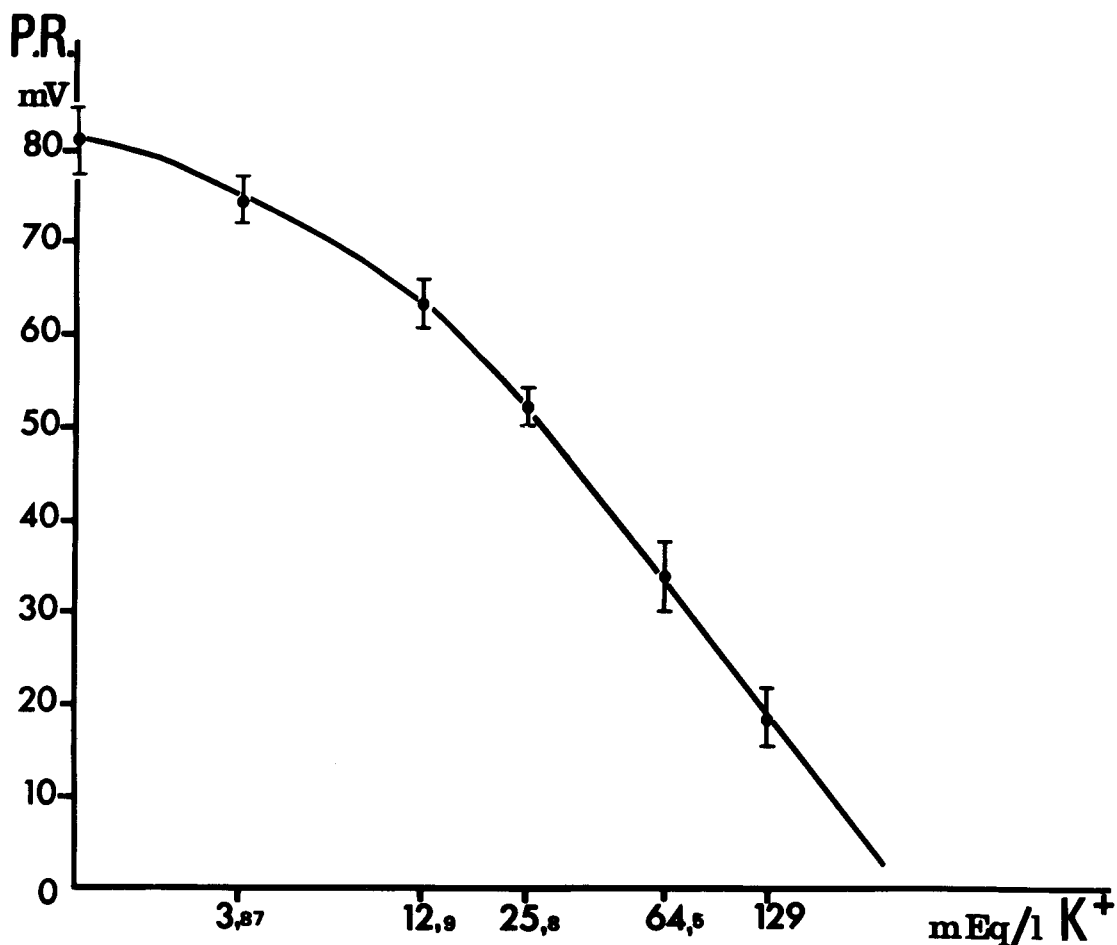


Figure 24 : Amplitude du P.R. en fonction du log de

$$[K]_e \text{ avec } [Cl]_e = 0 \text{ mEq/l}$$

montre que la droite obtenue pour les milieux hyperpotassiques a une pente moyenne de 47 mV.

En admettant que seuls les ions monovalents contribuent au P.R. (effet nul des ions divalents comme nous l'avons déjà signalé), les P.R. obtenus en absence de chlore correspondent à des potentiels de diffusion aux seuls ions K^+ et Na^+ . Nous avons vu que la contribution sodique au P.R. est faible et d'autant moins décelable que $[K]_e$ est forte. Dans ces conditions expérimentales, la participation

du Na^+ pourrait devenir plus nette par suite de l'absence des ions Cl^- . Le P.R. est alors exprimé par l'équation :

$$\text{P.R.} = V_{\text{K} + \text{Na}} = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[\text{K}]_i + \alpha [\text{Na}]_i}{[\text{K}]_e + \alpha [\text{Na}]_e}$$

$$\alpha = \frac{P_{\text{Na}}}{P_{\text{K}}} = \text{rapport des perméabilités de la membrane au sodium et au potassium}$$

Le fait que le chlore n'intervient plus à la fin de la repolarisation se trouve confirmé par la rapidité d'action des milieux potassiques dépourvus de chlore. Le tableau 14 permet de comparer les temps d'imbibition nécessaires pour obtenir un P.R. stable à ceux obtenus pour les mêmes milieux potassiques contenant du chlore ($[\text{Cl}]_e = 594 \text{ mEq/l}$).

$[\text{K}]_e$ mEq/l	Temps de stabilisation quand $[\text{Cl}]_e = 594 \text{ mEq/l}$	Temps de stabilisation quand $[\text{Cl}]_e = 0 \text{ mEq/l}$
0	7'	7'
3,87	7'	7'
25,8	10'	6'
64,5	12'	8'
129	18'	5'

Tableau 14 : Comparaison des temps de stabilisation des P.R. en fonction de $[\text{K}]_e$ et de $[\text{Cl}]_e$

Ce tableau révèle que les différences les plus importantes entre les temps d'action se produisent pour les concentrations en K^+ fortes démontrant que les mouvements potassiques sont contrebalancés par les mouvements de chlore en conditions normales alors que ceux-ci s'effectuent plus rapidement lorsque les ions Cl^- cessent de participer au P.R.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la phase de repolarisation est indépendante de la concentration en chlore externe et que les mouvements de Cl^- sont bien terminés à la fin de la repolarisation. A partir de cette observation, les mesures de R_m relevées à la fin de la repolarisation nous permettent de déterminer la contribution globale des ions K^+ et Na^+ à la conductance membranaire.

Le tableau récapitulatif 15 donne, pour chaque fibre étudiée, la valeur du P.R. initial et du P.R. à la fin de la repolarisation, G_{K+Na} exprimée en p. 100 de G_m et par différence G_{Cl} . Ces mesures nous permettent d'établir que G_{Cl} correspond en moyenne à 55,7 p. 100 de la conductance membranaire totale, G_{K+Na} ou G_c (c : cations) à 44,3 p. 100. Un test t effectué à partir de ces moyennes indique que la différence est significative (risque : 1 p. 100). Enfin, il est à noter que pour environ 25 p. 100 des fibres G_{K+Na} est supérieure à G_{Cl} .

d) Remplacement du NaCl par du sulfate de sodium

Des expériences ultérieures nécessitant l'application d'un milieu sans chlore à pH acide nous ont obligés à substituer à l'ion chlore un autre anion : le sulfate.

P.R. mV $Cl_e = 594 \text{ mEq/l}$ $K_e = 12,9$		P.R. $Cl_e = 23,6 \text{ ou } 0 \text{ mEq/l}$ $K_e = 12,9$		G_{K+Na} en p. 100 de G_m	G_{Cl} $G_m - G_{K+Na}$
66		65		30	70
62		60		51	49
62		56		43	57
68		56		33	67
62		65		50	50
59		64		41	59
63		61		28	72
63		58		48	52
64		60		50	50
65		62		64	36
65		61		53	47
67		67		45	55
64		60		40	60
72		63			
70		64			
69		65			
72		64			
66		58			

Tableau 15 récapitulatif : Valeurs des P.R. initiaux, des P.R. à la fin de la repolarisation en solution sans chlore et des conductances ioniques

En effet, le propionate forme un tampon à pH 6 et il est alors impossible d'étudier l'action de milieux plus acides. Nous avons donc réalisé la même expérience que celle décrite pour le propionate (figure 22) mais en substituant le sulfate de sodium au NaCl. La concentration de Cl^- est également de 23,6 mEq/l, les concentrations sodiques et potassiques restent normales.

Les effets produits par une telle solution sont identiques à ceux observés lors de l'application d'un milieu propionate dont la concentration en Cl^- est également de 23,6 mEq/l. Ainsi l'amplitude de la dépolarisation est la même et la repolarisation jusqu'à un P.R. stable proche du P.R. initial se produit également. Il faut toutefois signaler que les variations de potentiel obtenues en milieu sulfate sont plus rapides que celles relevées en solution propionate. Le maximum de dépolarisation est atteint en 3 à 5 minutes alors qu'il l'était en 8 minutes sous l'effet du milieu propionate. De même, la durée de la repolarisation est maintenant de 20 minutes environ soit deux fois plus rapide. Cette rapidité d'action du milieu sulfate par rapport au milieu propionate pourrait s'expliquer par le fait que l'équilibre ionique à l'intérieur de la lumière des tubules s'établirait plus lentement en milieu propionate qu'en milieu sulfate, compte tenu de l'encombrement et de la mobilité différents de ces deux ions.

Ces résultats nous permettent de considérer que le sulfate est un anion ne traversant pas la membrane en accord avec les travaux de CONWAY et MOORE (1945), FALK et LANDA (1960), ADRIAN (1961) et qu'il n'a pas d'effet propre sur le P.R. comme l'ont déjà démontré KAO

et STANFIELD (1968).

C) Courbes voltage-courant en milieu appauvri en chlore

Enfin, nous avons tracé des courbes voltage-courant à différents moments de l'expérience effectuée avec $Cl_e = 23,6 \text{ mEq/l}$ (le propionate de Na remplaçant le NaCl du milieu normal). Tous les tracés présentés sur la figure 25 ont été effectués à partir d'enregistrements obtenus pour une même fibre. La courbe 1 correspond à la fibre placée dans la solution normale et fait apparaître le phénomène de rectification déjà décrit lors de l'étude des caractéristiques membranaires de la fibre (chapitre I, V°). La courbe 2 est réalisée lorsque l'effet dépolarisant du milieu pauvre en Cl^- est maximum c'est-à-dire lorsque le chlore quitte la cellule et que G_{Cl} diminue. La courbe 3 correspond à la fin de la repolarisation où nous avons admis G_{Cl} nulle. Ces deux dernières courbes (2 et 3) sont parfaitement linéaires et traduisent une disparition de la rectification. La courbe 4 obtenue à la fin de l'hyperpolarisation lors du retour aux conditions normales est sensiblement parallèle à la courbe 1 et présente elle aussi le phénomène de rectification. A ce moment, la résistance de membrane reprend sa valeur initiale.

