

50376
1975
98

50376
1975
98

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

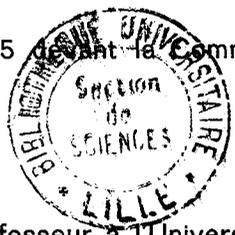
le grade de Docteur ès-Sciences

par

Yvonne BEDOURA-MOUNIER
Maître-Assistante

Analyse, en potentiel imposé, de l'activité électrique des fibres musculaires de Crabe. Interprétation des potentiels d'action gradués.

Soutenue le 25 Juin 1975 devant la Commission d'Examen



Membres du Jury :

- M. CORABŒUF, Professeur à l'Université de Paris XI
- M. DURCHON, Professeur à l'Université de Lille I
- M. GUILBAULT, Professeur à l'Université de Lille I
- M. NOBLE, Professeur à l'Université d'Oxford
- M. ROUGIER, Professeur à l'Université de Lyon
- M. VASSORT, Chargé de Recherche à l'INSERM

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLEME</u>	1
 <u>HISTORIQUE</u>	
A - Caractéristiques membranaires de repos	6
B - L'excitation : le potentiel d'action et la théorie ionique	32
 <u>MATERIEL et METHODES</u>	
A - Matériel biologique	68
B - Enregistrement des variations de potentiel et de courant	71
C - Limites de la technique et contrôle des mesures réalisées	83
D - Expression des résultats - Nomenclature	94
E - Solutions physiologiques	96

RESULTS

<u>Chapitre I</u> - Etude des paramètres membranaires à partir des enregistrements du courant capacitif	99
A - Le courant capacitif	101
B - Etude des paramètres membranaires	106
C - Conclusion	112
<u>Chapitre II</u> - Enregistrements obtenus en solution 1SW	
A - Réponses à des courants imposés	115
B - Réponses à des potentiels imposés dépolarisants	120
C - Réponses à des potentiels imposés hyperpolarisants	129
D - Conclusion	131
<u>Chapitre III</u> - Etude du courant entrant calcique	
A - Nature ionique de la composante entrante du courant initial	139
B - Mise en évidence du courant calcique	154
C - Caractéristiques du courant calcique	162
D - Conclusion	191

<u>Chapitre IV</u> - Etude de la composante sortante du courant initial	195
A - Rappel des résultats précédents relatifs à I_{K_1}	199
B - Arguments complémentaires	201
C - Nature ionique de la composante sortante du courant initial	205
D - Caractéristiques de I_{K_1}	213
E - Conclusion	229
 <u>Chapitre V</u> - Etude du courant sortant retardé	 233
A - Description et nature ionique du courant retardé	238
B - Etude du processus d'activation	250
C - Mise en évidence du processus d'inactivation du courant retardé	272
D - Conclusion	282
 <u>Chapitre VI</u> - Eléments d'interprétation du rôle des ions Cl^- dans le développement de l'activité électrique	
A - Influence d'un milieu $[Cl]_e = 0$ sur l'activité électrique	289
B - Détermination de l'influence de la polarisation membranaire sur le développement de l'activité élec- trique en milieu pauvre en chlore	300

C - Conclusion

309

DISCUSSION GENERALE

315

INTRODUCTION

ET

POSITION DU PROBLEME

Si le potentiel d'action se révèle être le dénominateur commun de toutes les activités électriques des cellules excitables, ses caractéristiques (décours et amplitude notamment) peuvent différer. Des variations considérables ont été mises en évidence en fonction de différents critères. L'un de ceux-ci réside dans le type de tissu étudié ; les potentiels d'action du tissu nerveux ou musculaire sont en effet bien moins durables que ceux du tissu cardiaque présentant une phase de repolarisation lente avec un plateau. Un autre critère de différenciation des potentiels provient, pour un même tissu, de l'espèce animale considérée ; ainsi, pour les fibres musculaires, l'activité électrique recueillie sur la fibre d'un Vertébré, tel que la grenouille, se traduit par un potentiel ample de type tout ou rien alors que la réponse des fibres d'Invertébrés à des stimulations supraliminaires se caractérise le plus souvent par des potentiels locaux et gradués de faible amplitude.

Ce n'est que grâce aux travaux des électrophysiologistes conjugués aux études de microscopie photonique puis électronique que l'on a pu décrire et interpréter les différentes propriétés des membranes cellulaires. En particulier, pour les fibres de Crustacés, l'abondance des résultats expérimentaux ainsi que leur concordance attestent d'une bonne connaissance des propriétés électrophysiologiques de ces muscles. Ces études, associées aux résultats relatifs à l'ultrastructure des fibres ont permis de comprendre les caractéristiques différentes apparaissant entre les fibres musculaires d'Invertébrés et de Vertébrés. Nous ferons un rappel des données essentielles acquises, dans le chapitre Historique de ce travail.

Cependant, en ce qui concerne l'activité électrique des fibres musculaires de Crustacés, malgré le grand nombre de travaux effectués, une question, découlant de l'observation des potentiels enregistrés, apparaît toujours posée : comment expliquer la faible amplitude de ces potentiels ainsi que la variabilité de leurs décours ? C'est l'un des principaux problèmes que nous aborderons dans ce travail.

Afin d'atteindre un tel objectif, il apparaissait important d'enregistrer, non seulement les variations de potentiel mais également les courants ioniques survenant au cours de l'excitation. L'étude de ces courants se situera dans le cadre de la théorie développée

par HODGKIN et HUXLEY (1952, a, b, c, d). Cette théorie, base de notre travail expérimental, fera l'objet d'un exposé succinct.

Les courants ioniques mis en jeu lors de l'activité électrique des fibres musculaires de Crustacés n'ont fait jusqu'alors l'objet que de quelques études sur les fibres musculaires de barnacle ou d'écrevisse et ne répondent pas totalement au problème posé (HAGIWARA et coll., 1969, 1974 ; HENČEK et coll., 1969 ; KEYNES et coll., 1973). Nous reprendrons donc, sur la fibre musculaire de crabe, l'étude des courants ioniques impliqués dans le processus d'activité électrique.

Une telle étude est réalisable grâce à la technique du potentiel imposé. Le dispositif expérimental que nous avons choisi pour l'étude des courants ioniques de la fibre musculaire de crabe est celui du double sucrose-gap (ou double pont de saccharose), utilisé par ROUGIER et coll. (1968 a, b). Cette technique, qui sera exposée et discutée permet l'utilisation d'électrodes externes et nous a paru mieux convenir à la fibre musculaire de crabe présentant une grande fragilité et des contractions souvent très amples (ATWOOD et DORAI RAJ, 1964 ; ATWOOD et coll., 1965 ; BRULE, 1972).

La mise en évidence des différents courants ioniques nous permettra de proposer d'une part une interprétation de la faible amplitude et de la forme des potentiels enregistrés et de discuter d'autre part des

4.

rôles respectifs des différents courants dans la régulation de l'activité électrique.

A - CARACTERISTIQUES MEMBRANAIRES DE REPOS

Etude comparée des propriétés des fibres musculaires striées de Vertébrés et de Crustacés.

I - R_m , C_m et influence de l'ultrastructure

II - Potentiel de membrane de repos

1°) Considérations générales

2°) Application aux fibres musculaires de Crustacés

III - Conductances ioniques membranaires de repos.

B - L'EXCITATION : Le potentiel d'action et la théorie ionique

I - Fibres nerveuse et musculaire squelettique de Vertébrés.

1°) Rappel des données classiques

2°) Théorie ionique d'HODGKIN - HUXLEY : le potentiel imposé

a) Le courant de membrane

b) Technique du potentiel imposé : principe et méthodes.

c) Modèle théorique d'HODGKIN - HUXLEY

i) Perméabilité au potassium

ii) Perméabilité au sodium

II - Autres structures excitables :
intervention des ions calcium.

III - Fibres musculaires de Crustacés :

1°) Les potentiels d'action calciques

2°) Caractéristiques particulières.

A - CARACTERISTIQUES MEMBRANAIRES DE REPOS.

Etude comparée des propriétés des fibres musculaires striées de Vertébrés et de Crustacés.

Les études électrophysiologiques ont permis d'étudier les propriétés passives membranaires qui peuvent être représentées par le schéma suivant (Fig. 1) :

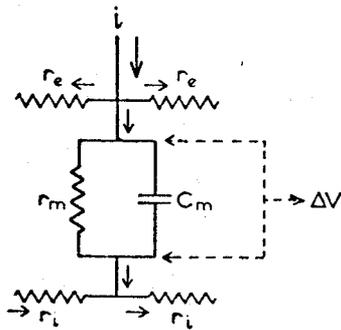


Figure 1 : Circuit électrique représentant les propriétés physiques passives de la membrane en un point.

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

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

I - Résistance (R_m) et Capacité (C_m)

membranaires des fibres musculaires de Crustacés. Influence de l'ultrastructure.

A partir des propriétés électriques passives des fibres, de très nombreuses mesures de résistance de membrane ont été effectuées aussi bien sur les muscles de Vertébrés que sur les muscles d'Invertébrés. L'ensemble des résultats laisse apparaître des différences importantes (Tableaux 1 et 2). Par rapport à la R_m des fibres musculaires de Vertébrés et plus précisément celles de grenouille, la R_m des fibres d'Invertébrés et notamment des Crustacés est au moins dix fois plus faible. Inversement, la C_m de la fibre musculaire d'Invertébrés est très élevée.

AUTEURS	MATERIEL	R_m (Ωcm^2)	C_m ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)
KATZ (1948)	Grenouille M. adductor magnus M. extensor longus sartorius (entier)	1500 4000 1180 ; 2080	5 5 8,7 ; 5,2
FATT et KATZ (1951)	Grenouille sartorius	4000	6 à 8
DEL CASTILLO et MACHNE (1953)	Grenouille sartorius (en fonc- tion de la tempéra- ture)	1628 à 2415	8,7 à 11,7
JENERICK (1953)		2500	
MEVES et VÖLKNER (1958)	Grenouille	2860	8
ADRIAN (1960)	Grenouille sartorius		2,5
ADRIAN et FREYGANG (1962)		2800	
FALK et FATT (1964)	Grenouille sartorius	3430	6,7
ROUGIER (1964)	Grenouille semi-tendineux	1550	
ADRIAN et PEACHEY (1965)	Grenouille iliofibularis	3140	6,8
GAGE et EISENBERG (1969)	Grenouille sartorius (dans glycérol)	3858	6,1

Tableau 1



Valeurs de R_m et C_m obtenues sur des fibres musculaires de Vertébrés.

AUTEURS	MATERIEL	R_m ($\Omega \text{ cm}^2$)	C_m ($\mu\text{F/cm}^2$)
FATT et KATZ (1953)	Crabes : Carcinus maenas Portunus depurator M. extenseurs du carpopodite.	130	24 à 83
FATT et GINSBORG (1958)	Ecrevisse : Astacus fluviatilis M. extenseur du carpopodite		20
FALK et FATT (1964)	Ecrevisse : Astacus fluviatilis M. extenseur du carpopodite		21,2
ATWOOD (1963)	Crabe : Carcinus maenas M. adducteur - fibres types A et B (diamètre 105μ) - fibres type C (diamètre 210μ)		36 54,5
EISENBERG (1965)	Crabes : Carcinus maenas et Portunus depurator M. fléchisseur du carpopodite	173	9 (surface) 47 (tubules)
PEACHEY (1965 a)	- M. extenseur du carpopodite Crabes : Portunus et Carcinus - M. adducteur du carpopodite Crabe : Carcinus		42 36 à 55*
SELVERSTON (1967)	Crabe : Carcinus maenas M. adducteur du carpopodite		50 ** 14,7



.../...

AUTEURS	MATERIEL	R_m (Ω cm ²)	C_m (μ F/cm ²)
HAYS, LANG et GAINER (1968)	Crabe : callinectes sapidus M. adducteur du carpopodite	465 (\pm 27)	36,9 (\pm 8,4)
MOUNIER (1970)	Crabe : Carcinus maenas M. extenseur du m�ropodite	100 � 180	35
PAPIR (1973)	Crabe : Ocypoda cursor M. adducteur du propodite		29 \pm 4,9

Tableau 2

Valeurs de R_m et C_m obtenues sur des fibres musculaires
de Crustacés.

* Selon le type de fibres

** Selon la méthode de mesure : au pied du potentiel
d'action (50) ou par propagation d'un courant
sous-liminaire (14,7).



Figure 2 : Section transverse à la surface d'une fibre musculaire de crabe *Carcinus maenas*.

Dans la partie droite de la photo, les myofibrilles ont été coupées à travers leurs bandes I et leurs lignes Z. On remarque que le sarcolemme s'invagine et on observe un tubule Z (TZ).

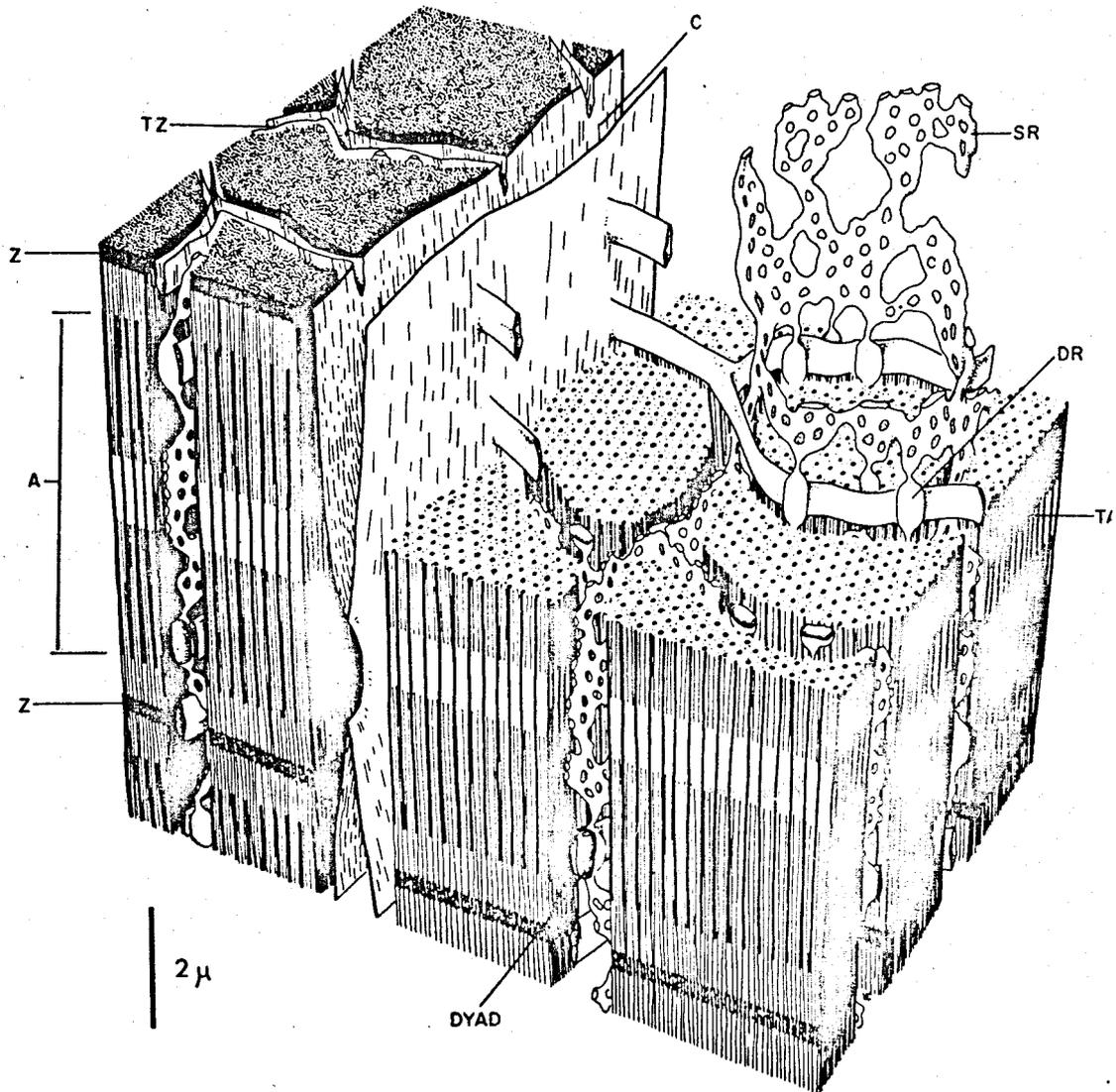
Dans la partie gauche de la photo, les bandes A des myofibrilles sont dans le plan de la section et un tubule A (TA) s'étend vers l'intérieur et forme une diade avec le réticulum sarcoplasmique (SR). D'autres diades peuvent être observées plus profondément dans la fibre (x 22000).

- D'après PEACHEY (1967) -



Figure 2

Ces résultats apparemment très dissemblables peuvent s'expliquer si l'on tient compte du fait que la fibre musculaire de Crustacé présente une très grande complexité ultrastructurale. La membrane externe de ces fibres émet d'importantes invaginations, formant un système complexe de canalicules ouverts sur le milieu extérieur. Cette structure, maintenant bien connue, a été décrite pour la fibre musculaire de grenouille par HUXLEY (1964), PAGE (1964), PEACHEY (1965 b) et ENDO (1966). Si la fibre musculaire de crabe présente le même type de structure, des différences apparaissent dans l'abondance et la distribution des membranes (Fig. 2 et 3). En effet, les invaginations de la membrane externe sont particulièrement développées et profondes comme l'ont observé PEACHEY et HUXLEY (1964), ATWOOD (1963, 1965), BRANDT et coll. (1965), ROSENBLUTH (1969) pour les fibres d'écrevisse, HOYLE et SMYTH (1963), FAHRENBACH (1967), pour les fibres de barnacle. En outre, les invaginations ne traverseraient pas seulement la fibre transversalement comme cela se produit pour le muscle squelettique de grenouille, mais bifurqueraient à angle droit, s'étendant longitudinalement, parallèlement aux myofibrilles (MELVIN et HESS, 1967). Enfin, PEACHEY (1967) démontre qu'il existe deux systèmes séparés de structures tubulaires : Z et AI ainsi appelés à cause de leur localisation respective près des lignes Z (système T_Z) ou à l'extrémité de chaque bande A à la



*Figure 3 : Reconstruction d'une petite portion de fibre musculaire (crabe *Carcinus maenas*) dans la zone d'une invagination (C). Les lettres font référence à la nomenclature déjà indiquée dans la légende de la figure 2.*

DR = citerne terminale dilatée du réticulum sarcoplasmique. (x 10 000).



jonction avec la bande I (système T_{AI}). Seul le système T_{AI} est étroitement lié au réticulum sarcoplasmique formant à ce niveau une structure en diades déjà signalée par PEACHEY et HUXLEY (1964) et différant des structures en triades rencontrées chez les Vertébrés. De plus, on s'accorde généralement à reconnaître à ce système un rôle primordial dans le couplage excitation-contraction dans la mesure où celui-ci semble responsable de la conduction de l'excitation à l'intérieur des fibres (HUXLEY et TAYLOR, 1958 ; GAGE et EISENBERG, 1969 ; BEZANILLA et coll., 1972) et contribue, du fait de son excitabilité, à la réponse mécanique (BASTIAN et NAKAJIMA, 1974).

La corrélation entre cette abondante structure membranaire interne et les mesures des caractéristiques R_m et C_m de la membrane apparaît de façon convaincante grâce aux travaux de SELVERSTON (1967) sur les fibres de *Balanus nubilus* et de Carcinus maenas et d'EISENBERG (1967) et de PEACHEY (1967) sur les fibres de Carcinus. Ces auteurs démontrent que les mesures de C_m varient considérablement selon que l'on considère la surface de la membrane représentée par la portion de membrane externe formant des replis, ou par cette dernière surface augmentée de la surface des invaginations internes (tubules). FALK et FATT (1964) estiment en effet que la plus grande partie de C_m est localisée au niveau des cloisons membranaires du système tubulaire transverse (STT). Les coupes de microscopie électronique ont permis

d'effectuer des corrections pour la surface invaginée au niveau des tubules. PEACHEY (1965 a) calcule que C_m passe d'environ 40 à $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ et EISENBERG (1967) trouve $4,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ pour la capacité membranaire de surface et $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ pour la capacité membranaire tubulaire. SELVERSTON (1967) propose $1,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ au lieu de 14,7.

Les propriétés électriques membranaires ont également été étudiées à partir de la forme du pied du potentiel d'action et de la vitesse de conduction (HODGKIN et NAKAJIMA, 1972 a, b). Récemment, PEACHEY et ADRIAN (1973) ont montré que des mesures effectuées dans ces conditions reflètent les propriétés électriques du système tubulaire. Plusieurs types de modèles sont actuellement proposés pour rendre compte de l'influence du système tubulaire sur l'activité électrique. Trois d'entre eux, analysés de façon détaillée par VALDIOSERA et coll. (1974 a, b), diffèrent par l'emplacement de la résistance s'opposant au passage radial du courant. Le modèle "lumped" attribue toute la résistance à l'ouverture des tubules ; le modèle "disk" place cette résistance dans la lumière des tubules ; le modèle "hybrid" prévoit deux résistances à chacun de ces emplacements. Le modèle "lumped" représente le premier modèle envisagé, dès 1964 par FALK et FATT, puis par FREYGANG et coll. (1967). Ce modèle, mathématiquement simple, traduit assez correctement les propriétés électriques de la fibre musculaire de crabe dans certaines conditions expérimentales

dépendant des solutions physiologiques utilisées (ADRIAN et ALMERS, 1973, 1974 ; VALDIOSERA et coll., 1974 a, b). Les modèles "disk" et "hybrid" sembleraient mieux décrire le système tubulaire. En effet, le premier permet de mesurer les capacités des membranes de surface et tubulaire égales dans la plupart des conditions expérimentales ; le deuxième amène à trouver des valeurs compatibles avec la capacité membranaire de surface pour des fibres glycérolées. SCHNEIDER (1970) considère que le modèle "lumped" conduit à une surestimation des composants de surface (R_m et C_m) et que seule une distribution spatiale représentée par son modèle "lattice" rend compte d'une égalité entre les capacités de surface et tubulaire. Cependant VALDIOSERA et coll. (1974 b) admettent que les modèles "disk" et "hybrid" présentent également des imperfections et que, sans soutenir l'existence réelle d'une résistance concentrée à l'ouverture des tubules, le modèle "lumped" décrit assez correctement les propriétés du système tubulaire.

Pour la fibre musculaire de crabe, il faut se reporter aux travaux d'EISENBERG (1967) qui propose deux schémas de membrane (Fig. 4). Ces circuits sont simplifiés dans la mesure où : i) la membrane de tous les tubules est concentrée en un élément R_{ce} C_e en série avec la résistance R_e d'accès aux tubules - ii) la membrane sarcolemmique et ses nombreux replis sont concentrés en un élément constitué par le sarcolemme à la surface

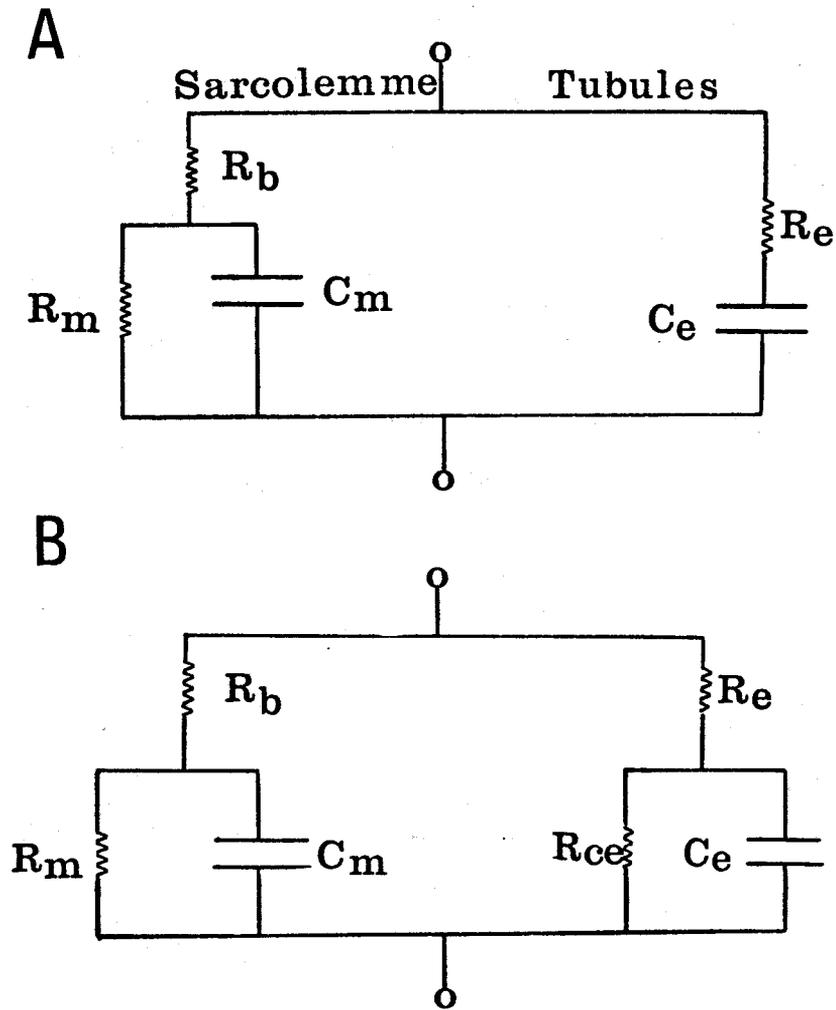


Figure 4 : Schémas électriques de la membrane de la fibre de crabe proposés par EISENBERG (1967)

R_b : résistance du matériel amorphe entourant les fibres et emplissant les invaginations

R_m : résistance du sarcolemme

C_m : capacité du sarcolemme

R_e : résistance d'accès aux tubules

R_{ce} : résistance de l'ensemble des tubules

C_e : capacité des membranes tubulaires



externe, l'ensemble étant groupé dans le facteur $R_m C_m$. Une simplification supplémentaire peut être effectuée pour le schéma B en considérant que R_{ce} est très grande, ce qui nous ramène alors au cas du modèle présenté en A et qui correspond à un modèle "lumped".

En conclusion, il apparaît que la détermination des caractéristiques passives de la membrane de surface peut être assez aisément effectuée, en introduisant une correction de la surface externe abondamment invaginée. Par contre, les propriétés membranaires du système tubulaire sont plus difficiles à introduire dans un modèle facilement analysable. Nous verrons comment cette complexité ultrastructurale peut être retrouvée dans nos enregistrements de courant capacitif.

II - Potentiel de membrane de repos (P.R.)

1°) Considérations générales : cas des fibres nerveuse et musculaire de Vertébrés.

BERNSTEIN (1902) formule le premier une théorie ionique du potentiel de membrane. Il relie le potentiel de repos à l'existence d'une pile de concentration résultant d'une distribution inégale des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. Il assimile ensuite cette pile de concentration à une pile aux ions potassium et admet que la membrane au repos est uniquement perméable à ces ions. Lors de l'activité,

cette pile serait court-circuitée et la membrane deviendrait perméable à tous les ions : le potentiel d'action correspondrait ainsi à une annulation du potentiel de repos.

Si une telle hypothèse avait, à l'époque, l'avantage de jeter les bases d'une théorie ionique, elle présentait néanmoins certaines insuffisances et inexac- titudes. En effet, selon la relation de NERNST, la varia- tion du potentiel de membrane en fonction du logarithme de la concentration potassique doit être linéaire : or, généralement, pour de faibles valeurs de la concentration cette relation n'est pas vérifiée, ce qui traduit l'exis- tence d'une perméabilité non négligeable à d'autres ions présents dans les phases intra et extracellulaires. De plus, HODGKIN et HUXLEY (1939) montrent sur l'axone géant de calmar que le potentiel de membrane ne s'annule pas lors de l'excitation mais change de signe.

En 1941, BOYLE et CONWAY émettent l'hypothèse que la membrane cellulaire est, au repos, perméable aux ions potassium et chlore mais imperméable au Na. Ils suggèrent l'existence d'un équilibre de DONNAN pour les ions K et Cl, la valeur du potentiel de membrane E_m pouvant alors être traduite par l'équation de NERNST :

$$E_m = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} \quad (1)$$

dans laquelle R et \mathcal{F} sont les constantes thermodynamiques usuelles, n la valence de l'ion, T la température absolue et $[K^+]_i$, $[Cl^-]_i$, $[K^+]_e$, $[Cl^-]_e$ les concentrations du potassium et du chlore respectivement dans le milieu intérieur et le milieu extérieur.

Quelques années plus tard, l'utilisation d'éléments marqués (LEVI et USSING, 1948 ; HARRIS et BURN, 1949) conduit à une nouvelle notion : la membrane serait également perméable aux ions sodium. Cette perméabilité permettait d'expliquer que la valeur absolue mesurée du potentiel de repos était toujours inférieure à la valeur théorique calculée par la relation de NERNST. HODGKIN et KATZ (1949) proposèrent pour rendre compte de la valeur exacte du potentiel de membrane d'utiliser une équation basée sur la théorie du champ constant de GOLDMAN (1943). Cette équation tient compte, non seulement des concentrations des ions dans les milieux intra et extracellulaires mais également de la perméabilité de la membrane vis à vis de chacun d'eux.

$$E_m = \frac{RT}{\mathcal{F}} \text{Log} \frac{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_e} \quad (2)$$

où

E_m est le potentiel de membrane

P_K ; P_{Na} ; P_{Cl} sont les constantes de perméabilité de la membrane vis à vis de chaque espèce ionique.

ADRIAN (1956), CONWAY (1957), HODGKIN et HOROWICZ (1959) observent, pour la fibre musculaire de grenouille, que, si le potentiel de membrane est proche du potentiel d'équilibre pour les ions potassium lorsque $[K]_e$ est élevée, il s'en écarte pour les faibles valeurs de $[K]_e$, les ions chlore étant répartis passivement (HODGKIN, 1958 ; HARRIS, 1963, 1965) ; leur potentiel d'équilibre est égal à E_m et l'équation (2) peut être réduite aux seuls termes en K et Na. La relation proposée est alors :

$$E_m = \frac{RT}{F} \text{Log} \frac{[K]_e + \alpha [Na]_e}{[K]_i + \alpha [Na]_i} \quad (3)$$

où $\alpha = \frac{P_{Na}}{P_K} = 0,01$

2°) Application aux fibres musculaires de Crustacés.

Les études du potentiel de repos effectuées sur les fibres musculaires de Crustacés accordent une importance très nettement prépondérante aux ions K^+ dans le maintien de E_m (SHAW, 1955 a-b, 1958 a-b ; ZACHAR et coll., 1964 ; HAYS et coll., 1968), comme pour les fibres musculaires squelettiques de grenouille. Le potentiel de membrane peut être traduit par l'équation de NERNST pour les valeurs de $[K]_e$ supérieures à 10 mM. Il n'en diffère que lorsque $[K]_e$ est faible et, dans ces conditions, l'équation 3 peut être appliquée (SHAW, 1955 b),

l'influence de la perméabilité sodique sur le potentiel de repos devenant non négligeable et les ions Cl^- étant distribués passivement. De plus, REUBEN et coll. (1964) considèrent que les fibres musculaires d'écrevisse ne sont pas caractérisées par une distribution des ions K^+ et Cl^- suivant l'équilibre de Donnan.

Différents travaux mettent en évidence l'absence de concordance entre les mesures des concentrations internes des ions déduites de l'équation de NERNST et celles obtenues par analyse chimique. Les travaux de GAYTON et HINKE (1968) et HINKE et GAYTON (1970) effectués sur la fibre musculaire géante de barnacle montrent que ces résultats ne sont en fait pas contradictoires si deux considérations sont prises en compte :

i) l'équation de NERNST est utilisée pour calculer les concentrations des ions en admettant que les coefficients d'activité de K^+ et Cl^- dans le myoplasme et dans la solution externe sont identiques. En réalité, cette équation aurait dû faire intervenir les activités des ions et être transcrite sous la forme :

$$E_m = \frac{RT}{\mathcal{F}} \text{Log} \frac{(a_K)_e}{(a_K)_i} = \frac{RT}{\mathcal{F}} \text{Log} \frac{(a_{\text{Cl}})_i}{(a_{\text{Cl}})_e} \quad (4)$$

où $(a_K)_i$, $(a_{\text{Cl}})_i$, $(a_K)_e$, $(a_{\text{Cl}})_e$ sont les activités du potassium et du chlore respectivement dans le milieu intérieur et le milieu extérieur.

ii) les concentrations myoplasmiques $[K]_i$ et $[Cl]_i$ sont déterminées en considérant que tous les ions K^+ et Cl^- sont dissous de façon homogène dans l'eau intracellulaire de la fibre. Ce postulat est en fait infirmé par un ensemble de travaux mettant en évidence une distribution hétérogène des ions et de l'eau, pour les fibres musculaires de Crustacés (HINKE, 1959 ; ROBERTSON, 1961 ; Mc LAUGHLIN et HINKE, 1966 ; DUNHAM et GAINER, 1968 ; HINKE, 1970), hétérogénéité qui serait particulièrement accentuée pour les ions chlore (GAYTON et HINKE, 1971). Ainsi, les mesures des cinétiques des échanges de ^{35}Cl et du flux sortant de Cl entre le milieu extracellulaire et un milieu pauvre en chlore (RICHARDS, 1969 sur la fibre de crabe ; GAYTON et HINKE, 1971 sur la fibre de balane) confirment l'idée que le chlore intracellulaire ne serait pas distribué de façon homogène. Les résultats indiquent que le chlore intracellulaire est réparti en deux fractions presque égales :

- L'une serait constituée d'ions Cl^- sous forme libre dans le myoplasme et représenterait une fraction facilement échangeable. Cette forme semble être absente d'environ 45 % de l'eau intracellulaire et apparaît, sur la fibre musculaire de barnacle, en équilibre passif avec le milieu externe. Dans ces conditions, le potentiel de membrane de repos suit l'équation de Nernst. HAYS et coll. (1968), sur la fibre musculaire de crabe,

arrivent à la même conclusion en estimant à 64 % l'eau de la fibre servant de solvant aux ions Cl^- .

- L'autre fraction, étudiée par DUNHAM et coll. (1964), DUNHAM et GAINER (1968), HAYS et coll. (1968) présenterait une cinétique d'échange lente. Le chlore y serait soit sous forme combinée, par liaison à des protéines notamment, soit sous forme compartimentée. La première hypothèse résulte des études réalisées in vitro montrant que les protéines, y compris la myosine, peuvent fixer du chlore (SZENT-GYÖRGYI, 1947 ; SAROFF, 1957 ; ZEPPEZAUER et coll, 1969). La deuxième hypothèse est étayée par les travaux de ALLEN et HINKE (1970) relatant les quantités et les vitesses d'échange entre le sodium interne et externe. Celles-ci sont semblables aux valeurs obtenues pour la fraction lente du chlore. Ces auteurs admettent alors que les ions Cl^- pourraient être concentrés sous forme de NaCl dans un compartiment interne qui pourrait être le réticulum (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967 ; KEYNES et STEINHARDT, 1968 ; BIRKS et DAVEY, 1969).

Enfin, pour terminer cette brève étude du potentiel de repos des fibres musculaires de Crustacés, rappelons les différentes valeurs du P.R. obtenues à l'aide de microélectrodes. Sur la fibre musculaire de crabe *Carcinus*, le potentiel de repos est compris entre 60 et 70 mV, valeurs comparables aux P.R. généralement

mesurés sur de nombreux muscles d'autres Crustacés
(Tableau 3).

MATERIEL	AUTEURS	Mesures du P.R. $m \pm s_m^*$ (mV)
<u>Crabe</u>		
Carcinus maenas	FATT et KATZ (1953)	$70,0 \pm 0,5$
Carcinus maenas	SHAW (1955 a)	58,0
Carcinus maenas	KERKUT et RIDGE (1961)	$63,4 \pm 1,4$
Carcinus maenas	MOUNIER et coll. (1969)	$65,0 \pm 0,6$
Callinectes	HAYS et coll. (1968)	$71,4 \pm 0,5$
<u>Balane</u>	BRINLEY (1968)	$68,1 \pm 0,8$
<u>Ecrevisse</u>	ORKAND (1962)	60 à 80
	SUGI et OCHI (1967)	
<u>Bernard l'ermite</u>	WIERSMA et BOBBERT (1961)	65

Tableau 3 : Valeurs du P.R. relevées sur
différents muscles de Crustacés.

s_m^* : Erreur standard par rapport à la
moyenne.

III - Conductances ioniques membranaires de repos des fibres musculaires de Crustacés.

Deux ions, le potassium et le chlore partici-
pent de façon déterminante à la conductance de repos.

La conductance relative de chacun de ces ions a été déterminée sur les fibres musculaires de crabe (MOUNIER, 1970) dans trois conditions expérimentales différentes :

1°) variations soudaines des concentrations ioniques externes des ions K^+ et Cl^- et détermination par la méthode d'HODGKIN et HOROWICZ (1959) des valeurs T_K et T_{Cl} définies ci-dessous. Ces valeurs peuvent être estimées à partir des équations suivantes :

$$T_K = \frac{G_K}{G_m} \quad (5)$$

et

$$T_{Cl} = \frac{G_{Cl}}{G_m} \quad (6)$$

sachant que

$$G_m = G_K + G_{Cl} \quad (7)$$

G_m : conductance membranaire totale

G_K : conductance potassique

G_{Cl} : conductance des ions Cl^-

2°) mesure de la variation relative de résistance de membrane ($R_m = \frac{1}{G_m}$) en milieu avec ou sans chlore. Dans ces conditions, l'augmentation de résistance résulte de la suppression de la G_{Cl} de repos (MOUNIER et GUILBAULT 1970).

3°) blocage de la perméabilité vis à vis d'un ion par modification du pH de la solution externe. Sur la fibre

musculaire de crabe, un milieu de pH 4,25 entraîne une augmentation de R_m associée à la chute de la conductance potassique (MOUNIER et coll., 1970).

Ces trois méthodes aboutissant à des résultats identiques pour la fibre musculaire de crabe permettent de déterminer une conductance au chlore supérieure à la conductance potassique. Leurs valeurs respectives moyennes sont

$$G_{Cl} = 55,7 \% G_m$$

et

$$G_K = 44,3 \% G_m$$

Ce résultat est comparable à celui obtenu sur la fibre musculaire de grenouille par HODGKIN et HOROWICZ (1959), ADRIAN (1960), HUTTER et NOBLE (1960) bien que, pour cette fibre, la conductance au chlore soit supérieure ($G_{Cl} = 68 \%$). HENČEK et coll. (1962), ZACHAR et coll. (1964) trouvent des contributions sensiblement équivalentes des ions K^+ et Cl^- à la conductance membranaire des fibres d'écrevisse ($T_K = 0,46$ et $T_{Cl} = 0,43$). Bien que ce résultat apparaisse différent de celui obtenu pour la fibre de crabe, il convient de signaler toutefois qu'il correspond à 20 p. 100 de nos mesures. Nous avons en effet observé que, sur certaines préparations, la conductance potassique était légèrement supérieure à la conductance au chlore. Par contre,

HINKLE et coll. (1971) obtiennent $T_K = 0,67$ et $T_{Cl} = 0,19$ sur des fibres musculaires d'écrevisse, valeurs que nous n'avons jamais rencontrées pour la fibre de crabe.

Enfin, différentes investigations ont tenté de préciser les voies de passage de ces ions et d'attribuer un rôle distinct à la surface membranaire et au système tubulaire transverse. La membrane du STT serait sélectivement perméable aux anions et représenterait le site d'efflux du chlore (GIRARDIER et coll., 1963 ; BRANDT et coll., 1965 ; RICHARDS, 1969). La conductance potassique de repos semblerait par contre localisée dans une zone plus immédiatement en contact avec la solution externe, vraisemblablement le sarcolemme. Cette hypothèse résulte de la mesure comparée des délais d'établissement de E_m lorsque sont réalisées des modifications des concentrations externes en ions K^+ ou Cl^- . Le P.R. se fixe toujours plus lentement à une valeur stable lorsque la concentration externe en chlore varie, laissant supposer que ces ions s'échangeraient au niveau de sites profonds entraînant alors un délai de diffusion (MOUNIER, 1970 ; ORENTLICHER et REUBEN, 1971).

B - L'EXCITATION : Le potentiel d'action et la théorie ionique

I - Fibres nerveuse et musculaire squelettique de Vertébrés.

1°) Rappel des données classiques

La théorie de BERNSTEIN prévoyait que lors de l'excitation, la membrane devienne perméable à tous les ions. De même, COLE et CURTIS (1939) observent que le potentiel d'action est accompagné d'une diminution d'impédance interprétable par un accroissement de perméabilité ionique. Les travaux effectués ensuite ont permis de préciser que le potentiel de membrane change de signe au moment de l'activité et qu'une perméabilité particulière vis à vis d'un ion doit être envisagée.

Sur la fibre musculaire squelettique, la conductance membranaire augmente pendant l'activité électrique (KATZ, 1942 ; FATT et KATZ, 1951). Dès 1936, FENN et COBB mettent en évidence que la cellule s'enrichit en sodium et perd du potassium pendant l'activité. HODGKIN et coll. (1949), NASTUK et HODGKIN (1950) montrent que l'amplitude du potentiel d'action dépend de la concentration sodique externe ou interne tandis que la vitesse de repolarisation paraît liée à la concentration intracellulaire en potassium (DESMEDT, 1953). Les études récentes en potentiel imposé confirment ces premières constatations (ILDEFONSE et ROUGIER, 1969, 1972 ; ADRIAN et coll., 1970 a). Ainsi, dès lors que la phase

rapide de dépolarisation correspond à une augmentation de perméabilité membranaire aux ions sodium -favorisant une entrée de ces ions dans la cellule- et que la repolarisation correspond à une augmentation de perméabilité aux ions potassium -ceux-ci sortant de la cellule-, on peut imaginer que surviennent une augmentation progressive de la concentration sodique interne et une diminution progressive de la concentration potassique interne. En fait, il existe un mécanisme capable, grâce à un apport d'énergie, de chasser le sodium entré et de reprendre le potassium perdu, afin de vaincre les gradients électrochimiques de ces ions (HODGKIN et KEYNES, 1955 ; CONWAY et coll., 1961 ; CONWAY, 1964 ; CROSS et coll., 1965 ; ADRIAN et SLAYMAN, 1966).

2°) Théorie ionique d'HODGKIN - HUXLEY :
le potentiel imposé

a) Le courant de membrane

Lors de leurs premières expériences en voltage imposé, HODGKIN et KATZ (1949) puis HODGKIN et coll. (1952) enregistrent le courant ionique global en fonction du potentiel et du temps.

Le courant global est égal à :

$$I_t = I_c + I_{Na} + I_K + I_L \quad (8)$$

où I_c est le courant capacitif, I_{Na} le courant sodique, I_K le courant potassique et I_L un courant ionique non

spécifique encore appelé "courant de fuite" ($L = \text{leak}$) comprenant souvent les ions Cl^- .

HODGKIN et HUXLEY (1952 a) extraient du courant global les composants sodique et potassique et considèrent que chaque espèce ionique se déplace de façon indépendante et :

i - passivement sous l'influence du potentiel électrochimique ou "driving-force" défini par $(E - E_{\text{Na}})$ pour les ions Na^+ , et $(E - E_{\text{K}})$ pour les ions K^+ .

ii - en fonction de la facilité avec laquelle la membrane laisse passer chacune de ces espèces, autrement dit selon la perméabilité membranaire exprimée en termes de conductance membranaire g_{Na} et g_{K} .

Les courants ioniques membranaires peuvent alors être définis par les équations suivantes :

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} (E - E_{\text{Na}}) \quad (9)$$

$$I_{\text{K}} = g_{\text{K}} (E - E_{\text{K}}) \quad (10)$$

avec $E_{\text{Na}} = \frac{RT}{F} \text{Log} \frac{[\text{Na}]_e}{[\text{Na}]_i}$

et $E_{\text{K}} = \frac{RT}{F} \text{Log} \frac{[\text{K}]_e}{[\text{K}]_i}$

Pour le courant capacitif on a :

$$I_c = C_m \frac{dE}{dt}$$

où C_m est la capacité membranaire.

Dans ces conditions, pour un potentiel donné E, l'évolution des courants en fonction du temps traduit celle des conductances membranaires.

La technique du potentiel imposé a donc consisté à mesurer les courants ioniques traversant une surface définie de membrane lorsque le potentiel de cette surface est fixé pendant un temps donné à un niveau choisi et constant.

Quel est l'intérêt d'une telle technique ?

Dans la mesure où les perméabilités dépendent du potentiel plutôt que du courant, les enregistrements à potentiel constant permettront une interprétation plus facile que les enregistrements à courant constant.

De plus, l'application d'un échelon de potentiel à la membrane provoque une charge rapide de la capacité membranaire, ce qui permet de séparer dans le temps, les courants ioniques du courant capacitif. L'application d'un courant dans la cellule, (technique du courant imposé), provoque, en raison de la valeur élevée du produit $R_m \cdot C_m$ un retard important dans le déroulement du changement de potentiel ce qui risque de masquer les processus rapides initiaux.

Il découle de ces considérations que toute mesure de conductance n'est possible que si :

- le potentiel de membrane au niveau duquel doit être mesurée la conductance est établi sans délai, ce qui nécessite l'élimination ou la réduction du temps

de charge de la capacité membranaire.

- le potentiel de membrane est rigoureusement fixe pendant toute la durée de la mesure.

On conçoit alors que, ces conditions impératives étant réalisées, la technique de mesure soit préférentiellement celle qui permet de mesurer le courant correspondant à une valeur imposée de potentiel.

b) Technique du potentiel imposé : principe et analyse de quelques méthodes.

Dans son principe, cette technique consiste à opposer à la batterie de membrane (de f.e.m. E et de résistance interne élevée R_m) un générateur de potentiel constant de f.e.m. : E_i et de résistance interne nulle par définition. La capacité de la membrane est alors court-circuitée par la résistance interne nulle de E_i . Le produit $R_m \cdot C_m$ du circuit est nul, ce qui revient à imposer instantanément le potentiel E_i (Fig. 8). Si $E_i = E$, aucun courant ne circule à travers R_m . Si E_i est différent de E , un courant traverse R_m ; le sens de ce courant dépend du signe de la ddp ($E - E_i$).

En pratique, la résistance interne équivalente de E_i (résistance interne + résistance des électrodes) n'est pas nulle. En outre, la résistance de membrane est variable et peut devenir très faible, si bien que E ne suit pas E_i et $R_m \cdot C_m$ est loin d'être négligeable. Il importe donc de délivrer au circuit un courant auxiliaire

I_a , ajusté de telle façon que toute tendance de E à dévier de la valeur E_i soit immédiatement et exactement compensée. I_a doit être égal, à tout instant, au courant qui traverse la résistance de membrane R_m (voir Fig. 5).

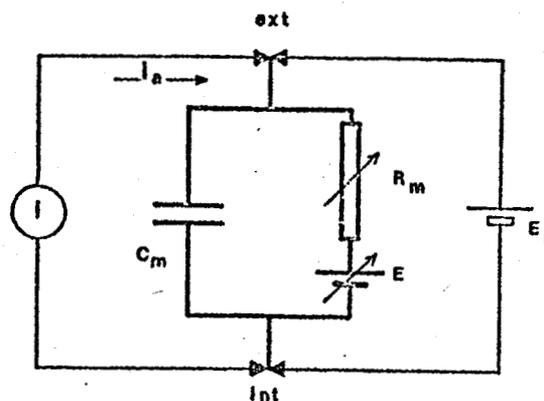


Figure 5 : Représentation simplifiée du principe de la technique du potentiel imposé. Le schéma équivalent de la membrane cellulaire est représenté en trait épais. C_m est la capacité de membrane ; R_m est la résistance de membrane et E le potentiel de membrane. E_i est le générateur de tension imposée et I le générateur de courant asservi.

- D'après BERGMAN (1969) -

Un tel résultat ne peut être obtenu que si l'on dispose d'un générateur de courant asservi au potentiel de la membrane. La solution fut trouvée par COLE et MARMONT (1949) qui proposèrent d'utiliser, comme générateur de courant, un amplificateur à contre-réaction extérieure. Le "stabilisateur de tension" consiste donc généralement en un amplificateur à contre réaction totale externe de type amplificateur opérationnel. La différence de potentiel entre les deux entrées de l'am-

plificateur bouclé est théoriquement nulle. En plaçant une de ses entrées à un potentiel choisi et en reliant l'autre à l'intérieur de la fibre, on fixe le potentiel de membrane, bloqué au niveau choisi par le réseau de contre-réaction.

De nombreux montages ont été utilisés, résultant des diverses configurations des réseaux d'entrée et de contre-réaction en fonction des possibilités d'implantation des électrodes c'est-à-dire en fonction des tissus étudiés.

Dans les premiers travaux réalisés à l'aide de cette technique, le potentiel était imposé entre une électrode axiale (fil métallique) placée à l'intérieur de la fibre et une électrode extérieure entourant cette même fibre. Les deux électrodes étaient reliées au circuit stabilisateur de tension. L'insertion d'une électrode à l'intérieur d'une fibre requiert évidemment que les fibres soient d'un diamètre suffisamment important pour ne pas être lésées même si les électrodes sont très fines. Cette méthode, appliquée à l'axone géant de calmar ou de seiche (COLE, 1949 ; MARMONT, 1949 ; COLE et MOORE, 1960 a,b), fut quelque peu modifiée par HODGKIN et coll. (1952). Ces auteurs insérèrent dans l'axoplasme non plus une, mais deux électrodes métalliques qui, avec deux autres électrodes annulaires extérieures, constituent les deux paires d'électrodes par lesquelles sont appliqués séparément, de part et d'autre de la membrane, le

potentiel impose E_i et le courant de contre-réaction I_a (Fig. 6A).

Actuellement, toutes les techniques de potentiel imposé, appliquées à des structures cellulaires diverses, font appel à ce principe général. Nous limiterons volontairement cet exposé à un rappel des différentes adaptations de la technique du potentiel imposé à l'étude des courants ioniques sur les fibres musculaires de Crustacés.

- HAGIWARA et coll. (1969) et plus récemment KEYNES et coll. (1973) pour les fibres musculaires de barnacle utilisèrent une technique par insertion d'électrodes dans le myoplasme, technique comparable à celle que nous venons de décrire (Fig. 6B).

- Une autre possibilité envisagée par STRICKHOLM (1963) sur les fibres de crabe consiste à mesurer le potentiel de membrane à l'aide d'une micro-électrode et à enregistrer le courant grâce à des macroélectrodes placées à la surface de la fibre (Fig. 6 C).

- L'emploi d'électrodes externes constitue une méthode différente de potentiel imposé. Elle nécessite la réalisation d'un "noeud artificiel" en réduisant la partie accessible d'une fibre à un pont étroit isolé entre deux compartiments de saccharose. Cette méthode, dite du double sucrose-gap permet généralement de mieux observer les phénomènes rapides (DODGE et FRANKENHAEUSER, 1958 ; BERGMAN, 1969 ; FOINER., 1969,

Figure 6 :

- A : Technique de potentiel imposé par électrodes intracellulaires de grande surface pour le contrôle du potentiel et la mesure du courant selon COLE (1949), HODGKIN, HUXLEY et KATZ (1952) rapporté par KATZ (1966).
- B : Technique de potentiel imposé dérivée de A et utilisée par KEYNES (1973) sur les fibres de barnacle (d'après BEZANILLA et coll., 1970). Partie gauche : condition de courant imposé ; partie droite : condition de potentiel imposé, le contact étant alors établi entre la sortie de l'amplificateur et l'électrode axiale.
- C : Technique de potentiel imposé d'après STRICKHOLM (1963) pour les fibres musculaires de crabe.
 V_i = potentiel intracellulaire ; R_o : résistance des macropipettes ; R_i : résistance de fuite ou shunt.
- D : Technique de potentiel imposé par double sucrose-gap d'après ROUGIER, VASSORT et STÄMPFLI (1968 b).
 Contrôle du potentiel et mesure du courant par électrodes externes.
 Voir explications détaillées dans le chapitre "Matériel et méthodes".

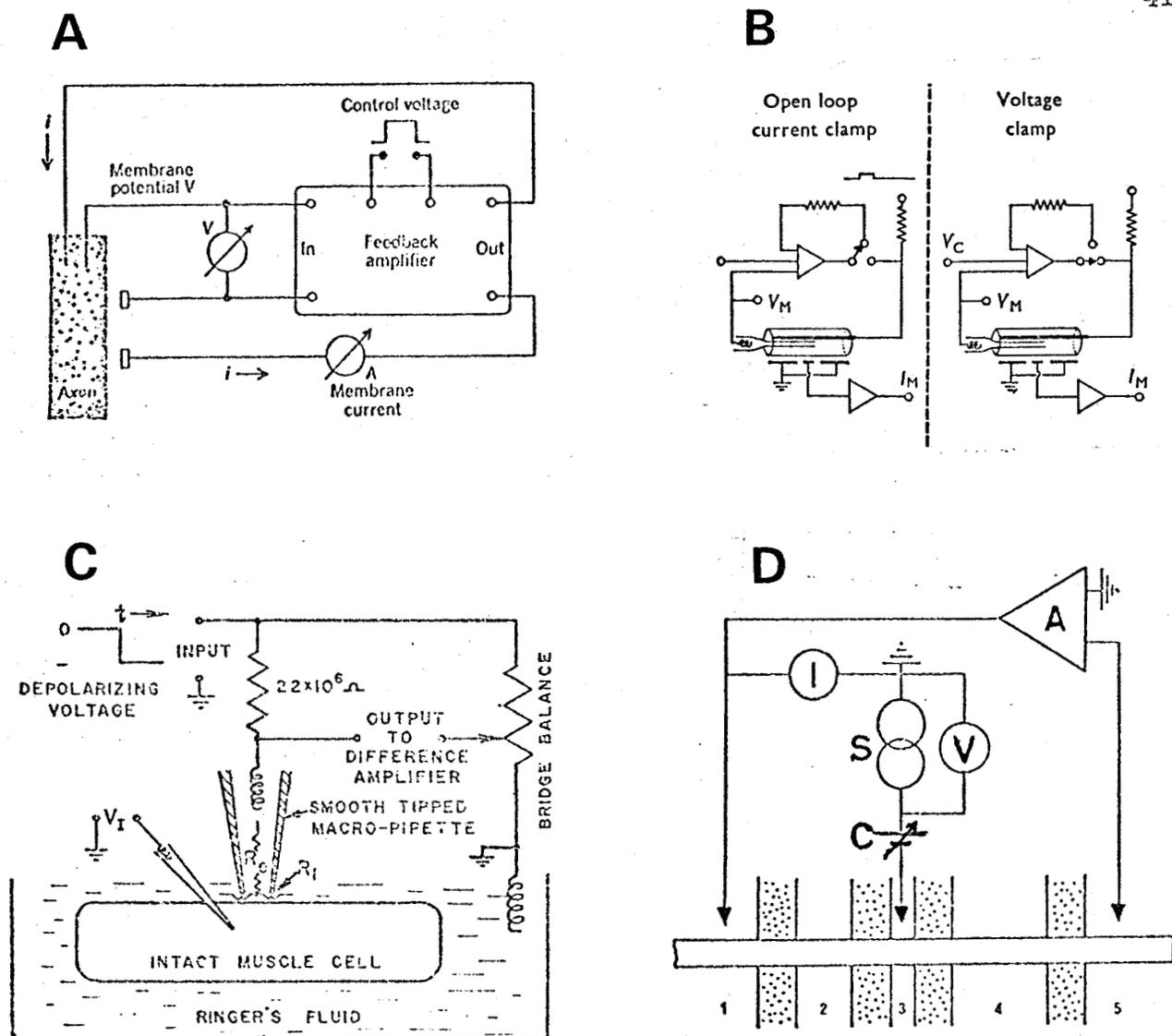


Figure 6 : Techniques de potentiel imposé utilisées sur les fibres musculaires de crustacés (B - C - D).

- Explications des schémas page ci-contre.

pour la fibre nerveuse myélinisée ; JULIAN et coll., 1962, pour l'axone géant de homard ; ROUGIER et coll., 1968 b, pour le faisceau sino-auriculaire de grenouille (Fig. 6 D) ; ANDERSON, 1969, pour le muscle utérin de ratte et ILDEFONSE, 1970, pour la fibre musculaire squelettique). C'est cette méthode que nous avons utilisée sur la fibre musculaire de crabe et que nous présenterons de façon plus détaillée dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

- Enfin, une variante de la technique du double sucrose-gap a été réalisée par HENČEK et coll. (1969) pour les fibres musculaires d'écrevisse. La modification apportée résulte du fait qu'une contracture importante se développe dès que la surface de la membrane est lavée par une solution isotonique de saccharose. Cet inconvénient se retrouve également pour la fibre de crabe et nous exposerons ultérieurement (Techniques) le moyen adopté pour résoudre cette difficulté. HENČEK et coll., quant à eux, modifient le dispositif d'imbibition de la fibre dans les solutions de saccharose. Ils réalisent un "annular sucrose gap" dans lequel les compartiments de saccharose sont circulaires et ont une largeur très faible.

c) Modèle théorique d'HODGKIN-HUXLEY

Nous avons vu que, pour un potentiel donné, l'évolution des courants en fonction du temps traduit

celle des conductances membranaires (équations 8 à 10).

HODGKIN et HUXLEY supposent que la perméabilité membranaire dépend de l'état ou de la position de groupes de particules chargées dans la membrane. Le passage des ions est subordonné à l'état de ces "sites" dont le nombre, pour la surface de membrane considérée est constant, limité et normalisé à 1. Il existerait pour ces sites deux états possibles : un état disponible ou ouvert " α " et un état indisponible ou fermé " β ", le nombre de sites dans l'état α ou β dépendant du potentiel pour des particules chargées.

i) Perméabilité au potassium

Pour une valeur du potentiel de membrane, le nombre de sites dans l'état α est n , ce qui revient à dire que $(1 - n)$ sites sont dans l'état β .

Pour $E = E_R$ (potentiel de repos) $n = n_0$ est très petit, par contre, $(1 - n_0)$ est grand. Si la membrane est brusquement dépolarisée, n_0 tend vers une valeur n supérieure à n_0 et le nombre de sites dans l'état β devient : $(1 - n)$. En d'autres termes, les sites β vont se convertir en sites α . La vitesse de conversion est : α_n ; par analogie, la vitesse de conversion de l'état α à l'état β est β_n .

Les vitesses de conversion α_n et β_n ont donc des valeurs qui sont dans le rapport du nombre de sites α et β .

$$\text{soit : } \frac{\alpha_n}{\beta_n} = \frac{n}{(1-n)}$$

Lors d'un brusque changement de potentiel, la variation de n est telle que :

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n$$

A l'état stable, quand la conversion est achevée, E_m est constant, n prend une valeur stationnaire n_∞ et $\frac{dn}{dt}$ est nul, donc :

$$n_\infty (\alpha_n + \beta_n) = \alpha_n$$

$$\text{Il s'en suit que : } n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}$$

Si l'on admet que chaque site dans l'état α se convertit en un site dans l'état β , la transition d'une valeur stationnaire d'origine (n_0) à une autre valeur stationnaire (n_∞) doit se développer selon une exponentielle de constante de temps τ_n telle que :

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}$$

Dans ces conditions, à l'établissement brusque d'une impulsion rectangulaire de potentiel, n doit varier, en fonction du temps, selon l'équation :

$$n = n_0 + (n_\infty - n_0) (1 - e^{-t/\tau_n}) \quad (11)$$

Lors du relâchement du potentiel imposé, n doit varier selon l'équation de "retour" :

$$n = n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) e^{-t/\tau_n} \quad (12)$$

L'expérience montre que les transitions de g_K ne sont pas toutes deux des exponentielles du temps : la phase d'augmentation de conductance potassique lors d'une dépolarisation n'est pas exponentielle mais d'allure sigmoïde ; la phase de retour étant, par contre, exponentielle.

Les équations ne rendent donc pas compte des faits expérimentaux si l'on admet que la perméabilité au potassium est simplement proportionnelle à n , hypothèse qui serait valable si chaque site était représenté par une seule particule chargée. Les résultats expérimentaux conduisent alors à supposer qu'un site est en réalité représenté par x particules. Dans ces conditions, les équations 11 et 12 doivent être respectivement remplacées par les équations 13 et 14 soit :

$$n = \left[n_0 + (n_{\infty} - n_0) (1 - e^{-t/\tau_n}) \right]^x \quad (13)$$

et
$$n = \left[n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) e^{-t/\tau_n} \right]^x \quad (14)$$

La valeur de l'exposant x traduit en pratique le retard de la variation de g_K par rapport au début du changement de potentiel. Ce retard est d'autant plus

grand que x est élevé. HODGKIN et HUXLEY, dans le cas de l'axone géant de calmar, constatent que la variation de conductance observée expérimentalement peut être décrite si g_K est proportionnelle à n^4 .

ii) Perméabilité au sodium

Le comportement de la conductance aux ions sodium est, pendant la période initiale de dépolarisation imposée, identique à celui de g_K , à la différence près que la constante de temps de la variable "d'activation sodium" (m) est beaucoup plus faible que celle de la variable d'activation potassium. m varie donc beaucoup plus vite que n . α_m croît, comme α_n , avec la dépolarisation.

Le même type d'équations est proposé, notamment :

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - (\beta_m m)$$

d'où

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}$$

Lors d'un changement brusque de potentiel imposé, m varie, selon l'équation :

$$m = \left[m_0 + (m_\infty - m_0) (1 - e^{-t/\tau_m}) \right] x$$

Si la dépolarisation imposée cesse brusquement au moment où le courant sodium est maximum, le retour progressif suit l'équation :

$$m = \left[m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) (e^{-t/\tau_m}) \right] x$$

La principale différence de comportement de g_{Na} par rapport à g_K vient du fait que l'augmentation de g_{Na} produite par une dépolarisation n'est pas maintenue mais est l'objet d'une inactivation.

HODGKIN et HUXLEY supposent donc qu'une variable "d'inactivation sodium" (variable h) gouverne aussi la perméabilité aux ions sodium.

Le système d'équations est alors :

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h$$

$$h_{\infty} = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h}$$

$$\tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h}$$

Lors d'une dépolarisation, h varie, en fonction du temps, selon les équations :

$$h = h_0 + (h_{\infty} - h_0) (1 - e^{-t/\tau_h})$$

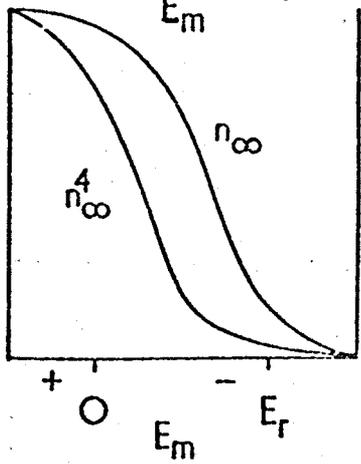
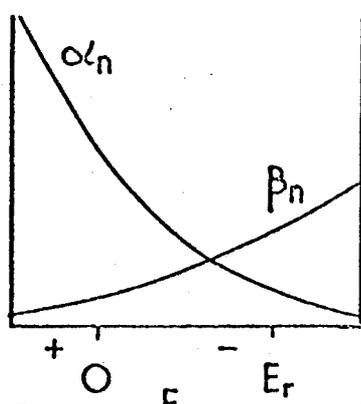
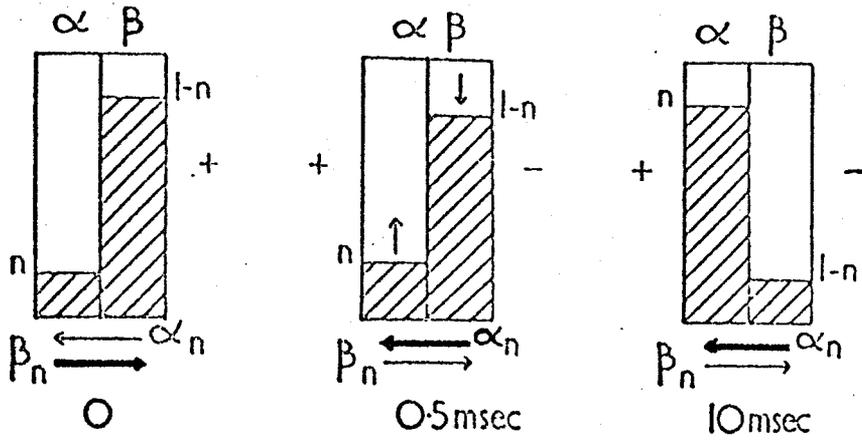
$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) e^{-t/\tau_h}$$

Enfin, contrairement à n et m , et étant donné que α_h décroît avec les dépolarisations, h décroît avec le potentiel de membrane.

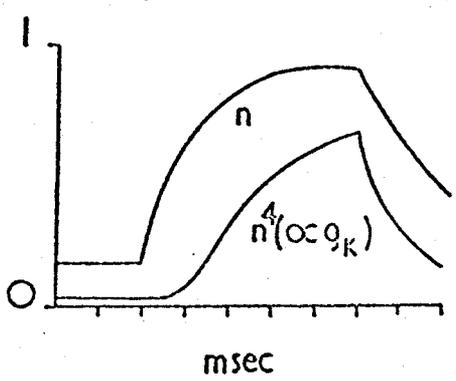
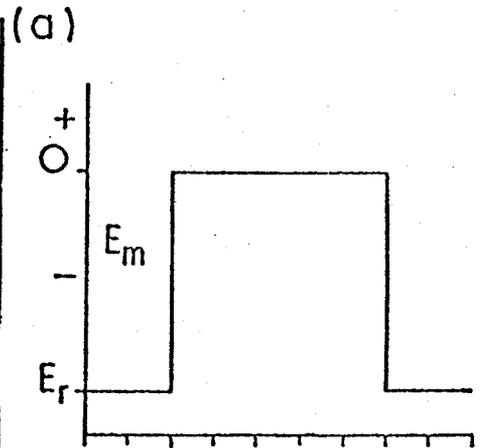
Figure 7 : Processus déterminant la conductance potassique dans la théorie d'Hodgkin et Huxley.

- a) Evolution de n lors d'une dépolarisation brusque : la fraction n de groupes dans l'état α , initialement faible (α_n est petit, β_n est grand) augmente exponentiellement par suite de l'augmentation de α_n et de la diminution de β_n par la dépolarisation. La grandeur relative des coefficients α et β est indiquée par l'épaisseur des flèches.
- b) partie supérieure : variation des constantes de vitesse en fonction du potentiel E_m (E_m = potentiel de repos, dépolarisation vers la gauche).
Partie inférieure : variation de n_∞ ($n_\infty = \alpha_n / (\alpha_n + \beta_n)$) et n_∞^4 en fonction de E_m .
- c) Evolution de n et g_K lors d'une dépolarisation brusque.

- D'après NOBLE (1966) -



(b)



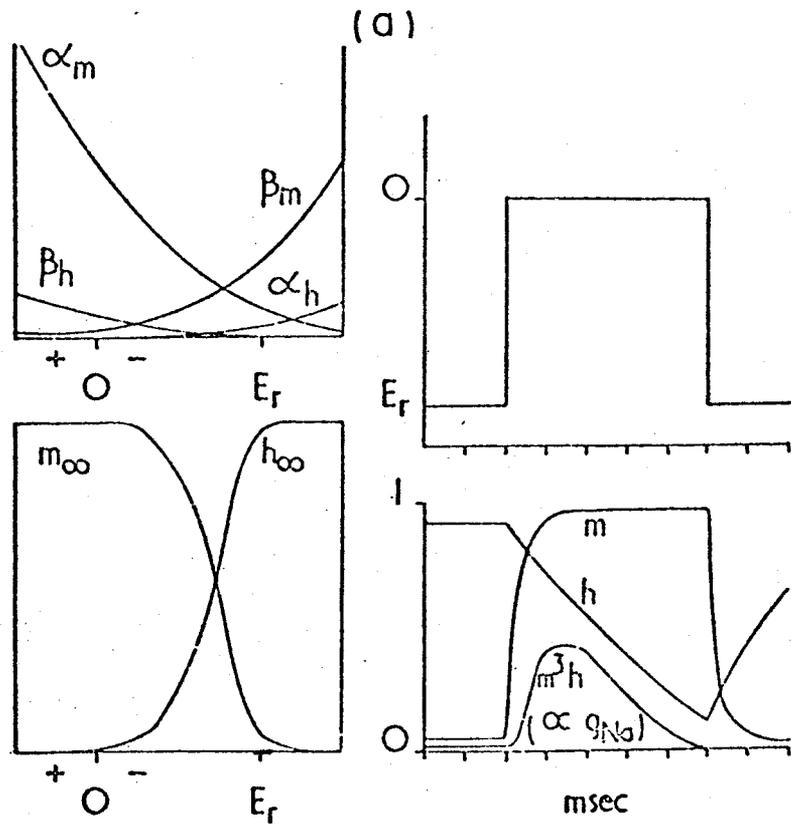
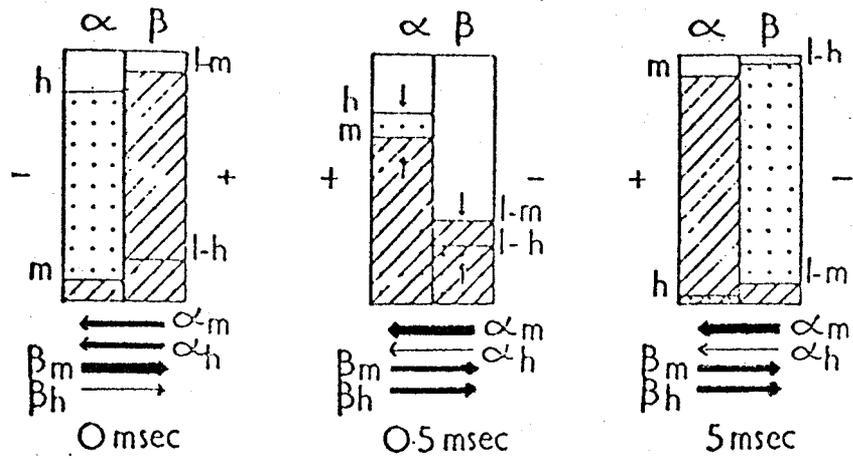
(c)



Figure 8 : Processus déterminant la conductance sodique dans la théorie de Hodgkin et Huxley.

