

N° d'ordre : 1147

50376
1984
66

50376
1984
66

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

OPTION : PHYSIOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE

(3ème cycle)

par

Hassan JDAÏAA

L'ANALYSE DE LA CONDUCTANCE MEMBRANAIRE AUX IONS CALCIUM DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE D'ECREVISSE - MISE EN EVIDENCE DE DEUX COURANTS ENTRANTS DE CALCIUM



Soutenu le 26 Avril 1984 devant la Commission d'Examen

Président	M. PORCHET	Professeur à l'Université de Lille 1
Rapporteur	M. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille 1
Examineurs	Mme MOUNIER	Professeur à l'Université de Lille 1
	M. ROUGIER	Professeur à l'Université Claude Bernard, Lyon 1

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

Je tiens à exprimer à Monsieur P. GUILBAULT toute ma reconnaissance, non seulement m'accueillir dans son Laboratoire et me proposer un thème de recherche mais aussi m'initier aux techniques électrophysiologiques qui m'étaient inconnues ; il m'a aussi permis de mener ce travail à bien en y consacrant une importante partie de son temps, et en apportant, grâce à sa constante disponibilité, son aide constante et efficace. Je tiens à lui affirmer mes sincères remerciements.

Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur M. PORCHET tous mes remerciements de l'honneur qu'il me fait en présidant le Jury.

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur O. ROUGIER de l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être membre de ce Jury. Ses critiques ne peuvent qu'être bénéfiques pour notre Laboratoire.

Je remercie Madame le Professeur Y. MOUNIER d'avoir acceptée de faire partie de mon Jury. Sa compétence et son autorité suscitent toute mon admiration.

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

- Madame F. ANSCUTTER pour son amicale et précieuse collaboration technique.

- Madame C. ROGER qui a accepté avec courage la dactylographie de ce mémoire. Je lui renouvelle mes remerciements, ainsi qu'à Madame C. PLANCQ qui a bien voulu assurer une partie de la frappe.

Je ne saurais oublier Mme J. BERNARD, Mrs. G. BRÛLE, G. HAUDECOEUR, A. LEROY pour leur aide amicale et spontanée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
PREMIER CHAPITRE : POSITION DU PROBLEME	p. 6
A. Problème d'imposition du potentiel	p. 8
B. Obtention du courant de calcium à partir du courant global	p. 9
C. L'inactivation du courant de calcium	p. 11
D. Difficulté de la détermination du potentiel apparent d'équilibre aux ions Ca^{2+} (E_{Ca})	p. 14
E. Existence possible de plusieurs composantes de courant entrant	p. 15
F. Conclusion	P. 17
DEUXIEME CHAPITRE : MATERIEL ET METHODE	p. 19
A. Matériel	p. 20
B. Enregistrement du courant de membrane dans les conditions de potentiel imposé	p. 20
C. Milieu	p. 25
TROISIEME CHAPITRE : RESULTATS	p. 27
I - ETUDE DES PHENOMENES DE RECTIFICATION	p. 28
A. Etude de la rectification dans le sens entrant	p. 29
1. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire de potassium (90 %)	p. 31
2. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire d'ions Cl^- (90 %)	p. 33
3. Effets de l'acide niflumique	p. 37
4. Conclusion sur la rectification dans le sens entrant	p. 44

B. Etude de la rectification dans le sens sortant	p. 46
1. Effets des ions TEA ⁺ (60 mM) sur la rectification dans le sens sortant	p. 47
2. Effets des ions Cs ⁺ (10 mM) sur la rectification dans le sens sortant	p. 49
3. Conclusion	p. 49
II - ETUDE DU COURANT (I_{Ca}) ET DE LA CONDUCTANCE (G_{Ca}) DE MEMBRANE AUX IONS Ca ²⁺	P. 52
A. Etude du courant entrant de calcium en présence d'ions Mn ²⁺	p. 55
B. Etude de I_{Ca} et G_{Ca} en présence de procaïne	p. 59
1. Analyse de I_{Ca}	p. 59
2. Influence de la procaïne (2 mM) sur le courant capacitif et stationnaire	p. 62
3. Mise en évidence de deux composantes de courant entrant de calcium I_{Ca1} et I_{Ca2}	P. 69
4. Mise en évidence de I_{Ca2} en absence de I_{Ca1} inhibé par une prédépolarisation conditionnante	p. 76
5. Analyse des conductances G_{Ca2} et G_{Ca1} en fonction du temps et du potentiel	P. 80
a. G_{Ca2}	P. 80
α/ Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture du canal calcique correspondant à la 2 ^{ème} composante	p. 80
β/ Analyse de la conductance calcique G_{Ca2} en fonction du potentiel	p. 84
b. G_{Ca1}	P. 85
α/ Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture du canal correspondant à G_{Ca1}	p. 87

B/ Analyse de la conductance calcique G_{Ca_i} au maximum du courant entrant ($G_{Ca_i}^*$)	p. 89
c. Conclusion	p. 91

QUATRIEME CHAPITRE : PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSION GENERALE p. 93

A. Les phénomènes de rectification	p. 95
B. Etude de la conductance calcique	p. 97
C. Conclusion	P. 100

RESUME

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS UTILISEES

- AN : acide niflumique
- E_{Na} : potentiel apparent d'équilibre aux ions Na^+ .
- E_{Ca} : potentiel apparent d'équilibre aux ions Ca^{2+} .
- E_0 : potentiel correspondant à la demi-activation maximale.
- E_f : potentiel d'inversion du courant de fuite.
- E_i : potentiel imposé.
- E_x : potentiel d'inversion du courant de rectification.
- G_r : conductance de rectification.
- G_m : conductance globale.
- G_f : conductance de fuite.
- G_{Ca} : conductance aux ions Ca^{2+} .
- \bar{G} : conductance maximale.
- $G_{Ca\infty}$: conductance aux ions Ca^{2+} au temps $t=\infty$.
- G_{Ca}^* : conductance aux ions Ca^{2+} correspondant au maximum de courant entrant de calcium.
- h : disponibilité de la conductance calcique.
- h_0 : disponibilité de la conductance calcique d'origine (au potentiel HP).
- HP : potentiel de référence ("Holding potentiel").
- I_m : courant globale.
- I_f : courant de fuite.
- I_c : courant capacitif.
- I_s : courant stationnaire.
- $I_{Ca\infty}$: courant aux ions Ca^{2+} à $t=\infty$
- K_D : constante de dissociation apparente.
- K : paramètre de mise en forme de la relation.
- m : variable d'activation

- m_0 : variable d'activation au potentiel HP.
- m_∞ : valeur stationnaire de m en fin de transformation d'un nombre de sites de l'état β à l'état α .
- Q_β : charges intramembranaires de type β .
- r_i : résistance du milieu intracellulaire par unité de longueur (en $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).
- R_i : résistivité du milieu intracellulaire (en $\Omega \cdot \text{cm}$)
- R_{ds} : résistance du volume intracellulaire.
- R_e : résistance d'entrée.
- R_a : résistance d'accès.
- RP (ou E_r) : potentiel de repos.
- SITS : 4-acetamido-4'isothiocyanostilbène -2, 2'disulfonic.
- x : nombre de particules impliquées dans l'activation du canal.
- λ : constante d'espace.
- τ_m : constante de temps d'activation.
- τ_h : constante de temps d'inactivation.

INTRODUCTION

Ce mémoire concerne l'analyse de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse.

L'augmentation de la perméabilité membranaire aux ions Ca^{2+} directement impliquée dans le déclenchement du potentiel d'action (PA) est observée sur de nombreuses cellules excitables (voir revue de HAGIWARA et BYERLY, 1981) comme par exemple les neurones de mollusque (MEVES, 1968 ; KOSTYUK, 1980), les dendrites des cellules nerveuses (LINAS et HESS, 1976), les fibres musculaires lisses (TOMITA, 1975), les fibres musculaires squelettiques d'insectes (ASHCROFT, 1981) et de crustacés (HAGIWARA et NAKA, 1964 ; FATT et GINSBORG, 1958). Cet accroissement de la perméabilité aux ions Ca^{2+} est un phénomène propre à la plupart des cellules. Elle est à l'origine d'une entrée de calcium qui est un messenger important dans les différents processus du fonctionnement cellulaire. On connaît en particulier le rôle majeur du calcium dans les mécanismes du couplage excitation-contraction (ENDO, 1977 ; BEELER et REUTER, 1970), du couplage excitation-sécrétion (BAKER et RINK, 1975) et des mouvements des êtres unicellulaires (NAITOH et KANEKO, 1972 ; ECKERT, 1972 ; DEITMER, 1983).

Cette entrée de calcium est d'autant plus primordiale qu'elle permet la régulation des autres perméabilités ioniques membranaires par le biais d'un accroissement de l'activité intracellulaire de cet ion calcium. En particulier MEECH (1978) montre, sur les neurones de mollusque, que l'augmentation du calcium intracellulaire déclenche dans les conditions de potentiel imposé un courant sortant de potassium dépendant donc du courant entrant de calcium. De même il est bien connu que les variations de concentration des ions Ca^{2+} aux faces des membranes excitables déplacent les courbes d'activation et d'inactivation des conductances ioniques membranaires fonction du

potentiel vers les hyperpolarisations ou les dépolarisations membranaires suivant le sens des variations de concentration. (REUTER, 1973).

L'étude de la conductance calcique en fonction du potentiel et du temps est moins aisée que celle relative à la conductance sodique en raison d'une part d'une très grande différence des concentrations des ions Ca^{2+} des milieux intra et extracellulaire et d'autre part de la présence d'un courant sortant non spécifique d'une espèce ionique qui n'est pas bloqué par les inhibiteurs de la perméabilité membranaire aux ions K^+ (tétréthylammonium, 4-aminopyridine, Césium...).

Pour arriver à analyser quantitativement la conductance aux ions Ca^{2+} , il a été nécessaire de rechercher les conditions ioniques les plus favorables, en d'autres termes de mettre au point un milieu physiologique qui supprime les phénomènes de rectification membranaire (sens sortant et entrant). La rectification dans le sens entrant traduit une augmentation de la conductance membranaire lors des hyperpolarisations. Sur la fibre musculaire d'écrevisse, les ions TEA^+ ou Cs^+ sont sans effet sur cet accroissement de conductance membranaire (BRÛLÉ et al., 1983b). Par contre, nous montrons que les inhibiteurs connus pour inhiber la perméabilité membranaire aux ions Cl^- (échange $\text{HCO}_3^- - \text{Cl}^-$) abolissent cette rectification. C'est le cas de l'acide niflumique (AN) qui, à concentration de 10^{-6} M, bloque réversiblement la rectification de sens entrant. Ainsi, en présence d'AN, il devient possible d'extrapoler le courant de fuite pour tous les niveaux de dépolarisation membranaire à partir de la relation courant-potentiel établie pour les hyperpolarisations. Quant à la rectification dans le sens sortant qui traduit une augmentation de conductance lors des dépolarisations, elle est,

pour une large part, inhibée par les ions TEA^+ ou Cs^+ . La part non bloquée par les inhibiteurs de perméabilité potassique, disparaît sous l'influence de la procaïne. Dans ces conditions en milieu de référence (milieu de VAN HARREVELD) additionné de TEA^+ , d'AN et de procaïne, le courant membranaire enregistré lors de dépolarisations imposées n'est constitué que de deux composantes : le courant de fuite qui varie linéairement avec le potentiel et le courant entrant de calcium qui dépend du potentiel et du temps.

Les différents résultats montrant la suppression de tous les phénomènes de rectification et permettant d'établir la condition la plus adéquate pour obtenir une bonne dissection du courant entrant de calcium, constituent le premier chapitre relatif aux phénomènes de rectification membranaire.

La deuxième partie des résultats est consacrée à l'étude de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} . L'ensemble des résultats montrent, en accord avec ceux de ZHRADNIK et ZACHAR (1982) obtenus sur la même préparation, que le courant entrant de calcium présente deux composantes témoignant de l'existence de deux populations de canaux calciques activés lors de dépolarisations membranaires. La première composante s'active pour un seuil de potentiel membranaire plus négatif (- 40 mV) que celui de la deuxième (- 30 à - 25 mV). De même, contrairement à la première, la deuxième composante ne s'inactive pas ou s'inactive avec une grande constante de temps. Enfin l'ouverture de chaque canal calcique requiert le déplacement de 6 particules pour la première composante et de 2 seulement pour la deuxième.

Dans le but de faciliter la présentation de ce mémoire, il est subdi-

visé en 4 chapitres :

- le premier concerne la position du problème relatant les principaux travaux publiés et les difficultés d'analyse de la conductance calcique ;

- le deuxième est relatif au matériel utilisé et à la méthode d'enregistrement du courant membranaire dans les conditions de potentiel imposé ;

- le troisième aux résultats discutés en rapport avec la bibliographie, au fur et à mesure de leur énoncé ;

- le quatrième est consacré à la conclusion générale.



P R E M I E R C H A P I T R E

P O S I T I O N D U P R O B L E M E

Contrairement aux résultats obtenus, quelquefois controversés, sur les effets du calcium extracellulaire sur le muscle de Vertébré (voir revue de FRANK, 1980), l'élimination du calcium provoque un découplage excitation-contraction dans le muscle des Crustacés. La diversité des caractéristiques fondamentales en particulier électrophysiologiques des courants calciques chez de nombreuses espèces suppose l'existence probable de plusieurs types de canaux calciques pouvant correspondre à des structures moléculaires différentes (voir HAGIWARA et BYERLY, 1981). A l'inverse, les canaux sodiques, décrits dans de nombreuses structures excitables, présentent le plus souvent les mêmes caractéristiques, comme par exemple leur sélectivité vis-à-vis des cations, leur sensibilité à la tétrodotoxine (K_D équivalent). Cependant cette homogénéité de structure au vue des caractéristiques des canaux sodiques commence actuellement à être mise en défaut puisqu'en particulier JAIMOVICH et al. (1983) montrent des différences notables de ces canaux présents dans la membrane sarcolemmique et tubulaire de la fibre musculaire squelettique de grenouille vis à vis de dérivés de la tétrodotoxine.

La différence des caractéristiques qui apparaît dans le fonctionnement des canaux calciques peut aussi refléter les difficultés d'analyse de la conductance calcique. En effet, de nombreux problèmes techniques surgissent lorsque l'on désire étudier le fonctionnement de ces canaux calciques dans les membranes où ils se trouvent, comme par exemple dans le système tubulaire transverse des fibres musculaires. Ces difficultés techniques sont également plus ou moins accentuées quand on s'adresse aux fibres musculaires de Crustacés comme cela est précisé par ZACHAR et al. (1978).

A - PROBLEME D'IMPOSITION DU POTENTIEL

L'analyse du courant entrant de calcium, dans les conditions de potentiel imposé, en particulier de la fibre musculaire de Crustacé est rendue difficile par la présence des invaginations longitudinales du sarcolemme et l'abondance du système tubulaire transverse (BRANDT et al., 1965 ; PEACHY, 1967 ; REUBEN et al., 1967 ; EISENBERG, 1967). Sur la fibre musculaire d'écrevisse, l'analyse du courant de membrane en conditions de potentiel imposé ne permet pas à HENČEK et ZACHAR (1977) d'imposer correctement le potentiel en dépit de l'emploi de la technique de "patch clamp" qui permet de mesurer le courant membranaire d'une petite surface de membrane. Ces auteurs observent en effet des oscillations du courant membranaire lorsque la surface interrogée dépasse $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ (diamètre de 50 μm). Ces oscillations sont dues à l'interférence du courant de membrane tubulaire avec celui de surface. Ces mêmes oscillations du courant sont décrites par KEYNES et al. (1973) sur la fibre de balane en employant une technique de potentiel imposé dérivant de celle de HODGKIN et HUXLEY (1952). KEYNES et al. (1973) suppriment les oscillations de courant en perfusant intracellulairement la fibre par un milieu privé de potassium ou contenant du tétraéthylammonium (TEA). Ainsi l'inhibition du courant sortant de potassium permet le développement plus apparent d'un courant de calcium dont la diminution au cours du temps est due à un accroissement de l'activité du calcium intracellulaire plutôt qu'à une inactivation dépendant du voltage. De même, le courant de membrane présente de nombreuses oscillations (BERTRAND et al., 1979) quand la fibre de crabe dans les conditions de potentiel imposé, est interrogée à l'aide de la technique des trois microélectrodes insérées à l'une des extrémités de la fibre (ADRIAN et al.,

1970). Il semble donc que les oscillations du courant de membrane soient attribuables à l'interférence du courant membranaire de surface et tubulaire plutôt qu'à l'emploi d'une technique particulière de potentiel imposé.

B - OBTENTION DU COURANT DE CALCIUM A PARTIR DU COURANT GLOBAL

Même si l'imposition du potentiel à l'ensemble des membranes est réalisée, la dissection du courant de calcium à partir du courant membranaire global présente des difficultés. Mis à part l'emploi de la tétrodoxine (TTX) qui bloque très sélectivement le courant entrant de sodium sans modifier les autres cinétiques des différentes composantes du courant membranaire, on ne dispose pas présentement de substances pharmacologiques aussi sélectives pour inhiber les autres courants ioniques en particulier le courant de calcium et les courants sortants généralement portés totalement ou partiellement par les ions potassium.

Actuellement, pour les fibres musculaires de CRUSTACES, l'ouverture des canaux ioniques activés par les dépolarisations membranaires conduit à l'apparition d'un courant entrant de calcium et de un, deux ou trois courants sortants portés par les ions K^+ . C'est ainsi que, sur la fibre de balane, KEYNES et al. (1973) décrivent un courant sortant de K^+ similaire au courant retardé trouvé sur de nombreuses structures excitables. En 1975, sur la fibre musculaire squelettique de Crabe, MOUNIER et VASSORT mettent en évidence deux courants sortants de potassium (I_{K_1} et I_{K_2}) ; I_{K_1} dépendant de l'entrée des ions Ca^{2+} (et donc de l'activité interne de ces ions) et I_{K_2} étant le courant sortant retardé classique équivalent à celui décrit par KEYNES et al. (1973). BRÛLÉ et al. (1983 b)

montrent que de plus le courant I_{K_2} est pour une part porté par les ions Cl^- . Un courant sortant I_{K_3} au niveau de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse est décrit par HENCEK et al. (1978). L'existence de ces différents courants sortants sur les fibres de Crustacés peut rendre compte de l'impossibilité de bloquer complètement le courant sortant par les ions TEA^+ . C'est ainsi que HAGIWARA et al. (1969) sont conduits à utiliser un anesthésique local, la procaïne, pour inhiber une composante de courant sortant associé dans les conditions normales au courant entrant de calcium. Ces derniers auteurs observent en effet, qu'en absence de procaïne, le potentiel d'inversion du courant entrant de "calcium" n'est que de + 30 mV en présence de TEA alors que l'addition de procaïne au milieu externe (toujours en présence de TEA) les rend très nettement plus positif, supérieur à + 60 mV. L'inhibition du courant sortant résistant aux ions TEA^+ ne dépend pas de l'activité interne de calcium. Cette difficulté d'inhiber totalement le courant sortant est rencontrée par de nombreux auteurs travaillant sur diverses préparations, en particulier sur les neurones d'escargot (MEECH et STANDEN, 1975 ; KOSTYUK et al., 1975 a, b, c ; HEYER et LUX, 1976 ; THOMPSON, 1977) ainsi que sur les fibres musculaires squelettiques de grenouille (SANCHEZ et STEFANI, 1983). De même si les ions K^+ sont remplacés par les ions Cs^+ , une part du courant sortant dépendant du voltage persiste sur les neurones d'escargot (MEVES et VOGEL, 1973 ; KOSTYUK et al., 1977). Enfin tout récemment, ZAHRADNIK et ZACHAR (1982) sont conduits pour éliminer complètement le courant sortant à perfuser la fibre musculaire squelettique d'écrevisse par un milieu sans K^+ contenant du TEA^+ ; le milieu extracellulaire ne contenant pas de K^+ ni de Na^+ . Dans ces conditions ioniques particulières, ces derniers auteurs montrent que le courant entrant de calcium présente deux composantes (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) reflétant selon eux l'existence dans la membrane de deux populations de canaux calciques.

C - L'INACTIVATION DU COURANT ENTRANT DE CALCIUM

Il est bien connu que l'inactivation sodique est un processus qui dépend du voltage et du temps et qu'il ne dépend pas de l'intensité de ce courant de Na^+ ou de la concentration des ions Na^+ de part et d'autre de la membrane (HODGKIN et HUXLEY, 1952 ; MEVES, 1978). Par contre, en ce qui concerne l'inactivation du courant de calcium, elle serait d'ue selon les préparations utilisées et les auteurs :

i) à une accumulation d'ions Ca^{2+} . C'est ce type d'inactivation apparente que décrivent KEYNES et al. (1973) pour la fibre musculaire de balane. Ces auteurs n'observent pas de diminution du courant entrant de calcium quand la fibre est perfusée par une solution contenant de l'EGTA qui, de ce fait, maintient à valeur constante (de l'ordre de 10^{-7}M) l'activité interne de calcium. De même au niveau des neurones d'escargot une diminution de la constante de temps d'inactivation, à la suite d'une injection interne d'EGTA, est observée par BROWN et al. (1981) et par PLANT et STANDEN (1982) ;

ii) à un processus dépendant du voltage. A partir de leurs tracés de courant, HENCEK et ZACHAR (1977), sur la fibre musculaire squelettique d'écrevisse, décrivent ce mécanisme selon la théorie de HODGKIN et HUXLEY, faisant intervenir les constantes de vitesse α_h et β_h fonction du potentiel. De même sur la fibre de Crabe, MOUNIER et VASSORT (1975) donnent l'équation qui permet de déterminer la disponibilité du courant de calcium (variable h) en fonction du potentiel ;

iii) à l'importance de l'entrée des ions Ca^{2+} . Cette entrée agissant sur le processus d'inactivation. En effet, la bibliographie relate actuellement un processus plus complexe pour l'inactivation du canal calci-

que. Celle-ci serait liée, soit en partie, soit totalement, selon les structures interrogées, à l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule indépendamment d'une modification éventuelle de l'activité interne de calcium. Les ions Ca^{2+} en passant dans le canal agiraient sur l'inactivation de celui-ci. Dans ce cadre, différents auteurs sont amenés à prendre en compte ce type d'inactivation puisque la relation traduisant la variable h en fonction du potentiel n'est pas d'allure sigmoïde. En effet, si pour de faibles dépolarisations h décroît en fonction du potentiel, à partir d'une certaine valeur de celui-ci, h croît de nouveau pour de plus amples dépolarisations ; h étant très voisin de 1 aux environs du potentiel d'inversion du courant entrant de calcium. C'est ce type d'inactivation qui est retenu par ASHCROFT et STANFIELD (1980, 1982 b) pour la fibre musculaire squelettique d'insecte. A l'appui de cette 3ème interprétation, il est important de signaler que le courant entrant porté par les ions Ca^{2+} qui diminue rapidement, voit sa cinétique d'inactivation considérablement ralentie lorsqu'il est porté par d'autres ions bivalents tels que les ions Sr^{2+} et Ba^{2+} . TILLOTSON (1979), BREHM et ECKERT (1978), SALKOFF et WYMAN (1983) interprètent l'augmentation de la constante de temps d'inactivation en émettant l'hypothèse que les ions Ba^{2+} et Sr^{2+} sont moins efficaces que les ions Ca^{2+} pour bloquer les canaux calciques. A l'inverse sur l'oeuf d'étoile de mer, HAGIWARA et al. (1975) constatent que le courant entrant diminue avec la même constante de temps qu'il soit porté indifféremment par les ions Ba^{2+} , Sr^{2+} ou Ca^{2+} .

Par ailleurs, des auteurs sont amenés pour expliquer leurs résultats à privilégier une hypothèse parmi les trois mentionnées ci-dessus sans pour autant rejeter les autres. KOSTYUK (1980) postule que l'inactivation du courant de calcium de la fibre nerveuse d'escargot est le résultat de l'activation d'un courant sortant de potassium dépendant de calcium ; ainsi le

Ba^{2+} et le Sr^{2+} seraient moins efficaces que les ions Ca^{2+} pour initier ce courant de K^+ (HAGIWARA et al., 1975 ; GORMAN et HERMAN, 1979 ; HAGIWARA et OHMORI, 1982). Cependant sur les fibres musculaires d'insecte, cette inactivation ne semble pas être liée à une activation d'un courant sortant dépendant du calcium, mais plutôt due à la fixation des ions Ca^{2+} sur des sites membranaires lors de leur passage à travers le canal calcique (ASHCROFT et STANFIELD, 1980, 1982 b).

Il est aussi connu que les canaux calciques sont pour une très large part localisés dans la membrane du système tubulaire transverse (NICOLA et al., 1980 ; ALMERS et al., 1981 ; STEFANI et CHIARANDINI, 1982). Ainsi la diminution du courant entrant de calcium pourrait être aussi due non à une accumulation du calcium dans la fibre mais à une "déplétion" de ces ions dans les tubules dans la mesure où la diminution du courant calcique en fonction du temps n'est plus observée en présence de tampon EGTA-Ca dans le milieu externe (voir HAGIWARA et BYERLY, 1981).

En conclusion, le mécanisme d'inactivation de la conductance calcique est à l'heure actuelle très controversé dans la mesure où ce processus peut être différent d'une préparation à l'autre. Finalement au niveau de la fibre musculaire d'écrevisse, HENČEK et ZACHAR (1977) explique la diminution en fonction du temps du courant entrant de calcium en faisant intervenir un processus d'inactivation qui dépend du voltage. Par contre en 1983 sur la même préparation, POLEDNA et al. prennent en compte plutôt le processus d'inactivation dépendant du calcium.

D - DIFFICULTE DE LA DETERMINATION DU POTENTIEL APPARENT D'EQUILIBRE AUX IONS Ca^{2+} (E_{Ca})

La différence importante de concentration des ions Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane crée une situation particulière pour le courant de calcium. En effet, l'existence de ce fort gradient calcique ne permet pas au courant de calcium de s'écouler dans le sens sortant impliquant que la relation courant-potentiel ne varie pas linéairement en fonction du potentiel quand la conductance maximale aux ions calcium est atteinte. Ainsi, après avoir atteint sa valeur maximale, la conductance semble diminuer, traduisant ainsi un phénomène de rectification au voisinage du potentiel d'inversion du courant entrant de calcium. Ce phénomène de rectification est d'ailleurs prévu par la théorie du champ de GOLDMAN quand le rapport des concentrations ioniques intra et extracellulaire est supérieur à 10^2 . En effet cette rectification du courant régénératif de calcium n'est pas observée pour le courant de Na puisque le rapport des concentrations de Na n'est que de 10. Ainsi le potentiel d'inversion du courant I_{Na} est proche sinon égal au potentiel d'équilibre aux ions Na^+ ($E_{\text{Na}} = + 60 \text{ mV}$). La relation courant (I_{Na})-potentiel est linéaire dans la gamme des potentiels très positifs, l'intersection de la courbe avec l'axe du voltage donne la valeur de E_{Na} . Par contre, l'accroissement du gradient de concentration pour les ions Na^+ en particulier en milieu externe sans Na^+ , conduit à une relation courant I_{Na} -potentiel qui présente alors comme pour I_{Ca} un phénomène de rectification. La présence de cette rectification du courant I_{Ca} ne permet pas à partir de la relation courant-potentiel de déterminer avec exactitude le potentiel d'inversion de ce courant qui en théorie doit être égal au potentiel E_{Ca} .

Enfin la présence d'un courant sortant, qui résiste aux inhibiteurs

de perméabilité classique ou qui persiste en milieu sans potassium (TEA, 4-AP, Cs⁺) activé aux potentiels très positifs (≥ 0 mV), introduit une distortion dans la relation courant-potentiel qui devient linéaire du fait que le courant I_{Ca} est associé à un courant sortant. Cette *linéarisation* de la relation peut expliquer la faible valeur du potentiel d'équilibre apparent déterminé par de nombreux auteurs sur diverses préparations.

Sur la fibre musculaire de grenouille SANCHEZ et STEFANI (1983) déterminent une valeur de + 30 mV seulement pour le potentiel d'inversion du courant de calcium en présence dans le milieu externe de 120 mM de TEA. En ce qui concerne les fibres de crustacés, la valeur estimée par MOUNIER et VASSORT (1975) sur la fibre de crabe, par HAGIWARA et al. (1969) sur la fibre de balane en absence de procaïne, est aussi de + 30 mV alors que HENČEK et ZACHAR (1977) sur la fibre d'écrevisse donne pour E_{Ca} une valeur de + 85 mV. Cependant cette faible valeur de E_{Ca} donnée par HAGIWARA et al. (1969) est considérablement augmentée quand la fibre est immergée dans le milieu externe contenant, en plus de TEA, de la procaïne, substance qui selon ces auteurs bloque une composante de courant sortant résistante aux ions TEA⁺.

E - EXISTENCE POSSIBLE DE PLUSIEURS COMPOSANTES DE COURANT ENTRANT

Les travaux de OKAMOTO et al. (1976) effectués sur la membrane de l'oeuf d'*Hocyntia routzi* révèlent l'existence de deux composantes de courant entrant. De même des observations analogues sont rapportées par MIYAZAKI et al. (1972) en ce qui concerne la membrane de l'oeuf d'étoile de mer. Avant la fertilisation, l'oeuf présente un faible potentiel de repos.

Cependant après l'augmentation de ce potentiel par passage à travers la membrane d'un ample courant négatif, il est possible ensuite de déclencher, par stimulation, des réponses dépolarisantes de grande durée dues à l'activation de deux conductances responsables du courant entrant : une composante sodique et une composante calcique. En conditions de potentiel imposé sur cette même préparation, MIYAZAKI et al. (1975), HAGIWARA et al. (1975), SHEN et STEINHARDT (1976), montrent en fait que les deux courants entrants sont portés par les ions Ca^{2+} puisqu'ils disparaissent tous les deux en présence des inhibiteurs de perméabilité calcique (Co^{2+} , Mg^{2+}). En effet, si la première composante de courant de nature calcique s'active pour une valeur de potentiel plus négative que celle de la deuxième composante, elle dépend en plus de la présence du Na dans le milieu externe ou des ions monovalents puisque les ions Li^+ , Rb^+ ou Cs^+ jouent le même rôle que les ions Na^+ . Récemment, HAGIWARA et OHMORI (1982) décrivent un courant entrant qui présente deux composantes : une composante portée par les ions Na^+ et une composante portée par les ions Ca^{2+} .

Sur les fibres musculaires d'insecte, en absence de Na^+ externe, le courant I_{Ca} s'inactive complètement alors que son inactivation est très incomplète quand le Na^+ ou Li^+ est présent dans le milieu externe (COLQUHOUN et al., 1981 ; YELLEN, 1982 ; SALKOFF et WYMAN, 1983). Ainsi, selon ces derniers auteurs il existerait dans la membrane en plus des canaux calciques des canaux perméables aux ions Na^+ ou Li^+ . De même sur la fibre de balane, SHEU et BLAUSTEIN (1983) mentionnent en plus des canaux calciques bloqués par les inhibiteurs de perméabilité calcique, la présence de canaux par où passent les ions Na^+ en absence de Ca^{2+} , canaux non bloqués par la tétrodotoxine mais inhibés par les ions La^{3+} ; ces derniers canaux n'apparaissent, semble-t-il, qu'en absence de calcium externe.

