50.376 1971 60

# THÈSE

50376 1971 60

présentée à

### L'UNIVERSITÉ DE LILLE |

#### pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE ANIMALE (3<sup>e</sup> cycle)

par

GHISLAIN HAUDECŒUR

# ÉTUDE DES PERMÉABILITÉS IONIQUES MEMBRANAIRES De la fibre musculaire striée

**DE CRABE** 



Soutenue le 30 mars 1971

devant la commission d'examen

MM. M. DURCHON, Président P. GUILBAULT, Rapporteur V. BLOCH, Examinateur J.P. ROUSSEAU, Examinateur Y.M. GARGOUIL, Invité AVANT-PROPOS

Le travail dont rend compte le présent mémoire a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire sous la direction de Monsieur le Professeur GUILBAULT.

Que Monsieur le Professeur GUILBAULT trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir bien voulu, non seulement m'accueillir dans son Laboratoire et me proposer un thème de recherche, mais aussi m'initier aux techniques électrophysiologiques qui m'étaient inconnues ; il m'a ainsi permis de mener ce travail à bien en y consacrant une importante partie de son temps, et en apportant son aide constante et efficace ainsi que ses conseils judicieux. Je tiens à lui affirmer toute ma reconnaissance pour sa bienveillance à mon égard.

Je remercie Monsieur le Professeur DURCHON qui m'a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence de mon jury. Qu'il veuille bien croire à l'expression de mon admiration et de mon profond respect.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur BLOCH qui a bien voulu examiner ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Que Monsieur le Professeur ROUSSEAU soit assuré de ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur GARGOUIL d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Sa compétence et son autorité suscitent toute mon admiration. Je tiens également à rendre hommage à Monsieur le Professeur BOUISSET qui m'a donné le goût de la Physiologie et qui m'a permis de me familiariser avec la recherche.

Le travail exposé ici a été réalisé avec l'aide plus ou moins directe de tous les membres du Laboratoire de Physiologie, et c'est avec plaisir que je les en remercie, en particulier :

- Madame Ivonne MOUNIER, avec qui je me suis initié aux problèmes des techniques électrophysiologiques et dont la présence m'a été profitable.

- Mademoiselle Josiane BREBION qui a assuré de façon efficace et avec une extrême gentillesse une partie des dépouillements et la réalisation des figures.

- Messieurs Georges ATTAGNANT et René COISNE pour leur amicale et précieuse collaboration technique.

- Madame Sylviane GARBE qui a accepté avec amabilité et courage, en plus de ses charges habituelles, la dactylographie de ce mémoire. Je lui renouvelle mes remerciements, ainsi qu'à Mademoiselle Brigitte COUSIN qui a bien voulu assurer, en dehors de ses heures de travail, la présentation de la bibliographie.

Je ne saurais oublier Mademoiselle Marie Madeleine HOUSSAIN Messieurs Gérard BRULE, Maurice FALEMPIN et Jacques MATHIEU pour leur aide amicale et spontanée. SOMMAIRE

# I - INTRODUCTION

## II - HISTORIQUE

1

5

Pages

1 - Théorie de HODGKIN-HUXLEY	6
2 - Propriétés électriques des fibres musculaires de Crustacés au repos	11
3 - Potentiel d'action des fibres musculaires de Crustacés	16
4 - Rapport entre la structure de la fibre musculaire d'Invertébré et	
ses propriétés électriques	24
III - TECHNIQUES	26
<u>A - Protocole</u>	27
<u>B - Animal d'expérience - préparation</u>	28
	20
<u>1 - Animai d'experience</u>	20
2 - Préparation	28
<u>C - Solutions</u>	32
<u>1 - Solution normale</u>	32
2 <u>- Solutions anormales</u>	32

D - Techniques électrophysiologiques

36

<u>1Technique_des_microélectrodes</u>	37
1.1 - Montage pour enregistrer le potentiel de membrane	37
1.2 - Montage pour l'étude des effets d'un shunt membranaire local	40
2Technique_du_pont_de_saccharose	42
IV - RESULTATS	45
A - Potentiel de repos	46
<u>l - Effets d'un shunt membranaire local sur la valeur du potentiel de</u>	
repos	49
<u>2 - Mesure du potentiel de repos par la technique du pont de saccha-</u>	
rose	55
2.1 - Action sur le P.R. d'un milieu isotonique du milieu intracel-	
lulaire	56
2.2 - Enregistrement du potentiel de repos par la technique du pont	,
de saccharose	58
<u>3Résumé_et_conclusion</u>	62
	(° – )
B - Caracteristiques electrophysiologiques de la fibre en activite	67
<u>1 - Dans les conditions normales</u>	69
1.1 - Décours du potentiel d'action	69
1.2 - Influence de la valeur du potentiel de repos sur le potentiel	
d'action	71
1.3 - Propagation du potentiel d'action	75

.

1.4 - Impédance membranaire pendant la phase d'activité	81			
1.5 - Résumé et conclusion	89			
2Dans_des_conditions_expérimentales_anormales	92			
2.1 - Rôle des ions et des inhibiteurs de perméabilité	92			
2.1.1 - Rôle des ions monovalents et du T.E.A.	92			
2.1.1.1 - Sodium	93			
2.1.1.2 - Potassium et T.E.A.	<b>9</b> 5			
2.1.1.3 - Chlore	99			
2.1.1.4 - Résumé et conclusion	110			
2.1.2 - Rôle du Ca <sup>++</sup> et de la P <sub>Ca</sub>	114			
2.1.2.1 - Calcium	114			
2.1.2.2 - Manganèse	116			
2.1.2.3 - Résumé et conclusion	122			
2.2 - Changement des perméabilités ioniques membranaires impliquée	S			
lors du potentiel d'action	123			
2.2.1 - Détermination des perméabilités membranaires au potas-				
sium et au calcium	125			
2.2.2 - Rôle du Cl $^-$ et du Ca $^{++}$	136			
2.2.3 - Antagonisme calcium-sodium	141			
2.2.4 - Résumé et conclusion	145			
V - DISCUSSION ET CONCLUSION	148			
1 - Caractéristiques de repos				
2 - Potentiel d'action				
VI - RESUME				

VIII - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

.

160

## I - INTRODUCTION

Il est bien connu maintenant que le potentiel d'action (P.A.), à l'origine de la contraction de la plupart des fibres musculaires striées, est une dépolarisation temporaire propagée à l'ensemble de la membrane. Le potentiel de membrane (P.M.) de la fibre musculaire au repos (P.R.) est dû, selon les tissus considérés, à l'existence d'un potentiel régi par un équilibre de DONNAN ou à l'existence d'un potentiel de pile de diffusion pouvant être déterminé par l'équation de GOLDMAN (1943) qui fait intervenir, outre les concentrations intra- et extracellulaires des ions, la perméabilité de la membrane à chacun de ceux-ci.

L'on sait en effet depuis les travaux de HODGKIN et HUXLEY (1945, 1952 a, b) que le P.A. peut être expliqué en tenant compte des variations des perméabilités ioniques membranaires. Ces variations ont permis à ces auteurs d'attribuer, pour la fibre nerveuse, la phase de dépolarisation à une augmentation de la perméabilité de la membrane au Na<sup>+</sup> ( $P_{Na}$ ) et la phase de repolarisation à celle au K<sup>+</sup> ( $P_{K}$ ).

A la suite de ces travaux, il a été montré qu'au niveau des fibres musculaires striées de Vertébrés les mêmes processus ioniques interviennent avec en plus, cependant, un phénomène particulier consistant en une diminution de  $P_K$  qui se situe entre l'augmentation de  $P_{Na}$  et celle de  $P_K$ . Cette diminution propre à la fibre musculaire explique la durée plus importante de son P.A..

Le comportement électrophysiologique de la fibre musculai-

re de crabe, dont l'étude fait l'objet du présent travail, se révèle à l'analyse de la littérature comme très différent de celui de la fibre de Vertébré. En effet, la phase ascendante du P.A. n'est pas de nature sodique et ce P.A. n'est pas conduit selon un processus régénératif (FATT et KATZ, 1953). Cependant, bien que cette fibre musculaire de crabe ait fait l'objet de nombreux travaux, aucune étude systématique de l'action des ions ou des inhibiteurs de permeabilité membranaıre ne semble avoir été entreprise jusqu'à ce jour de façon à entrevoir les conductances ioniques mises en jeu lors du déroulement du P.A.. Le but du présent travail a été d'essayer de réduire cette lacune et de donner, en intégrant les résultats acquis antérieurement, une tentative d'explication des phénomènes ioniques impliqués.

La première partie de ce travail porte sur l'étude du P.M. de la fibre au repos enregistré dans des conditions particulières, ce qui permet de confirmer les hypothèses concernant la perméabilité préférentielle au Cl<sup>-</sup> de la membrane du système tubulaire transverse et celle au K<sup>+</sup> de la membrane sarcolemmique et d'expliquer, entre autres, la valeur faible du P.R. et sa variabilité.

La deuxième partie concerne l'étude du P.A. de la fibre placée :

- dans des conditions normales, dans le but de mettre en

évidence l'évolution de la conductance membranaire  $(G_m)$  dont la connaissance est à l'origine d'hypothèses pouvant permettre de rendre compte du décours du P.A., de sa faible amplitude et de sa non-propagation à l'ensemble de la structure membranaire.

- dans des conditions anormales, c'est-à-dire soumise à l'action de milieux de concentrations variées en ions et à celle d'inhibiteurs de perméabilité, de façon à essayer de confirmer les hypothèses rendant compte de l'évolution de cette conductance membranaire globale.

Enfin l'ensemble des résultats acquis est discuté en relation avec l'étude de la structure membranaire dans le but d'essayer d'établir les rapports existant entre cette structure et les propriétés électrophysiologiques de la fibre.

## II - HISTORIQUE

1 - Théorie de HODGKIN-HUXLEY.

2 - Propriétés électriques des fibres musculaires de Crustacés au repos.

3 - Potentiel d'action des fibres musculaires de Crustacés.

4 - Rapport entre la structure de la fibre musculaire d'Invertébré et ses propriétés électriques. Les propriétés électriques et mécaniques du muscle et plus précisément de la fibre musculaire ont fait l'objet d'innombrables travaux. Ceux-ci ont amené leurs auteurs à élaborer de nombreuses hypothèses pour tenter d'expliquer aussi bien les propriétés électriques que mécaniques ainsi que le couplage excitation-contraction en faisant appel à différentes techniques d'investigation du domaine de l'électrophysiologie, de la biochimie, de la microscopie électronique et même de la modélisation soit de la membrane, soit de la fibre ou soit du muscle entier.

Ces différentes acquisitions ont permis à certains auteurs dont SANDOW (1965 ; 1970), PEACHEY (1968) et WILKIE (1968) d'en faire la synthèse et d'essayer d'expliquer le mécanisme du couplage excitation-contraction.

Le présent mémoire concerne l'étude de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe. Dans ces conditions, il convient surtout de rapporter les résultats acquis dans ce domaine en rappelant toutefois au préalable la théorie ionique qui constitue la base des études électrophysiologiques et qui permet de comprendre la génèse et le déroulement de l'activité électrique des fibres excitables.

#### 1 - Théorie ionique de HODGKIN-HUXLEY

La théorie ionique élaborée à la suite d'expériences

réalisées sur la fibre nerveuse par HODGKIN (1951), HODGKIN et HUXLEY (1952 a et b) et généralisée aux autres tissus excitables par NOBLE (1962, 1966), explique que le potentiel de membrane (P.M.) de la fibre au repos (P.R.) et lors de l'activité (P.A.) est un potentiel de diffusion aux ions présents de part et d'autre de la membrane et dont le calcul nécessite la connaissance de la valeur des différentes concentrations ioniques intracellulaires ainsi que la perméabilité de la membrane à chacun de ces ions.

Pour la fibre nerveuse, HODGKIN et HUXLEY (1952 a, b) montrent que le P.A. est dû à une augmentation initiale de la perméabilité de la membrane au Na<sup>+</sup> ( $P_{Na}$ ) responsable de la phase de dépolarisation et que l'augmentation tardive de la perméabilité de la membrane au K<sup>+</sup> ( $P_K$ ) est responsable de la phase de repolarisation. L'augmentation tardive de la P<sub>K</sub> correspond à un phénomène physique que les auteurs appellent la rectification membranaire normale ; elle correspond à une augmentation de P<sub>K</sub>. Cette augmentation de P<sub>K</sub> associée à une inactivation des mouvements de Na<sup>+</sup> peut expliquer que le P.M., lors de cette phase de repolarisation, tende vers la pile d'équilibre aux ions K<sup>+</sup>.

Pour les fibres musculaires il apparaît, en plus des phénomènes ioniques décrits ci-dessus pour la fibre nerveuse, une propriété qui leur est particulière : la rectification membranaire anormale qui traduit simplement une diminution de la  $P_K$  associée,

7.

pour les fibres musculaires cardiaques uniquement, à un maintien de la P<sub>Na</sub>. L'ensemble de ces phénomènes propres aux fibres musculaires rend compte de la grande durée de leur P.A. (HUTTER et NOBLE, 1960 ; WEIDMANN, 1955 ; CARMELIET, 1961 a ; HUTTER et NOBLE, 1961 ; KATZ, 1949 ; HODGKIN et HOROWICZ, 1959).

Afin de rendre compte des propriétés électriques de la membrane de la fibre excitable au repos et lors de l'activité, divers schémas électriques de cette membrane ont été proposés dérivant tous de celui donné par HODGKIN et HUXLEY (1952 c) concernant la fibre nerveuse (figure 1). Le schéma fait état de forces électromotrices dont les valeurs correspondent à celles des différentes piles de concentration ionique (au Na<sup>+</sup> :  $E_{Na}$ , au K<sup>+</sup> :  $E_{K}$  et aux autres ions :  $E_{F}$ ) chacune d'elle étant en série avec une résistance correspondante dont la valeur est inversement proportionnelle à la conductance de la membrane vis à vis de l'ion considéré. Le schéma comprend enfin un condensateur ( $C_{m}$ ) en parallèle avec les piles  $E_{Na}$ ,  $E_{K}$  et  $E_{F}$ .

En ce qui concerne le modèle électrique de la membrane de la fibre musculaire de crabe, EISENBERG en 1967 propose le schéma représenté figure 2 qui rend compte des propriétés électriques spécifiques de la membrane sarcolemmique et de celles de la membrane du système sarcotubulaire. Comme le montre la figure, ce schéma fait état de deux circuits R.C., l'un propre à la membrane sarcolemmique ( $R_m.C_m$ ), l'autre à la membrane du système tubulaire trans-

8.



Figure 1 : Schéma électrique de la membrane excitable. (D'après HODGKIN et HUXLEY, 1952 c).

E <sub>Na</sub>	: pil	e à l'ion Na <sup>†</sup>
Е <sub>К</sub>	: pil	e à l'ion K <sup>+</sup>
EF	: pil	e aux autres ions
c <sub>m</sub>	: cap	acité membranaire
R <sub>mNa</sub>	: rés	istance membranaire aux ions Na <sup>+</sup> (variable)
R <sub>mK</sub>	: rés	istance membranaire aux ions K <sup>+</sup> (variable)
R <sub>m</sub> F	: rés	istance membranaire aux autres ions (variable)
Re	: rés	istance du milieu externe
R <sub>i</sub>	: rés	istance du milieu interne.



Figure 2 : Schéma électrique de la membrane de la fibre musculaire. (D'après EISENBERG, 1967).

La fibre peut être considérée comme formée de deux éléments en parallèles : le sarcolemme et les sarcotubules.

Sarcolemme : R<sub>b</sub> : résistance externe

- $R_m$  : résistance sarcolemmique transversale
- $C_m$  : capacité de la membrane sarcolemmique

Sarcotubules : R : résistance tubulaire axiale

- R<sub>ce</sub> : résistance transversale de la membrane tubulaire
  - C<sub>e</sub> : capacité de la membrane sarco-tubulaire.

verse,  $(R_{ce}, C_{e})$ , en série avec une résistance représentant celle de la lumière des tubules  $(R_{e})$  ainsi que celle du matériel amorphe entourant les fibres  $(R_{b})$  et pénétrant profondément dans le système tubulaire.

2 - Propriétés électriques de la fibre musculaire de Crustacé au repos

2.1 - Potentiel de repos des fibres musculaires de Crustacés

Dès 1953, FATT et KATZ sur la fibre musculaire de crabe ainsi que SHAW (1955), puis, en 1958 FATT et GINSBORG, sur la fibre d'écrevisse montrent qu'il existe une relation linéaire entre l'amplitude du P.R. et le logarithme décimal de la concentration extracellulaire en ions  $K^+$  ( $[K^+]_e$ ), ce qui démontre que la membrane de ces fibres est perméable aux ions  $K^+$ .

L'analyse précise des résultats montre qu'ils diffèrent cependant selon ces auteurs puisque, pour FATT et KATZ (1953), la fibre ne se trouve pas en équilibre thermodynamique avec le milieu extracellulaire, la pente de la droite étant inférieure à 58 mV, tandis qu'à l'inverse pour SHAW (1955) il y aurait équilibre thermodynamique puisque la pente est de 58 mV, indiquant donc que la valeur du P.R. peut être calculée par l'équation de NERNST. Cette différence de résultats semble devoir être, du moins en partie, due au fait que la valeur du P.R. enregistrée dans les conditions normales varie selon ces auteurs. Pour SHAW, en effet le P.R. est de 58 mV, alors que pour FATT et KATZ, il est de 70 mV.

En ce qui concerne les mouvements du Na<sup>+</sup> dans le maintien du P.R., il faut signaler que les résultats conduisent à considérer qu'ils sont négligeables ou non suivant le matériel utilisé. En effet, pour GAINER et GRUNDFEST (1968) la membrane de la fibre de homard est peu perméable au Na<sup>+</sup> comme dans le cas d'ailleurs des fibres musculaires de grenouille (JENERICK, 1953 ; HODGKIN et HOROWICZ, 1959, 1960). Cette imperméabilité relative de la membrane au Na<sup>+</sup> est admise au niveau de la fibre musculaire de crabe par SHAW (1955) ainsi que par HAYS, LANG et GAINER (1968), tandis que pour MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 a), MOUNIER (1970) la perméabilité membranaire au Na<sup>+</sup> de la fibre musculaire de cette dernière espèce ne doit pas être négligée devant la perméabilité au K<sup>+</sup> et au Cl<sup>-</sup> (P<sub>C1</sub>) pour le calcul du P.R..

Pour ce qui est de la perméabilité de la membrane au Cl<sup>-</sup>, l'ensemble des résultats acquis indique que cette perméabilité est importante, mais révèle par contre, des divergences quant à la distribution du Cl<sup>-</sup>. En effet, pour SHAW (1955) et HAYS, LANG et GAINER (1968), le Cl<sup>-</sup> se distribuerait avec le K<sup>+</sup> passivement de part et d'autre de la membrane de la fibre musculaire de crabe selon un équilibre de DONNAN, comme dans le cas d'ailleurs des fibres musculaires de grenouille, ce qu'ont montré entre autres JENERICK (1953), HODGKIN et HOROWICZ (1959) et HARRIS (1963). Cependant les travaux de

12.

RICHARDS (1969) et de MOUNIER (1970) sur les fibres musculaires de crabe et ceux de GIRARDIER, REUBEN, BRANDT et GRUNDFEST (1963) sur les fibres d'écrevisse montrent que le Cl<sup>-</sup> ne se distribue pas passivement. En effet, ces derniers auteurs par l'étude de l'action de milieux dépourvus de Cl<sup>-</sup> ou de milieux acides montrent que chaque système membranaire présente une perméabilité ionique préférentielle, à savoir : une  $P_{K}$  pour la membrane sarcolemmique, une  $P_{C1}$  pour la membrane du système tubulaire transverse (S.S.T.). La discrimination entre ces perméabilités, mise en évidence par le blocage de l'une, leur a permis de montrer que la valeur des potentiels d'équilibre aux ions  $K^+$  et aux ions  $Cl^-$  n'est pas identique et que d'autre part le potentiel d'équilibre au Cl est de valeur plus faible que celle du P.R. ; dans de telles conditions, le Cl<sup>-</sup> ne peut être distribué passivement selon un équilibre de DONNAN avec le K<sup>+</sup>. D'ailleurs les travaux de HAGIWARA, GRUENER, HAYASHI, SAKATA et GRINNELL (1968) sur l'écrevisse, de MOUNIER et GUILBAULT (1970) sur le crabe montrent que la P<sub>C1</sub> de repos est supérieure à la P<sub>K</sub> comme le témoigne la pente plus forte de la courbe exprimant la variation du P.R. en fonction du logarithme décimal de  $\begin{bmatrix} C1 \end{bmatrix}_e$  que celle de la courbe exprimant la variation du P.R. en fonction du logarithme décimal de  $[K^+]_e$ . Quant à la conductance au Cl<sup>-</sup>, (G<sub>Cl</sub>) elle est supérieure à celle au  $K^+$  (G<sub>K</sub>) pour la fibre de grenouille (HUTTER et NOBLE, 1960 ; ADRIAN, 1960, 1961) ainsi que pour la fibre de crabe (MOUNIER, 1970), tandis qu'elle est égale à celle au  $K^+$  pour la fibre d'écrevisse, selon HENČEK, ZACHAR et ZACHAROVÁ (1962) et ZACHAR, ZACHAROVÁ et

13.

HENČEK (1964).

L'ensemble des résultats concernant le P.R. de la fibre musculaire de Crustacé montre qu'il correspond à un potentiel de diffusion dont la valeur peut être calculée d'après l'équation de HODGKIN et KATZ (1949) dérivée de celle de GOLDMANN (1943) qui fait donc intervenir les valeurs de perméabilités membranaires aux ions  $K^+$ , Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, ainsi que celles des concentrations intra- et extracellulaires de ces mêmes ions. Ce potentiel (E), dans ces conditions, est égal, pour une température de 20° C, à :

58 
$$\log_{10} \frac{P_{K} [K^{\dagger}]_{i} + P_{Na} [Na^{\dagger}]_{i} + P_{C1} [C1^{-}]_{e}}{P_{K} [K^{\dagger}]_{e} + P_{Na} [Na^{\dagger}]_{e} + P_{C1} [C1^{-}]_{i}}$$

2.2 - Constantes électriques de la fibre musculaire de Crustacé

D'après les travaux de FATT et KATZ (1953), de EISENBERG (1967), de SELVERSTON (1967) et de MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 b), la fibre musculaire de Crustacé peut être considérée physiquement comme un cable long : dans ces conditions, il est possible de calculer les valeurs de la résistance membranaire par unité de surface ( $R_m$ ) et de la capacité membranaire ( $C_m$ ) en connaissant la valeur de la constante d'espace ( $\lambda$ ) ainsi que la résistance des milieux intracellulaire ( $r_i$ ) et extracellulaire ( $r_e$ ) par unité de longueur.

La théorie du cable (COLE et CURTIS, 1936 ; 1938) permet

en effet, d'écrire que  $\lambda^2 = \frac{r_m}{r_e + r_i}$ ,  $r_m$  étant la résistance membranaire par unité de longueur. Connaissant  $r_m$ , la résistance spécifique ( $R_m$ ) peut être calculée : elle est égale à  $r_m \times 2 \pi$ .a (a étant le rayon de la fibre).

Quant à la capacité membranaire par unité de surface, elle peut être calculée si l'on connaît la valeur de  $R_m$  et  $\zeta_m$  qui est la constante de temps ( $\zeta_m = R_m \times C_m$ ). L'évaluation de  $\zeta_m$  peut être faite d'après la relation exprimant la variation du potentiel au cours du temps dans le cas d'un cable long cylindrique.  $\zeta_m$  sera égale au temps mis par la variation de potentiel produite par l'application du courant sous-liminaire rectangulaire à l'aide d'une microélectrode pour atteindre 84 p.100 de la valeur maximale pour une distance nulle entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode électrotonisante.