- a) Evolution de m et h lors d'une dépolarisation brusque.
Initialement m est petit et h grand ; lors d'une dépolarisation α_m devient très grand et m augmente ainsi rapidement, β_h est également augmenté mais, puisqu'il est plus petit que α_m , h ne diminue que lorsque m a atteint sa valeur presque maximale. La grandeur relative des coefficients α_m , β_m , α_h et β_h est indiquée par l'épaisseur des flèches.
- b) Partie supérieure : variation des constantes de vitesse en fonction du potentiel.
Partie inférieure : variation de m_∞ et h_∞ en fonction du potentiel.
- c) Evolution de m , h et g_{Na} lors d'une dépolarisation brusque.

- D'après NOBLE (1966) -



(b)

(c)



En conclusion, le développement de ces équations a permis de rendre compte de la majorité des propriétés électrophysiologiques de l'axone de calmar (phénomènes d'excitation et d'accomodation, forme du potentiel d'action, vitesse de propagation et propriétés de rectification) les valeurs calculées recouvrant les données expérimentales.

On retiendra principalement que les valeurs des constantes de vitesse α (m, n, h) et β (m, n, h) dépendent du potentiel de membrane uniquement. Les variables m, n et h peuvent, par contre, prendre toutes les valeurs comprises entre 0 et 1, en fonction du temps et du potentiel. Les schémas des figures 7 et 8 empruntés à NOBLE (1966) résument l'évolution de ces paramètres déterminant les conductances sodique et potassique.

Enfin, ce modèle élaboré pour la fibre nerveuse, demeure valable, dans ses grandes lignes, et applicable, avec certaines modifications proposées par NOBLE (1962, 1966) à un grand nombre de cellules excitables.

II - Autres structures excitables : intervention des ions calcium

Dans leur modèle, HODGKIN et HUXLEY (1952,d) ne prennent pas en considération la participation

d'ions Ca^{++} en tant que transporteurs de charges pour le potentiel d'action de l'axone de calmar. Cependant, à l'aide de traceurs, HODGKIN et KEYNES (1957) ont, sur ce même tissu, mesuré un accroissement de l'influx calcique lors de chaque potentiel d'action ($0,006 \text{ pmole/cm}^2$). Cet influx comparé à l'influx d'ions Na ($4 \text{ pmole/cm}^2/\text{PA}$) montre que la contribution des charges calciques est négligeable. Le problème d'une augmentation transitoire de perméabilité aux ions Ca a été repris par BAKER et coll. (1971) qui ont couplé les études en potentiel imposé à l'observation de l'émission lumineuse en présence de Ca d'une photoprotéine : l'aequorine.

Dans d'autres structures nerveuses, une contribution importante du calcium a été démontrée, notamment par KOKETSU et coll. (1959) sur le ganglion spinal de la grenouille et par GEDULDIG et YUNGE (1968), MEVES (1968), GEDULDIG et GRUENER (1970), CONNOR et STEVENS (1971 a) sur le soma des neurones géants de Mollusques (*Aplysia* et *Helix*). Dans tous ces cas, la dépendance de la dépolarisation vis à vis de l'entrée d'ions Ca^{++} est suggérée par :

- l'existence de potentiels d'action en milieu dépourvu d'ions Na,

- la dépendance de ces PA vis à vis des cations alcalino-terreux (Ca, Sr, Ba dans le milieu extracellulaire),

- l'insensibilité de ces PA à la tétrodotoxine alors que les ions La, Mn ou Co provoquent leur suppression.

De nombreuses structures musculaires présentent les mêmes caractéristiques. Une insensibilité de la phase ascendante des potentiels d'action aux variations de la concentration sodique extracellulaire a été rapportée sur :

- le muscle lisse et plus précisément sur le cobaye pour le vas deferens (BENNETT, 1967), le taenia coli (BRADING et coll., 1969 ; BULBRING et TOMITA, 1969, 1970) et l'utérus (VASSORT, 1973, 1975),

- les fibres musculaires d'insectes, soit myocardiques (Mc CANN, 1971), soit musculaires squelettiques (WASHIO, 1971).

Dans le cas du muscle cardiaque, l'amplitude du plateau du potentiel d'action est sous la dépendance d'un courant calcique. La suppression des ions Na n'a que peu d'influence alors que ces ions déterminent la dépolarisation rapide et initiale du PA (CORABOEUF et OTSUKA, 1956 ; NIEDERGERKE et ORKAND, 1966^{a,b} ; CORABOEUF et VASSORT, 1967, 1968 ; BEELER et REUTER, 1970 b).

Pour la plupart des tissus, la spécificité du canal lent vis à vis des ions Ca n'est cependant pas

clairement établie puisqu'une variation de 25 à 28 mV de l'amplitude du PA pour une variation de 10 fois $[Ca]_e$ n'est fréquemment observée que lorsque le milieu externe ne contient pas d'ions Na. Ceci suggère donc une participation conjointe des ions Na et Ca qui a pu être proposée aussi bien sur l'aplysie (GEDULDIG et GRUENER, 1970) que sur le muscle lisse (ANDERSON et coll., 1971 ; MIRONNEAU et LENFANT, 1971 ; MIRONNEAU, 1973, 1974) ou sur le muscle cardiaque (ROUGIER et coll., 1969). Une analyse détaillée de l'influence des ions Ca^{++} sur différents tissus a été effectuée par REUTER (1973).

III - Fibres musculaires de Crustacés

1°) Les potentiels d'action calciques

Les fibres musculaires de Crustacés constituent un matériel de choix pour la mise en évidence de la participation des cations divalents à la genèse du potentiel d'action. Les premiers travaux montrant que les cations divalents peuvent se comporter comme des transporteurs de charges sont dus à FATT et KATZ (1953) sur les muscles de crabe. Les fibres sont excitables lorsqu'elles sont placées dans des solutions dépourvues de sodium mais contenant du calcium et du magnésium. FATT et GINSBORG (1958) sur les muscles d'écrevisse, HAGIWARA et NAKA (1964),

HAGIWARA et coll. (1964) sur les muscles de barnacle constatent ensuite que ni le sodium, ni le magnésium ne sont indispensables pour maintenir l'excitabilité alors que la suppression du calcium extracellulaire abolit rapidement le PA. De plus, ces auteurs ainsi que WERMAN et GRUNDFEST (1961) sur les muscles de homard montrent que les ions Sr et Ba se révèlent être des cations capables de produire des réponses en absence de calcium, les potentiels étant alors très amples et très durables. Des potentiels, indépendants de $[Na]_e$ et dépendants de $[Ca]_e$ ont été également déterminés sur les muscles extenseur et fléchisseur d'écrevisse et de homard par ABBOTT et PARNAS (1965) et TAKEDA (1967). Ces potentiels, dépendants de $[Ca]_e$ sont insensibles à la TTX (OZEKI et coll., 1966 ; TAKEDA, 1967). L'augmentation de la concentration calcique externe provoque une augmentation d'amplitude du potentiel et un déplacement du seuil d'excitation dans une direction positive (HAGIWARA et NAKA, 1964). Dans la gamme de $[Ca]_e$ comprise entre 20 et 100 mM, la relation entre la valeur du potentiel à la pointe du PA et le logarithme de $[Ca]_e$ est linéaire avec une pente de 29 mV pour une variation de 10 fois $[Ca]_e$ (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 b). De plus, les mesures des influx de ^{45}Ca sur les fibres musculaires de barnacle apportent une preuve supplémentaire de l'augmentation de l'entrée de calcium durant l'activité

(HAGIWARA et NAKA, 1964). Plus récemment, l'injection d'aéuorine dans ces préparations, a clairement montré qu'une importante entrée de Ca a lieu lorsque des courants dépolarisants sont appliqués (ASHLEY et RIDGWAY, 1970).

Cependant, HAGIWARA et NAKAJIMA (1966, b) démontrent que la valeur du potentiel à la pointe du PA ne correspond pas à un potentiel d'équilibre calcique. Cette valeur n'est pas uniquement déterminée par le gradient calcique à travers la membrane mais serait plus exactement traduite en tenant compte du rapport : $\log \frac{[Ca]_e}{[K]_i}$, suggérant que le pic est fonction du rapport I_{Ca} / I_K . Cette hypothèse a été confirmée par différentes observations. En effet, nous avons mentionné que les ions Ba^{++} et Sr^{++} peuvent remplacer les ions Ca^{++} et provoquent en outre une augmentation de l'amplitude et de la durée des potentiels. Un résultat identique a été observé sur différents Crustacés en présence de TEA ou de TBA : tétrabutylammonium (FATT et KATZ, 1953), de procaïne (TAKEDA, 1967) ou en réduisant la concentration potassique interne (HAGIWARA et coll., 1964). Les ions Ba^{++} (SPERELAKIS et coll., 1967), le TEA (ARMSTRONG et BINSTOCK, 1965), la procaïne, (REUBEN et coll., 1959 ; GRUNDFEST, 1961) et la diminution de $[K]_i$ (CHANDLER et coll., 1965) sont des facteurs connus pour provoquer une diminution du courant potassique sortant dans les membranes excitables bien

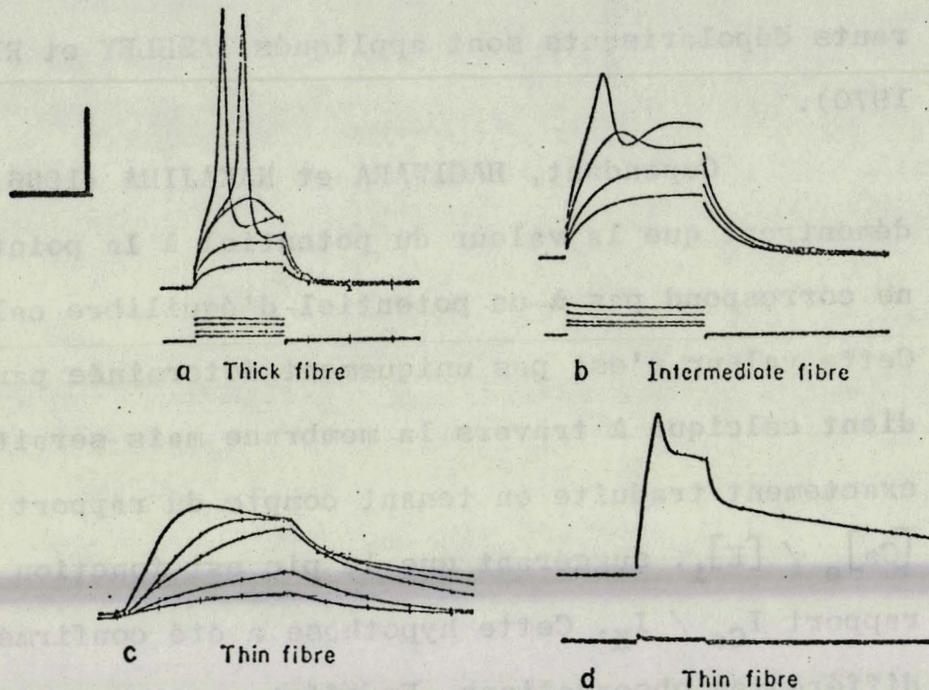


Figure 9 : Enregistrement de l'activité électrique des fibres du muscle abducteur du crabe *Chionecetes*.

- a : P.A. de type tout ou rien enregistré sur une grosse fibre ("thick fibre")
 b : Réponse graduée enregistrée sur une fibre de diamètre moyen ("intermediate fibre")
 c-d : Réponse obtenue sur une fibre fine et observation de la rectification retardée ("thin fibre")

Calibrage vertical : potentiel de membrane = 20 mV
 courants appliqués : 2 μ A (a) ; 1 μ A (b,d)

Calibrage horizontal : 100 ms (a) ; 200 ms (b) ; 400 ms (c) ;
 1 sec (d).

que leurs mécanismes d'action soient très différents.

Il apparaît donc, pour les fibres musculaires de Crustacés que le potentiel d'action est étroitement dépendant de l'influx d'ions Ca^{++} mais que l'existence d'une conductance potassique empêche le potentiel à la pointe du PA d'atteindre le potentiel d'équilibre calcique.

2°) Caractéristiques particulières

Outre le fait que la phase ascendante du potentiel d'action des fibres musculaires de Crustacés est de nature calcique, l'activité électrique de ces fibres se distingue de celles de beaucoup de structures excitables (en particulier, des fibres musculaires squelettiques de Vertébrés) par différentes caractéristiques que nous rappellerons ici :

- le potentiel enregistré lors de l'application de stimulations supraliminaires est le plus souvent de type gradué. Signalons également que, dans quelques cas, une réponse de type "tout ou rien" peut être enregistrée. Enfin, sur certaines préparations, seules des réponses passives sont obtenues même lors de stimulations dépolarisantes très fortes. Ces trois types de réponses ont été décrits pour les fibres musculaires de crabe par ATWOOD et DORAI RAJ (1964), ATWOOD et coll. (1965), ATWOOD (1965). Ces auteurs relient les différents potentiels à l'existence de variations morphologiques et histolo-

giques entre les fibres (COHEN, 1963 ; DORAI RAJ et COHEN, 1964) (Fig. 9).

- le potentiel évolue le long de la fibre selon un processus électrotonique (KATZ et KUFFLER, 1946 ; FATT et KATZ, 1953 ; FURSHPAN et WIERSMA, 1954 ; HAUDECOEUR, 1971).

- une réponse complexe peut être enregistrée lors de l'application de courants hyperpolarisants intenses. Celle-ci a particulièrement bien été étudiée sur de nombreux muscles de Crustacés notamment sur le crabe (ATWOOD et DORAI RAJ, 1964 ; ATWOOD, 1965, Fig. 10 C), le homard (REUBEN et coll., 1961, Fig. 10 D) et le barnacle (HAGIWARA et coll., 1964).

Cette réponse peut être décomposée en deux phases comme l'indiquent, de façon très nette, les enregistrements A et B de la figure 10 obtenus sur la fibre musculaire de crabe par EPSTEIN et HARDY (1973). Une première phase, appelée HH ("high hyperpolarization phase") correspond à une agumentation de la résistance de membrane et pourrait être interprétée comme une "inactivation" potassique. Une deuxième phase, dénommée LH ("low hyperpolarization phase") est consécutive de ce pic d'hyperpolarisation. Particulièrement accentuée sur la fibre musculaire de crabe, cette phase se traduit par une diminution de l'hyperpolarisation et une chute de la résistance. Ces deux phénomènes laissent supposer un processus d'activation lié à la présence des ions Cl^- comme tendent à le montrer les expériences

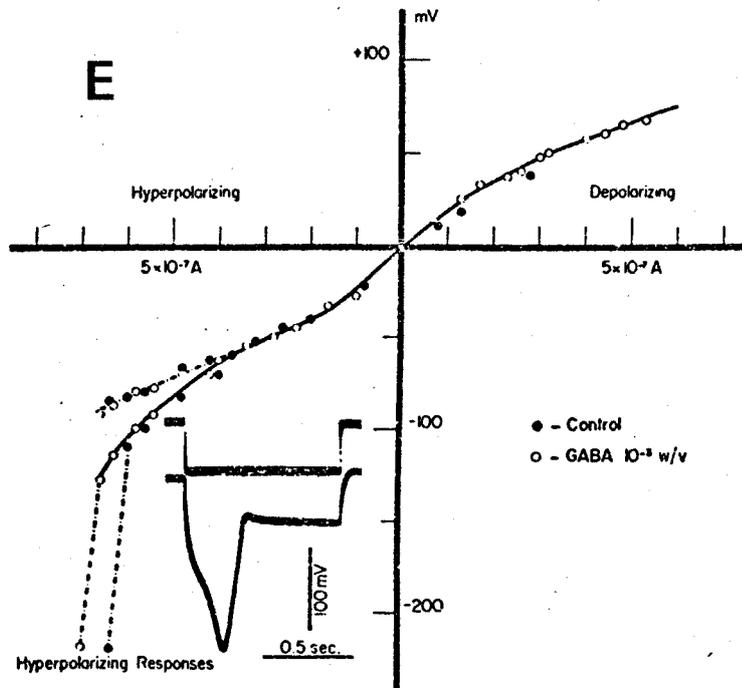
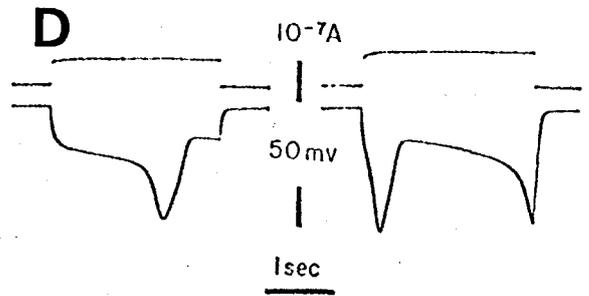
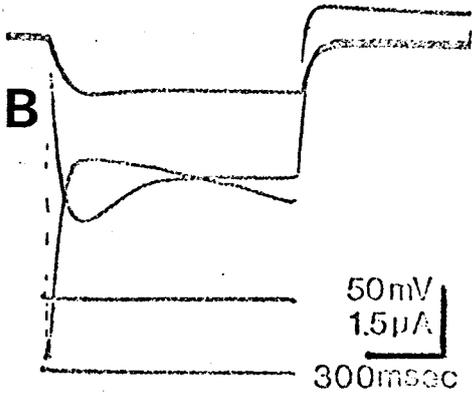
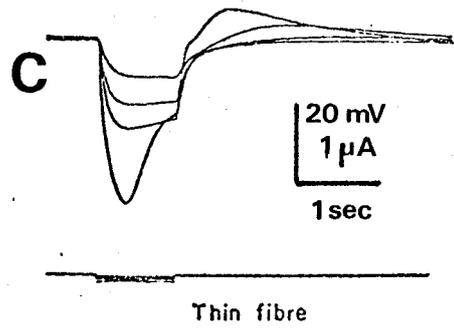
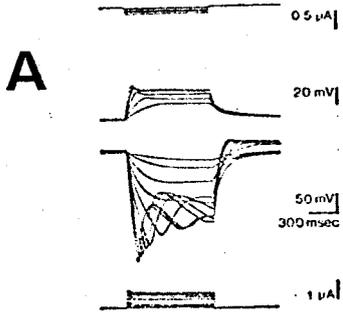
réalisées sur les fibres musculaires d'écrevisse (Fig. 10 E). Cependant, la phase LH pourrait être, d'après EPSTEIN et HARDY, dépendante des ions Ca^{++} à l'intérieur ou à proximité de la membrane, cette quantité de Ca^{++} étant sous le contrôle du métabolisme. En outre, UCHITEL et GARCIA (1974) supposent que la tension enregistrée durant l'application de forts courants hyperpolarisants est due à une entrée de calcium extracellulaire.

- Il est intéressant de signaler enfin qu'une interaction entre le mouvement des ions Cl^- et des cations, principalement des ions Ca^{++} , a été envisagée par REUBEN et coll. (1967) pour expliquer le couplage excitation-contraction (Fig. 11). Au moment de l'activité, un influx de cations, induit par la dépolarisation membranaire, se produirait à travers la membrane plasmique. Du fait de la perméabilité sélective au chlore de la membrane du STT au niveau de la jonction diadique (GIRARDIER et coll., 1963) le courant intracellulaire, passant vers l'extérieur, pourrait alors être responsable d'une accumulation de cations, en particulier d'ions Ca^{++} (GAINER, 1968). Simultanément un influx de Cl^- aurait lieu à travers les terminaisons tubulaires.

En résumé, il apparaît aujourd'hui certain que les différences de potentiel enregistrées sur les tissus excitables résultent du fait que la membrane séparant

Figure 10 : Réponses membranaires obtenues lors de l'application de courants hyperpolarisants.

- A : sur les fibres du muscle extenseur du crabe *T. dylocarcinus*.
Comparaison entre les réponses dues à des courants dépolarisants (tracés supérieurs) et hyperpolarisants (tracés inférieurs)
D'après EPSTEIN et HARDY (1973)
- B : sur ces mêmes fibres. Mise en évidence des phases HH et LH
(voir texte).
- C : sur les fibres fines du muscle abducteur du crabe *Chionecetes*.
D'après ATWOOD (1965)
- D : sur les fibres musculaires de homard
D'après REUBEN et coll. (1961)
- E : sur les fibres musculaires d'écrevisse en milieu sans chlore permettant d'observer une réponse hyperpolarisante. Cl_i est alors très faible et l'application de GABA n'entraîne aucune modification de la courbe courant-potentiel.
Courbe continue : mesures du potentiel initial.
Courbe en pointillés : mesures en fin d'impulsion.
D'après GIRARDIER et coll. (non publié) cité par GRUNDFEST (1966 a-b).



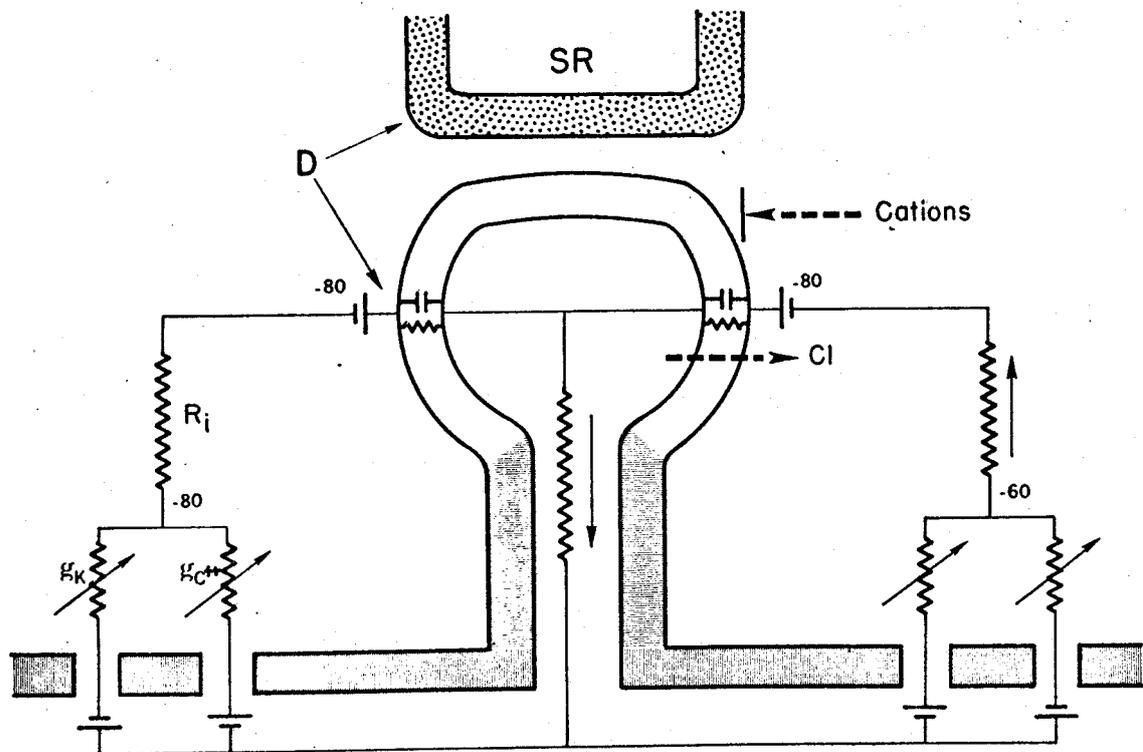


Figure 11 : Modèle d'interaction des flux cationique et anionique et d'interprétation du couplage excitation - contraction.

La membrane sarcolemmique (zone avec hachures verticales) est essentiellement perméable aux cations (K^+ et Ca^{++} pour le muscle d'écrevisse). Au repos (partie gauche du diagramme) la pile membranaire est d'environ 80 mV (intérieur négatif). La membrane du TTS (zone avec hachures horizontales) est relativement imperméable aux ions alors que la partie formant la jonction diadique avec le SR est sélectivement perméable aux anions et est également à - 80 mV.

Pendant l'activité (partie droite du diagramme), le sarcolemme est dépolarisé (jusqu'à - 60 mV dans cette représentation) et le courant circule entre le sarcolemme et la batterie au chlore de la diade. Le courant passe à l'extérieur par l'ouverture du TTS. Comme seuls les anions pénètrent à travers la membrane du TTS au niveau de la diade, le courant entraîne une accumulation de cations à ce niveau.

les milieux interne et externe est sélectivement perméable à certains ions, ces ions pouvant différer selon les structures envisagées. La détermination des processus survenant lors de l'excitation ne peut être faite sans connaître les valeurs de la résistance (ou de la conductance) membranaire correspondant aux dépolarisations de la membrane. Or, un courant dépolarisant conduit à une excitation de la cellule, ce qui revient à dire qu'au-delà d'une valeur liminaire du courant appliqué I , la valeur du potentiel de membranaire devient indépendante de celle de I . Ainsi, dans la mesure où les perméabilités ioniques dépendent du potentiel plutôt que du courant, les enregistrements à potentiel constant permettront une interprétation plus facile que les enregistrements à courant constant. Il fallait donc avoir recours à une technique qui ne consiste plus à déterminer une variation de potentiel due à l'application d'un courant mais au contraire à mesurer le courant correspondant à une valeur imposée de potentiel. La technique du potentiel imposé, particulièrement bien adaptée à ce but a été utilisée.

*

*

*

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE

- I - Animaux d'expérience
- II - Dissection des fibres musculaires isolées
- III - Préparation des fibres pour l'expérimentation.

B - ENREGISTREMENT DES VARIATIONS DE POTENTIEL ET DE COURANT

- I - Technique du double sucrose-gap
- II - Cuve expérimentale
- III - Dispositifs de mesures :
 - 1°) du potentiel de membrane en courant imposé
 - 2°) du courant de membrane en potentiel imposé

C - LIMITES DE LA TECHNIQUE ET CONTROLE DES MESURES REALISEES

- I - Propriétés inhérentes au sucrose-gap
- II - Contrôle des mesures
 - 1°) Enregistrements en courant imposé
 - 2°) Contrôle de la valeur du P.R.
 - 3°) Enregistrements en potentiel imposé

D - EXPRESSION DES RESULTATS - NOMENCLATURE

E - SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE

I - Animaux d'expérience

Les crabes utilisés pour toutes les expériences sont des crabes enragés *Carcinus maenas* provenant de la Manche (Institut de Biologie marine de Wimereux et Institut de Biologie marine de Luc sur mer).

Ces crabes, conservés au maximum une semaine au laboratoire, sont maintenus en vie dans des bacs contenant de l'eau de mer naturelle constamment renouvelée. La température ambiante est de 14 °C. Les animaux ne sont utilisés pour les expériences qu'après avoir séjourné au moins 24 heures dans les bacs, après leur arrivée.

II - Dissection des fibres musculaires isolées

Les expériences sont réalisées sur des fibres isolées du muscle extenseur du méropodite des péréiopodes P₂ P₃ P₄. Le méropodite est détaché de la patte par section au niveau du basiischiopodite d'une part et du carpopodite d'autre part. L'ouverture du méropodite après sections selon ses deux arêtes nous permet de mettre en évidence le muscle extenseur. Le demi-segment de méropodite dans lequel se trouve le muscle est fixé au moyen d'épingles dans le fond de la cuve à dissection contenant le liquide physiologique (eau de mer artificielle).

Les fibres du muscle extenseur utilisées, toujours situées dans la partie centrale du muscle, ont un diamètre variant de 150 à 300 μm et une longueur de 3 à 5 mm. Elles présentent deux points d'insertion : l'un sur l'axostyle (endosquelette), l'autre sur la carapace (exosquelette). Leur section est généralement cylindrique mais parfois elliptique, en particulier pour les plus grosses fibres. Ces fibres correspondent aux fibres "intermédiaires" décrites par ATWOOD et coll. (1965) parce qu'elles répondent le plus souvent à une stimulation par une activité électrique graduée et une contraction de type phasique. Une fibre est isolée, par section des fibres avoisinantes en conservant à ses deux extrémités un fragment d'axostyle et un fragment de carapace. L'obtention de la préparation présente une difficulté résultant du fait que les fibres sont étroitement accolées entre elles par de fins filets nerveux. L'arrachement de l'un d'entre eux provoque au niveau de la membrane musculaire une petite lésion se traduisant très rapidement, par une opacité locale alors qu'une fibre saine reste en tous points parfaitement transparente.

III) Préparation des fibres pour l'expérimentation

Après avoir été isolée, la fibre est conservée dans l'eau de mer artificielle pendant un quart

d'heure environ, délai suffisant pour constater l'apparition éventuelle d'une lésion. La fibre, lorsqu'elle se révèle intacte, est ensuite placée dans une solution de saccharose légèrement hypertonique (1,1 x tonicité normale) où elle produit quelques contractions brusques suivies d'une forte contracture. Cette fibre est ensuite remise dans la solution d'eau de mer artificielle où elle se relâche lentement, parfois seulement en partie. Cette opération permet d'éviter le développement de fortes contractures lorsque la fibre est installée dans la cuve expérimentale et mise au contact des deux écoulements de saccharose. Il faut noter que les fibres ne présentant pas de contracture dans la solution saccharose ni de relâchement lors du retour en eau de mer sont systématiquement rejetées. Celles-ci laissent en effet toujours apparaître, à un examen binoculaire soigneux à fort grossissement, une minuscule lésion.

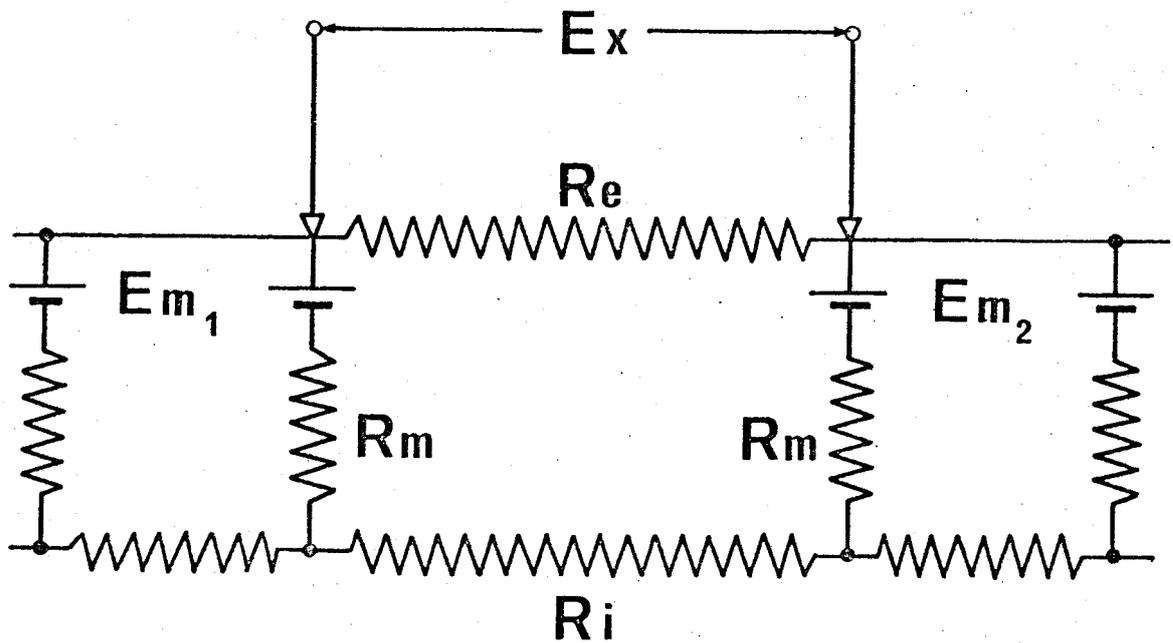
La dissection ainsi que les expériences sont effectuées à une température de 16°C. Le transport de la fibre isolée à la cuve à expérimentation est effectué sur une lamelle de verre dans une goutte d'eau de mer.

B - ENREGISTREMENT DES VARIATIONS DE POTENTIEL ET DE COURANT

Si l'utilisation des microélectrodes a été très développée pour la mesure des potentiels bioélectriques, nous avons signalé précédemment que l'étude des conductances membranaires pouvait être préférentiellement conduite à partir des enregistrements des courants membranaires. La technique du double sucrose-gap permet de mesurer ces courants en imposant un potentiel constant (voltage-clamp). En outre, le dispositif expérimental est tel que l'on peut également appliquer un courant et mesurer les variations de potentiel (current-clamp).

I - Technique du double sucrose-gap

Elle permet l'utilisation d'électrodes externes. Cette condition expérimentale nous impose de veiller à recueillir, aussi intégralement que possible, les variations de potentiel pouvant apparaître au niveau de la structure étudiée. Il est possible de mesurer la presque totalité des variations de potentiel susceptibles d'apparaître entre deux régions d'une structure excitable, si la chute de tension provoquée par l'écoulement de courant entre ces deux régions se manifeste intégralement aux bornes de la résistance constituée par le milieu extracellulaire. Ces conditions sont pratiquement réalisées si la résistance extérieure entre



$$E_x = E_{m_1} - E_{m_2} \frac{R_e}{R_e + R_i}$$

Figure 12

- R_m : Résistance membranaire
 R_e : Résistance extracellulaire
 R_i : Résistance intracellulaire
 E_{m1} : Potentiel de membrane au point 1
 E_{m2} : Potentiel de membrane au point 2
 E_x : Différence de potentiel entre les points 1 et 2 mesurée à l'aide d'électrodes externes.

- D'après STÄMPFLI (1963) -

ces deux régions est très grande par rapport à la résistance du milieu interne. En effet, si $E_{m1} - E_{m2}$ représente la différence de potentiel existant entre deux points 1 et 2 de la préparation, le potentiel mesuré par voie externe, E_x , dépend du rapport des résistances intracellulaires (R_i) et extracellulaires (R_e) tel que (Fig. 12) :

$$E_x = (E_{m1} - E_{m2}) \frac{R_e}{R_e + R_i}$$

Comme pour un pont diviseur de tension, la fraction enregistrée dépend du rapport entre la résistance shunt externe et la somme des résistances interne et externe. Ce rapport dit facteur de court-circuit tend vers 1 quand R_e est très grande devant R_i ; dans ces conditions :

$$E_x \approx E_{m1} - E_{m2}$$

Une telle augmentation de résistance extracellulaire a été réalisée pour l'étude du noeud de Ranvier en plaçant dans l'air la portion myélinisée qui sépare deux étranglements ; c'est la technique de l' "air-gap", (TASAKI, 1939). STÄMPFLI (1954) a proposé une méthode dérivée, susceptible d'être appliquée à la plupart des structures excitables. L'élévation de la résistance extracellulaire est obtenue par un lavage continu avec une solution de saccharose isotonique : c'est la méthode du "sucrose-gap". La résistance spécifique de la

solution de saccharose (10^5 ohm.cm) permet d'obtenir une résistance extracellulaire environ 200 fois supérieure à celle du milieu intracellulaire. La réalisation d'un double dispositif de "sucrose-gap" permet d'isoler électriquement une faible surface de membrane créant ainsi artificiellement un "étranglement" comparable à un noeud de Ranvier. La création d'un tel "étranglement artificiel" de longueur voisine de $100 \mu\text{m}$ alors que la constante d'espace λ des fibres musculaires de crabe est comprise entre 700 et $1400 \mu\text{m}$ (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, 1970) ainsi que l'utilisation d'électrodes externes de grande surface donc de faible résistance, ont permis de réunir des conditions favorables à l'étude de la membrane en potentiel imposé.

II - Cuve expérimentale

Les fibres isolées sont placées dans la cuve expérimentale constituée de 5 compartiments séparés par des cloisons de $60 \mu\text{m}$ d'épaisseur (Fig. 13) recouvertes d'un fil de vaseline.

Cette cuve a été conçue de manière à ce que :

- i) le compartiment central 3 constitue le compartiment test dans lequel la portion de fibre étudiée est baignée par la solution physiologique constamment renouvelée. La largeur de ce compartiment est déterminée pour que la portion de membrane testée soit nettement inférieure à la constante

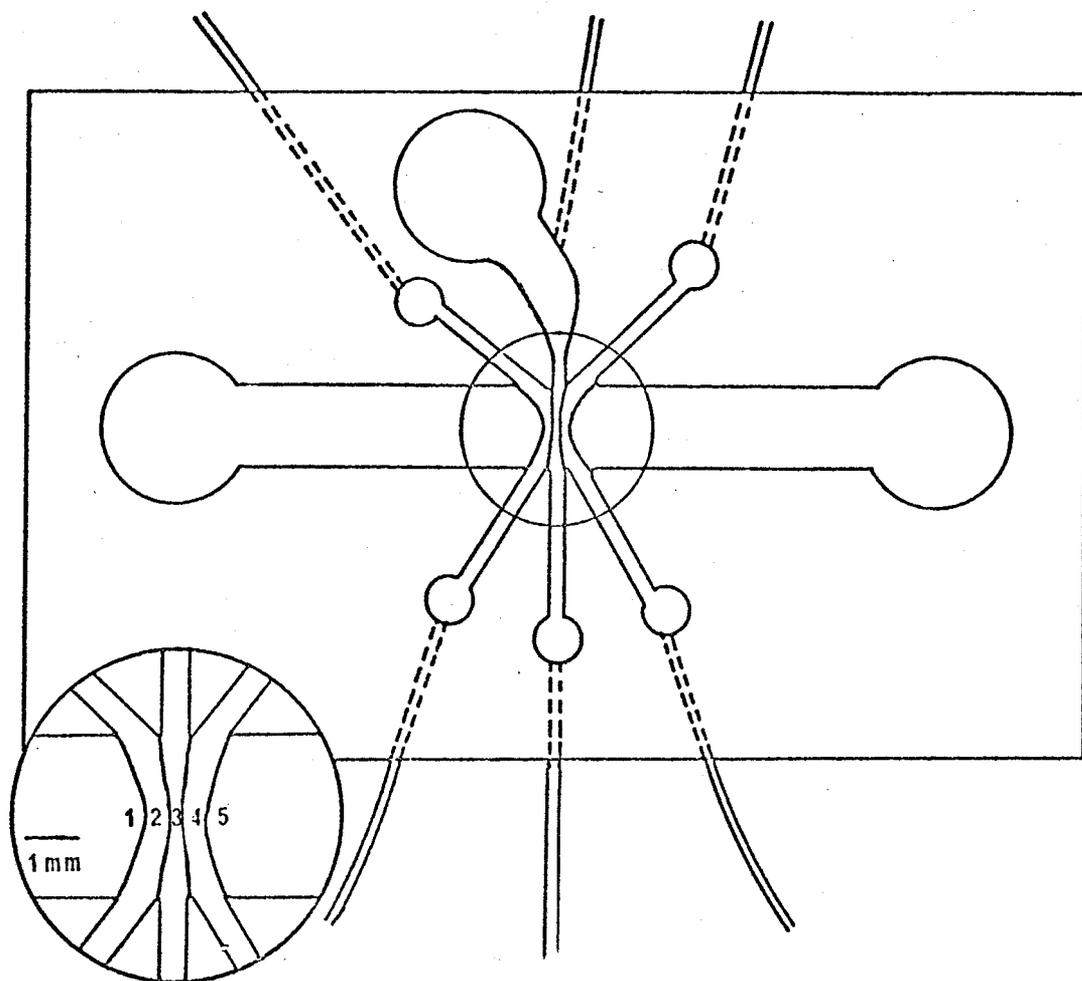


Figure 13 : Représentation schématique de la cuve expérimentale.

Dans le médaillon, la partie centrale a été agrandie.

1 et 5 : compartiments de référence contenant généralement du KCl isotonique

2 et 4 : compartiments saccharose, largeur $400 \mu\text{m}$ environ

3 : compartiment test, largeur $200 \mu\text{m}$ environ.

d'espace λ , en tenant compte du fait que λ diminue au moment de l'activité. Le compartiment central a une largeur de 200 μm , ce qui permet de tester une portion de membrane d'environ 150 μm lorsque les cloisons de vaseline sont en place.

De plus, le dessin de ce compartiment est étudié de façon à diminuer la résistance de la veine de liquide séparant la fibre de l'électrode.

ii) la solution de saccharose qui lave la fibre de part et d'autre de ce compartiment et qui s'écoule dans les compartiments 2 et 4 ne puisse se mélanger au liquide conducteur et assure ainsi un bon isolement électrique de l'étranglement. L'étanchéité entre les compartiments est assurée par les fils de vaseline recouvrant les cloisons. En outre, la vitesse d'écoulement de la solution saccharose, 25 ml/heure, est choisie plus faible que celle de la solution physiologique égale à 50 ml/heure. Lorsque la préparation est en place et que sont réalisées les cloisons de vaseline, la largeur des deux compartiments de saccharose est d'environ 300 à 400 μm .

iii) les compartiments latéraux 1 et 5 contiennent une solution isotonique de chlorure de potassium (130 mM K^+). Cependant, cette solution entraîne très fréquemment de fortes contractures et un déplacement de la fibre s'accompagnant d'une rupture des fils de vaseline. Nous avons remédié à cet

inconvenient en appliquant tout d'abord dans les compartiments 1 et 5 une solution d'eau de mer artificielle additionnée de formol (2%) pendant deux minutes. Cette solution est ensuite remplacée par une solution 50 p. 100 eau de mer - 50 p. 100 KCl isotonique. Différents essais nous avaient conduit notamment à utiliser une solution dont la composition ionique est identique à celle du milieu intérieur (voir "solutions"). Nos résultats expérimentaux ont été identiques, quelle que soit la solution choisie après traitement au formol.

Seules les solutions saccharose et test sont renouvelées. L'écoulement s'effectue par gravité ; la cuve étant ouverte dans sa partie supérieure, on doit assurer des débits de sortie strictement égaux à ceux d'arrivée.

Trois électrodes au calomel, reliées par l'intermédiaire de ponts d'agar - KCl 3 M (résistance d'un ensemble pont + électrode $\leq 2 \text{ K}\Omega$), les compartiments 1, 3, 5 aux différents appareils de stimulation et de mesure.

III - Dispositifs de mesure

Le dispositif utilisé permet d'effectuer deux types de mesure sur chaque préparation :

- mesure du potentiel de membrane en courant imposé ("current-clamp") ;

- mesure du courant de membrane en potentiel imposé ("voltage-clamp").

Dans les deux cas, nous avons utilisé un amplificateur différentiel à courant continu qui possède les caractéristiques suivantes : résistance d'entrée 10^9 ohms, courant grille inférieur à 10^{-12} A, gain 2000, produit : gain x bande passante 650 M Hz, impédance de sortie 100 ohms. Cet amplificateur (construit par J. CHEVAL - Dr Ing. Laboratoire Physiologie Générale, Université Paris Sud, ORSAY), fonctionne en contre réaction totale externe ("negative feed-back").

Les mesures de courant et de potentiel ont été effectuées sur un oscilloscope. Les courants de stimulation ou les potentiels imposés ont été délivrés par des unités Tektronix 161.

1°) Mesure du potentiel de membrane en courant imposé ("current clamp").

Pour les mesures en courant imposé, l'amplificateur est connecté selon la méthode décrite par STAMPFLI (1963, 1964). La contre-réaction est appliquée entre les compartiments 3 et 5. Le stimulateur S est branché entre le compartiment 1 et la terre, il délivre un courant (I) qui traverse la préparation par les résistances en série $R_{m1} - R_i (1' - 3') - R_{m3}$ et s'écoule

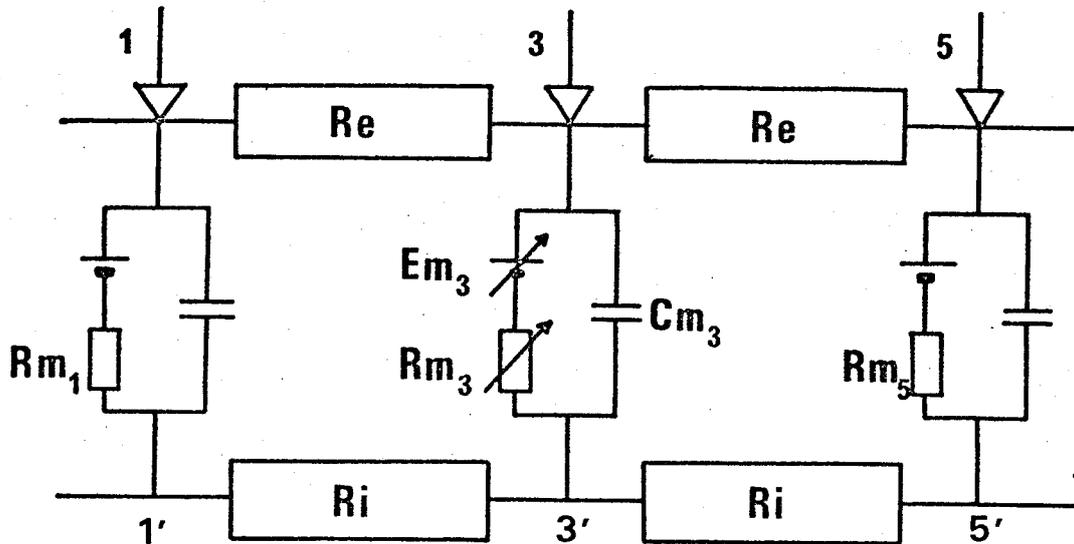


Figure 14 : Diagramme du circuit électrique équivalent de la préparation montée dans le dispositif à double "sucrose gap"

1 - 3 - 5 : électrodes des compartiments correspondants

R_e : résistance extracellulaire

R_i : résistance intracellulaire

E_{m3} , R_{m3} , C_{m3} : sont respectivement le potentiel, la résistance, la capacité de l'étranglement artificiel.

- D'après ROUGIER (1968) -

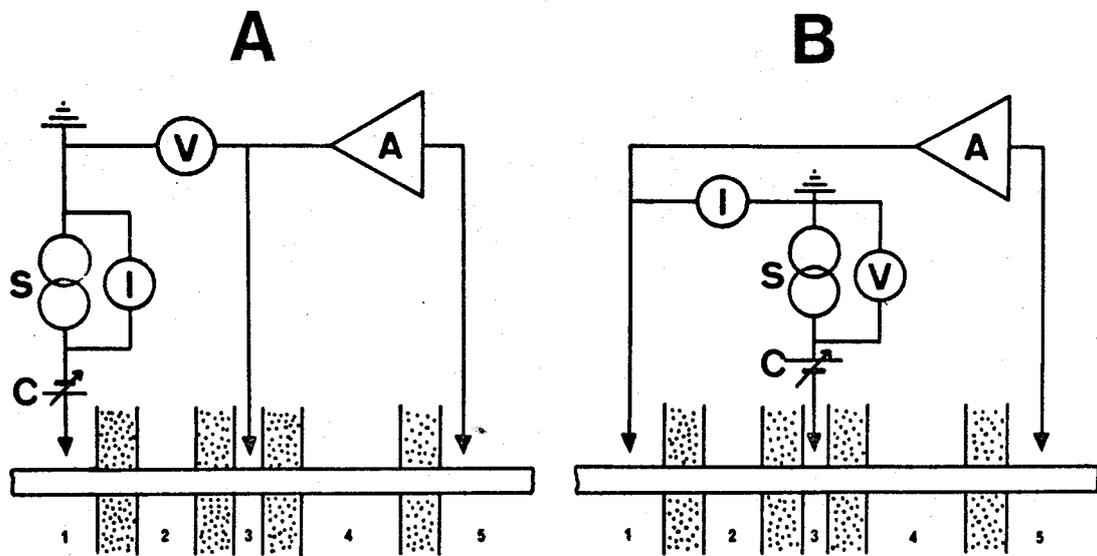


Figure 15 : Dispositif expérimental

A : mesure en courant imposé ("current clamp")

B : mesure en voltage imposé ("voltage clamp")

1 - 5 : compartiments de référence

2 - 4 : compartiments de saccharose

3 : compartiment test

A : amplificateur à contre réaction totale externe ; C : source électrique pour la compensation du potentiel d'électrode ;

I : oscilloscope cathodique (mesure du courant) ; V : oscilloscope cathodique (mesure du potentiel) ; S : stimulation

La source auxiliaire (C) permet de compenser les dissymétries d'électrodes et de potentiel.



vers la terre par la faible résistance de sortie de l'amplificateur (voir figures 14 et 15 A). Ce courant provoque au niveau de la préparation dans le compartiment test (3) des variations de potentiel qui sont enregistrées entre la sortie de l'amplificateur et la terre. La contre réaction de l'amplificateur maintenant le potentiel sarcoplasmique en 3' au potentiel de terre, on enregistre ainsi les variations de potentiel qui apparaissent de part et d'autre de la membrane dans ce compartiment.

2°) Mesure du courant de membrane en potentiel imposé ("voltage clamp")

Le dispositif utilisé pour les mesures en potentiel imposé est dérivé de celui décrit par BERGMAN et STÄMPFLI (1966) pour le noeud de Ranvier. L'amplificateur est connecté entre les points 1 et 5. La différence de potentiel délivrée par le stimulateur S est appliquée entre le compartiment test (3) et la terre. Le point 3' (sarcoplasme) étant virtuellement maintenu au potentiel de terre, la membrane dans le compartiment test (3) est ainsi portée à un potentiel égal à celui délivré par le stimulateur, pourvu que la résistance en série, constituée par l'électrode et le liquide physiologique soit suffisamment faible.

L'amplificateur fournit un courant pour maintenir la membrane au potentiel choisi. Ce courant est mesuré par la chute de potentiel à travers la résistance R_i (1' - 3') (voir figures 14 et 15 B) ; cette résistance est de l'ordre de 50 à 100 $K\Omega$ et correspond à la résistance axoplasmique de la portion de fibre dans le compartiment saccharose.

C - LIMITES DE LA TECHNIQUE ET CONTROLE DES MESURES
REALISEES

I - Propriétés inhérentes au sucrose-gap

Les premiers utilisateurs de la méthode du sucrose-gap (JULIAN et coll., 1962 ; STÄMPFLI, 1963) ont décrit un phénomène d'hyperpolarisation au niveau de l' "étranglement artificiel ". Cette hyperpolarisation pouvant atteindre 60 mV serait due à l'existence d'un potentiel de jonction entre les solutions de liquide physiologique et de saccharose, cette dernière étant négative par rapport à la première. Le potentiel ainsi créé entraîne l'écoulement d'un courant hyperpolarisant à travers la préparation. BLAUSTEIN et GOLDMAN (1966) ont montré que ce potentiel de jonction des liquides et l'hyperpolarisation qui en résulte pouvaient être éliminés en remplaçant les ions chlore par des anions de faible mobilité. Toutefois, ces auteurs ont remarqué que les relations courant-potentiel ne semblent pas affectées par ce potentiel surimposé et pensent que l'utilisation de cette méthode pour la réalisation d'expérience en conditions de potentiel imposé est parfaitement justifiée. En outre, l'interposition entre les liquides de cloisons de vaseline, déjà préconisée par STÄMPFLI (1963) pour pallier cet inconvénient, permet de supprimer la quasi totalité de ce phénomène.

Le cloisonnement de la fibre à l'aide de vaseline rend plus difficile l'estimation de la longueur de la portion de membrane étudiée, et donc de sa surface. En effet, le point de contact entre la fibre et la vaseline n'est pas toujours très nettement visible lorsque la cloison est terminée. De plus, la fibre ne se présentant pas systématiquement comme un cylindre parfait, l'évaluation de la surface de membrane étudiée risque d'être entachée d'erreurs. Enfin, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre "HISTORIQUE", cette surface doit être corrigée de la surface des invaginations, ce qui ne peut être fait de façon rigoureusement exacte pour chacune des fibres. C'est pourquoi, dans la plupart des expériences qui seront décrites ici, les potentiels et les courants mesurés ne sont pas rapportés à la surface. Dans quelques cas, cependant, nous en avons fait une estimation, aussi précise que possible, de manière à pouvoir effectuer une étude quantitative des phénomènes mesurés.

Il faut également rappeler ici que la méthode du "sucrose gap" ne permet pas de mesurer totalement la valeur des potentiels et des courants en raison de la faible partie du courant de contre-réaction qui passe à l'extérieur de la préparation, à travers les compartiments de saccharose (facteur de court-circuit). Il est possible toutefois d'en déterminer la valeur comme nous le verrons dans le prochain paragraphe.

Récemment, Mc GUIGAN (1974) a montré que la technique du double sucrose-gap imposait, pour être utilisée dans les meilleures conditions, une détermination de la largeur optimale du compartiment test. En effet, lorsque la largeur x de ce compartiment est trop faible par rapport à λ , un courant de fuite se produit. Inversement, lorsque x est trop grande par rapport à λ , la distribution du potentiel n'est plus homogène. Toutefois, ADRIAN et PEACHEY (1973) ont calculé, sur la fibre musculaire de grenouille, que le courant n'est pas notablement modifié si l'on considère que le potentiel au centre de la fibre diffère même sensiblement du potentiel imposé en surface. Ces divers résultats montrent qu'il ne suffit pas de choisir x nettement inférieur à λ mais de tenir compte du rapport x/λ pour déterminer la largeur du compartiment test de la cuve expérimentale c'est-à-dire la longueur de la portion de fibre soumise à l'expérimentation. Ces données récentes confortent notre choix concernant la largeur du compartiment permettant d'expérimenter sur une longueur de fibre d'environ $150 \mu\text{m}$.

Enfin, l'utilisation d'électrodes externes ne permet pas de mesurer directement la valeur réelle du potentiel de membrane.

Compte tenu de ces différentes remarques, il a donc fallu déterminer un certain nombre de critères permettant de juger du bon état physiologique de la préparation et de la bonne qualité de son isolement.

II) Contrôle des mesures

1°) Enregistrement en courant imposé

Les enregistrements en courant imposé sont jugés valables lorsque le potentiel d'action a une amplitude et une durée très voisines de celles obtenues à l'aide de microélectrodes. De plus, le passage d'une solution isotonique de chlorure de potassium dans le compartiment test entraîne une dépolarisation qui, comparée à la valeur théorique calculée à partir de l'équation de NERNST est légèrement plus faible. Ces différents contrôles nous permettent d'évaluer le facteur de court-circuit. Celui-ci n'est jamais inférieur à 0.8, fréquemment égal à 0.9 pour toutes les expériences présentées dans ce travail.

Dans ces conditions, nous considérons que le potentiel de membrane de repos est très voisin de - 65 mV, valeur moyenne obtenue à l'aide de microélectrodes sur les mêmes fibres. (MOUNIER et coll., 1969).

2°) Contrôle de la valeur du P.R.

Sur certaines préparations, nous avons effectué un contrôle de la valeur du P.R. en implantant une microélectrode dans la fibre au niveau du compartiment test, en absence de stimulation. Les différentes mesures obtenues se sont situées entre - 60 et - 80 mV. Si ces

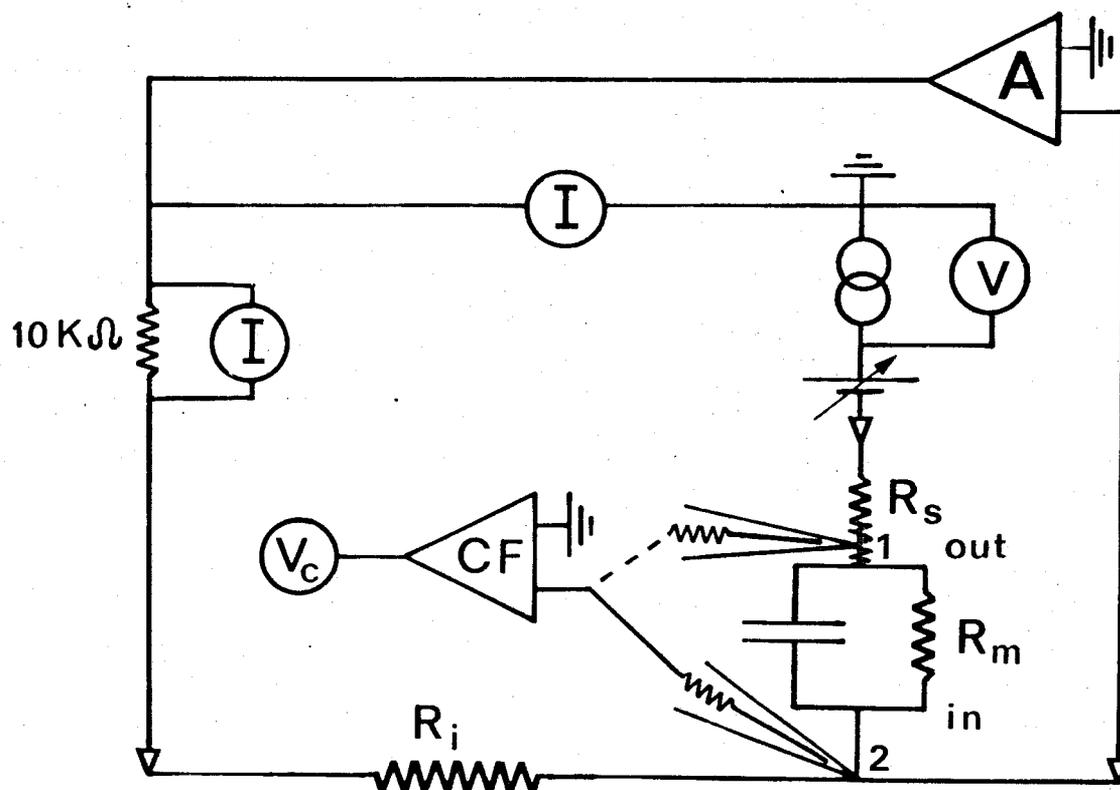


Figure 16 : Montage utilisé pour les enregistrements simultanés des courants ioniques I (dispositif de double sucrose) et du potentiel de membrane (microélectrode dans le compartiment test).

V est le potentiel imposé au moyen du stimulateur S .
 CF désigne le cathode follower employé pour la mesure de E_m et pour le contrôle du potentiel imposé.

valeurs sont comparables aux mesures obtenues sur des fibres musculaires non placées dans des conditions de sucrose gap (voir tableau 3), il faut toutefois noter que davantage de fibres semblent légèrement hyperpolarisées par rapport à la moyenne de -65 mV. Ceci semblerait confirmer l'existence possible, sur certaines préparations, d'une légère hyperpolarisation membranaire pouvant, selon toute vraisemblance, être attribuée au potentiel de jonction entre l'eau de mer et la solution saccharose.

3°) Enregistrements en potentiel imposé

Les enregistrements en potentiel imposé ont été contrôlés, à l'aide d'une microélectrode, grâce au dispositif expérimental décrit à la figure 16. Lorsque la microélectrode est en position 1, c'est-à-dire à l'extérieur de la fibre, aussi près que possible de la membrane, il est possible de contrôler le potentiel V_{c_1} appliqué à la membrane et correspondant au potentiel V délivré par le stimulateur (Fig. 17 a). Ainsi, pour un potentiel imposé V de 50 mV, on constate que la valeur de V_{c_1} est égale à $46,5$ mV. Cette légère différence s'explique par la présence d'une résistance R_s en série avec la membrane et qui est égale dans cette expérience à 7 K Ω . En effet : $V_{c_1} = V - (R_s I)$ avec I positif ou négatif. R_s est pour l'ensemble de nos expériences comprise entre 5 et 10 K Ω .

La microélectrode étant implantée dans la fibre (position 2 sur la figure 16), en absence de stimulation, la différence de potentiel correspond au P.R. comme nous venons de le préciser. Le potentiel intracellulaire pour la fibre dont les enregistrements sont présentés à la figure 17 a, b et c est de - 65 mV. Lorsqu'une stimulation est imposée, aucune variation du potentiel n'apparaît sur le tracé de contrôle (V_{c2}) (Fig. 17 b). Le montage est tel que l'amplificateur doit comparer le potentiel de l'intérieur de la fibre à la masse. Donc, pendant le passage d'une impulsion, le potentiel intracellulaire ne varie pas. Il en est de même :

- quel que soit le potentiel imposé, y compris pour des valeurs du potentiel de membrane correspondant au seuil d'excitation ou légèrement supraliminaire (Fig. 17 c avec $V = + 36$ mV)

- quel que soit le décours du courant initial. En effet, sur une fibre présentant un rebond aucune variation du potentiel intracellulaire n'apparaît. (Fig. 17 d).

- quelles que soient les amplitudes du courant membranaire en particulier lorsque celles-ci sont grandes (milieu Sr^{++} - Fig. 17 e) et enfin

- quelle que soit la position de la microélectrode dans le compartiment test. La microélectrode a en effet été placée dans la fibre en différentes zones,

Figure 17 : Contrôle des enregistrements obtenus en potentiel imposé.

V : potentiel délivré par le stimulateur

V_{c1} : potentiel imposé sur la membrane quand la microélectrode est en position 1 (voir Fig. 16)

V_{c1} diffère légèrement de V à cause de la résistance série :

$$V_{c1} = V - (R_S I)$$

V_{c2} : désigne le contrôle du potentiel intracellulaire quand la microélectrode est en position 2 (voir Fig. 16)

I : courant ionique enregistré.

Explications des différents tracés

a, b, c correspondent à des enregistrements obtenus en solution ASW sur une fibre dont le potentiel de repos est égal à -66 mV

a : potentiel imposé $V = +50$ mV

V_{c1} enregistré près de la membrane = $+46,5$ mV

b : même potentiel imposé : contrôle intracellulaire - microélectrode piquée dans la fibre dans la portion proche du saccharose droit.

c : même enregistrement qu'en b, pour un potentiel imposé de $+36$ mV.

d : même enregistrement qu'en b pour un potentiel imposé de $+80$ mV sur une autre fibre (P.R. = -70 mV) pour laquelle les tracés de I présentent un rebond.

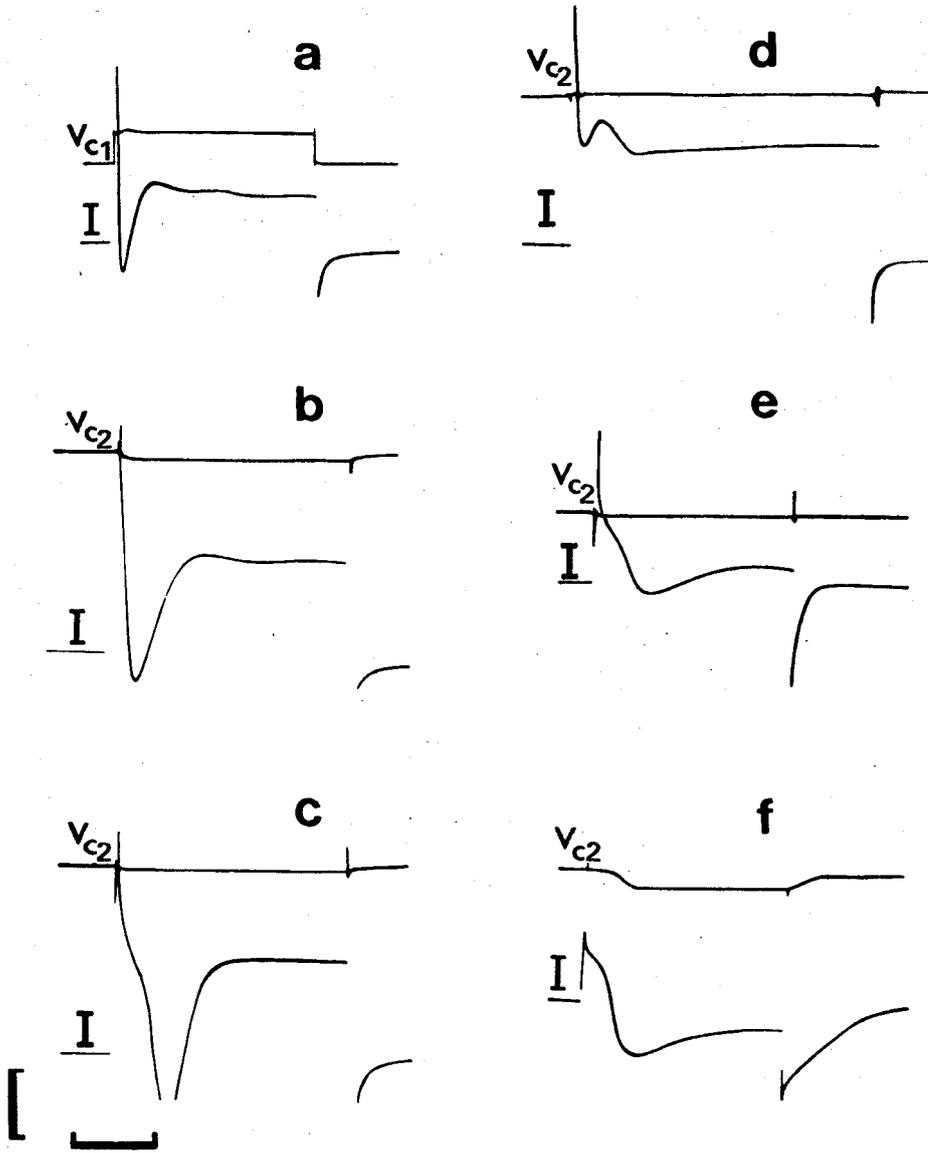
e et f : enregistrements en solution Sr (fibre avec P.R. = -60 mV) pour un potentiel imposé de $+24$ mV.

Echelle verticale : V et V_c : 100 mV en a, 40 mV en b - f

I : $0,4$ μ A pour a, d, e, f

: $0,1$ μ A pour b et c

Echelle horizontale : 20 ms en a, d, e, f ; 10 ms en b et c.



- Figure 17 -



notamment à proximité des compartiments de saccharose. Il faut également signaler que le contrôle du potentiel intracellulaire a été effectué pour des implantations de la microélectrode à différentes profondeurs à l'intérieur de la fibre.

L'enregistrement f de la figure 17 donne un exemple de mauvais "clamp". Un décrochement se produit entre le courant capacitif et le début d'activation du courant entrant. Le contrôle du potentiel intracellulaire montre que celui-ci varie alors très nettement. En outre, le courant apparaît d'emblée avec une amplitude maximale, même pour une dépolarisation juste supraliminaire. Enfin, ce courant s'active très brusquement.

Malheureusement, les fibres musculaires de crabe présentent une très grande fragilité résultant de l'implantation de la microélectrode dans la fibre au moment où se développe l'activité mécanique associée à chaque stimulation supraliminaire. Il apparaît très rapidement un fort courant de fuite ; aussi n'a-t-il pas été possible de contrôler systématiquement, de façon aussi précise que celle que nous venons d'indiquer, toutes les fibres soumises à l'expérimentation, ni de garder une microélectrode implantée pendant toute la durée de l'expérience. Il nous fallait donc déterminer quelques critères nous permettant de considérer que les conditions de potentiel imposé étaient correctes.

Les enregistrements en potentiel imposé sont donc considérés convenables lorsque :

i) la variation d'amplitude du courant initial entrant est progressive avec l'augmentation des dépolarisations imposées, le maximum étant atteint pour une dépolarisation imposée comprise entre 45 et 50 mV.

ii) la vitesse d'activation de ce courant entrant augmente progressivement au fur et à mesure que les dépolarisations imposées croissent.

iii) aucun décrochement ne se produit entre le courant capacitif et le début du développement du courant entrant.

Dans quelques expériences (< 10 p. 100) le courant entrant est suivi d'oscillations comparables à celles décrites par STRICKHOLM (1963) sur la fibre de crabe également, et par HAGIWARA et NAKA (1964), KEYNES et coll. (1973) sur les fibres de barnacle. Ces fibres sont rejetées car nous avons considéré que, dans ce cas, le potentiel imposé n'est vraisemblablement pas uniforme.

D - EXPRESSION DES RESULTATS - NOMENCLATURE

Les différents paramètres étudiés sont définis de la manière suivante :

E_m (mV) = potentiel de membrane

E_R ou P.R. = potentiel de membrane au repos, estimé
(mV) égal à - 65 mV, intérieur négatif.

V (mV) = variations du potentiel de membrane E_m par rapport à sa valeur initiale définie comme 0 et appelée "holding potentiel" (H.P.) soit
 $V = E_m - E_R$. Les valeurs positives de V correspondent à des dépolarisations, les valeurs négatives à des hyperpolarisations.

