

50376
1979
13
N° d'ordre : 762

50376
1979
13

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE
NERVEUSE ET MUSCULAIRE**

(3ème cycle)

par

Christiane GOBLET

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ MÉCANIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE EN RELATION AVEC LES COURANTS IONIQUES MEMBRANAIRES ET LE POTENTIEL DE MEMBRANE



Soutenue le 16 octobre 1979, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	Président	M. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille I
	Rapporteur	Mme MOUNIER	Maître-Assistante à l'Université de Lille I
	Examineurs	M. ROUSSEAU	Professeur à l'Université de Lille I
		M. VASSORT	Maître de Recherche à l'INSERM

Travail réalisé au laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE,
Laboratoire associé au CNRS n° 308.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

HISTORIQUE

p. 5

A - Contrôle de la contraction par les ions calcium p. 8

B - Mécanismes d'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. p. 11

C - Résumé des mécanismes proposés pour la régulation de la contraction. p. 24

MATERIEL et METHODES

p. 29

A - Matériel biologique p. 23

B - Cuve expérimentale p. 33

C - Enregistrement des variations de potentiel et de courant p. 36

D - Enregistrement de la contraction et contrôle des enregistrements	p. 55
E - Expression des résultats	p. 57
F - Solutions.	p. 61

RESULTATS p. 65

Chapitre I - Enregistrements obtenus
en solution ASW. p. 67

A - Etude de la relation entre le po-
tentiel de membrane, les courants
membranaires et la tension. p. 70

B - Décours des tensions p. 85

C - Conclusion p. 90

Chapitre II - Etude de la composante de
tension dépendante du courant calcique :
tension phasique C_1 . p. 93

A - Effets des milieux de composition
ionique modifiée. p. 97

B - Influence de la polarisation mem-
branaire sur l'inactivation du cou-
rant calcique et de la tension p. 102

C - Conclusion	p. 117
<u>Chapitre III</u> - Etude des composantes de tension indépendantes du courant calcique.	p. 119
A - Existence d'une tension en absence de courant calcique	p. 122
B - Dissociation des différentes composantes de tension par un milieu enrichi en manganèse	p. 123
C - Etude de la composante de tension indépendante de I_{Ca} : tension tonique C_2	p. 129
D - Etude de la composante de tension indépendante de I_{Ca} : tension phasique C_3	p. 147
E - Conclusion	p. 162
<u>Chapitre IV</u> - Approche du couplage excitation-contraction.	p. 165
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	p. 173
A - Composante de tension dépendante du courant calcique	p. 175

- B - Composante de tension indépendante p. 182
de I_{Ca} et fonction de l'amplitude
et de la durée du potentiel imposé :
 C_2
- C - Composante de tension indépendante p. 188
de I_{Ca} : C_3

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p. 195

INTRODUCTION

Il est connu depuis longtemps que l'activité mécanique des diverses structures contractiles est due à une augmentation de la concentration myoplasmique en ions calcium. Parallèlement, les études effectuées sur les fibres musculaires de Crustacés ont permis de déterminer la nature calcique du courant responsable du déclenchement de l'activité électrique. Il apparaît donc intéressant de déterminer si le flux entrant d'ions Ca^{++} se développant lors de la dépolarisation membranaire est responsable du développement de l'activité contractile des fibres musculaires de crabe.

De plus, divers auteurs ont montré l'existence de tensions lors de dépolarisations inférieures au seuil d'activation calcique ou supérieures au potentiel d'inversion pour les ions calcium. Nous nous sommes attachés à déterminer la nature des mécanismes permettant l'accroissement de la concentration calcique interne dans ces gammes de potentiel membranaires.

Nous avons également abordé la nature du couplage excitation-contraction : est-il direct ou indirect, selon un mécanisme de "calcium-induced Ca release" ou de "dépolarization-induced Ca release" à partir des citernes terminales du réticulum sarco-plasmique ?

HISTORIQUE

PLAN DE L'HISTORIQUE

A - Contrôle de la contraction par les ions calcium

B - Mécanismes d'augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

I - Influence de la concentration calcique extracellulaire.

II - Rôle du calcium stocké dans des zones intracellulaires. Nature du message permettant sa libération.

1. Libération induite par le courant calcique ("Ca-induced Ca release).

2. Libération induite par une dépolarisation membranaire ("dépolarization-induced Ca release).

3. Réticulum sarcoplasmique = compartiment extracellulaire.

III - Mécanisme d'échange Na-Ca

C - Résumé des mécanismes proposés pour la régulation de la contraction.

GALVANI (1791) fut le premier à observer qu'une stimulation électrique peut déclencher une contraction musculaire. Aujourd'hui, il est connu que les variations de longueur du muscle ou contraction dans les conditions d'isotonie impliquent chaque sarcomère dans un glissement relatif des filaments fins et épais qui maintiennent leur longueur constante mais dont le nombre d'interdigitations varie (voir la revue de question de Sandow, 1970). Comprendre le phénomène du couplage excitation-contraction correspond donc à déterminer les mécanismes qui interviennent entre la dépolarisation membranaire induite par une stimulation électrique et prenant la forme d'un potentiel d'action, et la contraction. Un résultat fondamental a permis de guider les recherches ; en effet, Heilbrunn et Wiercinsky (1947), Niedgergerke (1955), Podolsky et Costantin (1964), sur les fibres musculaires squelettiques et Caldwell et Walster (1963) sur le muscle de crabe, montrèrent que les mécanismes contractiles peuvent être activés par un accroissement de la concentration intracellulaire en ions calcium ($[Ca]_i$).

A - Contrôle de la contraction par les ions calcium.

Compte-tenu de l'importante bibliographie

relative à ce sujet, nous avons choisi de ne présenter dans cette partie que les travaux effectués sur des fibres musculaires de Crustacés. Ceux-ci mettent en évidence un phénomène classiquement décrit sur diverses structures : la nécessité des ions calcium pour le déclenchement de la contraction. En effet, Portzehl et coll. (1964) en utilisant une solution tamponnée (Ca-EGTA), ont estimé la valeur seuil de $[Ca]_i$ nécessaire pour initier la contraction sur des fibres intactes. Évaluée sur les fibres musculaires géantes de *Maia squinado*, cette valeur varie entre 3.10^{-7} M et 15.10^{-7} M alors que la concentration calcique interne de repos est inférieure à 10^{-7} M. Par une méthode comparable, Hagiwara et Nakajima (1966 b) et Ashley (1967) sur les fibres musculaires de barnacle déterminèrent la plus petite valeur de $[Ca]_i$ permettant le développement d'une tension ; celle-ci varie entre 5.10^{-7} M et 9.10^{-7} M. Sur ces mêmes fibres, la $[Ca]_i$ de repos est comprise entre $0,8.10^{-7}$ M et 2.10^{-7} M (Hagiwara et Nakajima, 1966 ; Ashley et Ridgway, 1970). Il est donc nécessaire que la concentration calcique intracellulaire soit au moins multipliée par 2 pour qu'une tension se développe.

Les travaux de Gillis (1967), sur les myofibrilles isolées de crabe, ont permis de déterminer la zone de la fibre musculaire la plus sensible aux

ions calcium (Ca^{++}). En effet, par l'injection d'ions calcium à l'aide d'une micropipette le long du sarcomère, il a mis en évidence que plus la pipette d'injection est proche de la jonction A-I, plus la quantité de Ca^{++} nécessaire pour produire la plus petite contraction peut être réduite. Or, les travaux de Selverston (1967) sur les fibres musculaires de barnacle et de crabe ont montré que la zone de la jonction A-I est la zone des diades. Il est connu que les diades sont l'équivalent, chez les Crustacés, des triades observées chez les Vertébrés et sont une zone de contact étroit entre la membrane des tubules et la membrane des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS) (Peachey et Huxley, 1964).

La nécessité de l'augmentation de la $[\text{Ca}]_i$ pour qu'une tension se développe est donc bien établie. De plus, les travaux de Ridgway et Ashley (1967) sur le muscle squelettique de barnacle ont permis de visualiser l'augmentation de la concentration myoplasmique en ions calcium après une stimulation ; leurs résultats obtenus en mesurant la variation de la concentration en ions calcium directement à l'aide d'une méthode optique (fluorescence de l'aequorine) prouvent que l'augmentation est transitoire et a une durée plus courte que celle de la contraction.

Le point que nous nous proposons d'exposer maintenant va donc consister à analyser par quels mécanismes la $[Ca]_i$, dont le rôle apparaît déterminant, est augmentée.

B - Mécanismes d'augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

I - Influence de la concentration calcique extracellulaire.

Les études effectuées dans les conditions de potentiel imposé ont permis de mettre en évidence sur la plupart des tissus contractiles l'existence d'un courant entrant calcique, I_{Ca} . Ce courant :

- est responsable de l'activité électrique membranaire, dans le cas des fibres musculaires de Crustacés (Hagiwara et Naka, 1964 ; Mounier et Vassort, 1973, 1975 a ; Henček et Zachar, 1977)

- participe à l'activité électrique membranaire, pour le tissu cardiaque (Mascher et Peper, 1969 ; Rougier et coll., 1969 ; Beeler et Reuter, 1970 a ; Ochi, 1970), et pour les fibres musculaires squelettiques de grenouille (Béaty et Stéfani, 1976 ;

Stanfield, 1977 ; Sanchez et Stéfani, 1978).

Ce flux entrant d'ions Ca^{++} crée une augmentation transitoire de $[\text{Ca}]_i$.

Pour certains auteurs cette variation de $[\text{Ca}]_i$ est essentielle dans le déclenchement de l'activité mécanique. En effet, ils montrèrent que l'apparition de la tension est très intimement liée à l'activation de I_{Ca} puisque divers ions ou drogues inhibant I_{Ca} bloquent le développement de la réponse mécanique. C'est notamment le cas pour

- le manganèse (Rougier et coll., 1969 ; Chapman et Ochi, 1972 ; Kohlhardt et coll., 1973 ; sur le tissu cardiaque ; Suarez-Kurtz et coll., 1972, sur les fibres musculaires d'écrevisse ; Chiarandini et Stéfani, 1973, sur les fibres musculaires de grenouille).

- le cobalt (Hagiwara et coll., 1968, sur les fibres musculaires de barnacle ; Matsumura, 1972 , sur les fibres musculaires d'écrevisse ; Sanchez et Stéfani, 1978, sur le muscle squelettique de grenouille).

- la streptomycine (Suarez-Kurtz, 1974, sur les fibres musculaires de crabe).

De plus, un autre résultat confirme cette hypothèse : une concentration calcique extracellulaire accrue induit une augmentation de I_{Ca} (Mounier et Vassort, 1975a; Caputo et Dipolo, 1978) et un accroissement

de l'amplitude de la tension (Hagiwara et coll., 1968 ; Caputo et Dipolo, 1978, sur les fibres musculaires de barnacle).

Par contre, pour d'autres auteurs les ions calcium du milieu externe ne sont pas nécessaires au développement de l'activité mécanique des fibres musculaires. En effet, Armstrong et coll. (1972) et Sandow et coll. (1975) montrèrent qu'en absence de calcium externe les fibres musculaires pour lesquelles le courant responsable du déclenchement de l'activité électrique est de nature sodique peuvent développer une tension en réponse à une dépolarisation membranaire.

Il semble donc que deux hypothèses concernant le couplage excitation-contraction se dégagent :

- le courant calcique est indispensable au développement de la tension
- le courant calcique n'est pas nécessaire au développement de la tension.

Dans le cadre de la première hypothèse, il faut maintenant savoir si l'influx de calcium produit lors d'une dépolarisation membranaire est suffisant pour permettre le développement d'une tension. Divers auteurs, sur diverses structures ont effectué une estimation de la quantité de Ca^{++} entrant lors du développement de I_{Ca} et de l'augmentation de $[\text{Ca}]_i$

consécutives. Ceux-ci démontrèrent que les ions calcium se fixent directement sur les protéines contractiles et sont en quantité suffisante pour induire la contraction. Ce résultat a été obtenu sur la fibre musculaire de grenouille (Bianchi et Shanes, 1959 ; Bianchi, 1969), sur la fibre musculaire de barnacle (Atwater et coll., 1974) et sur la cellule musculaire d'escargot (Kiss, 1977).

Un tel couplage a été dénommé couplage direct ou "direct coupling" (Bianchi, 1969).

D'autres auteurs estiment que la petite quantité de calcium entrant lors d'un potentiel d'action est essentielle mais insuffisante pour produire l'activation du système contractile. Ce résultat a été obtenu i) sur les fibres musculaires squelettiques pour lesquelles le courant responsable de l'activité électrique est sodique = "structures sodiques" (Weiss et Bianchi, 1965 ; Bianchi et Bolton, 1966, 1967 ; Godt, 1974), ii) sur les cellules cardiaques pelées (Fabiato et Fabiato, 1975), iii) sur les fibres musculaires de Crustacés (Brandt et coll., 1972 ; Endo, 1972 ; Caputo et Dipolo, 1978).

Il est donc nécessaire d'envisager une autre origine pour le calcium activateur de la contraction.

II - Rôle du calcium stocké dans les zones intracellulaires - Nature du message permettant sa libération.

Depuis les études de Costantin et coll. (1964) et de Winegrad (1968) il est établi que les ions Ca^{++} sont emmagasinés dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Ce résultat a été confirmé par la développement de contractures se produisant sous l'effet de la caféine (Weber et Herz, 1968). Or, il est connu que cette substance n'induit pas de dépolarisation membranaire mais perméabilise la membrane des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (Bianchi, 1968). Les contractures caféiniques ne peuvent donc se développer que grâce à la libération du calcium sequestré dans le RS.

Il s'agissait alors de déterminer la nature du message permettant l'accroissement de la perméabilité calcique de la membrane du RS lors de l'excitation. Actuellement deux hypothèses existent :

1 - l'influx calcique créé par la dépolarisation membranaire de surface, induit la libération du calcium sequestré dans le RS. Ce mécanisme est appelé "Ca-induced Ca release" (Ford et Podolsky, 1968).

2 - la dépolarisation de la surface membra-

naire prenant la forme d'un potentiel d'action se propage le long de la membrane du système tubulaire transverse et pourrait atteindre la membrane du réticulum sarcoplasmique. La dépolarisation de la membrane du RS permettrait la libération du calcium sequestré. Ce mécanisme est appelé "dépolarization-induced Ca release" (Endo et Nakajima (1973)).

1 - Libération induite par le courant calcique ("Ca-induced Ca release").

Différents travaux mettent en évidence l'insuffisance de l'influx calcique pour permettre le développement d'une tension. En effet, d'après certains auteurs la quantité d'ions calcium pénétrant dans le myoplasme lorsque I_{Ca} est activé est trop faible pour rendre compte de la concentration myoplasmique en calcium nécessaire pour l'activation de la contraction . En outre, certains travaux montrent la nécessité du calcium extracellulaire pour l'induction du largage du calcium sequestré dans le réticulum sarcoplasmique et d'autres, effectués dans les conditions de potentiel imposé, précisent que c'est le courant calcique qui induit la libération des ions Ca^{++} à partir du RS.

Un tel mécanisme de couplage excitation-contraction a été mis en évidence sur de nombreuses structures :

- sur les "structures sodiques", notamment le muscle squelettique de grenouille (Frank, 1960), les fibres squelettiques pelées de grenouille (Ford et Podolsky, 1970, 1972), et diverses fibres squelettiques pelées (Endo et coll., 1970).

- sur le tissu cardiaque, notamment diverses cellules cardiaques pelées (Fabiato et Fabiato, 1975, 1977 a), les fibres de Purkinje (Gibbons et Fozzard, 1975)

- sur les "structures calciques", notamment les fibres musculaires de crabe et de barnacle (Ashley et coll., 1972) et les fibres musculaires de barnacle (Hidalgo et coll., 1979).

Un autre type de résultat apporte indirectement une preuve supplémentaire de l'existence du mécanisme d'induction de la libération calcique par les ions calcium eux-mêmes (Gillis, 1967). En effet, cet auteur a montré que plus l'injection d'ions Ca^{++} est proche de la membrane des citernes terminales du RS plus la quantité à injecter est faible. Ce résultat signifie, compte tenu, de la diffusion des ions Ca^{++} dans le myoplasme que le site d'action de ces ions est la membrane des citernes terminales et qu'ils

induisent la libération du calcium stocké.

Ce mécanisme de largage du calcium est gradué (Fabiato et Fabiato, 1975), ce qui est en accord avec l'évolution parallèle de la tension et du courant calcique en fonction de la polarisation membranaire. En effet, la libération calcique n'est pas seulement fonction de la concentration du calcium libre qui l'induit mais aussi de la charge calcique du RS : une diminution de la concentration intravésiculaire en calcium inhibe l'efflux calcique à partir des vésicules du RS (Weber, 1971). Cependant, ce mécanisme est très largement remis en cause par Endo (1975 a et b). En effet à partir d'expériences sur le RS isolé, il a estimé que la concentration de calcium libre nécessaire pour induire un largage de calcium est supérieure à $3 \cdot 10^{-4}$ M. Or nous avons vu précédemment qu'à partir d'une concentration interne en calcium libre égale à $6-9 \cdot 10^{-7}$ M, une tension se développe. Cet auteur en déduit donc que le largage physiologique du calcium n'est probablement pas induit par le mécanisme de Ca-induced Ca release. Thorens et Endo (1975) par des expériences effectuées sur des fibres pelées, estiment que le mécanisme de Ca-induced Ca release n'aurait lieu que sous certaines conditions non physiologiques, notamment lors de l'application de concentrations faibles de caféine

produisant la potentiatiion de la secousse musculaire. De plus, ils pensent que ce mécanisme se produit préférentiellement sur le muscle lisse et le muscle cardiaque.

2. Libération induite par une dépolarisation membranaire : "Depolarization - induced Ca release".

Les expériences de Costantin et Podolsky (1966, 1967) montrèrent que l'application des ions chlorures (Cl^-) ou du tampon Tris sur des fibres pelées de grenouille provoque la contraction. Le développement de la tension a été interprété comme le résultat de l'augmentation de la perméabilité calcique de la membrane du RS par la dépolarisation induite par la substitution des ions. Ce mécanisme a été mis en évidence sur le muscle squelettique (Endo et Nakajima, 1973).

Une autre preuve de la dépolarisation de la membrane du RS lors de l'excitation est apportée par l'utilisation d'une substance fluorescente : le bleu Nil A dont l'émission fluorescente varie lors de changements du potentiel membranaire (Baylor et

Oetliker, 1975 a, b, c ; Bezannila et Horowicz, 1975 ; Vergara et coll., 1978). La variation de fluorescence enregistrée ayant lieu après le déclenchement du potentiel d'action et avant le développement de la tension, ces auteurs concluent que la dépolarisation membranaire a vraisemblablement atteint le niveau du réticulum sarcoplasmique et qu'elle pourrait être à l'origine de la libération du calcium.

3. Réticulum sarcoplasmique = compartiment extracellulaire.

Birks et Davey (1969) en comparant les variations de volume de la fibre entière et du RS en réponse à l'application de solutions hypertoniques ont conclu que celui-ci est un compartiment extracellulaire. Il y aurait donc entre les tubules et les citernes terminales du RS des "cross-bridges" ou encore pores semi-perméables qui créeraient une continuité entre l'espace extracellulaire et le RS (Birks, 1965). Donc, lors de l'excitation, la variation du potentiel membranaire (dépolarisation) qui se propage du sarcolemme vers les tubules transverses (Huxley et Straub, 1958 ; Huxley et Taylor, 1958 ; Strickholm, 1966) pourrait continuer directement vers

les citernes terminales du RS et permettre le largage du calcium vers le myoplasme.

Une approche comparable a été effectuée par Page et Page (1968). En effet par l'étude du temps d'équilibration des ions sulfates et du saccharose avec l'eau intracellulaire, ils ont, parmi d'autres observations, montré l'existence possible d'une continuité entre le compartiment extracellulaire et le réticulum sarcoplasmique.

III - Mécanisme d'échange Na-Ca.

Il est maintenant bien établi que lorsque la membrane des cellules excitables et contractiles est dépolarisée, un courant calcique entrant s'active. Afin que la cellule maintienne sa concentration calcique intracellulaire faible par rapport à celle de la solution externe, il est nécessaire d'admettre que dans chaque cellule un mécanisme permet l'éjection du calcium. Nous analyserons ici l'un d'entre eux : celui impliquant un échange entre les ions Ca et Na.

En effet, sur des préparations cardiaques isolées, Reuter et Seitz (1968) décrivent un efflux de calcium dépendant des concentrations sodique et calcique extracellulaires. L'énergie nécessaire pour

la sortie des ions calcium est fournie par l'entrée dans la cellule d'ions sodium et calcium à partir du milieu extracellulaire très concentré. De plus, Baker et coll. (1969) indiquent que le sodium intracellulaire peut modifier l'influx de calcium.

Plus tard, sur les fibres musculaires de barnacle, Russel et Blaustein (1974) ont décrit un efflux de calcium dépendant des concentrations sodique extracellulaire et intracellulaire. De plus, Blaustein et Russel (1975, sur les axones géants de calmar) ont observé un influx sodique dépendant de la concentration calcique intracellulaire ainsi qu'un mécanisme d'influx d'une part associé à un efflux sodique et d'autre part dépendant de la concentration calcique intracellulaire.

Les travaux de Horačková et Vassort (1979) sur l'oreillette de grenouille ont montré que le mécanisme d'échange Na-Ca fonctionne dans le sens d'un efflux calcique associé à un influx sodique lorsque la polarisation membranaire est égale à la polarisation membranaire de repos. Il fonctionne dans le sens d'un influx calcique associé à un efflux sodique lorsque la membrane est dépolarisée. Ce mécanisme interviendrait donc de la façon suivante pour réguler la concentration calcique intracellulaire :

1. l'influx calcique associé à l'efflux sodique, pourrait, par l'augmentation de $[Ca]_i$ qu'il induit, permettre le développement d'une tension (Miller et Moiescu, 1976, sur l'oreillette de grenouille) et plus précisément de la tension dite tonique (Horačková et Vassort, 1976, 1979, sur l'oreillette de grenouille). Le mécanisme d'échange Na-Ca est donc une autre source d'augmentation de $[Ca]_i$ et permet d'expliquer les tensions amples dépendantes de la concentration calcique extracellulaire, dues à des dépolarisations membranaires supérieures au potentiel d'équilibre pour les ions Ca^{++} . En effet, Horačková et Vassort (1979) ont montré que l'amplitude de l'influx calcique associé à l'efflux sodique augmente lorsque la dépolarisation membranaire est accrue.

2. l'efflux calcique associé à l'influx sodique pourrait être impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique à long terme (Russell et Blaustein, 1974).

C - Résumé des mécanismes proposés pour la régulation de la contraction.

La plupart des mécanismes proposés l'ont été pour les structures cardiaques. Cependant Nayler (1967) compare le couplage excitation-contraction des fibres musculaires squelettiques et des cellules musculaires cardiaques. D'après cet auteur la différence essentielle existant entre ces deux structures réside dans le fait que le couplage est direct sur les cellules cardiaques alors que sur les fibres squelettiques, le calcium activateur de la contraction est issu du réticulum sarcoplasmique (Fig. 1).

Plus tard, Tritthart et coll. (1973), sur le coeur de Chat, ont précisé le mécanisme du couplage excitation-contraction des cellules cardiaques : lors de l'excitation, une dépolarisation prenant la forme du potentiel d'action sodique de surface se propage le long du système tubulaire transverse puis induit le largage du calcium sequestré dans le RS selon un processus essentiellement dépendant du temps. Simultanément, lors de la dépolarisation, le courant calcique I_{Ca} se développe et les ions calcium sont distribués à la fois dans le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries où ils sont stockés. Le calcium fixé sur

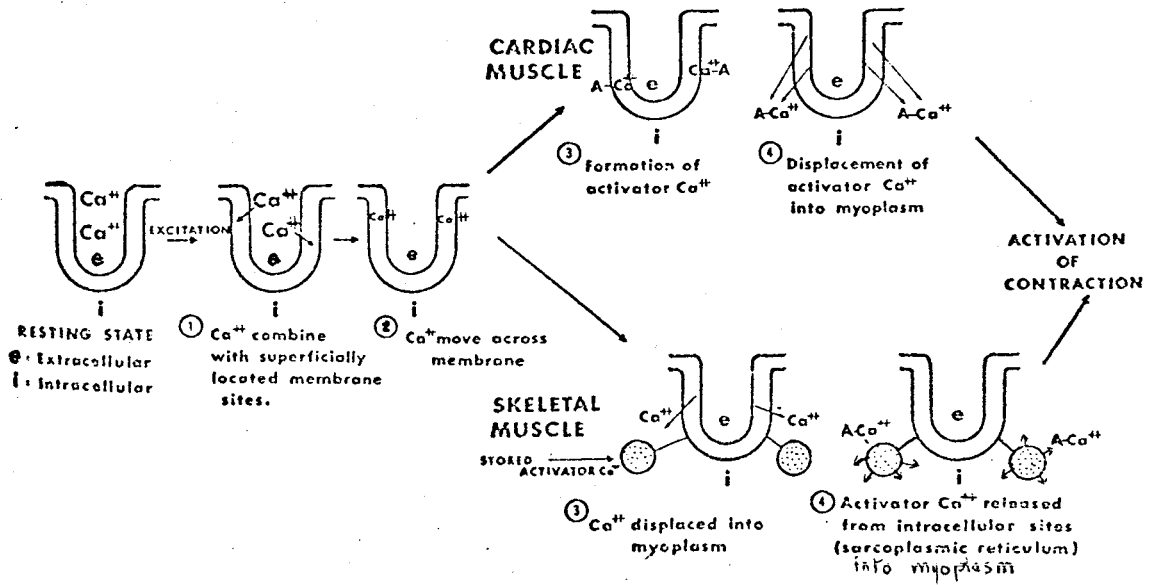


Figure 1. : Représentation schématique des événements impliqués dans le couplage excitation-contraction des muscles cardiaque et squelettique. Notez la différence d'origine du calcium activateur de la contraction.

D'après Nayler (1967)

les protéines contractiles est ensuite repris par une région du RS différente de la région du largage (Gibbons et Fozzard, 1971) et le mécanisme fonctionne dans le sens d'un efflux calcique associé à un influx sodique (Reuter et Seitz, 1968 ; Langer, 1968). Ces deux mécanismes permettent de diminuer $[Ca]_i$ afin qu'elle revienne à sa valeur de repos. Le calcium capté par le RS devra pour être à nouveau disponible, c'est-à-dire libéré par la dépolarisation membranaire, migrer dans une autre zone du RS. Ce déplacement d'une zone à une autre zone du RS est à la fois dépendant du temps et du potentiel (Beeler et Reuter, 1970 b ; Gibbons et Fozzard, 1971). Un tel mécanisme de régulation de $[Ca]_i$ lors de la contraction avait été partiellement proposé par Beeler et Reuter (1970 b) puisque les auteurs suggèrent que les ions calcium entrant lors d'une dépolarisation sont très rapidement inactivés par une fixation sur les sites intracellulaires avant de se fixer sur les protéines contractiles. Ces ions Ca^{++} seront ensuite largués par un mécanisme inconnu dépendant de la dépolarisation mais apparemment indépendant du flux calcique ou sodique. Le flux calcique permettrait donc le remplissage du réservoir calcique intracellulaire (Beeler et Reuter, 1970 b ; Gibbons et Fozzard, 1975).

Ce mécanisme tente de concilier l'importance de la dépolarisation membranaire et du flux calcique dans le couplage excitation-contraction. Une interprétation comparable a été émise sur les fibres musculaires d'Invertébrés. En effet, Caputo (1978) estime que sur ces structures les ions calcium qui pénètrent dans la cellule lors de la dépolarisation membranaire, ne contribuent pas directement à l'activation contractile. D'après cet auteur, ces ions pourraient remplir les zones de stockages intracellulaires à partir desquelles le calcium est libéré durant la dépolarisation membranaire. On peut également envisager comme Fabiato et Fabiato (1977 b, sur les cellules cardiaques pelées et les fibres musculaires squelettiques pelées) que le rôle de la dépolarisation membranaire et du courant calcique dans le couplage excitation-contraction ne s'excluent pas l'un l'autre. En effet, leurs résultats suggèrent que la dépolarisation de la membrane du RS observée lors de l'excitation est une conséquence de la libération calcique.

MATERIEL

ET

METHODES

A - Matériel biologique.

B - Cuve expérimentale.

C - Enregistrement des variations de potentiel et de courant.

I - La technique du "sucrose-gap".

II - Dispositif de mesure.

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

2. Mesure du courant de membrane en voltage imposé ("Voltage clamp").

III - Limites et contrôle de la technique.

1. Limites de la technique du potentiel imposé et propriétés inhérentes au "sucrose-gap".

2. Contrôle des mesures.

D - Enregistrement de la contraction et contrôle des enregistrements.

E - Expression des résultats.

F - Solutions

I - Eau de mer artificielle : solution physiologique de référence.

II - Autres solutions physiologiques externes.

III - Solutions avec inhibiteurs de perméabilité.

IV - Solutions avec drogues pharmacologiques.

A - MATERIEL BIOLOGIQUE.

Les expériences ont été réalisées sur des fibres isolées du muscle extenseur du méropodite des pattes du crabe enragé : *Carcinus maenas*. Ces fibres ont une section comprise entre 150 μm et 300 μm , section généralement cylindrique mais cependant elliptique pour les plus grosses d'entre elles. Elles correspondent aux fibres intermédiaires décrites par Atwood et coll. (1965).

Les fibres sont isolées dans de l'eau de mer artificielle (Artificial Sea Water : ASW), puis amenées à la cuve expérimentale dans une goutte de cette eau de mer déposée sur une lamelle de verre.

B - CUVE EXPERIMENTALE (Fig. 2).

La fibre est installée dans une cuve à cinq compartiments comparable à celle décrite par Rougier et coll. (1968) pour le trabécule sino-auriculaire du coeur de grenouille (voir aussi Mounier et Vassort, 1975 a), de telle façon que cette fibre s'étende sur les cinq compartiments. Ces compartiments

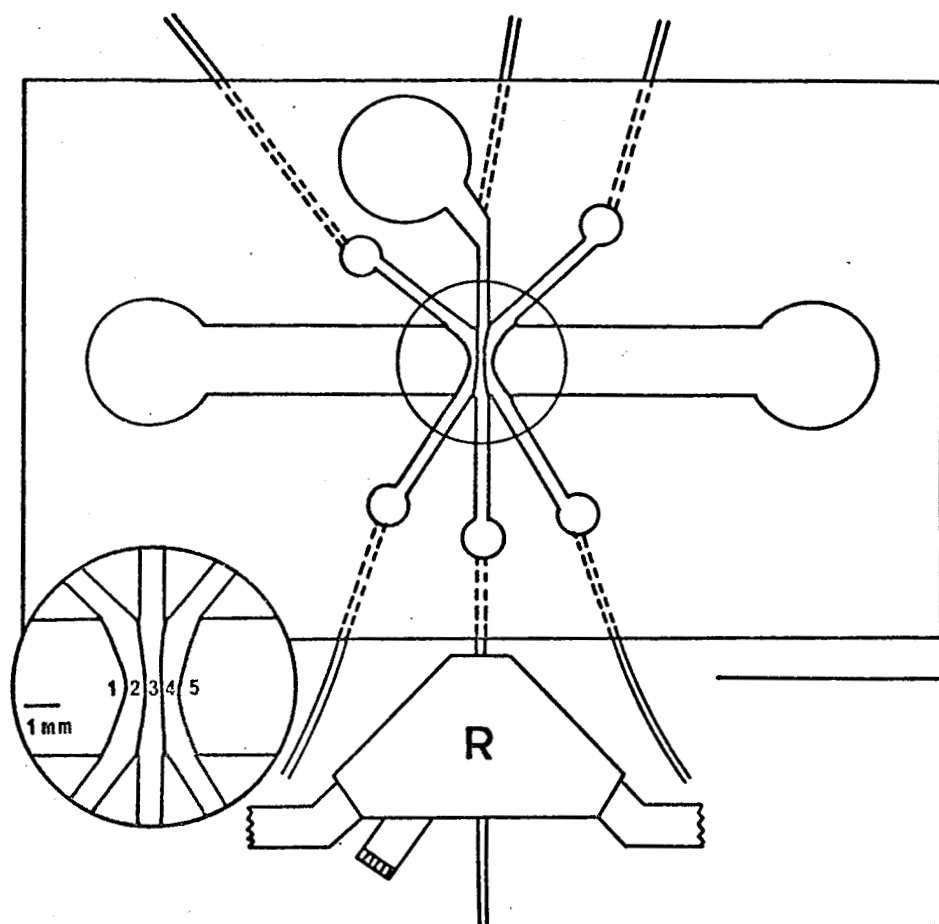


Figure 2 : Schéma de la cuve expérimentale.

Dans le médaillon, la partie centrale a été agrandie.

1-5 : compartiments de référence

2-4 : compartiments de saccharose, largeur
300 à 400 μm

3 : compartiment test, largeur 200 μm
environ

R : Robinet de changement de solution

sont :

- le compartiment central 3 constituant le compartiment test dans lequel baigne la portion de fibre étudiée et où circulent le liquide physiologique ou les différentes solutions à tester. A l'entrée de ce compartiment est situé un robinet spécial (Kilb et Stämpfli, 1955), dont l'utilisation permet, du fait du faible volume du compartiment, un changement complet de solution en une fraction de seconde.

- compartiments 2 et 4, d'une largeur d'environ 300 à 400 μm , dans lesquels circule une solution de saccharose légèrement hypertonique (1, 1 X la tonicité normale).

- compartiments 1 et 5 ou compartiments latéraux remplis d'une solution ionique similaire au milieu interne, ou d'une solution d'eau de mer artificielle additionnée de formol (2 %). Cette solution stagne dans ces 2 compartiments.

Ces différents compartiments sont séparés par de fines cloisons dont la tranche est recouverte d'un film de vaseline afin de créer une bonne étanchéité et d'éviter une hyperpolarisation de la fibre comme nous le verrons ensuite (limites de la technique).

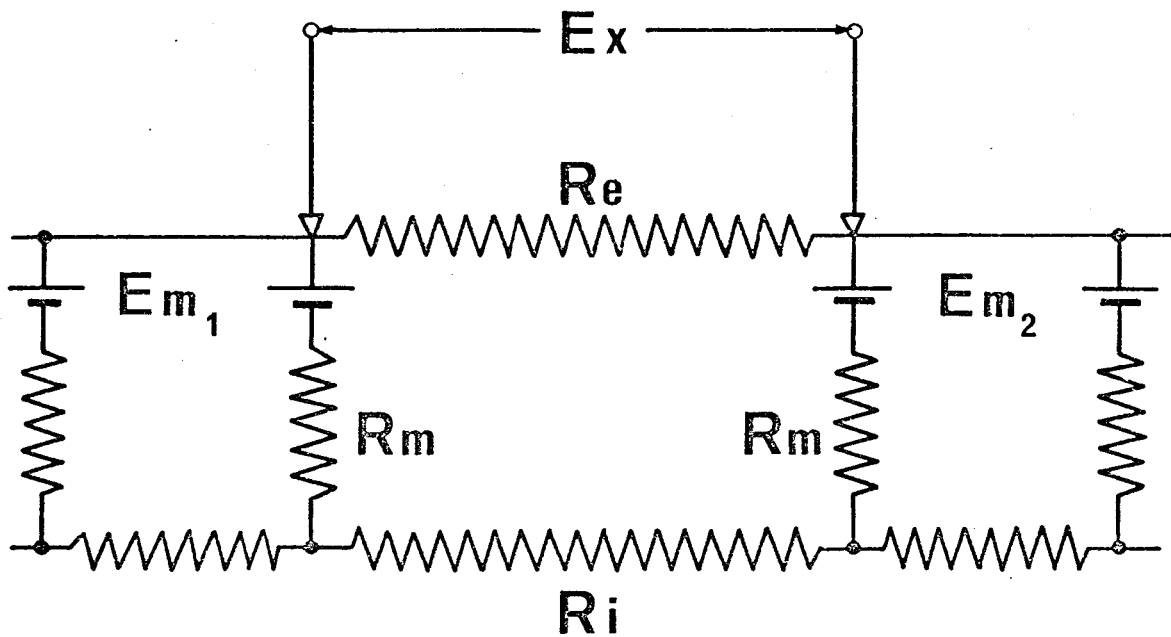
C - ENREGISTREMENT DES VARIATIONS DE POTENTIEL ET
DE COURANT.

L'activité électrique de la fibre est enregistrée à l'aide d'électrodes externes. Cette méthode nécessite une élévation des résistances extérieures à la fibre. En effet, on ne peut enregistrer la quasi-totalité des variations de potentiel entre deux régions d'une structure excitable que si la chute de tension due à un écoulement de courant entre ces deux points se manifeste intégralement aux bornes de la résistance constituée par le milieu extracellulaire. Ceci est réalisé si la résistance externe (R_e) est très grande par rapport à la résistance interne (R_i) (Fig. 3). En effet, soit :

$E_{m_1} - E_{m_2}$ la différence de potentiel existant entre deux points 1 et 2 à l'extérieur de la préparation, le potentiel mesuré E_x par voie externe, dépend du rapport des résistances internes et externes tel que

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

La valeur E_x mesurée sera d'autant plus proche de la vraie valeur de la différence de poten-



$$E_x = E_{m_1} - E_{m_2} \left(\frac{R_e}{R_e + R_i} \right)$$

Figure 3 :

- 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)



tiel entre 1 et 2 que $\frac{R_e}{R_e + R_i}$, appelé facteur de court circuit, tendra vers 1. Ceci a lieu si R_e est très grande par rapport à R_i . De telles conditions ont été réalisées pour l'étude du noeud de Ranvier, en plaçant dans l'air la portion internodale. C'est la technique de l'air gap (Tasaki, 1939).

I - La technique du "sucrose-gap".

Cette méthode, proposée par Stämpfli (1954), est dérivée de celle de l' "air gap" et est susceptible d'être appliquée à toute structure excitable.

Elle consiste à laver continuellement une portion de fibre avec une solution de saccharose isotonique : méthode du "sucrose gap". La résistance spécifique du saccharose est égale à $10^5 \Omega.cm$.

Le lavage de la fibre par deux écoulements de saccharose permet d'isoler électriquement un "noeud artificiel" comparable au noeud de Ranvier. Ce "noeud artificiel" a une longueur correspondant à peu près à la largeur du compartiment test, soit 100 μm lorsque les cloisons de vaseline sont réalisées. Cette valeur est très inférieure à la constante

d'espace de la fibre au repos comprise entre 700 μm et 1400 μm , valeur déterminée par microélectrodes (Fatt et Katz, 1953, Mounier, 1970).