Les valeurs de  $R_m$  et de  $C_m$  ainsi déterminées pour les fibres de Crustacés sont très différentes de celles des fibres nerveuses et des fibres musculaires de Vertébrés. En effet, la  $R_m$  des fibres du couturier de grenouille est supérieure à 1000  $\Omega.cm^2$  (4000 pour FATT et KATZ, 1951 ; 2500 pour JENERICK, 1953 ; ou 2800 pour ADRIAN et FREYGANG, 1962) alors qu'elle est de l'ordre d'une centaine d'ohms.cm<sup>2</sup> pour la fibre musculaire de crabe (130 pour FATT et KATZ, 1953 ; 465 pour HAYS, LANG et GAINER, 1968 ; 110 pour MOUNIER, 1970). En ce qui concerne la valeur de  $C_m$ , à l'inverse, elle est faible pour les fibres musculaires de Vertébrés (1 à 6  $\mu$ F/cm<sup>2</sup> : KATZ, 1948 ; FATT et KATZ, 1951 ; FALK et FATT, 1964) et très élevée pour les fibres musculaires d'Invertébrés (de l'ordre de 40  $\mu$ F/cm<sup>2</sup> pour FATT et KATZ, 1953 , ATWOOD, 1963 , MOUNIER, 1970). Cette différence entre la valeur de C<sub>m</sub> de la fibre musculaire de Vertébré et celle de la fibre de Crustacé peut s'expliquer en considérant, en plus de la surface sarcolemmique proprement dite, la surface de la membrane du S.T.T. que l'on sait très abondante chez les fibres de Crustacés (PEACHEY et HUXLEY, 1964 ; ATWOOD, 1965 ; PEACHEY, 1965, 1967 ; SELVERSTON, 1967). En effet, en prenant en considération la surface du S.T.T., PEACHEY en 1965 ramène la valeur de C<sub>m</sub> de 50  $\mu$ F/cm<sup>2</sup> à 1  $\mu$ F/cm<sup>2</sup>, SELVERSTON en 1967 à 5,7 et EISENBERG la même année à 9.

#### 3 - Potentiel d'action des fibres musculaires de Crustacés

L'on sait depuis les travaux de FATT et KATZ (1953) que le P.A. présente une amplitude très faible comparée à celle des fibres musculaires de Vertébrés. Cette faible amplitude serait liée, selon ces mêmes auteurs, à la valeur faible de la  $R_m$  et importante de la  $C_m$  ou selon FAHRENBACH (1967) à la structure particulière de la fibre.

Une autre particularité du P.A. de cette fibre réside dans le fait que celui-ci est conduit le long de la fibre selon un processus électrotonique (WIERSMA, 1941; KATZ et KÜFFLER, 1946; FATT et KATZ, 1953). Ce processus de propagation du P.A. serait dû, selon ATWOOD, HOYLE et SMYTH (1965), à un état physiologique anormal bien qu'en 1953 FATT et KATZ suggérent que ce phénomène peut être normal puisque la fibre présente une innervation multiple dont l'étude détaillée est donnée entre autres par WIERSMA (1961) et LOCKWOOD (1968).

Le P.A. de cette fibre étant lié, comme pour l'ensemble des fibres excitables, à des variations de la conductance membranaire ionique, de nombreux auteurs ont étudié l'influence de modifications de la concentration des ions dans le milieu extracellulaire de façon à montrer le rôle de ceux-ci dans le déroulement de la phase d'activité électrique.

3.1 - Rôle des ions monovalents

3.1.1 - Rôle du Na<sup>+</sup>

Le Na<sup>+</sup> s'avère dès 1953 par les travaux de FATT et KATZ comme non indispensable à l'activation de la fibre musculaire de Crustacé puisque ces auteurs, puis FATT et GINSBORG (1968), WERMAN et GRUNDFEST (1961), KOKETSU (1965) montrent que son absence dans le milieu extracellulaire permet, ce qui semble paradoxal, le développement d'une activité électrique plus ample et plus durable. L'explication de ce phénomène serait, pour FATT et KATZ, l'apparition d'une pile aux ions choline<sup>+</sup> (la choline remplaçant le Na<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire) ou selon KOKETSU (1965) l'intervention éventuelle des ions Ca<sup>++</sup> ; pour ce dernier auteur, la phase de dépolarisation correspondrait à un courant entrant de Ca<sup>++</sup>, ce qui d'ailleurs s'est trouvé vérifié en 1966 par, entre autres, HAGIWARA et NAKAJIMA qui montrent que le Mn<sup>++</sup>, inhibiteur de la  $P_{Ca}$ , supprime le P.A..

3.1.2 - Rôle du Cl

Quant au Cl<sup>-</sup>, sa présence dans le milieu externe joue un rôle important lors de l'activité des fibres musculaires striées, mais néanmoins, une différence notable apparaît dans le comportement des fibres d'Invertébrés et de Vertébrés soumises à l'action de milieux dépourvus de Cl<sup>-</sup>. En effet, il est bien connu qu'au niveau des fibres de Vertébrés, le remplacement du Cl<sup>-</sup> par un anion non pénétrant tel le pryoglutamate, l'acetylglycinate modifie la phase de repolarisation du P.A.. Ainsi, selon FALK et LANDA (1960), HUTTER et PADSHA (1959), en absence de Cl<sup>-</sup>, la durée du P.A. de la fibre musculaire de grenouille est prolongée ainsi que celle de la fibre du tissu de Purkinje (CARMELIET, 1961 b).

Quant aux effets de ces milieux dépourvus de Cl<sup>-</sup>, ils se traduisent, au niveau des fibres de Crustacés, par une annulation du processus d'excitation.

Pour REUBEN, BRANDT, GARCIA et GRUNDFEST (1967) travaillant sur la fibre musculaire d'écrevisse, et pour GAINER et GRUNDFEST (1968) sur la fibre de homard, cette annulation du processus d'excitation en absence de Cl<sup>-</sup> résulterait de l'absence d'une entrée de  $Ca^{++}$  qui serait d'ailleurs dans les conditions normales sous la dépendance de la  $[C1^-]_e$ .

Ainsi le gradient de concentration pour le Cl<sup>-</sup> intervient de façon indéniable lors de la phase de dépolarisation du P.A. des fibres musculaires de Crustacés alors qu'il n'intervient que lors de la phase de repolarisation du P.A. des fibres de Vertébrés.

## 3.1.3 - Rôle du K<sup>+</sup>

Quant au K<sup>+</sup>, son rôle, comme nous l'avons déjà vu, est important pour le maintien du P.R. tant au niveau des fibres musculaires d'Invertébrés qu'au niveau de celles de Vertébrés, puisque son absence se traduit par une légère hyperpolarisation de la membrane de la fibre de Crustacé (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1969 a) ou de la fibre de Vertébré (HODGKIN et HOROWICZ, 1959) alors qu'au contraire un excès de K<sup>+</sup> induit une dépolarisation que ces auteurs attribuent à une variation du gradient de concentration et à un changement de la P<sub>K</sub>.

En ce qui concerne l'activité électrique, l'influence de la variation de  $P_K$  est corroborée par l'étude de l'action du T.E.A., bien connu maintenant comme agent inhibiteur de cette  $P_K$ ; en effet, FATT et KATZ (1953) attribuent l'allongement du P.A. de la fibre musculaire de crabe produit par l'action du T.E.A. à une diminution de  $P_K$  bien que, la même année, BURKE, KATZ et MACHNE considèrent que le T.E.A. agit au niveau de la fibre nerveuse de crabe par un maintien de la  $P_{Na}$ . Il convient toutefois de signaler que dans les conditions expérimentales de FATT et KATZ, le T.E.A. agit à très forte concentration puisqu'il remplace le Na<sup>+</sup>.

Ce n'est qu'en 1958, que FATT et GINSBORG utilisent le T.E.A. comme inhibiteur de perméabilité puisqu'ils le font agir à faible concentration. Dans ces conditions cet inhibiteur se montre capable d'allonger la durée du P.A. de la fibre musculaire d'écrevisse. D'ailleurs, quelques années auparavant, HAGIWARA et WATANABE (1955) confirment le rôle inhibiteur de la  $P_K$  par le T.E.A. au niveau de la fibre de grenouille puis, en 1967, CORABOEUF et VASSORT sur le tissu myocardique. L'hypothèse de la diminution de la  $P_K$  par le T.E.A. se trouve étayée par la prolongation de la rectification anormale mise en évidence notamment par l'étude des courants membranaires en "voltage-clamp" (ILDEFONSE, PAGER et ROUGIER, 1969) sur les fibres musculaires squelettiques.

3.2 - Rôle des ions divalents

Si, comme nous l'avons vu, parmi les ions monovalents présents habituellement dans la solution physiologique qui agissent sur le P.A., il faut citer le Cl<sup>-</sup> et le K<sup>+</sup>, il convient d'indiquer, comme nous allons le voir, que parmi les ions divalents, le  $Mg^{++}$ ne semble pas avoir d'influence notable et que par contre, comme nous venons précédemment de l'entrevoir, le Ca<sup>++</sup> joue un rôle important.

20.

Le Mg<sup>++</sup> ne paraît pas en effet intervenir lors de l'activité électrique puisque FATT et GINSBORG en 1958 montrent que l'amplitude du P.A. est indépendante de la concentration extracellulaire en Mg<sup>++</sup> et que, de plus, en 1961, CALDWELL et WALSTER montrent qu'il ne participe pas à l'initiation de la contraction.

3.2.2 - Rôle du Ca<sup>++</sup>

Quant au Ca<sup>++</sup>, son action est très importante sur l'activité électrique. En effet, les travaux de FATT et GINSBORG en 1958 montrent que l'amplitude du P.A. de la fibre musculaire d'écrevisse est sous la dépendance de la concentration externe du Ca<sup>++</sup> et que ce P.A. est aboli quand la fibre est soumise à un milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup>. Ces résultats sont confirmés en 1964 par HAGIWARA et NAKA sur les fibres de barnacle et même sur les fibres lisses de Mammifères par BULBRING et TOMITA en 1968. Le fait que les fibres striées d'Invertébrés et lisses de Mammifères se comportent de façon similaire sous l'influence de la concentration du Ca<sup>++</sup> extracellulaire ne paraît pas invraisemblable puisque les membranes de ces fibres au repos présentent à l'inverse des fibres de Vertébrés des perméabilités ioniques peu différentes : la P<sub>Cl</sub> est plus importante que la  $P_{K}$ . Ce n'est cependant qu'en 1961 que WERMAN et GRUNDFEST sur la fibre de homard et qu'en 1964, que HAGIWARA, CHICHIBU et NAKA sur la fibre de barnacle, montrent que le Ca<sup>++</sup>

intervient directement sur la phase de dépolarisation du P.A. puisqu'ils mettent en évidence un courant de Ca<sup>++</sup> dont l'importance est sous la dépendance du gradient de concentration calcique. De plus, en 1962, sur la fibre d'écrevisse, ORKAND montre le rôle important de la  $P_{Ca}$  lors de la phase de dépolarisation du P.A. puisqu'il démontre que le Mn<sup>++</sup> bloque le courant de Ca<sup>++</sup>. En 1966, HAGIWARA et NAKAJIMA, en 1967, HAGIWARA et TAKAHASHI sur la fibre de barnacle confirment le rôle du  $Mn^{++}$  comme inhibiteur de la  $P_{Ca}$ et l'importance prépondérante du courant calcique entrant responsable de la phase de dépolarisation. D'ailleurs ce rôle inhibiteur du Mn<sup>++</sup> est retrouvé en 1967 sur la fibre cardiaque par CORABOEUF et VASSORT. Enfin, signalons que récemment, la similitude du comportement des fibres musculaires striées d'Invertébrés et des fibres lisses de Mammifères apparaît plus nettement puisque MIRONNEAU et LENFANT (1971) montrent par l'étude de la fibre lisse d'utérus de ratte en "voltage-clamp" que le courant entrant responsable de la phase de dépolarisation du P.A. présente une composante calcique très importante.

Le rôle des ions Ca<sup>++</sup> dans le déroulement des processus d'excitation n'est pas cependant exclusif puisque FATT et GINSBORG en 1958 montrent sur la fibre musculaire d'écrevisse que les ions Sr<sup>++</sup> remplaçant les ions Ca<sup>++</sup> permettent l'obtention d'un P.A. plus ample et plus durable et, d'ailleurs, qu'une relation linéaire existe entre son amplitude et le logarithme décimal de la concentration extracellulaire de Sr<sup>++</sup>. Ce résultat se trouve confirmé sur la fibre musculaire de barnacle par HAGIWARA et TAKAHASHI en 1967. D'ailleurs, ce rôle du Sr<sup>++</sup> dans les processus d'excitation est connu depuis 1951 puisque GARB, cette même année, observe que les ions Sr<sup>++</sup> exercent sur le muscle de papillaire de chat les mêmes effets que les ions Ca<sup>++</sup> quand ils sont ajoutés au liquide physiologique, mais que, lorsque la  $[Ca^{++}]_e$  est considérablement réduite, l'addition de Sr<sup>++</sup> augmente la durée de la systole électrique. Ces effets sont retrouvés également par CORABOEUF, GUILBAULT, BRETON et DUMONT (1961) sur le ventricule isolé de Mammifère.

#### 3.3 - Rôle de l'hypertonie

L'étude de l'action des ions sur le P.M. des fibres implique souvent celle de l'action de la pression osmotique ( $\pi$ ) car les milieux de concentrations variées en ions entraînent, dans certains cas, une hypertonie.

L'hypertonie joue en effet un rôle propre important. Elle se traduit au niveau des muscles striés squelettiques par une diminution de la valeur du P.R. (GORDON et GODT, 1970) et par un racourcissement de la durée du P.A. imputable à la disparition des propriétés membranaires du S.T.T..

En effet, DYDYNSKA et WILKIE (1963) sur la fibre musculaire de grenouille, GIRARDIER, DREIFUSS, HAENNI et PETROVICI (1964), GIRARDIER (1965) sur le tissu myocardique de Mammifères, MATHIEU (1971) sur la fibre musculaire de crabe, montrent que l'hypertonie entraîne un gonflement du S.T.T. consécutif à une sortie d'eau.

<u>4 - Rapport entre la structure et les propriétés élec-</u> triques des fibres d'Invertébrés

De nombreux travaux de microscopie électronique effectués sur le muscle strié tendent à rendre compte des différences de comportement entre les fibres d'Invertébrés et celles de Vertébrés soumises ou non à l'action de milieux anormaux. L'analyse de la structure de ces fibres peut en effet expliquer les propriétés électriques passives différentes. Le S.T.T. très ramifié des fibres d'Invertébrés plus important explique déjà la valeur plus forte de C<sub>m</sub> et la valeur moindre de R<sub>m</sub> comme le montrent les travaux de PEACHEY (1966, 1967), FAHRENBACH (1967), SELVERSTON (1967), EISENBERG (1967), GAYTON et HINCKE (1968), ROSENBLUTH (1969) et MATHIEU (1971).

L'analyse de la structure du S.T.T. au niveau de la fibre musculaire de crabe révèle que les replis du sarcolemme sont très importants et qu'il existe deux systèmes tubulaires : le  $T_{AI}$  au niveau de la jonction des bandes A et I et le  $T_Z$  au niveau des bandes Z. Seules les invaginations du  $T_{AI}$  sont étroitement liées au réticulum sarcoplasmique formant une structure en diade. D'autre part, le  $T_{AI}$  a une morphologie identique à celle du  $T_Z$  des fibres squelettiques. Ce système, selon PEACHEY (1967), jouerait un rôle primordial dans le couplage excitation-contraction. Quant au système  $T_Z$ , très développé et ramifié, il ne traverse pas la fibre uniquement transversalement au niveau de la bande Z, mais bifurque à angle droit, s'étendant ainsi longitudinalement, parallèlement aux myofibrilles (MELVIN et HESS, 1967 ; PEACHEY, 1967 ; MATHIEU, 1971). Le rôle de ce système selon PEACHEY ne serait qu'un rôle de soutien. Toutefois, cette hypothèse, fondée uniquement sur des études ultrastructurales de la fibre semblerait devoir être quelque peu révisée à la lumière des travaux récents.

L'ensemble de ces travaux peut permettre d'émettre l'hypothèse que le système T<sub>Z</sub> de la fibre musculaire de crabe aurait un rôle dans les processus d'excitation d'autant plus que le P.A. n'est pas conduit au niveau de la membrane sarcolemmique comme l'ont montré FATT et KATZ en 1953, et que de plus, l'hypertonie provoquée par l'addition de Cl<sup>-</sup> au liquide physiologique n'annule pas, à l'inverse des fibres squelettiques, les propriétés rectificatrices (HAUDECOEUR, FALEMPIN, BRULE et GUILBAULT, 1971 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1971) ; ces propriétés rectificatrices siègeant au niveau du S.T.T. concernent essentiellement les mouvements du Cl<sup>-</sup> (MOUNIER, 1970).

## III - TECHNIQUES

- A PROTOCOLE
- B ANIMAL D'EXPERIENCE PREPARATION
- C SOLUTIONS EMPLOYEES
- D TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

#### A - PROTOCOLE

Le présent mémoire porte sur l'étude électrophysiologique de la fibre musculaire de crabe. Dans ce but, sont enregistrés le potentiel de repos (P.R.), le potentiel d'action (P.A.) et les variations éventuelles de l'impédance membranaire ( $Z_m$ ). Ces trois paramètres, pouvant être déterminés par la technique classique des microélectrodes, nous ont permis d'envisager la contribution des différentes conductances ioniques membranaires lors de l'activité électrique de la fibre. Pour attribuer à chaque mouvement d'ions sa part prise dans le maintien du P.R., ou dans la génèse et la propagation du P.A., deux possibilités s'offraient à nous :

- soit de mesurer les variations de décours du P.A. en modifiant la conductance de la membrane à un ion donné par le changement de sa concentration dans le milieu externe, ou par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de perméabilité membranaire

- soit de mesurer le courant ionique par la technique du potentiel imposé (HODGKIN et HUXLEY, 1952 a, b).

Les problèmes rencontrés lors de l'application à notre préparation de la technique mentionnée au deuxième point ci-dessus, faisant intervenir un cloisonnement artificiel de la fibre par l'emploi de deux ponts de saccharose, (le principe sera décrit ultérieurement), nous ont inclinés à choisir la première méthode d'investigation.

#### B - ANIMAL D'EXPERIENCE - PREPARATION

#### 1 - Animal d'expérience

La fibre musculaire utilisée est issue de la patte locomotrice du crabe enragé (Carcinus maenas). Cet invertébré pélagique fait partie de la classe des Crustacés (sous-classe des Malacostracés, ordre des Décapodes, sous-ordre des Brachyoures). Les animaux d'expérience proviennent des côtes de la Mer du Nord (Institut de Biologie Maritime - WIMEREUX 62). Le choix de cet animal a été guidé par le fait que les fibres musculaires de ses pattes sont de grande taille, et, de plus, qu'elles présentent, d'un point de vue ultrastructural, deux systèmes tubulaires transverses permettant, semblet-il, de mieux saisir le mécanisme du couplage excitation-contraction.

Les crabes, remplacés chaque semaine, sont gardés en vie dans des bacs contenant de l'eau de mer maintenue à une température de 10 à 12° C. Celle-ci est régulièrement oxygénée et régénérée en circuit fermé par passage sur un filtre constitué en couches successives de laine de verre, de charbon de bois activé, de sable fin et de graviers.

#### 2 - Préparation

Selon le cas, une des fibres musculaires du méropodite de l'une des pattes locomotrices (figure 3) que l'on prélève par auto-


Figure 3 : Péreiopode p<sub>2</sub> de Carcinus maenas.

Schéma montrant la musculature de l'une des pattes locomotrices après section d'une partie de la carapace. Les fibres musculaires sont disposées parallèlement et inserrées sur la carapace d'une part et sur un axostyle d'autre part ; celles que nous avons employées proviennent du méropodite. nomie chez l'animal, est utilisée :

- soit maintenue en place

- soit isolée.

L'accès aux fibres musculaires est réalisé en pratiquant la section de la carapace selon ses deux arêtes. Ceci permet donc l'obtention de deux demi-segments qui sont immergés immédiatement dans le solution physiologique de survie. L'examen sous loupe binoculaire permet d'observer, après dégagement éventuel des fibres lésées et de l'induvie, la disposition de la musculature de la préparation (figure 3). Les fibres, disposées parallèlement en deux faisceaux, présentent un diamètre de 50 à 350  $\mu$  et une longueur variant entre 3 et 12 mm. Les deux faisceaux ainsi préparés sont conservés en place pour l'enregistrement du P.R. et du P.A. de la fibre par microélectrode, mais ils ne représentent qu'une étape pour l'obtenion de la fibre isolée rendue nécessaire pour son étude électrophysiologique par la technique du pont de saccharose. Dans ce cas, on procède à l'élimination de toutes les fibres entourant la fibre choisie inserrée, par ses extrémités, à une partie de l'axostyle et à un fragment de la carapace (figure 4). Toutes ces dissections sont effectuées sous contrôle binoculaire dans la solution de survie ; la préparation est utilisée au maximum 15 mn après son prélèvement. Il convient toutefois de signaler qu'une fibre isolée maintenue pendant 24 H à 4° C conserve après ce temps ses propriétés électriques et mécaniques.

D'autre part, les fibres sont maintenues, au cours de



Figure 4 : Aspect morphologique de la fibre après son isolement.

- F : fibre
- c : fragment de carapace
- a : fragment d'axostyle
- i : trace des insertions des fibres éliminées
- e : épingles de fixation.

l'expérience, à une température de 20° C grâce à la solution d'imbibition qui est constamment renouvelée et qui, de plus, en raison de son débit, (50 cm<sup>3</sup>/mn) assure un maintien rigoureux des concentrations ioniques extracellulaires.

C - SOLUTIONS

# 1 - Solution normale

La solution physiologique de survie considérée comme normale (milieu de référence) est celle proposée par FATT et KATZ en 1953.

Sa composition en mEq/l est la suivante :

- Chlore	: [C1 <sup>-</sup> ]	e = 5 <b>94</b>	
- Potass	ium : $[K^+]_{e}$	= 12,9	
- Sodium	n : [Na <sup>+</sup>	e = 513	
- Magnés	ium : [Mg <sup>+</sup>	f] <sub>e</sub> = 23,6	
- Calciu	ım : [Ca <sup>+</sup>	f] <sub>e</sub> = 11,8	
- Bicarb	oonate : [CO <sub>3</sub>	$\left[ -\frac{1}{2} \right]_{e} = 2,6$	
- Eau dé	sionisé <b>e :</b> (rés	istivité : 8 à	10 MΩ.cm <sup>-1</sup> ). q.s.p.1].
Son pH e	est de 7,85 et s	a pression osmo	tique ( $\pi$ ) est celle
d'une solution cor	tenant 1158 mil	liosmoles/l.	

2 - Solutions anormales

Pour déterminer les différentes conductances ioniques membranaires de la fibre impliquées lors de son activité électrique, plusieurs solutions anormales dérivant du milieu de référence ont été réalisées : soit d'une part, en modifiant la concentration de l'un ou de plusieurs des ions entrant dans sa composition, soit d'autre part en ajoutant des inhibiteurs spécifiques de perméabilités membranaires (en faible concentration).

Les ions de remplacement dans les solutions appauvries sont la choline pour les cations et le propionate pour les anions (Cl<sup>-</sup>). Ce choix a été déterminé par le fait que ces deux ions sont considérés comme non pénétrants (GAINER et GRUNDFEST, 1968 ; HODGKIN et HOROWICZ 1959).

De même, pour les milieux enrichis en ions ont été employés le chlorhydrate de choline pour un apport d'ions Cl<sup>-</sup>, le propionate de sodium pour les ions Na<sup>+</sup> et enfin le propionate de calcium pour les ions Ca<sup>++</sup>.

Comme l'indique l'examen des tableaux I et II donnant la composition des différents milieux que nous avons été amenés à employer, il s'avère que les milieux enrichis en ions sont rendus, de ce fait, hypertoniques. En conséquence, nous avons été conduits à étudier l'action du milieu de référence rendu hypertonique par addition de saccharose, de façon à pouvoir faire la discrimination entre les effets éventuels imputables à la pression osmotique et ceux des différents milieux envisagés.