Enfin au niveau des fibres musculaires de Crustacés interrogées dans les conditions de potentiel à l'aide de la technique de *patch clamp* (HENČEK et ZACHAR, 1977) ou à l'aide de la double partition de saccharose (MOUNIER et VASSORT, 1975), le courant de calcium limité à une seule composante s'inactive au cours du temps ; cette inactivation dépendant essentiellement du voltage. Sur la fibre de balane, le courant de calcium, présentant aussi une seule composante, ne s'inactive pas (KEYNES et al., 1973). Par contre en 1982 ZAHRADNIK et ZACHAR mettent en évidence sur la fibre musculaire d'écrevisse deux composantes de courant entrant de calcium qui présentent des cinétiques d'activation et d'inactivation très différentes : la première composante étant beaucoup plus sensible au processus d'inactivation dépendant du voltage. Par contre, POLEDNA et al., (1983) pensent que l'inactivation pourrait dépendre de l'entrée des ions Ca^{2+} dans la fibre d'écrevisse plutôt que de dépendre du voltage.

F - CONCLUSION

L'analyse des abondantes données bibliographiques concernant l'activation et l'inactivation de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} , révèle la complexité des mécanismes mis en jeu. La controverse qui apparaît au vu de l'analyse des résultats des différents auteurs peut correspondre à des différences de fonctionnement des canaux calciques ; ces différences pouvant traduire une évolution de ces canaux au niveau moléculaire. Cette diversité de fonctionnement des canaux calciques par rapport aux canaux sodiques qui présentent une "*structure moléculaire*" presque homogène traduit peut être une évolution plus poussée de ces canaux calciques à partir

d'un état plus *primitif*. En faveur de cette idée concernant l'évolution des ionophores aux ions calcium à partir d'une structure moléculaire relativement simple, il est intéressant de signaler les travaux de ANDERSON et MROSE (1978), ANDERSON et CASTILLO (1976) , ANDERSON (1979) effectués sur les muscles d'une annélide (SYLLIS). En effet, après avoir mis en évidence une réponse régénérative des fibres musculaires correspondant à l'activation de canaux calciques, ils montrent que les ions Mn^{++} n'inhibent pas le courant entrant régénératif de calcium, mais que ces ions Mn^{++} peuvent porter ce courant (en absence de calcium, l'amplitude de la réponse varie linéairement avec le logarithme de la concentration externe de Mn^{++} ; la pente étant de 27,5 mV par décade) ; la réponse régénérative normale étant abolie par les ions La^{3+} ou Co^{2+} .



DEUXIEME CHAPITRE
MATERIEL ET METHODE

A - MATERIEL

Les expériences sont réalisées à 20°C sur les fibres musculaires des pattes locomotrices d'écrevisse. L'accès aux fibres est réalisé par une simple section d'un méropodite selon le plan passant par les arêtes. La préparation est ensuite placée dans une cuve en plexiglass remplie de solution physiologique constamment renouvelée afin de maintenir à valeur constante les concentrations ioniques extracellulaires. L'examen de la préparation sous loupe binoculaire montre les fibres musculaires disposées parallèlement en faisceaux et fixées d'une part à l'axostyle et d'autre part à la carapace. Les fibres interrogées ont un diamètre de 150 à 400 μ et une longueur variant de 1 à 3 mm. Les faisceaux sont conservés en place pour l'enregistrement du courant et du potentiel transmembranaire par microélectrodes. Les fibres sont stabilisées au moins pendant 20 min dans le milieu physiologique de référence (milieu VAN HARREVELD) avant que ne soient insérées les microélectrodes permettant les mesures de courant et de potentiel.

B - ENREGISTREMENT DU COURANT DE MEMBRANE DANS LES CONDITIONS DE POTENTIEL IMPOSE

La technique de potentiel utilisée est celle d'ADRIAN et al. (1970).

Cette technique consiste à insérer 3 microélectrodes à l'une des extrémités de la fibre musculaire. Le schéma synoptique est présenté dans la figure 1. Deux microélectrodes, 1 et 2, mesurent le potentiel transmembranaire respectivement à une distance l (E_1) et $2l$ (E_2) de l'extrémité de la fibre. L'électrode 3, placée à une distance $2l+l'$ de l'extrémité de la fibre, permet de faire passer à travers la membrane un courant délivré par

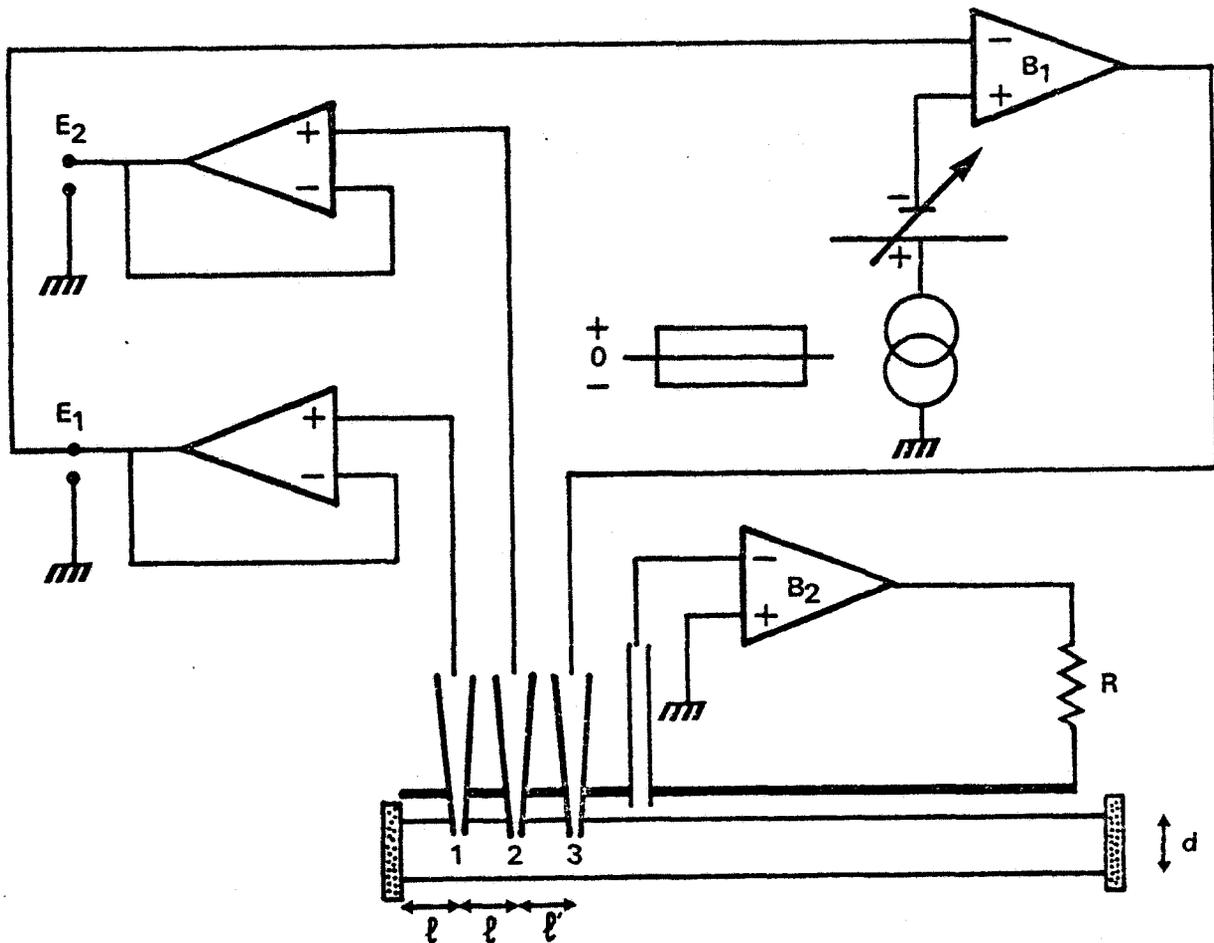


Figure 1 :

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 , $2l$, $2l+l'$ de l'une des extrémités de la fibre dont le diamètre (d) est compris entre 150 et 400 μm . E_i : potentiel transmembranaire imposé à une distance l ($E_i = E_1$) ; ($E_2 - E_1$) = différence de potentiel proportionnelle à I_m .

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

B_1 = Amplificateur opérationnel à contre réaction totale externe.

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

un amplificateur opérationnel (B_1) monté en contre réaction totale, courant nécessaire pour imposer le potentiel E_1 . Un deuxième amplificateur opérationnel (B_2) permet de maintenir le potentiel à la face externe de la membrane au potentiel de référence afin de s'affranchir d'une variation éventuelle du potentiel extracellulaire du fait de l'existence d'une résistance série qui est loin d'être négligeable devant la résistance d'entrée de la fibre (la résistance spécifique de membrane de la fibre d'écrevisse au repos n'est que de quelques centaines d'ohms alors que celle par exemple de la fibre squelettique de grenouille est de quelques milliers d'ohms).

Les microélectrodes remplies d'une solution de KCl 3M ont les caractéristiques suivantes : pointe inférieure à $0,5 \mu$; résistance comprise entre 4 et $10 M \Omega$; potentiel de pointe inférieur à 4 mV.

ADRIAN et al. (1970) établissent que le courant transmembranaire (i_m) exprimé par unité de longueur (en $A.cm^{-1}$) qui passe à travers la membrane à une distance l où le potentiel est imposé, est approximativement proportionnel à la différence de potentiel ($E_2 - E_1$), E_2 étant le potentiel enregistré par l'électrode 2. En effet l'équation est la suivante :

$$i_m = (2/3) \cdot (E_2 - E_1) / 3 r_i l^2 \quad (1)$$

r_i est la résistance du milieu intracellulaire par unité de longueur, exprimée en $\Omega.cm^{-1}$.

i_m est directement proportionnel à ($E_2 - E_1$) à 5 pour 100 près si le rapport de la longueur l par la constante d'espace de la fibre λ est inférieur ou égal à 2 ($l/\lambda \leq 2$) en absence de courant entrant régénératif. De

même i_m peut être calculé à 5 pour 100 près à partir de la valeur de $(E_2 - E_1)$ en présence d'un courant entrant régénératif si $1/\lambda$ est inférieur ou égal à 0,65 ($1/\lambda \leq 0,65$).

L'équation (1), ci-dessus, approximative peut être rendue exacte par l'introduction d'un facteur correctif p . En effet dans tous les cas l'expression de i_m en fonction de $E_2 - E_1$ est la suivante :

$$i_m = (2/3) \cdot p \cdot (E_2 - E_1) / 3 r_i l^2 \quad (2)$$

avec

$$p = (3/2)(1/\lambda)^2 \cdot \cosh(1/\lambda) / \cosh(21/\lambda) - \cosh(1/\lambda) \quad (3)$$

Cette expression (3) donnant la valeur de p en fonction de $1/\lambda$, montre que p est égale à $1 \pm 0,05$ si $(1/\lambda) \ll 2$ en absence d'un courant entrant régénératif ; à $1/\lambda \ll 2$ correspond le rapport $(E_2 - E_1)/E_1 \ll 6$. En présence d'un courant entrant régénératif l'équation de p est identique à l'équation (3) mise à part que les termes en \cosh sont remplacés par \cos . Dans ce dernier cas p est égale à $1 \pm 0,05$ si $1/\lambda \leq 0,65$ ou $(E_2 - E_1)/E_1 \leq 0,68$.

De plus la distance l' doit être correctement choisie pour que la différence de potentiel $(E_2 - E_1)$ soit directement proportionnelle à i_m . Si l'électrode 3 est trop près de l'électrode 2, le potentiel E_2 présente un comportement de voltage liée à la dispersion non homogène du courant au niveau de l'électrode 2. Ce comportement de voltage est évité si la résistance du volume intracellulaire (R_{ds}) compris dans le volume d'une demi-sphère de rayon l' est faible devant la résistance d'entrée R_e . La résis-

tance de la demi-sphère de rayon l' est égale à l'expression :

$$R_{ds} = R_i / 2\pi l'$$

R_i est la résistivité du milieu intracellulaire, sa valeur est égale à $125 \Omega \cdot \text{cm}$ (FATT et GINSBORG, 1958). La résistance d'entrée est égale au rapport de la différence de potentiel transmembranaire enregistrée à une distance de $2l + l'$ par le courant débité de l'amplificateur opérationnel (B_1) ou de l'amplificateur B_2 (voir Fig. 1), ce qui conduit à :

$$R_e = \lambda r_i$$

En conséquence le calcul montre que si R_e/R_{ds} est supérieur ou égal à 10, tout comportement de voltage au niveau de l'électrode 2 est supprimé. Pour la fibre d'écrevisse si l' est égale ou supérieure à $2a$ (a =rayon de la fibre) la condition précédente ($R_e/R_{ds} \gg 10$) est très largement satisfaite.

Dans la mesure où la conductance de membrane est exprimée en $\text{S} \cdot \text{cm}^{-2}$, l'équation du courant exprimé en $\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ (et non plus en $\text{A} \cdot \text{cm}^{-1}$) est :

$$I_m = a(E_2 - E_1) / 3 R_i l'^2$$

R_i, a correspondent aux termes définis ci-dessus.

Dans ces conditions, l'estimation de la surface de membrane est faite à partir de la détermination du diamètre de la fibre sans tenir compte des nombreuses invaginations longitudinales et transversales de la membrane de surface.

C - MILIEU

Le milieu physiologique de référence est le milieu de VAN HARREVELD, sa composition en mM.l^{-1} est : Na^+ 212,1 ; Cl^- = 248,8 ; K^+ = 5,25 ; Ca^{2+} = 14 ; Mg^+ = 2,8 ; HCO_3^- = 2,1 ; pH = 7,4.

Pour étudier la conductance calcique de la membrane de la fibre musculaire d'écrevisse, diverses solutions sont préparées à partir du milieu de VAN HARREVELD auquel est ajouté un ou plusieurs inhibiteurs réputés spécifiques de perméabilités ioniques membranaires. Dans certains cas, la diminution partielle ou totale d'une espèce ionique du milieu est compensée par un apport d'une autre espèce ionique dans le but d'une part de maintenir l'isotonie du milieu et d'autre part d'éliminer un courant spécifique porté par une espèce ionique.

Les différents milieux, consignés dans le tableau 1, sont tous maintenus à un pH de 7,4.



DIFFERENTES SOLUTIONS...PHYSIOLOGIQUES

N°	Milieux	Na ⁺ mM.l ⁻¹	Cl ⁻ mM.l ⁻¹	K ⁺ mM.l ⁻¹	Ca ²⁺ mM.l ⁻¹	Mg ²⁺ mM.l ⁻¹	MC ₃ ⁻ mM.l ⁻¹	AUTRES SUBSTANCES mM.l ⁻¹
I	VAN HARREVELD (VH)	212,1	248,8	5,25	14	2,8	2,1	-
II	VH- 1/10 [K ⁺] ₀ - Cs	210	247	0,52	14	2,8	2,1	Cs ⁺ = 4,73
III	VH- 1/10 [Cl ⁻] ₀	210	24,8	5,25	14	2,8	2,1	Methylsulfate = 187,3
IV	VH - AN	212,1	248,8	5,25	14	2,8	2,1	Acide niflumique 10 ⁻⁶ à 10 ⁻³
V	VH - Co	192,1	248,8	5,25	14	2,8	2,1	Co ²⁺ = 10
VI	VH - Co - TEA - AN	132,1	248,8	5,25	14	2,8	2,1	Co ²⁺ = 10 ; TEA ⁺ = 60 AN = 10 ⁻³
VII	VH - Co - Cs	182,1	248,8	5,25	14	2,8	2,1	Co ²⁺ = 10 ; Cs ⁺ = 10
VIII	VH - 2/10 [Ca ²⁺] ₀ TEA - Mn	159,3	248,1	5,25	2,8	2,8	2,1	TEA ⁺ = 60 ; Mn ²⁺ AN = 10 ⁻³
IX	VH - 2/10 [Ca ²⁺] ₀ TEA - AN procaïne	174,5	248,8	5,25	2,8	2,8	2,1	TEA ⁺ = 60 ; AN = 10 ⁻³ procaïne = 2
X	VH - 0 [Ca ²⁺] ₀ - TEA	180,1	248,8	5,25	0	2,8	2,1	TEA ⁺ = 60
XI	VH - 0 [Ca ²⁺] ₀ - TEA - procaïne	180,1	248,8	5,25	0	2,8	2,1	TEA ⁺ = 60 ; AN = 10 ⁻³ procaïne = 2

TABLEAU.1

TROISIEME CHAPITRE

RESULTATS

PREMIERE PARTIE
ETUDE DES PHENOMENES
DE RECTIFICATION

A - ETUDE DE LA RECTIFICATION DANS LE SENS ENTRANT *

C'est en 1949 que KATZ étudiant les propriétés électrophysiologiques de la fibre musculaire de grenouille en milieu isotonique de sulfate de potassium met en évidence pour la première fois ce phénomène de rectification dans le sens entrant. Cette rectification qu'il appelle : "rectification anormale", traduit une variation de la résistance de membrane qui dépend du potentiel. En effet, la résistance membranaire diminue quand des potentiels hyperpolarisants sont appliqués à la membrane ; le courant qui traverse la membrane étant porté par les ions K^+ . Cette rectification anormale ou de sens entrant est par la suite mise en évidence sur de nombreuses préparations notamment les fibres de Purkinje (STANFIELD, 1970), l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al., 1977). Pour toutes ces préparations, le courant de sens entrant, activé lors des hyperpolarisations, est porté spécifiquement par les ions K^+ . Ce courant de K^+ , ne pouvant être porté par les ions Cs^+ , Rb^+ , est bloqué par les ions TEA^+ , Ba^{2+} (ADRIAN, 1964 ; ISENBERG, 1976 ; HAGIWARA et al., 1976 ; STANDEN et STANFIELD, 1978 ; GAY et STANFIELD, 1977 ; STANFIELD, 1970, CONSTANTI et GALVAN, 1983). Plus récemment les travaux de DIFRANCESCO (1981, 1982) et DIFRANCESCO et OJEDA (1980) effectués sur les fibres de Purkinje de lapin et sur le noeud sinoauriculaire de veau montrent que le courant de rectification n'est pas exclusivement de nature potassique mais dépend également du sodium ; de même sur les neurones ganglionnaires sensoriels, CONSTANTI et GALVAN (1983) arrivent à la même conclusion.

Sur les fibres musculaires squelettiques de crabe, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974 a et b), BRÛLÉ et al. (1976) montrent que la relation courant-potentiel, dans les conditions de courant ou de voltage imposé, n'est pas modifiée quand les ions K^+ et Na^+ du milieu extracellulaire sont

* a fait l'objet d'une publication (BRÛLÉ et al., 1983 b).

remplacés mM à mM par les ions choline⁺, ions connus pour bloquer tout au moins partiellement, le courant de sens sortant de la membrane axonale, porté par les ions K⁺ (HILLE, 1967) et celle du noeud sinoauriculaire de lapin (SEYAMA, 1979 ; YANGIHARA et IRISAWA, 1980). Ces résultats sur la nature autre que potassique du courant entrant de rectification de la fibre musculaire squelettique de Crustacé (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 b) sont retrouvés plus récemment par de nombreux auteurs sur diverses préparations. Les résultats de CONSTANTINI et GALVANI, (1983), obtenus sur les neurones sensoriels, conduisent ces auteurs à proposer que la rectification dans le sens entrant (qui dépend aussi du temps) n'est pas de nature potassique. De même MAYER et WESTBROOK (1982), au niveau des mêmes neurones sensoriels observent que la valeur de la pile d'équilibre aux ions Cl⁻ est très proche du potentiel d'inversion du courant entrant de rectification ce qui les amène à proposer que le courant de rectification est probablement porté par les ions Cl⁻. WHITE et MILLER (1979) montrent que la rectification de sens entrant de vésicules formées à partir de la membrane post-synaptique de Torpille, incorporées dans une couche de phospholipides, induit un courant porté par les ions Cl⁻ ; de plus cette conductance activée est inhibée par un dérivé disulfoné du stilbène, le SITS (4-acétamido-4'-isothiocyanostilbène-2,2'-disulfonate) comme les mouvements d'ions Cl⁻ le sont par cette drogue au niveau de la membrane du globule rouge (COUSIN et MOTAIS, 1979, 1982), mouvements de Cl⁻ d'ailleurs aussi inhibés par une substance amphiphile, l'acide niflumique ($K_D = 10^{-7}M$).

Partant de ces données bibliographiques et des résultats négatifs concernant l'absence d'inhibition par les ions TEA⁺ et les ions Cs⁺ du courant entrant de rectification anormale, il est nécessaire d'étudier d'une part les effets d'un milieu appauvri en ions Cl⁻ (remplacés par les ions méthylsufa-

te, ions imperméants) et d'autre part ceux de l'acide niflumique à différentes concentrations. Puisque sur la fibre d'écrevisse la rectification est présente dans les conditions de repos et augmente lors des hyperpolarisations membranaires (figure 2), il s'avère impossible d'extrapoler la valeur du courant de fuite pour chaque niveau de dépolarisation membranaire à partir de la relation courant-potentiel établie pour les hyperpolarisations membranaires. C'est la raison pour laquelle il fallait rechercher la condition expérimentale la plus appropriée pour obtenir une relation linéaire courant-potentiel dont la pente corresponde à la conductance de fuite ; la connaissance de la valeur de cette conductance de fuite permet l'extrapolation de la valeur du courant de fuite pour chaque niveau de dépolarisation membranaire, valeur nécessaire pour établir la cinétique du courant entrant de calcium.

Les résultats présentés ci-dessous amènent à conclure que le courant de rectification de sens entrant est porté par les ions Cl^- ou dépend très étroitement de ceux-ci par le biais du mécanisme d'échange $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ mécanisme bloqué par le SITS ou l'acide niflumique (COUSIN et MOTAIS, 1979, 1982). En effet sur la fibre d'écrevisse l'acide niflumique à 10^{-6}M bloque complètement la rectification dans le sens entrant.

1. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire de potassium (90%)

Sous l'effet du milieu pauvre en K^+ (90% des ions K^+ sont remplacés mM à mM par des ions Cs^+ (milieu II) une hyperpolarisation membranaire de l'ordre de 10 mV est observée (après 20 minutes, le potentiel de repos passe de - 74 mV à - 83 mV). Les courbes courant-potentiel établies à l'état stable c'est à dire en fin d'impulsion de 125 msec en conditions de référence et

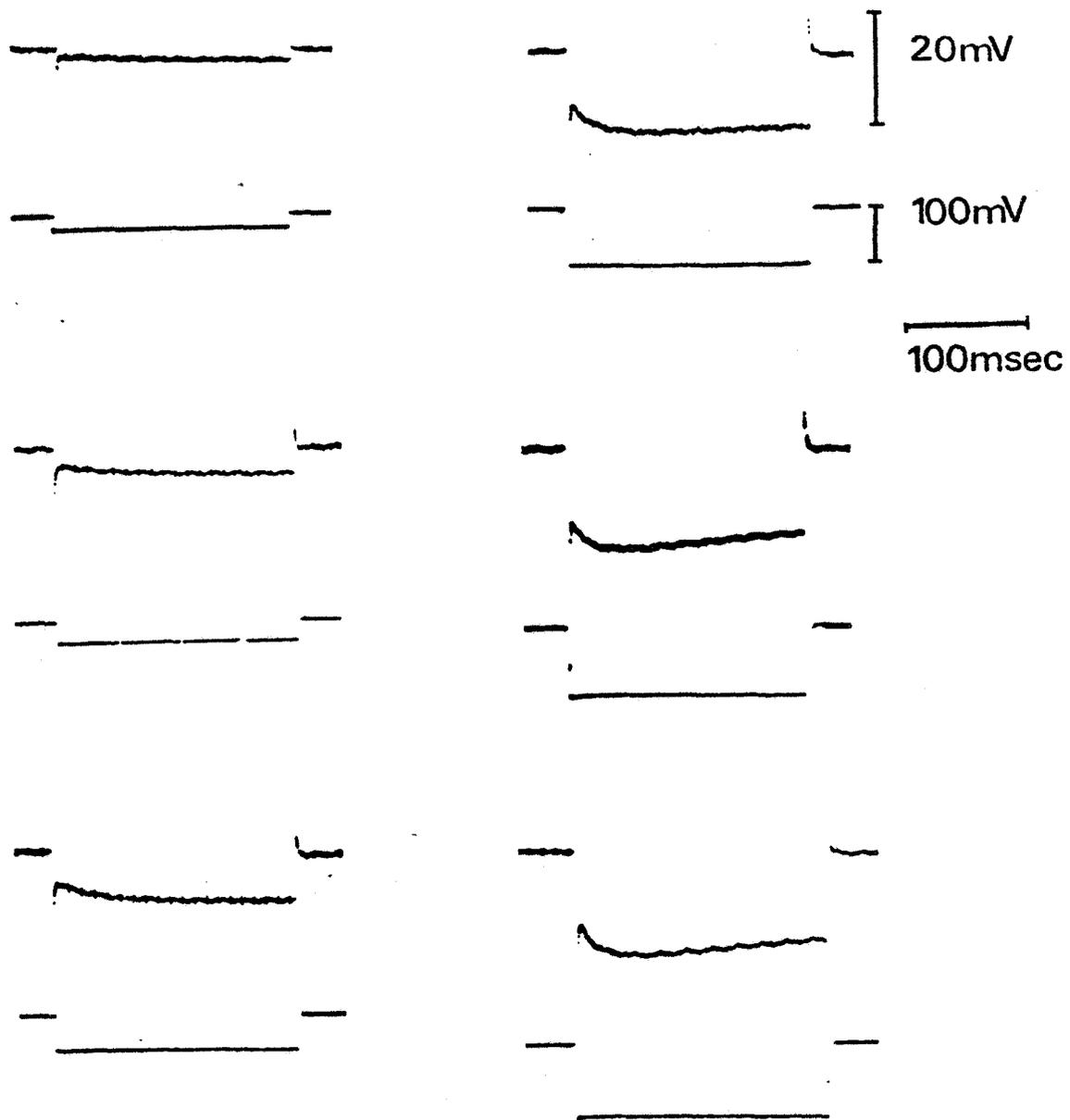


Figure 2 :

Courant global de membrane (tracés du haut) enregistré en réponse à des crêneaux de potentiel imposé (tracés du bas) au niveau d'une fibre placée depuis 20 min dans le milieu de VH.

RP = - 60 mV ; HP = - 70 mV ; $l = 250 \mu\text{m}$; $l' = 250 \mu\text{m}$; $d = 250 \mu\text{m}$.

Le courant de membrane est donné en terme de différence de potentiel ($E_2 - E_1$).

après 20 mn d'imbibition de la fibre par le milieu pauvre en K^+ sont présentées (figure 3). Ces courbes sont parallèles pour des potentiels $\ll - 90$ mV. Ce parallélisme traduit le fait que ce milieu pauvre en K^+ en dépit de la présence d'ions Cs^+ , n'a aucun effet sur la rectification dans le sens entrant si ce n'est un déplacement de la relation courant-potentiel dans le sens des hyperpolarisations, lié au déplacement du potentiel de repos (hyperpolarisation de 10 mV). Cette variation est en relation avec le déplacement de la courbe conductance de rectification anormale - potentiel qu'observent de nombreux auteurs en particulier HUTTER et WILLIAMS (1979) sur la fibre musculaire de grenouille, HAGIWARA et al. (1976) sur la membrane de l'oeuf d'étoile de mer.

Si la rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire d'écrevisse est de nature potassique comme sur la fibre musculaire de vertébré, la réduction de 90% de la concentration extracellulaire de K^+ compensée par l'apport de Cs^+ devait se traduire conformément à ce qui est observé sur les fibres de Vertébrés par une diminution voire une disparition de cette conductance de rectification. Ainsi la persistance du courant de rectification dans le sens entrant en milieu pauvre en K^+ implique que ce courant peut ne pas être porté par les ions K^+ .

2. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire d'ions Cl^- (90%)

Pour confirmer l'hypothèse ci-dessus, est étudié l'effet du milieu pauvre en ions Cl^- (90% de ces ions Cl^- sont remplacés mM à mM par les ions méthylsulfate, milieu III) sur la relation courant-potentiel établie en fin d'impulsion 125 msec. La figure 4 résume les résultats obtenus sur une fibre stabilisée pendant 20 min en milieu normal. Le milieu anormal

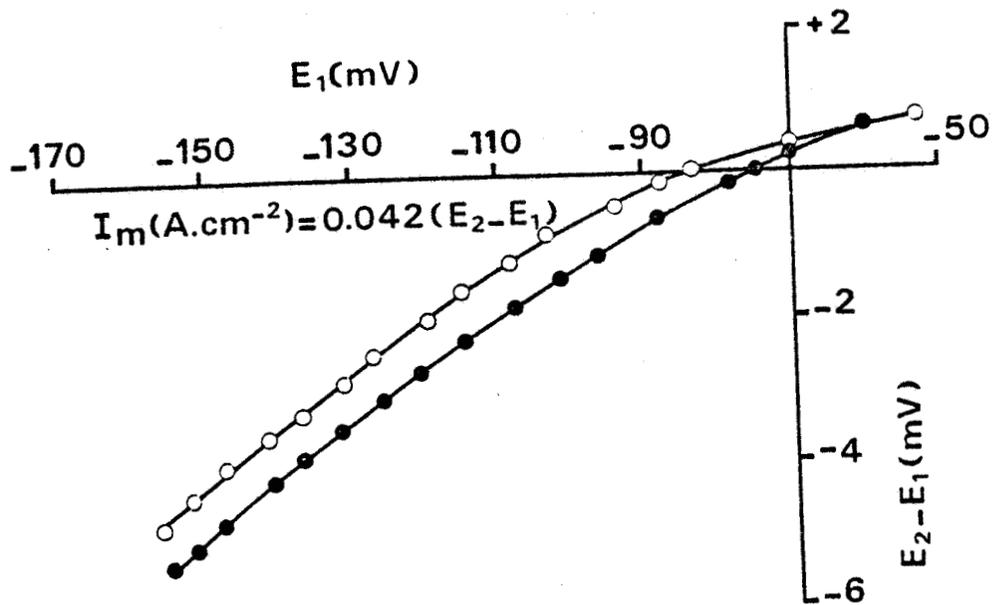


Figure 3 :

Relations courant-potential établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (125 msec) en milieu normal (●) et après 20 min d'action du milieu appauvri en ions K^+ (○) ; 90 % des ions K^+ sont remplacés par les ions Cs^+ (milieu II). RP = - 74 mV (référence) et - 83 mV après 20 min d'action du milieu appauvri en ions K^+ ; HP = - 70 mV ; $l = 312,5 \mu\text{m}$; $l' = 312,5 \mu\text{m}$; $d = 312,5 \mu\text{m}$.

Le phénomène de rectification dans le sens entrant est maintenu.

