

N° d'ordre : 882

50376
1981
62

50376
1981
62

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

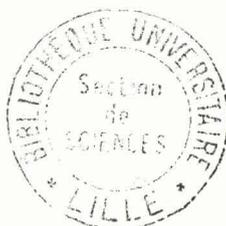
**DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE
NERVEUSE ET MUSCULAIRE**

(3^{ème} cycle)

par

Jacky AUBINEAU

**ETUDE DU COUPLAGE AU NIVEAU DE LA DIADE PAR
L'ANALYSE DE LA RECTIFICATION DANS LE SENS
ENTRANT DE LA FIBRE MUSCULAIRE DE CRABE**



Soutenu le 3 mars 1981 devant la Commission d'Examen

Président	M. ROUSSEAU	Professeur à l'Université de Lille I
Rapporteur	M. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille I
Examineurs	M. CHAPMAN	Professeur à l'Université de LEICESTER
	M. LEOTY	Professeur à l'Université de NANTES
	M. RAYMOND	Chargé de Recherche au CNRS

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

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'Université de LILLE sous la direction du Professeur GUILBAULT.

Que Monsieur le Professeur GUILBAULT soit ici remercié pour avoir bien voulu me faire confiance en m'accueillant dans son laboratoire en janvier 1979. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son enthousiasme à la recherche, sa bienveillance à mon égard et son dévouement total.

Je remercie Monsieur le Professeur ROUSSEAU pour l'intérêt constant qu'il a bien voulu porter à ce travail et accepter la présidence de mon jury.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur CHAPMAN. Sa compétence et son autorité m'inspirent le plus profond respect.

Que Monsieur le Professeur LEOTY soit ici remercié d'avoir accepté de juger mon travail. Son enseignement à la Faculté des Sciences de Poitiers est pour une large part à l'origine de mon goût pour la Physiologie. Qu'il veuille bien trouver dans ces lignes le témoignage de ma sincère gratitude et de ma respectueuse sympathie.

Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur RAYMOND d'avoir accepté, malgré ses nombreuses tâches, de consacrer son temps et sa compétence à l'examen de mon travail.

Je voudrais enfin remercier l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide constante, leurs conseils et leur sympathie. Je me refuse ici à nommer telle ou telle personne car sans une participation active de tous, chercheurs et ATOS, ce travail n'aurait pu être réalisé dans d'aussi bonnes conditions et je suis sûr que chacun saura trouver dans ces remerciements la part qui lui revient.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	p. 1
II - PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL PRESENTE ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	p. 7
A/ DONNEES GENERALES	p. 8
1. Nécessité de la propagation de l'activité électrique de surface vers l'intérieur de la fibre	p. 8
2. Travaux effectués sur fibres pelées	p. 9
B/ HYPOTHESE D'UN COUPLAGE ELECTROCHIMIQUE	p. 10
1. I_{Ca} entrant initiateur de la libération du Ca réticulaire ou hypothèse "Ca induced-Ca release"	p. 10
- Origines de cette hypothèse	p. 10
- Utilisation de chélateurs du Ca	p. 11
2. Modèle récent de couplage basé sur l'hypothèse "Ca induced-Ca release"	p. 12
C/ HYPOTHESE D'UN COUPLAGE ELECTRIQUE	p. 14
1. Libération du Ca réticulaire sous contrôle de mouvements de charges dans la membrane du STT	p. 14
2. Arguments électrophysiologiques en faveur de l'hypothèse "depolarization induced-Ca release" et modèle récent	p. 17
- Dépolarisation du RS : mise en évidence par des méthodes optiques	p. 18
- Modèle récent de Mathias et al.	p. 19
3. Arguments ultrastructuraux en faveur d'un couplage électrique	p. 21

III - METHODES	p. 25
A/ ANIMAL D'EXPERIENCE - PREPARATION	p. 25
B/ SOLUTIONS	p. 25
1. Solutions isotoniques	p. 25
2. Solutions hypertoniques	p. 27
C/ TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT	p. 27
1. Technique du potentiel imposé	p. 27
2. Technique du courant imposé	p. 30
- Courant imposé à l'extrémité de la fibre (utilisation de 3 microélectrodes)	p. 30
- Courant imposé en milieu de fibre (utilisation de 2 microélectrodes)	p. 33
IV - RESULTATS	p. 35
CHAPITRE I : COMPARAISON DES RESULTATS ENREGISTRES EN CONDITIONS DE POTENTIEL ET DE COURANT IMPOSE	p. 35
A/ EVALUATION DE LA CONDUCTANCE DE MEMBRANE A PARTIR DE LA RELATION COURANT-POTENTIEL	p. 36
1. Conditions de potentiel imposé (E_i)	p. 36
2. Conditions de courant imposé (I_i)	p. 42
B/ EVALUATION, EN COURANT IMPOSE, DE LA CON- DUCTANCE MEMBRANAIRE A PARTIR DE MESURES RELATIVES DE r_m A DIFFERENTS POTENTIELS	p. 46
1. Mise en équation de la relation $g_m = f(E_m)$	p. 46

2. Expériences réalisées à densité ou non de courant homogène, comparaison des relations $g_m = f(E_m)$ obtenues p. 50
- Technique de courant imposé utilisant 3 microélectrodes implantées à l'extrémité de la fibre p. 50
 - Technique de courant imposé n'utilisant que 2 microélectrodes implantées en milieu de fibre p. 50

CHAPITRE II : NATURE IONIQUE DU COURANT DE RECTIFICATION
DANS LE SENS ENTRANT p. 53

A/ RELATION $g_m = f(E_m)$ OBTENUE SUR 6 FIBRES
PLACEES EN MILIEU DE REFERENCE p. 54

- B/ EFFETS DES INHIBITEURS CLASSIQUEMENT UTILISES
POUR INHIBER LE COURANT DE RECTIFICATION PORTE
PAR LES IONS K^+ p. 56
1. Effets du TEA p. 56
 2. Effets des ions Cs^+ p. 57

- C/ REMPLACEMENT DES IONS Cl^- DU MILIEU DE REFERENCE
PAR DES ANIONS IMPERMEANTS p. 60
1. A $[K]_e$ constant p. 60
 2. A $[K]_e \cdot [Cl]_e$ constant p. 62

- D/ EFFETS D'INHIBITEURS REPUTES BLOQUER LES
MOUVEMENTS D'IONS Cl^- p. 64
1. Effet des ions I^- p. 64
 - Remplacement partiel des ions Cl^-
(80 mM) par des ions I^- p. 64
 - Remplacement de tous les ions Cl^-
du milieu par des ions I^- p. 67

2. Effet d'un agent pharmacologique réputé bloquer les mouvements d'ions Cl^- (SITS)	p. 69
E/ DISCUSSION DES RESULTATS RELATIFS A LA NATURE DE g_{re}	p. 70
CHAPITRE III : EFFET DE L'HYPERTONIE PAR UREE	p. 75
A/ EFFETS DE L'HYPERTONIE PAR UREE SUR LE CIRCUIT MEMBRANAIRE - ETUDE EN POTENTIEL IMPOSE	p. 76
B/ EFFETS DE L'HYPERTONIE PAR UREE SUR LA RELATION $g_m = f(E_m)$	p. 80
C/ EFFETS DU SITS SUR LA RELATION $g_m = f(E_m)$ OBTENUE EN HYPERTONIE PAR UREE	p. 82
D/ DISCUSSION RELATIVE AUX EFFETS DE L'HYPERTONIE PAR UREE	p. 82
V - PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSION GENERALE	p. 85
1. Choix de la technique	p. 87
2. Nature de G_{re}	p. 89
3. Effets de l'hypertonie par urée	p. 90
VI - RESUME	p. 93

INTRODUCTION

Des divers travaux qui tendent à analyser la nature du couplage excitation-contraction, il se dégage actuellement deux hypothèses majeures : couplage électrochimique d'une part et électrique d'autre part.

Dans la séquence des événements liant l'excitation à la contraction, certains maillons sont aujourd'hui parfaitement élucidés. Ils constituent des éléments communs aux deux hypothèses. Ainsi, l'excitation est initiée par la dépolarisation du sarcolemme, dépolarisation propagée dans le système tubulaire transverse (STT). De même, il est connu que c'est en réponse à une "information" provenant de la jonction diadique que le réticulum sarcoplasmique (RS) libère son contenu en ions Ca^{++} dans le sarcoplasme, ce qui conduit à la contraction.

Au niveau de la diade, les membranes du RS et du STT sont sinon confondues ou continues (BIRKS, 1965, Fig. 1a), du moins contigües ou très proches l'une de l'autre (FRANZINI-ARMSTRONG, 1970, Fig. 1b). Cette organisation offre la base structurale de la jonction de couplage excitation-contraction.

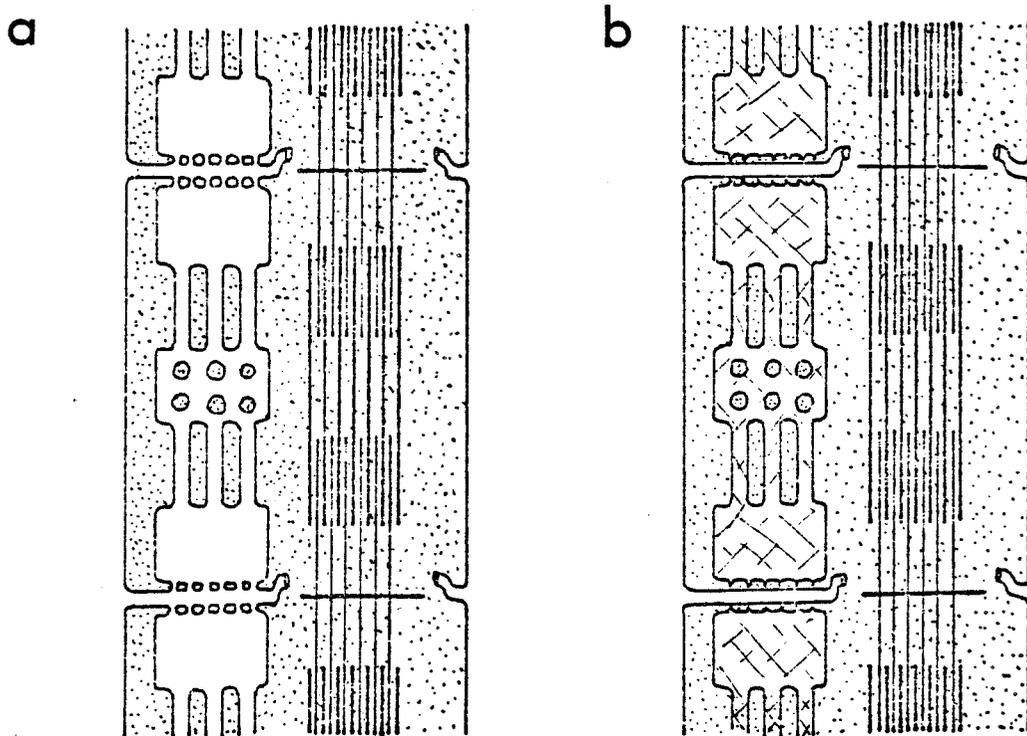


Figure 1 a-b

Modèle schématique de la coupe longitudinale d'une fibre musculaire.

En a - Le réticulum sarcoplasmique (RS) est en contact direct avec la lumière tubulaire. La communication entre ces 2 compartiments est assurée par des "ponts" diadiques creux ("gap junction" - couplage électrique).

En b - Le compartiment réticulaire est isolé. La membrane du RS présente des projections ou "pieds" en direction de la membrane tubulaire, mais sans jamais atteindre celle-ci (couplage électrochimique).

C'est en fait à propos de la nature de "l'information" qui traverse la jonction que les deux hypothèses mentionnées ci-dessus diffèrent :

- Dans la première hypothèse, la dépolarisation du STT provoquerait une légère augmentation de la concentration en ions Ca^{++} du myoplasme au niveau des diades. Cette augmentation induirait une libération autocatalytique du Ca réticulaire .

- Dans la seconde hypothèse, la membrane réticulaire verrait sa conductance calcique directement activée par un courant électrique dépolarisant traversant la diade ; l'intensité de ce courant étant fonction de la polarisation membranaire du STT. Un tel mécanisme impose nécessairement que la jonction de couplage soit une zone de moindre résistance et qu'il y ait, par conséquent, une organisation ultrastructurale adéquate à ce niveau.

Au vu de ces deux hypothèses et des structures membranaires correspondant à la jonction de couplage, il apparaît nécessaire d'analyser les propriétés électriques de la membrane du STT et du RS. L'étude des conductances siégeant au niveau de ces membranes devrait permettre d'apprécier la nature du couplage. De plus, si la jonction de couplage correspond à une zone de moindre résistance, il doit alors être possible, en interrogeant la membrane de surface d'une fibre placée en conditions de référence, d'enregistrer un phénomène électrique reflétant l'activité du RS. Dans l'hypothèse où le phénomène électrique étudié intéresserait à la fois la membrane du RS et celle des tubules, après rupture de la jonction de couplage, la composante réticulaire devrait être éliminée. Or, si l'on s'en réfère aux travaux de FRANK et TREFFERS (1977) sur la

fibre de grenouille et à ceux de DELORME et al. (1978) sur la fibre de crabe, l'hypertonie par urée provoque un découplage excitation-contraction simplement en altérant l'ultrastructure des diades. Ainsi, il devient possible d'enregistrer un phénomène électrique avec ou sans sa composante réticulaire.

Sur la fibre d'écrevisse, les mouvements d'ions Cl^- et de Ca^{++} seraient liés et localisés à l'extrémité des tubules (GIRARDIER et al., 1963). La membrane réticulaire serait, elle même, perméable aux ions Cl^- et ceux-ci pourraient être échangés avec les ions Ca^{++} lors de l'activation de la contraction (MATSUBARA et al., 1977). Enfin, contrairement à ce qui est observé sur les fibres de vertébrés, la conductance membranaire du STT de la fibre de crabe est largement de nature "chlore". Les mouvements de ces ions dépendent du potentiel (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974). En conséquence, si la membrane réticulaire et celle du STT sont en continuité électrique par l'intermédiaire de la jonction de couplage, elles peuvent à priori présenter des caractéristiques électriques similaires, en particulier des propriétés de rectification. Partant de cette hypothèse, il a été envisagé d'étudier le phénomène de rectification dans le sens entrant sur des fibres placées en milieu de référence puis en conditions d'hypertonie par urée (RS désolidarisé du STT). Ce phénomène de rectification caractérise la propriété d'une membrane de laisser passer de larges courants entrants mais de faibles courants sortants (KATZ, 1949 ; ADRIAN, 1969). Ce phénomène électrique présente, en outre, l'avantage de pouvoir être étudié sans que la contraction ne vienne perturber l'enregistrement, puisqu'il se développe dans une gamme de potentiel où le courant régénératif n'est pas activé.

Les expériences présentées dans ce mémoire sont réalisées sur des fibres musculaires squelettiques de crabe de "type tout ou rien" (ATWOOD et al., 1965). Les caractéristiques de ces fibres sont d'avoir un STT développé et de présenter un phénomène de double rectification membranaire (Fig. 2).

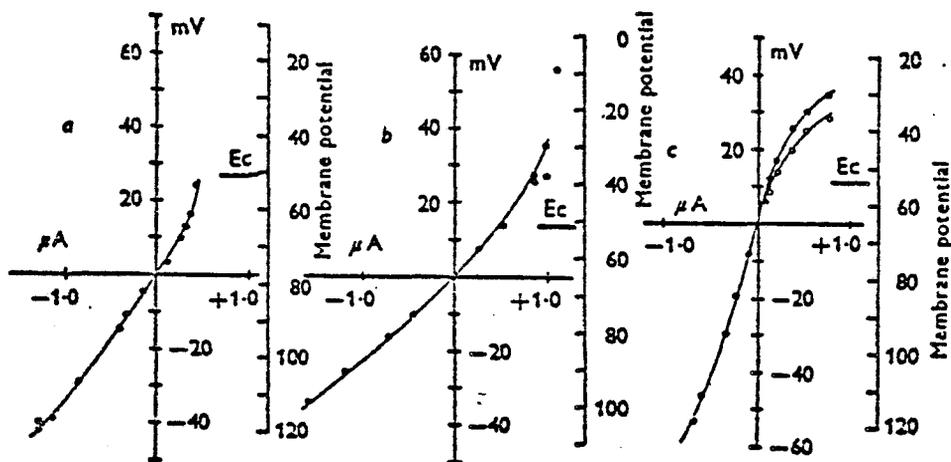


Figure 2

Courbes courant-potentiel établies en conditions de courant imposé sur des fibres squelettiques de crabe dont la réponse est : a) tout ou rien ; b) graduée ; c) passive.

Les abscisses positives représentent la valeur des courants dépolarisants, les ordonnées positives, celles des dépolarisations membranaires. Le point d'intersection de l'axe des abscisses avec l'échelle donnée en mV placée à droite de chaque courbe permet de déterminer la valeur du potentiel de référence pour chacun des trois types de fibres. E_c est la valeur du potentiel pour laquelle l'activité commence à se manifester.

Le phénomène de rectification membranaire dans le sens entrant n'apparaît que sur les fibres présentant un PA de type "tout ou rien" (a) ou gradué (b).

D'après ATWOOD et al. (1965).

Dans la présentation des résultats, il est d'abord montré que le courant de rectification dans le sens entrant (I_{re}) est porté par les ions Cl^- . Ce phénomène de rectification est ensuite étudié de façon comparative en conditions d'isotonie et d'hypertonie par urée. Les résultats montrent que ce phénomène a une composante réticulaire décelable en surface. Ceci suppose l'existence d'une zone de moindre résistance entre le STT et le RS. Ce fait est en faveur d'un couplage excitation-contraction de nature électrique au niveau de la diade.

PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL PRESENTE

ET

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les données bibliographiques relatées dans ce chapitre ne font référence qu'aux études réalisées sur les fibres musculaires squelettiques. Le premier paragraphe sera consacré à un rappel bref des travaux qui ont permis de mieux connaître certaines étapes du couplage (propagation de l'excitation le long des tubules, libération du Ca réticulaire...). Il sera ensuite fait mention des données bibliographiques allant dans le sens des différentes hypothèses qui existent actuellement, concernant la nature de ce couplage. En cela, il sera d'abord fait appel aux travaux qui abordent ce problème sous l'aspect électrophysiologique, puis à ceux se rapportant à l'ultrastructure de la jonction de couplage (diade). La bibliographie qui concerne l'étude de la rectification, et plus particulièrement la nature de I_{re} , ne sera introduite que parallèlement à l'exposé des résultats.

Il est maintenant bien établi que la contraction du muscle squelettique est induite par une augmentation importante de la concentration interne en ions Ca^{++} au contact des myofilaments (EBASHI et ENDO, 1968). Ces ions Ca^{++} , "piégés" dans le RS lorsque la fibre est à l'état de repos, sont libérés dans le milieu intracellulaire lors de l'activité et interagissent alors avec des unités protéiques régulatrices (troponine - tropomyosine). Le changement conformationnel ainsi provoqué au niveau de ces protéines permet l'interaction actine-myosine nécessaire au développement de la contraction. Cependant, si le rôle du Ca comme activateur des structures contractiles n'est plus contesté aujourd'hui, le mécanisme de la libération de ce Ca à partir du RS, ainsi que celui par lequel une forte dépolarisation de la membrane de surface (sarcolemme) induit la contraction, sont autant de points qui restent à élucider.

A/ DONNEES GENERALES

1. Nécessité de la propagation de l'activité électrique de surface vers l'intérieur de la fibre

Le potentiel d'action (PA) se propage par circuits locaux vers l'intérieur de la fibre via la membrane du STT. Comme l'ont notamment montré BASTIAN et NAKAJIMA (1974) sur la fibre de crapaud, la propagation du PA dans le STT est une phase essentielle du couplage en l'absence de laquelle la contraction est très réduite. Ces auteurs utilisent la technique du double pont de saccharose sur la fibre isolée et obtiennent ainsi un "noeud artificiel" au niveau duquel ils enregistrent le PA et la contraction. Sur une telle préparation devenue inexcitable par apport de tétrodotoxine (TTX) dans le milieu extracellulaire (ou

par absence de Na), le PA de référence, qui a été mémorisé, est alors imposé à la membrane du "noeud". L'amplitude de la contraction obtenue sous cette dernière condition se révèle être 2 à 3 fois plus faible que celle de référence obtenue en présence du courant entrant régénératif. Les auteurs en concluent que 70 p. 100 de la contraction sont dus à la propagation du PA dans le STT.

2. Travaux effectués sur fibres pelées

En éliminant la membrane de surface tel que l'a imaginé NATORI (1954, 1955), le milieu intracellulaire devient directement accessible et peut être modifié au gré de l'expérimentateur. Différents types de stimulus permettent d'obtenir la contraction d'une telle préparation : excès d'ions Cl^- dans le milieu d'imbibition, application d'un courant de stimulation. C'est par une action dépolarisante sur la membrane du RS que ces stimulus induiraient la libération du Ca réticulaire et, par là même, la contraction (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967). Cependant, NAKAJIMA et ENDO (1973) considèrent qu'en l'absence de la membrane de surface, les tubules pourraient se refermer, formant des vésicules susceptibles de se polariser (grâce à la pompe Na-K). Ainsi, l'excès d'ions Cl^- dans le milieu pourrait agir non pas sur la membrane du RS mais sur la polarisation tubulaire. Ceci conduit NAKAJIMA et ENDO (1973) à expérimenter sur la fibre semi-pelée, ce qui consiste à n'altérer que partiellement la membrane de surface. Ainsi ces auteurs concilient le fait de pouvoir accéder directement au milieu intracellulaire tout en conservant des tubules "ouverts" et non polarisés. Ils constatent alors que l'excès d'ions Cl^- dans le milieu pro-

voque la libération du Ca réticulaire et confirment, par là même, l'action directe des ions Cl^- sur le RS.

D'autre part, comme l'ont montré ENDO et al. (1970), ainsi que FORD et PODOLSKY (1970), il est possible, sur une fibre pelée, de provoquer la contraction par un apport d'ions Ca^{++} dans le milieu, c'est-à-dire au contact de la membrane du RS. Ce fait est à l'origine de l'une des 2 principales hypothèses du couplage excitation-contraction : le courant entrant de Ca (I_{Ca}) provoquerait une augmentation de la concentration cytoplasmique en ions Ca^{++} au voisinage de la membrane du RS, ce qui induirait la libération autocatalytique du Ca réticulaire (hypothèse "Ca induced-Ca release").

B/ HYPOTHESE D'UN COUPLAGE ELECTROCHIMIQUE

1. I_{Ca} entrant initiateur de la libération du Ca réticulaire ou hypothèse "Ca induced - Ca release"

- *Origines de cette hypothèse.* FORD et PODOLSKY (1970) ne font que reprendre l'hypothèse émise par SANDOW en 1952, hypothèse selon laquelle la contraction serait due à un influx d'ions Ca^{++} provenant directement du milieu extracellulaire. Cependant, les travaux de BIANCHI et SHANES (1959), puis ceux de CURTIS (1966), infirment cette hypothèse. Ces derniers auteurs montrent en effet (sur la fibre squelettique) que la quantité maximum d'ions Ca^{++} qui entre dans la fibre lors d'un PA est 100 fois trop faible par rapport à la quantité

requis permettant d'atteindre le seuil de la contraction. Malgré cela, WEISS et BIANCHI (1965), puis FORD et PODOLSKY (1972), reprennent l'idée de SANDOW et émettent cette fois l'hypothèse que l'influx de Ca pendant le PA pourrait servir de "gachette" (trigger) voire de "potentiateur" à la libération du Ca réticulaire. Cet influx viendrait en fait accroître localement l'activité des ions Ca^{++} à la face cytoplasmique de la membrane du RS et donc déclencher un processus de libération autocatalytique du Ca réticulaire.

- *Utilisation de chélateurs du Ca.* Par addition d'EGTA (acide éthylèneglycol-tétraacétique) au milieu de référence, ARMSTRONG et al. (1972) réduisent la concentration extracellulaire en ions Ca^{++} à $2 \cdot 10^{-9}$ M, c'est-à-dire à une concentration inférieure à celle de repos dans le milieu intracellulaire : $1 \cdot 10^{-7}$ M (HELLAM et PODOLSKY, 1969). Dans de telles conditions, il est encore possible d'obtenir une contraction, et ce en dépit de l'inversion du gradient électrochimique des ions Ca^{++} (même lors du PA, le flux d'ions Ca^{++} est net sortant). Sur la fibre de crabe, il n'est cependant pas possible d'obtenir une contraction en présence d'EGTA, mais ceci est lié au fait que le PA est "calcique" et non plus "sodique" comme sur la fibre squelettique de vertébré. Les observations faites par ARMSTRONG et al. (1972) sont évidemment un argument de poids à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle un courant entrant I_{Ca} serait l'initiateur de la libération du Ca réticulaire.

De plus, ENDO (1975) démontre que cette hypothèse est difficilement envisageable dans les conditions physiologiques en raison de

l'importance du flux calcique alors nécessaire. Cet auteur mentionne en effet que l'activité interne en ions Ca^{++} doit atteindre *une valeur de 3.10^{-4} M* pour que le Ca puisse jouer un rôle de "gachette" permettant au RS de libérer à son tour les ions Ca qu'il piège. Or cette concentration est déjà très supérieure à celle permettant d'obtenir une contraction maximale des myofilaments. COSTANTIN et TAYLOR (1973) observent quant à eux que la contraction de chacune des protéines de structure n'est pas "tout ou rien" mais graduée en fonction de la dépolarisation membranaire. Ceci peut laisser supposer que la libération des ions Ca^{++} piégés par le RS dépend du potentiel de membrane du STT. Cependant, ENDO (1977) interprète ce résultat en imaginant qu'il peut y avoir recrutement des sites calciques réticulaires en fonction du potentiel, chaque site libérant son Ca de façon tout ou rien.

L'hypothèse d'une libération du Ca réticulaire initiée par un influx calcique ne semble donc se vérifier que dans les conditions particulières ayant permis de l'imaginer, c'est à dire sur la fibre pelée. Cependant, même si les arguments à l'encontre de cette hypothèse sont nombreux, rien ne permet de l'exclure totalement et le modèle récemment proposé par FRANK (1979-1980) en atteste.

2. Modèle récent de couplage basé sur l'hypothèse

"Ca induced-Ca release"

Trois schémas résument les principes généraux de ce modèle (Fig. 3).