$E_K, E_{Na}, E_{Cl}, E_{Ca}$ = potentiels d'équilibre thermodynamique
(mV) définis d'après l'équation de NERNST pour les ions potassium, sodium, chlore et calcium

V_K, V_{Cl}, V_{Ca} = les mêmes potentiels exprimés de la même manière que V et appelés potentiels d'inversion.

V_{rev} = potentiel d'inversion pour un ion, indiqué sur les courbes courant potentiel par une flèche pour le courant initial entrant.

I (μA et $\mu A/cm^2$) : courants de membrane - Les courants sortants (sortie d'ions positifs ou entrée d'ions négatifs) sont positifs. Les courants entrants (entrée d'ions positifs) sont négatifs.

$I_C, I_K, I_{Cl}, I_{Ca}, I_L$ (μA et $\mu A/cm^2$) = respectivement courants capacitif, potassium, chlorure, calcique et de fuite.

g_K, g_{Ca} (mho ou mho/cm²) = conductances potassique et calcique, globale ou spécifique.

Les caractéristiques courant-potentiel sont établies sans correction du courant de fuite. Le potentiel d'inversion d'un ion entrant est obtenu par extrapolation linéaire des valeurs de courant mesurées lors de l'application d'hyperpolarisations ou de dépolarisations très faibles (inférieures à 20 mV). L'extrapolation est indiquée sur les courbes courant-potentiel par une ligne en pointillés. Enfin, signalons que, du fait de la fragilité des fibres, les potentiels imposés n'ont que rarement excédé + 100 mV.

E - SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES

I - Solution physiologique externe de référence

La solution physiologique choisie permettant une bonne survie des préparations est celle proposée par FATT et KATZ (1953).

Sa composition est :

NaCl	=	513	mM/l
KCl	=	12,9	mM/l
CaCl ₂	=	11,8	mM/l
MgCl ₂	=	23,6	mM/l
NaHCO ₃	=	2,6	mM/l

Son pH est égal à 7,8. Cette solution correspond à une eau de mer artificielle (ASW sur nos tracés).

II - Autres solutions physiologiques externes

Les solutions enrichies en calcium, résultent de l'addition de CaCl₂ à la solution ASW.

La solution strontium (SrCl₂ = 80 mM) est dérivée de la solution ASW par addition de SrCl₂ et retrait total du CaCl₂. La concentration en chlore de cette solution est augmentée de 34 mEq ce qui représente seulement un accroissement de 5 % par rapport à la concentration normale de la solution ASW.

Les milieux hyper ou hypopotassiques sont réalisés en ajoutant ou en retirant les quantités voulues de KCl de la solution ASW.

Pour toutes ces solutions :

- la pression osmotique est maintenue constante par diminution équimoléculaire du NaCl ou par adjonction de saccharose.

- le pH est ramené à 7,8 par un tampon tris - maléate.

Les solutions appauvries en chlore résultent du remplacement du NaCl :

- par du propionate de Na ;
- par du nitrate de Na.

III - Solutions avec inhibiteurs de perméabilité

Dans plusieurs expériences, nous avons ajouté au liquide physiologique des substances inhibant totalement ou partiellement certaines perméabilités membranaires.

Ce sont :

- la tétrodotoxine : TTX
- le chlorure de tétraéthylammonium : TEA
- le chlorure de manganèse : $MnCl_2$.

Les caractéristiques particulières d'action de chacune de ces substances seront précisées au moment de la description de leurs effets.

Quand le $MnCl_2$ (20 mM) ou le TEA (20 mM) sont

ajoutés aux différentes solutions, une quantité équivalente de NaCl est retirée. Les solutions TEA sont légèrement acidifiées : pH = 7,2 mais une aussi faible diminution du pH est sans effet sur les propriétés électriques (HAGIWARA et coll., 1968 ; MOUNIER et coll., 1970). Lorsque les solutions TEA sont utilisées, la fibre subit toujours une imbibition de 10 à 15 minutes dans ce milieu avant d'être utilisée pour l'expérimentation. Cette modalité a pour but de permettre une bonne pénétration du TEA, ARMSTRONG et BINSTOCK (1965) ayant montré que cette substance agit sur des sites membranaires internes.

IV - Composition du milieu intérieur :

Nous avons signalé que sur certaines préparations les compartiments latéraux de la cuve expérimentale avaient été remplis d'une solution ayant une composition ionique identique à celle du milieu intérieur, à savoir :
 $K^+ = 150 \text{ mEq/l}$; $Cl^- = 66 \text{ mEq/l}$; $Na^+ = 50 \text{ mEq/l}$;
 $SO_4^{--} = 170 \text{ mEq/l}$ (d'après SHAW, 1955 a et HAYS et coll., 1968).

*

*

*

- CHAPITRE I -

ETUDE DES PARAMETRES MEMBRANAIRES

A PARTIR DES ENREGISTREMENTS DU

COURANT CAPACITIF



A - LE COURANT CAPACITIF

I - Analyse de son évolution au cours du temps

II - Discussion

B - ETUDE DES PARAMETRES MEMBRANAIRES

I - Détermination de ces paramètres

II - Mesure et signification des différents paramètres musculaires en relation avec l'ultrastructure de la fibre.

1°) R_s

2°) C_m

3°) $R_{acc.T}$

4°) C_T

5°) R_m

C - CONCLUSION



Ce chapitre est consacré à l'étude du courant capacitif. A partir de l'analyse de son décours, nous tenterons de préciser les différents paramètres membranaires et de mettre en évidence l'existence de deux circuits RC pouvant être corréllés à l'ultrastructure de la fibre.

A - LE COURANT CAPACITIF

I - Analyse de son évolution au cours du temps

Dans les conditions de potentiel imposé, le courant capacitif précède les phénomènes faisant intervenir les variations de la résistance de membrane. La détermination de la constante de temps de ce courant dépend de la capacité membranaire de la fibre.

La figure 18 (A) présente l'enregistrement du courant observé lorsqu'une faible impulsion nettement infraliminaire est appliquée. Le courant capacitif évolue vers une valeur stationnaire. Dans cette expérience, le potentiel imposé est de 12,5 mV et la valeur stationnaire ($I_{stat.}$) du courant est de 0,08 μ A. Une hyperpolarisation de même amplitude provoque un courant symétrique.

L'étude du décours du courant capacitif en coordonnées semi logarithmiques (Fig. 18 B), déduction faite du courant stationnaire, montre qu'il évolue suivant deux phases exponentielles. Dans cette expérience, la phase la plus lente a une valeur τ_2 de 2,6 ms et la constante

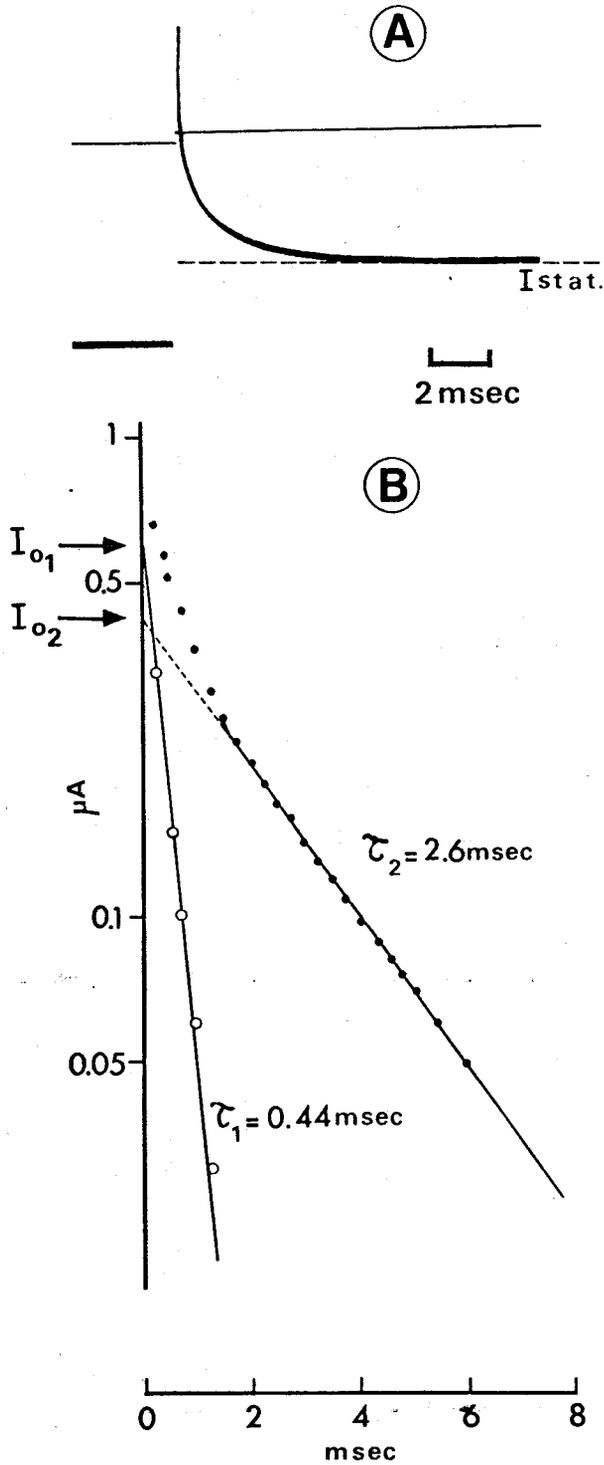


Figure 18 : Evolution du courant capacitif au cours du temps.

- A : Enregistrement du courant capacitif et du courant stationnaire (I_{stat}) pour une dépolarisation imposée de + 12,5 mV.
- B : Amplitude du courant capacitif portée en échelle logarithmique en fonction du temps (points). Noter l'existence de deux phases exponentielles. Les cercles représentent les valeurs de la première composante, déduction faite de la deuxième.



de temps τ_1 de la phase rapide est de 0,4 ms. Les valeurs de τ_1 et τ_2 varient d'une fibre à l'autre : sur six fibres testées, τ_1 est comprise entre 0,40 et 0,77 ms et τ_2 entre 2 et 4,3 ms. Le rapport τ_2/τ_1 se situe entre 4,2 et 6,5. Il faut remarquer que ces constantes de temps sont très supérieures à celles mesurées sur la fibre musculaire de grenouille dans des conditions identiques (ILDEFONSE, 1970).

II - Discussion

L'existence des deux phases exponentielles pour le décours du courant capacitif traduirait l'existence de deux systèmes résistance-capacité. Le modèle "lumped" proposé par EISENBERG (1967) et présenté à la figure (1) comprend une résistance R_m en parallèle avec deux capacités C_m et C_e . En nous basant sur ce modèle et compte-tenu de notre système de mesures, nous pouvons tenter d'analyser les différents composants membranaires à partir du schéma de la figure 19. Pour un échelon de potentiel, la réponse obtenue peut être décrite par l'équation :

$$\frac{V_o}{R_{i1}} = V \left[\frac{1}{R_S} \exp \frac{-t}{R_S C_m} + \frac{1}{R_S + R_{(acc.T)}} \exp \frac{-t}{[R_S + R_{(acc.T)}] C_T} + \frac{1}{R_m + R_S} \right]$$

dans laquelle :

V_o est le potentiel enregistré

- V est le potentiel délivré par le générateur
- R_{i1} est la résistance fixe aux bornes de laquelle le potentiel est enregistré, correspondant essentiellement à la résistance intracellulaire dans le compartiment 2 (voir Chapitre : Matériel et Méthodes).
- R_S est la résistance en série avec la résistance de membrane R_m .
- $R_{acc.T}$ est la résistance d'accès aux tubules
- C_m et C_T sont les capacités concernant respectivement la membrane de surface et la membrane des tubules.

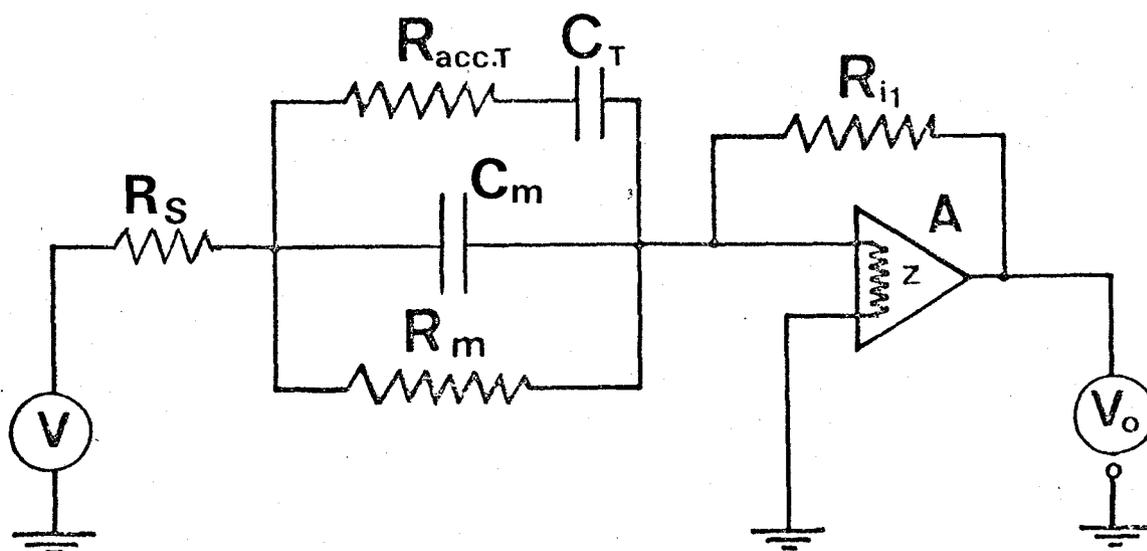


Figure 19 : Modèle du système capacités - résistances permettant de rendre compte du courant capacitif dans les conditions de potentiel imposé.

A : amplificateur différentiel à courant continu, d'impédance Z .
 V : potentiel délivré par le générateur d'impulsions rectangulaires.
 V_o : potentiel mesuré

Les définitions des composantes membranaires sont données dans le texte.

B - ETUDE DES PARAMETRES MEMBRANAIRES

I - Détermination de ces paramètres

Il apparaît maintenant possible, à partir des enregistrements du courant capacitif de calculer la valeur des différents éléments envisagés dans le modèle :

- le courant de membrane I_{o1} , au temps $t = 0$, est égal à $\frac{V}{R_S}$

(I_{o1} est exprimé en ampères, V en volts et R_S en ohms).

L'évolution de la phase initiale du courant est déterminée par $\tau_1 = R_S \cdot C_m$ (τ_1 exprimée en secondes).

$$\text{De même, } I_{o2} = \frac{V}{R_S + R_{acc.T}}$$

et

$$\tau_2 = (R_S + R_{acc.T})C_T$$

- le courant stationnaire correspond au terme $V \cdot \frac{1}{(R_m + R_S)}$ de l'équation, ce qui permet de calculer R_m .

Pour l'enregistrement de la figure 18, nous obtenons :

$$R_S = \frac{V}{I_{o1}} = \frac{12,5 \cdot 10^{-3}}{0,6 \cdot 10^{-6}} = 20 \cdot 10^3 \Omega = 20 \text{ K}\Omega$$

$$R_S + R_{acc.T} = \frac{V}{I_{o2}} = \frac{12,5 \cdot 10^{-3}}{0,44 \cdot 10^{-6}} = 28 \cdot 10^3 \Omega = 28 \text{ K}\Omega$$

$$R_{acc.T} = 8 \text{ K}\Omega$$

$$C_m = \frac{\tau_1}{R_S} = \frac{0,4 \cdot 10^{-3}}{20 \cdot 10^3} = 2 \cdot 10^{-8} \text{ F}$$

$$C_T = \frac{\tau_2}{R_{(\text{acc. T})} + R_S} = \frac{2,6 \cdot 10^{-3}}{28 \cdot 10^3} = 9,3 \cdot 10^{-8} \text{ F}$$

$$(R_m + R_S) = \frac{V}{I_{\text{stat.}}} = \frac{12,5 \cdot 10^{-3}}{0,08 \cdot 10^{-6}} = 160 \cdot 10^3 \Omega$$

$$R_m = 160 - 20 = 140 \text{ K}\Omega$$

La surface de membrane testée peut être évaluée approximativement sur les fibres les plus cylindriques, compte-tenu des remarques présentées au chapitre "Matériel et méthodes". La longueur de la fibre dans le compartiment test est d'environ $150 \mu\text{m}$ après réalisation des cloisons de vaseline. La surface moyenne externe est de 10^{-3} cm^2 . Cependant, il n'est pas possible de ramener ces valeurs à l'unité de surface sans tenir compte de l'ultrastructure de la fibre c'est-à-dire sans corriger la surface externe apparente selon que l'on détermine les paramètres relatifs à la membrane sarcolemmique de surface ou à la membrane tubulaire.

II - Mesure et signification des différents paramètres membranaires en relation avec l'ultrastructure de la fibre

1°) R_S

Cette résistance pourrait inclure la résistance série due au montage ainsi que la résistance R_p proposée dans le modèle d'EISENBERG pour le matériel amorphe

emplissant les invaginations sarcolemmiques.

R_s est évaluée dans cette expérience à $20 \text{ K}\Omega$ soit à $20 \Omega \text{cm}^2$. Elle est égale à la résistance mesurée par ILDEFONSE (1970) sur la fibre musculaire de grenouille mais elle est supérieure à la résistance série de $7 \Omega \text{cm}^2$ déterminée par HODGKIN et coll. (1952) sur l'axone de calmar où R_p est nulle. Cependant, une valeur de la résistance série peut être déterminée dans nos conditions expérimentales. En effet, l'altération de la trace du potentiel recueilli par une microélectrode placée près de la membrane (voir p. 30) nous a permis d'estimer cette résistance comprise entre 5 et $10 \text{ K}\Omega$. Dans le modèle d'EISENBERG, R_p est égale à $10,2 \Omega \text{cm}^2$. Ces deux valeurs sont donc compatibles avec notre mesure globale.

2°) C_m

C_m correspond au condensateur membranaire de surface.

SELVERSTON (1967) propose un facteur de correction pour la surface externe de la fibre afin de tenir compte de la surface sarcolemmique des replis et des invaginations ("clefts"), en excluant celle des tubules. Cet auteur admet qu'il est raisonnable de considérer que la surface réelle doit être environ 20 fois supérieure à celle évaluée uniquement à partir du périmètre de la fibre.

Dans nos conditions, la fibre isolée apparaissait assez régulièrement cylindrique avec un diamètre de $250\ \mu\text{m}$. Si nous admettons que le facteur 20 peut être appliqué, sans erreur trop importante, C_m devient égal à :

$$\frac{2 \cdot 10^{-8}}{20 \cdot 10^{-3}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ F/cm}^2 = 1 \ \mu\text{F/cm}^2.$$

Bien que cette valeur soit précisément en accord avec celle estimée par de nombreux auteurs, il faut reconnaître qu'il ne peut s'agir que d'une mesure approchée, compte-tenu de la difficulté d'évaluer la surface externe et le facteur de correction exact. En outre, il apparaît bien évidemment que, d'une fibre à l'autre, des erreurs non négligeables peuvent survenir, ce qui explique aisément la variabilité de nos mesures (voir tableau 4).

3°) $R_{\text{acc.T}}$

Elle correspond dans notre modèle à la résistance en série avec le condensateur des tubules envisagée par FALK et FATT (1964) ou à la résistance R_e du schéma d'EISENBERG (1967) ou résistance d'accès dans le modèle "lumped". Cette résistance $R_{\text{acc.T}}$ est égale à $8 \text{ K}\Omega$. Si l'on évalue celle-ci par rapport à la surface membranaire que nous considérons égale à $20 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$, cette résistance est égale à $160 \Omega \text{ cm}^2$. Il est à remarquer qu'ADRIAN et PEACHEY (1973) choisissent une valeur de $150 \Omega \text{ cm}^2$, sur la fibre musculaire de grenouille, pour effectuer la reconstruction correcte d'un potentiel d'action propagé.

4°) $\underline{\underline{C_T}}$

C_T représente la capacité membranaire tubulaire et serait l'équivalent de la capacité C_e du schéma d'EISENBERG. Sa mesure requiert une évaluation de la surface des tubules. PEACHEY (1965^e) propose pour une fibre musculaire de crabe de $180 \mu\text{m}$ de diamètre (alors que la fibre utilisée ici pour nos résultats a un diamètre de $250 \mu\text{m}$ de corriger la surface membranaire d'un facteur 50. Ainsi, C_T pourrait être approximativement estimé égal à : $\frac{9,3 \cdot 10^{-8}}{50 \cdot 10^{-3}} = 1,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Le facteur de correction utilisé n'est sans doute pas rigoureusement exact mais il est intéressant de remarquer qu'EISENBERG, à partir d'une correction analogue, obtient une capacité tubulaire de $1,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Il faut noter, en outre, que le rapport C_T/C_m est égal pour trois fibres à : 1,80 - 1,76 et 1,06. Ces valeurs sont proches de celles proposées par différents auteurs (voir tableau 4).

5°) $\underline{\underline{R_m}}$

R_m est assimilable à la résistance de membrane de surface. Sa mesure ramenée à l'unité de surface de membrane externe, sans tenir compte des invaginations, est de :

$$140 \cdot 10^3 \Omega \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 = 140 \Omega \text{ cm}^2$$

Cette valeur comparable à celles obtenues par différents auteurs sur les fibres musculaires de Crustacés (voir tableau 2, page 10), devient, en prenant le facteur de correction de SELVERSTON égale à $2800 \Omega\text{cm}^2$. Cette nouvelle mesure est proche de celles obtenues sur les fibres de Vertébrés (voir tableau 1 - page 9).

Fibre N°	τ_1 ms	τ_2 ms	R_S Ωcm^2	C_m $\mu\text{F}/\text{cm}^2$	C_T $\mu\text{F}/\text{cm}^2$	R_m Ωcm^2	C_T/C_m
2210	0,40	2,6	20	1	1,8	2800	1,80
2801	0,77	4,3	15	2,5	4,4	2400	1,76
1603	0,48	2,0	15	1,6	1,7	1940	1,06

Tableau 4 : Détermination des constantes des circuits RC membranaires.

Les résultats présentés ne portent que sur 3 fibres ayant permis d'effectuer des corrections de surface à priori acceptables du fait de leur diamètre et de leur aspect cylindrique.

1,74	FALK et FATT (1964)
1,80	FREYGANG et coll. (1967)
1,73	SCHNEIDER (1970)
1	HODGKIN et NAKAJIMA (1972 b)

C - CONCLUSION

A partir de l'analyse du décours du courant capacitif, il nous a été possible de calculer les différents composants membranaires et d'obtenir des résultats proches de ceux classiquement proposés sur d'autres structures excitables. Nous avons pris comme référence le modèle le plus simple parmi ceux actuellement décrits à savoir le modèle "lumped". Bien que ce modèle ne puisse rendre compte de toutes les propriétés membranaires dans différentes conditions expérimentales (voir Historique), il semble pouvoir être adapté correctement à la fibre musculaire de crabe placée dans des conditions physiologiques normales (solution ASW).

- CHAPITRE II -

ENREGISTREMENTS OBTENUS

EN SOLUTION ASW

A - REPNSES A DES COURANTS IMPOSES

I - Courants dépolarisants

II - Courants hyperpolarisants

B - REPNSES A DES POTENTIELS IMPOSES DEPOLARISANTS :
ENREGISTREMENT DES COURANTS IONIQUES

I - Description du courant initial

1°) Courant initial à une composante

2°) Courant initial composite

3°) Courant initial de fibres présentant
un potentiel de type tout ou rien

4°) Résumé

II - Description du courant sortant retardé
et des courants de queue.

C - REPNSES A DES POTENTIELS IMPOSES HYPERPOLARISANTS :
ENREGISTREMENT DES COURANTS IONIQUES

D - CONCLUSION



Ce chapitre a pour objet de présenter les potentiels enregistrés par la technique du double sucrose-gap puis de décrire sommairement les courants ioniques qui feront l'objet d'une étude détaillée dans les chapitres suivants.

A - REPNSES A DES COURANTS IMPOSES

I - Courants dépolarisants

L'activité électrique de la fibre musculaire de crabe se traduit généralement par l'apparition d'une réponse graduée de faible amplitude atteignant le plus souvent environ 60 mV (Fig. 20 A). La dépolarisation membranaire nécessaire pour le déclenchement de cette activité électrique est voisine de 35 mV. Pour des impulsions juste supraliminaire, il faut remarquer qu'après la repolarisation du P.A., la R_m est diminuée, phénomène particulièrement net sur la figure 20 B. Sur quelques préparations (environ 5 p. 100 des fibres testées) nous avons pu enregistrer un potentiel de type tout ou rien dont l'amplitude ne diffère pas sensiblement de celle des réponses graduées les plus amples. La figure 20 C donne un exemple de ce type de potentiel dont le seuil de déclenchement est bas et correspond pour cette fibre à une dépolarisation de 20 mV tandis que l'amplitude totale du potentiel d'action est de 70 mV.

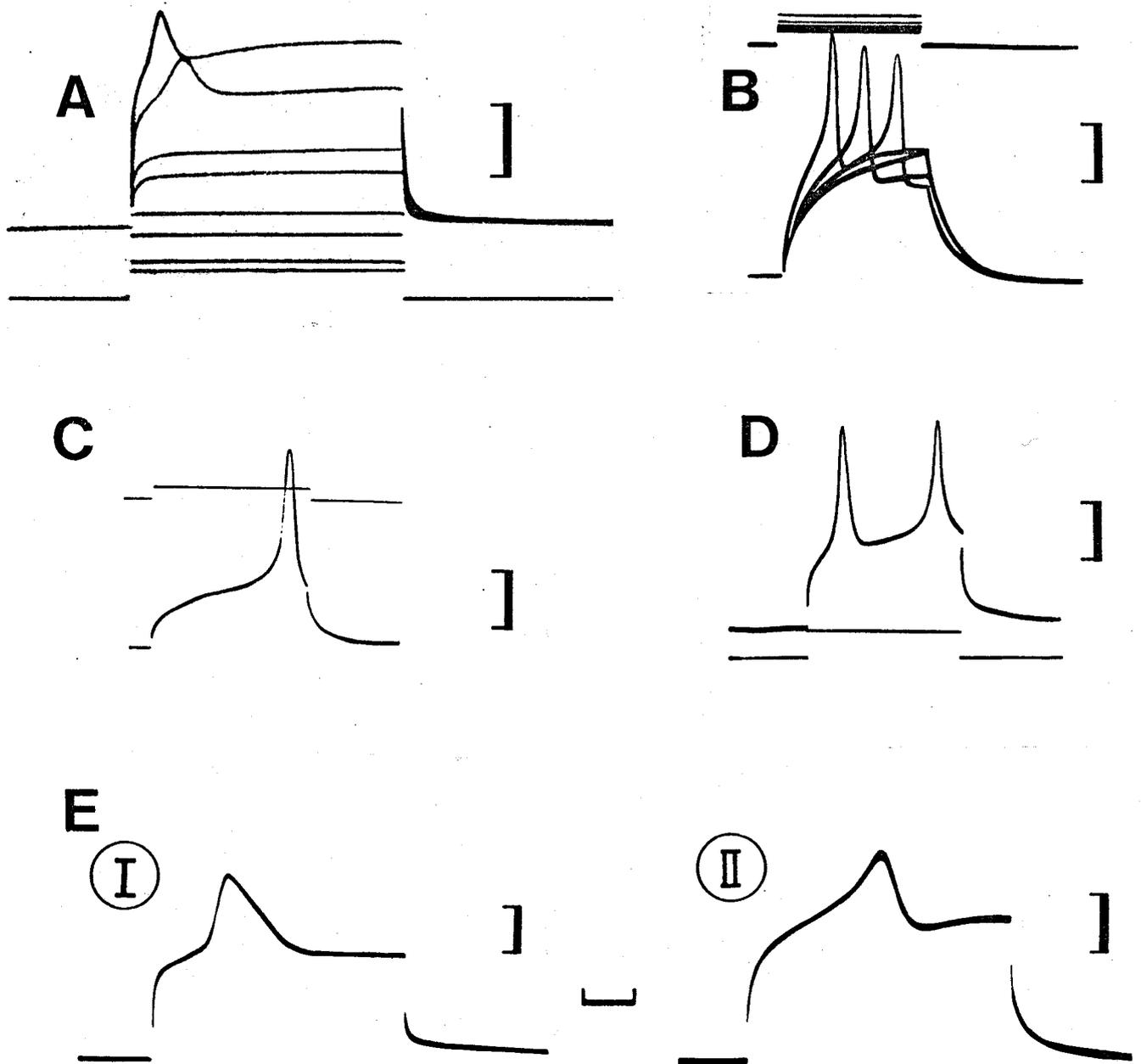


Figure 20 : Enregistrement des potentiels recueillis lors de l'application de courants en solution ASW.

- A : Réponse graduée
- B : Potentiel de grande amplitude. Mise en évidence de la diminution de R_m après la pointe.
- C : Potentiel de type tout ou rien obtenu sur la fibre dont les enregistrements en potentiel imposé sont présentés à la figure 23.
- D : Potentiels répétitifs
- E : I - Potentiel gradué présentant une phase de repolarisation lente (fibres de type I)
 II - Potentiel gradué présentant une phase de repolarisation rapide (fibres de type II)

Les enregistrements en potentiel imposé obtenus sur ces deux fibres sont présentés à la figure 22.

Echelle verticale : 20 mV - Echelle horizontale : 10 ms.

Lors de l'application de courants dépolarisants supraliminaires et suffisamment longs, une activité répétitive se manifeste parfois (Fig. 20 D).

Enfin, certaines fibres ne répondent à une dépolarisation que par un potentiel électrotonique, cette réponse passive étant particulièrement fréquente en hiver, de décembre à février.

Ces trois catégories de réponses à une dépolarisation imposée à savoir : réponse graduée, potentiel type tout ou rien, réponse passive, ont déjà été observées par différents auteurs mais, dans nos conditions expérimentales, il n'est pas possible de les relier à des réponses de muscles ou de fibres différents comme l'a fait ATWOOD (1965) puisque toutes nos expériences ont été réalisées à partir des fibres centrales du muscle extenseur du méropodite. Toutefois, la réponse la plus fréquente est incontestablement la réponse graduée. C'est pourquoi la plupart des résultats présentés dans ce travail se rapportera au cas de fibres dont le potentiel est de type gradué.

Dans ce dernier cas, il convient pour terminer cette description des potentiels de discuter des différences apparaissant dans leur décours. La durée des potentiels varie de 10 à 20 ms et, sur l'ensemble des fibres, deux catégories de potentiels peuvent être déterminées selon le rapport des vitesses des phases de dépolarisation et de repolarisation. A partir de ce critère, et surtout

en fonction des tracés des courants ioniques que nous présenterons ensuite, nous avons effectué un classement des fibres en deux catégories (Fig. 20 E).

- les fibres de type I correspondent à celles pour lesquelles la phase de repolarisation est plus lente que la phase de dépolarisation, le potentiel étant alors, en général, légèrement plus durable

- les fibres de type II correspondent à celles pour lesquelles les vitesses des phases de dépolarisation et de repolarisation sont sensiblement égales, la phase de repolarisation étant parfois même plus rapide (Fig. 20 E).

II - Courants hyperpolarisants

La figure 21 présente les réponses membranaires enregistrées lorsque des courants hyperpolarisants sont appliqués. Ces enregistrements sont obtenus sur la fibre dont les réponses à des courants dépolarisants sont illustrées à la figure 20 A.

Pour des courants hyperpolarisants de faible amplitude, la réponse membranaire augmente linéairement en fonction du courant. Par contre, lorsque l'hyperpolarisation de la membrane devient supérieure à 40 mV (soit $E_m \simeq -105$ mV) une réponse complexe apparaît, comparable à celle décrite par EPSTEIN et HARDY (1973) bien que dans notre cas, le potentiel de membrane semble se stabiliser à un niveau d'hyperpolarisation élevée. Cette réponse peut être répétée et ne correspond donc pas à un claquage de la membrane.

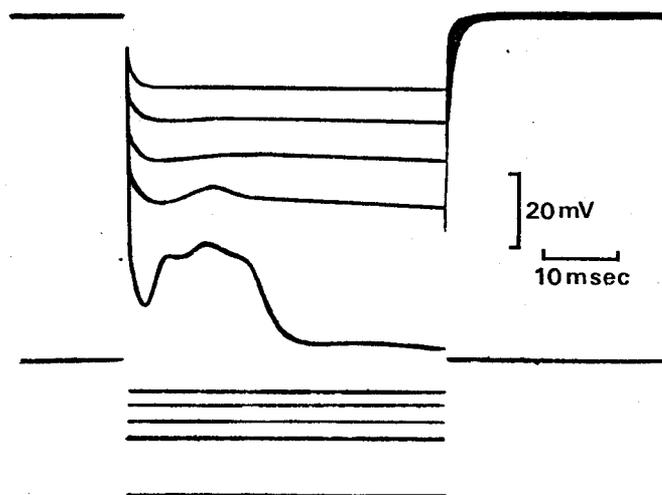


Figure 21 : Réponses enregistrées lors de l'application de courants hyperpolarisants (fibre 506). La réponse à des courants dépolarisants obtenue sur la même fibre a été présentée à la figure 20 A.

B - REponses A DES POTENTIELS IMPOSES DEPOLARISANTS :
ENREGISTREMENT DES COURANTS IONIQUES

Pour la plupart des enregistrements qui seront présentés dans ce travail, deux constatations préliminaires doivent être effectuées :

i) Les enregistrements obtenus en potentiel imposé (Fig. 22) montrent qu'il est relativement aisé de séparer le courant capacitif du courant ionique qui se développe lentement, ce qui corrobore l'absence de phase ascendante rapide du potentiel de la fibre de crabe. De plus, les courants ioniques et notamment la composante entrante du courant initial, apparaissent pour des potentiels imposés de 30 à 40 mV (32 mV pour la fibre représentant le type I ; 36 mV pour la fibre de type II - voir Fig. 22) ; ces valeurs correspondent aux dépolarisations nécessaires au déclenchement des potentiels dans les conditions de courant imposé.

ii) Il faut noter en outre l'existence d'un fort courant de fuite, phénomène fréquemment observé sur les muscles d'Invertébrés et déjà décrit par HENČEK et coll. (1969) sur la fibre musculaire d'écrevisse. Ce courant pourrait résulter de l'abondance du système tubulaire transverse.

Comme nous l'avons expliqué, l'examen de l'allure du courant initial et des formes différentes du

potentiel (Fig. 20 E), nous a permis d'effectuer un classement des fibres en deux catégories. Nous allons présenter maintenant les tracés de courant justifiant cette distinction.

I - Description du courant initial

1°) Enregistrements de type I (potentiel à repolarisation lente) : courant initial à une composante

Il apparaît que le courant initial est constitué d'une seule composante entrante qui, comme cela se produit pour la plupart des enregistrements, n'est pas net entrante (Fig. 22 A). Ce courant est fonction du potentiel imposé et présente un maximum d'autant plus précoce que la dépolarisation est plus élevée. Il est suivi, pour des potentiels imposés supérieurs à + 50 mV, d'un courant sortant.

La relation courant-potentiel imposé, établie pour cette fibre au maximum du courant entrant ou au minimum du courant sortant (Fig. 22 B), montre que le courant entrant atteint un maximum à + 40 mV environ et s'annule pour une dépolarisation imposée de + 92 mV (indiquée par V_{rev}). La détermination de ce potentiel d'inversion du courant initial repose sur la considération suivante : le courant de fuite mesuré pour les faibles potentiels imposés dépolarisants ou hyperpolarisants évoluerait linéairement en fonction du potentiel. Nous verrons

I

II

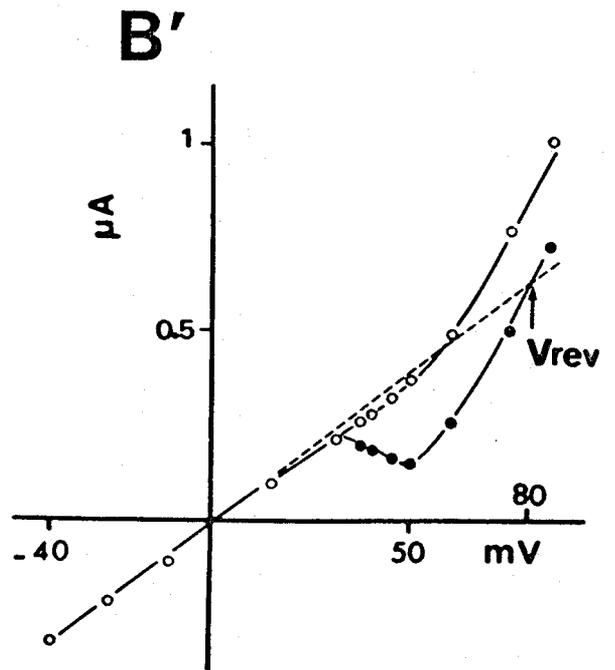
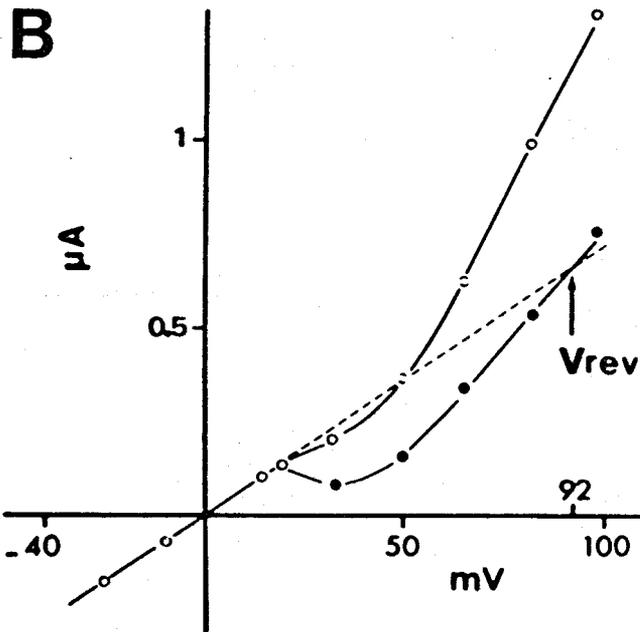
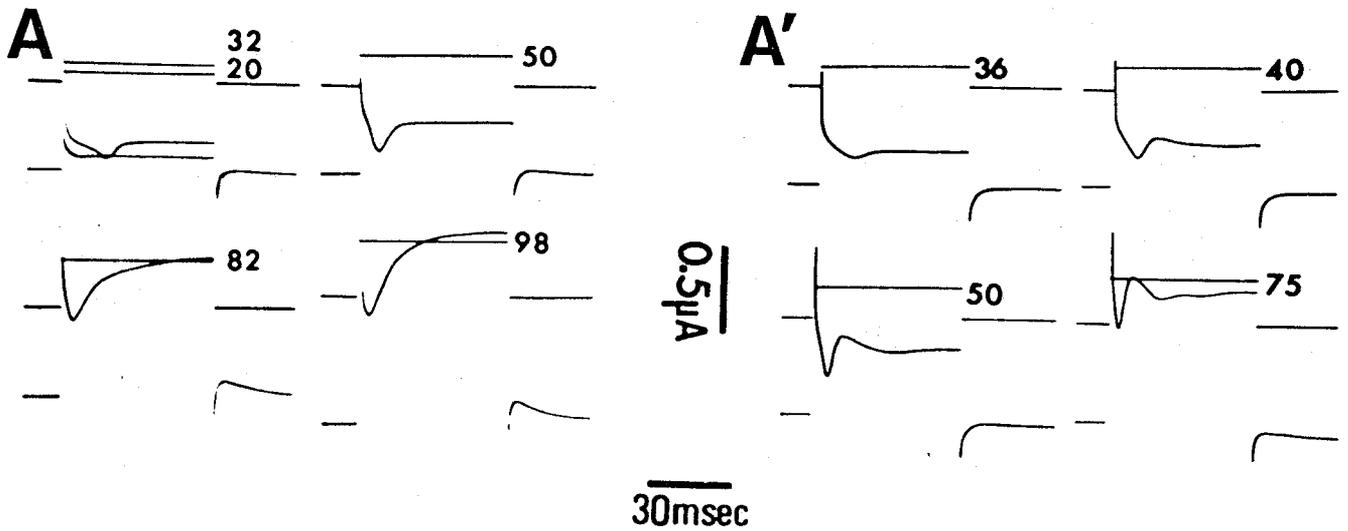


Figure 22 : A et A' : Résultats obtenus dans les conditions de potentiel imposé :

A - sur une fibre dont le courant initial ne présente qu'une composante entrante (type I)

A' - sur une fibre dont le courant initial présente un rebond après la composante entrante.

B et B' : Caractéristiques courant - potentiel établies à partir des mesures au maximum de I_e ou au minimum de I_s (points) et en fin d'impulsions (cercles) correspondant respectivement aux enregistrements en A et A'. Noter les potentiels d'inversion (V_{rev}) de I_e , différents en B et B' et mesurés par extrapolation linéaire du courant de fuite (symbolisé par les pointillés).

A et B : Fibre 109
A' et B' : Fibre 606



ultérieurement que cette extrapolation, bien que non rigoureusement exacte, n'entraîne pas d'erreur importante dans les mesures des potentiels d'inversion.

2°) Enregistrements de type II (potentiel à repolarisation rapide) : courant initial composite.

Les enregistrements en potentiel imposé (Fig. 22 A') mettent en évidence un courant initial complexe. En effet, la composante entrante de ce courant initial, comparable à celle que nous venons de décrire, apparaît suivie d'un rebond dont l'amplitude croît au fur et à mesure que les dépolarisations imposées augmentent.

La relation courant-potentiel imposé établie pour cette fibre au maximum du courant entrant ou au minimum du courant sortant (Fig. 22 B') montre que le courant entrant est maximal pour un potentiel imposé de 50 mV. Bien que cette valeur soit supérieure à celle obtenue pour le maximum de I_e sur l'enregistrement présenté de type I, l'ensemble de nos résultats ne permet pas d'établir de différence significative entre ces deux valeurs, le maximum de courant entrant, survenant pour des potentiels imposés compris généralement entre + 40 et + 50 mV. Le potentiel d'inversion de la composante entrante du courant initial se situe à + 80 mV, en admettant encore ici une fuite linéaire.

3°) Enregistrements du courant initial sur des fibres présentant un potentiel de type tout ou rien

Nous venons de décrire les enregistrements obtenus sur des fibres dont le potentiel est de type gradué. Lorsque le potentiel est de type tout ou rien les enregistrements ne diffèrent pas sensiblement, d'un point de vue qualitatif, de ceux présentés pour le type II. Cependant, il faut remarquer que le courant initial est de plus grande amplitude et devient net entrant.

La figure 23 (A) donne une illustration des courants enregistrés sur la fibre dont le potentiel est présenté à la figure 20 C. Le courant entrant apparaît activé pour un potentiel de 17 mV, correspondant au seuil de déclenchement du potentiel d'action, particulièrement bas pour cette fibre. Ce courant entrant est suivi d'un rebond survenant lorsque les potentiels imposés sont supérieurs à + 30 mV.

La caractéristique courant-potentiel établie pour cette fibre (Fig. 23 B) montre que le courant entrant est maximal pour un potentiel imposé de + 35 mV et s'inverse pour un potentiel de + 76 mV.

En résumé, sur toutes les fibres testées, indépendamment de l'amplitude du courant entrant et de l'amplitude du courant de fuite, nous avons pu constater que :

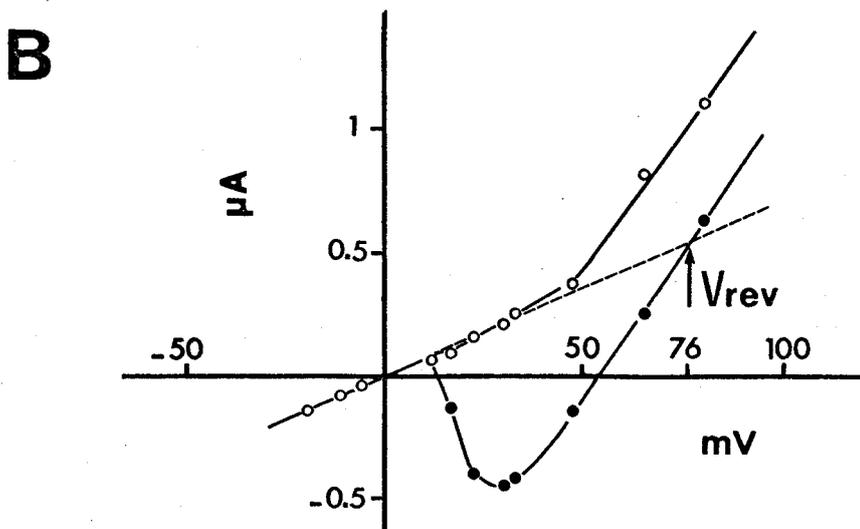
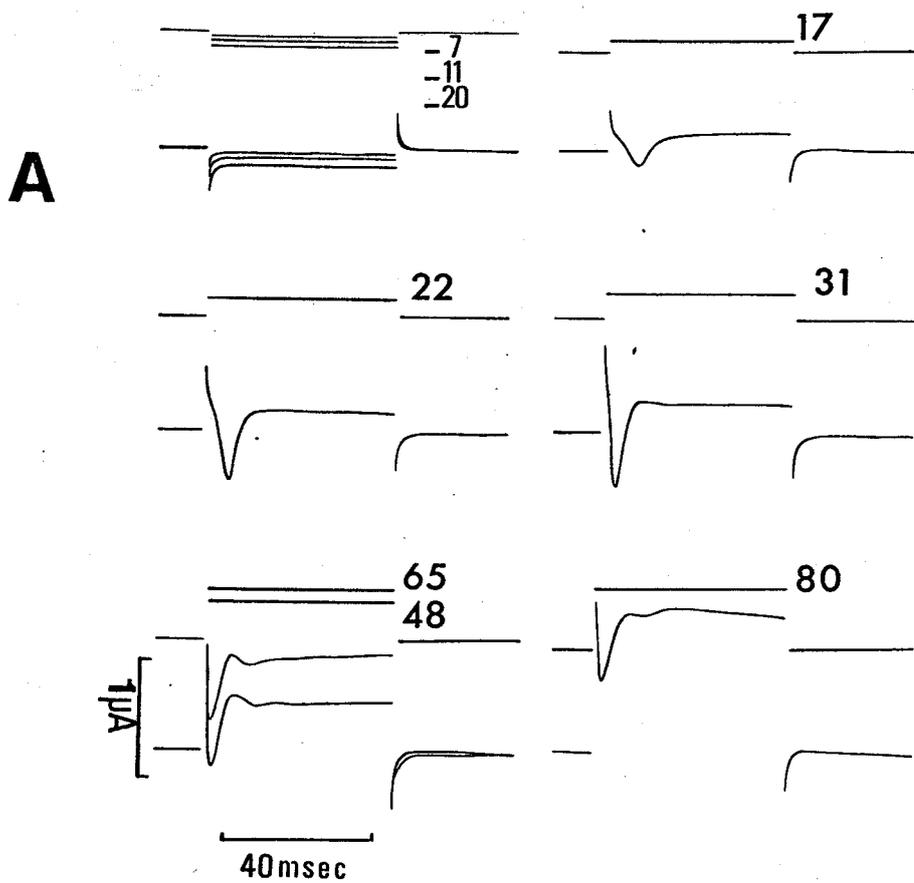


Figure 23 : A - Enregistrements obtenus dans les conditions de potentiel imposé sur une fibre dont le potentiel est de type tout ou rien (voir Fig. 20 - C)

B - Caractéristiques courant-potential établies à partir des mesures au maximum de I_e ou au minimum de I_s (points) et en fin d'impulsion (cercles).

Fibre 409 .

- lorsque le courant initial ne comprend que la composante entrante, le potentiel d'inversion de ce courant se produit pour des potentiels imposés compris entre + 90 et + 95 mV, correspondant à $E_m = + 25$ à + 30 mV (en admettant $E_R = - 65$ mV)

- lorsque le courant initial apparaît composite — courant entrant suivi d'un rebond — le potentiel d'inversion de la composante entrante est plus faible, généralement compris entre + 75 et + 80 mV.

Il est bien évident que ce classement en deux catégories en fonction des courants ioniques a été choisi de façon à simplifier l'exposé des résultats. Nous avons en effet rencontré des fibres dont les caractéristiques sont beaucoup moins tranchées. C'est ainsi que la phase de repolarisation du potentiel peut être plus ou moins lente, comparée à la phase de dépolarisation et, corrélativement, le rebond peut apparaître plus ou moins développé. Cependant, il est intéressant de mentionner dès maintenant que le décours du courant initial a toujours pu être associé au décours du potentiel, notamment en ce qui concerne le parallélisme établi entre l'existence du rebond et la vitesse de la phase de repolarisation.

II - Description du courant sortant retardé et des courants de queue.

Pour un potentiel imposé supérieur à + 50 mV,

le courant entrant apparaît suivi d'un courant sortant qui atteint un état stable en 60 à 80 ms. Lorsque le courant initial présente un rebond, l'analyse du courant retardé se révèle évidemment plus difficile, d'autant que celui-ci est généralement moins ample.

Les relations courant-potentiel imposé établies pour les mesures du courant sortant en fin d'impulsion de 60 ms (Fig. 22 B et B' et 23 B) présentent les caractéristiques suivantes :

- la rectification retardée ou rectification "dans le sens sortant" ("outward going rectification") apparaît pour un potentiel imposé supérieur à + 50 mV.

- le phénomène de rectification anormale ou rectification "dans le sens entrant" ("inward going rectification") n'apparaît que peu (voir notamment Fig. 22 et 26) ou pas. Une observation similaire a déjà été effectuée par TAKEDA (1967) sur la fibre musculaire d'écrevisse et par ILDEFONSE (1970) sur la fibre musculaire de grenouille dans des conditions identiques. Il se pourrait que ce phénomène soit en partie masqué par le courant de fuite relativement important pour la fibre musculaire de crabe.

De plus, l'enregistrement de la figure 23 pour un potentiel imposé de 80 mV montre que le courant sortant, après avoir atteint un maximum, diminue ensuite progressivement au cours du temps.

En ce qui concerne les courants de queue observés à la fin des impulsions lors du retour à E_R , il est intéressant de noter que ceux-ci sont sortants sur les fibres de type I, alors qu'ils apparaissent plus faibles ou nuls, pour les fibres de type II.

C - REponses A DES POTENTIELS IMPOSES HYPERPOLARISANTS :
ENREGISTREMENT DES COURANTS IONIQUES

Pour des hyperpolarisations imposées de faible amplitude, le courant développé après le courant capacitif est constant pendant toute la durée de l'impulsion. Ce courant a été assimilé au courant de fuite.

Pour des hyperpolarisations imposées voisines de -40 mV, un courant constant est également enregistré pendant toute la durée de l'impulsion sur certaines fibres et plus particulièrement celles de type I (Fig. 24 A). Sur d'autres fibres, immédiatement après le courant capacitif, le courant évolue au cours du temps pour devenir stable après 40 ms environ (Fig. 24 B). De tels enregistrements sont plus fréquemment et plus nettement observés sur les fibres de type II.

Cependant, les enregistrements dont nous disposons ne nous permettent pas d'analyser systématiquement les différentes réponses. Le plus souvent, nous avons appliqué des impulsions hyperpolarisantes inférieures à -40 mV, notre but étant d'obtenir une estimation du courant de fuite.

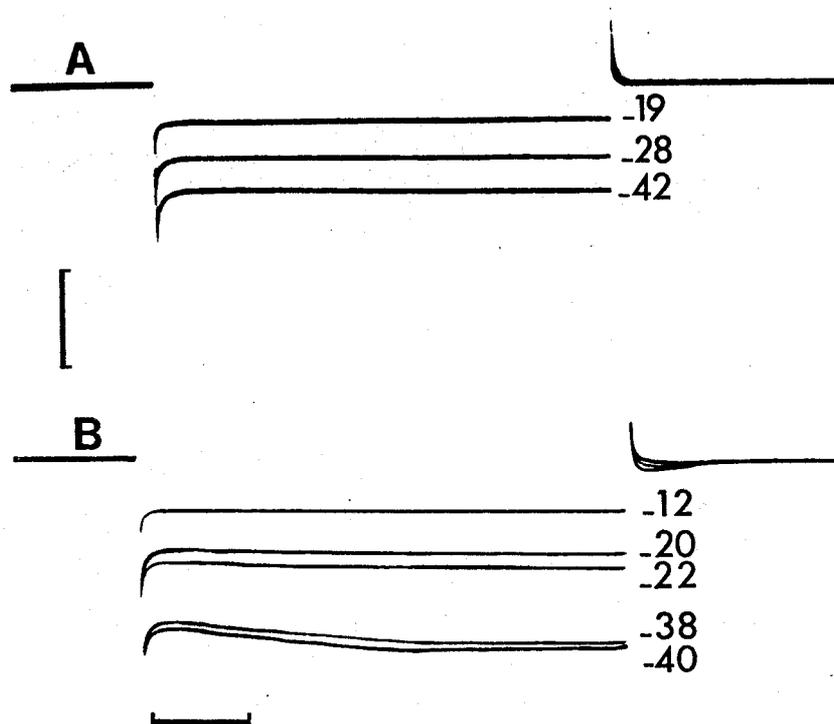


Figure 24 : Enregistrement des courants ioniques lors de l'application de potentiels hyperpolarisants.

A = courants correspondant aux réponses observées le plus fréquemment sur les fibres de type I (fibre 165).

B = courants correspondant aux réponses observées le plus fréquemment sur les fibres de type II (fibre 149).

Les chiffres à droite des tracés indiquent l'amplitude des hyperpolarisations imposées.

Echelle verticale = $0,3 \mu\text{A}$

Echelle horizontale = 10 ms.

D - CONCLUSION

Les enregistrements des courants ioniques obtenus en réponse à des potentiels imposés dépolarisants peuvent être classés en deux catégories.

Pour certaines fibres dites de type I, le courant initial entrant est suivi d'un courant sortant retardé. Ces deux courants, que l'on peut qualifier de classiques, ont déjà été observés sur les fibres musculaires de barnacle par HAGIWARA et coll. (1969) puis par KEYNES et coll. (1973). Nous en ferons une étude détaillée dans les chapitres suivants. Il est en outre intéressant de remarquer que ce type de réponse correspond, dans les conditions de courant imposé, aux enregistrements de potentiel à repolarisation lente.

Sur d'autres fibres, dites de type II, nous avons observé un courant initial composite. Celui-ci comprend un courant entrant et un courant sortant formant un rebond au moment de l'inactivation du courant entrant. Le potentiel d'inversion de la composante entrante est toujours inférieur à celui mesuré pour les fibres de type I. Enfin, ce courant initial complexe se produit toujours, lorsque la fibre présente, pour des courants imposés, un potentiel à phase de repolarisation au moins aussi rapide que la phase de dépolarisation.

Dès maintenant, il convient de signaler que nous avons distingué le rebond enregistré d'une oscilla-

tion. Nous avons montré au chapitre "Matériel et méthodes" que le contrôle du potentiel imposé demeurerait correct au moment où se produit ce rebond. Nous rassemblerons dans un chapitre particulier tous les arguments expérimentaux permettant de montrer qu'il s'agit d'un courant ionique.

Bien que ne faisant pas l'objet de ce travail, les réponses enregistrées pour des hyperpolarisations membranaires méritent d'être mentionnées.

Dans les conditions de courant imposé, la réponse obtenue pourrait être comparable, dans sa phase initiale (pic d'hyperpolarisation), à celle déjà enregistrée par d'autres auteurs sur la fibre musculaire de crabe. Cependant, le décours du potentiel enregistré nous conduit à supposer que nous n'avons pas enregistré correctement cette réponse. En effet, il est concevable que l'hyperpolarisation membranaire provoquée dans le compartiment test entraîne, du fait de l'existence d'une fuite importante, une dépolarisation membranaire au niveau de l'électrode latérale. Cette fuite résulterait à la fois de l'ultrastructure de la fibre et de nos conditions expérimentales, cette deuxième cause semblant mineure puisque nous avons pu évaluer le facteur de court-circuit voisin de 0,8 ou 0,9.

Dans les conditions de potentiel imposé, nous enregistrons, lorsque la membrane est hyperpolarisée

d'environ 40 mV, deux réponses différentes selon le type de fibre. Sur les fibres de type I, le courant obtenu semble pouvoir être identifié au courant de fuite. Sur les fibres de type II, il apparaît un courant évoluant au cours du temps. Cette réponse peut être interprétée comme la désactivation d'un courant sortant d'ions positifs dont le potentiel d'équilibre serait au moins égal à - 100 mV ou même plus négatif. Toutefois, il apparaît surprenant que nous n'enregistrons pas de variations de courant lorsque la membrane est hyperpolarisée de 20 mV (ou moins) à partir de E_R . Nous proposerons dans la discussion générale une interprétation de ce phénomène.

De toutes façons, il est bien évident qu'une étude spécifique de ces courants devrait être entreprise en liaison, vraisemblablement, avec la réponse hyperpolarisante enregistrée dans les conditions de courant imposé, comme le suggère TAKEDA (1967). Il est en effet intéressant de remarquer que la réponse obtenue en courant imposé est déclenchée lorsque le potentiel de membrane est hyperpolarisé d'environ 40 mV par rapport à E_R , c'est-à-dire lorsque nous enregistrons un courant évoluant au cours du temps dans les conditions de potentiel imposé.

- CHAPITRE III -

ETUDE DU COURANT ENTRANT CALCIQUE

A - NATURE IONIQUE DE LA COMPOSANTE ENTRANTE DU
COURANT INITIAL

- I - Influence de la tétrodotoxine
- II - Influence de la concentration calcique
externe
 - 1°) Milieu enrichi en calcium
 - 2°) Milieu dépourvu de calcium
- III - Influence des ions Sr^{++}
- IV - Influence des ions Mn^{++}
- V - Conclusion

B - MISE EN EVIDENCE DU COURANT CALCIQUE

- I - Etude du courant initial en solution
ASW + TEA
- II - Influence de la concentration calcique
externe en présence de TEA
- III - Conclusion

C - CARACTERISTIQUES DU COURANT CALCIQUE

- I - Potentiel d'inversion
 - 1°) Analyse des résultats acquis
 - 2°) Etude du courant de fuite
 - 3°) Détermination du potentiel d'inver-
sion par l'étude du courant de queue.
 - 4°) Conclusion

II - Analyse de la conductance calcique selon
le modèle d'HODGKIN-HUXLEY

- 1°) Activation calcique : dépendance
vis-à-vis du potentiel
- 2°) Inactivation calcique
 - a) Dépendance vis à vis du temps
 - b) Dépendance vis à vis du potentiel
- 3°) Conductance calcique
 - a) Variations de g_{Ca} en fonction
du potentiel
 - b) Variations de g_{Ca} au cours du
temps pour $V = + 45$ mV.

D - CONCLUSION

Les différents travaux relatant l'existence d'un courant entrant au moment de l'activité électrique des fibres musculaires de Crustacés s'accordent tous pour reconnaître la nature calcique de ce courant, sans intervention notable des ions sodium (FATT et GINSBORG, 1958, pour la fibre musculaire d'écrevisse ; HAGIWARA et NAKA, 1964, KEYNES et coll., 1973, pour la fibre musculaire de barnacle). Sur la fibre musculaire de crabe, FATT et KATZ (1953) ont décrit des potentiels d'action de grande amplitude en milieu ASW sans sodium mais ces auteurs supposent que la membrane peut être perméable à la choline, hypothèse reprise depuis par RENKIN (1961).

Dans un premier temps, nous vérifierons pour les fibres musculaires de crabe cette dépendance du courant entrant vis à vis des ions Ca^{++} . Cependant, pour un grand nombre de fibres, le courant initial est composite. Nous verrons qu'il est possible de déterminer une condition expérimentale permettant de n'enregistrer que la composante entrante calcique. La seconde partie de ce chapitre sera donc consacrée à l'exposé des expériences permettant d'établir ce résultat.

Cette condition expérimentale précisée, nous aborderons l'étude des caractéristiques du courant entrant : potentiel d'inversion, constantes d'activation et d'inactivation dépendantes du potentiel et du temps, conductance.

A - NATURE IONIQUE DE LA COMPOSANTE ENTRANTE DU
COURANT INITIAL

I- Influence de la tétrodotoxine

La tétrodotoxine (TTX) est connue pour abolir l'activité électrique de nombreux tissus excitables et pour inhiber spécifiquement la conductance sodique (KAO, 1966). Son action a été précisée, non seulement pour les fibres nerveuses mais également pour les fibres musculaires de grenouille dont le P.A. est de type sodique (FURUKAWA et coll., 1959 ; NARAHASHI et coll., 1960 ; NAKAJIMA et coll., 1962).

Sur les fibres musculaires de Crustacés présentant un potentiel calcique, la TTX ne modifie pas l'activité électrique (OZEKI et coll., 1966 ; TAKEDA, 1967, pour l'écrevisse - HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 a, pour le barnacle).

Sur la fibre musculaire de crabe l'application de TTX à la concentration relativement élevée de 10^{-6} g/ml n'entraîne aucune modification de l'activité électrique et des courants ioniques enregistrés préalablement en solution ASW.

II - Influence de la concentration calcique
externe

1°) Milieu enrichi en calcium

La solution ASW a été modifiée de façon à

multiplier par 3 la concentration calcique normale.

a) conditions de courant imposé

Cette solution entraîne dans les conditions de courant imposé une faible hyperpolarisation membranaire d'environ 4 mV et augmente légèrement la résistance membranaire de repos et le seuil d'activation. Ces effets sont identiques à ceux décrits par HAGIWARA et NAKA (1964) pour la fibre musculaire de barnacle et par FATT et GINSBORG (1958) pour la fibre musculaire d'écrevisse.

L'augmentation d'amplitude de la réponse électrique dans les conditions de courant imposé, bien que toujours observée, varie nettement selon le type de fibre utilisé. HAUDECOEUR et GUILBAULT (1972) décrivent un faible accroissement d'amplitude n'excédant pas 12 mV lorsque $[Ca]_e$ est multipliée par 10. HAGIWARA et NAKA (1964) trouvent une variation d'amplitude conforme à celle prévisible par l'équation de NERNST pour $[Ca]_e$ comprise entre 20 et 100 mM, à condition d'avoir injecté du K_2SO_4 ou de l'EDTA à l'intérieur de la fibre.

Dans nos conditions expérimentales, nous retrouvons ces deux types de résultats. En effet, sur les fibres de type II le potentiel n'est que faiblement augmenté, d'environ 6 mV en milieu (Ca x 3). Par contre, son accroissement peut atteindre 13 mV sur des fibres de type I comme le montre l'enregistrement de la figure

25 A. Une telle variation d'amplitude est proche de celle prévue par l'équation de NERNST, la pente étant de 25 mV pour $[Ca]_e \times 10$. Cependant, sur d'autres fibres de type I, une pente légèrement plus faible, égale à 20 mV, a été mesurée.

b) conditions de potentiel imposé

Corrélativement, dans les conditions de potentiel imposé, le courant entrant est augmenté de façon plus ou moins sensible. L'accroissement le plus net d'amplitude du courant entrant est obtenu sur les fibres de type I, c'est-à-dire celles pour lesquelles la réponse électrique a été elle-même plus nettement augmentée (Fig. 25 B). Les relations courant-potentiel imposé tracées pour le courant entrant montrent que le potentiel d'inversion est déplacé de 90 mV (quand $[Ca]_e$ est normale) à 102 mV (quand $[Ca]_e$ est triplée). Il est à noter que cette variation de 12 mV obtenue sur cette fibre de type I corrobore bien la variation de potentiel de 13 mV mesurée pour cette même fibre. Cette valeur correspond à un déplacement du potentiel d'inversion de 25 mV pour une augmentation de 10 fois $[Ca]_e$, nos différents résultats se situent entre 20 et 25 mV.

Lorsque le courant initial en solution ASW est de nature composite, la variation du potentiel d'inversion n'est, par contre, jamais supérieure à 15 mV (en considérant $[Ca]_e \times 10$).

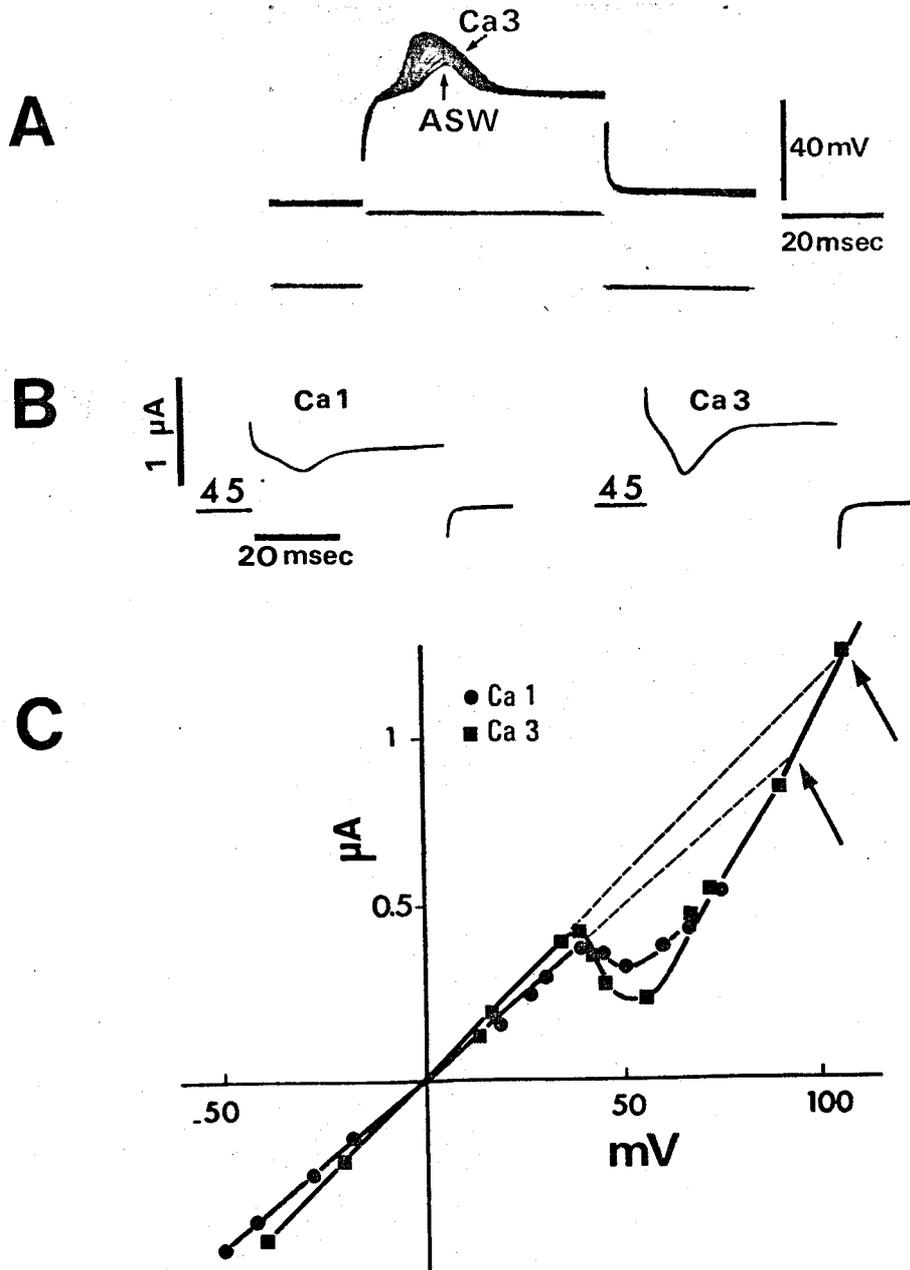


Figure 25 : Action d'un milieu hypercalcique.

- A - Modification de la réponse électrique enregistrée dans les conditions de courant imposé sous l'action d'un milieu hypercalcique $[Ca \times 3]_e$ après contrôle en solution ASW.
- B - Evolution du courant ionique pour une dépolarisation imposée de 45 mV lors de l'application du milieu Ca 3.
- C - Caractéristiques courant - potentiel en solution ASW (Ca 1) et en milieu hypercalcique (Ca 3) obtenues pour les mesures au maximum du courant entrant ou au minimum du courant sortant. Noter le déplacement du potentiel d'inversion de 12 mV pour une variation de trois fois $[Ca]_e$.

Fibre 1705 .