II - Dispositif de mesure.

Le dispositif utilisé permet de faire sur chaque préparation :

- des mesures du potentiel de membrane en courant imposé (current-clamp) ,
- des mesures du courant de membrane en potentiel imposé (voltage-clamp).

Dans les deux cas, nous avons utilisé un amplificateur différentiel à courant continu possédant les caractéristiques suivantes :

- résistance d'entrée 10^9 ohms
- courant grille inférieur à 10^{-12} A
- gain 2000
- produit gain x bande passante 650 MH_z
- 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.

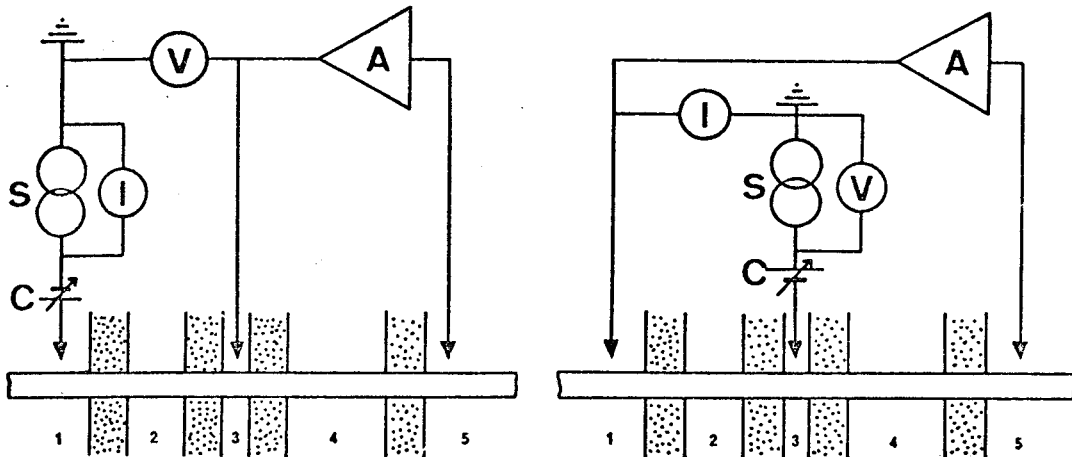


Figure 4 : Dispositif expérimental

à gauche : Mesure en courant imposé ("Current-clamp")

à droite : Mesure en potentiel 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 des
dissymétries d'électrodes et de potentiel

I : Oscilloscope cathodique (mesure du courant)

V : Oscilloscope cathodique (mesure du poten-
tiel)

S : Stimulation

d'après ROUGIER et coll. (1968)

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.

Trois électrodes au calomel relient aux appareils de mesure et de stimulation les compartiments 1, 3, 5, par l'intermédiaire de pont d'agar - KCL 3 M (Résistance de l'ensemble pont + électrode $2 \text{ k}\Omega$).

1. Mesure du potentiel de membrane en
courant imposé ("current clamp") (Fig. 4).

L'amplificateur est connecté suivant la méthode indiquée par Stämpfli (1963). La contre réaction de l'amplificateur appliquée entre les compartiments 3 et 5, a pour effet de maintenir le potentiel sarcoplasmique, au niveau du compartiment test, au potentiel de terre. Le courant I délivré par le stimulateur S s'écoule par les résistances en série R_{m1} , R_i (1'-3'), R_{m3} et par la faible impédance de sortie de l'amplificateur (voir Fig. 4 et 5). Le potentiel sarcoplasmique étant maintenu en 3', du fait de la contre-réaction, au potentiel de terre, on enregistre ainsi les variations de potentiel qui

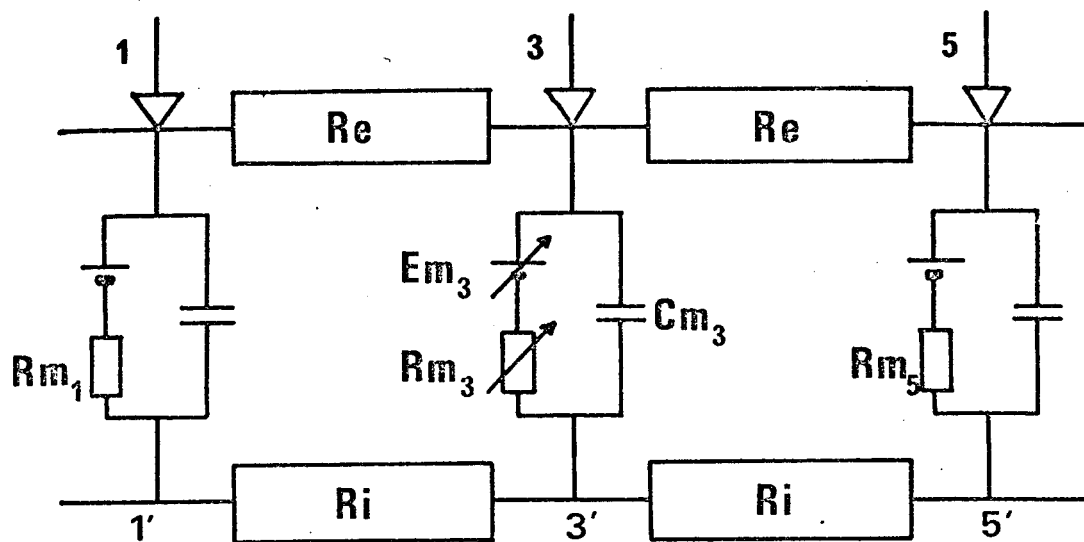


Figure 5 : Diagramme du circuit électrique équivalent de la préparation montée dans le dispositif à double "sucrose gap"

1-3-5 : Electrodes des compartiments correspondants

R_e : Résistance extracellulaire

R_i : Résistance intracellulaire

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

D'après ROUGIER (1968)

apparaissent de part et d'autre de la membrane.

2. Mesure du courant de membrane en voltage imposé ("voltage-clamp") (Fig. 4).

Pour les mesures en voltage imposé, 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' étant au potentiel de terre, la membrane dans ce compartiment test (3) est 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 assez faible.

L'amplificateur fournit un courant pour maintenir la membrane au potentiel choisi, ce courant est directement proportionnel au potentiel délivré par la sortie de l'amplificateur divisé par les résistances en série R_{m1} et R_i (1'-3') (Fig. 5).

III - Limites et contrôle de la technique.

1. Limites de la technique du potentiel imposé, et propriétés inhérentes au "sucrose-gap".

Afin de préciser les termes employés et la technique, le schéma de la technique du potentiel imposé et la représentation des potentiels en des points variés sont reportés à la figure 6. Il faut auparavant noter que le potentiel V appliqué dans le compartiment test (B) est égal et opposé au potentiel délivré par le générateur de tension puisque leur somme doit être dans cette technique égale à zéro et que le potentiel membranaire E_m est égal à $E_R + V_m$. Lors du flux de courant, le potentiel imposé à la membrane, V_m , à proximité du compartiment contenant le saccharose et isolant le compartiment relié à l'entrée de l'amplificateur (C) diffère du potentiel délivré par le stimulateur, $-V$, par 2 facteurs. Le premier facteur est un facteur commun à toutes les techniques de potentiel imposé : la chute de tension due au passage du courant, I_m , dans les résistances séries, R_S . Le potentiel $-V_0$, appliqué à la face externe de la membrane est donc égal à $-V + R_S I_m$ (I_m sortant est positif). Le second facteur résulte du fait que l'isolement par le compartiment de saccharose entre le compartiment test et le compartiment

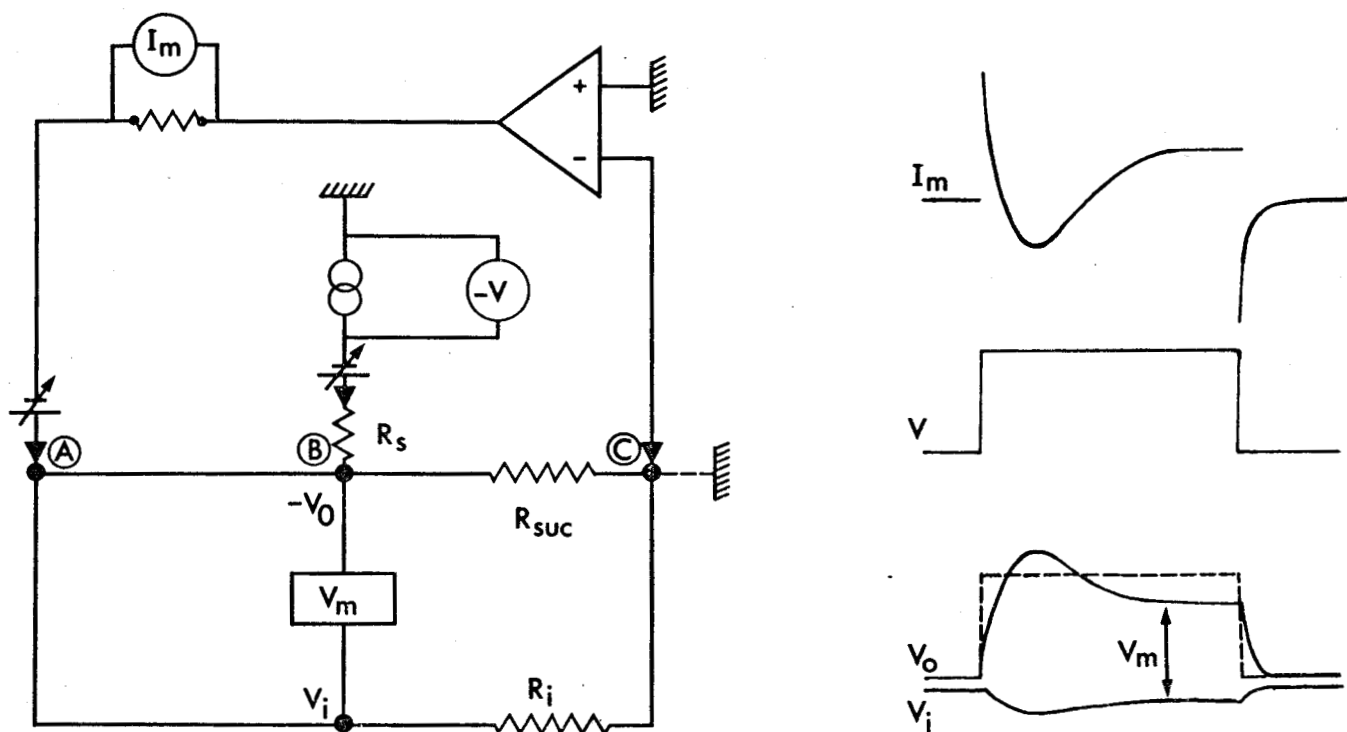


Figure 6 : Représentation schématique du circuit de potentiel imposé et du potentiel en des points variés de ce circuit. Les abréviations sont expliquées dans le texte.

relié à l'entrée de l'amplificateur n'est pas parfait et qu'un courant passe dans la résistance du saccharose R_{suc} et la résistance interne R_i . Par conséquent, le potentiel appliqué à la membrane V_m est tel que

$$V_o = V_m \cdot R_{\text{suc}} / (R_{\text{suc}} + R_i) \text{ c'est-à-dire}$$

$$V_m = (V - R_S I_m) (R_{\text{suc}} + R_i) / R_{\text{suc}} \quad (1).$$

Le courant de fuite crée également un potentiel, V_i , à la face interne de la membrane qui est égal à

$V_m \cdot R_i / (R_{\text{suc}} + R_i)$ ou encore en remplaçant V_m par sa valeur obtenue dans l'équation (1)

$V_i = (V - R_S I_m) R_i / R_{\text{suc}}$. Ce dernier facteur est d'amplitude limitée, quelques mV, comme l'ont montré les résultats obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires (Mounier, 1975 ; Mounier et Vassort, 1975 b). En effet, il compense partiellement la perte de potentiel appliqué à la face externe de la membrane quand I_m est sortant ; c'est la situation que l'on observe le plus souvent à cause des courants de fuite importants existant sur les fibres musculaires de crabe. De plus, l'écoulement des différents liquides crée l'apparition de potentiels de jonction. Ceux-ci se produisent, d'une part lors du changement de solution test à l'interface entre celle-ci et l'électrode au KCl et d'autre part, entre la solution test et les écoulements de saccharose. Ces différents potentiels, de même qu'une petite dissymétrie entre les potentiels

des électrodes au calomel sont compensables à l'aide de piles (voir Figure 6).

Ainsi, lorsque l'on commence une expérience ou 3 à 5 minutes après le changement de solution, le circuit de potentiel imposé est ouvert et les différents potentiels de jonction sont compensés. La compensation est contrôlée plusieurs fois durant l'expérience.

Nous avons vu précédemment qu'il est nécessaire d'utiliser une solution de saccharose dépourvue d'ions afin que le facteur de court-circuit $\frac{R_e}{R_e + R_i}$ tende vers 1. Cependant, celle-ci entraîne parfois une hyperpolarisation membranaire au niveau de l'étranglement pouvant atteindre 60mV. Pour réduire ce phénomène, des cloisons de vaseline sont placées entre les différentes solutions.

Pour utiliser la technique du "sucrose-gap" dans les meilleurs conditions, il ne suffit pas de choisir la largeur du compartiment test nettement inférieure à la constante d'espace, λ , mais il faut tenir compte du rapport x/λ avec x égal à la largeur du compartiment test. C'est pourquoi, la largeur x , c'est-à-dire la longueur de la portion de fibre soumise à l'expérimentation, a été choisie égale à environ 100 μm (Mounier, 1975).

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

Quand les différents potentiels de jonctions sont compensés, on admet que le niveau de référence correspond au niveau du potentiel de repos.

2. Contrôle des mesures.

Compte-tenu de ces remarques, il a 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. Ce travail a été effectué par Mounier (1975).

Les enregistrements en potentiel imposé ont été contrôlés, à l'aide d'une microélectrode, grâce au dispositif expérimental décrit à la figure 7. 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 VC_1 appliqué à la membrane et correspondant au potentiel V délivré par le stimulateur

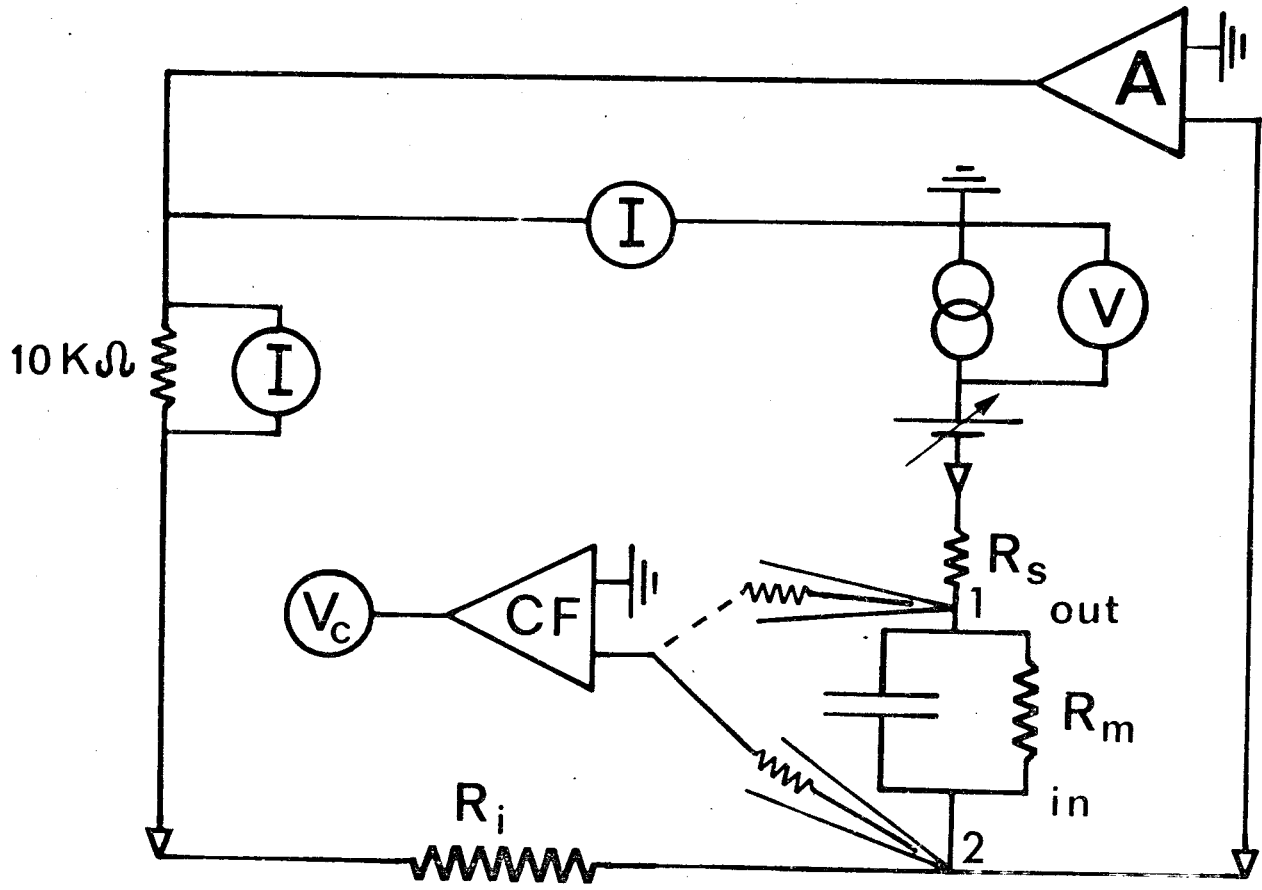


Figure 7 : Montage utilisé pour les enregistrements simultanés des courants ioniques I (dispositif de double sucrose) et du potentiel de membrane (micro-électrode dans le compartiment test).

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.



(Fig. 8 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 7), en absence de stimulation, la différence de potentiel correspond au potentiel de repos comme nous venons de le préciser. Le potentiel intracellulaire pour la fibre dont les enregistrements sont présentés à la figure 8 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_{C_2}) (Fig. 8 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. 8 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. 8 d).

- quelles que soient les amplitudes du courant membranaire en particulier lorsque celles-ci sont grandes (Milieu Sr^{++} - Fig. 8 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, 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 8 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

Figure 8 : 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. 7).

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. 7).

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.

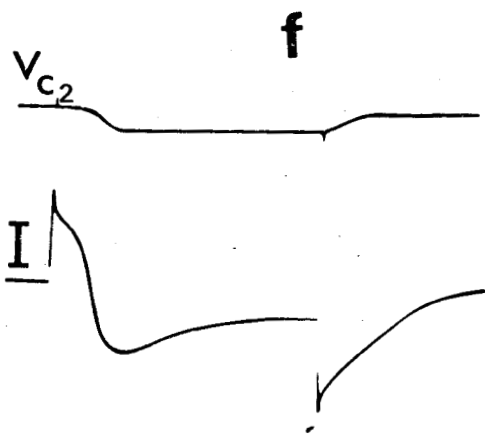
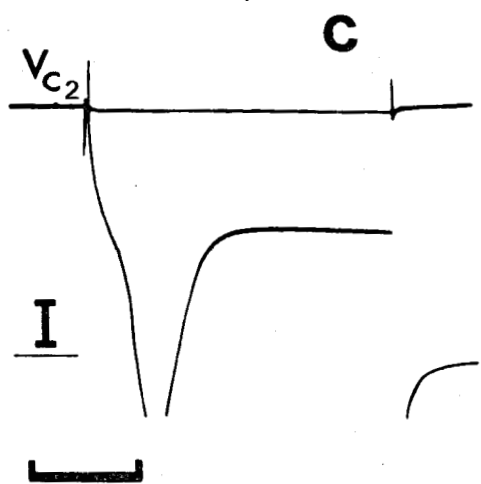
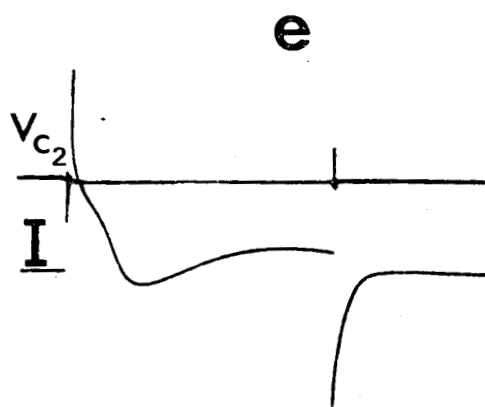
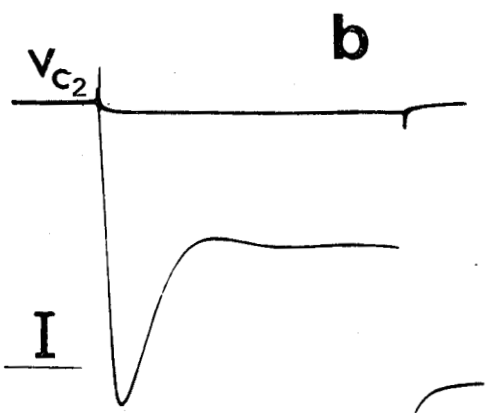
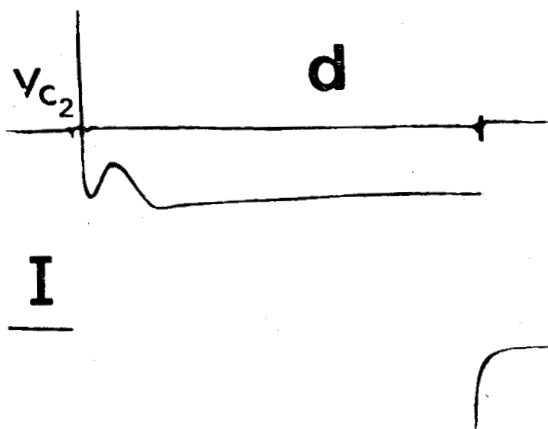
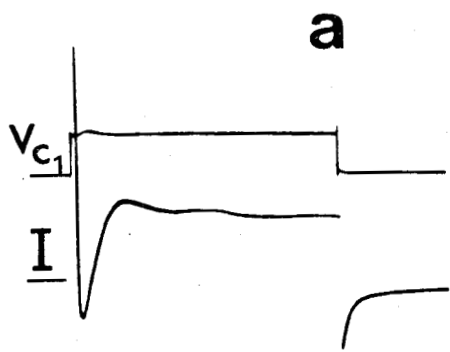
e et f : enregistrements en solution Sr (fibre avec P.R. = - 60 mV) pour un potentiel imposé de + 24 mV.

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.

D'après Mounier (1975).



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 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 50 et 60 mV.

ii) la vitesse d'activation de ce courant 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 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.

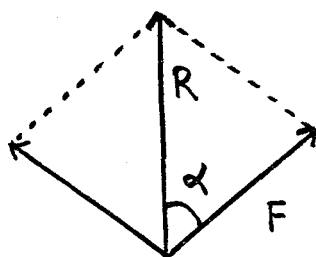
D - Enregistrement de la contraction et contrôle des enregistrements.

La tension, développée par la fibre musculaire, consécutive à une stimulation, est enregistrée dans le compartiment test (3) à l'aide d'une fine aiguille métallique reliée à un capteur de force composé de deux jauges de contrainte. La mesure de la force développée est effectuée en introduisant ces jauges dans deux des branches d'un pont de Wheastone. L'ensemble est relié à l'une des entrées de l'oscilloscope ou d'un enregistreur papier (Allcoscript), afin de visualiser le phénomène.

L'enregistrement peut être considéré comme isométrique grâce à une bonne fixation de la partie centrale de la fibre par les ponts de vaseline.

La force mesurée a une amplitude et une direction déterminée par la somme vectorielle des forces exercées par les deux demi-portions actives du faisceau. Si l'on admet que les deux forces (F) sont

égales, la force résultante (R) mesurée, à une direction qui est la bissectrice de l'angle (2α) formé par les deux forces et a une amplitude $R = 2 F \cos\alpha$



Un poids de 107,5 mg provoque une déflexion de 1500 mV et la réponse est linéaire de 1 à 200 mg. A partir de ces données et en évaluant l'angle α à une valeur égale à 45° nous avons pu déterminer la valeur de F en mg sachant que $F = \frac{R}{2 \cos\alpha}$. De plus, en évaluant le rayon de la fibre (généralement voisin de 10^{-2} cm) nous avons pu déterminer la valeur de F par unité de section en kg.cm^{-2} .

Ce dispositif permet d'imposer une tension déterminée si l'on a pris soin de placer cette préparation dans la cuve expérimentale sans aucun étirement. Cette prétension permet d'étirer la composante élastique de la fibre musculaire et nous l'avons imposée à la fibre en début de chaque expérience.

Lorsque le protocole expérimental nécessitait l'utilisation d'une large gamme de potentiels imposés, les impulsions fortes étaient toujours appliquées en alternance avec des impulsions faibles.

En outre , lors de toutes les expériences effectuées, nous avons imposé à la membrane, à intervalles réguliers, une dépolarisation donnée (en général 55 mV - 15 msec) afin de s'assurer de la constance des conditions expérimentales. S'il apparaissait des variations notables d'amplitude de la tension due à cette dépolarisation l'expérience était jugée inexploitable.

Notons également que nous avons toujours veillé à ce que le niveau de tension après le relâchement total de la fibre soit le niveau

E - Expression des résultats.

Les différents paramètres sont définis de la manière suivante :

E_m (mV) = potentiel de membrane

E_R ou P.R. (mV) = potentiel de membrane au repos
estimé 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_{Ca} (mV) = potentiel d'équilibre thermodynamique défini d'après l'équation de NERNST pour les ions calcium.

V_{Ca} (mV) = le même potentiel exprimé de la même manière que V et appelé potentiel d'inversion pour les ions calcium.

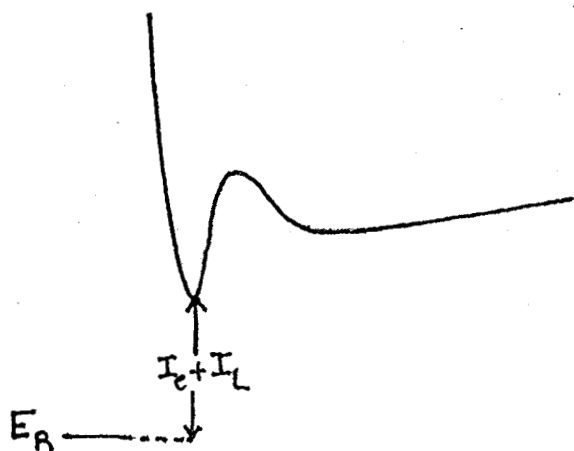
I (μA) = courants de membrane. Les courants sortants (sortie d'ions positifs ou entrée d'ions négatifs) sont positifs. Les courants entrants (entrée d'ions positifs) sont négatifs.

I_{Ca} , I_K (μA) = respectivement courant calcique et courant potassique.

Les caractéristiques courant-entrant potentiel sont établies avec correction du courant de fuite. Deux protocoles ont été utilisés (Fig. 9) :

- pour certaines fibres, les courants membranaires ont été enregistrés sans correction automatique du courant de fuite. L'amplitude du courant a été mesurée par la méthode indiquée en A. Afin d'obtenir l'amplitude réelle du courant, nous avons i) déterminé les valeurs du courant de fuite en fonction du potentiel par extrapolation linéaire des valeurs du courant mesurées lors de l'application d'hyperpolarisations ou de dépolarisations très faibles (inférieures à 20 mV) ii) soustrait à l'amplitude mesurée

A



B

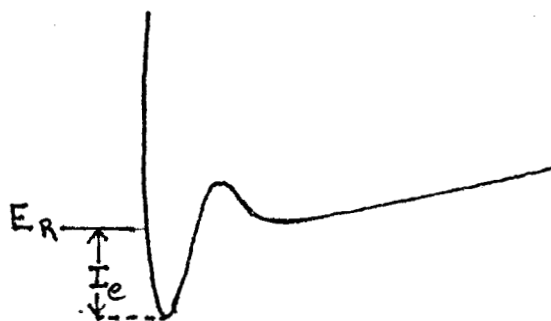


Figure 9 : Dessin des courants ioniques caractéristiques des fibres interrogées et méthode de mesure du courant calcique.

En A : lorsque le courant de fuite n'est pas automatiquement compensé

En B : lorsque le courant de fuite est automatiquement compensé.

du courant entrant, la valeur du courant de fuite pour chaque valeur de dépolarisation imposée.

- pour la majorité des fibres, les courants membranaires ont été enregistrés avec une correction automatique du courant de fuite. L'amplitude du courant a été mesurée par la méthode indiquée en B et correspond à l'amplitude réelle de ce courant. Le report pour chaque dépolarisation imposée de l'amplitude du courant entrant, traduit immédiatement la caractéristique courant-potentiel avec correction du courant de fuite.

Les fibres pour lesquelles le courant de fuite n'a pas été automatiquement soustrait, seront signalées dans la légende des figures correspondantes.

Les caractéristiques tension-potentiel sont établies par le report des amplitudes des tensions mesurées à partir du niveau de repos, soit au pic (T_1) soit en fin d'impulsion (T_2).

F - SOLUTIONS.I - Eau de mer artificielle : solution
physiologique externe de référence: ASW

NaCl	:	510 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
pH	:	7,8

II - Autres solutions physiologiques
externes.

Les solutions enrichies en calcium, résultent de l'addition de Ca Cl₂ à la solution ASW. La pression osmotique est maintenue constante par diminution équimoléculaire de NaCl.

La solution appauvrie en calcium, résulte du retrait de CaCl₂ à la solution ASW. La pression osmotique est maintenue constante par adjonction équimoléculaire de NaCl. L'EGTA est ajouté à une concentration de 10⁻⁴ M et le pH est ramené à 7,8 par un

tampon tris-maléate.

La solution sans sodium résulte du retrait de NaCl à la solution ASW et de l'apport d'une quantité équimoléculaire de chlorure de lithium (NaOLiCl).

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 :

- le chlorure de tétraéthylammonium : TEA
- le chlorure de manganèse : Mn Cl₂.
- le D 600

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

Le chlorure de manganèse étant utilisé à faible concentration (5 mM) aucun réajustement osmotique n'a été effectué. Il en est de même pour le D 600 qui a été utilisé à une concentration de 4×10^{-5} M. Par contre dans le cas du TEA (^{20 ou} 50 mM) une quantité équivalente de NaCl est retirée.

IV - Solutions avec drogues pharmacologiques.

La procaïne est ajoutée à la solution ASW ou enrichie en calcium (Ca 5) à une concentration de 2 mM.

RESULTATS

CHAPITRE I

ENREGISTREMENTS OBTENUS

EN SOLUTION ASW

A - Etude de la relation entre le potentiel de membrane, les courants membranaires et la tension.

I - Dans les conditions de courant imposé

II - Dans les conditions de potentiel imposé

1 - Influence de l'amplitude de la dépolarisation imposée sur les courants membranaires et les tensions.

2 - Influence de la durée de la dépolarisation imposée sur les tensions.

B - Décours des tensions

I - Temps mis pour atteindre le maximum de tension

1 - Dans la gamme de potentiels compris entre + 30 mV et + 275 mV.

2 - Pour des potentiels inférieurs au potentiel d'inversion calcique et supérieurs à + 275 mV

II - Les phases de relaxation

C - Conclusion

A - Etude de la relation entre le potentiel de membrane, les courants membranaires et la tension.

Nous avons vu dans le chapitre historique, que la réponse mécanique des fibres musculaires est selon les auteurs et pour diverses structures contractiles soit dépendante de l'influx calcique, soit dépendante du potentiel de membrane soit des deux. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'étudier les relations entre la tension des fibres musculaires de crabe et ces deux caractéristiques.

I - Dans les conditions de courant imposé.

Les enregistrements de la figure 10 illustrent les réponses membranaires dépolarisantes, V , et les tensions, T dues à des échelons de courant constant, I d'amplitude variable et de durée 75 msec, d'une fibre baignant en eau de mer artificielle (ASW). On observe, en a, qu'une impulsion sous liminaire de très faible amplitude ne permet ni le déclenchement d'un potentiel d'action ni le développement d'une tension. En b, le courant imposé est

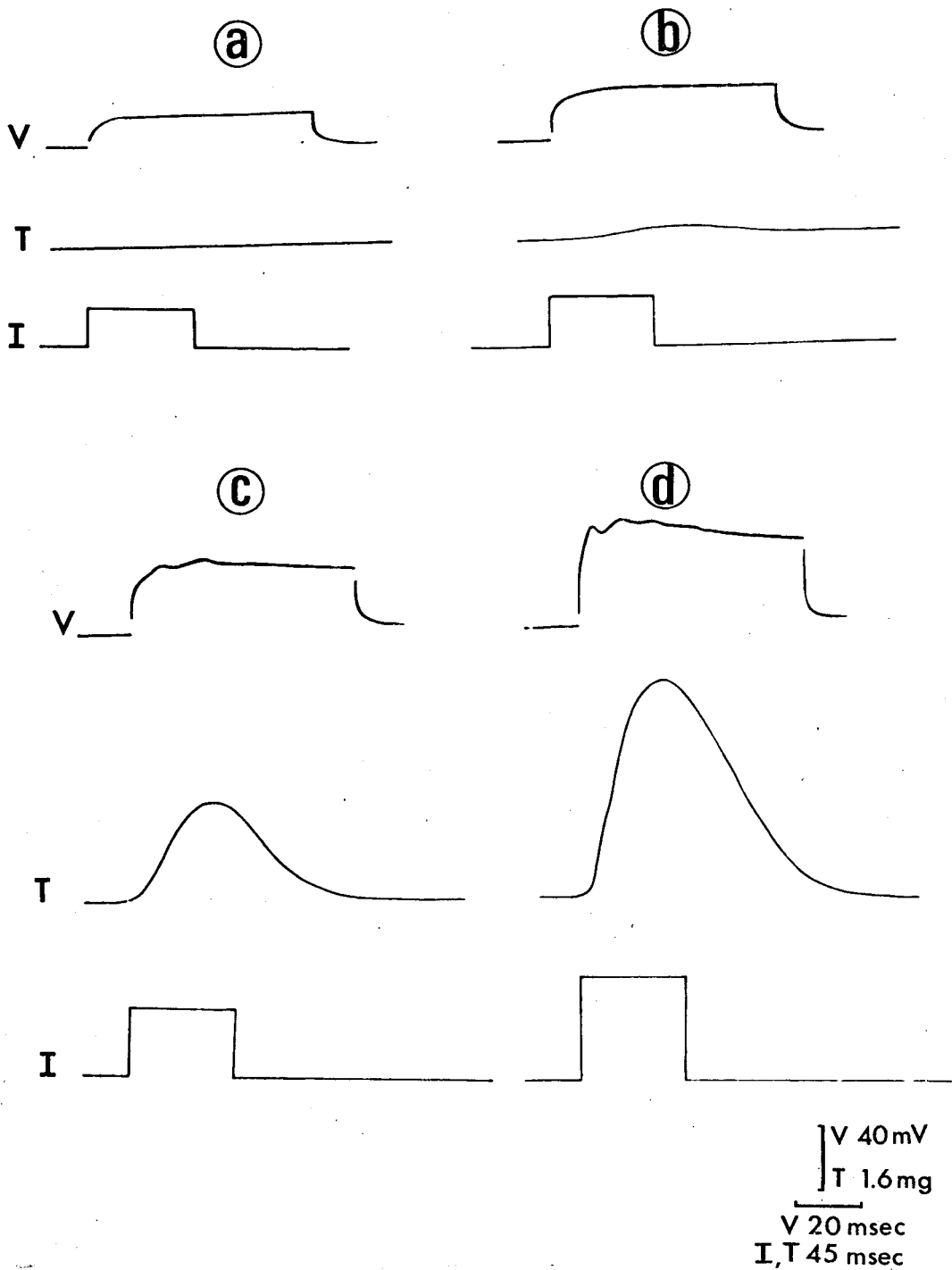


Figure 10 : Enregistrements de l'activité électrique membranaire (V) et de l'activité contractile (T) dans les conditions de courant imposé (I) d'une fibre placée en solution ASW. a, b : impulsions sous liminaires ; c, d : impulsions supraliminaires. I et T base de temps identique
V base de temps différente

sous liminaire, mais d'amplitude supérieure et permet l'apparition d'une tension d'amplitude très faible. En c et d, les 2 échelons de courant constant sont supraliminaires. En effet, dans les deux cas un potentiel d'action de faible amplitude se déclenche et une activité répétitive apparaît (Fig.10 c et d). Le potentiel d'action est de type gradué puisque son amplitude augmente avec l'amplitude de l'impulsion ; les tensions associées sont, elles aussi, d'amplitude croissante. Elles présentent de plus les caractéristiques suivantes : le temps mis pour atteindre le pic de tension est égal à 50 msec et la fibre se relâche avant la fin de l'impulsion suivant une phase exponentielle présentant une constante de temps égale à 35 msec. Il faut remarquer que ces caractéristiques n'ont pas été mesurées pour la tension de très faible amplitude à cause des difficultés de lecture évidentes. La figure 11 illustre, sur une autre fibre, un potentiel d'action de type "tout ou rien" et le développement simultané de la contraction. Le temps mis pour atteindre le maximum de tension est comme précédemment égal à 50 msec et la constante de temps est très voisine du résultat ci-dessus puisqu'elle est égale à 39 msec. Il semble donc que ces deux caractéristiques de tension soient indépendantes de l'amplitude du potentiel d'action.