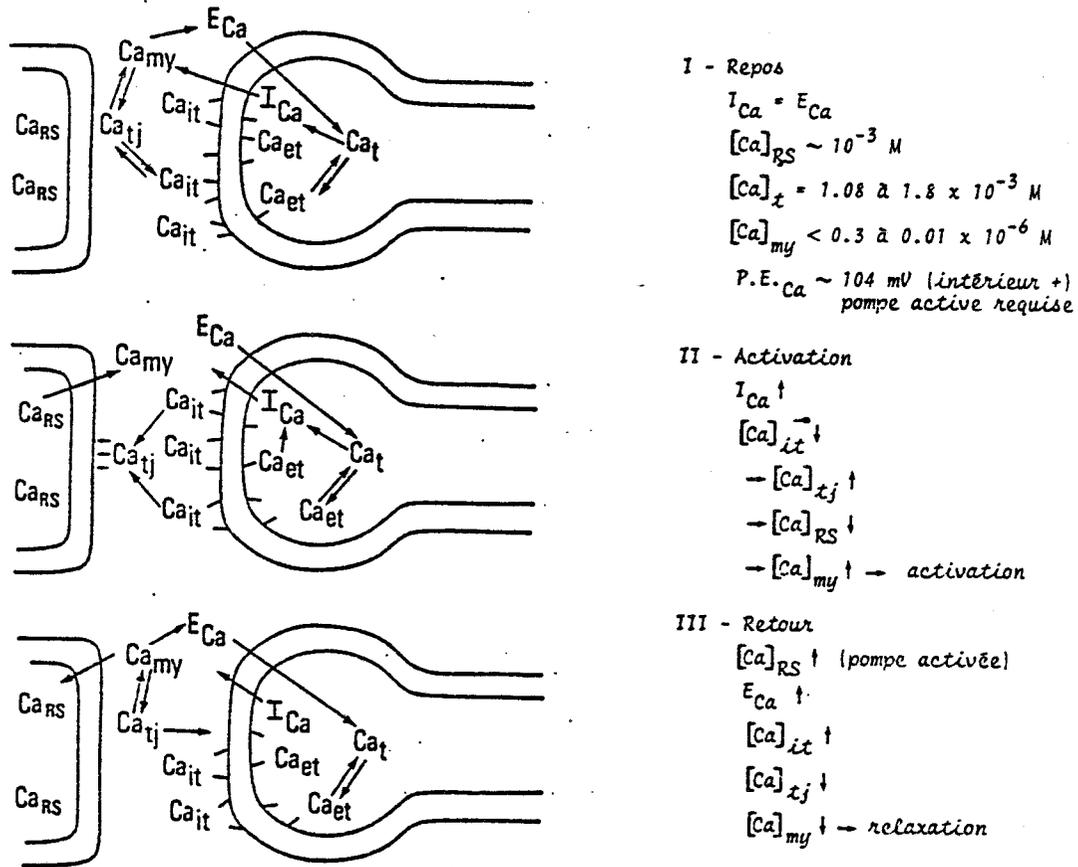


Figure 3

Modèle accréditant un couplage du type "Ca induced-Ca release" : I, repos ; II, couplage excitation-contraction ; III, relaxation. Abréviations : t, lumière tubulaire ; et, face externe de la membrane tubulaire ; it, face interne de la membrane tubulaire ; tj, jonction triadique ; my, myoplasme ; RS, réticulum sarcoplasmique ; E, efflux, I, influx ; et Ca, calcium.

(selon FRANK, 1979-1980).

Dans ce modèle, il est supposé que du calcium serait lié à la face extracellulaire de la membrane du STT (Ca_{et}) et que ce calcium influencerait ou contrôlerait le "trigger" (gachette) calcique fixé sur la face interne de cette même membrane (Ca_{it}). Ainsi, si la

membrane tubulaire se trouve dépolarisée, cela provoque la libération du Ca_{it} ce qui a pour effet d'augmenter la concentration en calcium libre au niveau de la diade (Ca_{tj}). Ce calcium, diffusant très rapidement, vient influencer la membrane réticulaire ce qui conduit le RS à relâcher les ions Ca^{++} qu'il piège (Ca_{RS}). La concentration en ions Ca^{++} va donc augmenter dans le myoplasme (Ca_{my}) et atteindre un niveau suffisant pour provoquer la contraction. La relation liant la quantité de Ca_{it} libérée en fonction de la dépolarisation serait telle que plus la concentration en Ca_{et} serait faible et plus la quantité de Ca_{it} libérée serait grande et inversement.

C/ HYPOTHESE D'UN COUPLAGE ELECTRIQUE

1. Libération du Ca réticulaire sous contrôle de mouvements de charges dans la membrane du STT

Dans cette hypothèse, la libération du Ca réticulaire est directement contrôlée par des mouvements de charges intramembranaires du STT, eux mêmes dépendant de la polarisation de cette membrane. Ces caractéristiques en font une hypothèse électrique. Cependant, au vu des 2 hypothèses définies dans l'introduction, cette hypothèse peut être considérée comme intermédiaire.

On peut s'attendre à ce que la séquence des événements liant l'excitation à la contraction commence par des changements de confor-

mation des protéines intrinsèques dans la membrane. En effet, des molécules ayant un large moment dipolaire peuvent s'orienter en fonction du potentiel. En se déplaçant ou en changeant d'orientation sous l'influence du potentiel transmembranaire, ces molécules produisent des déplacements de charges ("gating current" ou "courant de porte" lorsqu'il s'agit de canaux ioniques : ARMSTRONG et BEZANILLA, 1973). Ces courants peuvent être enregistrés en voltage imposé sous certaines conditions favorables (TEA + TTX dans le milieu extracellulaire afin de bloquer les courants ioniques I_K et I_{Na}).

SCHNEIDER et CHANDLER (1973), ayant observé de tels mouvements de charges sur des fibres musculaires de grenouille, imaginent que ceux-ci peuvent jouer le rôle de "trigger" dans le couplage excitation contraction. En potentiel imposé, ces auteurs mesurent, en début et en fin d'impulsion, des phénomènes électriques égaux en amplitude mais de sens opposé. La relation qui lie les mouvements de charges au potentiel membranaire est de type sigmoïde, ces mouvements étant minimum à - 80 mV (potentiel de repos) et maximum à - 20 mV. Lors de la dépolarisation, une partie des charges intramembranaires du STT est sensée se déplacer depuis la face externe de la membrane vers la face cytoplasmique, et inversement lors de la repolarisation. Si ces charges sont exclusivement localisées dans la membrane du STT, le calcul permet d'obtenir $1700 \text{ charges}/\mu\text{cm}^2$ soit environ 600 groupes chargés de valence 3. Ceci est bien sûr à rapprocher des 700 "pieds"/ μcm^2 ou "projections" de la membrane réticulaire localisés au niveau des diades et mis en évidence par FRANZINI-ARMSTRONG (1970). Suite à leur travaux, CHANDLER et al. (1976) proposent un modèle de couplage où une protéine "piston" rattachée à la membrane du STT vient ouvrir ou fermer un canal calcique situé au niveau des cisternes du RS. La position de chacune de ces molécules protéiques est contrôlée par les mouvements

de charges intramembranaires du STT, eux mêmes dépendant de la polarisation membranaire. L'un des exemples hypothétiques du fonctionnement d'un tel mécanisme donné par ces auteurs est présenté ci-dessous (Fig. 4).

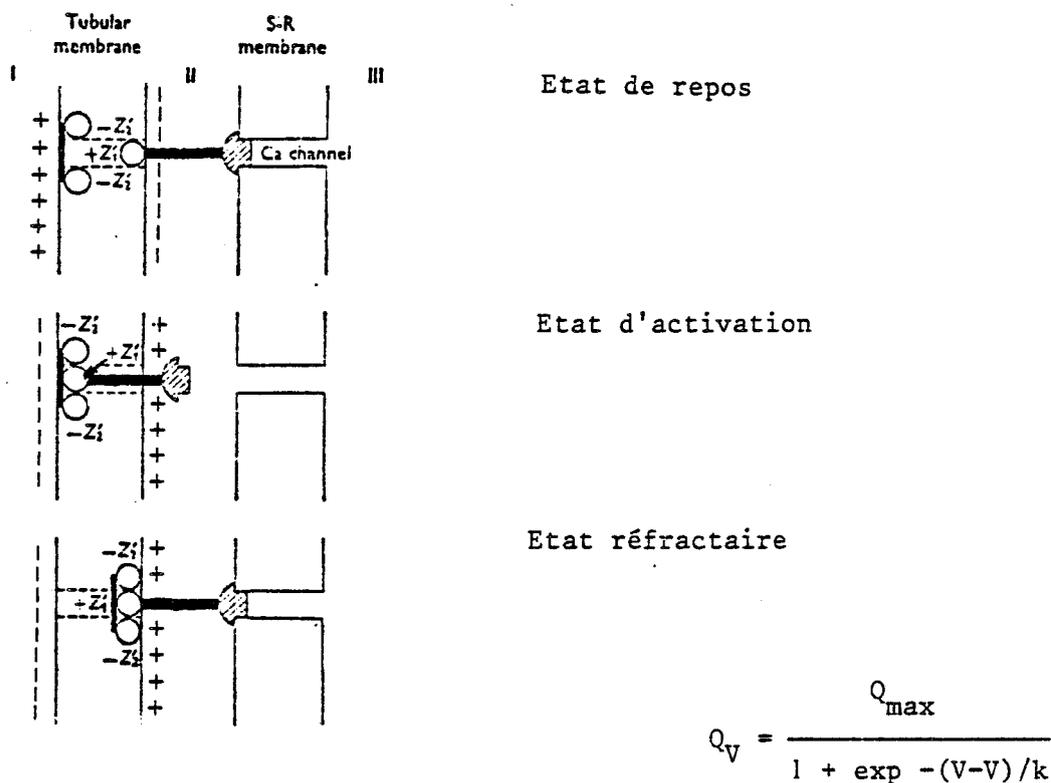


Figure 4. Exemple hypothétique de la façon dont un complexe chargé peut réguler la libération du Ca réticulaire. Les compartiments I et III représentent respectivement la lumière tubulaire (STT) et les cisternes du S-R, lieu de stockage des ions Ca^{++} au repos. Le compartiment II correspond à l'espace cytoplasmique au niveau de la diade. Les 2 groupes chargés Z'_2 sont reliés entre eux et peuvent mouvoir Z'_1 vers la droite si Z'_2 est supérieur à Z'_1 . La configuration (a) traduit l'état de repos, (b) l'état d'activation et (c) la période réfractaire (d'après CHANDLER et al. 1976).

Evolution de la charge du système complexe en fonction du potentiel (ou détermination de sa position dans la membrane). Chaque charge Z' a 2 positions possibles et la position (a) est favorisée lorsque le potentiel de membrane est très négatif. La position (b) est obtenue pour une certaine charge globale Q , Q_{max} étant le total des charges. \bar{V} est le potentiel pour lequel $Q_V = Q_{max}/2$; k détermine la pente de la sigmoïde. Une moyenne réalisée sur 6 fibres a permis aux auteurs d'obtenir les valeurs suivantes : $Q_{max} = 25 \text{ nC}/\mu\text{F}$, $\bar{V} = -44 \text{ mV}$ et $K = 8 \text{ mV} = \frac{RT}{3F}$

Dans la configuration réfractaire (c), le canal est fermé bien que les charges ne soient pas en position de repos. Ceci suggère que les mouvements de Z'_1 sont rapides comparés à ceux du complexe Z'_2 . Lors de la dépolarisation, Z'_1 se déplace rapidement à gauche et tant que Z'_2 occupe sa position de repos, le canal est ouvert (b). Le couple Z'_2 se déplaçant lentement à droite va ramener Z'_1 à sa position de repos et le canal présente à nouveau une configuration fermée (c). Cette dernière étape suppose que $2Z'_2$ soit supérieur à Z'_1 . Ce modèle est attrayant parce qu'en accord avec beaucoup de résultats expérimentaux ; en particulier avec celui concernant le développement de la contraction contrôlé par le potentiel de membrane. Cependant, comme le précisent *avec insistance* les auteurs, ces résultats expérimentaux pourraient être interprétés différemment, par exemple en assurant que les mouvements de charges induisent une augmentation de la perméabilité tubulaire à un ion activateur. Cependant, dans ce dernier cas, une restriction importante est alors à formuler : l'ion activateur ne pourrait être le Ca lui-même parce que s'il en était ainsi, la contraction ne serait plus sous le contrôle du potentiel de membrane du STT une fois l'ion activateur relâché (plus de contrôle "ON-OFF" ; LUTTGAU, 1977). En effet, il pourrait alors y avoir libération autocatalytique de Ca et dans ce cas, un tel fonctionnement n'entre plus dans le cadre d'un simple couplage soit électrique soit électrochimique, mais devient une conjugaison des deux.

2. Arguments électrophysiologiques en faveur de l'hypothèse "dépolarization induced-Ca release" et modèle récent

Lors de la dépolarisation de la fibre induisant la contraction,

le flux net sortant de Ca depuis le RS vers le cytoplasme est plus grand qu'au repos ($[Ca]_i$ de repos = 10^{-7} M ; $[Ca]_i$ activité = 10^{-4} M). Cependant, KITAZAWA et ENDO (1977) démontrent que le mouvement unidirectionnel de Ca vers le RS est augmenté sous l'influence de la dépolarisation. Ces 2 faits expérimentaux ne peuvent être conciliés qu'en considérant, avec ENDO (1977), que la perméabilité calcique est très augmentée sous l'influence de la dépolarisation. Il est donc possible d'envisager que la membrane du RS ait les mêmes caractéristiques que les membranes excitables. La libération du Ca réticulaire lié à la dépolarisation se ferait selon un mécanisme semblable à celui conduisant à un PA (ENDO, 1977). Il est d'ailleurs bien connu que les membranes excitables répondent généralement à une dépolarisation en augmentant leur P_{Ca} (voir même PA "calcique" sur la fibre musculaire squelettique de crabe).

- *Dépolarisation du RS : mise en évidence par des méthodes optiques.* L'hypothèse selon laquelle une stimulation électrique de la membrane de surface est susceptible d'entraîner une variation du potentiel de membrane réticulaire est confirmée par un certain nombre de travaux faisant appel à des techniques optiques. Ainsi, BEZANILLA et HOROWICZ (1975) utilisent les changements d'intensité de fluorescence du "NILE BLUE A" en réponse à la stimulation électrique du muscle semi-tendineux de grenouille pour obtenir des informations concernant les propriétés électrochimiques du RS. Ces auteurs observent que l'accroissement de fluorescence suit immédiatement l'activité électrique de surface mais précède très nettement le développement de la contraction. Si, pour la membrane de l'axone, le changement de fluorescence en fonction du potentiel suit une relation linéaire, pour le muscle de grenouille, ce changement est constitué de trois composantes :

la première est attribuée au sarcolemme, la seconde au STT et la dernière à un système membranaire profond que ces auteurs supposent être le RS.

De même, par des mesures de biréfringence, BAYLOR et OETLIKER (1975) arrivent à des conclusions similaires à celles de BEZANILLA et HOROWICZ. Ils attribuent en effet une large composante du signal optique enregistré à l'instant qui précède la contraction, à la dépolarisation du RS.

Ces résultats concernant l'activation du RS lors du PA sont en accord avec l'hypothèse d'un couplage électrique. Un modèle récent basé sur cette hypothèse est donné par MATHIAS et al. (1980).

Modèle récent de Mathias et al. Ce modèle reprend en détail l'hypothèse selon laquelle l'excitation conduit à la contraction grâce à un courant ionique transitoire *couplant* le STT et le RS. Ce modèle apparaît très intéressant car il rend compte de l'ensemble des différentes étapes du couplage excitation-contraction et reste cohérent avec tout ce qui est aujourd'hui admis concernant les propriétés électriques et mécaniques de la fibre squelettique. En cela, il satisfait notamment :

- (i) aux caractéristiques électriques de repos de la fibre (capacités et résistances effectives) ;
- (ii) à la durée, l'amplitude et la vitesse de dépolarisation lors du PA ;
- (iii) aux caractéristiques des mouvements de charges décrits par différents auteurs ;
- (iiii) au changement du potentiel transmembranaire du RS en fonction du potentiel appliqué à la membrane de surface ;
- (iiiii) au contrôle de la libération du Ca réticulaire par le potentiel de la membrane tubulaire. Dans ce modèle, une seule condition est posée : au repos, aucun courant ne doit traverser la

jonction de couplage X dont g_x représente la conductance (voir schéma électrique équivalent à la Fig. 5 a et b). La somme des potentiels de repos des membranes tubulaire et réticulaire doit être égale à zéro.

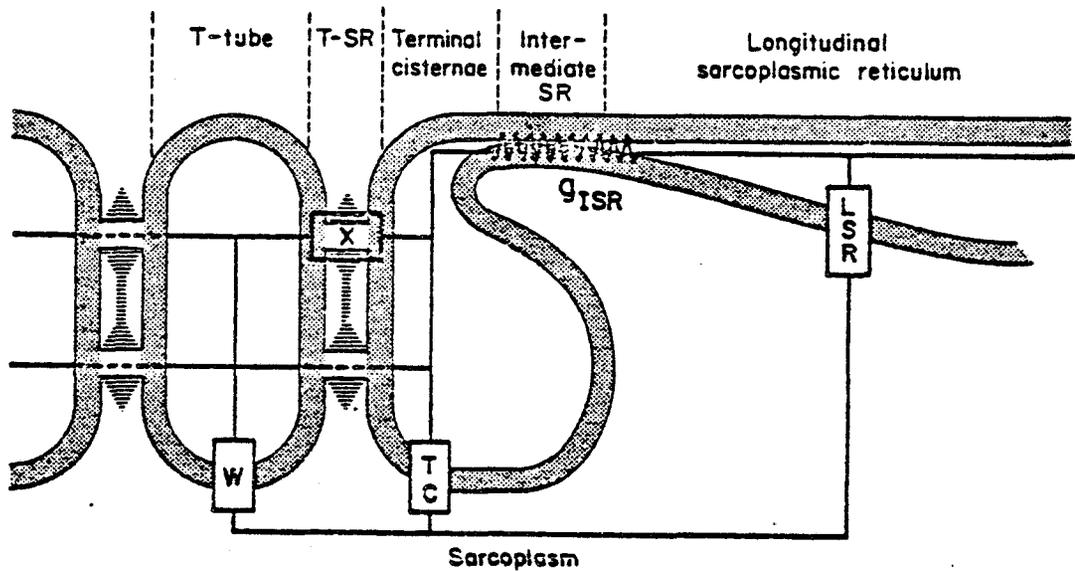


Figure 5a

Circuit membranaire du modèle. Ce schéma représente la membrane tubulaire (W) en relation avec la cisterne terminale (TC) et le réticulum sarcoplasmique longitudinal (LSR). L'élément important de ce modèle concerne la conductance g_x (notée X). Cette conductance, située au niveau de la diade, est sensée permettre le passage d'un courant en provenance des tubules vers la cisterne.

Les schémas équivalents des circuits électriques des différentes membranes sont détaillés à la figure 5 b.

(d'après MATHIAS et al. 1980).

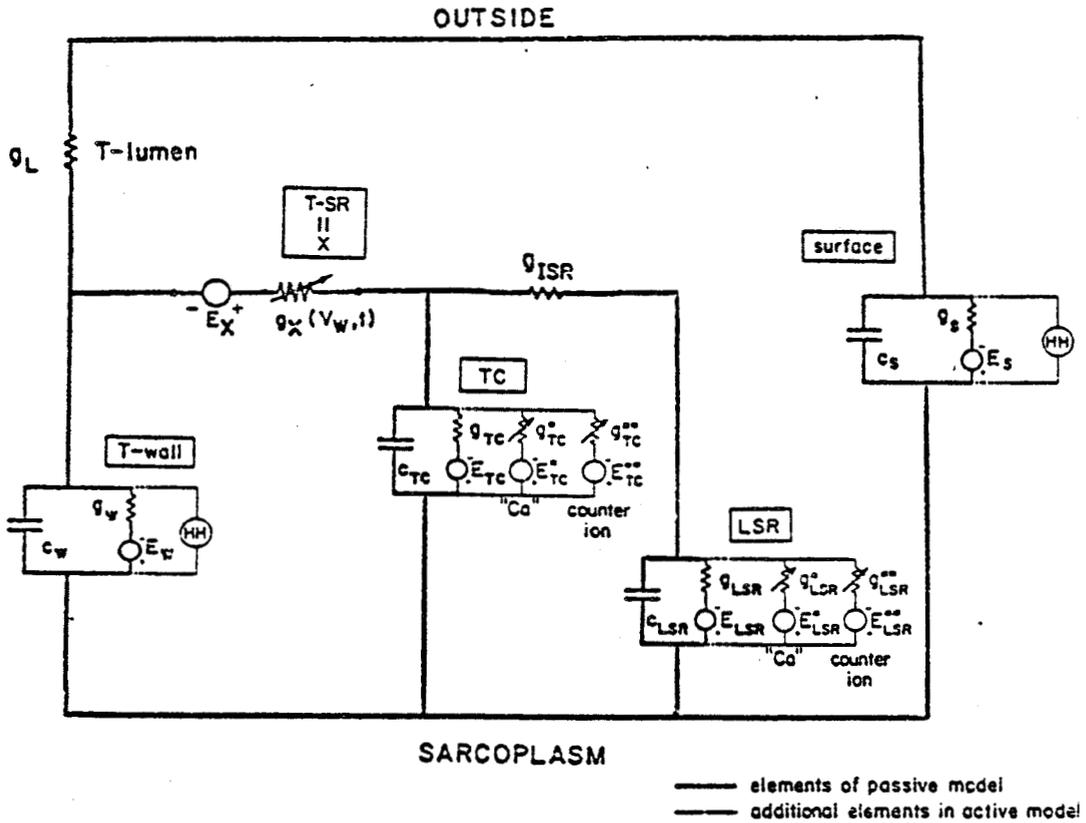


Figure 5 b

Description des différents circuits membranaires. Chaque membrane est représentée par une capacitance fixe (indépendante du potentiel) en parallèle avec des canaux ioniques. Dans le modèle "passif", ces canaux sont représentés par une conductance en série avec une pile. Dans le modèle "actif", une conductance aux ions Ca^{++} et celle d'une autre espèce ionique sont incluses dans les membranes de la cisterne et du RS longitudinal. Les cercles notés HH représentent les conductances aux ions Na^+ et K^+ définies par HODGKIN et HUXLEY et modifiées par PEACHEY (1973) pour le muscle squelettique. Les conductances HH n'interviennent que lors du potentiel d'action.

(d'après MATHIAS et al. 1980).

3. Arguments ultrastructuraux en faveur d'un couplage électrique

Le bien fondé d'une telle hypothèse nécessite qu'il y ait des relations structurales entre le RS et le STT. De toute évidence, c'est au niveau des triades que l'on peut espérer trouver un agencement mem-

branaire tel que la conduction électrique entre le STT et le RS soit possible. Nombreux sont les laboratoires qui se sont attachés à l'observation de ces structures fines, mais les résultats, souvent variables en raison des techniques et du matériel biologique utilisés, n'ont pas permis de solutionner le problème de façon définitive.

L'un des points essentiels concernant la structure de la diade est de savoir si le RS constitue un compartiment en contact direct avec le milieu extérieur (voir Fig. 1), ou bien s'il y a à ce niveau une simple fusion des feuilletts cytoplasmiques des deux systèmes membranaires considérés, STT et RS (SOMLYO, 1979). Dans ce dernier cas, le RS serait alors un compartiment clos mais relié électriquement à la membrane de surface.

Un nombre important de travaux (EBASHI, 1965 ; BIRKS et DAVEY, 1969 ; RUBIO et SPERELAKIS, 1972 ; ZIERLER, 1973 ; SPERELAKIS et al., 1973) suggèrent que des ions, des molécules non chargées voire même des marqueurs cellulaires peuvent être échangés entre le STT et le RS via les diades et les triades. COSTANTIN (1975) quant à lui pense que ces phénomènes de pénétration de substances extracellulaires dans le RS seraient non physiologiques mais liés aux techniques ou aux conditions expérimentales (les triades "s'ouvriraient" sous l'effet d'un choc osmotique...).

Des travaux récents, utilisant des techniques plus fines apportent des précisions quant aux structures particulières des "feets" ou "ponts" décrits par FRANZINI-ARMSTRONG (1970,1980). SOMLYO (1979) observe que les feuilletts cytoplasmiques des membranes du STT et du RS sont continus au niveau des triades, et que c'est la juxtaposition deux par deux de ces feuilletts continus qui constitue les "ponts". Pour cet auteur, les "ponts" seraient de nature phospholipidique et comporteraient une protéine fixant le calcium. Ce dernier modèle rejoint

celui de CHANDLER et al. (1976) puisqu'il prévoit qu'une protéine ou un piston puisse se mouvoir entre le STT et le RS via les feuilletts cytoplasmiques.

KELLY et KUDA (1979) observent, quant à eux, sur le feuillet interne de la membrane du RS des points de fixation pouvant supporter des structures creuses, structures qui sont également observées sur le feuillet externe. Ces sortes de piliers creux viennent en contact de la membrane du STT mais la preuve de fixation à ce niveau n'a pu être faite par ces auteurs. Cependant, FRANZINI-ARMSTRONG (1980), en dépit de ses résultats antérieurs (1970-1975-1978), observe une correspondance entre la disposition des particules intramembranaires du STT et la structure des "feets". Ceci laisse supposer l'existence d'un système complexe fixé à la fois sur la membrane du RS et du STT, système jouant probablement un rôle important dans le couplage excitation-contraction. Enfin, EISENBERG et GILAI (1979) montrent que sur une préparation stimulée à basse fréquence puis aussitôt fixée, le nombre de "ponts" présents est supérieur (+ 21 %) à celui observé sur cette "même préparation" fixée à l'état de repos. L'accroissement du nombre de "ponts" serait même accompagné d'une augmentation de leur diamètre alors que l'espace inter-ponts entre le STT et le RS resterait constant (110 Å°).

Sur la fibre musculaire de crabe, DELORME et al. mettaient en évidence dès 1978 l'existence de ponts disposés régulièrement, réunissant les membranes tubulaires et réticulaires. Le découplage excitation-contraction obtenu en conditions d'hypertonie par urée était attribué par ces auteurs à la disparition de l'aspect palissadique de la triade (étirement ou rupture des ponts). Ceci laisse évidemment supposer que dans les conditions physiologiques, le couplage excitation-contraction

est de nature électrique, avec l'idée sous-jacente que les ponts seraient des structures du type "gap-junction".

La somme des données bibliographiques ainsi que la diversité des résultats et des interprétations (lorsqu'il ne s'agit pas de divergences), concernant l'étude du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique, montrent toute la complexité de ce problème et la controverse qui existe encore tant du point de vue des études électrophysiologiques qu'ultrastructurales.