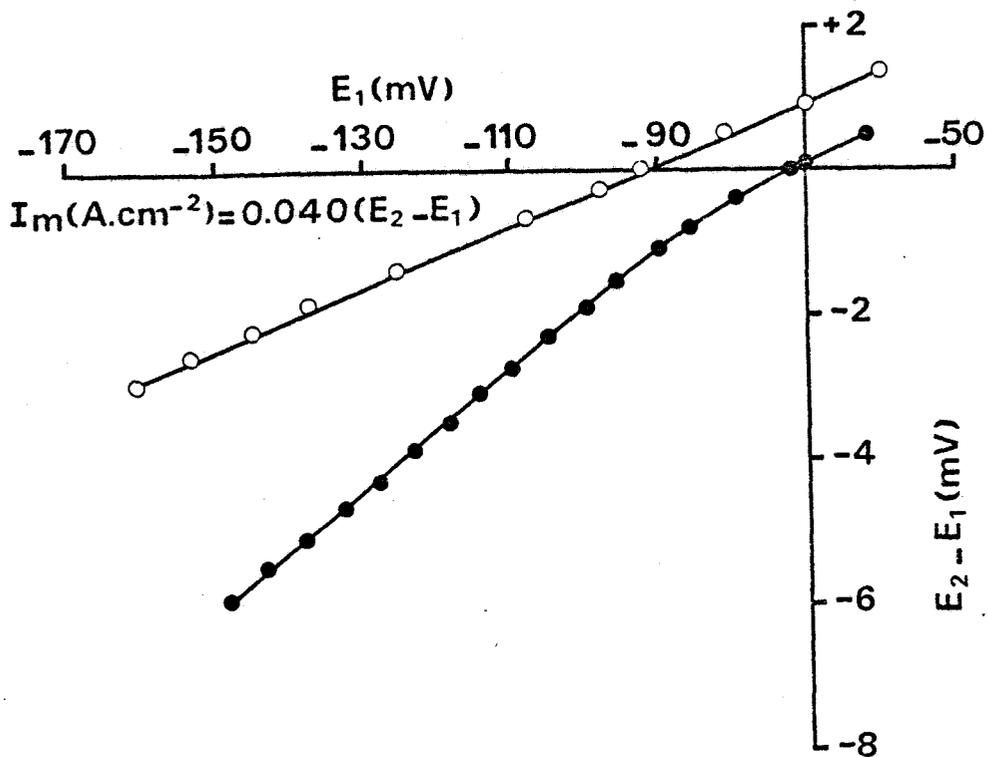


Figure 4 :

Relations courant-potentiel établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (125 msec) en milieu de référence (●) et après 20 min d'action du milieu appauvri en ions Cl^- (○) ; 90 % d'ions Cl^- du milieu externe sont remplacés par les ions méthylsulfate (milieu III).

RP = - 72 mV (référence) et - 93 mV après 20 min d'action du milieu appauvri en ions Cl^- ; HP = - 70 mV ; $l = 300 \mu\text{m}$; $l' = 300 \mu\text{m}$; $d = 270 \mu\text{m}$.

Le phénomène de rectification dans le sens entrant est aboli en milieu très pauvre en ions Cl^- .

entraîne une hyperpolarisation membranaire qui n'atteint une valeur stable de 20 mV qu'après 20 min. Le potentiel de repos passe pour la fibre interrogée de - 73 mV à - 93 mV. Cette hyperpolarisation est à associer à la linéarisation de la courbe qui traduit la relation courant-potentiel. Aussi sous l'effet de ce milieu anormal, la rectification de sens entrant est supprimée. Signalons de plus que l'hyperpolarisation membranaire est maintenue tant que la fibre est en milieu pauvre en ions Cl^- ; ceci conduit à supposer que dans les conditions de référence (en milieu de VAN HARREVELD) les ions Cl^- ne sont pas distribués selon l'équilibre de DONNAN et que le potentiel d'équilibre de ces ions Cl^- est moins négatif que le potentiel de repos. Ceci implique de plus que dans les conditions de référence un transport actif de Cl^- dirigé vers l'intérieur de la fibre maintiendrait l'activité du Cl^- à une valeur élevée. Enfin le fait que la diminution de la concentration de Cl^- supprime la rectification dans le sens entrant (responsable d'un mouvement sortant d'ions Cl^-) sur la fibre d'écrevisse n'est pas pour surprendre dans la mesure où sur les fibres musculaires de grenouille HUTTER et WILLIAMS, (1979) montrent que la diminution de la concentration extracellulaire de potassium diminue la conductance maximale de rectification dans le sens entrant qui dépend, sur ces préparations, d'un mouvement entrant d'ions K^+ . De même sur la membrane de l'oeuf d'étoile de mer, HAGIWARA et al. (1976) montrent que la conductance maximale de rectification qui dépend aussi d'un mouvement d'ions K^+ est fonction de la concentration extracellulaire en ions K^+ . Ainsi sur la fibre musculaire d'écrevisse, la diminution de la conductance de rectification aux ions Cl^- pourrait rendre compte de l'hyperpolarisation membranaire ; le potentiel de repos dans ces conditions étant égal au potentiel de diffusion aux seuls ions K^+ et Na^+ .

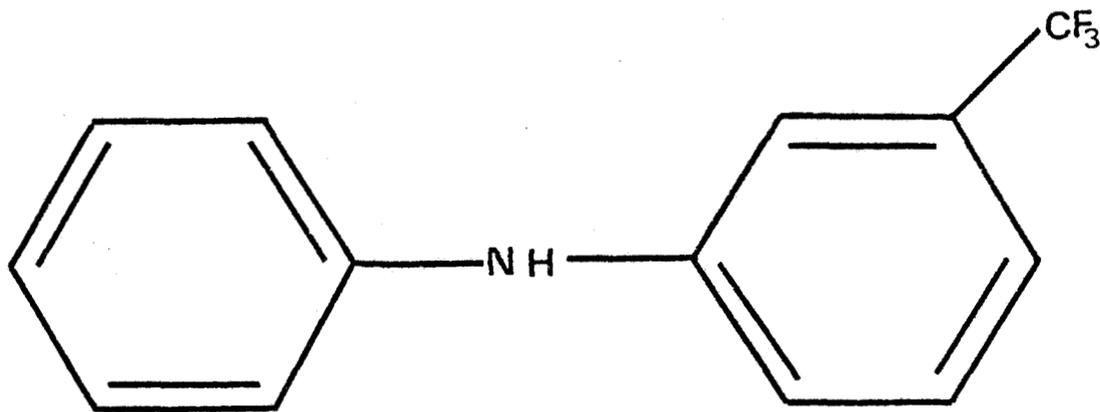
En conclusion, la persistance de la rectification dans le sens entrant

en milieu appauvri en ions K^+ (et en présence d'ions Cs^+) et sa disparition en milieu très pauvre en ions Cl^- permet ainsi de supposer que le courant de rectification de sens entrant de la fibre musculaire d'écrevisse est, comme sur l'organe électrique de Torpille (WHITE et MILLER, 1979 ; MILLER et WHITE, 1980) et sur les neurones d'Aplysie (CHESNOY-MARCHAIS, 1982, 1983), porté par les ions Cl^- .

3. Effets de l'acide niflumique

L'acide niflumique (AN) est une substance amphiphile dont la molécule présente deux pôles (voir formule ci-dessous). Cette substance inhibe réversiblement le transport d'anions au niveau de la membrane du globule rouge. Comme le montrent COUSIN et MOTAIS (1979, 1982), cette AN se fixe sur deux populations de sites (de haute affinité et de faible affinité) ; de ce fait, la courbe dose-réponse présente deux composantes : une composante linéaire qui reflète l'interaction de AN avec les lipides membranaires et une composante saturable qui disparaît lorsque les mouvements de Cl^- sont préalablement bloqués par le SITS qui lui se fixe de façon covalente donc irréversiblement sur la protéine impliquée dans la translocation des ions Cl^- de la membrane de globule rouge.

Compte tenu du fait que cette substance amphiphile apparaît être un inhibiteur spécifique de la perméabilité aux ions Cl^- , agissant à très faible concentration ($K_D \approx 10^{-7} M$), son effet sur la rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse a été étudié.



Structure moléculaire de l'acide niflumique ou acide (trifluoro-méthyl-3 phénylamino)-2 nicotinique.

Les caractéristiques de l'inhibition du transport anionique au niveau de la membrane de globule rouge (COUSIN et MOTAIS, 1979, 1982) révèlent que les effets pharmacologiques de cette drogue se situent au niveau moléculaire à savoir, l'interaction avec un site protéique. En effet, l'acide niflumique a une structure amphiphilique, c'est-à-dire présente un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, ce qui implique qu'elle soit adsorbée à l'interface.

Les figures 5 et 6 résument les effets de cette substance à différentes concentrations respectivement sur la rectification dans le sens entrant

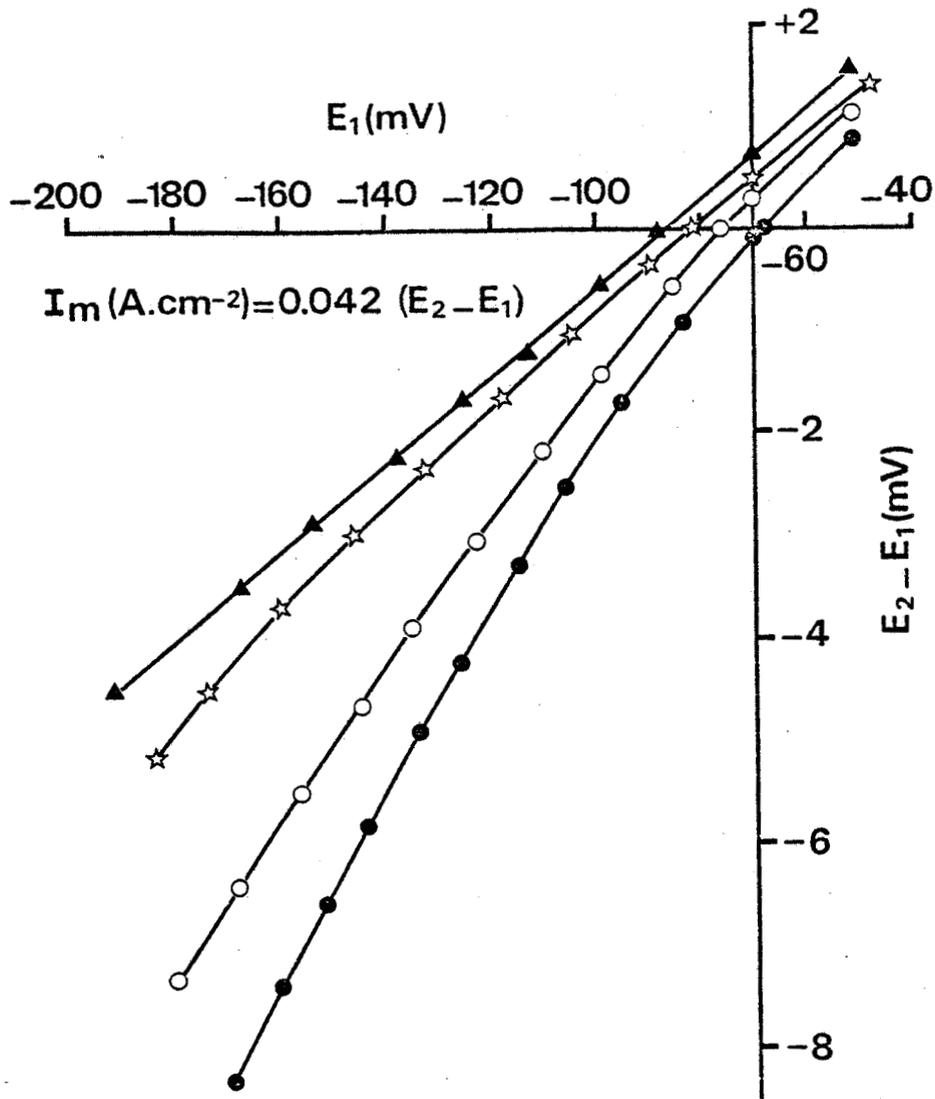


Figure 5 :

Relations courant-potentiel établies en fin d'impulsion (200 msec) dans les conditions de potentiel imposé, sur une fibre placée dans les conditions normales (\bullet) (milieu I) et après action, à intervalle de temps de 15 min, du milieu contenant de l'acide niflumique aux concentrations de $10^{-9} \text{ M}\cdot\text{l}^{-1}$ (\circ) ; $10^{-7} \text{ M}\cdot\text{l}^{-1}$ (\star) et $10^{-6} \text{ M}\cdot\text{l}^{-1}$ (\blacktriangle) (milieu IV).

RP = - 68 mV (référence) et - 76 mV, - 81 mV, - 88 mV respectivement pour les concentrations en acide niflumique de 10^{-9} , 10^{-8} et $10^{-6} \text{ M}\cdot\text{l}^{-1}$.
 HP = - 70 mV ; $l = 312,5 \mu\text{m}$; $l' = 150 \mu\text{m}$; $d = 312,5 \mu\text{m}$.

L'ampleur de l'inhibition de la rectification dans le sens entrant ainsi que l'hyperpolarisation membranaire dépendent de la concentration en AN.

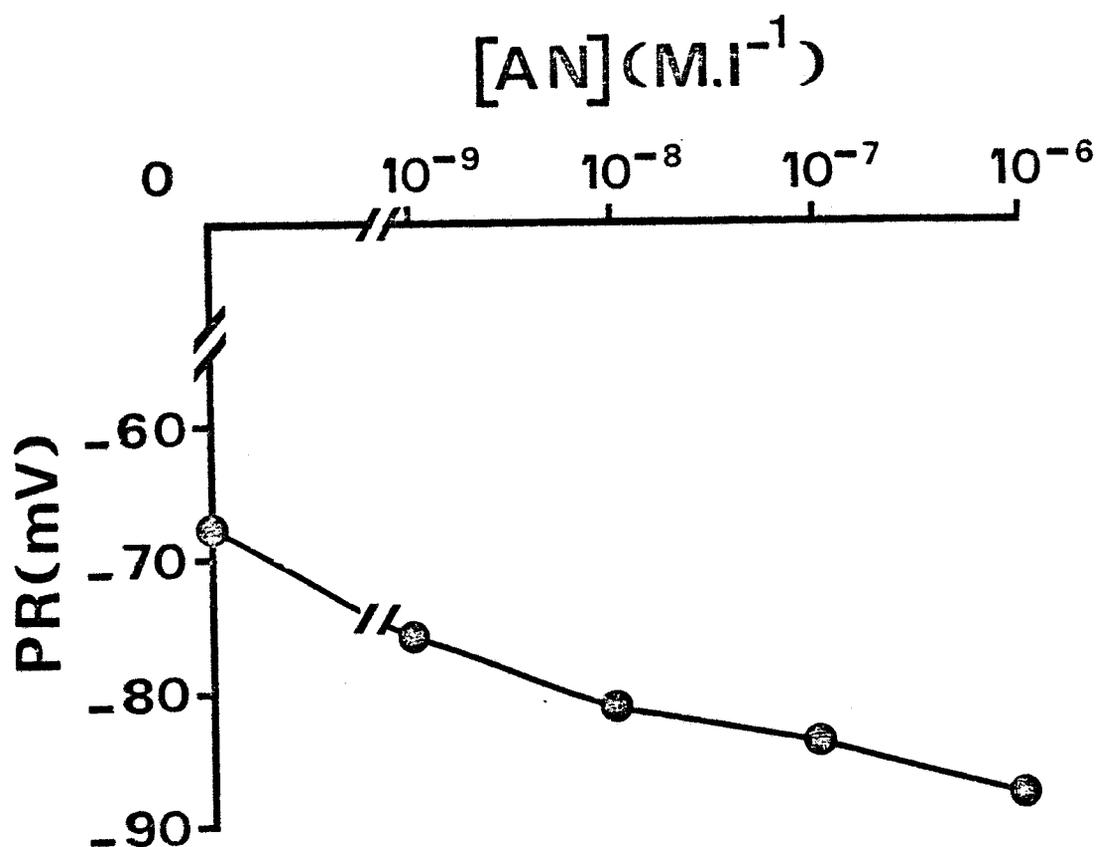


Figure 6 :

Evolution du potentiel de repos (RP) en fonction de la concentration en acide niflumique (AN) établie sur une même fibre stabilisée durant 15 min, pour chaque concentration testée.

L'acide niflumique entraîne une hyperpolarisation membranaire d'autant plus importante que la concentration en AN est élevée.

et sur le potentiel de repos d'une même fibre musculaire. On note que l'AN entraîne une hyperpolarisation membranaire dont l'ampleur dépend de la concentration en AN (figure 6). Cette hyperpolarisation est d'environ 20 mV pour une $[AN]$ de $10^{-6}M$; à cette même concentration, la rectification dans le sens entrant est totalement inhibée puisque la relation courant-potentiel devient linéaire et la pente est alors égale à la conductance de fuite (figure 7).

Les effets de l'AN agissant à intervalle de temps de 15 min pour chaque concentration (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6}) montrent que l'inhibition de la rectification dans le sens entrant est d'autant plus ample, comme d'ailleurs l'amplitude de l'hyperpolarisation membranaire, que la concentration est plus élevée. L'établissement de la relation liant l'inhibition au logarithme de $[AN]$ permet de déterminer la concentration pour laquelle la conductance est réduite de 50%. Comme le montre la figure 8, la valeur de cette concentration extrapolée à partir de cette relation est de l'ordre de $6.10^{-8}M$. Cette concentration, correspondant à la constante de dissociation apparente K_D , est très proche de celle déterminée par COUSIN et MOTAIS, (1979, 1982) en ce qui concerne l'inhibition de la perméabilité aux ions Cl^- de la membrane érythrocytaire.

Enfin les résultats obtenus sur le noeud de Ranvier de grenouille dus à l'obligeance de DUBOIS (CORBIER et DUBOIS, 1983) montrent que cette substance amphiphile, à la concentration $10^{-6}M$, n'a aucun effet sur toutes les composantes du courant membranaire enregistré. Ce résultat négatif n'est pas surprenant dans la mesure où aucune conductance aux ions Cl^- qui dépendrait du voltage n'a été décrite sur cette préparation. Cependant à plus forte concentration ($10^{-3}M$), CORBIER et DUBOIS (1983) signalent que l'AN agit en diminuant la conductance aux ions Na^+ , ne touchant pas par contre

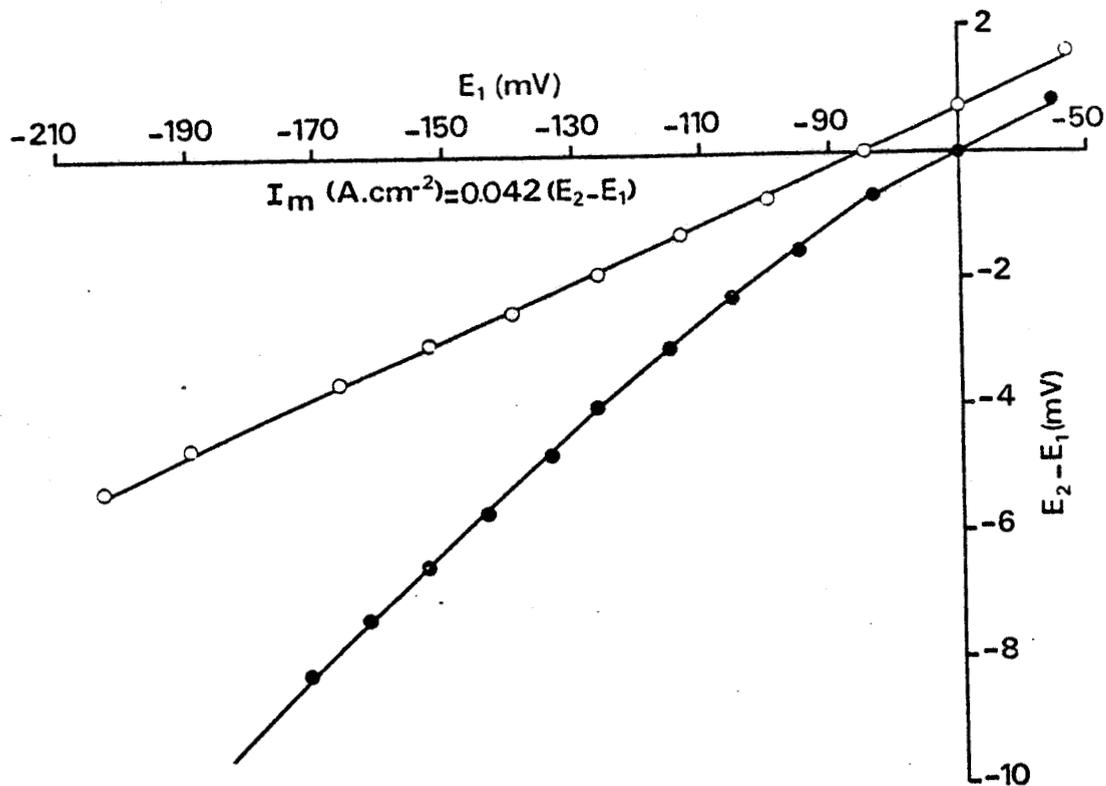


Figure 7 :

Relations courant-potentiel établies en potentiel imposé sur une fibre en milieu de référence (●) et en milieu VH additionné d'acide niflumique (10⁻⁶M) (○) après 20 min d'action.

RP = - 70 mV (référence) et - 86 mV après 20 mn d'aciton de l'acide niflumique ; HP = - 70 mV ; $l = 312,5 \mu\text{m}$; $l' = 312,5 \mu\text{m}$; $d = 312,5 \mu\text{m}$.

L'acide niflumique à 10⁻⁶ M abolit entièrement la rectification dans le sens entrant.

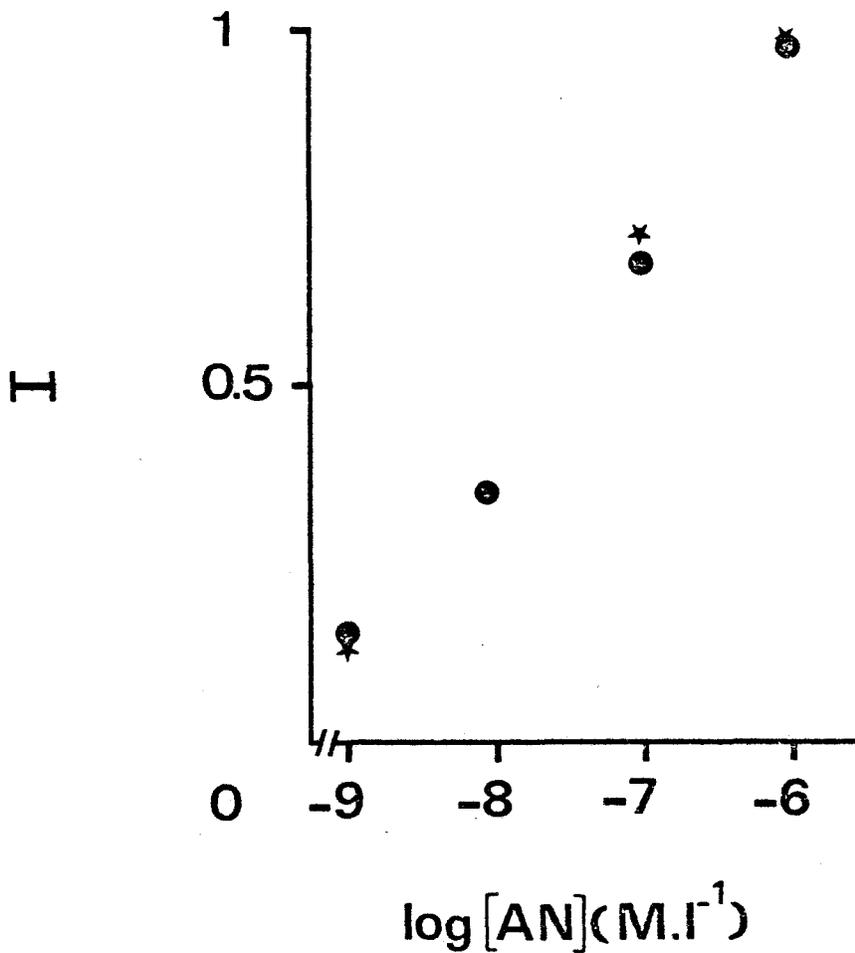


Figure 8 :

Relation liant l'inhibition de la rectification maximale dans le sens entrant (I) au logarithme de la concentration extracellulaire en acide niflumique ($\text{Log} [\text{AN}]$), établie à partir des résultats obtenus sur deux fibres (●) (★). L'inhibition est maximale ($I = 1$) lorsque la conductance membranaire ne correspond plus qu'à la conductance de fuite (G_f). La conductance maximale de rectification (\overline{G}_r) est calculée à partir de la valeur maximale de la pente de la relation courant potentiel (\overline{G}_m) obtenue pour de fortes hyperpolarisations auquel est soustraite la conductance de fuite.

La constante de dissociation apparente de AN (K_D) est de $2,51 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

celle aux ions K^+ ni celle correspondant au courant de fuite. Pour ce qui est de la conductance aux ions Na^+ , seule la conductance maximale est diminuée puisque la relation sigmoïde liant la disponibilité de la conductance aux ions Na^+ (variable h) au potentiel membranaire est déplacée dans le sens des hyperpolarisations. Ainsi à cette concentration relativement élevée ($10^{-3}M$), l'AN peut être considéré comme une substance ayant les propriétés d'un anesthésique local.

En résumé, l'absence d'effet de l'AN à $10^{-6}M$ sur le noeud de RANVIER et le blocage complet par contre de la rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire d'écrevisse confortent l'hypothèse relative à l'existence d'un courant entrant porté par les ions Cl^- sur cette dernière préparation, activé lors d'hyperpolarisations membranaires.

4. Conclusion sur la rectification dans le sens entrant

Dans la mesure où la rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse persiste en milieu contenant des ions TEA^+ (résultat non illustré) et en milieu Cs^+ (voir figure 3) et dans la mesure où en milieu pauvre en Cl^- ou en milieu normal contenant de l'acide niflumique à la concentration de $10^{-6}M$ cette rectification est inhibée, cela amène à conclure qu'il existe un courant entrant porté par les ions Cl^- activé lors d'hyperpolarisations membranaires. Ces résultats sont en accord avec ceux de HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974 a et b) obtenus sur la fibre d'un autre crustacé : le crabe, de WHITE et MILLER (1979), MILLER et WHITE (1980) sur l'organe électrique de Torpille et ceux de CHESNOY-MARCHAIS (1982, 1983) sur les neurones d'Aplysie.

Au potentiel de repos ($E_r = -70$ mV) en supposant que la conductance de membrane est égale à la conductance de fuite (G_f) plus celle de recti-

fication (G_r), que le potentiel d'inversion du courant de fuite ainsi que celui du courant de rectification sont respectivement E_f et E_x , il vient l'équation suivante :

$$E_r = (G_r/G_m) \cdot E_x + (G_f/G_m) \cdot E_f$$

Les résultats illustrés aux figures 4 et 5 permettent pour les différents paramètres de l'équation ci-dessus, de donner les valeurs suivantes :

$$E_r = - 70 \text{ mV}, E_f = - 86 \text{ mV}, G_r = 0,93 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}, G_f = 1,826 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}, G_m = 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}, \text{ ainsi le potentiel } E_x \approx - 40 \text{ mV}.$$

Si ce potentiel E_x correspond au potentiel d'inversion du courant de rectification porté par les ions Cl^- , cela implique que la pile d'équilibre aux ions Cl^- est moins négative que le potentiel de repos. Il existerait au niveau de la fibre musculaire d'écrevisse un mouvement entrant actif d'ions Cl^- qui permettrait le maintien de l'activité interne du Cl^- à une valeur bien supérieure à ce que prévoit la distribution passive de l'équilibre de DONNAN.

Enfin, en présence d'acide niflumique, il devient possible sur notre préparation d'extrapoler la valeur du courant de fuite pour les dépolarisations à partir de la relation linéaire établie pour les impulsions hyperpolarisantes. En effet, l'obtention d'une relation linéaire entre le courant et le potentiel ($I_f = f(E_i)$) est une des conditions nécessaires pour établir la cinétique du courant régénératif entrant de calcium lors de dépolarisations membranaires à partir du potentiel imposé de référence (HP).

B - ETUDE DE LA RECTIFICATION DANS LE SENS SORTANT

En 1977 HENČEK et ZACHAR, étudiant les propriétés de la membrane de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse, montrent qu'il existe trois courants activés lors d'amples dépolarisations dans les conditions de potentiel imposé : un courant entrant porté par les ions Ca^{2+} et deux courants sortants I_{K_1} et I_{K_2} portés par les ions K^+ . Le courant I_{K_1} est dépendant du voltage, quant au courant I_{K_2} , il correspond _____ au courant retardé classiquement mis en évidence sur de nombreuses structures excitables. Ces résultats de HENČEK et ZACHAR confirment ceux obtenus antérieurement sur la fibre musculaire de crabe par MOUNIER et VASSORT (1975) et ceux décrits postérieurement par ASHCROFT et STANFIELD (1982a) sur la fibre musculaire squelettique d'insecte.

Cependant, sur les fibres musculaires de Crabe ayant des réponses régénératives par tout-ou-rien, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974 a et b) ; BRÛLÉ et al. (1976) BRÛLÉ et al. (1983 a) constatent la disparition du courant sortant retardé en milieu pauvre en ions Cl^- alors que ce courant persiste en milieu isotonique de chlorure de choline en dépit du fait que ces ions choline⁺ bloquent, tout au moins partiellement, le courant sortant retardé de K^+ de la membrane axonale (HILLE, 1967). De plus, BRÛLÉ et al. (1983b) montrent que le potentiel d'inversion du courant retardé, courant pleinement activé par une ample dépolarisation, varie linéairement avec le logarithme de la concentration extracellulaire d'ions Cl^- (la pente étant de 25 mV par décade). Aussi la participation des ions Cl^- à la perméabilité membranaire est par ailleurs observée sur de nombreuses préparations, en particulier sur les fibres musculaires squelettiques de grenouille (HUTTER et WARNER, 1972 ; WARNER, 1972). C'est probablement l'existence d'une composante du courant sortant porté par des ions autres que les ions K^+ qui

explique l'impossibilité de bloquer totalement le courant sortant retardé par les ions TEA^+ comme cela est montré sur la fibre musculaire squelettique de grenouille (STANFIELD, 1970 et SANCHEZ et STEFANI, 1978 ; 1983), sur les fibres musculaires d'insecte en dépit de la présence de 120 mM de TEA^+ (ASHCROFT et STANFIELD, 1982) et aussi sur la fibre musculaire d'écrevisse (ZAHRADNIK et ZACHAR, 1982).

Par ailleurs, dès 1969 HAGIWARA et al. (1969), signalent l'existence d'un courant sortant associé au courant entrant de calcium sur la fibre de balane, courant sortant supprimé par addition au milieu extracellulaire de 2 mM de procaïne ; ce dernier courant étant selon ces auteurs porté par les ions K^+ et/ou Cl^- , son potentiel d'inversion étant proche du potentiel de repos. De plus ce courant apparaît nettement à partir d'un seuil de potentiel imposé voisin de - 10 mV.