Le blocage de la perméabilité membranaire au K<sup>+</sup> est obtenu

MILIEUX	[Na <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[C1 <sup>-</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[Ca <sup>++</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[Mg <sup>++</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[CO <sub>3</sub> H] mEq/1	Autres substances	π milli- osmoles
Milieu de référence	513	5 <b>9</b> 4	12,9	11,8	23,6	2,6	-	1158
$\left[Na^{\dagger}\right]_{e} = 0$	0	594	12,9	11,8	23,6	2,6	Choline <sup>+</sup> (513 mEq/l)	1158
$\left[\kappa^{+}\right]_{e} = 0$	513	581	0	11,8	23,6	2,6	-	1132
Milieu - T.E.A.	513	614	12,9	11,8	23,6	2,6	T.E.A. <sup>+</sup> (20 mEq/1)	1198
[c1 <sup>-</sup> ] <sub>e</sub> = 0,13 X	513	81	12,9	11,8	23,6	2,6	Propionate (513 mEq/1)	1158
[C1 <sup>-</sup> ] <sub>e</sub> = 2 X	513	1107	12,9	11,8	23,6	2,6	Choline <sup>+</sup> (513 mEq/l)	2184
Milieu hypertonique	513	594	12,9	11,8	23,6	2,6	Saccharose (1026 mM/1)	2184
[1 <sup>-</sup> ] <sub>e</sub> = 0,13 X, T.E.A.	513	101	12,9	11,8	23,6	2,6	Propionate (513 mEq/1) T.E.A. (20 mEq/1)	1198
[NaC1] = 2 X	1026	1107	12,9	11,8	23,6	2,6	-	2184
$\left[Ca^{++}\right]_{e} = 0$	513	570	12,9	0	23,6	2,6	-	1122
$\left[Ca^{++}\right]_e = 4 X$	513	594	12,9	47,2	23,6	2,6	Propionate (70,8 mEq/1)	1264
Milieu - Mn <sup>++</sup>	513	614	12,9	11,8	23,6	2,6	Mn <sup>++</sup> (10 mEq/1)	1188

<u>Tableau I</u> : Composition quantitative ionique des milieux utilisés pour déterminer le rôle des ions dans l'activité électrophysiologique de la fibre musculaire de crabe.

.

MILIEUX	Na <sup>‡</sup> e mEq/1	[c1] <sub>e</sub> mEq/1	[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[Ca <sup>++</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	[Mg <sup>++</sup> ] <sub>e</sub> mEq/1	CO <sub>3</sub> H] mEq/1	Autres substances	π milli- osmoles
Milieu de référence	513	· 594 ·	12,9	11,8	23,6	2,6	-	1158
[Ca <sup>++</sup> ] <sub>e</sub> = 0 , T.E.A.	513	590	12,9	0	23,6	2,6	T.E.A. <sup>+</sup> (20 mEq/1)	1162
$[Ca^{++}]_e = 4 \times , T.E.A.$	513	614	12,9	47,2	23,6	2,6	Propionate (70,8 mEg/1) T.E.A. (20 mEq/1)	1304
Milieu - T.E.AMn <sup>++</sup>	513	634	12,9	11,8	23,6	2,6	T.E.A. <sup>+</sup> (20 mEq/1) Mn <sup>++</sup> (10 mEq/1)	1228
Milieu - T.E.AMn <sup>++</sup> , [ <sup>Ca<sup>++</sup>]</sup> e = 0	513	610	12,9	0	23,6	2,6	T.E.A. <sup>+</sup> (20 mEq/1) Mn <sup>++</sup> (10 mEq/1)	1192
Milieu - T.E.AMn <sup>++</sup> , [Na <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> = 0	0	634	12,9	11	23,6	2,6	T.E.A. <sup>+</sup> (20 mEq/1) Mn <sup>++</sup> (20 mEq/1) Choline <sup>+</sup> (513 mEq/1)	1228
$\begin{bmatrix} C1^{-} \end{bmatrix}_{e} = 1 X,$ $\begin{bmatrix} Ca^{++} \end{bmatrix}_{e} = 1 X$	0	536,6	0	11,8	0	2,6	Saccharose (96,6 mM/1) Choline (513 mEq/1)	1160
$[C1^{-}]_{e} = 2 X,$ $[Ca^{++}]_{e} = 1 X$	0	1050	0	11,8	0	2,6	Choline <sup>+</sup> (1026 mEq/l	) 2090
$\begin{bmatrix} NaC1 \end{bmatrix} = 2 X,$ $\begin{bmatrix} Ca^{++} \end{bmatrix}_{e}^{e} = 6 X$	1026	1107	12,9	23,6	23,6	2,6	Propionate (23,6 mEq/1	2219
$\begin{bmatrix} NaC1 \\ e = 2 X \\ Ca^{++} \end{bmatrix}_{e}^{e} = 6 X$	1026	1107	12,9	70,8	23,6	2,6	Propionate (129,8 mEq/	2373

Tableau II : Composition des milieux utilisés pour déterminer les conductances ioniques responsables de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe.

par action du chlorure de tétraéthylammonium : T.E.A., (considéré comme inhibiteur spécifique de la  $P_K$  : HAGIWARA et WATANABE, 1955), additionné au milieu de référence à raison de 10,20 ou 30 mM/l, celui de la perméabilité au Ca<sup>++</sup>, par action du chlorure de manganèse (MnCl<sub>2</sub>), ajouté au milieu de référence à la concentration de 10 mM/l. Le Mn<sup>++</sup> est connu comme inhibiteur de la perméabilité membranaire aux ions divalents et en particulier de la  $P_{Ca}$  (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 ; HAGIWARA et TAKAHASHI, 1967).

Dans certains cas, un milieu, dont la concentration ionique est proche de celle du milieu intracellulaire de la fibre, a été utilisé, de façon à annuler tous les gradients ioniques, et par conséquent de provoquer le plus rapidement possible une disparition du P.R.. Ce milieu, dont la composition a été donnée par PROSSER et BROWN (1962) contient en mEq/1,  $[C1^-]_e = 53$ ;  $[K^+]_e = 112$ ;  $[Na^+]_e = 54$ ;  $[Ca^{++}]_e = 5,2$  et  $[Mg^{++}]_e = 16,9$ .

#### D - TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

L'enregistrement des divers phénomènes permettant l'étude des propriétés électriques de la membrane de la fibre musculaire a été réalisé par l'intermédiaire d'un oscilloscope TEKTRONIX (564 S) ; les phénomènes, mémorisés sur l'écran, sont photographiés à l'aide d'un appareil photographique (TEKTRONIX, C 12). L'impédance d'entrée des amplificateurs verticaux (type 3 A3) étant de 1 M $\Omega$ , faible devant l'impédance du montage à laquelle s'ajoute la résistance interne

de la pile biologique, nécessite un abaisseur d'impédance (CF) (CHEVAL, 1966) dont les caractéristiques sont les suivantes : impédance d'entrée pratiquement infinie (1000 M $\Omega$ ) ; impédance de sortie faible (  $\leq$  9 k $\Omega$ ) ; bande passante de 20 kHz avec 10 M $\Omega$  ; gain de 0,88.

### 1 - Technique des microélectrodes

1.1 - Montage utilisé pour l'enregistrement du potentiel de membrane et des potentiels électrotoniques (figure 5)

La préparation placée dans une cuve de plexiglas de volume réduit est imbibée par la solution étudiée qui est renouvelée constamment à raison de 50 cm<sup>3</sup>/mn.

#### 1.1.1 - Enregistrement

Le potentiel de membrane est mesuré grâce à une microélectrode ( $E_e$ ) fichée à l'intérieur de la fibre par rapport à une électrode indifférente ( $E_i$ ) placée à l'extérieur, dans le bain. Ces électrodes sont rendues impolarisables par utilisation de piles au calomel (EI) (Hg - HgCl - KCL 3M)

Les microélectrodes utilisées sont réalisées selon les données de ALEXANDER et NASTUK (1953). Après leur remplissage par du KCL 3M, seules sont conservées celles qui présentent une impé-





- F : fibre musculaire baignant dans un milieu normal ou anormal
- A droite, circuit de stimulation :
  - E<sub>c</sub> : microélectrode de stimulation
    - R : résistance de valeur élevée (10 M $\Omega$ )
    - r : résistance (5 k $_{\Omega}$ ) permettant de mesurer l'intensité du courant de stimulation
    - I : amplificateur vertical de l'une des voies de l'oscilloscope
    - S : stimulateur délivrant des signaux rectangulaires supraliminaires
    - G : générateur de courant

**∧**: alternatif

**└**: constant

A gauche, circuit d'enregistrement :

 $E_{\rho}$  : microélectrode d'enregistrement

- B : blindage de la microélectrode d'enregistrement
- EI : électrodes impolarisables (piles au calomel)
- CF : abaisseur d'impédance
- V : amplificateur vertical de l'autre voie de l'oscilloscope
- T : boite de tarage
- E; : électrode indifférente.

38,

dance comprise entre 5 et 10 M $\Omega$ , (ce qui correspond à un diamètre à la pointe de 1 à 0,5  $\mu$ ) et un potentiel de pointe inférieur à 4 mV. Les microélectrodes ainsi choisies s'avèrent être du type le mieux adapté pour l'enregistrement durable et satisfaisant du P.M., comme l'ont d'ailleurs suggéré GESTELAND et Coll. en 1959.

La mise en place des microélectrodes est assurée par un micromanipulateur mécanique (PRIOR).

Le blindage (B) de l'électrode d'enregistrement est relié à la sortie du changeur d'impédance, ce qui évite les parasites notamment le passage direct par capacité parasite du courant de stimulation de l'électrode de stimulation à l'électrode d'enregistrement.

#### 1.1.2 - Stimulation

En ce qui concerne le circuit de stimulation, le schéma synotique (figure 5) montre les différents composants électroniques.

La modification de la polarité de la membrane de la fibre musculaire est portée par une microélectrode  $(E_s)$  de même type que celle destinée à l'enregistrement.

Le stimulateur S (TEKTRONIX, 162 + 163 + 161, complété par un relai au mercure permettant d'isoler l'impulsion de la masse et d'en augmenter notablement la tension) peut délivrer des chocs électriques de forme rectangulaire, le courant étant rendu constant par l'impédance propre de la microélectrode et l'interposition dans le circuit d'une résistance de valeur élevée ( $R > 5 M_{\Omega}$ ).

Un générateur (G) en série permet de modifier le P.R. par un courant dépolarisant ou hyperpolarisant constant ( $\neg$ ). Il permet en outre de délivrer un courant sinusoïdal sous-liminaire d'amplitude constante ( $\bigwedge$ ) dans le but de mesurer selon la méthode de HODGKIN et RUHSTON (1946) l'impédance membranaire ( $Z_m$ ) de la fibre musculaire.

La résistance de faible valeur (r = 5 k $\Omega$ ) rend possible, par l'intermédiaire du deuxième amplificateur vertical (I) de l'oscilloscope, la mesure du courant traversant la membrane au niveau de l'électrode E<sub>s</sub>.

1.2 - Montage utilisé pour étudier les effets sur leP.R. d'un court-circuit membranaire local (figure 6)

Il nous importait de savoir si un shunt local de la membrane entraînait une distribution selon la loi électrotonique des lignes du courant de court-circuit ainsi produites. Le montage comporte donc de ce fait un circuit d'enregistrement et un circuit shunt.

Le circuit d'enregistrement du P.M. est rigoureusement le même que celui décrit précédemment (§ D, 1.1).

Le court-circuit local de la pile biologique a été réalisé par une électrode E<sub>a</sub> qui est, en fait, une microélectrode classique mais argentée extérieurement selon le procédé de CAILLAT,



Figure 6 : Montage utilisé pour l'étude de l'effet sur le P.R. d'un shunt membranaire local.

- F : fibre baignant dans la solution physiologique de survie
- E<sub>a</sub> : électrode argentée extérieurement constituant le shunt membranaire local
- $E_e$  : microélectrode d'enregistrement
- EI : électrodes impolarisables (piles au calomel)
- CF : abaisseur d'impédance
  - V : amplificateur vertical de l'oscilloscope
  - T : boite de tarage
- E<sub>i</sub> : électrode indifférente
  - d : distance interélectrode.

CONREUR, et LALLEMANT (1948). Cette microélectrode présente un diamètre à la pointe de 1 à 2  $\mu$  et une résistance moyenne de 300 k $\Omega$ .

2 - Technique du pont de saccharose (figure 7)

Cette technique permet la mesure effective des différents courants ioniques membranaires si elle est réalisée avec un double pont de saccharose. Un seul pont ne rend possible que l'enregistrement du P.M..

La cuve conçue pour une fibre isolée est réalisée de telle façon que deux cloisons, distantes de 1 mm, délimitent trois compartiments distincts (I, II, III).

La fibre, isolée de la façon décrite précédemment (§ B, 2) est placée transversalement aux plans des deux cloisons dans chacune des saignées correspondantes. L'étanchéité fibre-cloison est assurée par de la graisse minérale, celle-ci s'étant révélée comme non toxique.

Le compartiment central (II) sert à isoler électriquement la fibre en deux parties. Pour ce faire, on y fait passer à raison de 40 cm<sup>3</sup>/mm une solution molaire de saccharose (S) dont la résistivité est comprise entre 1 et 3 m $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>.

Le compartiment I est le compartiment test, dans lequel coule avec un débit de 10 cm $^3$ /mn le milieu normal (R).

Le troisième compartiment (III) donnant le potentiel de



<u>Figure 7</u> : Montage utilisé pour l'étude du potentiel de repos de la fibre musculaire de crabe par la technique du pont de saccharose.

- F : fibre musculaire isolée et cloisonnée en trois compartiments : I, II, III
- I : compartiment témoin contenant la solution physiologique normale(R).
- II : compartiment contenant la solution molaire de saccharose (S).
- III : compartiment contenant la solution dont la concentration ionique est proche de celle du milieu interne de la fibre (I).
- EI : électrodes impolarisables (piles au calomel).
- CF : abaisseur d'impédance
  - V : amplificateur vertical de l'oscilloscope
  - T : boite de tarage.

référence, contient une solution (I) renouvelée constamment (débit :  $20 \text{ cm}^3/\text{mm}$ ) dont la composition a été donnée au paragraphe C, 2. Ce milieu est supposé annuler les gradients membranaires ioniques et, de ce fait, le potentiel existant de part et d'autre de la membrane cellulaire.

La mesure du P.R. entre les compartiments I et III est faite classiquement sur oscilloscope (V) par l'intermédiaire de l'abaisseur d'impédance (CF). Le potentiel est capté au niveau des milieux R et I par l'intermédiaire des électrodes impolarisables au calomel (EI), le contact étant assuré grâce à des ponts de KCl 3M gélosé.

# IV - RESULTATS

## A - Potentiel de repos

 1 - Effets d'un shunt membranaire local sur l'amplitude du potentiel de repos mesuré par microélectrode

2 - Mesure du potentiel de repos par la méthode du pont de saccharose

3 - Résumé et conclusion

Rappelons que le potentiel de repos (P.R.) de la fibre musculaire de crabe est, comme l'ont montré MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 a), MOUNIER (1970), un potentiel de diffusion où interviennent pour une plus grande part les mouvements à travers la membrane des ions  $C1^{-}$  et  $K^{+}$  et, pour une moindre part, ceux des ions Na<sup>+</sup>. Le P.R. mesuré par microélectrode a une valeur moyenne portant sur 184 fibres de 68,2 mV ( $\sigma$  = 4,8 mV), valeur conforme à celle donnée par FATT et KATZ en 1953. Les travaux de MOUNIER (1970) déterminent que le P.R. est dû à une participation de la conductance membranaire au Cl égale à 56 p.100 de la conductance globale et à une conductance membranaire aux cations ( $K^+$  et Na<sup>+</sup>) égale à 44 p.100 seulement. De plus, le P.R. d'une même fibre, mesuré par microélectrode, présente des variations d'amplitude, allant jusqu'à 4 mV de part et d'autre de la moyenne, selon l'endroit et le niveau d'implantation de l'électrode ; ce résultat peut rendre compte, en partie du moins, de l'importance relative de l'écart-type ( $\sigma$ ) caractérisant la moyenne obtenue. En effet, à l'appui de cette hypothèse, les travaux de MOUNIER et GUILBAULT (1970) ont permis de suggérer que la membrane sarcolemmique serait préférentiellement perméable aux ions  $K^{\dagger}$ , celle du système tubulaire transverse aux ions Cl<sup>-</sup>. D'autre part, la valeur de la pile de concentration aux ions  $K^{\dagger}$  serait de 70 à 75 mV au moins, celle aux ions  $Cl^{-}$  de 56 à 60 mV seulement. L'ensemble de ces résultats indique que la fibre, au repos, pourrait être parcourue par des courants locaux.

Compte-tenu de cette dernière hypothèse, il importe d'étudier l'influence d'un court-circuit membranaire local sur le P.R., la propagation des courants le long de la fibre, et de vérifier que la microélectrode classique ne provoque pas de shunt local de la pile biologique, qui forcerait celle-ci à débiter un courant de valeur élevée et, de ce fait, abaisserait la valeur de son potentiel.

# <u>1 - Effets d'un shunt membranaire local sur l'amplitude du P.R.</u> mesuré par microélectrode

Le montage utilisé a été décrit au chapitre III, § D, 1.2. Ainsi, pour provoquer un court-circuit membranaire local, il suffit d'implanter une électrode argentée extérieurement, de résistance faible (300 k $\Omega$ ) à l'intérieur de la fibre. L'amplitude du P.R. est mesurée grâce à une microélectrode classique placée à une distance variable (d) de l'électrode-shunt.

La figure 8 montre les variations de la valeur moyenne (10 fibres) du P.R. mesuré en fonction de la distance d séparant l'électrode d'enregistrement de l'électrode-shunt. L'examen de la courbe obtenue indique que la valeur du P.R. ne diminue de façon significative que pour une distance interélectrode de 500  $\mu$ , diminution qui s'accentue d'ailleurs d'autant plus que d décroît. L'extrapolation de la courbe lorsque d tend vers 0 laisse supposer que le P.R. prend une valeur proche de 0.

Nous avons vérifié qu'en remplaçant l'électrode argentée par une électrode classique, la baisse du P.R. ne se manifeste plus, sauf dans certains cas (quelques mV) pour une distance d de toutes façons inférieure à 50 µ.

La courbe représentée figure 8 traduisant les variations du P.R. en fonction de la distance interélectrode n'est pas une exponentielle répondant à l'équation :



Figure 8 : Action d'un shunt membranaire local sur l'amplitude du P.R..

Valeur du potentiel de repos (P.R.) en fonction de la distance (d) existant entre l'électrode-shunt et l'électrode d'enregistrement.

On observe que la valeur **moye**nne du P.R. (caractérisée par son écart-type) diminue d'autant plus que l'on se rapproche du lieu du shunt membranaire.  $V = V_0 e^{-\frac{d}{\lambda}}$ , où V est le potentiel de membrane mesuré à une distance d de l'électrode-shunt,

 $V_0$ , la différence entre le P.R. et le potentiel de membrane pour d = o,

 $\lambda$ , la constante d'espace.

En effet, en dérivant l'équation précédente, on obtient :

log V = log V<sub>0</sub> -  $\frac{d}{\lambda}$  log e, qui est l'équation d'une droite ; il s'avère que la courbe de la figure 9 représentant les variations du logarithme décimal du P.R. en fonction de d n'est pas une droite. D'ailleurs, la figure 10 montre que la valeur du P.R. est une fonction linéaire du logarithme décimal de la distance d.

En conclusion, le fait de shunter localement la membrane de la fibre musculaire de crabe n'entraîne pas une baisse de l'amplitude du P.R. de l'ensemble de la fibre comme c'est le cas, par exemple, pour la fibre du couturier de grenouille. Au delà d'une certaine distance, le P.R. présente une valeur pratiquement identique à celle d'une fibre intacte. Tout laisse donc supposer que de fortes résistances longitudinales s'opposeraient à l'extension du passage du courant de court-circuit. En effet, comme la résistance membranaire est relativement faible (une centaine d'ohms.cm<sup>2</sup>, FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1969 b) seule ne pourrait s'opposer au passage de ce courant que la résistance interne longitudinale car la résistance du milieu extracellulaire peut être considérée comme négligeable. Dans de telles conditions, il paraît possible d'émettre l'hypothèse que la valeur de la résis-



Figure 9 : Effets sur le potentiel de repos (P.R.) d'un shunt membranaire local.

Amplitude du P.R. (en échelle logarithmique) en fonction de la distance (d) entre l'électrode-shunt et l'électrode d'enregistrement.

La courbe montre qu'il n'existe pas de relation linéaire entre le logarithme du P.R. et la distance d.



Figure 10 : Effets d'un shunt membranaire local sur le potentiel de repos (P.R.) en fonction de la distance (d) entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode-shunt.

d est portée en échelle logarithmique

Chaque point de la courbe donne une valeur moyenne du P.R. caractérisée par l'écart-type correspondant.

L'amplitude du P.R. apparaît comme étant fonction linéaire du logari**t**hme de la distance interélectrode. tance intracellulaire par unité de longueur serait élevée et que tout se passerait comme s'il existait un cloisonnement transversal électrique.

Ceci expliquerait de plus qu'une fibre sectionnée à l'une de ses extrémités conserve à l'autre extrémité, comme nous l'avons vérifié, un potentiel de repos dont la valeur est satisfaisante, et ce, pendant plusieurs mn. 2 - Mesure du potentiel de repos par la technique du pont de saccharose

Cette technique, proposée par STÂMPFLI en 1954, permet la mesure des caractéristiques électrophysiologiques de la fibre, et plus particulièrement, dans certaines conditions (double pont de saccharose) l'enregistrement des différents courants ioniques membranaires. Signalons que cette technique ne nous a pas permis d'obtenir les résultats escomptés ; néanmoins, bien que négatifs, ils méritent d'être mentionnés car ils peuvent contribuer à entrevoir et confirmer les propriétés électrophysiologiques attribuées à chaque système membranaire.

Avant d'aborder la mesure des caractéristiques membranaires par la technique du pont de saccharose, il convient au préalable d'étudier les effets sur l'évolution de l'amplitude du P.R. au cours du temps d'un milieu de concentration ionique identique autant que possible à celle du milieu intracellulaire.

Le milieu isotonique de KCl classiquement utilisé pour annuler le P.R. sur une certaine longueur de fibre s'est avéré non satisfaisant. En effet, la mesure du P.R. en "sucrose gap" nécessite d'amener une partie de la fibre au potentiel O. Comptetenu du fait que le P.R. de la fibre musculaire de crabe est dû à un potentiel de diffusion où interviennent, pour une part importante, d'autres ions que le potassium, il nous a semblé préférable de remplacer la solution de KCL isotonique utilisée généralement pour les tissus excitables de Vertébrés, par une solution isotonique dont la composition est la plus proche possible du milieu ionique intracellulaire (données de PROSSER, et BROWN, 1962).

2.1 - Action sur le P.R. du milieu de concentration identique à celle du milieu intracellulaire

Pour vérifier si un tel milieu entraîne effectivement la disparition rapide des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane, l'enregistrement de l'amplitude du P.R. a été réalisé par microélectrode lors de l'action de ce milieu au cours du temps.

Les résultats traduits par la courbe représentée figure 11 montrent une annulation du P.R. qui n'apparaît qu'après 12 mn d'action de la solution. La baisse du P.R., rapide au début, se ralentit progressivement, comme le montre d'ailleurs le graphe.