M E T H O D E S

A/ ANIMAL D'EXPERIENCE - PREPARATION

Les expériences sont réalisées à 20°C sur les fibres musculaires de la patte locomotrice du crabe (*Carcinus maenas*). L'accès aux fibres se fait par simple section d'un méropodite selon le plan passant par les arêtes. La préparation est ensuite placée dans une cuve emplie de solution physiologique constamment renouvelée afin de maintenir constantes les concentrations ioniques extracellulaires. L'examen de la préparation sous loupe binoculaire montre alors les fibres musculaires disposées parallèlement en faisceaux fixés d'une part à la carapace et d'autre part à l'axostyle. Ces fibres ont un diamètre de 200 à 350 µm et une longueur variant entre 3 et 12 mm. Les faisceaux sont conservés en place pour l'enregistrement du potentiel ou du courant membranaire par microélectrodes. Les fibres interrogées répondent à un courant dépolarisant par un PA d'amplitude constante dès que le seuil d'intensité liminaire est atteint, et par une contraction de type phasique (fibres de type I ; ATWOOD, et al. 1965).

B/ SOLUTIONS

1. Solutions isotoniques

La composition ionique des différentes solutions utilisées, exprimée en mM, est consignée au tableau I.

Tableau I

Espèces ioniques Solutions	Cl ⁻	CO ₃ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	TEA ⁺	Ca ⁺	I ⁻	SO ₄ ²⁻	CH ₃ OSO ₃ ⁻	CH ₃ CH ₂ COO ⁻	SITS	Choline
Normale (ASN)	596.7	2.6	515.6	12.9	11.8	23.6	-	-	-	-	-	-	-	-
ASN-TEA	596.7	2.6	457.6	12.9	11.8	23.6	58	-	-	-	-	-	-	-
ASN-Cs (sans K)	596.7	2.6	515.6	-	11.8	23.6	-	12.9	-	-	-	-	-	-
ASN-Cs	596.7	2.6	502.7	12.9	11.8	23.6	-	12.9	-	-	-	-	-	-
ASN-(I-Cs) (sans K)	516.7	2.6	515.6	-	11.8	23.6	-	12.9	80	-	-	-	-	-
ASN-I	516.7	2.6	515.6	12.9	11.8	23.6	-	-	80	-	-	-	-	-
ASN-Faivre en Cl [K] _e = C _e e	25	2.6	515.6	12.9	11.8	23.6	-	-	-	29.3	-	513	-	-
ASN-Faivre en Cl [K] _e · [Cl] _e = C _e e	150	2.6	477.2	51.3	11.8	23.6	-	-	-	-	38.4	384.7	-	-
ASN-I	-	2.6	515.6	12.9	11.8	23.6	-	-	513	23.6	12.9	23.6	-	-
ASN-SITS	596.7	2.6	515.6	12.9	11.8	23.6	-	-	-	-	-	-	5 · 10 ⁻² a 1	-
Chlorure de Choline	596.7	2.6	2.6	-	-	23.6	-	-	-	-	-	-	-	549.5
Chlorure de choline TEA	596.7	2.6	2.6	-	-	23.6	58	-	-	-	-	-	-	491.5

2. Solutions hypertoniques

Les solutions hypertoniques sont obtenues par addition de 1.75 M d'urée aux solutions isotoniques correspondantes (pression osmotique x 2.5).

C/ TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT

1 - Technique du potentiel imposé

Le courant de membrane est enregistré selon la méthode décrite et validée par ADRIAN et al. (1970) et appliquée à la fibre de crabe par BERTRAND et al. (1979).

Trois microélectrodes sont implantées à l'une des extrémités de la fibre. Deux microélectrodes classiques mesurent les potentiels transmembranaires E_1 et E_2 , respectivement aux distances l et $2l$ de l'extrémité de la fibre. La troisième microélectrode, insérée à une distance $2l + l'$, remplie de KCl 3 M et ayant une résistance de l'ordre de 1 à $2 M \Omega$, permet de faire passer à travers la membrane le courant nécessaire au contrôle du potentiel transmembranaire E_1 . Le contrôle de ce potentiel est assuré par un amplificateur opérationnel (B_1) monté en contre réaction. Cet amplificateur permet de disposer d'une tension de sortie allant de 0 à ± 150 V. De même, de façon à bien imposer le potentiel aux bornes de la membrane, un deuxième amplificateur

opérationnel (B_2), monté en contre réaction, permet de maintenir le potentiel extracellulaire au niveau du potentiel de référence en dépit de l'existence de la résistance série située entre la face externe de la membrane et la masse. Le schéma synoptique du montage est donné à la figure 6.

ADRIAN et al. (1970) ont montré que le courant de membrane (I_m) pour un potentiel imposé (E_i) à une distance l de l'extrémité de la fibre est donné par la relation :

$$i_m(\text{A.cm}^{-1}) \approx \frac{2 (E_2 - E_1)}{3 r_i l^2} \quad (1)$$

où E_2 et E_1 sont exprimés en volts ; r_i , qui représente la résistance du milieu intracellulaire, est exprimée en $\Omega.\text{cm}^{-1}$. l est exprimée en cm. i_m est calculée avec une erreur maximale de 5 p. 100 dans la mesure où, en absence de courant entrant régénératif (c'est le cas dans toutes les expériences que nous avons réalisées), le rapport $(E_2 - E_1)/E_1$ est \leq à 6, ce qui correspond à un rapport $l/\lambda \leq$ à 2 (λ , constante d'espace). De plus, pour éviter un comportement de voltage au niveau de E_2 , il est nécessaire que la résistance (R_{ds}) du volume intracellulaire compris dans la demi-sphère de rayon l' , soit faible devant la résistance d'entrée R_e ($R_e = \lambda r_i$; $R_{ds} \approx R_i/2 \pi l'$; R_i est la résistivité du milieu intracellulaire). En particulier, pour éviter ce comportement de voltage, R_e/R_{ds} doit être \geq à 10.

La nécessité que la valeur de R_{ds} soit suffisamment faible devant R_e , donc liée à une valeur adéquate de l' , se justifie puisque la technique de potentiel imposé à l'aide de 3 microélectrodes suppose

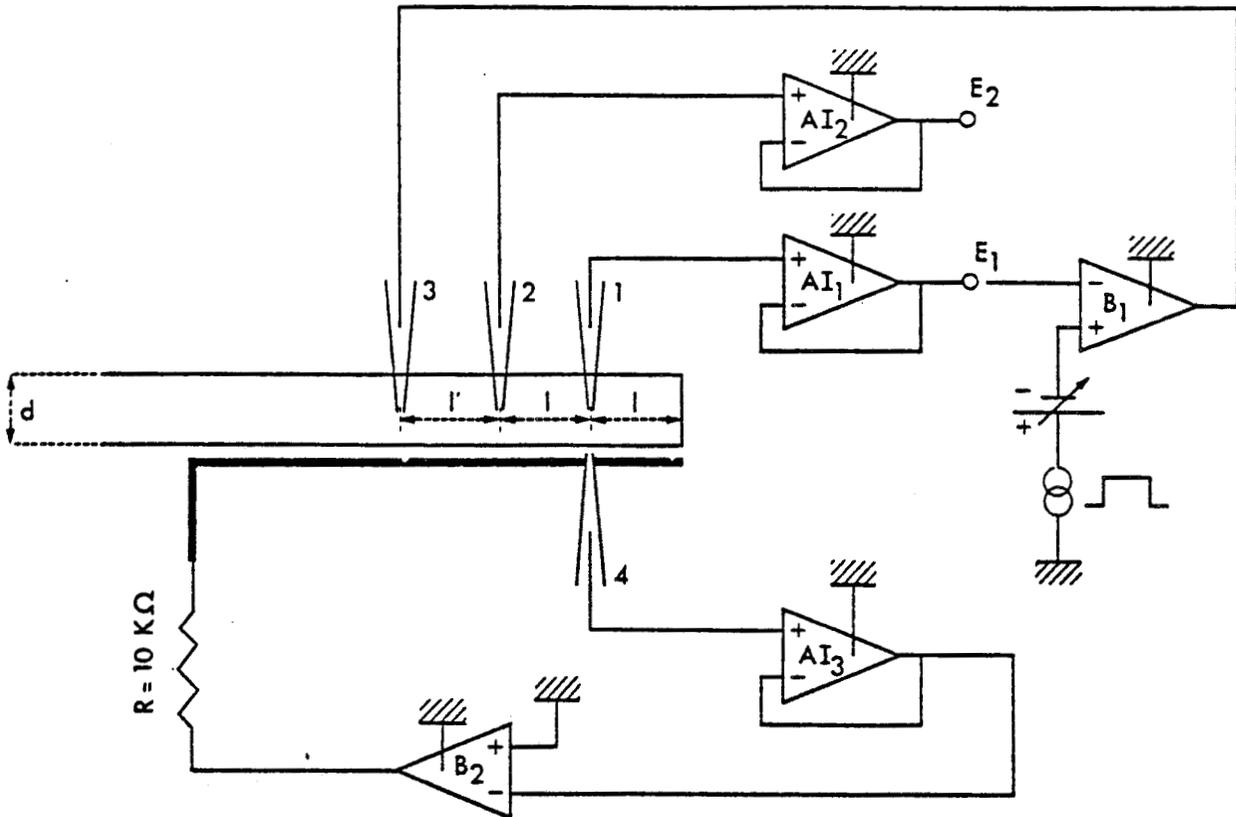


Figure 6

Schéma du montage utilisé pour l'enregistrement du courant de membrane (I_m) dans les conditions de potentiel imposé à l'aide de trois microélectrodes (technique d'ADRIAN et al. 1970).

Les microélectrodes 1, 2, 3 sont implantées respectivement à une distance l , $2l$ et $2l + l'$ de l'une des extrémités de la fibre dont le diamètre (\emptyset) est compris entre 0,020 et 0,035 cm. E_1 (en l), potentiel transmembranaire imposé ; $E_2 - E_1$, différence de potentiel proportionnelle à I_m .

$$I_m (\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}) \approx a_{(\text{cm})} \cdot \frac{(E_2 - E_1) \text{ volts}}{3 R_i (\Omega \cdot \text{cm}) \cdot L^2 (\text{cm})}$$

B_1 , amplificateur opérationnel à contre réaction totale externe, permet le contrôle de E_1

B_2 , amplificateur opérationnel à contre réaction, permet de maintenir le potentiel de la face externe de la membrane au potentiel de référence.

que la théorie du câble soit applicable à la préparation musculaire. Or, il est bien connu que, sur les fibres de crustacés de grand diamètre et en particulier sur celles de crabe, la variation de potentiel produite par le courant imposé localement à l'aide d'une microélectrode ne diminue exponentiellement en fonction de la distance que si l' est suffisamment important ($l' \geq 4/3$ de a , a étant le rayon de la fibre ; FATT et KATZ, 1953).

Sous réserve de respecter les 2 conditions requises ($1/\lambda \leq 2$ en absence de courant entrant régénératif et $l' \geq 4/3$ de a), il est possible d'évaluer le courant de membrane de la fibre squelettique de crabe en potentiel imposé à l'aide de microélectrodes. A partir de l'équation (1), le courant de membrane par unité de surface peut également être évalué, cette équation devient :

$$I_{m(A.cm^{-2})} = \frac{a (E_2 - E_1)}{3 R_i l'^2} \quad (2)$$

(R_i , résistivité du milieu intracellulaire)

2. Techniques de courant imposé

- *Courant imposé à l'extrémité de la fibre (densité de courant homogène - Utilisation de 3 microélectrodes)*. Cette technique est celle décrite et validée par ADRIAN et FREYGANG (1962). Les exigences posées par l'utilisation de cette technique sont les mêmes que celles définies précédemment à propos de la technique de potentiel imposé.

Le schéma synoptique du montage est présenté à la figure 7.

Comme les caractéristiques ultrastructurales de la fibre de crabe en font une préparation propice au développement de phénomènes d'accumulation ou de déplétion d'ions dans les tubules, cette technique a été utilisée en double impulsion. Des courants rectangulaires hyperpolarisants ou dépolarisants (I_2) permettent d'amener la membrane à un potentiel E_1 (potentiel recueilli à une distance l de l'extrémité de la fibre) auquel est testée la résistance de la membrane (r_m). La valeur de r_m est mesurée par la variation de potentiel (ΔE_1) produite par un second courant rectangulaire (I_1) plus faible en amplitude et en durée.

Le courant qui passe à une distance l de l'extrémité est proportionnel à la différence de potentiel $E_2 - E_1$.
 L'amplificateur (B), monté en contre réaction totale, permet de maintenir constant le courant imposé à la membrane par l'intensité de la fibre selon la technique décrite par ADRIAN et FREVYANG en 1962 (à densité de courant homogène).

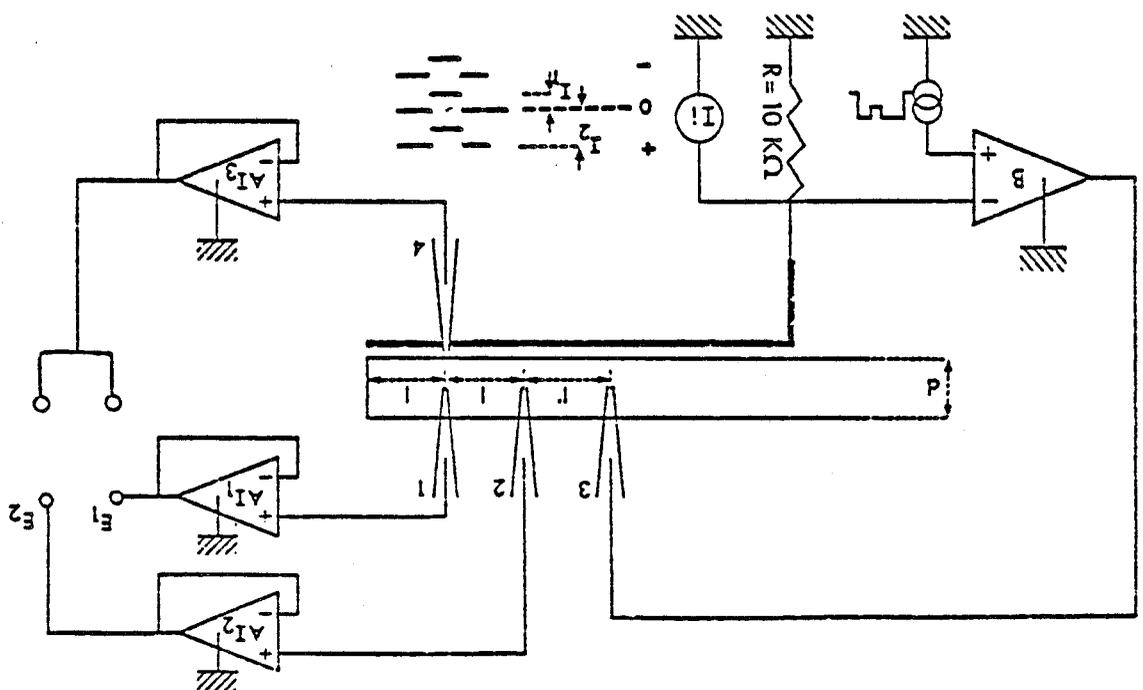


Figure 7

Bien que le générateur de tension utilisé fournisse des créneaux de tension parfaitement rectangulaire, s'il apparaît des variations de résistance non négligeables devant la résistance totale du circuit de "stimulation", la fibre ne sera plus traversée à son extrémité par un courant constant. Or, il est bien connu que la résistance d'une microélectrode peut varier au cours du temps, et ce dans de larges proportions, notamment en fonction du sens et de l'intensité du courant qui la traverse (une microélectrode présente un phénomène de rectification). Afin de s'affranchir de ce problème, le courant total qui passe réellement à travers la membrane peut être contrôlé en mesurant la chute de tension qu'il provoque aux bornes d'une résistance R ($R = 10 \text{ K } \Omega$). Cette tension est comparée à la tension rectangulaire délivrée par le générateur par l'intermédiaire d'un amplificateur opérationnel (B) monté en contre-réaction totale permettant ainsi de compenser toute variation éventuelle du courant. Les conditions sont donc bien ainsi de réelles conditions de courant imposé.

L'imposition du courant à l'extrémité de la fibre (densité de courant homogène) permet, pour toute variation du potentiel à une distance l de l'extrémité de la fibre, d'évaluer le courant qui l'induit. Ce courant est directement proportionnel à la différence de potentiel $E_2 - E_1$. La valeur du courant qui s'écoule à cette distance l , exprimée en A.cm^{-1} , est égale à :

$$i_i = \frac{2 (E_2 - E_1)}{3 r_i l^2}$$

Les termes de cette équation sont les mêmes que ceux donnés pour l'équation (1).

- Courant imposé en milieu de fibre (utilisation de 2 microélectrodes). Comme cela sera montré à la figure 15 page 51 l'emploi de la technique classique de courant imposé n'utilisant que 2 microélectrodes insérées en milieu de fibre (schéma synoptique donné à la figure 8), permet également de tester r_m . Pour les raisons déjà précisées ci-dessus relatives aux phénomènes d'accumulation, cette technique a également été utilisée en double impulsion. Il sera en effet montré que pour une distance interélectrode x (séparant le point d'application du courant du point d'enregistrement du potentiel) égale au diamètre de la fibre, l'amplitude du courant qui passe à travers la membrane est indépendante du potentiel membranaire.

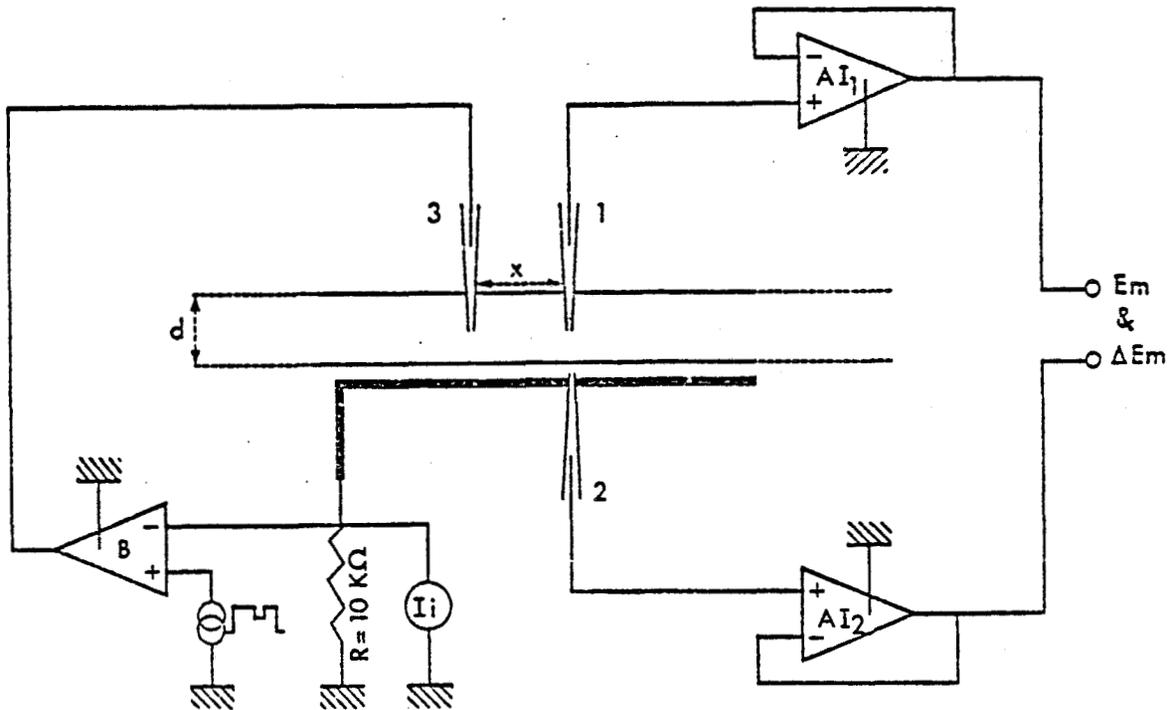


Figure 8

Schéma du montage utilisé lors de l'enregistrement du potentiel transmembranaire E_m et de ses variations induites par des courants rectangulaires dépolarisants ou hyperpolarisants.

Les microélectrodes (1) et (2) permettent l'enregistrement de E_m et ΔE_m . La microélectrode (3) permet d'imposer le courant. Ce courant est maintenu constant grâce à l'amplificateur opérationnel (B) monté en contre réaction totale.

La distance x qui sépare les électrodes (1) et (2) est égale au diamètre (d) de la fibre.

R E S U L T A T S

CHAPITRE I

COMPARAISON DES RESULTATS ENREGISTRES EN CONDITIONS
DE POTENTIEL IMPOSE ET DE COURANT IMPOSE

Etudier la conductance de rectification dans le sens entrant sur la fibre de crabe impose de s'affranchir de certains problèmes. En effet, cette préparation présente un STT développé et des invaginations longitudinales profondes du sarcolemme. Ces caractéristiques ultrastructurales en font une préparation particulièrement propice au développement de phénomènes d'accumulation ou de déplétion d'ions aux faces des membranes. De plus, le phénomène de rectification est sinon sensible à la concentration interne de l'ion portant le courant de rectification, du moins sensible à sa concentration externe. Les conductances de rectification étant principalement localisées au niveau des membranes du STT, celles-ci sont donc particulièrement sensibles aux variations des concentrations ioniques dans les tubules. Compte-tenu de la structure particulière de la préparation utilisée, il est donc apparu indispensable de rechercher la technique la plus adéquate pour étudier le phénomène de rectification dans le sens entrant.

A/ EVALUATION DE LA CONDUCTANCE DE MEMBRANE A PARTIR DE LA RELATION
COURANT-POTENTIEL

Dans ce paragraphe, il est vérifié que sur des fibres placées dans un milieu de même composition ionique, les relations courant-potentiel obtenues en conditions de potentiel ou de courant imposé sont similaires.

1. Conditions de potentiel imposé (E_i)

Des potentiels (E_i) hyperpolarisants et dépolarisants sont appliqués à la membrane de fibres successivement placées dans un milieu "chlorure de choline" puis dans ce même milieu contenant du TEA (58 mM) (Fig. 9 a-b). L'utilisation du milieu "chlorure de choline" permet de pallier aux différentes manifestations intervenant en milieu de référence lors de dépolarisations importantes. Ces manifestations sont liées à l'activation du courant entrant calcique qui entraîne, d'une part l'apparition du phénomène contractile, et d'autre part l'impossibilité d'imposer un potentiel uniforme à la membrane (notamment au niveau du STT). Cette mauvaise imposition du potentiel se traduit par des oscillations du courant de membrane enregistré (KEYNES et al., 1973, sur la fibre de balane et BERTRAND et al., 1979, sur celle de crabe).

Bien que les ions K^+ soient absents du milieu extracellulaire, le phénomène de rectification dans le sens entrant subsiste comme en atteste la relation $I_m = f(E_i)$ présentée à la figure 10. La courbe a

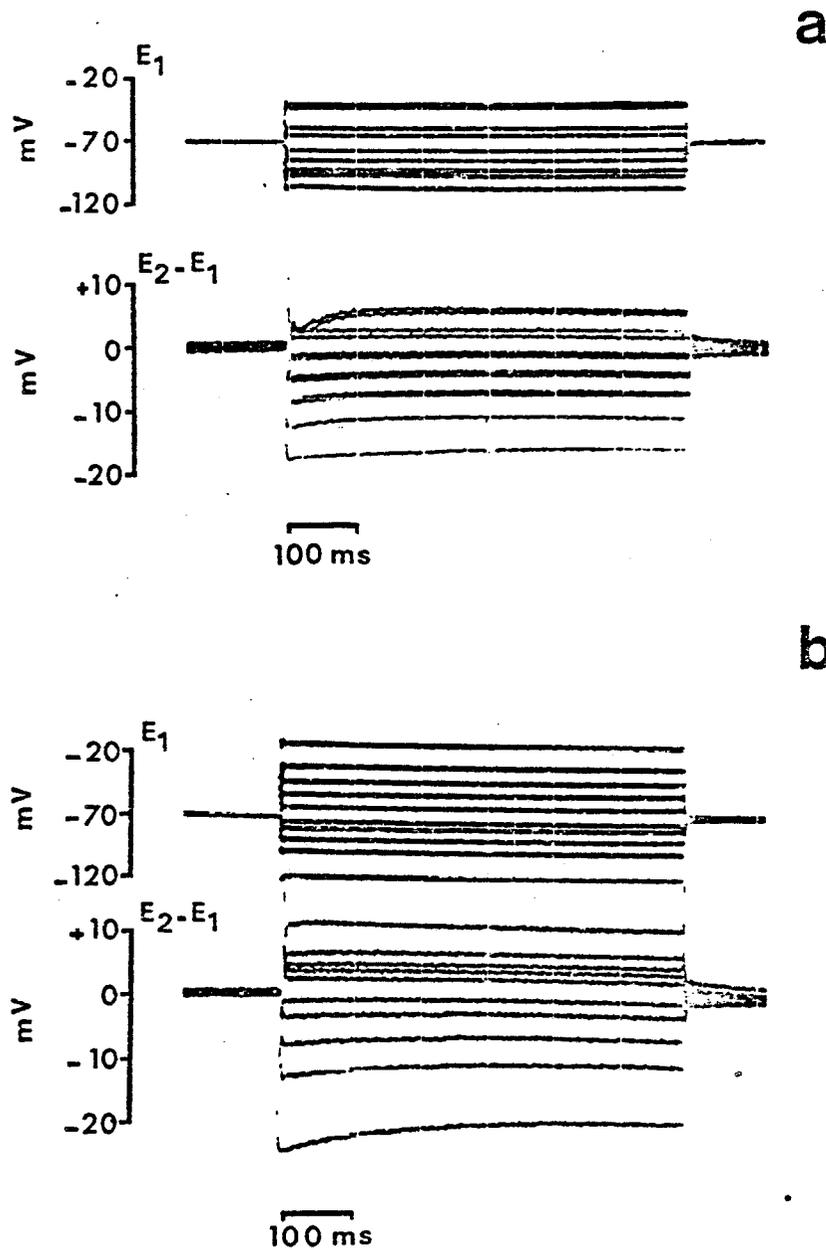


Figure 9 a-b

Conditions de potentiel imposé. Tracés du potentiel membranaire E_1 et du courant de membrane I_m exprimé en termes de différence de potentiel $E_2 - E_1$ (HP = -70 mV, $E_h = -70$ mV).

a : Fibre placée en solution "chlorure de choline"

b : Effet du TEA (58 mM) remplaçant mM à mM une partie des ions choline de la solution. L'enregistrement a été effectué après 30 mn d'action de ce milieu.