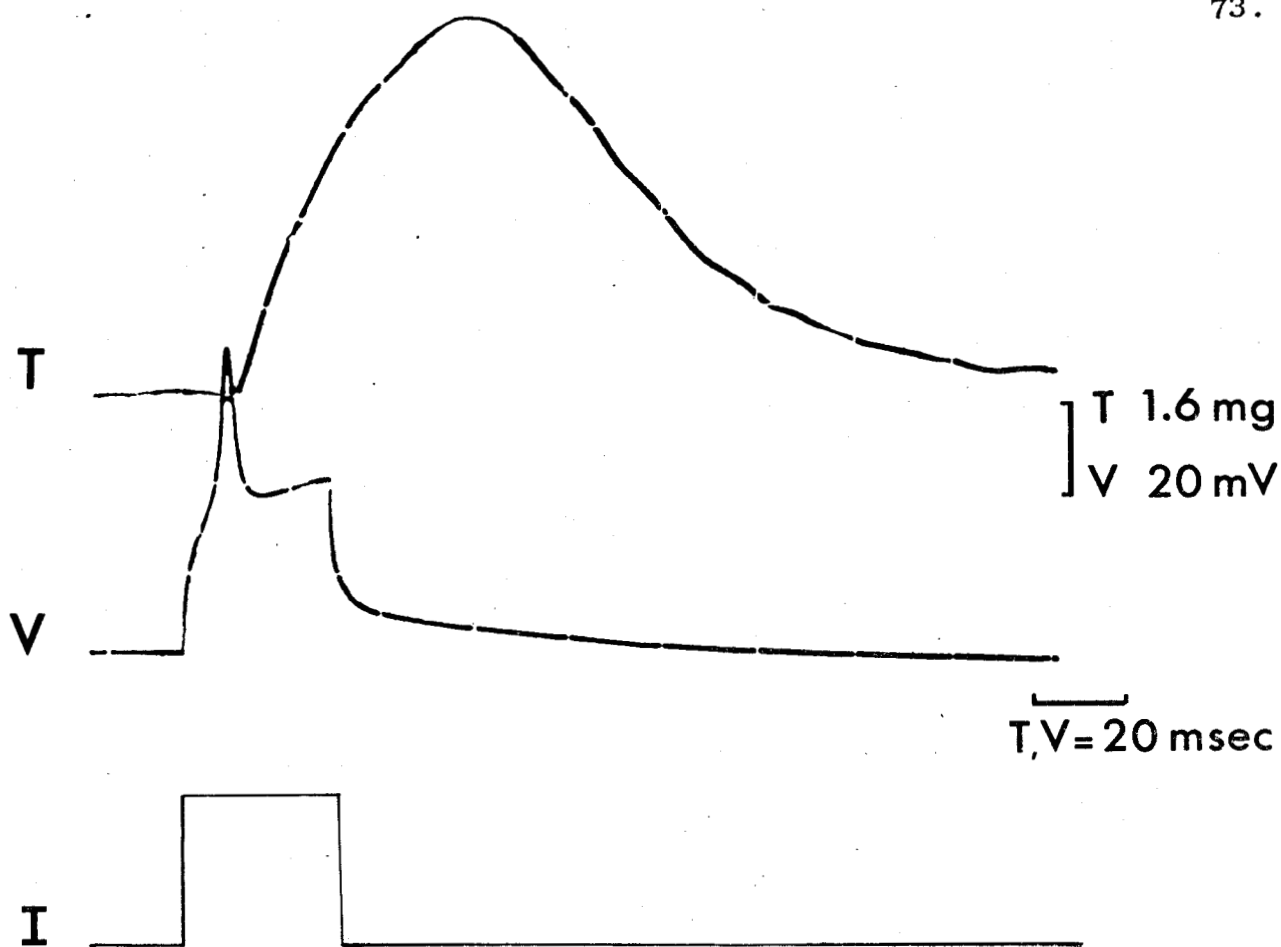


Figure 11 : Enregistrement du potentiel d'action maximal (V) et de l'activité contractile (T) d'une fibre placée en solution ASW.

II - Dans les conditions de potentiel imposé.

La relation liant le potentiel membranaire aux tensions et aux courants ioniques que développe la portion de fibre située dans le compartiment test a été établie lorsque la fibre baigne dans le milieu de référence (ASW). Nous avons d'abord établi cette relation pour une large gamme de potentiels imposés compris entre + 20 mV et + 300 mV, pour une durée donnée d'impulsion, puis pour une gamme de potentiels compris entre + 20 mV et + 125 mV pour deux durées d'impulsions.

1 - Influence de l'amplitude de la dépolarisation imposée sur les courants membranaires et les tensions.

Les enregistrements de la figure 12 illustrent les courants ioniques I et les réponses mécaniques T enregistrés à 4 niveaux de potentiel imposé V de durée 1500 msec. Pour une dépolarisation imposée de 25 mV, on observe que, bien que le courant calcique ne soit pas activé, une tension de faible amplitude se

N.B. Sur tous les enregistrements effectués dans les conditions de potentiel imposé, les tensions et les potentiels ont une base de temps identique ; les courants une autre base de temps.

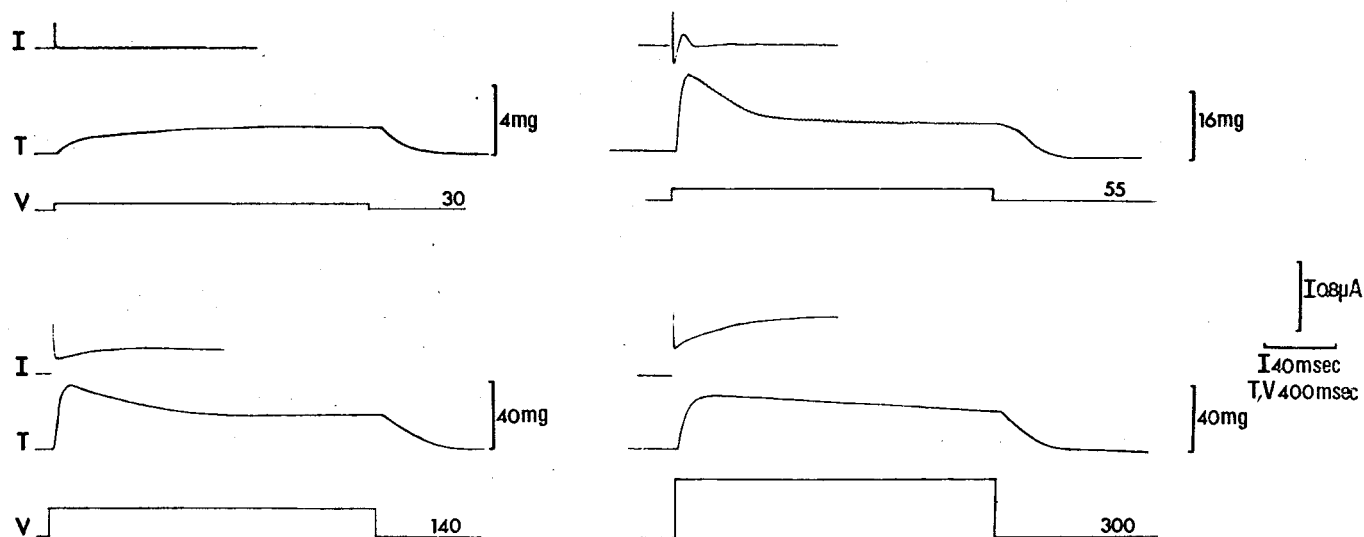


Figure 12 : Enregistrements dans les conditions de potentiel imposé, des courants membranaires (I) et des tensions (T) pour 4 niveaux de dépolarisation imposée de durée 1500 msec sur une fibre placée en solution ASW.

développe, maintenue tant que dure la dépolarisation imposée. Pour des potentiels plus élevés (+ 55 mV), le courant calcique entrant, I_{Ca} s'active suivi du courant potassique sortant rapide, I_{K_1} , et une tension ample apparaît. Pour une dépolarisation imposée importante (+ 140 mV), supérieure au potentiel d'inversion calcique ($V_{Rev} = V_{Ca} \# + 75$ mV, Mounier et Vassort, 1975 a ; Mounier, 1975), seul le courant potassique sortant retardé, I_{K_2} est apparent. Simultanément une tension phasique d'amplitude supérieure à celle enregistrée pour la dépolarisation imposée de 55 mV se développe. Notons que le décours des tensions obtenues pour les dépolarisations imposées de + 55 mV et + 140 mV est complexe : elles présentent un pic suivi d'un niveau stable, maintenu tant que dure la dépolarisation. Enfin, pour une dépolarisation imposée très élevée (+ 300 mV), on observe que seul I_{K_2} est activé et qu'une tension, maintenue, d'amplitude inférieure à celle obtenue pour 140 mV, se développe. Notons qu'elle ne présente pas de pic phasique.

Les résultats complets sont donnés par la relation entre la tension, le courant entrant et le potentiel imposé illustrée à la figure 13. L'amplitude des tensions est mesurée entre le niveau de repos et le maximum de tension développée. L'amplitude des courants est déterminée entre le niveau de référence et le pic de courant entrant, procédé valable dans la

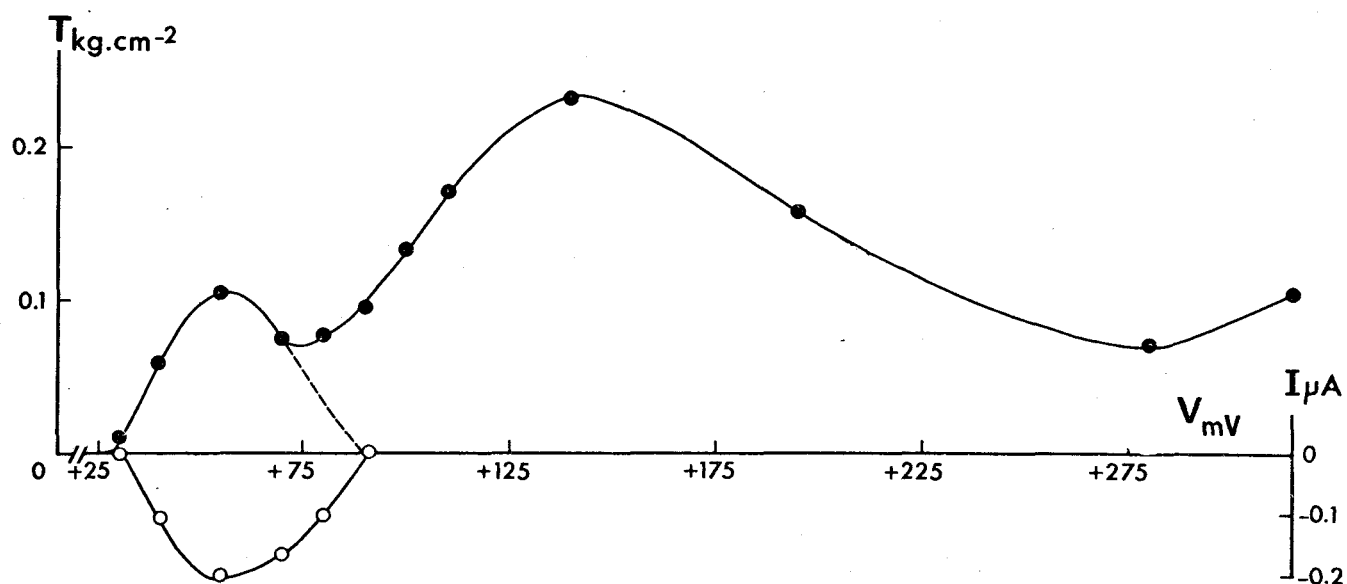


Figure 13 : Relation entre les amplitudes de la tension et du courant entrant et le potentiel membranaire lors de dépolarisations imposées de 1500 msec en eau de mer artificielle (ASW). Points (•) amplitude de la tension mesurée au pic ; cercles (○) amplitude du courant entrant.

même fibre qu'à la figure 12.

mesure où le courant de fuite a été automatiquement corrigé dans cette expérience.

Quatre points importants peuvent être mis en évidence.

i) le seuil mécanique égal à + 20 mV ne coïncide pas avec le seuil d'activation calcique, égal pour cette fibre à + 28 mV.

ii) quand la dépolarisation est supérieure au seuil d'activation de I_{Ca} , la tension augmente fortement parallèlement à I_{Ca} , atteint un maximum pour une dépolarisation imposée égale à 55 mV valeur pour laquelle I_{Ca} est maximal. Ensuite, la tension et I_{Ca} diminuent.

iii) pour des potentiels imposés supérieurs à + 70 mV, la tension augmente à nouveau et atteint un maximum pour une valeur de dépolarisation imposée égale à + 140 mV alors que I_{Ca} diminue d'amplitude et s'annule pour une valeur de potentiel d'inversion calcique égale à + 83 mV. Ensuite, la tension diminue et atteint un minimum pour une valeur de dépolarisation imposée égale à + 275 mV.

iv) pour des potentiels imposés supérieurs à + 275 mV, la tension augmente à nouveau.

2 - Influence de la durée de la dépolarisation imposée sur les tensions.

L'influence de la durée de la dépolarisation imposée sur l'amplitude de la tension a été étudiée en deux parties : d'une part pour une gamme de potentiels compris entre + 20 mV et + 125 mV, d'autre part pour des potentiels supérieurs à + 125 mV. Ce protocole a été utilisé dans la mesure où les fibres musculaires de crabe sont très fragiles et qu'il est très difficile d'établir sur une même fibre l'influence de la durée pour une large gamme de potentiels.

a - dépolarisations imposées de courte durée (Fig. 14 A et 15 A). Pour une dépolarisation imposée de 20 mV (Fig. 14 A), ni le courant calcique ni la tension ne se développent. Pour des potentiels plus élevés (+ 58 mV), le courant calcique entrant, I_{Ca} , s'active jusqu'à son maximum et une tension phasique apparaît. Pour une dépolarisation imposée importante (+ 123 mV), seul le courant potassique sortant retardé, I_{K_2} , est apparent. Ce courant est bien caractérisé par le courant de queue sortant se développant lors du retour du potentiel de membrane au potentiel de repos. Simultanément une tension phasique d'amplitude légèrement supérieure à celle enregistrée pour la dépolarisation imposée de 58 mV se développe. Enfin, sur une autre fibre, pour une dépolarisation imposée très élevée, (+ 225 mV, Fig. 15 A) une tension

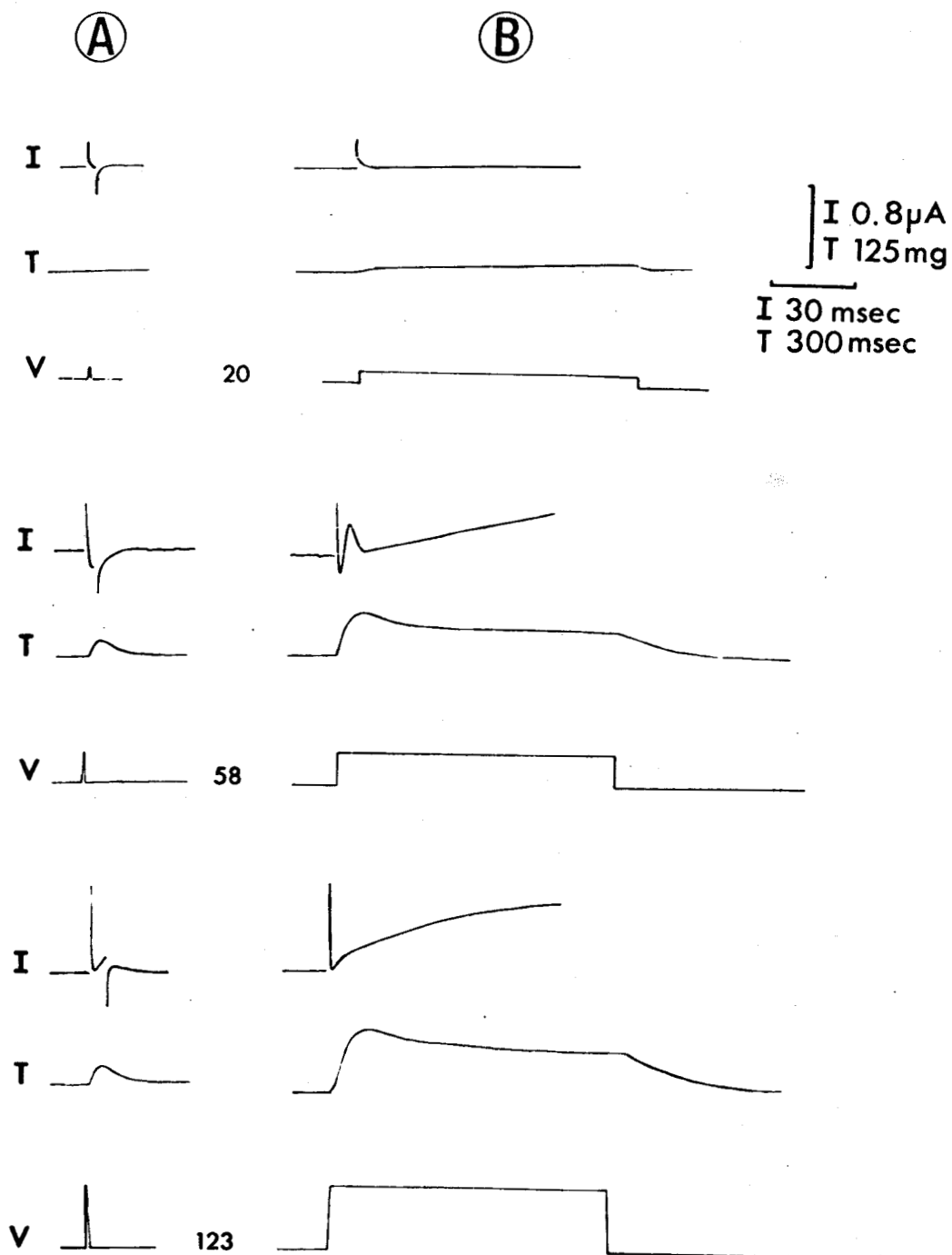


Figure 14 : Enregistrements dans les conditions de potentiel imposé, des courants membranaires (I) et des tensions (T) pour 3 niveaux de dépolarisation imposée d'une fibre placée en solution ASW. En A : durée de l'impulsion = 5 msec ; en B : durée de l'impulsion = 1000 msec.

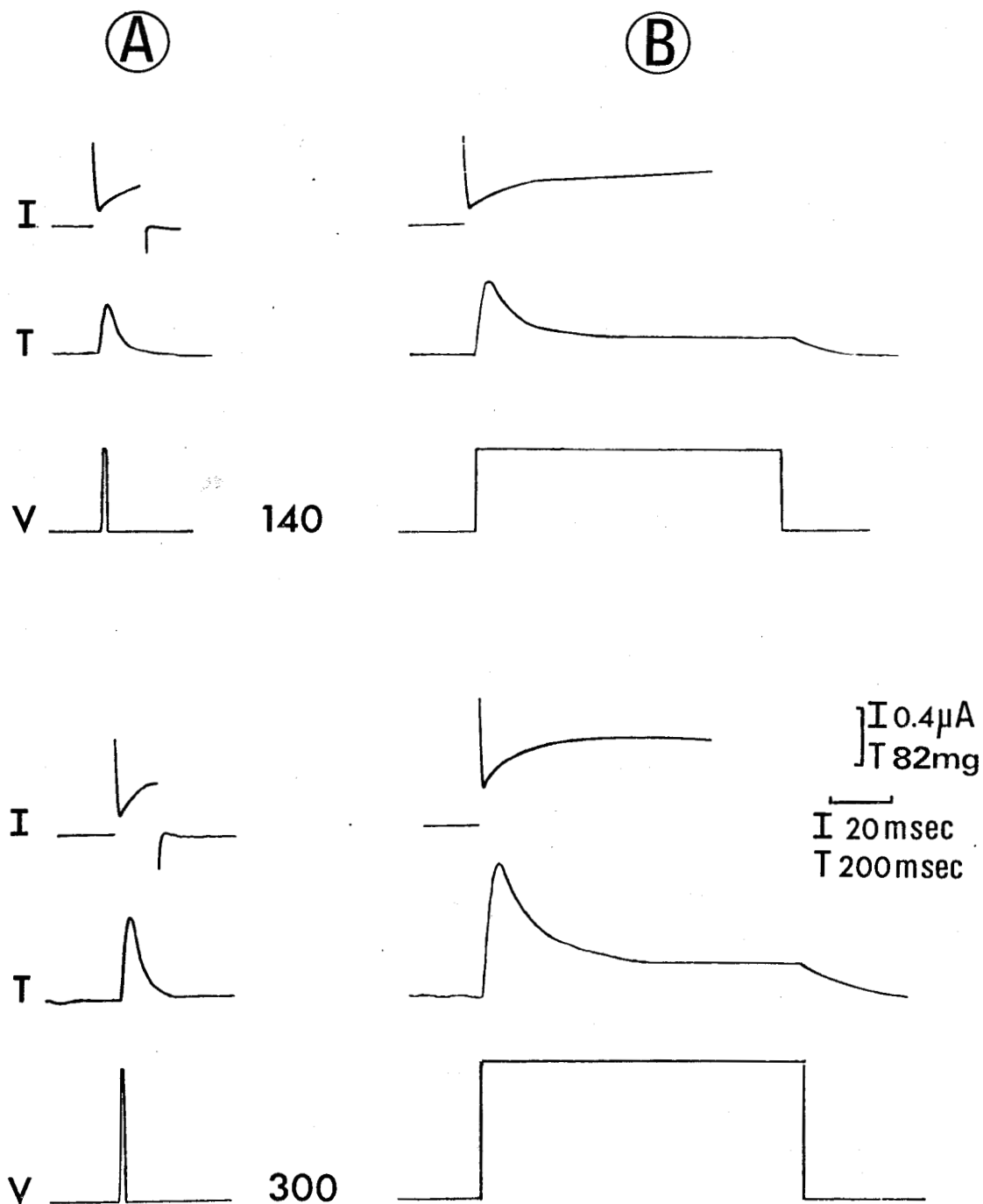


Figure 15 : Enregistrements dans les conditions de potentiel imposé, des courants membranaires (I) et des tensions (T) pour 2 niveaux de dépolarisation imposée d'une fibre placée en solution ASW. En A : durée de l'impulsion = 5 msec ; en B : durée de l'impulsion 1500 msec.

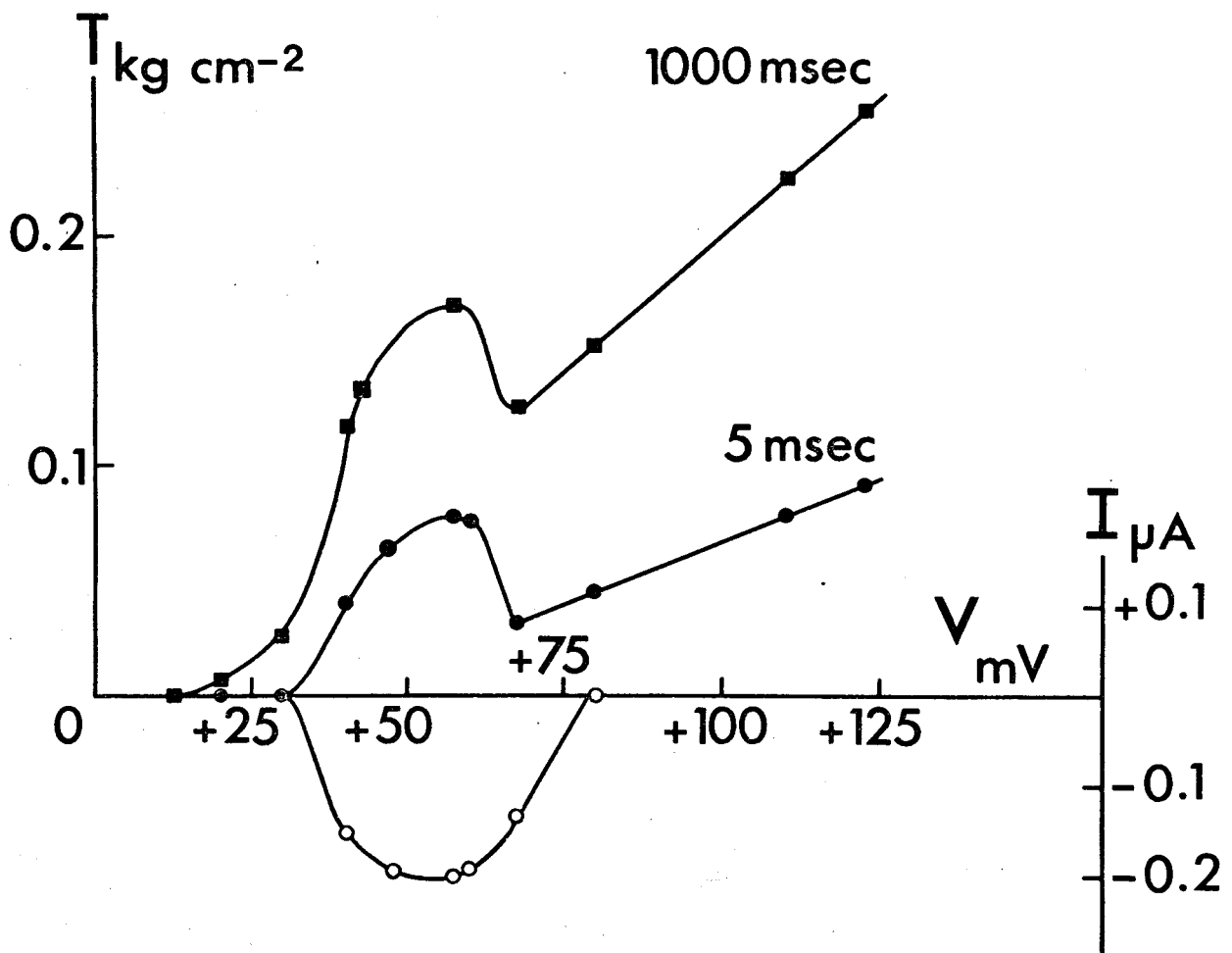
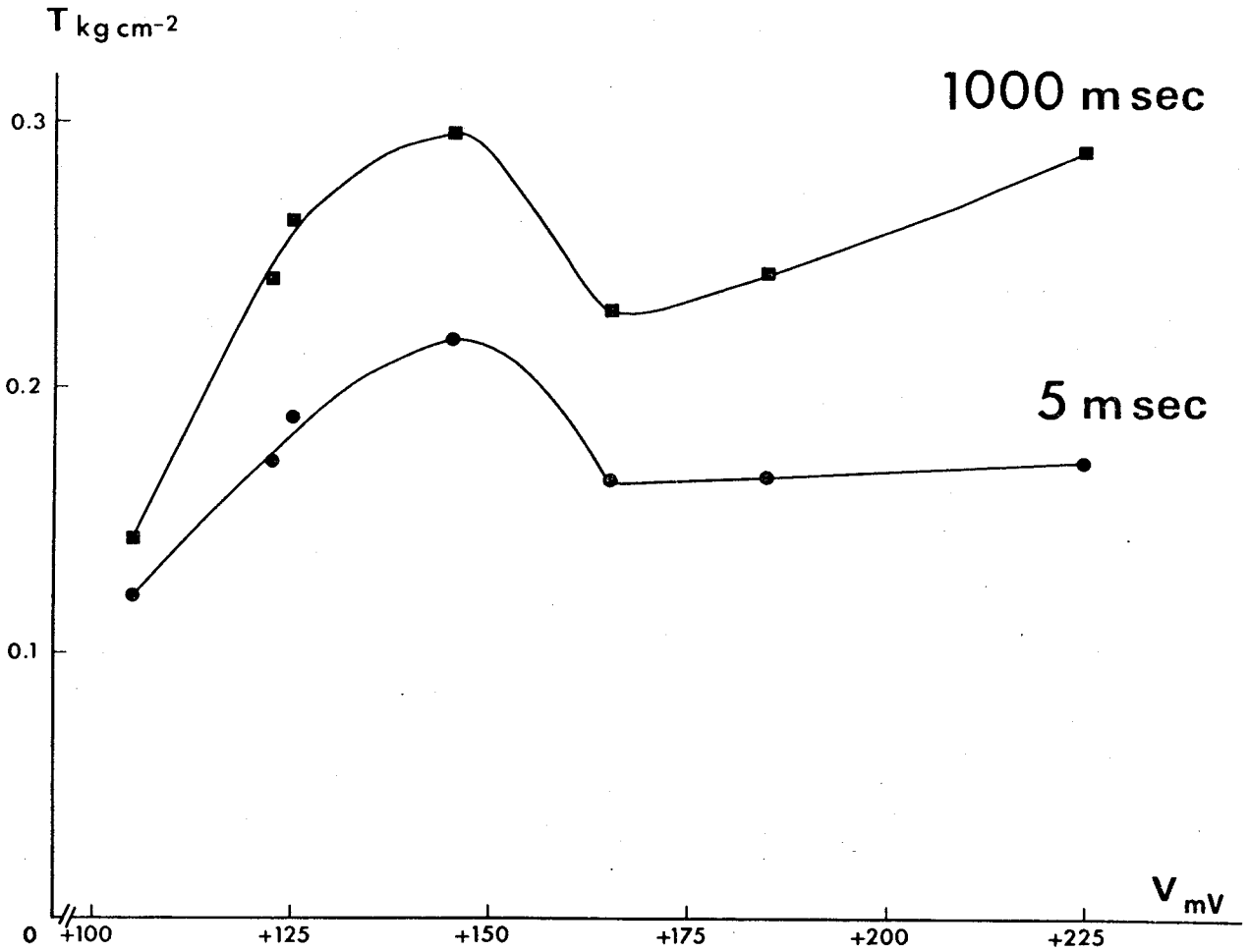


Figure 16 :

(A)

Relation tension potentiel et courant entrant potentiel pour les durées d'impulsion de 5 msec et 1000 msec, pour des dépolarisations imposées comprises entre + 20 mV et + 125 mV. Même fibre que la figure 14.



(B)

Relation tension-potentiel et courant entrant potentiel pour les durées d'impulsions de 5 msec et 1500 msec, pour des dépolarisations imposées supérieures à 100 mV - Même fibre que la figure 15.

phasique d'amplitude plus faible que celle obtenue pour une dépolarisation de 145 mV se développe.

b - dépolarisations imposées de longue durée (1000 msec, Fig. 14 B et 15 B) : les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits antérieurement (voir Fig. 12 et 13). On observe que lorsque la durée de la dépolarisation est allongée, le seuil mécanique est abaissé, les tensions sont plus amples quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation imposée. Enfin, pour + 58 mV et + 123 mV le décours des tensions est complexe comme nous l'avons noté précédemment alors que les tensions dues aux dépolarisations de + 20 mV et + 225 mV ne présentent pas de pic phasique de tension et sont maintenues tant que dure la dépolarisation.

Les résultats complets sont donnés par la relation entre la tension, le courant entrant et le potentiel imposé pour les durées de dépolarisation de 5 et 1000 msec (Fig. 16 A et B). On observe que :

i) le seuil mécanique coïncide avec le seuil d'activation calcique, égal pour cette fibre à + 30 mV, uniquement pour des dépolarisations imposées de courte durée. Il est abaissé et indépendant du courant calcique lorsque la dépolarisation est allongée. On observe

dans le cas de cette fibre un abaissement de 15 mV du seuil mécanique.

ii) pour tous les niveaux de potentiel, plus la durée de la dépolarisation est élevée, plus les tensions sont amples.

B - Décours des tensions.

Les enregistrements illustrés aux figures 12, 14 et 15 montrent que la tension ne se développe qu'après une latence de 10 à 15 msec. On observe également que le décours des tensions est différent en fonction de la durée et de l'amplitude de la dépolarisation. Nous nous proposons d'aborder ici les deux caractéristiques suivantes : le temps mis pour atteindre le pic de tension, et les différentes phases de relaxation.

I - Temps mis pour atteindre le maximum de tension.

Ce temps est mesuré entre le début d'aug-

mentation de la tension et le pic ou maximum de tension. On observe sur un grand nombre de fibres interrogées qu'il est peu dépendant de la valeur de la dépolarisation imposée, dans la gamme comprise entre + 30 mV et + 275 mV, mais est essentiellement fonction de sa durée.

1 - dans la gamme de potentiels compris
entre + 30 mV et + 275 mV.

Les tensions illustrées à la figure 14 ont un temps de mise sous tension maximale égal à 45 msec pour une dépolarisation imposée de durée 5 msec et d'amplitude égale à 58 et 123 mV ; il est identique pour les autres valeurs de dépolarisation imposée (non illustré). Dans le cas de la fibre illustrée à la figure 15 le temps de mise sous tension maximale lors de dépolarisations importantes mais inférieures à 275 mV est aussi voisin de 45 msec. Ce résultat confirme l'indépendance de ce paramètre vis-à-vis de l'amplitude de la dépolarisation imposée. La moyenne obtenue sur 5 fibres est égale à 50 msec. Pour des dépolarisations imposées de durée 1000 msec les valeurs de mise sous tension maximale sont comprises entre 100 msec et 115 msec quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation imposée. La moyenne obtenue sur 5 fibres est égale à 110 msec.

2 - pour des potentiels inférieurs au potentiel d'activation calcique et supérieurs à + 275 mV.

Dans le cas de la fibre illustrée à la figure 14, il est, en outre, intéressant de noter que lors de la dépolarisation imposée pour laquelle I_{Ca} n'est pas encore activé (20 mV) et de durée 1000 msec, la contraction présente une mise sous tension lente et atteint le maximum, maintenu jusqu'à la fin de l'impulsion, après 650 msec. Dans le cas des dépolarisations imposées très élevées (voisines de 300 mV), la tension se développe lentement. En effet, le temps de mise sous tension maximale est voisin de 155 msec.

II - Les phases de relaxation

Le décours des tensions enregistrées est complexe : en fonction de la durée de la dépolarisation, il existe une ou plusieurs phases de relaxation. Ce résultat est illustré à la figure 17 par le décours des tensions et l'analyse semi-logarithmiques des phases de relaxation enregistrées sur une fibre pour une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 5 et 1000 msec.

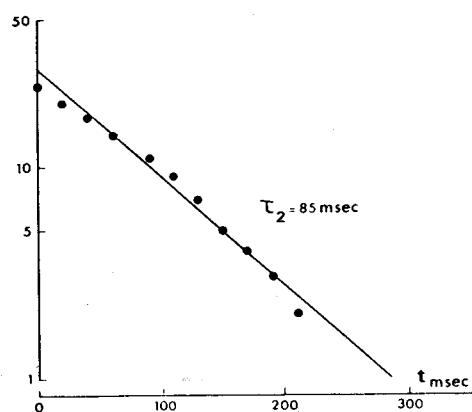
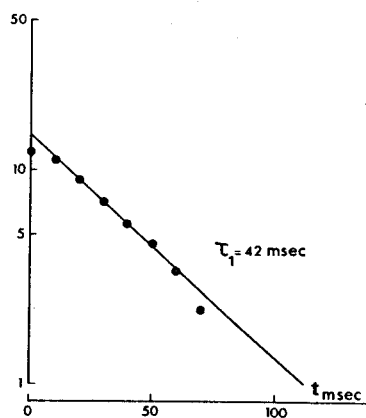
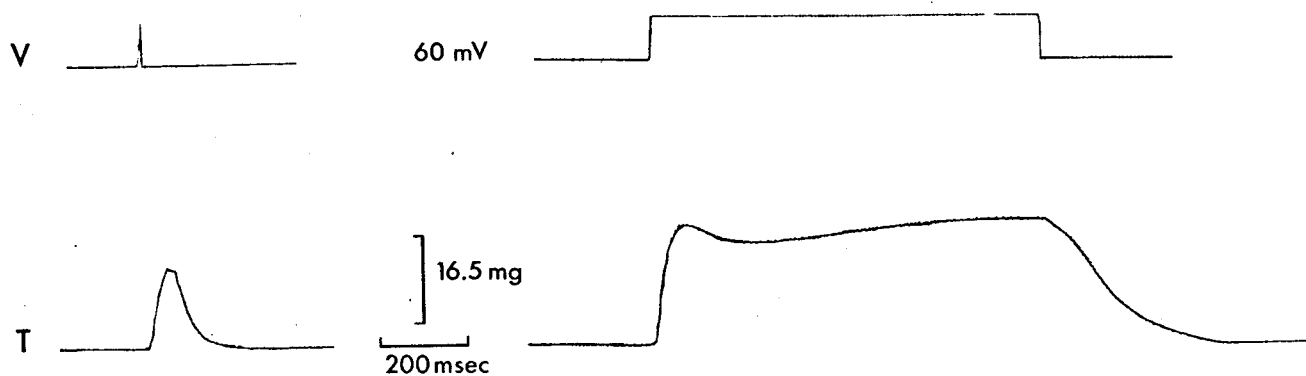


Figure 17 : Dépendance des phases de relaxation vis à vis de la durée de la dépolarisation membranaire.

En haut : enregistrements des tensions dues à une dépolarisation imposée de 58 mV et de durée 5 et 1000 msec.

En bas : Analyse semi-logarithmique en fonction du temps des phases de relaxation des tensions illustrées ci-dessus.

— Pour une durée de 5 msec, la fibre se relâche selon une seule phase exponentielle avec une constante de temps, τ_1 , égale à 42 msec. L'analyse semi-logarithmique effectuée sur cette même fibre pour diverses valeurs de dépolarisations imposées (comprises entre 40 mV et 240 mV) et non illustrée, montre que la constante de temps de relaxation varie peu avec l'amplitude du potentiel imposée puisqu'elle est comprise entre 40 msec et 45 msec.

Les résultats obtenus sur 3 autres fibres confirment que la constante de temps de relaxation ne varie pas avec l'amplitude de la dépolarisation ; sa valeur est comprise pour ces différentes fibres entre 34 msec et 45 msec.

— Pour une durée de 1000 msec, la tension se développe et passe par un pic puis diminue, atteint un niveau stable maintenu pendant toute la durée de la dépolarisation. Lorsque la polarisation membranaire est ramenée à son niveau de repos, la fibre se relâche suivant une phase exponentielle ayant une constante de temps τ_2 égale à 85 msec et indépendante de l'amplitude de la dépolarisation imposée.

L'analyse semi-logarithmique des relaxations effectuée sur d'autres fibres et pour une durée de dépolarisation égale à 1000 msec, confirme le

résultat obtenu ci-dessus et montre que τ_2 a une valeur comprise entre 85 msec et 140 msec.

Notons enfin que τ_2 est peu dépendante de la durée de la dépolarisation imposée. En effet, si la durée de la dépolarisation imposée est égale à 500 msec, τ_2 a une valeur de 80 msec. Ces résultats sont les moyennes obtenues sur 9 fibres.

C - Conclusion.

Les résultats illustrés dans ce chapitre montrent que dans la gamme de potentiels pour lesquels I_{Ca} est activé, la relation tension potentiel a une allure parallèle à la relation courant entrant-potentiel. Par contre,

- pour des potentiels imposés inférieurs au potentiel d'activation calcique, des tensions de faible amplitude peuvent être enregistrées, si la durée de la dépolarisation est suffisamment longue.