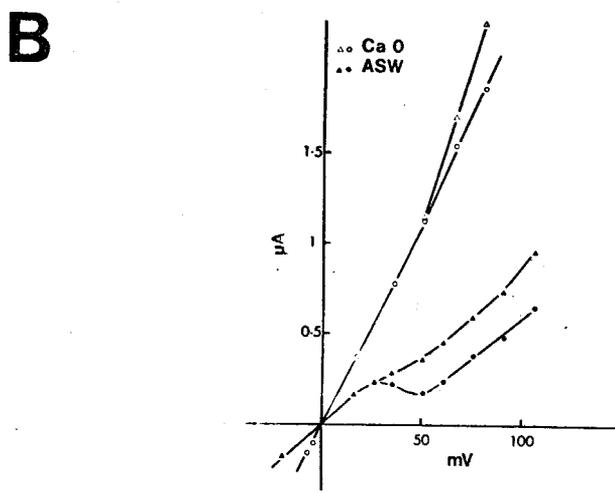
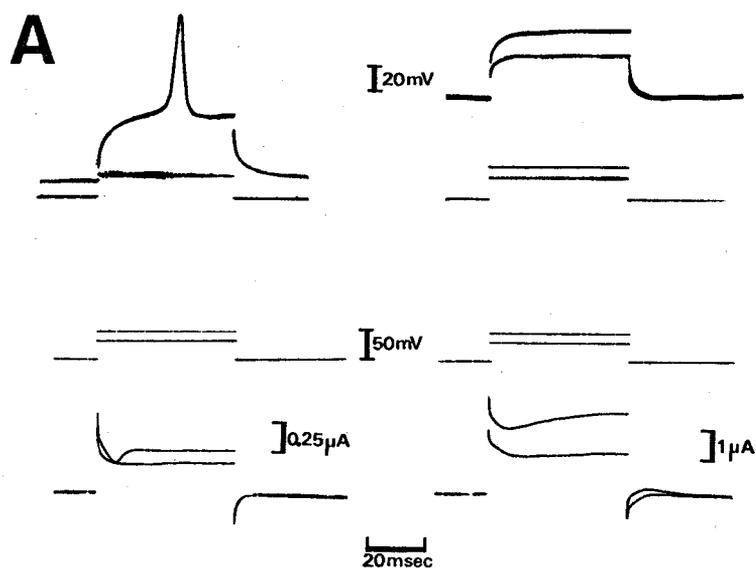


Figure 26 : Action d'un milieu dépourvu de calcium ($\text{CaCl}_2 = 0 \text{ mM}$)

- A - Suppression de la réponse électrique (conditions de courant imposé) et du courant entrant (conditions de potentiel imposé) sous l'effet d'un milieu dépourvu de calcium (Ca 0).
Noter l'augmentation très nette du courant de fuite.
- B - Caractéristiques courant potentiel établies sur cette fibre en solution ASW puis en solution Ca 0 pour le courant initial au maximum du courant entrant ou au minimum du courant sortant (points et cercles) et en fin d'impulsions de 50 ms (triangles pleins et évidés)
Fibre 2505 .

Enfin, quel que soit le type de fibre, le courant sortant retardé n'est pas affecté par l'augmentation de $[Ca]_e$.

2°) Milieu dépourvu de calcium

Lorsque la solution ASW ne contient plus de $CaCl_2$, l'activité électrique et le courant entrant sont totalement supprimés (Fig. 26 A). Très rapidement un courant de fuite important se produit, comme le montrent clairement les caractéristiques courant potentiel présentées (Fig. 26 B). Cette augmentation du courant de fuite résulte probablement de la suppression de l'effet stabilisant des ions Ca^{++} (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957).

III - Influence des ions Sr^{++}

Il est maintenant bien connu que les ions Sr^{++} peuvent, sur les fibres musculaires de Crustacés, remplacer les ions Ca^{++} . FATT et GINSBORG (1958), HENČEK et coll. (1969) sur les fibres d'écrevisse, HAGIWARA et coll. (1974) sur les fibres de barnacle, ont montré que la réponse graduée obtenue en solution de référence est transformée en réponse régénérative de grande amplitude et très durable en solution Sr.

Nous avons utilisé une solution contenant 80 mM de $SrCl_2$ et dépourvue de $CaCl_2$. Un résultat

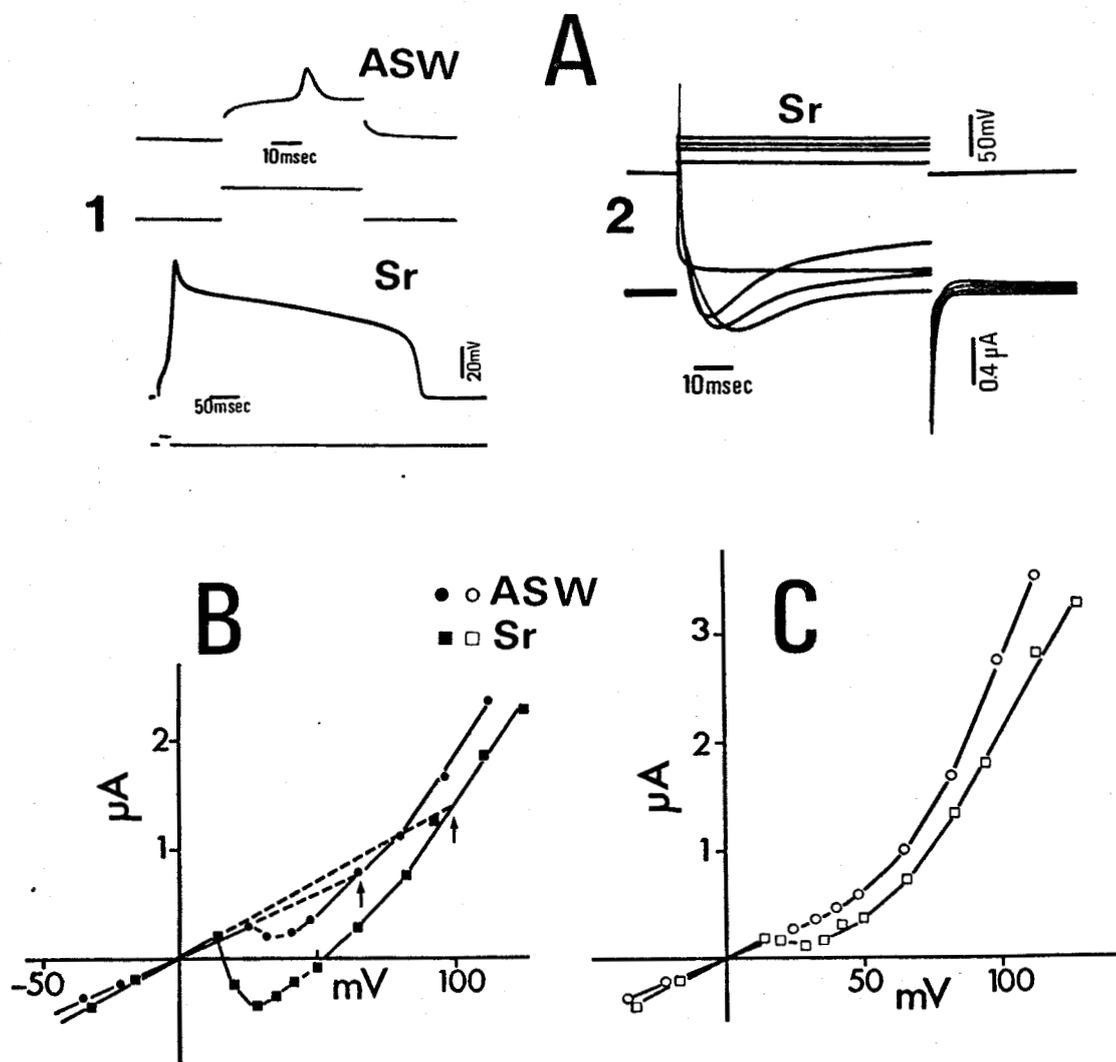


Figure 27 : Enregistrements de l'activité électrique (A 1) et des courants ioniques pour différentes dépolarisations imposées (A 2) en milieu Sr ($\text{SrCl}_2 = 80 \text{ mM}$; $\text{CaCl}_2 = 0 \text{ mM}$).

- B - Caractéristiques courant potentiel établies sur la même fibre pour le courant entrant en solution ASW (points) et en solution Sr (carrés).
- C - Caractéristiques courant potentiel obtenues sur la même fibre à partir de mesures à la fin d'impulsions de 70 ms en solution ASW (cercles) et en solution Sr (carrés évidés).

Fibre 2010 .

comparable à celui décrit ci-dessus est obtenu sur la fibre musculaire de crabe placée dans les conditions de double sucrose. Sous l'action de la solution Sr la réponse électrique graduée augmente très rapidement en amplitude atteignant environ 100 mV tandis que le seuil diminue (Fig. 27 A1). L'allongement du P.A. s'effectue par contre plus lentement.

Lors de l'application de potentiels imposés (Fig. 27 A2) le courant entrant apparaît pour de faibles dépolarisations puis devient très ample et net entrant pour des dépolarisations plus élevées.

Lorsque le rebond est présent sur les tracés de courant en solution ASW, celui-ci disparaît. L'inactivation du courant entrant devient alors exponentielle, la constante d'inactivation étant d'environ 16 ms pour un potentiel de membrane de - 17 mV, valeur proche de celles que nous déterminerons pour l'inactivation du courant calcique.

Les relations courant-potentiel montrent que le courant entrant en solution Sr est maximal pour une dépolarisation de 35 mV. Dans toute la gamme des potentiels imposés, ce courant est toujours plus entrant ou moins sortant que le courant enregistré en solution ASW pour les mêmes valeurs de potentiel imposé. Le potentiel d'inversion du courant entrant situé pour un potentiel imposé de + 65 mV en solution ASW est déplacé à + 100 mV en solution Sr (Fig. 27 B). Le courant sortant

tardif et la rectification retardée apparaissent diminués (Fig. 27 C).

Il faut noter que dans cette expérience, ainsi que dans celle décrite pour illustrer l'action d'un milieu hypercalciqque, le courant de fuite semble très légèrement augmenté. Ceci peut résulter d'une réelle augmentation de la fuite membranaire ou bien d'une faible augmentation de la résistance sarcoplasmique.

IV - Influence des ions Mn^{++}

Les ions Mn^{++} bloquent sélectivement le courant calcique provoquant le potentiel d'action des fibres musculaires de barnacle (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 a) et élimine la réponse graduée des fibres d'écrevisse (FATT et GINSBORG, 1958 ; TAKEDA, 1967) et des fibres de crabe (HAUDECOEUR et GUILLEAULT, 1972).

L'addition de 20 mM de $MnCl_2$ à la solution ASW provoque toujours la suppression totale de l'activité électrique (Fig. 28 A et A') dans nos conditions de courant imposé.

Sur cette fibre, en potentiel imposé, le courant entrant disparaît et simultanément, le rebond existant dans le courant initial est supprimé (Fig. 28 B et B'). Le courant sortant retardé, particulièrement ample sur cette fibre de type II, n'est pas affecté par les ions Mn^{++} pour des potentiels imposés inférieurs à + 80 mV. Pour des dépolarisations supérieures, ce

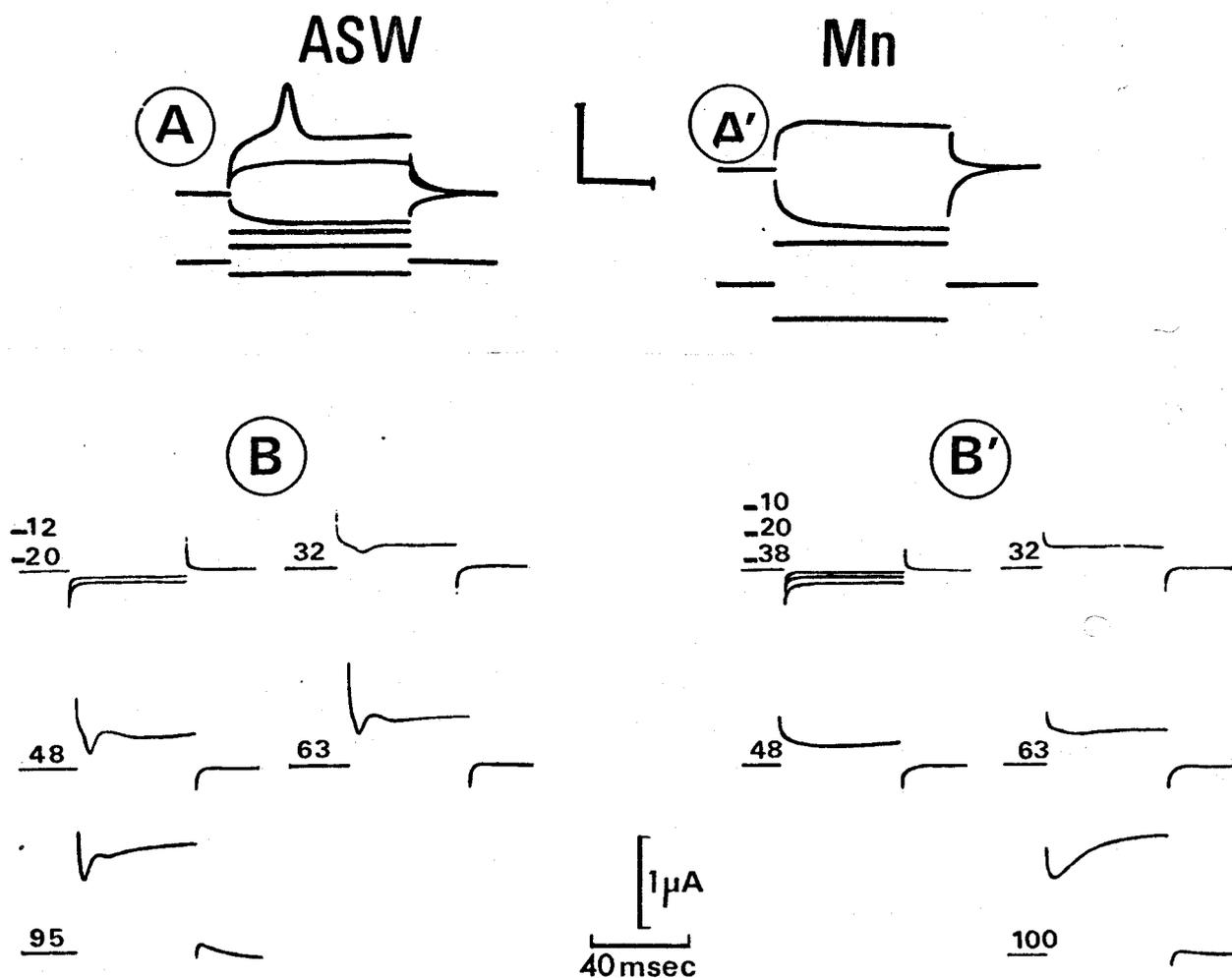


Figure 28 : Enregistrements dans les conditions de courants imposés (A et A') et dans les conditions de potentiels imposés (B et B') obtenus pour une fibre placée en solution ASW puis en solution-Mn ($\text{Mn Cl}_2 = 20 \text{ mM}$)

échelles verticales : A = 40 mV
 A' = 100 mV
 échelle horizontale : 20 ms.

Les chiffres à la gauche des enregistrements indiquent les valeurs des potentiels imposés à partir du HP = E_R .

Fibre 2504 .

courant subit une légère diminution.

Les relations courant-potentiel imposé (Fig. 29) établies pour cette fibre en solution ASW puis ASW + Mn pour le courant entrant mettent en évidence ces différents résultats. Il est intéressant de noter que l'intersection de deux courbes ASW et ASW + Mn représentant l'évolution du courant entrant ou du courant initial en fonction du potentiel se produit pour une dépolarisation imposée de + 90 mV. Ce résultat suggérerait donc un potentiel d'inversion pour le courant entrant correspondant à $E_m = + 25$ mV, ce qui confirme la mesure effectuée en solution ASW par extrapolation du courant de fuite.

Enfin, si le courant sortant n'est, comme nous l'avons signalé, que légèrement influencé par les ions Mn^{++} , les courants de queue sont par contre toujours nettement diminués (voir enregistrements Fig. 28).

Dans le cas des fibres de type I (courant initial à une seule composante entrante) les mêmes résultats sont obtenus notamment pour le courant entrant. En outre, les caractéristiques courant-potentiel présentées (Fig. 30) montrent la diminution du courant sortant retardé, celle-ci se produisant déjà pour un potentiel imposé voisin de + 60 mV.

Il faut mentionner toutefois que les fibres, indépendamment de leur type, présentent plus ou moins nettement cette diminution mais il apparaît compréhensible que celle-ci soit plus évidente pour les fibres de type I

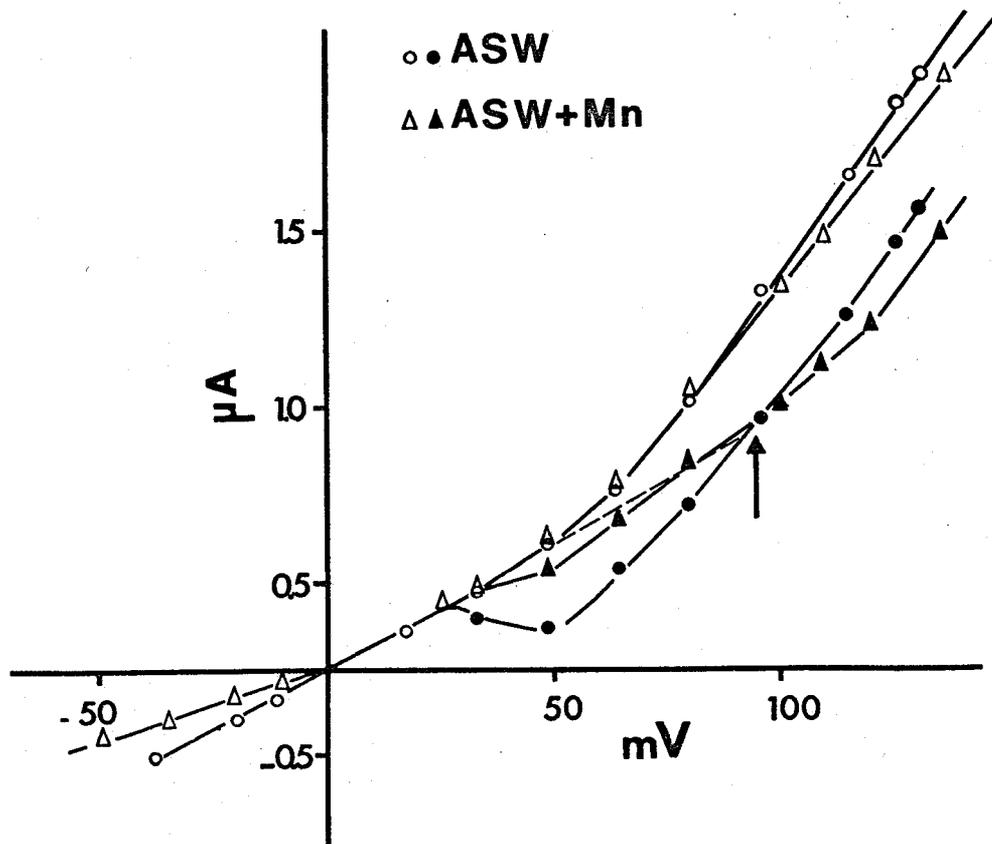


Figure 29 : Caractéristiques courant potentiel tracées en solution ASW (cercles) puis en solution-Mn (triangles) sur la fibre dont les enregistrements sont présentés à la figure 28 (Fibre 2504).

Symboles pleins : mesures au maximum du courant entrant ou au minimum du courant sortant.

Symboles évidés : mesure en fin d'impulsions de 46 ms.

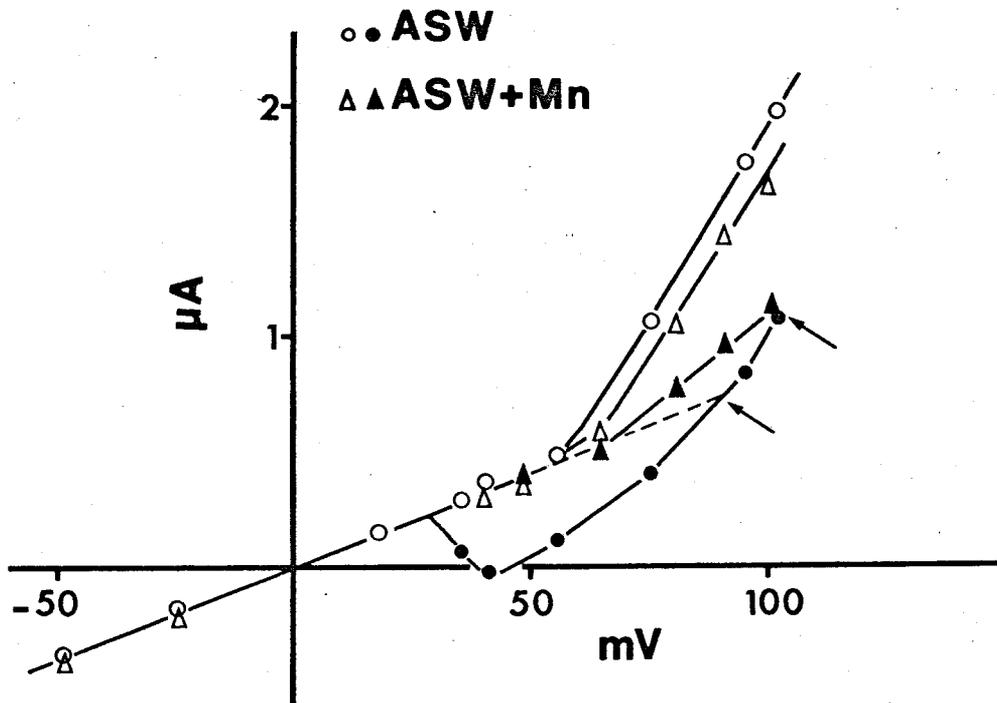


Figure 30 : Même légende qu'à la figure 29.

Ces caractéristiques sont obtenues pour une fibre de type I.

Fibre 707 .

où le courant retardé est généralement plus ample en solution ASW (voir chapitre II).

V - Conclusion

L'ensemble des résultats que nous venons de présenter confirme la nature calcique du courant entrant ou de la composante entrante du courant initial. Insensible à la TTX, ce courant dépend de la concentration calcique externe, peut être transporté par les ions Sr^{++} et est inhibé par les ions Mn^{++} .

Cependant, deux résultats nous conduisent à nous interroger quant à la nature purement calcique de ce courant. D'une part, toutes les valeurs obtenues pour son potentiel d'inversion sont particulièrement basses. Elles correspondent à E_m variant de 0 à + 35 mV selon le type de fibres. D'autre part, la dépendance du courant entrant vis à vis de $[\text{Ca}]_e$ n'est le plus souvent que partielle et se révèle plus grande si le courant initial ne présente pas de rebond. Il n'est pas sans intérêt de remarquer en outre que cette sensibilité vis à vis de $[\text{Ca}]_e$ peut varier, quoique légèrement, pour des fibres classées dans le même type. Cette variabilité peut cependant s'expliquer assez facilement. En effet, nous avons signalé que pour les fibres de type II, le rebond pouvait être plus ou moins développé. De même, pour les fibres de type I, on peut concevoir que l'absence apparente de rebond ne signifie pas

systematiquement, pour toutes les fibres, qu'aucun courant sortant initial n'ait été au moins faiblement activé. Une interaction entre l'influence de chacune des composantes du courant initial pourrait ainsi rendre compte de nos différentes observations.

Deux hypothèses peuvent donc être émises :

- soit le canal calcique présente une faible sélectivité

- soit un autre courant se produit en même temps que le courant entrant. Il pourrait évidemment s'agir du courant responsable du rebond.

Les résultats qui vont être présentés auront pour but de permettre de juger de la validité de ces hypothèses et de trancher éventuellement entre l'une ou l'autre.

B - MISE EN EVIDENCE DU COURANT CALCIQUE

I - Etude du courant initial en solution

ASW + TEA

Le chlorure de tétraéthylammonium (TEA) est réputé être un inhibiteur de la conductance potassique (HILLE, 1967 ; KOPPENHOFFER, 1967 ; STANFIELD, 1970 a).

Le TEA produit des effets très variables sur le potentiel de repos des fibres musculaires de Crustacés. FATT et KATZ (1953) observent une diminution du P.R. sur les fibres de *Carcinus* et de *Portunus*, effet comparable à celui décrit par STANFIELD (1970 b) pour le P.R. de la fibre musculaire de grenouille. Sur les fibres d'écrevisse, le P.R. demeure inchangé (FATT et GINSBORG, 1958) tandis que WERMAN et GRUNDFEST (1961) constatent une hyperpolarisation membranaire et une augmentation de la R_m sur le muscle de homard.

Dans nos conditions de courant imposé, l'addition de TEA (20 mM) à la solution de référence ne modifie pas les propriétés membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe, en accord avec les résultats de HAUDECOEUR (1971) obtenus à l'aide de microélectrodes sur les mêmes fibres.

Sur la fibre musculaire de crabe, comme sur d'autres muscles de Crustacés (HAGIWARA et WATANABE, 1955), le TEA provoque la transformation de la réponse électrique, même lorsque celle-ci est graduée et de

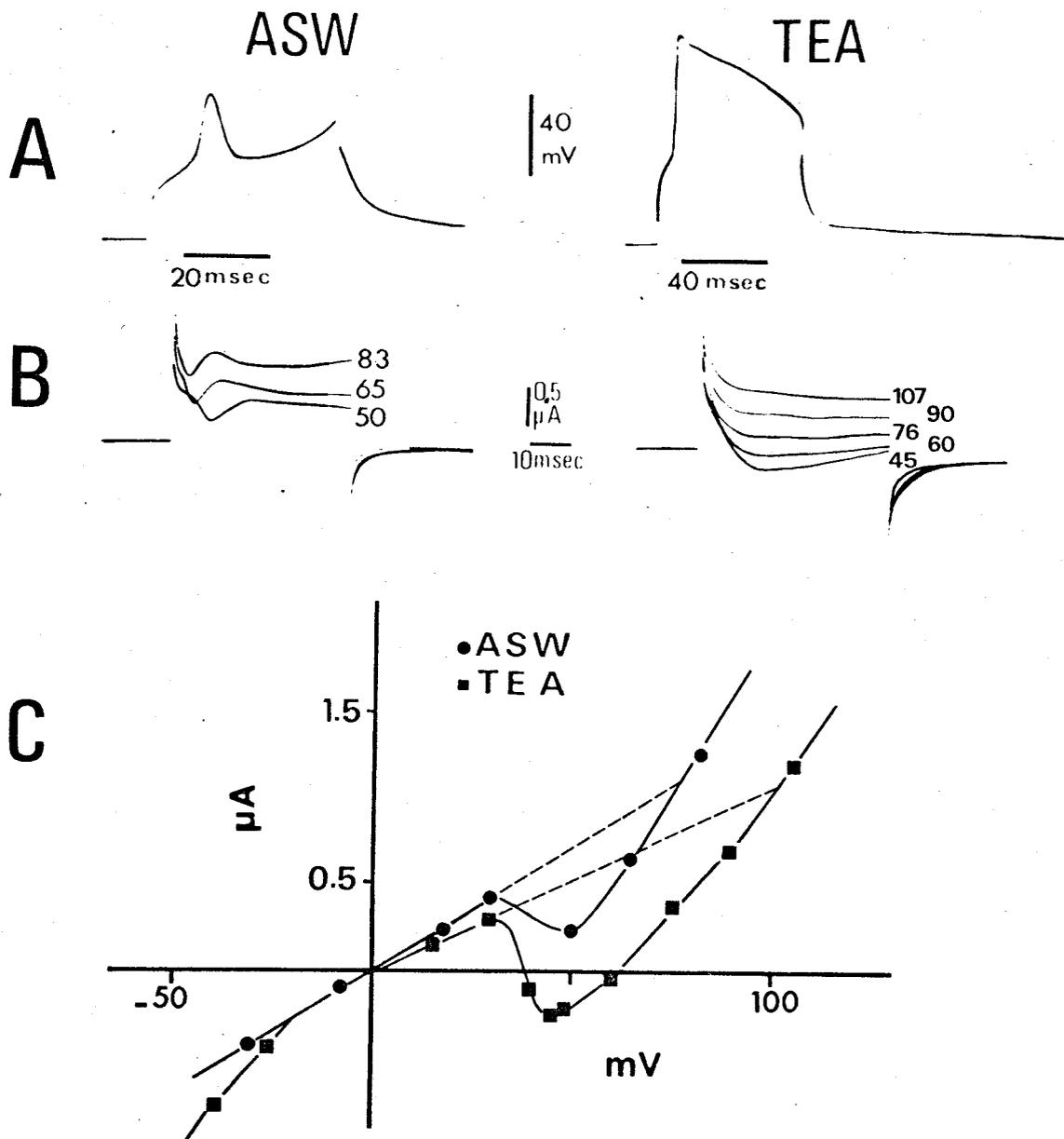


Figure 31 : Effet d'une solution TEA (20 mM) sur l'activité électrique

- A - L'amplitude et la durée de la réponse électrique dans les conditions de courant imposé sont nettement augmentées en présence de TEA.
- B - Enregistrements des courants ioniques en solution ASW puis en solution TEA. Noter la disparition du rebond et l'augmentation d'amplitude du courant entrant.
- C - Caractéristiques courant-potentiel établies en solution ASW (points) puis en solution TEA (carrés) pour le courant entrant. Noter le déplacement de + 25 mV du potentiel d'inversion du courant entrant.

Fibre 1609 .



faible amplitude, en une réponse régénérative ample atteignant 90 à 100 mV et très durable (Fig. 31 A). Le seuil est généralement légèrement diminué.

Dans les conditions de potentiel imposé, le TEA entraîne l'augmentation de l'amplitude du courant entrant, qui devient même net entrant.

Ces effets sont enregistrés sur toutes les fibres testées, quel que soit leur type en solution ASW. Sur les fibres de type II présentant un rebond il faut noter la disparition du rebond simultanément à l'augmentation du courant entrant (Fig. 31 B).

Les caractéristiques courant-potentiel (Fig. 31 C), établies sur la fibre de type II dont les enregistrements sont présentés en B, permettent de déterminer le potentiel d'inversion du courant entrant. La composante entrante du courant initial est annulée pour un potentiel imposé de + 75 mV en solution ASW tandis qu'en présence de TEA le potentiel d'inversion du courant entrant est déplacé d'environ 30 mV. Sur l'ensemble des fibres de type II étudiées, l'application de TEA a toujours provoqué une variation du potentiel d'inversion de 25 à 30 mV. Celui-ci correspond alors à un potentiel de membrane égal à + 30 ou + 35 mV.

Pour les fibres de type I pour lesquelles le courant initial ne présente pas de rebond apparent, la variation du potentiel d'inversion du courant entrant sous l'effet du TEA est beaucoup plus faible, d'environ 5 à 10 mV.

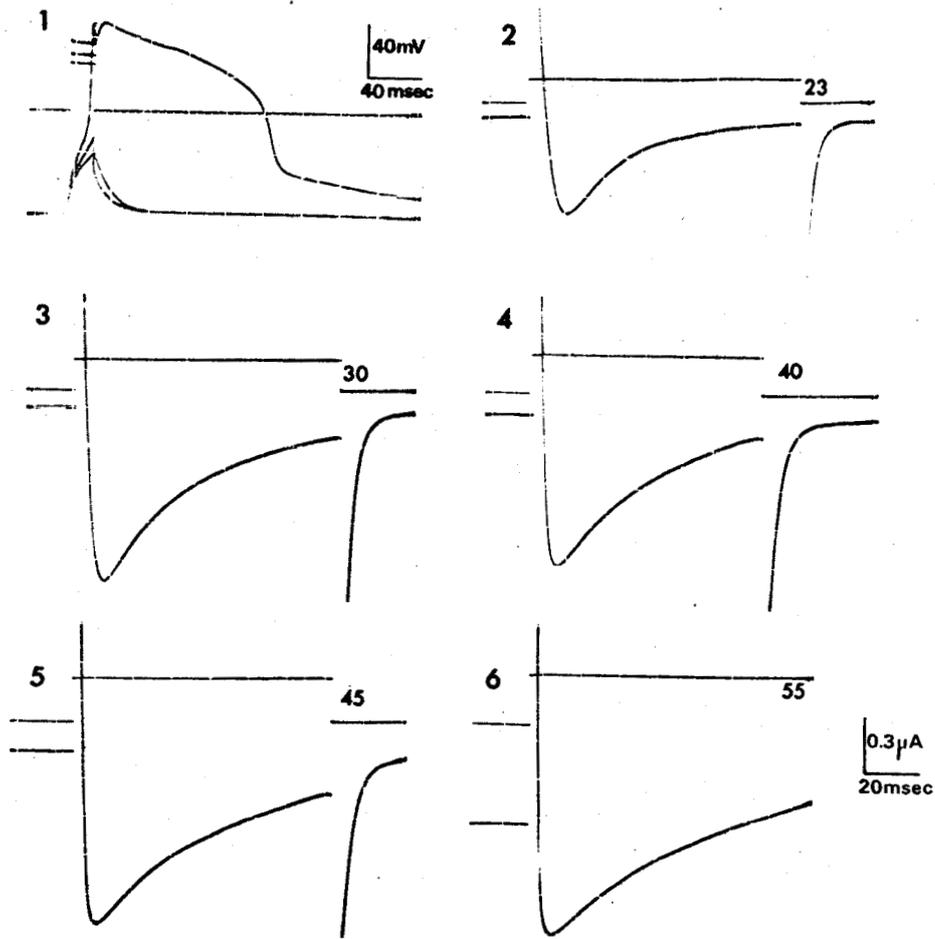


Figure 32 : Effet d'une solution TEA (20 mM) sur l'activité électrique.

- 1 : Potentiel d'action obtenu dans les conditions de courant imposé.
 2-6 : Courants ioniques enregistrés pour différentes dépolarisations imposées dont les valeurs sont portées à la droite des enregistrements.
 Noter la grande amplitude et l'activation relativement plus rapide du courant entrant.

Fibre 7275.



De plus, il faut remarquer que, pour les enregistrements présentés, le courant calcique est activé avec un certain retard. Cette observation, très nette pour les enregistrements correspondant aux dépolarisations de 45 à 60 mV a pu être effectuée également sur de nombreuses autres fibres. Il ne semble pas que cette sorte de décrochement puisse être attribuée à un défaut de "clamp", dans la mesure où nous avons toujours pu enregistrer un accroissement progressif du courant entrant en fonction du potentiel entre + 30 et + 50 mV. Sur d'autres fibres, ce retard apparaît moins marqué comme le montrent les enregistrements de la figure 32. Dans ce cas, les courants ioniques sont très comparables à ceux obtenus en milieu Sr (voir Fig. 27 I_2).

Les différents effets dus au TEA que nous venons d'observer à savoir :

- augmentation d'amplitude et de durée de la réponse électrique
- augmentation du courant entrant
- suppression du rebond
- déplacement du potentiel d'inversion du courant entrant.

étaient la deuxième hypothèse émise précédemment. En effet, il est possible d'admettre que le TEA a inhibé un courant sortant se produisant au moins en partie en même temps que le courant entrant. Dans ces conditions, en présence de TEA, il devient intéressant d'examiner

à nouveau la dépendance du courant entrant vis à vis de la concentration calcique externe.

II - Influence de la concentration calcique externe en présence de TEA

Deux solutions ont été appliquées successivement sur une même fibre. L'une correspond à la solution ASW + TEA (20 mM), l'autre est un milieu hypercalcique ($Ca \times 5$) additionné de TEA (20 mM).

Dans les conditions de courant imposé, le potentiel de 92 mV en milieu ASW + TEA devient égal à + 110 mV lorsque le milieu $[Ca]_e \times 5$ + TEA est appliqué.

En potentiel imposé, les courbes courant - potentiel de la figure 33 traduisent les résultats obtenus. L'application de la solution enrichie en calcium provoque l'augmentation du courant entrant et un déplacement de son potentiel d'inversion de + 95 mV à + 113 mV ($E_m = + 30$ à + 48 mV). Cette variation correspond à un changement de 27 mV pour une augmentation de $[Ca]_e$ d'un facteur 10.

Un milieu appauvri en calcium : ($Ca \times 0,5$) provoque sur la même fibre la suppression de la réponse électrique et du courant entrant.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par HAGIWARA et NAKA (1964). Rappelons que selon ces auteurs, la variation de $[Ca]_e$ entre 20 et 100 mM provoque une variation de potentiel conforme à celle calculable

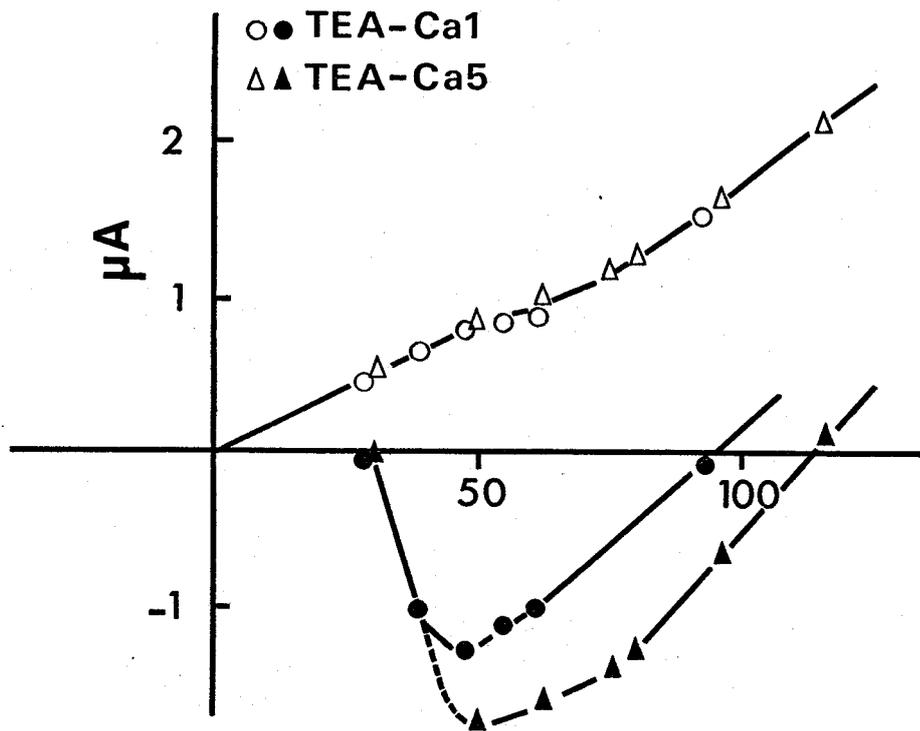


Figure 33 : Caractéristiques courant-potentiel obtenues sur une fibre placée successivement dans un milieu ASW + TEA (20 mM) : "TEA-Ca 1" puis dans un milieu hypercalcique ($[Ca]_e \times 5$) additionné de TEA : "TEA-Ca5". Mesures au maximum du I entrant ou au minimum du I sortant en TEA-Ca 1 (points) puis en TEA-Ca 5 (triangles pleins). Ces mesures sont corrigées du courant de fuite supposé indépendant du potentiel et du temps. Mesures en fin d'impulsions de 65 ms en TEA-Ca 1 (cercles) et en TEA-Ca 5 (triangles évidés).

Fibre 2410 .

par l'équation de NERNST. Toutefois, ce résultat ne peut être acquis qu'à condition d'avoir injecté du K_2SO_4 ou de l'EDTA à l'intérieur de la fibre. Dans notre cas, il apparaît qu'en présence de TEA, l'augmentation de la concentration calcique externe permet également de mettre en évidence une dépendance du potentiel d'inversion du courant entrant vis à vis des ions Ca^{++} proche de celle prévisible par l'équation de NERNST. Ce résultat suggère donc que l'hypothèse d'une faible sélectivité du canal calcique doit être rejetée.

III - Conclusion

L'addition de TEA à la solution de référence nous permet d'enregistrer une activité électrique et un courant entrant de grande amplitude. Dans la mesure où le courant de fuite n'apparaît que peu ou pas affecté, il est donc raisonnable d'admettre que le TEA a pu agir sur un courant ionique survenant dès la phase de dépolarisation du potentiel. La composante sortante du courant initial étant supprimée par le TEA il semblerait donc que celle-ci puisse être due à un courant potassique se produisant, au moins en partie, en même temps que le courant calcique. En effet, le courant entrant enregistré se révèle être, en présence de TEA, un courant calcique relativement pur et dépendant de $[Ca]_e$. Dans ces conditions, il devient possible d'aborder une étude plus détaillée de ce courant calcique afin de préciser ses différentes caractéristiques.

C - CARACTERISTIQUES DU COURANT CALCIQUE

I - Potentiel d'inversion

1°) Analyse des résultats acquis

Au cours de l'exposé des résultats précédents, nous avons déterminé à différentes reprises le potentiel d'inversion du courant entrant. Nous allons résumer les résultats acquis.

Dans les conditions de potentiel imposé, lorsque les fibres sont placées en solution ASW, deux valeurs du potentiel d'inversion peuvent être proposées selon le type de fibre étudiée (voir chapitre II, paragraphe B).

- Fibre du type I (courant initial sans rebond apparent) : $V_{rev} = 90$ à 95 mV
- Fibre du type II (courant initial avec rebond) : $V_{rev} = 75$ à 80 mV.

Nous venons de constater que ces valeurs ne sont pas réellement celles du potentiel d'inversion du courant calcique, surtout pour les fibres du type II. En effet, en présence de TEA, le potentiel d'inversion correspond toujours à V_{rev} voisin de 100 mV. Dans la mesure où le canal calcique semble assez sélectif, il serait à priori logique de considérer que le potentiel de membrane correspondant, soit $E_m = + 35$ mV (en admettant $E_R = - 65$ mV), puisse être assimilé au potentiel d'équilibre des ions Ca^{++} .

Un problème important se trouve immédiatement soulevé. En effet, si la valeur de + 35 mV était celle de E_{Ca} , la concentration interne en ions Ca^{++} serait d'environ 1 mM. Il est bien évident que si la répartition du calcium est homogène, une telle valeur est impossible puisqu'elle correspond d'une part au contenu interne calcique total (ASHLEY, 1967) et que d'autre part, PORTZEHL et coll. (1964) proposent une valeur de 10^{-7} M de Ca^{++} compatible avec l'activité mécanique. De plus, HAGIWARA et NAKAJIMA (1966 b) obtiennent des réponses régénératives après avoir injecté un agent chélatant permettant de réduire $[Ca]_i$ à environ $8 \cdot 10^{-8}$ M. Or, dans nos conditions expérimentales, nous enregistrons parfois des réponses analogues mais le potentiel d'inversion demeure conforme à l'ensemble de nos résultats. Il apparaît donc indispensable de rechercher d'une part quelle erreur a pu fausser notre mesure et de déterminer d'autre part ce potentiel d'inversion par une méthode différente.

2°) Etude du courant de fuite (I_L)

Une source d'erreur peut bien sûr provenir de notre technique graphique d'estimation du courant de fuite dont la variation d'amplitude en fonction du potentiel a été considérée linéaire. Afin de contrôler ce postulat nous avons tenté de déterminer expérimentalement les valeurs de ce courant de fuite en fonction

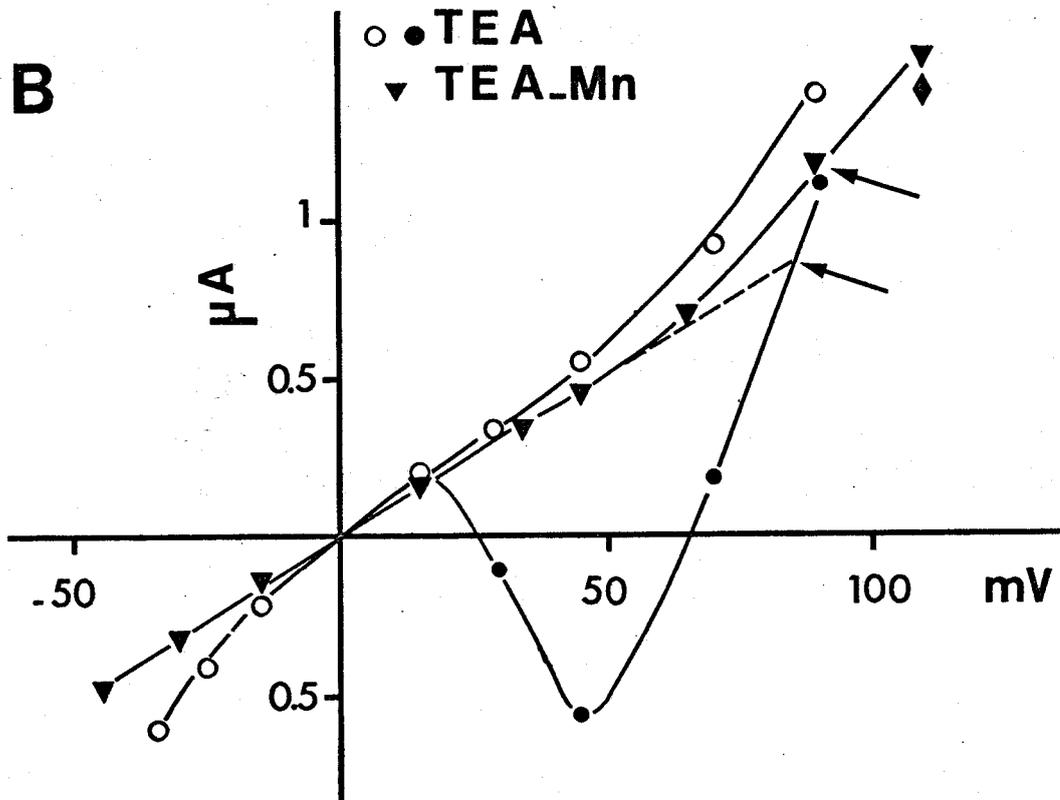
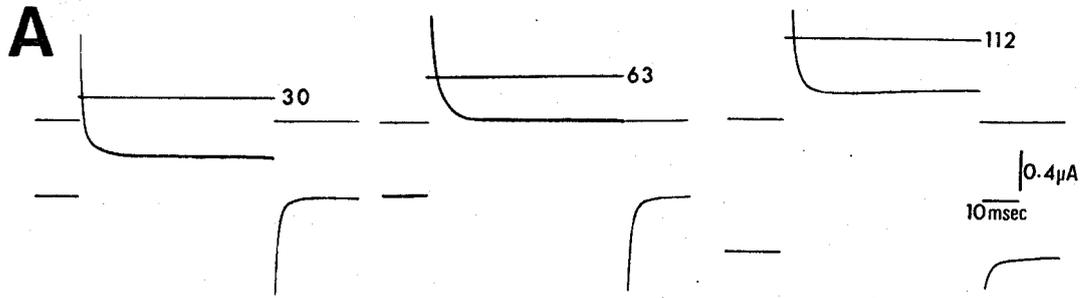


Figure 34 : Etude du courant de fuite en milieu TEA-Mn.

A - Enregistrements obtenus en milieu TEA (20 mM)-Mn (20 mM)

B - Caractéristiques courant potentiel établies :

1°) en milieu TEA pour le courant entrant (points) et en fin d'impulsions de 65 ms (cercles).

2°) en milieu TEA-Mn (triangles) : les mesures du courant initial I_i et du courant en fin d'impulsions de 65 ms sont identiques (sauf pour le potentiel imposé de + 112 mV où une petite différence apparaît : I_i symbolisé par un losange), indiquant la suppression du courant entrant et du courant retardé. Le courant de fuite présente une légère rectification. Remarquer cependant que la différence entre les deux valeurs du potentiel d'inversion (indiquées par des flèches) est faible.

Fibre 1503.

du potentiel. Nous avons vu que les ions Mn^{++} permettent de supprimer le courant entrant ou tout le courant initial et qu'en outre le TEA inhibe le courant sortant initial. De plus, le courant sortant retardé que nous étudierons ultérieurement est fortement diminué par le TEA. Par conséquent, il semble possible d'éliminer les différents courants ioniques impliqués dans le processus d'excitation pour enregistrer un courant résiduel représentant certainement en grande partie le courant de fuite.

L'expérience est réalisée en deux temps : tout d'abord les enregistrements sont effectués en milieu TEA (20 mM) afin de supprimer les courants sortants puis une solution TEA + Mn (20 mM) est appliquée. La figure 34 B présente les caractéristiques courant-potentiel obtenues. Le milieu TEA-Mn provoque la suppression totale du courant entrant ainsi qu'une légère diminution du courant sortant. Les courants deviennent indépendants du temps, les valeurs du courant initial et du courant final étant identiques ; une très faible différence apparaît seulement pour un potentiel imposé de + 112 mV (Fig. 34 A).

La diminution du courant sortant en milieu TEA-Mn alors qu'un milieu TEA a déjà été appliqué doit être soulignée. Cet effet peut s'interpréter de deux façons. Il pourrait s'agir soit d'une action plus complète des ions TEA au cours du temps soit de l'effet

précédemment décrit des ions Mn^{++} sur le courant sortant retardé (voir Fig. 30). La première hypothèse apparaît peu vraisemblable puisque, comme nous l'avons déjà signalé, la fibre subit toujours une imbibition d'au moins un quart d'heure dans la solution TEA avant que les enregistrements ne soient effectués. La seconde hypothèse peut être valable, à la lumière de nos précédents résultats, si l'on admet que la solution TEA (à la concentration de 20 mM) n'a pas totalement supprimé le courant sortant retardé. Dans ces conditions, les Mn^{++} auraient pu agir sur un courant résiduel.

Quoi qu'il en soit, il semble bien qu'en milieu TEA-Mn la quasi-totalité des courants ioniques soit supprimée et que le courant enregistré puisse être assimilé au courant de fuite. Nous constatons que celui-ci suit une relation linéaire en fonction du potentiel pour des potentiels imposés hyperpolarisants ou dépolarisants inférieurs à + 55 mV. Au-delà de cette valeur, le courant de fuite rectifie légèrement. Une observation similaire a été signalée par ADELMAN et TAYLOR (1961) sur l'axone de seiche et par GOLDMAN et BINSTOCK (1969) sur l'axone de Myxicola.

Nous constatons que la courbe traduisant la variation de I_L croise celle établie pour le courant entrant en milieu TEA à + 92 mV. Par contre, si la variation du courant de fuite est considérée linéaire,

le point d'intersection correspond à un potentiel imposé de + 86 mV. Par conséquent, l'erreur commise pour la détermination du potentiel d'inversion du courant entrant est de 6 mV lorsque l'on utilise la méthode d'extrapolation du courant de fuite. Elle est généralement voisine de 5 mV pour les autres expériences réalisées, ce faible écart étant explicable par la forte "slope-conductance" calcique dans cette zone de potentiels.

Ce résultat nous oblige à considérer que notre détermination graphique du potentiel d'inversion du courant entrant ne peut être la cause des valeurs basses que nous enregistrons généralement.

3°) Détermination du potentiel d'inversion du courant entrant par l'étude du courant de queue.

Une autre méthode de détermination du potentiel d'inversion d'un courant consiste à observer la direction du courant de queue à différents niveaux de potentiel après avoir activé ce courant. Les expériences ont été réalisées en présence de TEA. Un potentiel conditionnant est appliqué, de 65 mV d'amplitude et 13 ms de durée, valeurs légèrement supérieures à celles obtenus pour le pic du courant entrant. La membrane est ensuite amenée à un deuxième niveau de potentiel variable dans une gamme comprise ici entre + 80 et + 105 mV (Fig. 35). Le courant de queue est entrant pour $V_2 = + 81$ ou $+ 93$ mV. Il s'annule pour $V_2 = + 97$ mV et devient

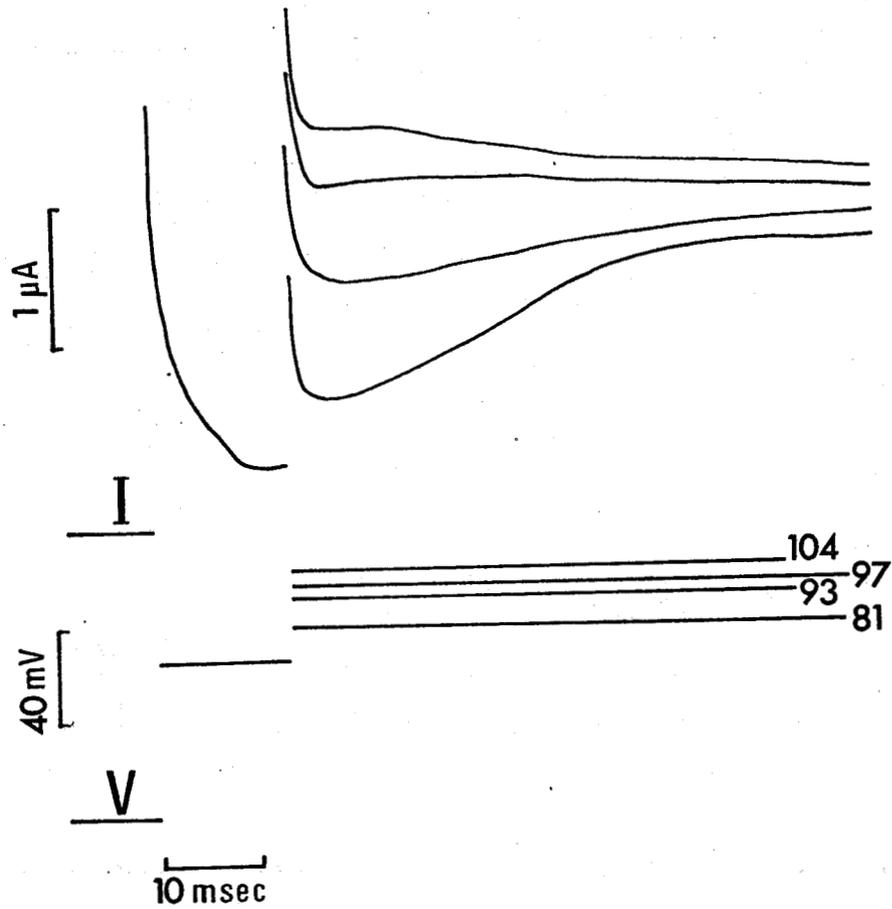


Figure 35 : Détermination du potentiel d'équilibre calcique en milieu TEA (20 mM).

L'impulsion conditionnante a une amplitude de 65 mV et une durée de 13 ms. La seconde impulsion est d'amplitude variable (valeurs indiquées sur les enregistrements).

Fibre 573 .

sortant pour $V_2 = + 104$ mV. Il est intéressant de constater que sur le tracé de la figure 31 B, le courant initial apparaît légèrement sortant pour un potentiel imposé de + 107 mV.

4°) Conclusion

Ainsi, dans différentes conditions expérimentales, le potentiel d'inversion du courant calcique apparaît situé à E_m voisin de + 35 mV. Cette valeur est, comme nous l'avons expliqué, trop basse pour pouvoir représenter réellement le potentiel d'équilibre des ions Ca^{++} . Nous proposerons dans la discussion générale une interprétation possible de ce résultat.

II - Analyse de la conductance calcique selon le modèle d'HODGKIN-HUXLEY

L'étude de la conductance calcique peut être effectuée à partir des mesures du courant calcique net puisque :

$$I_{Ca} = g_{Ca} (E_m - E_{Ca}) \quad \text{ou} \quad I_{Ca} = g_{Ca} (V - V_{Ca})$$

avec

I_{Ca} : courant entrant maximum mesuré pour un potentiel imposé V amenant la membrane à un niveau E_m .

V_{Ca} : potentiel d'inversion correspondant au potentiel d'équilibre des ions Ca (E_{Ca}) selon $V_{Ca} = E_{Ca} - \frac{E_R}{R}$.

Le terme g_{Ca} peut être décrit comme le produit de la conductance calcique maximale \bar{g}_{Ca} caractérisant le canal calcique et des variables sans dimension, variant de 0 à 1, dépendantes du potentiel et du temps, et caractérisant l'activation et l'inactivation. Soit :

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot d^x \cdot f$$

La variable d est la variable d'activation qui, pour la conductance calcique, correspond à la variable m proposée par HODGKIN et HUXLEY pour la conductance sodique. La variable f est la variable d'inactivation de la conductance calcique, équivalente à la variable h du système sodique. Les variables que nous pouvons déterminer expérimentalement sont d_{∞} et f_{∞} correspondant à un état stable et liées respectivement à d et f par les équations :

$$d = d_0 + (d_{\infty} - d_0) (1 - e^{-t/\tau_d})$$

$$f = f_0 + (f_{\infty} - f_0) (1 - e^{-t/\tau_f})$$

(voir explications dans le chapitre "Historique").

Nous allons donc aborder maintenant la détermination des différents paramètres permettant de calculer g_{Ca} .

1°) Activation calcique : dépendance vis à vis du potentiel

L'étude de l'activation du courant calcique

a été réalisée en solution ASW + TEA (20 mM) puisque, comme nous l'avons montré, le TEA permet l'enregistrement d'un courant initial calcique relativement pur.

Les enregistrements des figures 31 et 32 montrent nettement que, pour chaque potentiel imposé, une étude de l'activation du courant calcique au cours du temps serait très imprécise. Nous avons donc volontairement limité ce paragraphe à l'examen de la dépendance de l'activation calcique en fonction du potentiel imposé.

Lorsque le potentiel imposé est annulé au moment où le courant calcique est maximal, le courant de queue enregistré au niveau $HP = E_R$ est maximal. L'amplitude de ce courant de queue dépend du potentiel imposé. Elle est d'autant plus grande que la dépolarisation imposée est plus élevée. Pour des potentiels imposés supérieurs à + 60 mV environ, l'amplitude du courant de queue reste identique et fixée à sa valeur maximale. L'analyse semi-logarithmique des courants de queue enregistrés pour les différents potentiels imposés présentés précédemment (voir Fig. 32) est représenté par le graphique de la figure 36. L'extrapolation au temps $t = 0$ correspondant à la rupture du potentiel imposé permet de déterminer les amplitudes maximales du courant de queue en fonction des potentiels imposés. Le report de ces différentes amplitudes en fonction de V (Fig. 37) traduit l'évolution de la variable d'activation d_{∞} . Pour les amplitudes maximales de I , d_{∞} est par convention

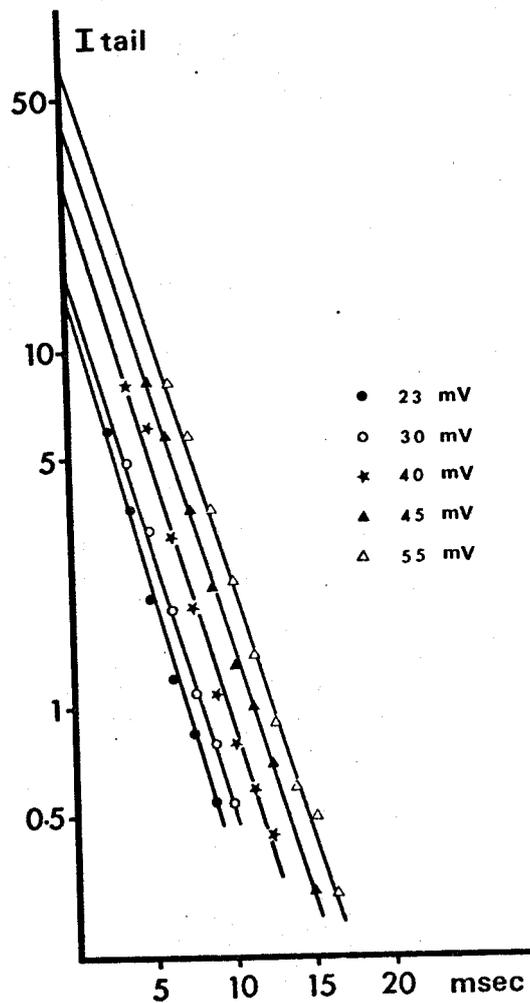


Figure 36 : Analyse semi-logarithmique de l'amplitude des courants de queue au cours du temps, enregistrés au niveau $HP = E_R$, après des impulsions de différentes amplitudes interrompues au moment du maximum d'activation.

Fibre 7275 (voir Fig. 32).

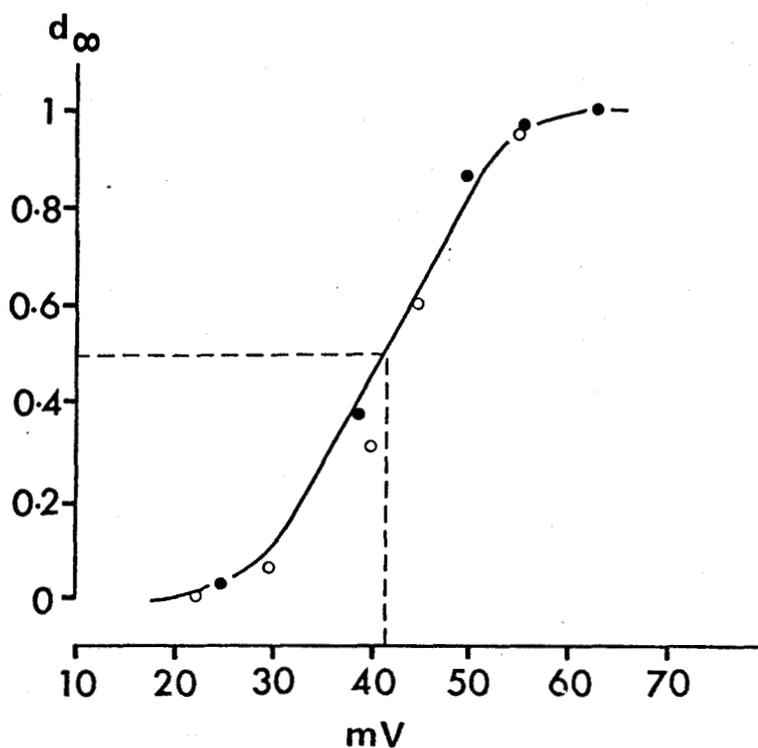


Figure 37 : Evolution de la variable d'activation d_∞ du courant calcique en fonction du potentiel imposé. Report des amplitudes des courants de queue au maximum d'activation.

Les deux types de symboles indiquent des résultats obtenus sur deux fibres différentes - Cercles : mesures obtenues sur la fibre 7275.

La courbe est tracée d'après l'équation

$$d_\infty = 1 + 1 + \exp \left[(V_H - V) / k \right]$$

avec $V_H = 42$ mV et $k = 6$



égale à 1. Cette variable est nulle pour toute dépolarisation imposée inférieure à + 20 mV. La valeur de demi-activation correspond à une dépolarisation membranaire de 42 mV. La courbe tracée à la figure 37 est déterminée par l'équation $d_{\infty} = 1/1 + \exp [(V_H - V)/k]$ dans laquelle $V_H = 42$ mV et $k = 6$.

2°) Inactivation calcique

En solution ASW, pour de faibles dépolarisations imposées, ou en milieu TEA, lorsque le courant sortant retardé n'est que peu ou pas activé (voir précédemment et chapitre V), le courant entrant développé diminue après avoir atteint son maximum d'amplitude, laissant supposer l'existence d'une inactivation calcique. Nous développerons particulièrement l'étude de cette inactivation et notamment sa dépendance vis à vis du temps, ce phénomène étant en effet actuellement très controversé pour les fibres musculaires de Crustacés (KEYNES et coll., 1973 ; HAGIWARA et coll., 1974).

Comme nous l'avons déjà signalé, ces expériences sont effectuées en solution ASW + TEA afin de supprimer les courants sortants qu'il s'agisse de la composante sortante du courant initial ou du courant retardé.

a) Dépendance de l'inactivation calcique vis à vis du temps

La constante de temps d'inactivation du courant

calcique est déterminée selon le protocole expérimental suivant : pour chaque potentiel, l'amplitude du courant de queue est mesurée quand la membrane est repolarisée au niveau de repos ($HP = E_R$) après une impulsion de durée variable. La figure 38 A présente les enregistrements obtenus pour un potentiel imposé de + 40 mV pour trois durées différentes. Les courants de queue sont entrant et leur amplitude au moment de la repolarisation est d'autant plus faible que l'impulsion a été plus durable. L'expérience complète comprend six impulsions de + 40 mV de durées comprises entre 15 et 65 ms. L'analyse semi-logarithmique du courant de queue enregistré à la fin de chaque impulsion en fonction du temps est illustrée à la figure 38 B. Les courbes obtenues sont des droites mettant en évidence une désactivation exponentielle du courant calcique. Le fait que les droites obtenues soient parallèles montre que la constante de temps de désactivation de 9 ms dans cette expérience est indépendante de la durée de l'impulsion. Elle varie de 9 à 10 ms sur d'autres fibres. L'extrapolation de ces droites au temps $t = 0$ donne l'amplitude I_0 du courant de queue au moment de l'interruption de l'impulsion appliquée. Cette amplitude I_0 apparaît d'autant plus faible que la durée de l'impulsion est plus grande. Le report des différences valeurs de I_0 en fonction de la durée de l'impulsion (Fig. 38 C) permet de mesurer la

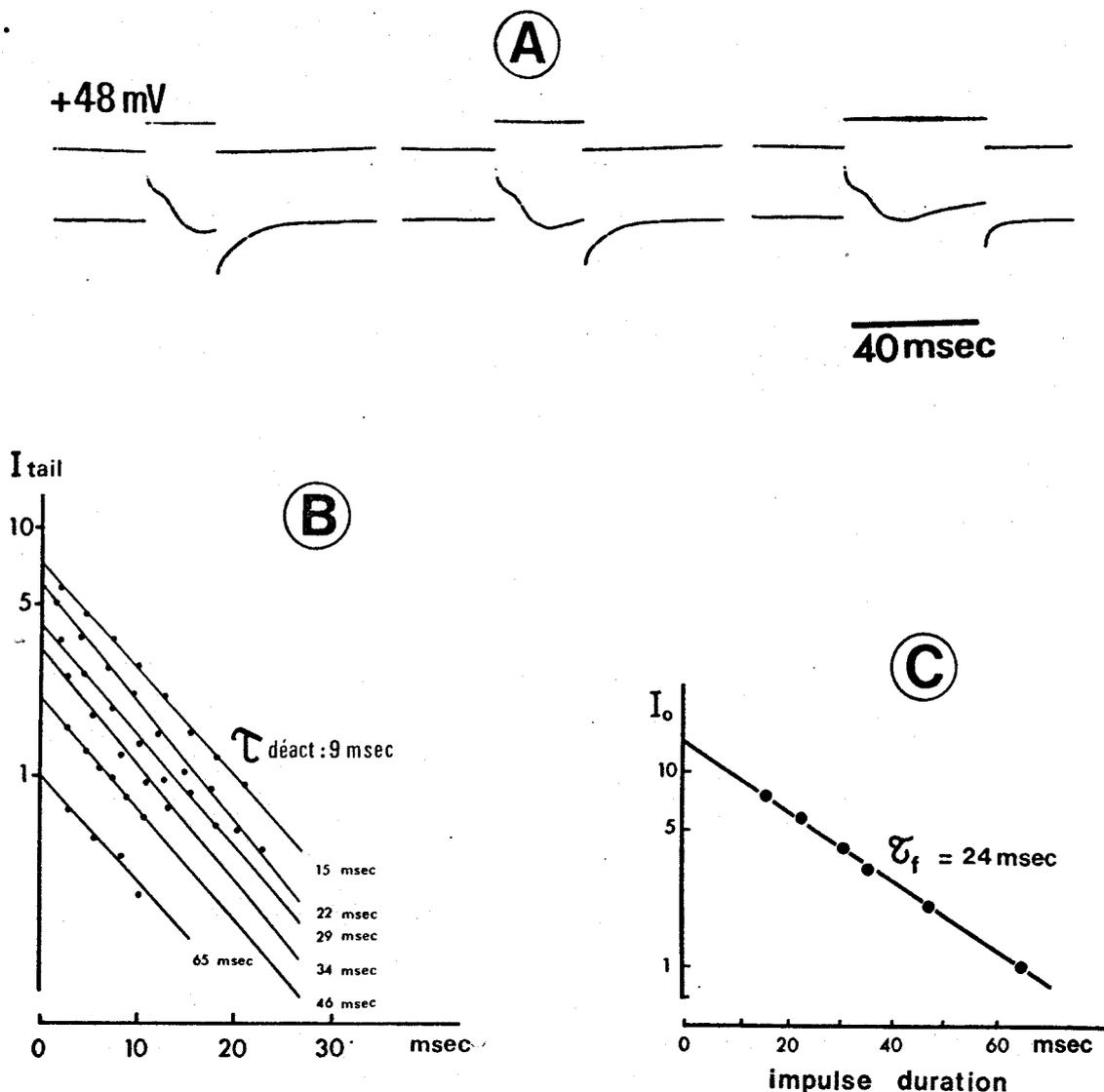


Figure 38 : Dépendance de l'inactivation calcique vis-à-vis du temps.

- A - Enregistrements du courant calcique pour un potentiel de 48 mV et de durée variable.
- B - Analyse semi-logarithmique du déroulement des courants de queue enregistr es à la fin des impulsions de 48 mV. La durée de chaque impulsion est portée à l'extr emite des droites obtenues.
- C - Détermination de la constante de temps d'inactivation pour $V = +48$ mV par report des amplitudes maximales des courants de queue I_0 (correspondant à $t = 0$ du retour à E_R) en fonction de la durée de l'impulsion.
- Fibre 1609 (voir Fig. 31).