Il semble donc que le phénomène de rectification soit lié au mouvement du chlore. Celui-ci doit être présent dans la solution externe, de façon à ce que G_{Cl} reste importante. En effet, nous avons signalé (tableau 15) l'existence de fibres pour lesquelles G_{K+Na} est supérieure à G_{Cl} et les courbes voltage-courant obtenues pour ces

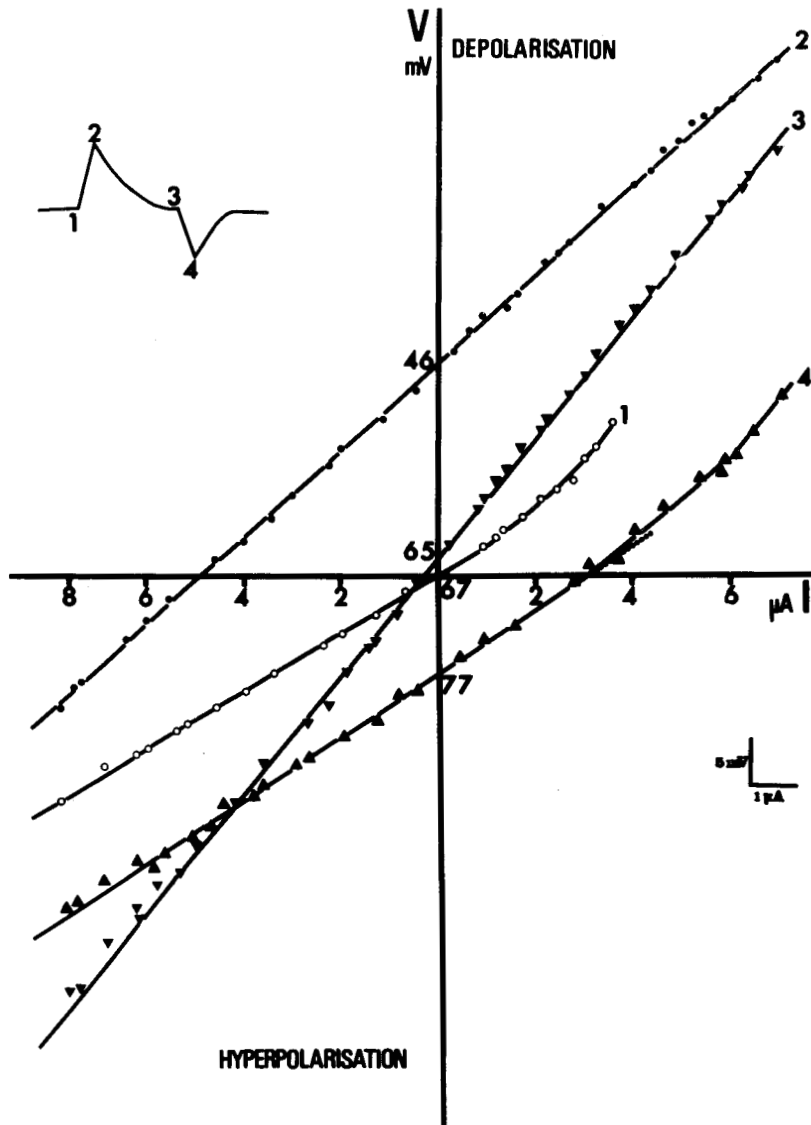


Figure 25 : Courbes voltage-courant obtenues aux différentes phases de l'évolution du P.R. lorsque $[Cl]_e = 23,6 \text{ mEq/l}$ (courbes 2 et 3) au lieu de 594 (courbes 1 et 4).

fibres placées en solution normale ne présentent pas le phénomène de rectification.

D) Conclusion

L'enlèvement du chlore dans la solution externe ou le rétablissement de sa concentration normale après une diminution de celle-ci démontrent la prédominance des mouvements potassiques tendant toujours à maintenir le P.R. à sa valeur normale. Ainsi, les effets de Cl^- sur le P.R., bien que très nets, sont seulement passagers et freinés par le potassium. Nous avons vu que le même phénomène était susceptible de se produire lors d'applications de solutions enrichies en chlore. Cependant, la contribution des ions Cl^- à la conductance membranaire est prédominante et permet, du moins en partie, d'expliquer l'existence de la rectification membranaire.

IV°) INFLUENCE DES IONS H^+ EN EXCES (pH ACIDES)

Dans les conditions normales, la contribution du chlore à la conductance membranaire est supérieure à celle du potassium. En absence de chlore externe, nous avons signalé que l'efflux de chlore entraîne un gonflement du système tubulaire transverse laissant supposer un passage des ions Cl^- à ce niveau (GIRARDIER, REUBEN, BRANDT et GRUNDFEST 1963 - SELVERSTON 1967). Sachant que les ions H^+ agissent sur des sites de surface (HUTTER et WARNER 1967 b - SPURWAY 1965 b - BROOKS et HUTTER 1964) nous nous sommes alors proposé de déterminer quelle conductance ionique est modifiée lors de variations du pH extracellulaire afin de relier ce résultat avec les hypothèses émises pour les voies de passage des ions K^+ et Cl^- .

Les mélanges tampons utilisés afin d'obtenir les pH désirés ont été indiqués au tableau 6 (TECHNIQUES). Nous avons vérifié au préalable si le biphthalate de K et le tris ont un effet propre sur le P.R. et la R_m . Les solutions tests renferment 5 mM de tampon et sont amenées à pH 7,8 par adjonction de quantités convenables de NaOH. La solution de référence est la solution physiologique normale tamponnée à pH 7,8 par le bicarbonate de Na. Nous n'avons enregistré aucune variation du P.R. lors de l'imbibition des fibres dans les solutions tests par rapport au P.R. de référence. De même, la R_m reste à sa valeur normale lorsque de faibles courants dépolarisants ou hyperpolarisants traversent la membrane, aussi bien en milieu tris qu'en milieu biphthalate. Dans nos conditions expérimentales, il n'apparaît

donc pas d'effet propre des tampons utilisés.

Nos mesures de R_m en solutions acides ont été obtenues à partir des variations de potentiel électrotonique enregistrées lors de l'application de courants hyperpolarisants, d'une part afin d'éviter une erreur de mesure due à une action propre possible du tampon tris signalée par MANDRINO (1969) et d'autre part parce que la fibre présente très rapidement une activité électrique en milieu acide.

A) Variations du P.R. en fonction du pH

Le P.R. moyen de 64 mV reste à sa valeur normale pour des pH compris entre 7,8 (pH de la solution normale) et 5,5. Lorsque la solution externe est à un pH inférieur à 5,5, la fibre se dépolarise et le P.R. se stabilise à une valeur de 54,2 mV ($\sigma = 4,0$) pour un pH de 3,77. Le P.R. reste pratiquement à cette valeur même lorsque l'acidification du milieu externe est plus forte : P.R. moyen de 52,3 mV ($\sigma = 3,8$) à pH 3,4.

pH	3,4	3,77	4,25	5,0	5,5	6,4
P.R. mV	52,3 ($\sigma = 3,2$)	54,2 ($\sigma = 4,0$)	56,9 ($\sigma = 2,3$)	63,0 ($\sigma = 1,3$)	62,5 ($\sigma = 1,5$)	63,6 ($\sigma = 1,1$)
Nombre de fibres testées	15	7	16	6	7	8

Tableau 16 : Valeurs moyennes des P.R. en fonction du pH

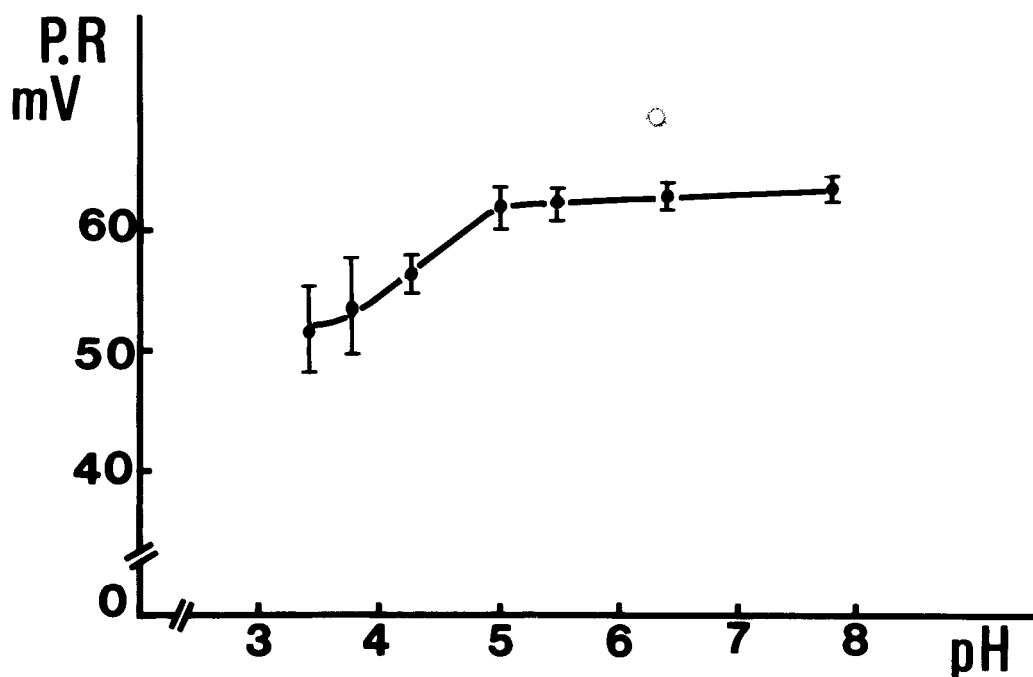


Figure 26 : Evolution du P.R. en fonction du pH extracellulaire

B) Variations de la R_m en fonction du pH

L'acidification du milieu externe provoque une augmentation de la R_m dès que le pH devient inférieur à 5. La R_m à pH 4,25 double presque par rapport à celle de la fibre placée dans la solution de pH 7,8 (R_m pH 4,25 = 180 p. 100 R_m pH 7,8 : valeur moyenne établie sur 15 fibres) (figure 27). Pour des pH plus faibles, une très importante variabilité des résultats se manifeste, due à la toxicité de ces milieux très acides. C'est pourquoi ne sont mentionnés à pH 3,4 que 4 points correspondants à des fibres ayant récupéré à la fois leurs valeurs initiales de P.R. et de R_m relevées à pH 7,8.

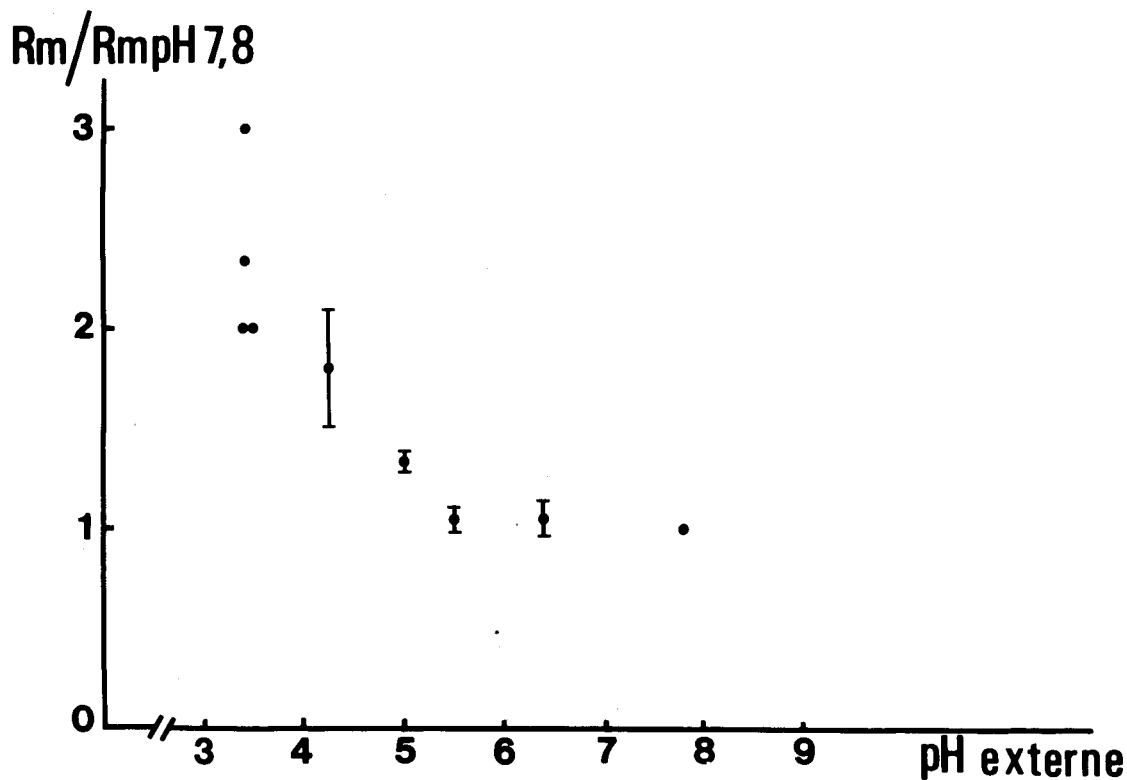


Figure 27 : Variation de la résistance de membrane en fonction du pH

Cette augmentation de résistance associée à une dépolarisation ne peut donc être interprétée que comme une diminution de perméabilité ionique. Sachant que les ions K^+ et Cl^- sont principalement responsables de la valeur de la conductance membranaire, il s'agirait donc, lors de l'acidification, d'une diminution de G_{Cl} ou de G_K .

C) Détermination de la perméabilité modifiée à pH acide

a) Influence des variations de la concentration potassique externe

La figure 28 représente la variation d'amplitude du P.R. sous l'action d'un milieu hyperpotassique ($[K]_e = 129 \text{ mEq/l}$) à dif-

férents pH. Nous remarquons que la pente des courbes diminue d'autant plus que le pH est plus acide. Il pourrait donc s'agir à la vue de ce résultat d'une diminution de P_K ou d'une augmentation de P_{Cl} . La deuxième hypothèse semble ne pas pouvoir être retenue puisque nous enregistrons des augmentations de la résistance de membrane.