- pour des potentiels imposés supérieurs au potentiel d'inversion calcique, des tensions amples se développent. Dans cette gamme de potentiels il semble qu'il existe deux composantes de tension. L'une permettant d'expliquer la bosse de tension obtenue pour des

potentiels compris entre + 80 mV et + 250 mV, (^{valeur} comprise entre 225 et 275 mV), l'autre permettant d'expliquer l'augmentation linéaire de la tension observée pour des potentiels supérieurs à + 250 mV.

Il semble donc pour permettre d'expliquer l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe, qu'il faille envisager l'existence de trois composantes de tension :

- une composante dépendante de I_{Ca} ou tension phasique dont les tensions présentent une mise sous tension maximale rapide.

- une composante permettant d'expliquer les tensions observées pour de faibles dépolarisations de longue durée ainsi que les tensions obtenues pour des dépolarisations de très grande amplitude (voisines de 250 mV). Ces tensions ont une mise sous tension lente qui est fonction de l'amplitude de la dépolarisation.

- une composante permettant d'expliquer les tensions observées pour des potentiels supérieurs au potentiel d'inversion calcique mais inférieurs à 250 mV. Ces tensions ont un temps de mise sous tension comparables à ce que nous observons pour la composante de tension dépendante de I_{Ca} .

Nous nous proposons ^{donc} dans le cadre de notre étude de confirmer la pluralité de l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA COMPOSANTE DE TENSION
DEPENDANTE DU COURANT CALCIQUE :
TENSION PHASIQUE C_1

A - Effets des milieux de composition ionique modifié

I - Milieu enrichi en calcium ($[Ca]_e \times 5$)

II - Milieux annulant le courant calcique:
milieu sans calcium et milieu manganèse

B - Influence de la polarisation membranaire sur
l'inactivation du courant calcique et de la
tension.

I - en solution ASW

II - en solution TEA.

C - Conclusion.

Afin de confirmer la relation entre une partie de la tension et le courant calcique, des expériences ont été effectuées en milieu enrichi en calcium ($[Ca]_e \times 5$), appauvri en calcium \longrightarrow (Ca 0 - EGTA 10^{-4} M) ainsi qu'en milieu manganèse, les ions Mn étant connus comme inhibiteurs de la conductance calcique. De plus, la relation entre le potentiel de membrane et l'inactivation d'une part du courant calcique, d'autre part de la tension, a été étudiée.

A - Effets des milieux de composition ionique modifiée.

I - Milieu enrichi en calcium ($[Ca]_e \times 5$).

La figure 16 illustre l'influence d'un milieu hypercalcique (Ca 5) sur les courants membranaires et la tension se développant pour une impulsion de 55 mV et de durée 15 msec. Ces paramètres de stimulation ont été choisis afin i) de se situer à une valeur de potentiel pour laquelle I_{Ca} est maximal ii) de minimiser l'influence de la durée de la dépolarisation sur la réponse mécanique. On

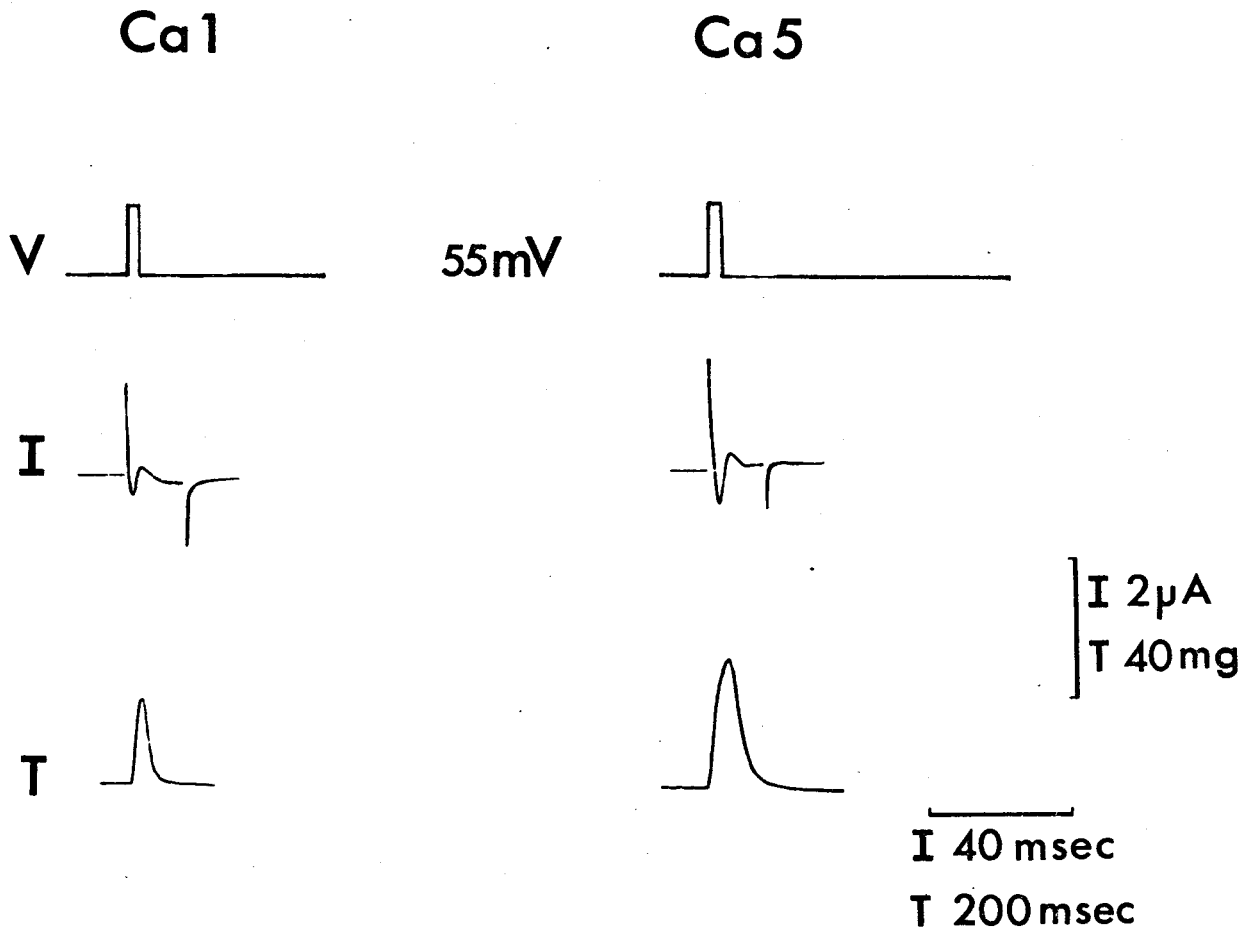


Figure 18 : Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et des réponses mécaniques (T) dues à une dépolarisation imposée de 55 mV et de durée 15 msec, en milieu de concentration calcique normale (Ca 1) puis en milieu enrichi en calcium (Ca 5).

observe que le courant calcique et la tension sont nettement augmentés. De plus, la phase de relaxation est allongée. puisque la constante de temps de relaxation est augmentée : elle est égale à 58 msec en Ca 1 et 72 msec en Ca 5. L'analyse semi-logarithmique de la phase de relaxation, effectuée sur 4 autres fibres montre toujours une augmentation de la constante de temps de relaxation même si l'allongement de la phase de relaxation est peu visible sur les enregistrements.

II - Milieux annulant le courant calcique :
milieu sans calcium et milieu manga-
nèse.



Dans le but de confirmer l'existence d'une composante de tension dépendante du courant calcique, nous avons effectué des expériences dans des conditions permettant d'annuler I_{Ca} .

Les effets sur la réponse mécanique d'un milieu sans calcium et d'un milieu contenant du chlorure de manganèse ($Mn Cl_2$ 5 mM), ont été observés (Fig. 19). Les paramètres de stimulation ont été choisis tels que l'amplitude de la dépolarisation imposée soit voisine de 55 mV (55 et 60 mV) et sa

Figure 19 : Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et des tensions (T).

- En haut, dus à une dépolarisation imposée de 55 mV et de durée 15 msec, en milieu de concentration calcique normale (Ca 1) puis en milieu sans calcium (Ca 0).

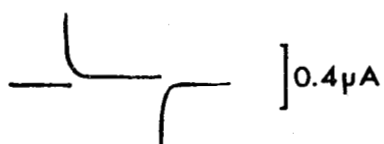
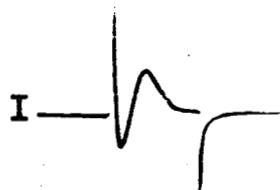
- En bas, dus à une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 15 msec, en eau de mer artificielle (ASW) puis dans une solution contenant du chlorure de manganèse 5 mM (Mn).

Ces enregistrements ont été obtenus sur deux fibres différentes.

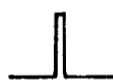
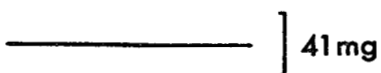
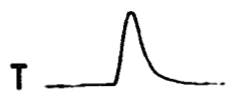
Ca1

Ca0

55 mV



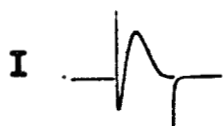
I 10 msec
T 100 msec



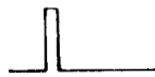
ASW

Mn

60 mV



I 20 msec
T 200 msec



durée égale à 15 msec, pour les raisons indiquées dans le paragraphe précédent. On observe que dans ces deux milieux les courants ioniques I_{Ca} et I_{K1} ainsi que la tension sont annulés.

Notons ici que nous avons ajouté de l'EGTA (acide ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N'-tetraacétique) au milieu sans calcium afin de chélater les traces d'ions vraisemblablement situés au niveau des invaginations membranaires.

B - Influence de la polarisation membranaire sur l'inactivation du courant calcique et de la tension.

I - En solution ASW

La conductance calcique dans le cadre de la théorie de Hodgkin et Huxley présente une inactivation en fonction du potentiel. Une relation f_{∞} est obtenue en testant l'amplitude du courant calcique pour une impulsion donnée après avoir modifié la polarisation initiale de la membrane ou holding potential (H.P.)

L'expérience décrite ici a pour but d'étudier l'évolution du courant calcique d'une part, de la tension d'autre part lors de variations imposées

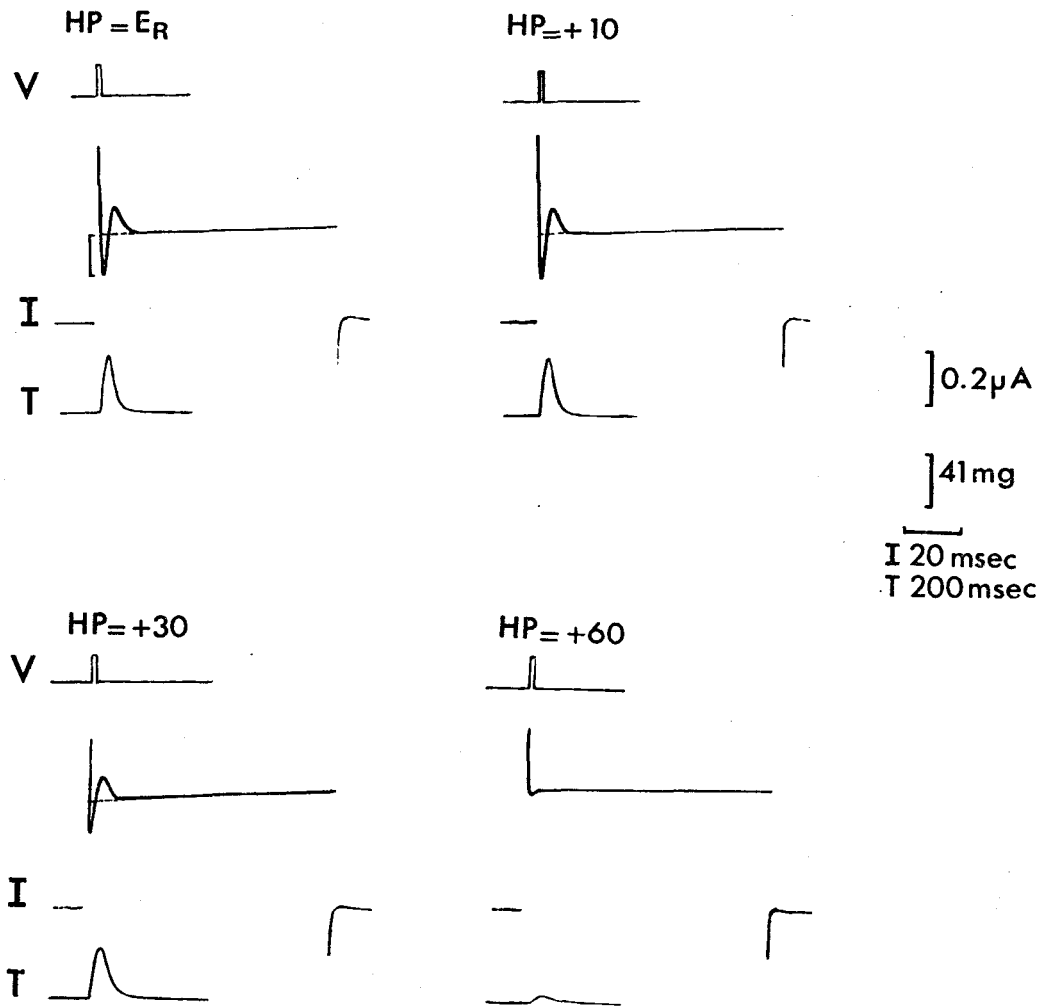


Figure 20 : Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et des tensions (T) dus à une dépolarisation membranaire de 55 mV et de durée 15 msec à partir de la polarisation membranaire initiale ($HP = E_R = 0$) et lorsque celle-ci est modifiée (Holding potential supérieur au niveau de repos, E_R). Le courant de fuite n'a pas été automatiquement compensé.

au potentiel de membrane initial (Fig. 20). Comme précédemment la dépolarisation test imposée à la membrane a été choisie égale à 60 mV et de durée 15 msec. L'amplitude de la tension est mesurée entre le niveau de repos et le pic de tension. L'amplitude du courant entrant est mesurée après extrapolation du courant en fin d'impulsion de 80 msec afin de permettre au courant sortant de se développer. Les tensions se développant pour ces impulsions de durée 80 msec n'ont pas été utilisées.

Le courant entrant et la tension ont une amplitude donnée lorsque $HP = E_R$ pris comme niveau 0. Ils augmentent tous les deux et sont maximaux pour $HP = E_R + 10$ mV puis ils diminuent parallèlement lorsque HP est modifié de + 10 mV à + 60 mV. Notons ici que le courant I_{K_1} diminue d'amplitude quand la polarisation initiale membranaire est plus positive que E_R .

Le rapport entre l'amplitude I du courant entrant mesuré pour les différentes polarisations membranaires initiales et le courant entrant maximum (I_{max}) a été établi pour différentes valeurs de polarisation membranaire initiale. Le même protocole est employé pour la tension (Fig. 21). La relation de dépendance vis à vis du potentiel est commune aux deux paramètres I_{Ca} et T : la composante entrante du

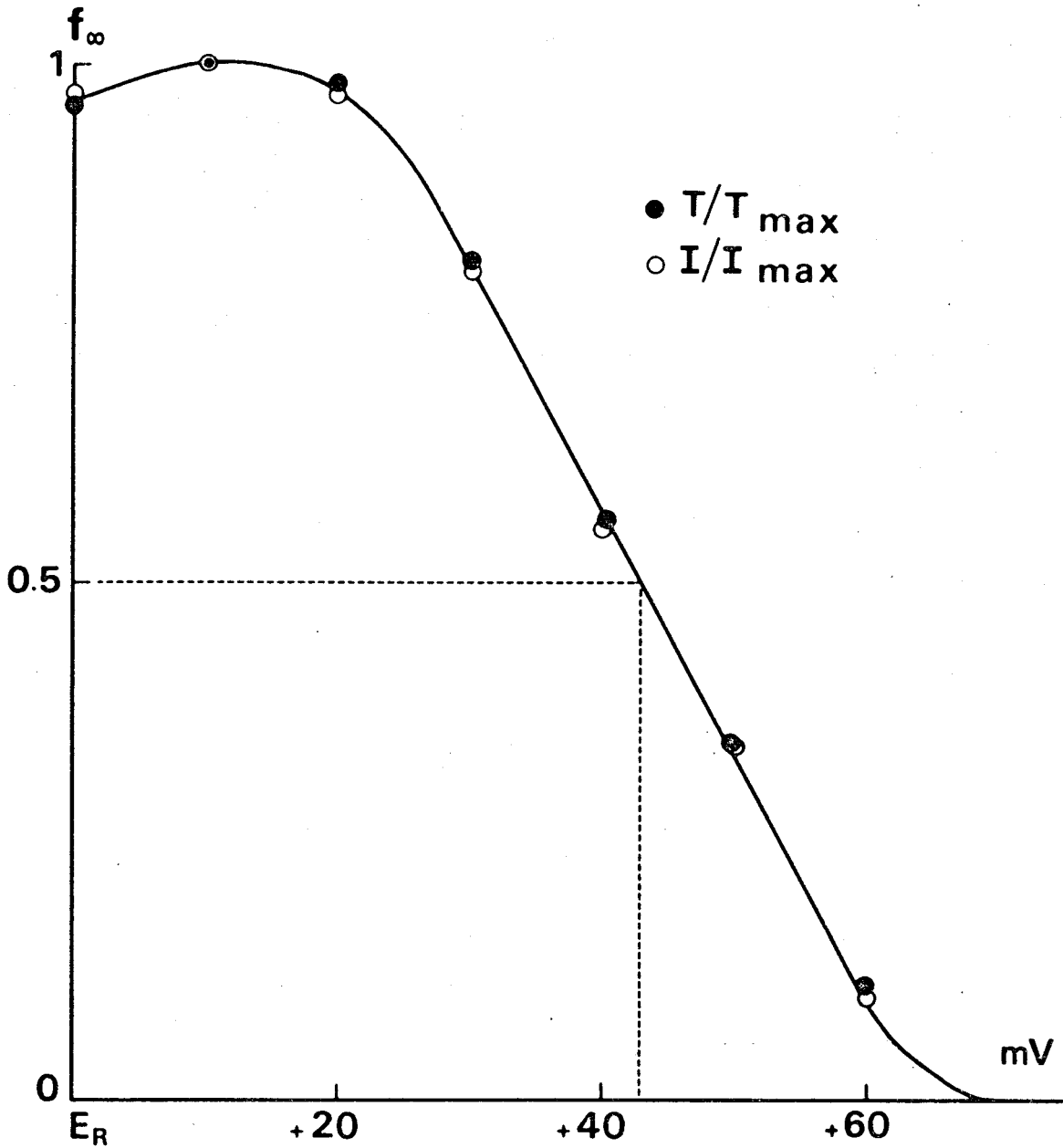


Figure 21 : Courbe de disponibilité du courant calcique (o) et de la tension (●) en fonction du potentiel. La valeur de demi-inactivation est obtenue pour une dépolarisation imposée de 42,5 mV.

Même fibre qu'à la figure 20 .



courant initial et la tension n'apparaissent pas totalement disponibles lorsque la polarisation membranaire initiale est égale à la polarisation membranaire de repos. Le courant calcique et la tension sont maximaux pour une valeur de polarisation initiale de la membrane égale à + 10 mV. Lorsque celle-ci est supérieure à + 10 mV, une inactivation de I_{Ca} et de la tension apparaît et elle est totale pour une valeur de HP égale à 70 mV. La demi-inactivation ($I/I_{max} = T/T_{max} = 0.5$) se situe à des potentiels de 42,5 mV. Cette valeur du potentiel pour laquelle le courant calcique est à moitié inactivé est conforme à celles que nous avons obtenues sur d'autres fibres développant comme celle-ci un courant initial composite (Mounier, 1975, figure 49 ; Mounier et Vassort, 1975 b, figure 6 ; Goblet, 1977, figures 8 et 17).

Il est intéressant de noter qu'à la fois la tension et le courant calcique ne sont pas totalement disponibles lorsque la polarisation membranaire est égale à E_R . Ce phénomène avait déjà été observé pour le courant calcique par Mounier (1975) et interprété comme la conséquence du développement simultané du courant I_{K_1} qui présente une propre dépendance vis à vis du potentiel dans une gamme allant des hyperpolarisations membranaires à des dépolarisations voisines

de + 20 mV par rapport à E_R (Mounier 1975 , figure 49). A la lumière de cette interprétation, la concordance des courbes de disponibilité de I_{Ca} et de la tension phasique est compréhensible dans la gamme de polarisation membranaire pour lesquelles I_{K_1} est inactivé (HP 20 mV). Par contre, cette interprétation ne rend pas compte du fait que le rapport T/T_{max} est différent de 1 à E_R dans la mesure où l'on peut s'attendre à ce que l'amplitude de la tension phasique (C_1) ne dépende que de I_{Ca} .

Dans le but d'analyser plus complètement ce problème, nous avons étudié simultanément la disponibilité de I_{Ca} et de la tension phasique, C_1 , lors de variations de la polarisation membranaire de repos dans le sens des hyperpolarisations, sur une fibre baignant dans une solution physiologique normale. Des préimpulsions dépolarisantes ont également été appliquées. Le protocole expérimental est légèrement différent de celui utilisé antérieurement (voir Fig. 20) : une dépolarisation test de 60 mV et de durée 50 msec est imposée à la membrane ; elle est précédée d'un prépotentiel de longue durée (280 msec), d'amplitude et de sens variables. La durée de la préimpulsion a été choisie afin de permettre à la tension phasique qui se développe lors des prédépolarisations de se relâcher. Les amplitudes de I_{Ca} et de la tension ont

été mesurées au niveau de la dépolarisation test. I_{Ca} est mesuré par rapport au courant en fin d'impulsion en veillant à limiter à environ 50 msec sa durée afin que la tension tonique se développe peu.

La figure 22 illustre les courants et les tensions enregistrés lors de l'application à la membrane de la dépolarisation test sans préimpulsion et lors d'une préhyperpolarisation de 40 mV. On observe que lorsque la polarisation initiale membranaire a été modifiée dans le sens des hyperpolarisations, le courant calcique et la tension diminuent d'amplitude. De plus on remarque que I_{Ca} est beaucoup plus diminué que la tension. Les résultats complets sont donnés par la courbe traduisant les disponibilités du courant entrant et de la tension phasique en fonction du potentiel, obtenues sur la même fibre (Fig. 23). Cette courbe a été établie comme nous l'avons noté antérieurement (voir figure 21). Comme précédemment, quand la polarisation membranaire est égale à E_R ou quand la membrane est prédépolarisée, une correspondance des valeurs de I/I_{max} et T/T_{max} peut être observée. Par contre, lorsque la membrane est initialement hyperpolarisée, trois points importants peuvent être notés :

1. La disponibilité du courant calcique apparaît diminuée lorsque l'amplitude de la préhyperpolarisation augmente et I_{Ca} apparaît nul sur les tracés pour HP = - 48 mV.

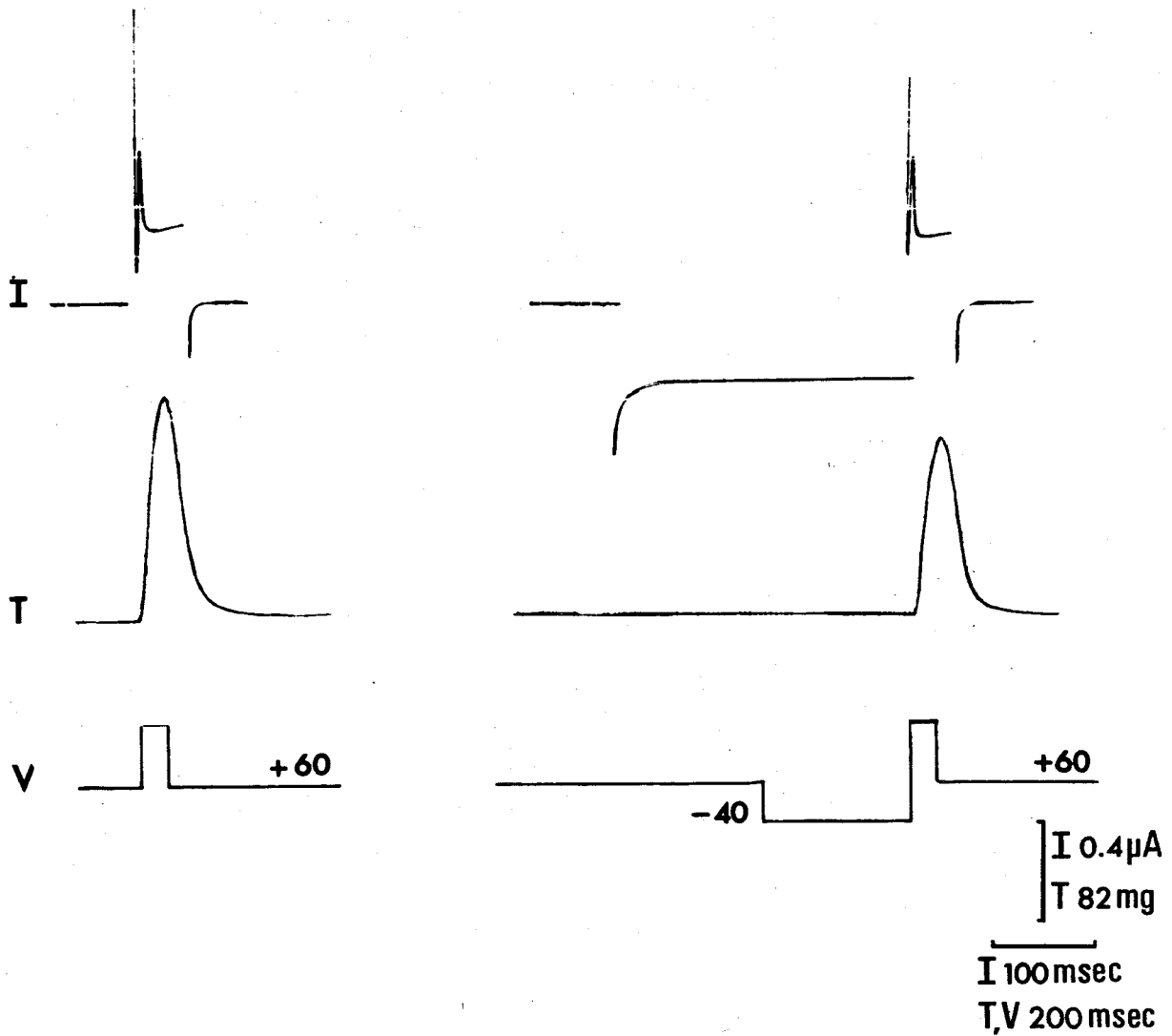


Figure 22 : Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et de la tension phasique (T) pour une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 50 msec, d'une fibre placée en solution ASW.

A gauche : pour une polarisation initiale membranaire égale à E_R

A droite : après une préhyperpolarisation de 40 mV et 280 msec. Noter la diminution plus importante de I_{Ca} par rapport à la tension.

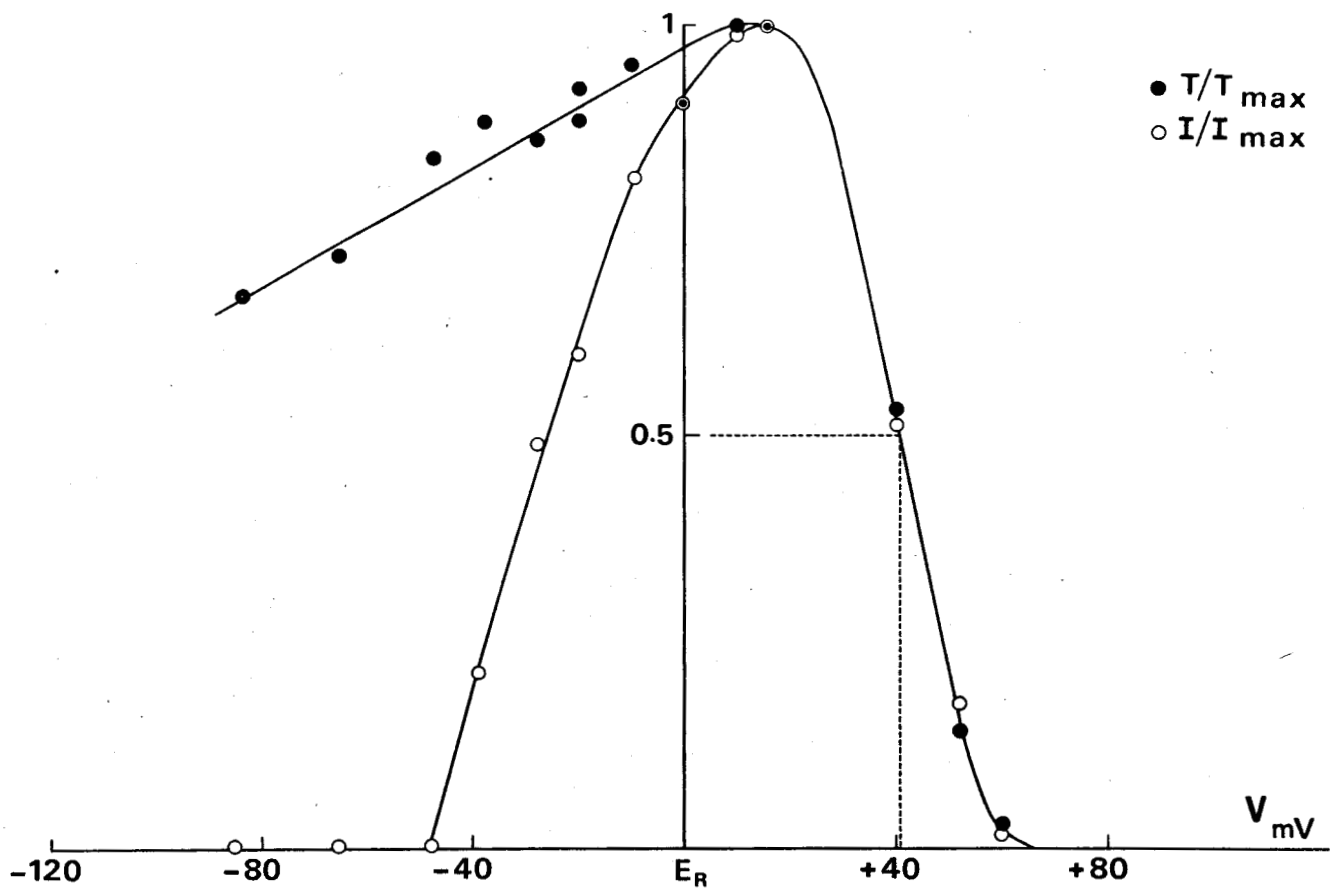


Figure 23 : Courbe traduisant la disponibilité du courant calcique et de la tension phasique en fonction du potentiel d'une fibre placée en solution ASW.

Même fibre qu'à la figure 22.

2 - La tension phasique diminue d'autant plus que la préhyperpolarisation augmente : il apparaît donc que dans cette gamme de potentiels pour lesquelles I_{K_1} est disponible, les ions Ca^{++} pénètrent moins dans la cellule.

3 - Les valeurs de T/T_{max} sont toujours supérieures à celles de I/I_{max} . Ce phénomène est lié au développement de I_{K_1} simultanément à I_{Ca} , créant de ce fait un masquage de l'amplitude de I_{Ca} . Plus I_{K_1} est disponible, plus l'amplitude de I_{Ca} est masquée par I_{K_1} sur les enregistrements des courants ioniques membranaires.

II - En solution TEA.

Nous savons maintenant que i) l'amplitude de I_{Ca} et de la tension C_1 sont diminuées ii) l'amplitude réelle de I_{Ca} est masquée, quand I_{K_1} est très disponible. Afin de pouvoir relier la tension phasique à I_{Ca} il faut donc que nous nous placions dans des conditions telles que I_{K_1} soit inhibé. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de la conductance potassique, la Chlorure de tetraethylammonium (TEA, 20 mM). Si les perturbations que nous avons observées viennent de l'existence de I_{K_1} , les courbes de disponibilité doivent alors être modifiées en particulier dans la

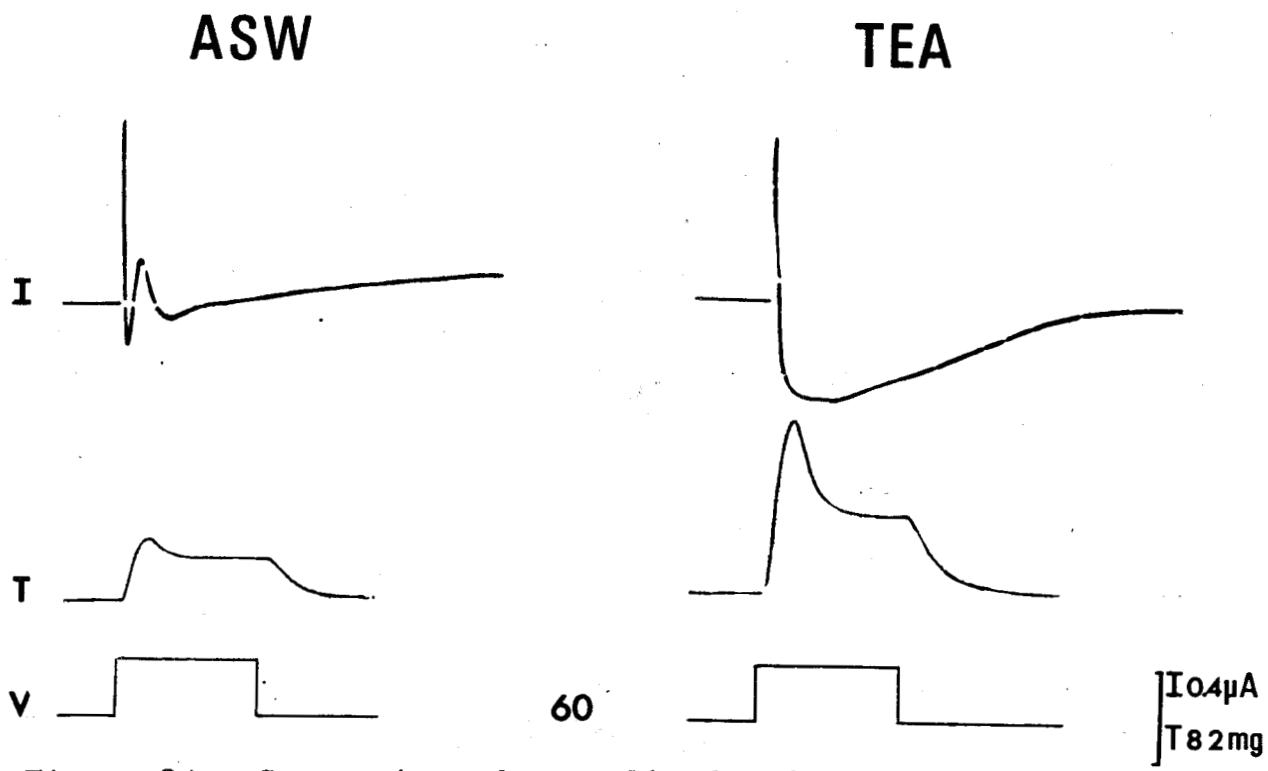
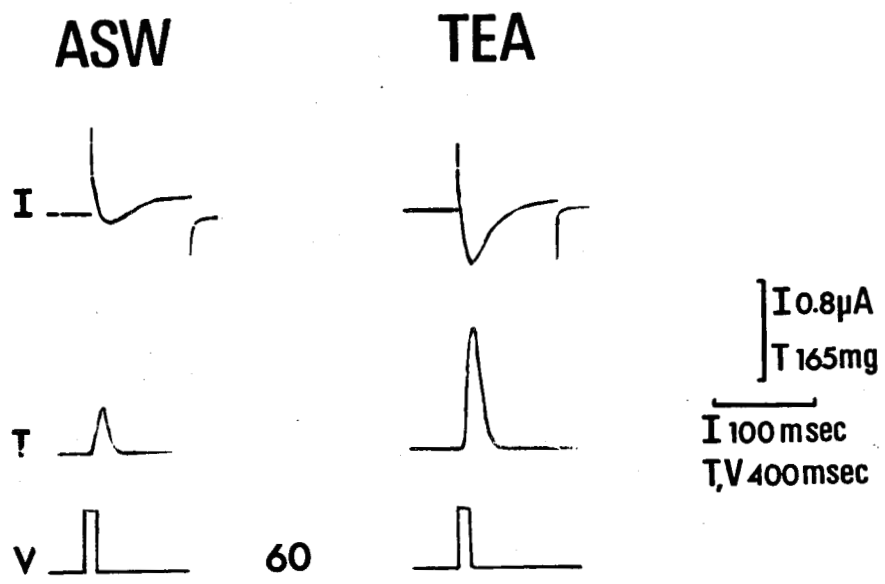


Figure 24 : Comparaison des amplitudes des courants ioniques (I) et des tensions (T) en solution physiologique normale (ASW) et après 10 minutes d'action du TEA (20 mM).

En haut : pour une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 50 msec. Même fibre qu'à la figure 25 et 26.

En bas : pour une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 300 msec.



zone des hyperpolarisations membranaires.

Nous avons donc étudié la disponibilité de la tension phasique et du courant calcique sur une fibre placée successivement en solution ASW puis en solution TEA (20 mM). On peut observer, pour une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 50 msec (Fig. 24), que l'application de la solution TEA crée en 10 minutes une augmentation de l'amplitude de I_{Ca} et de la tension phasique d'un facteur de 2,6 (moyenne sur 5 fibres : 2.54). Pour une dépolarisation imposée de 60 mV mais de durée longue (300 msec), I_{Ca} et le pic de tension sont nettement augmentés alors que la tension tonique l'est faiblement (Fig. 24). Ceci ^(en moyenne facteur de 1.5) suggère donc que l'application de TEA affecte essentiellement la composante phasique de tension.

La figure 25 illustre la disponibilité de la tension phasique d'une fibre placée d'une part en solution ASW, d'autre part en solution TEA (20 mM). Le protocole expérimental et les paramètres de stimulation sont identiques à ceux cités pour la fibre illustrée aux figures 22 et 23. La figure 25 est établie par report des amplitudes des tensions sans les normaliser à 1, afin de comparer les amplitudes réelles de la tension en ASW et en TEA. On observe qu'en milieu TEA i) quel que soit le niveau de la polarisation initiale la tension est accrue ii) pour

une polarisation initiale comprise entre - 90 mV et + 25 mV par rapport au niveau de repos, la tension phasique est totalement disponible.