1. Effet des ions TEA^+ sur le courant sortant

Sur la fibre musculaire, l'addition de Co^{2+} au milieu de VAN HARREVELD (milieu V), en absence d'acide niflumique, permet comme le montre la figure 9 d'établir la relation courant-potentiel au maximum de courant. Cette relation permet de mettre en évidence d'une part la rectification dans le sens entrant et d'autre part celle dans le sens sortant. Cette relation est très modifiée en ajoutant au milieu du TEA^+ à la concentration de 60 mM (60 mM de NaCl sont remplacés par 60 mM de TEACl) et de l'acide niflumique à 10^{-6}M (milieu VI). La figure 9 montre l'abolition de la rectification dans le sens entrant par l'acide niflumique et le blocage important mais non complet de la rectification dans le sens sortant par les ions TEA^+ . La courbe montre en effet qu'il persiste un courant dynamique nettement visible

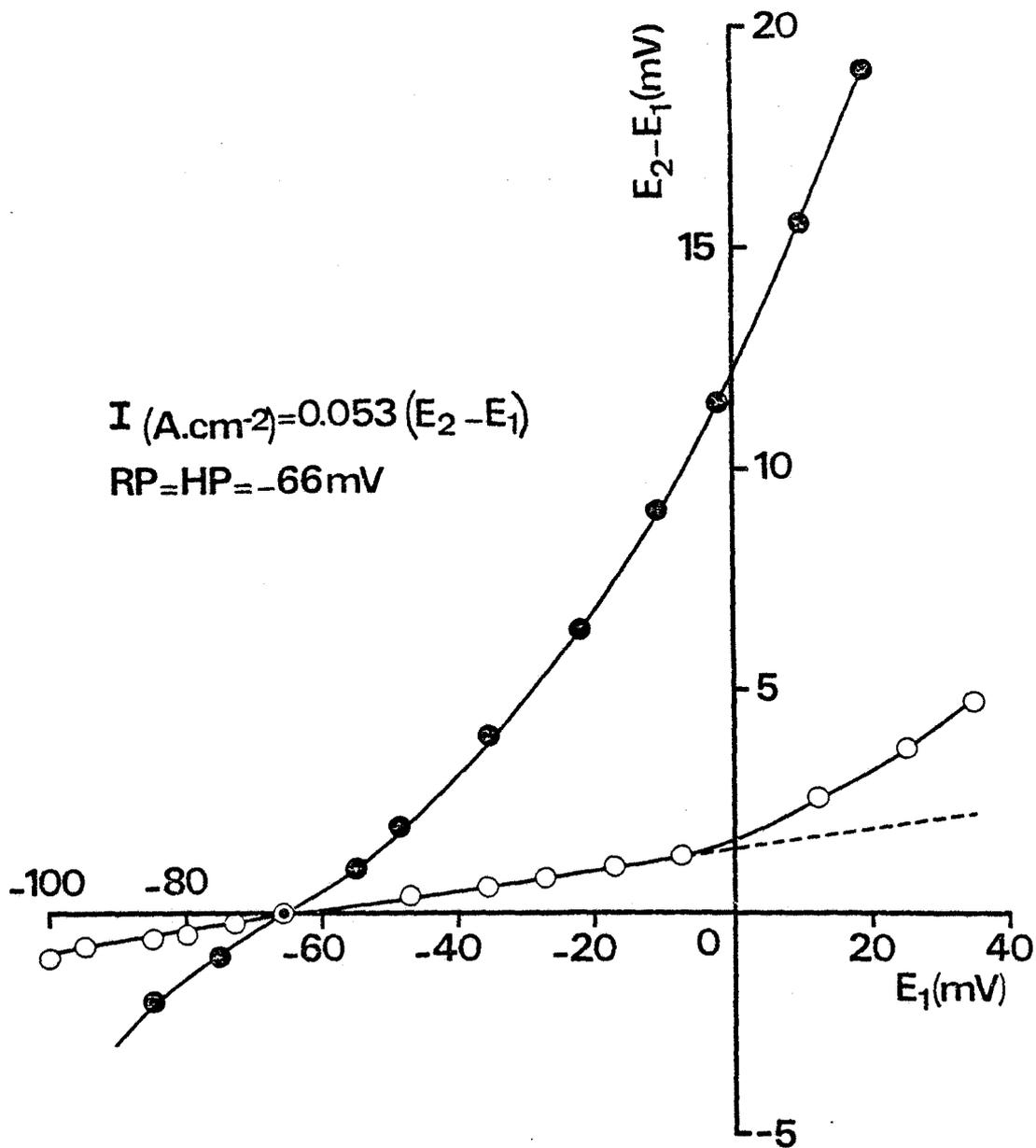


Figure 9 :

Relations courant-potentiel établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (500 msec) sur une fibre placée depuis 20 min en milieu de VH contenant les ions CO_3^{2+} (10 mM) (●) - milieu V, et dans ce même milieu additionné de TEA^+ (60 mM) et d'AN (10^{-3} mM) - milieu VI - après 20 min d'action (○).

$HP = -66 \text{ mV}$; $l = 250 \text{ }\mu\text{m}$; $l' = 250 \text{ }\mu\text{m}$; $d = 250 \text{ }\mu\text{m}$.

La rectification dans le sens entrant est supprimée par AN alors que les ions TEA^+ laissent subsister une partie de la rectification dans le sens sortant.

au seuil de potentiel imposé - 10 mV. Ce résultat est conforme aux observations de HAGIWARA et al. (1969).

2. Effets des ions Cs^+ (10mM) sur la rectification dans le sens sortant

En présence d'ions Cs^+ dans le milieu de VAN HARREVELD (10 mM de NaCl sont remplacés par 10 mM de ClCs milieu VII), la modification de la relation courant-potentiel (figure 10) est similaire à celle observée en présence d'ions TEA^+ . Là encore, comme avec les ions TEA^+ , un courant sortant persiste qui s'active au seuil de potentiel - 10 mV. Dans le cas de la figure présentée, l'absence dans le milieu d'acide niflumique se traduit par le maintien de la rectification dans le sens entrant en dépit de la présence dans le milieu d'ions Cs^+ connus pour bloquer sur les fibres musculaires de vertébré le courant entrant porté par les ions K^+ .

3. Conclusion sur la rectification dans le sens sortant

Sur la fibre musculaire d'écrevisse, l'inhibition incomplète par les ions TEA^+ de la rectification dans le sens sortant confirme les observations de ZAHRADNIK et ZACHAR (1982). En effet pour bloquer complètement le courant sortant de rectification, ces auteurs sont amenés à perfuser intracellulairement la fibre par un milieu dépourvu de KCl (remplacé par du tris propionate pour conserver l'isotonie). De même, la solution externe ne contient pas d'ions K^+ et Na^+ , ces deux ions étant remplacés par les ions tris^+ . C'est dans ces conditions ioniques particulières que ZAHRADNIK et ZACHAR sont conduits à décrire deux composantes de courant entrant de calcium correspondant selon eux à deux populations de canaux calciques qui présenteraient des cinétiques d'activation et d'inactivation différentes.

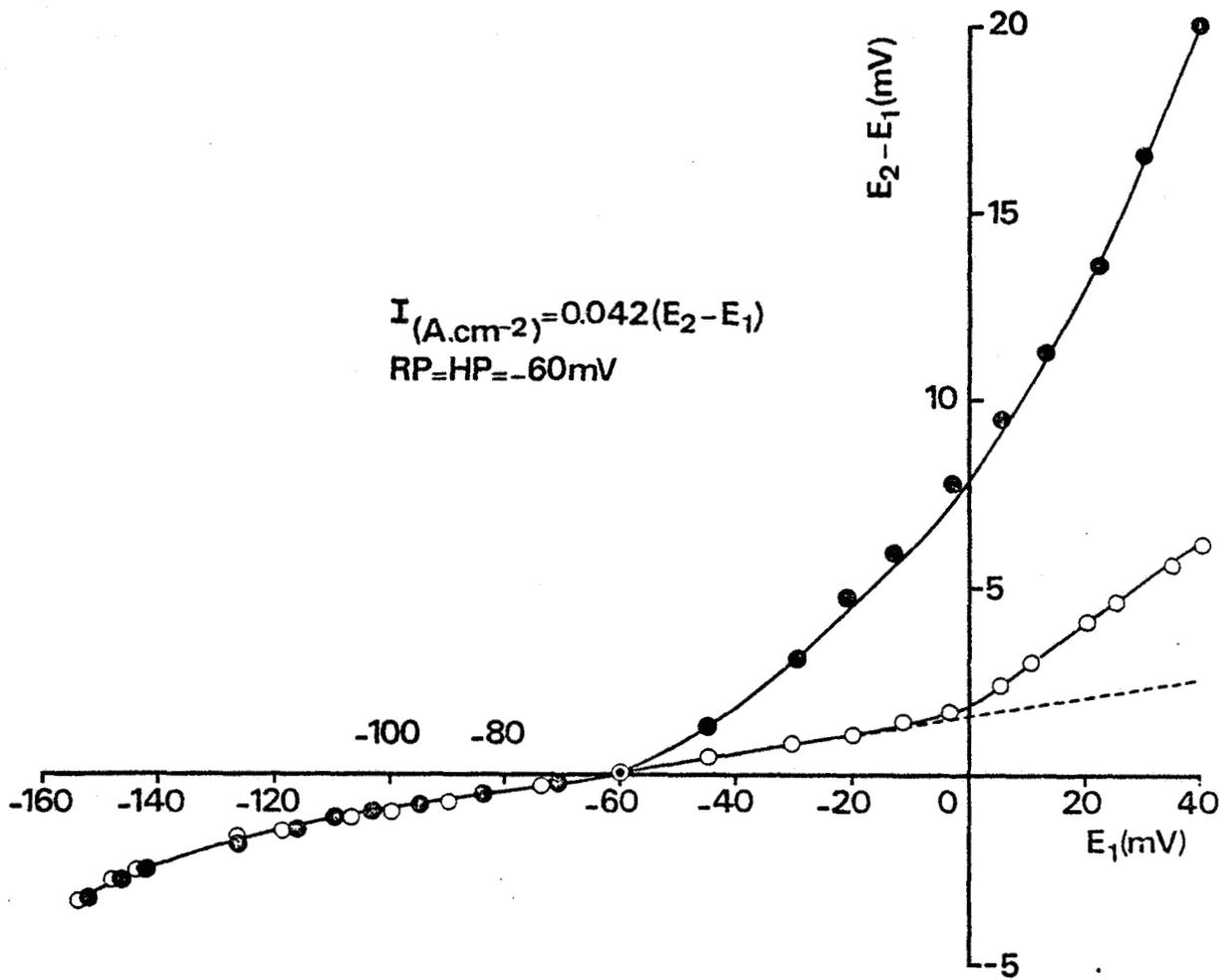


Figure 10 :

Relations courant-potential établies en potentiel imposé en fin d'impulsion de 500 msec sur une fibre placée depuis 30 min dans le milieu de VH contenant les ions CO^{2+} (●) et dans ce même milieu additionné d'ions Cs^+ (10 mM) - milieu VII- après 30 min d'action (○).

$HP = -60 mV$; $l = 312,5 \mu m$; $l' = 312,5 \mu m$; $d = 312,5 \mu m$.

Les ions Cs^+ ne modifient pas la rectification dans le sens entrant mais diminuent très fortement la rectification dans le sens sortant sans pour autant l'abolir complètement.

Egalement, comme cela va être développé ci-dessous, nos résultats conduisent aux mêmes conclusions que celles de ZHRADNIK et ZACHAR (1982) dans la mesure où la dissection du courant de calcium est rendu possible, c'est à dire dans les conditions où tous les phénomènes de rectification membranaire (sens entrant et sortant) sont totalement inhibés. Bien que les résultats ne soient pas illustrés (ci-dessus) ces phénomènes sont totalement inhibés quand la fibre musculaire d'écrevisse est maintenue en survie dans le milieu de VAN HARREVELD additionné de 10^{-6} M d'AN, de 2 mM de procaïne et dont une partie du NaCl (60 mM) est remplacée par du TEACl.

Comme cela va être montré maintenant, il est en effet impossible de déterminer avec plus de certitude la valeur du potentiel d'inversion du courant entrant de calcium et la cinétique de ce courant en absence de procaïne.



DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU COURANT

ENTRANT (I_{Ca}) ET DE LA CONDUCTANCE

(G_{Ca}) DE MEMBRANE AUX

IONS Ca^{2+}

Sur la fibre musculaire d'écrevisse interrogée dans les conditions de potentiel imposé (patch clamp) HENČEK et ZACHAR (1977) décrivent un courant entrant de calcium qui s'inactive au cours du temps et dont le potentiel d'inversion est voisin de la valeur de la pile d'équilibre aux ions Ca^{2+} ($E_{\text{Ca}} = + 85 \text{ mV}$). Sur la fibre musculaire de crabe, interrogée à l'aide de la technique de la double partition de saccharose, MOUNIER et VASSORT (1975) observent en présence d'ions TEA^+ (20 mM) que le courant entrant de calcium présente également une phase d'inactivation, le potentiel d'inversion de ce courant étant de + 30 mV seulement. A l'inverse, en 1973 KEYNES et al. décrivent également un courant entrant de calcium qui ne s'inactive pas au cours du temps : la fibre de balane est perfusée intracellulairement par de l'EGTA (chelateur de calcium permettant ainsi le maintien de l'activité interne de Ca^{2+} à une valeur de 10^{-8} M) en absence d'ions Cl^- et K^+ (ces derniers ions étant remplacés par les ions Cs^+) ou en présence de TEA^+ à la concentration de 50 mM.

Il est également important de signaler pour les fibres de crustacés que la valeur de l'exposant x correspondant à la relation $m_{\infty}^x = f(E_i)$ est de 2 pour la fibre de crabe (MOUNIER et VASSORT, 1975) alors qu'il est de 6 pour celle d'écrevisse (HENČEK et ZACHAR, 1977). Cette valeur différente de x conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les canaux calciques interrogés pourraient être différents. Signalons à l'appui de cette hypothèse que ZAHRADNIK et ZACHAR (1982) sont amenés à postuler l'existence de deux populations de canaux calciques correspondant à deux composantes de courant entrant de calcium. La première composante quant à son amplitude est particulièrement très sensible à une prédépolarisation. Dans ces conditions, en formulant avec ZAHRADNIK et ZACHAR qu'il existe au niveau des fibres musculaires de crustacés deux populations de canaux calciques, les résultats décrits ci-dessus

des différents auteurs, en apparence différents, peuvent être conciliés. En effet, suivant les techniques utilisées par les auteurs, l'une ou l'autre des deux composantes du courant de calcium ou les deux pourraient être enregistrées.

En plus des conditions ioniques imposées pour l'étude du courant entrant de calcium (abolition des phénomènes de rectification), il faut, dans nos conditions de potentiel imposé à l'aide de microélectrodes, s'affranchir de la contraction. En effet, le déplacement de la fibre lors de la contraction entraîne une sortie des microélectrodes. Pour ce faire, le milieu de VAN HARREVELD contenant du TEA et de l'AN, est en plus additionné de 2 mM de Mn^{++} ou de 2 mM de procaïne. Par ailleurs la concentration extracellulaire de calcium est réduite au 5ème de sa valeur normale (2,8 mM au lieu de 14 mM). D'une part la réduction du calcium extracellulaire permet le développement d'un courant entrant de calcium plus faible que dans les conditions normales et facilite ainsi une meilleure imposition du potentiel membranaire, d'autre part la présence de procaïne connue pour inhiber la libération du Ca^{++} à partir du réticulum sarcoplasmique, ou la présence d'ions Mn^{2+} inhibant en partie le courant entrant de calcium, suffit à annuler le phénomène mécanique. Précisons que la constante de dissociation apparente du Mn^{2+} avec les sites des canaux calciques est, selon HAGIWARA et TAKAHASHI (1967), de 2 mM pour la fibre musculaire de balane. Enfin en tenant compte des données de HENČEK et ZACHAR (1977) en ce qui concerne la valeur de E_{Ca} ($+ 85 \pm 4,2$ mV) pour une concentration externe de calcium normale de 13,5 mM, on doit s'attendre à déterminer dans nos conditions ($[Ca]_0 = 2,8$ mM) un potentiel d'inversion pour I_{Ca} d'environ + 65 mV.

A - ETUDE DU COURANT ENTRANT DE CALCIUM EN PRESENCE D'IONS Mn^{++}

La figure 11 donne un exemple d'enregistrements du courant de membrane pour une fibre placée dans le milieu VIII (milieu de VAN HARREVELD contenant TEA^+ , AN, Mn^{++}) pour différentes valeurs de dépolarisation imposée à partir d'un potentiel imposé de référence HP de - 70 mV. La figure montre l'évolution du courant de membrane pour ces niveaux de dépolarisation. Pour une faible dépolarisation ($E_i = - 40$ mV), un courant entrant est activé correspondant au seuil du potentiel d'activation de la conductance calcique. Pour $E_i = 0$ mV, le courant I_m est net entrant et conserve sa valeur tant que dure la dépolarisation (180 msec). Lors du retour à la valeur de HP le courant de queue est entrant et correspond à la désactivation du courant I_{Ca} . Pour une plus ample dépolarisation ($E_i = + 28$ mV), le courant durant tout le temps du potentiel imposé est de sens sortant ; comme sa valeur minimale est atteinte rapidement et presque conservée pendant toute la durée de l'impulsion, cela implique que le courant I_m ne s'inactive pas. A l'appui de l'absence d'inactivation, il faut signaler la présence d'un courant de queue de sens entrant. Pour une plus ample dépolarisation ($E_i = + 48$ mV) I_m évolue comme précédemment ; l'apparente inactivation étant due au courant sortant qui résiste aux ions TEA^+ et qui se développe à partir de $E_i = 0$ mV (voir figure 9 et 10). De plus, l'absence d'inactivation du courant I_{Ca} dans la gamme des potentiels compris entre - 40 et 0 mV, peut être due au blocage d'une des deux composantes de courant entrant I_{Ca} , composantes mises en évidence par ZAHRADNIK et ZACHAR (1982), et qui sont également décrites ci-après.

L'établissement de la relation courant, exprimé en termes de différence de potentiel ($E_2 - E_1$), en fonction du potentiel imposé E_i (figure 12) montre que le courant global s'annule pour une valeur de E_i de l'ordre de - 20 mV, atteint sa valeur maximale entrante pour $E_i = 0$ mV et s'inverse

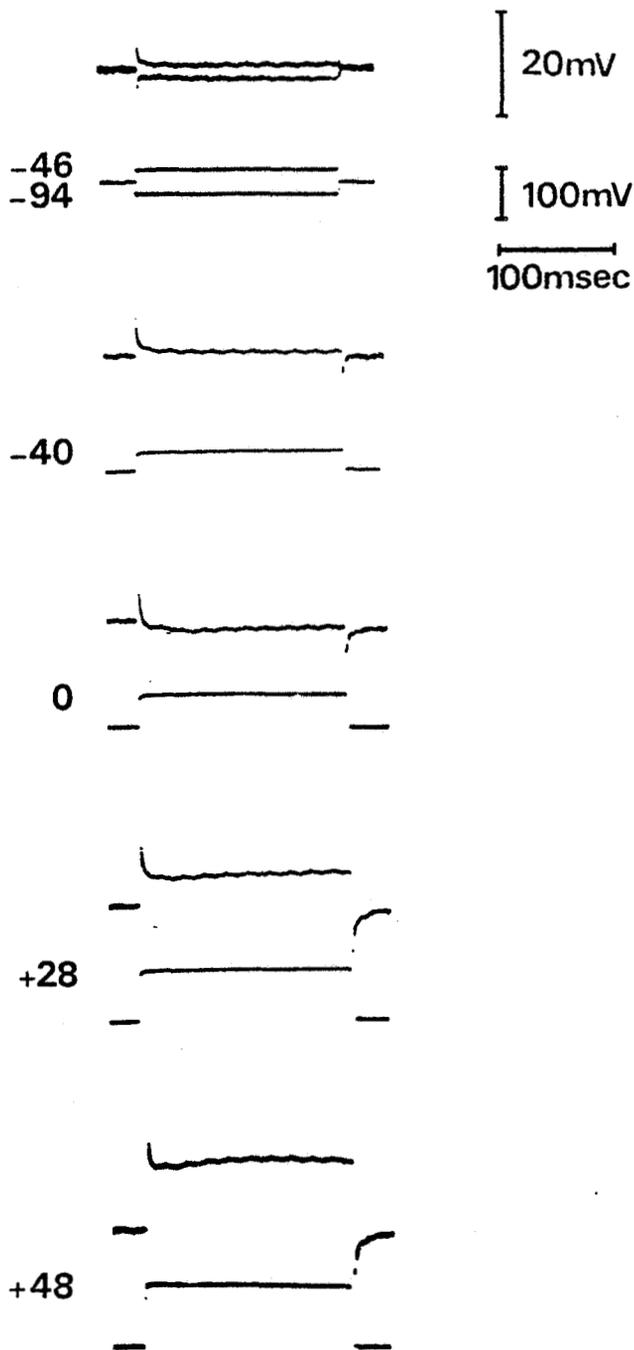


Figure 11 :

Courant global de membrane (tracés du haut) enregistré en réponse à des crêneaux de potentiel imposé (tracés du bas) au niveau d'une fibre placée depuis 20 min dans le milieu de VH contenant les ions Mn^{++} (2 mM), TEA^+ (60 mM) et l'AN (10^{-3} mM) dont la concentration externe de Ca est réduite au 5ème de sa valeur normale (milieu VIII).

RP = - 60 mV ; HP = - 70 mV ; $l = 250 \mu m$; $l' = 250 \mu m$; $d = 250 \mu m$.

Les valeurs données à gauche des tracés correspondent à la valeur du potentiel imposé, exprimée en mV. Le courant est exprimé en terme de différence de potentiel ($E_2 - E_1$).

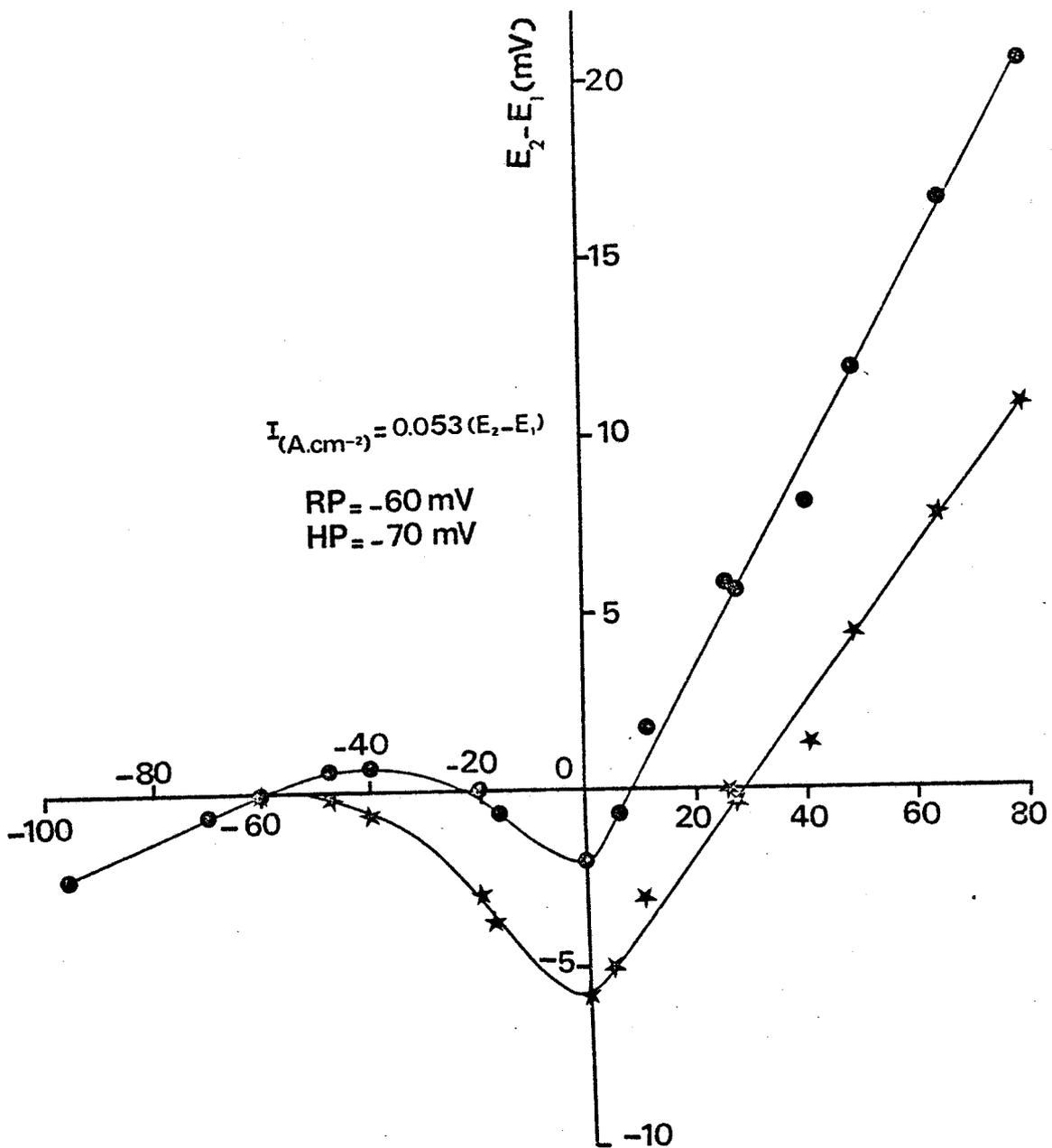


Figure 12 :

Relations courant-potentiel obtenues sur une fibre dont les enregistrements de courant et de potentiel sont ceux présentés à la figure 11.
 (●) courant mesuré au maximum entrant ou au minimum sortant et après soustraction du courant de fuite (I_f) (★).

pour une $E_i = + 5$ mV. L'établissement du courant dynamique (" I_{Ca} ") en fonction du potentiel après soustraction du courant de fuite extrapolé à partir de la relation linéaire obtenue pour les hyperpolarisations, montre que ce courant s'active pour un seuil de potentiel de l'ordre de $- 45$ mV, est maximale pour $E_i = 0$ mV et s'inverse pour $E_i = + 30$ mV. Pour des potentiels très positifs (à partir de 0 mV) la relation courant-potentiel, comme cela est illustré à la figure 12, est linéaire. Cette relation linéaire d'une part et la faible valeur du potentiel d'inversion du courant d'autre part nous amène à conclure au vu des résultats d'ASHCROFT et STANFIELD (1982a) de ceux de HENČEK et ZACHAR (1977) et de ZHRADNIK et ZACHAR (1982) que le courant correspond, pour de fortes dépolarisations, à un courant entrant de calcium associé à un courant sortant. En effet, si le potentiel d'inversion du courant entrant de calcium est de $+ 30$ mV, la concentration interne de calcium, dans nos conditions expérimentales, serait de $0,26 \cdot 10^{-3} M$, valeur incompatible avec une absence de contraction. De plus, d'après les travaux de HENČEK et ZACHAR (1977) effectués sur la même préparation, la valeur de E_{Ca} compte tenu de la concentration externe de calcium devrait être de $+ 65$ mV. Par ailleurs, ASHCROFT et STANFIELD (1982 a) montrent que la relation $I_{Ca} = f(E_i)$ présente une très forte rectification au voisinage du potentiel E_{Ca} qui est en accord avec la théorie du champ constant de Goldman. Enfin, nos résultats antérieurs (figure 9 et 10) montrent qu'il subsiste, en présence d'ions TEA^+ ou Cs^+ , une composante de courant sortant qui est nettement activée à partir de $E_i = - 10$ mV. Ainsi donc, l'existence de ce courant sortant associé au courant entrant rend compte de la faible valeur du potentiel d'inversion ($+ 30$ mV) et de la relation linéaire liant le courant au potentiel pour les valeurs positives de E_i .

En conclusion la présence d'ions Mn^{++} , en dépit de l'absence de contraction, interdit la poursuite de l'analyse du courant entrant de calcium et, de ce fait, de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} . Ceci est la raison pour laquelle la procaine a été utilisée pour la suite de l'expérimentation.

Si, comme les ions Mn^{++} (2 mM), la procaïne bloque le développement de la contraction elle présente de plus l'avantage de faire disparaître la composante de courant sortant qui résiste aux ions TEA^+ comme cela a été démontré dès 1969 par HAGIWARA et al. sur la fibre de balane.

B - ETUDE DE I_{Ca} ET G_{Ca} EN PRESENCE DE PROCAÏNE

1. Analyse de I_{Ca}

La procaïne est un anesthésique local qui provoque le découplage entre le potentiel d'action et la contraction en inhibant la libération de Ca par le réticulum sarcoplasmique comme cela est montré sur les fibres de crabe (SUAREZ-KURTZ et SORENSON, 1979 ; SUAREZ-KURTZ, 1982) sur celle d'écrevisse (REUBEN et al., 1967 ; SUAREZ-KURTZ et al., 1972) et de balane (CAPUTO et DIPOLO, 1978). Egalement, ce découplage apparaît au niveau des fibres musculaires squelettiques de grenouille (FEINSTEIN, 1963 ; LUTTGAW et OETLIKER, 1968 ; CAPUTO, 1976). Ce découplage n'est pas dû à une altération des protéines contractiles (ORENTLICHER et al., 1974 ; SUAREZ-KURTZ, 1982) mais à un blocage de la libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (LEA et ASHLEY, 1981). Ceci est observé aussi bien sur des fibres intactes de grenouille (CHIARANDINI et al., 1970) que sur les vésicules isolées de réticulum sarcoplasmique (YAMAMOTO et KASAI, 1982). Par ailleurs, JACOBS et KEATINGE (1974) et KURIHARA (1975) montrent que la procaïne exerce sur le muscle lisse un effet excitateur à faible concentration et inhibiteur à forte concentration. KURIHARA, (1975), KURIHARA et SAKAI, (1976) et CASTEELS et al. (1977) interprètent cet effet excitateur de la procaïne comme étant dû au blocage de la perméabilité potassique. En effet, la procaïne provoque une augmentation de la résistance de membrane (KURIHARA, 1975, ITO et al., 1977),

une diminution de la rectification dans le sens sortant (CASTEELS et al., 1977 ; HARA et al., 1980) et une prolongation de la durée du potentiel d'action (KURIHARA, 1975). Récemment, IMAIZUMI et WATANABE (1982) mentionnent deux sites d'action de la procaïne : un site à haute affinité ($K_D = 0,26$ mM) qui intervient directement dans la régulation de la perméabilité potassique (en dépolarisant la membrane et en augmentant l'excitabilité membranaire) ; un site à plus faible affinité ($K_D \approx 3$ mM), impliqué dans la libération du Ca réticulaire. Sur la fibre musculaire de balane, la procaïne à 2 mM ne modifie pas le courant entrant de Ca^{2+} mais bloque une composante de courant sortant dont l'espèce ionique peut correspondre à une sortie de K^+ et/ou à une entrée de Cl^- (HAGIWARA et al., 1969).

La figure 13 donne un exemple de relation courant-potentiel établie à partir de l'enregistrement de courant sur une fibre placée dans le milieu IX (milieu de VAN HARREVELD, contenant TEA, AN et procaïne). La courbe qui traduit l'amplitude du courant global mesuré au maximum entrant ou au minimum sortant, en fonction du potentiel, montre que ce courant s'annule pour $E_i = -40$ mV devient le plus entrant à -30 mV et s'inverse vers -5 mV. La relation traduisant l'évolution du courant de calcium en fonction du potentiel après soustraction du courant de fuite, révèle que ce courant I_{Ca} s'active pour un potentiel seuil de -50 mV, est maximale pour $E_i = -10$ mV et qu'il s'inverse pour une valeur de potentiel voisine de $+65$ mV. De plus à partir des valeurs positives de potentiel imposé, la relation courant-potentiel présente le phénomène de rectification attendu par la théorie du champ constant de Goldman ; par ailleurs, le potentiel d'inversion de I_{Ca} de $+65$ mV est proche de la valeur attendue pour le potentiel de la pile d'équilibre aux ions calcium. Ce résultat différent de celui en présence de Mn^{2+} pour ce qui est en particulier de la valeur du potentiel d'inversion du courant de Ca

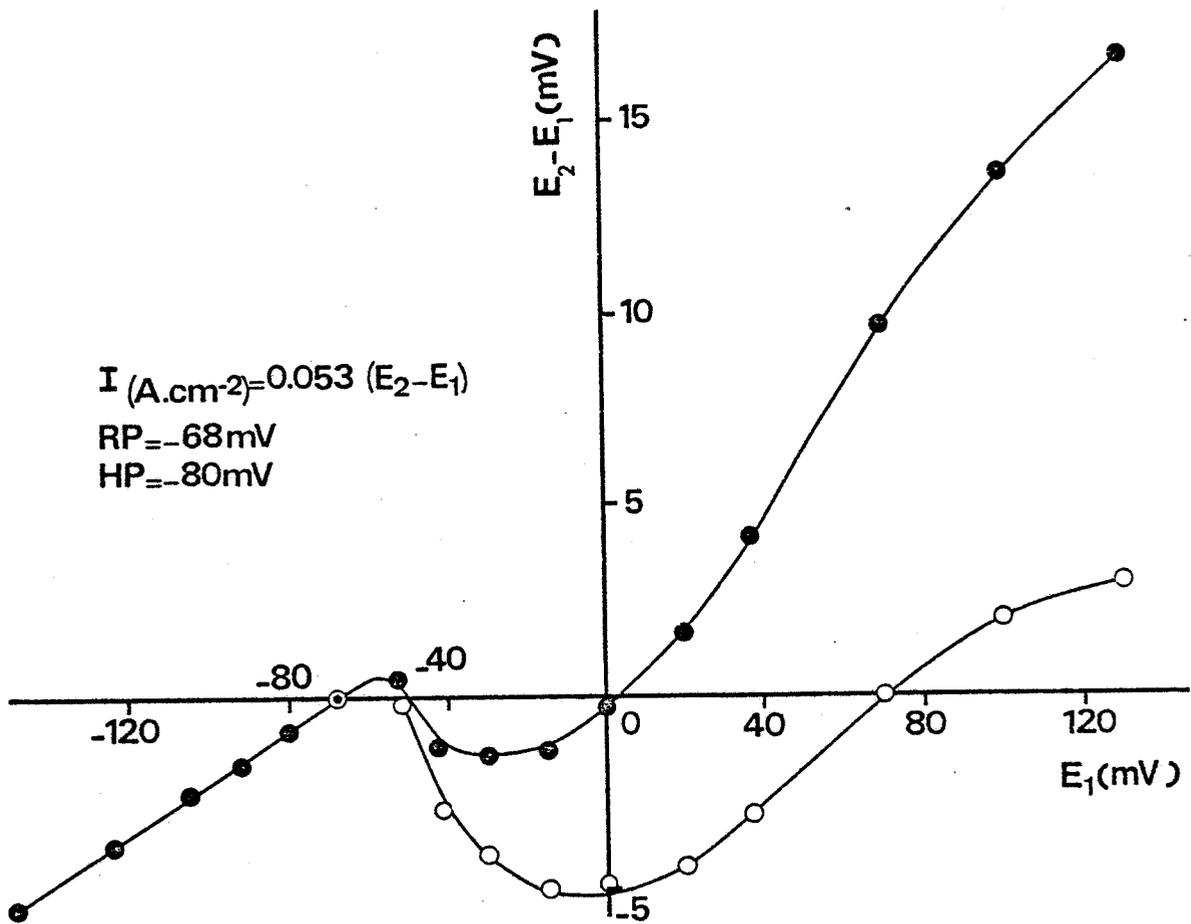


Figure 13 :

Relations courant-potentiel établies pour une fibre placée depuis 20 mn dans le milieu VH contenant les ions TEA^+ (60 mM), l'AN (10^{-3} mM), la procaine (2 mM) et dans lequel la concentration externe de calcium est réduite au 5^{ème} de sa valeur normale (milieu IX).