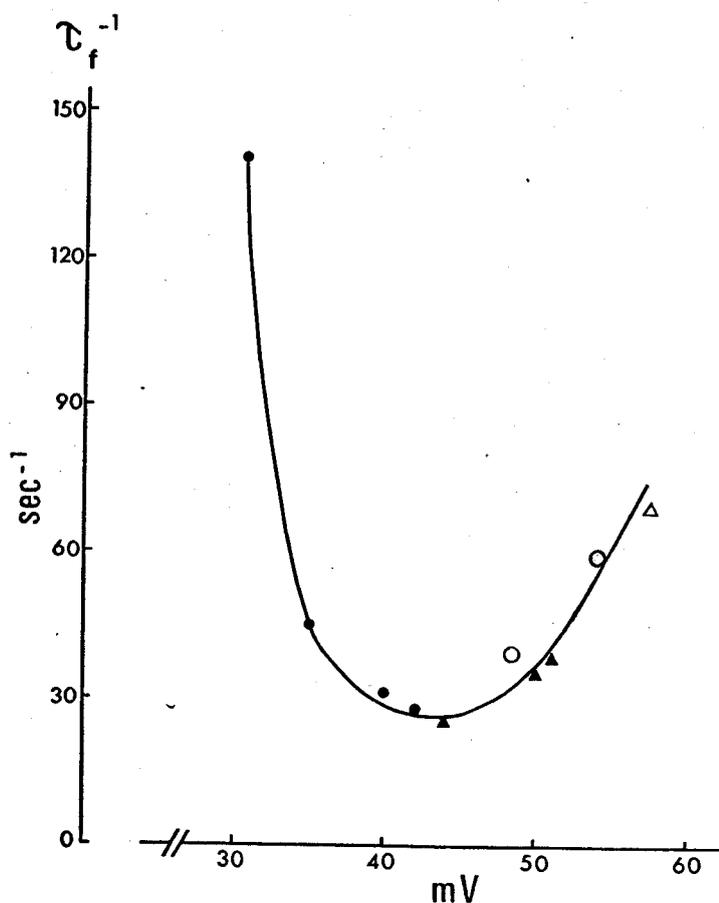


Figure 39 : Relation entre les vitesses d'inactivation mesurées en solution TEA et la valeur du potentiel imposé. Les différents symboles indiquent des résultats obtenus sur différentes fibres.

Cercles : résultats obtenus sur la fibre 1609 (voir Fig. 31).

Triangle évidé : mesure obtenue en milieu hyperpotassique. (voir Fig. 45 chapitre IV).

constante d'inactivation du courant entrant pour le potentiel imposé de + 48 mV. L'utilisation de coordonnées semi-logarithmiques montre que la relation linéaire obtenue traduit une inactivation suivant une loi exponentielle. La constante de temps est ici de 24 ms.

La même technique est répétée pour différentes valeurs du potentiel imposé. Les inverses des différentes valeurs des constantes de temps d'inactivation τ_f^{-1} obtenus pour différents potentiels imposés sont reportés sur la figure 39 pour 3 fibres, compte-tenu de la difficulté déjà signalée de pouvoir obtenir un grand nombre d'enregistrements sur une même fibre. La constante de temps d'inactivation est maximale pour un potentiel imposé voisin de + 42 mV.

b) Dépendance de l'inactivation calcique vis à vis du potentiel

Les expériences décrites ici ont pour but de montrer l'influence du potentiel de membrane initial sur la disponibilité de la conductance calcique.

Une dépolarisation test est imposée à la membrane et permet d'observer un courant entrant calcique maximum ou voisin de sa valeur maximale. Cette dépolarisation est précédée d'un prépotentiel de longue durée (80 à 100 ms), d'amplitude et de sens variables.

L'expérience est réalisée en solution ASW sur des fibres dont le courant initial ne comprend qu'une composante entrante (type I).

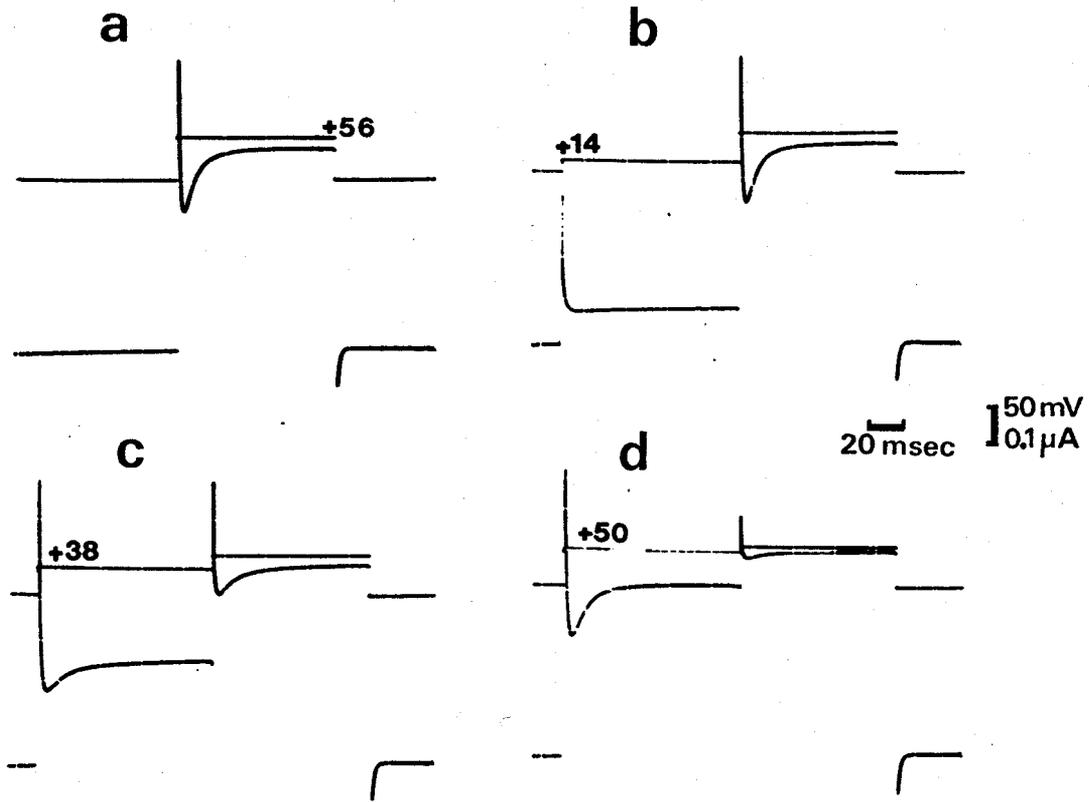


Figure 40 : Variations de l'amplitude du courant entrant en fonction du potentiel de membrane, en solution ASW pour une fibre de type I.

L'impulsion test a une amplitude de 56 mV (a). L'impulsion conditionnante a une durée de 85 ms et une amplitude variable à partir de $HP = E_R$ indiquée sur les tracés (b, c, d).

Fibre 307.

Les enregistrements de la figure 40 montrent l'influence du prépotentiel sur l'amplitude du courant initial.

Le courant initial est maximal pour une impulsion test de + 56 mV (enregistrement a). Un prépotentiel de + 14 mV ne modifie pas l'amplitude de ce courant (enregistrement b) mais des impulsions conditionnantes supérieures à + 15 ou + 20 mV provoquent sa diminution (enregistrement c et d). Le courant ne peut plus être activé lorsque le prépotentiel est supérieur à + 55 mV. Des préhyperpolarisations ne modifient pas l'amplitude du courant.

Le courant entrant $I_{(V)}$ produit par l'impulsion test lorsque celle-ci est précédée d'un prépotentiel est mesuré par rapport au courant final extrapolé en début d'impulsion puis comparé au courant $I_{(V=0)}$ obtenu dans les conditions de polarisation membranaire normale, c'est-à-dire lorsque le prépotentiel est nul et que $HP = E_R$. Le rapport de l'amplitude $I_{(V)}/I_{(V=0)}$ permet d'établir la courbe de disponibilité de ce courant en fonction de la polarisation membranaire (Fig. 41). Une courbe identique est obtenue lorsque l'impulsion test est de + 50 ou + 63 mV. Cette courbe représente l'évolution de la variable d'inactivation f_{∞} en fonction du potentiel. Par convention f_{∞} est égale à 1 lorsque la membrane peut produire un courant entrant calcique d'amplitude maximale tandis que f_{∞} est nulle lorsque

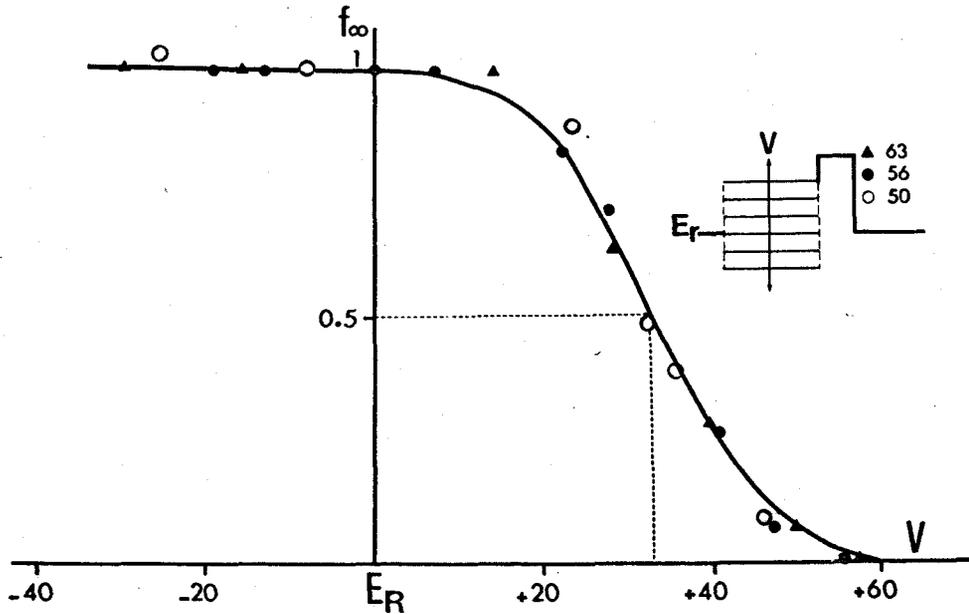


Figure 41 : Courbe de disponibilité du courant entrant en fonction du potentiel de membrane établie sur la fibre dont certains enregistrements sont présentés à la figure 40. (Les valeurs portées en abscisse sont les valeurs des potentiels imposés à partir de $HP = E_R$). Remarquer que la courbe est identique, quelle que soit l'impulsion test. La valeur de demi-inactivation est obtenue pour une dépolarisation imposée de 33 mV.

La courbe est tracée à partir de l'équation théorique :

$$f_{\infty} = 1 / 1 + \exp [(V_H - V) / k] \text{ définie dans le texte.}$$

ce même courant ne peut se développer.

La demi-inactivation se produit dans cette expérience pour une dépolarisation de 33 mV et se situe pour 5 autres fibres entre 30 et 33 mV. La courbe passant à travers les points expérimentaux coïncide avec celle répondant à l'équation

$$f_{\infty} = 1 / 1 + \exp \left[(V_H - V) / k \right]$$

où V_H représente le potentiel imposé correspondant à la demi-inactivation soit $V_H = + 33$ mV

V est le potentiel imposé

k est appelé paramètre de forme et déterminé égal à $- 7$ mV, ce qui permet d'obtenir la meilleure concordance entre les valeurs calculées et expérimentales. La même équation avec le coefficient $k = - 7$ a été utilisée par HODGKIN et HUXLEY (1952 c) pour rendre compte des résultats expérimentaux obtenus sur l'axone de calmar.

En présence de TEA, une courbe identique est obtenue ; les potentiels de demi-inactivation sont compris entre $+ 33$ et $+ 42$ mV sur 6 fibres.

L'étude de l'inactivation de la composante entrante du courant initial composite des fibres de type II sera abordée dans le chapitre suivant consacré à l'analyse du courant de rebond. Nous verrons en effet que cette étude constitue un élément intéressant de

preuve de l'existence d'un courant ionique sortant simultanément au courant entrant.

Enfin, le processus théorique d'inactivation envisagé par HODGKIN et HUXLEY est tel que, pour le potentiel de demi-inactivation, la constante de vitesse τ_f^{-1} doit être minimale. En effet, $f_\infty = \frac{\alpha_f}{\alpha_f + \beta_f}$ est égal à 0,5 quand $\alpha_f = \beta_f \cdot \tau_f^{-1}$ qui est égal à $\alpha_f + \beta_f$ est alors minimum.

Nous avons vu que la valeur minimale de τ_f^{-1} correspondait à un potentiel imposé voisin de + 42 mV, ce qui concorde assez correctement avec l'ensemble de nos mesures du potentiel de demi-inactivation.

3°) Conductance calcique

Connaissant maintenant la nature ionique du transporteur du courant entrant et ayant mesuré ses paramètres d'inactivation f_∞ et τ_f et la variable d'activation d_∞ , il devient possible de calculer la variation théorique de la conductance calcique pour un potentiel donné et de la comparer à la variation expérimentale. Cette étude nous obligera à prendre une valeur approximative pour la constante de vitesse d'activation.

Au préalable, il est nécessaire de mesurer la valeur maximale de la conductance calcique en fonction du potentiel imposé.

a) Conductance calcique maximale \bar{g}_{Ca}

Nos résultats précédents nous ont permis de préciser qu'il est possible i) en milieu TEA, d'enregistrer un courant initial ne comprenant que le courant calcique.

ii) en milieu TEA-Mn, de mesurer la valeur du courant de fuite en fonction du potentiel.

Pour la fibre dont la caractéristique courant-potentiel a été présentée à la figure 34, nous avons mesuré les valeurs du courant calcique net et calculé la conductance calcique correspondant à chaque valeur de potentiel. La courbe a de la figure 42 rend compte de la variation de g_{Ca} en fonction de V imposé à la membrane. La conductance calcique est activée pour un potentiel $V = + 20$ mV, plus faible pour cette fibre que pour la plupart de nos expériences où $V = + 30$ mV (voir courbe b). La conductance croît ensuite jusqu'à un potentiel imposé de $+ 70$ mV. KEYNES et coll. (1973) obtiennent un résultat comparable sur la fibre de barnacle. La valeur maximale de la conductance calcique pour cette fibre est de $21 \mu\text{mho}$ ce qui correspond à une conductance spécifique de $21 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ puisque la surface de la portion de membrane dans le compartiment test a été estimée égale en moyenne à 10^{-3} cm^2 . KEYNES et coll. mesurent une conductance de 4 mmho dans leurs conditions expérimentales pour une surface de fibre de $0,26 \text{ cm}^2$, ce qui correspon-

drait à une g_{Ca} égale à 15 mmho/cm^2 , valeur proche de celles que nous avons calculées. Toutefois, ces auteurs proposent de retenir une surface effective très supérieure pour calculer la conductance spécifique mais nos résultats ne nous permettent pas d'effectuer une telle évaluation, conditionnée au moins par la détermination précise des systèmes membranaires sièges de la g_{Ca} .

La courbe b de la figure 42 présente également l'évolution de la conductance calcique en fonction du potentiel pour la fibre dont les enregistrements et la caractéristique courant potentiel sont illustrés à la figure 31. Dans ce cas, nous ne disposons pas d'enregistrements en solution TEA-Mn pour mesurer précisément le courant de fuite, et de ce fait, nous avons considéré sa variation linéaire en fonction du potentiel imposé. Nous pouvons constater que cette approximation introduit une différence dans le décours de g_{Ca} en fonction de V par rapport à la courbe a, dans la zone des potentiels imposés compris entre + 60 et 100 mV alors que pour des potentiels inférieurs les deux courbes sont parallèles. En outre, cette approximation conduit vraisemblablement à une légère sous-estimation du maximum de g_{Ca} . En effet, dans le cas b, nous pouvons concevoir qu'une sous-estimation du courant calcique net a été effectuée, puisque le courant de fuite présente une légère rectification retardée dont nous n'avons pu tenir compte. Il est à noter enfin que les deux courbes ne peuvent être

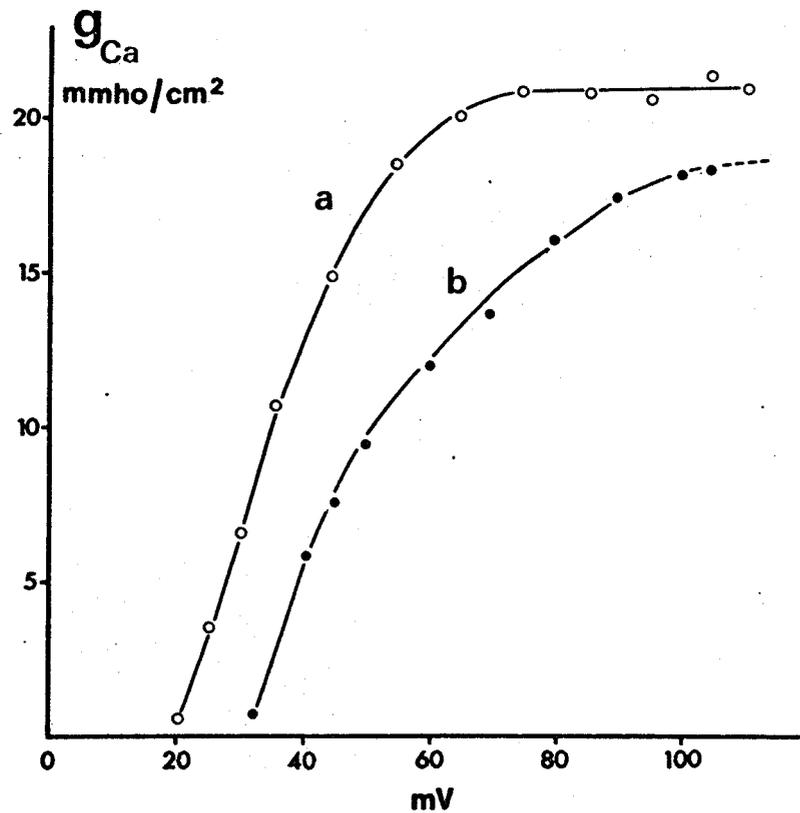


Figure 42 : Variations de la conductance calcique en fonction du potentiel de membrane.

Courbe a : d'après les mesures obtenues sur la fibre 1503 (voir Fig. 34)

Courbe b : d'après les mesures obtenues sur la fibre 1609 (voir Fig. 31)

Le maximum de conductance est obtenu pour un potentiel imposé compris entre + 80 et + 100 mV.

superposées puisque, comme nous l'avons signalé, l'activation calcique se produit pour la fibre décrite par la courbe a pour un potentiel imposé de + 20 mV alors qu'elle survient plus généralement (cas de la courbe b) pour un potentiel de + 30 mV. Cette légère différence ne modifie en rien l'évolution similaire de g_{Ca} pour ces 2 fibres lorsque le potentiel imposé est faible.

En réalité, pour cette fibre (b), la variation de g_{Ca} en fonction de V ne constitue pas en elle-même un résultat important mais nous avons voulu déterminer au moins approximativement la valeur de la conductance calcique maximale. Nous la considérerons ici égale à 19 mmho/cm^2 . Ce résultat nous sera nécessaire pour reconstruire la variation théorique de g_{Ca} au cours du temps à un potentiel donné. En effet, sur cette fibre, nous disposons de valeurs concernant l'inactivation calcique, s'intégrant avec une bonne concordance à l'ensemble de nos mesures.

b) Evolution de g_{Ca} au cours du temps pour un potentiel donné

Nous avons vu, que, dans le cadre de la théorie d'HODGKIN et HUXLEY, la conductance calcique g_{Ca} peut être évaluée à chaque instant en connaissant la conductance maximale du canal calcique \bar{g}_{Ca} ainsi que les paramètres d'activation et d'inactivation. En effet :

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot d^x \cdot f$$

avec :

$$d = d_0 + (d_\infty - d_0) (1 - e^{-t/\tau_d})$$

$$f = f_0 + (f_\infty - f_0) (1 - e^{-t/\tau_f})$$

Nous avons vu pour la fibre musculaire de crabe qu'au potentiel de repos nous avons :

$$d_0 = 0$$

$$f_0 = 1$$

Les valeurs de d_∞ , τ_d , f_∞ , τ_f dépendent du potentiel de membrane.

Nous avons effectué l'étude de la variation de g_{Ca} au cours du temps pour un potentiel imposé de + 45 mV enregistré sur la fibre pour laquelle certains résultats sont présentés à la figure 31. Cette valeur de potentiel est choisie parce que nous pouvons déterminer d'après nos différents résultats la plupart des paramètres avec un minimum d'erreurs.

Les paramètres déterminés graphiquement sont les suivants :

$$\bar{g}_{Ca} = 19 \text{ mmho/cm}^2$$

$$d_\infty = 0,7$$

$$f_\infty = 0,27$$

$$\tau_f = 30 \text{ ms}$$

La constante de temps d'activation sera prise égale à 3,5 ms.

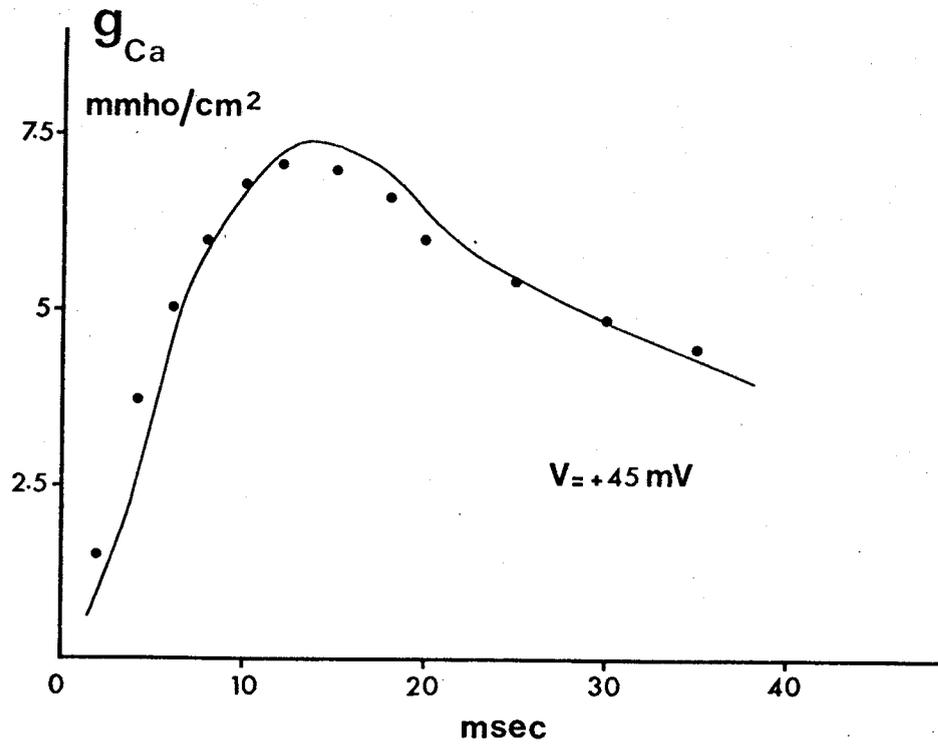


Figure 43 : Evolution de la conductance calcique au cours du temps pour un potentiel imposé de + 45 mV (Fibre 1609). La courbe traduit la variation de g_{Ca} d'après l'enregistrement du courant sachant que :

$$g_{Ca} = \frac{I_{Ca}}{V - V_{Ca}}$$

Les points correspondent aux valeurs calculées de g_{Ca} d'après la relation :

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot d^2 \cdot f \quad (\text{voir texte}).$$



La meilleure concordance entre les résultats théorique et expérimental est obtenue en utilisant la relation :

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot d^2 \cdot f \text{ comme le montre la figure 43.}$$

Il faut remarquer que pour la fibre musculaire de grenouille une concordance satisfaisante ne peut être obtenue qu'en utilisant une puissance 3 pour la variable d'activation. Il est bien évident que, compte-tenu de notre méthode non systématique d'analyse des paramètres, le seul intérêt du résultat obtenu est de confirmer nos remarques faites antérieurement et relatives au retard survenant pour certaines fibres dans l'apparition du courant calcique en milieu TEA. Des enregistrements comparables sont d'ailleurs présentés par HAGIWARA et coll. (1974, leur figure 3).

D - CONCLUSION

Ce chapitre a été consacré à l'étude de la composante entrante du courant initial. Les ions Ca^{++} sont les transporteurs de ce courant entrant et peuvent être remplacés par les ions Sr^{++} . La voie de passage de ces ions apparaît être un canal de cinétique lente puisque la TTX est sans effet tandis que les ions Mn^{++} inhibent le courant initial.

En outre, nous avons pu constater que l'influence des ions Mn^{++} ne se limite pas à la seule suppression du courant entrant. Ces ions agissent également en inhibant la composante sortante du courant initial et en diminuant le courant sortant tardif qui sont, comme nous le verrons, des courants potassiques. Ce résultat, diffère de celui obtenu par TAKEDA (1967) sur la fibre musculaire d'écrevisse et par BAKER et coll. (1973) sur l'axone de seiche selon lesquels les ions Mn^{++} n'influenceraient que la conductance calcique. Par contre, CHIARANDINI et STEFANI (1973) supposent pour la fibre musculaire de grenouille une diminution de g_K due aux ions Mn^{++} qui peut être rapprochée des effets que nous avons observés.

Compte-tenu des différents courants ioniques mis en jeu au cours de l'activité électrique et compte-tenu tout particulièrement de l'existence d'une composante sortante dans le courant initial, l'étude du courant entrant calcique ne peut être menée qu'à

condition d'avoir supprimé les autres courants ioniques. Ceci est réalisable en présence de TEA.

Nous avons précisé les caractéristiques de ce courant. L'activation et l'inactivation calcique apparaissent dépendantes du potentiel et du temps et s'inscrivent dans le principe d'indépendance prévu par HODGKIN et HUXLEY puisque la courbe de f_{∞} reste identique quelle que soit l'impulsion test (voir Fig. 41). En effet, cette courbe aurait dû être déplacée dans le sens des dépolarisations ou des hyperpolarisations en fonction de l'amplitude de l'impulsion test si l'inactivation avait été couplée même partiellement à l'activation (HOYT et ADELMAN, 1970).

Enfin, un point intéressant par rapport à notre but d'analyser l'activité électrique graduée et variable des fibres de Crustacés se situe dans nos résultats relatifs à l'inactivation du courant calcique. La courbe de disponibilité de I_{Ca} en fonction du potentiel établie ici pour des fibres de type I présente un décours classique. Nous allons voir, dans le prochain chapitre, comment cette relation évolue pour des fibres de type II.

En outre, nous avons mis en évidence l'existence d'une inactivation dépendante du temps. Ce processus est supposé inexistant pour les fibres musculaires de barnacle d'après les travaux de KEYNES et coll. (1973). Ces auteurs admettent que l'inactivation n'est qu'apparente et que la cause réelle réside dans une variation

du potentiel imposé au niveau de certaines zones membranaires. Bien que cette hypothèse puisse être étayée par la complexité ultrastructurale des fibres, il ne nous apparaît pas possible, d'après nos enregistrements et nos différents contrôles relatifs à notre technique, d'admettre une interprétation analogue pour la fibre musculaire de crabe. Nous reviendrons dans la discussion générale sur ce phénomène de diminution du courant entrant faisant actuellement l'objet d'interprétations divergentes.

- CHAPITRE IV -

ETUDE DE LA COMPOSANTE
SORTANTE DU COURANT INITIAL

A - RAPPEL DES RESULTATS PRECEDENTS RELATIFS A I_{K1}

- I - Contrôle du potentiel imposé
- II - Observation des tracés de courant en solution ASW
- III - Influence de la concentration calcique externe
- IV - Influence du TEA

B - ARGUMENTS COMPLEMENTAIRES

- I - Etude du courant de fuite
- II - Cas de fibres présentant un courant initial ne comprenant que la composante sortante
- III - Observation des courbes courant - potentiel imposé
- IV - Conclusion

C - NATURE IONIQUE DE LA COMPOSANTE SORTANTE DU COURANT INITIAL :

Variations de la concentration potassique externe

- I - Milieu enrichi en K^+
- II - Milieu appauvri en K^+
- III - Conclusion

D - CARACTERISTIQUES DE I_{K_1}

I - Potentiel d'inversion

1°) Protocole expérimental et résultats

2°) Conclusion

II - Inactivation du courant I_{K_1} : dépendance vis à vis du potentiel

1°) Objet de cette expérimentation

2°) Résultats

3°) Discussion de ces résultats

III - Inactivation du courant I_{K_1} établie sur une fibre ne présentant pas de composante entrante.

1°) Résultats

2°) Conclusion

IV - Dépendance du courant I_{K_1} vis à vis du courant calcique

1°) Impossibilité d'enregistrer I_{K_1} en l'absence de I_{Ca} .

2°) Récupération de l'activabilité du courant initial après inactivation.

E - CONCLUSION

Les enregistrements obtenus en solution ASW lors de l'application de dépolarisations ont montré que, pour certaines fibres, le courant initial présente un décours complexe. Un rebond apparaît immédiatement après le courant entrant calcique. Ce chapitre a pour but d'étudier particulièrement le rebond observé et de montrer qu'il est assimilable à un courant sortant potassique dont nous précisons quelques caractéristiques.

Afin de simplifier l'exposé de nos résultats et de façon à distinguer ce courant du courant sortant retardé, la nomenclature suivante a été adoptée :

- I_{K1} est le courant sortant responsable du rebond dans le courant initial.
- I_{K2} sera le courant sortant retardé observé après le courant initial et que nous étudierons dans le chapitre suivant.

Avant d'aborder l'analyse de I_{K1} , nous allons effectuer un rappel des quelques données relatives à ce courant et acquises d'après les différents résultats présentés dans les chapitres précédents.

A - RAPPEL DES RESULTATS PRECEDENTS RELATIFS A I_{K1}

I - Contrôle du potentiel imposé

Dans les conditions de potentiel imposé, le contrôle par une microélectrode du potentiel intracellulaire (voir Fig. 17) ne présente pas d'irrégularité de tracé, laissant supposer que le rebond n'est pas une oscillation consécutive au courant entrant. En outre, le rebond apparaît même si le courant entrant n'est pas de grande amplitude (comparer les enregistrements des figures 22 A' et 23).

II - Comportement différent des fibres étudiées.

Classification des fibres en deux types.

1°) Observation des tracés de courant en solution ASW

Nous avons montré qu'il était possible de classer les réponses des fibres étudiées en deux catégories se différenciant par l'existence d'un rebond au moment de l'inactivation de la composante entrante dans le courant initial.

Ce rebond se produit toujours lorsque la phase de repolarisation du potentiel enregistré en courant imposé est aussi rapide ou même plus rapide que la phase de dépolarisation.



De plus, le potentiel d'inversion de la composante entrante des fibres de type II est toujours nettement plus faible que celui des fibres de type I.

Enfin, pour les fibres de type II, le courant sortant retardé et le courant de queue observés lors de la repolarisation à E_R sont plus faibles que ceux enregistrés pour les fibres de type I.

2°) Influence de la concentration calcique externe

Nous avons pu constater que l'augmentation de $[Ca]_e$ produisait de plus fortes variations des amplitudes de l'activité électrique et du courant entrant lorsque les fibres présentaient un courant initial sans rebond c'est-à-dire ne comprenant que la composante entrante.

III - Influence du TEA

Lorsque les fibres présentent un rebond en solution ASW, l'application de TEA provoque la suppression de celui-ci et le développement simultané d'un grand courant entrant calcique (voir Fig. 31 et 32). Le potentiel d'inversion de I_{Ca} est alors déplacé d'environ 30 mV. De plus, l'inactivation du courant entrant devient exponentielle.

B - ARGUMENTS COMPLEMENTAIRES

I - Etude du courant de fuite

Le courant de fuite, mesuré pour de faibles dépolarisations et hyperpolarisations imposées est toujours plus ample pour les fibres présentant un rebond. Les résultats établis sur 5 fibres de chaque type sont traduits par les 2 courbes de la figure 44. La conductance de repos apparaît en moyenne pratiquement double pour les fibres de type II.

II - Cas de fibres présentant un courant initial ne comprenant que la composante sortante

Lors de deux expériences, nous avons pu enregistrer un courant initial sans composante entrante apparente. Seul, le rebond peut être observé (voir Fig. 50). Ce type d'enregistrement, bien qu'exceptionnel, étaye les différents arguments nous ayant déjà permis d'éliminer l'hypothèse d'une oscillation consécutive au courant entrant.

III - Observation des courbes courant-potentiel

L'observation des différentes courbes courant-potentiel imposé présentées précédemment et notamment à la figure 22 suggère une remarque intéressante : la "slope conductance" correspondant à la courbe établie pour le courant calcique lorsque les dépolarisations

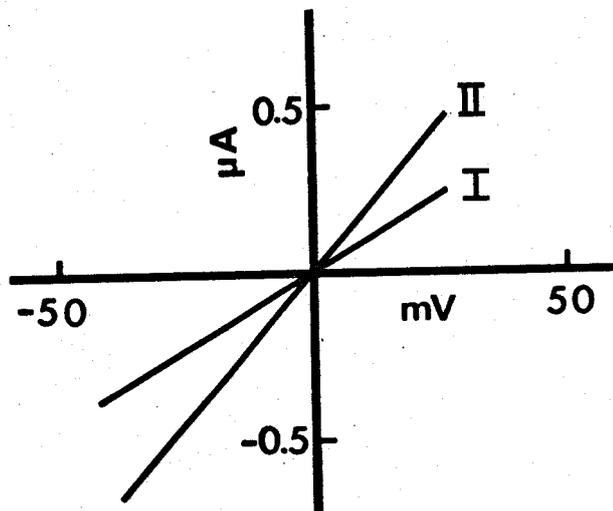


Figure 44 : Relations courant-potentiel pour les fibres de types I et II tracées à partir de mesures des courants ioniques obtenus lors de l'application de potentiels imposés dépolarisants et hyperpolarisants de faible amplitude.

Les droites tracées correspondent aux bissectrices de l'angle formé par les deux droites de régression calculées à partir de l'ensemble de nos mesures.

imposées sont supérieures à + 50 mV est aussi grande que la "slope conductance" correspondant au courant sortant retardé.

Ce résultat laisserait penser qu'il existe une faible sélectivité de la membrane vis à vis des ions Ca^{++} , d'autres ions pouvant emprunter le même canal. Il pourrait s'agir des ions K^+ ou Cl^- entrant. Une telle hypothèse a été émise par GEDULDIG et GRUENER (1970) et ITO et coll. (1970). Cependant, nous avons vu que l'étroite dépendance du potentiel d'inversion du courant entrant vis à vis des ions Ca^{++} en présence de TEA ne nous permet pas d'envisager un mécanisme analogue pour la fibre musculaire de crabe.

IV - Conclusion

Pour les fibres de type II, les différentes caractéristiques telles que : repolarisation rapide de l'activité électrique, faible potentiel d'inversion du courant entrant, conductance de repos plus forte, existence du rebond sur les tracés de courant, sont toujours rencontrées simultanément alors qu'aucune de celles-ci n'a été observée pour les fibres de type I.

Ces diverses notions nous conduisent à supposer une origine ionique pour le rebond enregistré, hypothèse renforcée par l'influence des ions TEA.

Dans ces conditions, le courant calcique pourrait être, pour les fibres de type II, antagonisé

par un courant sortant se produisant presque simultanément. En retenant une telle hypothèse, le premier élément de mise en évidence de ce courant va donc consister à préciser sa nature ionique. Il ne peut s'agir que d'un courant sortant d'ions positifs (K^+) ou d'un courant entrant d'ions négatifs (Cl^-), hypothèse peu vraisemblable compte-tenu du fait que le TEA supprime le rebond enregistré.

C - NATURE IONIQUE DE LA COMPOSANTE SORTANTE DU
COURANT INITIAL

Le TEA étant réputé inhibiteur de la perméabilité potassique, il semble possible dès maintenant d'envisager que le rebond correspond à un courant sortant potassique.

En outre, ce premier résultat peut être confirmé par l'étude de l'évolution du courant initial résultant de la modification de la concentration potassique de la solution ASW.

I. - Milieu enrichi en ions K^+

Une solution riche en potassium ($[K]_e \times 5 = 64.5 \text{ mM}$) est appliquée après la solution ASW. Une dépolarisation très rapide de 38 mV survient. Lors du passage aux conditions de potentiel imposé, HP est ramené à E_R initial. Les courants obtenus lors de l'application d'une dépolarisation de + 57 mV sont illustrés à la figure 45 A. Lorsque la solution $[K]_e = 64,5 \text{ mM}$ est appliquée, le rebond disparaît. Ce résultat est celui attendu pour un courant potassique dont la "driving-force" se trouve réduite de 40 mV (du fait de la nouvelle valeur de E_K). De plus, en considérant que le courant sortant retardé est, pour ce potentiel imposé, encore très faible et essentiellement constitué du

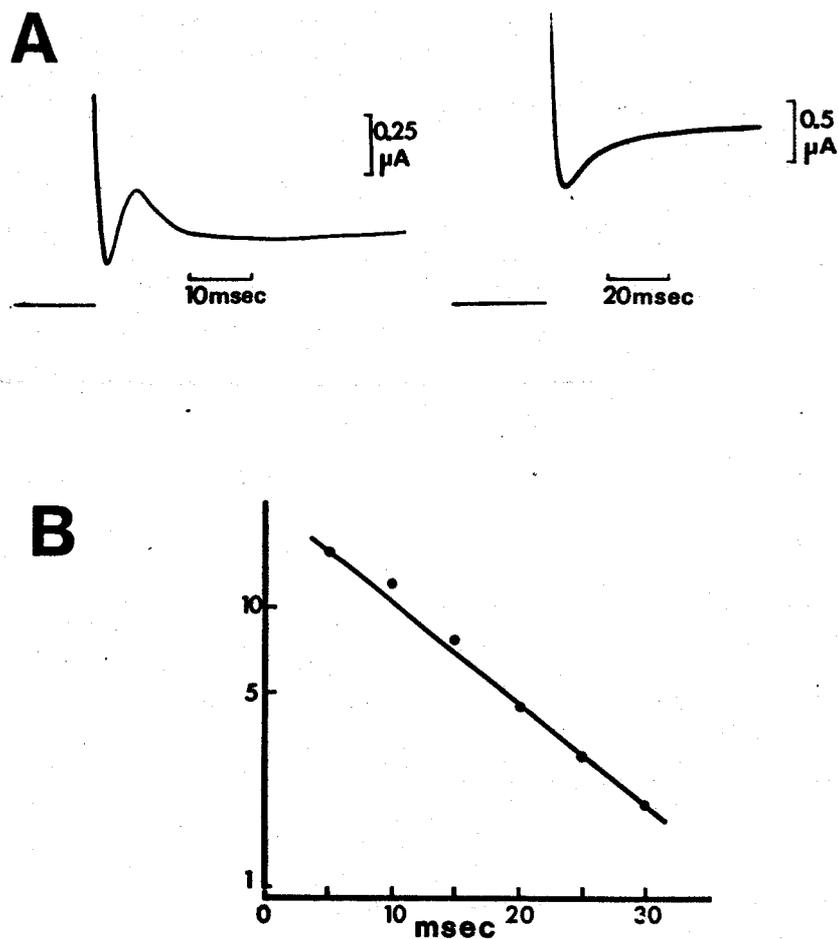


Figure 45 : Influence d'un milieu hyperpotassique : $[K]_e \times 5$

- A - Enregistrements des courants sur une fibre placée successivement en solution ASW (gauche) et en milieu $[K]_e \times 5$ (droite) pour une dépolarisation imposée de 57 mV.
- B - Report semi-logarithmique des amplitudes du courant entrant au moment de l'inactivation. Remarquer que celle-ci s'effectue selon une exponentielle simple dont la constante de temps est égale à 15 ms.

Fibre 104.



courant de fuite, nous pouvons remarquer que le courant entrant est nettement augmenté en milieu riche en potassium et que son inactivation devient pratiquement exponentielle avec une constante de temps de 15 ms (Fig. 45 B). Malheureusement, l'application de cette solution riche en potassium entraîne une forte augmentation du courant de fuite, ce qui ne nous permet pas d'effectuer une étude comparative plus poussée entre les résultats obtenus en solution ASW et (K x 5).

II - Milieu appauvri en ions K⁺

Un milieu contenant 2,6 mM de K⁺ (c'est-à-dire correspondant à la concentration potassique de la solution ASW divisée par 5 : "milieu K/5") est appliqué après la solution ASW.

Dans les conditions de courant imposé, nous constatons que le potentiel de repos demeure pratiquement inchangé, ce qui est conforme à nos résultats antérieurs où nous avons pu mesurer les valeurs absolues du P.R. en solution ASW puis en milieu K/5 (MOUNIER, 1970). Le P.R. moyen de 66,3 mV (s ± 0,3) en solution ASW devient égal à 68 mV (s ± 0,5) sous l'effet du milieu K/5. Le potentiel d'action devient nettement plus ample, atteignant environ 85 mV tandis que son seuil est abaissé (Fig. 46 c) et qu'une activité répétitive se manifeste (Fig. 46 d).

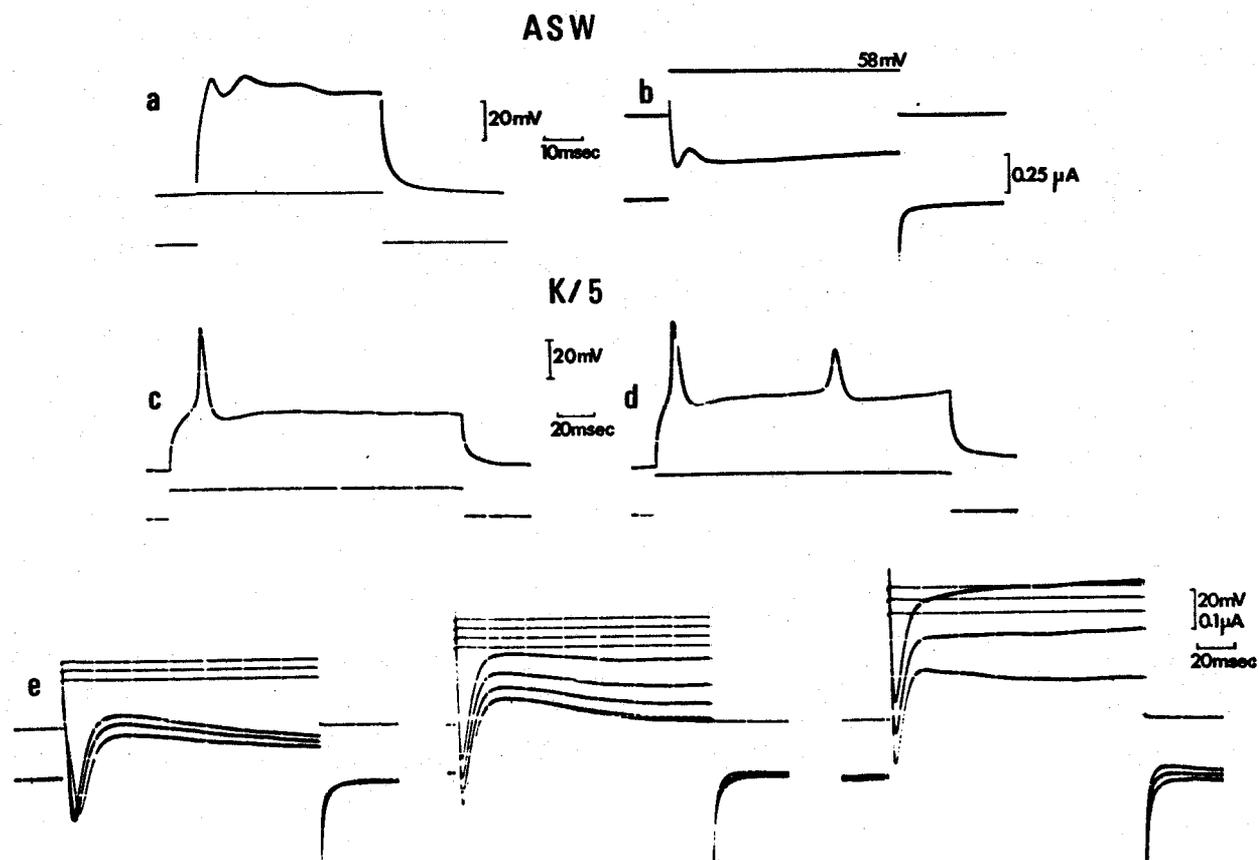


Figure 46 : Influence d'un milieu hypopotassique : $[K]_e / 5$

a et b : Enregistrements de l'activité électrique et d'un courant ionique pour $V = + 58$ mV en solution ASW.

c et d : Activité électrique enregistrée sur la même fibre en milieu hypopotassique.

Noter l'apparition d'une activité répétitive lorsque la stimulation est augmentée (d).

e : Courants ioniques enregistrés en milieu $[K]_e / 5$

Fibre 810

Dans les conditions de potentiel imposé, HP est maintenu à E_R initial. Les courants ioniques enregistrés en solution ASW présentent des caractéristiques identiques à celles que nous avons décrites au chapitre II pour les fibres de type II (Fig. 46 b). L'application du milieu K/5 provoque une augmentation du courant entrant qui devient net entrant. Le seuil d'activation de ce courant survient pour des dépolarisations faibles et le maximum d'amplitude est atteint pour un potentiel imposé voisin de + 27 mV. Simultanément, le courant de fuite est très diminué, le rebond disparaît et le courant retardé n'apparaît sortant que pour un potentiel imposé de + 70 mV (Fig. 46 e).

III - Conclusion

Nous venons de présenter les résultats obtenus dans deux conditions expérimentales conduisant à la suppression du rebond lorsque la concentration potassique externe est modifiée.

Il apparaît primordial de constater que les variations de $[K]_e$ entraînent des changements très nets du rebond. Il est donc possible de considérer ce rebond comme l'image d'un courant potassique que nous appellerons I_{K_1} . Ce courant doit pouvoir être décrit par la relation :

$$I_{K_1} = g_{K_1} (E - E_{K_1})$$

Dans le cas de l'application du milieu hyperpotassique, nous nous sommes placés dans une situation où la "driving-force" ($E - E_{K_1}$) est diminuée puisque E_{K_1} se trouve déplacé de 40 mV par rapport à E_R . Même si la g_K de repos et si la g_{K_1} activée par l'application des dépolarisations sont augmentées, la réduction de ($E - E_{K_1}$) explique la disparition de I_{K_1} . Nous avons alors pu constater que le courant entrant était plus ample et que son inactivation devenait exponentielle. Il faut remarquer que la valeur de la constante de temps mesurée (15 ms pour $V = +57$ mV) s'intègre correctement à l'ensemble des mesures obtenues précédemment en milieu TEA (voir Fig. 39). Deux points expérimentaux correspondant au début de l'inactivation (voir Fig. 45 B) se situent légèrement en dehors de la droite : ceci laisse supposer que la composante sortante du courant initial n'a sans doute pas été totalement supprimée mais est devenue tellement faible que le rebond ne peut plus être décelé sur le tracé du courant initial ni influencer sensiblement le déroulement du courant entrant.

Dans le cas du milieu hypopotassique, nous avons choisi la situation expérimentale inverse. En effet, E_{K_1} est déplacé de 40 mV vers les potentiels plus négatifs et la "driving-force" devient nettement plus importante. Par contre, la g_K est alors considérablement réduite et constitue maintenant l'élément déterminant de la diminution de I_{K_1} . Cet effet se manifeste donc par

la suppression du courant de rebond. En outre, le courant de fuite est diminué et le courant retardé n'est activé que lorsque la "driving-force" est très grande.

Cette influence très forte du milieu hypopotas-
sique est en accord avec les résultats de TAKEDA
(1967) obtenus dans des conditions de courant imposé
sur la fibre musculaire d'écrevisse, mais apparaît en
contradiction avec le résultat signalé par HAUDECOEUR
et GUILBAULT (1972) : l'activité électrique ne serait
que faiblement augmentée, d'environ 5 mV, lors de
l'application d'un milieu dépourvu d'ions K^+ ; en outre,
la vitesse de la phase de dépolarisation ne serait pas
affectée ce qui a permis à ces auteurs de considérer
que les ions K^+ n'interviendraient pas au cours de la
phase de dépolarisation du potentiel.

Dans nos conditions expérimentales, sur les
fibres de type II, il apparaît qu'une conclusion très
différente doit être envisagée. La forte augmentation
du courant entrant associée à la disparition du rebond
étaient notre hypothèse initiale. En effet, deux cou-
rants semblent se produire simultanément ou presque au
cours du déclenchement de l'activité électrique. L'un
serait le courant calcique que nous avons décrit,
l'autre un courant potassique I_{K_1} responsable du rebond.
Leurs directions opposées et leurs dépendances respec-
tives vis à vis du potentiel et du temps pourraient

expliquer le courant initial complexe que nous observons. Il devient donc nécessaire d'aborder maintenant l'étude des caractéristiques de ce courant I_{K_1} .

D - CARACTERISTIQUES DE I_{K1}

I - Potentiel d'inversion

1°) Protocole expérimental et résultats

La détermination du potentiel d'inversion du courant I_{K1} a été effectuée en solution ASW par l'analyse des courants de queue enregistrés par la méthode du double pulse décrite précédemment pour le courant calcique (Voir chapitre III - C - 2°). L'impulsion conditionnante a une amplitude de 47, 5 mV. Cette impulsion est interrompue après 9 ms, au moment du maximum d'amplitude du rebond comme le montre l'enregistrement a de la figure 47. Le potentiel de membrane est alors ramené à différents niveaux de potentiel.

Nous constatons sur l'enregistrement b que lorsque le deuxième potentiel imposé est dépolarisant le courant de queue est nettement sortant. Lorsque la membrane est repolarisée au niveau initial soit à $HP = E_R$, le courant de queue est encore très légèrement sortant. Pour un niveau de repolarisation égal à - 12 mV, le courant de queue apparaît pratiquement nul.

2°) Conclusion

Le potentiel d'inversion du courant I_{K1} semble donc se produire pour un potentiel de membrane plus négatif que E_R . Cependant, cette mesure n'est que très approximative. En effet, nous savons qu'après 10 ms,

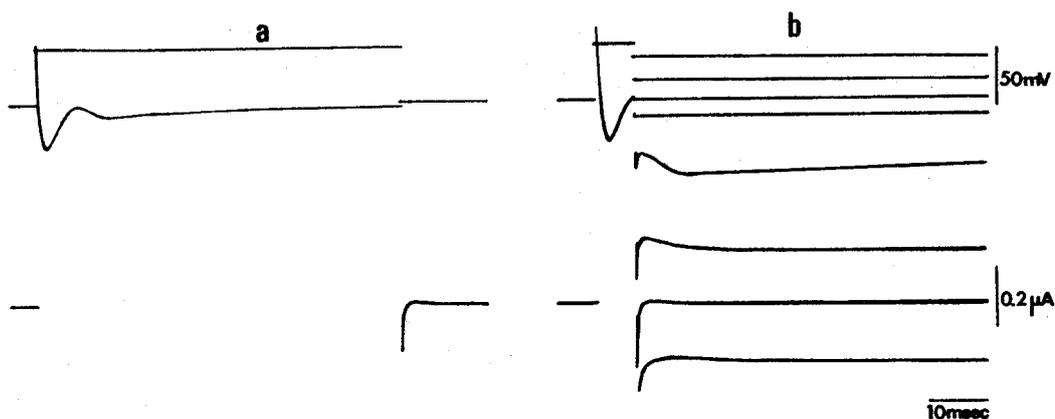


Figure 47 : Estimation du potentiel d'inversion du courant I_{K_1} en solution ASW.

a : enregistrement du courant pour une dépolarisation imposée de 47,5 mV

b : détermination du potentiel d'inversion par l'étude des courants de queue observés à différents niveaux de potentiel appliqués après l'impulsion conditionnante de 47,5 mV interrompue au maximum d'amplitude apparent de I_{K_1}

Fibre 303.

la composante calcique n'est pas inactivée. Le potentiel d'inversion mesuré correspond donc à un potentiel intermédiaire entre E_{K_1} et E_{Ca} . Dans ces conditions, il est vraisemblable que le potentiel d'équilibre du courant I_{K_1} soit nettement plus négatif que E_R .

Nous verrons ultérieurement qu'il ne nous a pas été possible de définir une meilleure condition expérimentale pour mesurer plus rigoureusement ce potentiel d'inversion.

II - Inactivation du courant I_{K_1} : dépendance vis à vis du potentiel

1°) Objet de cette expérimentation

Dans les conditions de potentiel imposé, en solution ASW, nous avons toujours observé sur les fibres de type II un courant initial comprenant deux composantes de directions opposées. Dans la mesure où ces deux courants ioniques semblent présenter des cinétiques relativement voisines, il nous est apparu possible de concevoir que leur dissociation puisse être basée sur une dépendance différente pour chacun d'eux vis à vis du potentiel de membrane. Dans ce cas, l'application de préimpulsions conditionnantes devrait nous conduire à modifier les amplitudes relatives de I_{Ca} et I_{K_1} à condition, bien sûr, que les conductances respectives de ces deux courants ne présentent pas la même dépendance

vis à vis du potentiel pour leurs variables d'inactivation. En d'autres termes, nous pouvons espérer que la courbe de disponibilité de l'un de ces courants en fonction du potentiel sera différente de celle établie pour l'autre courant.

2°) Résultats

La courbe de disponibilité de la conductance calcique traduite par l'évolution de la variable f_{∞} en fonction de l'impulsion conditionnante V a été établie au chapitre précédent pour les fibres de type I (voir Fig. 40). La même expérience répétée sur des fibres de type II présentant un rebond nettement apparent dans le courant initial conduit à un résultat très différent, apparemment paradoxal.

Une impulsion test de 56 mV est précédée par une impulsion conditionnante de 30 ms de durée et d'amplitude variable. L'amplitude du courant entrant est mesurée après extrapolation du courant en fin d'impulsion qui, pour cette valeur de potentiel, est peu activé (voir encart de la figure 49). Le courant entrant, présentant une certaine amplitude en l'absence d'impulsion conditionnante c'est à dire lorsque $HP = E_R$ (Fig. 48 a) augmente et devient maximal lorsqu'une prédépolarisation d'environ 20 à 30 mV est appliquée (Fig. 48 b). Pour une prédépolarisation inférieure le courant entrant est inférieur à sa valeur maximale et

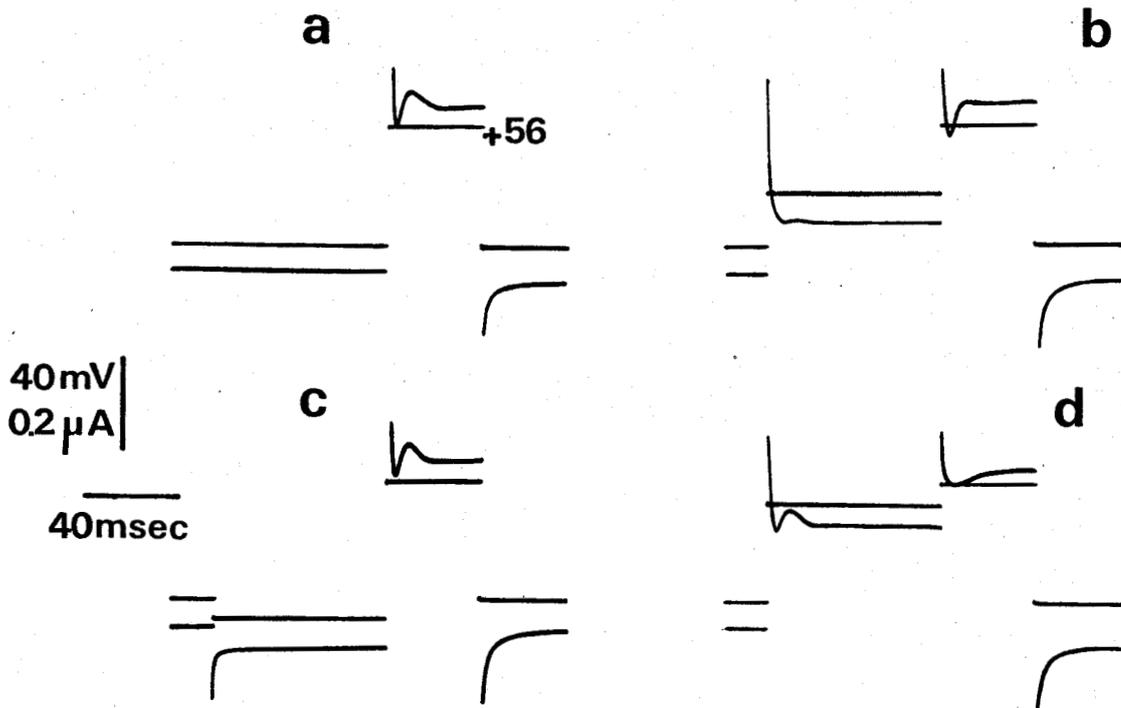


Figure 48 : Variations de l'amplitude du courant initial en fonction du potentiel de membrane, en solution ASW pour une fibre de type II.

L'impulsion test a une amplitude de 56 mV (a).

L'impulsion conditionnante a une durée de 80 ms et une amplitude variable à partir de $HP = E_R$ (b, c, d, voir texte).

Fibre 213.

pour une préhyperpolarisation il devient même inférieur à sa valeur de référence lorsque $HP = E_R$ (Fig. 48 c). Pour des dépolarisations conditionnantes supérieures à 20 ou 30 mV, le courant entrant diminue (Fig. 48 d). La valeur de demi-inactivation correspond pour cette fibre à une dépolarisation de 38 mV.

Parallèlement, l'amplitude du courant I_{K1} est modifiée. Celle-ci est augmentée lorsque des potentiels hyperpolarisants sont appliqués, tandis qu'elle est diminuée pour des dépolarisations membranaires et annulée lorsque la dépolarisation imposée atteint 20 à 30 mV.

Le rapport entre l'amplitude I du courant entrant mesuré pour différentes impulsions conditionnantes V et le courant entrant maximum enregistré (I_{max}) a été établi pour différentes valeurs de V . La courbe obtenue présente un décours inhabituel (Fig. 49 - points). La composante entrante du courant initial n'apparaît pas totalement disponible à la polarisation membranaire de repos et semble diminuée quoique non complètement inactivée lorsque la membrane est hyperpolarisée. Des résultats et des courbes identiques ont pu être obtenus sur 4 autres fibres de type II.

Après application d'une solution TEA sur cette même fibre, le rebond disparaît et la dépendance du courant entrant vis à vis du potentiel se traduit alors par une courbe simple (Fig. 49 - carrés). La valeur du potentiel de demi-inactivation est inchangée.

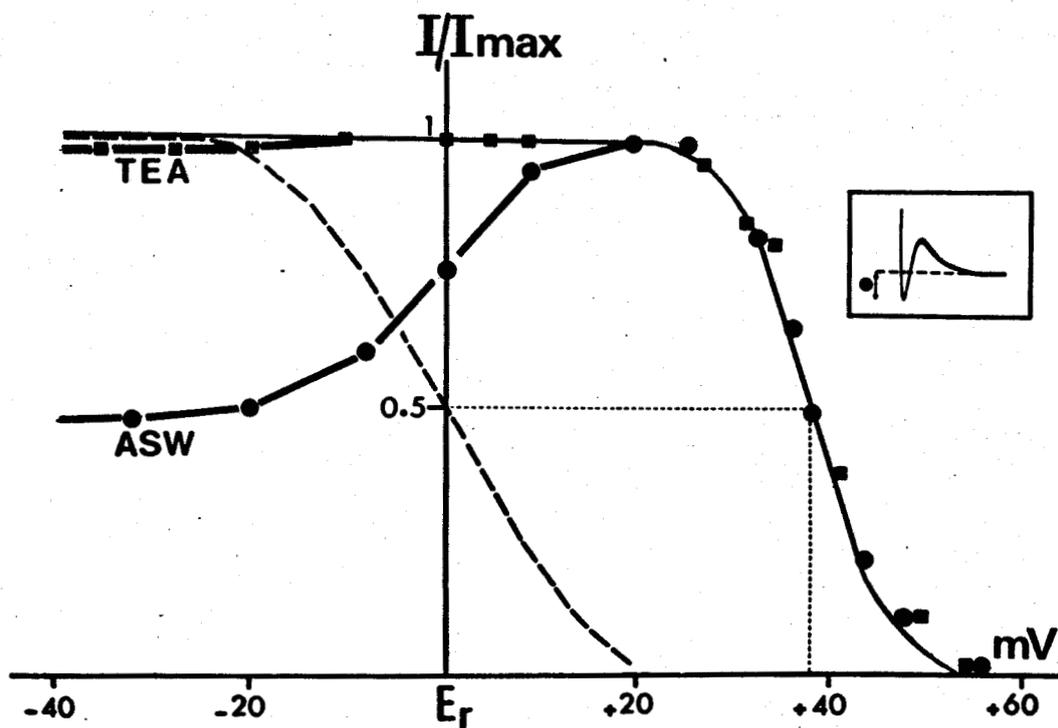


Figure 49 : Courbe de disponibilité du courant entrant en fonction de la polarisation membranaire : variations du rapport entre l'amplitude I du courant pour une impulsion conditionnante V et l'amplitude maximale du courant enregistrée (I_{max})

points : mesures du courant entrant par rapport au courant tardif en solution ASW

carrés : mêmes mesures en solution TEA.

La courbe la plus fine est tracée selon l'équation théorique (voir texte).

Courbe en pointillés : différence entre les deux courbes ASW et TEA, correspondant à l'inactivation du courant I_{K1} .

Fibre 213 (voir Figure 48).



La courbe tracée à travers les mesures expérimentales obtenues en TEA ou en solution ASW lorsque la dépolarisation imposée est supérieure à 20 mV correspond à la courbe théorique suivant l'équation :

$$I/I_{\max} = 1/1 + \exp. \left[(V_H - V)/k \right]$$

en prenant $V_H = 38$ mV et $k = -4$ mV. Nous avons signalé que V_H est le potentiel de demi-inactivation pour la fibre considérée et que k est un paramètre de forme. Pour toutes les fibres de type II étudiées, la valeur de k donnant un bon accord entre la courbe théorique et la courbe expérimentale est également de -4 . Il faut remarquer que précédemment, pour les fibres de type I, nous avons pris $k = -7$ et que la courbe d'inactivation présentait une pente plus faible.

3°) Discussion de ces résultats

Cette courbe complexe de l'inactivation du courant initial peut être expliquée en considérant qu'elle représente le résultat obtenu pour deux courants se produisant presque simultanément dans des directions opposées. Chacun de ces courants présenterait donc une dépendance particulière vis à vis du potentiel. En présence de TEA, il nous a été possible de construire la courbe d'inactivation de la composante entrante. En solution ASW, pour une hyperpolarisation conditionnante, le courant sortant est plus ample qu'à E_R et notamment le courant calcique demeurant alors constant

(d'après la courbe obtenue en solution TEA), le courant initial apparaît diminué. Ces résultats ne peuvent se comprendre qu'en admettant que les deux courants I_{Ca} et I_{K1} sont mélangés dans une certaine gamme de potentiels et que le courant initial n'est en réalité qu'une résultante. En effectuant point par point la différence entre les deux courbes de dépendance vis à vis du potentiel (en solution ASW et en solution TEA) nous pouvons admettre que nous allons obtenir au moins approximativement la courbe d'inactivation du courant I_{K1} . Cette courbe a été tracée sur la figure 49 en pointillés. Le courant I_{K1} présente une disponibilité maximale pour des potentiels de membrane hyperpolarisés d'au moins 20 mV. Il est inactivé pour une dépolarisation d'environ 20 mV et sa demi-inactivation se situe à E_R .

III - Inactivation du courant I_{K1} établie sur une fibre ne présentant pas de composante entrante dans le courant initial.

1°) Résultats

De façon très exceptionnelle (2 cas sur l'ensemble des fibres étudiées) et sans que le protocole expérimental ait été modifié, c'est à dire en particulier avec $HP = E_R$, nous avons enregistré en solution ASW un courant initial ne comprenant que le courant

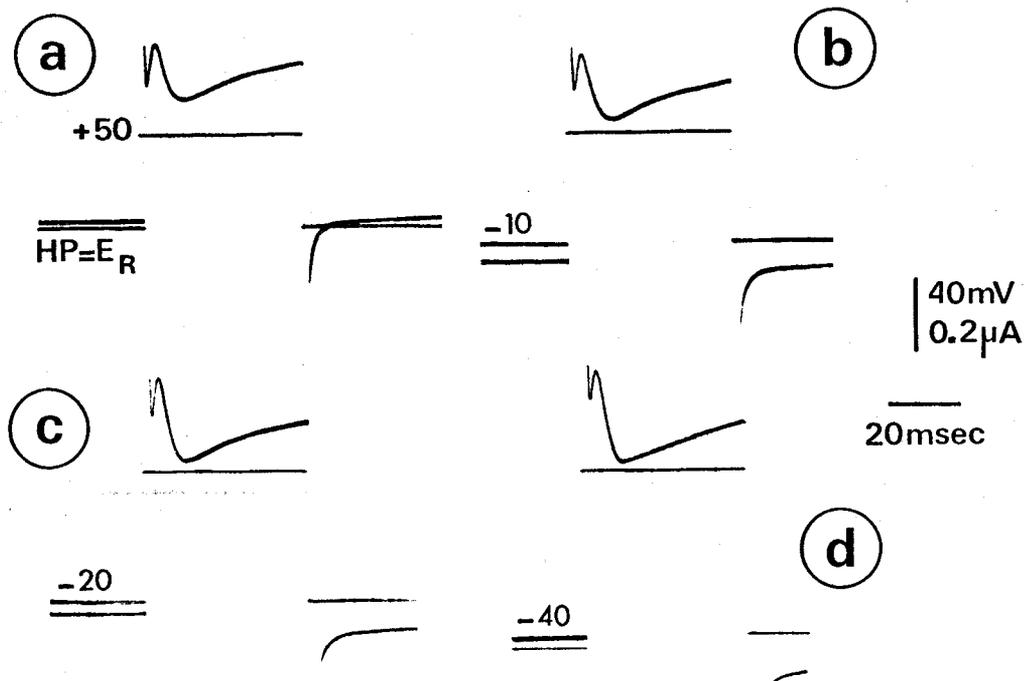


Figure 50 : Enregistrement du courant sortant initial I_{K_1} sans que le courant entrant soit apparent.

a : Enregistrement à $HP = E_R$

b, c, d : Influence de la polarisation membranaire.

Les hyperpolarisations croissantes provoquent une augmentation de l'amplitude de I_{K_1} .

Noter l'activation et l'inactivation rapides de ce courant.

Fibre 69.



I_{K1} . La composante entrante n'était pas apparente comme le montre l'enregistrement de la figure 50 a obtenu pour une dépolarisation imposée de 50 mV à partir du niveau de polarisation normale de la membrane (égal à E_R). Sur cette fibre, nous avons alors modifié la polarisation membranaire initiale afin de contrôler la variation d'amplitude de I_{K1} . Le potentiel de membrane a été hyperpolarisé successivement de 10, 20, 30 et 40 mV (Fig. 50 b, c, d). L'amplitude de I_{K1} augmente en fonction de l'hyperpolarisation et est maximale pour un potentiel imposé de - 30 mV. Les rapports entre l'amplitude (I) de I_{K1} pour les différents potentiels imposés et son amplitude maximale (I_{max}) en fonction du potentiel imposé sont reportés sur la courbe de la figure 51. Il est intéressant de comparer cette courbe à celle que nous avons déduite (voir Fig. 49). Le courant I_{K1} est ici à demi-inactivé pour un potentiel imposé de + 4 mV. Il est totalement inactivé lorsque la dépolarisation imposée est d'environ 30 mV. Ces valeurs concordent relativement bien avec celles que nous avons obtenues précédemment par déduction.

2°) Conclusion

Cette expérience apporte donc de façon convaincante la preuve expérimentale de la validité de notre hypothèse d'analyse du courant initial composite pour les fibres de type II. Le rebond observé corres-

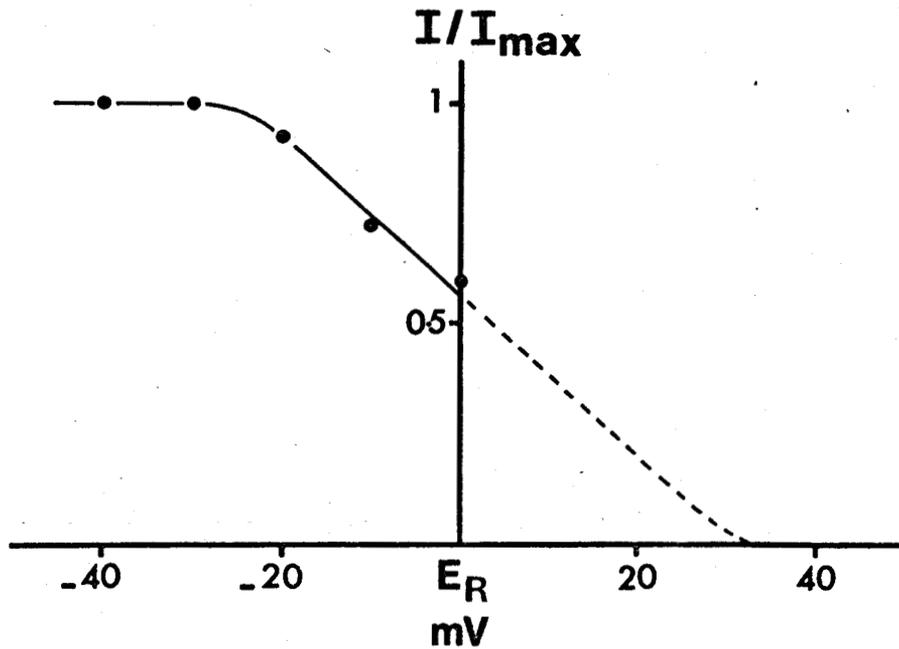


Figure 51 : Courbe d'inactivation du courant I_{K_1} en fonction de la polarisation membranaire correspondant aux enregistrements de la figure 50 (Fibre 69).