La différence $E_2 - E_1$ est proportionnelle à I_m à moins de 5 p. 100 puisque $l/\lambda = 0,54$ et donc très inférieur à 2 pour $E_1 = -110$ mV ($l = 0,0300$ cm, $l' = 0,0250$ cm, $\phi = 0,0275$ cm).

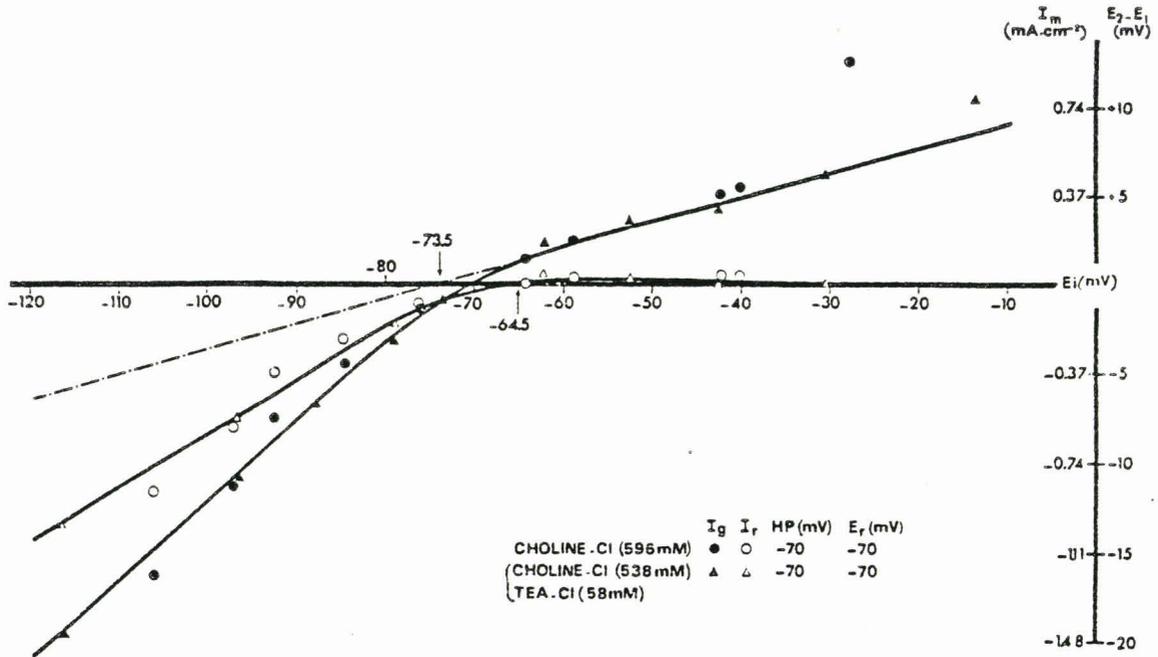


Figure 10

Relation courant-potentiel construite à partir des tracés de courants obtenus en voltage imposé (mesures faites en fin d'impulsion : 600 ms). Les tracés utilisés sont ceux de la figure 9.

- ▲ courant total I_g
- △ courant de rectification I_r

Les courbes $I_g = f(E_i)$ et $I_r = f(E_i)$ ont été tracées à partir de l'équation d'un polynôme ne prenant en compte que les points expérimentaux obtenus pour $-120 < E_i \text{ (mV)} \leq -40$ (gamme de potentiels dans laquelle le phénomène de rectification dans le sens entrant, se développe).



été tracée à partir de l'équation d'un polynôme où seuls sont pris en compte les points expérimentaux qui traduisent le phénomène de rectification dans le sens entrant ($-100 \text{ mV} < E_i < -40 \text{ mV}$). Les différentes valeurs de I_m (A.cm^{-2}) sont calculées à partir de l'équation proposée par ADRIAN et al. (1970) :

$$I_m (\text{A.cm}^{-2}) = a_{(\text{cm})} \cdot (E_2 - E_1) (\text{V}) / 3 R_i (\Omega.\text{cm}) \cdot l^2 (\text{cm})$$

où a est le rayon de la fibre, R_i la résistivité du milieu intracellulaire et l la distance entre les électrodes 1 et 2 (voir techniques page 29).

La conductance membranaire* (g_m) atteint sa valeur maximale pour $E_i < -90 \text{ mV}$. Au potentiel -40 mV , les conductances de rectification g_{re} (sens entrant) et g_{rs} (sens sortant) sont minimales ($g_m = g_f$). A ce potentiel, la pente de la relation $I_m = f(E_i)$ permet donc de calculer la valeur de g_f et, par extrapolation, de déterminer celle du

* La pente de la relation courant-potentiel correspond à ce que les auteurs anglo-saxons appellent la "slope conductance" ce qui ne traduit pas toujours la vraie valeur de la conductance membranaire. C'est en fait la "chord conductance" qui permet d'obtenir cette dernière. Cependant, l'étude théorique (annexe 1) révèle qu'au potentiel -40 mV (ou g_{re} et g_{rs} sont nulles), la "slope conductance" est égale à la "chord conductance". Il en est de même pour les potentiels très négatifs ($E_i < -90 \text{ mV}$) où g_{re} atteint sa valeur maximale.

potentiel d'inversion du courant de fuite ($E_f = -73,5$ mV). Le courant de rectification (I_{re}) peut être estimé en soustrayant le courant de fuite (I_f) du courant membranaire global (I_m) pour chaque valeur de E_i . La relation $I_{re} = f(E_i)$ ainsi obtenue (Fig. 10) montre que I_{re} est négatif au potentiel de repos (E_r) et que ce courant s'inverse pour un potentiel E_x de $-64,5$ mV. Ayant déterminé E_f et E_x , la relation $I_m = f(E_i)$ permet de calculer g_{re} et g_f par l'intermédiaire de l'équation :

$$I_m = \underbrace{g_{re}(E_i - E_x)}_{I_{re}} + \underbrace{g_f(E_i - E_f)}_{I_f}$$

En effet, en supposant I_f varier linéairement en fonction de E_i , comme I_{re} est égal à $I_m - I_f$, il vient alors :

$$I_{re} = g_{re}(E_i - E_x)$$

Traités ainsi, les résultats expérimentaux de la figure 9 donnent une relation $g_{re} = f(E_i)$ complexe, différente de la relation sigmoïde obtenue sur diverses préparations, en particulier l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1976, 1977) et la fibre de grenouille (HUTTER et WILLIAMS, 1979)

Cependant, déterminée à partir d'une technique différente (paragraphe B), la relation liant g_{re} au potentiel décrit également une sigmoïde. Selon toute vraisemblance, E_x qui est considéré avoir une valeur constante dans l'équation ci-dessus doit en fait varier

lorsque des potentiels très hyperpolarisants sont appliqués à la membrane. Cela suppose que pour toute valeur de E_i différente de E_r , il se développe des phénomènes d'accumulation ou de déplétion d'ions dans les invaginations du sarcolemme et la lumière tubulaire. Ceci est d'ailleurs confirmé par les enregistrements présentés à la figure 9 où il apparaît nettement que la valeur du courant (dont $E_2 - E_1$ est l'image) diminue en fonction du temps pour les potentiels très hyperpolarisants. Il s'agit bien en effet de la manifestation d'un phénomène d'accumulation ou de déplétion d'ions car comme cela est montré à la figure 12 (paragraphe B), la rectification dans le sens entrant observé sur la fibre de crabe n'est pas dépendante du temps.

Le développement de ce type de phénomène n'est pas pour surprendre. En effet, sur la fibre de balane (préparation présentant également un STT très développé) KEYNES et al. (1973) observent que lors de dépolarisations imposées permettant une activation maximale du courant dynamique sortant, le potentiel d'inversion de ce courant passe en 800 ms de - 69 mV à - 13 mV. Il est donc nécessaire d'évaluer E_x pour chaque valeur de E_i si l'on cherche à déterminer g_{re} en fonction du potentiel à partir de l'équation $I_{re} = g_{re} (E_i - E_x)$. Cependant, la technique de double impulsion (technique généralement utilisée pour déterminer E_x) ne nous a pas permis d'obtenir des résultats très satisfaisants. Le temps requis pour une telle expérimentation est en effet relativement long en raison du nombre important de mesures à effectuer.

Notre souci est, en fait, de pouvoir comparer le phénomène de rectification dans le sens entrant sur des fibres placées en conditions ioniques diverses. Cela nous a conduit à rechercher une technique qui permette à la fois de s'affranchir du phénomène d'accumulation et qui soit cependant plus simple à mettre en oeuvre que celle du potentiel

imposé. Ainsi, la technique de courant imposé en double impulsion a été préférée à celle du potentiel imposé. L'utilisation de cette technique permet en effet de suivre l'évolution de g_m (exprimée en unités arbitraires) en fonction du potentiel à partir de mesures directes de la résistance membranaire (r_m) réalisée pour différents potentiels (voir paragraphe B).

Au préalable, nous nous sommes assurés que les relations courant-potentiel obtenues en condition de potentiel et de courant imposé étaient similaires. De plus, nous nous sommes affranchis du problème relatif à la densité de courant homogène posé par l'utilisation de la technique de courant imposé.

2. Conditions de courant imposé (I_i)

La relation $I_i = f(E_m)$ présentée à la figure 11 a été établie à partir des variations du potentiel produites en fin d'impulsion par le passage à travers la membrane de courants constants hyperpolarisants ou dépolarisants. La technique utilisée est celle qui consiste à insérer 2 microélectrodes en milieu de fibre (voir chapitre technique, Fig. 8). Comme précédemment (Fig. 9 et 10), la fibre est ici placée en milieu "chlorure de choline". Au potentiel - 40 mV la pente de la relation $I_i = f(E_m)$ (Fig. 11) traduit la valeur de g_f ("slope conductance" = "chord conductance"). Le potentiel d'inversion E_f du courant de fuite obtenu par extrapolation est de valeur légèrement plus négative que E_r . Cela suppose donc qu'au repos (où $I_m = 0$), I_f est positif et I_r négatif. Ainsi, comme dans les conditions de po-

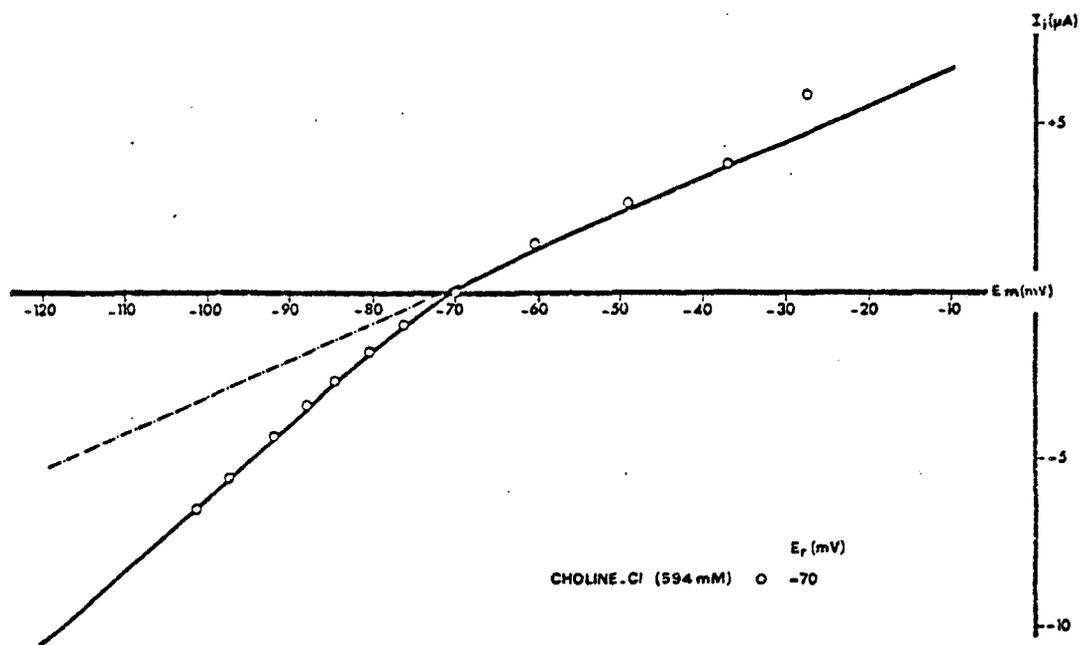


Figure 11

Relation courant-potentiel établie à partir d'enregistrements réalisés en conditions de courant imposé (technique des 2 microélectrodes insérées en milieu de fibre).

La courbe $I_i = f(E_m)$ est tracée à partir de l'équation d'un polynôme ne prenant en compte que les points expérimentaux qui s'inscrivent dans la gamme des potentiels où le phénomène de rectification dans le sens entrant se développe.

tentiel imposé, la valeur de E_x est plus positive que celle de E_r .

La courbe liant les points expérimentaux a été tracée selon le même principe que lors de l'expérience présentée à la figure 7 ; les valeurs expérimentales correspondant aux potentiels moins négatifs que - 40 mV n'ont donc pas été prises en compte. L'équation proposée par COLE et

CURTIS (1941) permet d'exprimer I_m en $A.cm^{-2}$:

$$I_m(A.cm^{-2}) = \left[R_i(\Omega.cm) / 8 \pi^2 a^3 (cm) \right] I_i(A) (dI_i/dE_m) (\Lambda/V)$$

où I_i est la valeur du courant imposé ; dI_i/dE_m la dérivée du courant par rapport au potentiel (pente de la relation ou "slope conductance") ; R_i la résistivité du milieu intracellulaire et a le rayon de la fibre.

Cependant, cette dernière équation ne permet le calcul de I_m que dans la mesure où la constante d'espace (λ) est petite devant la longueur (L_f) de la fibre d'une part et grande devant son diamètre (2a) d'autre part. Sur la fibre de crabe, si la première condition requise est satisfaite ($0,04 < \lambda_{(cm)} < 0,18$ $L_{f(cm)} \simeq 0,7$ et $a_{(cm)} \simeq 0,02$), la seconde ne l'est pas forcément. En effet, comme le montrent FATT et KATZ (1953) sur cette même préparation, le potentiel électrotonique des fibres ne diminue exponentiellement en fonction de la distance x inter-électrode que pour une valeur de x supérieure à $4/3$ de a . Ceci traduit en fait un éparpillement du courant de polarisation au voisinage de l'électrode de courant non seulement selon la longueur de la fibre, mais selon la circonférence (ce problème sera traité plus en détail au paragraphe B). De plus, si l'on considère que la relation liant g_{re} à E_m sur la fibre de crabe est une relation sigmoïde comme sur la fibre de grenouille (HUTTER et WILLIAMS, 1979) ou l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1976), alors g_m ne correspondra à la dérivée de la courbe courant-potentiel (Fig. 11) que pour $E_m < -90$ mV et $E_m = -40$ mV. L'analyse mathématique justifiant ce dernier point est donnée en annexe 1.

Quoiqu'il en soit, les courbes courant-potential obtenues en conditions de potentiel imposé ou de courant imposé se révèlent être identiques si l'on s'en réfère à la valeur du coefficient de corrélation liant les courbes présentées aux figures 10 et 11 ($R=0.995 \rightarrow p < .001$ avec $n = 18$). De même, comme en attestent les valeurs portées au tableau II, g_m et g_{re} exprimés en $\text{U} \cdot \text{cm}^{-2}$ obtenues dans ces conditions sont comparables.

Tableau II

	Expérience réalisée en potentiel imposé (fibre de la figure 10)		Expérience réalisée en courant imposé (fibre de la figure 11)	
	- 120	- 40	- 120	- 40
$E_m(\text{mV})$	- 120	- 40	- 120	- 40
$G_m(\text{m} \text{U} \cdot \text{cm}^{-2})$	32,4	10,8	36,3	18,1
$R_m(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	30,8	93	27,5	55,2
$G_{re}(\text{m} \text{U} \cdot \text{cm}^{-2})$	21,6	0	18,2	0
$R_{re}(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	46,3	∞	55	∞

En conclusion, la similitude des 2 relations signifie que la variation de E_x en fonction du potentiel, ainsi que la valeur de E_f , sont identiques quelle que soit la technique utilisée.

B/ EVALUATION, EN COURANT IMPOSE, DE LA CONDUCTANCE MEMBRANAIRE A PARTIR DE MESURES RELATIVES DE r_m A DIFFERENTS POTENTIELS

1. Mise en équation de la relation $g_m = f(E_m)$

Les tracés présentés à la figure 12 donnent un exemple de la variation du potentiel "électrotonique" (ΔV) consécutive au passage à travers la membrane d'un courant rectangulaire (I_1) de très faible amplitude. Un courant constant plus durable (I_2) variable en amplitude, permet d'amener la membrane aux différents niveaux de potentiel auxquels r_m est testée. Comme le montrent ces tracés, r_m ne varie pas en fonction du temps.

La Figure 13 représente l'évolution de g_m donnée en unités arbitraires (u.a.) en fonction de E_m pour une fibre placée en milieu "chlorure de choline". g_m passe par une valeur minimale pour $E_m = -40$ mV et atteint sa valeur maximale pour $E_m < -90$ mV. Partant de l'équation $g_m = g_{re} + g_f$ et puisque g_m est minimum à -40 mV ($g_{re} = 0$), $g_m (-40$ mV) est assimilable à g_f . Le potentiel de repos moyen de la fibre de crabe est de -68 mV selon FATT et KATZ (1953). De ce fait, $g_m (-68$ mV) a été arbitrairement considérée égale à 1^* pour toutes les fibres testées.

* Ceci présente l'avantage de pouvoir exprimer l'évolution de la conductance en $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ en fonction du potentiel dans la mesure où FATT et KATZ (1953) donnent g_m moyen égal à $9,1 \text{ m } \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ pour E_r moyen égal à -68 mV.

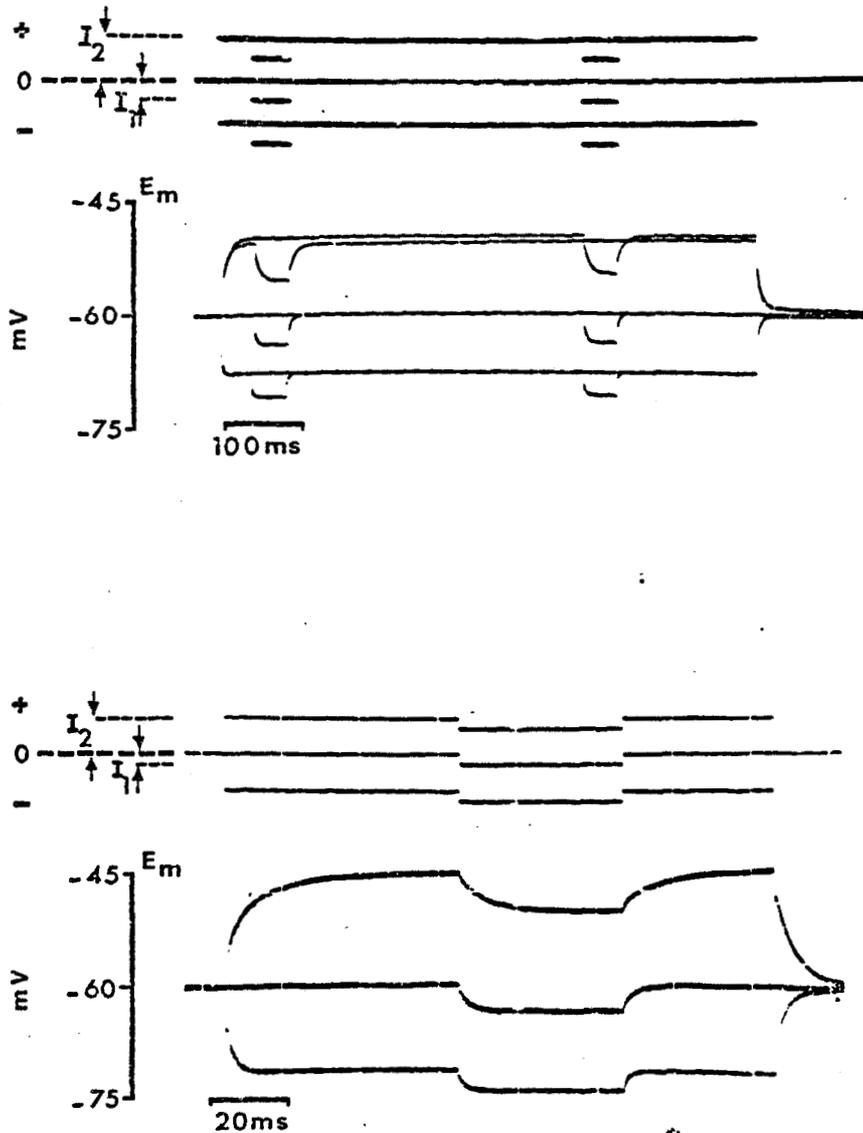


Figure 12

Exemples de tracés d'enregistrement du potentiel "électrotonique" produit par des courants rectangulaires imposés.

r_m est déterminée par la variation de potentiel (ΔE_m) produite par un courant (I_1), faible en amplitude et en durée. Un second courant (I_2), plus durable, permet d'amener la membrane aux différents niveaux de potentiel (E_m) auxquels est testée r_m .

Il est à remarquer que la conductance membranaire ne varie pas en fonction du temps, et ce, quelle que soit la valeur de E_m .

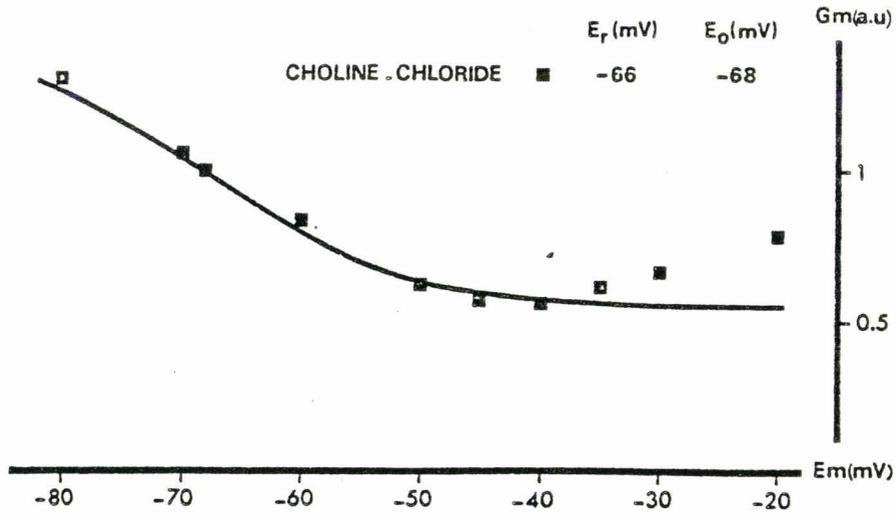


Figure 13

Conductance membranaire (g_m) en fonction du potentiel (E_m) pour une fibre baignée par une solution de "chlorure de choline".

g_m est donnée en unités arbitraires, et $g_m(-68 \text{ mV}) = 1$. La courbe en trait plein est tracée à partir de l'équation 3, équation qui ne rend compte que du seul phénomène de rectification dans le sens entrant ; c'est la raison pour laquelle la courbe s'éloigne des points expérimentaux pour $E_m > -40 \text{ mV}$.

La fonction $g_m = f(E_m)$ suit une relation sigmoïde dont l'expression proposée est :

$$g_m = g_f + \frac{\bar{g}_{re}}{1 + \exp((E_m - E_0)/K)} \quad (3) \quad \text{où}$$

g_f est la conductance de fuite ; g_{re} la conductance de rectification dans le sens entrant et dont la valeur maximale (\bar{g}_{re}) est atteinte pour $E_m \leq -90 \text{ mV}$; E_0 le potentiel de membrane pour lequel $g_{re} = \bar{g}_{re} / 2$ et K un paramètre de mise en forme ayant les dimensions d'un potentiel ($K \approx 8,5 \text{ mV} \approx \frac{RT}{3F}$).

Cette relation a été établie à partir de mesures réalisées en conditions de courant imposé ; les microélectrodes 3 (courant) et 1 (potentiel) étant implantées au milieu de la fibre (voir schéma technique, Fig. 8). Ce point de technique soulève le problème de la validité de la relation proposée ci-dessus. En effet, sur la fibre de crabe, il y a "échappement" à la théorie du cable si la distance x qui sépare les électrodes 3 et 1 est inférieure au diamètre de la fibre. Ainsi, alors qu'il est nécessaire d'implanter l'électrode 1 le plus près possible de l'électrode 3 sur la fibre de vertébré, une telle disposition des électrodes entraîne un comportement de voltage au niveau de l'électrode 1 sur la fibre de crabe. Pour cette raison, il a été choisi d'implanter l'électrode 1 à une distance x (x est égale au diamètre de la fibre) de l'électrode 3. En fait, la relation $g_m = f(E_m)$ obtenue dans ces conditions ne rend réellement compte du phénomène de rectification dans le sens entrant que si le courant I_1 qui traverse la membrane au niveau de l'électrode 1 est constant quelle que soit la valeur du potentiel en ce point. En effet, les mesures relatives de r_m sont obtenues à partir de la relation :

$$(\Delta V / I_1) / (\Delta V^* / I_1) = \Delta V / \Delta V^* \quad (4)$$

avec ΔV^* pris égale à 1 (soit $\Delta V^* = \Delta V_{(-68 \text{ mV})}$)

Il est donc apparu nécessaire de vérifier si la relation sigmoïde obtenue dans ces conditions rend compte de l'évolution réelle de g_m en fonction de E_m .

2. Expériences réalisées à densité ou non de courant homogène, comparaison des relations $g_m = f(E_m)$ obtenues.

- Une technique de courant imposée utilisant 3 microélectrodes implantées à l'extrémité de la fibre (ADRIAN et FREYGANG, 1962 ; Fig. 7) permet d'établir une relation courant-potentiel (non représentée). Cette relation est similaire à celles obtenues en potentiel imposé (Fig. 10), et en courant imposé en milieu de fibre (Fig. 11). Afin de s'affranchir des phénomènes d'accumulation, cette technique de courant imposé utilisant 3 microélectrodes a également été utilisée en double impulsion. Les mesures de r_m déterminées à courant constant sont incontestablement réalisées à densité de courant homogène. La valeur de g_m peut dès lors être calculée pour chaque valeur du potentiel (E_m) auquel est amenée la membrane. L'allure de la relation est de type sigmoïde (Figure 14).

- Technique de courant imposé n'utilisant que 2 électrodes implantées en milieu de fibre. La relation $g_m = f(E_m)$ obtenue à partir de cette technique (Fig. 13 et 17...) est la même que celle obtenue ci-dessus à densité de courant homogène (Fig. 14) ; la valeur du coefficient de corrélation ($r = .998 \rightarrow P < .001$) liant les courbes en atteste.