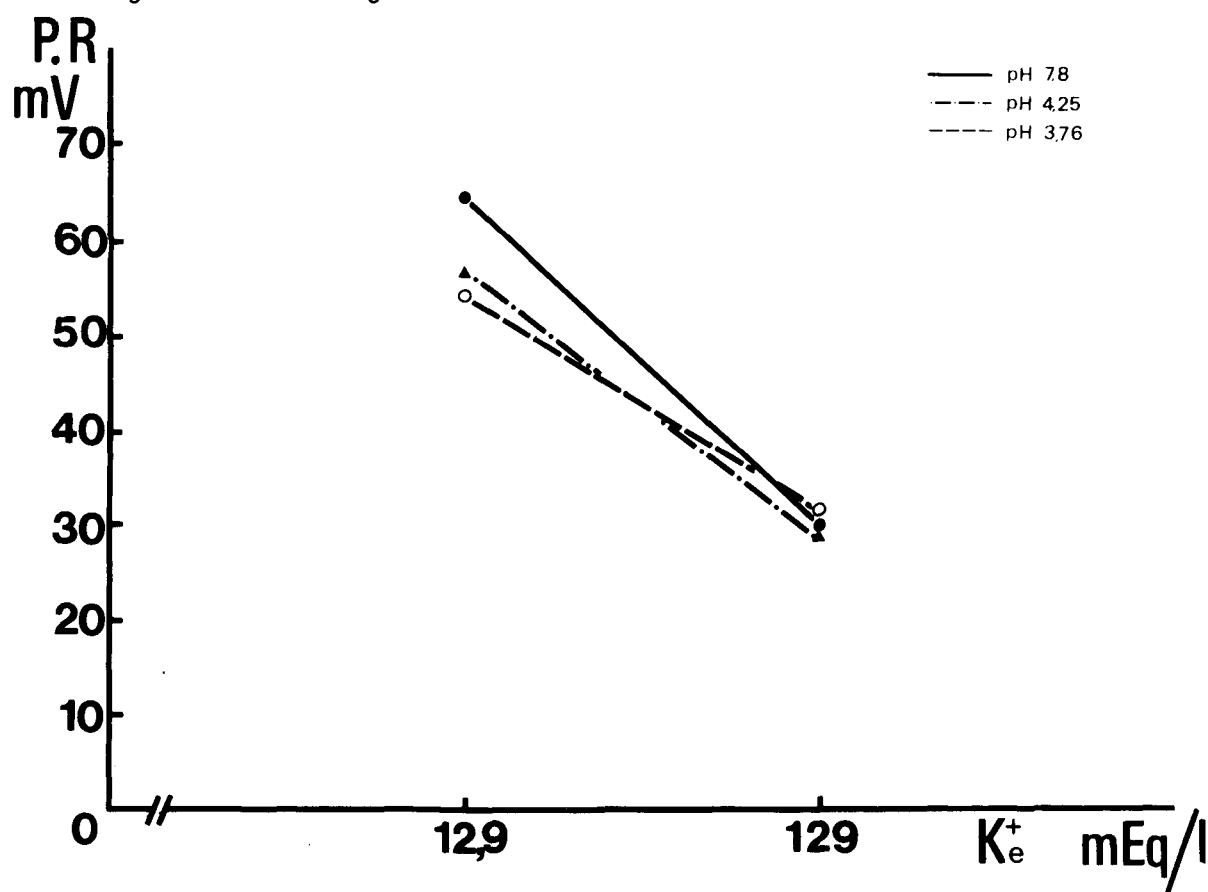


Figure 28 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[K]_e$ à différents pH

b) Influence des variations de la concentration en chlore externe à pH 4,25

Quatre expériences préliminaires ont été réalisées en remplaçant NaCl par du méthylsulfate de Na. A pH 7,8 ses effets sur le P.R. sont identiques à ceux obtenus en utilisant le sulfate de Na

comme substitut de NaCl. Cependant à pH 4,25, la présence du méthylsulfate dans la solution accentue la violence des contractions et des contractures déjà signalées. Nous observons alors une lésion générale de la préparation et une rupture des points d'attache des fibres au niveau de la carapace et de l'axostyle. Ce phénomène s'est toujours produit pour les quatre muscles utilisés et il nous a donc paru intéressant de signaler une toxicité du méthylsulfate vis-à-vis de la fibre de crabe en milieu acide, sans pouvoir expliquer les causes de celle-ci.

Les solutions pauvres en chlore et de pH acide ont donc été réalisées en n'utilisant que le sulfate de Na en remplacement de NaCl.

Les variations du P.R. en fonction de $[Cl]_e$ à pH 4,25 sont récapitulées au tableau 17.

$[Cl]_e$ mEq/l	594	340	250	83,7	23,6	0
P.R. mV (σ)	- 56,9 ($\sigma = 2,3$)	- 42 ($\sigma = 4,5$)	- 31,5 ($\sigma = 1,3$)	- 17 ($\sigma = 3$)	- 18,8 ($\sigma = 4$)	+ 3,5 ($\sigma = 3$)

Tableau 17 : Valeurs moyennes des P.R. en fonction de $[Cl]_e$ à pH 4,25

Nous avons vu que la pente de la courbe P.R. = f (log $[Cl]_e$) à pH 7,8 est de 33 mV (figure 21) lorsque $[Cl]_e$ varie d'un facteur x 10 et est supérieure à 300 mEq/l.

En deçà de cette concentration nous n'observons pratique-

ment plus de modifications du P.R. résultant vraisemblablement de la diminution de P_{Cl} .

A pH 4,25 la courbe P.R. = f (log $[Cl]_e$) (figure 29) apparaît également linéaire pour $[Cl]_e$ supérieure à 250 mEq/l mais la pente de cette droite est alors de 62 mV.

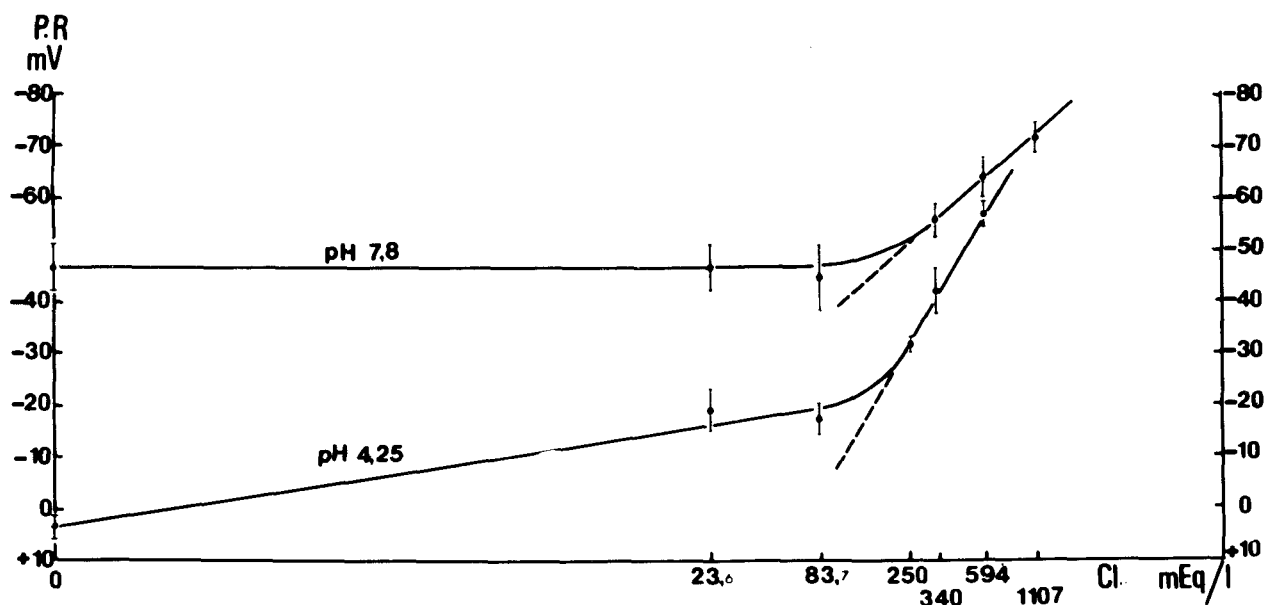


Figure 29 : Amplitude du P.R. en fonction du log de $[Cl]_e$ à pH 7,8 et 4,25

Il semble donc que nous sommes en présence d'une pile de concentration au Cl^- . La contribution des ions K^+ au potentiel de repos est annulée et la perméabilité potassique apparaît bloquée. Pour des concentrations en chlore inférieures à 250 mEq/l, les P.R. varient en fonction de $[Cl]_e$ et ceci peut alors s'expliquer par le fait que le rapport $\frac{P_{Cl}}{P_K}$ augmente. En effet P_K chute et bien que P_{Cl} soit diminuée la membrane devient relativement plus perméable au chlore.

Les expériences décrites précédemment (chapitre II, III^o) et relatives à la suppression du chlore en remplaçant le NaCl par du propionate de Na ou du sulfate de Na mettent en évidence le rôle important du potassium dans le rétablissement du P.R. à sa valeur normale. En effet, la dépolarisation résultant de la diminution de $[Cl]_e$ est rapidement suivie d'une phase de repolarisation de nature potassique. Ainsi, si les ions H^+ inhibent P_K , l'évolution du P.R. de la fibre placée en milieu acide pauvre en chlore doit être très modifiée par rapport à celle observée à pH 7,8. Les courbes a et b de la figure 30 permettent de comparer les résultats obtenus.

Deux différences essentielles doivent être retenues :

- L'amplitude de la dépolarisation en milieu $Cl_e = 23,6$ mEq/l est beaucoup plus importante à pH 4,25 qu'à pH 7,8. Ceci résulte du fait qu'à pH 7,8 le P.R. de - 41 mV est un potentiel intermédiaire entre V_K (proche du P.R. normal), V_{Na} et le nouveau V_{Cl} (gradient de concentration inversé) tandis qu'à pH 4,25 le P.R. de - 17 mV correspond à un potentiel intermédiaire entre le nouveau V_{Cl} et V_{Na} .

- La phase secondaire de repolarisation ne se produit plus à pH 4,25. Ceci démontre bien que le flux potassique est inhibé et ne peut plus permettre le rétablissement du P.R. à sa valeur normale.

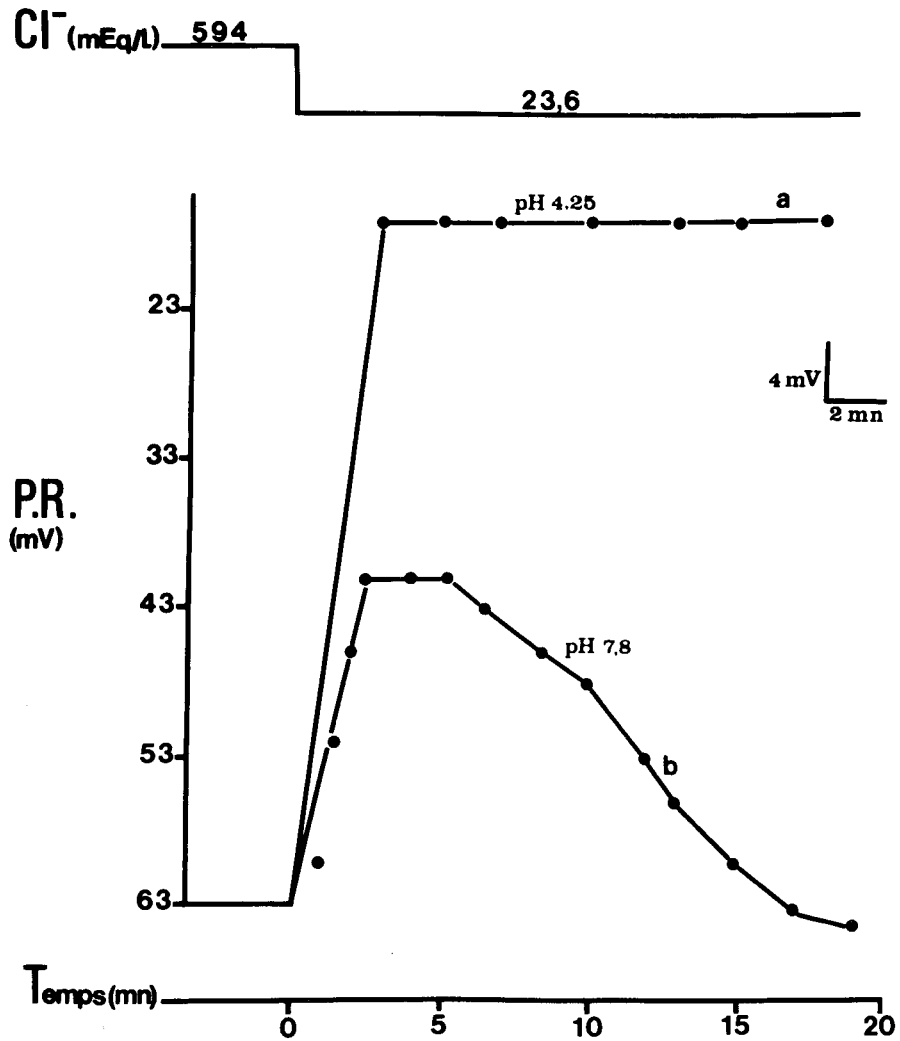


Figure 30 : Mise en évidence du blocage de la perméabilité potassique à pH 4,25 en absence de chlore externe : comparaison des variations du P.R. sous l'effet de solutions $[Cl]_e = 23,6$ mEq/l (NaCl remplacé par Na_2SO_4) à pH 7,8 et 4,25 sur une même fibre.