$RP = -68 \text{ mV}$; $HP = -80 \text{ mV}$; $l = 250 \text{ }\mu\text{m}$; $l' = 250 \text{ }\mu\text{m}$; $d = 250 \text{ }\mu\text{m}$.

La relation (●) correspond au courant global mesuré au maximum entrant et au minimum sortant et (○) après soustraction de I_f .

est tout à fait conforme à celui prévu lorsque la composante du courant sortant qui résiste aux inhibiteurs de perméabilité potassique est éliminée.

Connaissant l'amplitude du courant entrant et la valeur du potentiel d'inversion de I_{Ca} , c'est-à-dire E_{Ca} , la valeur maximale de conductance (\bar{G}_{Ca}) estimée est de $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}$. Cette valeur de G_{Ca} est réduite de l'ordre de 70 % par rapport à la valeur donnée par HENCEK et ZACHAR (1977) sur la fibre musculaire d'écrevisse et par KEYNES et al. (1973) sur la fibre de balane. Cette réduction très importante de G_{Ca} par rapport à celle estimée par les auteurs cités ci-dessus amène à penser qu'un système membranaire pourrait être soustrait à l'analyse sous l'effet de la procaïne. Cette hypothèse est confirmée par les résultats qui sont exposés ci-après.

2. Influence de la Procaïne (2 mM) sur le courant capacitif et stationnaire

De nombreux travaux réalisés sur les fibres musculaires squelettiques montrent qu'aussi bien l'hypertonie (CAPUTO, 1968 ; BRÛLÉ et al., 1977) que les anesthésiques locaux : tétracaïne et procaïne et certaines drogues tel que le dantrolène provoque un découplage excitation-contraction (BLOCKLEHURST, 1975 ; HUI, 1983 b ; SUAREZ-KURTZ, 1982). Selon FRANK et TREFFERS (1977) pour la fibre musculaire squelettique de grenouille et selon DELORME et al. (1978) pour la fibre musculaire de crustacé, l'hypertonie provoque un élargissement de la zone de contact entre le système tubulaire transverse et le réticulum sarcoplasmique. En accord avec cette interprétation, HUI (1983 a et b) étudiant les courants de porte au niveau de la triade de la fibre musculaire de grenouille constate que la tétracaïne supprime un transfert de charges intramembranaires (Q_{β}) qui, selon l'auteur, seraient impliquées

dans la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique. De plus la diminution du gradient électrochimique des ions K^+ et Cl^- au niveau de la membrane réticulaire provoque la libération de Ca^{2+} (NAKAJIMA et ENDO, 1973). Il y aurait donc pour ces derniers auteurs ainsi que pour THORENS et ENDO, 1975 ; MATSUBARA et al., 1977, un couplage entre le système tubulaire transverse et le réticulum sarcoplasmique de type "depolarization induced- Ca^{2+} -release". En conséquence la membrane réticulaire pourrait être stimulée par un courant venant des tubules transverses via une structure de type "gap junction" au niveau de la diade. Cette hypothèse peut être prise en considération en ce qui concerne la fibre musculaire squelettique d'écrevisse dans la mesure où d'une part il est montré qu'en présence de procaïne (2 mM) il y a une réduction de 70 % de la conductance calcique (voir ci-dessus), où d'autre part il va être maintenant montré qu'également, en présence de procaïne, le courant stationnaire diminue dans les mêmes proportions (70 %) et que de plus une des deux composantes du courant capacitif disparaît.

La figure 14 donne un exemple de tracés obtenus sur une fibre placée dans le milieu de VH sans calcium, additionné de TEA^+ en absence (milieu X) ou en présence de procaïne (milieu IX). Sous l'influence d'une ample dépolarisation ($\Delta E_i = + 70 \text{ mV}$) à partir d'une valeur de HP de $- 70 \text{ mV}$, le tracé du courant de référence (tracé A) sous l'action de la procaïne est très modifiée (tracé B). D'une part le courant capacitif est moins ample et moins durable, d'autre part le courant stationnaire diminue, de l'ordre de 70% en présence de procaïne.

Les tracés de droite de la figure 14 (A' et B') correspondant respectivement aux tracés A et B enregistrés, sont reconstitués. Pour le tracé A' en tenant compte de deux composantes de courant capacitif (1 et 2) et pour

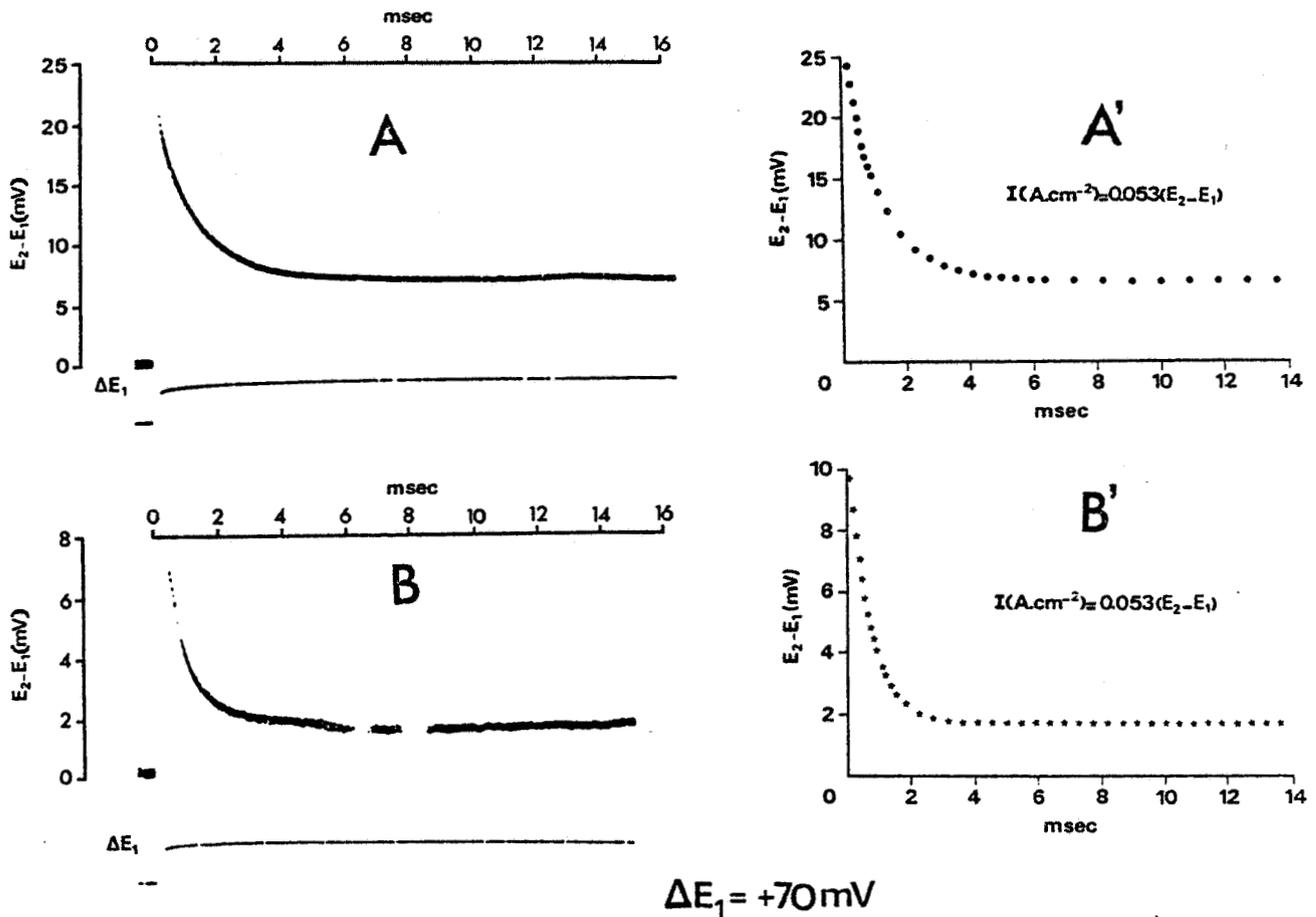


Figure 14 :

Evolution du courant capacitif (I_c) et stationnaire (I_s) en fonction du temps en réponse à une dépolarisation membranaire de + 70 mV, enregistrée sur une fibre placée dans le milieu de VH sans calcium contenant les ions TEA^+ (60 mM) (A) et en plus la procaine (2 mM) (B). Les tracés A' et B' sont respectivement les courants A et B calculés en tenant compte de l'existence de deux composantes de I_c pour A, d'une seule composante de I_c pour B et d'une diminution de I_s de 70 % pour B par rapport à I_s de A.

le tracé B' en ne tenant compte que de la composante (1) du courant capacitif. En effet la figure 15 montre l'évolution du logarithme du courant capacitif en fonction du temps en absence et en présence de procaïne. Cette représentation en coordonnées semi-logarithmiques met bien en évidence la suppression d'une composante du courant capacitif sous l'influence de la procaïne.

A partir des deux valeurs instantanées (au temps $t = 0$) I_{0_1} et I_{0_2} ainsi que des constantes de temps τ_1 et τ_2 des deux composantes du courant capacitif et de la valeur du courant stationnaire en absence ou en présence de procaïne, il peut être proposé un schéma électrique équivalent à la membrane correspondant à une portion de membrane externe de 1 cm^2 incluant les membranes profondes sans estimation de leur surface. Ce schéma électrique est constitué en absence de procaïne de deux circuits RC en parallèle (figure 16 a et b) schémas identiques à ceux proposés en 1967 par EISENBERG pour la fibre musculaire squelettique crabe (a) et par MATHIAS et al., 1980 pour la fibre de grenouille (b). Ainsi comme cela est précisé sur le schéma, sous l'influence de la procaïne, un des deux systèmes membranaires (probablement le système profond) pourrait être soustrait à l'analyse.

Il est important de signaler que chaque circuit RC est associé à une résistance d'accès (R_a) qui représente, d'une part la résistance du matériel amorphe constitué par la basale et d'autre part la résistance des invaginations longitudinales du sarcolemme et probablement celle de la lumière des tubules. Aussi les valeurs données pour les résistances et les capacités (figure 16) ne peuvent être que très approximatives étant donné l'incertitude concernant les valeurs instantanées, I_{0_1} et I_{0_2} , des deux composantes de courant capacitif. En effet les tracés A et B de la figure 14 montrent que le potentiel imposé n'atteint une valeur stable qu'après un délai de l'ordre de 2 à 3 msec. A l'appui de cette interprétation quant à la détermination appro-

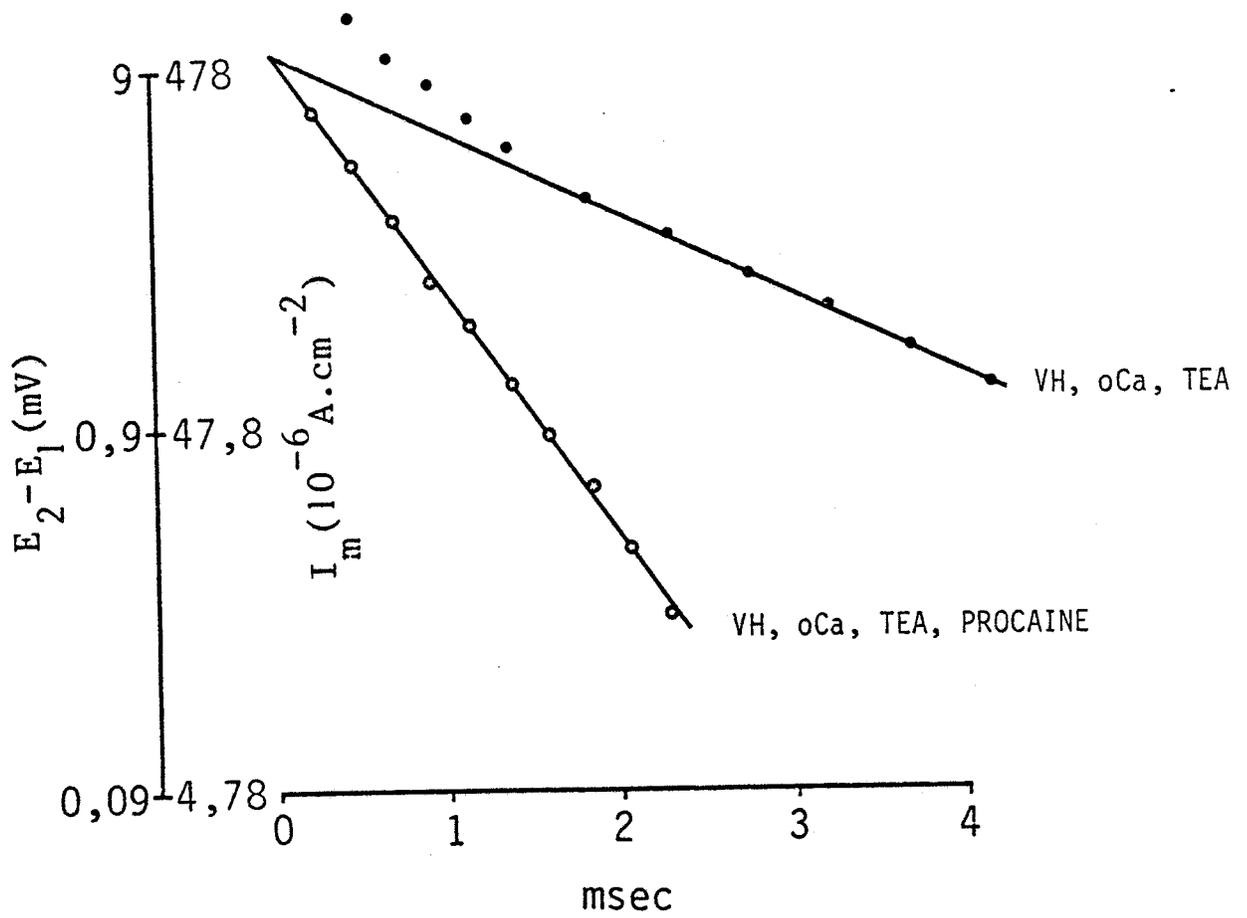


Figure 15 :

Evolution en coordonnées semi-log du courant capacitif en fonction du temps pour une dépolarisation imposé de + 70 mV correspondant aux tracés de la figure 14.

La procaine élimine une composante capacitive.

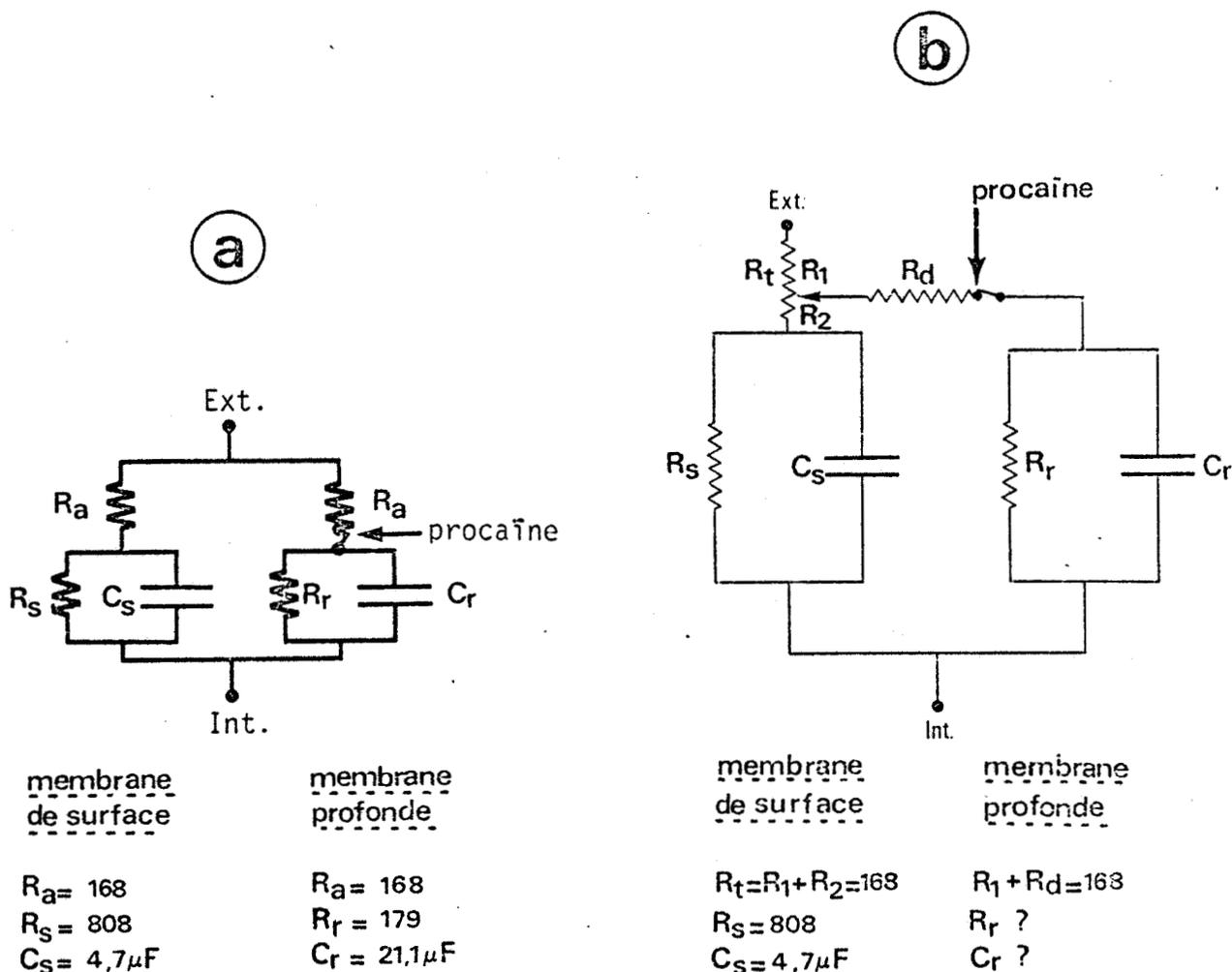


Figure 16 :

Schéma électrique de la membrane de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse montrant l'existence de deux systèmes membranaires (membrane de surface et membrane profonde).

- Membrane de surface : la résistance de la membrane de surface (R_s) est en parallèle avec la capacité membranaire (C_s). R_a et R_t représentent les résistances d'accès qui correspondent au matériel amorphe constitué par la basale recouvrant le sarcolemme et emplissant les invaginations longitudinales de celui-ci.

- Membrane profonde : la capacité (C_r) est en parallèle avec la résistance (R_r) ; R_a et R_d sont les résistances d'accès.

La procaïne soustrait à l'analyse le système membranaire profond.

Bien que les deux schémas a et b rendent compte des résultats électrophysiologiques (fig. 14, 15), le schéma b est plus conforme à la réalité dans la mesure où d'une part il a été montré qu'au niveau des fibres de crustacés les diades (voire triades) sont situées tout le long des invaginations de la membrane de surface), et d'autre part MATHIAS et al. (1980) - voir annexe -, décrivent une conductance, $g(x)$, entre le système tubulaire et la citerne terminale du réticulum, conductance qui dépendrait du potentiel.

ximative des valeurs des résistances et des capacités, il faut signaler que, sur la fibre musculaire d'écrevisse, POLEDNA et al. (1978) montrent que la résistance d'accès de chaque circuit RC varie très largement d'une fibre à l'autre ($0,2$ à $344 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $m = 126.1 \pm 23 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 19$).

En conclusion en dépit de l'incertitude dans l'estimation des résistances et des capacités, il apparaît cependant, sous l'influence de la procaïne, une diminution importante de l'ordre de 70 % du courant stationnaire et une réduction d'environ 80% de la capacité membranaire. Dans la mesure où, en présence de procaïne la conductance maximale aux ions Ca^{2+} est réduite également de 70% (voir ci-dessus), on est amené à émettre l'hypothèse d'un blocage par la procaïne de la jonction de couplage entre le système tubulaire transverse et le réticulum sarcoplasmique en accord avec les résultats de HUI (1983 b) concernant le découplage excitation-contraction par la tétra-caïne sans pour autant exclure un effet direct de ces anesthésiques locaux sur la libération du calcium par le RS (HERTZ, 1968 ; YAMAMOTO et KASAI, 1982). La diminution de 70 % du courant stationnaire et de la capacité membranaire est en accord avec la grande surface des membranes profondes (tubules, réticulum) par rapport à la membrane de surface des fibres de crustacés (SELVERSTON, 1967 ; ATWOOD, 1963, 1965 ; BRANDT et al. 1965 ; ROSENBULUTH, 1969 ; HOYLE et SMYTH, 1963 ; FAHRENBACH, 1967). Enfin, la disparition du courant sortant résistant au TEA^+ activé lors d'amples dépolarisations membranaires sur la fibre musculaire de balane (HAGIWARA et al., 1969) et sur la fibre musculaire d'écrevisse (résultats donnés ci-dessus) pourrait être interprétée non par une inhibition spécifique de ce courant par la procaïne mais plutôt par une élimination d'un système membranaire profond où s'écoulerait ce courant sortant. Quoiqu'il en soit, le milieu de VAN HARREVELD contenant de l'AN, du TEA et de la procaïne convient tout à fait pour établir très correctement la cinétique du courant de calcium lors des dépolarisations imposées.

3 . Mise en évidence de deux composantes de courant entrant de calcium

$$I_{Ca_1} \text{ et } I_{Ca_2}$$

La figure 17 donne un exemple de tracés enregistrés en milieu de VH pauvre en calcium (20% de la $[Ca]_0$ normale) additionné des substances qui suppriment tous les courants de rectification. Ainsi, pour chaque niveau de dépolarisation le courant de membrane, mis à part la composante rapide du courant capacitif, est égale à la somme du courant de calcium I_{Ca} et du courant de fuite I_f . Pour de faibles dépolarisations membranaires comme par exemple celle de + 35 mV illustrée dans la figure ($E_i = - 35$ mV), le courant devient net entrant puis diminue au cours du temps pour s'annuler, s'inverser et devenir net sortant en fin d'impulsion (50 msec). Cette diminution de courant au cours du temps peut refléter l'inactivation de I_{Ca} . Pour de plus amples dépolarisations, par exemple de + 55 mV ($E_i = - 15$ mV), le courant est plus entrant, le maximum apparaissant plus précocement, puis ce courant diminue pour cependant en fin d'impulsion rester de sens entrant. Pour une dépolarisation de 70 mV ($E_i = 0$ mV), le courant net entrant s'active rapidement pour conserver cette même valeur pendant toute la durée de l'impulsion. Il en est de même quant au maintien de l'amplitude du courant durant toute la durée de la dépolarisation pour des niveaux de potentiel imposé supérieurs à 0 mV ; de plus ce courant global qui se maintient au cours du temps s'annule et s'inverse au potentiel de + 20 mV.

En première analyse, la diminution du courant entrant de calcium peut refléter le mécanisme d'inactivation qui est décrit sur cette même préparation par HENČEK et ZACHAR (1977). Cependant si cette inactivation est dépendante du voltage, il est surprenant de constater que plus la dépolarisation imposée est ample, moins est apparent le phénomène d'inactivation. Cette

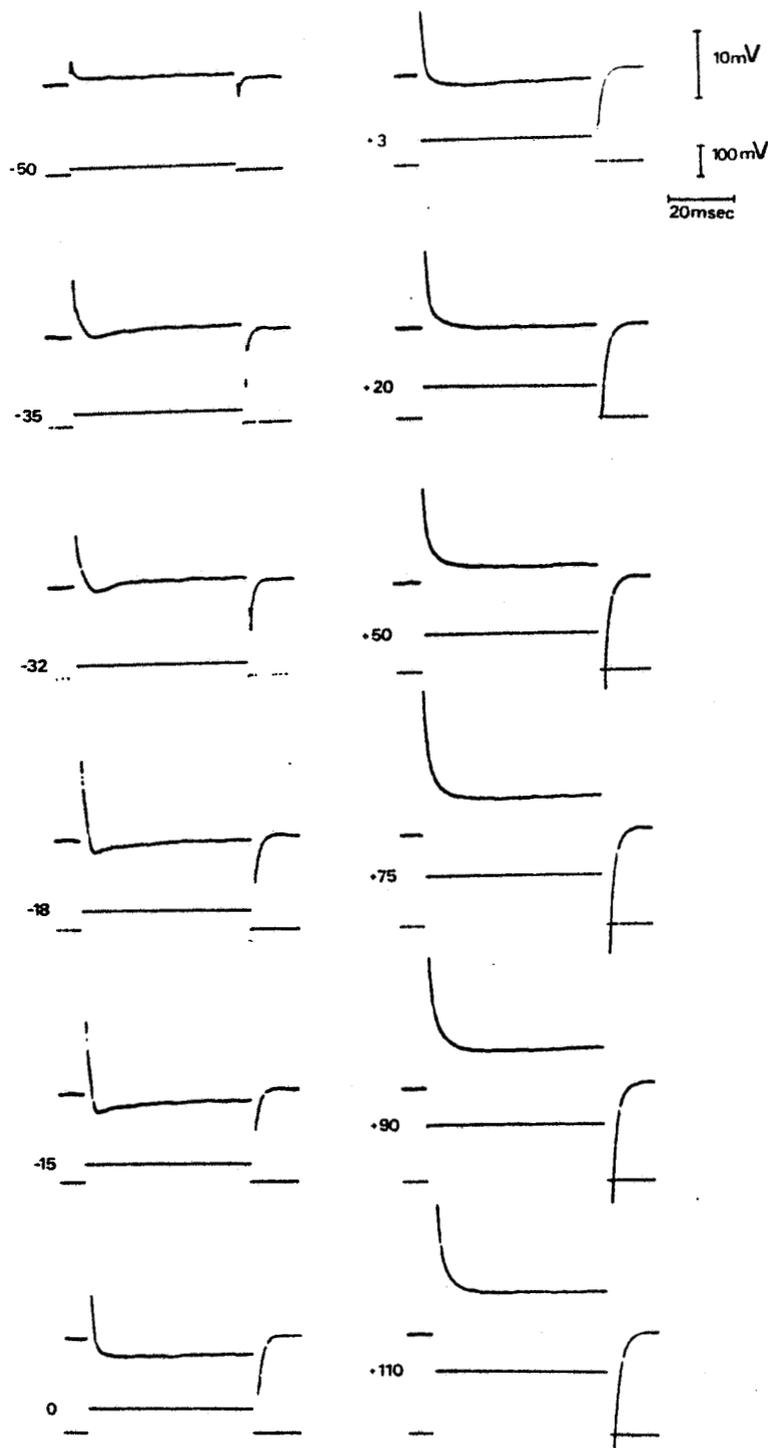


Figure 17 :

Courant membranaire (tracés du haut) exprimé en terme de différence de potentiel, enregistré en réponse à des créneaux de potentiel (tracés du bas) d'une fibre placée depuis 30 min dans le milieu VH contenant les ions TEA^+ (60 mM) l'AN (10^{-3} mM), la procaine (2 mM) et dans lequel la concentration externe de calcium est réduite au 5^{ème} de sa valeur normale.

RP = - 60 mV ; HP = - 70 mV ; $l = 312,5 \mu m$; $l' = 312,5 \mu m$;
 $d = 312,5 \mu m$.

Les valeurs situées à gauche de chaque tracé correspondent à la valeur du potentiel imposé.

diminution apparente de l'inactivation en ce qui concerne la conductance calcique est actuellement expliquée par un processus qui fait intervenir le calcium lui-même ; l'ampleur de l'inactivation étant fonction de la quantité d'ions calcium qui entre dans la cellule. ASHCROFT et STANFIELD (1980, 1982 b) sont les premiers à décrire ce mécanisme d'inactivation au niveau de la fibre musculaire squelettique d'insecte. Si un tel mécanisme existe au niveau de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse, il est surprenant de constater, pour une ample dépolarisation de 70 mV ($E_i = 0$ mV), que d'une part le courant très net entrant (illustré à la figure 17) se maintient pendant toute la durée de l'impulsion alors qu'à ce niveau de potentiel la valeur maximale de conductance aux ions Ca^{2+} est atteinte selon HENČEK et ZACHAR (1977) et que d'autre part la "driving force" pour les ions calcium est encore de valeur élevée. Dans ces conditions si l'inactivation, dépendant du voltage et/ou de l'importance de l'entrée de calcium dans la fibre, ne rend pas compte de l'ensemble de la cinétique des tracés de courant, on est amené à suggérer que le courant entrant de calcium pourrait être en fait constitué de deux composantes (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) comme viennent de le montrer tout récemment ZHRADNIK et ZACHAR (1982).

L'existence de deux courants entrants de calcium peut être envisagée après analyse des relations courant-potentiel (figures 18 et 19) et de l'évolution en fonction du temps du courant I_{Ca} pour chaque niveau de dépolarisation (figure 20 a et b).