La similitude des résultats obtenus dans ces deux conditions laisse supposer qu'en courant imposé avec 2 microélectrodes, le courant qui passe à travers la membrane au niveau de l'électrode de mesure du potentiel est constant. Cela a réciproquement été vérifié en mesurant l'image du courant passant à travers la membrane au niveau de l'électrode d'enregistrement du potentiel (Fig. 15). En effet, le courant total ($I_1 + I_2$, voir techniques Fig. 7) appliqué à la membrane à l'aide d'une

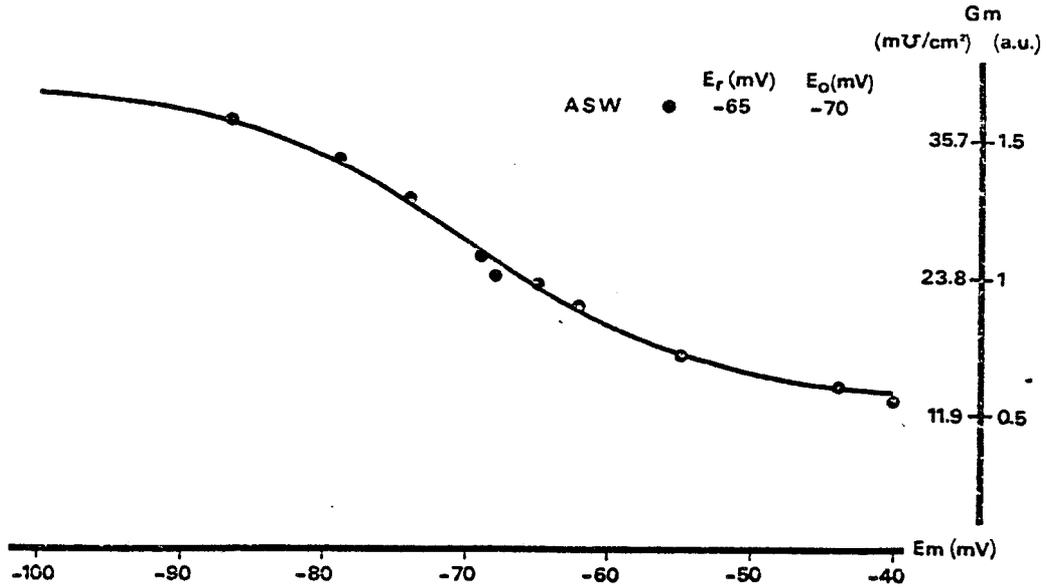


Figure 14

Relation $G_m = f(E_m)$ établie dans les conditions de courant imposé (densité de courant homogène) sur une fibre placée en milieu de référence. G_m est exprimée en mU/cm^2 ou en unités arbitraires (a.u.) ($G_m(a.u.) = 1$ pour $E_m = -68$ mV).

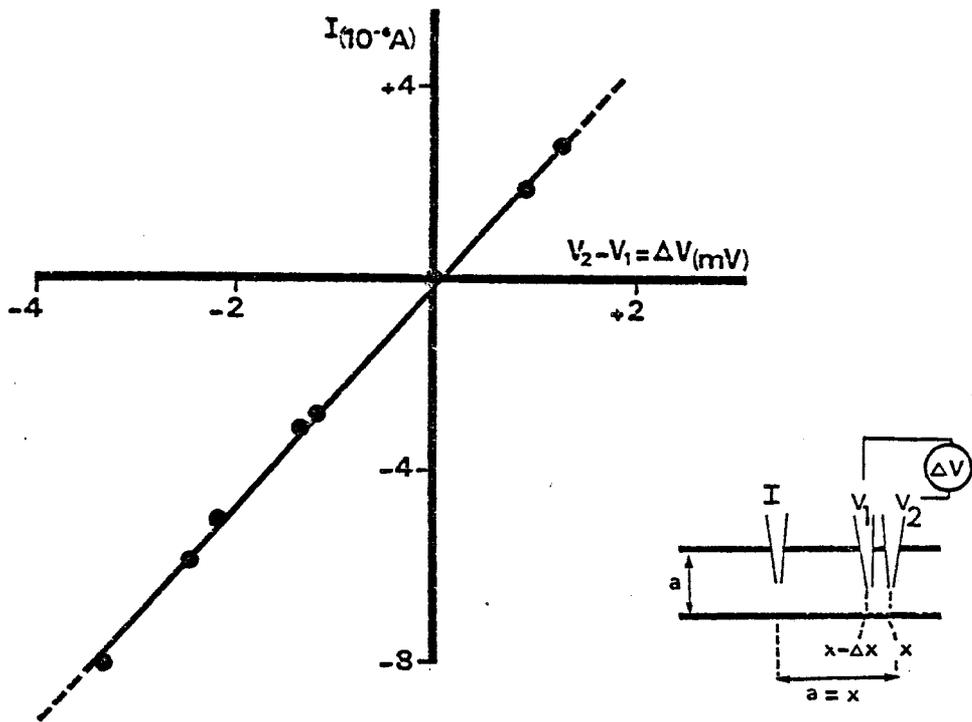


Figure 15

Relation linéaire liant le courant imposé délivré par le générateur (I_x) à l'image du courant (" ΔV ") passant à travers la membrane à une distance x ($x =$ diamètre de la fibre) de son point d'application (" ΔV " est égale à dV/dx).



microélectrode insérée au milieu de la fibre est directement proportionnel à la différence de potentiel $V_2 - V_1$ ($V_2 - V_1 = \Delta V$, Fig. 15). Si les 2 électrodes qui mesurent les potentiels V_1 et V_2 sont très proches l'une de l'autre (Δx), ΔV est l'image du courant traversant la membrane à la distance x de l'électrode de courant. Comme x est choisie égale à un diamètre, la relation linéaire illustrée à la figure 15 implique que le courant qui passe en x est indépendant du niveau de polarisation membranaire. Ainsi, les variations de potentiel en x induites par le courant I_1 traduisent directement la variation *réelle* de la résistance de la membrane.

Cette deuxième technique, plus simple à mettre en oeuvre et surtout moins stressante pour la préparation (2 électrodes sont implantées au lieu de 3) a par conséquent été utilisée pour la suite de l'expérimentation.

CHAPITRE II

NATURE IONIQUE DU COURANT DE RECTIFICATION

DANS LE SENS ENTRANT

Le phénomène de rectification dans le sens entrant traduit le développement d'un courant dynamique (dépendant du potentiel) qui, du point de vue "électrique", est dirigé vers l'intérieur de la fibre. Ce courant, porté par des ions, peut correspondre soit à une entrée de charges positives (cations : K^+ , Na^+) soit à une sortie de charges négatives (anions : Cl^-).

Le phénomène de double rectification (sens entrant et sortant) mis en évidence sur la fibre de grenouille (KATZ, 1949 ; ADRIAN, 1964), la fibre de Purkinje (STANFIELD, 1970), l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1977), induit des mouvements d'ions K^+ . Ces courants sont réduits par divers cations dont le Rb, le Cs ou le TEA. A l'inverse, les résultats obtenus sur les fibres squelettiques de crabe (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974) tendent à montrer que les courants de rectification observés sur cette préparation pourraient ne pas être portés par des ions K^+ mais plutôt par des ions Cl^- .

L'étude entreprise concernant la nature ionique du phénomène de rectification a fait appel à 2 approches classiques : (i) modification de la concentration externe de l'ion supposé porter le courant de rectification, (ii) utilisation d'inhibiteurs spécifiques du canal par où passe l'espèce ionique considérée.

A/ RELATION $g_m = f(E_m)$ OBTENUE SUR 6 FIBRES PLACÉES EN MILIEU DE
 REFERENCE (ASW)

Les résultats expérimentaux obtenus sur six fibres immergées en milieu de référence sont présentés à la figure 16 . Les différentes courbes traduisent la relation $g_{re} = f(E_m)$ pour chacune des six fibres. L'expression mathématique qui traduit cette relation est :

$$g_{re} = f(E_m) = 1 / \left[1 + \text{Exp} \left((E_m - E_o) / K \right) \right] \quad (5)$$

$$(\bar{g}_{re} = 1)$$

Seule la valeur de E_o est propre à chaque fibre ce qui explique que les courbes ne soient pas confondues, par contre la valeur du facteur K est constante ($K \approx 8,5 \text{ mV} \approx RT/3F$). Cette équation est identique à celle proposée par HAGIWARA et al. (1976 et 1977) ou par HUTTER et WILLIAMS (1979) pour rendre compte du phénomène de rectification dans le sens entrant respectivement sur l'oeuf d'étoile de mer et la fibre squelettique de grenouille. La figure 16 montre que $g_{re(-40 \text{ mV})}$ est faible mais non nulle. Ceci s'explique par le fait que g_{re} est déterminé à partir de l'équation $g_m = g_f + g_{re}$. En effet, la détermination de g_f sur une fibre placée en milieu de référence ne peut se faire qu'en extrapolant g_m au potentiel -40 mV . g_m ne peut en effet être directement mesurée à ce potentiel car le seuil moyen de potentiel d'activation du courant régénératif (I_{ca}) conduisant au couplage excitation-contraction est de -44 mV environ (valeur identique à celle

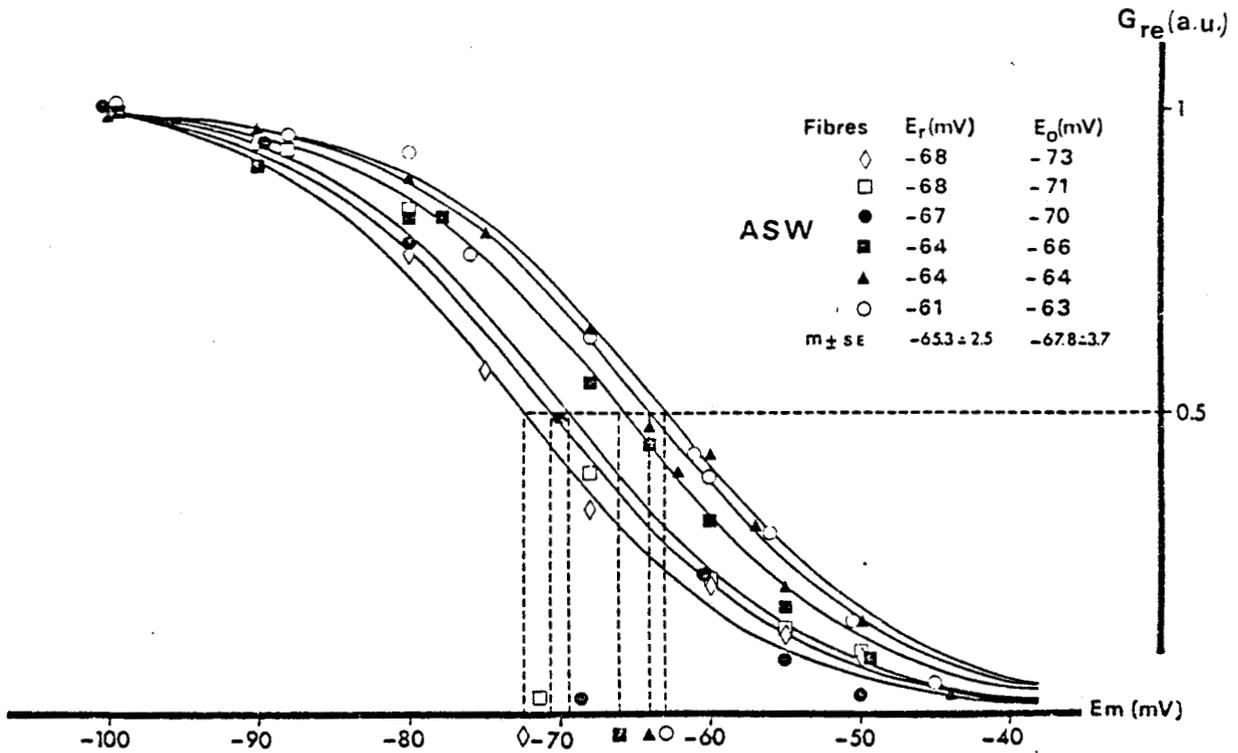


Figure 16

Relations liant g_{re} "normalisée" au potentiel de membrane E_m .

Les différents symboles correspondent aux points expérimentaux obtenus sur chacune des 6 fibres testées en solution de référence (ASW). Les courbes en trait plein sont tracées à partir de l'équation (5). ΔE ($E_r - E_0$), bien que particulier à chacune des fibres, varie peu.

donnée par ATWOOD et al., 1965). En conséquence, au-delà de ce seuil, le phénomène de rectification dans le sens entrant est d'une part perturbé par l'activation de g_{Ca} et d'autre part par la contraction qui en résulte ; ceci conduit à une sortie des microélectrodes.

Cependant, dans le cas où la préparation est placée en milieu "chlorure de choline" (I_{Ca} absent) (Fig. 13), il apparaît que c'est bien au voisinage du potentiel -40 mV que g_m atteint sa valeur minimale. Quoiqu'il en soit, il est manifeste que l'équation (3) rend compte de l'évolution de g_{re} en fonction du potentiel aussi bien pour les fibres placées en milieu de référence (Fig. 16) que pour celles placées en milieu "chlorure de choline" (Fig. 13).

B/ EFFETS DES INHIBITEURS SPECIFIQUES CLASSIQUEMENT UTILISES POUR
INHIBER LE COURANT DE RECTIFICATION PORTE PAR LES IONS K^+ .

1. Effets du TEA

Les résultats présentés à la figure 17 montrent que l'apport de 58 mM de TEA (tétraéthyl-ammonium) dans le milieu extracellulaire de référence est sans effet sur la relation liant g_m au potentiel. Cependant, si g_{re} n'est pas altérée, g_f est quelquefois légèrement diminuée (20 p. 100 au maximum). Le PA obtenu en fin d'expérience sur la fibre ayant permis d'établir la relation de la figure 17 présentait un "overshoot". Ceci atteste de l'efficacité du TEA sur le courant dynamique sortant et confirme donc les résultats obtenus en TEA en conditions de potentiel imposé (Fig. 9) où g_{rs} est réduite cependant que g_{re} n'est pas affectée.

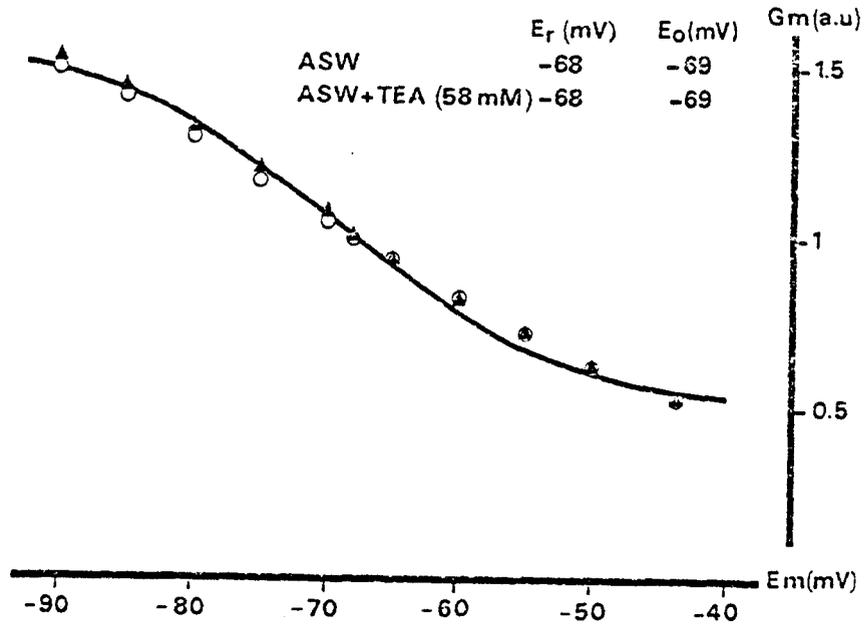


Figure 17

Relation liant g_m à E_m pour une fibre placée en milieu de référence (o, ASW) puis après 30 mn de traitement par le TEA (\blacktriangle , 58 mM).

L'ensemble de ces résultats est en accord avec ceux obtenus par HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974) sur cette même préparation, mais différent de ceux observés sur la fibre squelettique de vertébré (ADRIAN, 1969 ; STANFIELD, 1970).

2. Effets des ions Cs^+

Les résultats illustrés à la figure 18 sont ceux obtenus sur une fibre placée en milieu de référence dans lequel 12,9 mM de Na-Cl

sont remplacés par 12,9 mM de Cs-Cl. La présence d'ions Cs^+ dans le milieu extracellulaire n'entraîne aucune variation de E_r . De même, la relation liant g_m à E_m reste inchangée.

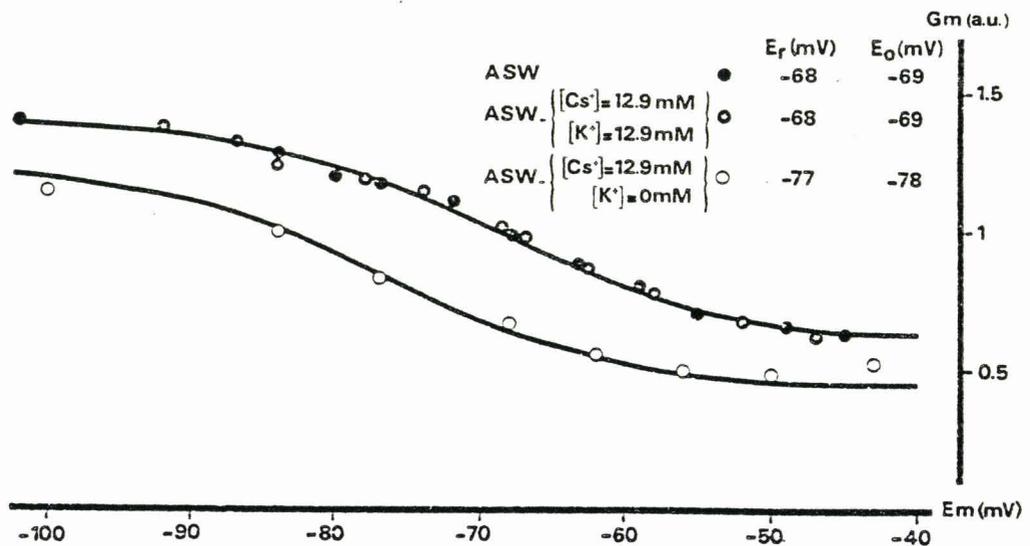


Figure 18

Relation liant g_m à E_m sur une fibre placée en solution de référence (\bullet , ASW), puis après remplacement de 12,9 mM des ions Na^+ de ce milieu par des ions Cs^+ (\circ , Cs- K_1 , 30 mn). Enfin, les ions Cs^+ (12,9 mM) sont substitués aux ions K^+ de la solution de référence (\circ , Cs- K_0 , 30 mn).

Par contre, lorsque les ions K^+ sont remplacés mM à mM par des ions Cs^+ (Cs- K_0), E_r augmente rapidement (l'hyperpolarisation atteignant en moyenne $10,3 \text{ mV} \pm 4,1 \text{ mV}$, $n = 9$), g_f diminue d'environ 30 à 40 p. 100 alors que g_{re} n'est pas modifiée. E_o se déplace de façon identique

à E_r ($\Delta E_r = \Delta E_o \approx -10$ mV). La valeur du coefficient de corrélation liant la courbe de référence (ASW) à la courbe Cs-K_o ($R = 0.997 \rightarrow P < 0.01$), confirme que la relation $g_m = f(E_m)$ n'est pas modifiée malgré la présence d'ions Cs⁺ (\bar{g}_{re} et K sont inchangés). La diminution de g_f et le déplacement de E_r et E_o sont uniquement dûs à l'absence des ions K⁺ du milieu extracellulaire. A ce propos, il est à remarquer que les ions Cs⁺ semblent relativement imperméants dans la mesure où ils ne peuvent prévenir l'hyperpolarisation due à l'absence d'ions K⁺.

Ces résultats tendent donc à montrer que le phénomène de rectification dans le sens entrant de la fibre de crabe est insensible aux ions Cs⁺. A l'inverse, sur des préparations aussi diverses que l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al., 1976), le muscle de grenouille (GAY et STANFIELD, 1977), la fibre cardiaque de Purkinje (ISENBERG, 1976), les ions Cs⁺ provoquent un blocage très efficace de g_{re} .

L'absence d'effet des ions TEA ou Cs⁺ sur g_{re} et le fait que cette conductance peut être mise en évidence en milieu "chlorure de choline", laisse supposer que sur la fibre de crabe, l'activation de g_{re} entraîne un mouvement sortant d'ions Cl⁻ plutôt qu'un mouvement entrant d'ions K⁺. Il ne peut en effet s'agir d'un mouvement entrant d'ions Na⁺ dans la mesure où ces derniers sont absents en milieu "chlorure de choline".

C/ REMPLACEMENT DES IONS Cl^- DU MILIEU DE REFERENCE PAR DES ANIONS
IMPERMEANTS

1. A $\left[\text{K} \right]_e$ constante

Les courbes présentées à la figure 19 traduisent l'évolution de g_m en fonction de E_m pour une fibre placée en milieu de $\left[\text{Cl} \right]_e$ normale puis réduite. L'abaissement de $\left[\text{Cl} \right]_e$ de 596 à 27 mM diminue considérablement le phénomène de rectification dans le sens entrant sans pour autant modifier g_f de façon très significative. Cependant, bien que \bar{g}_{re} soit largement réduite, l'allure de la relation $g_m = f(E)_m$ n'est pas modifiée puisque l'équation (3) reste parfaitement applicable. De ce fait, la différence $E_r - E_o$, et le facteur K apparaissent inchangés et semblent donc indépendants de $\left[\text{Cl} \right]_e$. De plus, l'abaissement de $\left[\text{Cl} \right]_e$ provoque une dépolarisation transitoire de la fibre mais la repolarisation est toujours incomplète à l'inverse de ce qui est généralement observé sur la fibre de grenouille (HODGKIN et HOROWICZ, 1959).

A partir d'expériences réalisées sur l'oeuf d'étoile de mer (préparation où g_{re} est de nature potassique), HAGIWARA et al., (1977) définissent la conductance de rectification dans le sens entrant comme suit :

$$g_K = B_K \cdot \left[\text{K} \right]_e^{1/2} / (1 + \exp [(\Delta E - \Delta E_o) / K]) \quad (6)$$

où ΔE est le déplacement du potentiel de membrane par rapport à E_r ; B_K et ΔE_o étant des constantes dont la valeur est propre à chaque cellule. B_K (exprimée en $\text{mho} \cdot \text{M}^{-1/2}$) représente \bar{g}_{re} pour $\left[\text{K} \right]_e = 1 \text{ M/l}$. $K \approx RT/3F$. $\Delta E = E_m - E_r$; $\Delta E_o = E_o - E_r$.

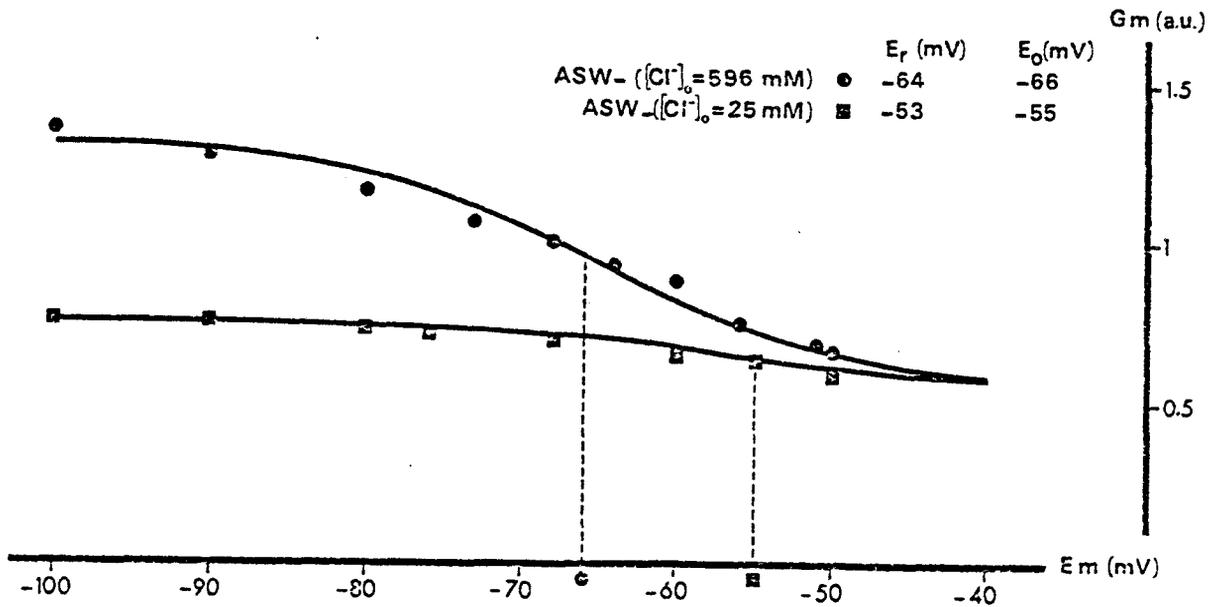


Figure 19

Relation $g_m = f(E_m)$ obtenue sur une fibre placée en solution de référence (●, ASW), puis après 30 mn en milieu pauvre en chlore (■, $[Cl]_e = 25$ mM). L'abaissement de $[Cl]_e$ est obtenu en substituant une large part des ions Cl^- de la solution de référence par des ions $CH_3 CH_2 COO^-$ ($[K]_e$ est inchangée).

22

En supposant que pour la fibre de crabe les ions Cl^- sont porteurs du courant de rectification, l'application de l'équation (6) prévoit une réduction de \bar{g}_{re} de 79 p. 100 en milieu de $[Cl]_e$ égale à 27 mM. En fait, lors d'expériences réalisées avec des $[Cl]_e$ égales à 156 et 160 mM, \bar{g}_{re} apparaît presque toujours plus faible que ce que prévoit l'équation d'HAGIWARA et al. (1977). Cependant cette différence est peut être simplement due au fait que si $[K]_i$ est insensible à $[K]_e$

sur l'oeuf d'étoile de mer (pompe Na-K), il n'en va pas forcément de même à propos de $[Cl]_i$ vis à vis de $[Cl]_e$ concernant la fibre de crabe. En effet, rien ne permet d'affirmer que les variations de $[Cl]_e$ n'entraînent pas de modifications de $[Cl]_i$. C'est pourquoi il a été envisagé d'effectuer une nouvelle série d'expériences à produit $[K]_e \cdot [Cl]_e$ constant.