Pour pouvoir comparer la disponibilité de I_{Ca} et de C_1 en milieu TEA, nous avons reporté les valeurs de I/I_{max} et de T/T_{max} , en fonction de la polarisation membranaire, normalisés à 1 (Fig. 26). Nous avons également reporté les valeurs obtenues sur la même fibre en solution ASW. On observe :

- en ASW : le même phénomène que celui décrit à la figure 23, c'est à dire une diminution des valeurs de I/I_{max} et T/T_{max} dans le sens des hyperpolarisations, diminution plus importante pour I/I_{max} que pour T/T_{max} . On peut remarquer que sur cette fibre les rapports de I/I_{max} et T/T_{max} à E_R diffèrent légèrement entre eux. Ceci est dû à la variabilité de l'amplitude ou/et de la disponibilité de I_{K_1} , à E_R , d'une fibre à l'autre.

- en TEA : la disponibilité de I_{Ca} et C_1 est maximale dans une dépolarisation membranaire se situant entre - 90 mV et + 25 mV par rapport à E_R . Notons que les courbes de disponibilité de I_{Ca} et de C_1 en ASW et en TEA sont superposées vers les dépolarisations ; la valeur de potentiel pour laquelle I_{Ca} et C_1 sont à demi inactivés est égale à + 45 mV, valeur en accord avec celles généralement observées.

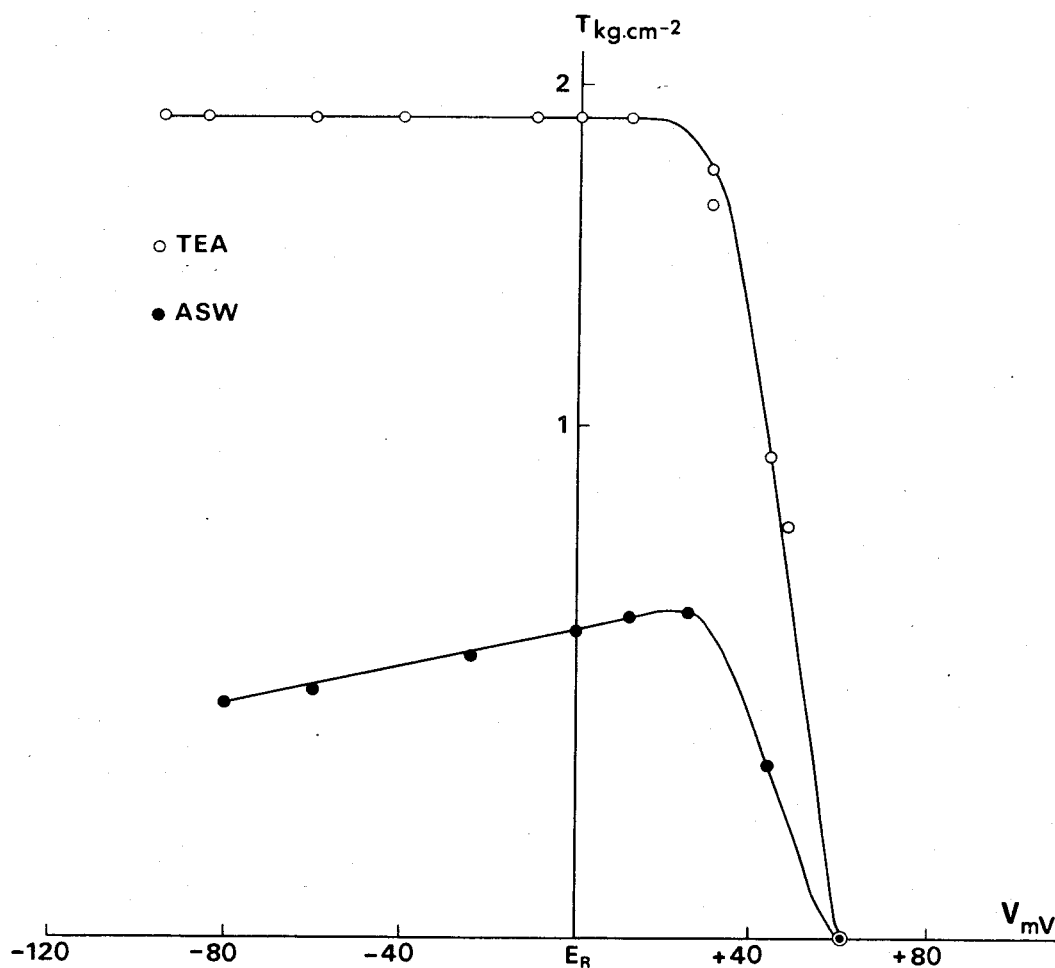


Figure 25 : Courbes traduisant l'amplitude de la tension phasique due à une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 50 msec, en fonction de la polarisation initiale membranaire.

Points (●) en solution ASW

Cercles (○) en solution TEA (20 mM)

Résultats obtenus sur la même fibre.



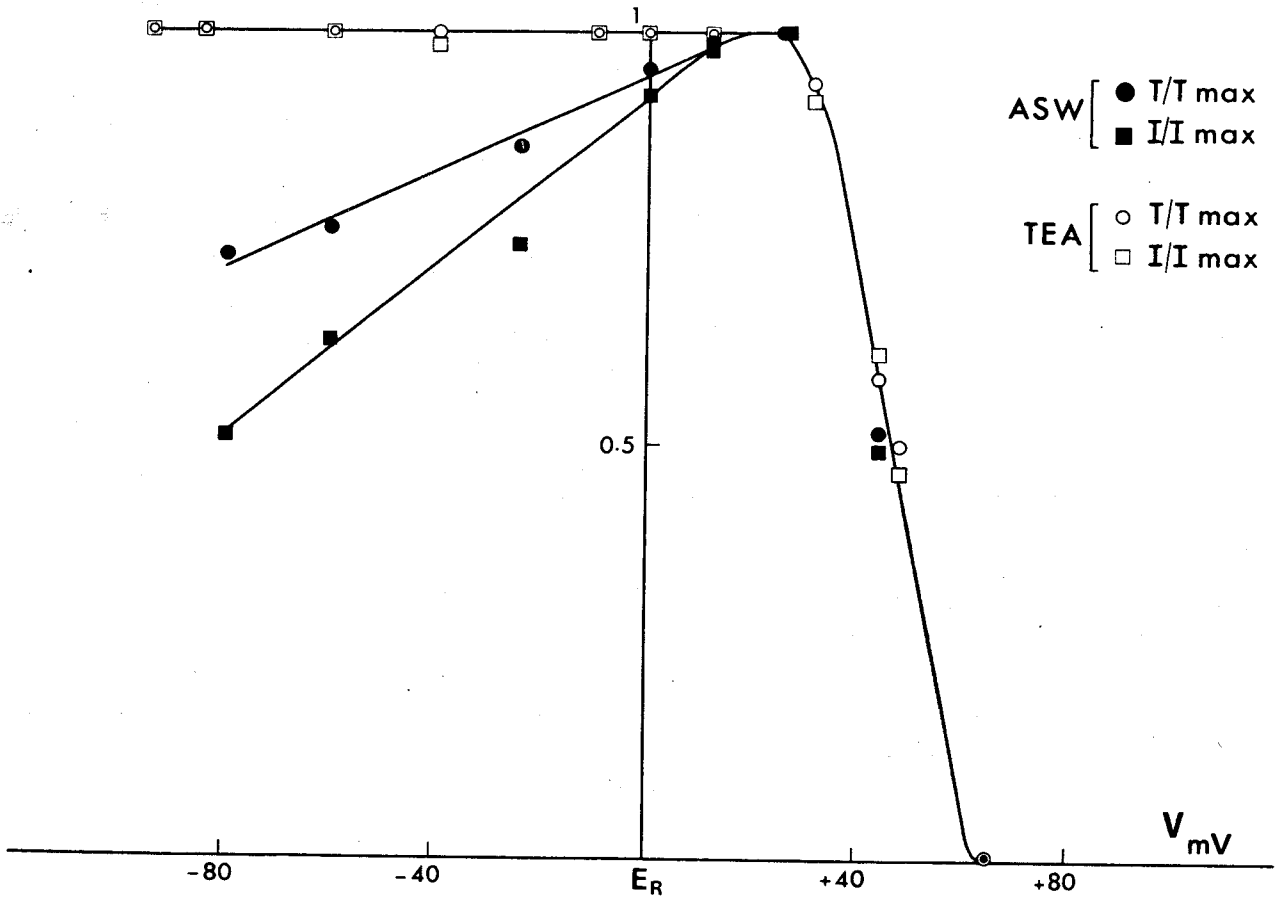


Figure 26 : Courbes traduisant la disponibilité de I_{Ca} et de la tension phasique en fonction du potentiel, d'une fibre placée en solution ASW puis en solution contenant du TEA (20 mM).

Même fibre qu'à la figure 25.

C - Conclusion

L'augmentation de la tension lorsque I_{Ca} est accru par un milieu enrichi en calcium, l'annulation de la tension lorsque I_{Ca} est supprimé - soit en milieu sans calcium soit en milieu manganèse -, enfin la même relation traduisant l'inactivation de I_{Ca} et de la tension phasique en fonction de la polarisation membranaire observée en milieu TEA confirment que la composante de tension produite par des impulsions de courte durée est dépendante du courant calcique.

De plus les résultats concernant la disponibilité, en fonction du potentiel, du courant calcique et de la tension phasique, en milieu physiologique normal (ASW) et en TEA nous permettent d'apporter les conclusions suivantes. L'entrée moins importante d'ions Ca^{++} lorsque la membrane est préhyperpolarisée et le masquage de l'amplitude de I_{Ca} sont dus à l'existence de I_{K_1} qui est de plus en plus disponible pour des hyperpolarisations. Son amplitude plus grande masque d'une part I_{Ca} de façon plus importante et empêche d'autre part les ions Ca^{++} d'entrer dans la cellule. Il semble que les ions Ca^{++} et K^+ passent par le même canal qui devient plus sélectif à I_{K_1} dans ces conditions de préhyperpolarisations.

CHAPITRE III

ETUDE DES COMPOSANTES DE TENSION
INDEPENDANTES DU COURANT CALCIQUE

A - Existence d'une tension en absence de courant calcique.

B - Dissociation des différentes composantes de tension par un milieu enrichi en manganèse.

C - Etude de la composante de tension indépendante de I_{Ca} ; tension tonique : C_2

I - Influence de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation imposée sur la composante C_2

1 - Etude du seuil mécanique

2 - Relation entre l'amplitude de la tension en fin d'impulsion de longue durée et le potentiel de membrane.

3 - Les fibres passives.

II - Effets de milieux ioniques modifiés

1 - Milieu enrichi en calcium

2 - Milieu sans calcium

3 - Milieu sans sodium

III - Conclusion

D - Etude de la composante de tension indépendante de I_{Ca} : tension phasique : C_3

I - Mise en évidence

II - Eléments de distinction entre la 3ème composante et la composante dépendante du courant calcique.

- 1 - Mise en évidence en inactivant le courant calcique
- 2 - Action différentielle d'un inhibiteur du courant calcique : le D600.
- 3 - Disponibilité de la tension phasique C_3 en fonction de la polarisation initiale membranaire.

III - Élément de distinction entre la 3ème composante et la composante tonique de tension

IV - Dépendance vis-à-vis de la concentration calcique extracellulaire.

E - Conclusion

A - Existence d'une tension en absence du courant calcique.

L'analyse des résultats illustrés dans le chapitre I, nous oblige à envisager l'existence d'une tension se développant en absence du courant I_{Ca} . En effet, nous avons mis en évidence plusieurs points importants :

- la plus petite valeur de dépolarisation imposée permettant le développement d'une tension est abaissée lorsque la durée de la dépolarisation est élevée. Elle devient inférieure au potentiel d'activation du courant calcique (voir Fig. 16).

- lorsque la dépolarisation imposée est de longue durée le niveau de tension en fin d'impulsion est supérieur au niveau de repos. Cette tension développée ne peut être due au courant calcique. En effet, celui-ci s'inactive selon une constante de temps d'inactivation maximale, τ_f , égale à 38 msec (Mounier et Vassort, 1975 a ; Mounier, 1975). En fin d'impulsion longue (1000 msec), I_{Ca} est donc totalement inactivé et l'origine des ions Ca^{++} permettant le maintien de la tension doit être différente du courant calcique.

- de plus, pour des dépolarisations imposées supérieures au potentiel d'inversion calcique, des

tensions importantes existent.

- enfin, des contractions se développent sur les fibres passives, comme nous le verrons ensuite.

Cependant nous avons vu qu'il existe vraisemblablement deux composantes de tension indépendantes de I_{Ca} . En effet i) il n'existe pas de relation simple entre le potentiel de membrane et l'amplitude de la tension lorsque la dépolarisation est supérieure au potentiel d'inversion calcique (voir Fig. 13) ii) les tensions se développant pour des dépolarisations imposées comprises entre + 75 mV et + 250 mV présentent une mise sous tension maximale rapide individualisant un pic de tension alors que les tensions se développant pour des dépolarisations imposées d'amplitudes faibles ou très élevées ont une mise sous tension lente sans présence de pic de tension.

B - Dissociation des différentes composantes de tension par un milieu enrichi en manganèse.

La figure 27 illustre les courants membranaires et les tensions enregistrées à 3 niveaux de

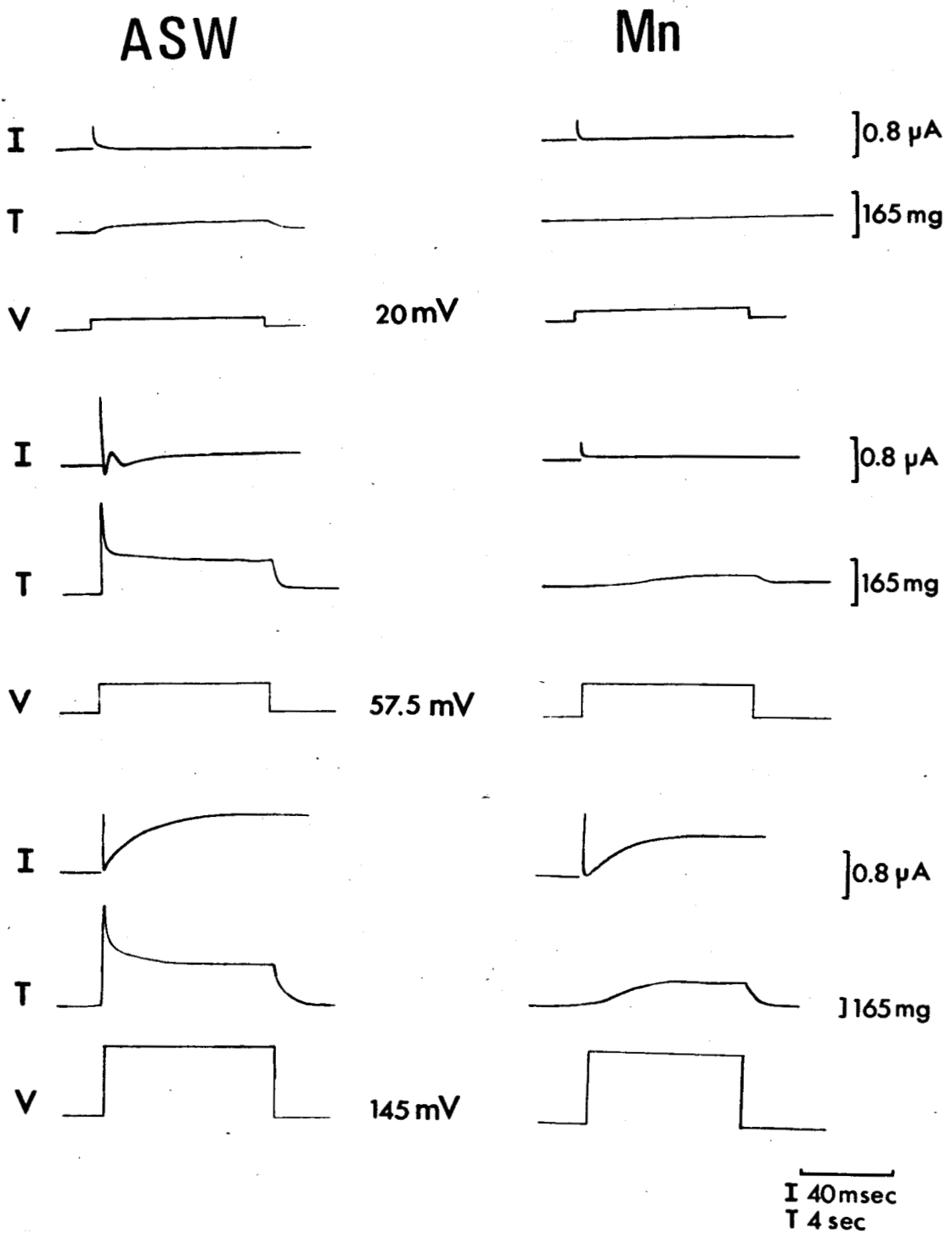


Figure 27 : Enregistrement des courants membranaires (I) et des tensions (T) pour 3 niveaux de dépolarisation imposée de durée 7 secondes, en eau de mer artificielle (ASW) puis en milieu manganèse 5 mM (Mn)

potentiel imposé de durée 7 secondes, d'une part en milieu ASW, d'autre part en milieu manganèse 5 mM sur une même fibre. On observe qu'en solution ASW, les tracés des courants et des tensions obtenus pour des dépolarisations imposées de 20 mV, 57,5 mV et 145 mV sont comparables à ceux illustrés à la figure 14 pour une durée d'impulsion de 1000 msec, (voir Fig. 14), ceci en tenant compte de la différence de base de temps pour les enregistrements de tension. Après 18 minutes d'action du manganèse on observe pour une dépolarisation imposée de 20 mV un courant nul, comme en milieu ASW, mais la faible tension qui existait est supprimée. Pour une dépolarisation imposée plus élevée (+ 57.5 mV) I_{Ca} est annulé et la tension a nettement diminué d'amplitude. Pour une dépolarisation imposée importante (+ 145 mV), le courant potassique sortant retardé (I_{K_2}) se développe plus lentement en milieu manganèse et la tension est fortement diminuée bien que supérieure à l'amplitude de celle enregistrée pour + 57,5 mV. Dans les deux cas, le pic de tension a disparu et la mise sous tension maximale est lente. L'ensemble des résultats obtenus sur cette même fibre pour différents potentiels imposés est reporté sur la relation tension-potentiel en solutions ASW et Mn 5 mM et ^{sur} la relation courant entrant - potentiel dans les mêmes milieux (Fig. 28). On

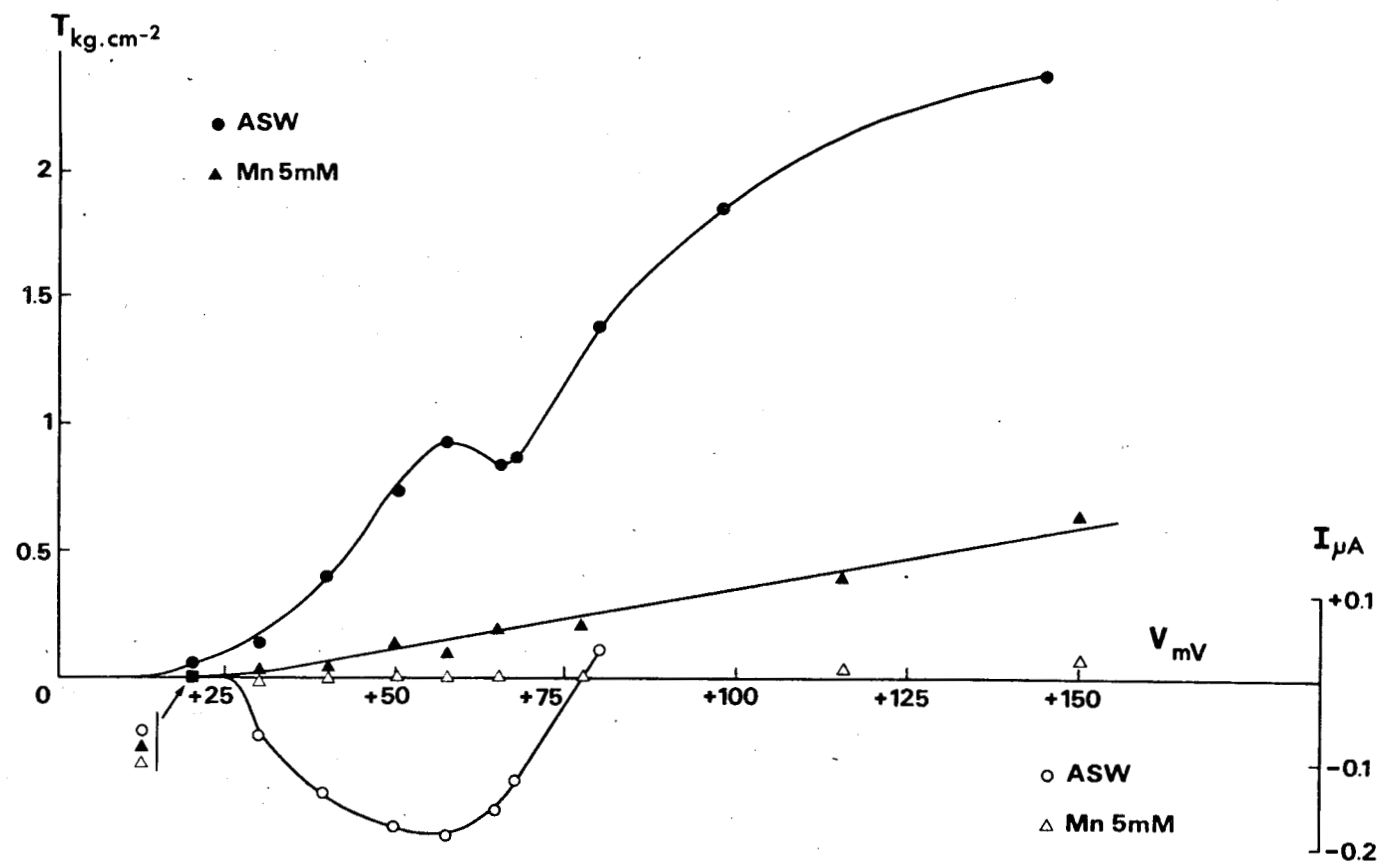


Figure 28 : Relation entre la tension et le potentiel et entre le courant entrant et le potentiel en solution normale (ASW) et en solution manganèse (Mn 5 mM). Points (●) : tension en ASW ; triangles pleins (▲) : tension en milieu Mn 5 mM ; cercles (○) : courant entrant en ASW ; triangles évidés (△) : courant entrant en Mn 5 mM.



observe qu'en solution ASW, la relation entre l'amplitude du maximum de tension et le potentiel est comparable à celle illustrée à la figure 13 et la relation courant entrant-potentiel est de type classique. Par contre, en solution manganèse, on remarque que :

1. la tension augmente d'amplitude lorsque la dépolarisation imposée est accrue.

2. le seuil d'activation de la contraction est augmenté de 15 mV.

3. l'annulation de I_{Ca} et une disparition concomittante de la "bosse" de tension comprise entre + 30 mV et + 70 mV, ce qui confirme l'existence d'une composante de tension dépendante de I_{Ca} .

4. Une disparition de la seconde "bosse" de tension comprise entre + 70 mV et + 150 mV.

Cette expérience effectuée dans un milieu contenant un inhibiteur du courant calcique a permis de confirmer l'existence de la composante de tension dépendante de I_{Ca} . De plus, elle a permis de dissocier les deux composantes de tension indépendantes de I_{Ca} . En effet la composante apparaissant pour des potentiels imposés compris entre + 70 mV et + 250 mV disparaît en milieu manganèse. Nous appellerons désormais cette composante sous le terme C_3 . La relation illustrée à la figure 28 traduit donc la dépendance de l'autre composante indépendante de I_{Ca} vis à vis

du potentiel et que nous appellerons ultérieurement C_2 . On remarque que son amplitude est fonction de l'amplitude de la dépolarisation imposée.

Notons que si l'expérience illustrée ici est effectuée pour une durée de dépolarisation nettement plus faible que 7 secondes, notamment 500 msec, le pic de tension disparaît après 1 minute d'action du manganèse puis, après 5 minutes, la tension maintenue disparaît également. De plus, l'effet du manganèse est fonction de la concentration utilisée : une concentration de 20 mM crée en 1 minute la disparition de toute tension qu'elle soit phasique ou tonique quelle que soit la durée de la dépolarisation imposée.

Ces résultats expliquent le choix que nous avons effectué concernant la concentration de manganèse utilisée et la durée de la dépolarisation imposée à la membrane dans le but d'obtenir la relation entre la tension tonique et le potentiel de membrane. Ils montrent également que la composante de tension C_2 est aussi dépendante de la durée de la dépolarisation imposée.

C - Etude de la composante de tension indépendante de
 I_{Ca} : tension tonique; C_2

I - Influence de l'amplitude et de la durée
de la dépolarisation imposée sur la
composante C_2 .

1 - Etude du seuil mécanique

La figure 29 A illustre les tensions et courants membranaires enregistrés pour une dépolarisation imposée de 25 mV de durée variable (15, 100, 200, 300, 500, 1000 et 2000 msec). On observe que le courant calcique n'est pas activé; seul le courant capacitif est enregistré. Si l'impulsion dure 15 msec, aucune tension ne se développe. Pour une durée de 100 msec, une tension d'amplitude faible se développe lentement. Ces deux observations confirment ce que nous avons mis en évidence pour des valeurs différentes de durée d'impulsion; sur la fibre illustrée à la figure 14. Si l'impulsion est prolongée, des contractions sont toujours enregistrées. La mise sous tension maximale étant lente, (900 msec), la prolongation de l'impulsion induit une augmentation d'amplitude de la tension. Pour des dépolarisations imposées de durée supérieure au temps de mise sous tension maximale (2000 msec), la tension obtenue n'a pas son amplitude accrue. Ces observations sont résumées sur la courbe illustrant la relation entre l'amplitude de la tension et la durée de l'impulsion pour un

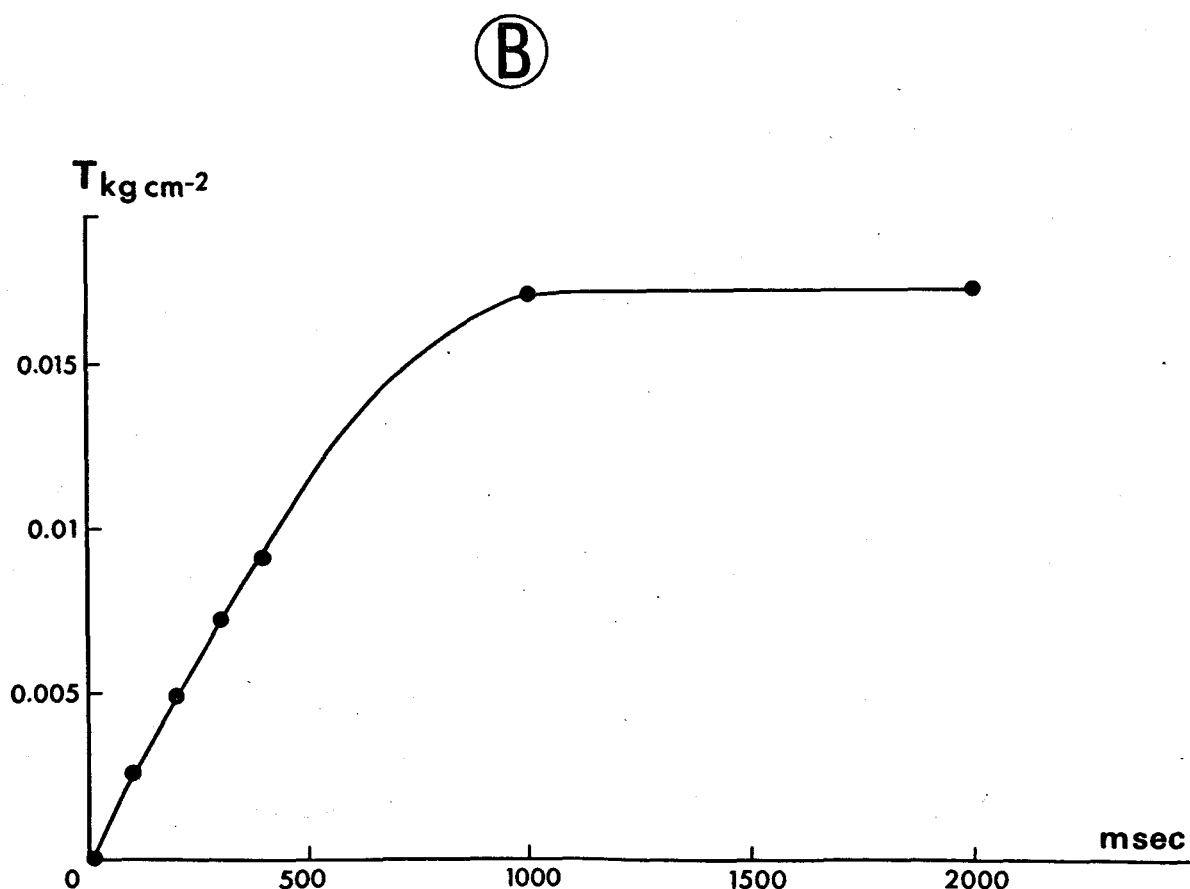
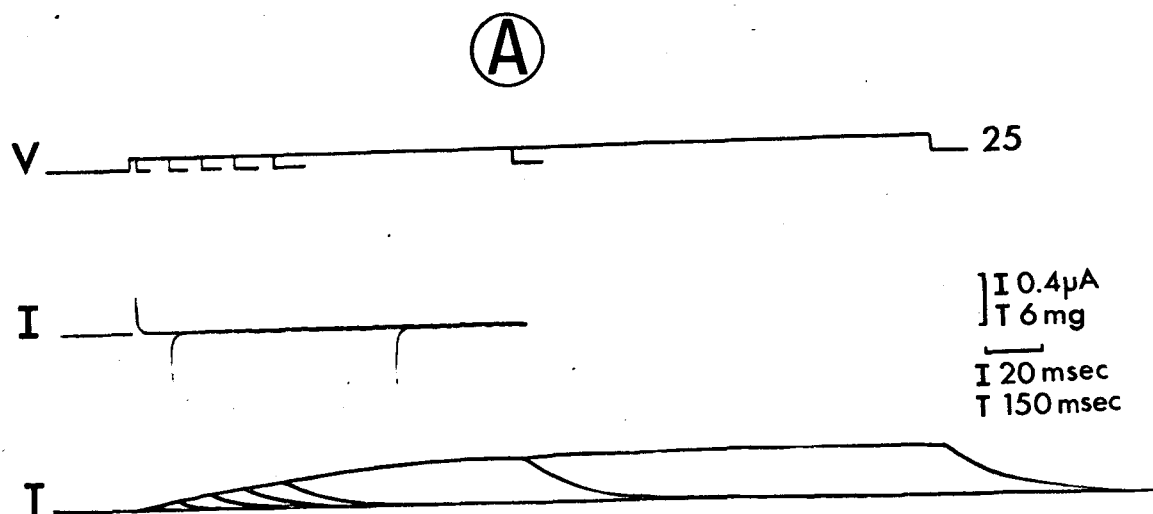


Figure 29 : Dépendance de l'amplitude de la tension, élicitée par une dépolarisation imposée de 25 mV, vis à vis de la durée de l'impulsion.

En A : enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et des tensions (T) pour des durées d'impulsion de 15, 100, 200, 300, 500, 1000 et 2000 msec.

En B : relation entre l'amplitude de la tension et la durée de la dépolarisation imposée tracée à partir des enregistrements illustrés en A

niveau faible de dépolarisation imposée (Fig. 29 B)

2 - Relation entre l'amplitude de la
tension en fin d'impulsion de longue
durée et le potentiel de membrane.

La figure 30 illustre les courants et les tensions enregistrés à 3 niveaux de potentiel et pour une dépolarisation imposée de très longue durée (7 sec). Les tracés des courants et tensions obtenus pour des dépolarisations imposées de 20 mV, 58 mV et 145 mV ont été décrits à la figure 27. Nous avons reporté en fonction du potentiel l'amplitude du pic de tension (T_1) et l'amplitude du courant entrant. De plus nous avons tracé la relation liant l'amplitude de la tension en fin d'impulsion (T_2) et le potentiel de membrane (Fig. 31). Cette relation confirme l'existence de trois composantes de tension dans l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe. En effet on observe sur la relation T_1/V les deux bosses de tension mises en évidence précédemment. La première traduisant la dépendance vis à vis du potentiel de la composante dépendante de I_{Ca} (C_1) et la seconde celle de la composante indépendante de I_{Ca} (C_3). La relation T_2/V traduit donc la dépendance vis à vis du potentiel de la composante de tension C_2 .

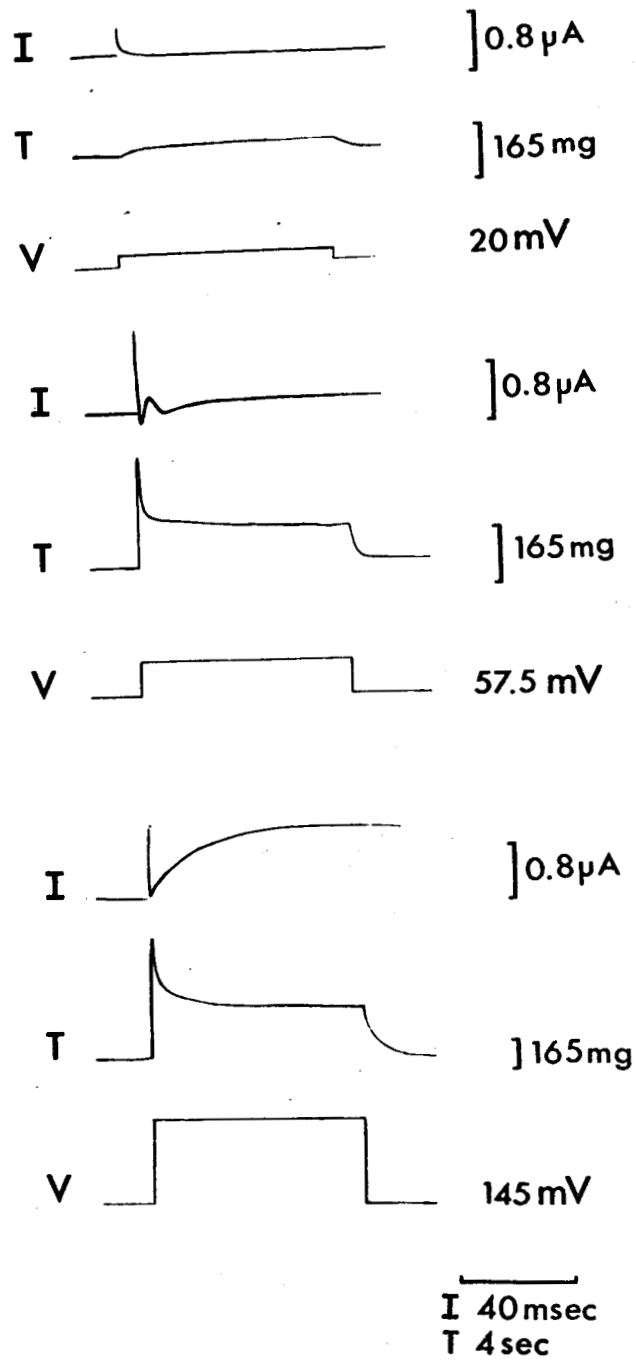


Figure 30 : Tracés des courants membranaires et de l'activité contractile (T) pour 3 niveaux de dépolarisation imposée de durée 7 secondes.

Même fibre qu'aux figures 27 et 28.

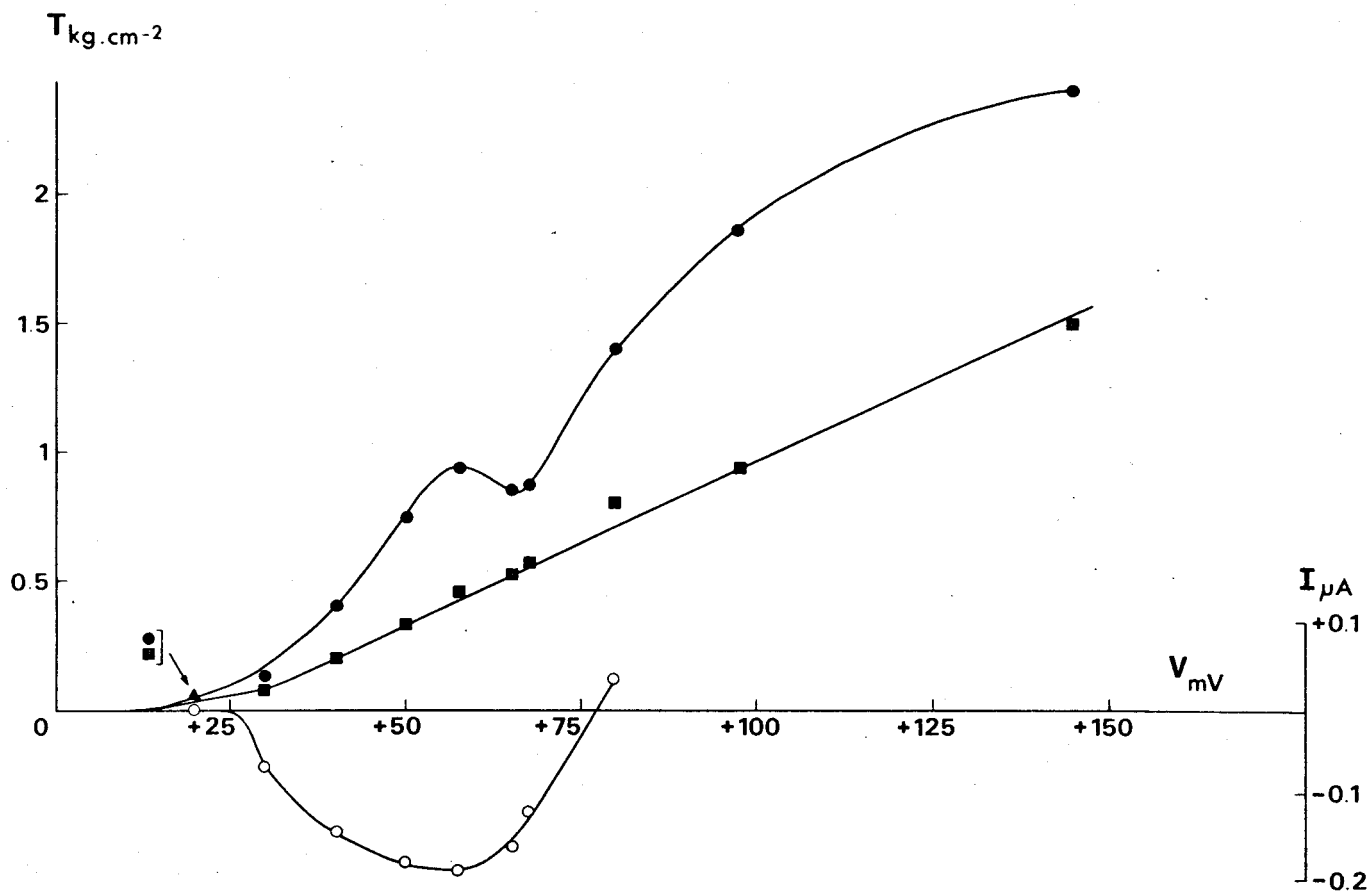


Figure 31 : Relation entre le courant entrant et le potentiel (O) et entre la tension et le potentiel : (●) mesure au pic de tension (T_1) ; (■) mesure en fin d'impulsion de 7 secondes (T_2).