Des résultats similaires sont obtenus si nous provoquons d'abord la chute de G_{Cl} par un milieu pauvre en chlore de pH 7,8 et si nous faisons agir ensuite une solution également pauvre en chlore mais

de pH 4,25. Dans ce cas nous déclenchons consécutivement les blocages de G_{Cl} et de G_K . Les P.R. moyens atteints sont identiques à ceux obtenus précédemment soit : - 18,8 mV lorsque $[Cl]_e = 23,6$ mEq/l et + 3,5 mV lorsque $[Cl]_e = 0$ mEq/l. En fait, cette dernière valeur du P.R. devrait être proche du potentiel d'équilibre sodique $V_{Na} = + 56$ mV (avec $[Na]_i = 54$ mEq/l d'après SHAW, 1955 a) ou $V_{Na} = + 36$ mV (avec $[Na]_i = 121$ mEq/l d'après HAYS et Coll. 1968) puisque nous nous sommes assurés d'une part que la pile au chlore n'intervient plus et d'autre part que la perméabilité potassique est bloquée. L'inversion du P.R. n'a jamais été telle que $P.R. = V_{Na}$ mais il suffit que l'une ou l'autre ou les deux perméabilités au K^+ et au Cl^- ne soient pas parfaitement annulées pour que le P.R. reste influencé par ces ions puisque nous savons que le potassium et le chlore sont essentiellement responsables de la valeur du P.R. et que la contribution sodique est comparativement faible.

D) Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre que les ions H^+ en excès dans le milieu externe entraînent un blocage de la perméabilité potassique se traduisant par une légère dépolarisation et une importante augmentation de la R_m . Ces résultats sont conformes à ceux de DE MELLO et HUTTER (1966) qui relèvent sur la fibre d'écrevisse en milieu acide une augmentation de G_{Cl} imputable en réalité à une diminution de G_K . Par contre sur la balane, une diminution du pH entraîne une chute de la R_m due à une augmentation réelle de G_{Cl} (HAGIWARA et Coll. 1968). Sur

la fibre musculaire de crabe, nos résultats expérimentaux démontrent qu'en milieu acide l'apparente augmentation de P_{Cl} ne provient que de l'augmentation du rapport $\frac{P_{Cl}}{P_K}$ due au fait que la perméabilité potassique est seule affectée par les milieux acides. Ce résultat est très différent de celui obtenu sur le muscle de grenouille où seule la perméabilité au chlore est modifiée (BROOKS et HUTTER 1962 - HUTTER et WARNER 1967 a, b).

Ainsi, sachant que les ions H^+ agissent en surface, nous pouvons admettre, compte-tenu de leurs effets sur la perméabilité potassique, que le potassium passerait au niveau de la membrane sarcolemmique. Cette hypothèse semble confirmée par l'étude du délai nécessaire pour obtenir le blocage de la perméabilité potassique. Celui-ci est de l'ordre de 3 minutes et au maximum égal à 6 minutes, c'est-à-dire très rapide par rapport au temps d'action d'une solution permettant la suppression de P_{Cl} . Nous avons vu en effet que la conductance au chlore n'était annulée qu'après 20 minutes en solution sulfate et 40 minutes en solution propionate.

CHAPITRE III

EVALUATION DES CONDUCTANCES IONIQUES MEMBRANAIRES DE LA FIBRE PLACEE EN CONDITIONS NORMALES

- I°) Choix des valeurs des concentrations ioniques internes
- II°) Evaluations relatives de G_K et G_{Cl}
- III°) Vérification de la valeur expérimentale de R_m
Valeurs absolues de G_K et G_{Cl}

I°) CHOIX DES VALEURS DES CONCENTRATIONS IONIQUES INTERNES

SHAW (1955 a) propose les valeurs suivantes pour la fibre musculaire de *Carcinus maenas*

$$- [K]_i = 120 \text{ mEq/l}$$

$$- [Cl]_i = 54 \text{ mEq/l}$$

$$- [Na]_i = 54 \text{ mEq/l}$$

HAYS, LANG et GAINER (1968) admettent des valeurs différentes pour la fibre musculaire du crabe *Callinectes sapidus*.

$$- [K]_i = 188 \text{ mEq/l}$$

$$- [Cl]_i = 68 \text{ mEq/l}$$

$$- [Na]_i = 121 \text{ mEq/l}$$

D'après nos résultats expérimentaux nous avons vu que le potentiel de repos est un potentiel de diffusion aux ions K^+ , Cl^- et Na^+ dont la valeur moyenne est de 65 mV ($\sigma = 4$). La participation sodique étant faible, nous pouvons admettre que la valeur du P.R. doit être comprise entre les valeurs des potentiels d'équilibre au K^+ et au Cl^- soit V_K et V_{Cl}

$$V_K = 58 \log \frac{[K]_i}{[K]_e} ; V_{Cl} = 58 \log \frac{[Cl]_e}{[Cl]_i}$$

Nous obtenons $V_K = 56 \text{ mV}$ et $V_{Cl} = 60,3 \text{ mV}$ à partir des valeurs proposées par SHAW et $V_K = 67,3 \text{ mV}$ et $V_{Cl} = 54,5 \text{ mV}$ à partir des valeurs proposées par HAYS et Coll.

En milieu acide (pH 4,25) nous avons vu que la relation P.R. = f (log $[Cl]_e$) (figure 29) suit approximativement l'équation de NERNST pour les ions Cl^- . Dans ce cas lorsque $[Cl]_e = 594 \text{ mEq/l}$



nous pouvons écrire :

$$\text{P.R.} = 56,9 = 58 \log \frac{594}{[\text{Cl}]_i}$$

Nous trouvons alors $[\text{Cl}]_i = 62 \text{ mEq/l.}$

Ainsi il apparaît que la valeur trouvée pour $[\text{Cl}]_i$ est proche des concentrations internes proposées par les auteurs mentionnés ci-dessus. Il semble donc acceptable pour nos calculs ultérieurs de prendre la valeur $[\text{Cl}]_i = 62 \text{ mEq/l.}$

Par contre, sachant que le P.R. de la fibre musculaire de crabe se situe entre 60 et 70 mV, il faut alors admettre, compte-tenu des valeurs des conductances ioniques, que V_K est au moins égal à 70 mV ce qui oblige à prendre pour valeur de $[\text{K}]_i$ celle proposée par HAYS et Coll. (1968) soit 188 mEq/l. La mesure de V_K d'après SHAW paraît trop faible mais il faut signaler que cet auteur obtient un P.R. moyen de 58 mV, valeur plus faible que celui que nous avons enregistré.

II°) EVALUATIONS RELATIVES DE G_K ET G_{Cl}

A partir des figures 13 et 21 montrant les variations du P.R. d'une part en fonction du log de $[K]_e$ avec $[Cl]_e = C^{ste} : 594 \text{ mEq/l}$ et d'autre part en fonction du log de $[Cl]_e$ avec $[K]_e = C^{ste} = 12,9 \text{ mEq/l}$, nous pouvons calculer les conductances relatives de K^+ et Cl^- (G_K et G_{Cl}) d'après la méthode de calcul de HODGKIN (1959).

Nous admettons que la conductance membranaire totale G_m est la somme de G_K et G_{Cl} (G_{Na} négligée)

$$G_m = G_K + G_{Cl} \quad (1)$$

Le potentiel de membrane V en absence de courant externe ($I_K + I_{Cl} = 0$) est donné par :

$$V = V_K T_K + V_{Cl} T_{Cl} \quad (2)$$

formule dans laquelle :

V_K et V_{Cl} sont les potentiels d'équilibre aux ions K^+ et Cl^-

$$V_K = 58 \log \frac{[K]_e}{[K]_i} \quad (3)$$

$$V_{Cl} = 58 \log \frac{[Cl]_i}{[Cl]_e} \quad (4)$$

$$T_K = \frac{G_K}{G_K + G_{C1}} = 1 - T_{C1} \quad (5)$$

$$T_{C1} = \frac{G_{C1}}{G_K + G_{C1}} = 1 - T_K \quad (6)$$

à partir des équations (2) et (6) nous obtenons :

$$\left(\frac{\partial v}{\partial v_K} \right)_{(v_{C1})} = T_K + (v_K - v_{C1}) \left(\frac{\partial T_K}{\partial v_K} \right)_{v_{C1}} \quad (7)$$

et

$$\left(\frac{\partial v}{\partial v_{C1}} \right)_{(v_K)} = T_{C1} + (v_{C1} - v_K) \left(\frac{\partial T_{C1}}{\partial v_{C1}} \right)_{v_K} \quad (8)$$

Dans les conditions normales nous savons que :

$$P.R. \neq v_K \neq v_{C1}$$

Lors d'une variation faible du P.R. nous pouvons écrire :

$$\left(\frac{\partial v}{\partial v_K} \right)_{v_{C1}} = T_K \quad (9)$$

et

$$\left(\frac{\partial v}{\partial v_{C1}} \right)_{v_K} = T_{C1} \quad (10)$$

sachant d'après (5) et (6) que $T_K + T_{Cl} = 1$ nous obtenons :

$$\left(\frac{\partial V}{\partial v_K} \right)_{V_{Cl}} + \left(\frac{\partial V}{\partial v_{Cl}} \right)_{V_K} = 1 \quad (11)$$

Si V_K et V_{Cl} sont constants et si le P.R. varie, la fraction du courant membranaire transporté par les ions K^+ est T_K et par les ions Cl^- : T_{Cl} . En utilisant les équations (3) et (4), les équations (9), (10) et (11) peuvent s'écrire :

$$\left(\frac{\partial V}{\partial \log [K]_e} \right)_{[Cl]_e} = 58 T_K \quad (12)$$