La figure 18 rend compte de deux relations courant-potentiel établies au maximum de courant global entrant ou au minimum sortant et en fin d'impulsion (50 msec). Ces courbes sont construites à partir des tracés de courant enregistrés sur une même fibre dont un certain nombre sont présentés à la figure 17. Cette figure 18 montre que les deux relations sont confondues

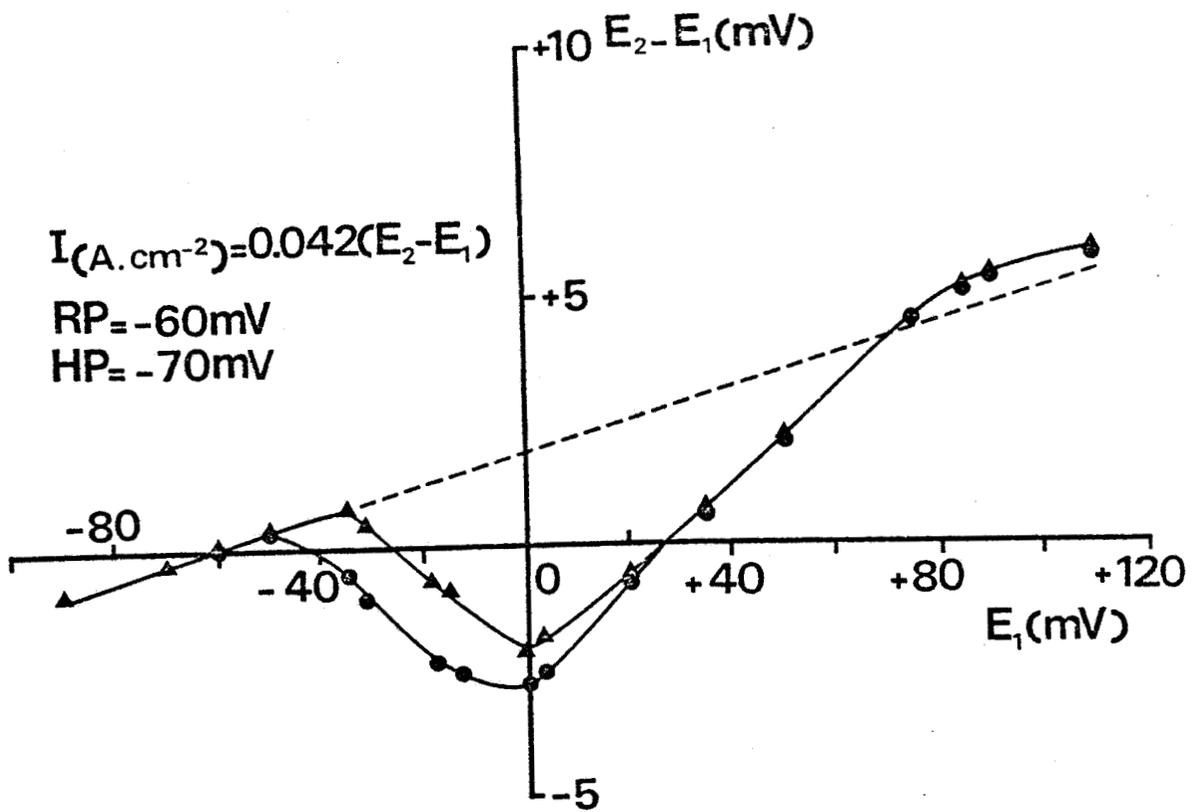


Figure 18 :

Relations entre le courant membranaire et le potentiel imposé établies à partir des tracés de la figure 17, d'une part au maximum de courant entrant ou au minimum sortant (●) d'autre part en fin d'impulsion (▲).

pour des valeurs de potentiel imposé > 0 mV. Par contre, pour les potentiels imposés négatifs ($E_i \leq 0$ mV), les courbes sont distinctes. Si l'inactivation dépendait du voltage elle serait donc d'autant plus importante que le potentiel imposé est plus positif et par conséquent les deux relations devraient être confondues ou très proches l'une de l'autre pour les faibles dépolarisations et très distinctes pour les fortes dépolarisations ; c'est l'inverse qui est observé. Si l'inactivation dépendait de la quantité d'ions calcium qui entre dans la cellule, comme cela a été mentionné ci-dessus, au potentiel 0 mV l'amplitude du courant global devrait être très différente au début et en fin d'impulsion dans la mesure où la conductance aux ions Ca^{2+} atteint à ce potentiel sa valeur maximale selon HENČEK et ZACHAR (1977). L'établissement de ces deux relations après soustraction du courant de fuite présentées à la figure 19, montre de plus très nettement la rectification importante du courant de calcium au voisinage de son potentiel d'inversion ; ce résultat est tout à fait conforme à celui décrit par ASHCROFT et STANFIELD (1980) sur la fibre musculaire d'insecte.

L'hypothèse selon laquelle il existerait deux composantes de courant entrant de calcium est semble-t-il plausible au vu de l'évolution du courant entrant de calcium en fonction du temps illustré à la figure 20 pour différents niveaux de potentiel imposé. Pour chaque niveau de potentiel, l'évolution du courant de calcium en fonction du temps est obtenue à partir du tracé de courant enregistré auquel est soustrait le courant de fuite et la composante rapide du courant capacitif. L'examen de la cinétique des courants montre qu'en partant de l'hypothèse selon laquelle une seule composante de I_{Ca} est présente, ni l'inactivation dépendant du voltage ni celle relative à l'importance de l'entrée de calcium dans la cellule ne rendent compte de l'ensemble des tracés de courant I_{Ca} reconstitués pour tous les niveaux de

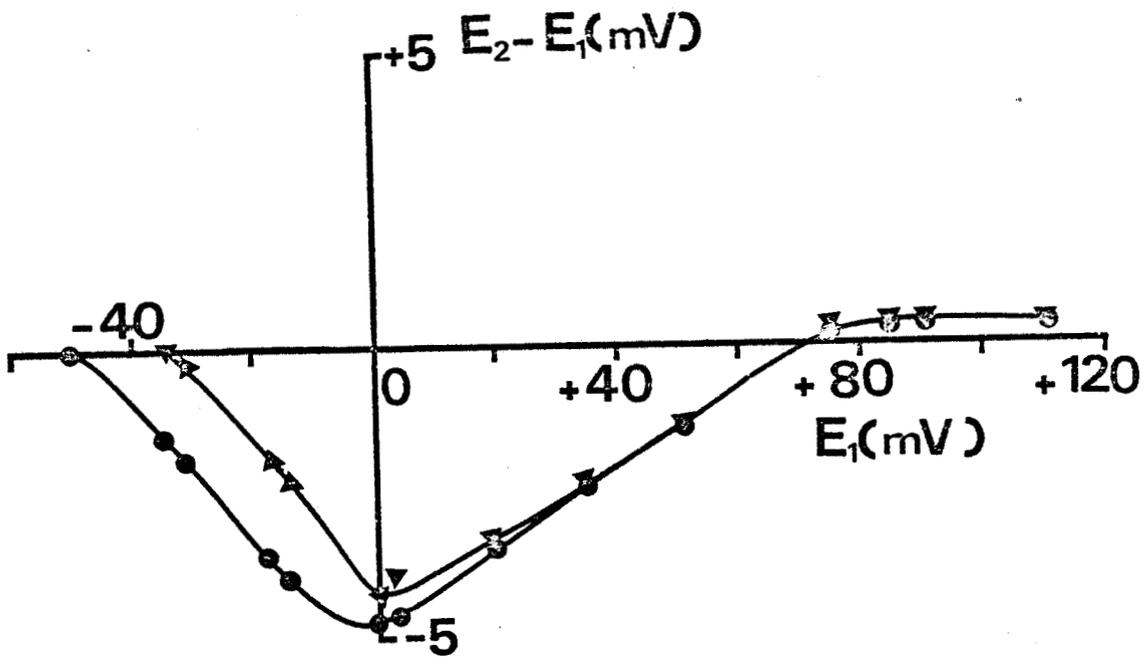


Figure 19 :

Relations liant l'évolution du courant I_{Ca} au potentiel correspondant à la figure 18 après soustraction de courant de fuite.

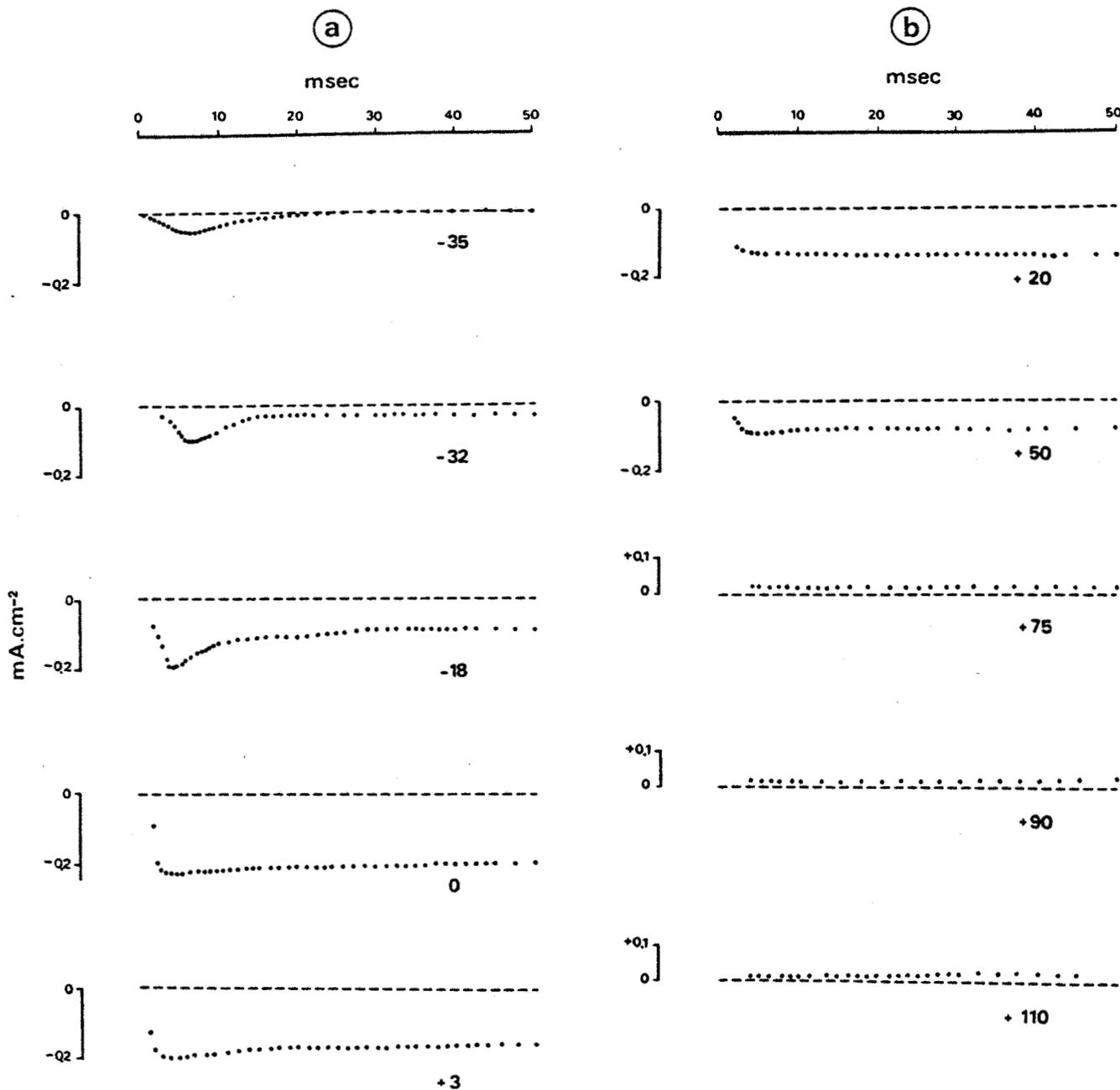


Figure 20 :

Evolution du courant de calcium (I_{Ca}), exprimé en mA.cm^{-2} , en fonction du temps pour différents niveaux de dépolarisation. I_{Ca} est reconstitué point par point à partir des tracés du courant global données à la figure 17, dont sont soustraits I_f et I_c . Les valeurs données au dessous de chaque tracé correspondent aux valeurs de potentiel imposé.

potentiel imposé. En effet, en partant du tracé de courant de calcium correspondant au potentiel - 35 mV, il est observé que ce courant est totalement inactivé après 20 msec, il s'ensuit que, pour d'autres niveaux du potentiel imposé supérieurs à - 35 mV, l'inactivation devrait être complète tout au moins après 30 msec. Au potentiel 0 mV, le courant I_{Ca} reste cependant constant pendant toute la durée de l'impulsion dépolarisante. Enfin les tracés de courant de calcium reconstitués révèlent que le courant de Ca tend à s'inverser pour une valeur de potentiel de l'ordre de + 70 mV et qu'à partir de ce potentiel il garde une valeur constante quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation témoignant de l'existence d'une très forte rectification.

4. Mise en évidence de I_{Ca_2} en absence de I_{Ca_1} inhibé par une prédépolarisation conditionnante.

Comme il a été montré (figure 20) pour une faible dépolarisation de + 35 mV ($E_i = - 35$ mV) qu'après 20 msec le courant I_{Ca} est totalement inactivé, c'est la raison pour laquelle une dépolarisation conditionnante de + 65 mV d'une durée égale à 50 msec est imposée à la membrane de façon à pouvoir mettre en évidence lors d'une deuxième impulsion (séparée de la première par un intervalle de temps de 10 msec) un courant I_{Ca} correspondant à la deuxième composante qui ne présente pas ou peu d'inactivation. Les enregistrements présentés à la figure 21 montrent qu'un courant entrant peut être activé à partir d'une valeur seuil de potentiel de - 25 mV environ et que ce courant est de plus en plus entrant au fur et à mesure que l'amplitude de la dépolarisation, correspondant à la deuxième impulsion, est plus grande. Il est à remarquer que ce courant entrant, activé lors de la deuxième

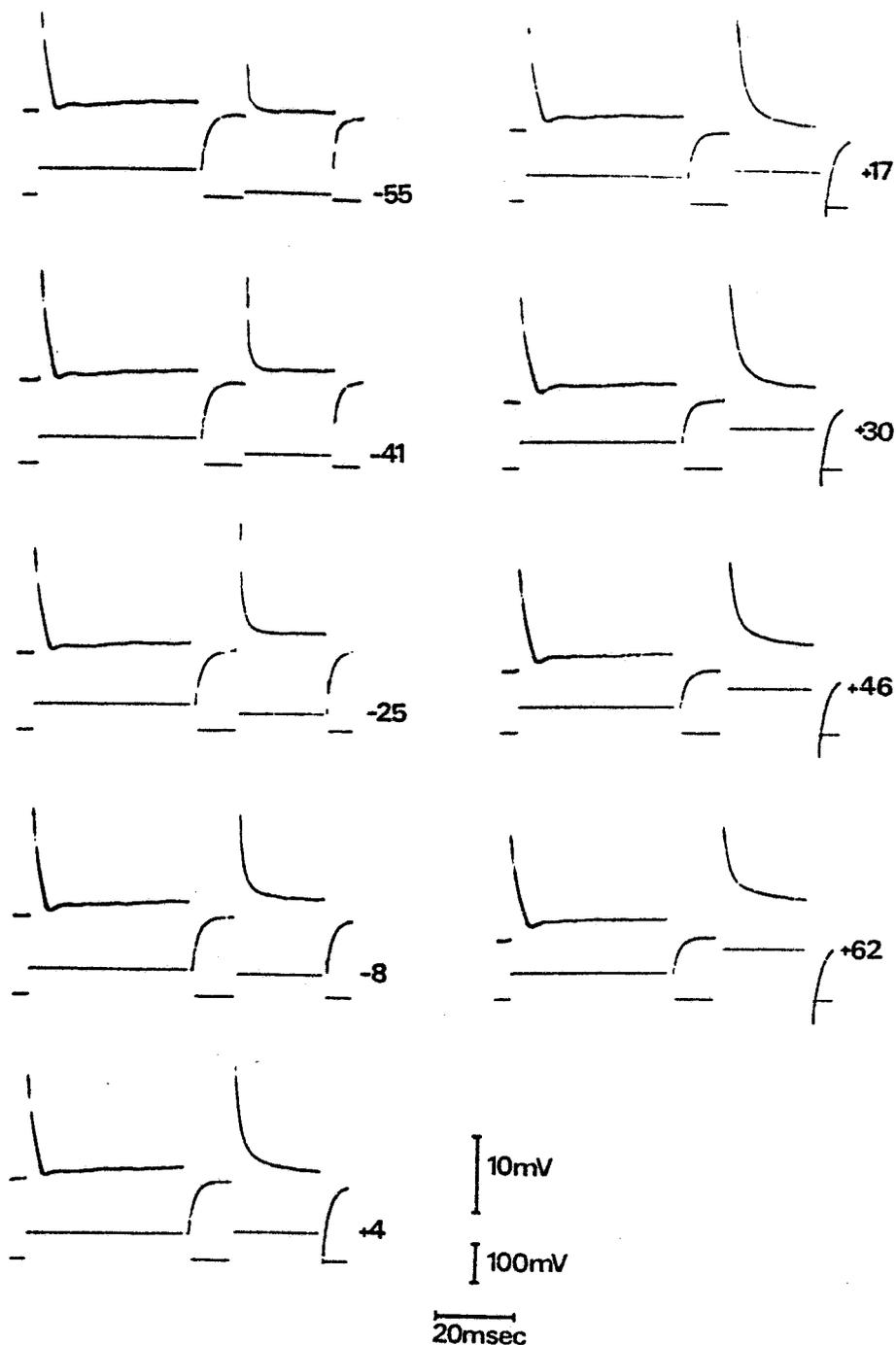


Figure 21 :

Courant membranaire (tracés du haut) en fonction du potentiel imposé (tracés du bas), enregistré sur une fibre placée depuis 30 min dans le milieu de VH contenant les ions TEA^+ (60 mM), AN (10^{-3} mM), la procaine (2 mM) et dans lequel la concentration externe de calcium est réduite au 5^{ème} de sa valeur normale. La dépolarisation conditionnante est de + 67 mV. Les valeurs données à droite de chaque tracé, correspondent au potentiel test imposé durant la seconde impulsion.

RP = - 70 mV ; HP : - 70 mV ; $l = 437,5 \mu\text{m}$; $l' = 437,5 \mu\text{m}$;
 $d = 437,5 \mu\text{m}$.

impulsion, ne s'inactive pas tout au moins pendant la durée de la dépolarisation-test.

A partir de ces tracés de courant correspondant à la deuxième impulsion, l'établissement de la relation liant le courant total mesuré en fin d'impulsion en fonction du potentiel (figure 22), révèle en effet que le courant entrant est activé pour une valeur seuil de potentiel de l'ordre de - 25 mV, qu'il prend une valeur minimale pour un potentiel de 18 mV et qu'au delà de cette valeur il varie linéairement avec le potentiel. La relation traduisant le courant I_{Ca} en fonction du potentiel après soustraction de courant de fuite permet d'estimer la conductance maximale correspondant à ce courant I_{Ca_2} , elle est atteinte pour une valeur de potentiel de + 30 mV puisque au delà le courant varie linéairement avec le potentiel (dans la gamme de potentiels testés) pour s'annuler vers une valeur de potentiel d'environ + 80 mV (valeur extrapolée).

En conclusion au vu de l'ensemble des résultats, il peut être admis qu'au niveau de la fibre musculaire d'écrevisse, il existe deux composantes de courant entrant de Ca : - une première composante I_{Ca_1} dont le potentiel seuil d'activation est de l'ordre de - 40 mV qui, en accord avec ZAHRADNIK et ZACHAR (1982), s'inactive en fonction du temps, inactivation dépendant du voltage ; - une deuxième composante I_{Ca_2} dont le potentiel seuil d'activation est moins négatif, de l'ordre de - 25 mV qui ne présente pas ou peu d'inactivation. Les seuils d'activation différents de ces deux courants entrants de calcium (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) peuvent d'ailleurs être observés à la figure 19, figure qui traduit la relation I_{Ca} en fonction du potentiel au maximum de courant entrant et en fin d'impulsion. Cependant si le potentiel seuil d'activation de la deuxième composante apparaît moins négatif que celui correspondant à la première composante, il est quand même de valeur plus

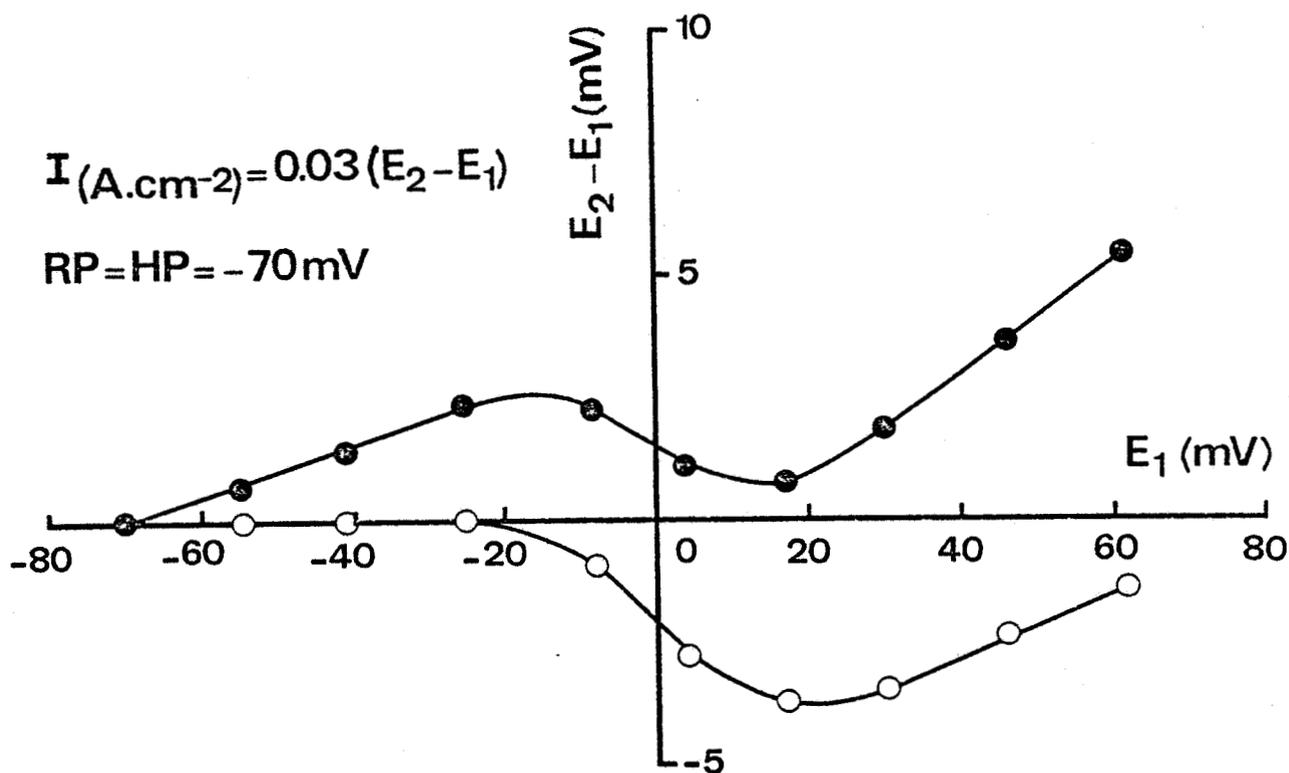


Figure 22 :

Relations courant membranaire (mesuré à la fin de la 2^{ème} impulsion) en fonction du potentiel, établies à partir des tracés de la figure 21 avant (\bullet) et après soustraction de courant de fuite (\circ).

négative que celle qui peut être estimée à partir de la figure 22. Cette différence de seuil d'une expérience à l'autre peut semble-t-il, refléter l'existence d'une inactivation de la deuxième composante I_{Ca_2} ; en effet la suppression de la composante I_{Ca_1} par une prédépolarisation conditionnante de 50 msec de durée peut avoir aussi entraîné un certain degré d'inactivation de la composante I_{Ca_2} ce qui peut rendre compte de la différence de seuil d'activation observée dans deux conditions expérimentales (figure 19 et 22).

5. Analyse des conductances calciques G_{Ca_2} et G_{Ca_1} en fonction du temps et du potentiel.

a) G_{Ca_2}

α/ Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture du canal calcique correspondant à la deuxième composante.

L'évolution du courant de calcium I_{Ca_2} en fonction du temps déterminé point par point après soustraction du courant de fuite et du courant capacitif pour un potentiel imposé de + 17 mV, est présentée à la figure 23. Il est possible à partir de l'équation générale qui traduit l'évolution de la conductance en fonction du temps pour cette valeur particulière de potentiel imposé, + 17 mV, de déterminer le nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux calciques permettant le passage du courant entrant transporté par les ions Ca^{2+} .

Comme ce courant ne semble pas s'inactiver l'équation générale $G_{Ca}=f(t)$ est la suivante :

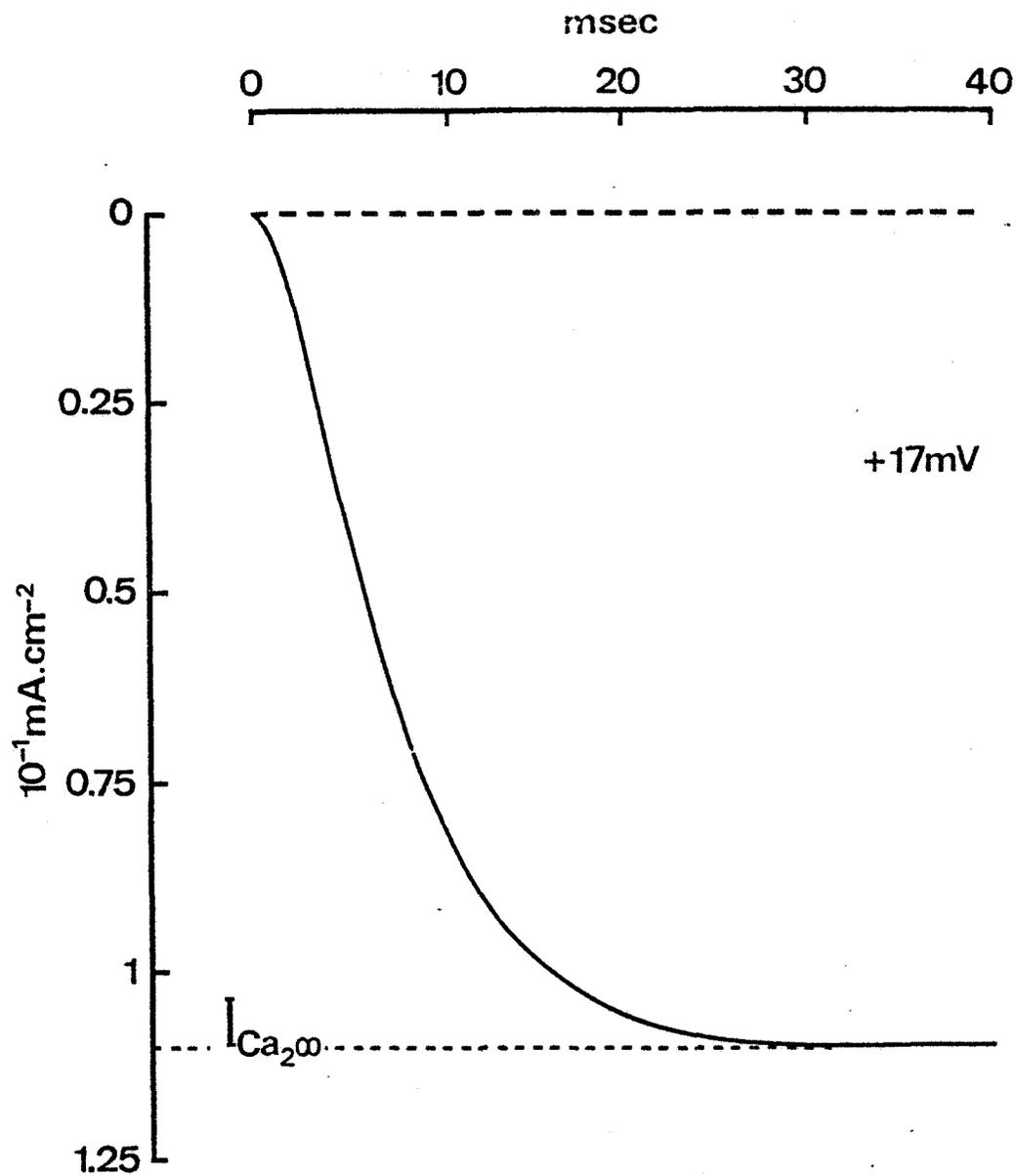


Figure 23 :

Courant de calcium (I_{Ca_2}) en fonction du temps pour une dépolarisation test de + 87 mV ($E_i = + 17$ mV) tracé à partir de l'enregistrement du courant global, illustré à la figure 21, duquel est soustrait le courant capacitif et le courant de fuite.

L'équation qui donne I_{Ca_2} en fonction du temps est :

$$I_{Ca_2} = I_{Ca_2\infty} (1 - e^{-t/\tau_m})^x$$

avec $\tau_m = 5,10$ msec ; $x = 2$.

$$G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} \left[m_0 + (m_\infty - m_0) (1 - e^{-t/\tau_m}) \right]^x \quad (1)$$

m_0 est la valeur de la variable d'activation, m , au potentiel HP (- 70 mV); m_∞ est la valeur stationnaire de m en fin de transformation d'un certain nombre de sites de l'état β en état α des canaux calciques. \bar{G}_{Ca} est la valeur maximale de conductance correspondant à la valeur de $m_\infty^x=1$. Au potentiel HP de -70 mV, m_0 peut être considéré comme négligeable ($m_0=0$) puisque le seuil de potentiel d'activation de G_{Ca_2} est de - 25 mV et que HENČEK et ZACHAR en 1977 démontrent que la valeur m_0 à HP= - 70 mV est aussi égale à zéro pour la conductance que nous avons assimilé à G_{Ca_1} dont le seuil de potentiel d'activation est de - 40 mV. Dans ces conditions en prenant $m_0=0$ l'équation (1) devient :

$$G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} \left[m_\infty (1 - e^{-t/\tau_m}) \right]^x$$

d'où

$$G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} m_\infty^x (1 - e^{-t/\tau_m})^x \quad (2)$$

en posant

$$\bar{G}_{Ca} \cdot m_\infty^x = G_{Ca\infty} \quad (3) \quad \text{pour } E_i = + 17 \text{ mV}$$

il vient

$$G_{Ca}/G_{Ca\infty} = (1 - e^{-t/\tau_m})^x \quad (4)$$

comme

$$G_{Ca} = I_{Ca} / (E_i - E_{Ca})$$

l'équation (4) devient :

$$I_{Ca} / I_{Ca\infty} = (1 - e^{-t/\tau_m})^x \tag{5}$$

$I_{Ca\infty}$ est la valeur maximale atteinte par le courant I_{Ca} pour le potentiel + 17 mV, $I_{Ca\infty} = 0,11 \text{ mA.cm}^{-2}$.

De l'équation (5) on tire :

$$(I_{Ca} / I_{Ca\infty})^{1/x} = 1 - e^{-t/\tau_m}$$

d'où

$$1 - (I_{Ca} / I_{Ca\infty})^{1/x} = e^{-t/\tau_m}$$

ainsi

$$\text{Log} \left[1 - (I_{Ca} / I_{Ca\infty})^{1/x} \right] = -t/\tau_m \tag{6}$$

Cette relation linéaire (équation 6) satisfait à l'équation de la forme $y = -ax$ avec l'ordonnée à l'origine égale à 0. En partant des couples de valeurs (t, I_{Ca}) et en donnant à $I_{Ca\infty}$ la valeur de $0,11 \text{ mA.cm}^{-2}$ on constate que l'ordonnée à l'origine est bien égale à 0 quand la valeur 2 est donnée

à x ; pour $x < 2$, l'ordonnée est positive et pour $x > 2$ l'ordonnée est négative. De plus le coefficient de corrélation r est le plus proche de 1 pour $x = 2$ ($r = .999$). Ce résultat implique que deux particules sont impliquées lors de l'ouverture des canaux calciques correspondant à la conductance G_{Ca_2} . Cette valeur 2 est celle déterminée par MOUNIER et VASSORT (1975) pour décrire la relation $m_{\infty}^x = f(E_i)$ de la fibre musculaire de crabe alors qu'au niveau de la fibre d'écrevisse HENČEK et ZACHAR sont amenés à donner à x la valeur 6. La valeur 2 pour l'exposant x qui permet de décrire l'évolution de I_{Ca_2} en fonction du temps pour $E_i = +17$ mV (figure 23) est aussi celle qui permet de décrire $I_{Ca} = f(t)$ pour tous les différents niveaux de potentiel testés (figure 21).