Le maintien relativement durable d'une certaine valeur du P.R. pourrait s'expliquer par sa nature même ; ce P.R. résulterait en fait de l'influence des piles de concentration aux ions  $C1^-$  et aux ions K<sup>+</sup>, dont on sait qu'elles sont de valeur différente : la pile potassique serait localisée superficiellement au niveau de la membrane sarcolemmique et celle au Cl<sup>-</sup> au niveau de sites bien précis de la membrane tubulaire (MOUNIER et GUILBAULT, 1970). Dans de telles conditions, le P.R. serait initialement touché par la suppression du gradient aux ions K<sup>+</sup>, et secondairement par la disparition du gradient pour le Cl<sup>-</sup>, du fait d'une diffusion lente du



Figure 11 : Evolution du potentiel de repos (P.R.) en fonction du temps d'imbibition (t) de la fibre immergée dans la solution de concentration ionique proche de celle du milieu intracellulaire.

Le P.R. est enregistré par microélectrode.

liquide extracellulaire à l'intérieur du système tubulaire transverse. D'ailleurs, de par l'importance de ce système tubulaire et de par sa morphologie (ROSENBLUTH, 1969) il est possible de supposer que l'annulation du gradient pour le C1<sup>-</sup> ne se ferait que relativement lentement, ce qui semble être corroboré par la baisse progressive effective du P.R. qu'illustre la figure 11.

S'il en est ainsi, l'amplitude du P.R. mesurée par la technique du pont de saccharose ne serait maximale qu'après un délai d'une dizaine de mn environ. C'est d'ailleurs ce que vont vérifier les résultats que nous exposons à présent.

2.2 - Enregistrement du P.R. par la technique du pont de saccharose

Le montage utilisé, ne comportant qu'un seul pont de saccharose, a été décrit au chapitre III, § D, 2, figure 7.

Après avoir placé la fibre dans la cuve et réglé les débits des différents milieux (S, R et I) s'écoulant dans chacun des trois compartiments, la différence de potentiel entre les compartiments I et III est enregistrée au cours du temps. La figure 12 traduit la valeur moyenne du P.R. caractérisée par son intervalle de confiance à .05. La courbe obtenue indique que le P.R. s'établit progressivement : la valeur moyenne maximale est atteinte après un



Figure 12 : Valeur moyenne du potentiel de repos (P.R.) enregistré par la technique du pont de saccharose.

Evolution du P.R. en fonction du temps (t).

Nous avons porté pour chaque valeur de t l'amplitude moyenne correspondante du P.A. ainsi que les écarts-type caractérisant cette moyenne.

On peut observer que le P.R. augmente pendant les 7 premières mn avant de se stabiliser quelque temps, pour diminuer ensuite. temps de l'ordre de 10 mn. Cette valeur, obtenue après des délais variables d'une fibre à l'autre (figure 13), est de 75,1  $\pm$  9,9 mV. Il convient déjà de remarquer que cette valeur est plus grande que celle mesurée par microélectrode. De plus, il est à noter que l'amplitude du P.R. ne se maintient pas au cours du temps et qu'elle évolue vers une valeur nulle. L'histogramme de la figure 13 donnant, pour chaque classe de temps de 1 mn, le nombre (n) de fibres ayant atteint la valeur maximale de leur P.R., explique la dispersion importante autour des valeurs moyennes (figure 12).

Que le P.R. s'établisse lentement, cela pourrait s'expliquer, comme nous l'avons déjà indiqué (§ A, 2.1) par le temps que met la solution isotonique employée pour agir du fait de sa diffusion lente dans le système tubulaire transverse ; cependant, cela n'explique pas l'absence de maintien de la valeur maximale du P.R. atteinte, à moins d'émettre une hypothèse que peut confirmer la morphologie du système tubulaire transverse. Ce système T, très ramifié (notamment le système  $T_Z$ ), pourrait en effet permettre le passage de l'un des milieux d'un compartiment à l'autre, ce qui aurait comme conséquence la diminution de la résistance de grande valeur que constitue le compartiment saccharose qui, de ce fait, shunterait le pont isolant et provoquerait donc la chute du P.R..



Figure 13 : Histogramme représentant, pour chaque intervalle de temps (t) de 1 mn suivant le début des mesures, le nombre (n) de fibres ayant atteint la valeur maximum de leur P.R. précisemment pendant l'intervalle de temps considéré.

On remarque la disparité relative des valeurs maxima du P.R. des différentes fibres avec, toutefois, une prédominance aux environs de 5 à 6 mn après le début des mesures.

#### 3 - Résumé et conclusion

Nous avons indiqué, d'après les travaux entre autres de FATT et KATZ (1953), de HAGIWARA et Coll. (1968), de MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 a) et de MOUNIER (1970), que le P.R. de la fibre musculaire de crabe serait dû à un potentiel de diffusion aux ions K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et également aux ions Na<sup>+</sup>, et que la perméabilité de la membrane aux ions K<sup>+</sup> se situerait au niveau de la membrane sarcolemmique alors que la perméabilité aux ions Cl<sup>-</sup> serait localisée au niveau des parois tubulaires : la valeur de la pile au K<sup>+</sup> serait de l'ordre de 75 mV, celle au Cl<sup>-</sup> de 56 mV environ. Enfin, le système tubulaire transverse de la fibre de crabe, comme le montre la figure 14 (MATHIEU, 1971), est extrêmement ramifié et amène le milieu extracellulaire très profondément à "l'intérieur" de la fibre.

A la lumière de l'ensemble des résultats et des hypothèses que nous venons de rappeler, les différences que l'on observe quant à la valeur du P.R. mesurée soit par microélectrode, soit par pont de saccharose pourraient s'expliquer de la façon suivante : la pointe de la microélectrode détectant le potentiel intracellulaire pourrait être influencée préférentiellement par la pile de concentration aux ions K<sup>+</sup> si elle se trouve proche de la membrane sarcolemmique ou davantage par la pile au Cl<sup>-</sup> si elle se trouve proche d'un tubule. S'il en est ainsi, on peut concevoir que la valeur du potentiel enregistré varie selon le lieu d'implantation de la microélectrode et qu'elle oscille entre les deux extrêmes 56 et 75 mV, ce qui confirme d'ailleurs l'expérience.



<u>Figure 14</u> : Structure et ultrastructure de la fibre musculaire de Carcinus maenas. (d'après MATHIEU, 1971).

Le schéma du haut montre les invaginations de la membrane sarcolemmique déterminant ainsi un pseudo-cloisonnement de la fibre.

Le schéma du bas est relatif à l'organisation du sarcomère. Outre la disposition des myofibrilles, on remarquera l'existence d'un double système tubulaire transverse, l'un au niveau des bandes Z ( $T_Z$ ) et l'autre au niveau de la jonction bande A - bande I ( $T_{AI}$ ).

Mb : membrane sarcolemmique
A : bande A
Z : bande Z
D : diade
T<sub>AI</sub> : système tubulaire transverse au niveau de la jonction A-I
T<sub>Z</sub> : système tubulaire transverse au niveau de la

bande Z.

De plus, si l'on admet que le milieu externe, du fait des invaginations profondes et ramifiées du système tubulaire transverse, diffuse lentement dans celui-ci, il est possible d'expliquer l'évolution au cours du temps du P.R. enregistré par la technique du pont de saccharose. En effet, compte-tenu de l'isolement électrique extracellulaire produit par la solution de saccharose (compartiment II), une différence de potentiel entre les compartiments I et III pourrait être décelée dès le début de l'expérience (voir figure 12), car la partie de la fibre placée dans le compartiment III se trouverait presque immédiatement à un potentiel plus bas que celui du compartiment I du fait de l'annulation du gradient potassique. Puis le milieu du compartiment III diffusant dans les tubules tendrait à annuler le gradient pour le Cl pour finalement le supprimer ; dans ces conditions le potentiel existant entre I et III aurait à ce moment une valeur proche de celle mesurée par microélectrode. Ensuite le saccharose, diffusant d'un compartiment à l'autre du fait des ramifications du système T, tendrait à diminuer le gradient de concentration pour le Cl dans les tubules de la partie de la fibre située dans le compartiment I et par là éliminerait la pile au Cl, ce qui devrait se traduire par l'enregistrement d'un potentiel dont la valeur s'approcherait préférentiellement de celle de la pile de concentration aux jons  $K^{\dagger}$ . Il s'avère que la figure 12 montre que le potentiel atteint effectivement la valeur de 75 mV. Finalement, la diffusion des différents milieux par la voie du système T tendrait d'une part, à égaliser les différences de concentrations ioniques de part et
d'autre de la membrane et, d'autre part, à shunter la résistance élevée constituée par le pont de saccharose ; la conséquence serait la baisse de la différence de potentiel existant entre les compartiments I et III, ce que confirme la courbe de la figure 12.

Quant à l'action sur la valeur du P.R. d'un shunt membranaire local provoqué par l'implantation dans la fibre d'une électrode argentée extérieurement, il serait possible d'admettre que l'absence de diffusion des lignes de courant naissant au niveau du court-circuit aurait pour origine l'existence d'une résistance intracellulaire longitudinale élevée en liaison, peut-être, avec la structure de la fibre qui présente un pseudo-cloisonnement morphologique (voir figure 14).

Ainsi, il apparaît que l'ensemble de nos résultats confirme, comme nous venons de l'indiquer, certaines hypothèses émises par certains auteurs dont entre autres : GIRARDIER et Coll., 1964 ; GAYTON et HINCKE, 1968 ; MOUNIER et GUILBAULT, 1970. Ces hypothèses, s'appliquant aux membranes des fibres musculaires d'Invertébrés, postulent l'existence de perméabilités sélectives, l'une au Cl<sup>-</sup> située au niveau de la membrane du système tubulaire transverse et l'autre au K<sup>+</sup> située au niveau de la membrane sarcolemmique. La membrane de la fibre musculaire serait donc au repos le siège de circuits locaux du fait de propriétés de perméabilité ionique propre à chaque système membranaire et du fait de valeurs différentes des potentiels d'équilibre des piles aux ions K<sup>+</sup> et aux ions Cl<sup>-</sup>.

¥ ¥

Les données concernant les perméabilités ioniques membranaires de repos et leur importance relative au niveau de la fibre musculaire de crabe se trouvant confirmées par nos résultats, il devient possible d'entreprendre à présent l'étude pendant l'activité des variations du potentiel de membrane (P.M.) qui sont dues à un changement des conductances membranaires ioniques.

## B - Potentiel d'action

1 - Caractéristiques électrophysiologiques de la fibre
musculaire de crabe dans les conditions normales

2 - Caractéristiques électrophysiologiques de la fibre musculaire de crabe dans les conditions expérimentales anormales. Nous savons depuis les travaux de FATT et KATZ, en 1953 que le potentiel d'action (P.A.) des fibres d'Invertébrés, et plus particulièrement de la fibre musculaire de crabe, est caractérisé par une phase de dépolarisation (ou phase ascendante) relativement lente, par rapport à celle de la fibre musculaire de grenouille et que, de plus, ce P.A. ne présente pas, dans les conditions normales, d'inversion de potentiel. Une autre de ses caractéristiques réside dans le fait qu'il est généralement non conduit par la membrane selon le processus régénératif classique.

Ainsi, pour tenter d'expliquer la génèse et le décours de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe, nous avons :

- dans un premier temps, enregistré dans les conditions normales certaines de ses caractéristiques électrophysiologiques, c'est-à-dire plus particulièrement : le décours, la propagation du P.A. et les variations de l'impédance membranaire qui sont le témoin des changements des conductances ioniques responsables de la variation du P.M.

- dans un deuxième temps, étudié les modifications de ces caractéristiques dans certaines conditions anormales, à savoir lors du changement des concentrations ioniques du milieu de référence ou lors de l'addition à ce milieu d'inhibiteurs spécifiques de perméabilité. 1 - Caractéristiques électrophysiologiques de la fibre musculaire de crabe dans les conditions normales

1.1 - Décours du P.A.

Dans les conditions normales, une dépolarisation membranaire suffisante et rapide conduit à l'activation de la fibre, qui se traduit par l'apparition d'un P.A.. En effet, un courant dépolarisant, appliqué localement par une première microélectrode, d'une valeur généralement comprise entre 2 et 4  $\mu$ A, d'une durée de 15 ms, permet l'obtention d'un P.A. enregistré par une deuxième microélectrode (voir schéma du montage figure 5, chapitre III, § D, 1.1).

La figure 15 donne un exemple de l'évolution du P.M. au cours du temps à la suite de l'application de part et d'autre de la membrane d'un courant rectangulaire d'intensité 3  $\mu$ A. Le courant dépolarisant donne naissance à un P.A. d'une amplitude moyenne de 56,6 ± 5,9 mV caractérisé par une absence d'inversion de potentiel. De plus, comme le fait apparaître le tracé, la vitesse de la phase ascendante est relativement faible (de l'ordre de 10 V/s) par rapport à celle de la fibre musculaire de grenouille. Quant à la phase de repolarisation, elle est légèrement plus durable (9 ms en moyenne) ce qui correspond à une vitesse de repolarisation de 5 V/s.

La nécessité d'utiliser un courant de stimulation de forte intensité ( $R_m$  étant faible) et de grande durée, compatible avec son



Figure 15 : Exemple d'enregistrement du potentiel d'action dans les conditions normales.

En bas : courant de stimulation

En haut : réponse de la membrane à ce courant de stimulation.

Le tracé horizontal supérieur donne le potentiel de référence. Dans le cas de la figure la distance entre l'électrode de stimulation et l'électrode d'enregistrement est de 100 µ. passage dans une microélectrode d'impédance élevée nous a amenés à rechercher la durée minimale de ce courant de façon à stimuler chaque fibre, dans la mesure du possible, dans les mêmes conditions. La courbe de la figure 16 représentant l'intensité minimale du courant en fonction de sa durée minimale nous a conduits à utiliser par la suite un courant de stimulation d'une durée de 15 ms, voisine de la valeur de la chronaxie.

De plus, la durée importante du courant de stimulation se justifie par le fait qu'il ne suffit pas d'atteindre le seuil de dépolarisation critique par le courant liminaire pour que la phase d'activité se déroule normalement ; il est nécessaire que le courant persiste pendant toute cette phase, à moins d'utiliser un courant de plus forte intensité mais qui, dans ce cas, présente l'inconvénient de masquer le décours du P.A., du fait de l'importance du circuit R.C. de la membrane.

La faible amplitude du P.A. obtenu, pouvant résulter de l'existence d'un P.R. de faible valeur, nous a conduits à étudier l'influence du niveau de potentiel membranaire de la fibre au repos sur cette amplitude.

1.2 - Influence de la valeur du P.R. sur le P.A.

A l'aide d'un générateur de courant continu constant (G,٦) nous avons hyperpolarisé la membrane (voir montage représenté figure



Figure 16 : Courbe intensité-durée de la fibre musculaire de crabe.



de façon à voir si une relation lie l'amplitude du P.A. à celle du P.R..

La figure 17 représente l'évolution du P.M. sous l'influence de courants hyperpolarisants d'intensité croissante (tracës 2, 3, 4) ; le tracé 1 correspond au P.M. de référence qui est, pour cet exemple, caractérisé par un P.R. de 65 mV et par un P.A. de 53 mV d'amplitude. Le courant de stimulation supraliminaire est toujours de même intensité quelle que soit la valeur imposée du P.R.. Les résultats obtenus font apparaître que la faible amplitude du P.A. n'est pas liée à une valeur trop faible du P.R. et que la phase d'activité n'est déclenchée que lorsqu'un niveau critique de potentiel, voisin de - 40 mV, est atteint; ils diffèrent de ceux obtenus sur le tissu cardiaque, où l'amplitude du P.A. est proportionnelle à la valeur du P.R. (CORABOEUF, BOISTEL, GARGOUÎL, LAPLAUD et GALAND, 1959).

Les résultats obtenus suggèrent que la valeur mesurée du P.M. de la fibre au repos correspond bien à la vraie valeur et que l'absence d'inversion de potentiel lors de l'activité ne serait pas imputable à une dépolarisation membranaire de repos consécutive, par exemple, à une éventuelle lésion provoquée par les microélectrodes.

La faible amplitude du P.A. peut aussi résulter de sa



Figure 17 : Influence de la valeur du potentiel de repos sur le décours du potentiel d'action.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Dans les conditions normales 2 - 3 - 4 - Dans le cas d'hyperpolarisation de la membrane de valeur respective 15, 30 et 45 mV.

L'amplitude du potentiel d'action n'est pas liée à la valeur du potentiel de repos. non-propagation selon un processus régénératif. Les travaux de FATT et KATZ (1953) font état d'une diminution de l'amplitude du P.A. au fur et à mesure que la distance entre l'électrode de stimulation et celle d'enregistrement augmente. La détermination du type de propagation du P.A., nous à conduits à rechercher la relation existant entre son amplitude et la distance interélectrode séparant l'endroit de son initiation de celui de son enregistrement.

1.3 - Propagation du P.A.

La figure 18 donne un exemple du décours du P.A. d'une même fibre recueilli à une distance variable (d) de la microélectrode de stimulation.

On constate, en accord avec les observations de FATT et KATZ, (1953) que le P.A. diminue d'amplitude au fur et à mesure que la distance interélectrode augmente. De plus, pour une faible distance interélectrode (d = 50  $\mu$ ), le P.A. présente une inversion notable de potentiel qui n'apparaît, dans les conditions normales, que de rares fois. Cette absence d'inversion peut s'expliquer par le fait que, généralement, la distance interélectrode choisie est voisine de 125  $\mu$ .

L'observation montrant qu'un shunt membranaire local modifie la valeur du P.R. et que celle-ci varie linéairement en fonction du logarithme décimal de la distance séparant l'électrodeshunt de l'électrode d'enregistrement pouvait nous laisser supposer



<u>Figure 18</u> : Amplitude du potentiel d'action enregistré dans les conditions normales en fonction de la distance (d) existant entre l'électrode de stimulation et l'électrode d'enregistrement.

Les enregistrements sont effectués sur une même fibre, le courant de stimulation restant inchangé.

(a) 
$$d = 50 \mu$$
  
(b)  $d = 250 \mu$   
(c)  $d = 2250 \mu$   
(d) courant de stimulation.

qu'une relation de même type existe en ce qui concerne les variations de l'amplitude du P.A.. La figure 19, exprimant les variations de cette amplitude en fonction de la distance interélectrode, montre que sa propagation est différente de celle des lignes de courant produites par un shunt membranaire local. En effet, la figure 20 exprimant le logarithme décimal de l'amplitude du P.A. (V) en fonction de la distance interélectrode (d) fait apparaître une relation linéaire. Celle-ci semble montrer que la propagation du P.A. le long de la fibre musculaire de crabe obéit à une loi exponentielle, et ainsi que cette propagation se fait selon un processus électrotonique. Dans de telles conditions, l'amplitude (V) du potentiel recueilli à une distance (d) de son lieu d'initiation est égale à V<sub>o</sub> e<sup>-</sup>  $\frac{d}{\lambda}$ , où V<sub>o</sub> est le potentiel correspondant à une distance nulle, et  $\lambda$  la constante d'espace. L'évaluation graphique à partir de la figure 20 donne une valeur de 1,2 mm pour  $\lambda$ .

Les observations mentionnées ci-dessus et les résultats obtenus sont de nature à suggérer que le P.A. pourrait résulter d'une augmentation de la résistance membranaire ( $R_m$ ) de la fibre puisque la valeur de  $\lambda$  est égale à 1,2 mm, alors qu'elle n'est que de 0,8 mm en moyenne pour la fibre au repos (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, 1970). En effet, la valeur de  $R_m$  peut être calculée à partir des équations du cable (COLE et CURTIS, 1936 ; HODGKIN et RUSHTON, 1946) en connaissant la valeur de  $\lambda$  et celle des résistances des milieux intracellulaire et extracellulaire ( $r_i$  et  $r_e$ )



Figure 19 : Amplitude (V) du potentiel d'action en fonction de la distance (d) entre l'électrode de stimulation et l'électrode d'enregistrement.



<u>Figure 20</u> : Amplitude (V) du potentiel d'action en fonction de la distance (d) séparant l'électrode d'enregistrement de l'électrode de stimulation.

V est portée en échelle logarithmique.

Le potentiel d'action se propage électrotoniquement du fait de la relation linéaire liant log V à d.

On a 
$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{r_e + r_i}}$$
 ou  $\lambda^2 = \frac{R_m}{r_e + r_i}$ 

Puisque  $r_e$  et  $r_i$  sont des constantes, il faut supposer que si  $\lambda$ augmente, c'est que R<sub>m</sub> croît. Ainsi le P.A., tout au moins la phase de dépolarisation, correspondrait à une augmentation de la résistance membranaire globale. S'il en est ainsi, la fibre musculaire de crabe se comporterait pendant l'activité, très différemment de celle de la plupart des autres tissus excitables, puisque pour ceux-ci, le P.A. correspond à une diminution de la résistance membranaire de repos. Cette hypothèse semble, de plus, pouvoir être retenue dans la mesure où l'on compare les valeurs de la résistance membranaire de repos des fibres nerveuses et musculaires de grenouille à celle des fibres musculaires de Crustacés ; en effet, la  $R_m$  pour les fibres de Vertébrés s'échelonne entre 2000 et 10 000  $\Omega.cm^2$ (FATT et KATZ, 1951 ; JENERICK, 1953 ; ADRIAN et FREYGANG, 1962) alors que pour les fibres de crabe, elle est de l'ordre de 100 à 130  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1969 b), de l'ordre de 465  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> selon HAYS, LANG et GAINER (1968), mais faible de toutes façons. Donc, si l'activité de la fibre de crabe correspondait à une diminution de la  $R_m$ , celle-ci tendrait vers une valeur très faible, conduisant à un très fort court-circuit membranaire, ce qui semble peu probable.

L'hypothèse formulée ci-dessus concernant la variation de résistance membranaire lors de l'activité demande, du fait de son importance, sa vérification que l'on peut aborder par l'étude de l'évolution de l'impédance globale de la membrane.

1.4 - Impédance membranaire pendant le P.A.

Rappelons que la conductance membranaire globale  $(G_m)$ est inversement proportionnelle à la résistance membranaire  $(R_m)$ , d'où  $G_m$  (mhos) =  $\frac{1}{R_m} (\Omega)$ . Il est donc possible, par mesure de l'impédance membranaire globale  $(Z_m)$  qui correspond à la résistance équivalente de la résistance membranaire en parallèle sur le condensateur membranaire, (voir § II, figures 1 et 2), de connaître la valeur de la conductance ionique de repos et ses variations éventuelles pendant le P.A..

La mesure de  $Z_m$  selon la technique de HODGKIN et RUSHTON (1946), utilisée par KATZ en 1949 sur la fibre musculaire de grenouille,peut être faite grâce au générateur à courant constant (G,  $\sim$ ), placé dans le circuit de stimulation (voir montage figure 5), qui délivre un courant sous-liminaire sinusoïdal de fréquence réglable.

La figure 21 donne un exemple de tracé du P.A. obtenu dans les conditions normales auquel se superpose le résidu électronique des impulsions sinusoïdales produites par le courant sousliminaire d'une fréquence égale à 30 Hz. Une augmentation de l'amplitude des ondes sinusoïdales se manifeste pendant la phase



<u>Figure 21</u> : Exemple d'enregistrement permettant la mesure des variations d'impédance de la membrane  $(Z_m)$  pendant l'activité électrique.

F : fréquence du courant sous-liminaire sinusoïdal d'inten-

I : Intensité du courant supraliminaire de stimulation.

Les variations de l'épaisseur du tracé pendant la réponse de la membrane à un courant hyperpolarisant et à un courant dépolarisant figurent les modifications de  $Z_m$ . La valeur arbitraire de référence 1 est celle de repos.

Du fait de la faible fréquence (F = 30 Hz) du courant sinusoïdal sous-liminaire d'intensité constante appliqué à la membrane, il est possible de considérer que les variations de  $Z_m$  représentent en fait celles de la résistance membranaire ( $R_m$ ).

On peut observer que la R<sub>m</sub> augmente pendant le P.A., alors qu'elle ne varie pas pour un courant de valeur et de durée égales à celui de stimulation, mais de sens opposé,appliqué à la membrane de la fibre. ascendante du P.A., cette amplitude, dans le cas de l'exemple donné ici, passe d'une valeur de référence arbitraire de 1 à une valeur 5 fois plus grande ; le maximum se situe pratiquement au niveau du sommet du P.A., comme le fait apparaître le schéma de la figure 22. Le retour progressif à la valeur initiale se produit pendant la phase de repolarisation. Il est à remarquer qu'un courant rectangulaire de même intensité et de même durée que le courant de stimulation, mais de sens inverse, donc hyperpolarisant, n'entraîne pas de variations de l'impédance membranaire.