Même fibre qu'aux figures 27, 28, 30.



La tension maintenue tant que dure la dépolarisation, est donc due au développement de la composante de tension indépendante de I_{Ca} , C_2 , appelée pour cela composante tonique de tension.

3 - Les fibres passives.

Atwood (1965), Atwood et coll. (1965) et Mounier et Vassort (1975, b) ont montré l'existence, sur le crabe, de fibres présentant une réponse électrique membranaire passive. Dans les conditions de potentiel imposé, le courant entrant calcique ne se développe jamais lorsque ce type de fibre est interrogé. La figure 32 A illustre les courants membranaires et les tensions obtenues pour différents niveaux de dépolarisation imposée d'une durée de 140 msec. On observe que, quelle que soit l'amplitude du potentiel imposé, aucun courant entrant n'est activé. Seul un courant sortant se développe pour des potentiels imposés égaux et supérieurs à + 75 mV. Pourtant, pour des impulsions égales ou supérieures à + 40 mV, une tension apparaît ; elle augmente d'amplitude avec l'amplitude de la dépolarisation. Le décours des tensions obtenues diffère de celui des tensions se développant lorsque I_{Ca} est activé :

- i) le temps de mise sous tension maximale est allongé

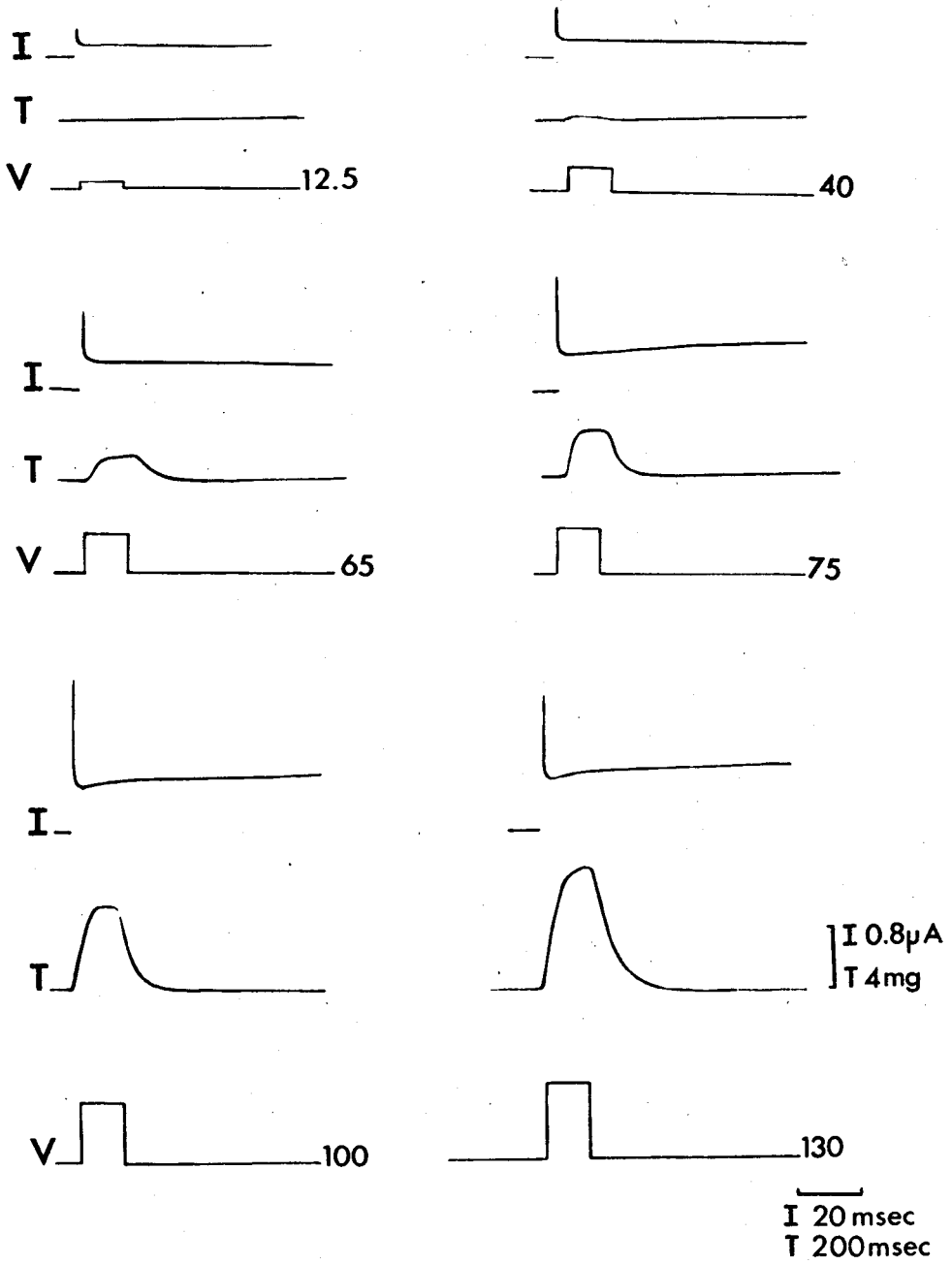
et est voisin de 75 msec pour les dépolarisations imposées de 75, 100 et 130 mV (moyenne obtenue sur 5 fibres : 100 msec). Par contre, pour la dépolarisation imposée de 65 mV, le temps mis pour atteindre le maximum de tension est supérieur à 140 msec puisque le niveau maximum de tension n'est pas atteint en fin d'impulsion. Donc, contrairement à ce que nous observons lorsque I_{Ca} est activé, le temps de mise sous tension maximale est fonction de l'amplitude de la dépolarisation membranaire. ii) on n'observe pas de pic de tension mais un plateau maintenu tant que dure la dépolarisation imposée, iii) la fibre se relâche suivant un décours exponentiel avec une constante de temps égale à 40 msec (moyenne obtenue sur 5 fibres : 45 msec). Les résultats complets sont donnés par la relation liant l'amplitude de la tension à l'amplitude de la dépolarisation imposée illustrée à la figure 32 B. On remarque qu'il existe un seuil d'activation de la tension pour une valeur de potentiel imposé égale à + 32 mV et que l'amplitude de la tension croît lorsque l'amplitude de la dépolarisation imposée augmente. Il faut noter que l'amplitude des tensions enregistrées est très faible (voir échelle verticale).

Figure 32 : Influence de la dépolarisation membranaire sur l'activité contractile d'une fibre passive.

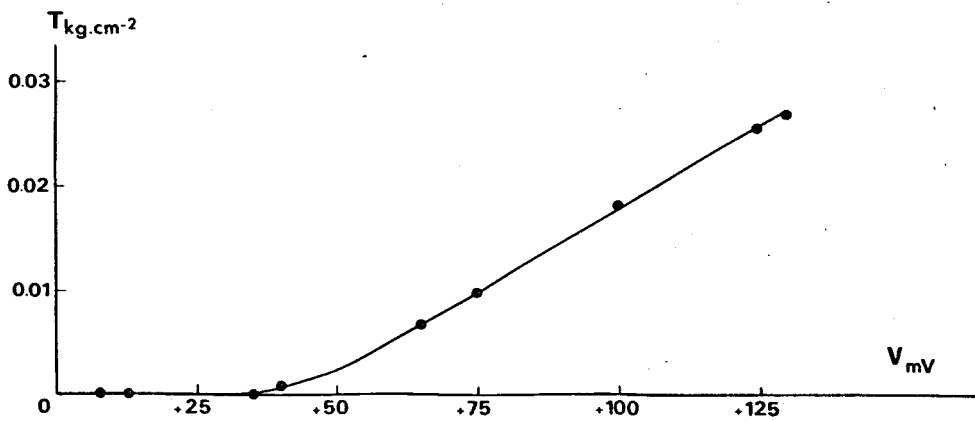
En A : enregistrements des courants membranaires (I) et des tensions (T) pour 6 niveaux de dépolarisation imposée de durée 140 msec. Le courant de fuite n'a pas été automatiquement compensé.

En B : relation entre l'amplitude de la tension et le potentiel membranaire tracée à partir des enregistrements illustrés en A.

(A)



(B)



BUS
LILLE

Par les expériences présentées ci-dessus, nous avons mis en évidence l'existence d'une composante de tension indépendante du courant calcique mais dépendante d'une part de la durée de la dépolarisation imposée et d'autre part de son amplitude. Cependant, afin de préciser la nature de cette composante de tension, des expériences ont été réalisées en milieux dont la composition ionique est modifiée.

II - Effets de milieux de composition ionique modifié.

1 - Milieu enrichi en calcium.

L'expérience illustrée à la figure 33 et effectuée sur une fibre passive montre l'influence d'un milieu enrichi en calcium ($[Ca]_e \times 5 = Ca 5$) sur la composante de tension indépendante de I_{Ca} se développant pour 3 niveaux de dépolarisation imposée de durée 500 msec. Lorsque la fibre baigne dans le milieu à concentration calcique externe normale (Ca 1), aucun courant calcique entrant ne se développe pour les 3 niveaux de potentiel testé ($V = + 20 \text{ mV}, + 60 \text{ mV}, + 140 \text{ mV}$), tandis qu'un courant sortant est activé pour la dépolarisation imposée de

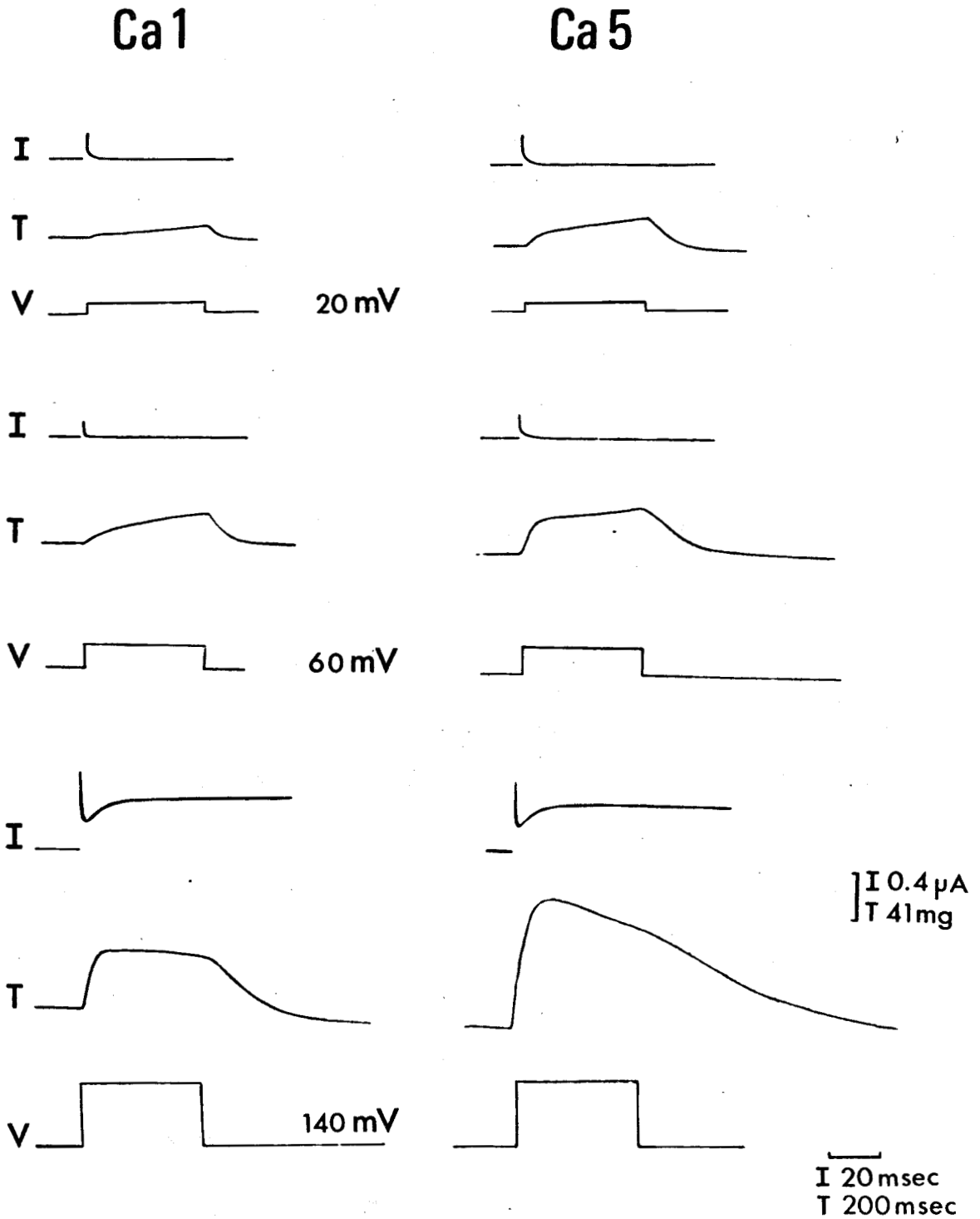


Figure 33 : Enregistrements des courants membranaires

(I) et des tensions (T) développés par une fibre passive pour 3 niveaux de dépolarisations imposées (V) de durée 500 msec.

A gauche : dans un milieu de concentration calcique normale (Ca 1)

A droite : dans un milieu hypercalcique (Ca 5).

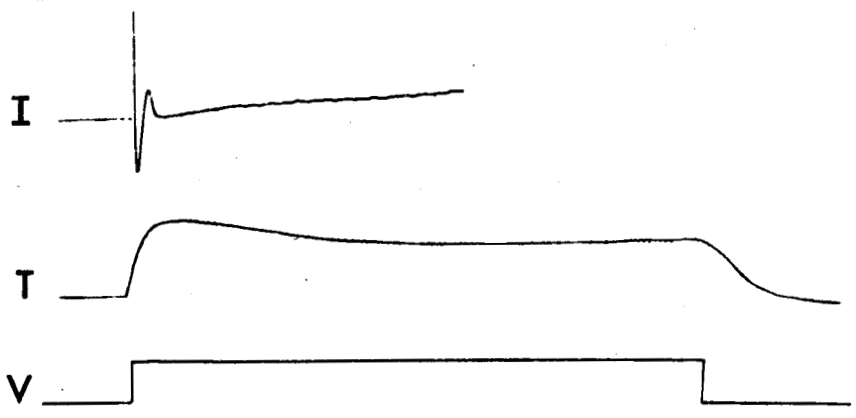


140 mV. Les tensions simultanément enregistrées sont de type tonique et ne présentent pas de pic de tension. Ceci est caractéristique des réponses mécaniques développées par les fibres passives (voir aussi Fig. 32). Notons à nouveau que le temps de mise sous tension maximale est nettement diminué lorsque l'amplitude de la dépolarisation est augmentée. En effet, le niveau stable n'est pas atteint en fin d'impulsion de 500 msec pour les dépolarisations de 20 mV et 60 mV alors que le maximum de tension est atteint en 70 msec pour la dépolarisation imposée de 140 mV. En milieu enrichi en calcium (Ca 5), quelle que soit l'amplitude de l'impulsion, la tension pour un potentiel imposé donné est augmentée alors que les courants ioniques correspondants sont inchangés. Le décours des tensions enregistrées est modifié : la mise sous tension s'effectue selon 2 phases, une initiale rapide et une tardive plus lente pour les dépolarisations imposées de 20 et 60 mV. Par contre, la tension due à la dépolarisation imposée de 140 mV présente dans ce milieu un pic de tension et sa mise sous tension maximale s'effectue plus rapidement.

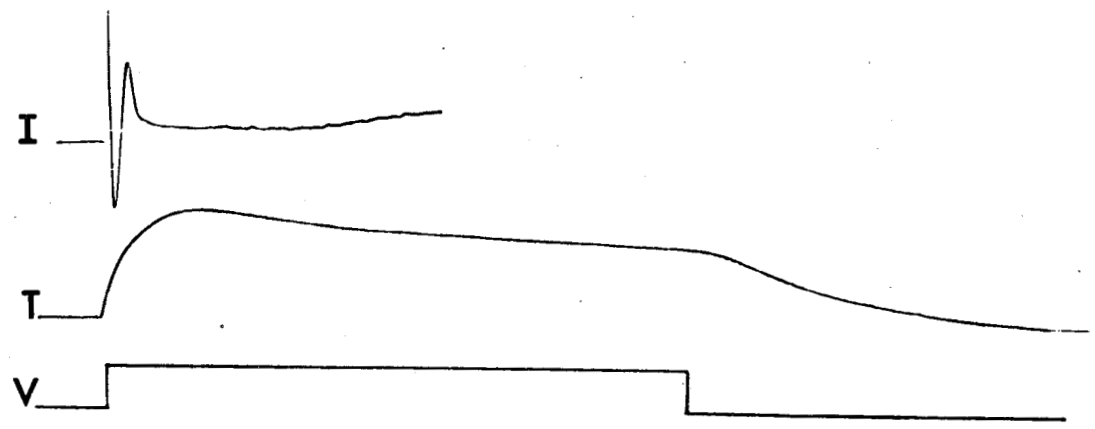
Cependant, cette composante de tension est moins sensible à la concentration calcique extracellulaire que la composante dépendante de I_{Ca} .

En effet l'expérience illustrée à la figure 34 montre l'influence de $[Ca]_e$ sur une tension due à une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 1500 msec. Nous avons comparé les pourcentages d'augmentation du pic de tension, T_1 , et de la tension en fin d'impulsion, T_2 . On peut admettre que T_1 correspond essentiellement à la composante phasique de tension puisque le temps de mise sous tension maximale, pour ce potentiel donné, de la composante tonique de tension est lent. De plus, on peut estimer que T_2 correspond à la composante tonique de tension puisque I_{Ca} est totalement inactivé en fin d'impulsion de 1500 msec. L'application du milieu riche en calcium (Ca 5) induit une augmentation par 2,6 du courant calcique. Simultanément la tension T_1 est augmentée de 45 %. Ce résultat est en accord avec l'augmentation de tension observée dans les mêmes conditions sur la composante phasique de tension (54 %). Par contre, la tension T_2 est seulement accrue de 29 %. On observe également que la constante de temps de relaxation τ_2 est nettement augmentée puisqu'elle est égale à 82 msec en Ca 1 et à 400 msec en Ca 5, ce qui confirme le ralentissement de la relaxation en milieu enrichi en calcium observé antérieurement.

Ca1



Ca5



I 0.7 μ A
T 82 mg
I 20 msec
T 200 msec

Figure 34: Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et de l'activité contractile (T) pour une dépolarisation imposée (V) de 60 mV et de durée 1500 msec.

En haut : dans une solution de concentration calcique normale (Ca 1)

En bas : dans une solution enrichie en calcium (Ca 5).



2 - Milieu appauvri en calcium.

L'influence d'un milieu appauvri en calcium (CaO) sur les courants et les tensions dus à une dépolarisation imposée de 20 mV et de durée 500 msec, est illustrée à la figure 35). Ces paramètres de stimulation ont été choisis afin de permettre le développement de la composante de tension indépendante de I_{Ca} . On observe qu'en solution ASW aucun courant n'est activé bien qu'une contraction avec mise sous tension lente se développe. L'application du milieu sans calcium induit la disparition de la tension.

3 - Milieu appauvri en sodium.

En milieu sans sodium en utilisant le chlorure de lithium (NaOL) comme substitut du chlorure de sodium, on observe également que la tension tonique due à une dépolarisation imposée de 20 mV et de durée 500 msec disparaît (Fig. 35).

Ce résultat est confirmé par la relation-tension potentiel d'une fibre passive en milieu ASW et en milieu NaO-LiCl (Fig. 36). On observe que quelle soit l'amplitude de la dépolarisation imposée, la tension est nulle.

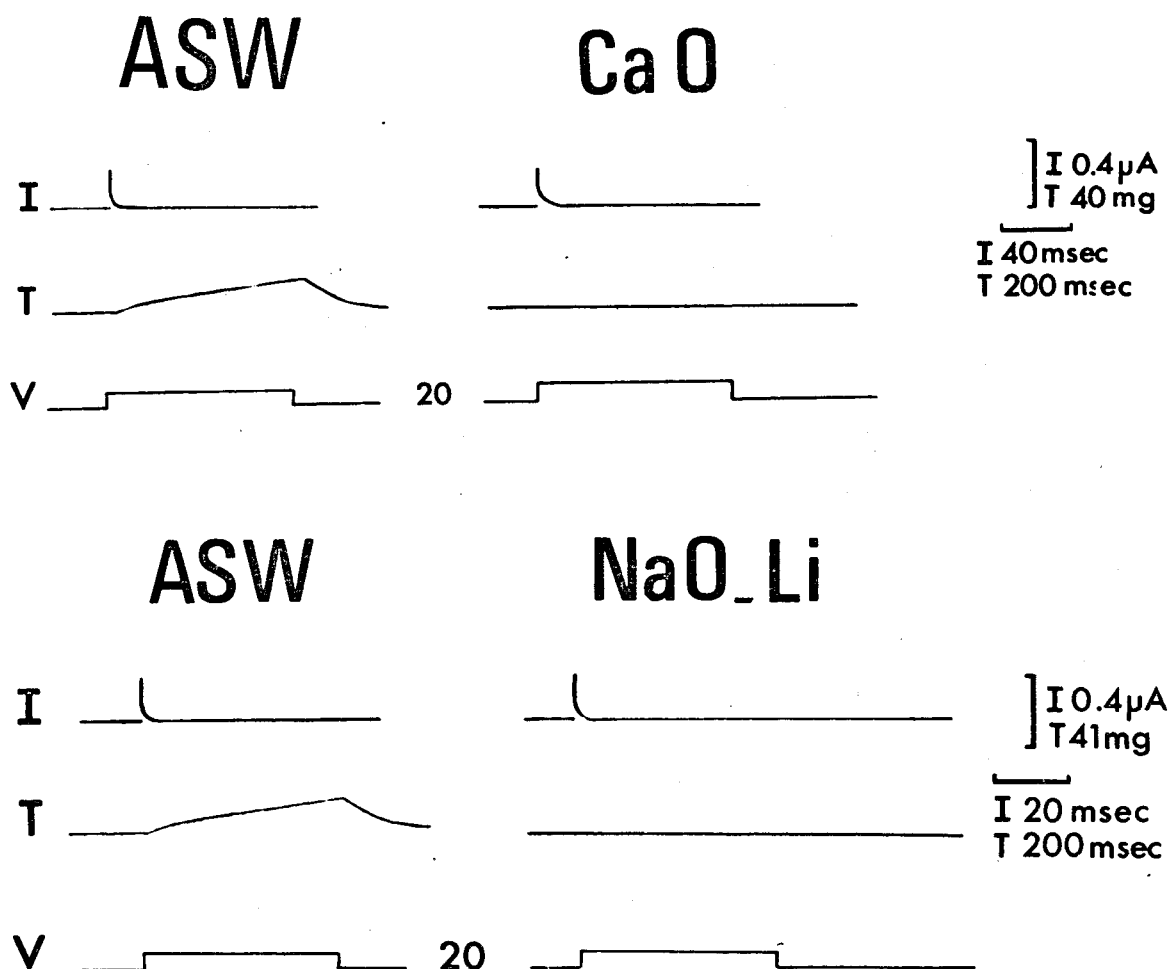


Figure 35 : Enregistrements des courants membranaires (I) et des tensions (T) dus à une dépolarisation imposée (V) de 20 mV et de durée 500 msec.

En haut : sur une fibre placée dans une solution de concentration calcique normale ASW puis dans une solution hypercalcique (Ca 5).

En bas : sur une fibre placée dans une solution d'eau de mer artificielle (ASW) puis dans une solution sans sodium (NaOLiCl).

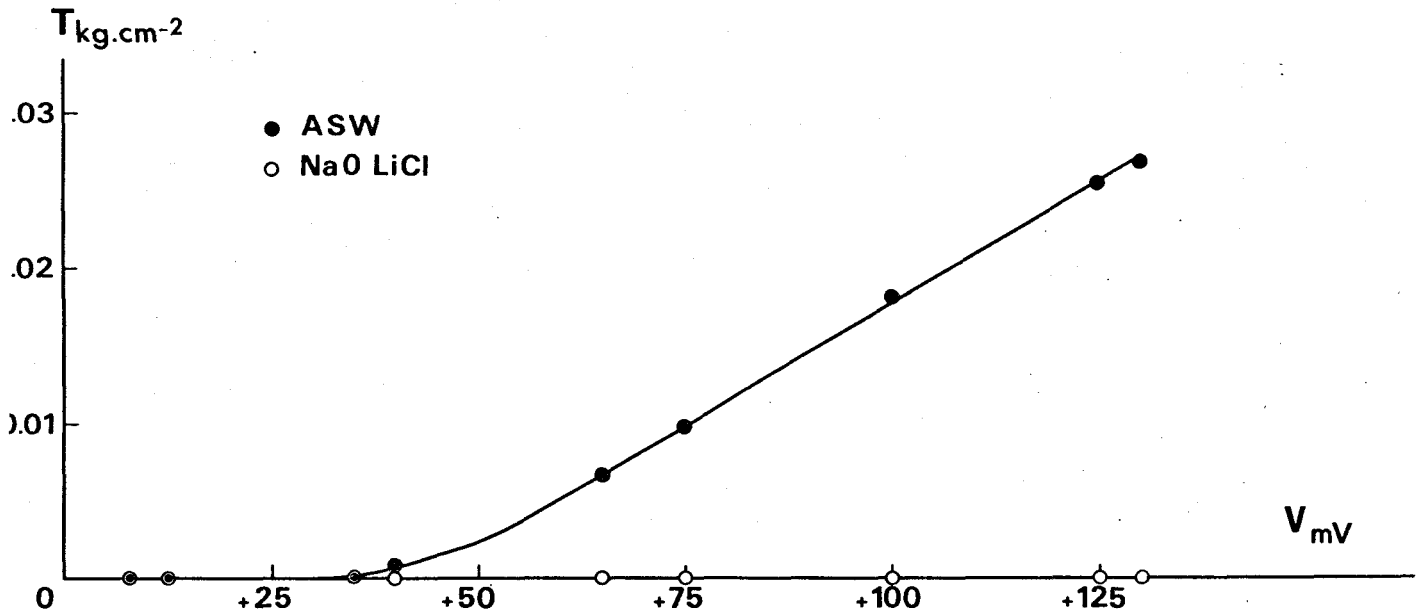


Figure 36 : Relation entre l'amplitude de l'activité mécanique d'une fibre passive et le potentiel membranaire, d'une part en solution d'eau de mer artificielle (ASW) et d'autre part en solution sans sodium (NaOLiCl) pour une durée d'impulsion de 140 msec.

Même fibre qu'à la figure 23.

III - Conclusion

Les expériences illustrées dans ce chapitre ont mis en évidence l'existence de deux composantes de tension indépendantes du courant calcique. L'étude de celle permettant d'expliquer le développement des tensions dues à des dépolarisations de faible amplitude et de longue durée et l'existence de tensions dues à des dépolarisations d'amplitude supérieure à +250 mV montre qu'elle est dépendante de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation.

De plus, les expériences en milieux ioniques modifiés ont montré que cette composante de tension est dépendante des concentrations calcique et sodique extracellulaires. Une telle dépendance vis à vis de $[Ca]_e$ et $[Na]_e$ permet d'envisager une relation entre cette seconde composante de tension et le mécanisme de Na-Ca échange décrit sur les fibres musculaires de barnacle par Russel et Blaustein (1974). Cette possibilité sera discutée ultérieurement.

Nous avons précédemment mis en évidence l'existence de deux composantes de tension dans l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe :

- une composante dépendante du courant calcique et se développant dans une gamme de potentiels compris entre + 30 mV et + 80 mV.

- une composante dépendante de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation. Elle présente la particularité de se maintenir tant que dure la dépolarisation et de se développer lentement jusqu'à son maximum.

Cependant, nous avons vu que plusieurs observations nous obligent à émettre l'hypothèse de l'existence d'une 3ème composante de tension.

D - Etude de la composante de tension indépendante
de I_{Ca} : C_3 .

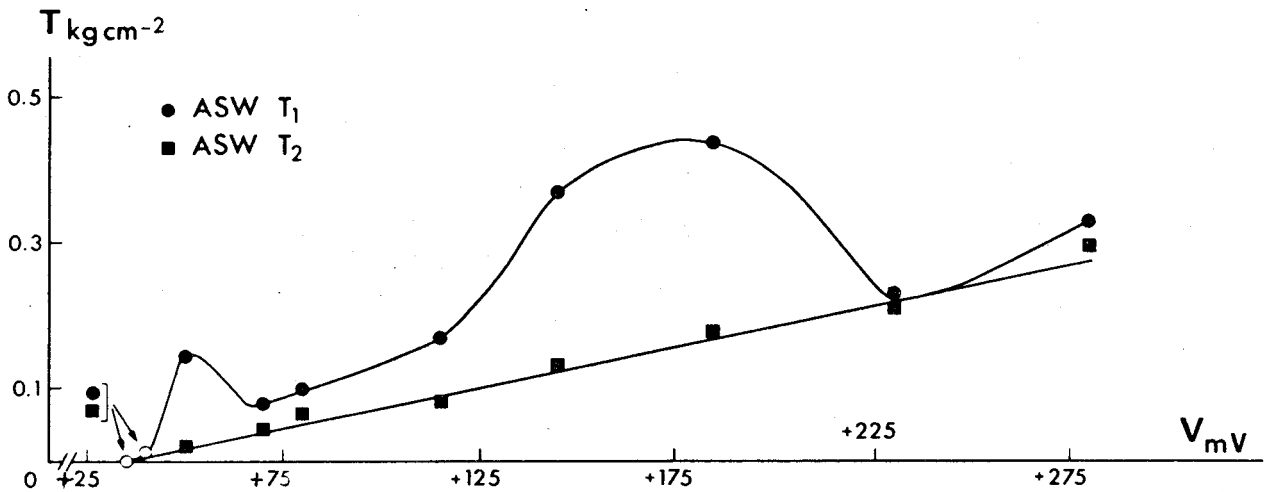
I - Mise en évidence.

Afin de mieux étudier la nature des contractions dues à des dépolarisations élevées, nous avons établi comme nous l'avions fait antérieurement (voir Fig. 13), mais sur une autre fibre, la relation entre la tension et le potentiel pour une large gamme de potentiels compris entre + 30 mV et + 300 mV et de durée 1500 msec. La figure 37 illustre la relation obtenue. Pour des dépolarisations imposées comprises entre + 30 mV et + 125 mV, la relation est de type classique (voir Fig. 13 et 15). Pour les potentiels plus élevés,

la relation est comparable à celle précédemment décrite (voir Fig. 13) : l'amplitude de la tension augmente fortement et atteint un maximum pour une valeur de dépolarisation imposée égale à 170 mV. Ensuite, elle diminue et atteint un minimum pour une valeur de dépolarisation imposée égale à + 230 mV. Pour des potentiels imposés plus élevés, la tension augmente à nouveau linéairement. Nous avons également reporté sur la figure 37 B la différence entre l'amplitude du pic de tension (T_1) et l'amplitude de la tension en fin d'impulsion (T_2) de 1500 msec de durée. S'il n'existait que deux composantes de tension, cette relation devrait illustrer la dépendance vis à vis du potentiel de la composante phasique (dépendante de I_{Ca}) puisque nous savons que T_2 traduit l'amplitude de la composante tonique C_2 . On observe effectivement une relation comparable à la relation existant entre le courant calcique et le potentiel membranaire, ceci pour des potentiels compris entre + 40 mV et + 80 mV. Cependant, pour des potentiels imposés supérieurs à + 80 mV, valeur pour laquelle le courant calcique est annulé, sur cette fibre la différence $T_1 - T_2$ n'est pas nulle et augmente pour atteindre un maximum à $V = + 170$ mV puis diminue et s'annule pour $V = + 230$ mV.

Ces résultats semblent montrer qu'une troisième composante de tension se développe pour des po-

(A)



(B)

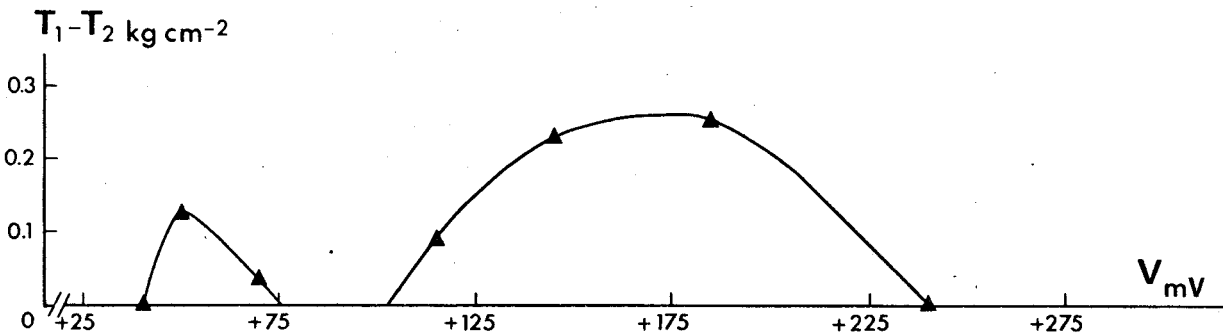


Figure 37 :

A : Relation entre l'amplitude de la tension et du courant entrant et le potentiel membranaire lors de dépolarisations imposées de 1500 msec, en eau de mer artificielle (ASW). Points (\bullet), amplitude de la tension mesurée au pic (T_1) ; carrés pleins (\blacksquare), amplitude de la tension mesurée en fin d'impulsion, (T_2).

B : triangles pleins (\blacktriangle), différence entre l'amplitude de T_1 et celle de T_2 .

EUS
MUE

tentiels imposés compris entre + 80 mV et + 230 mV (+ 70 mV et +250 mV, moyenne sur 6 fibres).

Afin de prouver l'existence de cette troisième composante de tension nous avons effectué deux types d'expériences permettant de la distinguer des deux composantes de tension mises en évidence dans ce travail.

II - Eléments de distinction entre la 3ème composante et la composante dépendante du courant calcique.

1 - Mise en évidence en inactivant le courant calcique.

Afin de tenter de permettre uniquement le développement de cette composante, nous avons effectué l'expérience suivante, illustrée à la figure 38 A.

La membrane de la fibre interrogée est amenée à un potentiel membranaire $V_m = + 150$ mV soit instantanément soit en prédépolarisant la membrane de 65 mV. L'objectif de la prédépolarisation de 65 mV est d'inactiver le courant calcique puisque l'on sait qu'il est totalement inactivé pour un niveau du potentiel égal à + 60 mV (Mounier et Vassort, 1975 a

et b). Sa durée est choisie égale à 380 msec afin de permettre à la tension phasique qui se développe simultanément de se relâcher. Dans les deux cas, l'amplitude et le décours de la tension, lorsque le potentiel membranaire est amené à + 150 mV par rapport à E_R , sont identiques. Notons également que leur décours présente toujours le pic phasique que nous avons noté précédemment. Donc, en absence de I_{Ca} il existe une tension autre que la tension tonique. Sa gamme d'apparition et sa dépendance vis à vis du potentiel a pu être établie. En effet, nous avons comme précédemment prédépolarisé la membrane de 65 mV, puis sans délai, des dépolarisations d'amplitude variable et d'une durée égale à 2000 msec sont appliquées. La relation entre l'amplitude de la tension et le potentiel de membrane est illustrée à la figure 38 B. Dans ces conditions la tension due à la seconde impulsion augmente d'amplitude si le potentiel imposé est supérieur à + 75 mV, atteint un maximum pour $V = + 160$ mV et diminue jusqu'à un minimum pour $V = + 205$ mV. Au-delà, la tension augmente à nouveau.

Figure 38 : Influence de la polarisation initiale membranaire sur l'amplitude de la tension due à des dépolarisations imposées élevées, en présence d'eau de mer artificielle (ASW).

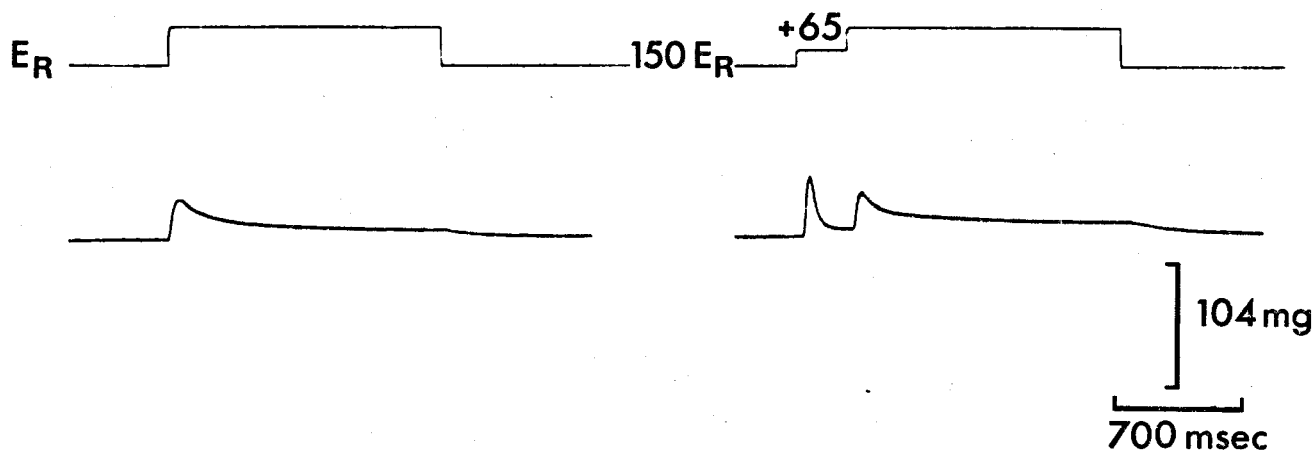
En A : tracés des tensions enregistrées (T) pour une dépolarisation membranaire de 150 mV et de durée 2000 msec.