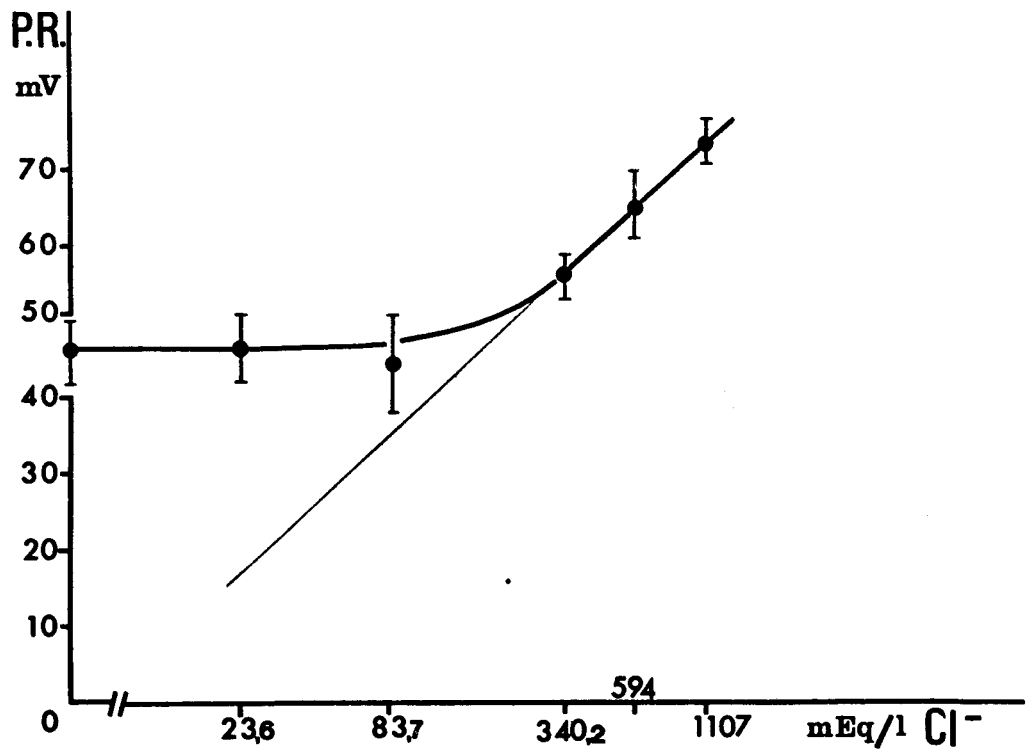
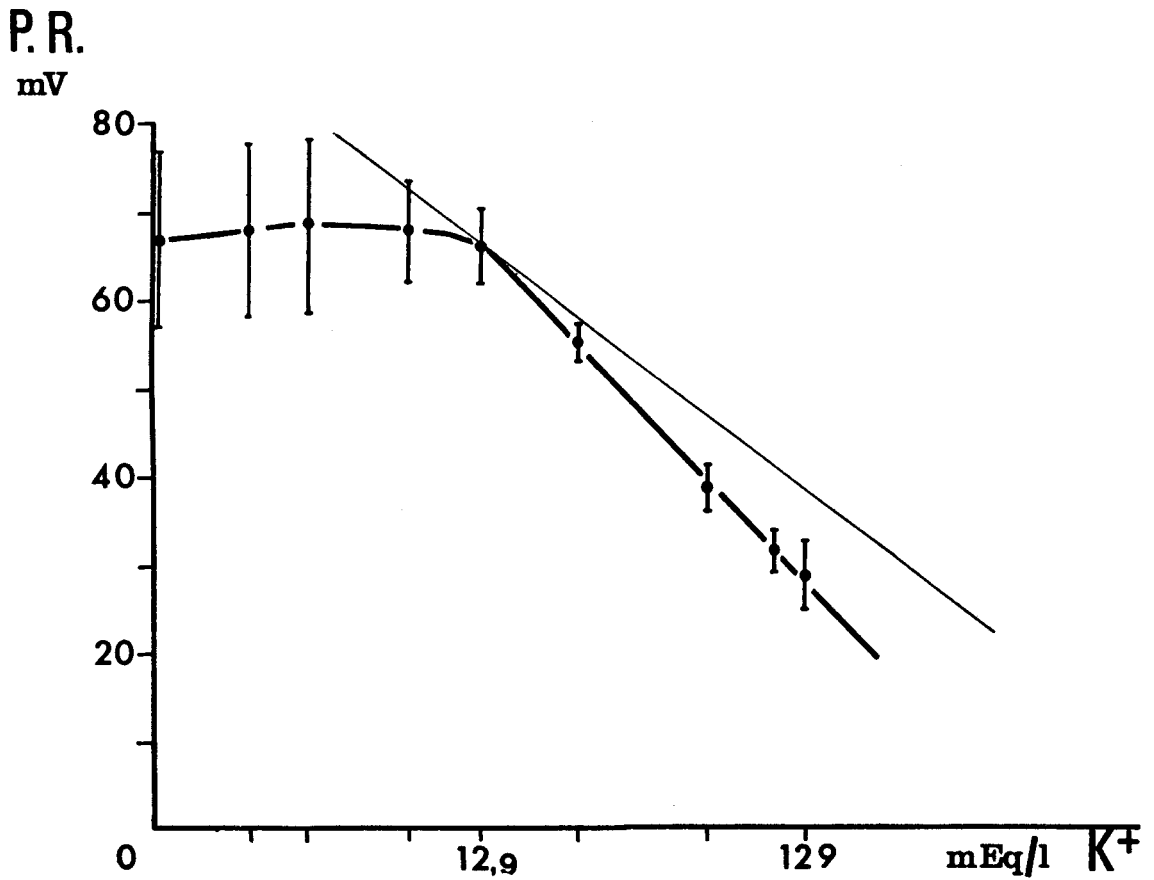
$$- \left(\frac{\partial V}{\partial \log [Cl]_e} \right)_{[K]_e} = 58 T_{Cl} \quad (13)$$

$$\left(\frac{\partial V}{\partial \log [K]_e} \right)_{[Cl]_e} - \left(\frac{\partial V}{\partial \log [Cl]_e} \right)_{[K]_e} = 58 \quad (14)$$

L'expression $\left(\frac{\partial V}{\partial \log [K]_e} \right)_{[Cl]_e}$ peut être évaluée à partir de la courbe

P.R. = f (log $[K]_e$) (figure 13).

Elle représente la pente de la tangente au point correspondant à $[K]_e$ pour laquelle la fibre a été équilibrée soit 12,9 mEq/l. L'équation de la courbe (figure 13) nous a été fournie par le laboratoire de calcul numérique (méthode des moindres carrés). Les points calculés



Rappel des figures 13 et 21 :

$$P.R. = f(\log [K]_e) \quad [Cl]_e = c^{ste} = 594 \text{ mEq/l}$$

$$P.R. = f(\log [Cl]_e) \quad [K]_e = c^{ste} = 12,9 \text{ mEq/l}$$

présentent une bonne concordance avec nos points expérimentaux (écart maximum : 1 mV). L'équation de la courbe est :

$$y = 11,83 x^3 - 62,7 x^2 + 69,9 x + 47,9$$

x désignant le produit $M \cdot \log [K]_e$ ($M = 0,43429$ facteur de conversion des logarithmes décimaux en logarithmes népériens).

La dérivée de cette équation donne une valeur $y' = - 0,77$ signifiant que la tangente au point $[K]_e = 12,9$ mEq/l fait un angle de 37° avec l'axe des x. La pente de cette tangente est de 27 mV.

De même, l'expression $\left(\frac{\partial V}{\log [Cl]_e} \right)_{[K]_e}$ représente sur la figure 21 la pente de la tangente au point $[Cl]_e = 594$ mEq/l. Cette pente est de 33 mV. Le tableau 18 donne les valeurs des différentes expressions permettant de calculer T_K et T_{Cl} .

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
$[K]_e$ mEq/l	$[Cl]_e$ mEq/l	V mV	$\left(\frac{\partial V}{\log [Cl]_e} \right)_{[K]_e}$	$\left(\frac{\partial V}{\log [K]_e} \right)_{[Cl]_e}$	Somme IV + V	T_{Cl}	T_K	Somme VII + VIII
12,9	594	65	33	27	60	56,8	46,5	1,033

Tableau 18 : Evaluation de T_K et T_{Cl} en conditions normales

Nous remarquons que la somme IV et V est de 60 mV au lieu de 58 et que la somme VII et VIII est égale à 1,033 au lieu de 1. Les mesures de T_K et T_{Cl} sont donc à peu près satisfaisantes.

D'après les équations (5) et (6) :

$$G_K = T_K G_m$$

$$G_{Cl} = T_{Cl} G_m$$

soit

$$G_K = 46,5 \text{ p. } 100 G_m$$

$$G_{Cl} = 56,8 \text{ p. } 100 G_m$$

Il faut signaler que l'expression V exacte est :

$$\left(\frac{\partial V}{\partial \log [K]_e + \alpha [Na]_e} \right) [Cl]_e$$

et que le calcul de G_K correspond en réalité à la somme $G_K + G_{Na}$ ou G_c (conductance des cations monovalents).

Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues (chapitre II, III^o) pour la mesure des résistances de membrane de fibres placées dans une solution dépourvue de chlore. Ces mesures consignées au tableau 15 nous donnaient :

$$G_K = 44,3 \text{ p. } 100 G_m$$

$$G_{Cl} = 55,7 \text{ p. } 100 G_m$$

Un autre résultat expérimental peut nous permettre de contrôler les valeurs obtenues pour G_{Cl} . A pH 4,25 nous avons vu que la

pende de la courbe $P.R. = f(\log [Cl]_e)$, pour $[Cl]_e > 250$ mEq/l, est de 62 mV (figure 29). La perméabilité potassique est donc bloquée et l'augmentation de R_m correspond à la chute de la conductance potassique. Dans ces conditions, seuls les ions Cl^- participent à la conductance membranaire. La R_m moyenne à pH 4,25 est égale à 180 % de la R_m à pH 7,8 soit $G_{Cl} = 55$ p. 100 G_m .

Ainsi à partir de 3 méthodes différentes : mesure des variations de R_m en milieu sans chlore, technique de calcul de HODGKIN à partir des valeurs de P.R., mesure de la R_m en milieu acide, nous obtenons des valeurs assez concordantes pour G_{Cl} : 55,7 ; 56,8 et 55 p.100.

Il apparaît donc que deux ions : le potassium et le chlore participent de façon déterminante à la conductance membranaire sans considérer cependant comme nulle la conductance sodique. La conductance au chlore de la membrane de la fibre musculaire de crabe est supérieure à la conductance potassique ou cationique. Ce résultat est comparable à celui obtenu sur la fibre musculaire de grenouille par HODGKIN et HOROWICZ (1959) et HUTTER et NOBLE (1960) bien que le rapport $\frac{G_{Cl}}{G_K}$ pour cette fibre soit légèrement supérieur ($G_{Cl} = 68$ p. 100 G_m). Par contre, ZACHAR, ZACHAROVÁ et HENČEK (1964) trouvent des contributions sensiblement équivalentes des ions K^+ et Cl^- à la conductance membranaire des fibres d'écrevisse ($T_K = 0,46$ et $T_{Cl} = 0,43$).

III°) VERIFICATION DE LA VALEUR EXPERIMENTALE DE R_m . VALEURS ABSOLUES

DE G_K et G_{Cl}

Nous avons considéré précédemment (chapitre II, III°) qu'après 40 minutes en solution propionate ($[Cl]_e = 23,6$ mEq/l) la fibre atteint un état d'équilibre tel qu'il satisfasse à la relation :

$$[K]_i \cdot [Cl]_i = [K]_e \cdot [Cl]_e$$

lorsque : $[K]_e = 12,9$ mEq/l

$$[Cl]_e = 23,6$$
 mEq/l

$$[K]_i = 188$$
 mEq/l

nous obtenons $[Cl]_i = 1,7$ mEq/l

Si nous admettons $[K]_i = 120$ mEq/l nous trouvons $[Cl]_i = 2,1$ mEq/l.

Il se produit donc une variation de $62 - 2 = 60$ mEq/l de la concentration interne en chlore. Ainsi, sachant que le volume de la fibre, dont le diamètre moyen est de 300μ et la longueur moyenne de 8 mm, est de $55 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$, nous pouvons alors calculer le flux de Cl^- . Après 40 minutes la quantité d'ions Cl^- qui quittent la cellule est de :

$$\frac{60 \times 55 \cdot 10^{-5}}{10^3} = 33 \cdot 10^{-6} \text{ mEq/l}$$

ceci correspond à un courant :

$$I = \frac{Q}{t} = \frac{33 \cdot 10^{-6} \cdot 96,5}{2400} = 1,77 \mu\text{A}$$

soit par unité de surface : $11,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \text{ sec.}$

La conductance au chlore est alors égale à :

$$G_{\text{Cl}} = \frac{I_{\text{Cl}}}{V - V_{\text{Cl}}} = \frac{- 11,8 \cdot 10^{-6}}{- 62 - (- 18,8) 10^{-3}}$$

I_{Cl} est affecté du signe - car le courant chlore est sortant

$$G_{\text{Cl}} = 267 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$$

La pente de la courbe P.R. = $f(\log [Cl]_e)$ au point $[Cl]_e = 23,6$ est de 2 mV soit en appliquant la méthode de calcul proposée par HODGKIN :

$$T_{\text{Cl}} = \frac{2}{58} = 0,034$$

La conductance de $267 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ correspond à $G_{\text{Cl}} = 3,4 \text{ p. } 100 G_m$. G_m est donc égale à $7850 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ ce qui donne $R_m = 127 \Omega\text{cm}^2$.