Cette variation d'impédance, mesurée par l'intermédiaire d'un courant sinusoïdal de fréquence faible (30 Hz) traduit en fait une variation préférentielle de la résistance membranaire, la résistance du condensateur membranaire pouvant dans ces conditions, compte-tenu de la valeur de la fréquence, être considérée comme très grande devant celle de la résistance. Ainsi, comme la  $Z_m$ évolue dans le sens d'une augmentation pendant le P.A., ceci conduit à admettre une diminution de la conductance membranaire ionique globale.

Cette augmentation de résistance se trouve d'ailleurs confirmée par l'examen de la figure 23 qui montre la variation moyenne de la  $R_m$  (10 fibres) pendant le P.A. en fonction de l'évolution de la valeur du P.M., d'une part lors de la dépolarisation et d'autre part lors de la repolarisation. Les valeurs moyennes de  $Z_m$  exprimées en p.100 de la valeur de repos et limitées par leur



Figure 22 : Schéma représentant en valeurs arbitraires l'évolution de  $Z_m$  en fonction du temps.

En bas : courant de stimulation appliqué à la membrane de la fibre musculaire

En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant.

Les segments, portés sur le tracé de la réponse électrique à différentes valeurs du potentiel de membrane et caractérisés chacun par un nombre, représentent la variation de Z<sub>m</sub>. (La valeur de référence 1 est la valeur de l'impédance membranaire de repos).



<u>Figure 23</u> : Variations de l'impédance membranaire  $(Z_m)$  en fonction de l'amplitude de la dépolarisation pendant le potentiel d'action (courant sinusoïdal de fréquence 30 Hz).

Nous avons porté les valeurs relatives moyennes de  $Z_m$ , délimitées par leur intervalle de confiance (seuil .05), à droite lors de la phase ascendante du P.A., à gauche lors de la phase de repolarisation.

 $Z_m = 100 \text{ p.100}$  représente la valeur de repos.

 $Z_m$  augmente avec l'amplitude de la dépolarisation lors du P.A..

intervalle de confiance (seuil .05) montrent qu'effectivement l'augmentation la plus grande (350 p.100) se situe au sommet du P.A..

De façon à s'assurer que les variations de la  $R_m$  sont bien imputables à des modifications effectives de la conductance membranaire, un courant sinusoïdal sous-liminaire de même intensité, mais de fréquence plus élevée (600 Hz) a été appliqué, dans les mêmes conditions, de part et d'autre de la membrane des mêmes fibres, soit antérieurement, soit ultérieurement à l'application du courant de fréquence 30 Hz. Dans ce cas, le courant sinusoïdal de fréquence élevée traversant le circuit  $R_m C_m$  abaisse considérablement, du fait même de la valeur de la fréquence, l'impédance du condensateur qui, par conséquent, doit shunter les variations de  $R_m$ .

La figure 24 donnant un exemple de l'évolution de l'amplitude du résidu électrotonique lors du P.A. montre qu'il reste en effet d'amplitude constante, ainsi que lors de l'hyperpolarisation produite par un courant rectangulaire de même valeur, mais de sens inverse. La figure 25 confirme cette absence de variations : en effet, la valeur moyenne de  $Z_m$  n'est pas modifiée en fonction de la variation du potentiel de membrane lors de la phase de dépolarisation et lors de la phase de repolarisation.

Ainsi l'impédance membranaire augmentant lors de l'appli-



Figure 24 : Exemple d'enregistrement permettant la mesure des variations d'impédance de la membrane  $(Z_m)$  pendant l'activité électrique.

- F : fréquence du courant sinusoïdal sous-liminaire
- I : intensité du courant supraliminaire de stimulation.

Les variations de l'épaisseur du tracé pendant la réponse de la membrane à un courant hyperpolarisant ou dépolarisant figurent les modifications de Z<sub>m</sub>. La valeur arbitraire de référence 1 est celle de repos.

Du fait de la fréquence élevée du courant sinusoïdal sousliminaire (F = 600 Hz) appliqué à la membrane, il est possible d'admettre que l'impédance de la capacité membranaire devienne très faible. Dans ce cas les variations éventuelles de  $R_m$  sont sans effets sur la valeur de  $Z_m$ .

On remarque, dans ces conditions, que  $\rm Z_{m}$  varie très peu lors du P.A..



Figure 25 : Variations de l'impédance membranaire  $(Z_m)$  en fonction de l'amplitude de la dépolarisation pendant le potentiel d'action (courant sinusoïdal de fréquence 600 Hz).

Du fait de la fréquence élevée (600 Hz) du signal sous-liminaire sinusoïdal appliqué à la membrane, l'impédance très basse de la capacité membranaire masque les variations éventuelles de la résistance membranaire. Les valeurs moyennes de  $Z_m$  et les limites de l'intervalle de confiance (défini au seuil .05) sont portées,

> - à droite pour la phase de dépolarisation du potentiel d'action

- à gauche pour la repolarisation.

La valeur  $Z_m$  = 100 p.100 correspond à la valeur de repos.

Z<sub>m</sub> ne varie pas de façon significative lors du potentiel d'ac-

tion.

cation, de part et d'autre de la membrane de la fibre musculaire de crabe, d'un courant sinusoïdal de valeur constante sous-liminaire de basse fréquence, et ne variant pas pour un même courant, mais de fréquence élevée, témoigne finalement en faveur d'une diminution de la conductance ionique membranaire globale pendant le P.A..

1.5 - Résumé et conclusion

Les résultats exposés ci-dessus, concernant les propriétés électrophysiologiques de la fibre musculaire de crabe en activité dans les conditions normales (imbibition de la fibre par la solution physiologique de référence), montrent que le P.A. de cette fibre est de nature très différente quant à sa génèse et quant à son décours de celui des autres fibres excitables.

En effet, il n'est pas conduit le long de la membrane selon un processus régénératif classique, mais propagé électrotoniquement, du moins en partie, à partir de son lieu d'initiation.

D'autre part, il ne présente pas, dans la plupart des cas, d'inversion de potentiel. Il semblerait d'ailleurs que l'inversion de potentiel se manifesterait, d'une part lorsque les électrodes de stimulation et de réception sont très proches, ce dont peut rendre compte la propagation électrotonique, mais d'autre part lorsque la stimulation est portée au niveau de ce que l'on pourrait appeler une zone excitable. En effet, il faut préciser qu'un courant de stimulation de même valeur n'entraîne pas toujours, bien que suffisant, une activation de la membrane selon l'endroit d'application du courant de stimulation.

Une autre différence importante avec les autres tissus excitables réside dans le fait que, pour la fibre musculaire de crabe, le P.A. correspond à une augmentation de la résistance membranaire de repos, donc à une diminution de la conductance ionique globale.

Cette diminution de la conductance ionique membranaire globale pendant le P.A. de la fibre musculaire de crabe pourrait suggérer une diminution de la perméabilité de repos de la membrane aux ions Cl<sup>-</sup>, associée à l'apparition d'une perméabilité membranaire au Ca<sup>++</sup>, en tenant compte des travaux de MOUNIER et GUILBAULT (1970) et de HAGIWARA et NAKAJIMA (1966) sur les Crustacés. Les travaux de ces derniers auteurs montrent que le Mn<sup>++</sup>, inhibiteur de la perméabilité calcique, (P<sub>Ca</sub>) abolit le P.A.. Ainsi, la phase de dépolarisation serait due à une entrée de Ca<sup>++</sup>. De plus, l'hypothèse d'une diminution transitoire de la P<sub>C1</sub> pendant le P.A. peut être prise en considération puisque MOUNIER et GUILBAULT, 1970, MOUNIER, 1970, montrent qu'en absence de Cl<sup>-</sup>, la rectification membranaire induite par des courants dépolarisants ne se produit plus. Ils constatent également que certaines fibres, caractérisées dans les conditions normales par une valeur faible de la  $P_{C1}$  ( $P_{K} > P_{C1}$ ), ne présentent pas, non plus, ce phénomène de rectification, et que,

par contre, les fibres placées en milieu acide (dont l'action se situe au niveau de la membrane sarcolemmique) perdent leur perméabilité potassique, mais conservent, bien que dépolarisées, leurs propriétés excitables.

Enfin, on peut admettre, lors de la phase de repolarisation, l'existence d'une augmentation de la  $P_K$ , responsable du retour du potentiel à sa valeur de repos, puisque FATT et KATZ en 1953, FATT et GINSBORG en 1958, montrent que le chlorure de T.E.A. augmente considérablement la durée du P.A..

> \* \* \*

Dans ces conditions il convient maintenant d'étayer les hypothèses suggérées ci-dessus par des preuves expérimentales. Pour cette raison il devient nécessaire d'étudier le rôle sur le P.A. des différents ions contenus dans le milieu externe et des inhibiteurs spécifiques de perméabilité afin de pouvoir déterminer les différents processus ioniques membranaires responsables de l'excitation de la fibre musculaire et du décours de son P.A. 2 - Caractéristiques électrophysiologiques de la fibre musculaire de crabe dans des conditions expérimentales anormales

De façon à mieux saisir le rôle et l'évolution au cours du temps des différents changements de perméabilités ioniques membranaires responsables de l'apparition et du décours du P.A., sont présentement analysés :

- tout d'abord les résultats concernant l'étude systématique de l'action de chaque ion présent normalement dans le milieu physiologique et les résultats de l'action des inhibiteurs spécifiques de perméabilité ionique.

- puis les résultats portant sur l'action simultanée d'un ou plusieurs ions bien déterminés associés ou non à un ou plusieurs inhibiteurs.

2.1 - Rôle des ions et des inhibiteurs spécifiques de perméabilité

Seront abordés successivement le rôle des ions monovalents et du T.E.A. (inhibiteur de la  $P_{K}$ ) et celui du Ca<sup>++</sup> et du Mn<sup>++</sup> (inhibiteur de la  $P_{Ca}$ ).

2.1.1 - Rôle des ions monovalents et du T.E.A.

L'étude du rôle de ces ions porte sur le  $Na^+$ , le  $K^+$  et le

Cl<sup>-</sup> dont les concentrations normales dans le milieu extracellulaire sont respectivement en mEq/l de 513, de 12,9 et de 594.

## 2.1.1.1 - Rôle du sodium

Le milieu dépourvu de sodium  $\left( \left[ Na^{+} \right]_{e} = 0 \right)$  est obtenu en remplaçant mM à mM le NaCl par du chlorhydrate de choline.

La figure 26 est un exemple de l'effet de l'absence du Na<sup>+</sup> extracellulaire sur le P.A.. En accord avec les travaux de FATT et KATZ en 1953, après 20 mn d'imbibition de la fibre par la solution sans Na<sup>+</sup>, une inversion de potentiel se manifeste, l'augmentation de l'amplitude du P.A. atteignant en moyenne, pour l'ensemble de nos résultats, 42 p.100. Ces modifications ne semblent pas liées aux changements des propriétés électriques de repos de la membrane, puisqu'il n'apparaît pas de variations notables des valeurs du P.R. et de la  $R_m$ , sauf toutefois au niveau de certaines fibres où une hyperpolarisation de l'ordre de 4 mV et une augmentation faible (20 p.100) de la  $R_m$  se manifeste. Il est à noter que ces effets du milieu dépourvu de Na<sup>+</sup> sont parfaitement réversibles.

Ces résultats semblent indiquer que le Na<sup>+</sup> ne serait pas indispensable à l'initiation et au déroulement de la phase ascendante du P.A., et même qu'à l'inverse, il se comporterait comme un inhibiteur de cette phase, puisque le fait de le supprimer se traduit par une augmentation de l'amplitude du P.A., à moins de supposer au contraire, comme le suggèrent FATT et KATZ (1953) que l'ion

 $(\mathbf{i})$ 



Figure 26 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu sans Na<sup>+</sup>.

En bas : courant de stimulation

En haut : réponse de la membrane

- 1 Dans les conditions normales
- 2 Après 20 mn d'action du milieu dépourvu de Na<sup>+</sup>.

Le potentiel d'action est devenu plus ample.

choline<sup>+</sup> pourrait participer au courant membranaire d'activité. Cependant les résultats ultérieurs vont montrer, semble-t-il, que le Na<sup>+</sup> se comporterait plutôt comme un inhibiteur et que l'ion choline<sup>+</sup> serait bien un ion non pénétrant.

2.1.1.2 - Rôle du potassium

Il est bien connu que la variation de la perméabilité potassique intervient de façon indéniable au niveau de nombreux tissus excitables lors de la phase de repolarisation (HODGKIN et HUXLEY, 1952 a, b ; CORABOEUF, ZACOUTO, GARGOUÏL et LAPLAUD, 1958 ; NOBLE, 1962 ; ILDEFONSE et ROUGIER, 1969).

De façon à vérifier que la  $P_K$  intervient pendant le P.A. de la fibre musculaire de crabe nous avons :

- tout d'abord supprimé le  $K^+$  extracellulaire, ce qui doit entraîner une diminution de la P<sub>K</sub> de repos (HODGKIN et HOROWICZ, 1959) et par là même, une modification de son éventuelle variation pendant le P.A.

- puis ajouté à la solution normale du T.E.A. qui est connu pour bloquer la  $P_K$  (HAGIWARA et WATANABE, 1955).

La suppression du  $K^+$  extracellulaire (milieu  $[K^+]_e = 0$ ) entraîne, après 30 mn d'action, comme le montre l'exemple de la figure 27, une légère augmentation de l'amplitude du P:A. (5 mV en moyenne) associée à un très léger retard de repolarisation.

95.

Į



Figure 27 : Action, sur le potentiel d'action, d'un milieu sans  $K^+$ .

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 30 mn d'action du milieu sans K<sup>+</sup>.

Le potentiel d'action est peu modifié.

A la lumière de ce résultat, il semble intéressant de remarquer que la pente de repolarisation plus faible que dans les conditions normales (2 V/s environ) traduirait éventuellement, soit une simple diminution de la P<sub>K</sub> membranaire de repos, soit un accroissement d'une possible rectification potassique anormale (dont on sait qu'elle est responsable au niveau des fibres musculaires de Vertébrés de la longue durée du P.A.), ou soit encore un retard d'une rectification normale responsable du retour du P.M. à sa valeur de repos. Ces suggestions semblent pouvoir être prises en considération puisque le T.E.A. ajouté au milieu de référence entraîne une augmentation considérable de la durée du P.A..

En effet, l'addition du T.E.A. à la concentration de 20 mM/l (milieu T.E.A.) provoque rapidement (en moins de 5 mn) et réversiblement (15 mn après le retour aux conditions normales) une augmentation de l'amplitude du P.A. et de sa durée, l'apparition d'une inversion de potentiel très ample. La figure 28 donne un exemple de l'action du T.E.A. sur le P.A. : elle montre qu'il présente une inversion de potentiel de 17 mV (25 mV en moyenne pour l'ensemble de nos résultats) et que sa durée augmente de 4 à 5 fois.

> ¥ ¥

Ces données concernant les variations de P<sub>K</sub> lors de l'activité de la fibre de crabe suggèrent que la phase ascendante



Figure 28 : Action du T.E.A. (20 mM/1) sur le potentiel d'action.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 5 mn d'action du T.E.A.

Le potentiel d'action est plus ample et plus durable tout en conservant inchangée sa phase initiale de dépolarisation.

initiale du P.A. ne serait pas liée à un éventuel changement de la  $P_{K}$  de repos (comparaison des tracés 1 et 2 des figures 27 et 28). Par contre, en bloquant ou en diminuant la  $P_{K}$ , l'allure de la phase de repolarisation est modifiée, ce qui conduit à supposer que des variations de la  $P_{K}$  interviendraient dans les conditions normales pendant cette phase.

S'il en est ainsi, étant donné que la phase de dépolarisation du P.A. est liée à une augmentation de la  $R_m$  (chapitre IV, § B, 1.4) il faudrait admettre, comme nous l'avons d'ailleurs déjà suggéré, l'hypothèse d'une diminution temporaire de la  $P_{C1}$  de repos.

> \* ¥ \*

Dans le but de vérifier qu'il existe effectivement des variations de la  $P_{C1}$  lors du P.A., est abordée maintenant l'étude des effets de milieux de concentrations variées en Cl<sup>-</sup>.

## 2.1.1.3 - Rôle du chlore

Il est connu depuis les travaux de FATT et KATZ (1953) que le retrait du NaCl de la solution normale abolit l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe, et que l'absence de Na<sup>+</sup> n'entraîne pas, au contraire, comme nous l'avons d'ailleurs également vérifié (§ 2.1.1.1) la disparition du P.A.. En conséquence, il semblerait que la perméabilité de la membrane au Cl<sup>-</sup> jouerait un rôle important, d'autant plus important que la P<sub>K</sub> n'interviendrait pas pendant la phase ascendante du P.A. comme nous venons de le voir (§ 2.1.1.2).

Le remplacement mM à mM du NaCl de la solution normale par du propionate de sodium conduit à une diminution de 87 p.100 de la concentration en Cl<sup>-</sup>. Le milieu anormal ainsi obtenu  $([Cl<sup>-</sup>]_e = 0,13 X, X \text{ étant la concentration normale})$  entraîne (figure 29) la disparition du P.A. après 10 mn d'action ainsi qu'une dépolarisation membranaire de 10 mV en moyenne.

\$

La disparition réversible du P.A. (réversibilité 20 mn environ après le retour aux conditions normales) n'est pas imputable à une augmentation du seuil d'excitation liée ou non à la dépolarisation membranaire de repos, car, un accroissement de la valeur du courant de stimulation, associé à un courant constant hyperpolarisant tel qu'il rétablisse le P.R. à sa valeur initiale, ne permet pas le retour à une phase d'activité électrique normale.

A la lumière de ce résultat, l'hypothèse attribuant à la  $P_{C1}$  un rôle dans l'initiation du P.A. de la fibre musculaire semble pouvoir être retenue puisque la présence du Cl<sup>-</sup> dans le milieu extracellulaire s'avère indispensable à l'activation.

De façon à confirmer cette hypothèse et d'analyser au mieux le rôle du Cl<sup>-</sup>, l'action d'un milieu enrichi en cet ion est étudiée. Dans ces conditions, la pression osmotique est pratiquement doublée ( $\pi$  # 2200 milliosmoles), et dans ce cas, il est nécessaire de faire agir un milieu normal rendu hypertonique par addition de saccharose de façon à pouvoir discerner le rôle propre


Figure 29 : Action sur le potentiel de membrane d'un milieu appauvri en Cl.

> En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 10 mn d'action du milieu appauvri en Cl.

Les traits horizontaux supérieurs représentent le potentiel de référence en milieu normal (1) et en milieu anormal (2).

L'amplitude du potentiel de repos diminue et le potentiel d'action disparaît.

du Cl<sup>-</sup> de celui de l'hypertonie.

Un exemple des effets d'un milieu  $[C1^-]_e = 2 \text{ X}$  sur le P.M. de la fibre musculaire est représenté figure 30. Ces effets se traduisent par une très légère hyperpolarisation (augmentation du P.R. de 5 mV en moyenne) et par l'apparition d'un P.A. de grande amplitude, de grande durée qui est caractérisé par une inversion de potentiel. L'amplitude de ce P.A. passe de 54 à 84 mV en moyenne, ce qui correspond à une augmentation de 55 p.100 ; sa durée varie entre 30 et 100 ms. De plus, la phase ascendante présente une vitesse de dépolarisation plus grande (de l'ordre de 15 V/s). Enfin il est à souligner que, dans certains cas, comme le montre d'ailleurs l'exemple de la figure 30, le P.A. se décompose en deux parties traduites au niveau de la phase de repolarisation par la présence d'un "trou" de potentiel qui semble indiquer que le P.A. se déroule, dans ces conditions, en deux phases plus ou moins indépendantes.

L'augmentation de l'amplitude du P.A. pouvant résulter d'un changement du type de propagation nous a conduits à étudier la relation liant le logarithme décimal de l'amplitude du P.A. à la distance séparant l'électrode de stimulation de l'électrode d'enregistrement.

La figure 31 montre que la baisse de l'amplitude du P.A., en milieu  $[C1]_e = 2 \text{ X}$ , au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'électrode de stimulation, est très faible, bien que la distance passe, dans le cas de la figure, de 560  $\mu$  (tracé 1) à 2650  $\mu$  (tracé 3).



Figure 30 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu enrichi en Cl<sup>-</sup>.

En bas : courant de stimulation

En haut : réponse électrique de la fibre

- 1 Dans la solution de référence
- 2 Après 20 mn d'action du milieu enrichi en Cl<sup>-</sup>.

Le potentiel d'action devient plus ample et plus durable : on notera une phase de dépolarisation plus rapide.



Figure 31 : Allure du potentiel d'action, en fonction de la distance (d) entre l'électrode de stimulation et celle d'enregistrement, d'une fibre baignant depuis 20 mn dans un milieu enrichi en Cl<sup>-</sup>.

En bas : courant de stimulation

En haut : réponses électriques de la fibre à ce courant

**\* \*** 1 - pour d = 560  $\mu$  **----** 2 - pour d = 1310  $\mu$ **----** 3 - pour d = 2625  $\mu$ 

A - Potentiel de référence dans les conditions normales

B - Potentiel de référence dans les conditions anormales.

L'amplitude du potentiel d'action et la vitesse de sa phase ascendante ne varient pas quelque soit la distance interélectrode. La comparaison des courbes de la figure 32, la courbe (a) représentant la fonction liant l'amplitude du P.A. à la distance interélectrode dans les conditions normales (voir § B, 1.3.), la courbe (b), celle obtenue dans ces nouvelles conditions ( $\begin{bmatrix} Cl - \end{bmatrix}_e = 2 X$ ), suggère que le P.A. se propagerait encore, du moins en partie, électrotoniquement comme le montrent en effet les tracés de la figure 31. Toutefois, cette figure 31 révèle que la vitesse de la phase de dépolarisation et l'amplitude de la phase tardive du P.A. ne diminuent pas au fur et à mesure que la distance interélectrode augmente. Il semble donc logique d'admettre qu'il existerait, dans ces conditions, une activation de la membrane qui serait plus étendue, et ceci, peut-être, en relation avec l'augmentation de la durée du P.A.

Afin de pouvoir attribuer une part des effets observés ci-dessus à l'action propre du Cl<sup>-</sup>, il convient d'entreprendre, comme nous l'avons d'ailleurs déjà précisé, l'étude de l'influence de la pression osmotique.

La solution normale, rendue hypertonique par addition de 1026 mM/l de saccharose ( $\pi$  est alors de valeur équivalente à celle du milieu  $[C1^-]_e = 2 X$ ) entraîne après 10 mn d'action environ une annulation réversible du P.A. (exemple figure 33). La disparition du P.A. n'est pas due à la diminution du P.R., faible d'ailleurs (7 mV en moyenne) car, là encore, le passage d'un courant constant



Figure 32 : Propagation du potentiel d'action dans les conditions normales (tracé a) et après 20 mn d'imbibition dans un milieu enrichi en  $Cl^{-}$  (tracé b).

L'amplitude du logarithme du potentiel d'action (V) est fonction linéaire de la distance (d) existant entre l'électrode de simulation et l'électrode d'enregistrement.

Les conditions anormales entraînent une propagation du P.A. sans décrément important (constante d'espace considérablement plus élevée que dans les conditions normales).



Figure 33 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu rendu hypertonique par addition de saccharose.

En bas : courant de stimulation

En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant

- 1 Dans les conditions normales
- 2 Après 5 mn d'action du milieu hypertonique
- 3 Après 10 mn.

Le milieu hypertonique entraîne la disparition du potentiel d'action.

hyperpolarisant et l'augmentation de l'intensité du courant de stimulation n'induisent pas le retour à une activité électrique.