Comme cela va être exposé ci-après, la valeur 6 pour x en ce qui concerne la fibre musculaire d'écrevisse est également trouvée pour décrire l'évolution de I_{Ca_1} en fonction du temps. Ceci renforce donc l'hypothèse émise ci-dessus concernant l'existence de deux populations de canaux calciques dans la membrane de la fibre musculaire d'écrevisse en accord avec l'hypothèse de ZHRADNIK et ZACHAR (1982).

B/ Analyse de la conductance calcique G_{Ca_2} en fonction du potentiel

Puisque le courant I_{Ca_2} après avoir atteint sa valeur maximale pour chaque niveau de dépolarisation, la conserve pendant toute la durée de l'impulsion (voir figure 17 et 20), il est possible à partir de la relation I_{Ca} - potentiel (figure 22) de déterminer la relation liant la conductance G_{Ca_2} au potentiel après avoir déterminé le potentiel d'inversion de I_{Ca_2}

(potentiel d'inversion extrapolé de l'ordre de + 80 mV). Dans ces conditions la conductance maximale G_{Ca_2} est de $2,62 \cdot 10^{-3} S \cdot cm^{-2}$. L'équation de la relation traduisant l'évolution de la conductance $G_{Ca_2^\infty}$ est la suivante :

$$G_{Ca_2^\infty} = \bar{G}_{Ca_2} / (1 + e^{(E_0 - E_i)/k}) \quad (7)$$

avec $E_0 = 3,31$ mV, potentiel pour lequel $G_{Ca_2^\infty} = \bar{G}_{Ca_2}/2$ et $k = 7,11$ mV (paramètre de mise en forme de la relation). Dans ces conditions $G_{Ca_2^\infty}/\bar{G}_{Ca_2}$ est égale à m_∞^x .

Puisqu'il a été montré (voir ci-dessus) que $x = 2$, la relation $G_{Ca_2^\infty}/\bar{G}_{Ca_2} = f(E_i)$ correspond à la relation $m_\infty^2 = f(E_i)$. Cette dernière relation ainsi que celle traduisant $m_\infty = f(E_i)$ est présentée à la figure 24.

L'évolution de $m_\infty = f(E_i)$ montre que pour $HP = -70$ mV, la valeur de la variable m d'origine (m_0) peut être considérée comme négligeable. La valeur maximale de $m_\infty^2 = 1$ est atteinte pour une valeur de $E_i = +30$ mV. Le potentiel pour lequel la conductance G_{Ca_2} est maximale est bien plus positif que celui donné par HENČEK et ZACHAR (1977) pour m_∞^6 ($E_i = 0$ mV).

b) G_{Ca_1}

L'analyse de la conductance G_{Ca_1} ne peut être aussi complète que celle concernant G_{Ca_2} puisqu'à partir d'un potentiel de l'ordre de -30 mV le courant I_{Ca_1} activé (seuil de potentiel d'activation de -40 mV) se trouve plus ou moins en fonction du temps associé au courant I_{Ca_2} . C'est la raison pour laquelle seul le courant correspondant à des potentiels inférieurs à -30 mV peut être analysé pour déterminer le nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux correspondant à la conductance G_{Ca_1} . Il en est de

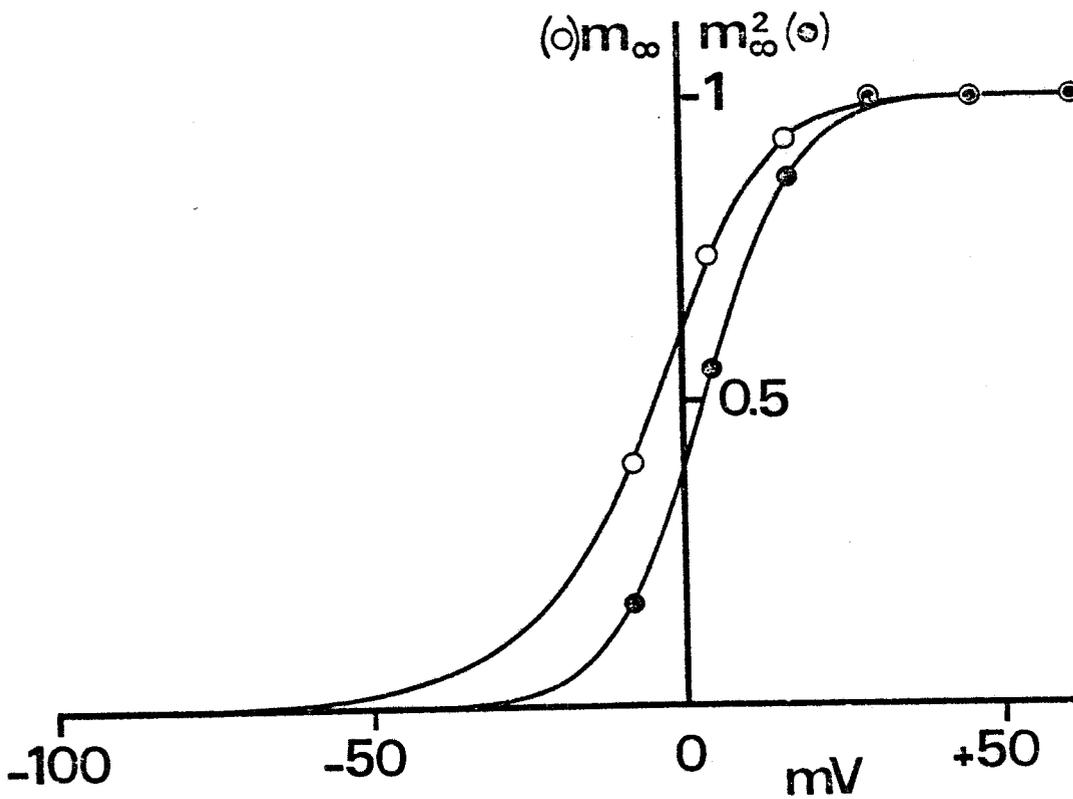


Figure 24 :

Relation liant le potentiel membranaire à la variable d'activation m_{∞} (O) correspondant à I_{Ca_2} . m est calculée à partir de l'égalité

$$m_{\infty}^2 (\bullet) = G_{Ca_2^{\infty}} / \bar{G}_{Ca_2}$$

Le rapport $G_{Ca_2^{\infty}} / \bar{G}_{Ca}$ est déterminé à partir de la relation $I_{Ca_2} = f(E_i)$ donnée à la figure 22.

même de la relation $m_{\infty}^x = f(E_i)$ dont l'équation ne peut être établie avec certitude.

α/ Détermination du nombre de particules x impliquées dans l'ouverture du canal correspondant à G_{Ca_1}

La figure 25 montre l'évolution du courant I_{Ca_1} en fonction du temps, courant qui a déjà été présenté à la figure 20 ($E_i = -35$ mV). Ce courant transitoire (tracé a) prouve qu'il existe un processus d'inactivation : I_{Ca_1} diminue exponentiellement avec une constante de temps d'inactivation (τ_h) de 6,32 msec. A partir de τ_h , il est possible de tracer l'évolution du courant I_{Ca_1} en absence d'inactivation (tracé b). Ainsi, comme cela a été expliqué précédemment, l'équation donnant l'évolution de I_{Ca_1} en fonction du temps en absence d'inactivation est la suivante :

$$I_{Ca_1} = I_{Ca_1\infty} (1 - e^{-t/\tau_m})^x \quad (5).$$

Puisqu'au potentiel HP = -70 mV, la valeur de la variable d'activation m d'origine est égale à 0 ($m_0 = 0$) et que la variable h est égale à 1 ($h_0 = 1$). Cela implique que la disponibilité du courant I_{Ca_1} est maximale à HP = -70 mV (HENČEK et ZACHAR, 1977).

De l'équation (5) il s'ensuit l'équation (6) donnée précédemment :

$$\text{Log} \left[1 - (I_{Ca} / I_{Ca\infty})^{1/x} \right] = -t/\tau_m.$$

La meilleure corrélation entre ces deux variables ($r = .9998$) est obtenue en donnant à x la valeur 6, l'ordonnée à l'origine étant dans ce cas

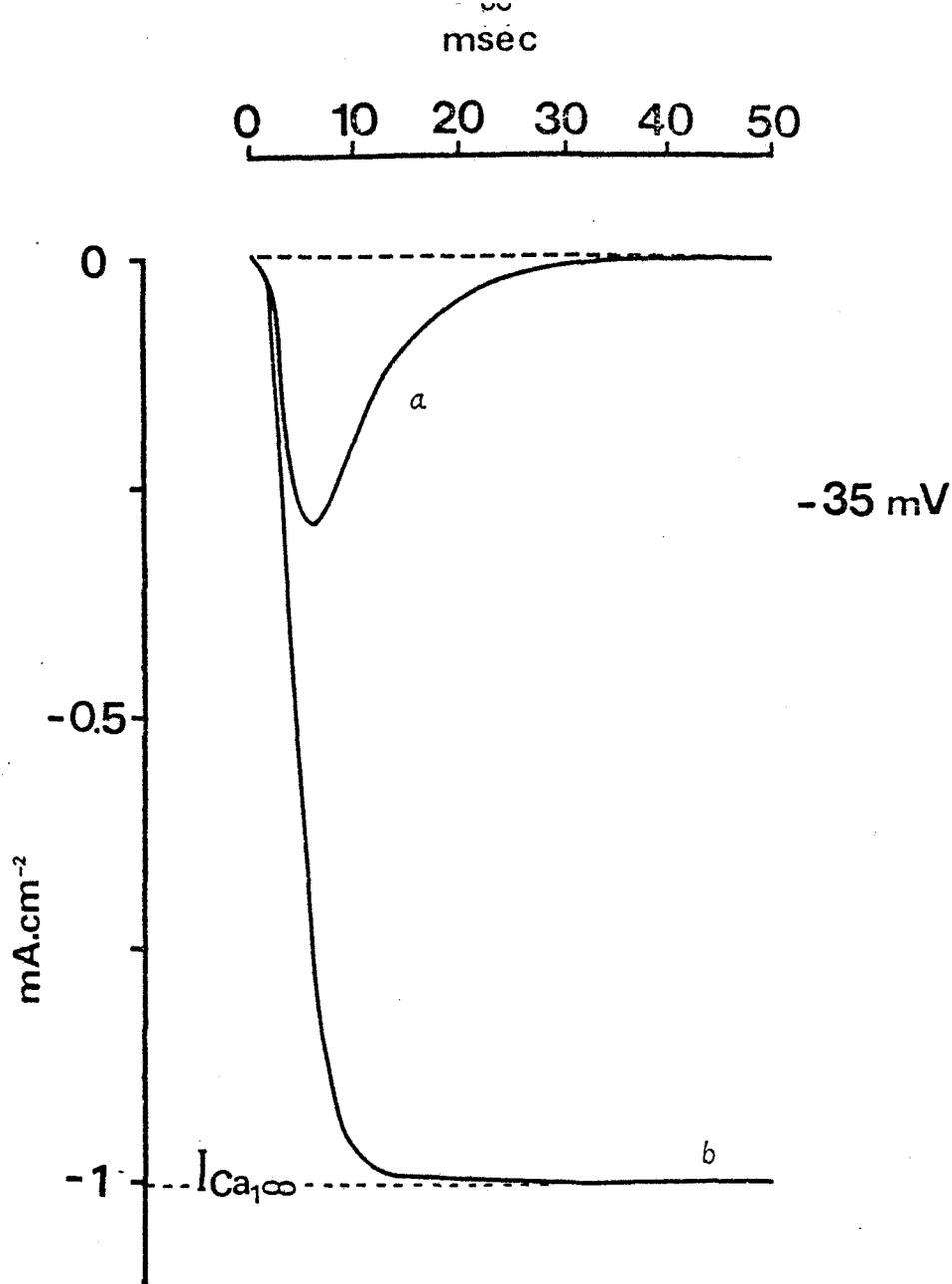


Figure 25 :

Evolution du courant de calcium (I_{Ca_1}) en fonction du temps pour une dépolarisation de + 35 mV ($E_i = -35$ mV) donnée à la figure 20.a (la constante de temps d'inactivation est de 6,32 msec). Le tracé b, qui correspondrait à l'évolution de a en absence d'inactivation, satisfait à l'équation suivante :

$$I_{Ca_1} = I_{Ca_1\infty} (1 - e^{-t/\tau_m})^x$$

puisque pour $HP = -70$ mV, la variable d'activation m_0 est égale à 0, $\tau_m = 1,99$ msec et $x = 6$.

nulle, alors que pour $x < 6$ l'ordonnée est positive et négative pour $x > 6$.

Ainsi, en accord avec HENČEK et ZACHAR, la relation $G_{Ca_1\infty}/\bar{G}_{Ca_1} = f(E_i)$ est identique à la relation $m_{\infty}^6 = f(E_i)$.

B/ Analyse de la conductance, G_{Ca_1} , au maximum de courant entrant ($G_{Ca_1}^$)*

Cette valeur de conductance $G_{Ca_1}^*$ ne rend pas compte, pour chaque niveau de potentiel, de la valeur vraie de $G_{Ca\infty}$ puisque est présent le phénomène d'inactivation.

La relation exprimant $(G_{Ca_1}^*/\bar{G}_{Ca_1}) = f(E_i)$ est présentée à la figure 26. Cette relation est sigmoïde et correspond très exactement à la relation $m_{\infty}^6 = f(E_i)$ qui peut être établie à partir des relations α_m, β_m fonction de E_i données par HENČEK et ZACHAR en 1977. Il est surprenant de constater que le rapport $G_{Ca_1}^*/\bar{G}_{Ca_1}$, pour chaque valeur de potentiel imposé, se trouve être égal au rapport $G_{Ca\infty}/\bar{G}_{Ca}$ c'est-à-dire m_{∞}^6 . En effet, $G_{Ca_1}^*$ correspond à la valeur de conductance au maximum de courant entrant I_{Ca_1} alors que $G_{Ca\infty}$ est la conductance qui serait atteinte en absence d'inactivation. De plus comme cela a été démontré, pour des potentiels E_i supérieurs ou égales à - 30 mV le courant I_{Ca} correspond à la somme de I_{Ca_2} et de I_{Ca_1} , ce dernier s'inactivant au cours du temps. Si la même équation peut rendre compte de la relation G_{Ca}^*/\bar{G}_{Ca} (dans nos conditions expérimentales) et m_{∞}^6 dans celle de HENČEK et ZACHAR (1977) en fonction de E_i , cela ne peut être que fortuit dans la mesure où, au potentiel - 35 mV, les valeurs de τ_m et de τ_h sont très différentes (respectivement 1,99 et 6,32 msec dans nos conditions contre 13,86 et 11,51 msec dans celles de HENČEK et ZACHAR). Cependant ces différences peuvent être expliquées en particulier à la lumière des travaux récents de HAGIWARA

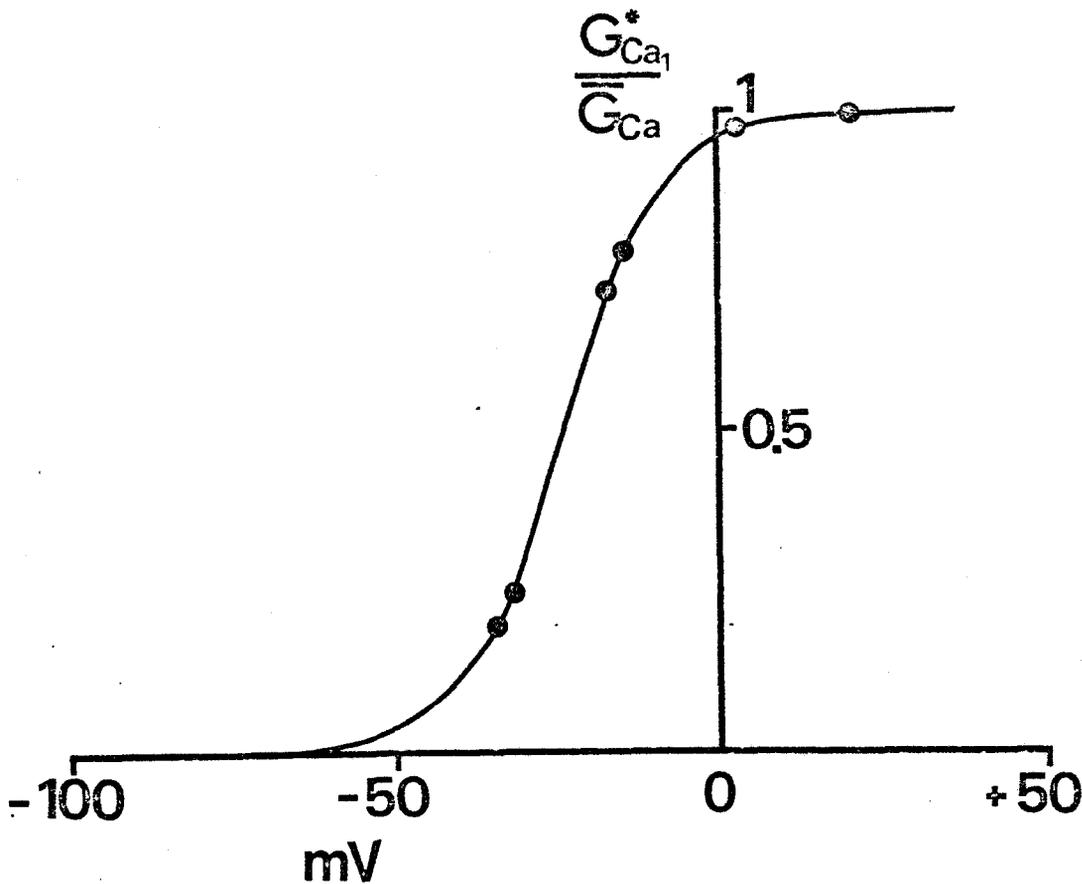


Figure 26 :

Relation entre le potentiel de membrane et le rapport $G_{Ca_1}^*/\bar{G}_{Ca}$ déterminé à partir des enregistrements de courant et de potentiel de la figure 20. $G_{Ca_1}^*$ est la conductance calcique correspondant au courant I_{Ca} mesuré au maximum entrant. \bar{G}_{Ca} est la conductance maximale atteinte, sa valeur est de $2,9 \text{ mS.cm}^{-2}$.

La courbe de cette figure a été tracée à partir des équations proposées par HENČEK et ZACHAR (1977) donnant les valeurs de α_m et β_m en fonction du potentiel.

Il est surprenant de constater que la relation liant le rapport $G_{Ca_1}^*/\bar{G}_{Ca}$ à E_i , c'est-à-dire $\left(\frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}\right)^6$ à E_i , est identique au rapport $G_{Ca_1}^*/\bar{G}_{Ca}$ qui est déterminé dans nos conditions expérimentales.

et OHMORI (1982) qui montrent que la valeur de τ_m dépend de la concentration extracellulaire en cations divalents. En effet au niveau des cellules pituitaires, la constante τ_m est, pour de faibles dépolarisations imposées, considérablement augmentée quand la concentration extracellulaire en cations divalents est elle même augmentée (voir leur figure 5 p. 242). Ainsi la différence de valeur de τ_m au potentiel - 35 mV (figure 25 et les données de HENČEK et ZACHAR, 1977) peut être expliquée dans la mesure où, dans nos conditions expérimentales, la concentration externe de calcium est réduite de 80% par rapport à sa valeur normale.

γ/ Conclusion

En dépit de l'impossibilité de déterminer les constantes de temps τ_m et de τ_h de I_{Ca_1} pour plusieurs niveaux de dépolarisation et donc de l'impossibilité de traduire la relation liant m_∞^6 au potentiel du fait qu'à un potentiel imposé supérieur à - 30 mV le courant de calcium correspond à la somme de I_{Ca_1} et de I_{Ca_2} , il est cependant important de mentionner que, selon toute vraisemblance l'ouverture des canaux calciques correspondant à G_{Ca_1} implique au niveau de chaque canal le déplacement de 6 particules en accord avec les résultats de HENČEK et ZACHAR (1977). Il est aussi important de mentionner la difficulté d'analyse de la conductance calcique puisqu'elle correspond (en accord avec ZHRADNIK et ZACHAR, 1982) à deux populations de canaux calciques. Enfin, les cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi que les potentiels seuils différents d'activation de I_{Ca_1} et de I_{Ca_2} pourraient traduire en première analyse (en prenant en compte non plus deux mais une population homogène de canaux calciques) une inactivation du courant de calcium qui dépendrait non pas du voltage mais de la quantité

d'ions Ca^{2+} qui entre dans la fibre. En effet la courbe de disponibilité de la conductance calcique en fonction du potentiel ne décrirait pas une courbe sigmoïde mais une relation présentant un pourcentage de disponibilité de conductance calcique qui diminuerait pour, par la suite, augmenter en fonction du potentiel.



PRINCIPAUX RESULTATS

ET

CONCLUSION GENERALE

Le but du travail présenté était d'étudier le courant entrant (I_{Ca}) et la conductance (G_{Ca}) membranaire aux ions Ca^{2+} de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement par ZHRADNIK et ZACHAR (1982) sur la même préparation. Ces auteurs montrent que le courant de calcium présente deux composantes reflétant l'existence de deux populations de canaux calciques.

La diversité des caractéristiques fondamentales en particulier électrophysiologiques des canaux calciques, décrits par de nombreux auteurs (voir revue de questions de HAGIWARA et BYERLY, 1981), suppose que d'une préparation à une autre et qu'au niveau d'une même préparation il existe différents types de canaux calciques qui peuvent correspondre à des structures moléculaires différentes à moins que les différences de fonctionnement de ces canaux ne soient dans certains cas qu'apparentes du fait des difficultés techniques d'analyse de la conductance membranaire aux ions calcium. En effet de nombreux problèmes surgissent lorsque l'on désire étudier le fonctionnement de ces canaux calciques du fait de :

- leur localisation au niveau du système membranaire profond ;
- la présence des oscillations du courant de membrane attribuées à l'interférence des courants membranaires de surface et tubulaire et/ou à une mauvaise imposition du potentiel au niveau de la membrane tubulaire ;
- la difficulté d'inhiber totalement le courant sortant ;
- l'existence d'un fort gradient de concentration des ions Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane.

Dans le but de minimiser ces différents problèmes il a été nécessaire de trouver les conditions ioniques les plus favorables permettant de supprimer tous les courants dynamiques (qui dépendent du potentiel et du temps)

à l'exception du courant I_{Ca} , et ainsi de supprimer les oscillations du courant membranaire qui apparaissent dans les conditions physiologiques normales quelle que soit la technique de potentiel imposé utilisée : *patch clamp* (HENČEK et al., 1978) ; technique dérivée de celle de HODGKIN-HUXLEY (KEYNES et al., 1973) ; technique des 3 microélectrodes (BERTRAND et al., 1979). En effet, la fibre musculaire d'écrevisse présente un système tubulaire transverse très développé et d'importantes invaginations du sarcolemme. Ces caractéristiques ultrastructurales en font une préparation particulièrement propice aux phénomènes d'accumulation et de "déplétion" d'ions aux faces des membranes, ce qui retentit inévitablement sur l'amplitude du courant entrant de calcium par le biais de la variation de valeur de la pile d'équilibre aux ions Ca^{2+} .

A l'aide de la technique de potentiel imposé d'ADRIAN et al. (1970) il est possible d'obtenir, pour la fibre musculaire d'écrevisse, l'évolution du courant de calcium en fonction du potentiel et du temps en éliminant les phénomènes de rectification et en diminuant le gradient de concentration des ions Ca^{2+} .

A - LES PHENOMENES DE RECTIFICATION

Les protocoles expérimentaux généralement utilisés pour déterminer la nature ionique du courant de rectification et par là inhiber ce courant sont les suivants : *i) variation de la concentration ionique extracellulaire de l'ion supposé porter le courant de rectification ; ii) utilisation d'inhibiteurs spécifiques de perméabilité.* Les résultats obtenus sur la fibre d'écrevisse conduisent à la conclusion suivante :

- le courant entrant de rectification n'est pas, comme sur la fibre de Vertébré ou l'oeuf d'étoile de mer, porté par les ions K^+ mais par

les ions Cl^- ;

les ions TEA^+ ou Cs^+ inhibent pour seulement une large part le courant sortant retardé ; la composante de ce courant sortant qui résiste à ces inhibiteurs de perméabilité potassique disparaît en présence de procaïne.

1) variation extracellulaire de K^+ ou Cl^-

La diminution importante (90%) de la concentration extracellulaire de K^+ est sans effet sur la rectification dans le sens entrant si ce n'est un déplacement de la relation courant-potentiel d'une amplitude égale au déplacement du potentiel de repos dans le sens des hyperpolarisations. A l'inverse en milieu pauvre en ions Cl^- ($1/10^{\text{ème}}$ de la concentration normale) la rectification dans le sens entrant disparaît. Ainsi l'absence d'effet des ions TEA^+ ou Cs^+ et la disparition du courant entrant de rectification quand les ions Cl^- extracellulaires sont remplacés par les ions méthylsulfate amènent à penser que le courant entrant activé lors des hyperpolarisations membranaires de la fibre musculaire d'écrevisse est porté par les ions Cl^- , comme ce courant l'est également sur l'organe électrique de Torpille (WHITE et MILLER, 1979 ; MILLER et WHITE, 1980) et sur les neurones d'Aplysie (CHESNOY-MARCHAIS, 1982 ; 1983).

2) Effet de l'acide niflumique (AN)

Cette substance amphiphile, connue pour bloquer le mécanisme d'échange $\text{HCO}_3^- - \text{Cl}^-$ au niveau de la membrane de globule rouge (COUSIN et MOTAIS, 1979 ; 1982), entraîne aussi à la concentration de 10^{-6}M sur la fibre d'écrevisse la suppression du courant de rectification. L'ampleur de cette inhibition est fonction de la concentration de l'AN. La constante apparente de AN (K_D) est de 6.10^{-8}M , valeur ainsi très proche de celle déterminée par COUSIN et MOTAIS

(1979 ; 1982) pour la membrane érythrocytaire. Enfin l'absence d'effet de cette substance amphiphile à $10^{-6}M$ sur le noeud de Ranvier (CORBIER et DUBOIS, 1983) où il n'existe pas de courant dynamique de Cl^{-} fonction du potentiel et du temps et le blocage de la rectification de sens entrant de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse conforte l'hypothèse relative à l'existence d'un courant entrant porté par les ions Cl^{-} activé lors d'hyperpolarisations membranaires sur cette dernière préparation.

B - ETUDE DE LA CONDUCTANCE CALCIQUE

1) Obtention du courant I_{Ca}

En absence de procaïne le courant I_{Ca} est associé à une composante du courant sortant non bloqué par les ions TEA^{+} ou Cs^{+} . Cette composante qui résiste aux inhibiteurs de perméabilité potassique s'active comme pour la fibre de balane (HAGIWARA et al., 1969) pour une valeur seuil de potentiel de - 10 mV. C'est l'existence de ce courant sortant associé au courant de calcium qui explique la faible valeur (+ 30 mV) du potentiel d'inversion de I_{Ca} (E_{Ca}) et l'absence de rectification de ce courant I_{Ca} au voisinage du potentiel E_{Ca} . Par contre, en présence de procaïne, comme sur la fibre de balane, la suppression du courant sortant qui résiste aux ions TEA^{+} conduit à la détermination d'un potentiel d'inversion de I_{Ca} de + 65 mV, valeur proche de celle attendue pour le potentiel de la pile d'équilibre aux ions Ca^{2+} .

De plus le courant I_{Ca} au voisinage du potentiel E_{Ca} présente une très forte rectification comme le montre ASHCROFT et STANFIELD (1982 a) pour la fibre musculaire d'insecte. En outre la procaïne entraîne une réduction de 70 % de la conductance calcique par rapport à la valeur estimée par HENČEK et ZACHAR (1977) sur la même préparation et par KEYNES et al. (1973)

sur la fibre de balane. Cette réduction importante de G_{Ca} par rapport à la valeur estimée par ces auteurs est probablement due à l'élimination d'un système membranaire profond dans la mesure où cet anesthésique local élimine dans les mêmes proportions le courant capacitif et le courant stationnaire. Ainsi, la procaïne et la tétracaïne (HUI, 1983 a et b) agiraient à la jonction entre le système tubulaire transverse et le réticulum sarcoplasmique en empêchant le signal électrique d'atteindre la membrane réticulaire sans qu'il soit pour autant nécessaire de rejeter l'hypothèse selon laquelle la procaïne exerce un effet direct sur la membrane réticulaire (voir figure 27). En conséquence, il pourrait y avoir en accord avec NAKAJIMA et ENDO (1973), THORENS et ENDO (1975) et MATSUBARA et al. (1977) un couplage de type "depolarization induced- Ca^{2+} -release" entre le système tubulaire transverse et le réticulum sarcoplasmique de la fibre musculaire d'écrevisse.