2. A $[K]_e \cdot [Cl]_e$ constant

Le fait de réduire $[Cl]_e$ tout en maintenant le produit $[K]_e \cdot [Cl]_e$ constant entraîne une diminution de \bar{g}_{re} ainsi qu'une augmentation de g_f (Fig. 20 a). Par contre, sur des préparations où la nature de I_{re} est potassique et celle de I_f "chlore" (fibre de grenouille, oeuf d'étoile de mer...), ces mêmes conditions ioniques provoquent une "potentiation" de \bar{g}_{re} , cette conductance n'étant alors plus shuntée par g_f qui se trouve réduite (HUTTER et NOBLE, 1960 ; HUTTER et WILLIAMS, 1979).

Dans le but de comparer nos résultats à ceux de HAGIWARA et al. (1977), la courbe traduisant l'évolution de \bar{g}_{re} en fonction de E_m (Fig. 20 a) a été normalisée de 0 à 1 (Fig. 20 b). Alors que $[Cl]_e$ passe de 596 à 150 mM, \bar{g}_{re} varie de 1 à 0.5, ce qui est conforme à ce que prévoit l'équation (6) de HAGIWARA et al. (1977) puisque

$\sqrt{150} / \sqrt{596} = 0.5$. Néanmoins, il faut noter que si cet exemple n'est pas unique, il n'est pas entièrement représentatif de l'ensemble des résultats obtenus sous ces conditions. Cependant, le pourcentage de diminution de \bar{g}_{re} est moins important à produit $[K]_e \cdot [Cl]_e$ constant.

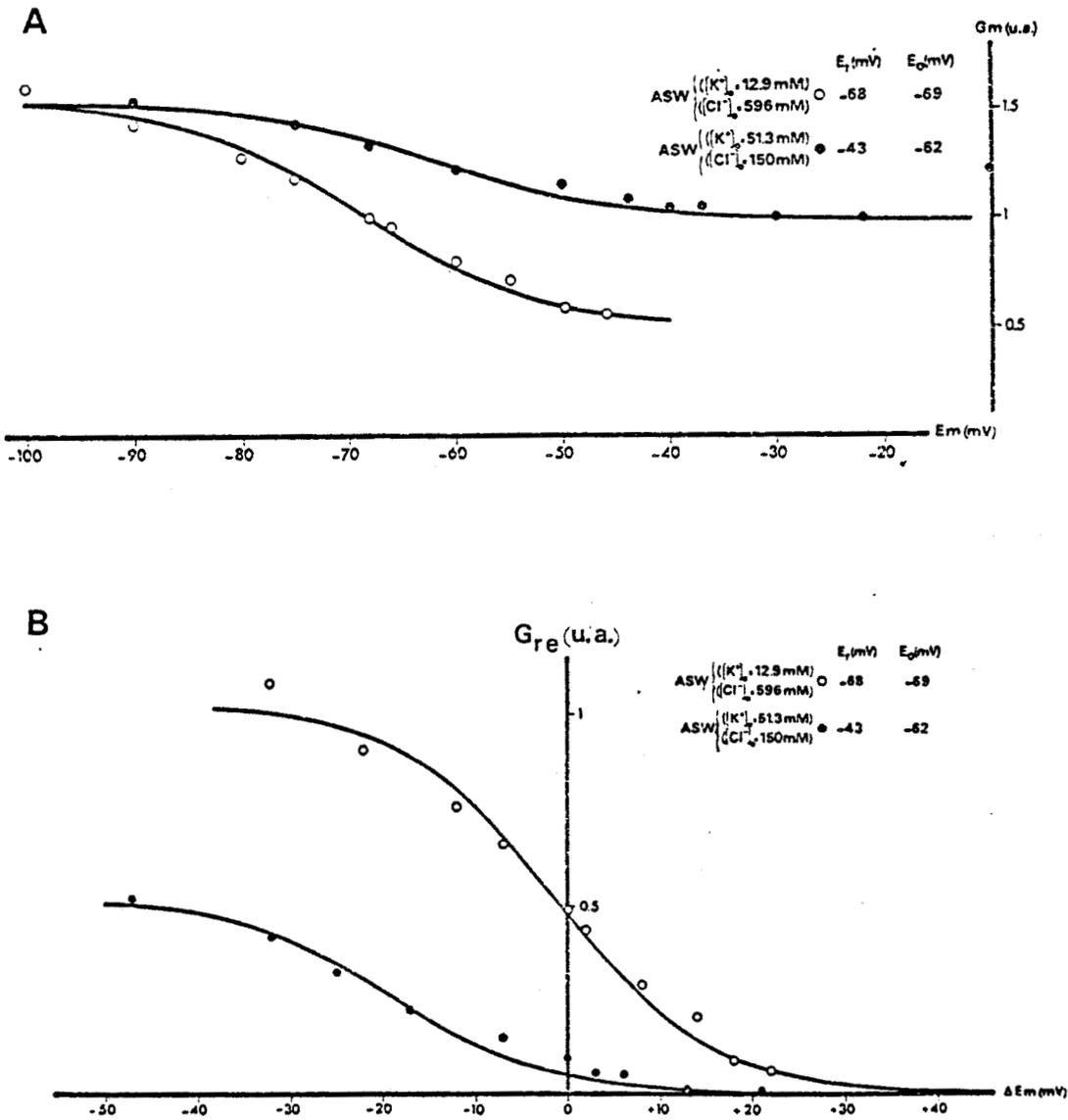


Figure 20

Relation liant g_m à E_m (a) ou g_{re} à E_m (b), pour une fibre placée en solution de référence (○) puis après 30 mn de traitement en milieu pauvre en chlore (●), le produit $[K]_e \cdot [Cl]_e$ étant constant

- en (a) les courbes sont tracées à partir de l'équation 3
- en (b) les courbes sont tracées à partir de l'équation (5) ($\bar{g}_{re} = 1$ en ASW).

S'il semble difficile de mettre en évidence une relation simple liant \bar{g}_{re} à $[Cl]_e$, il n'en est pas moins vrai qu'il existe un faisceau d'arguments en faveur d'un courant I_{re} porté par les ions Cl^- . L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la perméabilité aux ions Cl^- devrait permettre de confirmer le bien fondé de cette hypothèse.

D/ EFFETS D'INHIBITEURS REPUTES BLOQUER LES MOUVEMENTS D'IONS Cl^-

1. Effet des ions I^-

Les ions Rb^+ et Cs^+ , inhibiteurs du courant entrant dynamique de potassium ont un diamètre voisin de celui de l'ion K^+ . On peut penser que leurs propriétés vis à vis de ce canal ne sont pas indépendantes de cette caractéristique. Partant de ce raisonnement, il a été décidé d'étudier la relation $g_m = f(E_m)$ en présence d'iodure dans le milieu en raison de la position de I^- par rapport à celle de Cl^- dans le tableau de MENDELEIFF. Cette hypothèse de travail a été encouragée par le fait que sur des préparations aussi diverses que la peau de grenouille, le coeur de pigeon, le muscle de grenouille, ALVARADO et al. (1975), MORGAN et al. (1975), HUTTER et WARNER (1967), ont respectivement montré que la présence d'ions I^- dans le milieu, tend à diminuer g_{Cl} et ce, sans affecter g_K .

a - Remplacement partiel des ions Cl^- (80 mM) par des ions I^- . La présence d'une faible concentration d'iodure (80 mM) dans le milieu extracellulaire empêche le développement de la rectification dans le sens entrant alors que g_f n'est pas affectée (Fig. 21). Des concen-

trations en ions I^- plus faibles conduisent au même résultat, mais le temps requis est alors beaucoup plus long (45 mn au moins si $[I^-]_e = 10$ mM et seulement 15 mn si $[I^-]_e = 80$ mM).

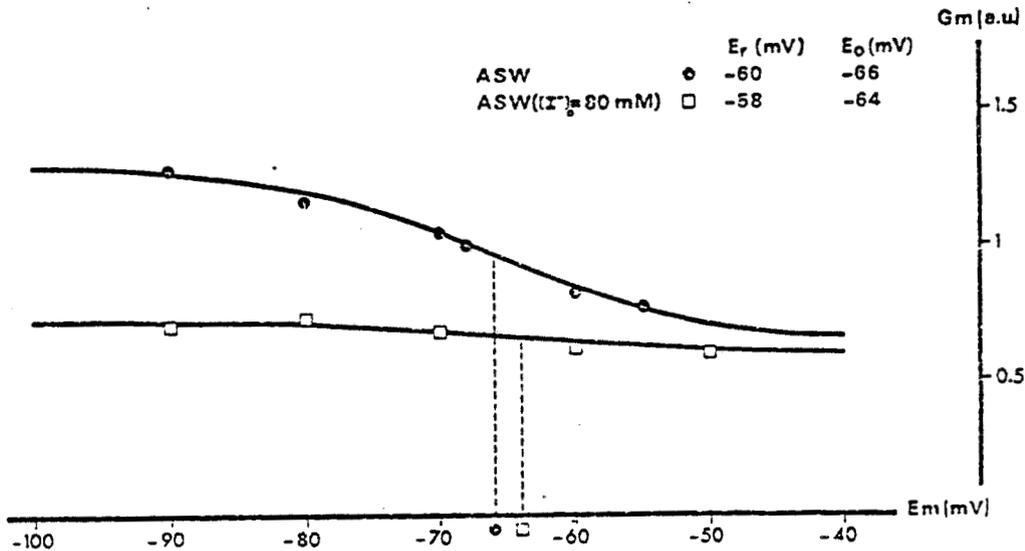


Figure 21

Inhibition de g_{he} par remplacement de moins de 10 p. 100 des ions Cl^- du milieu de référence par des ions I^- .

Les courbes présentées à la figure 22 résument les résultats obtenus sur une fibre placée successivement en milieu : (i) normal (ASW) ; ii) pauvre en chlore (27 mM) ; iii) pauvre en chlore (27 mM) et présence d'ions I^- (80 mM). La faible rectification qui subsiste après traitement de la fibre en milieu pauvre en chlore diminue très rapidement lorsque les ions I^- sont ajoutés.

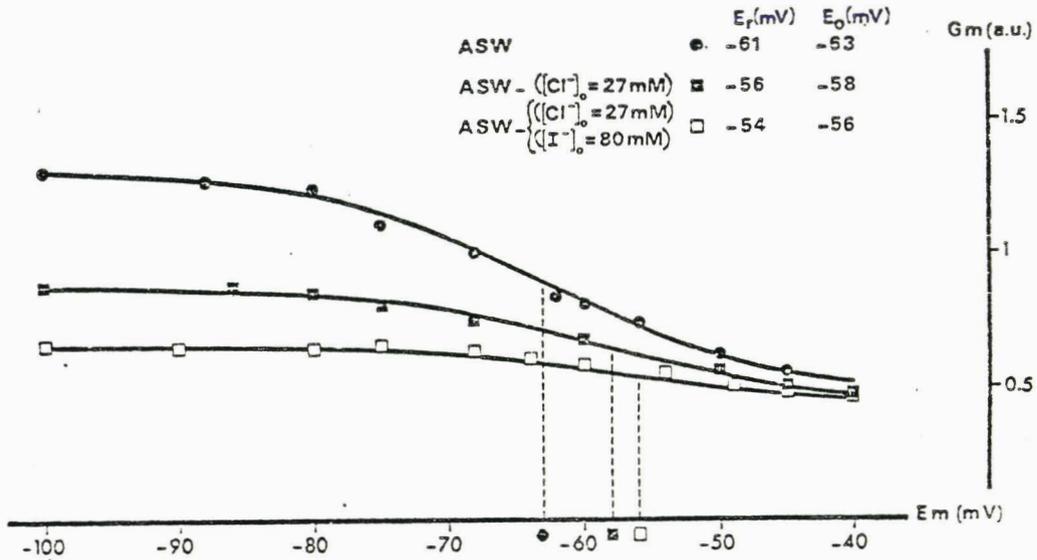


Figure 22

Effet des ions I^- (80 mM) sur la relation $g_m = f(E_m)$ obtenue en présence d'une faible concentration de Cl (27 mM).

Enfin, la substitution de 80 mM d'ions Cl^- par des ions I^- dans le milieu de référence où les ions Cs^+ ont remplacé les ions K^+ , réduit considérablement \bar{g}_{re} , conductance maximale qui n'est pas affectée par les ions Cs^+ (Fig. 23). L'abaissement de g_f est le déplacement de E_r sont uniquement dus à l'absence des ions K^+ dans le milieu comme cela a déjà été mentionné lors de la discussion des résultats présentés à la figure 18 page 56.

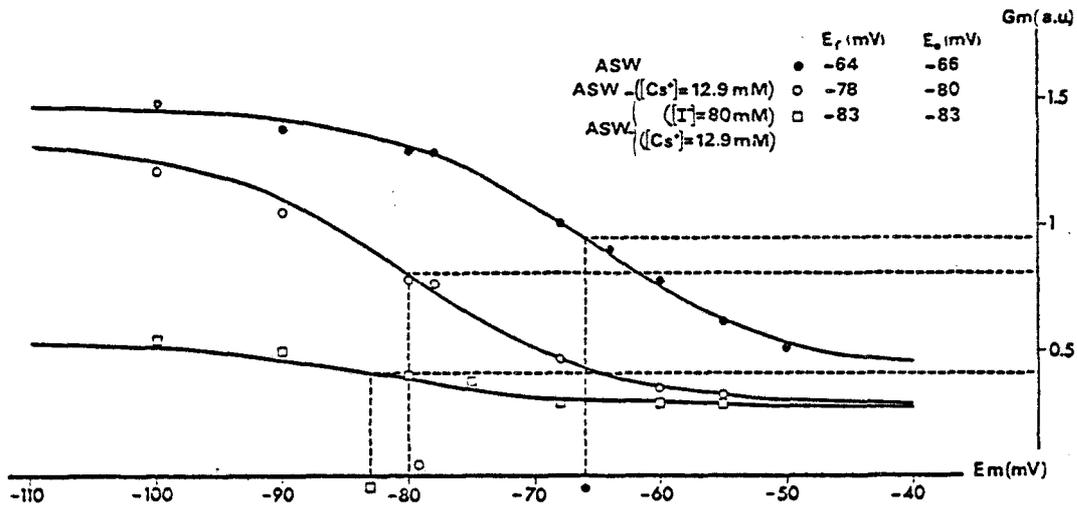


Figure 23

Relations $g_m = f(E_m)$ obtenues sur une fibre placée successivement en milieu de référence (●), en milieu Cs sans K (○, 30 mn), puis en milieu I-Cs sans K (□, 15 mn).

b - Remplacement de tous les ions Cl^- par des ions I^- .

Sur l'oeuf d'étoile de mer, HAGIWARA et al. (1977) montrent que le remplacement partiel des ions K^+ par des ions Tl^+ conduit à une réduction de \bar{g}_{re} . Par contre, cette conductance n'est pas affectée lorsque tous les ions K^+ sont remplacés par des ions Tl^+ . Ceci revient à dire qu'il se développe alors un courant de rectification entrant porté par les ions Tl^+ . Les auteurs concluent en émettant l'hypothèse que ces ions peuvent emprunter le canal de rectification tout comme les ions K^+ , mais que la présence des deux espèces ioniques conduit à leur compétition pour ce canal et, en conséquence, à l'inhibition de \bar{g}_{re} .

Par analogie aux travaux cités ci-dessus, une expérience a été réalisée où tous les ions Cl^- du milieu de référence sont remplacés par des ions I^- . L'ensemble des résultats obtenus dans ces conditions montre une complète inhibition de g_{re} et une faible réduction de g_f . L'exemple présenté à la figure 24 correspond à la plus forte réduction de g_f observée. L'inhibition de g_{re} par les ions I^- persiste donc même en absence d'ions Cl^- extracellulaires. Cela traduit un type d'inhibition différent de celui produit par les ions Tl^+ sur l'oeuf d'étoile de mer.

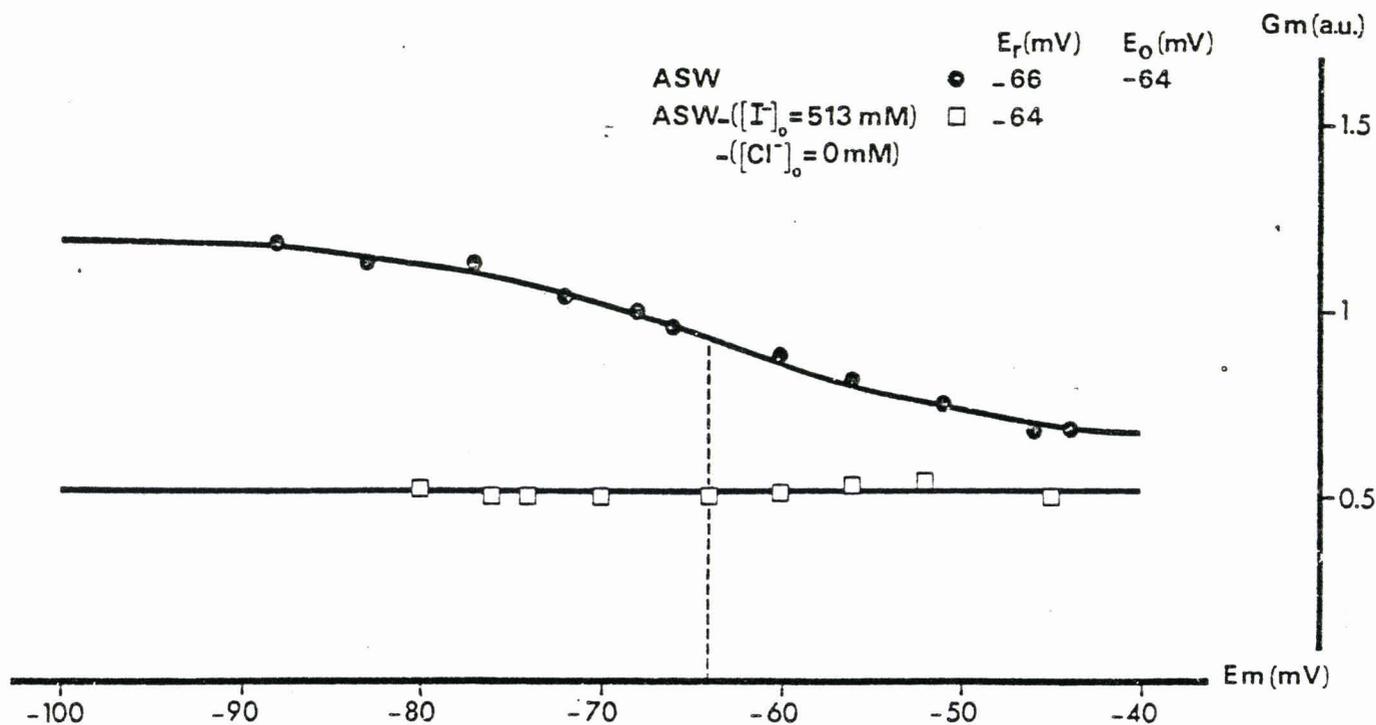


Figure 24

Inhibition de g_{re} par les Ions I^- remplaçant les ions Cl^- du milieu de référence (ASW).

Enfin, il est à souligner que le remplacement partiel ou total des ions Cl^- par des ions I^- n'entraîne aucune modification de la valeur de E_r et ce, même de façon transitoire.

2. Effet d'un agent pharmacologique réputé bloquer les mouvements d'ions Cl^- (SITS)

Le SITS est un dérivé disulfoné du stilbène (4-acétamido-4'-isothiocyanostilbène-2,2'-disulfonic acid). Cette substance est largement utilisée pour inhiber les flux de Cl sur des préparations diverses. KNAUF et ROTHSTEIN (1971), KNAUF et al. (1977) montrent que le SITS bloque de façon irréversible les flux entrant et sortant de Cl du globule rouge. Plus récemment, EHRENSPECK et BRODSKY (1976) signalent que les mouvements transmembranaires de Cl au niveau de la vessie de tortue sont largement réduits en présence de cette substance. Lors d'études sur l'axone de calmar et les neurones d'aplysie, RUSSEL et BORON (1976) et RUSSEL (1978) en arrivent à des conclusions similaires. Ce dérivé du stilbène se révèle également très actif pour bloquer les mouvements de Cl, dépendant du potentiel, de la membrane artificielle (WHITE et MILLER, 1979). Enfin, BITTARD et al. (1980) viennent de montrer que l'efflux de Cl qui existe au repos sur la fibre de balane (préparation dont les propriétés électriques sont proches de celles de la fibre de crabe) est largement réduit en présence de SITS dans le milieu extracellulaire. En raison même de la large application de cette substance dans l'étude des mouvements de Cl, il est apparu intéressant d'étudier ses éventuels effets sur la fibre de crabe.

Pour ce faire, le SITS a été ajouté au milieu extracellulaire à des concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-5}$ et 10^{-3} M. Pour une concentration de 10^{-3} M, environ 60 p. 100 de g_{re} disparaît (Fig. 25). La courbe de la figure 26 traduit la diminution de \bar{g}_{re} (exprimée en p. 100) en fonction de la concentration de SITS dans le milieu extracellulaire. L'effet de cet agent pharmacologique n'a pu être testé à des concentrations supérieures à 10^{-3} M, car au-delà, la dissolution est incomplète. Cependant, la courbe présentée à la figure 26 montre que cette concentration de 10^{-3} M est celle qui permet d'obtenir un effet proche du maximum.

E/ DISCUSSION DES RESULTATS RELATIFS A LA NATURE DE G_{re} .

Sur la fibre de grenouille, l'abaissement de $[Cl]_e$ a généralement pour effet de diminuer g_f et par là même de démasquer la conductance aux ions K^+ responsable du phénomène de rectification (KATZ, 1949 ; HUTTTER et NOBLE, 1960...). Sur la fibre de crabe, ce même milieu produit des effets totalement inverses. Ainsi, en supposant que la présence d'ions Cl^- dans le milieu externe ne soit pas indispensable au développement d'un courant de rectification entrant de nature potassique, I_{re} serait porté par les ions Cl^- et I_f en tout ou partie par les ions K^+ . Cependant, il est à noter que la courbe de rectification $g_{re} = f(E_m)$ se déplace dans la direction hyperpolarisante, sous l'effet du milieu sans K^+ , E_o suivant rigoureusement E_r .

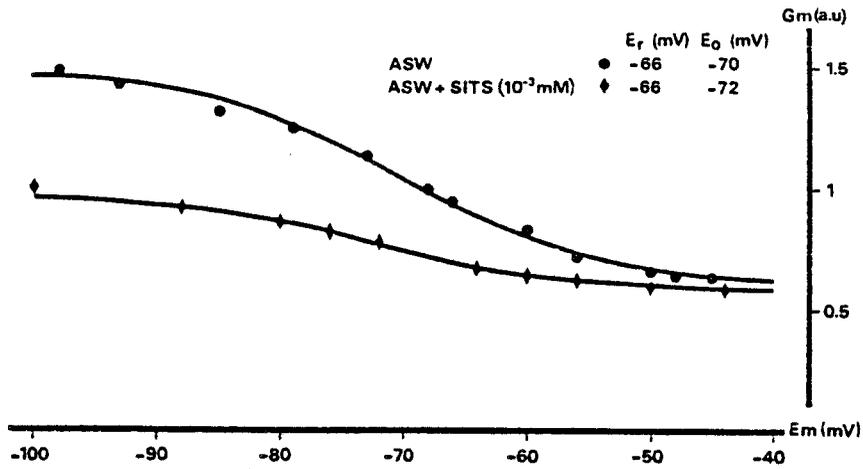


Figure 25

Effet du SITS (10^{-3} M) sur la relation $g_m = f(E_m)$.

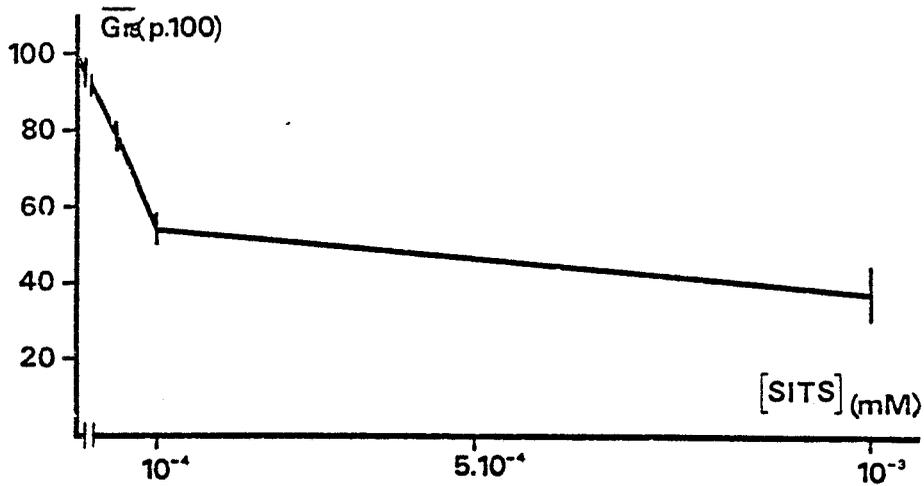


Figure 26

Effet du SITS à différentes concentrations sur la valeur maximale de la conductance de rectification dans le sens entrant (\bar{g}_{re} de référence = 100 p. 100).

De plus, alors que 58 mM de TEA inhibent largement le phénomène de double rectification sur le muscle de grenouille (STANFIELD, 1970), l'addition de cet ion au milieu de référence des fibres de crabe n'entraîne aucune modification sensible de g_m dans la gamme des potentiels où g_{re} se développe. Tout au plus, g_f est parfois légèrement réduite. Les expériences réalisées en potentiel imposé (Fig. 9 chapitre I) confirment ce résultat mais font par contre apparaître que les ions TEA sont efficaces pour réduire g_{rs} conformément à ce qu'ont montré HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974). A propos de ces effets "TEA", il est intéressant de souligner (Fig. 10 chapitre I), que g_{re} et g_{rs} se développent sur notre préparation en dépit de l'absence d'ions K^+ dans le milieu extracellulaire. Le "découplage" des rectifications obtenu en présence de TEA laisse en effet supposer que cet ion pourrait agir en tant qu'inhibiteur d'un type de canal de rectification plutôt qu'en tant qu'inhibiteur spécifique de canaux potassiques.

De même, alors que la présence d'ions Cs^+ dans le milieu externe entraîne un blocage très efficace de la rectification dans le sens entrant sur l'axone géant de calmar (BEZANILLIA et ARMSTRONG, 1972), la fibre de Purkinje (ISENBERG, 1976), l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1977), la fibre cardiaque (GAY et STANFIELD, 1977), sur la fibre de crabe cet ion est sans effet sur g_{re} .