En conséquence, un milieu de concentration normale en ions, mais hypertonique, exerce sur l'activité électrique de la fibre des effets inverses de ceux d'un milieu enrichi en C1<sup>-</sup> de même pression osmotique. Il convient, de ce fait, d'admettre que le C1<sup>-</sup> possède des effets propres dont l'importance se trouve, dans nos conditions expérimentales, relativement masquée par l'accroissement simultané de  $\pi$ .

Ainsi le Cl<sup>-</sup> en excès apparaît comme favorisant le déclenchement et la propagation du P.A. en agissant, semble-t-il, au début de la phase de dépolarisation. Pour étayer cette hypothèse, il convient maintenant d'étudier l'influence d'un milieu appauvri en Cl<sup>-</sup> et additionné de T.E.A. d'une part, d'un milieu hypertonique riche en NaCl d'autre part, dans le but de montrer si la phase ascendante du P.A. est sous l'influence prépondérante du Cl<sup>-</sup>, non du K<sup>+</sup>, et si le Na<sup>+</sup> est bien un inhibiteur de cette phase.

Le milieu  $[Cl_{e}]_{e} = 0,13 \text{ X}, \text{ T.E.A. obtenu en remplaçant le}$ NaCl du milieu normal par du propionate de sodium et en y ajoutant 20 mM/l de T.E.A., entraîne, comme le montre l'exemple de la figure 34, une annulation réversible du P.A. après 10 mn d'action. Ces effets sont semblables à ceux concernant l'action du milieu  $[Cl_{e}]_{e} = 0,13 \text{ X}$  (voir figure 29) qui entraîne une dépolarisation



Figure 34 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu appauvri en Cl et enrichi en T.E.A..

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 5 mn d'action du milieu anormal 3 - Après 10 mn 4 - Après 20 mn.

On remarque une dépolarisation membranaire de repos et une disparition du potentiel d'action.

membranaire et la disparition du P.A.. Ainsi il apparaît qu'effectivement le K<sup>+</sup> n'interviendrait pas lors de la phase de dépolarisation du P.A. et que, dans les conditions normales, l'augmentation de la résistance membranaire serait donc, comme nous l'avons déjà supposé, due à une diminution de la  $P_{C1}$ .

Quant à l'action du milieu enrichi en NaCl ( $[NaCl]_e = 2 X$ ), elle se traduit après 10 mn environ, comme le montre l'exemple de la figure 35, par une baisse du P.R. (12 mV en moyenne pour l'ensemble de nos résultats) et par une disparition du P.A.. Il est à noter que ces effets sont plus ou moins réversibles selon les fibres interrogées (8 fibres seulement sur 12 ont récupéré leur P.R. et leur P.A. initiaux 30 mn après le retour aux conditions normales).

Ainsi se confirme l'hypothèse selon laquelle la présence du Cl<sup>-</sup> extracellulaire est nécessaire pour que la fibre musculaire de crabe puisse être activée par un courant de stimulation efficace. D'autre part, l'amplitude de ce P.A. serait étroitement liée au gradient de concentration pour le Cl<sup>-</sup> et également à la concentration extracellulaire en Na<sup>+</sup>. Quant au K<sup>+</sup>, il n'interviendrait effectivement, par ses mouvements, que lors de la phase de repolarisation, et même plus précisément à la fin de la phase ascendante du P.A..

2.1.1.4 - Résumé et conclusion



Figure 35 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu enrichi en NaCl.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 5 mn d'action du milieu enrichi en NaCl 3 - Après 10 mn.

On remarque une dépolarisation membranaire de repos et une disparition du P.A..

L'action des ions  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $C1^-$  et du T.E.A., est de nature à suggérer le rôle pris par chaque ion monovalent dans le déroulement de la phase d'activité électrique de la fibre musculaire de crabe.

Ainsi la présence du Na<sup>+</sup> n'est pas indispensable pour permettre l'activation membranaire ; cet ion se comporterait plutôt comme un inhibiteur de la phase ascendante du P.A., sa concentration dans le milieu externe réglant, du moins partiellement, l'amplitude de celui-ci.

Le Cl<sup>-</sup>, par contre est nécessaire, puisque son absence dans le milieu extracellulaire abolit l'activité électrique, alors qu'un excès l'augmente en amplitude et en durée. Ses effets se situant, semble-t-il, au niveau de la phase de dépolarisation, seraient antagonisés, en première approximation, par ceux du Na<sup>+</sup>.

Ainsi, dans les conditions normales, puisque le rapport des concentrations intra- et extracellulaires de Cl<sup>-</sup> est tel que le travail résultant, somme algébrique du travail (W<sub>1</sub>) de la force osmotique (W<sub>1</sub> = RT log  $\frac{[C1^-]_e}{[C1^-]_i}$ ) et celui (W<sub>2</sub>) de la force électrique

 $(W_2 = EF)$  est en faveur d'une sortie nette passive de Cl<sup>-</sup>, (le potentiel d'équilibre de la pile au Cl<sup>-</sup> étant de - 56 mV, inférieur à celui du P.R. qui est de - 68 mV), il faut admettre, du fait de l'augmentation de R<sub>m</sub> pendant la phase de dépolarisation, que le flux net de Cl<sup>-</sup> serait de valeur bien plus faible qu'au repos et probablement de signe opposé (le gradient osmotique pour le Cl<sup>-</sup> n'étant pas modifié).

Enfin le K<sup>+</sup> serait responsable, par ses mouvements, de la phase de repolarisation lors du P.A.. Ces effets, se situeraient, comme nous l'avons vu (§ 2.1.1.2), à la fin de la phase ascendante. Le retour du P.M. à sa valeur de repos se traduisant par une diminution progressive de la valeur de R<sub>m</sub> qui tend à recouvrer sa valeur de repos serait lié à une augmentation de la P<sub>K</sub>, puisque le blocage de celle-ci par le T.E.A. et les effets de l'absence du K<sup>+</sup> extracellulaire conduisent à une augmentation de la durée du P.A..

¥ ¥

Puisque, semble-t-il, la conductance de la membrane au Cl<sup>-</sup> est diminuée pendant la phase ascendante du P.A. et non celle au K<sup>+</sup>, on peut comprendre que le P.M. tende vers une valeur voisine de - 10 mV, d'autant plus que la  $G_{Cl}$  de repos est supérieure à la  $G_{K}$  (MOUNIER et GUILBAULT, 1970).

Dans ces conditions, la valeur du P.M. s'approche de celle d'une pile de concentration à un cation qui ne peut être que le Na<sup>+</sup> ou le Ca<sup>++</sup>, compte-tenu du sens de leur gradient osmotique. Nous avons vu qu'il ne peut certainement pas s'agir d'un courant entrant de Na<sup>+</sup> puisque cet ion semble jouer un rôle inhibiteur (§ 2.1.1.1.) ; il ne reste donc que la possibilité d'un courant entrant de Ca<sup>++</sup>, dont on connaît l'importance dans le couplage excitation-contraction (SANDOW, 1965 ; GAINER, 1968 entres autres) et également dans le

déroulement de la phase ascendante du P.A. des fibres musculaires d'Invertébrés (FATT et GINSBORG, 1958 ; HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966).

Il convient donc d'étudier à présent l'évolution du P.A. sous l'action de milieux sans Ca<sup>++</sup> ou hypercalcique et sous celle du Mn<sup>++</sup> dont on connaît le rôle inhibiteur de la P<sub>Ca</sub> (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 ; HAGIWARA et TAKAHASHI, 1967 ; CORABOEUF et VASSORT, 1967).

2.1.2 - Rôle du calcium et de la  $P_{Ca}$ 

## 2.1.2.1 - Rôle du calcium

L'absence de Ca<sup>++</sup> dans la solution normale ( $[Ca^{++}]_e = 0$ ) obtenue en remplaçant mM à mM le CaCl<sub>2</sub> par du chlorhydrate de choline, entraîne comme le montre la figure 36 une disparition réversible du P.A. après 10 mn d'action environ, non imputable, comme nous l'avons vérifié, à une élévation du seuil de stimulation. Ces effets du milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup> révèlent que la présence de celui-ci dans le milieu extracellulaire est indispensable pour que puisse se manifester, à la suite d'une stimulation, l'activité électrique normale.

Puisque le courant de Ca<sup>++</sup> semble jouer un rôle important, il convient d'étudier l'influence du gradient de concentration calcique sur l'amplitude du P.A..



Figure 36 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu sans  $Ca^{++}$ .

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - En milieu de référence 2 - Après 5 mn d'action du milieu sans Ca<sup>++</sup> 3 - Après 10 mn. Un milieu normal enrichi en propionate de calcium  $(35,4 \text{ mM/1}) ([Ca^{++}]_e = 4 \text{ X})$  ne provoque pas de modifications notables du P.A. (figure 37) : aucune variation significative de l'amplitude n'est enregistrée ; seul un léger retard de repolarisation apparaît après 20 mn d'action du milieu anormal.

Cet effet pratiquement négligeable du milieu hypercalcique semblerait donc indiquer que le P.M. lors de la phase de dépolarisation ne tendrait pas vers une pile d'équilibre au Ca<sup>++</sup>. Dans de telles conditions, puisque le Ca<sup>++</sup> extracellulaire est indispensable à l'activation membranaire, mais que, par contre, la concentration calcique semble peu jouer, il faut envisager que le courant entrant responsable de la phase de dépolarisation pourrait ne pas être de nature calcique ; le Ca<sup>++</sup> jouerait un rôle indispensable certes, mais ne serait qu'un "intermédiaire".

Dans le but de confirmer une telle hypothèse, l'action du  $Mn^{++}$  (inhibiteur de la P<sub>Ca</sub>) sur l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe doit être faite.

2.1.2.2 - Rôle du Mn<sup>++</sup>

L'addition au milieu de référence de 10 mM/1 de  $MnC1_2$ (milieu-Mn<sup>++</sup>) entraîne comme l'absence de Ca<sup>++</sup> une disparition du P.A. après un temps d'action de 15 mn à 20 mn en moyenne (figure 38).

Ainsi, le milieu  $\left[Ca^{++}\right]_e = 0$  et le milieu-Mn<sup>++</sup> abolissent, tous deux, la possibilité de déclencher un P.A.. Toutefois



Figure 37 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu hypercalcique.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la membra**n**e

1 - Dans les conditions normales
 2 - Après 5 mn d'action du milieu hypercalcique
 3 - Après 10 mn
 4 - Après 20 mn.

Le potentiel d'action est peu modifié si ce n'est une légère augmentation de son amplitude.



Figure 38 : Action sur le potentiel d'action du milieu de référence additionné de  $Mn^{++}$ .

> En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 10 mn d'action du Mn<sup>++</sup> 3 - Après 20 mn.

Le potentiel d'action disparaît sous l'effet du Mn<sup>++</sup>.

il apparaît des différences essentielles d'effets de ces milieux.

- La première réside dans le fait que le milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup> exerce des effets réversibles, à l'inverse de ceux produits par le Mn<sup>++</sup>.

- Une autre différence apparaît en examinant les tracés de la figure 39 ;ils révèlent que la fibre dont le P.A. a été aboli par le  $Mn^{++}$  présente, après 30 mn d'imbibition dans le milieu -  $Mn^{++}$ , un phénomène de rectification déclenché par un courant dépolarisant remplaçant le courant responsable, dans les conditions normales, de la phase de dépolarisation du P.A.. A l'inverse, l'action d'un milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup> est telle qu'il n'est pas possible d'obtenir ce phénomène de rectification. Cette rectification membranaire observée en milieu- $Mn^{++}$ , indiquant un changement de la valeur de  $R_m$ , est traduite (figure 40) par la courbe exprimant la variation de l'amplitude (V) du P.M. en fonction de l'intensité (I) du courant hyper- ou dépolarisant appliqué à la membrane. La figure montre que la pente de la courbe augmente lorsque le P.M. atteint un niveau de potentiel égal à 38 mV.

- La troisième différence d'action du milieu ( $[Ca^{++}]_e = 0$ ) et du milieu additionné de Mn<sup>++</sup> se traduit, comme l'indique la figure 39, par le fait que, dans le cas du Mn<sup>++</sup> seulement, un plateau de dépolarisation se manifeste à la cessation du courant dépolarisant, l'amplitude et la durée de ce plateau étant fonction du niveau de potentiel atteint.



<u>Figure 39</u> : Effets d'un courant de stimulation d'intensité croissante sur la réponse électrique d'une fibre baignant depuis 30 mn dans la solution de référence additionné de  $Mn^{++}$ .

En bas : courants rectangulaires appliqués à la fibre. En haut : réponse de la fibre.

Pour un courant dépolarisant suffisant, une activité électrique apparaît d'autant plus durable que l'intensité du courant est élevée.





Pour des courants hyperpolarisants et pour des courants dépolarisants inférieurs à 6  $\mu A$ , la membrane répond passivement.

2.1.2.3 - Résumé et conclusion

Comme le permet de le suggérer l'analyse de nos résultats, la présence du Ca<sup>++</sup> extracellulaire est indispensable au déroulement de la phase ascendante du P.A.

Ce rôle du Ca<sup>++</sup>, compte-tenu des effets de son absence ou de l'augmentation de sa concentration dans le milieu externe, paraît tout d'abord se limiter à un rôle d'activateur n'intervenant pas de façon directe par l'apparition d'un courant calcique entrant ; en effet, l'augmentation de la concentration externe en Ca<sup>++</sup> ne se traduisant pas par un accroissement d'amplitude du P.A., et, à l'inverse, l'absence de Ca<sup>++</sup> abolissant l'activité électrique nous incline à choisir une telle hypothèse.

Cependant, l'étude de l'action du  $Mn^{++}$  annulant le P.A. plaide plutôt en faveur d'un courant calcique entrant puisque le  $Mn^{++}$ , rappelons-le, est bien connu comme agent inhibiteur de la  $P_{Ca}$ .

Ces deux hypothèses concernant le rôle du Ca<sup>++</sup>, en apparence contradictoires, pourraient être, au moins partiellement conciliées au vu des résultats portant sur l'action du Cl<sup>-</sup> (§ 2.1.1.3). Il semble en effet possible, pour expliquer le rôle du Ca<sup>++</sup>, de faire intervenir la diminution de la P<sub>Cl</sub> lors de la phase ascendante du P.A., diminution dont nous avons postulé l'existence en considérant l'augmentation de la R<sub>m</sub> de repos et la variation d'amplitude du P.A. en fonction de la concentration extracellulaire de Cl<sup>-</sup>. Ainsi, la phase de dépolarisation du P.A. de la fibre musculaire de crabe pourrait être déclenchée lors d'une stimulation électrique efficace, par une diminution de la  $P_{Cl}$  de repos responsable de l'apparition de la  $P_{Ca}$  conduisant à un couplage entre le courant de Cl<sup>-</sup> et le courant de Ca<sup>++</sup>.

\* \* \*

L'étude systématique de l'action de chacun des ions entrant dans la compostion du milieu de référence et d'inhibiteurs spécifiques de perméabilité (le T.E.A. pour la  $P_K$ , le  $Mn^{++}$  pour la  $P_{Ca}$ ) nous a conduits à formuler un certain nombre d'hypothèses pour tenter d'expliquer nos résultats expérimentaux. Dans le but de vérifier ces hypothèses, il convient à présent d'entreprendre l'étude des interactions éventuelles de chacun des ions et des inhibiteurs ( $Mn^{++}$ , T.E.A.). En effet, cette étude devrait permettre de dégager le rôle des différentes perméabilités ioniques impliquées lors de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe placée dans les conditions normales.

2.2 - Changements des perméabilités ioniques impliquées lors du P.A.

L'étude des variations de l'impédance membranaire, de l'amplitude et de la durée du P.A. nous ont amenés à émettre certaines hypothèses :

- l'augmentation de la  ${\rm R}_{\rm m}$  pendant le P.A. résulterait de

changements transitoires des perméabilités ioniques suivantes :

une diminution initiale de la perméabilité membranaire
au Cl<sup>-</sup>, associée à une apparition de celle au Ca<sup>++</sup> qui permettraient
le déroulement de la phase ascendante,

.une augmentation ultérieure de la perméabilité de la membrane au  $K^+$ , corroborée par le retour progressif à la valeur de repos de la conductance globale qui serait responsable de la phase de repolarisation.

- l'amplitude du P.A. serait sous la dépendance de la concentration extracellulaire du Na<sup>+</sup> (l'ion Na<sup>+</sup> agirait comme un inhibiteur de la phase ascendante) et dépendrait également d'un couplage entre les mouvements du Cl<sup>-</sup> et ceux du Ca<sup>++</sup>.

De façon à confirmer ces hypothèses, l'étude des effets de trois groupes de milieux anormaux, a été entreprise.

- ler groupe : il concerne l'action des milieux suivants : d'une part, milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup> et additionné de T.E.A. ; milieu hypercalcique enrichi en T.E.A. ; milieu enrichi en T.E.A. et Mn<sup>++</sup> ; l'étude de ces milieux est effectuée dans le but de montrer qu'une modification de la  $P_K$  n'induit pas l'apparition de la  $P_{Ca}$  responsable, comme on le sait, de la phase de dépolarisation (voir § 2.1.2) ; d'autre part, milieu enrichi en T.E.A. et Mn<sup>++</sup>, mais dépourvu de Na<sup>+</sup> ; milieu enrichi en T.E.A. et Mn<sup>++</sup>, dépourvu de Ca<sup>++</sup> ; cette étude a pour but de tenter de déterminer la nature du plateau de dépolarisation caractérisant le P.A. en milieu T.E.A. (§ 2.1.1.2).

- 2ème groupe : il concerne les milieux suivants : milieu ne contenant que les ions  $C1^-$  et  $Ca^{++}$  (à leur concentration normale),

 $\pi$  étant compensée par du saccharose ; même milieu mais enrichi en Cl<sup>-</sup>; l'action de ces deux milieux est effectuée, soit directement, soit après un traitement de la fibre par un milieu  $[C1^-]_e = 2 X$ . Les effets de ces milieux doivent permettre de montrer le rôle indispensable et suffisant des ions Cl<sup>-</sup> et Ca<sup>++</sup> dans le processus d'excitation.

- Enfin le 3ème groupe concerne les milieux enrichis en NaCl et de concentration calcique variable dont l'action est étudiée dans le but de montrer qu'il pourrait effectivement exister pour la fibre de crabe un antagonisme  $Na^+$  -  $Ca^{++}$ .

2.2.1 - Détermination du rôle de la  ${\rm P}_{\rm Ca}$  et de la  ${\rm P}_{\rm K}$  (effets des milieux du 1er groupe).

L'action du milieu dépourvu de Ca<sup>++</sup> et additionné de 20 mM/1 de T.E.A. ( $[Ca^{++}]_e = 0, T.E.A.$ ) se traduit sur le P.A., préalablement augmenté en durée et en amplitude par ce même inhibiteur, par une diminution progressive de son amplitude qui conduit à sa disparition après 20 mn (figure 41). Quant à la durée du P.A., elle augmente préalablement avant de diminuer, ou bien diminue continuellement.

Nous avons vu précédemment (§ 2.1.2.2) qu'un courant dépolarisant de valeur suffisante appliqué de part et d'autre de la membrane de la fibre dans le but de remplacer la phase de dépolarisation abolie par le Mn<sup>++</sup>, permet l'apparition d'un plateau de



<u>Figure 41</u> : Action d'un milieu additionné de T.E.A. et sans  $Ca^{++}$  sur le potentiel d'action d'une fibre placée initialement dans le même milieu mais contenant le  $Ca^{++}$  à la concentration normale.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant

- 1 Après action préalable du T.E.A.
- 2 Après 3 mn d'action conjugée du T.E.A. et de l'absence de Ca<sup>++</sup>
- 3 Après 5 mn
- 4 Après 10 mn
- 5 Après 20 mn.

Le potentiel d'action, préalablement allongé par le T.E.A., diminue en amplitude puis disparaît. dépolarisation (voir figure 39). De façon à préciser la nature du plateau, nous avons procédé de la même façon sur les fibres rendues inexcitables par action du milieu  $[Ca^{++}]_e = 0$ , T.E.A.. La figure 42 révèle que le courant tardif responsable du plateau obtenu en milieu T.E.A. serait de nature calcique puisque l'absence de Ca<sup>++</sup> extracellulaire empêche son apparition, bien que la dépolarisation imposée à la membrane soit très ample.

L'existence de ce plateau en milieu contenant du Ca<sup>++</sup> et du T.E.A. semblerait liée à un courant de Ca<sup>++</sup> entrant permis, soit par une prolongation de la diminution initiale de la  $P_{C1}$  non antagonisée par une rectification potassique normale responsable dans les conditions normales du retour plus rapide du P.M. à sa valeur de repos, soit par l'apparition d'une rectification potassique anormale.

Il faut cependant préciser, à l'encontre de l'hypothèse concernant l'existence d'un courant calcique tardif, que le  $Mn^{++}$ , connu comme inhibiteur de la  $P_{Ca}$ , permet le développement d'un plateau de dépolarisation durable sous l'action d'une dépolarisation membranaire importante (§ 2.1.2.2 figure 39). Toutefois, les différentes hypothèses concernant la nature du plateau pourraient être conciliées en tenant compte des délais d'action différents du T.E.A. et du Mn<sup>++</sup>.

Le milieu contenant du T.E.A. (20 mM/1) et du Mn<sup>++</sup> (10 mM/1) entraîne transitoirement (pendant les 7 premières mn en moyenne) une augmentation d'amplitude et de durée du P.A. précédant sa disparition qui survient après 30 mn d'action (figure 43).



<u>Figure 42</u> : Réponse électrique à des courants d'intensité croissante de la fibre baignant depuis 20 mn dans un milieu sans Ca<sup>++</sup> additionné de T.E.A..

En bas : courants imposés à la membrane En haut : réponse électrique de la membrane à ces courants.

On remarque que, dans ces conditions, même si l'on augmente le courant de stimulation, la fibre présente pas de plateau à la cessation du courant.



Figure 43 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu additionné de T.E.A. et de  $Mn^{++}$ .

En bas : courant de stimulation
En haut : réponse électrique de la membrane à ce courant

1 - Dans les conditions normales
2 - Après 2 mn d'action du milieu anormal
3 - Après 5 mn
4 - Après 10 mn
5 - Après 20 mn.

On observe une disparition du potentiel d'action après une augmentation temporaire de son amplitude et de sa durée.

L'explication de l'action de ce milieu anormal peut être apportée en tenant compte des résultats antérieurs : en effet le  $Mn^{++}$  annule le P.A. après un temps supérieur à 20 mn (§ 2.1.2.2., figure 38) alors que le T.E.A. allonge le P.A. seulement 5 mn après le début de son action (§ 2.1.1.2., figure 28). Ainsi, le blocage de la P<sub>K</sub> rapide, celui de la P<sub>Ca</sub> plus lent semblent permettre d'expliquer les résultats obtenus précédemment.

D'autre part, le P.A. préalablement augmenté en amplitude et en durée par l'action simultanée du  $Mn^{++}$  et du T.E.A. (après 5 à 8 mn) disparaît rapidement (5 mn) et réversiblement sous l'action du milieu contenant ces deux inhibiteurs mais dépourvu de Ca<sup>++</sup> (figure 44) et ne s'annule que très lentement (de 15 à 20 mn) sous l'action du milieu contenant toujours les mêmes inhibiteurs, mais cette fois dépourvu de Na<sup>+</sup> (figure 45).

Ainsi, en tenant compte de la durée minimale d'action des milieux T.E.A., Mn<sup>++</sup>, sans Ca<sup>++</sup> et T.E.A., Mn<sup>++</sup>, sans Na<sup>+</sup>, comme le montrent les courbes de la figure 46, la preuve semble apportée que le plateau de dépolarisation, apparaissant dans certaines conditions, serait de nature calcique.

Dans le but de confirmer l'hypothèse du courant calcique tardif, lié à une diminution de la  $P_{C1}$ , ou de la  $P_K$ , ou des deux, responsable de l'augmentation de la durée du P.A., les effets d'un milieu hypercalcique enrichi en T.E.A. ( $[Ca^{++}]_e = 4 X, T.E.A.$ ) sont analysés.