à gauche : lorsque la polarisation initiale membranaire est la polarisation membranaire de repos (E_R).

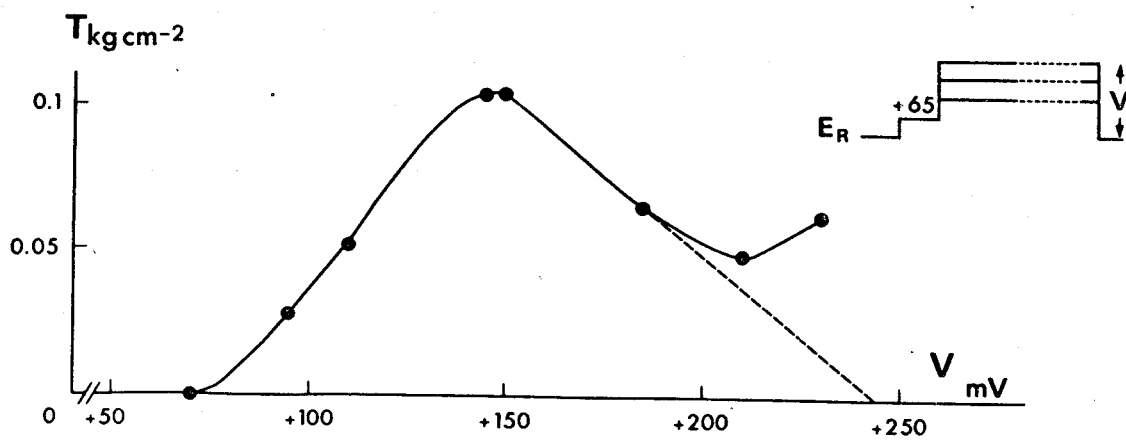
à droite : lorsque la fibre a été prédépolarisée de 65 mV pendant 380 msec.

En B : relation entre l'amplitude de la tension et le potentiel membranaire lorsque la fibre a été initialement dépolarisée de 65 mV pendant 380 msec.

(A)



(B)



PH'S
LILLE

2 - Action différentielle d'un inhibi-
teur du courant calcique : le D 600.

Dans le but de dissocier la tension due à I_{Ca} et la 3ème composante de tension, nous avons effectué des expériences sur des fibres baignant dans une solution contenant du D600, connu comme inhibiteur de la conductance calcique. L'expérience illustrée à la figure 39 montre que la tension due à une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 2000 msec disparaît après 3 minutes d'action du D600 alors que la tension due à une dépolarisation imposée de 140 mV et de même durée, bien qu'ayant beaucoup diminuée existe encore après 4 minutes d'action du D600. Cette expérience montre que la 3ème composante de tension ne peut être due au courant calcique. Nous ne pouvons pas actuellement comprendre le mode d'action du D600 sur cette 3ème composante mais ce résultat sera discuté ultérieurement.

3 - Disponibilité de la tension phasique
 C_3 en fonction de la polarisation.
initiale membranaire.

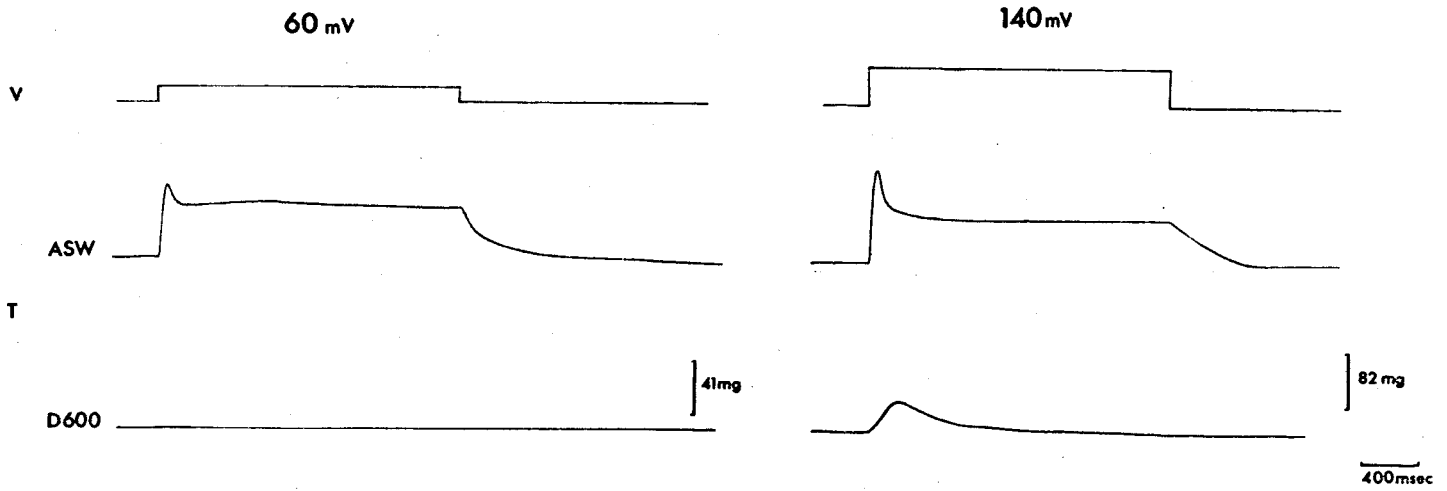


Figure 39 : Influence du D600 sur les tensions dues à une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 2000 msec (à gauche) et à une dépolarisation imposée de 140 mV de même durée.

Dans le but d'étudier la disponibilité de la tension phasique C_3 en fonction de la polarisation initiale membranaire nous avons effectué l'expérience suivante en milieu TEA. Nous avons imposé à la membrane une dépolarisation test de 170 mV et de durée 50 msec et nous avons fait varier la polarisation initiale membranaire en imposant un prépotentiel de longue durée (280 msec), d'amplitude et de sens variables. L'amplitude test de 170 mV a été choisie afin de se situer à un niveau de potentiel pour lequel C_3 est maximale. La durée de la préimpulsion a été choisie afin de permettre à la tension phasique C_1 ou C_3 se développant lors des prédépolarisations de se relâcher. L'amplitude de la tension a été mesurée au niveau de l'impulsion test pour chaque variation d'amplitude du prépotentiel. Cette amplitude exprimée par rapport à l'amplitude maximale (T/T_{\max}) a été reportée en fonction de la polarisation membranaire (Fig. 40). On observe que la tension est maximale pour une polarisation initiale comprise entre - 20 mV et + 61 mV par rapport à E_R ; elle diminue d'amplitude entre + 61 mV et + 160 mV, valeur de polarisation membranaire pour laquelle C_3 est nulle. Le rapport T/T_{\max} est égal à 0.5 pour un prépotentiel de + 112 mV. Cette expérience montre que la composante C_3 a sa propre dépendance vis à vis du

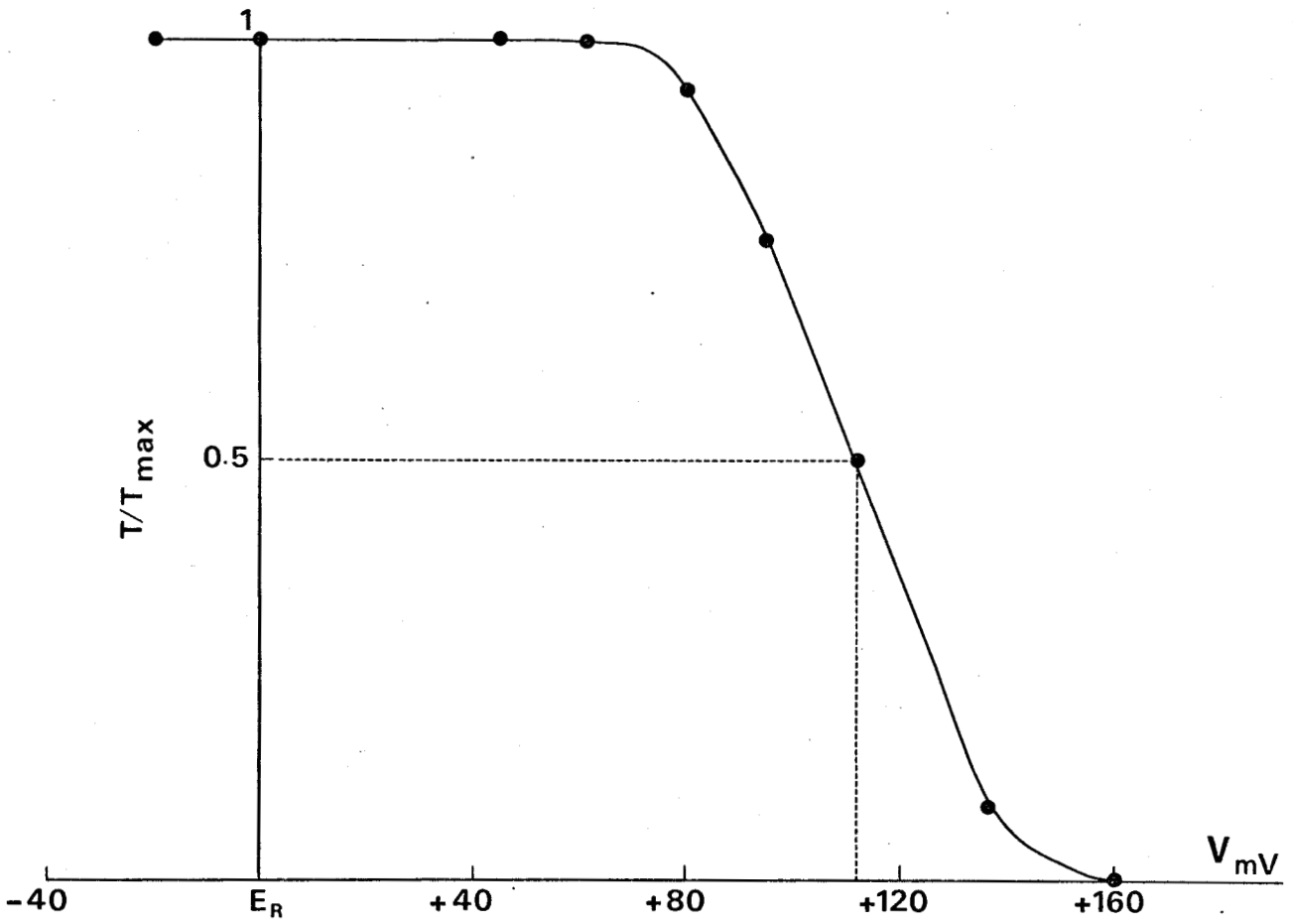


Figure 40 : Courbe traduisant la disponibilité de la tension phasique C_3 en fonction du potentiel membranaire.



potentiel. Elle n'est pas influencée par la disponibilité de la composante phasique C_1 en fonction du potentiel puisqu'on ne note pas de diminution du rapport T/T_{\max} dans la zone de potentiels où la disponibilité de C_1 diminue (+ 20 mV à + 60 mV par rapport à E_R).

Ce résultat est une autre preuve en faveur de la non identité de C_1 et de C_3 .

III - Élément de distinction entre la 3ème composante et la composante tonique de tension.

L'expérience permettant de prouver, que C_3 se distingue de la composante de tension tonique est illustrée à la figure 44. L'amplitude de la tension en début d'impulsion de 1000 msec d'une fibre baignant dans un milieu sans sodium, a été reportée en fonction du potentiel. On remarque que le seuil d'activation de la contraction coïncide avec le seuil d'activation calcique. Ceci confirme la dépendance de la composante tonique de tension vis à vis de $[Na]_e$. Pour les potentiels imposés compris entre + 25 mV et + 175 mV l'allure de la courbe est identique à

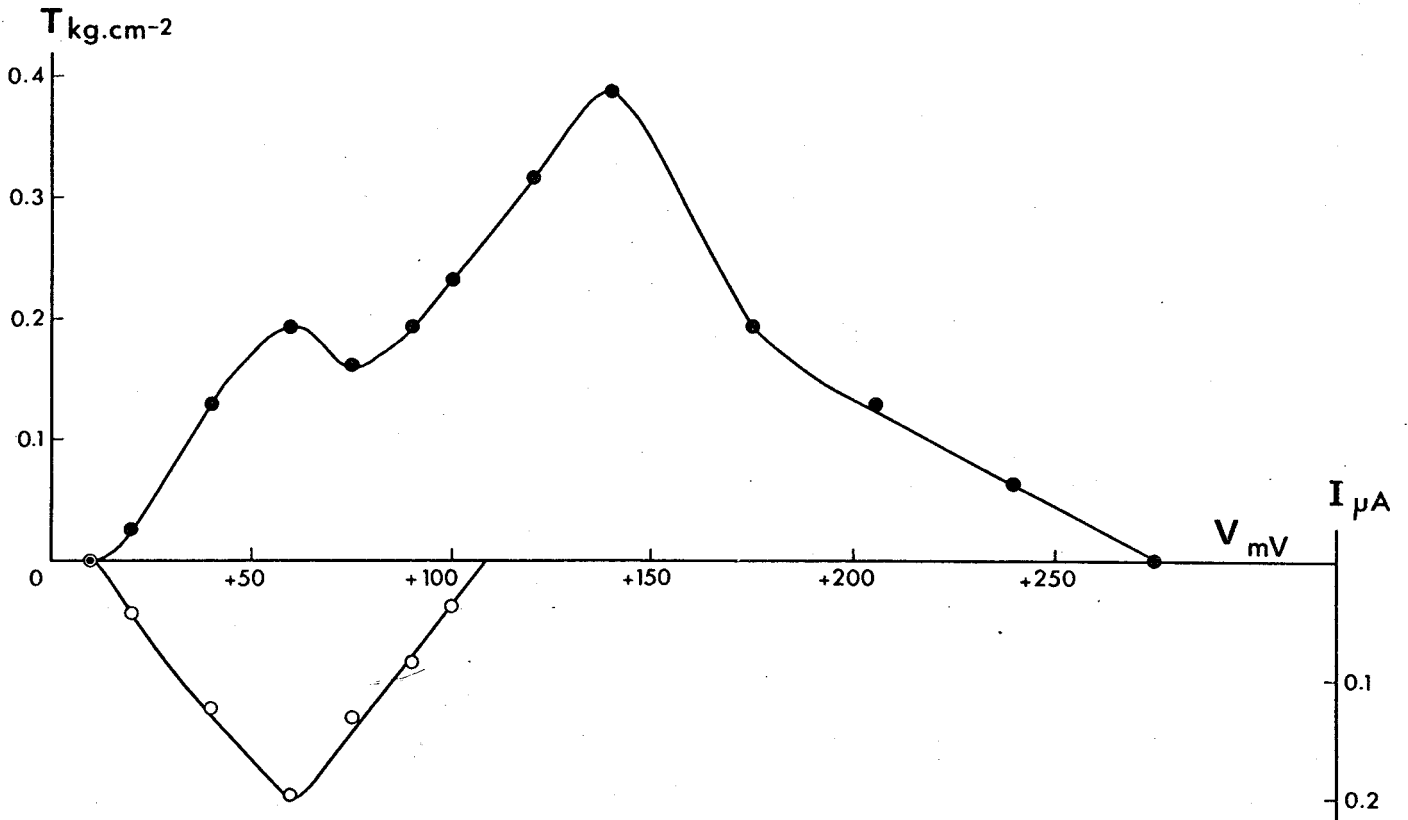


Figure 41 : Dépendance de l'amplitude de la tension et du courant entrant vis à vis du potentiel lors de dépolarisation imposées de 1000 msec en milieu pauvre en sodium (NaOLiCl).

ce que nous observions en solution ASW. Si la dépolarisation membranaire est supérieure à + 175 mV la tension diminue d'amplitude et s'annule pour $V = + 265$ mV. Donc, dans la gamme de potentiels pour lesquels nous supposons que la 3ème composante se développe, le milieu appauvri en sodium n'induit aucune modification. Cette composante est donc indépendante de $[Na]_e$ et ne peut être assimilée à la tension tonique mise en évidence précédemment.

IV - Dépendance vis à vis de la concentration calcique extracellulaire.

L'application à la membrane d'une dépolarisation imposée de 140 mV et de durée 500 msec induit, en milieu ASW ou Ca 1, une tension dont le décours présente un pic (T_1) suivi d'un niveau stable (T_2) maintenu tant que dure la dépolarisation membranaire (Fig. 42). L'enrichissement du milieu en ions calcium (Ca 5) crée une augmentation de T_2 , ce qui confirme la dépendance de la tension tonique vis à vis de $[Ca]_e$, mais aussi une augmentation du pic (Fig. 42). Or nous venons de voir que ce pic est vraisem-

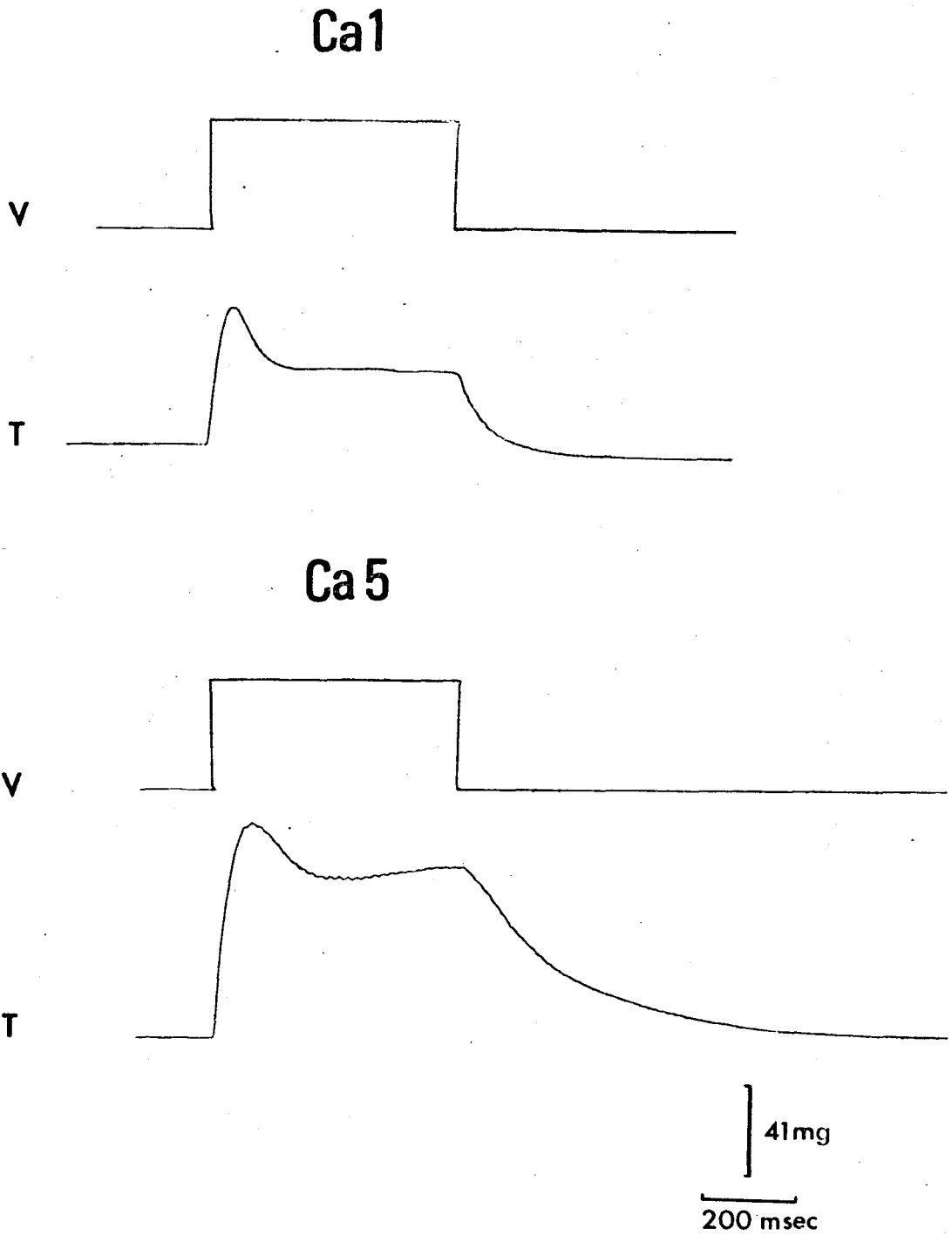


Figure 42 : Influence d'un milieu hypercalcique (Ca 5) sur la tension développée lors d'une dépolarisation imposée de 140 mV et de durée 500 msec.

En haut : enregistrement de la tension en milieu de concentration calcique normale (Ca I)

En bas : enregistrement de la tension en milieu hypercalcique (Ca 5).



blement dû à l'existence d'une 3ème composante de tension. Ce résultat montre donc que cette composante est dépendante de $[Ca]_e$.

E - Conclusion.

Nous avons dans le cadre de ce chapitre montré l'existence de deux composantes de tension indépendantes de I_{Ca} :

- l'une, fonction de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation et dépendante des concentrations extracellulaires calcique et sodique. Elle présente un temps de mise sous tension maximale élevé qui diminue lorsque la dépolarisation imposée augmente d'amplitude ; elle se maintient tant que dure la dépolarisation ; elle est de faible amplitude.

- l'autre, se développant pour des potentiels imposés compris entre + 80 mV et + 250 mV avec un maximum d'amplitude pour des dépolarisations imposées voisines de + 150 mV. Elle est dépendante de la concentration calcique extracellulaire mais indépendante de la concentration sodique extracellulaire mais in-

dépendante de la concentration sodique extracellulaire. Elle présente un temps de mise sous tension maximale court , un pic de tension individualisé , une amplitude élevée.

CHAPITRE IV

APPROCHE DU COUPLAGE

EXCITATION-CONTRACTION

Les résultats présentés ici, montrent une grande dépendance de la tension à la concentration calcique extracellulaire quel que soit le niveau du potentiel membranaire. On peut se demander cependant s'il n'existe pas de source intracellulaire du calcium activateur de la contraction comme l'ont montré Caputo et Dipolo (1978) sur les fibres musculaires de barnacle. Pour répondre à cette question, nous avons effectué des expériences en milieu procaïne 2 mM connu comme inhibiteur du largage calcique au niveau des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (Suarez-Kurtz, 1976). Cette expérience est illustrée à la figure 43 par la relation tension-potentiel et courant entrant potentiel en milieu ASW et procaïne 1 mM pour une durée de dépolarisation de 300 msec. Les dépendances de la tension et du courant calcique au potentiel de membrane en milieu ASW sont classiques (voir Fig. 13, 16, 23). En milieu procaïne, quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation imposée, la tension est nulle. Par contre, le courant calcique apparaît nettement augmenté. Notons cependant que l'augmentation apparente de I_{Ca} peut être une conséquence de l'inhibition de I_{K1} (voir encart de la Fig. 43 pour un niveau de dépolarisation égal à + 55 mV). En effet, il est généralement admis que la procaïne n'augmente pas la conductance calcique (Hagiwara et

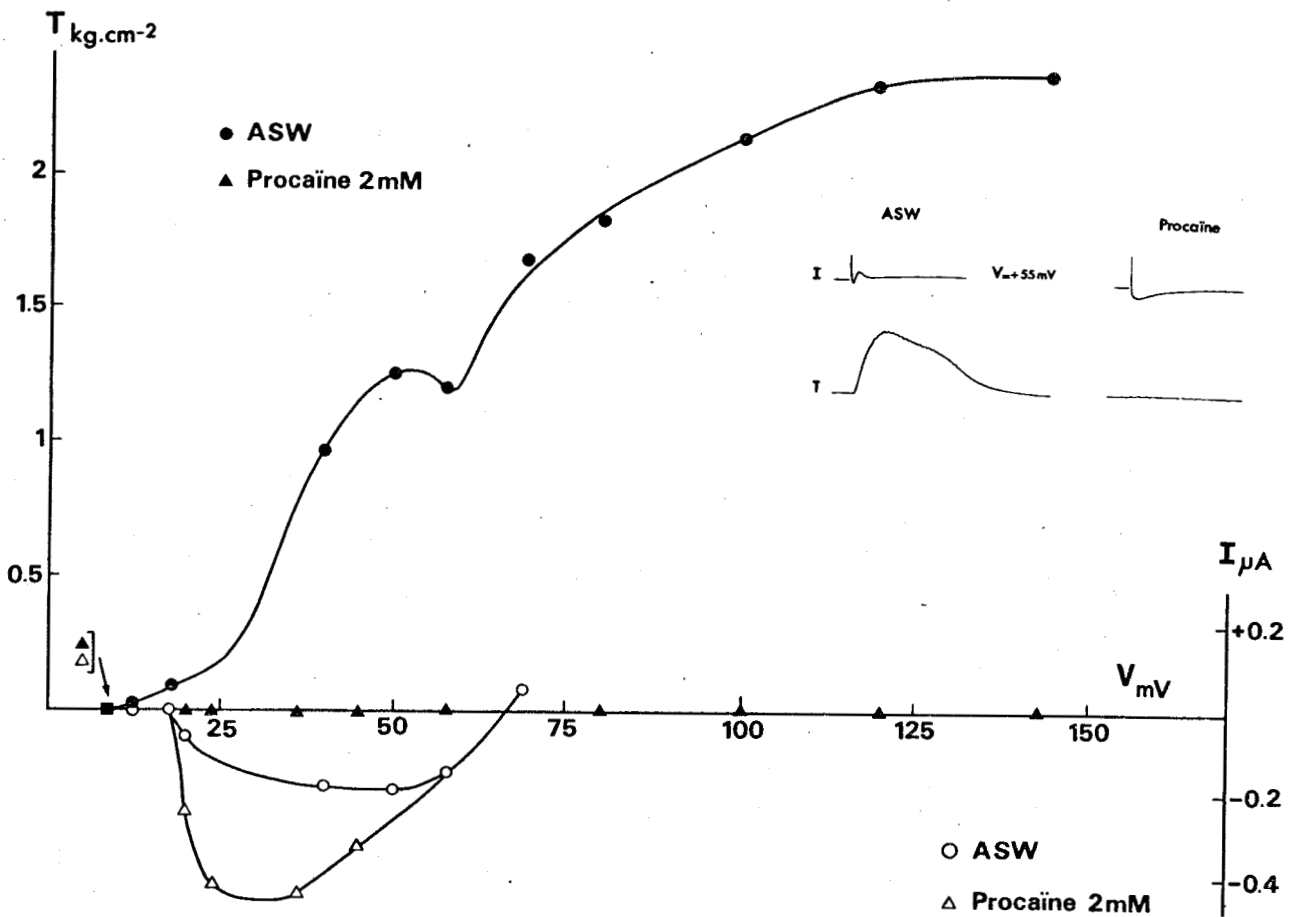


Figure 43 : Relation entre la tension et le potentiel en ASW (●) et en milieu procaine 1 mM (▲) et relation entre le courant entrant et le potentiel en ASW (○) et en milieu procaine 1 mM (△). Durée des dépolarisations imposées égale à 300 msec.

Encart : courants membranaires (I) et tension (T) pour une dépolarisation imposée de 50 mV - 300 msec ; à gauche en ASW, à droite en milieu procaine 2 mM.



coll., 1969, sur la fibre musculaire de barnacle). Le résultat présenté ici montre donc que le courant calcique seul ne permet pas le déclenchement de la contraction. De même, l'influx calcique du Na-Ca échange ne semble plus être suffisant pour permettre le déclenchement de la tension tonique. Il faut donc envisager l'existence d'une source interne du calcium activateur de la contraction.

On peut donc conclure, à la lumière de ces résultats, que le couplage excitation contraction des fibres musculaires de Crabe n'est pas direct et qu'une source interne de calcium, vraisemblablement le réticulum sarcoplasmique, doit être envisagée.

Par contre, si l'on se place dans des conditions telles que le flux entrant d'ions calcium soit augmenté (milieu enrichi en calcium, Ca 5) il est possible de déclencher des contractions en présence de procaïne mais uniquement dans la gamme de potentiels pour lesquels I_{Ca} est activé. Dans le cadre de cette expérience les fibres ont baigné en milieu procaïne Ca 5 pendant 10 minutes. Nous avons ensuite testé les courants membranaires et la réponse mécanique associée pour des dépolarisations imposées comprise entre 20 mV et 147,5 mV et de durée 500 msec. La relation liant la tension et le courant calcique au potentiel de membrane est illustrée à la figure 44. On observe que le seuil

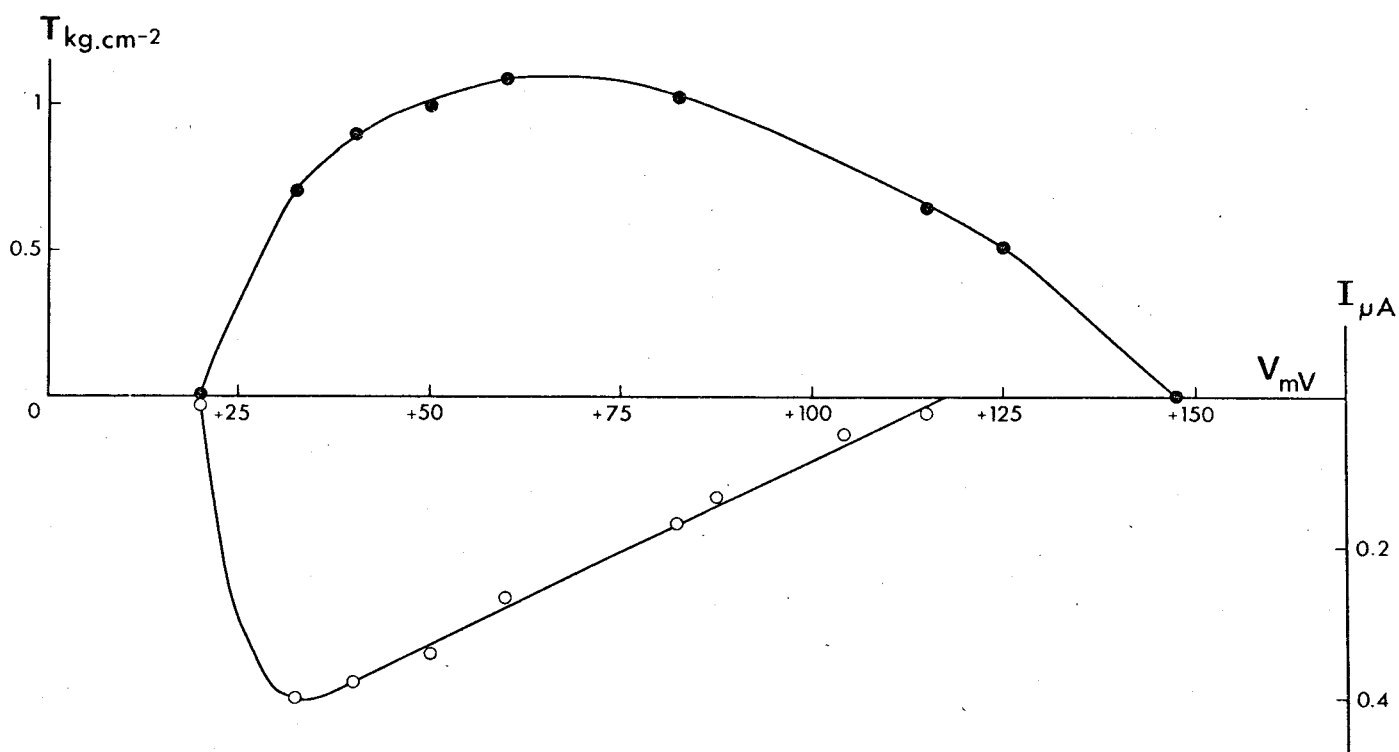


Figure 44 : Relation entre la tension et le potentiel (●) et le courant entrant et le potentiel (○) pour des dépolarisations imposées de durée 500 msec en milieu procaine Ca 5.

mécanique correspond au seuil d'activation du courant calcique et est égal à + 20 mV. Pour des dépolarisations imposées plus élevées, la tension et I_{Ca} augmentent d'amplitude. Cependant, si le courant calcique maximal se développe pour une dépolarisation imposée de + 32,5 mV, la tension est maximale pour une dépolarisation imposée de + 60 mV. Lorsque le potentiel imposé est supérieur à celui induisant le développement maximal de la tension et de I_{Ca} , ils diminuent tous les deux d'amplitude jusqu'à l'annulation. La tension s'annule pour une dépolarisation de 148 mV et le courant calcique pour une dépolarisation de 117,5 mV. Ce résultat montre donc que si la concentration calcique est augmentée par 5, la quantité d'ions Ca^{++} entrant lors de l'activation de I_{Ca} est suffisante pour déclencher des contractions de faible amplitude. Cependant, il n'y a pas un parallélisme parfait entre les deux relations ; nous en discuterons ultérieurement.

Cette expérience nous permet de mettre en évidence deux autres points importants : i) il ne semble pas que l'accroissement de $[Ca]_e$ augmente suffisamment l'influx calcique dépendant de l'efflux sodique et permette un couplage direct. En effet en milieu Ca5 procaine, la composante de tension dépendante du potentiel membranaire, de $[Ca]_e$ et de

$[Na]_e$ ne se développe pas. ii) cette expérience confirme la non identité de la composante de tension dépendante de I_{Ca} et de la 3ème composante de tension puisque cette dernière ne se développe pas en milieu Ca 5 procaïne. De plus l'origine des ions Ca^{++} permettant le développement de cette tension est probablement le réticulum sarcoplasmique.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ont permis de mettre en évidence l'existence de trois composantes de tension dans l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe, une composante de tension dépendante du courant entrant calcique (C_1), une composante de tension dont l'amplitude est fonction de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation membranaire et dépendante des concentrations calcique et sodique extracellulaires (C_2), enfin, une composante visible pour des potentiels imposés compris entre + 80 mV et + 250 mV et dépendante de la concentration calcique extracellulaire (C_3).

A - Composante de tension dépendante du courant calcique.

Les travaux effectués par la technique du potentiel imposé ont permis de montrer sur les fibres musculaires de Crustacés l'existence d'un courant entrant calcique consécutivement à une dépolarisation membranaire. L'enregistrement simultané des courants membranaires et des tensions d'une même portion de fibre nous a permis de mettre en évidence un lien étroit entre I_{Ca} et la composante phasique d'activité

mécanique. Ce résultat confirme les travaux de Suarez-Kurtz et coll. (1972) effectués sur les fibres musculaires d'écrevisse. En effet, cet auteur montre que l'activation du courant calcique est une étape essentielle dans le couplage excitation contraction. Cependant, si ce courant peut rendre compte d'une augmentation calcique interne, l'estimation de la quantité d'ions Ca^{++} entrant lors d'une dépolarisation membranaire montre que l'accroissement de la concentration calcique interne est insuffisant pour permettre le développement de la tension phasique. Les expériences que nous avons effectuées en milieu contenant de la procaine confirme ce résultat. En effet, l'inhibition par cette drogue de la libération du calcium par les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique entraîne la disparition de l'activité mécanique sans affecter le courant calcique. Ceci prouve que I_{Ca} bien qu'indispensable au développement de la tension phasique, n'est pas suffisant : le couplage électro-mécanique est donc indirect et suppose qu'un mécanisme de type "calcium induced calcium release" se produise.

Paradoxalement, Caputo et Dipolo, (1978) ont pu, dans la gamme de potentiels pour laquelle I_{Ca} est activé, mettre en évidence une tension faible sur les fibres musculaires de barnacle baignant dans une solution de procaine. On peut interpréter la dif-

férence entre notre résultat et le leur, par le fait que la $[Ca]_i$ de repos est deux fois plus élevée sur les fibres musculaires de barnacle comparativement aux fibres musculaires de crabe (Ashley et coll., 1972). L'augmentation de $[Ca]_i$ nécessaire pour atteindre la concentration calcique seuil, permettant le déclenchement de la tension (identique sur ces deux types de fibres) doit donc être moins importante ; le flux entrant d'ions Ca^{++} (I_{Ca}) permet cet accroissement, et le couplage est dans ce cas de type direct. Cette interprétation est confirmée par l'expérience que nous avons effectué en milieu contenant de la procaine et enrichi en calcium extracellulaire. En effet, la concentration calcique extracellulaire accrue permet l'augmentation du flux entrant d'ions Ca^{++} ; la valeur seuil de $[Ca]_i$ peut donc être atteinte et des tensions de faible amplitude se déclenchent.

L'enregistrement de l'activité mécanique associé à celui des courants ioniques et la mise en évidence de la composante phasique de tension dépendante de I_{Ca} nous ont apporté des informations supplémentaires concernant i) la dépendance vis à vis du potentiel du paramètre d'inactivation de la conductance calcique, f_{∞} ii) la valeur du potentiel d'équilibre pour les ions calcium.

En effet, grâce à l'étude de la disponibilité de I_{Ca} et de la tension phasique en fonction de la polarisation membranaire (voir figures 21, 23) nous avons pu mettre en évidence les deux points suivants :

- le courant calcique et le courant potassique initial passent par le même canal.
- ce canal a une sélectivité différentielle en fonction de la polarisation membranaire. Il est très sélectif pour I_{Ca} lorsque la polarisation initiale membranaire est positive par rapport à E_R ; il devient beaucoup plus sélectif pour I_{K_1} lorsque la polarisation initiale membranaire est négative par rapport à E_R .

Ces résultats sont confirmés par les expériences effectuées en milieu TEA (voir figures 25 et 26) montrant que dans les conditions où I_{K_1} est inhibé le canal devient très sélectif pour les ions Ca^{++} . Nos conclusions concernant la sélectivité du canal confirment les observations faites par Mounier (1975). En effet, d'après cet auteur, en solution physiologique normale une multiplication par 10 de la concentration extracellulaire en calcium crée une augmentation de 19 à 23 mV du potentiel d'équilibre pour les ions calcium (E_{Ca}), sur les fibres présentant le courant I_{K_1} (type II). Cette variation de E_{Ca} est très éloignée de 29 mV, valeur prévue par l'équation de Nernst.