I est l'amplitude de I_{K_1} pour les différents niveaux d'hyperpolarisation membranaire, I_{\max} est l'amplitude maximale de I_{K_1} enregistrée lorsque l'hyperpolarisation est égale à 30 ou 40 mV.

Noter la similitude entre cette courbe et celle en pointillés de la figure 49.



pond à un courant I_{K1} dont l'amplitude est dépendante du potentiel de membrane, dans la gamme des potentiels imposés comprise entre - 30 et + 30 mV.

L'expérience que nous venons de présenter est exceptionnelle en ce sens que le courant I_{K1} a vraisemblablement une amplitude très largement supérieure à I_{Ca} de telle sorte que I_{Ca} ne devient pas apparent et que la courbe d'inactivation obtenue est très proche de la courbe théorique déduite pour I_{K1} .

Le phénomène inverse peut être envisagé pour expliquer les résultats obtenus pour les fibres de type I. Le courant calcique serait très nettement plus ample que I_{K1} qui ne pourrait alors pas être décelé sur nos tracés de courant.

IV - Dépendance du courant I_{K1} vis à vis du courant calcique

1°) Impossibilité d'enregistrer I_{K1} en l'absence de I_{Ca} sur la base de leurs dépendances différentes vis à vis du potentiel membranaire

Les résultats précédents nous conduisent à supposer qu'en hyperpolarisant la membrane d'environ 20 à 30 mV, il doit être possible lorsque de faibles dépolarisations sont appliquées, d'enregistrer le courant I_{K1} sans avoir encore activé le courant calcique.

Toutes les expériences que nous avons réalisées ne nous ont jamais permis d'atteindre un tel objectif. L'amplitude de l'hyperpolarisation membranaire ne modifie pas ce résultat négatif. De même, si au lieu d'amener le potentiel de membrane à une valeur plus négative de façon continue nous choisissons d'appliquer des préimpulsions hyperpolarisantes de différentes durées (de 5 à 200 ms), il ne nous a pas davantage été possible d'enregistrer le courant I_{K1} seul. Celui-ci ne peut être observé que lorsque le courant calcique est activé.

2°) Récupération de l'activabilité du courant initial après inactivation

Si la polarisation membranaire initiale n'apparaît pas comme un facteur discriminatif des

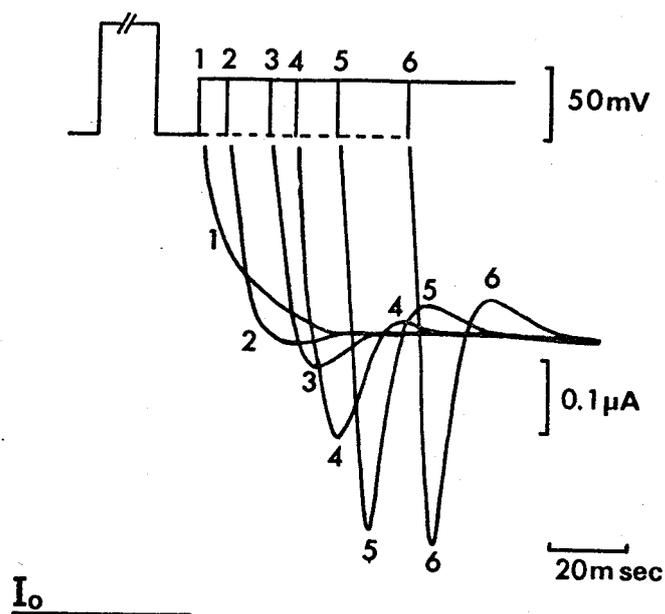


Figure 52 : Redisponibilités des courants I_{Ca} et I_{K1} en solution ASW.

La première impulsion a une amplitude de 75 mV et une durée de 75 ms de façon à inactiver le courant initial. Après un délai variable une seconde impulsion de 40 mV est appliquée. Les deux courants réapparaissent pratiquement simultanément.

Fibre 137.



courants I_{K_1} et I_{Ca} , une autre possibilité pour séparer ces courants pouvait résider dans leurs disponibilités différentes, en fonction du temps, pour être réactivés après avoir été inactivés.

L'expérience est réalisée de la façon suivante : une fibre est dépolarisée de 75 mV pendant 75 ms de façon à ce que les courants ioniques activés aient eu le temps de s'inactiver. Le potentiel de membrane est ensuite ramené à E_R pendant une durée variable puis une nouvelle impulsion de + 40 mV est appliquée. Cette amplitude est choisie parce que le courant entrant est encore sous-maximal pour cette fibre (Fig. 52).

Nous constatons que, quelle que soit la durée de repolarisation à E_R entre les deux impulsions, le courant I_{K_1} n'est "réactivé" que lorsque le courant entrant réapparaît. Plus précisément, I_{K_1} ne peut être observé que lorsque I_{Ca} a atteint une amplitude suffisante (tracé 4) correspondant à un délai d'environ 35 ms.

Un résultat identique est obtenu lorsque le niveau de repolarisation entre les deux impulsions est fixé à - 30 mV par rapport à E_R .

E - CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce chapitre nous ont permis d'identifier le rebond observé sur les tracés de courant des fibres de type II placées en solution ASW. Ce rebond résulte de l'existence d'un courant sortant, sensible à des variations de $[K]_o$ et inhibé par les ions TEA. La nature ionique de ce courant serait donc potassique.

La composante entrante du courant initial enregistré sur les fibres de type II est apparemment plus faible lorsque des préimpulsions hyperpolarisantes sont appliquées. Une observation analogue est mentionnée pour les neurones d'escargot par CONNOR et STEVENS (1971 b), NEHER (1971), KOSTYUK et coll. (1974) et pour le muscle lisse par VASSORT (1975). Plutôt que de supposer une dépendance anormale de la conductance calcique vis à vis du potentiel (GEDULDIG et GRUENER, 1970), il apparaît que ce phénomène résulte de l'existence du courant I_{K1} . En effet, en présence de TEA, la diminution apparente du courant calcique, lorsque la membrane est initialement hyperpolarisée, ne se produit plus. De plus, il faut remarquer que, pour les fibres présentant un rebond, la relation entre la variable d'inactivation f_{∞} et la polarisation membranaire se traduit par une courbe dont la pente est beaucoup plus grande que celle obtenue précédemment pour les fibres de type I (comparer Fig. 41 et 49). Les valeurs expérimentales de la variable d'inac-

tivation f_{∞} concordent avec les valeurs calculées lorsqu'un facteur 4 est utilisé dans l'équation théorique. Un résultat identique a été obtenu par NEHER (1971) et par STANDEN (1974) sur les neurones d'escargot pour lesquels un courant potassique rapide comparable à I_{K1} a été mis en évidence. Pour les fibres sans rebond (type I) un facteur 7 a été estimé, cette valeur correspondant à celle proposée pour l'axone de seiche (HODGKIN et HUXLEY, 1952 c).

Le courant I_{K1} est à demi disponible au potentiel de repos et se produit presque simultanément au courant entrant. Ceci peut rendre compte, pour les fibres de type II, des potentiels d'inversion particulièrement bas ($E_{Ca} = +10$ à $+15$ mV) ainsi que de la faible variation de E_{Ca} lorsque $[Ca]_e$ est modifiée.

Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'obtenir le courant I_{K1} sans enregistrer également le courant calcique. La "réactivation" de ces deux courants apparaît identique, quels que soient l'amplitude et le niveau du potentiel fixé après une première activation. Ces résultats, s'ajoutant à celui obtenu en milieu Mn où nous supprimons à la fois la composante entrante et la composante sortante du courant initial suggèrent que le courant I_{K1} pourrait être dépendant du courant calcique. Nous proposerons dans la discussion générale un mécanisme capable de justifier cette hypothèse. Cependant, nous avons montré que le courant I_{K1} possède sa propre

caractéristique d'inactivation en fonction du potentiel. Bien que nous n'ayons pas pu la déterminer, I_{K1} présente vraisemblablement une activation propre.

Nous sommes donc amenés à considérer que le courant I_{K1} possède une double origine. Son amplitude serait dépendante de deux facteurs : le premier correspondrait à la dépendance propre de I_{K1} vis à vis du potentiel et du temps, le deuxième correspondrait à I_{K1} lié à I_{Ca} . Il apparaîtrait, d'après nos résultats expérimentaux, que ce deuxième élément serait nettement prépondérant puisqu'en absence de I_{Ca} , il ne nous est pas possible de "visualiser" la fraction de I_{K1} due à ses propres caractéristiques.

- CHAPITRE V -

ETUDE DU COURANT SORTANT RETARDE

A - DESCRIPTION ET NATURE IONIQUE DU COURANT RETARDE

I - Enregistrements en solution ASW

1°) Résultats

2°) Conclusion

II - Nature ionique du courant retardé

1°) Potentiel d'équilibre du courant retardé en solution ASW

2°) Action d'un milieu hyperpotassique

3°) Influence du TEA

4°) Conclusion

B - ETUDE DU PROCESSUS D'ACTIVATION

I - Détermination de I_{K_2}

1°) Protocole

2°) Résultats

3°) Conclusion

II - Variation de la conductance potassique en fonction du potentiel

1°) Résultats

2°) Conclusion

III - Paramètres d'activation du courant I_{K_2} : mesures en solution ASW

1°) Dépendance vis à vis du potentiel

2°) Détermination de la constante de temps d'activation

3°) Conclusion

IV - Caractéristiques du courant I_{K2} étudiées
en solution ASW + Mn.

- 1°) Variable d'activation n_{∞}
- 2°) Constante de temps d'activation
- 3°) Conclusion - Discussion

V - Etude de l'évolution de la conductance
potassique au cours du temps.

- 1°) Principes des déterminations
théorique et expérimentale
- 2°) Résultats
- 3°) Conclusion

C - MISE EN EVIDENCE DU PROCESSUS D'INACTIVATION DU
COURANT RETARDE

I - Détermination du processus impliqué dans
la diminution du courant retardé.

- 1°) Contrôle du facteur $(V - V_K)$
 - a) Protocole expérimental
 - b) Résultats
 - c) Conclusion
- 2°) Contrôle du facteur g_K
 - a) Protocole expérimental
 - b) Résultats
 - c) Conclusion

II - Constantes de temps d'inactivation

D - CONCLUSION

Nous allons aborder maintenant l'étude du courant retardé observé après le courant initial lorsque des dépolarisations sont appliquées à la membrane. Nous avons précisé au début du chapitre IV que ce courant sera appelé I_{K_2} afin de le distinguer du courant potassique rapide I_{K_1} que nous venons d'étudier.

Deux remarques préliminaires doivent être mentionnées :

i) les caractéristiques du courant I_{K_2} seront établies pour des fibres de type I. En effet, nous avons vu que lorsque le rebond est présent sur les tracés du courant (fibres de type II) il est impossible d'effectuer des mesures de I_{K_2} pendant les 20 à 30 premières ms du potentiel imposé. De plus, nous avons précisé (voir chapitre II) que le courant I_{K_2} est généralement plus ample pour les fibres de type I. Enfin, les courants de queue sont beaucoup plus nettement mesurables lors du retour du potentiel imposé à sa valeur de repos pour les fibres du type I, ce qui nous permettra d'étudier plus précisément sur ces fibres, l'évolution de la variable n_{∞} .

ii) dans la plupart des travaux relatifs à l'étude du courant retardé, les expériences sont effectuées en solution Mn (ou TTX - Mn selon le tissu étudié) afin d'éliminer le courant initial. Nous n'avons pas pu utiliser une procédure analogue pour la fibre musculaire de crabe. En effet, nous avons vu

(chapitre III - 1) que si le courant initial est effectivement supprimé (y compris le courant I_{K_1} , ce qui aurait pu constituer une facilité pour l'étude de I_{K_2} seul), le courant retardé est légèrement diminué et les courants de queue sont nettement plus faibles en présence d'ions Mn^{++} . A ce propos, nous proposerons dans ce chapitre une interprétation du mode d'influence des ions Mn^{++} .

Pour ces deux raisons, les expériences qui vont être décrites se rapporteront généralement au cas de fibres du type I placées en solution ASW.

A - DESCRIPTION ET NATURE IONIQUE DU COURANT RETARDE

I - Enregistrements en solution ASW

1°) Résultats

Lorsque la membrane est polarisée à différents niveaux, l'activation du courant retardé au cours du temps est illustrée à la figure 53 (A). Pour une faible valeur de dépolarisation, il se manifeste un courant de faible amplitude qui n'évolue pas au cours du temps. Des dépolarisations imposées supérieures à + 50 mV font apparaître un courant sortant qui devient d'autant plus ample et qui évolue d'autant plus rapidement que la dépolarisation est plus importante. L'état stable du courant retardé est atteint en 50 à 80 ms.

Pour cette fibre, nous enregistrons un courant de queue très net lorsque la membrane est repolarisée à E_R . L'amplitude de ce courant de queue de sens sortant augmente en fonction de l'amplitude de la dépolarisation imposée. Pour une même dépolarisation, ce courant de queue augmente au fur et à mesure que le courant sortant s'active. La figure 53 (B) donne une illustration de ce phénomène pour un potentiel imposé de 70 mV. Dans cette expérience, la membrane est repolarisée à un niveau de potentiel de + 9 mV par rapport à E_R afin d'observer des courants de queue d'amplitudes plus grandes.

De plus, lorsque le potentiel est imposé pendant un temps supérieur à environ 150 ms, le courant

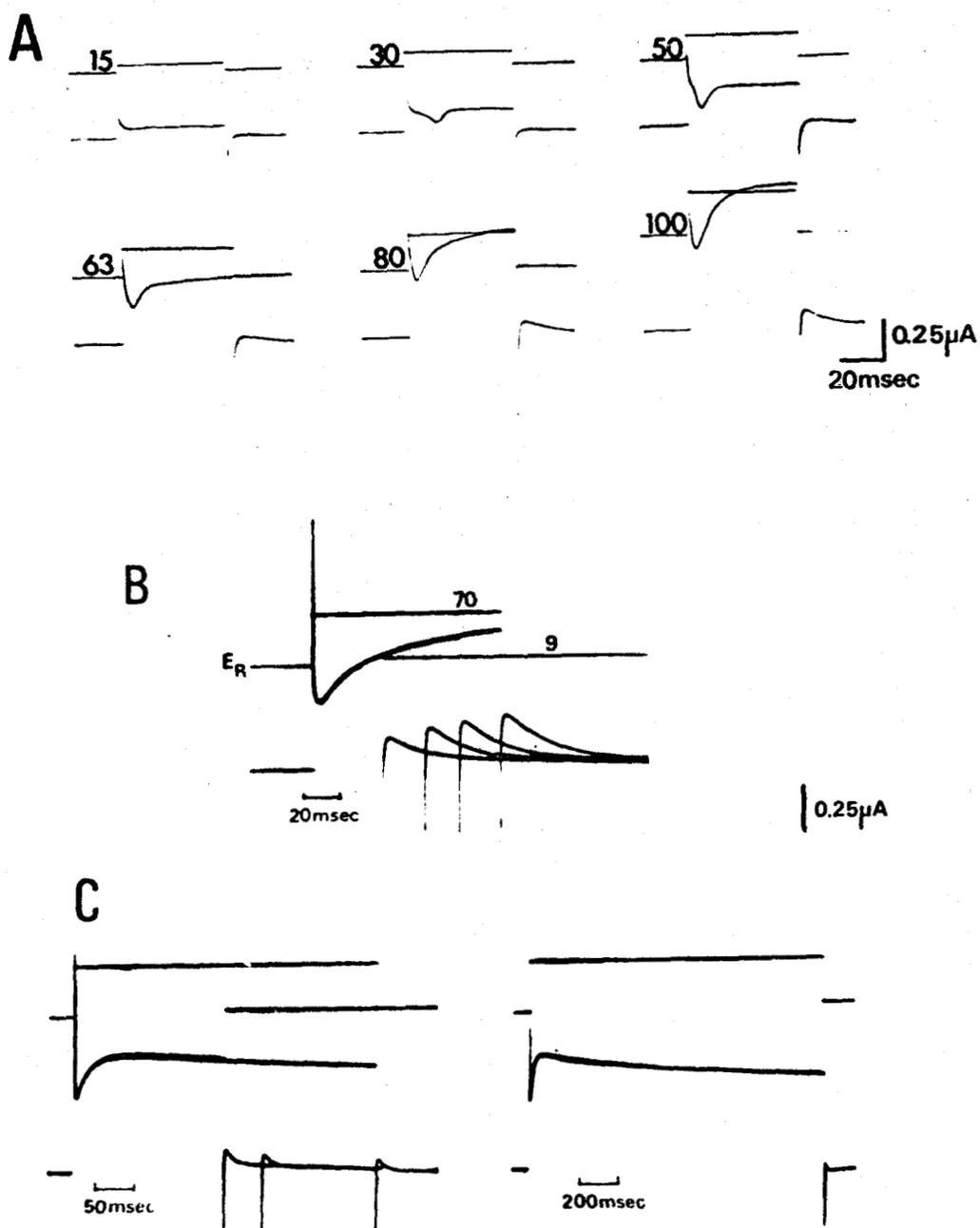


Figure 53 : Etude du courant sortant retardé

A - Enregistrements des courants ioniques en solution ASW pour des impulsions d'amplitude variable indiquée à gauche de chaque trace de potentiel (en mV)

HP = E_R

Fibre 109.

B - Courants de queue observés à un niveau $V = +9$ mV et enregistrés au fur et à mesure du déroulement de l'activation du courant retardé produit par une dépolarisation de 70 mV.

C - Diminution d'amplitude du courant retardé pour des impulsions de longues durées. Noter également la diminution des courants de queue.

B et C : même fibre n° 2106.



diminue au cours du temps (Fig. 53 C) puis atteint un nouvel état stable en 1000 à 1500 ms. Corrélativement, le courant de queue est très nettement diminué.

2°) Conclusion

Le courant sortant observé pour des dépolarisations supérieures à 50 mV apparaît dépendant du potentiel et du temps. Ce courant rend compte du phénomène de rectification retardée signalée précédemment (voir chapitre II).

Il semble possible, dès maintenant, de prévoir que le potentiel d'activation du courant retardé doit, pour cette fibre, se produire pour une dépolarisation membranaire inférieure à 50 mV. En effet, nos enregistrements montrent que, pour une dépolarisation de 30 mV, le courant de queue apparaît légèrement sortant. Ceci laisserait supposer que le courant retardé a déjà été activé.

Nos résultats antérieurs relatifs au courant I_{K1} nous ont permis de constater que ce courant rapide semble inactivé à la fin d'impulsions de durée supérieure à 60 ms. Par conséquent, il est peu probable que le courant de queue sortant enregistré pour de faibles dépolarisations imposées puisse être attribué au courant I_{K1} . Nous verrons que l'analyse semi-logarithmique des courants de queue confirme cette hypothèse.

Après avoir atteint son amplitude maximale, le courant retardé diminue au cours du temps lorsque le potentiel imposé est suffisamment long. Ce résultat est en accord avec ceux de ADRIAN et coll. (1966, 1968), de KAO et STANFIELD (1968) et de ILDEFONSE et ROUGIER (1968) pour la fibre musculaire de grenouille. Ces auteurs décrivent un processus d'inactivation. Nous verrons pour la fibre musculaire de crabe si la diminution du courant doit être attribuée à une inactivation ou à un phénomène d'accumulation.

II - Nature ionique du courant retardé

Afin de démontrer la nature ionique de ce courant, des expériences sont réalisées en déterminant d'une part le potentiel d'équilibre du courant retardé et d'autre part l'action d'un milieu hyperpotassique et du TEA.

1°) Potentiel d'équilibre du courant retardé en solution ASW

La valeur du potentiel d'équilibre du courant retardé peut être déterminée en appliquant deux impulsions successives. L'évolution du courant de queue enregistré pour la deuxième impulsion V_2 correspond à la désactivation du courant retardé activé par la première impulsion V_1 . Le potentiel V_2 pour lequel le sens du courant de queue s'inverse donne la valeur du potentiel d'inversion du courant retardé.

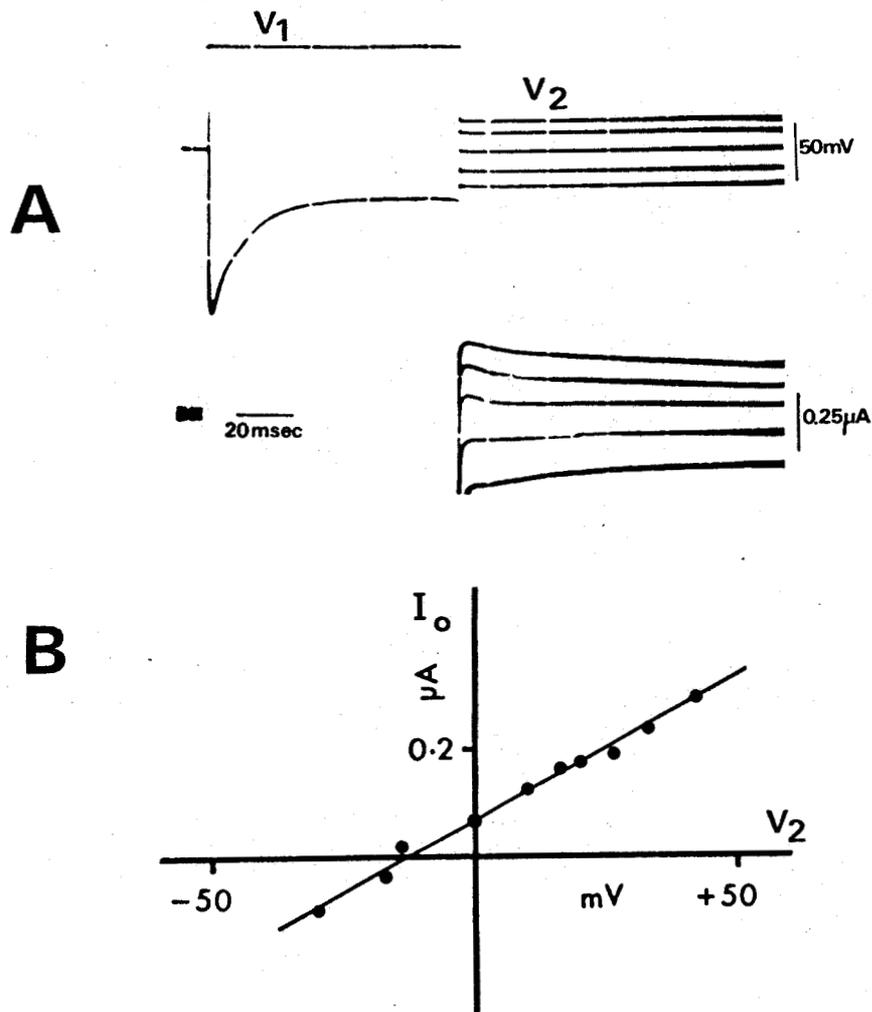


Figure 54 : Détermination du potentiel d'inversion du courant retardé en solution ASW.

- A : Enregistrement des courants de queue à différents niveaux de potentiels V_2 après une impulsion conditionnante V_1 de 90 mV à partir de E_R .
- B : Relation entre le courant instantané I_0 et le potentiel V_2 sur la fibre dont certains enregistrements sont présentés ci-dessus en A.
 I_0 est mesuré au temps $t = 0$ de V_2 par extrapolation de l'enveloppe de chaque courant de queue.

Fibre 1909.



Dans l'expérience présentée (Fig. 54 A) la membrane est dépolarisée d'une valeur $V_1 = 90$ mV à partir de E_R . Lorsque le courant est activé à son amplitude maximale, après 85 ms, différents potentiels V_2 sont appliqués. Le courant de queue est sortant lorsque V_2 est positif ou égal à E_R . Il devient entrant lorsque V_2 est négatif par rapport à E_R .

Le courant de queue sera nul pour V_2 égal au potentiel d'équilibre du courant retardé. Une détermination précise de cette valeur peut être effectuée graphiquement. L'extrapolation des valeurs du courant de queue au temps $t = 0$ de la deuxième impulsion donne la valeur du courant instantané I_0 . Le report des mesures de I_0 en fonction de V_2 se traduit par une relation linéaire (Fig. 54 B). Le potentiel d'équilibre du courant retardé apparaît donc situé à une valeur de potentiel égale à - 12 mV par rapport à E_R .

Pour les enregistrements présentés à la figure 53 A, le potentiel d'équilibre déterminé de la même façon est de + 5 mV par rapport à E_R .

Sur l'ensemble des fibres testées, les différentes valeurs des potentiels d'équilibre obtenues se situent au voisinage du potentiel de repos dans une gamme comprise entre - 12 et + 7 mV par rapport à E_R .

Sachant que le potentiel d'équilibre des ions K^+ est, selon différents auteurs, voisin de E_R ou légèrement plus négatif (d'après SHAW, 1955 a et HAYS et

coll., 1968), le potentiel d'équilibre du courant retardé semble donc proche de E_K et le courant retardé serait, au moins pour une large part, de nature potassique. En outre, le niveau de polarisation initiale de la membrane considéré égal à E_R n'étant pas connu, il est difficile de donner une valeur exacte du potentiel d'équilibre du courant retardé. La fluctuation, bien que faible, de nos résultats pourrait s'expliquer par de légères variations, d'une fibre à l'autre, de la polarisation de référence.

2°) Action d'un milieu hyperpotassique

La mesure du potentiel d'inversion du courant retardé nous permet donc de supposer que ce courant est essentiellement de nature potassique. Un autre moyen pour contrôler l'influence des ions K^+ , sans faire appel aux valeurs absolues des potentiels d'équilibre, est de mesurer la variation du potentiel d'inversion pour une même fibre placée successivement en solution ASW et dans un milieu hyperpotassique.

Une solution contenant 129 mM de potassium ($[K]_e \times 10$: milieu "K 10") est appliquée après la solution ASW où nous avons déterminé un potentiel d'inversion proche de E_R ($V = -5$ mV).

Le contrôle du potentiel de membrane (conditions de courant imposé) nous permet d'observer une dépolarisation de 48 mV par rapport à E_R survenant instantanément sous l'effet du milieu K 10. Le retour aux

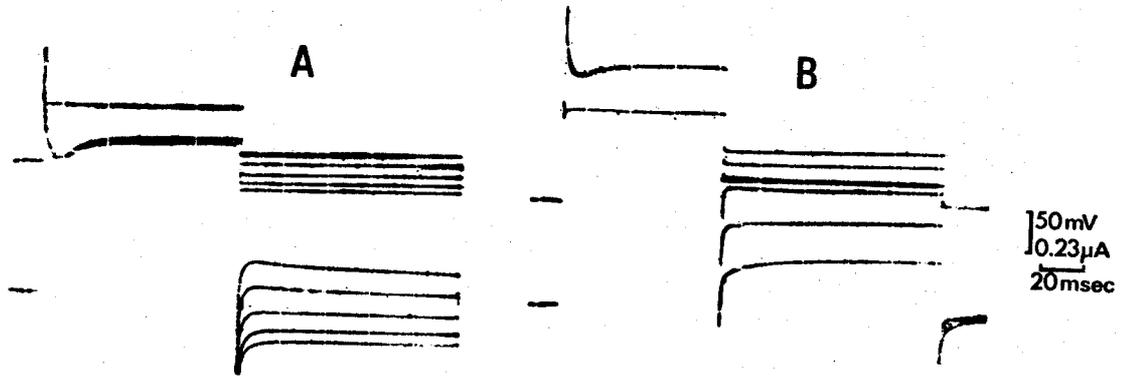


Figure 55 : Etude de la variation du potentiel d'inversion du courant retardé pour une fibre placée successivement en solution ASW (A) puis en milieu K10 (B).

Fibre 153.

conditions de potentiel imposé ainsi que le rétablissement de la polarisation membranaire à E_R nous permettent de déterminer, de la même façon qu'en ASW, le nouveau potentiel d'inversion du courant retardé en milieu K 10. Celui-ci correspond à une dépolarisation imposée de 48 mV (Fig. 55) ce qui traduirait un déplacement du potentiel d'inversion de 53 mV. Il faut remarquer sur les tracés que le courant de fuite est considérablement augmenté en milieu hyperpotassique. Ceci expliquerait que pour le potentiel test de 100 mV, le courant n'apparaisse pas plus ample. Il en est de même pour l'amplitude des courants de queue à différents V. Cette diminution des courants résulte également de la driving-force plus faible en milieu K 10 puisque E_K est très nettement déplacé (théoriquement de 58 mV). De ce fait, notre mesure du déplacement du potentiel d'inversion ne peut pas être réalisée dans de très bonnes conditions.

Cependant, il apparaît que les ions responsables du courant retardé seraient principalement les ions potassium sans que ce canal présente une parfaite sélectivité. En effet, la variation de 53 mV du potentiel d'inversion que nous venons de déterminer correspond au déplacement maximal que nous ayons pu enregistrer. Sous l'action d'un milieu K 10, le potentiel d'inversion du courant retardé varie, pour différentes fibres, entre 47 et 53 mV. Il ressort donc de ces mesures que le canal potassique retardé pourrait laisser passer d'autres

ions et que le potentiel d'inversion mesuré (entre - 12 et + 7 mV par rapport à E_R) serait probablement surestimé.

3°) Influence du TEA

Nous avons déjà mentionné que le TEA peut être considéré comme un inhibiteur de la perméabilité potassique.

Le TEA est ajouté à la solution ASW à la concentration de 20 mM.

Nous avons signalé que, dans les conditions de courant imposé, le potentiel d'action enregistré est nettement plus durable (voir Fig. 31 A et 32-1).

Dans les conditions de potentiel imposé, la relation courant-potentiel établie tout d'abord en solution ASW pour des impulsions de 120 ms montre que la rectification retardée se produit pour une dépolarisation supérieure à 45 mV. L'application de la solution TEA provoque une diminution nette de ce courant retardé sans toutefois sembler le supprimer totalement (Fig. 56). Cependant nous avons vu qu'une légère rectification due au courant de fuite devait subsister, même en présence de TEA (voir Fig. 34).

Ces résultats montrent le rôle inhibiteur du TEA vis à vis du courant retardé, confirmant ainsi la nature potassique de celui-ci.

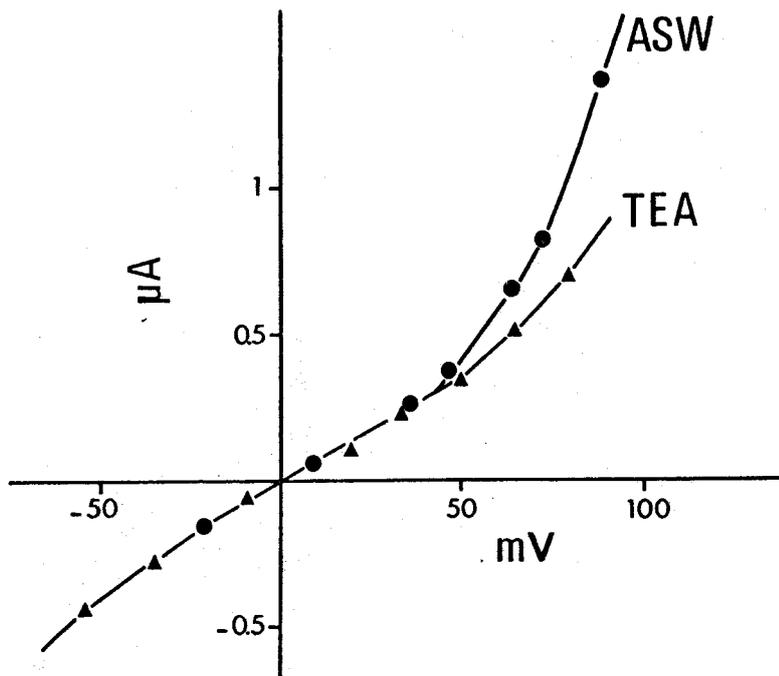


Figure 56 : Influence du TEA (20 mM) sur le courant retardé.

Les mesures du courant retardé sont faites à la fin d'impulsions de 120 ms sur la même fibre placée en solution ASW (points) puis en solution TEA (triangles).

Noter la diminution du courant retardé en présence de TEA pour des impulsions supérieures à 40 mV.



Fibre 1609 (Voir Fig. 31).

4°) Conclusion

Le potentiel d'équilibre proche de E_R , la sensibilité à une variation de $[K]_e$ et la diminution sous l'effet du TEA du courant retardé I_{K2} nous conduisent à considérer que la conductance retardée est essentiellement potassique.

Ce résultat est en accord avec ceux obtenus sur divers muscles de Crustacés en particulier par HIGIWARA et coll. (1969), KEYNES et coll. (1973) sur la fibre de barnacle, TAKEDA (1967) sur la fibre d'écrevisse. Il est différent cependant du résultat obtenu sur la fibre de crabe par H'UDECCEUR (1974 b,c) selon lequel le courant retardé pourrait être transporté par les ions Cl^- . Cependant, cette conductance retardée n'apparaît pas spécifiquement potassique. Notre mesure du potentiel d'inversion du courant retardé ne correspondrait donc pas précisément à E_K et pourrait être légèrement surestimée dans la mesure où ce canal laisserait passer également d'autres ions (Na^+ ou Cl^-). E_K serait donc plus négatif que E_R , résultat que nous avait également suggéré notre étude du courant I_{K1} .

B - ETUDE DU PROCESSUS D'ACTIVATION

Les résultats que nous venons de présenter mettent en évidence la nature essentiellement potassique du courant retardé. Toutefois, les mesures de ce courant que nous avons faites correspondent en réalité, pour chaque potentiel imposé, à la somme du courant potassique I_{K_2} et du courant de fuite.

De façon à étudier plus précisément dans cette partie les caractéristiques d'activation de I_{K_2} , nous allons spécifier dès maintenant la méthode de détermination de ce courant.

I - Détermination de I_{K_2}

1°) Protocole

Le courant I_{K_2} est calculé en considérant que le courant maximal à la fin d'une impulsion dépolarisante (I_{SS}) est égal à la somme du courant retardé I_{K_2} et du courant de fuite I_L . Nous admettrons, d'après nos résultats précédents, que la (ou les) composante(s) du courant initial est inactivée à la fin d'impulsions d'environ 80 ms.

Le courant de fuite initial est obtenu en extrapolant au temps $t = 0$ du potentiel imposé la phase d'activation du courant sortant. Ce procédé utilisé par GOLDMAN et BINSTOCK (1969) pour des axones géants de

Myxicola placés en solution TTX revient à mesurer le pic initial minimal du courant sortant. Dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire pour des enregistrements obtenus en solution ASW, cette méthode est aisément applicable lorsque les dépolarisations imposées à la membrane sont élevées, supérieures ou égales à 80 mV. Pour des dépolarisations inférieures, il est évident que l'extrapolation risque de conduire à une valeur de I_L moins précise puisque le courant entrant est développé. Dans ce cas, une autre technique de détermination est utilisée pour contrôler nos mesures.

La valeur de I_L est prise à un temps donné après le début de l'application du potentiel c'est-à-dire après la phase de courant capacitif. Nous pouvons constater, d'après nos tracés, que l'activation du courant entrant est relativement lente et peut donc être dissociée assez correctement du courant capacitif.

2°) Résultats

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 57. Il apparaît que :

- le courant mesuré à la fin des impulsions (I_{ss}) présente une rectification retardée pour des potentiels supérieurs à + 35 mV.

- le courant de fuite ne varie pas linéairement en fonction du potentiel lorsque les dépolarisations imposées sont supérieures à 50 mV.

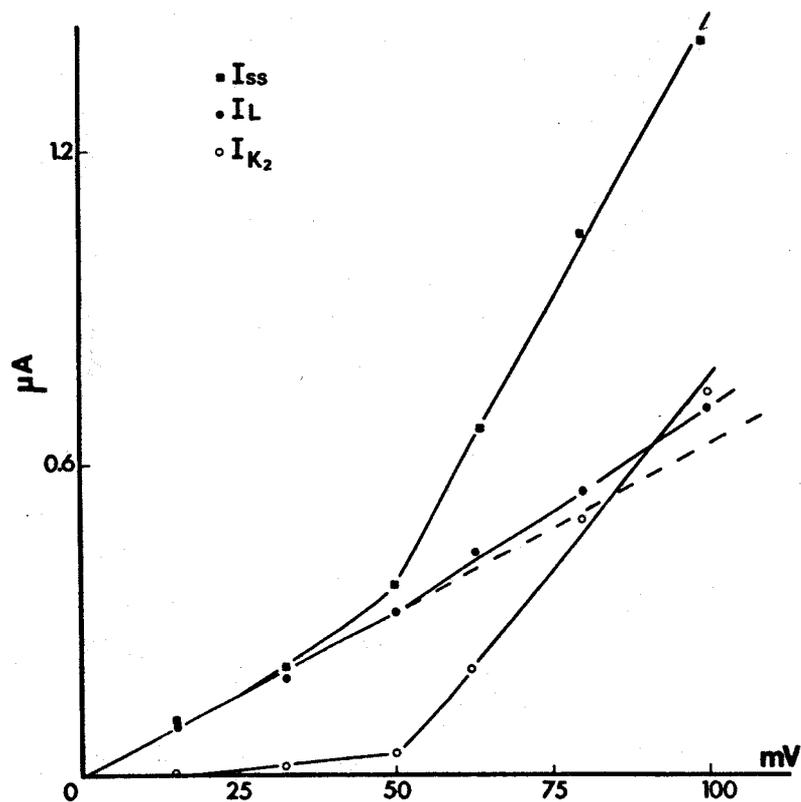


Figure 57 : Détermination du courant I_{K_2} en fonction du potentiel. (cercles).

$$I_{K_2} = I_{SS} - I_L$$

I_{SS} = courant sortant maximal en fin d'impulsions de 60 ms (carrés).

I_L = courant de fuite (points). Voir détails concernant sa mesure dans le texte.

La ligne en pointillés indique une conductance constante en fonction du potentiel par extrapolation des résultats obtenus pour les faibles valeurs de V.



Fibre 109 (voir Fig. 53 A).

- la différence entre les valeurs de I_{SS} et I_L pour chaque potentiel permet d'obtenir les valeurs de I_{K_2} . Ce courant apparaît activé pour un potentiel voisin de + 30 mV, la variation maximale de l'activation se situant entre + 50 et + 90 mV.

3°) Conclusion

Le courant mesuré à la fin des impulsions apparaît activé pour cette fibre pour des potentiels imposés supérieurs à + 35 mV. Il faut noter que, sur un grand nombre de fibres, ce courant ne pouvait être décelé que pour des potentiels imposés de 45 ou 50 mV. Toutefois, les différentes relations traduisant les variations de I_{K_2} seul en fonction du potentiel sont identiques pour toutes les fibres testées. La variation apparente du potentiel d'activation de I_{SS} ne semble donc résulter que de l'existence de I_L et de son amplitude relative par rapport à I_{K_2} . Il apparaît en effet que pour de faibles dépolarisations imposées, I_{SS} est essentiellement constitué de I_L , ce qui explique que l'activation du courant I_{K_2} puisse être alors difficilement mise en évidence.

Il convient de remarquer en outre que la rectification anormale du courant retardé, décrite pour de nombreux tissus tels que les fibres auriculaires de grenouille (ROUGIER et coll., 1968 a) ou les fibres ventriculaires de Mammifères (BEELER et REUTER, 1970 a), ne se produit pas pour la fibre musculaire de crabe, lorsque des potentiels dépolarisants sont appliqués à la membrane.

En ce qui concerne nos résultats relatifs à la variation du courant de fuite en fonction du potentiel, nous avons pu constater que celle-ci présente une légère rectification pour des potentiels supérieurs à 50 - 55 mV. Ce résultat est en accord avec notre détermination faite en milieu TEA-Mn (voir Fig. 34). De plus, nous avons établi que le courant de fuite était identique au début et en fin d'impulsion de 65 ms de durée, ce fait nous permettant de considérer que notre méthode de détermination de I_{K_2} nous conduit à des mesures assez exactes.

II - Variation de la conductance potassique en fonction du potentiel

Connaisant, pour une fibre, la valeur du courant I_{K_2} et le potentiel d'inversion V_K de ce courant, il est possible de déterminer la conductance potassique pour chaque potentiel choisi. Cette conductance peut être traduite par l'équation :

$$g_{K_2} = \frac{I_{K_2}}{V - V_K}$$

1°) Résultats

Les résultats obtenus pour les mesures de g_{K_2} sur cinq fibres différentes sont rassemblés à la figure 53. Pour chacune de ces fibres, V_K a été déterminé selon la technique décrite précédemment (voir Fig. 54).

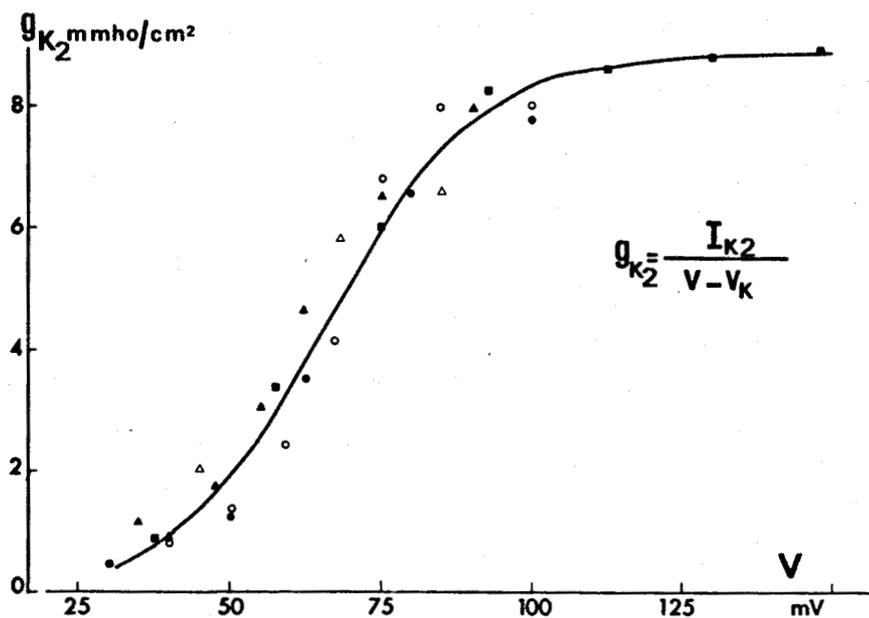


Figure 58 : Relation entre la conductance potassique spécifique du courant retardé et le potentiel imposé V .

I_{K_2} est le courant maximal sortant déterminé selon le procédé indiqué à la figure 57.

V_K est le potentiel d'inversion du courant retardé déterminé selon le procédé indiqué à la figure 54.

Les points correspondent aux mesures obtenues à partir des enregistrements de la figure 53 A et 57 (Fibre 109) avec $V_K = + 5$ mV

Autres symboles : résultats obtenus sur 4 autres fibres.

La conductance potassique est activée dans une gamme de potentiels compris entre + 30 et + 90 mV. Pour des potentiels supérieurs, g_K est maximale. Ce maximum correspond pour les différentes fibres à des valeurs se situant entre 6,5 et 9 μmho .

2°) Conclusion

Une variation comparable de g_K du courant retardé en fonction du potentiel a été décrite par KEYNES et coll. (1973) pour la fibre musculaire de barnacle. De plus, en admettant que la surface de la portion de fibre dans le compartiment test est d'environ 10^{-3}cm^2 , g_K peut être considérée égale à 6,5 à 9 mmho/cm^2 . Ce résultat est en accord avec les mesures proposées par KEYNES et coll. comprises entre 4 et 13 mmho/cm^2 .

III - Paramètres d'activation du courant I_{K2} : mesures en solution ASW.

La dépendance vis à vis du potentiel et du temps de l'activation du courant retardé a été étudiée en analysant les courants de queue par la méthode décrite par NOBLE et TSIEN (1969) pour les courants sortants enregistrés sur les fibres cardiaques du tissu de Purkinje.

1°) Dépendance vis à vis du potentiel

Pour chaque potentiel imposé, la valeur instantanée I_0 du courant de queue est déterminée graphiquement par extrapolation de la droite obtenue en reportant en coordonnées semi-logarithmiques les amplitudes du courant de queue au cours du temps.

Des dépolarisations d'amplitude variable sont imposées pendant 60 ms environ de façon à activer le courant retardé jusqu'à son amplitude maximale stable. Le niveau de repolarisation est choisi égal à E_R (c'est à dire au HP initial), lorsque les courants de queue sont nettement sortants, ou est déplacé vers les dépolarisations lorsque l'amplitude de ces courants de queue apparaît trop faible donc difficilement mesurable à E_R .

Pour les différents courants de queue consécutifs aux dépolarisations d'amplitude variable présentées à la figure 53 A, une famille de droites parallèles est obtenue (Fig. 59). La constante de temps de celles-ci est égale à 9,5 ms et correspond dans cette expérience à la valeur de la désactivation à E_R . Cette valeur est indépendante de l'amplitude de la dépolarisation imposée et se situe pour différentes fibres entre 6,5 et 10 ms.

La dépendance vis à vis du potentiel de la variable d'activation est illustrée à la figure 60 A (cercles). Nous avons représenté sur le même graphique les résultats obtenus sur une autre fibre pour laquelle nous avons choisi un niveau de repolarisation égal à + 25 mV

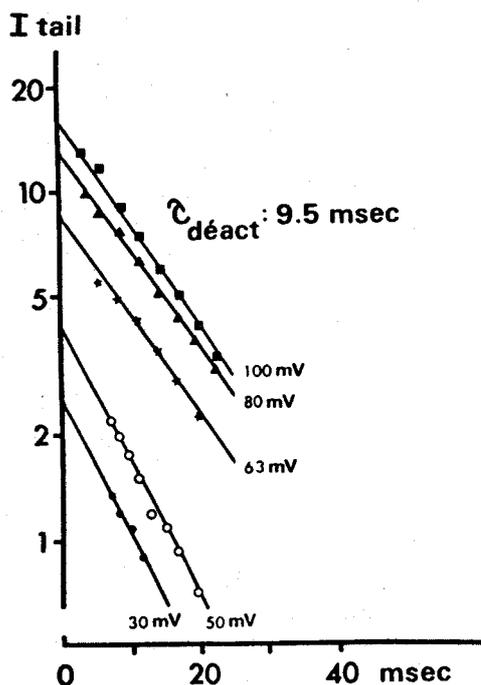


Figure 59 : Analyse semi-logarithmique des courants de queue enregistrés au niveau de polarisation égal à E_R , après des impulsions d'amplitudes variables interrompues au moment où le courant sortant est maximal. Les amplitudes de chaque impulsion sont indiquées à l'extrémité des droites.

Noter que la désactivation du courant sortant s'effectue selon une exponentielle simple dont la constante de temps est indépendante de l'amplitude de l'impulsion.

Fibre 109 (voir précédemment).



(points). n_{∞} varie entre 0 et 1 dans une large gamme de potentiels compris entre + 25 et + 100 mV. Nous remarquons qu'au potentiel de repos $n_{\infty} = 0$ et que la valeur de demi-activation $n_{\infty} = 0,5$ correspond à un potentiel imposé de 63 mV.

2°) Détermination de la constante de temps d'activation

La constante de temps τ_n a été calculée, pour chaque potentiel, en reportant en coordonnées semi-logarithmiques la différence entre l'amplitude maximale du courant retardé (I_{∞}) et l'amplitude de ce courant à différents temps (I). Les relations obtenues sont linéaires et leurs pentes différentes permettent de déterminer τ_n pour chaque potentiel. Les inverses des constantes de temps τ_n^{-1} sont reportés à la figure 60 B.

Ces mesures étant établies pour la fibre dont l'évolution de la variable n_{∞} en fonction du potentiel est présentée à la figure 60 A (cercles), il est possible de calculer l'évolution des paramètres α_n et β_n . En effet, nous savons que :

$$n_{\infty} = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}$$

et que

$$\tau_n^{-1} = \alpha_n + \beta_n$$

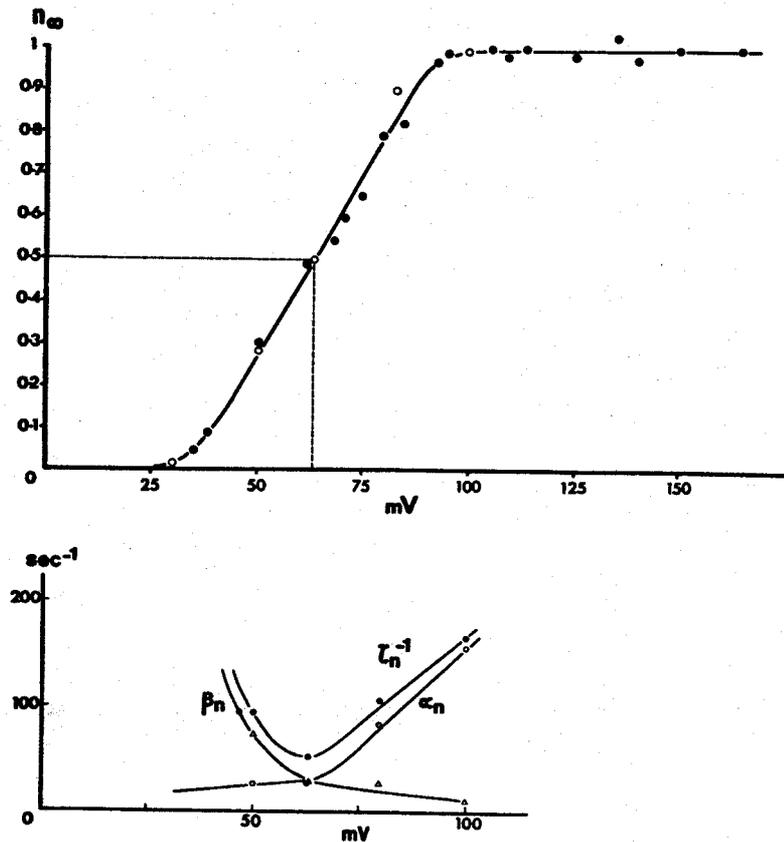


Figure 60 : Caractéristiques d'activation du courant retardé.

- A : Relation entre la variable d'activation n_{∞} et le potentiel.
Les cercles correspondent aux mesures obtenues à partir de la figure 59 (Fibre 109).
- B : Caractéristiques cinétiques du courant sortant retardé en fonction du potentiel imposé.
Les points pour τ_n^{-1} correspondent aux mesures faites sur la fibre 109.
Les cercles et les triangles évidés sont les valeurs correspondantes calculées pour α_n et β_n .

L'évolution de α_n et β_n s'effectue selon des fonctions monotones de E_m . Leur intersection se produit pour $V = 62$ mV, ce qui concorde avec la valeur de V correspondant à n_∞ de demi-activation et que nous avons déterminée égale à 63 mV.

3°) Conclusion

Il ressort de nos analyses semi-logarithmiques de l'activation du courant retardé ou de sa désactivation au niveau des courants de queue que les relations obtenues sont linéaires et ne présentent qu'une seule phase. Ceci traduit donc l'existence d'une seule composante dans le courant retardé.

Ce résultat diffère de celui obtenu par ADRIAN et coll. (1970 a-b) sur la fibre musculaire de grenouille pour laquelle deux composantes peuvent être mises en évidence. BROWN et NOBLE (1969 a-b) ont également décrit deux composantes dans le courant retardé enregistré sur l'oreillette de grenouille. De même, NOBLE et TSIEN (1969) ont précisé que, dans la gamme des potentiels du plateau du PA des fibres de Furkinje, le courant sortant activé correspond à la somme de deux exponentielles. Sur la fibre musculaire de crabe, seule une expérience nous a permis de détecter deux composantes bien que les conditions expérimentales soient identiques à celles fixées pour toutes les autres préparations. Il ne semble donc pas que notre analyse du courant retardé nous permette

d'effectuer une distinction entre deux sortes de préparations comme ont pu le faire OJEDA et ROUGIER (1974). Le courant I_{K2} mesuré pourrait être comparé au courant retardé rapide décrit par ADRIAN et coll. (1970 a), ILDEFONSE et ROUGIER (1968), ROUGIER et coll. (1968 a) sur la fibre musculaire de grenouille.

Comme nous l'avons expliqué au début de ce chapitre, nos études du courant retardé ont été réalisées préférentiellement sur des fibres de type I. Pour deux préparations de type II testées, les résultats sont identiques à ceux obtenus pour les fibres du type I. En particulier, la désactivation du courant retardé à la fin d'impulsions de 70 et 80 ms s'effectue selon une exponentielle simple. Ceci confirme notre hypothèse d'une inactivation rapide du courant I_{K1} .

IV - Caractéristiques du courant I_{K2} étudiées en solution ASW + Mn (20 mM)

Un protocole expérimental identique à celui que nous venons de décrire pour l'établissement des paramètres n_{∞} , τ_n , α_n et β_n est répété sur une fibre placée successivement en solution ASW + Mn.

Pour cette fibre, dont certains enregistrements ont été présentés à la figure 28, le courant de queue, lors de la repolarisation à E_R était assez nettement sortant.

1°) Variable d'activation n_{∞}

Nous avons signalé qu'en présence d'ions Mn^{++} , le courant retardé ainsi que les courants de queue sont diminués. La figure 61 montre l'évolution de l'amplitude (portée en coordonnée logarithmique) des courants de queue au cours du temps pour différents potentiels imposés, en milieu ASW et ASW + Mn.

Nous constatons que la désactivation de ces courants s'effectue dans les deux cas selon des exponentielles simples dont les constantes de temps sont égales à 8 et 6,5 ms.

L'amplitude maximale I_0 du courant de queue instantané à la rupture du potentiel est nettement inférieure, pour un potentiel identique, en solution Mn qu'en solution ASW. Les différentes valeurs de I_0 en fonction de V traduisent la dépendance vis à vis du potentiel de la variable d'activation n_{∞} (Fig. 62 A). La demi-activation est obtenue en solution ASW pour un potentiel imposé de 65 mV, valeur en accord avec celle de 63 mV déterminée précédemment sur une autre fibre (voir Fig. 60). En présence d'ions Mn^{++} , le potentiel de demi-activation devient égal à 76 mV. La relation $n_{\infty} : f(V)$ se trouve dans ce cas déplacée, d'environ 10 mV dans le sens des dépolarisations. Sur deux autres fibres, un déplacement identique de la courbe de n_{∞} a été enregistré.

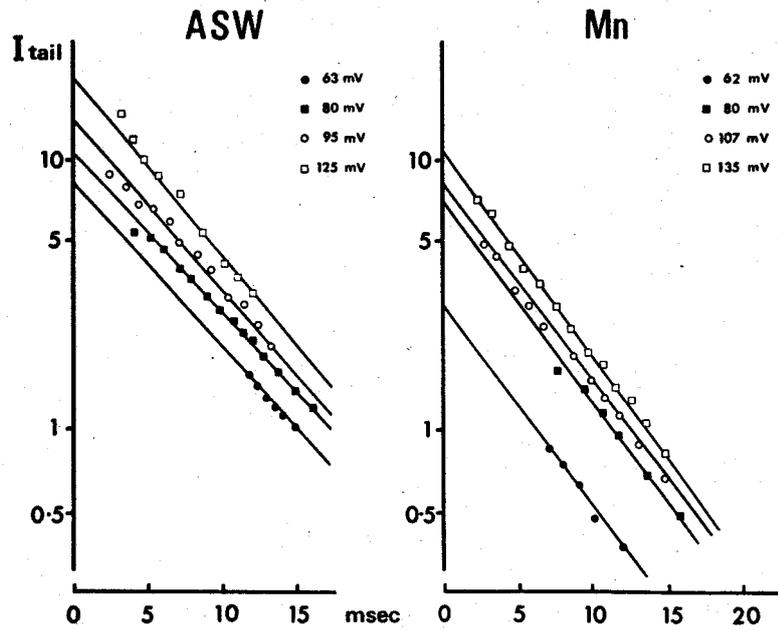


Figure 61 : Analyse semi-logarithmique des courants de queue (même procédé qu'à la figure 59) pour une fibre placée successivement en solution ASW et en solution Mn.

Noter l'amplitude plus faible des courants de queue en solution Mn.

Fibre 2504 (voir précédemment Fig. 28 et 29).



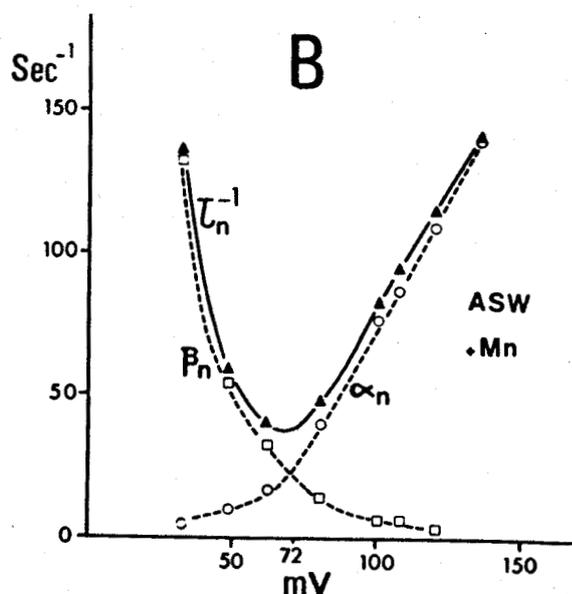
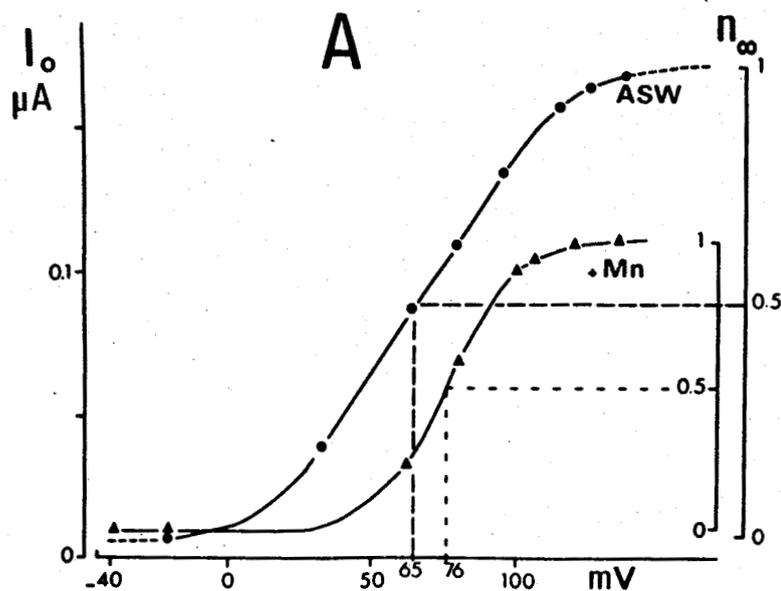


Figure 62 : Caractéristiques d'activation du courant retardé établies pour la fibre 2504.

- A - Relation entre la variable d'activation n_{∞} et le potentiel imposé. Mesures en solution ASW (cercles) et en solution Mn (triangles). Noter la translation vers la droite de la relation en solution Mn et les valeurs plus faibles pour I_0 . Les amplitudes maximales sont normalisées à 1. Le potentiel de demi-activation ($n_{\infty} = 0,5$) est de 65 mV en solution ASW et est déplacé à 76 mV en présence d'ions Mn.
- B - Caractéristiques cinétiques établies en solution Mn.

2°) Constante de temps d'activation

Elle est déterminée sur cette même fibre en solution ASW + Mn. Les inverses des constantes de temps mesurées sont portées en fonction du potentiel imposé (Fig. 62 B). Le minimum de τ_n^{-1} se produit pour $V = 72$ mV, ce qui concorde assez bien avec le potentiel de 76 mV correspondant à $n_\infty = 0,5$. Il est à noter qu'en solution ASW nous avons observé ce minimum de τ_n^{-1} pour $V = 62$ mV (voir Fig. 60 B).

3°) Conclusion - Discussion relative à l'effet des ions Mn⁺⁺

Il apparaît que l'addition d'ions Mn⁺⁺ provoque une modification de l'activation du courant retardé vis à vis du potentiel imposé mais n'influence pas sensiblement la cinétique d'activation de ce courant. En effet, la déactivation se produit selon des constantes de temps voisines en absence ou en présence de Mn. En outre, les relations obtenues correspondent dans les deux cas à des exponentielles simples laissant supposer que le courant initial est déjà fortement inactivé à la fin d'impulsions d'environ 60 ms et ne peut être retrouvé au niveau du courant de queue.

Nos résultats montrant par contre l'influence des ions Mn⁺⁺ sur la variation de l'activation du courant retardé en fonction du potentiel. La diminution de l'am-

plitude maximale du courant retardé et la diminution des courants de queue sont à associer au déplacement de la courbe d'activation de n_{∞} d'environ 10 mV dans le sens des dépolarisations. Un déplacement identique a déjà été décrit par FRANKENHAEUSER et HODGKIN (1957) dans le cas des milieux hypercalciques.

Il est connu que le champ électrique contrôlant les paramètres d'activation et d'inactivation est modifié par l'addition de charges positives à la surface externe de la membrane (HUXLEY, 1959). Nos résultats expérimentaux semblent donc pouvoir être interprétés de façon analogue : un excès de cations à double charge provoquerait une diminution du courant retardé par déplacement de la courbe d'activation de ce courant dans une direction dépolarisante. D'ARRIGO (1973) décrit un effet similaire sur l'axone d'écrevisse lorsque des ions métalliques polyvalents sont présents dans la solution externe.

De plus, cette interprétation semblerait également de nature à rendre compte des résultats obtenus dans une autre condition expérimentale, lorsque nous avons choisi de remplacer le calcium de la solution externe par des ions Sr^{++} (voir chapitre III). Dans ce cas, nous avons enregistré un allongement du P.A. et une diminution du courant retardé qui pourraient s'expliquer par une variation de la courbe d'activation de ce courant potassique comparable à celle que nous venons d'étudier.

V - Etude de l'évolution de la conductance potassique au cours du temps.

1°) Principes des déterminations théorique et expérimentale de g_{K_2} , pour un potentiel donné

Connaissant maintenant les paramètres d'activation du courant retardé, il doit être possible de comparer la variation théorique de la conductance g_{K_2} du courant retardé I_{K_2} à sa variation mesurée d'après nos expériences.

La variation expérimentale de g_{K_2} peut être déterminée, de façon très simple, à partir des mesures de I_{K_2} à différents temps, pour un potentiel donné, selon l'équation :

$$g_{K_2} = \frac{I_{K_2}}{V - V_K}$$

V_K étant obtenu selon le processus précisé précédemment.

La variation théorique de g_{K_2} peut être prévue dans le cadre de la théorie d'HODGKIN - HUXLEY. A chaque instant, g_{K_2} sera égale à :

$$g_{K_2} = \bar{g}_{K_2} \left[n_0 + (n_\infty - n_0) (1 - e^{-t/\tau_n}) \right]^x$$

Dans cette équation \bar{g}_{K_2} est la conductance potassique maximale du courant retardé, n_0 , n_∞ , τ_n ont leurs significations définies précédemment.

2°) Résultats

La variation de g_{K_2} est mesurée expérimentalement à partir des enregistrements obtenus sur la fibre pour laquelle différents paramètres ont déjà été établis (voir Fig. 53 A - 57 - 58 et 60, cercles). Pour cette fibre nous avons également déterminé V_K égal à + 5 mV (par rapport à $HP = E_R$). Les valeurs de g_{K_2} sont calculées pour des potentiels de + 80 et + 100 mV et indiquées par des points sur les graphiques de la figure 63.

Les calculs théoriques de g_{K_2} pour ces mêmes potentiels sont effectués en prenant :

$$n_{\infty} = 0,76 \quad \text{et} \quad \tau_n^{-1} = 108 \quad \text{pour } V = 80 \text{ mV}$$

et

$$n_{\infty} = 0,97 \quad \text{et} \quad \tau_n^{-1} = 160 \quad \text{pour } V = 100 \text{ mV}$$

Les courbes sont tracées à la figure 63 à partir de ces mesures théoriques.

3°) Conclusion

Une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques sont obtenues lorsqu'un exposant 1 est affecté à l'équation théorique. Ce résultat montre que l'évolution du courant retardé s'effectue selon une cinétique du premier ordre. Ceci diffère notablement de la variable n^4 déterminée pour la fibre nerveuse (HODGKIN et HUKLEY, 1952 d) ou de n^2 obtenue pour différentes autres structures excitables telles que les fibres

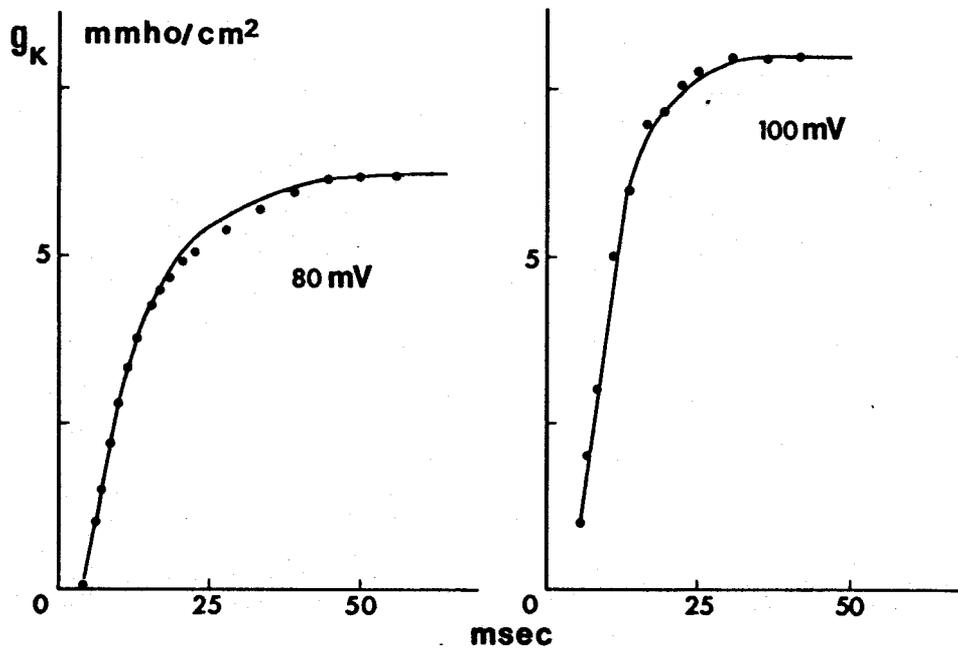


Figure 63 : Variations de la conductance potassique retardée au cours du temps pour deux dépolarisations imposées de 80 et 100 mV (Fibre 109 voir précédemment).

Les points correspondent aux valeurs expérimentales obtenues d'après la relation

$$g_{K_2} = \frac{I_{K_2}}{V - V_K}$$

avec $V_K = +5 \text{ mV}$ sur cette fibre.

Les courbes sont tracées à partir des valeurs calculées d'après l'équation : $g_K = \bar{g}_K \cdot n$ (voir texte).



auriculaires de grenouille (DE HEMPTINNE, 1971).

Toutefois, un résultat analogue a été décrit pour une composante lente par NOBLE et TSIEN (1968) sur les fibres de Purkinje et par BROWN et NOBLE (1969 b) sur les fibres auriculaires de grenouille.

C - MISE EN EVIDENCE DU PROCESSUS D'INACTIVATION DU
COURANT RETARDE

Pour des potentiels imposés d'une durée généralement supérieure à 100 ms, une diminution du courant retardé a été observée. Des résultats analogues ont déjà été signalés pour de nombreuses autres cellules (ADRIAN et coll., 1966 ; EHRENSTEIN et GILBERT, 1966). Différents travaux permettent maintenant d'expliquer ce phénomène. Deux mécanismes indépendants, capables cependant de se produire simultanément, peuvent être envisagés. Il s'agit :

- soit d'une variation de la conductance du courant retardé correspondant à un processus d'inactivation telle que l'ont décrite CONNOR et STEVENS (1971 a) sur les ganglions d'Aplysie, ou ADRIAN et coll. (1970 a,b) sur les fibres musculaires de grenouille.

- soit d'une variation du potentiel d'inversion du courant retardé, due à un processus d'accumulation des ions transporteurs de ce courant. Une accumulation d'ions K^+ dans un espace extracellulaire restreint a été suggérée sur l'axone de seiche par FRANKENHAEUSER et HODGKIN (1957) et mise en évidence sur les cellules "pacemaking" d'Aplysie par ALVING (1969) et EATON (1972).

Nous nous proposons donc, pour la fibre musculaire de crabe, de déterminer lequel de ces mécanismes rend compte de la diminution du courant retardé.

I - Détermination du processus impliqué dans la diminution du courant retardé.