<u>Figure 44</u> : Effets d'un milieu additionné de T.E.A. et de  $Mn^{++}$ , sans  $Ca^{++}$ , sur le potentiel d'action préalablement allongé par imbibition de la fibre dans un milieu normal enrichi de T.E.A. et  $Mn^{++}$ .

En bas : courant de stimulation
En haut : réponse électrique de la fibre

Après prétraitement dans un milieu additionné de
T.E.A. et de Mn<sup>++</sup>
Après 2 mn d'action d'un même milieu, mais sans
Ca<sup>++</sup>
Après 5 mn
Après 10 mn.

L'absence de Ca<sup>++</sup> fait disparaître rapidement le potentiel d'action allongé en durée et en amplitude par le T.E.A. et le  $Mn^{++}$ .



<u>Figure 45</u> : Effets d'un milieu additionné de T.E.A. et de Mn<sup>++</sup>, sans Na<sup>+</sup>, sur le potentiel d'action préalablement allongé par imbibition de la fibre dans un milieu normal enrichi en T.E.A. et en Mn<sup>++</sup>.

> En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre 1 - Après prétraitement dans un milieu enrichie en T.E.A. et en Mn<sup>++</sup>

- 2 Après 5 mn d'action dans le même milieu, mais privé de Na<sup>+</sup>
- 3 Après 10 mn
- 4 Après 20 mn.

L'absence de Na<sup>+</sup> ne fait disparaître que très tardivement le potentiel d'action allongé en durée et en amplitude par le T.E.A. et le  $Mn^{++}$ .



<u>Figure 46</u> : Amplitude (V) de la réponse électrique de la fibre prétraitée par du T.E.A. et du  $Mn^{++}$  en fonction du temps.

- (a) baignant dans un milieu enrichi en T.E.A. et en Mn<sup>++</sup> privé de Na<sup>+</sup>
- (b) baignant dans un milieu enrichi en T.E.A. et Mn<sup>++</sup> privé de Ca<sup>++</sup>.

La figure 47 montre que ce milieu hypercalcique n'entraîne pas de modifications significatives de l'amplitude et de la durée du plateau de dépolarisation comparées à celles provoquées par l'action d'un milieu normal additionné de T.E.A.. Pourtant, du fait de l'augmentation du gradient de concentration du Ca<sup>++</sup>, on pourrait s'attendre à l'apparition d'une inversion de potentiel plus importante. Il faut cependant, à cet égard, faire remarquer que l'étude des milieux hypercalciques (§ 2.1.2.1., figure 37) nous a conduits à suggérer que les mouvements du Cl<sup>-</sup> seraient couplés à ceux du Ca<sup>++</sup>, et qu'ainsi l'augmentation d'amplitude pourrait être masquée.

Cependant un doute subsiste, doute qui ne peut être levé, semble-t-il, qu'en émettant une hypothèse supplémentaire. En effet, nous avons précédemment mentionné (§ 2.1.2.2.) qu'un plateau peut être obtenu en milieu Mn<sup>++</sup> par application d'un courant électrique dépolarisant remplaçant le courant ionique initial entrant bloqué par le Mn<sup>++</sup>. Dans ce cas, il pourrait peut être s'agir d'une inhibition incomplète de la P<sub>Ca</sub> par le Mn<sup>++</sup>. S'il en était ainsi, on ne pourrait pas faire état de l'utilisation d'une concentration en  $Mn^{++}$  trop faible (10 mM/l) pour bloquer la  $P_{Ca}$  car nous avons au préalable vérifié qu'une concentration double (20 mM/1) produisait des effets évoluant dans le temps d'une manière identique. Peut être vaudrait-il mieux faire intervenir dans ce cas, comme nous l'avons déjà suggéré, le démasquage d'une pile au Na<sup>+</sup> (la P<sub>Na</sub> de repos n'étant pas négligeable, comme l'ont montré MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT en 1969) quand cesse l'influence prépondérante de celle au Ca<sup>++</sup>.

\* \*



Figure 47 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu enrichi en T.E.A. et en  $Ca^{++}$ .

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la membrane 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 10 mn d'action du milieu anormal 3 - Après 20 mn.

Le potentiel d'action devient plus ample et plus durable.

L'ensemble de nos résultats tend à suggérer que trois ions participent, de façon prépondérante, à l'activation de la fibre musculaire de crabe dans les conditions normales, à savoir : le  $Ca^{++}$ , le  $Cl^-$  et le  $K^+$ ; le  $Ca^{++}$  et le  $Cl^-$  interviendraient pendant la phase de dépolarisation, le  $K^+$  lors de la phase de repolarisation.

De manière à confirmer ces rôles respectifs sont abordés maintenant les effets de milieux ne contenant que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup>.

2.2.2 - Rôle prépondérant du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup> (effets des milieux du 2ème groupe).

Le milieu ne contenant que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup> aux concentrations normales,  $([Cl_]_e = 1 X, [Ca^{++}]_e = 1 X)$ , la  $\pi$  étant compensée par apport convenable de saccharose, permet, comme l'indique l'exemple de la figure 48, même après 30 mn d'action, la persistance d'une activité électrique. D'autre part, le P.R. accuse une baisse d'amplitude de 16 mV en moyenne, qui serait due à la diminution de la P<sub>K</sub> provoquée par l'absence du K<sup>+</sup> extracellulaire, le P.R. prenant alors dans ces conditions une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre au Cl<sup>-</sup> (MOUNIER, 1970).

L'action du milieu  $[Cl_e]_e = 2 X$ ,  $[Ca_e^{++}]_e = 1 X$  sur le P.A. préalablement allongé par le milieu  $[Cl_e]_e = 2 X$  (voir § 2.1.1.3.) se traduit, comme le montre l'exemple de la figure 49, par une diminution importante de sa durée qui devient égale à celle du P.A. obtenu dans les conditions normales mais qui se traduit également


<u>Figure 48</u> : Action sur le potentiel d'action d'un milieu ne contenant que du  $Ca^{++}$  et du  $Cl^{-}$  (pression osmotique compensée).

En bas : courant de stimulation
En haut : réponse électrique de la fibre à cette stimulation

Dans les conditions normales
- Après 5 mn d'action du milieu anormal
- Après 10 mn
- Après 20 mn.

On remarque un maintien de l'activité électrique, avec toutefois une diminution de son amplitude et une baisse du potentiel de repos.



Figure 49 : Action sur le potentiel d'action d'un milieu enrichi en  $Cl^-$ , puis du même milieu, mais privé de K<sup>+</sup>, de Na<sup>+</sup> et de Mg<sup>++</sup>.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Dans les conditions normales 2 - Après 20 mn d'action du milieu  $\begin{bmatrix} CI \\ e \end{bmatrix}_e = 2 X$ 3 - Après 40 mn d'action du milieu  $\begin{bmatrix} CI \\ e \end{bmatrix}_e = 2 X$ ,  $\begin{bmatrix} Ca^{++} \end{bmatrix}_e = 1 X$ 

Le potentiel d'action dans ces conditions, reste de grande amplitude.

par l'absence de variation notable de son amplitude, ces effets se maintenant même après 40 mn d'action de ce milieu anormal.

A l'inverse, si l'on fait agir, dans les mêmes conditions, c'est-à-dire après un prétraitement de la fibre par un milieu enrichi en Cl<sup>-</sup>, le milieu utilisé précédemment ne contenant que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup> aux concentrations de référence ( $[Cl<sup>-</sup>]_e = 1 X$ ,  $[Ca^{++}]_e = 1 X$ ), on peut remarquer, comme l'indique l'exemple de la figure 50, qu'apparaît progressivement une annulation de l'activité en 25 mn environ.

Ainsi,des différences importantes apparaissent quant aux effets de ces deux milieux  $([C1^-]_e = 2 X, [Ca^{++}]_e = 1 X et [C1^-]_e = 1 X, [Ca^{++}]_e = 1 X)$  sur le P.A. préalablement modifié par action du milieu de référence enrichi en C1<sup>-</sup>. Elles sembleraient indiquer que la fibre de crabe pourrait en quelque sorte "s'adapter" aux milieux enrichis en C1<sup>-</sup>; en effet, le retour d'une concentration en C1<sup>-</sup> double  $([C1^-]_e = 2 X)$  à une concentration normale  $([C1^-]_e = 1 X)$  entraîne une annulation du P.A. tout comme le passage de la concentration en C1<sup>-</sup> normale  $([C1^-]_e = 1 X)$  à la concentration presque nulle  $([C1^-]_e = 0,13 X)$ .

Le maintien de l'amplitude du P.A. et de l'augmentation de la vitesse de la phase ascendante, dans le cas de l'action du milieu  $[Cl_e^-]_e = 2 X$ ,  $[Ca_e^{++}]_e = 1 X$ , confirme l'hypothèse du rôle primordial, lors de la phase de dépolarisation, des mouvements de Cl<sup>-</sup> couplés à ceux du Ca<sup>++</sup>. De plus, le fait que la durée du P.A. soit la



Figure 50 : Action d'un milieu ne contenant à la concentration normale que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup> ( $\pi$  compensée par apport de saccharose) sur le potentiel d'action préalablement allongé par effet du milieu normal enrichi en Cl<sup>-</sup>.

En bas : courant de stimulation En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant 1 - Après action préalable du milieu enrichi en Cl<sup>-</sup> 2 - Après 3 mn d'action du milieu sans Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> 3 - Après 5 mn 4 - Après 10 mn 5 - Après 20 mn .

Le potentiel d'action préalablement allongé disparaît.

même que dans les conditions normales (comparaison des tracés 1 et 3 de la figure 49) plaide en faveur, semble-t-il de la seule modification de la  $P_{C1}$  qui serait responsable (avec celle de la  $P_{Ca}$ ) du décours du P.A., étant donné que l'absence de K<sup>+</sup> extracellulaire ne semble pas induire de rectification anormale potassique à l'origine du maintien de la dépolarisation.

Ainsi, l'augmentation de la durée de la phase de repolarisation provoquée par action du milieu normal enrichi en Cl<sup>-</sup>  $([Cl^-]_e = 2 X)$  pourrait correspondre, en prenant en considération les suggestions ci-dessus, à l'apparition d'une rectification potassique dont l'importance rendrait compte de l'amplitude et de la durée du plateau.

> \* \* \*

L'ensemble de nos interprétations nous a amenés à entrevoir la possibilité d'un couplage entre les mouvements du Cl<sup>-</sup> et ceux du Ca<sup>++</sup> réglant l'amplitude du P.A. qui dépendrait également de la concentration extracellulaire du Na<sup>+</sup> comme nous l'a suggéré l'étude du milieu dépourvu de Na<sup>+</sup> (§ 2.1.1.1., figure 26) et du milieu enrichi en NaCl (§ 2.1.1.3., figure 35). Dans le but de préciser ce rôle inhibiteur du Na<sup>+</sup> et ceux du Ca<sup>++</sup>, sont étudiés maintenant les effets, de milieux enrichis en NaCl et en Ca<sup>++</sup>.

2.2.3 - Rôle inhibiteur du Na<sup>+</sup> sur l'activité électrique (effets des milieux du 3ème groupe) Nous savons que le milieu enrichi en NaCl ( $[NaCl]_e = 2 X$ ) entraîne, comme cela a été précisé au § 2.1.1.3., une disparition de l'activité électrique non imputable totalement à l'augmentation de  $\pi$  puisqu'un milieu enrichi en Cl<sup>-</sup> ( $[Cl^-]_e = 2 X$ ) de même  $\pi$  provoque, au contraire, une augmentation d'amplitude et de durée du P.A. (§ 2.1.1.3., figure 30). Dans de telles conditions, il semblerait que l'on puisse attribuer la différence entre les effets des deux milieux rappelés ci-dessus qu'à la seule présence du Na<sup>+</sup> en excès. Comme la phase ascendante du P.A. paraît être de nature calcique, il semble aussi possible d'attribuer au Na<sup>+</sup> un rôle d'antagoniste du Ca<sup>++</sup>, ce que doit permettre de vérifier l'étude des effets de milieux enrichis en NaCl et en Ca<sup>++</sup> :  $[NaCl]_e = 2 X$ ,  $[Ca^{++}]_e = 2 X$  d'une part et  $[NaCl]_e = 2 X$ ,  $[Ca^{++}]_e = 6 X$ , d'autre part.

Le milieu dont les concentrations en Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et Ca<sup>++</sup> sont doublées, entraîne, au niveau de la fibre (figure 51) outre une dépolarisation membranaire moyenne de 10 mV, une annulation du P.A. qui n'est due ni à la baisse du P.R., ni à une intensité de stimulation insuffisante, comme nous l'avons vérifié en rétablissant le P.R. à sa valeur initiale par un courant hyperpolarisant et en augmentant l'intensité du courant de stimulation.

Le milieu  $[NaCl]_e = 2 X$ ,  $[Ca^{++}]_e = 6 X$ , à l'inverse, permet, comme le montre l'exemple de la figure 52 le maintien d'un



<u>Figure 51</u> : Action sur le potentiel d'action d'un milieu dont les concentrations en ions  $Na^+$ ,  $Cl^-$  et  $Ca^{++}$  sont doublées.

En bas : courant de stimulation
En haut : réponse électrique de la fibre à ce courant
1 - Dans les conditions normales
2 - Après 5 mn d'action du milieu anormal
3 - Après 10 mn
4 - Après 20 mn.

On remarque une dépolarisation membranaire de repos et une disparition du potentiel d'action.



<u>Figure 52</u> : Action sur le potentiel d'action d'un milieu dont les concentrations du Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> sont doublées, celle du Ca<sup>++</sup> étant multipliée par 6.

En bas : courant de stimulation
En haut : réponse de la membrane à ce courant

Dans les conditions normales
Après 5 mn d'action du milieu anormal
Après 10 mn
Après 15 mn
Après 20 mn.

On remarque une dépolarisation membranaire de repos et une augmentation de l'amplitude du potentiel d'action.

P.A. plus ample (32 p.100 en moyenne) que dans les conditions normales mais de durée identique bien qu'il y ait une baisse corrélative du P.R. de quelques mV en moyenne.

L'étude de l'influence de la concentration du Ca<sup>++</sup> en milieu enrichi en NaCl, sur l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe, conduit à suggérer que le Na<sup>+</sup> agirait bien sur les mouvements du Ca<sup>++</sup> et par là sur ceux du Cl<sup>-</sup> responsables de la phase de dépolarisation.

De plus, la levée de l'inhibition sodique par augmentation de la concentration du Ca<sup>++</sup> amenant une élévation de l'amplitude du P.A., n'entraîne pas, par contre, de modification de la durée de celui-ci. Ceci laisserait supposer que la rectification anormale potassique, dont a été postulée l'existence, ne serait pas liée, quant à son importance, au niveau de potentiel atteint, mais serait plutôt en relation avec la valeur de la rectification membranaire qui la précéderait, c'est-à-dire celle au Cl<sup>-</sup>.

2.2.4 - Résumé et conclusion

Les changements de perméabilités ioniques membranaires impliqués lors de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe soumise à des milieux anormaux nous amènent à proposer ce que pourrait être le processus ionique responsable du P.A. dans les conditions normales.

La phase de dépolarisation semblerait liée à une diminu-

tion de la  $P_{C1}$  et à l'apparition simultanée d'une  $P_{Ca}$ . En effet, l'étude de l'action des milieux de concentrations différentes en Cl<sup>-</sup> ou en Ca<sup>++</sup> (§ 2.1.1.3. et 2.1.2.1.) ainsi que celle du Mn<sup>++</sup> (§ 2.1.2.2.) nous a suggéré l'éventualité d'une telle hypothèse. Celle-ci se trouve étayée par l'analyse des résultats concernant, d'une part l'action d'un milieu additionné de T.E.A. (soit dépourvu de Ca<sup>++</sup>, soit additionné de Mn<sup>++</sup>), qui se traduit par une disparition de la phase ascendante du P.A., d'autre part l'action de milieux ne contenant que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup>, qui se traduit, soit par le maintien, soit par l'augmentation de l'amplitude du P.A. selon la concentration externe du Cl<sup>-</sup> dans le milieu anormal.

L'absence d'inversion de potentiel dans les conditions normales serait liée :

- tout d'abord à la concentration du Na<sup>+</sup> extracellulaire qui jouerait le rôle d'inhibiteur comme semble le confirmer l'étude des milieux enrichis en NaCl et en Ca<sup>++</sup>.

- ensuite, comme on pourrait le supposer, à un maintien de la  $P_K$  à sa valeur de repos pendant la durée du P.A.. Cette valeur de  $P_K$  ne changerait que sous l'influence du T.E.A. qui serait, dans ces conditions, à l'origine d'une rectification membranaire potassique anormale rendant compte de l'accroissement d'amplitude du P.A. et de sa durée. A l'appui de cette hypothèse, on peut préciser l'absence d'effets sur la durée du P.A. des milieux ne contenant que les ions C1<sup>-</sup> et Ca<sup>++</sup> qui peuvent, néanmoins permettre le maintien d'une activité électrique ; en effet l'action de ces milieux, privés donc de K<sup>+</sup>, induit, comme cela est connu (HODGKIN et HOROWICZ, 1959 ; MOUNIER, 1970), une forte diminution de la P<sub>K</sub> de repos, qui pourrait rendre compte de l'absence de plateau en milieu  $[C1^-]_e = 2 X$ ,  $[Ca^{++}]_e = 1 X$ .

Quant à la phase de repolarisation dans les conditions normales, elle pourrait être due comme nous l'avons déjà suggéré à l'apparition d'une rectification potassique normale ; mais l'absence d'effets notables sur le P.A. du milieu dépourvu de K<sup>+</sup> (§ 2.1.1.2.) ou des milieux ne contenant que du Cl<sup>-</sup> et du Ca<sup>++</sup>, plaiderait plutôt en faveur d'un retour de la P<sub>Cl</sub> à sa valeur de repos. Ce retour à la valeur de repos serait associé à la disparition concomitante de la P<sub>Ca</sub>.

## V - DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats que nous avons présentés nous ont amenés à formuler les hypothèses ayant pour but de tenter d'entrevoir les processus ioniques membranaires responsables de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe. Il convient maintenant de les rassembler et de les discuter en les confrontant avec l'ensemble des résultats acquis concernant les fibres musculaires d'Invertébrés.

## 1 - Caractéristiques de repos

Il est maintenant admis que la fibre musculaire d'Invertébré au repos n'est pas en équilibre thermodynamique avec le milieu extracellulaire (voir LOCKWOOD, 1968) et que son P.R. correspond à une pile de diffusion dont le calcul de la valeur fait intervenir les concentrations intra- et extracellulaires ainsi que les perméabilités respectives de la membrane aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>. GIRARDIER et Coll. (1963) sur la fibre d'écrevisse ; GAINER et GRUNDFEST (1968) sur la fibre de homard ; RICHARDS (1969), MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 a), MOUNIER et GUILBAULT (1970) sur la fibre de crabe montrent l'existence de cette pile de diffusion bien que certains auteurs, cependant, considèrent que le P.R. de cette dernière fibre est régi par un équilibre de DONNAN (SHAW, 1955 ; HAYS, LANG et GAINER, 1968).

L'hypothèse de la pile de diffusion se trouve vérifiée par nos mesures du P.R. faites en utilisant la technique du pont de

saccharose. En effet, la valeur moyenne du P.R. mesurée dans nos conditions expérimentales est voisine de 75 mV, valeur égale à celle du potentiel d'équilibre de la pile au K<sup>+</sup> ( $E_K$ ), celle au Cl<sup>-</sup> ( $E_K$ ) étant de 56 mV (MOUNIER, 1970). En tenant compte du fait que la membrane sarcolemmique de la fibre musculaire d'écrevisse serait préférentiellement perméable au K<sup>+</sup>, celle du S.T.T. au Cl<sup>-</sup> selon GIRARDIER et Coll. (1963), hypothèse confirmée au niveau de la fibre de crabe par MOUNIER et GUILBAULT (1970), et du fait que la structure membranaire complexe du S.T.T. (PEACHEY, 1967 et MATHIEU, 1971 entre autres) permet la communication entre les différents compartiments (§ A, 2.2), l'hypothèse de la pile de diffusion se trouve vérifiée. En effet, l'élimination progressive de la pile au Cl<sup>-</sup> par la diffusion du saccharose à l'ensemble de la fibre par la voie du S.T.T., explique que le P.R. puisse atteindre une amplitude de 75 mV, plus importante que celle mesurée par microélectrode.

La présence d'une perméabilité préférentielle à un ion pour un système membranaire déterminé et d'une valeur différente de  $E_K$  et de  $E_{C1}$  (MOUNIER, 1970) impliquent l'existence de courants locaux entrant dans la fibre par les tubules transverses. Cette existence de courants locaux paraît d'ailleurs être confirmée par les résultats de FATT et KATZ (1953) et de MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 a) qui donnent des valeurs du P.M. s'échelonnant entre 55 et 80 mV, montrant par là, qu'il existe une grande variabilité, attribuée selon ces auteurs, soit au lieu d'implantation de la microélectrode ou, soit à l'état physiologique de la fibre.

Enfin, l'étude de la propagation du courant de court-circuit nous a amenés à supposer que la résistance interne (R<sub>i</sub>) du milieu intracellulaire serait de valeur élevée, bien que les résultats de FATT et KATZ (1953) concernant la propagation électrotonique de courants sous-liminaires ont conduit ces auteurs à donner pour R<sub>i</sub> une valeur moyenne de 50  $\Omega$ .cm qui se trouve être satisfaisante puisqu'elle permet de calculer une résistance membranaire ( ${\rm R}_{\rm m}^{})$  de 130  $\Omega.cm^2$ , valeur retrouvée par EISENBERG (1967) ainsi que par MOUNIER, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1969 b). Si cette valeur de  $R_i$ paraît compatible avec les valeurs de  $\lambda$  et de  $R_{m}^{},$  il n'en reste pas moins vrai qu'elle n'explique pas, comme nous l'avons constaté, qu'une lésion d'une des extrémités de la fibre de crabe n'entraîne pas l'annulation du P.R. à l'autre extrémité, et que, de plus, le shunt membranaire produit par une microélectrode argentée ne provoque pas une dispersion importante des lignes de courant. Peut-être doit on faire intervenir un comportement différent de la fibre suivant qu'elle se trouve soumise à un courant sous-liminaire ou qu'on l'oblige à débiter un courant dans une résistance très faible.

### 2 - Potentiel d'action

Nous avons observé en accord avec les travaux de FATT et

KATZ, (1953) que le P.A. de la fibre de crabe est de faible amplitude et qu'il ne présente généralement pas d'inversion de potentiel.

Cette faible amplitude peut s'expliquer en tenant compte des phénomènes suivants : le maintien d'une certaine perméabilité ionique de repos pendant le P.A., la propagation de ce P.A., ainsi que la variation concomitante de la conductance membranaire  $(G_m)$ correspondant à une augmentation de la  ${\rm R}_{\rm m}$  de repos. La propagation de ce P.A. selon un processus électrotonique, traduite par la variation linéaire du logarithme décimal de l'amplitude du P.A. en fonction de la distance qui sépare son lieu d'enregistrement de celui de son initiation, et non selon un processus régénératif, peut être une cause de sa faible amplitude. La constante d'espace ( $\lambda$ ) lors de l'activité de la fibre est de valeur supérieure à celle de repos (1,2 mm contre 0,8 mm). Etant donné que la valeur de  $\lambda$  augmente, cela traduit une augmentation de la  ${\rm R}_{\rm m}$  de repos puisque  ${\rm r}_{\rm i}$  peut être considérée comme une constante dépendant de la forme du "cylindre" constitué par le milieu intracellulaire. Dans de telles conditions, cette variation de  ${\rm R}_{\rm m}$  ne correspond en fait qu'à une variation de valeur bien inférieure, puisque le P.A. ne se propage pas à l'ensemble de la structure membranaire : la résistance de "l'élément membranaire" ou plus exactement de la zone excitée se trouverait shuntée par la résistance plus faible du reste de la fibre.