Nous avons calculé dans le chapitre I, III^o) la résistance de membrane à partir de la technique basée sur la propagation des courants sous-liminaires. La valeur moyenne trouvée était de $110 \Omega\text{cm}^2$.

Ces deux valeurs quasiment semblables obtenues à l'aide de deux méthodes différentes nous permettent de considérer que la mesure de R_m est satisfaisante. Dans ces conditions connaissant la R_m en

valeur absolue et les rapports des conductances G_K et G_{Cl} nous pouvons en déduire les valeurs absolues de chaque conductance ionique.

$$G_{Cl} = 55,7 \text{ p. } 100 G_m \text{ (moyenne des 3 valeurs obtenues)}$$

$$G_K = 44,3 \text{ p. } 100 G_m$$

soit

$$G_{Cl} = 4372 \text{ } \mu\text{mho/cm}^2$$

$$G_K \text{ ou plus précisément } G_C = 3477 \text{ } \mu\text{mho/cm}^2$$

**DISCUSSION
ET
CONCLUSION**

CARACTERISTIQUES MEMBRANAIRES

Les mesures des caractéristiques membranaires de la fibre musculaire de crabe conduisent à deux types de résultats dépendant comme nous l'avons signalé de l'évaluation de la surface membranaire. En ne considérant que la surface externe de la membrane, nous avons déterminé R_m égale à $110 \Omega \text{cm}^2$ et C_m égale à $35,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, valeurs comparables à celles déjà obtenues par FATT et KATZ (1953) et par ATWOOD (1963). Par contre, en tenant compte de l'augmentation de surface due aux invaginations de la membrane externe, d'autres auteurs et notamment SELVERSTON (1967) et EISENBERG (1967) obtiennent des valeurs différentes : la valeur de la R_m est environ dix fois supérieure à celle que nous avons obtenue et celle de C_m se trouve réduite à quelques $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, valeurs devenant alors comparables à celles relevées pour les muscles de vertébrés (FATT et KATZ 1951 - JENERICK 1953 - ADRIAN et FREYGANG 1962 a).

Si la complexité ultrastructurale de la fibre de crabe conduit à des résultats différents pour la valeur de R_m , ceux-ci ne résultent que de la méthode d'estimation de la surface membranaire et il faut signaler que la technique de la propagation électrotonique utilisée pour mesurer la R_m est néanmoins parfaitement applicable à ce type de fibre. En effet, SELVERSTON (1967) démontre que les tubules du réticulum sont courts et n'entravent pas la propagation des courants à l'intérieur de la fibre, ce qui est confirmé par la concordance des valeurs enregistrées pour la constante d'espace λ ne nécessitant que la connaissance du diamètre de la fibre. En tenant

compte de l'ultrastructure de la fibre et à partir de mesures électrophysiologiques, EISENBERG (1967) propose deux schémas de membrane (figure 31) selon le type de réponse obtenue pour telle ou telle fibre, et admet dans tous les cas que deux capacités membranaires sont indispensables pour expliquer le comportement électrique de ces fibres.

Dans le circuit le plus simple (A) le facteur R_{ce} n'apparaît pas et est supposé très grand. Mise à part la résistance R_b , ce circuit correspond à celui proposé par FALK et FATT (1964) puis par FREYGANG, RAPOPORT et PEACHEY (1967) pour la fibre musculaire de grenouille.

Pour le circuit B, les membranes du sarcolemme et des tubules sont supposées avoir les mêmes propriétés électriques c'est-à-dire que $R_{ce} C_e \neq R_m C_m$. EISENBERG évalue chaque surface membranaire se rapportant aux constituants électriques de ce circuit et trouve la valeur de C_e égale à $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. La valeur de C_m obtenue est de $4,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ et peut être considérée comme satisfaisante compte-tenu de la difficulté d'évaluer une surface à partir de photographies de microscopie électronique.

Ces deux circuits de membrane proposés par EISENBERG et dont les composants électriques diffèrent en fonction du type de réponses obtenues selon les fibres sont peut être également le reflet de zones d'ultrastructures différentes à l'intérieur d'une même fibre. Nous avons en effet signalé que, suivant le lieu d'implantation des micro-électrodes, les valeurs de P.R. pouvaient varier d'une dizaine de mV.

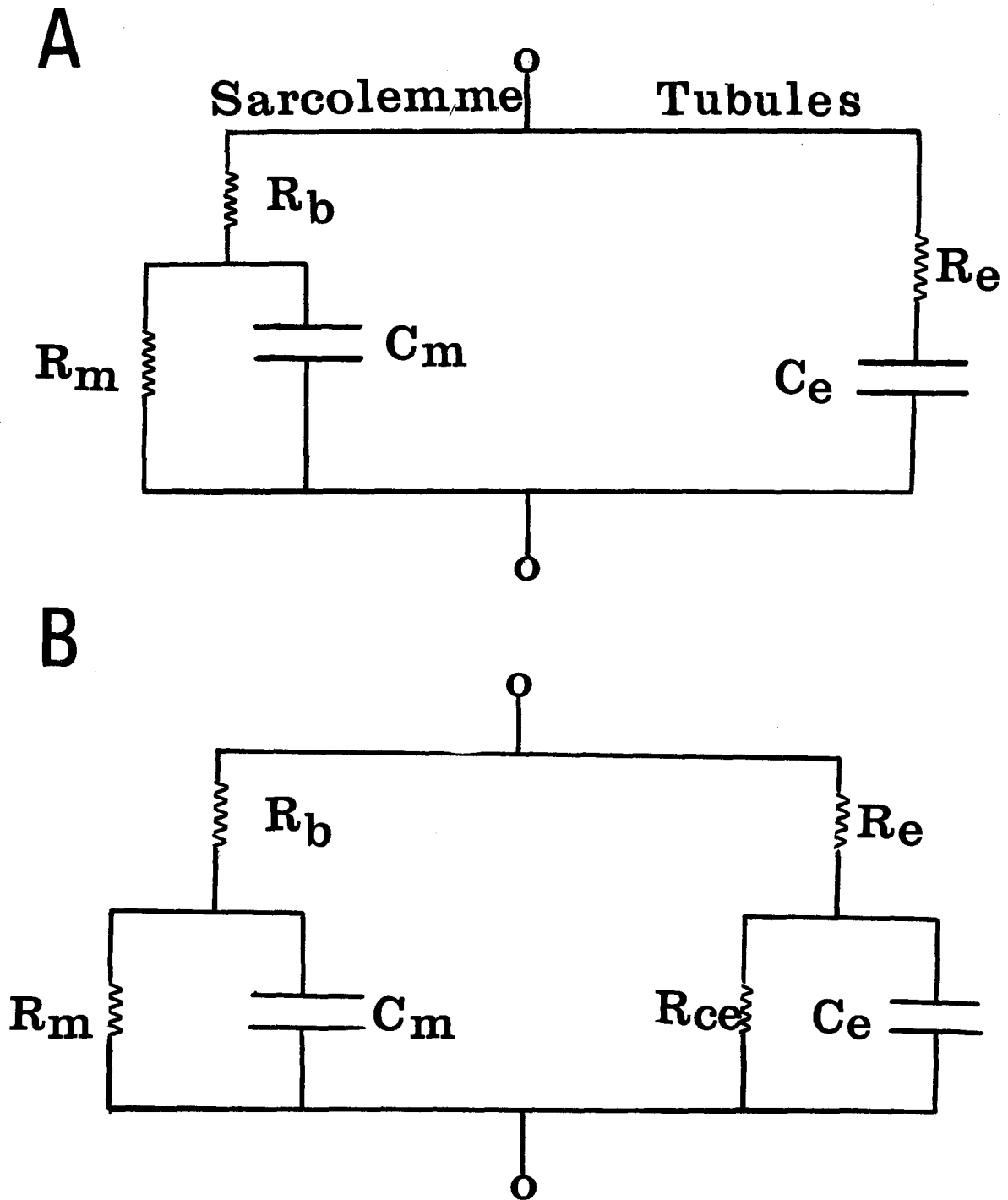


Figure 31 : Schémas électriques de la membrane de la fibre de crabe proposés par EISENBERG (1967)

- R_b : résistance du matériel amorphe entourant les fibres
- R_m : résistance du sarcolemme
- C_m : capacité du sarcolemme
- R_e : résistance du conducteur des tubules
- R_{ce} : résistance de surface de l'ensemble des tubules
- C_e : capacité des tubules

POTENTIEL DE REPOS

Le potentiel de repos de la fibre musculaire de *Carcinus maenas* est compris entre 60 et 70 mV (moyenne : 65 mV, $\sigma = 4,4$) et est comparable aux P.R. obtenus sur de nombreux muscles de crustacés : $68,1 \pm 0,8$ mV pour la fibre musculaire de balane (BRINLEY 1968), 60 à 80 pour l'écrevisse (ORKAND 1962 et SUGI et OCHI 1967), 65 mV pour le bernard l'ermite (WIERSMA et BOBBERT 1961). Notre mesure du P.R. est également proche de celles obtenues par d'autres auteurs sur le crabe *Carcinus* : 58 mV (SHAW 1955 a), $70 \pm 0,5$ (FATT et KATZ 1953), $63,4 \pm 1,4$ (KERKUT et RIDGE 1961) et $71,4 \pm 0,5$ (HAYS, LANG et GAINER 1968) pour le crabe bleu *Callinectes*.

Si les mesures de P.R. varient d'une fibre à l'autre, des différences très nettes se produisent également au niveau d'une fibre isolée. En effet, nous avons signalé des variations du P.R. tout le long de la fibre et particulièrement en profondeur, détectables selon le niveau de pénétration des microélectrodes. La même observation a été faite par WIERSMA et BOBBERT (1961) sur le bernard l'ermite et par HUXLEY et TAYLOR (1958) sur la fibre musculaire de grenouille. Ces derniers auteurs ont alors conclu à une réduction possible du P.R. en des zones ultrastructurales précises à savoir les tubules et les triades.

Il semble donc que les mesures du P.R. varient en fonction du niveau où le potentiel est recueilli mais il faut également admettre que cette variabilité peut résulter de l'influence relative de chacun des ions dans le maintien du P.R. Ainsi, nous avons constaté que la

conductance au chlore n'est supérieure à la conductance potassique que pour 75 p. 100 des fibres interrogées.

Nos résultats concernant l'influence des ions monovalents sur le potentiel de repos et la résistance de membrane mettent en évidence la contribution importante de deux ions : le potassium et le chlore et pour une moindre part : le sodium. Le potentiel de repos de la fibre musculaire de crabe correspond à un potentiel de diffusion à ces trois ions. En effet, pour une variation de 10 fois la concentration normale externe de K^+ ou de Cl^- , les courbes représentent les variations du P.R. en fonction du logarithme de $[K]_e$ ou de $[Cl]_e$ n'atteignent jamais une pente de 58 mV. Nous ne sommes donc pas, dans les conditions normales, en présence d'une pile de concentration à l'un ou l'autre de ces ions. Par contre, lorsque la perméabilité potassique est bloquée en milieu acide, la fibre se comporte comme une électrode au chlore pour d'importantes variations de $[Cl]_e$ autour de la valeur normale.

Lorsque le chlore est supprimé de la solution externe, la fibre se comporte approximativement comme une électrode aux cations c'est-à-dire que le P.R. correspond à un potentiel de diffusion aux ions K^+ et Na^+ . La pente moyenne de la courbe P.R. = f (log $[K]_e$) est devient en effet égale à 47 mV au lieu de 58.