Une si faible variation de E_{Ca} traduit une mauvaise sélectivité du canal calcique en solution ASW. Par contre, dans les conditions où I_{K_1} est de faible amplitude, c'est à dire sur les fibres de type I, ou quand I_{K_1} est inhibé c'est à dire en solution TEA, cet auteur observe une variation de E_{Ca} proche de 29 mV lors d'une multiplication par 10 de $[Ca]_e$. Lorsque I_{K_1} est inhibé, le canal devient très sélectif aux ions Ca^{++} .

La figure 44, illustrant les relations entre l'amplitude du courant entrant et le potentiel, et entre l'amplitude de la tension et le potentiel, pour une fibre baignant en milieu procaïne Ca 5, apporte une information concernant la valeur du potentiel d'équilibre pour les ions calcium. En effet, nous avons vu précédemment que dans ces conditions expérimentales, le couplage excitation-contraction est direct dans la gamme de potentiels pour laquelle I_{Ca} est activé. On doit donc observer une identité des courbes traduisant et la dépendance de I_{Ca} et la dépendance de la tension vis à vis du potentiel. Or, on remarque qu'elles ne sont pas similaires. Notamment, leur intersection avec l'axe des abscisses traduisant la valeur du potentiel d'inversion calcique, V_{Ca} se situe pour des valeurs de

potentiels différentes. Les travaux de Mounier (1975) et Mounier et Vassort (1975 a) donne, sur les fibres musculaires de crabe, une valeur de V_{Ca} égale à + 100 mV ou encore une valeur du potentiel d'équilibre pour les ions calcium, E_{Ca} , égale à + 35 mV puisque $V_{Ca} = E_{Ca} - E_R$ (E_R est le potentiel de repos et a une valeur de - 65 mV). Ces auteurs ont également montré, en milieu TEA, une bonne sélectivité du canal calcique puisque les variations de E_{Ca} en fonction de la concentration calcique extracellulaire suivent l'équation de Nernst.

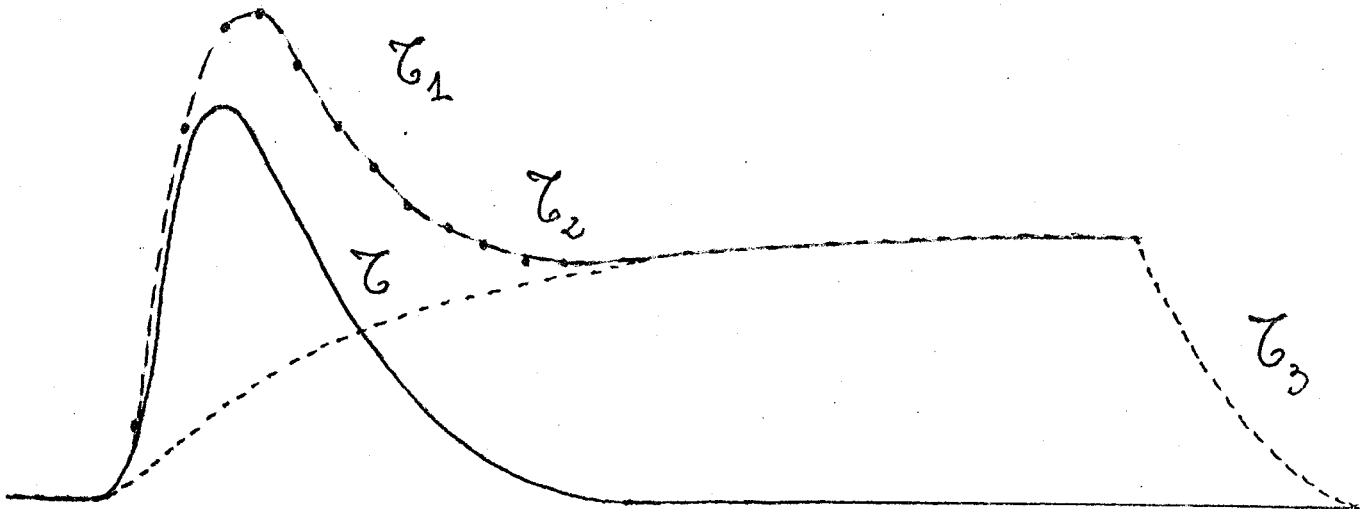
$$E_{Ca} \text{ (mV)} = 29 \log \frac{[Ca]_e}{[Ca]_i} \quad \text{à } 20^\circ\text{C.}$$

D'après cette équation, on doit donc s'attendre à ce qu'en milieu Ca 5, E_{Ca} soit égal à + 55 mV ($V_{Ca} = + 120$ mV). C'est en effet la valeur que l'on obtient sur la fibre illustrée à la figure 37 lorsque la détermination de E_{Ca} est effectuée à l'aide de la courbe courant entrant-potentiel. Cependant, Mounier (1975) et Mounier et Vassort (1975 a) discutent la valeur qu'ils donnent de E_{Ca} . En effet, ils estiment qu'elle doit être faussée puisqu'elle correspond à une $[Ca]_i$ voisine de 10^{-3} M, valeur très largement supérieure à ce qui est généralement admis (10^{-7} M).

L'hypothèse d'une accumulation locale d'ions Ca^{++} située au niveau des jonctions diadiques et évaluée à 1 ou 2 mM (Zacharovà et Zachar, 1967) a été émise afin d'expliquer la valeur basse de E_{Ca} obtenue. De plus, la valeur de E_{Ca} déterminée par Keynes et coll. (1973) sur des fibres de barnacle perfusées est très nettement supérieure puisqu'elle est égale à + 125 mV pour une $[\text{Ca}]_i$ égale à 5×10^{-7} M. On pouvait donc s'attendre à ce que la détermination de E_{Ca} par le biais de la relation tension phasique potentiel nous donne une valeur de E_{Ca} tendant à se rapprocher des valeurs généralement admises. C'est en effet le cas puisque nous observons que $E_{\text{Ca}} = + 85$ mV ($V_{\text{Ca}} = + 150$ mV) valeur comparable à celle obtenue par Henček et Zachar (1977) sur la fibre musculaire d'écrevisse non perfusée. Une telle valeur de E_{Ca} traduit une concentration calcique intracellulaire égale à $8 \cdot 10^{-5}$ M. On peut expliquer la meilleure évaluation de E_{Ca} en milieu procaïne Ca5 par la fait que dans ces conditions la libération du calcium par le RS est inhibé diminuant de ce fait la concentration en ions Ca^{++} au niveau des jonctions diadiques.

B - Composante de tension indépendante de I_{Ca} et
fonction de l'amplitude et de la durée du potentiel
imposé : C_2

Cette composante d'activité mécanique est la seule responsable des réponses enregistrées lors des dépolarisations de faible amplitude et de longue durée ou des dépolarisations supérieures à + 250 mV, lors de toutes les variations du potentiel de membrane imposées en milieu manganèse ou imposées aux fibres passives. Elle est de faible amplitude comme l'illustrent les expériences effectuées sur les fibres passives, résultat confirmé par la faible variation d'amplitude des tensions obtenues sur des fibres baignant en milieu sans sodium, inhibant C_2 . De plus, elle se développe lentement. Lors d'une dépolarisation imposée voisine de 60 mV et de longue durée, le développement rapide de la composante de tension dépendante de I_{Ca} et le développement lent de la composante de tension tonique permet d'assimiler l'amplitude du pic de tension T_1 à l'amplitude de la tension phasique (Fig. 45). De plus ce phénomène permet d'expliquer le léger allongement du temps mis pour atteindre le maximum de tension lorsque la durée de la dépolarisation imposée est accrue (Fig. 45). De même l'existence de ces deux ten-



— tension phasique
 - - - tension tonique
 - · - · résultante de la tension phasique et tonique.

Figure 45 : Schéma des tensions généralement enregistrées pour une durée de dépolarisation imposée de 5 msec et 1000 msec. Essai d'explication des différentes phases de relaxation.

sions simultanées explique le relâchement partiel de la tension suivi de son maintien à un niveau stable lorsque la durée de la dépolarisation est longue (Fig. 45).

Nous avons également montré que cette composante de tension est dépendante de la concentration sodique extracellulaire. Russell et Blaustein (1974) ont mis en évidence sur les fibres musculaires de barnacle un mécanisme d'échange Na-Ca (Na influx-Ca efflux). Sur la fibre musculaire de crabe, Vaughan-Jones (1977) a mis en évidence un efflux sodique dépendant des concentrations sodiques et calciques extracellulaires. Or, sur une structure cardiaque, Horačková et Vassort (1979) ont montré que, lors d'une dépolarisation membranaire, ce mécanisme d'échange Na-Ca est inversé (Ca influx-Na efflux) et que l'amplitude de l'influx calcique est fonction de l'amplitude de la dépolarisation. On peut donc envisager comme ces auteurs et Miller et Moisescu (1976) que le mécanisme d'échange Na-Ca (Ca influx - Na efflux) est responsable de la composante tonique de tension. Nos résultats montrent que ce mécanisme est inhibé par le manganèse. En effet l'amplitude de T_2 en fonction du potentiel illustrée à la figure ³⁴ est plus élevée que l'amplitude des tensions obtenues sur la même fibre en milieu manganèse (voir Fig. 28). Ce résultat confirme les observations de Vaughan-Jones

(1977- et Horačková et Vassort (1979).

Cette dépendance de la tension tonique au mécanisme d'échange Na-Ca permet de comprendre que nous ayons observé un déplacement du seuil d'activation de la contraction de l'ordre de 20 mV vers les hyperpolarisations lorsque le milieu est enrichi en calcium pour des dépolarisations imposées longues (résultat non illustré), puisque nous savons que seule la tension tonique est responsable des tensions observées pour les dépolarisations faibles et de longue durée. Notons tout d'abord que l'hyperpolarisation de 5 mV observée lors de l'application du milieu enrichi en ions Ca^{++} ne permet pas d'expliquer l'amplitude de l'abaissement du seuil mécanique. On peut cependant expliquer ce résultat par le fait que le mécanisme de Na-Ca échange est le résultat d'une compétition à la face externe de la membrane des ions Ca^{++} et Na^+ pour la fixation sur un transporteur R (Baker et coll., 1969 ; Glitsch et coll., 1970 ; Horačková et Vassort, 1979). Bien que cet échange soit d'après Horačková et Vassort (1979) dépendant du potentiel et fonctionne dans le sens d'un influx calcique associé à un efflux sodique lorsque la membrane est dépolarisée, on peut penser qu'en milieu riche en calcium, l'effet résultant de l'hyperpolarisation membranaire de faible amplitude et de l'augmentation de la concentration calcique externe soit

pour une dépolarisation donnée, l'apparition d'un influx calcique et donc d'une tension. Ce résultat est en désaccord avec de nombreux auteurs qui ont montré un déplacement du seuil mécanique dans le sens des dépolarisations lorsque la $[Ca]_e$ est accrue (Hagiwara et coll., 1968 ; Matsumura, 1972). Leur résultat est généralement interprété comme la conséquence d'un effet stabilisant ou encore d'une modification du champ électrique membranaire par l'apport de cations divalents. En effet, il est connu qu'une augmentation de la concentration externe des cations divalents crée un déplacement dans une direction dépolarisante des courbes traduisant l'évolution des paramètres d'activation et d'inactivation des conductances membranaires.

(Frankenhaeuser et Hodgkin, 1957 ; Hauswirth et coll., 1968 ; D'Arrigo, 1973 ; Reuter, 1973). Le paramètre, d traduisant l'activation calcique est donc nul pour des dépolarisations imposées voisines de 20 mV alors qu'il est différent de zéro en solution ASW (voir Mounier 1975 ; figure 37). Cependant, Hagiwara et coll. (1968) montrent que si l'on empêche l'effet stabilisateur de l'augmentation de $[Ca]_e$ en ajoutant à la solution du chlorure de magnésium, le seuil mécanique devient indépendant de la $[Ca]_e$.

Il faut cependant noter que bien que nous ayons enregistré des tensions pour des dépolarisations de très faibles amplitudes (+ 10 mV) lorsque la fibre

baigne en milieu Ca 5 nous avons toujours observé l'existence d'un seuil mécanique. Egalement, en milieu physiologique normal (ASW), quelle que soit la durée de la dépolarisation imposée (jusqu'à 7 secondes), il existe toujours un seuil pour l'activation de la contraction. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur les fibres musculaires d'écrevisse par Reuben et coll. (1967) qui montrent une relation continue entre l'amplitude de la tension et la dépolarisation membranaire induit par des milieux riches en potassium ou par l'application de courants sortants.

Il est intéressant de noter que cette composante seule visible sur les fibres passives a les caractéristiques mises en évidence par Atwood et Dorai Raj (1964) sur les fibres proximales du crabe, Cancer magister, et par Strickholm (1974) sur les fibres musculaires de grenouille d'hiver. L'observation de ce dernier auteur confirme nos résultats antérieurs : en effet Mounier (1975) et Goblet (1977) ont noté une variabilité de l'activité électrique membranaire en fonction des saisons. Notamment en hiver, nous avons une grande probabilité d'expérimenter des fibres passives.

C - Composante de tension indépendante de I_{Ca} : C_3

L'état actuel de nos connaissances concernant cette troisième composante de tension nous permet seulement d'avancer plusieurs hypothèses en ce qui concerne son origine et de réfuter certaines idées.

L'une des premières critiques qui peut être avancée, concerne la chute de l'amplitude de la tension observée pour des potentiels imposés supérieurs à + 150 mV. En effet, on peut penser que l'application de dépolarisations aussi élevées détruit la membrane et entraîne une diminution progressive de la tension due à la destruction de la cellule. Cependant, cette idée ne peut être retenue pour deux raisons : d'une part la tension augmente à nouveau pour des potentiels très élevés, d'autre part notre protocole expérimental est tel que nous avons imposé à la membrane alternativement un potentiel d'amplitude élevé et un potentiel d'amplitude situé dans la gamme 40 - 80 mV. De plus, à intervalle régulier l'amplitude de tension due à une dépolarisation de 60 mV a été testée (voir matériel et méthodes).

Cette composante de tension pourrait être due à l'échange Na-Ca qui présenterait une dépendance différentielle au potentiel de membrane. Cette interprétation est peu probable puisque nous avons vu que cette composante ne disparaît pas en milieu pauvre en

sodium contrairement à la composante C_2 .

Cette troisième composante de tension résulterait-elle de l'existence d'un courant tubulaire ? La propagation du signal électrique membranaire prenant la forme d'un potentiel d'action est d'après les auteurs, soit une simple conduction impliquant une diminution de l'amplitude du signal électrique issu de la surface membranaire (Adrian et coll., 1969), soit un processus régénératif (Costantin, 1971 ; Strickholm, 1974). Si l'on admet que le processus est régénératif, on peut envisager l'existence au niveau de la membrane tubulaire d'un potentiel d'action ayant une amplitude proche de + 250 mV, valeur pour laquelle la composante de tension C_3 s'annule. Sa nature serait calcique puisque la composante C_3 est dépendante de $[Ca]_e$. Cette hypothèse implique que la membrane tubulaire ait un gradient calcique différent du gradient calcique de la membrane de surface puisque son potentiel d'équilibre pour les ions calcium, E'_{Ca} serait égal à + 185 mV alors que l'on sait que $E_{Ca} = + 35$ mV. L'étude théorique d'Eisenberg et Costantin (1971) a montré qu'il devait exister, lors d'une dépolarisation, un courant net entrant au niveau de la membrane tubulaire. Leur étude est basée sur l'observation selon laquelle la dépolarisation des tubules localisés axialement est plus positive que la dépolarisation des tubules situés près de la surface membranaire

(Costantin, 1970, sur la fibre musculaire de grenouille). De même, Caillé et coll. (1978) ont mis en évidence sur la même structure contractile un courant entrant sodique lent se situant au niveau des tubules. Cependant il présente le même seuil d'activation et le même potentiel d'inversion que le courant sodique rapide.

Enfin, Brûlé et coll. (1977) ont montré sur les fibres musculaires de Crabe, l'existence de deux courants entrants : l'un précoce ayant un seuil d'activation égal à + 30 mV, l'autre tardif avec un seuil d'activation égal à + 50 mV. Cependant deux zones distinctes d'activation n'ont pas été mentionnées.

On devrait donc, dans les conditions de potentiel imposé enregistrer un courant entrant calcique qui s'active, est maximum pour 150 mV et s'annule pour un potentiel d'inversion calcique égal à 250 mV. Or, dans nos conditions expérimentales actuelles, nous ne décelons pas l'existence d'un tel courant, même en présence de TEA.

Cette composante de tension est-elle une conséquence de la stimulation du réticulum sarcoplasmique par des potentiels imposés élevés ?

On sait d'après les travaux de Vergara et

coll. (1978) effectués sur le muscle squelettique de grenouille qu'une dépolarisation membranaire imposée à la membrane induit une variation du signal fluorescent dû au bleu Nil, traduisant la dépolarisation de la membrane du réticulum sarcoplasmique. La courbe traduisant la dépendance vis à vis du potentiel membranaire de l'amplitude de l'émission fluorescente a une allure sigmoïde. Le seuil d'émission se situe pour une valeur de potentiel de membrane de - 75 mV et l'émission est maximale pour une valeur de potentiel égale à + 25 mV. Cette relation ressemble à la dépendance vis à vis du potentiel du courant créé par le mouvement de groupes chargés associé au couplage excitation-contraction (Schneider et Chandler, 1973 ; Adrian et Almers, 1976).

On peut donc penser que la 3ème composante de tension est une conséquence de la dépolarisation de la membrane du réticulum sarcoplasmique et de la libération calcique induite. Le décours phasique de C_3 n'est pas contradictoire avec cette hypothèse puisque Vergara et coll. (1978) ont montré que le signal fluorescent (c'est-à-dire la dépolarisation de la membrane du SR) n'est pas maintenu quand la dépolarisation imposée dure et est supérieure à + 90 mV. La courbe reliant l'amplitude de la tension au potentiel imposé ($V < + 150$ mV), obtenue dans le

cadre de ce travail, serait dans ces conditions la résultante de la relation sigmoïde traduisant la dépolarisation de la membrane du S.R. ayant un seuil voisin de + 30 mV sur laquelle se superpose la tension phasique se développant dans la gamme de potentiels pour lesquels I_{Ca} est activé ainsi que la tension tonique due au Na-Ca échange et visible pour les dépolarisations très faibles et de longue durée et très élevés.

Cependant, cette explication ne peut être totalement acceptée car l'amplitude de la tension diminue pour des potentiels supérieurs à + 150 mV au lieu de se maintenir au niveau maximum comme la relation sigmoïde de Vergara et coll. (1973).

La mise en évidence dans notre travail en plus de la composante dépendante de I_{Ca} , des deux autres composantes de tension indépendantes de I_{Ca} mais cependant fonction de la concentration calcique extracellulaire permet de concilier les observations antérieures de divers auteurs. En effet, de nombreux auteurs, sur les fibres de Crustacés, observaient des tensions qui ne pouvaient être associées au développement du courant calcique: , la diminution du seuil mécanique lorsque la dépolarisation est

allongée ainsi que le développement de tensions amples pour des dépolarisations supérieures au potentiel d'inversion calcique ont été largement observés (Orkand, 1962 ; Edwards et coll., 1964 ; Düdel et coll., 1968 ; Gainer, 1968 ; Hagiwara et coll., 1968) mais jamais interprétés. La mise en évidence dans ce travail de deux composantes de tension dépendantes de la concentration calcique extracellulaire (C_2 et C_3) en plus de la composante dépendante de I_{Ca} permet de concilier ces observations avec la mise en évidence du rôle essentiel joué par le calcium externe dans le couplage excitation-contraction (Suarez-Kurtz et coll., 1972) interprété alors de façon restrictive comme le rôle essentiel du courant calcique, I_{Ca} , uniquement.

BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1976)

Charge movement in the membrane of striated muscle.

J. Physiol., Londres, 254, 339-360.

ADRIAN, R.H., COSTANTIN, L.L. & PEACHEY, L.D. (1969).

Radial spread of contraction in frog muscle fibers.

J. Physiol., Londres, 204, 231-257.

ARMSTRONG, C.M., BEZANNILLA, F.M. & HOROWICZ, P. (1972)

Twitches in the presence of ethylene glycol bis (-aminoethyl ether)- N,N'- tetraacetic acid.

Biochim. biophys. Acta, 267, 605-608.

ASHLEY, C.C. & RIDGWAY, E.B. (1970)

On the relationship between membrane potential calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres.

J. Physiol., Londres, 209, 105-130.

ASHLEY, 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.

ATWATER, I., ROJAS, E. & VERGARA, J. (1974)

Calcium influxes and tension development in perfused single barnacle muscle fibres under membrane potential control.

J. Physiol., Londres, 243, 523-551.

ATWOOD, H.L. (1965)

Excitation and inhibition in crab muscle.
Comp. Biochem. Physiol., 16, 409-426.

ATWOOD, H.L. & DORAI RAJ, B.S. (1964)

Tension development and membrane responses in
phasic and tonic muscle fibers of a crab.
J. cell and 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., BLAUSTEIN, N.P., HODGKIN, A.L. &
STEINHARDT, R.A. (1969)

The influence of calcium on sodium efflux in
squid axons.
J. Physiol., Londres, 200, 431-458.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 a)

A large birefringence signal preceding contrac-
tion in single twitch fibres of the frog.
J. Physiol., Londres, 264, 141-162.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 b)

The optical properties of birefringence signals
from single muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 264, 163-198.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 c)

Birefringence signals from surface and T-system
membranes of frog single muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 264, 199-213.

- BEATY, G.N. & STEFANI, E. (1976)
Inward calcium current in twitch muscle fibres
of the frog.
J. Physiol., 260, 27 p.
- BEELER, G.W. & REUTER, H. (1970 a)
Membrane calcium current in ventricular myo-
cardial fibres.
J. Physiol., Londres, 207, 191-210.
- BEELER, G.W. & REUTER, H. (1970 b)
The relation between membrane potential, membra-
ne currents and activation of contraction in
ventricular myocardial fibres.
J. Physiol., Londres, 207, 211-229.
- BEZANILLA, F. & HOROWICZ, P. (1975)
Fluorescence intensity changes associated with
contractile activation in frog muscle stained
with Nile blue A.
J. Physiol., Londres, 246, 709-735.
- BIANCHI, C.P. (1968)
Pharmacological actions on excitation contrac-
tion coupling in striated muscle.
Fed. Proc., 27, 126-131.
- BIANCHI, C.P. (1969)
Pharmacology of excitation-contraction coupling
in muscle.
Fed. Proc., 28, 1624-1627.
- BIANCHI, C.P. & SHANES, M. (1959)
Calcium influx in skeletal muscle at rest,
during activity and during potassium contracture.
J. gen. Physiol., 42, 803-815.

- BIANCHI, C.P. & BOLTON, T.C. (1966)
Effect of thiocyanate on radiocalcium uptake during potassium contracture of frog sartorius muscle.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 151, 456-463.
- BIANCHI, C.P. & BOLTON, T.C. (1967)
Action of local anesthetics on coupling systems in muscle.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 157, 388-405.
- BIRKS, R.I. (1965)
The sarcoplasmic reticulum of twitch fibres in the frog sartorius muscle.
In Muscle, ed. PAUL, W.W., DANIEL, E.E., KAY, C.M. & MONCKTON, G., pp. 199-216. Oxford : Pergamon.
- BIRKS, R.I. & DAVEY, D.F. (1969)
Osmotic responses demonstrating the extracellular character of the sarcoplasmic reticulum.
J. Physiol., Londres, 202, 171-188.
- BLAUSTEIN, M.P. & RUSSELL, J.M. (1975)
Na-Ca exchange and Ca-Ca exchange in internally dialyzed squid giant axons.
J. Membrane Biol., 22, 285-312.
- BRANDT, P.W., REUBEN, J.P. & GRUNDFEST, H. (1972)
Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. II Role of calcium.
J. gen. Physiol., 59, 305-317.
- BRÛLE, G., GUILBAULT, P. & HAUDECOEUR, G. (1977)
Existence of two components of dynamic inward current in the crab skeletal muscle fibre.
Proceedings of the international union of physiological Sciences, XXVIIth international congress, Paris.

- CAILLE, J., ILDEFONSE, M. & ROUGIER, O. (1978).
Existence of a sodium current in the tubular membrane of frog twitch muscle fibre ; its possible role in the activation of contraction. *Pflügers Arch.*, 374, 167-177.
- CALDWELL, P.C. & WALSTER, G.E. (1963)
Studies on the microinjection of various substances into crab muscle fibers.
J. Physiol., Londres, 169, 353-372.
- CAPUTO, C. (1978)
Excitation and contraction processes in muscle.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 63-83.
- CAPUTO, C. & DIPOLO, R. (1978)
Contractile activation phenomena in voltage-clamped barnacle muscle fiber.
J. gen. Physiol., 71, 467-488.
- CHAPMAN, R.A. & OCHI, R. (1972)
The effects of manganese ions on the contractile responses of isolated frog atrial trabeculae.
J. Physiol., 222, 56-58 P.
- CHIARANDINI, D.J. & STEFANI, E. (1973)
Effects of manganese on the electrical and mechanical properties of frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol., Londres, 232, 129-147.
- COSTANTIN, L.L. (1970)
The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers.
J. gen. Physiol., 55, 703-715.

COSTANTIN, L.L., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PODOLSKY, R.
(1964)

Localization of calcium accumulating structures
in striated muscle fibers.

Science, 147, 158-159.

COSTANTIN, L.L. & PODOLSKY, R.J. (1966)

Evidence for depolarization of the internal
membrane system inactivation of frog semiten-
dinous muscle.

Nature, 210, 483-486.

COSTANTIN, L.L. & PODOLSKY, R.J. (1967)

Depolarization of the internal membrane system
in the activation of frog skeletal muscle.

J. gen. Physiol., 50, 1101-1124.

D'ARRIGO, J.S. (1973)

Possible screening of surface charges on crayfish
axons by polyvalent metal ions.

J. Physiol., Londres, 231, 117-128.

DÜDEL, J., MORAD, M. & RÜDEL, R. (1968)

Contractions of single crayfish muscle fibers
induced by controlled changes of membrane poten-
tial.

Pflügers Arch., 299, 38-51.

EDWARDS, C., CHICHIBU, S. & HAGIWARA, S. (1964)

Relation between membrane potential changes
and tension in barnacle muscle fibers.

J. gen. Physiol., 48, 225-234.

- ENDO, M. (1972)
Stretch-induced increase in activation of skinned muscle fibres by calcium.
Nature New Biol., 237, 211-213.
- ENDO, M. (1975 a)
Conditions required for calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.
Proc. Japan Acad., 51, 467-472.
- ENDO, M. (1975 b)
Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.
Proc. Japan Acad., 51, 479-484.
- ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970)
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres.
Nature, 228, 34-36.
- ENDO, M. & NAKAJIMA, Y. (1973)
Release of calcium induced by "depolarization" of the sarcoplasmic reticulum.
Nature New Biol., 246, 216-218.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. (1975)
Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.
J. Physiol., Londres, 249, 469-495.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. (1977 a)
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.
Circulat. Res., 40, 119-129.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1977 b)

Variations of the membrane potential of the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle detected with a potential sensitive dye.

J. gen. Physiol., 70, 6 a.

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

The electrical properties of crustacean muscle fibres.

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

FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1968)

Force development and calcium movements in skinned muscle fibers.

Fed. Proc., 27, 375.

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.

FRANK, G.B. (1960)

Effects of changes in extracellular calcium concentration on the potassium-induced contraction of frog's skeletal muscle.

J. Physiol., Londres, 151, 518-538.

FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A.L. (1957)

The action of calcium on the electrical properties of squid axons.

J. Physiol., Londres, 137, 213-244.

GAINER, H. (1968)

The role of calcium in excitation-contraction coupling of lobster muscle.
J. gen. Physiol., 52, 88-110.

GALVANI, L. (1791)

Le viribus electricitatis in motu musculari commentarius.
Istituto scienze orti liberali Bologna, 7, 363-418.

GIBBONS, W.R. & FOZZARD, H.A. (1971)

Voltage dependence and time dependence of contraction in sheep cardiac Purkinje fibers.
Circulat. Res., 28, 446-460.

GIBBONS, W.R. & FOZZARD, H.A. (1975)

Slow inward current and contraction of sheep cardiac Purkinje fibers.
J. gen. Physiol., 65, 367-384.

GILLIS, J.M. (1967)

Contraction of isolated crab myofibrils by local application of calcium ions.
J. Physiol., Londres, 191, 103 P - 104 P.

GLITSCH, H.G., REUTER, H. & SCHOLZ, H. (1970)

The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles.
J. Physiol., Londres, 209, 25-43.

GOBLET, C. (1977)

Régulation de l'activité électrique des fibres musculaires de crabe par le calcium intracellulaire libre : contrôle par la ryanodine.
Diplôme d'études approfondies, Lille.

GODT, R.E. (1974)

Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration.

J. gen. Physiol., 63, 722-739.

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. & 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)

Effects of the intracellular calcium ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle.

J. gen. Physiol., 49, 807-818.

HAGIWARA, S., TAKAHASHI, K. & JUNGE, D. (1968)

Excitation-contraction coupling in a barnacle muscle fiber as examined with voltage-clamp technique.

J. gen. Physiol., 51, 157-175.

HAUSWIRTH, O., NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1968)

Adrenaline : mechanism of action on the pacemaker potential in cardiac Purkinje fibers.

Science, 162, 916-917.

HEILBRUNN, L.V. & WIERCINSKI, F.J. (1947)

The action of various cations on muscle protoplasm.

J. Cell. Comp. Physiol., 29, 15-32.

HENČEK, M. & ZACHAR, J. (1977)

Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish.

J. Physiol., Londres, 268, 51-71.

HIDALGO, J., LUXORO, M. & ROJAS, E. (1979)

On the role of extracellular calcium in triggering contraction in muscle fibres from barnacle under membrane potential control.

J. Physiol., Londres, 288, 313-330.

HORAČKOVA, M. & VASSORT, G. (1976)

Regulation of tonic tension in frog atrial muscle by voltage-dependent Na-Ca exchange.

J. Physiol., Londres, 258, 77-78 P.

HORAČKOVA, M. & VASSORT, G. (1979)

Na-Ca exchange in regulation of Cardiac contractility : evidence for electrogenic, voltage-dependent mechanism.

J. gen. Physiol., 73, 403-424.

HUXLEY, A.F. & STRAUB, R.W. (1958)

Local activation and interfibrillar structures in striated muscle.

J. Physiol., 143, 40-41 P.

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

Local activation of striated muscle fibres.

J. Physiol., 144, 426-441.

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.

KILB, H. & STÄMPFLI, R. (1955)

Ein Viel weghahn zur raschen Umschaltung auf
Verschiedene Durchströmungs flügssigkeiten
Helv. Physiol. Acta, 13, 191-194.

KISS, T. (1977)

Electrical properties of the cardiac muscle cell membrane and its role in the excitation-contraction coupling.

Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.,
12, 291-302.

KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H. & FLECKENSTEIN, A.
(1973)

Selective inhibition of the transmembrane Ca conductivity of mammalian myocardial fibres by Ni, Lo and Mn ions.

Pflügers Arch., 338, 115-123.

LANGER, G.A. (1968)

Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.

Physiol. Rev., 48, 708-757.

MASCHER, D. & PEPPER, K. (1969)

Two components of inward current in myocardial muscle fibers.

Pflügers Arch., 307, 190-203.

MATSUMURA, M. (1972)

The effects of metal ions and caffeine on electromechanical coupling in crayfish muscle fibers.

Jap. J. Physiol., 22, 71-85.

MILLER, D.J. & MOISESCU, D.G. (1976)

The effects of very low external calcium and sodium concentrations on cardiac contractile strength and calcium-sodium antagonism.

J. Physiol., 259, 283-308.

MOUNIER, Y. (1970)

Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe.

Thèse de 3ème cycle, Lille.

MOUNIER, Y. (1975)

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

Thèse d'état, Lille.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1973)

Analyse en potentiel imposé des courants membranaires de la fibre musculaire de crabe.

C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 276, 173-176.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975 a)

Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions. *J. Physiol., Londres*, 251, 589-608.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975 b)

Evidence for a transient potassium membrane current dependent on calcium influx in crab muscle fibre.

J. Physiol., Londres, 251, 609-625.

NAYLER, W.G. (1967)

Calcium exchange in cardiac muscle : a basic mechanism of drug action.

Am. Heart J., 73, 379-394.

NIEDERGERKE, R. (1955)

Local muscular shortening by intracellularly applied calcium.

J. Physiol., Londres, 128, 12-13 P.

OCHI, R. (1970)

The slow inward current and the action of manganese ions in guinea-pig's myocardium.

Pflügers Arch., 316, 81-94.

ORKAND, R.D. (1962)

The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres.

J. Physiol., Londres, 161, 143-159.

PAGE, E. & GROSS-PAGE, E. (1968)

Distribution of ions and water between tissue compartments in the perfused left ventricle of the rat heart.

Circulation Res., 22, 435-446.

- PEACHEY, L.D. & HUXLEY, A.F. (1964)
Transverse tubules in crab muscle.
J. Cell. Biol., 23, 2, 70 A.
- PODOLSKY, R.J. & COSTANTIN, L.L. (1964)
Regulation by calcium of the contraction and relaxation of muscle fibers.
Fed. Proc., 23, 933-939.
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. & RUEGG, 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.
Biochem. Biophys. Acta, 79, 581-591.
- REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, H. & GRUNDFEST, H. (1963)
Excitation-contraction coupling in crayfish.
Am. Zoologist, 7, 623-645.
- REUTER, H. (1973)
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Progr. Biophys. molec. Biol., 26, 1-43.
- REUTER, H. & SEITZ, N. (1968)
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol., Londres, 4, 29-42.
- 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, F., GARGOUIL, Y.
& CORABOEUF, E. (1969)

Existence and role of a slow inward current
during the frog atrial action potential.
Pflügers Arch., 308, 91-110.

ROUGIER, O., VASSORT, G. & STÄMPFLI, R. (1968)
Voltage clamp experiments on frog atrial heart
muscle fibres with the sucrose gap technique.
Pflügers Arch., 301, 91-108.

RUSSELL, J.M. & BLAUSTEIN, M.P. (1974)
Calcium efflux from barnacle muscle fibers.
Dependence on external cations.
J. gen. Physiol., 63, 144-167.

RIDGWAY, E.B. & ASHLEY, C.C. (1967)
Calcium transients in single muscle fibers.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 229-234.

SANDOW, A., KRISHNA, M., PAGALA, D. & SPICAS, E.C.
(1975)
Excitation-contraction coupling : effects of
"zero"-Ca²⁺ medium.
Biochim. biophys. Acta, 404, 157-163.

SANCHEZ, J.A. & STEFANI, E. (1978)
Inward calcium current in twitch muscle fibres
of the frog.
J. Physiol., Londres, 283, 197-209.

SANDOW, A. (1970)
Skeletal muscle.
Annual review of physiology, 32, 87-138.

SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973)

Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling.

Nature, 242, 244-246.

SELVERSTON, A. (1967)

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

Am. Zoologist, 7, 515-525.

STÄMPFLI, R. (1954)

A new method for measuring membrane potentials with external electrodes.

Experientia, 10, 508-509.

STAMPFLI, R. (1963)

Die doppelte Saccharosetrennmethode zur Messung von elektrischen Membraneigenschaften mit extracellulären Elektroden.

Helv. Physiol. Acta, 21, 189-204.

STANFIELD, P.R. (1977)

A calcium dependent inward current in frog skeletal muscle fibers.

Pflügers Arch., 368, 267-270.

STRICKHOLM, A. (1963)

Membrane current of crab muscle.

Nature, Londres, 198, 393-394.

STRICKHOLM, A. (1966)

Local sarcomere contraction in fast muscle fibres.

Nature, Lond., 212, 835-836.

STRICKHOLM, A. (1974)

Intracellular generated potentials during excitation-contraction coupling in muscle. *J. of Neurobiology*, 5, 161-187.

SUAREZ-KURTZ, G. (1974)

Inhibition of membrane calcium activation by Neomycin and Streptomycin in crab muscle fibers. *Pflügers Arch.*, 349, 337-349.

SUAREZ-KURTZ, G. (1976)

A comparison of effects of SKF 525 A and procaine on excitation-contraction coupling in single crayfish muscle fibers. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 198, 687-694.

SUAREZ-KURTZ, G., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. & GRUNDFEST, H. (1972)

Membrane calcium activation in excitation-contraction coupling. *J. gen. Physiol.*, 59, 676-688.

TASAKI, I. (1939)

The strength-duration relation of the normal polarized and narcotized nerve fibre. *Amer. J. Physiol.*, 125, 367-379.

THORENS, S. & ENDO, M. (1975)

Calcium induced calcium release and "depolarization" induced calcium release : their physiological significance. *Proc. Japan Acad.*, 51, 473-478.

TRITTHART, H., KAUFMANN, R., VOLKMER, H.P., BAYER, R.
& KRAUSE, H. (1973)

Ca-movement controlling myocardial contractility.
I Voltage-, current- and time-dependence of me-
chanical activity under voltage clamp conditions
(Cat papillary muscles and trabeculae).
Pflügers Arch., 338, 207-231.

VAUGHAN-JONES, R.D. (1977)

The effect of lowering external sodium on the
intracellular sodium activity of crab muscle
fibres.
J. Physiol., 264, 239-265.

VASSORT, G. & ROUGIER, O. (1972)

Membrane potential and slow inward current
dependence of frog cardiac mechanical activity.
Pflügers Arch., 331, 191-203.

VERGARA, J., BEZANILLA, F. & SALZBERG, B.M. (1978)

Nile blue fluorescence signals from cut single
muscle fibers under voltage or current clamp
conditions.
J. gen. Physiol., 72, 775-800.

WEBER, A. (1971)

Regulatory mechanisms of the calcium transport
system of fragmented rabbit sarcoplasmic reti-
culum. II. Inhibition of outflux in calcium-
free media.
J. gen. Physiol., 57, 64-70.

WEBER, A. & HERZ, R. (1968)

The relationships between caffeine contracture
of intact muscle and the effect of caffeine on
reticulum.
J. gen. Physiol., 52, 750-759.

WEISS, G.B. & BIANCHI, C.P. (1965)

The effect of potassium concentration on ^{45}Ca uptake in frog sartorius muscle.

J. Cellular Comp. Physiol., 65, 385-392.

WINEGRAD, S. (1968)

Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus.

J. gen. Physiol., 51, 65-83.

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.