1°) Contrôle du facteur $(V - V_K)$

a) Protocole expérimental

L'expérience suivante a été réalisée : une dépolarisation V_1 de 85 mV active le courant retardé qui diminue ensuite au fur et à mesure que la durée de V_1 augmente. A la fin de l'impulsion V_1 , nous observons les courants de queue pour deux niveaux de potentiels V_2 et V'_2 choisis symétriques par rapport au potentiel d'inversion V_K du courant retardé. V_K est mesuré selon la méthode décrite précédemment au maximum d'activation du courant retardé. Dans cette expérience V_K correspond exactement à E_R (= HP). V_2 et V'_2 sont choisis égaux à + 35 et - 35 mV de façon à observer des courants de queue nettement développés. Dans ces conditions, nous devons enregistrer au niveau V_2 un courant de queue sortant et au niveau V'_2 un courant de queue entrant. Les mesures des valeurs instantanées de ces courants de queue sont obtenues par extrapolation (au temps $t = 0$ d'établissement de V_2 ou V'_2) de l'enveloppe des amplitudes du courant de queue : $I_t - I_\infty$, I_∞ étant le niveau stable du courant de queue. La comparaison des amplitudes de ces courants de queue pour une durée donnée de V_1 nous permettra de déterminer si $(V - V_K)$ est restée constante quelle que soit la durée de V_1 .

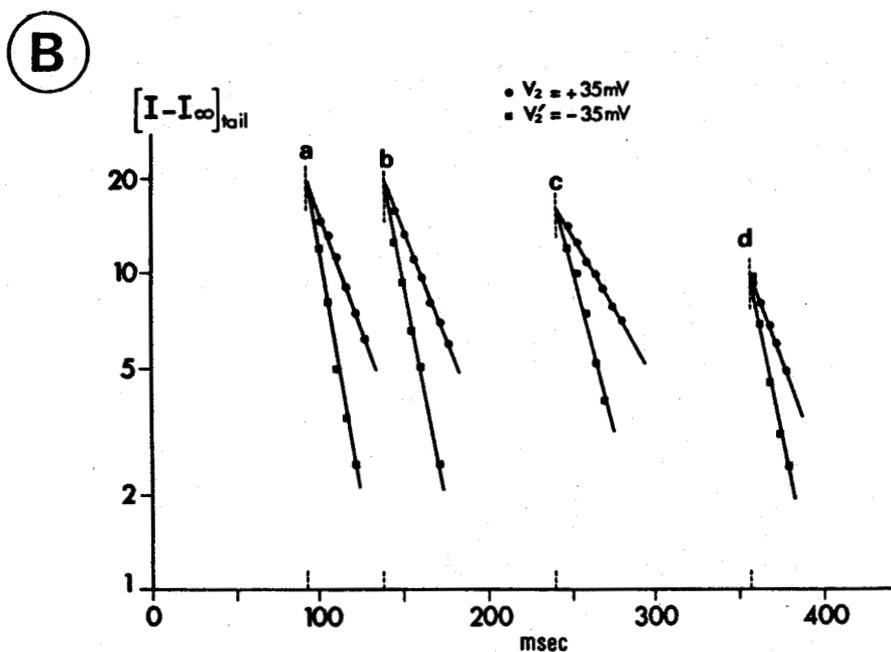
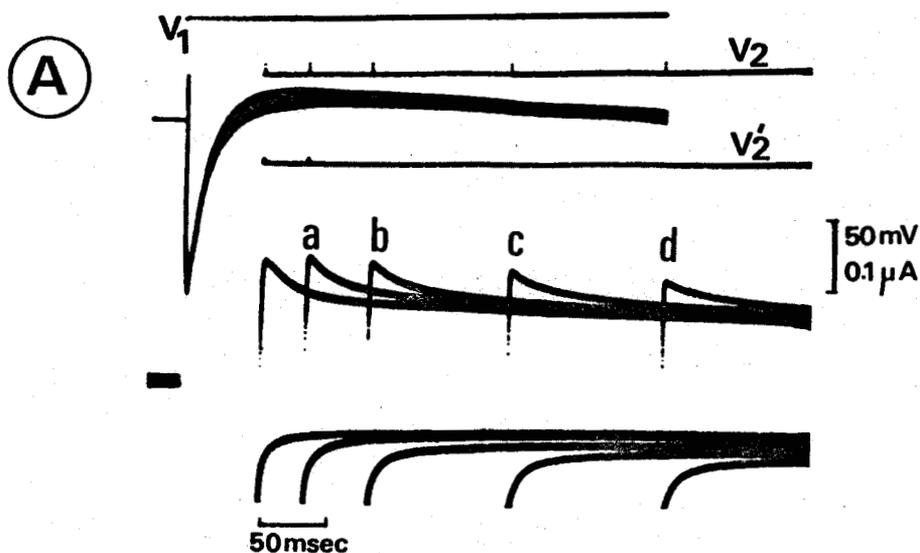


Figure 64 : Influence de la durée d'une dépolarisation $V_1 = 85 \text{ mV}$ sur le décroît du courant retardé et des courants de queue.

A : Enregistrement des courants de queue à la fin du potentiel conditionnant V_1 de 96 ms (a), 140 ms (b), 244 ms (c) et 360 ms (d) lorsque le potentiel de membrane est ramené à deux niveaux : $V_2 = +35 \text{ mV}$ (courants de queue sortants) et $V'_2 = -35 \text{ mV}$ (courants de queue entrants).

B : Analyse semi-logarithmique des amplitudes de ces courants de queue : $(I - I_\infty)_{\text{tail}}$ au cours du temps.

Les pointillés verticaux indiquent les différents temps 0 de la rupture de l'impulsion V_1 permettant de déterminer I_0 . Remarquer que I_0 est le même, pour chaque durée de V_1 que V_2 soit égal à $+35$ ou à -35 mV . La constante de temps de déactivation des courants de queue sortants est de 30-40 ms, celle des courants de queue entrants d'environ 15 ms.

Fibre 107.

b) Résultats

Pour un potentiel V_1 de 96 ms de durée permettant l'activation complète du courant retardé (Fig. 64 A - enregistrement a), les valeurs absolues de I_0 pour V_2 et V'_2 sont égales (Fig. 64 B - a). Ce résultat confirme la bonne polarisation membranaire déterminée pour $V_K = E_R$. Les deux "driving-force" ($V_2 - V_K$) et ($V'_2 - V_K$) sont donc bien égales.

Lorsque la durée de V_1 augmente, le courant retardé diminue et nous observons une diminution des courants de queue sortants ou entrants qui est d'autant plus nette que V_1 est plus durable (Fig. 64 A - b c d). Les mesures de I_0 aux niveaux V_2 et V'_2 sont effectuées lorsque V_1 est interrompue après 140 ms (enregistrement et mesures b), 244 ms (enregistrement et mesures c) et 360 ms (enregistrement et mesures c). L'analyse semi-logarithmique des courants de queue (Fig. 64 - B - b c d) indique que le courant instantané I_0 est le même (en valeur absolue), que le courant de queue soit sortant ou entrant, et ceci, pour chaque durée de V_1 fixée.

c) Conclusion

Ce résultat montre donc que les deux "driving-force" ($V_2 - V_K$) et ($V'_2 - V_K$) sont restées égales indépendamment de la durée de V_1 . Si V_K avait été déplacé par suite d'une accumulation d'ions K^+ nous aurions dû trouver une valeur de I_0 au niveau V'_2 supérieure à I_0 .

au niveau V_2 . L'égalité de I_0 à V_2 et V'_2 permet donc de prévoir qu'un mécanisme d'accumulation ne semble pas être mis en jeu. Puisque I_0 décroît au fur et à mesure que la durée de V_1 augmente, nous sommes amenés à considérer que la diminution du courant retardé résulte d'une variation de conductance.

2°) Contrôle du facteur g_K

a) Protocole expérimental

L'expérience va consister maintenant à mesurer les valeurs instantanées I_0 des courants enregistrés à différents niveaux V_2 de potentiels, appliqués après un premier potentiel V_1 d'une amplitude de 90 mV et de durées égales à 85 et 1200 ms. Cette méthode que nous avons déjà décrite pour déterminer le potentiel d'inversion du courant retardé (voir Fig. 54) nous permet de tracer deux courbes traduisant la relation entre les valeurs du courant instantané et V_2 , d'une part après 85 ms et d'autre part après 1200 ms. La pente de ces relations sera fonction de la conductance pour le potentiel de commande V_1 à ces deux temps. De plus, l'intersection de ces droites avec l'axe des potentiels V_2 nous permettra de contrôler si V_K est demeuré inchangé après 1200 ms comme le résultat précédent nous incite à le croire. Si g_K a varié, les deux relations (à 85 et 1200 ms) devront avoir des pentes différentes.

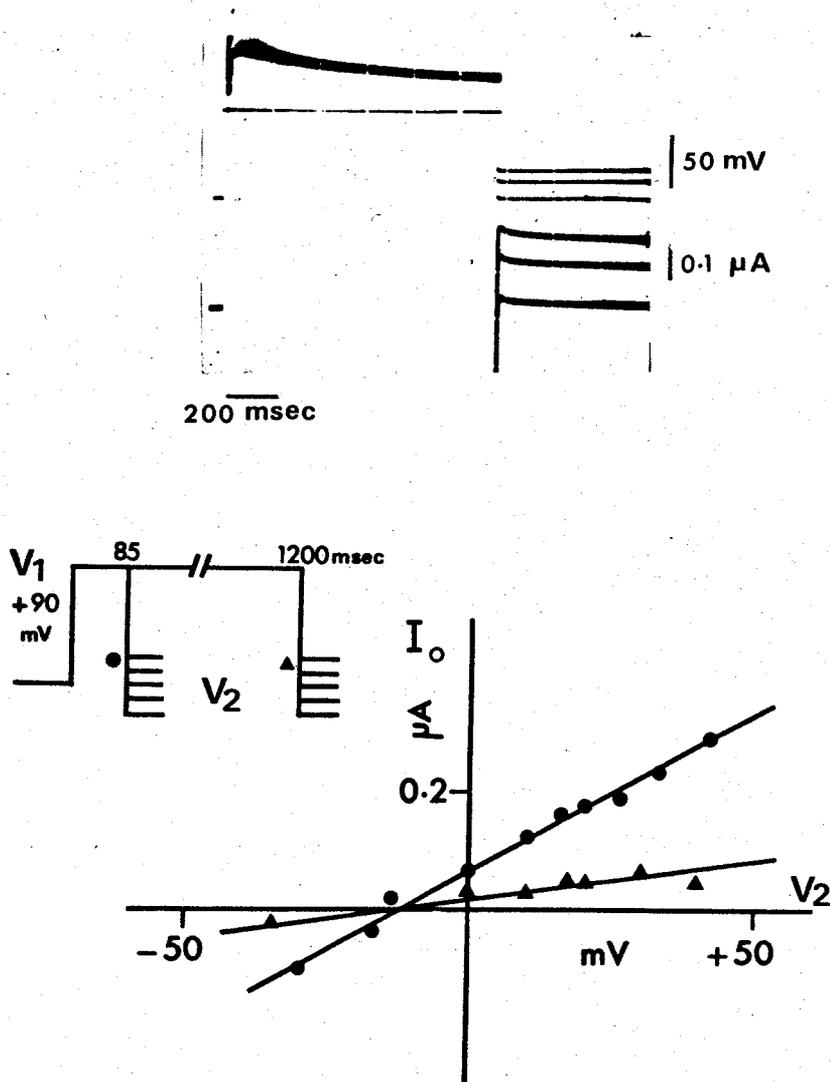


Figure 65 : Détermination du potentiel d'inversion du courant retardé à la fin d'une impulsion de longue durée (1200 ms).

Même procédé et même fibre qu'à la figure 54.

Remarquer que les deux relations se croisent pour la même valeur de potentiel et que leurs pentes sont différentes.

b) Résultats (Fig. 65)

Lorsque V_1 a une durée de 85 ms, nous obtenons le potentiel d'inversion du courant retardé pour un potentiel V_2 égal à - 12 mV par rapport à E_R . La relation courant-instantané I_0 en fonction de V_2 est linéaire.

Lorsque le même potentiel V_1 a une durée de 1200 ms, nous constatons qu'une nouvelle relation linéaire courant instantané - potentiel V_2 est obtenue mais que le potentiel d'inversion demeure inchangé. La nouvelle pente de la relation obtenue traduit une diminution de la conductance après 1200 ms d'un facteur 4 par rapport à sa valeur après 85 ms. Sur d'autres fibres, ce facteur de diminution de la conductance varie entre 3 et 4.

c) Conclusion

Cette expérience nous permet donc de confirmer que la diminution du courant retardé résulte d'une inactivation de la conductance potassique. Dans une expérience, cette inactivation a été accompagnée d'une légère accumulation potassique. En effet, nous avons obtenu une valeur de V_K à la fin d'une impulsion de 1000 ms déplacée de 5 mV dans le sens des dépolarisations. Une légère accumulation d'ions K^+ dans un espace restreint, en dehors du système tubulaire transverse, et ne représentant que 1/3 ou 1/6 du volume d'une fibre musculaire de grenouille, a été décrite par ADRIAN et coll. (1970 a) mais, sur la fibre musculaire de crabe, il est certain que le facteur

déterminant dans la diminution du courant retardé est l'inactivation de ce courant.

II - Constantes de temps d'inactivation

Nous n'entreprendrons pas ici une étude détaillée de la variation des constantes de temps en fonction de V dans la mesure où :

- i) il est difficile d'appliquer sur une même fibre un grand nombre d'impulsions de longue durée afin de contrôler une large gamme de potentiels
- ii) rares sont les fibres développant un courant sortant assez ample pour être mesuré lorsque des dépolarisations faibles sont appliquées.

Nous pouvons toutefois donner une mesure de cette constante de temps pour un potentiel imposé de 85 mV. Les enregistrements de la figure 66 permettent de déterminer assez précisément la constante d'inactivation τ car deux méthodes peuvent être utilisées. La première méthode de détermination de τ consiste à reporter les différentes valeurs de I_0 obtenues en fonction de la durée de V_1 (Fig. 66 - carrés). La deuxième méthode revient à mesurer à différents temps la différence entre l'amplitude du courant retardé I et l'amplitude de ce courant à l'état stable I_∞ à la fin de l'impulsion de longue durée (Fig. 66 - points).

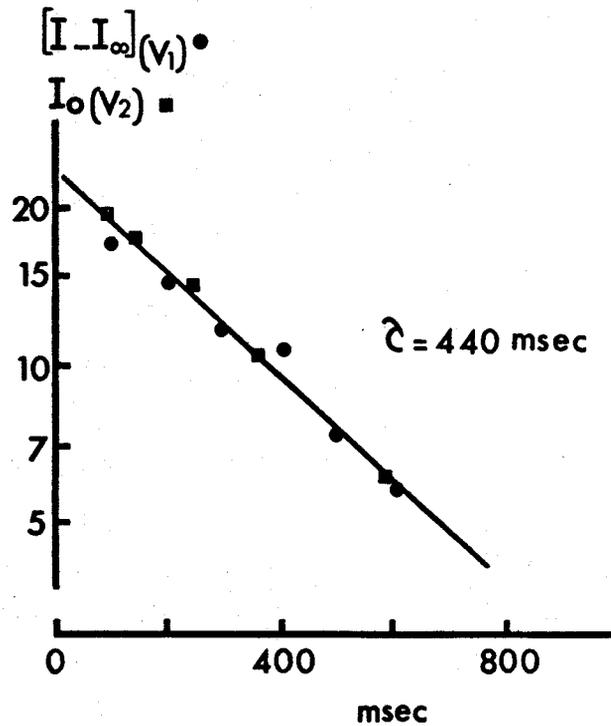


Figure 66 : Détermination de la constante de temps d'inactivation pour un potentiel imposé de 85 mV dont les enregistrements sont présentés à la figure 66 (Fibre 107). Report semi-logarithmique, en fonction de la durée de l'impulsion, des amplitudes de I_0 déterminées précédemment (carrés) et des amplitudes du courant retardé ($I - I_\infty$), I_∞ étant pris à 1200 ms (points).

Les mesures obtenues par ces deux méthodes, reportées en coordonnées semi logarithmiques, s'alignent sur une même droite dont la pente permet de mesurer $\tau = 440$ ms. Il est à noter que cette inactivation s'effectue selon une exponentielle simple.

D - CONCLUSION

Nous avons étudié dans ce chapitre le courant retardé sortant. Ce courant apparaît essentiellement potassique. La conductance potassique est activée dans une large gamme de potentiels compris entre + 30 et + 100 mV. Au potentiel de repos, l'activation de ce courant est nulle. En outre, les cinétiques d'activation de ce courant sont relativement rapides, ce qui permet de supposer que pour des valeurs de potentiels assez élevées, ce courant intervient déjà légèrement au cours de la phase de dépolarisation. Cependant, cette cinétique d'activation ne semble pas suffisamment rapide pour pouvoir rendre compte de la repolarisation rapide des potentiels de courte durée observés sur les fibres de type II.

Enfin, le processus d'inactivation mis en évidence sur la fibre musculaire de crabe, nous permet de retrouver un résultat identique à celui obtenu sur la fibre musculaire de grenouille (NAKAJIMA et coll., 1962 ; HEISTRACHER et HUNT, 1969 ; STANFIELD, 1970 a) mais différant quelque peu des résultats signalés pour l'axone de seiche dans la mesure où ce courant sortant s'inactive assez rapidement et complètement. Toutefois, nous n'avons pas observé, pour les impulsions appliquées inférieures à 2 secondes, une deuxième composante telle que la décrit ADRIAN et coll. (1970 a, b) et STANFIELD (1970 a). Selon ces auteurs, la constante de temps de cette deuxième composante serait environ 9 fois supérieure à la constante

de temps de la première composante comparable à celle que nous enregistrons. Il est possible qu'une composante lente puisse également exister sur la fibre musculaire de crabe et être démasquée à condition d'appliquer des impulsions de très longue durée.

- CHAPITRE VI -

ELEMENTS D'INTERPRETATION DU ROLE
DES IONS Cl^- DANS LE DEVELOPPEMENT
DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE

A - INFLUENCE D'UN MILIEU $[Cl]_e = 0$ SUR L'ACTIVITE

ELECTRIQUE

I - Substitution du chlore par du propionate

- 1°) Enregistrements en courant imposé
- 2°) Enregistrements en potentiel imposé
- 3°) Conclusion

II - Substitution des ions Cl^- par NO_3^-

- 1°) Résultats en courant et potentiel imposés
- 2°) Conclusion

III - Discussion

B - DETERMINATION DE L'INFLUENCE DE LA POLARISATION

MEMBRANAIRE SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'ACTIVITE

EN MILIEU PAUVRE EN CHLORE

I - Etude de la variation de f_∞ du courant calcique en fonction du potentiel en milieu propionate

II - Etude de la variation de f_∞ du courant calcique en fonction du potentiel en milieu nitrate

III - Etude de la variation de n_∞ du courant retardé en fonction du potentiel en milieu propionate

IV - Confirmation des résultats obtenus pour f_∞ par les observations de FATT et KATZ (1953) substitution de NaCl par du sucre.

V - Possibilité de faire apparaître une
activité électrique en milieu pauvre en chlore.

C - CONCLUSION

En milieu dépourvu de chlore, l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe disparaît (FATT et KATZ, 1953 ; HAUDECOEUR, 1971). HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974 a) considèrent que ce phénomène peut résulter d'une variation de la conductance aux ions chlore. GIRARDIER et coll. (1963), REUBEN et coll. (1967) admettent que les ions Cl^- et Ca^{++} pourraient être associés pour transporter le courant critique pour le couplage excitation-contraction. Cependant, nos résultats expérimentaux nous ont conduits à associer la phase de dépolarisation du potentiel d'action, enregistrée en solution ASW, à l'existence d'un courant initial à deux composantes pratiquement simultanées : l'une calcique, l'autre potassique. Ainsi, dans la mesure où nous n'avons pas mis en évidence de courant ionique transporté par les ions Cl^- , il apparaît intéressant de comprendre quel mécanisme peut être responsable de cette disparition de la réponse électrique en absence de chlore. Le but de ce chapitre ne sera donc pas d'effectuer une étude exhaustive de l'influence des ions Cl^- et des différents substituts possibles au NaCl . Dans les expériences présentées, le NaCl de la solution externe est remplacé soit par du nitrate du Na, soit par du propionate de Na, réputé imperméant (REUBEN et coll., 1964 ; GAINER et GRUNDFEST, 1968), ce qui revient à conserver 80 mEq de Cl^- dans la solution externe (solution "Cl 80"). Pour la solution $[\text{Cl}]_e = 0$, les sels suivants : CaCl_2 , MgCl_2 , KCl sont

respectivement remplacés, de façon équimolaire par du propionate de Ca, $MgSO_4$ et $K_2 SO_4$.

A - INFLUENCE D'UN MILIEU $[Cl]_e = 0$ SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE

I - Substitution du chlore par du propionate

1°) Enregistrements en courant imposé

L'application d'un milieu pauvre en chlore ou totalement dépourvu de chlore provoque une brusque dépolarisation membranaire d'environ 20 mV en 1 à 2 minutes suivie d'une repolarisation plus lente amenant le potentiel de membrane, après 15 minutes environ, à une valeur proche de E_R mesuré initialement en solution ASW. D'après des mesures obtenues par microélectrodes sur 18 fibres, le P.R. moyen initial de $65 \pm 0,6$ mV ($m \pm s_m$) devient égal après 15 minutes de milieu $Cl_e = 0$ à $62 \pm 0,15$ mV.

Lorsque des stimulations, même très largement supraliminaires, sont appliquées, l'activité électrique disparaît totalement (Fig. 67).

2°) Enregistrements en potentiel imposé

La figure 67 (B) permet de comparer les courants ioniques enregistrés sur une fibre placée successivement en solution ASW et en solution $[Cl]_e = 0$.

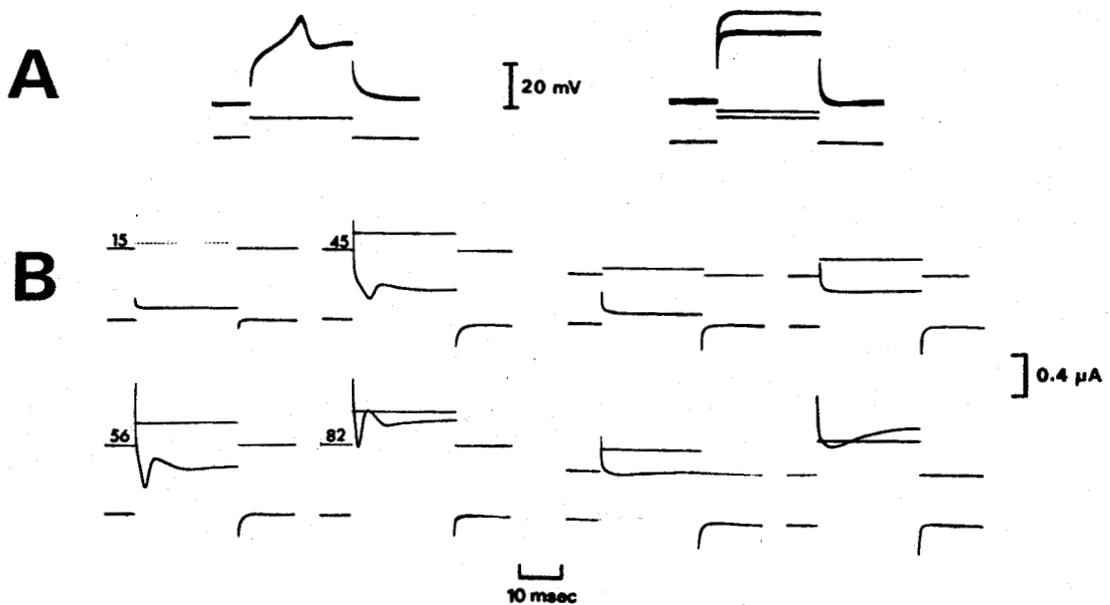


Figure 67 : Enregistrements de l'activité électrique sur une fibre placée successivement en solution ASW et en solution $[Cl]_e = 0$ (NaCl remplacé par du propionate de Na).

A = Enregistrements dans les conditions de courant imposé en ASW (partie gauche) et en milieu $[Cl]_e = 0$ (partie droite).

B = Enregistrements des courants ioniques dans les conditions de potentiel imposé.

Les valeurs des potentiels imposés sont identiques en ASW et en solution Cl 0 et indiquées à gauche de chaque potentiel dépolarisant en solution ASW.

Noter la disparition du courant initial composite (fibre de type II) tandis que le courant retardé demeure inchangé.

Fibre 706.

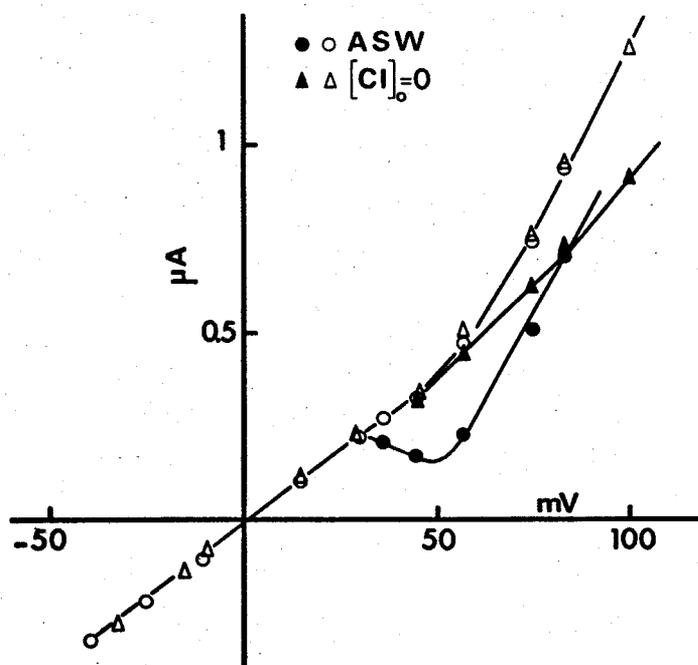


Figure 68 : Courbes courant-potentiel tracées à partir des enregistrements obtenus sur la fibre 706 (voir Fig. 67).

- mesures : au pic du courant entrant en solution ASW (points) ou du courant initial en solution $[Cl]_e = 0$ (triangles pleins).

- mesures en fin d'impulsions en solution ASW (cercles) et en solution $[Cl]_e = 0$ (triangles évidés).

Les enregistrements de référence en ASW sont identiques à ceux décrits pour les fibres de type II. En milieu sans chlore, nous constatons que les deux composantes du courant initial disparaissent. De même, pour des fibres de type I, le courant calcique (seul apparent) disparaît. Par contre, le courant retardé mesuré à la fin d'impulsions de 55 ms demeure inchangé. Il en est de même des courants de queue. Sur certaines fibres et très généralement celles de type I, nous avons pu enregistrer une augmentation du courant sortant retardé et des courants de queue.

Les caractéristiques courant potentiel présentées à la figure 60 mettent en évidence ces différentes observations. En particulier, il est intéressant de remarquer que le courant de fuite n'est pas modifié.

Des résultats rigoureusement identiques sont obtenus en milieu Cl 80, lorsque le propionate de Na remplace NaCl.

3°) Conclusion

Ces résultats confirment les travaux antérieurs relatant la disparition de l'activité électrique en milieu dépourvu de chlore. Dans les conditions de potentiel imposé, la disparition du courant entrant corrobore les observations faites en courant imposé.

Le courant sortant est légèrement augmenté, cet effet étant plus net lorsque les fibres en solution

ASW développent un courant de grande amplitude, fait plus fréquent sur les fibres de type I. Corrélativement, les courants de queue sont nettement augmentés. Un effet dissymétrique comparable, relatif à la variation d'amplitude du courant sortant et des courants de queue avait déjà été décrit en solution Mn. Dans ce cas, nous observions une diminution d'amplitude du courant retardé associée à une diminution plus nette des courants de queue. Ces effets peuvent être attribués à l'amplitude du courant de fuite masquant davantage le courant retardé (puisque I_L est plus forte pour des dépolarisations élevées) que le courant de queue observé à $HP = E_R$.

Enfin, nous avons noté l'absence de variation du courant de fuite en milieu sans chlore par rapport au milieu ASW. Or, nous savons que la suppression du chlore externe entraîne une augmentation de la résistance de membrane de repos qui est alors pratiquement doublée (MOUNIER, 1970). Dans nos conditions de courant imposé, la R_m n'est que très légèrement augmentée. Cette réduction de l'influence des ions Cl^- pourrait résulter d'une variation de la surface membranaire dans le compartiment test, à la suite des fortes contractures survenant au moment de l'application du milieu Cl 0.

II - Substitution des ions Cl^- par NO_3^-

L'influence du nitrate sur les fibres muscu-

lares a déjà fait l'objet de nombreuses études. En particulier, pour la fibre musculaire de crabe, ATWOOD (1968) a décrit les effets de ces ions sur les propriétés électriques et mécaniques et RICHARDS (1969) a déterminé l'efflux de Cl^- en présence d'ions NO_3^- . En milieu pauvre en chlore, les ions NO_3^- pénètrent dans la cellule sans modifier l'efflux de chlore. Les différents résultats obtenus suggèrent que la membrane de la fibre musculaire de crabe est aussi perméable à NO_3^- qu'à Cl^- , en accord avec DE MELLO et HUTTER (1966) pour le muscle d'*Astacus* mais différant des observations de GIRARDIER et coll. (1963) et GRUNDFEST (1967) selon lesquels la perméabilité au nitrate serait inférieure à celle au chlore. Mis à part ces derniers résultats obtenus sur l'écrevisse, la conformité des analyses d'ATWOOD et de RICHARDS pour les fibres de crabe met en évidence une différence de comportement de ces fibres par rapport aux fibres squelettiques ou cardiaques de Vertébrés. En effet :

- sur la fibre musculaire de grenouille, les ions NO_3^- entraînent une diminution de l'efflux de chlore (HARRIS, 1958 ; ADRIAN , 1961 ; MOORE, 1969) et la perméabilité au nitrate est plus faible que celle au chlore (HUTTER et PADSHA, 1959).

- sur la fibre musculaire cardiaque, une augmentation de la g_m est enregistrée (HUTTER et NOBLE, 1961 ; DE MELLO, 1963).

Nous nous sommes donc proposé d'étudier, sur la fibre musculaire de crabe, l'évolution de l'activité électrique et des courants ioniques lorsque le chlore est remplacé par un anion pénétrant à l'intérieur de la cellule.

1°) Résultats en courant et potentiel imposés

La figure 69 présente les enregistrements obtenus sur une même fibre en solution ASW et en solution nitrate (NaCl remplacé par NaNO_3 - 80 mEq de Cl^- subsistent). Sur cette fibre, l'application de la solution nitrate entraîne une hyperpolarisation membranaire de 4 mV, conforme aux hyperpolarisations de 2 à 5 mV mentionnées par ATWOOD (1968). La résistance de membrane est légèrement augmentée. Lorsque des dépolarisations supraliminaires sont appliquées, l'activité électrique demeure (Fig. 69 A).

Dans les conditions de potentiel imposé, nous observons toujours le courant entrant, qui devient plus ample. En outre, sur cette fibre, le courant I_{K_1} qui était nettement apparent en solution ASW ne se produit plus (Fig. 69 B).

2°) Conclusion

Nos résultats expérimentaux apparaissent sensiblement identiques à ceux d'ATWOOD (1968), bien que nous puissions supposer que la membrane soit légèrement

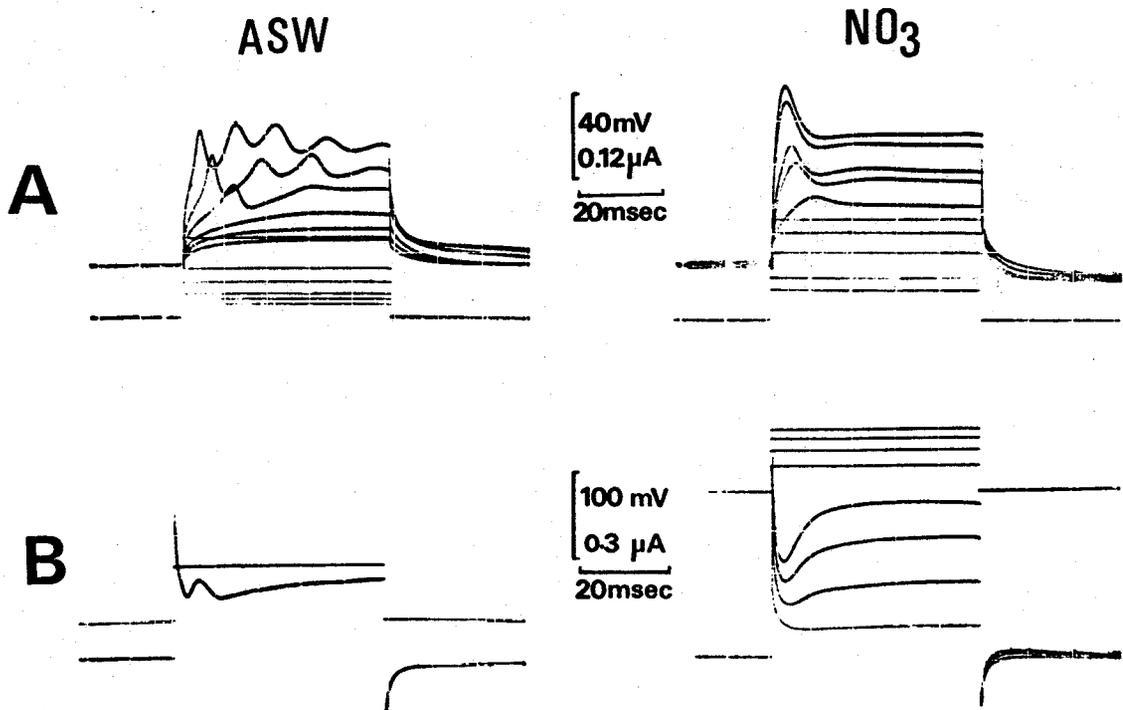


Figure 69 : Influence d'un milieu pauvre en chlore sur l'activité électrique. Substitution de NaCl par NaNO_3 .

A - Enregistrements dans les conditions de courant imposé pour une même fibre placée en solution ASW puis en solution nitrate (" NO_3 ").

B - Enregistrements dans les conditions de potentiel imposé sur cette même fibre.

Fibre 2505.



moins perméable aux ions NO_3^- qu'aux ions Cl^- . Le maintien de l'activité électrique correspond à la permanence du courant entrant que nous enregistrons. L'amplitude accrue de celui-ci pourrait être due à la disparition du courant I_{K_1} .

III - Discussion

La comparaison des résultats en milieu propionate (imperméant) et nitrate (perméant) nous conduit à nous interroger sur le rôle joué par les ions Cl^- . En effet, dans ces deux situations expérimentales, l'efflux de Cl^- se produit mais l'activité électrique diffère.

Les ions Cl^- quittent la cellule associés à des ions K^+ , à un niveau membranaire profond, vraisemblablement à travers la membrane du STT (GIRARDIER et coll., 1963 ; ORENTLICHER et REUBEN, 1971). Cet efflux de KCl serait couplé à une sortie d'eau entraînant précisément le gonflement du STT (GIRARDIER et coll., 1963 ; SELVERSTON, 1967). En outre, GIRARDIER et coll. admettent que l'efflux de Cl^- au niveau du STT provoque une accumulation locale de cations, en particulier Ca^{++} , au niveau des jonctions A - I, sites stratégiques pour initier le couplage excitation-contraction. Confortant ce résultat, CARVALHO (1968) a montré qu'une diminution de $[\text{Cl}]_i$ entraîne un largage de Ca à partir du réticulum sarcoplasmique. Il semblerait donc que la conséquence de la diminution de $[\text{Cl}]_i$ soit une augmentation de

$[Ca]_i$, ce qui justifierait l'apparition des fortes contractions survenant dès le début de l'application des solutions pauvres en chlore et observées également par ATWOOD (1968).

Les effets d'une augmentation de la concentration calcique externe sont connus pour provoquer un déplacement des courbes d'activation et d'inactivation sodique (FRANKENHAEUSER et HODGKIN (1957) dans une direction dépolarisante. Ce phénomène est également observé lorsque la force ionique de la solution interne est diminuée (NARAHASHI, 1963 ; BAKER et coll., 1964 ; MOORE et coll., 1964 ; CHANDLER et coll., 1965).

Nos conditions expérimentales se traduisent par une situation inverse. S'il ne nous est pas possible de mesurer la force ionique de la solution interne, nous pouvons envisager que celle-ci n'a pas été sensiblement modifiée. En effet, l'efflux d'eau permet un réajustement des concentrations ioniques internes et la variation de $[Cl]_i$ (au maximum de 60 mEq) est peu importante par rapport à la somme des concentrations ioniques internes égale à 1100 mEq. L'augmentation de $[Ca]_i$ pourrait donc être préférentiellement la cause des effets observés. Dans ce cas, nous pouvons supposer que les courbes d'activation et d'inactivation de la conductance calcique ont été déplacées et que ce déplacement s'est produit dans une direction hyperpolarisante.

C'est ce que nous nous proposons d'analyser

maintenant pour la variable f_{∞} d'inactivation du courant calcique. Nous testerons également la variation éventuelle de la courbe f_{∞} en milieu nitrate afin de tenter d'expliquer le maintien de l'activité électrique lorsque la fibre est imbibée dans cette solution. En outre, nous contrôlerons la variable n_{∞} d'activation du courant retardé en fonction du potentiel.



B - DETERMINATION DE L'INFLUENCE DE LA POLARISATION
MEMBRANAIRE EN MILIEU PAUVRE EN CHLORE

I - Etude de la variation de f_{∞} du courant
calcique en fonction du potentiel en milieu proproniate
 ($[Cl]_e = 30 \text{ mEq}$).

L'expérience n'est réalisée que lorsque le contrôle dans les conditions de courant imposé montre un retour de E_m à sa valeur initiale ou à une valeur très proche. Lorsque ce retour n'est pas total, la fibre est repolarisée à $HP = E_m$. Dans d'autres expériences, nous avons effectué une imbibition préalable de la fibre pendant une demi-heure dans la solution Cl 30 afin d'éviter la destruction fréquente des ponts de vaseline, provoquée par l'apparition des contractures, lorsque l'imbibition a lieu dans la cuve expérimentale. La solution préconisée pour pallier cet inconvénient présente cependant deux désavantages :

i) nous sommes obligés de considérer dans ce cas qu'après trente minutes, la fibre est bien repolarisée à E_R .

ii) nous ne disposons pas d'enregistrements de référence en solution ASW.

Une série de potentiels dépolarisants et hyperpolarisants par rapport à E_R sont ensuite appliqués. L'impulsion test est de 62 mV et l'amplitude du courant

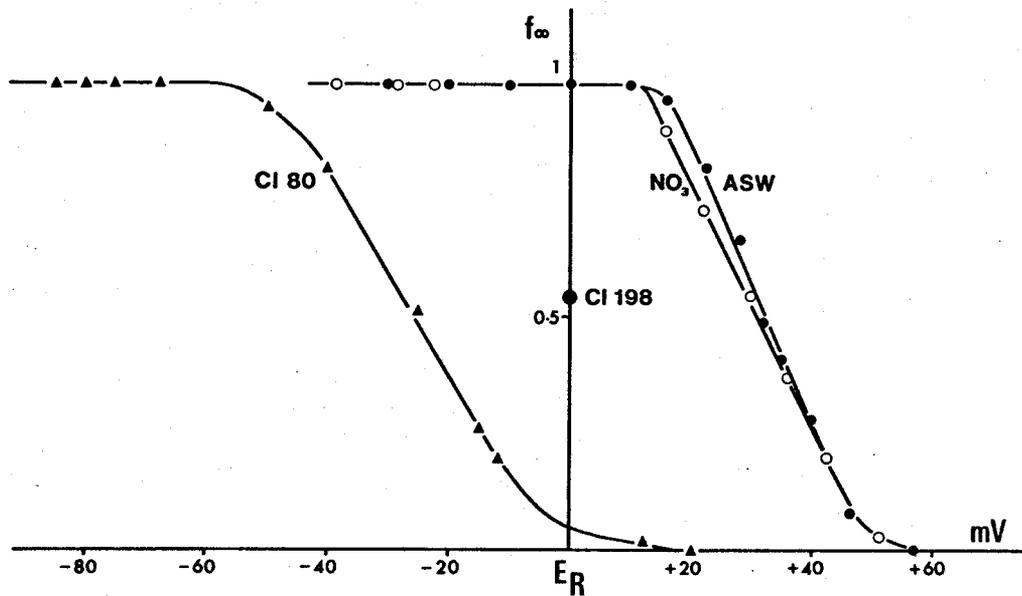


Figure 70 : Evolution de la variable f_∞ en fonction du potentiel

- en solution ASW : $[Cl]_e = 594$ mEq (points)
- en milieu propionate $[Cl]_e = 80$ mEq (triangles)

Ces deux courbes sont obtenues pour la même fibre n° 501.

- en milieu nitrate $[Cl]_e = 80$ mEq (cercles)
(Fibre 2505, voir Fig. 69).
- Le point situé à $f_\infty = 0,55$ correspond à la mesure de FATT et KATZ pour $V = E_R$ lorsque $[Cl]_e = 198$ mEq.

entrant est mesurée par rapport au courant retardé.

Une prédépolarisation ne modifie pas le courant enregistré en milieu Cl 80 correspondant à l'impulsion test et ne permet donc pas de remettre en évidence I_{Ca} . Par contre, des préimpulsions hyperpolarisantes provoquent la réapparition du courant entrant qui devient maximal pour une préhyperpolarisation d'environ 60 mV. La courbe d'inactivation calcique f_{∞} obtenue en milieu Cl 80 comparée à la courbe de f_{∞} en milieu ASW montre que la diminution de la concentration externe de Cl^{-} a provoqué un déplacement de f_{∞} dans le sens des hyperpolarisations. Le potentiel de demi-inactivation de + 32 mV en ASW devient égal à - 25 mV en solution Cl 80 (Fig. 70).

II - Etude de la variation de f_{∞} du courant calcique en fonction du potentiel en milieu nitrate.

La détermination de f_{∞} est établie comme précédemment. Les résultats obtenus en fonction de l'amplitude de la préimpulsion sont reportés, afin de faciliter l'étude comparative, sur la figure 70. Nous constatons qu'en milieu nitrate la demi-inactivation se produit pour un potentiel de 30 mV. Il semblerait donc qu'un léger déplacement de la courbe de f_{∞} se produise, également dans le sens des hyperpolarisations, sans que nous puissions toutefois préciser si le potentiel de demi-

inactivation mesuré en solution nitrate est significativement différent du potentiel de demi-inactivation en solution ASW sur cette même fibre.

III - Etude de la variation de n_{∞} du courant retardé en fonction du potentiel en milieu propionate

Sur la même fibre que celle utilisée pour l'étude de f_{∞} , nous avons mesuré la variable n_{∞} en milieu Cl 80 par l'étude des courants de queue selon la méthode décrite au chapitre précédent (V).

Pour les fibres de type I, où le courant retardé est plus fortement activé, nous avons signalé que celui-ci est augmenté, ainsi que les courants de queue, sous l'effet du milieu Cl 80.

L'évolution de n_{∞} en fonction du potentiel montre que la courbe obtenue est déplacée également dans le sens des hyperpolarisations (Fig. 71). Le potentiel de demi-activation est de 45 mV et, bien que nous ne disposions pas d'enregistrements suffisants en solution ASW pour établir correctement la courbe de n_{∞} sur cette même fibre, la comparaison avec nos résultats du chapitre V nous permet de constater que le déplacement de la courbe est de 15 à 20 mV dans le sens hyperpolarisant.

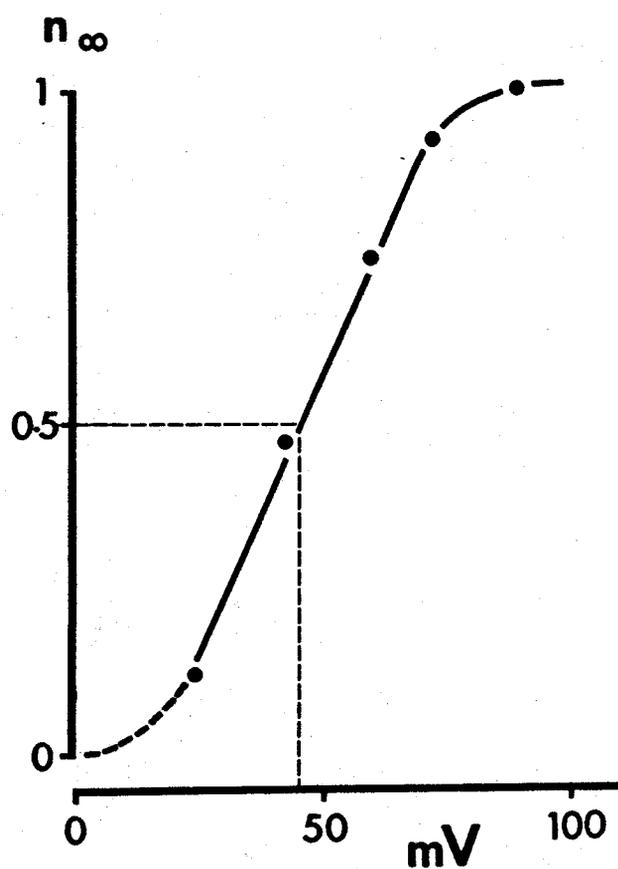


Figure 71 : Evolution de la variable n_{∞} du courant retardé en milieu pauvre en chlore ($[Cl]_e = 80 \text{ mEq}$; NaCl remplacé par du propionate de Na).

Fibre 501 (voir Fig. 70)



IV - Confirmation des résultats obtenus pour
 f_{∞} par les observations de FATT et KATZ (1953).

Substitution de NaCl par du sucrose.

FATT et KATZ (1953) notent dans leur article fondamental la remarque suivante (p. 192) sans pouvoir, à cette date, proposer une interprétation :

"Pour des concentrations intermédiaires (1/4 NaCl + 3/4 sucrose ou 1/3 NaCl + 2/3 sucrose) il demeure une dépolarisation appréciable (réduction du potentiel de repos de 76 à 67 mV) mais beaucoup de fibres restent excitables. Pour certaines d'entre elles, la durée de la phase ascendante du potentiel d'action augmente et le PA atteint la même amplitude ou une amplitude quelque peu supérieure qu'en solution avec $[Na]_e$ normale. La vitesse maximale est toujours moindre en milieu pauvre en Na ; la diminution sur 5 fibres, pour $[Na]_e = 1/3$ de $[Na]_e$ du Ringer, est de 0,55 (variation de 0,37 à 0,7)."

Il est particulièrement intéressant de relier ce résultat à ceux que nous venons de présenter. En effet, la diminution de vitesse de la phase ascendante du PA, dans la mesure où celui-ci garde son amplitude maximale, ne peut être expliquée dans le cadre de la théorie d'HODGKIN - HUXLEY, que par une variation de f_{∞} .

Ainsi, en milieu NaCl = 1/3 soit $[Cl]_e = 198 \text{ mEq}$, nous pouvons considérer qu'à E_R , f_∞ est en moyenne de 0,55. Cette valeur est reportée sur notre graphique de la figure 70.

V - Possibilité de faire apparaître une activité électrique en milieu pauvre en chlore.

Notre observation du déplacement de la courbe de la variable d'inactivation calcique dans le sens des hyperpolarisations en milieu Cl 80 nous permet de supposer, qu'en adaptant notre protocole expérimental, il doit être possible de déclencher une activité électrique. En effet, si nous polarisons la membrane par un courant hyperpolarisant provoquant une variation de E_m d'au moins 60 mV afin de rendre le courant calcique disponible (alors qu'il est presque totalement inactivé à E_R), un courant dépolarisant supraliminaire appliqué immédiatement après, doit permettre d'observer une réponse électrique.

Cette hypothèse de travail se trouve confirmée par les enregistrements de la figure 72 (A) obtenus sur la fibre pour laquelle nous avons déterminé f_∞ en milieux ASW et propionate : Cl 80. Il apparaît que l'activité électrique récupérée est de plus faible amplitude que celle mesurée initialement en solution ASW. Ce résultat était toutefois prévisible. En effet, nous avons montré sur cette même fibre que la variable n_∞ d'activation du courant retardé est également déplacée dans

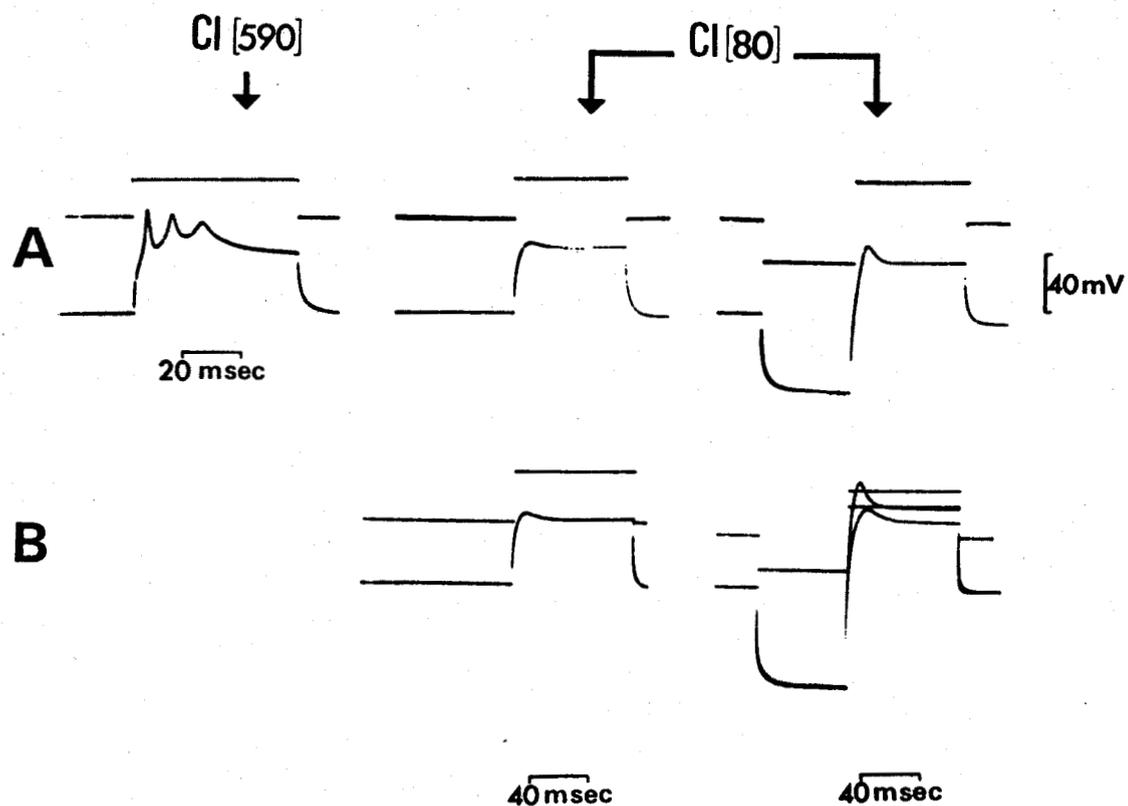


Figure 72 : Possibilité de faire apparaître une activité électrique en milieu Cl 80 (NaCl remplacé par du propionate de Na) lorsqu'une préhyperpolarisation membranaire est imposée.

A - Enregistrements obtenus sur une même fibre placée successivement en solution ASW et Cl 80

(Fibre 501. Voir Fig. 70 et 71).

B - Enregistrements obtenus sur une autre fibre.

le sens d'une hyperpolarisation membranaire. Ainsi, lorsque nous appliquons un courant électrique dépolarisant, non seulement nous activons le courant calcique rendu disponible, mais nous activons également plus fortement le courant potassique.

Les enregistrements B de la figure 75 mettent en évidence des résultats identiques sur une autre fibre, pour laquelle nous n'avons pas de référence en solution ASW.

C - CONCLUSION

Nos analyses des variables d'inactivation calcique et d'activation potassique nous ont permis de montrer qu'en hyperpolarisant la membrane, il est possible d'évoquer la réponse électrique, inexistante à E_R , cette réponse étant cependant "limitée" par l'activation du courant retardé.

Ces effets sont interprétés comme la conséquence de l'existence d'éléments potentiel-dépendants à l'intérieur de la membrane et gouvernant les changements de conductance. Ces éléments, polarisés par des gradients de potentiel locaux, non mesurables par la ddp entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, résulteraient des charges négatives aux limites externe et interne de la membrane. Leur degré de neutralisation varierait en fonction de $[Ca]_e$ ou de la force ionique interne (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957 ; CHANDLER et coll., 1965 ; MULLER et FINKELSTEIN, 1972).

Dans nos conditions expérimentales, il n'est évidemment pas possible de proposer un schéma précis du mécanisme d'action des ions Cl^- . Deux possibilités peuvent être retenues :

1) les ions Cl^- modifieraient le champ électrique membranaire par une variation de la liaison (binding) ou du masquage (screening) des charges positives de surface, ce processus devant être envisagé

au niveau de la face interne de la membrane. La modification du champ électrique provoquerait les variations des paramètres d'activation et d'inactivation des canaux calcique ou potassique.

ii) les ions Cl^- n'interviendraient qu'en temps que facteur de variation de $[\text{Ca}]_i$. L'augmentation des ions Ca^{++} à l'intérieur de la fibre serait l'élément déterminant dans la régulation de l'activité électrique lorsque $[\text{Cl}]_e$ est modifiée. Les ions Ca^{++} pourraient provoquer une variation du champ électrique membranaire par une fixation sur les charges négatives internes ou en masquant ces charges.

La première hypothèse aurait l'avantage de tenir compte de nos résultats en milieu nitrate comparés à ceux obtenus en milieu propionate. En effet, si une variation de la liaison (ou du masquage) des ions Cl^- avec des charges positives membranaires internes est le mécanisme essentiel, nous devons nous attendre à ce que les ions NO_3^- pénétrant dans la cellule remplacent les ions Cl^- d'autant plus que nous avons signalé que les perméabilités au chlore et au nitrate devaient être approximativement équivalentes. Dans ce cas, la courbe de f_∞ ne doit pas subir de variation notable, ce qui est le cas. Dans le cadre de la deuxième hypothèse nous devrions observer en milieu nitrate ou propionate un déplacement comparable puisque l'augmentation de $[\text{Ca}]_i$

résulte de l'efflux de chlore, cet efflux n'étant pas modifié par les ions NO_3^- . Cependant, il est certain que cette argumentation n'est pas suffisante. Nous n'avons encore pas rencontré dans la littérature d'évidence de déplacement des courbes d'activation et d'inactivation due à une modification des liaisons entre les anions et les charges positives membranaires. De nombreuses études, par contre, ont mis en évidence l'existence de zones à forte densité de charges négatives (ELUL, 1967 ; SEGAL, 1968) sur les axones mais également sur les fibres musculaires (RAPOPORT, 1969 ; SCHNEIDER et CHANDLER, 1973) en particulier au niveau du système T, ces zones pouvant être influencées par des cations divalents ou polyvalents.

En outre, ces zones auraient une densité de groupes chargés négativement différente à proximité des canaux sodique ou potassique. Ceci expliquerait que les courbes potentiel-dépendantes pour g_{Na} ou pour g_{K} ne soient pas déplacées de façon égale (CHANDLER et coll., 1965 ; HILLE, 1968). Sur la fibre musculaire de crabe, il faut remarquer que l'élément potentiel-dépendant de la conductance calcique est nettement plus influencé par une variation de $[\text{Cl}]_e$ que celui de la conductance potassique du courant retardé. Dans ce dernier cas, le déplacement de la courbe de n_∞ n'est en effet que d'environ 15 mV.

Enfin, le déplacement des courbes d'inactivation du courant calcique en fonction de V est accompagné

d'une modification de la pente de la courbe. Un résultat identique est noté par TSIEN (1974) pour la variable s du courant I_{K_2} des fibres de Purkinje.

Quel que soit le mode d'action des ions Cl^- (de façon directe : 1ère hypothèse, ou indirecte : 2ème hypothèse) un problème actuellement très fréquemment soulevé est également posé ici : l'interaction entre les groupes chargés au niveau de la membrane et les ions monovalents ou divalents se ferait-elle selon un processus de "liaison" ou de "masquage" (binding ou screening). De nombreux exemples de relation entre les charges négatives sur l'une ou l'autre des faces de la membrane et les cations di- ou polyvalents ont été fournis à l'appui des hypothèses de binding (FRANKENHAEUSER et HODGKIN, 1957 ; HILLE, 1968 ; GILBERT et EHRENSTEIN, 1970) ou de screening (Mc LAUGHLIN et coll., 1971 ; MULLER et FINKELSTEIN, 1972 ; D'ARRIGO, 1973), le passage de l'un à l'autre de ces deux mécanismes étant possible en fonction de la densité des groupes acides ionisés à la surface de la membrane (GILBERT et EHRENSTEIN, 1969 ; D'ARRIGO, 1974).

DISCUSSION GENERALE

L'utilisation de la technique du double pont de saccharose nous a permis d'enregistrer les courants ioniques survenant dans les processus de l'activité électrique. Nous avons pu décrire dans ce travail :

- un courant initial simple ou composite
- un courant retardé, sortant, essentiellement potassique appelé I_{K_2} .

La variabilité du courant initial nous a amené à classer les fibres en deux types :

- le type I pour lequel le courant initial ne comprend qu'une composante entrante de nature calcique.
- le type II qui présente, outre cette composante, un courant sortant rapide et transitoire, provoquant un rebond sur le tracé du courant initial, rebond que nous avons distingué d'une oscillation et interprété comme un courant potassique I_{K_1} .

Avant d'aborder l'analyse de l'activité électrique globale de la fibre musculaire de crabe et le rôle des différents courants ioniques impliqués, nous avons repris quelques points particuliers relatifs à chacun de ces courants, ou quelques points de comparaison entre leurs caractéristiques, leurs différentes propriétés ayant été démontrées et discutées au fur et à mesure des exposés des résultats expérimentaux.

LE COURANT ENTRANT CALCIQUE :

Comme pour tous les muscles d'Invertébrés déjà étudiés par de nombreux auteurs, le courant entrant est de nature calcique. Nous avons montré qu'un deuxième courant survenait presque simultanément, au cours de la phase de dépolarisation. Ce deuxième courant étant de nature potassique, l'étude du courant calcique a pu être menée en solution ASW additionnée de TEA. Dans ces conditions, le potentiel d'inversion du courant entrant, quel que soit le type de fibre considéré, se situe à $E_m = + 30$ ou $+ 40$ mV. La concentration interne en ions Ca^{++} serait alors égale à 1 mM, valeur incompatible avec celles proposées par PORTZEHL et coll. (1964), ASHLEY (1967) et ASHLEY et coll. (1972) d'environ 10^{-7} M. De plus, nous enregistrons parfois des réponses régénératives qui, selon les estimations de HAGIWARA et NAKAJIMA (1966 b) se produisent lorsque $[Ca]_i$ est réduite à 8.10^{-8} M.

Une interprétation de ce résultat, apparemment aberrant, doit donc être recherchée. Nous avons déjà écarté deux hypothèses :

i) celle d'une mauvaise évaluation de E_{Ca} résultant de l'extrapolation linéaire du courant de fuite mesuré pour de faibles valeurs de potentiel. E_{Ca} n'est augmenté que d'environ 5 mV lorsque l'on détermine la variation du courant de fuite en fonction du potentiel en milieu TEA-Mn.

ii) celle d'une mauvaise sélectivité du canal calcique comme le suggèrent GEDULDIG et GRUENER (1970), ITO et coll. (1970). En présence de TEA, l'application d'un milieu hypercalcique provoque une variation de E_{Ca} proche de celle prévisible, théoriquement, par l'équation de NERNST.

Une explication de la valeur basse de E_{Ca} pourrait être que le TEA, à la concentration choisie de 20 mM ne supprime pas complètement les courants sortants potassiques, en particulier le courant I_{K1} contemporain de I_{Ca} . Toutefois, FATT et KATZ (1953) n'enregistrent pas de potentiels d'action supérieurs à 115 mV en présence de 527 mM de TEA.

Une autre hypothèse consiste à examiner la possibilité d'une accumulation locale d'ions Ca^{++} dans une zone interne juxta-membranaire. Celle-ci a été envisagée par GIRARDIER et coll. (1963), REUBEN et coll. (1967) et GAINER (1968). ZACHAROVÁ et ZACHAR (1967) évaluent à 1 ou 2 mM la concentration en ions Ca^{++} au niveau des jonctions diadiques. L'idée d'un stockage des ions Ca^{++} libérés par le réticulum sarcoplasmique, après un signal qui pourrait être l'influx de Ca induit par une dépolarisation, a été émise par ENDO et coll. (1970) et par FORD et PODOLSKY (1970, 1972). Dans ce cas, si E_{Ca} varie du fait même de l'influx de Ca, il est évidemment difficile d'utiliser la variation de E_{Ca} comme indice de la sélectivité du canal calcique. Dans

le système classique d'HODGKIN et HUXLEY on admet en effet que la concentration interne ne varie pas significativement et que les driving-forces ne sont fonction que du potentiel de membrane. Cependant, ASHLEY et coll. (1972) ont calculé que lorsqu'un stimulus active le largage du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique, la concentration interne en ions Ca^{++} est au maximum doublée.

Il semble donc que la forte concentration interne estimée à partir de nos mesures de E_{Ca} puisse résulter de zones juxta-membranaires à forte concentration en ions Ca^{++} , indépendantes de l'influx de calcium au moment de l'activité. BEAULIEU et FRANK (1967) ont déterminé sur la fibre musculaire de grenouille que le TEA favorise la libération des ions Ca^{++} à partir de sites membranaires situés au niveau des terminaisons nerveuses motrices, ce processus pouvant également être envisagé pour les fibres musculaires de crabe. Une concentration locale importante de calcium libre est possible, d'après WINEGRAD (1968), et peut être tolérée par un muscle si les ions Ca^{++} sont séparés des éléments contractiles. Cela serait le cas dans nos conditions expérimentales, si la forte $[Ca]_i$ était localisée au niveau des diades.

Il faut remarquer que dans les expériences de HAGIWARA et coll. (1969), un agent chélatant est injecté dans les fibres et que, dans celles de KEYNES et coll. (1973) les fibres sont constamment perfusées. Ces auteurs

ont toujours mesuré des potentiels d'équilibre calcique très supérieurs à la valeur que nous obtenons, ce qui est aisément concevable puisque leurs conditions expérimentales sont telles que tout phénomène d'accumulation locale d'ions Ca^{++} se trouve supprimé.

Enfin, la conductance calcique présente des caractéristiques dépendantes du potentiel et du temps. En particulier, nous avons pu montrer que pour un potentiel donné, le courant s'inactive au cours du temps, résultat en contradiction avec celui de KEYNES et coll. (1973) et H^AGIWARA et coll. (1974). Cette différence ne semble pas pouvoir être interprétée. Il apparaît en effet difficile de supposer que la diminution du courant entrant que nous enregistrons puisse être expliquée par une accumulation d'ions Ca^{++} . Celle-ci résulterait d'une diminution de la driving-force, facteur expliquant la diminution de I_{Ca} au cours du temps pour un potentiel donné. Mais, s'il en était ainsi, nous n'aurions pas dû observer une constante de temps d'inactivation plus faible pour les fortes dépolarisations que pour une dépolarisation de l'ordre de 45 mV. Il semble donc que la diminution du courant calcique soit davantage interprétable par un phénomène d'inactivation.

LES COURANTS POTASSIQUES

- Le courant I_{K_1}

Les différents résultats que nous avons présentés et commentés nous ont conduits à admettre l'existence d'un courant potassique sortant simultanément au courant entrant.

Nous avons vu que ce courant est entièrement disponible lorsque la membrane est hyperpolarisée d'environ 20 mV, qu'il est à demi-inactivé à E_R et qu'il est totalement inactivé lorsque la membrane est dépolarisée d'environ 20 mV.

Bien que nous n'ayons pu étudier l'activation de ce courant seul, différents résultats peuvent nous permettre d'émettre une hypothèse quant à la position de sa courbe d'activation en fonction du potentiel (Fig. 73). En effet, nous avons mesuré un potentiel d'inversion pour ce courant légèrement plus négatif que E_R et nous avons signalé que cette valeur devait être surestimée puisque notre mesure était intermédiaire entre E_K et E_{Ca} . De plus, lors de l'application de potentiels hyperpolarisants, nous avons supposé que les enregistrements des courants obtenus sur les fibres de type II pouvaient correspondre à la désactivation d'un courant initialement sortant et visible pour les fortes hyperpolarisations, ce qui laisserait supposer que E_K est très nettement plus négatif que E_R , d'au moins 40 mV c'est-à-dire à

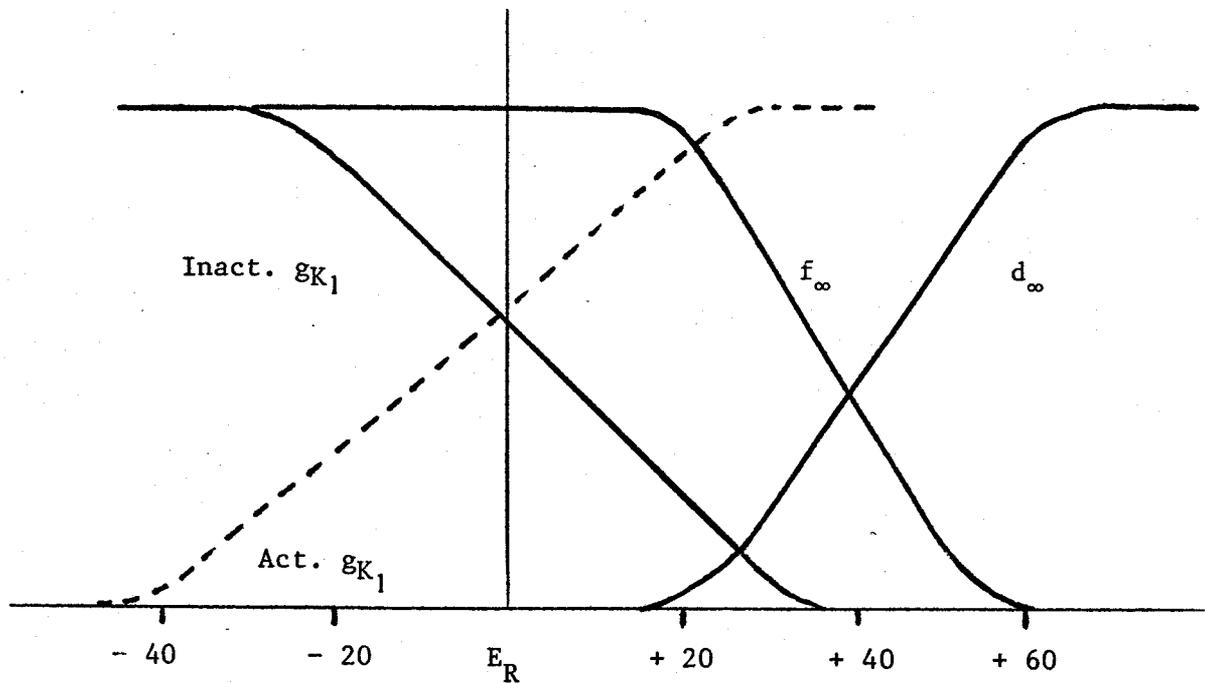


Figure 73 : Schéma récapitulatif des positions des courbes d'activation et d'inactivation des conductances g_{Ca} et g_{K_1} en fonction du potentiel de membrane. La position de la courbe d'activation de g_{K_1} (tracée en pointillés) est suggérée d'après nos différents résultats.

$E_m = -100 \text{ mV} - 110 \text{ mV}$. Il est évidemment difficile de comprendre pourquoi nous n'observons plus ce courant pour des potentiels imposés hyperpolarisants moins négatifs. Cependant, on peut concevoir que dans cette zone de potentiels le courant est moins disponible et que la constante de temps d'activation peut être relativement grande. Il est certain que nous ne disposons pas d'arguments irréfutables pour assimiler le courant sortant observé lors des hyperpolarisations membranaires au courant I_{K_1} . Il ne peut s'agir ici que d'une hypothèse qu'il serait intéressant de pouvoir vérifier. Cependant, nous avons vu qu'il semblait impossible d'enregistrer ce courant sans avoir déclenché simultanément le courant calcique.

- Le courant I_{K_2}

Ce courant, essentiellement mais non exclusivement potassique, est responsable de la rectification retardée. Son potentiel d'inversion apparaît proche de E_R , légèrement plus négatif et correspond à un niveau de potentiel pour lequel la variable n_∞ est nulle. Enfin, ce courant diminue au cours du temps sous l'effet d'une inactivation plutôt que d'une accumulation. Les constantes de temps d'inactivation sont très grandes, de l'ordre de 440 ms pour un potentiel imposé de 85 mV.