Enfin, il faut signaler que les variations de potentiel dues aux modifications de $[Cl]_e$ ne sont jamais d'amplitude telle que la

valeur du P.R. atteint V_{Cl} . De plus, ces variations ne sont que transitoires et le P.R. est constamment ramené vers sa valeur initiale grâce aux mouvements du potassium. Cette importance du flux potassique dans le maintien du P.R. à sa valeur normale est également mise en évidence par nos résultats obtenus en milieu acide. A pH 4,25 la dépolarisation provoquée par une absence de chlore dans la solution externe est plus ample qu'à pH 7,8 et n'est pas suivie de la phase de repolarisation de la fibre. Le P.R. reste très éloigné de sa valeur normale et ceci résulte du blocage de la perméabilité potassique par les milieux acides.

Il semble qu'un rétablissement identique du P.R. à sa valeur initiale se produise après l'hyperpolarisation provoquée par un milieu dépourvu de sodium. Toutefois, il ne nous a pas été possible de distinguer si ce phénomène est dû au mouvement propre des ions K^+ ou bien à une pénétration de la choline à l'intérieur de la cellule.

Ainsi, le P.R. de la fibre musculaire de crabe est un potentiel de diffusion aux ions K^+ , Cl^- et Na^+ . Les ions K^+ et Cl^- rendent compte de la valeur du P.R. dans la plupart des conditions expérimentales. Bien que la membrane soit faiblement perméable au sodium, la participation sodique n'est pas négligeable et devient beaucoup plus apparente lorsque la solution externe est pauvre en potassium. Dans ce cas, la contribution de trois ions au P.R. dans des proportions relatives variant, comme nous l'avons déjà signalé, d'une fibre à l'autre, expliquerait les écarts types importants calculés à partir des mesures obtenues lors de l'application des milieux hypopotassiques

CONDUCTANCE MEMBRANAIRE : DETERMINATION DES VOIES DE PASSAGE DES IONS
K⁺ et Cl⁻

Bien que les effets du chlore sur le P.R. ne soient que passagers, les ions Cl⁻ jouent un rôle prépondérant dans la conductance de repos. Nous avons montré, de trois façons différentes, que ceux-ci rendent compte de 56 p. 100 de la conductance membranaire totale. La conductance potassique est plus faible, égale au maximum à 44 p. 100.

A partir des résultats de BROOKS et HUTTER (1964) HUTTER et WARNER (1967 b) et de SPURWAY (1965 b) montrant une action en surface des ions H⁺ et sachant que la perméabilité potassique est bloquée en milieu acide, nous pouvons donc envisager que le flux potassique, ou une partie importante du moins, traverse la membrane sarcolemmique de surface. Par contre, la perméabilité au chlore n'est pas modifiée pour des pH compris entre 3,7 et 7,8. Il semblerait donc possible d'envisager que le passage des ions Cl⁻ s'effectue à un autre niveau de la fibre. A l'appui de cette hypothèse mentionnons les effets des solutions pauvres en chlore. Celles-ci provoquent une chute de G_{Cl} qui serait associée à un gonflement du STT. Il s'établirait, en effet, un flux sortant de Cl⁻ associé à un efflux de K⁺ provenant de l'augmentation de la driving-force potassique. Cet efflux de KCl serait couplé à un efflux d'eau permettant le maintien de l'équilibre osmotique et expliquant le gonflement des tubules (HAYS, LANG et GAINER 1968) dont la capacité membranaire augmente (SELVERSTON 1967 ; FREYGANG, RAPOPORT et PEACHEY 1967). Seul le système T serait gonflé, le réticulum longitudinal n'étant pas affecté (GIRARDIER, REUBEN, BRANDT et GRUNDFEST 1963). Ce

gonflement ne peut être provoqué que par l'efflux de Cl^- (GAYTON et HINKE 1968) et ainsi la membrane du système tubulaire transverse serait comme le supposent GIRARDIER et Coll. (1963) pour le muscle d'écrevisse sélectivement perméable aux anions et représenterait le site d'efflux du chlore.

En outre, les hypothèses de passage du potassium en surface et du chlore au niveau du STT se trouvent étayées par nos résultats relatifs aux temps de blocage de P_K et P_{Cl} . La perméabilité potassique est annulée en milieu acide en quelques minutes (temps moyen : 3 minutes) alors que la perméabilité au chlore chute en solution propionate après 40 minutes et en solution sulfate après 20 minutes.

Une autre possibilité de contrôle de ces voies de passage réside dans l'analyse des décours des courbes voltage-courant. Le phénomène de rectification de la membrane d'une fibre placée en conditions normales disparaît lorsque le milieu externe ne contient plus de chlore. Or, de nombreux auteurs attribuent la propriété de rectification à la membrane du système tubulaire transverse (NAKAJIMA, IWASAKI et OBATA 1962 - KAO et STANFIELD 1968 - TAKEDA et OOMURA 1969 - ILDEFONSE, PAGER et ROUGIER 1969). La perte de rectification lorsque G_{Cl} est annulée pourrait donc confirmer l'hypothèse du passage du chlore au niveau de la membrane du système tubulaire transverse.

Enfin l'existence de sites différents pour les influx et les efflux de chlore a été envisagée par RICHARDS (1969) sur la fibre musculaire de crabe. Nos résultats expérimentaux ne nous permettent pas de préciser une localisation différente de ces sites et seule l'hypothèse d'un efflux de Cl^- à travers la membrane du système tubulaire transverse

peut être retenue

L'ensemble de nos résultats concernant les voies de passage des ions K^+ et Cl^- au niveau de la fibre musculaire de crabe sont différents de ceux obtenus sur le couturier de grenouille. En effet, HODGKIN et HOROWICZ (1960) notent que la variation du P.R. lors d'une modification de $[Cl^-]_e$ se produit plus rapidement que lors d'une modification équivalente de $[K^+]_e$. Ce fait est interprété en admettant que le chlore traverserait la membrane en surface alors que le potassium serait échangé au niveau des cloisons du STT, ce qui avait déjà été envisagé par HUXLEY et TAYLOR (1958). Ces auteurs considèrent que les tubules sont le lieu de rétention du potassium ou le site d'action de cet ion. ADRIAN et FREYGANG (1962 a, b) admettent dans les conditions de repos, l'existence d'une voie de passage pour Cl^- localisée à la surface de la fibre, la membrane présentant une P_{Cl} importante et constante. De plus, pour le potassium, il existerait deux "canaux" en parallèle, l'un en surface, l'autre en profondeur qui représenterait à lui seul le lieu d'échange des ions K^+ au repos. Ce niveau correspondrait à la membrane séparant la lumière des tubules du réticulum sarcoplasmique. Celle-ci ne serait pas perméable au Cl^- , ce qui semble confirmé par RAPOPORT (1969) pour lequel la face externe de la membrane des tubules serait chargée négativement, ces charges assurant une régulation du contenu ionique libre à l'intérieur du système T (RAPOPORT, PEACHEY et GOLDSTEIN 1969).

Cependant, il apparaît que la localisation de P_K strictement en profondeur ou de P_{Cl} strictement en surface ne peut être le reflet

de tous les phénomènes électriques observés. HODGKIN et HOROWICZ (1960) reconnaissent en effet qu'il est difficile d'interpréter le fait que le retrait d'une certaine quantité de potassium dans la solution externe provoque une variation du P.R. plus lente que l'addition d'une même quantité de K^+ dans cette solution. De même FOULKS, PACEY et PERRY (1965) démontrent que la perméabilité au chlore est certainement une propriété de surface de la membrane mais qu'il existe également une P_{Cl} non négligeable pour la membrane des tubules.

Il semble donc bien que les voies de passage pour les ions K^+ et Cl^- soient pour la fibre musculaire de crabe inverses de celles déterminées pour la fibre musculaire de grenouille. En fait, chaque structure membranaire, à la surface ou en profondeur, semble présenter une perméabilité préférentielle mais non exclusive vis à vis d'un ion. Ainsi, la membrane du système tubulaire transverse de la fibre musculaire de crabe au repos apparaît comme le site d'efflux des ions Cl^- . Par contre, les ions K^+ traverseraient la membrane en surface.

RESUME

- L'étude des caractéristiques membranaires de la fibre musculaire de crabe nous a permis d'évaluer la résistance de membrane $R_m = 110 \text{ cm}^2$ et la conductance $G_m = 9090 \text{ } \mu\text{mho/cm}^2$. Ces valeurs sont équivalentes à celles obtenues sur de nombreux muscles de crustacés lorsqu'on ne tient pas compte de la surface des invaginations de la membrane externe.

- Le potentiel de repos est un potentiel de diffusion dans lequel interviennent les ions K^+ , Na^+ et Cl^- , la perméabilité sodique de la membrane apparaissant très faible.

- La conductance membranaire résulte principalement de deux courants ioniques dus aux ions K^+ et Cl^- . La conductance au chlore correspond à 55,7 p. 100 de la conductance totale, la conductance cationique à 44,3 p. 100, cette dernière étant essentiellement représentée par la conductance potassique.

- La diminution du pH extracellulaire provoque un blocage de la perméabilité potassique.

- L'ensemble de nos résultats nous permet de supposer un passage des ions K^+ au niveau de la membrane plasmique alors que le système tubulaire transverse serait le site des efflux de Cl^- .

BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, R.H. (1956).

The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle.

J. Physiol., Londres, 133, 631-658.

ADRIAN, R.H. (1961).

Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle.

J. Physiol., Londres, 156, 623-632.

ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H. (1962 a).

The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.

J. Physiol., Londres, 163, 61-103.

ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H. (1962 b).

Potassium conductance of frog muscle membrane under controlled voltage.

J. Physiol., Londres, 163, 104-114.

ADRIAN, R.H. et SLAYMAN, C.L. (1966).

Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle.

J. Physiol., Londres, 184, 970-1014.

ATWOOD, H.L. (1963).

Differences in muscle fibre properties as a factor in "fast" and "slow" contraction in *Carcinus*.

Comp. Biochem. Physiol., 10, 17-32.

ATWOOD, H.L. (1965).

Excitation and inhibition in crab muscle fibers.

Comp. Biochem. Physiol., 16, 409-426.

BOYLE, P.J. et CONWAY, E.J. (1941).

Potassium accumulation in muscle and associated changes.
J. Physiol., Londres, 100, 1-63.

BRINLEY, F.J. (1968).

Sodium and potassium fluxes in isolated barnacle muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 51, 4, 445-447.

BROOKS, A.E. et HUTTER, O.F. (1962).

The influence of pH on the chloride conductance of skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 163, 9P-10P.

BROOKS, A.E. et HUTTER, O.F. (1964).

The effect of pH on the efflux of ^{36}Cl from skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 172, 29P-30P.

BURNSTOCK, G. et STRAUB, R.W. (1958).

A method for studying the effect of ions and drugs on the resting and action potentials in smooth muscle with external electrodes.
J. Physiol., Londres, 140, 156-177.

CALDWELL, P.C. (1968).

Factors governing movement and distribution of inorganic ions in nerve and muscle.
Physiol. Rev., 48, 1, 1-64.

CHEVAL, J. (1966).

Changeur d'impédance à transistor à effet de champ. Electronique et électromécanique appliquée à la physiologie.
Bull. d'information technique C.N.R.S., 2.

CLARK et LUBS (1917). dans DOCUMENTA GEIGY (1966) p. 320.

COLE, K.S. et CURTIS, H.J. (1938).

Electric impedance of Nitella during activity.

J. Gen. Physiol., 22, 37-64.

CONWAY, E.J. (1964).

New light on the active transport of sodium ions from skeletal muscle.

Fed. Proc., 23, 680-688.

CONWAY, E.J., KERNAN, R.P. et ZADUNAISKY, J.A. (1961).

The sodium pump in skeletal muscle in relation to energy barriers.

J. Physiol., Londres, 155, 263-279.

CONWAY, E.J. et MOORE, P.T. (1945).

Cation and anion permeability constants for the muscle fibre membrane.

Nature, 156, 170-171.

CROSS, S.R., KEYNES, R.D. et RYBOVA, R. (1965).

The coupling of sodium efflux and potassium influx in frog muscles.

J. Physiol., Londres, 181, 865-880.

CSAPO, A. et WILKIE, D.R. (1956).

The dynamics of the effect of potassium on frog's muscle.

J. Physiol., Londres, 134, 497-514.

DE MELLO, W.C. et HUTTER, O.F. (1966).

The anion conductance of crustacean muscle.
J. Physiol., Londres, 183, 11P-12P.

DESMEDT, J.E. (1953).