L'autre cause de l'absence d'inversion de potentiel peut

provenir d'un maintien pendant l'activité de la fibre de la perméabilité de repos relativement importante de la membrane au K<sup>+</sup> (la  $G_K$  de repos étant de l'ordre de 40 p.100 de  $G_m$  d'après MOUNIER, 1970), puisque FATT et KATZ (1953) montrent que le T.E.A. dont l'action essentielle est de bloquer la P<sub>K</sub> (HAGIWARA et WATANABE, 1955) allonge considérablement et réversiblement la durée du P.A.. Il faut toutefois préciser que dans les conditions de FATT et KATZ, le T.E.A. agit à très forte concentration et qu'en fait il remplace le Na<sup>+</sup> du milieu externe. Cependant, comme nous l'avons précisé, nos expériences montrent que 20 mM/1 de T.E.A. ajoutées au liquide physiologique produisent sur la fibre de crabe des effets semblables. De plus, l'absence d'effets notables sur le P.A. d'un milieu dépourvu de K<sup>+</sup>, comme nous l'avons observé, plaide, là encore, en faveur d'un maintien de la P<sub>K</sub> à sa valeur de repos pendant l'activité.

Quant à la génèse et au décours du P.A., il semble, comme nous l'avons déjà signalé, qu'il faille faire intervenir un changement de la conductance membranaire au Cl<sup>-</sup> déclenchant l'apparition d'une perméabilité calcique.

L'absence de Na<sup>+</sup> du milieu extracellulaire se traduit par une augmentation de l'amplitude du P.A. analogue à celle obtenue par FATT et KATZ (1953) sur le même matériel et dans les mêmes conditions. Cet effet du milieu sans Na<sup>+</sup> montre que le sommet du P.A. obtenu dans les conditions normales, qui correspond à une valeur du P.M. bien plus faible que celle des fibres excitables de Vertébrés, ne tend

pas vers un potentiel d'équilibre de pile de concentration au Na<sup>+</sup>. Dans de telles conditions, il semble qu'il faille plutôt considérer le Na<sup>+</sup> comme un inhibiteur de la phase ascendante du P.A. antagonisant l'entrée de Ca<sup>++</sup>. Cet antagonisme Ca<sup>++</sup>-Na<sup>+</sup> pourrait correspondre à celui décrit par LÜTTGAU et NIEDERGERKE (1958) au niveau des fibres cardiaques.

L'absence du  $Ca^{++}$  dans le milieu externe se traduit par une annulation réversible du P.A. tout comme d'ailleurs l'absence de Cl<sup>-</sup>. Ces résultats confirmant, en partie tout au moins, ceux de REUBEN, BRANDT, GARCIA et GRUNDFEST (1967) obtenus sur la fibre d'écrevisse et de GAINER et GRUNDFEST (1968) sur la fibre de homard, inclinent donc à considérer que la phase ascendante du P.A., correspondant à une diminution de la conductance membranaire globale aux ions, serait due à une diminution de la  $G_{C1}$  ( $G_K$  de repos ne variant pas) associée à l'apparition d'une conductance membranaire au  $Ca^{++}$ . De plus, le fait que la seule absence du  $Cl^{-}$ , ou que celle du  $Ca^{++}$  se traduisant dans les deux cas par l'annulation du P.A. permet de concevoir que le courant de Ca<sup>++</sup> serait couplé à une diminution du courant de Cl<sup>-</sup>. En effet, l'expérience montre que le blocage du courant entrant de Ca<sup>++</sup> ou la diminution plus forte du courant de Cl<sup>-</sup> se traduisent, dans le premier cas par une absence d'excitation de la fibre (action du Mn<sup>++</sup>) et, dans le deuxième cas par une augmentation de l'amplitude du P.A. (en milieu riche en C1<sup>-</sup>). Dans ce dernier cas, l'augmentation du gradient de concentration pour le Cl pourrait entraîner un efflux moindre de Cl.

L'hypothèse d'un couplage des variations de perméabilités de la membrane au Ca<sup>++</sup> et au Cl<sup>-</sup> peut, semble-t-il, être retenue en prenant en considération l'existence de la perméabilité sélective au Cl<sup>-</sup> de S.T.T. de la fibre d'écrevisse (GIRARDIER et Coll., 1963) et de la fibre musculaire de crabe (MOUNIER et GUILBAULT, 1970). En effet, ces derniers auteurs montrent qu'en absence de Cl<sup>-</sup>, la fibre perd ses propriétés rectificatrices dont on sait, pour les fibres de Vertébrés, qu'elles sont dues à une diminution de P<sub>K</sub> et qu'elles siègent au niveau de ce S.T.T. (HODGKIN et HOROWICZ, 1959 ; KAO et STANFIELD, 1968 ; TAKEDA et OOMURA, 1969 ; ILDEFONSE, PAGER et ROUGIER, 1969).

Cette hypothèse de la rectification au Cl<sup>-</sup> de la membrane du S.T.T. de la fibre musculaire de crabe, responsable de la phase ascendante du P.A., se trouve, de plus, étayée par le fait que la vitesse de cette phase est relativement faible, comparée à celle des fibres excitables de Vertébrés : pour ces dernières fibres, cette phase ascendante est produite par un fort courant de Na<sup>+</sup> entrant passant par des "canaux" spécifiques situés au niveau de la membrane sarcolemmique.

Enfin, dans certaines conditions anormales, le maintien d'une dépolarisation membranaire de la fibre de crabe, par exemple lors de l'action du T.E.A., pourrait correspondre à l'apparition d'une rectification potassique anormale. Cette hypothèse pourrait expliquer le maintien de la dépolarisation qui se traduit, en plus,

par une inversion de la polarisation membranaire. La diminution initiale de la  $P_{C1}$  et l'apparition d'une diminution de la  $P_K$  sous l'action du T.E.A. entraînant une diminution importante des principales perméabilités de repos, expliqueraient cette inversion de potentiel, dont la valeur tendrait vers celle de la pile de concentration aux ions Ca<sup>++</sup> ou éventuellement aux ions Na<sup>+</sup> notamment, dans ce dernier cas, sous l'action simultanée du T.E.A. et du Mn<sup>++</sup>.

> \* \* \*

L'étude de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe que nous venons de présenter, s'intègre dans un travail d'ensemble visant à expliquer le couplage excitation-contraction de cette fibre.

Il importe enfin de préciser également que ces résultats ne constituent qu'une étape dans la recherche des mécanismes ioniques responsables de l'activité électrique.

# VI - RESUME

Les résultats exposés dans le présent mémoire, portant

 sur les propriétés électrophysiologiques de repos de la fibre de crabe, ont permis :

- d'étayer l'hypothèse attribuant à la membrane sarcolemmique une perméabilité préférentielle aux ions  $K^+$  et à la membrane du système tubulaire transverse une perméabilité aux ions Cl<sup>-</sup>.

de suggérer, du fait de ces perméabilités préférentielles,
 l'existence au repos de courants locaux parcourant la fibre.

 de supposer enfin une forte résistance longitudinale du milieu intracellulaire, ce qui pourrait rendre compte de la nonpropagation du potentiel d'action.

 sur les propriétés électrophysiologiques de la fibre en activité, ont permis de déterminer les mécanismes ioniques probablement responsables du changement du potentiel de membrane.

- le potentiel d'action de cette fibre musculaire de crabe possède deux caractéristiques essentielles : d'une part, il ne diffuse pas à l'ensemble de la structure membranaire selon une propagation de type régénératif comme c'est le cas pour les fibres de Vertébrés, mais électrotoniquement, et d'autre part il correspond à une diminution de la conductance ionique membranaire globale de repos.

- par l'étude de l'action des ions et des inhibiteurs, les hypothèses suivantes rendant compte de l'augmentation de la résistan-

ce de la membrane pendant l'activité de la fibre dans les conditions normales peuvent être formulées :

• la phase ascendante du potentiel d'action se traduirait par une diminution de la conductance de la membrane au Cl<sup>-</sup> associée à l'apparition de la conductance au Ca<sup>++</sup>, ces deux phénomènes correspondraient à un couplage entre un courant de Ca<sup>++</sup> et un courant de Cl<sup>-</sup> moindre, couplage dont l'importance serait sous la dépendance de la concentration du Na<sup>+</sup> extracellulaire, le Na<sup>+</sup> jouant le rôle d'inhibiteur.

• la phase de repolarisation associée à un retour progressif de la résistance membranaire vers sa valeur de repos correspondrait à une augmentation de la conductance de la membrane au  $Cl^$ et à une annulation de celle au  $Ca^{++}$ , ces deux processus tendant à permettre la repolarisation membranaire.

Ces mécanismes ioniques expliquent la faible amplitude du potentiel, du fait, semble-t-il, d'un maintien pendant l'activité, de la conductance au  $K^+$  de la membrane à sa valeur de repos. Celle-ci, néanmoins, pourrait diminuer dans certaines conditions anormales, ce qui expliquerait l'allongement en durée et en amplitude de ce potentiel d'action.

# VII - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADRIAN, R.H. (1960)

Potassium chloride movement and the membrane potential of frog muscle.

J. Physiol., London, <u>151</u>, 154-185.

ADRIAN, R.H. (1961)

Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle.

J. Physiol., London, <u>156</u>, 623-632.

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

The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.

J. Physiol., London, <u>163</u>, 61-103.

ALEXANDER, J.T. et NASTUK, W.L. (1953)

An instrument for the production of microelectrodes used in electrophysiological studies.

Rev. Scient. Instrum., 24, 7, 528-531.

ATWOOD, H.L. (1963)

Differences in muscle fibre properties as a factor in "fast " and " slow " contraction in Carcinus. Comp. Biochem. Physiol., <u>10</u>, 17-32.

ATWOOD, H.L. (1965)

Excitation and inhibition in crab muscle fibres. Comp. Biochem. Physiol., <u>16</u>, 409-426. ATWOOD, H.L., HOYLE, G. et SMYTH, J. (1965)

Mechanical and electrical responses of single innervated crab muscle fibres.

J. Physiol., London, <u>180</u>, 449-483.

BRULE, G., FALEMPIN, M. et GUILBAULT, P. (1970)

Effets de milieux riches en potassium (K<sup>+</sup>) et privés de sodium (Na<sup>+</sup>) sur les propriétés mécaniques de la fibre musculaire isolée de crabe.

J. Physiol., Paris, <u>62</u>, suppl.1, 136.

BULBRING, E. et TOMITA, T. (1968)

The effect of Ba<sup>++</sup> and Mn<sup>++</sup> on the smooth muscle of guinea pig taenia-coli.

J. Physiol., London, <u>196</u>, 137 P.

BURKE, W., KATZ, B. et MACHNE, X. (1953)

The effect of quaternary ammonium ions on crustacean nerve fibres.

J. Physiol., London, <u>122</u>, 588-598.

CAILLAT, R., CONREUR, J. et LALLEMENT, C. (1948)

Note de laboratoire. Argenture chimique du verre. Bull. d'information technique CNRS, n°155, 763.

CALDWELL, P.C. et WALSTER, G.E. (1961)

A cannulated crab muscle fiber.

J. Physiol., London, <u>157</u>, 36-37 P.

CARMELIET, E. (1961 a)

Chloride ions and the membrane potential of Purkinje fibres.

J. Physiol., London, <u>156</u>, 375-388.

CARMELIET, E. (1961 b)

Chloride and potassium permeability in cardiac Purkinje fibres. ARSCIA, S.A. Ed., Bruxelles.

COLE, K.S. et CURTIS, H.J. (1936)

Electric impedance of nerve and muscle. Cold Spring. Harb. Symp. quant. Biol., <u>4</u>, 73-89.

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

Electric impedance of Nitella during activity. J. Gen. Physiol., <u>22</u>, 37-64.

CORABOEUF, E., BOISTEL, J., GARGOUÏL, Y.M., LAPLAUD, J. et GALAND, G. (1959)

Hyperpolarisation transmembranaire au niveau du tissuconducteur du coeur de Mammifère.C. R. Soc. Biol., <u>43</u>, 3, 445-450.

CORABOEUF, E., GUILBAULT, P., BRETON, D. et DUMONT, M. (1961)

Action des ions strontium sur le coeur isolé de rat et de cobaye. C. R. Soc. Biol., <u>45</u>, 6, 1251-1257.

CORABOEUF, E. et VASSORT, G. (1967)

Effets de la tétrodotoxine, du tétraéthylammonium et du manganèse sur l'activité du myocarde de rat et de cobaye.

C. R. Acad. Sci., Paris, 264, 1072-1075.

CORABOEUF, E., ZACOUTO, F., GARGOUÏL, Y.M. et LAPLAUD, J. (1958)

Mesure de la résistance membranaire du myocarde ventriculaire de Mammifère au cours de l'activité. C. R. Acad. Sci., Paris, <u>246</u>, 2934-2937.

DONNAN, F.G. (1924)

The theory of membrane equilibria. Chem. Rev.,  $\underline{1}$ , 73-90.

DYDYNSKA, M. et WILKIE, D.R. (1963)

The osmotic properties of striated muscle fibres in hypertonic solutions.

J. Physiol., London, <u>169</u>, 312-329.

The equivalent circuit of single crab muscle fibers as determined by impedance measurements with intracellular electrodes.

J. Gen. Physiol., 50, 1785-1806.

#### FAHRENBACH, W.H. (1967)

The fine structure of fast and slow crustacean muscles. J. Cell. Biol., <u>35</u>, 69-79.

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

Linear electrical properties of striated muscle fibers observed with intracellular electrodes. Proc. Roy. Soc., London, Ser. B, 160, 69-123.

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

Prolonged response of skeletal muscle in the absence of penetrating anions.

Amer. J. Physiol., <u>198</u>, 2, 289-299.

FATT, P. et GINSBORG, B.L. (1958)

The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. J. Physiol., London, <u>142</u>, 516-543.

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

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

J. Physiol., London, <u>115</u>, 320-370.

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

The electrical properties of crustacean fibres. J. Physiol., London, 120, 171-204.

GAINER, H. (1968)

The role of calcium in excitation - contraction coupling of lobster muscle.

J. Gen. Physiol., <u>52</u>, 1, 88-110.

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

Permeability of alkali metal cations in lobster muscle. A comparison of electrophysiological and osmometric analyses.

J. Gen. Physiol., <u>51</u>, 3, 399-425.

GARB, S. (1951)

The effects of potassium, ammonium, calcium, strontium and magnesium on the electrogram and myogram of mammalian heart muscle.

J. Pharmacol. Exp. Therap., <u>101</u>, 317-326.

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

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

Cam. J. Physiol. Pharmacol., <u>46</u>, 213-219.

GESTELAND, R.C., HOWLAND, B., LETTVIN, J.Y. et PITTS, W.H. (1959)

> Comments on microelectrodes. Proc. Inst. Radio Engrs., 1856-1862.

```
GIRARDIER, L., DREIFUSS, J.J., HAENNI, B.
et PETROVICI, A. (1964)
```

Réponse du tissu myocardique de rat in vitro à une augmentation de la pression osmotique du milieu externe.

Path. et Microbiol., Basel, 27, 16-30.

```
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 excitationcontraction coupling.

J. Gen. Physiol., <u>47</u>, 189-214.

GOLDMAN, D.E. (1943)

Potential, impedance and rectification in membranes. J. Gen. Physiol., <u>27</u>, 37-60.

GORDON, A.M. et GODT, R.E. (1970)

Some effects of hypertonic solutions on contraction and excitation-contraction coupling in frog skeletal muscles. J. Gen. Physiol., 55, 2, 254-275.

HAGIWARA, S., CHICHIBU, S. et NAKA, K. (1964)

The effects of various ions on resting and spike potentials of barnacle muscle fibers. J. Gen. Physiol., <u>48</u>, 163-179. 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, 5, 773-792.

HAGIWARA, S. et NAKA, K. (1964)

The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca<sup>++</sup>. J. Gen. Physiol., <u>48</u>, 141-162.

HAGIWARA, S. et NAKAJIMA, S. (1966)

Differences in Na<sup>+</sup> and Ca<sup>++</sup> spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine and manganese ions. J. Gen. Physiol., <u>49</u>, 793-805.

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

Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. J. Gen. Physiol., <u>50</u>, 583-601.

HAGIWARA, S. et WATANABE, A. (1955)

The effect of tetraethylammonium chloride on the muscle membrane examined with an intracellular microelectrode. J. Physiol., London, <u>129</u>, 513-527.

HARRIS, E.J. (1963)

Distribution and movement of muscle chloride. J. Physiol., London, 166, 87-109.

HAUDECOEUR, G., FALEMPIN, M., BRULE, G. et GUILBAULT, P. (1971)

> Rôle des ions Cl-, Na<sup>+</sup> et de l'hypertonie dans les processus d'excitation et de contraction de la fibre musculaire striée de crabe (Carcinus Maenas). (à paraître).

HAUDECOEUR, G. et GUILBAULT, P. (1971)

Perméabilités ioniques membranaires pendant le potentiel d'action de la fibre musculaire striée du crabe. C. R. Soc. Biol., (à paraître).

HAYS, E.A., 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.

HENČEK, M., ZACHAR, J. et ZACHAROVÁ, D. (1962)

The relative potassium and chloride conductances in the muscle membrane of the crayfish. J. Physiol., London, 162, 68-69 P. HODGKIN, A.L. (1951)

The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 26, 339-409.

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

The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J. Physiol., London, <u>148</u>, 127-160.

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., London, 153, 370-385.

HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. (1945)

Resting and action potentials in single nerves fibres. J. Physiol., London, <u>104</u>, 176-195.

HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. (1952 a)

Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., London, <u>116</u>, 449-472.

HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. (1952 b)

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol., London, <u>117</u>, 500-544. HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. (1952 c)

Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol., 17, 43-52.

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

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

J. Physiol., London, <u>108</u>, 37-77.

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

The electrical constants of a crustacean nerve fibre. Proc. roy. Soc. B., <u>133</u>-B, 444-479.

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

Rectifying properties of cardiac muscle. Nature, London, <u>188</u>, 495.

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

Anion conductance of cardiac muscle. J. Physiol., London, <u>157</u>, 335-350.

HUTTER, O.F. et PADSHA, S.M. (1959)

Effect of nitrate and other anions on the membrane resistance of frog skeletal muscle. J. Physiol., London, <u>146</u>, 117-132.

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

Sodium and potassium components of the membrane current in twitch skeletal muscle fibres investigated with a voltageclamp technique.

Proc. Physiol. Soc., 204, 97-98 P.
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, <u>61</u>, suppl.1, 137.

```
JENERICK, H.P. (1953)
```

Muscle membrane potential, resistance and external potassium chloride.

J. Cell. Comp. Physiol., 42, 427-448.

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

Actions of some anions on electrical properties and mechanical threshold of frog twitch muscle. J. Physiol., London, 198, 291-309.

```
KATZ, B. (1948)
```

The electrical properties of the muscle fibre membrane. Proc. Roy. Soc. B., <u>135</u>, 506-534.

KATZ, B. (1949)

Les constantes électriques de la membrane du muscle. Arch. Sci. Physiol., <u>3</u>, 285-300.

KATZ, B. et KÜFFLER, S.W. (1946)

Excitation of the nerve-muscle system in crustacea. Proc. Roy. Soc. B., <u>133</u>, 374-389. KOKETSU, K. (1965)

The role of calcium in membrane excitation. Proc. Int. Physiol. Sci., 4, 521-541.

LOCKWOOD, A.P.M. (1968)

The neuromuscular system, in "Aspects of the Physiology of crustacea". OLIVIER et BOYD Ed., Edimburgh et London, 160-205.

LUTTGAU, H.C. et NIEDERGERKE, R. (1958)

The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart.

J. Physiol., London, <u>143</u>, 486-505.

MATHIEU, J. (1971)

Ultrastructure de la fibre musculaire de crabe (Carcinus maenas). (à paraître).

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

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

Amer. J. Anat., <u>121</u>, 2, 285-304.

MIRONNEAU, J. et LENFANT, J. (1971)

Analyse des réponses électriques de la fibre musculaire lisse d'utérus de ratte : mise en évidence d'un courant lent calcico-sodique.

C. R. Acad. Sci., Paris, 272, 436-439.

## MOUNIER, Y. (1970)

Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe. Thèse 3e Cycle, Lille.

MOUNIER, Y. et GUILBAULT, P. (1970)

Influence du chlore sur les phénomènes électriquesde repos de la fibre musculaire striée de crabe.C. R. Acad. Sci., Paris, <u>271</u>, 415-418.

MOUNIER, Y., HAUDECOEUR, G. et GUILBAULT, P. (1969 a)

Perméabilité membranaire aux ions monovalents de la fibre musculaire de crabe (Carcinus maenas). C. R. Soc. Biol., Paris, <u>163</u>, 7, 1546-1550.

MOUNIER, Y., HAUDECOEUR, G. et GUILBAULT, P. (1969 b)

Données électrophysiologiques sur la fibre musculaire de crabe (Carcinus maenas).

J. Physiol., Paris, <u>61</u>, suppl.2, 359-360.

NOBLE, D. (1962)

A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. J. Physiol., London, <u>160</u>, 317-352.

NOBLE, D. (1966)

Applications of Hodgkin-Huxley equations to excitable tissues. Physiol. Rev., <u>46</u>, 1, 1-50. ORKAND, R.K. (1962)

Chimical inhibition of contraction in directly stimulated crayfish muscle fibres.

J. Physiol., London, <u>164</u>, 103-115.

PEACHEY, L.D. (1965)

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

PEACHEY, L.D. (1966)

The role of transverse tubules in excitation-contraction coupling in striated muscles.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 137, 1025-1037.

PEACHEY, L.D. (1967)

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

PEACHEY, L.D. (1968)

Muscle.

Ann. Rev. Physiol., <u>30</u>, 201-440.

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

Transverse tubules in crab muscle. J. Cell. Biol., <u>23</u>, 70-71 A. PROSSER, C.L. et BROWN, F.A. (1962)

Inorganic ions, in "Comparative animal physiology ". SAUNDERS COMPANY Ed., Philadelphia, ch.3, 57-80.

REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, H. et GRUNDFEST, H. (1967)

> Excitation-contraction coupling in crayfish. Amer. Zoologist., 7, 623-645.

RICHARDS, C.D. (1969)

Chloride fluxes in crab muscle fibres. J. Physiol., London, <u>202</u>, 1, 211-221.

ROSENBLUTH, J. (1969)

Sarcoplasmic reticulum of an unusually fast-acting crustacean muscle.

J. Cell. Biol., <u>42</u>, 2, 534-547.

SANDOW, A. (1965)

Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Pharmacol. Rev., <u>17</u>, 3, 265-320.

SANDOW, A. (1970)

Skeletal muscle. Ann. Rev. Physiol., <u>32</u>, 87-138. Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers.

Amer. Zoologist., 7, 515-525.

SHAW, J. (1955)

Ionic regulation in the muscle fibres of Carcinus
maenas. I. The electrolyte composition of single fibres.
J. Exp. Biol., <u>32</u>, 383-396.

STAMPFLI, R. (1954)

A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. Experientia, Basel, <u>10</u>, 508-509.

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

Two component anomalous rectification in frog muscle fibers.

Proc. Japan Acad., <u>45</u>, 814-819.

WEIDMANN, S. (1955)

Rectifier properties of Purkinje fibres. Amer. J. Physiol., <u>183</u>, 671.

WERMAN, R. et GRUNDFEST, H. (1961)

Graded and all-or-none electrogenesis in arthropod muscle. II. The effects of alkali-earth and onium ions on lobster muscle fibers.

J. Gen. Physiol., <u>44</u>, 997.

WIERSMA, C.A.G. (1941).

The efferent innervation of muscle. Biol. Symp., <u>3</u>, 259-289.

WIERSMA, C.A.G. (1961)

The neuromuscular system, in WATERMAN "The Physiology of Crustacea". ACADEMIC PRESS Ed., New-York, vol. II, 191-240.

WILKIE, D.R. (1968)

Muscle. St MARTIN'S PRESS Ed., New-York.

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

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

Physiol. Bohemoslov., <u>13</u>, 129-136.