- Distinction entre les courants I_{K_1} et I_{K_2} -

Les courants I_{K_1} et I_{K_2} , bien qu'étant tous les deux de nature essentiellement potassique, peuvent être distingués principalement par leurs dépendances différentes vis à vis du potentiel de membrane et leurs cinétiques respectives. Le potentiel d'inversion du courant I_{K_2} apparemment moins négatif que celui du courant I_{K_1} pourrait résulter du fait que la conductance retardée présente une moins grande sélectivité vis à vis des ions K^+ que la conductance du courant I_{K_1} . La même base de distinction a été établie pour deux courants i_{x_1} et i_{x_2} par NOBLE et TSIEN (1969) sur les fibres de Purkinje et par NEHER (1971) et CONNOR et STEVENS (1971, a, b) sur les neurones d'escargot.

Etablir une comparaison précise entre les dépendances vis à vis du potentiel des variables d'activation et d'inactivation pour ces deux courants n'est pas possible puisque, pour I_{K_1} , nous ne disposons que de peu d'informations. Toutefois, nos résultats nous permettent de constater que les gammes de potentiels concernées par I_{K_1} et I_{K_2} sont très différentes, celle pour I_{K_1} étant nettement décalée vers les hyperpolarisations. De plus, les cinétiques de ces deux courants sont très différentes; celles du courant I_{K_1} sont beaucoup plus rapides que celles de I_{K_2} .

Une autre série de distinctions entre ces deux courants peut être établie en examinant de quelle façon ceux-ci sont affectés par des modifications ioniques de la solution ASW :

- les ions Mn^{++} bloquent aussi rapidement le courant I_{K_1} que le courant calcique alors qu'ils n'occasionnent qu'une diminution du courant I_{K_2} .

- de façon plus démonstrative, dans les conditions de courant imposé, les ions Sr^{++} augmentent très rapidement l'amplitude du PA (par suppression du courant I_{K_1}) tandis que la durée de ce PA n'est augmentée que progressivement, ce qui s'explique par une action plus lente sur le courant I_{K_2} .

- enfin, le TEA inhibe totalement I_{K_1} (et l'inactivation du courant entrant devient alors exponentielle) tandis que la rectification retardée est fortement diminuée mais peut-être pas totalement supprimée, bien qu'il soit délicat d'être très catégorique sur ce point.

Nous avons en effet montré que le courant de fuite présente une légère rectification retardée en fonction du potentiel.

Une sensibilité différente de deux courants potassiques vis à vis de la concentration et du temps d'action du TEA a été décrite par NEHER et LUX (1972). Nous ne pouvons établir de telles distinctions dans nos conditions expérimentales puisque nous avons toujours utilisé le TEA à la concentration de 20 mM et fait subir

systematiquement une imbibition de 15 minutes à nos fibres dans la solution TEA avant de commencer nos enregistrements.

ANALYSE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE

L'existence de deux courants, de sens opposé et de cinétiques comparables, l'un entrant calcique, l'autre sortant potassique, survenant dès l'application d'un échelon de potentiel supraliminaire, représente un élément fondamental d'explication de la faible amplitude des potentiels observés.

La valeur du potentiel à la pointe de la réponse électrique est comprise entre E_{Ca} et E_K . Lorsque le courant I_{K_1} n'est pas apparent sur le tracé du courant initial, ou est d'amplitude faible par rapport à I_{Ca} , le potentiel tend davantage vers E_{Ca} et la réponse graduée peut alors être remplacée par une réponse de type tout ou rien. De même, en milieu TEA, lorsque les courants potassiques I_{K_1} et I_{K_2} sont supprimés, ou fortement diminués, la réponse graduée se transforme en potentiel de type tout ou rien de plus grande amplitude et plus durable. Sans vouloir aborder encore l'analyse des durées différentes des potentiels enregistrés, l'influence du courant I_{K_2} sur l'amplitude de la réponse électrique, pour des niveaux assez élevés de potentiels, ne peut être totalement négligée. En effet, pour une dépolarisation imposée de 65 mV, la valeur de n_{∞} du courant I_{K_2} est déjà d'environ 0,5 mais la constante de temps est de l'ordre de 30 ms, ce qui suggère évidemment qu'à ce niveau de potentiel, le courant I_{K_2}

n'intervient que faiblement. Pour des réponses électriques légèrement plus amples, d'environ 75 à 80 mV, I_{K_2} sera activé plus fortement et plus rapidement.

Au niveau du seuil d'excitation, I_{K_2} est négligeable mais il n'en demeure pas moins que le courant calcique doit être d'amplitude très grande pour vaincre la somme des courants sortants initiaux représentés par le courant I_{K_1} et par le courant de fuite dont l'amplitude est relativement importante.

L'influence des courants I_{K_1} et I_{K_2} sur la durée des potentiels d'action peut être envisagée à partir de nos observations des formes de potentiels, en rapport avec le décours des courants ioniques. Lorsque les fibres présentent un courant initial à une seule composante entrante, c'est à dire lorsque I_{K_1} n'est pas apparent et que le courant retardé est plus nettement activé, le potentiel d'action comporte une phase de repolarisation lente, comparée à la vitesse de la phase de dépolarisation. Par contre, lorsque le courant initial a deux composantes, la repolarisation du potentiel d'action est au moins aussi rapide que la phase de dépolarisation. La durée de ces potentiels des fibres de type II est alors toujours inférieure à celle des potentiels des fibres de type I. Par conséquent, le courant I_{K_1} serait, pour les fibres de type II, le courant responsable de la repolarisation rapide tandis que le

courant I_{K_2} rendrait compte pour les fibres de type I de la repolarisation plus tardive des potentiels d'action plus durables. Les cinétiques de I_{K_1} et I_{K_2} justifieraient ces rôles différents.

En outre, nous avons présenté certains enregistrements montrant une activité répétitive. Celle-ci n'a pas été étudiée dans ce travail mais il est intéressant de remarquer qu'elle ne se produit que sur les fibres de type II, lorsque le courant I_{K_1} est développé et permet une repolarisation rapide. Une étude dans ce sens a été effectuée par CONNOR et STEVENS (1971 b) sur les neurones d'escargot.

Il apparaît donc, qu'à la fois l'amplitude et la durée des potentiels d'action sont liées à l'existence du courant I_{K_1} . L'amplitude est conditionnée par l'importance relative de I_{Ca} et I_{K_1} . La durée dépend de l'activation du courant I_{K_1} , assurant une repolarisation rapide du potentiel. Cependant, une telle disparité dans les potentiels enregistrés nous oblige à nous interroger sur son origine. En particulier, il convient de se demander pourquoi le courant I_{K_1} n'est pas toujours décelable et ne peut être mis en évidence que lorsque le courant calcique est lui-même activé. Il se pose donc la question de la connaissance de l'origine de I_{K_1} et des éléments pouvant conditionner son activation et contrôler par conséquent l'activité électrique.

CONTROLE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE

Nos résultats expérimentaux ainsi que de nombreuses données bibliographiques que nous avons mentionnées lors des discussions de certains résultats (voir chapitre V page 266 et chapitre VI pages 298 et 309 à 312) nous permettent de proposer un mécanisme du contrôle de l'activité électrique. Nous avons signalé qu'une augmentation de la concentration externe en cations divalents provoque un déplacement des courbes d'activation dans une direction dépolarisante (FRANKENHAUSER et HODGKIN, 1957) et de façon plus générale nous savons que le champ électrique contrôlant les paramètres d'activation et d'inactivation est modifié par l'addition de charges positives à la surface externe de la membrane (HUXLEY, 1959), qu'il s'agisse de cations divalents ou polyvalents (HILLE, 1968 ; GILBERT et EHRENSTEIN, 1970 ; Mc LAUGHLIN et coll., 1971 ; MULLER et FINKELSTEIN, 1972 ; D'ARRIGO, 1973). La relation entre ces cations et les charges négatives présentes sur l'une ou l'autre des faces de la membrane rendrait compte des changements de conductance, la relation entre ces deux éléments pouvant résulter soit d'une liaison, soit d'un phénomène d'écran (voir discussion du chapitre VI).

De nombreux exemples obtenus sur les fibres nerveuses mettent en évidence l'influence d'une augmentation de la concentration externe en cations divalents

sur le déplacement des courbes d'activation et d'inactivation sodique dans une direction dépolarisante. Un résultat identique a pu être obtenu sur les fibres de Purkinje pour la variable s du courant lent I_{K_2} par HAUSWIRTH et coll. (1968). Dans ce cas, le phénomène observé est attribué à une diminution de $[Ca]_i$ et par conséquent à une diminution des ions positifs formant écran à la face interne de la membrane (Mc NAUGHTON et NOBLE, 1973). De plus, les résultats de ROMERO et WHITTAM (1971) sur les globules rouges, puis de KRNJEVIC et LISIEWICZ (1972) et de MEECH (1972, 1974) sur les axones montrent qu'une augmentation de $[Ca]_i$ induit une augmentation de g_K . La corrélation entre ces différents résultats conduit à supposer que des variations de $[Ca]_e$ ou de $[Ca]_i$ provoquent des variations de g_K et de façon plus générale, des déplacements des courbes d'activation ou d'inactivation des différentes conductances.

Le mécanisme de régulation pourrait donc se situer au niveau du champ électrique membranaire qui serait contrôlé par le gradient des cations divalents à travers cette membrane. Une augmentation du rapport $[X^{++}]_e / [X^{++}]_i$ induirait un déplacement des courbes des paramètres membranaires contrôlant l'activation ou l'inactivation en fonction du potentiel de membrane dans le sens des dépolarisations. Sur la fibre musculaire de crabe, nous pouvons imaginer que, lorsqu'une dépolarisation

sation est imposée, le courant entrant provoque une augmentation transitoire de $[Ca]_i$ qui entraîne une augmentation de g_K résultant d'un déplacement de la courbe d'activation du courant I_{K_1} vers les hyperpolarisations membranaires. Ceci rendrait possible l'apparition du courant I_{K_1} .

Le courant I_{K_1} diminue très rapidement. Il ne peut être réobservé dans les courants de queue à la fin d'impulsions de 50 à 60 ms de durée. Cette apparition de l'inactivation après l'activation de I_{K_1} suppose que la cinétique de déplacement de la variable d'inactivation vers les hyperpolarisations est plus lente. L'inactivation se produirait d'une part parce que la membrane se trouve dépolarisée par l'impulsion qui a donné naissance à I_{Ca} et d'autre part, parce que, pour un niveau de potentiel donné, le degré de disponibilité de I_{K_1} est alors moindre. De plus, l'inactivation de I_{K_1} peut résulter d'une diffusion rapide des ions Ca^{++} à l'intérieur de la fibre. Il s'agirait alors davantage d'une désactivation que d'une inactivation du courant I_{K_1} .

Cette dépendance de g_{K_1} par rapport à $[Ca]_i$ nous conduit à préciser que nous ne pouvons pas connaître la cinétique réelle du courant I_{K_1} . Celle que nous observons est en effet toujours la conséquence i) de la cinétique propre de g_{K_1} à un potentiel donné et ii) de la cinétique consécutive au déplacement des courbes d'activation et d'inactivation résultant de l'accroissement momentané de la concentration calcique interne locale.

Enfin, nous devons remarquer qu'une telle dépendance d'un courant potassique ne semble pouvoir être envisagée jusqu'à maintenant que vis à vis d'un courant calcique. Sur les neurones d'aplysie, GEDULDIG et GRUENER (1970) n'obtiennent une courbe d'inactivation du courant entrant à décours complexe que lorsque la solution externe contient des ions Ca alors que cette courbe devient de type classique quand les ions Ca sont remplacés par des ions Na. Une courbe identique est obtenue uniquement sur les tissus présentant des réponses calciques (CONNOR et STEVENS, 1971 b ; NEHER, 1971 ; VASSORT, 1973 ; STANDEN, 1974). Sur la fibre musculaire de crabe, il apparaît que la composante de I_{K_1} liée à I_{Ca} serait nettement prépondérante par rapport à l'activation propre de I_{K_1} puisque nous n'avons jamais pu observer I_{K_1} sans I_{Ca} . Dans les deux cas expérimentaux exceptionnels où I_{K_1} semblait seul, nous pouvons imaginer que l'élément activation propre de I_{K_1} était prédominant. Ceci n'exclue pas qu'un courant calcique ait été activé. Son amplitude serait seulement trop faible par rapport à celle de I_{K_1} , ce qui expliquerait qu'une composante entrante n'ait pu être décelée sur les enregistrements. Il est en effet vraisemblable que la composante calcique était alors véritablement peu importante puisque la courbe d'inactivation de I_{K_1} correspond sensiblement à celle obtenue en soustrayant tout le courant calcique (voir Fig. 49 et 51).

Les tracés différents des courants ioniques et des PA se justifieraient donc par le jeu des deux composantes calcique et potassique et par l'origine propre ou Ca-dépendante du courant I_{K_1} . La polarisation membranaire serait en elle-même un élément de régulation de l'activité électrique. En dehors des variations qui peuvent être introduites par notre protocole expérimental, divers autres facteurs peuvent rendre compte d'une modulation de l'activité électrique. Nous avons retenu en particulier le rôle éventuel des synapses présentes dans les portions de fibres testées.

- Influence de zones synaptiques

Le fait que le courant I_{K_1} soit activé, ou non apparent et que, dans le premier cas, son amplitude soit variable, pourrait s'interpréter en considérant que la portion de membrane dans le compartiment test ne présente pas systématiquement le même type de structure d'une fibre à l'autre. WIERSMA et RIPLEY (1952) ont montré que des branches de l'axone inhibiteur commun sont présentes dans le muscle extenseur. De plus, ATWOOD (1965) a démontré que les fibres phasiques sont plus affectées par une stimulation de l'axone inhibiteur que les fibres toniques. Toutes nos expériences étant réalisées sur des fibres phasiques prélevées dans la même zone du muscle extenseur, la différence entre leurs réponses

pourrait provenir de la présence ou de l'influence prépondérante des synapses inhibitrices dans la portion de fibre testée par rapport aux synapses excitatrices. ATWOOD et BITTNER (1971) ont en effet suggéré que l'inhibition peut être très variable d'une fibre à l'autre. On sait en outre, que la libération du médiateur agissant à la jonction synaptique inhibitrice provoque, suivant les fibres, soit une hyperpolarisation, soit une dépolarisation de la membrane post-synaptique des fibres musculaires de Crustacés ou bien laisse inchangé le P.R. (DUDEL et KUFFLER, 1961 ; ATWOOD, 1965 ; USHERWOOD (1973). On peut donc supposer, lorsqu'il s'agit d'hyperpolarisations membranaires, que la disponibilité du courant I_{K1} a été augmentée. Si la membrane est au contraire légèrement dépolarisée, des potentiels autorégénératifs se produiront avec une plus grande probabilité, même si la conductance membranaire est, dans ces différentes possibilités, inchangée. Un mécanisme comparable de modulation de l'excitabilité a été décrit sur les neurones d'escargot par DAUT (1973).

Une autre possibilité de régulation peut résulter du fait, que, même si le potentiel de repos demeure identique, la conductance membranaire au niveau post-synaptique est toujours augmentée (DUDEL et KUFFLER, 1961). TAKEUCHI et TAKEUCHI (1967) sur les fibres musculaires d'écrevisse, MOTOKIZAWA et coll. (1969) sur les fibres de homard ont montré que cette

augmentation de g_m correspond à une augmentation sélective de g_{Cl} . Le courant calcique devrait alors surpasser un courant de fuite plus ample.

Par conséquent, il apparaît que la présence de zones synaptiques excitatrices et inhibitrices sur la fibre musculaire de crabe pourrait être un des éléments d'explication de la diversité des phénomènes électriques enregistrés.

Par ailleurs, nous avons constaté qu'une variabilité non aléatoire des courants ioniques se produit en fonction de la période au cours de laquelle les enregistrements sont effectués. Les différences concernent non seulement le décours du courant initial mais également l'apparition même du courant entrant.

Variations saisonnières observées. Essai d'interprétation

Au printemps et en automne, la quasi-totalité des fibres étudiées peut être classée dans le type II c'est à dire que nous observons à la fois le courant I_{Ca} et le courant I_{K_1} . Par contre, durant l'été, la fréquence d'apparition du courant I_{K_1} devient plus faible et la majorité des fibres se comporte comme des fibres de type I. Enfin, en hiver, en particulier de décembre à février, peu de fibres se révèlent excita-
bles et nous n'enregistrons que des réponses passives ou, au mieux, une très faible activité électrique, à

condition d'appliquer des stimulations très élevées. Toutefois, lorsque les températures hivernales ne sont pas très basses, comme cela a été le cas cette année, nous avons pu continuer à enregistrer une activité électrique au cours de l'hiver comparable à celle de l'automne.

Ces observations suggèrent donc que, si des variations saisonnières influent sur l'activité électrique, ce serait plus vraisemblablement par le biais de la température extérieure. De nombreux travaux relatent une variation des concentrations ioniques du sang au cours de l'année. En particulier, THOMPSON et FARRAGUT (1966) sur le crabe *Callinectes sapidus* observent une évolution de la concentration calcique dans l'hémolymphe mais leurs résultats, comme la plupart de ceux obtenus sur différents Crustacés, sont reliés à la période de mue ou aux différents stades d'intermue des animaux. Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons retenir ce facteur. En effet, les fibres soumises à l'expérimentation n'ont été prélevées que sur des crabes ayant une carapace dure et ne présentant pas de cuticule préexuviale. Les crabes totalement ou partiellement mous, étaient systématiquement rejetés. Les animaux se trouvaient donc, selon la terminologie de DRACH (1939) aux stades d'intermue C_3 à D_0 . Or, au cours de ces stades, le contenu ionique et en particulier le taux de Ca, ne varie pas sensiblement au niveau

de l'hémolymphe (ROBERTSON, 1960 ; GRAF, 1974). Par contre, CHARMANTIER (1975) mesure en fonction de la température, à différentes périodes, des variations de l'ionorégulation sur un Crustacé isopode : *Sphaeroma serratum* au stade C₄. Les dosages portent sur la modification de la natrémie de l'hémolymphe et indiquent que les régulations sont comparables en automne et au printemps, opposées en hiver et en été. Les concentrations ioniques s'élèveraient lorsque la température est abaissée, résultat en accord avec les premières constatations de ROBERTSON (1960). Nous n'avons malheureusement pas trouvé dans la littérature d'études relatives aux modifications ioniques intramusculaires. La seule corrélation que nous puissions établir est basée sur la notion de régulation isosmotique intracellulaire introduite par FLORKIN (1962) : un réajustement ionique à l'intérieur des cellules se produirait lorsque les concentrations ioniques du sang varient. Il serait donc possible d'émettre l'hypothèse suivante : des variations sensibles de la température extérieure peuvent provoquer une modification des concentrations ioniques intracellulaires en particulier intramusculaires. Ainsi, lorsque la température est abaissée, une régulation ionique s'effectuerait dans le sens d'un enrichissement en ions. La diminution ou la disparition de l'activité électrique en hiver pourraient alors s'expliquer par un accroissement des ions Ca⁺⁺ à l'intérieur des fibres musculaires.

L'ensemble de ces résultats montre donc que les divers types de potentiels qui ont pu être recueillis sur la fibre musculaire de crabe résultent d'une régulation de l'activité électrique à partir de facteurs d'origine physiologique ou biologique. Par conséquent, les réponses graduées enregistrées et observées très généralement sur les fibres de Crustacés ne s'avèrent pas fondamentalement différentes des réponses de type tout ou rien. Ces diverses réponses, de même que l'activité répétitive qui se manifeste parfois, doivent être reliées en fait à un même comportement membranaire, modulable et correspondant à l'existence d'un courant potassique rapide simultané et dépendant pour une large part du courant calcique, l'influence relative de ces deux courants ioniques représentant un élément de régulation de l'activité électrique.

Si ce schéma semble capable de rendre compte des phénomènes observés en réponse à des stimulations dépolarisantes, un certain nombre de points reste encore à élucider. En particulier, il serait intéressant de déterminer une condition expérimentale permettant d'isoler le courant potassique I_{K_1} ou tout ou moins la fraction de ce courant non dépendante de I_{Ca} . Il n'est bien sûr pas certain que cela soit réalisable, comme de nombreuses tentatives nous incitent à le penser, dans la mesure où l'apparition de ce courant se révèle essentiellement liée à l'accroissement de $[Ca]_i$.

Un complément à l'ensemble de nos résultats peut être également envisagé par l'étude de la participation de facteurs liés à la structure et à l'ultrastructure de ces fibres musculaires. Dans ce cadre, il semblerait intéressant d'analyser la régulation de l'activité électrique en contrôlant l'influence des zones synaptiques présentes dans les fibres étudiées et qui sont soit excitatrices, soit inhibitrices. Une autre voie consisterait à examiner le rôle du STT dans le processus d'excitation. Toutefois, quelques essais effectués au laboratoire (HAUDECOEUR, communication personnelle), consistant à détruire le STT par du glycérol, se sont avérés peu fructueux mais il serait certainement très utile de réussir à dissocier les activités membranaires de surface ou tubulaire.

Enfin, nous avons signalé les phénomènes particuliers survenant lorsque des stimulations hyperpolarisantes sont appliquées. L'analyse des mécanismes mis en jeu constitue également un axe qu'il serait intéressant de développer, à partir des hypothèses que nous avons pu formuler au cours de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT, B.C. & PARNAS, I. (1965)
Electrical and mechanical responses in deep abdominal extensor muscles of crayfish and lobster.
J. gen. Physiol., 48, 919-931.
- ADELMAN, W.J. & TAYLOR, R.E. (1961)
Leakage current rectification in the squid giant axon.
Nature, Londres, 190, 883-885.
- ADRIAN, R.H. (1956)
The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle.
J. Physiol., Londres, 133, 631-658.
- ADRIAN, R.H. (1960)
Potassium chloride movement and the membrane potential of frog muscle.
J. Physiol., Londres, 151, 154-185
- ADRIAN, R.H. (1961)
Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle.
J. Physiol., Londres, 156, 623-632.
- ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1973)
Measurement of membrane capacity in skeletal muscle.
Nat. New. Biol., 242, 62-64.
- ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1974)
Membrane capacity measurements on frog skeletal muscle in media of low ion content.
J. Physiol., Londres, 237, 573-605.
With an appendix by R.H. ADRIAN, W. ALMERS and W.K. CHANDLER.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1966)
Voltage clamp experiments in skeletal muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 186, 51-52 P.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1968)
Voltage clamp experiments in striated muscle fibres.
J. gen. Physiol., 51, 188 s - 192 s.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1970 a)
Voltage clamp experiments in striated muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 208, 607-644.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1970 b)
Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 208, 645-668.
- ADRIAN, R.H. & FREYGANG, W.H. (1962)
The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.
J. Physiol., Londres, 163, 61-103.

- ADRIAN, R.H. & PEACHEY, L.D. (1965)
The membrane capacity of frog twitch and slow muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 181, 324-336.
- ADRIAN, R.H. & PEACHEY, L.D. (1973)
Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle.
J. Physiol., Londres, 235, 103-131.
- ADRIAN, R.H. & SLAYMAN, C.L. (1966)
Membrane potential and conductance during transport of sodium,
potassium and rubidium in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 184, 970-1014.
- ALLEN, R.D. & HINKE, J.A.M. (1970)
Sodium compartmentalization in single muscle fibers of the
giant barnacle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 48, 139-146.
- ALVING, B.O. (1969)
Differences between pacemaker and nonpacemaker neurons of
Aplysia on voltage clamping.
J. gen. Physiol., 54, 512-531.
- ANDERSON, N.C. (1969).
Voltage clamp studies on uterine smooth muscle.
J. gen. Physiol., 54, 145-165.
- ANDERSON, N.C., RAMON, F. & SNYDER, A. (1971)
Studies on calcium and sodium in uterine smooth muscle excitation
under current clamp and voltage-clamp conditions.
J. gen. Physiol., 58, 322-339.
- ARMSTRONG, C.M. & BINSTOCK, L. (1965)
Anomalous rectification in the squid giant axon injected with
tetraethylammonium chloride.
J. gen. Physiol., 48, 859-872.
- ASHLEY, C.A. (1967)
The role of cell calcium in the contraction of single cannulated
muscle fibres.
Am. Zoologist, 7, 647-659.
- ASHLEY, C.C. & RIDGWAY, E.B. (1970)
On the relationships between membrane potential, calcium transient
and tension in single barnacle muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 209, 105-130.
- ASHELY, C.C., CALDWELL, P.C. & LOWE, A.G. (1972)
The efflux of calcium from single crab and barnacle muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 223, 735-755.
- ATWOOD, H.L. (1963)
Differences in muscle fibre properties as a factor in "fast"
and "slow" contraction in Carcinus.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 17-32.

- ATWOOD, H.L. (1965)
Excitation and inhibition in crab muscle fibres.
Comp. Biochem. Physiol., 16, 409-426.
- ATWOOD, H.L. (1968)
Influence of nitrate and other anions on fast and slow contractions of crab muscle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, 1-9.
- ATWOOD, H.L. & BITTNER, G.D. (1971)
Matching of excitatory and inhibitory inputs to crustacean muscle fibers.
J. Neurophysiol., XXXIV, 1, 157-170.
- ATWOOD, H.L. & DORAI RAJ, B.S. (1964)
Tension development and membrane responses in phasic and tonic muscle fibres of a crab.
J. Cell. Comp. Physiol., 64, 55-72.
- ATWOOD, H.L., HOYLE, G. & SMYTH, T. (1965)
Mechanical and electrical responses of single innervated crab-muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 180, 449-482.
- BAKER, P.F., HODGKIN, A.L. & MEVES, H. (1964)
The effect of diluting the internal solution on the electrical properties of a perfused giant axon.
J. Physiol., Londres, 170, 541-560.
- BAKER, P.F., HODGKIN, A.L. & RIDGWAY, E.B. (1971)
Depolarization and calcium entry in squid giant axons.
J. Physiol., Londres, 218, 709-755.
- BAKER, P.F., MEVES, H. & RIDGWAY, E.B. (1973)
Effects of Mn and other agents on the calcium uptake that follows depolarization of squid axons.
J. Physiol., Londres, 231, 511-526.
- BASTIAN, J. & NAKAJIMA, S. (1974)
Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle.
J. gen. Physiol., 63, 257-278.
- BEAULIEU, G. & FRANK, G.B. (1967)
Tetraethylammonium - induced contractions of frog's skeletal muscle. III - Mechanism of action by calcium release.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 45, 845-855.
- BEEELER, G.W. & REUTER, H. (1970 a)
Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres.
J. Physiol., Londres, 207, 165-190.
- BEEELER, G.W. & REUTER, H. (1970 b)
Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres.
J. Physiol., Londres, 207, 191-209.

- BENNETT, M.R. (1967)
The effect of cations on the electrical properties of the smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens.
J. Physiol., Londres, 190, 465-479.
- BERGMAN, C. (1969)
Seuil d'excitation et régimes d'activités du noeud de Ranvier ; étude quantitative dans le cadre de la théorie de HODGKIN-HUXLEY.
Thèse d'état, ORSAY.
- BERGMAN, C. & STÄMPFLI, R. (1966)
Différence de perméabilité des fibres nerveuses myélinisées sensorielles et motrices à l'ion potassium.
Helv. Physiol. Acta, 24, 247-258.
- BERNSTEIN, J. (1902)
Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 92, 521-562.
- BEZANILLA, F., ROJAS, E. & TAYLOR, R.E. (1970)
Sodium and potassium conductance changes during a membrane action potential.
J. Physiol., Londres, 211, 729-751.
- BEZANILLA, F., CAPUTO, C., GONZALEZ-SERRATOS, H. & VENOSA, R.A. (1972)
Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibres of the frog.
J. Physiol., Londres, 223, 507-523.
- BIRKS, R.I. & DAUEY, D.F. (1969)
Osmotic responses demonstrating the extracellular character of the sarcoplasmic reticulum.
J. Physiol., Londres, 202, 171-188.
- BLAUSTEIN, M.P. & GOLDMAN, D.E. (1966)
Origin of axon membrane hyperpolarization under sucrose-gap.
Biophys. J., 6, 453-470.
- BOYLE, P.J. & CONWAY, E.J. (1941)
Potassium accumulation in muscle and associated changes.
J. Physiol., Londres, 100, 1-63.
- BRADING, A., BULBRING, E. & TOMITA, T. (1969)
The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli.
J. Physiol., Londres, 200, 637-654.
- BRANDT, P.W., REUBEN, J.P., GIRARDIER, L. & GRUNDFEST, H. (1965)
Correlated morphological and physiological studies on isolated single muscle fibers - I - Fine structure of the crayfish fiber.
J. Cell. Biol., 25, 233-261.

- BRINLEY, F.J. (1968)
Sodium and potassium fluxes in isolated barnacle muscle fibers.
J. gen. Physiol., 51, 445-447.
- BROWN, H. & NOBLE, S.J. (1969 a)
Membrane currents underlying delayed rectification and pace-
maker activity in frog atrial activity
J. Physiol., Londres, 204, 717-736
- BROWN, H. & NOBLE, S.J. (1969 b)
A quantitative analysis of the slow component of delayed rectifi-
cation in frog atrium.
J. Physiol., Londres, 204, 737-747.
- BRULE, G. (1972)
Etude de la secousse de la fibre musculaire striée de crabe.
Thèse de 3ème cycle, Lille.
- BULBRING, E. & TOMITA, T. (1969)
Effect of calcium, barium and manganese on the action of
adrenaline in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli.
Proc. Roy. Soc. B., 712, 121-136.
- BULBRING, E. & TOMITA, T. (1970)
Effects of Ca removal on the smooth muscle of the guinea-pig
Taenia coli.
J. Physiol., Londres, 210, 217-232.
- CARVALHO, A.P. (1968)
Calcium-binding properties of sarcoplasmic reticulum as influen-
ced by ATP, caffeine, quinine, and local anesthetics.
J. gen. Physiol., 52, 622-642.
- CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. & MEVES, H. (1965)
The effect of changing the internal solution on sodium inactiva-
tion and related phenomena in giant axons.
J. Physiol., Londres, 180, 821-836.
- CHARMANTIER, G. (1975)
Variations saisonnières des capacités ionorégulatrices de
Sphaeroma serratum (Fabricius, 1787) (Crustacea, isopoda,
flabellifera).
Comp. Biochem. Physiol., 50 A, 339-345.
- CHIARANDINI, D.J. & STEFANI, E. (1973)
Effects of Mn on the electrical and mechanical properties of
frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 232, 129-147.
- COHEN, M.J. (1963)
Muscle fibres and efferent nerves in a crustacean receptor
muscle.
Quart. J. micr. Sci., 104, 551-559.

- COLE, K.S. (1949)
Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane.
Arch. Sci. Physiol., 3, 253-258.
- COLE, K.S. & CURTIS, H.J. (1939)
Electric impedance of the Squid giant axon during activity.
J. gen. Physiol., 22, 649-670.
- COLE, K.S. & MARMONT, G. (1949)
cité par HODGKIN, HUXLEY & KATZ in "ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid".
XXII Congr. Int. CNRS Paris, Electrophysiologie.
- COLE, K.S. & MOORE, J.W. (1960 a)
Ionic current measurements in the squid giant axon membranes.
J. gen. Physiol., 44, 123-167.
- COLE, K.S. & MOORE, J.W. (1960 b)
Potassium ion current in the squid giant axon : dynamic characteristics.
Biophys. J., 1, 1-14.
- CONNOR, J.A. & STEVENS, C.F. (1971 a)
Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp.
J. Physiol., Londres, 213, 1-19.
- CONNOR, J.A. & STEVENS, C.F. (1971 b)
Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in Gastropod neural somata.
J. Physiol., Londres, 213, 21-30.
- CONWAY, E.J. (1957)
Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle.
Physiol. Rev., 37, 84-132.
- CONWAY, E.J. (1964)
New light on the active transport of sodium ions from skeletal muscle.
Fed. Proc., 23, 680-688.
- CONWAY, E.J., KERNAN, R.P. & ZADUNAISKY, J.A. (1961)
The sodium pump in skeletal muscle in relation to energy barriers.
J. Physiol., Londres, 155, 263-279.
- CORABOEUF, E. & OTSUKA, M. (1956)
L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de Mammifères.
C.R. Acad. Sci. Paris, 243, 441-444.
- CORABOEUF, E. & 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. & VASSORT, G. (1968)
Effects of some inhibitors of ionic permeabilities on ventricular action potential and contraction of rat and guinea-pig hearts.
J. Electrocardiology, 1, 19-30.
- COSTANTIN, L.L. & PODOLSKY, R. (1967)
Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle.
J. gen. Physiol., 50, 1101-1124.
- CROSS, S.R., KEYNES, R.D. & RYBOVA, R. (1965)
The coupling of sodium efflux and potassium influx in frog muscles.
J. Physiol., Londres, 181, 865-880.
- D'ARRIGO, J.S. (1973)
Possible screening of surface charges on crayfish axons by polyvalent metal ions.
J. Physiol., Londres, 231, 117-128.
- D'ARRIGO, J.S. (1974)
Axonal surface charges : binding or screening by divalent cations governed by external pH.
J. Physiol., Londres, 243, 757-764.
- DAUT, J. (1973)
Modulations of the excitation synaptic response by fast transient-K⁺ current in snail neurones.
Nat. New. Biol., 236, 193-196.
- DE HEMPTINNE, A. (1971)
Properties of the outward currents in frog atrial muscle.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 329, 321-331.
- DEL CASTILLO, J. & MACHNE, X. (1953)
Effect of temperature on the passive electrical properties of the muscle fibre membrane.
J. Physiol., Londres, 120, 431-434.
- DE MELLO, W.C. (1963)
Role of chloride ions in cardiac action and pacemaker potentials.
Amer. J. Physiol., 205, 567-575.
- DE MELLO, W.C. & HUTTER, O.F. (1966)
The anion conductance of crustacean muscle.
J. Physiol., Londres, 183, 11-12 P.
- DESMEDT, J.E. (1953)
Electrical activity and intracellular sodium concentration in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 121, 191-205.
- DODGE, F.A. & FRANKENHAEUSER, B. (1958)
Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage-clamp conditions.
J. Physiol., Londres, 143, 76-90.

- DORAI RAJ, B.S. & COHEN, M.J. (1964)
Structural and functional correlations in crab muscle fibres.
Naturwissenschaften, 51, 224-225.
- DRACH, P. (1939)
Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes.
Ann. inst. océanog. (Paris), 19, 103-391.
- DUNHAM, P.B. & GAINER, H. (1968)
The distribution of inorganic ions in lobster muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 150, 488-499.
- EATON, D.C. (1972)
Potassium ion accumulation near a pace-making cell of *Aplysia*.
J. Physiol., Londres, 224, 421-440.
- EHRENSTEIN, G.S. et GILBERT, D.L. (1966)
Slow changes of potassium permeability in the squid giant axon.
Biophys. J., 6, 553-566.
- EISENBERG, R.S. (1965)
A.C. impedance of single muscle fibers.
P h. D. theses, University College, London.
- EISENBERG, R.S. (1967)
The equivalent circuit of single crab muscle fibers as determined
by impedance measurements with intracellular electrodes.
J. gen. Physiol., 50, 1785-1806.
- ELUL, R. (1967)
Fixed charge in the cell membrane.
J. Physiol., Londres, 189, 351-365.
- ENDO, M. (1966)
Entry of fluorescent dyes into the sarcotubular system of the
frog muscle.
J. Physiol., Londres, 185, 224-238.
- ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970)
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticu-
lum of skinned skeletal muscle fibres.
Nature, Londres, 228, 24-36.
- EPSTEIN, R. & HARDY, M.A. (1973)
Electric response of crab muscle fibers dependent on Ca^{2+} and
metabolism.
Acta Physiol. Latinoam., 23, 183-192.
- FAHRENBACH, W.H. (1967)
The fine structure of fast and slow crustacean muscles.
J. Cell. Biol., 35, 69-79.
- FALK, G. & FATT, P. (1964)
Linear electrical properties of striated muscle fibers observed
with intracellular electrodes.
Proc. Roy. Soc. B., 160, 69-123.

- FATT, P. & GINSBORG, B.L. (1958)
The ionic requirements for the production of action potentials
in crustacean muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 142, 516-543.
- FATT, P. & KATZ, B. (1951)
An analysis of the end-plate potentials recorded with an
intracellular electrode.
J. Physiol., Londres, 115, 320-370.
- FATT, P. & KATZ, B. (1953)
The electrical properties of crustacean muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 120, 171-204.
- FENN, W.O. & COBB, D.M. (1936)
Electrolyte changes in muscle during activity.
Amer. J. Physiol., 115, 345-356.
- FLORKIN, M. (1962)
Bull. Acad. Roy. Med. Belg., Cl. Sci. 48, 687
in Chemical Zoology, Vol V, Arthropode part A, Acad. Press
New York and London (chapitre 9 : osmoregulation in aquatic
Arthropods, SCHOFFENIELS, E. & GILLES, R.)
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1970)
Regenerative calcium release within muscle cells.
Science, 167, 58-59.
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1972)
Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 223, 21-33.
- FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A.L. (1957)
The action of calcium on the electrical properties of squid
axons.
J. Physiol., Londres, 137, 218-244.
- FREYGANG, W.H., RAPOPORT, S.I. & PEACHEY, L.D. (1967)
Some relations between changes in the linear electrical proper-
ties of striated muscle fibers and changes in ultrastructure.
J. gen. Physiol., 50, 2437-2458.
- FURSHPAN, E.J. & WIERSMA, C.A.G. (1954)
Local and spike potentials of impaled crustacean muscle fibres
on stimulation of single axons.
Fed. Proc., 13, 51-64.
- FURUKAWA, T., SASAOKA, T. & HOSOYA, Y. (1959)
Effects of tetrodotoxin on the neuromuscular junction.
Jap. J. Physiol., 9, 143.

- GAGE, P.W. & EISENBERG, R.S. (1969)
Capacitance of the surface and transverse tubular membrane of frog sartorius muscle fibers.
J. gen. Physiol., 53, 265-278.
- GAINER, H. (1968)
The role of calcium in excitation - contraction coupling of lobster muscle.
J. gen. Physiol., 52, 88-110.
- GAINER, H. & GRUNDFEST, H. (1968)
Permeability of alkali metal cations in lobster muscle.
J. gen. Physiol., 51, 399-423.
- GARNIER, D., ROUGIER, O., GARGOUIL, Y.M. & CORABOEUF, E. (1969)
Analyse électrophysiologique du plateau des réponses myocardiques, mise en évidence d'un courant lent entrant en absence d'ions bivalents.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 313, 321-342.
- GAYTON, D.C. & HINKE, J.A.M. (1968)
The location of chloride in single striated muscle fibers of the giant barnacle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, 213-219.
- GAYTON, D.C. & HINKE, J.A.M. (1971)
Evidence for the heterogeneous distribution of chloride in the barnacle muscle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 49, 323-330.
- GEDULDIG, D. & GRUENER, R. (1970)
Voltage clamp of the aplysia giant neurone : early sodium and calcium currents.
J. Physiol., Londres, 211, 217-244.
- GEDULDIG, D. & YUNGE, D. (1968)
Sodium and calcium components of action potentials in the Aplysia giant neurone.
J. Physiol., Londres, 199, 347-365.
- GILBERT, D.L. & EHRENSTEIN, G. (1969)
Effect of divalent cations on potassium conductance in squid axons: determination of surface charge.
Biophys. J., 9, 447-463.
- GILBERT, D.L. & EHRENSTEIN, G. (1970)
Use of a fixed charge model to determine the pK of the negative sites on the external membrane surface.
J. gen. Physiol., 55, 822-825.
- GIRARDIER, L., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. & GRUNDFEST, H. (1963)
Evidence for anion-permeable membrane in crayfish muscle fibers and its possible role in excitation-contraction coupling.
J. gen. Physiol., 47, 189-213.

- GOLDMAN, D.E. (1943)
Potential, impedance and rectification in membranes.
J. gen. Physiol., 27, 37-60.
- GOLDMAN, L. & BINSTOCK, L. (1969)
Leak current rectification in Myxicola giant axons. Constant field and constant conductance components.
J. gen. Physiol., 54, 755-764.
- GRAF, F. (1974)
Quelques aspects du métabolisme du calcium chez les Crustacés in "Physiologie comparée des échanges calciques".
SIMEP - Editions.
- GRUNDFEST, H. (1961)
Ionic mechanisms in electrogenesis.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 405-457.
- GRUNDFEST, H. (1966 a)
Comparative electrobiology of excitable membranes.
Physiol. Biochem., 2, 1-116.
- GRUNDFEST, H. (1966 b)
Heterogeneity of excitable membranes : electrophysiological and pharmacological evidence and some consequences.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 137, 901-949.
- GRUNDFEST, H. (1967)
Some comparative biological aspects of membrane permeability control.
Fed. Proc., 26, 1613-1626.
- HAGIWARA, S., FUKUDA, J. & EATON, D.C. (1974)
Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fiber during voltage-clamp.
J. gen. Physiol., 63, 564-578.
- HAGIWARA, S., CHICHIBU, S. & NAKA, K.I. (1964)
The effects of various ions on resting and spike potentials of barnacle muscle fibers.
J. gen. Physiol., 48, 163-179.
- HAGIWARA, S., HAYASHI, H. & TAKAHASHI, K. (1969)
Calcium and potassium currents of the membrane of a barnacle muscle fibre in relation to the calcium spike.
J. Physiol., Londres, 205, 115-129.
- HAGIWARA, S., GRUENER, R., HAYASHI, H., SAKATA, H. & GRINNELL., A.D. (1968)
Effects of external and internal pH changes on K and Cl conductances in the muscle fiber membrane of a giant barnacle.
J. gen. Physiol., 52, 773-792.
- HAGIWARA, S. & NAKA, K.I. (1964)
The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low internal Ca⁺⁺.
J. gen. Physiol., 48, 141-162.

- HAGIWARA, S. & NAKAJIMA, S. (1966 a)
Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, Procaine and Mn.
J. gen. Physiol., 49, 793-806.
- HAGIWARA; S. & NAKAJIMA, S. (1966 b)
Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle.
J. gen. Physiol., 49, 807-818.
- HAGIWARA, S. & TAKAHASHI, K. (1967)
Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane.
J. gen. Physiol., 50, 583-601.
- HAGIWARA, S. & WATANABE, A. (1955)
The effect of TEA chloride on the muscle membrane examined with an intracellular microelectrode.
J. Physiol., Londres, 129, 513-527.
- HARRIS, E.J. (1958)
Anion interaction in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 141, 351-365.
- HARRIS, E.J. (1963)
Distribution and movement of muscle chloride.
J. Physiol., Londres, 166, 87-109.
- HARRIS, E.J. (1965)
The chloride permeability of frog sartorius.
J. Physiol., Londres, 176, 123-135.
- HARRIS, E.J. & BURN, G.P. (1949)
The transfer of sodium and potassium ions between muscle and the surrounding medium.
Trans. Faraday Soc., 45, 508-528.
- HAUDECOEUR, G. (1971)
Etude des perméabilités ioniques membranaires de la fibre musculaire striée de crabe.
Thèse de 3ème cycle, Lille.
- HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1972)
Contribution à l'étude de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe (*Carcinus maenas*). Effets sur le potentiel d'action de solutions de contenu ionique modifié.
J. Physiol., Paris, 64, 367-386.
- HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1974 a)
Action des ions H⁺ et des ions tétraéthylammonium (TEA) sur la réponse dépolarisante de la fibre musculaire striée phasique de Crabe (*Carcinus maenas*).
C.R. Acad. Sc. Paris, 278, 303-306.

- HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1974 b)
Effets du TEA sur la rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe étudiée dans des conditions de courant imposé en présence d'ions chlorure.
C.R. Acad. Sci. Paris, 279, 175-178.
- HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1974 c)
La rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe étudiée en courant imposé.
Communication orale, Congrès des Physiologistes, Strasbourg.
- HAUSWIRTH, O., NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1968)
Adrenaline : mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibers.
Science, 162, 916-917.
- HAYS, E., LANG, M.A. & GAINER, H. (1968)
A re-examination of the Donnan distribution as a mechanism for membrane potentials and potassium and chloride ions distribution in crab muscle fibers.
Comp. Biochem. Physiol., 26, 761-792
- HEISTRACHER, P. & HUNT, C.C. (1969)
The relation of membrane changes to contraction in twitch muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 201, 589-611.
- HENČEK, M., NONNER, W. & STÄMPFLI, R. (1969)
Voltage-clamp of a small muscle membrane area by means of a circular sucrose-gap arrangement.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 313, 71-79.
- HENČEK, M., ZACHAR, J. & ZACHAROVÁ, D. (1962)
The relative potassium and chloride conductances in the muscle membrane of the crayfish.
J. Physiol., Londres, 162, 68-69 P.
- HILLE, B. (1967)
The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion.
J. gen. Physiol., 50, 1287-1302.
- HILLE, B. (1968)
Charges and potentials at the nerve surface : divalent ions and pH.
J. gen. Physiol., 51, 221-236.
- HINKE, J.A.M. (1959)
Glass microelectrodes for measuring extracellular activities of sodium and potassium.
Nature, Londres, 184, 1257-1258.
- HINKE, J.A.M. (1970)
Solvent water for electrolytes in the muscle fiber of the giant barnacle.
J. gen. Physiol., 56, 521-541.

- HINKE, J.A.M. & GAYTON, D.C. (1970)
Transmembrane K^+ and Cl^- activity gradients for the muscle fiber of the giant barnacle.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 49, 312-322.
- HINKLE, M., HELLER, P. & VAN DER KLOOT, W. (1971)
The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers of the crayfish.
Comp. Biochem. Physiol., 40 A, 181-201.
- HODGKIN, A.L. (1958)
Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres.
Proc. Roy. Soc. B., 148, 1-37.
- HODGKIN, A.L. & HOROWICZ (1959)
The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 148, 127-106.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1939)
Action potentials recorded from inside a nerve fibre.
Nature, Londres, 144, 710.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952 a)
Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo.
J. Physiol., Londres, 116, 449-472.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952 b)
The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.
J. Physiol., Londres, 116, 473-496.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952 c)
The dual effects of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.
J. Physiol., Londres, 116, 497-506.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952 d)
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol., Londres, 117, 500-544.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. & KATZ, B. (1949)
Ionic currents underlying activity in the giant axon of the Squid.
Arch. Sci. Physiol., 3, 129-150.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. & KATZ, B. (1952)
Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo.
J. Physiol., Londres, 116, 424-448.

- HODGKIN, A.L. & KATZ, B. (1949)
The effect of sodium ions on the electrical activity of the
giant axon of the Squid.
J. Physiol., Londres, 108, 37-77.
- HODGKIN, A.L. & KEYNES, R.D. (1955)
Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.
J. Physiol., Londres, 128, 28-60
- HODGKIN, A.L. & KEYNES, R.D. (1957)
Movements of labelled calcium in squid giant axons.
J. Physiol., Londres, 138, 253-281.
- HODGKIN, A.L. & NAKAJIMA, S. (1972 a)
The effect of diameter on the electrical constants of frog
skeletal muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 221, 105-120.
- HODGKIN, A.L. & NAKAJIMA, S. (1972 b)
Analysis of the membrane capacity in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 221, 121-136.
- HOYLE, G. & SMYTH, T. Jr. (1963)
Neuromuscular physiology of giant muscle fibers of a barnacle,
Balanus nubilus Darwin.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 291-314.
- HOYT, R. & ADELMAN, J.R. (1970)
Sodium inactivation. Experimental test of two models.
Biophys. J., 10, 610-626.
- HUTTER, O.F. & NOBLE, D. (1960)
The chloride conductance of frog skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 161, 89-102.
- HUTTER, O.F. & NOBLE, D. (1961)
Anion conductance of cardiac muscle.
J. Physiol., Londres, 157, 335-350.
- HUTTER, O.F. & PADSHA, S.M. (1959)
Effect of nitrate and other anions on the membrane resistance
of frog skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 146, 117-132.
- HUXLEY, A.L. (1959)
Ion movements during nerve activity.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 81, 221-246.
- HUXLEY, H.E. (1964)
Evidence for continuity between the central elements of the
triads and extracellular space in frog sartorius muscle.
Nature, Londres, 202, 1067-1071.
- HUXLEY, A.F. & TAYLOR, R.E. (1958)
Local activation of striated muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 144, 426-441.

- ILDEFONSE, M. (1970)
Analyse des courants de membrane de la fibre musculaire squelettique rapide.
Thèse d'état, Poitiers.
- ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1968)
Activation et inactivation du courant potassium de la fibre musculaire squelettique.
C.R. Acad. Sci. Paris, 267, 2344-2347.
- ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1969)
Sodium and potassium components of the membrane current in twitch skeletal muscle fibres investigated with a voltage clamp technique.
J. Physiol., Londres, 204, 97-98 P.
- ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1972)
Voltage clamp analysis of the early current in frog skeletal muscle fibre using the double sucrose-gap method.
J. Physiol., Londres, 222, 373-395.
- ITO, Y., KURIYAMA, H. & SAKAMOTO, Y. (1970)
Effects of tetraethylammonium chloride on the membrane activity of guinea-pig stomach smooth muscle.
J. Physiol., 211, 445-460.
- JENERICK, H.P. (1953)
Muscle membrane potential, resistance, and external potassium chloride.
J. Cell. Comp. Physiol., 42, 427-448.
- JULIAN, F.J., MOORE, J.W. & GOLDMAN, D.E. (1962)
Membrane potentials of the lobster giant axon obtained by use of the sucrose-gap technique.
J. gen. Physiol., 45, 1195-1216.
- KAO, C.Y. (1966)
Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena.
Pharmac. Rev., 18, 997-1049.
- KAO, C.Y. & STANFIELD, P.R. (1968)
Action of some anions on the electrical properties and mechanical threshold of frog twitch muscle.
J. Physiol., Londres, 198, 291-309.
- KAO, C.Y. & STANFIELD, P.R. (1970)
Actions of some cations on the electrical properties and mechanical threshold of frog sartorius muscle fibers.
J. gen. Physiol., 55, 620-639.
- KATZ, B. (1942)
Impedance changes in frog's muscle associated with electrotonic and "end-plate" potentials.
J. Neurophysiol., 5, 169-184.

- KATZ, B. (1948)
The electrical properties of the muscle fibre membrane.
Proc. Roy. Soc. B., 135, 506-534.
- KATZ, B. & KÜFFLER, S.W. (1946)
Excitation of the nerve-muscle system in Crustacea.
Proc. Roy. Soc. B., 133, 374-389.
- KATZ, B. (1966)
Nerve, muscle and synapse.
Mc Graw-Hill book company.
- KERKUT, G.A. & RIDGE, R.M.A.P. (1961)
The effect of temperature changes on the resting potential of crab, insect and frog muscle.
Comp. Biochem. Physiol., 3, 64-70.
- KEYNES, R.D., ROJAS, E., TAYLOR, R.E. & VERGARA, J. (1973)
Calcium and potassium systems of a giant barnacle muscle fibre under membrane potential control.
J. Physiol., Londres, 229, 409-455.
- KEYNES, R.D. & STEINHARDT, R.A. (1968)
The components of the sodium efflux in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 198, 581-599.
- KOKETSU, K., CERF, J.A. & NISHI, S. (1959)
Further observations on electrical activity of frog spinal ganglion cells in sodium-free solutions.
J. Neurophysiol., 22, 693-703.
- KOPPENHÖFER, E. (1967)
Die Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid auf die Membranströme Ranvierscher Schnürringe von *Xaenopus laevis*.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 293, 34-55.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A. & DOROSHENKO, P.A. (1974)
Calcium currents in snail neurones - II - The effect of external calcium concentration on the calcium inward current.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 348, 95-104.
- KRNJEVIC, K. & LISIEWICZ, A. (1972)
Injections of calcium ions into spinal motoneurons.
J. Physiol., Londres, 225, 363-390.
- LEVI, H. & USSING, H.H. (1948)
The exchange of sodium and chloride ions across the fibre membrane of the isolated frog sartorius.
Acta Physiol. Scand., 16, 232-249.
- MARMONT, G. (1949)
Studies on the axon membrane. I - A new method.
J. Cell. Comp. Physiol., 34, 351-382.
- Mc CANN, F.V. (1971)
Calcium action potentials in insect myocardial fibers.
Comp. Biochem. Physiol., 40 A, 353-357.

- Mc GUIGAN, K.A.S. (1974)
Some limitations of the double sucrose gap and its use in a study of the slow outward current in mammalian ventricular muscle. *J. Physiol.*, Londres, 240, 775-806.
- Mc LAUGHLIN, S.G.A. & HINKE, J.A.M. (1966)
Sodium and water binding in single striated muscle fibers of the giant barnacle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 44, 837-848.
- Mc LAUGHLIN, S.G.A., SZABO, G. & EISENMAN, G. (1971)
Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. *J. gen. Physiol.*, 58, 667-687.
- Mc NAUGHTON, P.A. & NOBLE, D. (1963)
The role of intracellular calcium ion concentration in mediating the adrenaline-induced acceleration of the cardiac pacemaker potential. *J. Physiol.*, Londres, 234, 53-54 P.
- MEECH, R.W. (1972)
Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42 A, 493-499.
- MEECH, R.W. (1974)
The sensitivity of *Helix Aspersa* neurones to injected calcium ions. *J. Physiol.*, Londres, 237, 259-277.
- MELVIN, C.J. & HESS, A. (1967)
Fine structural differences in "fast" and "slow" muscle fibers of the crab. *Am. J. Anat.*, 121, 2, 285-304.
- MEVES, H. (1968)
The ionic requirements for the production of action potentials in *Helix pomatia* neurones. *Pflügers Archiv. ges. Physiol.*, 304, 215-241.
- MEVES, H. & VÖLKNER, K.G. (1958)
Die Wirkung von CO₂ auf das Ruhemembranpotential und die elektrischen Konstanten der quergestreiften Muskelfaser. *Pflügers Archiv. ges. Physiol.*, 265, 457-476.
- MIRONNEAU, J. (1973)
Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J. Physiol.*, Londres, 233, 127-141.
- MIRONNEAU, J. (1974)
Voltage clamp analysis of the ionic currents in uterine smooth muscle using the double sucrose gap method. *Pflügers Archiv. ges. Physiol.*, 352, 197-210.

- MIRONNEAU, J. & 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.
- MOORE, L.E. (1969)
Anion permeability of frog skeletal muscle.
J. gen. Physiol., 54, 33-52.
- MOORE, J.W., NARAHASHI, T. & ULBRICHT, W. (1964)
Sodium conductance shift in an axon internally perfused with a sucrose and low-potassium solution.
J. Physiol., Londres, 172, 163-173.
- MOTOKIZAWA, F., REUBEN, J.P. & GRUNDFEST, H. (1969)
Ionic permeability of the inhibitory postsynaptic membrane of lobster muscle fibers.
J. gen. Physiol., 54, 437-461.
- MOUNIER, Y. (1970)
Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe.
Thèse de 3ème cycle, Lille.
- MOUNIER, Y., HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1969)
Données électrophysiologiques sur la fibre musculaire de crabe (*Carcinus maenas*).
J. Physiol., Paris, 61, 359-360.
- MOUNIER, Y. & GUILBAULT, P. (1970)
Influence du chlore sur les phénomènes électriques de repos de la fibre musculaire striée de crabe.
C.R. Acad. Sc. Paris, 271, 415-418.
- MOUNIER, Y., VILAIN, J.P. & GUILBAULT, P. (1970)
Influence du pH externe sur la perméabilité ionique membranaire de la fibre musculaire de crabe (*Carcinus maenas*).
C.R. Séanc. Soc. Biol., 164, 2566-2570.
- MULLER, R.U. & FINKELSTEIN, A. (1972)
The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monoazomycin.
J. gen. Physiol., 60, 285-306.
- NAKAJIMA, S., IWASAKI, S. & OBATA, K. (1962)
Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane.
J. gen. Physiol., 46, 97-115.
- NARAHASHI, T. (1963)
Dependence of resting and action potentials on internal potassium in perfused squid giant axons.
J. Physiol., Londres, 169, 91-115.

- NARAHASHI, T., DEGUCHI, T., URAKAWA, N. & OHKUBO, Y. (1960)
Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin.
Amer. J. Physiol., 198, 934-938.
- NASTUK, W.L. & HODGKIN, A.L. (1950)
The electrical activity of single muscle fibers.
J. Cell. Comp. Physiol., 35, 39-73.
- NEHER, E. (1971)
Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons.
J. gen. Physiol., 58, 36-53.
- NEHER, E. & LUX, H.D. (1972)
Differential action of TEA⁺ on two K⁺ - current components of a molluscan neurone.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 336, 87-100.
- NIEDERGERKE, R. & ORKAND, R.K. (1966 a)
The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart.
J. Physiol., Londres, 184, 291-311.
- NIEDERGERKE, R. & ORKAND, R.K. (1966 b)
The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration.
J. Physiol., Londres, 184, 312-334.
- NOBLE, D. (1962)
A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials.
J. Physiol., Londres, 160, 317-352.
- NOBLE, D. (1966)
Application of HODGKIN-HUXLEY equations to excitable tissues.
Physiol. Rev., 46, 1-50.
- NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1968)
The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres.
J. Physiol., Londres, 195, 185-214.
- NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1969)
Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres.
J. Physiol., Londres, 200, 205-231.
- NONNER, W. (1969)
A new voltage clamp method for Ranvier nodes.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 309, 176-192.
- OJEDA, C. & ROUGIER, O. (1974)
Kinetic analysis of the delayed outward currents in frog atrium. Existence of two types of preparation.
J. Physiol., Londres, 239, 51-73.

- ORENTLICHER, M. & REUBEN, J.P. (1971)
Localization of ionic conductances in crayfish muscle fibers.
J. Membrane Biol., 4, 209-226.
- ORKAND, R.K. (1962)
The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 161, 143-159.
- OZEKI, M., FREEMAN, A.R. & GRUNDFEST, H. (1966)
The membrane components of crustacean neuromuscular system.
I - Immunity of different electrogenic components to tetrodotoxin and saxitoxin.
J. gen. Physiol., 49, 1319-1334.
- PAGE, S. (1964)
The organization of the sarcoplasmic reticulum in frog muscle.
J. Physiol., Londres, 175, 10 P - 11 P.
- PAPIR, D. (1973)
The effect of glycerol treatment on crab muscle fibers.
J. Physiol., Londres, 230, 313-330.
- PEACHEY, L.D. (1965 a)
Transverse tubules in excitation-contraction coupling.
Fed. Proc., 24, 1124-1134.
- PEACHEY, L.D. (1965 b)
The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius.
J. Cell. Biol., 25, 209-231.
- PEACHEY, L.D. (1967)
Membrane systems of crab fibers.
Am. Zoologist, 7, 505-513.
- PEACHEY, L.D. & ADRIAN, R.H. (1973)
Electrical properties of the transverse tubular system in :
The structure and function of muscle, vol. 3, Ed. BOURNE, G.H.,
Acad. Press. 2nd edition.
- PEACHEY, L.D. & HUXLEY, A.F. (1964)
Transverse tubules in crab muscle.
J. Cell. Biol., 23, 2, 70 A.
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. & RÜEGG, J.C. (1964)
The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia Squinado* on the internal concentration of free calcium ions.
Biochim. Biophys. Acta, 79, 581-591.
- RAPOPORT, S.I. (1969)
A fixed charge model of the transverse tubular system of frog sartorius.
J. gen. Physiol., 54, 178-187.

- RENKIN, E.M. (1961)
Permeability of frog skeletal muscle cells to choline.
J. gen. Physiol., 44, 1159-1164.
- REUBEN, J.P., BERGMANN, F. & GRUNDFEST, H. (1959)
Chemical excitation of presynaptic terminals at lobster neuromuscular junctions.
Biol. Bull., 119, 335.
- REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, M. & GRUNDFEST, H. (1967)
Excitation-contraction coupling in crayfish.
Am. Zoologist., 7, 623-645.
- REUBEN, J.P., GIRARDIER, L. & GRUNDFEST, H. (1964)
Water transfer and cell structure in isolated crayfish muscle fibers.
J. gen. Physiol., 47, 1141-1174.
- REUBEN, J.P., WERMAN, R. & GRUNDFEST, H. (1961)
The ionic mechanisms of hyperpolarizing responses in lobster muscle fibers.
J. gen. Physiol., 45, 243-265.
- REUTER, H. (1973)
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Progress in biophysics and molecular biology, 26, 1-43.
- RICHARDS, C.D. (1969)
Chloride fluxes in crab muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 202, 211-221.
- ROBERTSON, J.D. (1960)
Ionic regulation in the crab *Carcinus maenas* (L.) in relation to the moulting cycle.
Comp. Biochem. Physiol., 7, 1-14.
- ROBERTSON, J.D. (1961)
Studies on the chemical composition of muscle fibers.
J. Exp. Biol., 38, 707-728.
- ROMERO, P.J. & WHITTAM, R. (1971)
The control by internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium.
J. Physiol., Londres, 214, 481-507.
- ROSENBLUTH, J. (1969)
Sarcoplasmic reticulum of an unusually fast-acting crustacean muscle.
J. Cell. Biol., 42, 543-547.
- ROUGIER, O. (1963)
La rectification de la membrane musculaire étudiée à l'aide du "sucrose-gap".
Helv. Physiol. Acta., 22, C 36-C 38.
- ROUGIER, O. (1964)
Mesure de la résistance membranaire de la fibre musculaire squelettique. Etude à l'aide de la méthode dite du "sucrose-gap".
C. r. Séanc. Soc. Biol., 158, 343-347.

- ROUGIER, O. (1968)
Le potentiel d'action cardiaque : interprétation d'après les données du "voltage clamp".
Thèse d'état, Poitiers.
- ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUIL, Y.M. & CORABOEUF, E. (1969)
Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 308, 91-110.
- ROUGIER, O., VASSORT, G. & IDLEFONSE, M. (1968 a)
Analyse qualitative en voltage imposé du courant de membrane de la fibre musculaire squelettique.
C.R. Acad. Sci. Paris, 266, 1754-1757.
- ROUGIER, O., VASSORT, G. & STAMPFLI, R. (1968 b)
Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose-gap technique.
Pflügers Archiv. ges. Physiol., 301, 91-108.
- SAROFF, H.A. (1957)
The binding of ions to muscle protein.
Arch. Biochem. Biophys., 71, 194-203.
- SCHNEIDER, M.F. (1970)
Linear electrical properties of the transverse tubules and surface membrane of skeletal muscle fibers.
J. gen. Physiol., 56, 640-671.
- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973)
Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling.
Nature, Londres, 242, 244-246.
- SEGAL, J.R. (1968)
Surface charge of giant axons of squid and lobster.
Biophys. J., 8, 470-489.
- SELVERSTON, A. (1967)
Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers.
Am. Zoologist, 7, 515-525.
- SHAW, J. (1955 a)
Ionic regulation in the muscle fibres of *Carcinus maenas* :
I - The electrolyte composition of single fibres.
J. Exp. Biol., 32, 383-396.
- SHAW, J. (1955 b)
Ionic regulation in the muscle fibres of *Carcinus maenas* :
II - The effect of reduced blood concentrations.
J. Exp. Biol., 32, 664-680.
- SHAW, J. (1958 a)
Further studies on ionic regulation in the muscle fibers of *Carcinus maenas*.
J. Exp. Biol., 35, 902-919.

- SHAW, J. (1958 b)
Osmoregulation in the muscle fibers of *Carcinus maenas*.
J. Exp. Biol., 35, 920-929.
- SPERELAKIS, N., SCHNEIDER, M.F. & HARRIS, E.J. (1967)
Decreased K⁺ conductance produced by Ba⁺⁺ in frog sartorius fibres.
J. gen. Physiol., 50, 1565-1583.
- STÄMPFLI, R. (1954)
A new method for measuring membrane potentials with external electrodes.
Experientia, 10, 508-509.
- STÄMPFLI, R. (1963)
Die doppelte Saccharosetrennmethode zur Messung von elektrischen Membraneigenschaften mit extracellulären Elektroden.
Helv. Physiol. Acta, 21, 189-204.
- STÄMPFLI, R. (1964)
Développement de méthodes pour mesurer les propriétés électriques de la membrane à l'aide d'électrodes extracellulaires.
Actual. Neurophysiol., 5, 1-13.
- STANDEN, N.B. (1974)
Properties of a calcium channel in snail neurones.
Nature, Londres, 250, 340-342.
- STANFIELD, P.R. (1970 a)
The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 290, 209-229.
- STANFIELD, P.R. (1970 b)
The differential effects of tetraethylammonium and zinc ions on the resting conductance of frog skeletal muscle.
J. Physiol., Londres, 290, 231-256.
- STRICKHOLM, A. (1963)
Membrane current of crab muscle.
Nature, Londres, 198, 393-394.
- SUGI, H. & OCHI, R. (1967)
The mode of transverse spread of contraction initiated by local activation in single crayfish muscle fibers.
J. gen. Physiol., 50, 2145-2166.
- SZENT-GYÖRGYI, A. (1947)
Chemistry of muscular contraction.
Acad. Press. Inc., New York.
- TAKEDA, K. (1967)
Permeability changes associated with the action potential in procaine-treated crayfish abdominal muscle fibers.
J. gen. Physiol., 50, 1049-1074.

- TAKEUCHI, A. & TAKEUCHI, N. (1967)
Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction.
J. Physiol., Londres, 191, 575-590.
- TASAKI, I. (1939)
The strength-duration relation of the normal polarized and narcotized nerve fibre.
Amer. J. Physiol., 125, 367-379.
- THOMPSON, M.H. & FARRAGUT, R.N. (1966)
Amino acid composition of the chesapeake bay blue crab *Callinectes sapidus*.
Comp. Biochem. Physiol., 17, 1065-1078.
- TSIEN, R.W. (1974)
Effects of epinephrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers.
J. gen. Physiol., 64, 293-319.
- UCHITEL, O.D. & GARCÍA, H. (1974)
Muscle contraction during hyperpolarizing currents in the crab.
J. gen. Physiol., 63, 111-122.
- USHERWOOD, P.N.R. (1973)
Action of iontophoretically applied gamma-aminobutyric acid on locust muscle fibres.
Comp. Biochem. Physiol., 44 A, 663-664.
- VALDIOSERA, R., CLAUSEN, C. & EISENBERG, R.S. (1974 a)
Circuit model of the passive electrical properties of frog skeletal muscle fibers.
J. gen. Physiol., 63, 432-359.
- VALDIOSERA, R., CLAUSEN, C. & EISENBERG, R.S. (1974 b)
Impedance of frog skeletal muscle fibers in various solutions.
J. gen. Physiol., 63, 460-491.
- VASSORT, G. (1973)
Initial ionic currents in Guinea-Pig myometrium.
J. Physiol., Londres, 237, 50-51 P.
- VASSORT, G. (1975)
Voltage clamp analysis of transmembrane ionic currents in Guinea-Pig myometrium. Evidence for an initial potassium activation triggered by calcium influx.
J. Physiol., Londres, (sous presse).
- WASHIO, H. (1971)
Initiation of action potential in insect muscle fibres.
Proc. Can. Fed. Biol. Soc., 14, 144.
- WERMAN, R. & 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., 44, 997-1027.

- WIERSMA, C. & BOBBERT, A.C. (1961)
Membrane potential changes on activation in crustacean muscle.
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 10, 51-72.
- WIERSMA, C.A. & RIPLAY, S.H. (1952)
Innervation patterns of crustacean limbs.
Physiol. Comp., 2, 391-405.
- WINEGRAD, S. (1968)
Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during
recovery from tetanus.
J. gen. Physiol., 51, 65-83.
- ZACHAR, J., ZACHAROVÁ, D. & HENČEK, M. (1964)
The relative potassium and chloride conductances in the muscle
membrane of the crayfish (*Astacus fluviatilis*).
Physiologia Bohemoslov., 13, 129-136.
- ZACHAROVÁ, D. & ZACHAR, J. (1967)
The effect of external calcium ions on the excitation-
contraction coupling in single muscle fibres on the crayfish.
Physiologia bohemoslov., 16, 191-206.
- ZEPPEZAUER, M., LINDMAN, B., FORSEN, S. & LINDQUIST, I. (1969)
A ^{81}Br nuclear magnetic resonance study of bromide ion binding
to proteins in aqueous solution.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 137-142.

Certains résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des communications, notes préliminaires et publications suivantes :

- MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1973)
Analyse en potentiel imposé des courants membranaires de la fibre musculaire de crabe.
C.R. Acad. Sci. Paris, 276, 173-176.
- MOUNIER, Y. (1973)
Activité électrique de la fibre musculaire striée de crabe. Etude du courant entrant lent par la technique du double "sucrose-gap".
J. Physiol., Paris, 67, 296 A.
- MOUNIER, Y. (1974)
Nature composite du courant initial de la fibre musculaire de crabe.
J. Physiol., Paris, 69, 165-166 A.
- MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1974)
Influence of Cl ions on the Ca-current in crab muscle fibre.
J. Physiol., Londres, 242, 92-93 P.
- MOUNIER, Y. (1974)
Etude du courant sortant retardé de la fibre musculaire de crabe.
J. Physiol., Paris, 69, 279 A.
- MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975)
Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage clamp control.
J. Physiol., Londres, (sous presse).
- MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975)
Evidence for a transient potassium membrane current dependent on Ca-influx in crab muscle fibre.
J. Physiol., Londres, (sous presse).