Electrical activity and intracellular sodium concentration in
frog muscle.
J. Physiol., Londres, 121, 191-205.

^{II}
DUDEL, J. et RUDEL, R. (1969).

Voltage controlled contractions and current-voltage relations of
crayfish muscle fibers in chloride free solutions.
Pflügers Arch., 308, 291-314.

DYDYNKA, M. et HARRIS, E.J. (1966).

Consumption of high energy phosphates during active sodium
and potassium interchange in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 182, 92-109.

EISENBERG, R. (1965).

A.C. impedance of single muscle fibers.
Ph. D. thesis, University College, London.

EISENBERG, R.S. (1967).

The equivalent circuit of single crab muscle fibers as
determined by impedance measurements with intracellular
electrodes.
J. Gen. Physiol., 50, 1785-1806.

ENDO, M. (1966).

Entry of fluorescent dyes into the sarcotubular system of the frog muscle.

J. Physiol., Londres, 185, 224-238.

FALK, G. et FATT, P. (1964).

Linear electrical properties of striated muscle fibres observed with intracellular electrodes.

Proc. Roy. Soc., Londres, Ser. B, 160, 69-123.

FALK, G. et LANDA, J.F. (1960).

Effects of potassium on frog skeletal muscle in a chloride deficient medium.

Amer. J. Physiol., 198, 1225-1231.

FATT, P. et KATZ, B. (1951).

An analysis of the end plate potential recorded with an intracellular electrode.

J. Physiol., Londres, 115, 320-370.

FATT, P. et KATZ, B. (1953).

The electrical properties of crustacean muscle fibres.

J. Physiol., Londres, 120, 171-204.

FOULKES, J.G., PACEY, J.A. et PERRY, F.A. (1965).

Contractures and swelling of the transverse tubules during chloride withdrawal in frog skeletal muscle.

J. Physiol., Londres, 180, 96-115.

FREYGANG, W.H., RAPOPORT, S.I. et PEACHEY, L.D. (1967).

Some relations between changes in the linear electrical properties of striated muscle fibers and changes in ultrastructure.

J. Gen. Physiol., 50, 2437-2458.

FRUMENTO, A.S. (1965).

Sodium pump ; its electrical effects in skeletal muscle. Science, 147, 1442-1443.

GAINER, H. et GRUNDFEST, H. (1968).

Permeability of alkali metal cations in lobster muscle.

J. Gen. Physiol., 51, 399-423.

GAYTON, D.C. et HINKE, J.A.M. (1968).

The location of chloride in single striated muscle fibers of the giant barnacle.

Can. J. of Physiol. and Pharmacol., 46, 213-219.

GIRARDIER, L., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. et GRUNDFEST, H. (1963).

Evidence for anion-permselective membrane in crayfish muscle fibers and its possible role in excitation-contraction coupling.

J. Gen. Physiol., 47, 189-214.

GOLDMAN, D.E. (1943).

Potential, impedance, and rectification in membranes.

J. Gen. Physiol., 27, 37-60.

GOMORI, G. (1955). dans COLOWICK et KAPLAN (Ed.) Methods in Enzymology, vol. I, N.V., p. 138.

HAGIWARA, S. et TAKAHASHI, K. (1967).

Resting and spike potentials of skeletal muscle fibres of salt-water elasmobranch and teleost fish.

J. Physiol., Londres, 190, 499-518.

HAGIWARA, S., GRUENER, R., HAYASHI, H., SAKATA, H. et GRINNELL, A.D. (1968).

Effect of external and internal pH changes on K and Cl conductances in the muscle fiber membrane of a giant barnacle.

J. Gen. Physiol., 52, 773-792.

HARRIS, E.J. (1963).

Distribution and movement of muscle chloride.

J. Physiol., Londres, 166, 87-109.

HARRIS, E.J. (1965).

The chloride permeability of frog sartorius.

J. Physiol., Londres, 176, 123-135.

HARRIS, E.J. et OCHS, S. (1966).

Effects of sodium extrusion and local anaesthetics on muscle membrane resistance and potential.

J. Physiol., Londres, 187, 5-21.

HAYS, E., LANG, M.A. et GAINER, H. (1968).

A re-examination of the Donnan distribution as a mechanism for membrane potentials and potassium and chloride ions distributions in Crab muscle fibers.

Comp. Biochem. Physiol., 26, 761-792.

HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P. (1959).

The influence of potassium and chloride ions on the membrane of single muscle fibres.

J. Physiol., Londres, 148, 127-138.

HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P. (1960).

The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres.

J. Physiol., Londres, 153, 370-385.

HODGKIN, A.L. et KATZ, B. (1949).

The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.

J. Physiol., Londres, 108, 37-77.

HODGKIN, A.L. et RUSHTON, W.A.H. (1946).

The electrical constants of a crustacean nerve fiber.

Proc. Roy. Soc. B., 133, 444-479.

HUTTER, O.F. et NOBLE, D. (1960).

The chloride conductance of frog skeletal muscle.

J. Physiol., Londres, 161, 89-102.

HUTTER, O.F. et NOBLE, D. (1961).

Anion conductance of cardiac muscle.

J. Physiol., Londres, 157, 335-350.

HUTTER, O.F. et WARNER, A.E. (1967 a).

The pH sensitivity of the chloride conductance of frog skeletal muscle.

J. Physiol., Londres, 189, 403-425.

HUTTER, O.F. et WARNER, A.E. (1967 b).

The effect of pH on the ^{36}Cl efflux from frog skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 189, 427-443.

HUXLEY, H.E. (1964).

Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in the frog sartorius muscle.
Nature, 202, 1067-1071.

HUXLEY, A.F. et TAYLOR, R.E. (1958).

Local activation of striated muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 144, 426-441.

ILDEFONSE, M., PAGER, J. et ROUGIER, O. (1969).

Relations entre les propriétés de rectification et le système tubulaire transverse des fibres musculaires squelettiques rapides.
J. Physiol., Paris, 61, sup. 1, 137.

JENERICK, H.P. (1953).

Muscle membrane potential, resistance, and external potassium chloride.
J. Cell. Comp. Physiol., 42, 427-448.

JENERICK, H.P. (1959).

The control of membrane ionic currents by the membrane potential of muscle.
J. Gen. Physiol., 42, 5, 923-930.

KAO, C.Y. et STANFIELD, P.R. (1968).

Actions of some anions on electrical properties and mechanical threshold of frog twitch muscle.

J. Physiol., Londres, 198, 291-309.

KATZ, B. (1949).

Les constantes électriques de la membrane du muscle.

Arch. Sci. Physiol., 3, 285-300.

KERKUT, G.A. et RIDGE, R.M.A.P. (1961).

The effect of temperature changes on the resting potential of crab, insect and frog muscle.

Comp. Biochem. Physiol., 3, 64-70.

LANG, M.A. et GAINER, H. (1969).

Volume control by muscle fibers of the blue crab.

J. Gen. Physiol., 53, 323-341.

MAINWOOD, G.W. et LEE, S.L. (1968).

The hyperpolarizing effect of hydrogen ions on transmembrane potential in frog skeletal muscle.

Can. J. of Physiol. and Pharmacol., 46, 151-157.

MANDRINO, M. (1969).

Action du tampon tris sur les propriétés électriques de la membrane de la fibre musculaire striée de grenouille.

J. Physiol., Paris, 61, sup. 2, 346-347.

MELVIN, C.J. et HESS, A. (1967).

Fine structural differences in "fast" and "slow" muscle fibers of the crab.

Am. J. Anat., 121, 2, 285-304.

MEVES, H. et VÖLKNER, K.G. (1958).

Die Wirkung von CO₂ auf das Ruhemenbranpotential und die elektrischen Konstanten der quergestreiften Muskelfaser.
Pflügers Arch., 265, 457-476.

MOORE, L.E. (1969).

Anion permeability of frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 54, 33-52.

MULLINS, L.J. et FRUMENTO, A.S. (1963).

The concentration dependance of sodium efflux from muscle.
J. Gen. Physiol., 46, 629-653.

NAKAJIMA, S., IWASAKI, S. et OBATA, K. (1962).

Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane.
J. Gen. Physiol., 46, 97-115.

NASTUK, W.L. et HODGKIN, A.L. (1950).

The electrical activity of single muscle fibers.
J. Cell. Comp. Physiol., 35, 39-73.

OCHS, S. (1966).

Action of choline on frog sartorius muscle.
J. Physiol., Londres, 182, 244-254.

ORKAND, R.K. (1962).

The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 161, 143-159.

PAGE, S. (1964).

The organization of the sarcoplasmic reticulum in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 175, 10P-11P.

PEACHEY, L.D. (1965 a).

The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius.
J. Cell. Biol., 25, 3, 209-231.

PEACHEY, L.D. (1965 b).

Transverse tubules in excitation-contraction coupling.
Fed. Proc., 24, 1124-1134.

PEACHEY, L.D. (1967).

Membrane systems of crab fibers.
Am. Zoologist, 7, 505-513.

PEACHEY, L.D. et HUXLEY, A.F. (1964).

Transverse tubules in crab muscle.
J. Cell. Biol., 23, 2, 70 A.

RAPOPORT, S.I. (1969).

A fixed charge model of the transverse tubular system of frog sartorius.
J. Gen. Physiol., 54, 178-187.

RAPOPORT, S.I., PEACHEY, L.D. et GOLDSTEIN, D.A. (1969).

Swelling of the transverse tubular system in frog sartorius.
J. Gen. Physiol., 54, 167-177.

RENKIN, E.M. (1961).

Permeability of frog skeletal muscle cells to choline.
J. Gen. Physiol., 44, 1159-1164.

REUBEN, J.P., GIRARDIER, L. et GRUNDFEST, H. (1962).

The chloride permeability of crayfish muscle fibers.
Biol. Bull. mar., 123, 509-510.

REUBEN, J.P., GIRARDIER, L. et GRUNDFEST, H. (1964).

Water transfer and cell structure in isolated crayfish muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 47, 1141-1174.

RICHARDS, C.D. (1969).

Chloride fluxes in crab muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 202, 211-221.

RUSHTON, W.A.H. (1934). cité dans HODGKIN, A.L. et RUSHTON, W.A.H. (1946).

Proc. Roy. Soc. B., 133, 444-479.

SANDOW, A. (1965).

Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.
Pharmacol. Rev., 17, 265-320.

SANDOW, A. et MANDEL, H. (1951).

Effects of potassium and rubidium on the resting potential of muscle.
J. Cell. Comp. Physiol., 38, 271-291.

SELVERSTON, A. (1967).

Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers.

Am. Zoologist., 7, 515-525.

SHAW, J. (1955 a).

Ionic regulation in the muscle fibres of *Carcinus maenas* : I - the electrolyte composition of single fibres.

J. Exp. Biol., 32, 383-396.

SHAW, J. (1955 b).

Ionic regulation in the muscle fibres of *Carcinus maenas* : II - the effect of reduced blood concentrations.

J. Exp. Biol., 32, 664-680.

SPURWAY, N.C. (1965 a).

Effects of pH variation upon the anion permeability of frog muscle.

J. Physiol., Londres, 181, 51 P.

SPURWAY, N.C. (1965 b).

The site of "anion interaction" of frog skeletal muscle.

J. Physiol., Londres, 178, 51P-52P.

STEINBACH, H.B. (1951).

Sodium extrusion from isolated frog muscle.

Am. J. Physiol., 167, 284-287.

STEFANI, E. et STEINBACH, A.B. (1969).

Resting potential and electrical properties of frog slow muscle fibres. Effect of different external solutions.

J. Physiol., Londres, 203, 383-401.

SUGI, H. et OCHI, R. (1967).

The mode of transverse spread of contraction initiated by local activation in single crayfish muscle fibers.

J. Gen. Physiol., 50, 2145-2166.

TAKEDA, K. et OOMURA, Y. (1969).

Two component anomalous rectification in frog muscle fibers.

Proc. Japon Acad., 45, 814-819.

WIERSMA, C. et BOBBERT, A.C. (1961).

Membrane potential changes on activation in crustacean muscle.

Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 10, 51-72.

ZACHAR, J., ZACHAROVÁ, D. et HENČEK, M. (1964).

The relative potassium and chloride conductances in the muscle membrane of the crayfish (*Astacus fluviatilis*).

Physiologia Bohemoslovenica, 13, 129-136.