Par contre, le remplacement partiel (10 p. 100) ou total des ions Cl^- par des ions I^- provoque sur la fibre de crabe une large inhibition de g_{re} sans diminution notable de g_f . Or, tous les auteurs

ayant travaillé sur les effets des ions I^- sur diverses préparations sont unanimes à conclure que ces ions diminuent g_{Cl} mais n'affectent pas g_K .

Enfin, le SITS, agent pharmacologique largement utilisé pour inhiber les mouvements d'ions Cl^- sur de nombreuses préparations, se révèle réduire g_{re} sur la fibre de crabe.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés nous amène à proposer que l'activation de g_{re} de la fibre de crabe induirait un mouvement sortant d'ions Cl^- . Le fait que la valeur du potentiel d'équilibre du courant de rectification ($E_x = -64,5$ mV ; Fig. 10, page 36), déterminée en conditions de potentiel imposé, soit identique à la valeur de E_{Cl} proposée par VAUGHAN-JONES (1977) renforce cette hypothèse.

CHAPITRE III

EFFET DE L'HYPERTONIE PAR UREE

De nombreux travaux réalisés sur les fibres pelées montrent que l'augmentation de l'activité en ions Cl^- au contact du réticulum sarcoplasmique (RS) provoque une libération du Ca réticulaire, ce qui conduit à la contraction des myofilaments (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967 ; MATSUBARA et al., 1977). Cet effet des ions Cl^- est attribué à une modification du gradient électrochimique de ces ions au niveau de la membrane du RS (ENDO et NAKAJIMA, 1973). Il y aurait donc, dans ces conditions, un couplage du type "depolarization induced- Ca^{++} release". THORENS et ENDO (1975) et MATSUBARA et al. (1977) suggèrent que ceci pourrait traduire le mécanisme physiologique d'activation du RS. Cela revient à considérer que lors du couplage excitation-contraction, la membrane réticulaire serait stimulée par un courant électrique venant des tubules et qu'il y aurait par conséquent une zone de moindre résistance au niveau de la diade.

D'autre part, DELORME et al. (1978), signalent l'existence de "ponts" membranaires au niveau des diades de la fibre musculaire de crabe. Ces mêmes auteurs observent un élargissement de l'espace intermembranaire au niveau de la diade (étirement ou rupture des "ponts") dans des conditions d'hypertonie par addition d'urée au milieu de référence (Fig. 27).

Enfin, il est aujourd'hui admis que la conductance aux ions Cl^- des fibres de crustacés siège pour une large part au niveau de la membrane tubulaire (GIRARDIER et al., 1963 ; RICHARDS, 1969...). Or, les résultats présentés au chapitre II conduisent à penser que le courant de rectification entrant de la fibre de crabe, serait porté par les ions Cl^- . Dans la mesure où l'on suppose que la membrane réticulaire des fibres de crustacés présente une conductance aux ions Cl^- (g_{Cl}), comme cela a été montré sur la fibre pelée de vertébré, la question se pose de savoir si cette g_{Cl} participe au phénomène global de rectification membranaire dans le sens entrant, et si cette "participation" disparaît en conditions d'hypertonie par urée. S'il en est ainsi, cela signifie en effet qu'un phénomène électrique affectant la membrane du RS peut être enregistré en surface. Il semble difficile d'expliquer un tel fait sans postuler l'existence d'une communication électrique (zone de moindre résistance) entre le RS et le STT.

A/ EFFETS DE L'HYPERTONIE PAR UREE SUR LE CIRCUIT MEMBRANAIRE - ETUDE EN POTENTIEL IMPOSE

Les tracés de la figure 28 montrent l'évolution du courant membranaire pour une dépolarisation imposée de 10 mV. La comparaison

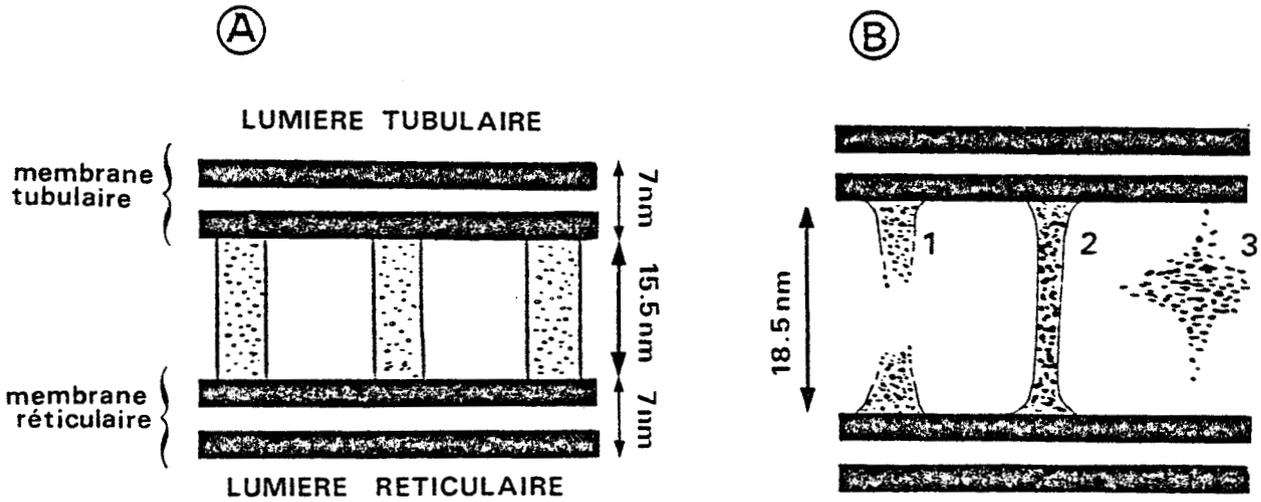


Figure 27

Schéma montrant les effets ultrastructuraux de l'hypertonie par urée au niveau de la diade. ce schéma a été établi à partir des résultats donnés par DELORME et al. (1978).

A) Zone de couplage en ASW. Les membranes tubulaires et réticulaires sont réunies par des ponts disposés régulièrement.

B) Zone de couplage en ASW rendue hypertonique par addition d'urée. Les ponts, soit ont disparus et laissent des fragments rattachés aux membranes (1), soit sont devenus plus ténus par étirement (2), soit se sont rompus faisant place à une ligne médiane dense discontinue (3).



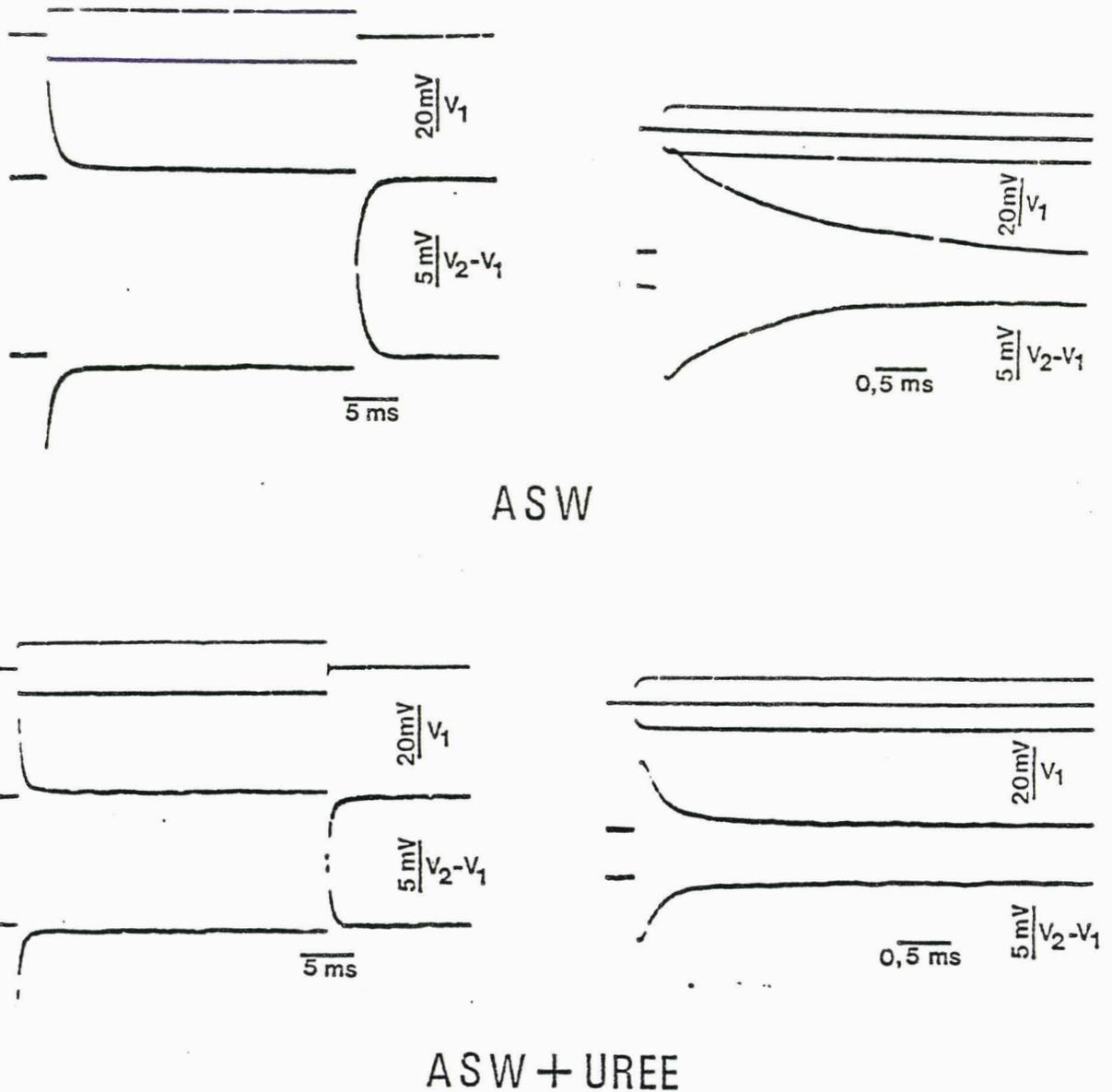


Figure 28

Evolution, au cours du temps, du courant de membrane en termes de différence de potentiel ($V_2 - V_1$) pour une hyperpolarisation et une dépolarisation imposées de 10 mV (en isotonie, ASW ; en hypertonie, ASW + Urée).

(d'après AUBINEAU et al. 1979).

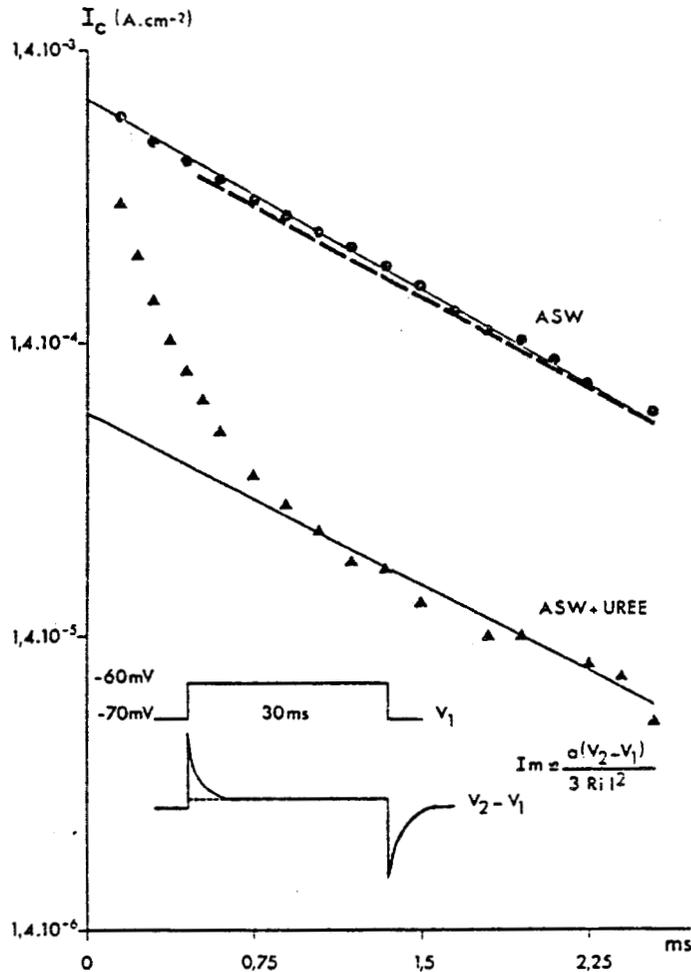


Figure 29

Evolution en coordonnées semi-log. du courant capacitif I_c en fonction du temps pour une dépolarisation imposée de 10 mV (isotonie ●, hypertonie ▲).

La courbe en tiré traduit la composante du courant I_c éliminée en hypertonie.



des résultats obtenus en conditions d'isotonie (ASW) et d'hypertonie (ASW + urée) révèle que le courant membranaire est largement diminué sous cette dernière condition. Cette diminution concerne d'une part le courant capacitif (I_c), et d'autre part le courant stationnaire I_s (I_s est réduit de 30 p. 100 environ).

Le courant capacitif enregistré en conditions d'isotonie évolue exponentiellement en fonction du temps, comme en atteste la relation linéaire liant le log. de I_c au temps (Fig. 29). Par contre, en conditions d'hypertonie, ce courant présente 2 composantes. Ceci laisse bien évidemment supposer qu'en isotonie, le circuit membranaire serait en fait constitué de 3 composantes, l'une d'elles, très importante, étant éliminée en hypertonie. La soustraction des points expérimentaux traduisant l'évolution du log. de I_c en fonction du temps en hypertonie à ceux obtenus en isotonie permet de confirmer ce résultat (courbe en tiré, Fig. 29).

Compte-tenu des observations en microscopie électronique (DELORME et al. 1978), on peut penser que la composante du courant membranaire (circuit RC) éliminée sous l'effet de l'hypertonie par urée puisse représenter le circuit membranaire du RS.

B/ EFFET DE L'HYPERTONIE PAR UREE SUR LA RELATION $g_m = f(E_m)$

Les expériences ont été réalisées en courant imposé à densité de courant homogène (3 microélectrodes implantées à l'une des extrémités de la fibre). La figure 30 résume les résultats concernant

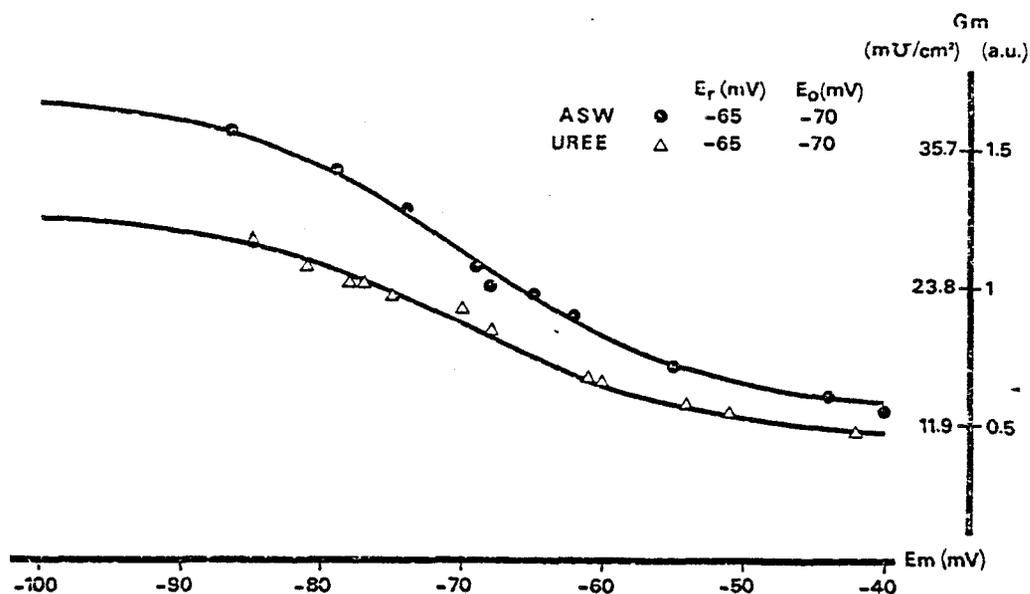


Figure 30

Effets de l'hypertonie par urée sur la relation $g_m = f(E_m)$. g_{re} et g_f sont affectées dans les mêmes proportions (30 p. 100 environ).

l'évolution de la conductance membranaire en fonction du potentiel d'une fibre placée en conditions d'isotonie puis d'hypertonie. Ces courbes révèlent que sous l'effet de l'augmentation de la pression osmotique, g_m est réduite de 30 p. 100 environ, g_{re} et g_f étant affectées dans les mêmes proportions. Cette diminution de g_m est à rapprocher de celle de I_s mesuré en potentiel imposé (Fig. 28). Le fait que g_{re} et g_f soient modifiées dans les mêmes proportions indique que la relation $g_m = f(E_m)$ n'est pas modifiée par l'hypertonie (équation 3 toujours applicable).

C/ EFFETS DU SITS SUR LA RELATION $g_m = f(E_m)$ OBTENUE EN HYPERTONIE
PAR UREE

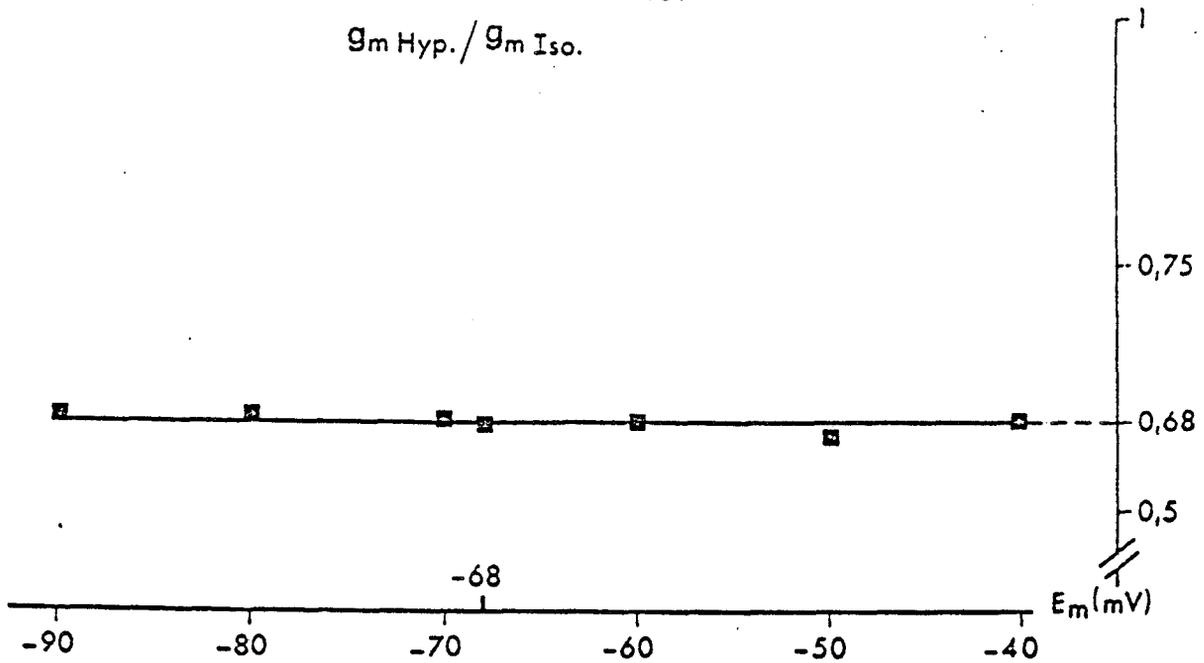
Ces expériences ont été réalisées en courant imposé en milieu de fibre (2 microélectrodes implantées). Comme lors des expériences réalisées à densité de courant homogène, les effets de l'hypertonie se traduisent par une diminution similaire de g_{re} et de g_f . Ceci est illustré à la figure 31 où il est montré que la réduction de g_m due à l'hypertonie est indépendante du niveau de polarisation auquel est amenée la membrane. Ces résultats viennent encore confirmer ceux obtenus en potentiel imposé.

L'apport de SITS en milieu hypertonique permet d'inhiber \bar{g}_{re} (45 p. 100 en moyenne, Fig. 32). Le fait que le SITS (10^{-3} M) apparaisse réduire moins fortement \bar{g}_{re} en hypertonie qu'en isotonie ne semble pas aisément explicable. Cependant, l'une des interprétations possibles pour expliquer ce résultat serait que le SITS agisse préférentiellement sur la membrane éliminée en hypertonie, à savoir la membrane du RS. Aussi pourrait-il être envisagé une influence de l'urée sur l'efficacité du SITS à inhiber g .

Cl

D/ DISCUSSION RELATIVE AUX EFFETS DE L'HYPERTONIE PAR UREE

L'analyse concernant l'évolution du courant capacitif en fonction du temps, ainsi que la diminution du courant stationnaire dans les conditions de potentiel imposé, révèle qu'une partie du système membranaire est éliminée par l'hypertonie. Ces résultats ne peuvent être interprétés que d'un point de vue qualitatif. En effet, la réponse



RAPPORT MOYEN = $0,68 \pm 0,01$ ($m \pm \sigma$)

Figure 31

Rapport $g_m \text{ hyp.} / g_m \text{ iso.}$ - g_m est diminuée en milieu rendu hypertonique par addition d'urée au milieu de référence. Cette diminution est indépendante du niveau de polarisation membranaire, sa valeur moyenne est de 32 p. 100 ($n = 6$).

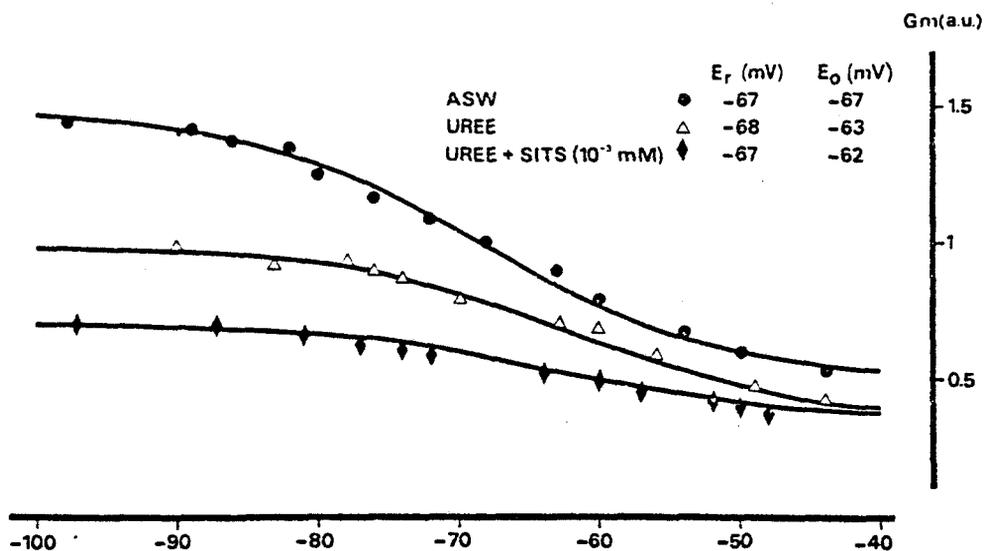


Figure 32

Effets du SITS (10^{-3} M) sur la relation $g_m = f(E_m)$ obtenue dans les conditions d'hypertonie.

des systèmes membranaires profonds (RS, extrémité du STT) est effectivement perçue de part et d'autre de la membrane sarcolemique, mais l'amplitude de cette réponse est largement réduite par les résistances d'accès diverses (résistance de la lumière tubulaire par exemple...). Ceci peut expliquer le fait que le courant capacitif enregistré en conditions d'hypertonie, et soustrait à celui obtenu en isotonie, ne diminue exponentiellement en fonction du temps qu'après 0,5 ms (fig. 29).

De même, la diminution de g_m observée en hypertonie ne permet pas de déterminer la valeur exacte de la conductance de la membrane réticulaire. Là encore l'analyse ne peut être que qualitative. Il est cependant à souligner que le courant stationnaire et la conductance membranaire sont affectés dans les mêmes proportions.

L'ensemble des résultats obtenus en milieu hypertonique tendent à montrer que la membrane du RS présente des propriétés de rectification dans le sens entrant, et que celles-ci sont tout à fait similaires à celles observées sur l'ensemble des autres systèmes membranaires de la fibre (sarcolemme + STT). Partant de ces résultats et sachant que la rectification dans le sens entrant induit, sur la fibre squelettique de crabe, un courant dynamique d'ions Cl^- , il devient possible d'affirmer que la membrane réticulaire présente une g_{Cl} . Enfin, s'il existe des mouvements d'ions au niveau d'une structure membranaire profonde (RS), mouvements non silencieux du point de vue électrique et décelables en surface, cela traduit obligatoirement la présence d'une zone de moindre résistance permettant la conduction électrique entre la surface et le RS. Ces zones de moindre résistance seraient situées au niveau de la jonction de couplage et correspondraient ainsi aux "ponts" diadiques décrits par DELORME et al. 1978).

PRINCIPAUX RESULTATS

ET

CONCLUSION GENERALE

L'objet du travail présenté était d'étudier le fonctionnement de la jonction de couplage (diade) de la fibre musculaire de crabe. Ce travail fait suite aux résultats obtenus dans le laboratoire montrant que l'hypertonie par urée entraîne un découplage excitation-contraction. Ce découplage serait le résultat d'une modification de l'ultrastructure de la diade. En effet, DELORME et al. (1978) observent un élargissement de la jonction en milieu hypertonique. Ces auteurs font également mention d'une profonde altération des "ponts" et de l'aspect palissadique observée en isotonie. Sur le plan électrophysiologique, ce milieu provoque une augmentation de l'amplitude et de la durée du PA, ce qui permet à BRULE et al. (1977) d'interpréter le découplage comme étant probablement dû à une forte réduction de la libération du Ca^{++} par le RS. En effet, si sur la fibre de vertébré, le développement du PA est lié à l'activation de la conductance aux ions Na^+ suivie de celle aux ions K^+ ; sur la fibre de crabe, la phase de dépolarisation du PA résulte d'un courant entrant d'ions Ca^{++} . Il est bien évident que ce courant sera d'autant plus grand que le gradient électrochimique aux ions Ca^{++} sera lui même plus important.

Sur la fibre de grenouille, FRANK et TREFFERS (1977) observent également un élargissement de la jonction sous l'effet de l'hypertonie par urée, ce qui conduit aussi à un découplage. Ces auteurs interprètent ce résultat en considérant que l'augmentation de l'espace intermembranaire au niveau de la diade tend à diminuer la quantité de calcium provenant du milieu extracellulaire et atteignant la membrane des cisternes du RS. Ils en déduisent que l'absence de contraction est le résultat d'un blocage du processus de libération autocatalytique du Ca réticulaire. Pour cela ils se basent sur le fait qu'ils peuvent restaurer en partie la contraction en augmentant l'influx de Ca par accroissement de sa concentration extracellulaire couplée à une stimulation

itérative. Ces résultats, et l'analyse qu'ils en font peuvent s'accorder à ce qu'observent BRULE et al. (1977) sur la fibre de crabe. Cependant, sur cette dernière préparation, le fait que l'hypertonie par urée provoque une disparition de l'aspect palissadique et une augmentation de l'amplitude et de la durée du PA permet d'émettre une seconde hypothèse. En effet, tout laisse supposer que dans les conditions normales, le RS serait stimulé par un courant venant des tubules via les "ponts". En hypertonie, la rupture des ponts empêcherait la pénétration du courant dans les cisternes et l'amplitude du PA serait augmentée du fait d'une valeur plus élevée de la pile au Ca. Ce résultat, s'il n'exclue pas la possibilité d'un couplage électrochimique, semble cependant accréditer la possibilité d'un couplage de nature électrique.

Si donc il existe une zone de moindre résistance entre la lumière tubulaire et le RS un phénomène électrique affectant la membrane réticulaire doit pouvoir être perçu par un enregistrement de part et d'autre de la membrane sarcolemmique. Par ailleurs, il est bien connu que la membrane tubulaire des fibres de crustacés est préférentiellement perméable aux ions Cl^- . De plus, les travaux présentés par HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974) tendent à montrer que la conductance de rectification dans le sens entrant de la fibre de crabe serait de nature "chlore". Enfin, de nombreux auteurs travaillant sur les fibres pelées montrent que le RS libère son Ca sous l'influence d'un excès d'ions Cl^- au contact de sa membrane. L'ensemble de ces résultats permet d'imaginer que les membranes tubulaire et réticulaire peuvent avoir des propriétés électriques semblables, et en particulier en ce qui concerne le phénomène de rectification dans le sens entrant. Ainsi, si l'hypothèse émise correspond à une réalité physiologique, l'hypertonie par urée doit conduire à une diminution du courant de rectification enregistré en surface. Si tel est le cas, ceci accrédite l'idée d'un couplage de type "depolarization induced-Ca release".

Etudier la conductance de rectification dans le sens entrant de la fibre de crabe et rechercher une formulation mathématique traduisant l'évolution de cette conductance en fonction du potentiel ($g_{re} = f(E_m)$) impose de s'affranchir d'un certain nombre de problèmes de techniques inhérents à la structure de la préparation.

1. Choix de la technique

La fibre de crabe présente un STT développé et des invaginations longitudinales profondes du sarcolemme. Ces caractéristiques ultrastructurales en font une préparation particulièrement propice au développement de phénomènes d'accumulation et de déplétion d'ions, ce qui retentit inévitablement sur g_{re} . Compte-tenu de cela, il est apparu indispensable de rechercher la technique la plus adéquate et la plus simple permettant d'étudier cette conductance.

Technique du potentiel imposé. La relation courant-potentiel établie à partir de résultats obtenus en conditions de potentiel imposé (technique des 3 microélectrodes d'ADRIAN et al., 1970) traduit l'existence d'une rectification dans le sens entrant. Cependant, cette relation ne nous a pas permis de déterminer la vraie valeur de g_m en fonction du potentiel. En effet, en raison des phénomènes d'accumulation, déterminer la valeur exacte de g_{re} suppose de connaître l'évolution du potentiel d'inversion (E_x) du courant de rectification en fonction du potentiel et du temps. La technique de double impulsion de potentiel imposé (technique généralement utilisée pour déterminer E_x) ne nous a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Le temps requis pour une telle expérimentation est en effet relativement long en raison

même du nombre de mesures à effectuer.

Techniques du courant imposé. Une technique de courant imposé utilisant également 3 microélectrodes implantées à l'extrémité de la fibre (ADRIAN et FREYGANG, 1962) permet d'établir une relation courant-potentiel. Cette relation est similaire à celle obtenue en potentiel imposé. Afin de s'affranchir des phénomènes d'accumulation, cette technique de courant imposé a alors été utilisée en double impulsion. La valeur de g_m peut dès lors être calculée pour chaque valeur de potentiel E_m auquel est amenée la membrane. L'allure de la relation liant g_m à E_m est de type sigmoïde et répond à l'équation :

$$g_m = g_f + \bar{g}_{re} / (1 + \exp((E_m - E_o)/K)).$$

Il a cependant été fait usage d'une autre technique de courant imposé. Cette technique consiste à n'implanter que 2 électrodes (imposition du courant et enregistrement du potentiel) en milieu de fibre. Les 2 électrodes doivent être placées à une distance x (égale au diamètre) l'une de l'autre. La relation $g_m = f(E_m)$ est identique à celle obtenue précédemment alors que la densité de courant était homogène. Il a cependant été vérifié que le courant qui passe à travers la membrane au niveau de l'électrode de potentiel est constant et indépendant de la polarisation membranaire de la fibre. Cette seconde technique, plus simple à mettre en oeuvre et surtout moins stressante pour la préparation a par conséquent été utilisée pour la suite de l'expérimentation.

2. Nature du g_{re}

Les protocoles expérimentaux sont ceux généralement utilisés pour déterminer la nature de g_{re} , à savoir (i) faire varier la concentration extracellulaire de l'ion supposé porté le courant de rectification; (ii) utilisation d'inhibiteurs spécifiques de perméabilité. Les résultats obtenus conduisent tous à la conclusion que g_{re} induirait non pas un mouvement d'ions K^+ comme sur les fibres de vertébré ou l'oeuf d'étoile de mer, mais un mouvement d'ions Cl^- .

Variation de $[Cl]_e$ et de $[K]_e$. L'abaissement de $[Cl]_e$, utilisé sur la fibre de vertébré pour réduire g_f et par le fait même "potentialiser" g_{re} de nature potassique, conduit sur la fibre de crabe à une diminution de g_{re} cependant que g_f est inchangée. Si l'abaissement de $[Cl]_e$ se fait à produit $[K]_e [Cl]_e$ constant, cela conduit à une réduction de g_{re} légèrement plus faible et à une augmentation nette de g_f . Le fait que g_{re} semble moins affectée par l'abaissement de $[Cl]_e$ dans cette dernière condition peut être interprété comme le résultat d'un maintien rigoureux de $[Cl]_i$ à sa valeur de référence.

Milieu "chlorure de Choline." HILLE (1967) indique que les ions choline ont tendance à réduire les mouvements de K. Malgré cela, g_{re} se développe en milieu ne contenant que des ions Cl^- associés aux ions choline.

Inhibiteurs des mouvements d'ions K^+ . La relation $g_m = f(E_m)$ est inchangée en présence d'ions Cs^+ ou TEA dans le milieu ; ceci atteste de leur inefficacité à inhiber g_{re} sur la fibre de crabe.

Cependant, lorsque les ions Cs^+ sont apportés dans le milieu en remplacement des ions K^+ , g_f diminue et la relation $g_m = f(E_m)$ se déplace dans le sens des hyperpolarisations de façon similaire à E_r ($\Delta E_r = \Delta E_o$). A ce propos, il est à remarquer que les ions Cs^+ semblent relativement imperméants dans la mesure où ils ne peuvent prévenir l'hyperpolarisation due à l'absence d'ions K^+ .

L'inefficacité des ions Cs^+ et TEA à inhiber g_{re} , le développement de cette conductance en milieu chlorure de choline, et l'abaissement de g_{re} en présence d'une faible concentration extracellulaire de chlore laissent à penser que, sur la fibre de crabe, I_{re} serait porté par les ions Cl^- .

Inhibiteurs des mouvements d'ions Cl^- . Le SITS, agent pharmacologique largement utilisé pour diminuer les mouvements d'ions Cl^- et notamment inhiber fortement l'efflux de chlore sur la fibre de balane, réduit largement g_{re} de la fibre de crabe. De même, sur cette dernière préparation, le remplacement partiel ou total des ions Cl^- du milieu de référence par des ions I^- , ions réputés bloquer I_{Cl} sur la fibre de grenouille (HUTTER et WARNER, 1967) ou le coeur de pigeon (MORGAN et al., 1975) conduit à une inhibition totale et rapide de g_{re} .

3. Effets de l'hypertonie par urée.

En hypertonie par urée, l'évolution de I_c fait apparaître 2 composantes alors qu'une seule est mise en évidence en isotonie. Ceci laisse supposer que dans les conditions normales, le circuit membranaire serait en fait constitué de 3 sous-unités R.C. au moins, se

comportant globalement comme une seule.

De même, g_{re} est réduite en conditions d'hypertonie. La disparition d'une composante de g_{re} amène à postuler l'existence d'une conductance "chlore" au niveau de la membrane du RS. Plus encore, ce résultat est intéressant dans la mesure où il apporte un argument en faveur d'un couplage du type "depolarization induced-Ca release". En effet, il est difficile d'expliquer qu'un phénomène électrique affectant la membrane du RS soit décelable en surface sans postuler l'existence d'une zone de moindre résistance au niveau de la diade.

Cependant, le fait que l'hypertonie par urée conduise à diminuer le courant stationnaire et g_{re} dans les mêmes proportions (30 p. 100 en moyenne) ne renseigne absolument pas sur la valeur réelle de la conductance de la membrane réticulaire. Ces résultats ne peuvent avoir en effet qu'une valeur qualitative, car les phénomènes électriques du RS sont "vus" en surface au travers de diverses résistances d'accès (lumière tubulaire, diade...).

En conclusion, il apparaît que la fibre de crabe présente les différentes caractéristiques ultrastructurales et électriques nécessaires pour qu'un courant venant des tubules stimule le RS par la voie diadique lors du couplage excitation-contraction. Ces résultats sont en plein accord avec le modèle de couplage électrique proposé récemment par MATHIAS et al. (1980).

Cette hypothèse se doit bien sûr d'être confirmée. Cependant, il ne semble pas que les techniques électrophysiologiques classiques existantes à ce jour permettent d'apporter de nouveaux arguments fondamentaux dans ce sens. En effet, il faut maintenant accéder d'une manière plus directe, à la jonction diadique. Pour cela, il semble nécessaire de traiter ce problème par des approches nouvelles et donc des techniques différentes : RS isolé et fluorescence en présence de SITS, étude des contractures caféiniques et potassiques, migration de micromarqueurs sur fibres entières dépolarisées...

RESUME

Le travail a été effectué sur des fibres musculaires de crustacés présentant un PA "tout ou rien" et un phénomène de rectification dans le sens entrant (fibres de type I selon ATWOOD et al. 1965). Ce phénomène de rectification est similaire à celui observé sur les fibres de Vertébrés ; cependant, à l'inverse, il n'est pas mieux démasqué en milieu pauvre chlore. De plus, la conductance membranaire de rectification dans le sens entrant s'avère insensible aux inhibiteurs classiques du canal potassique (TEA, Cs) alors qu'elle est largement réduite par le SITS et l'iodure (inhibiteurs des mouvements d'ions Cl^-). Tout laisse à penser que sur les fibres squelettiques de crabe le courant dynamique induit par la rectification dans le sens entrant est porté par les ions Cl^- . En milieu isotonique, l'équation rendant compte de l'évolution de g_m en fonction de E_m est la suivante : $g_m = g_f + \bar{g}_{re} / [1 + \exp((E_m - E_o)/k)]$ où g_m est la conductance membranaire globale au potentiel E_m ; g_f , la conductance de fuite ; \bar{g}_{re} , la conductance maximale de rectification ; E_o , la valeur du potentiel pour $\bar{g}_{re}/2 = g_{re}$ et K, un paramètre de mise en forme ($K \approx \frac{RT}{3F}$).

L'équation établie à partir de mesures réalisées sur les fibres placées en milieu isotonique rend parfaitement compte des résultats obtenus en conditions d'hypertonie. Il faut cependant souligner que dans ces dernières conditions, g_m diminue de 30 p. 100 et que cette réduction affecte g_f et \bar{g}_{re} dans les mêmes proportions.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence un fait essentiel : dans les conditions normales, un phénomène affectant

la membrane réticulaire est décelable par l'enregistrement de la ddp de part et d'autre du sarcolemme. Il apparaît difficile d'expliquer un tel résultat sans admettre l'existence d'une zone de moindre résistance entre le STT et le RS. La conduction électrique se ferait via les "ponts" diadiques décrits par DELORME et al. (1978).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADRIAN, R.H. (1964)
The rubidium and potassium permeability of frog muscle membrane.
J. Physiol., London, 175, 134-159.
- ADRIAN, R.H. (1969)
Rectification in muscle membrane.
Prog. Biophys. biophys. chem., 19, 341-369.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. (1970)
Voltage clamp experiments in striated muscle fibers.
J. Physiol. London, 208, 607-644.
- ADRIAN, R.H., FREYGANG, W.H. (1962)
The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.
J. Physiol. London, 163, 61-103.
- ALVARADO, R.H., DIGTZ, T.H., MULLEN, T.L. (1975)
Chloride transport across isolated skin of *Rana pipens*.
Am. J. Physiol. 229, 869-874.
- ARMSTRONG, C.M., BEZANILLA, F. (1973)
Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels.
Nature, 242, 459-461.
- ARMSTRONG, C.M., BEZANILLA, F.M., HOROWICZ, P. (1972)
Twitches in the presence of ethylene glycol bis (β -aminoethyl-ether)-N,N'- tetraacetic acid.
Biochim. biophys. Acta, 267, 605-608.
- ATWOOD, H.L., HOYLE, G., SMYTH, T. (1965)
Mechanical and electrical responses of single innervated crab muscle fibres.
J. Physiol., London, 180, 449-482.
- AUBINEAU, J., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1979)
La rectification dans le sens entrant de la fibre squelettique de crabe. Influence de l'hypertonie et des ions chlorure.
J. Physiol., Paris, 75, 35 A-41 A.
- BASTIAN, J., NAKAJIMA, S. (1974)
Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle.
J. gen. Physiol., 63, 257-278.
- BAYLOR, S.M., OETLIKER, H. (1975)
Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum.
Nature, 253, 97-101.
- BERTRAND, F., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1979)
Expériences de potentiel imposé à l'aide de microélectrodes sur la fibre squelettique de crabe. Etude du courant membranaire global.
J. Physiol., Paris, 75, 851-860.

- BEZANILLA, F., ARMSTRONG, C. M. (1972)
 Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into potassium channels in squid axons.
 J. gen. Physiol., 60, 588-608.
- BEZANILLA, F., HOROWICZ, P. (1975).
 Fluorescence intensity changes associated with contractile activation in frog muscle stained with Nile blue A.
 J. Physiol., London, 246, 709-735.
- BIANCHI, C.P., SHANES, A.M. (1959)
 Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity and during potassium contracture.
 J. gen. Physiol., 42, 803-815.
- BIRKS, R.I. (1965)
 The sarcoplasmic reticulum of twitch fibres in the frog sartorius muscle.
 In "Muscle", PERGAMON PRESS Ed., OXFORD, LONDON, 199-216.
- BIRKS, R.I., DAVEY, D.R. (1969).
 Osmotic responses demonstrating the extracellular character of the sarcoplasmic reticulum.
 J. Physiol., London, 202, 171-188.
- BITTAR, E.E., SCHULTZ, R., TESAR, J. (1980)
 Chloride efflux in single barnacle muscle fibres.
 J. Physiol. London, 301, 317-336.
- BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1977).
 Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
 J. Physiol., Paris, 73, 633-674.
- CHANDLER, W.K., RAKWOSKI, R.F., SCHNEIDER, M.F. (1976)
 Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle.
 J. Physiol., London, 254, 285-316.
- COLE, K.S., CURTIS, H.J. (1941)
 Membrane potential of the squid giant axon during current flow.
 J. gen. Physiol., 24, 551-563.
- COSTANTIN, L.L. (1975)
 Contractile activation in skeletal muscle.
 Prog. Biophys. Molecular. Biol., 29, 199-224.
- 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.
- COSTANTIN, L.L., TAYLOR, S.R. (1973)
 Graded activation in frog muscle fibers.
 J. gen. Physiol., 61, 424-443.

- CURTIS, B.A. (1966)
Ca fluxes in single twitch muscle fibers.
J. gen. Physiol., 50, 255-267.
- DELORME, P., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1978)
Effets de l'hypertonie sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
J. Physiol., Paris, 74, 287-404.
- EBASHI, S. (1965)
The sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling. PP. 197-206.
In : Molecular Biology of muscular contraction.
- EBASHI, S., ENDO, M. (1968)
Calcium ion and muscle contraction.
Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 123-183.
- EHRENSPECK, G., BRUDSKY, W.A. (1976)
- Effects of 4-acetamido-4'-isothiocyano-2,2'-disulfonic stilbene on ion transport in turtle bladders.
Biochim. Biophys. Acta. 419, 555-558.
- EISENBERG, B.R., GILAI, A. (1979)
Structural changes in single muscle fibers after stimulation at a low frequency.
J. gen. Physiol., 74, 1-16.
- ENDO, M. (1975)
Conditions required for calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.
Proc. Japan Acad., 51, 467-472.
- ENDO, M. (1977)
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.
Physiol. Rev., 57, 71-108.
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970)
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres.
Nature, London, 228, 34-36.
- FATT, P., KATZ, B. (1953)
The electrical properties of crustacean muscle fibers.
J. Physiol., London, 120, 171-204.
- 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., 223, 21-33.

FRANK, G.B. (1979)

Surface membrane bound calcium is the main source of trigger calcium for excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle fibers.
Proc. West. Pharmacol. Soc., 22, 309-319.

FRANK, G.B. (1980)

The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle.
Biochem. Pharmacol., 29, 2399-2406.

FRANK, G.B., TREFFERS, R.C. (1977)

Calcium antagonism of the block in excitation-contraction coupling produced by a urea exposure removal treatment.
Jap. J. Physiol., 27, 215-224.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970)

Natural variability in the Length of thin and thick filaments in single fibres from a crab, *Portunus depurator*.
J. Cell. Sci., 6, 559-592.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1975)

Membranes particles and transmission at the triad.
Fed. Proc., 34, 1382-1389.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1980)

Structure of sarcoplasmic reticulum.
Fed. Proc., 39, 2403-2409.

FRANZINI-ARMSTRONG, C., HEUSER, J.E., REESE, T.S., SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. (1978)

T. Tubule swelling in hypertonic solutions : a freeze substitution study.
J. Physiol. London, 283, 133-140.

GAY, L.A., STANFIELD, P.R. (1977)

Cs⁺ causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal muscle fibres.
Nature, 267, 169-170.

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

Evidence for anion perselective membrane in crayfish muscle fibers and its possible role in excitation-contraction coupling.
J. gen. Physiol., 47, 189-214.

HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., KRASNE, S., CIANI, S. (1977)

Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of a starfish in K⁺-TL⁺ mixtures.
J. gen. Physiol., 70, 269-281

HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., ROSENTHAL, N.P. (1976)

Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish.
J. gen. Physiol., 67, 621-638.

- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974)
 Etude des phénomènes de rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe (*Carcinus maenas*).
 C. R. Acad. Sci., Paris, 278, 2457-2460.
- HELLAM, D.C., PODOLSKY, R.J. (1969)
 Force measurements in skinned muscle fibres.
 J. Physiol., London, 200, 807-819.
- HILLE, B. (1967)
 The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve tetraethyl-ammonium ion.
 J. gen. Physiol., 50, 1287-1302.
- HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1959)
 The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.
 J. Physiol., London, 148, 127-160.
- HUTTER, O.F., NOBLE, D. (1960)
 The chloride conductance of frog skeletal muscle.
 J. Physiol., London, 161, 89-102.
- HUTTER, O.F., WARNER, A.E. (1967)
 Action of some foreign cations and anions on the chloride permeability of frog muscle.
 J. Physiol., London, 189, 445-460.
- HUTTER, O.F., WILLIAMS, T.L. (1979)
 A dual effect of formaldehyde on the inwardly rectifying potassium conductance in skeletal muscle.
 J. Physiol. London, 286, 591-606.
- ISENBERG, G. (1976)
 Cardiac purkinje fibers : cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents.
 Pflügers Arch., 365, 99-106.
- KATZ, B. (1949)
 Les constantes électriques de la membrane du muscle.
 Arch. Sci. Physiol., 3, 285-300.
- KELLY, D.E., KUDA, A.M. (1979)
 Subunits of the triadic junction in fast skeletal muscle as revealed by freeze-fracture.
 J. Ultrastruct. Res., 68, 220-233.
- 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., London, 229, 409-455.
- KITAZAWA, T., ENDO, M. (1977)
 Increase in passive calcium flux into the sarcoplasmic reticulum by "depolarization" on caffeine.
 Proc. Japan. Acad. In press.
- KNAUF, P.A., FURHMAN, G.F., ROTHSTEIN, S., ROTHSTEIN, A. (1971)
 The relationship between anion exchange and net anion flow across the human red blood cell membranes.
 J. gen. Physiol., 69, 363-386.

- KNAUF, P.A., ROTHSTEIN, A. (1971)
 Chemical modification of membrane. I. Effects of sulfhydryl and amino reactive reagents on anion and cation permeability of the human red blood cell.
J. gen. Physiol., 58, 190-210.
- LUTTGAU, H.C. (1977)
 New trends in membrane physiology of nerve and muscles fibres.
J. comp. Physiol., 120, 51-70.
- MATHIAS, R.T., LEVIS, R.A., EISENBERG, R.S. (1980)
 Electrical models of excitation contraction coupling and charge movement in skeletal muscle.
J. gen. Physiol., 76, 1-31.
- MATSUBARA, S., SAKAI, T., HASHIZUME, K. (1977).
 Chloride-induced contraction in a skinned fiber of toad striated muscle.
Jap. J. Physiol., 27, 501-509.
- MORGAN, K.G., ENTRIKIN, R.K., BRYANT, S.H. (1975)
 Myotonia and block of chloride conductance by iodide in avian muscle.
Am. J. Physiol., 229, 1155-1158.
- NAKAJIMA, Y., ENDO, M. (1973)
 Release of calcium induced by "depolarization" of the sarcoplasmic reticulum membrane.
Nature New Biol., 246, 216-218.
- NATORI, R. (1954)
 The property and contraction process of isolated myofibrils.
Jikeikai Med. J., 1, 119-126.
- NATORI, R. (1955)
 Repeated contraction and conductive contraction observed in isolated myofibrils.
Jikeikai Med. J., 2, 1-5.
- RUBIO, R., SPERELAKIS, N. (1972)
 Penetration of horseradish peroxidase into the terminal cisternae of frog skeletal muscle fibers and blockade of caffeine contracture by Ca^{++} depletion.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 124, 57-71.
- RUSSEL, J.M. (1978)
 Effects of ammonium and bicarbonate- CO_2 on intracellular chloride levels in *Aplysia* neurons.
Biophys. J., 22, 131-137.
- RUSSEL, J.M., BORON, W.F. (1976)
 Role of chloride transport in regulation of intracellular pH.
Nature (Lond.), 264, 73-74.
- RUSSEL, J., BRODWICK, M.S. (1979)
 Properties of chloride transport in barnacle muscle fibers.
J. gen. Physiol., 73, 343-368.

- SANDOW, A. (1952)
Excitation-contraction coupling in muscular response.
Yale J. Biol. Med., 25, 176-201.
- SCHNEIDER, M.F., CHANDLER, W.K. (1973)
Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling.
Nature, London, 242, 244-246.
- SOMLYO, A.V. (1979)
Bridging structures spanning the gap at the triad of skeletal muscle.
J. Cell. Biol., 80, 743-750.
- SPERELAKIS, N.R., VALLE, C., OROZCO, A., MARTINEZ-PALOMO, A., RUBIO, R. (1973)
Electromechanical uncoupling of frog skeletal muscle by possible change in sarcoplasmic reticulum content.
Ann. J. Physiol., 225, 793-800.
- STANFIELD, P.R. (1970)
The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of the skeletal muscle.
J. Physiol. London, 209, 209-229.
- VAUGHAN-JONES, R.D. (1977)
The effect of lowering external sodium on the intracellular sodium activity of crab muscle fibers.
J. Physiol. London, 264, 239-265.
- WEISS, G.B., BIANCHI, C.P. (1965)
The effect of potassium concentration on ⁴⁵Ca uptake in frog sartorius muscle.
J. Cellular Comp. Physiol., 65, 385-392.
- WHITE, M.M., MILLER, C. (1979)
A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*.
J. of Biochem. chem., 254, 10161-10166.
- ZIERLER, K.L. (1973)
Some aspects of the biophysics of muscle.
PP. 117-183. In : The structure and function of Muscle. Vol. III, ed. C.H. Bourne.
New-York, London : Academic Press.

ANNEXE

ANNEXE 1

I_g = courant global

I_{re} = courant de rectification dans le sens entrant

I_f = courant de fuite

E_x = potentiel d'inversion du courant I_{re}

E_f = potentiel d'inversion du courant I_f

$$I_g = I_{re} + I_f$$

$$I_g = g_{re} (E_m - E_x) + (E_m - E_f)$$

$$I_g = \overline{g_{re}} \left[\frac{1}{1 + \exp.((E_m - E_o)/K)} \right] \cdot (E_m - E_x) + g_f (E_m - E_f)$$

$$dI_g/dE_m = dI_{re}/dE_m + dI_f/dE_m$$

$$dI_{re}/dE_m = - \frac{\overline{g_{re}} (1/K) \cdot \exp.((E_m - E_o)/K) \cdot (E_m - E_x)}{1 + \exp.((E_m - E_o)/K)^2} + \frac{\overline{g_{re}}}{1 + \exp.((E_m - E_o)/K)} \cdot \frac{d(E_m - E_x)}{dE_m}$$

comme $g_{re} \left[1 + \exp.((E_m - E_o)/K) \right] = \overline{g_{re}}$ et $\exp.((E_m - E_o)/K) = (\overline{g_{re}}/g_{re}) - 1$

$$dI_{re}/dE_m = g_{re} \left[\frac{d(E_m - E_x)}{dE_m} - \frac{1}{K} \cdot \left(1 - \frac{g_{re}}{\overline{g_{re}}} \right) (E_m - E_x) \right]$$

comme la relation entre I_f et E_m est une fonction linéaire $dI_f/dE_m = g_f$ et en supposant que $d(E_m - E_x)/dE_m = 1$, ce qui n'est vrai que si E_x est constant, il peut être écrit :

$$dI_g/dE_m = g_{re} \left[1 - \frac{1}{K} \left(1 - \frac{g_{re}}{\overline{g_{re}}} \right) (E_m - E_x) \right] + g_f$$

Pour $E_m \leq -90$ mv, $g_{re} = \overline{g_{re}}$, $dI_g/dE_m = \overline{g_{re}} + g_f$

Pour $E_m = -40$ mv $dI_g/dE_m = g_f$