2) Mise en évidence de deux courants entrants de calcium (I_{Ca_1} et I_{Ca_2})

L'examen de la cinétique du courant entrant de calcium pour différents niveaux de dépolarisation montre qu'en partant de l'existence d'un seul courant I_{Ca} selon HENCEK et ZACHAR (1977), ni l'inactivation dépendant du voltage, ni celle relative à l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule ne rendent compte de l'ensemble des tracés que nous avons obtenus. Par contre en accord avec ZHRADNIK et ZACHAR (1982) l'existence de deux composantes du courant entrant de calcium, correspondant à deux populations de canaux calciques, peut rendre compte de l'évolution de I_{Ca} pour les différents niveaux de potentiel testés :

i) La composante I_{Ca_1} s'active au seuil de potentiel de - 40 mV ; son inactivation dépendrait du voltage. L'activation des canaux calciques corres-

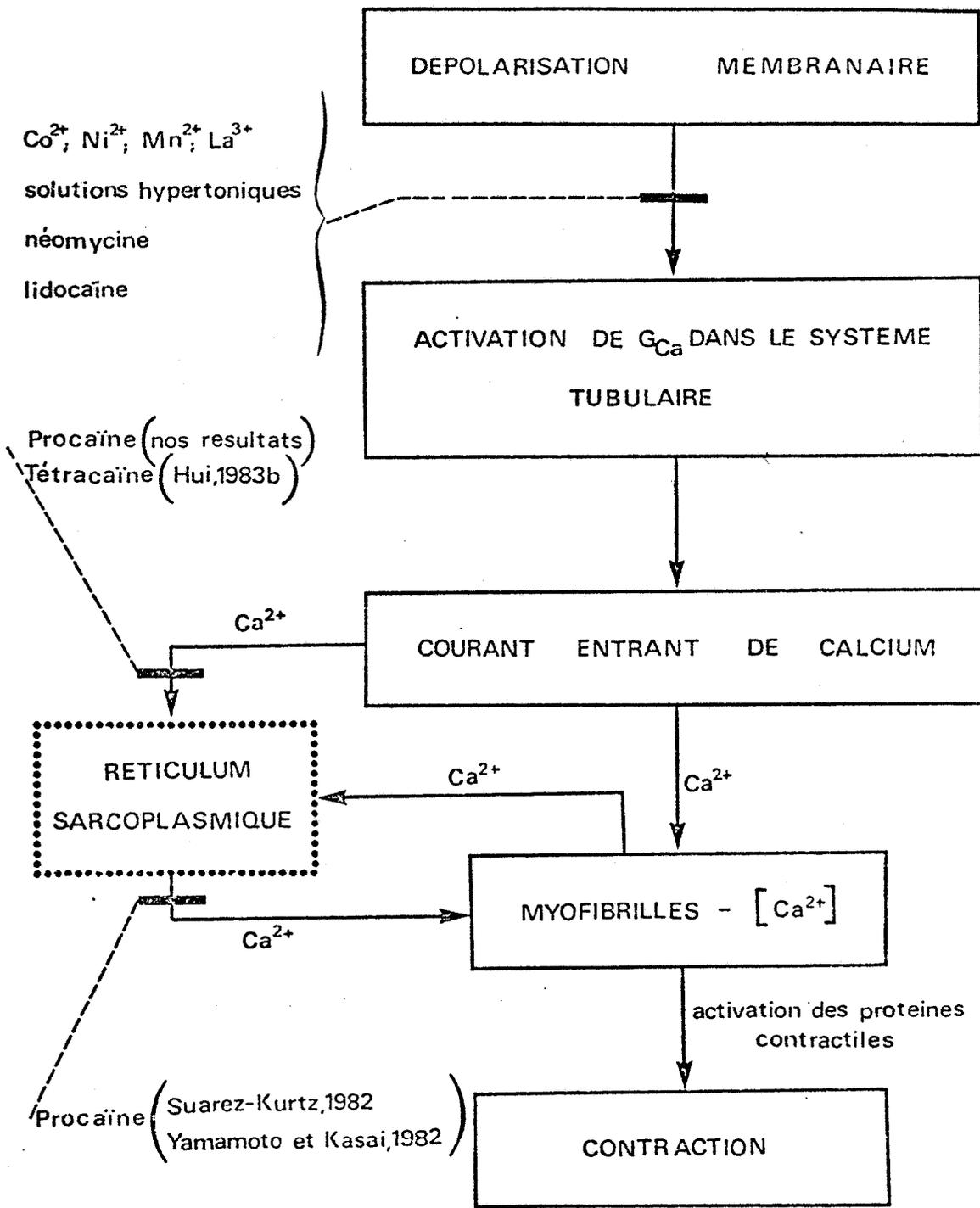


Figure 27 :

Sites possibles d'action de la procaine.

pondant à I_{Ca_1} nécessite le déplacement de 6 particules pour chaque canal ($X = 6$). L'analyse de la conductance G_{Ca_1} en fonction du potentiel ne peut être complète dans la mesure où, pour les potentiels peu négatifs ou positifs, la composante de courant I_{Ca_1} est associée à la deuxième composante I_{Ca_2} ;

ii) La deuxième composante I_{Ca_2} dont le potentiel seuil d'activation est de l'ordre de - 30 mV, ne présente pas ou peu d'inactivation. Cette composante peut être enregistrée sans celle correspondant à I_{Ca_1} puisque cette dernière peut être inhibée par une prédépolarisation conditionnante ; ainsi en absence de I_{Ca_1} , la cinétique d'activation de I_{Ca_2} permet de démontrer que deux particules sont impliquées dans l'ouverture des canaux calciques correspondant à G_{Ca_2} .

La relation liant le rapport $G_{Ca_2^\infty}/G_{Ca_2}$ en fonction du potentiel (E_j) (ce qui correspond à la relation $m_\infty^2 = f(E_j)$) est de forme sigmoïde ; la valeur maximale de m_∞^2 étant atteinte pour $E_j = + 30$ mV.

C - CONCLUSION

L'analyse bibliographique relative aux résultats des différents auteurs concernant en particulier le nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux calciques (voir tableau II) révèle une possible différence de structure moléculaire des canaux calciques. En ce qui concerne la fibre musculaire d'écrevisse, la technique de *patch clamp* utilisé par HENCEK et ZACHAR (1977), ZHARADNIK et ZACHAR (1982) et celle des trois microélectrodes que nous avons utilisées dans des conditions ioniques très particulières conduisent aux mêmes résultats et autorisent à émettre l'hypothèse selon laquelle il existerait deux composantes de courant entrant de calcium correspondant à deux populations de canaux calciques.



PREPARATIONS	Valeur de X	AUTEURS	CONDITIONS D'EXPERIENCE
Fibres musculaires squelettiques :			
<i>crabe</i>	2	MOUNIER et VASSORT, 1975	Ext. TEA ⁺
<i>écrevisse</i>	6	HENČEK et ZACHAR, 1977	Correction du courant (sans inactivation)
<i>insecte</i>	3	ASHCROFT et STANFIELD 1982 b	
Axone de Calmar	5	LLINAS et al., 1976	
Neurones d'Escargot			
1) <i>Limnea</i>	2	KOSTYUK et al., 1977	Int. Tris ⁺
2) <i>Helix pomatia</i>	2	KOSTYUK et al., 1979	Int. Tris ⁺ ; à 6,5°C
	3	MAGURA , 1977	Correction du courant Courant Ba, ext-TEA ⁺
3) <i>Helix aspera</i>	1 ou 2	AKAIKE et al., 1978 b	Int. Cs ⁺
Neurones d'Aplysie	1 ou 2	ADAMS et GAGE, 1979 a	Ext. TEA ⁺
Cellules pituitaires	2	HAGIWARA et OHMORI, 1982	Int. TEA ⁺

TABLEAU II

RESUME

L'étude de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} de la fibre musculaire squelettique d'écrevisse que nous venons de présenter s'intègre dans un travail d'ensemble visant à expliquer le couplage excitation-contraction des fibres musculaires de crustacés tout en apportant un nouvel éclairage sur le fonctionnement des ionophores aux ions Ca^{2+} .

Pour l'étude de la conductance aux ions Ca^{2+} , il a été nécessaire de rechercher les meilleures conditions pour extraire du courant de membrane global, le courant porté par les ions Ca^{2+} . Les courants de rectification ont pu être inhibés en ajoutant au milieu de référence pauvre en Ca^{2+} (1/5 ème de la concentration normale) d'une part l'acide niflumique (10^{-3} mM) qui bloque le courant de sens entrant et d'autre part les ions TEA^+ (60 mM) associés à la procaïne (2 mM) qui bloquent le courant sortant de rectification.

Ces résultats portant sur les phénomènes de rectification montrent que :

- i)- le courant de sens entrant activé lors d'hyperpolarisations membranaires est porté non par les ions K^+ comme sur les fibres de vertébrés, mais par les ions Cl^- ;
- ii)- le courant de sens sortant activé lors de dépolarisations membranaires est porté pour une très large part, comme sur les fibres de vertébrés, par les ions K^+ ; la part qui résiste aux ions TEA^+ ou Cs^+ disparaît sous l'action de la procaïne.

La diminution d'environ 70% des valeurs de la conductance de fuite, de la conductance maximale aux ions Ca^{2+} et de la capacité membranaire sous l'action de la procaïne conduit à émettre l'hypothèse de la soustraction à l'analyse électrophysiologique par cet anesthésique local d'une structure membranaire profonde. On est tenté de supposer que ce système membranaire correspond au réticulum sarcoplas-

mique dans la mesure où d'une part MATHIAS et al. (1980) décrivent une conductance $g(x)$ (qui dépend du potentiel) entre le réticulum sarcoplasmique et le système tubulaire transverse et où d'autre part HUI (1983b) montre au niveau de la fibre musculaire de grenouille qu'un transfert de charges impliquées dans le couplage excitation-contraction, disparaît sous l'effet d'un homologue de la procaïne : la tétracaïne.

En présence de procaïne et ayant bloqué les courants de rectification, il a été possible de mettre en évidence deux composantes du courant I_{Ca} (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) :

i) I_{Ca_1} s'activant pour un seuil de potentiel voisin de - 40 mV ; son inactivation dépendrait du voltage ; l'activation du canal calcique correspondant à ce courant I_{Ca_1} nécessite le déplacement de 6 particules ($x=6$) ;

ii) I_{Ca_2} dont le seuil de potentiel d'activation est de l'ordre de - 30 mV, ne présente pas ou peu d'inactivation. Cette composante peut être analysée en absence de I_{Ca_1} inhibé par une préimpulsion dépolarisante. Dans ces conditions, l'analyse de I_{Ca_2} montre que 2 particules seulement sont impliquées dans l'activation du canal correspondant à I_{Ca_2} .

Ainsi l'existence de deux populations de canaux calciques ayant des caractéristiques d'activation et d'inactivation très différentes peut être à l'origine de la controverse qui apparaît au vu de l'analyse des résultats des différents auteurs. Cette diversité de fonctionnement des canaux calciques par rapport aux canaux sodiques qui présentent une "structure moléculaire" presque homogène traduit peut être une évolution plus poussée de ces canaux à partir d'un état plus primitif.

ANNEXE

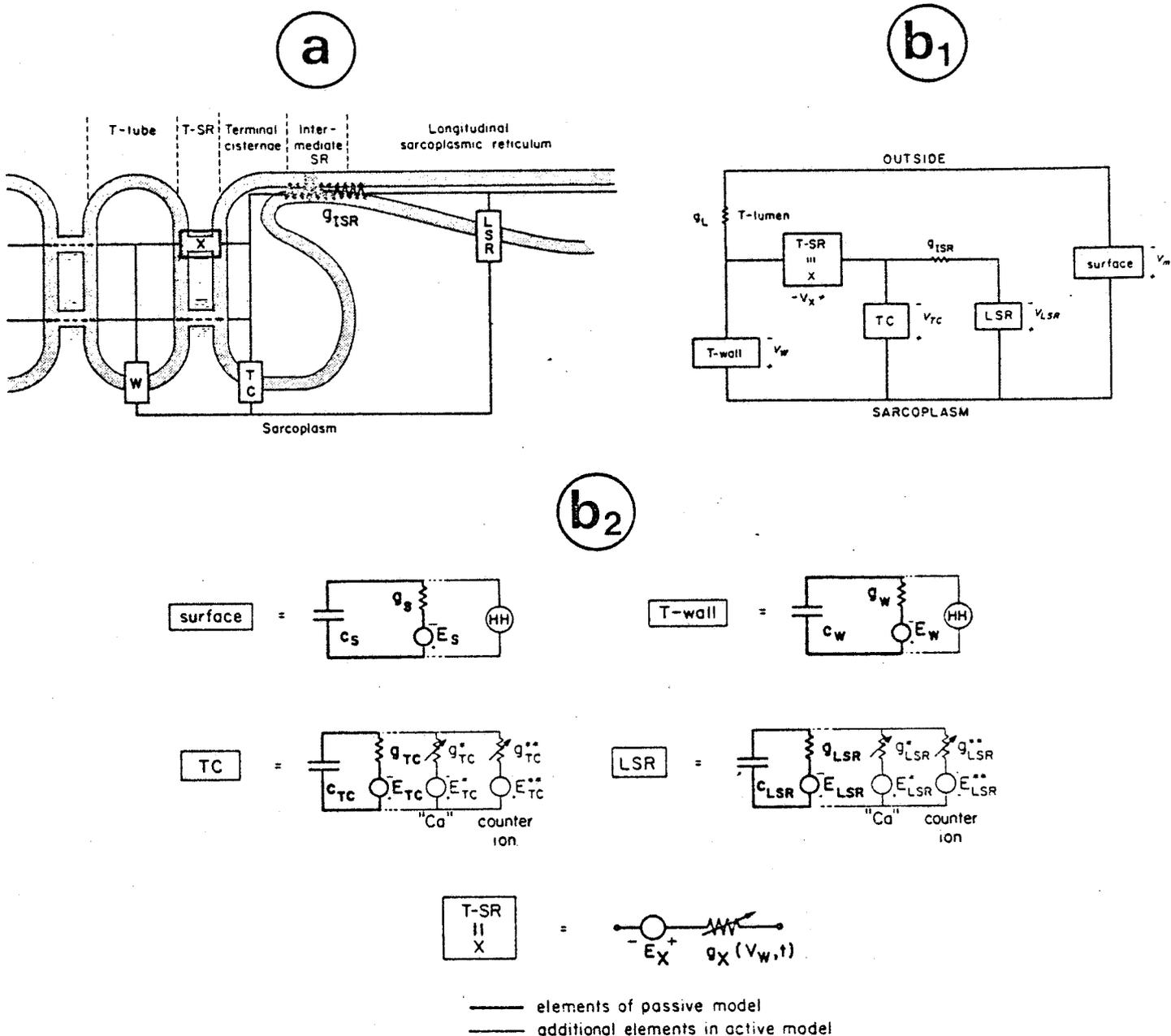


Figure 28 : a - circuit membranaire du modèle. Schéma membranaire représentant la membrane tubulaire (W) en relation avec la citerne terminale (TC) et le réticulum sarcoplasmique longitudinale (LSR). X est la conductance entre W et TC. b₁ et b₂ - Descriptions des différents circuits membranaires équivalents au schéma présenté en a. Chaque membrane est représentée par une capacité fixe (indépendante de potentiel) en parallèle avec les canaux ioniques représentés dans le modèle d'"éléments passifs" par une conductance en série avec une pile. Dans le modèle d'"éléments actifs", une conductance aux ions Ca²⁺ et celle d'une autre espèce ionique sont localisées dans les membranes de la citerne et du RS longitudinal. Les cercles notés HH, représentent les conductances g_{Na} et g_K qui n'interviennent que lors du potentiel d'action. (D'après MATHIAS et al. 1980).

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, D.J., GAGE, P.W. (1979).
Characteristics of sodium and calcium conductance produced by membrane depolarization in *Aplysia* neurone.
J. Physiol., London, 289, 141-161.
- ADRIAN, R.H. (1964).
The rubidium and potassium permeability of frog muscle membrane.
J. Physiol., London, 175, 134-159.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. (1970).
Voltage clamp experiments in striated muscle fibers.
J. Physiol., London, 208, 607-644.
- AKAIKE, N., LEE, K.S., BROWN, A.M. (1978).
The calcium current of *Helix* neuron.
J. Gen. Physiol., 71, 509-531.
- ALMERS, W., FINK, R., PALADE, P.T. (1981).
Calcium depletion in muscle tubules : the decline of calcium current under maintained depolarization.
J. Physiol., London, 312, 177-207.
- ANDERSON, M. (1979).
 Mn^{2+} ions pass through Ca^{2+} channels in myoepithelial cells.
J. exp. Biol., 82, 227-238.
- ANDERSON, M., CASTILLO, J. (1976).
Electrical activity of the proventriculus of the polychaete worm *Syllis spongiphila*.
J. exp. Biol., 64, 691-710.
- ANDERSON, M., MOROSE, H. (1978).
Chemical excitation of the proventriculus of the polychaete worm *Syllis spongiphila*.
J. exp. Biol., 75, 113-122.
- ASHCROFT, F.M. (1981).
Calcium-dependent action potentials in skeletal muscle fibres of the stick insect, *Carausius morosus*.
J. exp. Biol., 93, 257-267.

- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1980).
Inactivation of calcium currents in skeletal muscle fibres of
an insect depends on calcium entry.
J. Physiol., London, 308, 36 P.
- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1982 a).
Calcium and potassium currents in muscle fibres of an Insect
(*Carausius morosus*).
J. Physiol., London, 323, 93-115.
- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1982 b).
Calcium inactivation in skeletal muscle fibres of the stick insect
Carausius morosus.
J. Physiol., London, 330, 349-372.
- ATWOOD, H.L. (1963).
Differences in muscle fibre properties as a factor in "fast" and "slow"
contraction in *Carcinus*.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 17-32.
- ATWOOD, H.L. (1965).
Excitation and inhibition in crab muscle fibres.
Comp. Biochem. Physiol., 16, 409-426.
- BAKERT, P.F., RINK, T.J. (1975).
Catecholamine release from bovine adrenal medulla in response
to maintained depolarization.
J. Physiol., London, 253, 593-620.
- BEELEER, G.W., REUTER, H. (1970).
The relation between membrane potential, membrane currents, and
activation of contraction in ventricular myocardial fibres.
J. Physiol., London, 207, 211-229.
- BERTRAND, F., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1979).
Experiences 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.
- BRANDT, P.W., REUBEN, J.P., GIRARDIER, L., GRUNDFEST, H. (1965).
Correlated morphological and physiological studies on isolated single
muscle fibres. I. Fine structure of the crayfish muscle fiber.
J. Cell. Biol., 25, 233-261.
- BREHM, P., ECKERT, R. (1978).
Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in
Paramecium.
Science N. Y., 202, 1203-1206.

- BROCKLEHURST, L. (1975).
Dantrolène sodium and "skinned" muscle fibers.
Nature, London, 254, 364.
- BROWN, A.M., MORIMOTO, K., TSUDA, Y., WILSON, D.L. (1981).
Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of
calcium channels in *Helix aspersa*.
J. Physiol., London, 320, 193-218.
- BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1976).
Delayed rectification in the skeletal muscle fiber of the crab.
J. Physiol., London, 263, 251-252.
- 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.
- BRULE, G., HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1983a)
Ionic nature of the outward-going rectification in crab skeletal
muscle fibres.
Gen. Physiol. Biophys., 2, 137-151.
- BRULE, G., HAUDECOEUR, G., JDAIAA, H., GUILBAULT, P. (1983b)
Inhibition par une substance amphiphile : l'acide niflumique de la
rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire de
Crustacé.
Arch. Inter. Physiol. Biochim., sous presse.
- CAPUTO, C. (1968).
Volume and Twitch tension changes in single muscle fibers in
hypertonic solutions.
J. Gen. Physiol., 52, 793-809.
- CAPUTO, C. (1976).
The effects of caffeine and tetracaine on the time course of
potassium contractures of single muscle fibres.
J. Physiol., London, 255, 191-207.

- CAPUTO, C., DIPOLO, R. (1978).
Contractile activation phenomena in voltage-clamped barnacle muscle fiber.
J. gen. Physiol., 71, 461-488.
- CASTEELS, R., KITAMURA, H., KURIYAMA, H., SUZUKI, H. (1977).
The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery.
J. Physiol., London, 271, 41-61.
- CHESNOY-MARCHAIS, D. (1982).
A Cl^- conductance activated by hyperpolarization in Aplysia neurones.
Nature, London, 299, 359-361.
- CHESNOY-MARCHAIS, D. (1983).
Characterization of a chloride conductance activated by hyperpolarization in Aplysia neurones.
J. Physiol., London, 342, 277-308.
- CHIARANDINI, D.J., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1970).
Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. I. Activation of contraction and induction of Ca-spike electrogenesis.
J. Gen., Physiol., 55, 640-664.
- COLQUHOUN, D., NEHER, E., REUTER, H., STEVENS, C.F. (1981).
Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells.
Nature, London, 294, 752-754.
- CONSTANTI, A., GALVAN, M. (1983).
Fast inward rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones.
J. Physiol., London, 335, 153-178.
- CORBIER, A., DUBOIS, J.M. (1983).
Two transient Na currents in the frog node of Ranvier.
J. Physiol. London, 345, 79 p.

COUSIN, J.L., MOTAIS, R. (1979).

Modification de la perméabilité des membranes biologiques par des composés amphiphiles d'intérêt pharmacologique.
Colloques nationaux du CNRS. N° 938, Physicochimie des composés amphiphiles, p. 243.

COUSIN, J.L., MOTAIS, R. (1982).

Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. II. Chemical properties of the flufenamate-binding site on the band 3 protein.
Biochim. Biophys. Acta , 687, 156-164.

DEITMER, J.W. (1983).

Ca channels in the membrane of the hypotrich ciliate *Stylonychia*.
Physiol. Excit. Cel., 51-63.

DELORME, P., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. 1978).

Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
J. Physiol., Paris, 74, 387-407.

DIFRANCESCO, D. (1981).

A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres.
J. Physiol., London, 314, 377-393.

DIFRANCESCO, D. (1982).

Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres : effects of potassium, caesium and rubidium.
J. Physiol., London, 329, 485-507.

DIFRANCESCO, D., OJEDA, C. (1980).

Properties of the current I_f in the sino-atrial node of the rabbit composed with those of the current I_{K_2} in Purkinje fibres.
J. Physiol., London, 308, 353-367.

- ECKERT, R. (1972).
Bioelectric control of ciliary activity.
Science N.Y., 176, 473-481.
- EISENBERG, R.S. (1967).
The equivalent circuit of single crab muscle fibers as determined
by impedance measurements with intracellular electrodes.
J. Gen. Physiol., 50, 1785-1806.
- ENDO, M. (1977).
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.
Physiol. Rev., 57, 71-108.
- FAHRENBACH, W.H. (1967).
The fine structure of fast and slow crustacean muscles.
J. Cell. Biol., 35, 69-79.
- FATT, P., GINSBORG, B.L. (1958).
The ionic requirements for the production of action potentials
in crustacean muscle fibres.
J. Physiol., London, 142, 516-543.
- FEINSTEIN, M.B. (1963).
Inhibition of caffeine rigor and radiocalcium movements by local
anesthetics in frog sartorius muscle.
J. Gen. Physiol., 47, 151-172.
- 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.
Jpn. J. Physiol., 27, 215-224.
- 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.

- GORMAN, A.L.F., HERMANN, A. (1979).
Internal effects of divalent cations on potassium permeability
in molluscan neurones.
J. Physiol., London, 296, 393-410.
- HAGIWARA, S., BYERLY, L. (1981).
Calcium channel.
Ann. Rev. Neurosci., 4, 69-125.
- HAGIWARA, S., HAYASHI, H., TAKAHASHI, K. (1969).
Calcium and potassium currents of the membrane of a barnacle
muscle fiber in relation to the calcium spike.
J. Physiol., London, 205, 115-129.
- 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.
- HAGIWARA, S., OHMORI, H. (1982).
Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with
patch electrode voltage clamp.
J. Physiol., London, 331, 231-252.
- HAGIWARA, S., HAKA, K. (1964).
The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under
low intracellular Ca^{2+} .
J. Gen. Physiol., 48, 141-162.
- HAGIWARA, S., OZAWA, S., SAND, O. (1975).
Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the
egg cell membrane of a starfish.
J. Gen. Physiol., 65, 617-644.

- HAGIWARA, S., TAKAHASHI, K. (1967).
Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane.
J. Gen. Physiol., 50, 583-601.
- HARA, Y., KITAMURA, K., KURIYAMA, H. (1980).
Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig.
Br. J. Pharmacol., 68, 99-101.
- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974 a).
Etude des phénomènes de rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe (*Carcinus maenas*).
C.R. Acad. Sci., Paris, 278, 2457-2460.
- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974 b).
Effets du TEA sur la rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe étudiée dans les conditions de courant imposé en présence d'ions chlorure.
C.R. Sci., Paris, 279, 175-178.
- HENCEK, M., ZACHAR, J. (1977).
Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish.
J. Physiol., London, 268, 51-71.
- HENCEK, M., ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. (1978).
Membrane currents in a calcium type muscle membrane under voltage clamp.
Physiologia bohemoslov., 27, 457.
- HEYER, C.B., LUX, H.D. (1976).
Control of the delayed outward potassium currents in bursting pacemaker neurones of the snail, *Helix pomatia*.
J. Physiol., London, 262, 349-382.
- HILLE, B. (1967).
The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ions.
J. Gen. Physiol., 50, 1287-1302.

- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. (1952).
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation-contraction in nerve.
J. Physiol., London, 117, 500-544.
- HOYLE, G. et SMYTH, T. Jr. (1963).
Neuromuscular physiology of giant muscle fibers of a barnacle, *Balanus nubilus* Darwin.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 291-314.
- HUI, C.S. (1983 a).
Differential properties of two charge components in frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 337, 531-552.
- HUI, C.S. (1983 b).
Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 337, 509-529.
- HUTTER, O.F., WARNER, A.E. (1972).
The voltage dependence of the chloride conductance of frog muscle.
J. Physiol., London, 227, 275-290.
- 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.
- IMAIZUMI, Y., WATANABE, M. (1982).
Effect of procaine on potassium permeability of canine tracheal smooth muscle.
Pflügers Arch., 394, 144-149.
- ISENBERG, G. (1976).
Cardiac Purkinje fibers : cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents.
Pflügers Arch., 365, 99-106.
- ITO, Y., SUZUKI, H., KURIYAMA, H. (1977).
Effect of caffeine and procaine on the membrane and mechanical properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery.
Jpn. J. Physiol., 27, 467-481.

- JACOBS, A., KEATINGE, W.R. (1974).
Effects of procaine and lignocaine on electrical and mechanical activity of smooth muscle of sheep carotid arteries.
Br. J. Pharmacol., 51, 405-411.
- JAIMOVICH, E., CHICHEPORTICHE, R., LOMBET, A., LAZDUNSKI, M., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O. (1983).
Differences in the properties of Na⁺ channels in muscle surface and T-tubular membranes revealed by tetrodotoxin derivatives.
Pflügers Arch., 397, 1-5.
- KATZ, B. (1949).
Les constantes électriques de la membrane de muscle.
Arch. Sci. Physiol., 3, 285-300.
- 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.
- KOSTYUK, P.G. (1980).
Calcium ionic channels in electrically excitable membrane.
Neuroscience, 5, 945-960.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 a).
Outward currents in isolated snail neurones. I. Inactivation kinetics.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 259-263.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 b).
Outward currents in isolated snail neurones. II. Effect of TEA.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 265-268.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 c).
Outward currents in isolated snail neurones. III Effect of verapamil.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 269-274.

- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., PIDOPLICHKO, V.I., SHAKHOVALOV, Y.A. (1979).
Kinetics of calcium inward current activation.
J. Gen. Physiol., 73, 675-677.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., SHAKHOVALOV, Y.A. (1977).
Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane
of mollusc neurones.
J. Physiol., London, 270, 545-568.
- KURIHARA, S. (1975).
The effect of procaine on the mechanical and electrical activities
of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder.
Jpn. J. Physiol., 25, 775-788.
- KURIHARA, S., SAKAI, T. (1976).
Relationship between effects of procaine and Ca on spontaneous
electrical and mechanical activities of the smooth muscle cells
of the guinea pig urinary bladder.
Jpn. J. Physiol., 26, 487-501.
- LEA, T.J., ASHLEY, C.C. (1981).
Carbon dioxide or bicarbonate ions release Ca^{2+} from internal
stores in crustacean myofibrillar bundles.
J. Membr. Biol., 62, 115-125.
- LLINAS, R., HESS, R. (1976).
Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells.
Proc. natl. Acad. Sci., USA, 73, 2520-2523.
- LUTTGAU, H.C., OETLIKER, H. (1968).
The action of caffeine on the activation of the contractile
mechanism in striated muscle fibers.
J. Physiol., London, 194, 51-74.
- MAGURA, I.S. (1977).
Long-lasting inward current in snail neurons in barium solutions
in voltage-clamp conditions.
J. Membr. Biol. 35, 239-256.

- 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.
Jpn. J. Physiol., 27, 501-509.
- MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L. (1982).
'Anomalous' rectification in mouse spinal sensory neurones generated by a time-and voltage-dependent inward current.
J. Physiol., London, 332, 24-25 P.
- MEECH, R.W. (1978).
Calcium dependent K-activation in nervous tissues.
A. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 1-18.
- MEECH, R.W., STANDEN, N.B. (1975).
Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp : A component mediated by calcium influx.
J. Physiol., London, 249, 211-239.
- MEVES, H. (1968).
The ionic requirements for the production of action potentials in *Helix pomatia* neurones.
Pflügers Arch., 304, 215-241.
- MEVES, H. (1978).
Inactivation of the sodium permeability in squid giant nerve fibers.
Prog. Biophys. Mol. Biol., 33, 207-230.
- MEVES, H., VOGEL, W. (1973).
Calcium inward currents in internally perfused giant axons.
J. Physiol., London, 235, 225-265.
- MILLER, C., WHITE, M.M. (1980).
A voltage-dependent chloride conductance channel from *Tropedon* electroplax membrane.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 341, 534-551.

- MIYAZAKI, S., OHMORI, H., SASAKI, S. (1975).
Action potential and nonlinear current-voltage relation in
starfish oocytes.
J. Physiol., London, 246, 37-54.
- MIYAZAKI, S., TAKAHASHI, K., TSUDA, K. (1972).
Calcium and sodium contributions to regenerative responses in the
embryonic excitable cell membrane.
Science, 176, 1441-1443.
- MOUNIER, Y., VASSORT, G. (1975).
Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under
voltage-clamp conditions.
J. Physiol., London, 251, 589-608.
- NAITOH, Y., KANEKO, H. (1972).
Reactivated triton-extracted models of Paramecium : modification
of ciliary movement by calcium ions.
Science, N.Y., 176, 523-524.
- NAKAJIMA, Y., ENDO, M. (1973).
Release of calcium induced by "depolarization of the sarcoplasmic
reticulum membrane."
Nature New Biol., 246, 216-218.
- NICOLA, S.L., SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1980).
Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog
skeletal muscle.
J. Physiol., London, 305, 87-96.
- OKAMOTO, H., TAKAHASHI, K., YOSHII, M. (1976).
Two components of the calcium current in the egg cell membrane of
the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate.
J. Physiol., London, 255, 527-561.
- ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H., BRANDT, P.W. (1974).
Calcium binding and tension development in detergent-treated
muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 63, 168-186.

- PEACHY, L.D. (1967).
Membrane systems of crab fibers.
Amr. Zool., 7, 505-513.
- PLANT, T.D., STANDEN, N.B. (1982).
Effect of injection of EGTA/Ca buffers on calcium currents in
Helix aspersa neurones.
J. Physiol., London, 329, 29 P.
- POLEDNA, J., ZACHAROVA, D., HENCEK, M. (1983).
The effect of temperature on ionic currents in the muscle membrane
of the crayfish.
Gen. Physiol. Biophys., 2, 129-132.
- POLEDNA, J., ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. (1978).
Electrical properties of the surface and the T system membranes
determined from the voltage transients.
Biologia (Bratislava), 33, 12, 929-938.
- REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, H., GRUNDFEST, H. (1967).
Excitation-contraction coupling in crayfish.
Am. Zool., 7, 623-645.
- * REUTER, H. (1973) voir p. XVII.
- ROSENBLUTH, J. (1969).
Sarcoplasmic reticulum of an unusually fast-acting crustacean muscle.
J. Cell. Biol., 42, 543-547.
- SALKOFF, L.B., WYMAN, R.J. (1983).
Ion currents in *Drosophila* flight muscles.
J. Physiol., London, 337, 687-709.
- SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1978).
Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog.
J. Physiol., London, 283, 197-209.
- SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1983).
Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres
of the frog.
J. Physiol., London, 337, 1-17.

- SEYAMA, I. (1979).
Characteristics of the anion channel in the sino-atrial node cell of the rabbit.
J. Physiol., London, 294, 447-460.
- STANDEN, N.B., STANFIELD, P.R. (1978).
A mechanism for the fall in resting potassium conductance of frog skeletal muscle fibres occurring under extreme hyperpolarization.
J. Physiol., London, 282, 18-19 P.
- STANFIELD, P.R. (1970).
The effect of the tetraethylammonium ions on the delayed currents of frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 209, 209-229.
- STEFANI, E., CHIARANDINI, D.J. (1982).
Ionic channels in skeletal muscle.
Ann. Rev. Physiol., 44, 357-372.
- SHEU, S.S., BLAUSTEIN, M.P. (1983).
Effects of calcium on membrane potential and sodium influx in barnacle muscle fibers.
Amer. Physiol. Soci., C297-C302.
- SHEN, S., STEINHARDT, R.A. (1976).
Electrophysiological study of the membrane properties of the immature and mature oocyte of the batstar, *Patiria miniata*.
Dev. Biol., 48, 148-162.
- SUAREZ-KURTZ, G. (1982).
The role of calcium in excitation-contraction coupling in crustacean muscle fibers.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 60, 446-458.
- SUAREZ-KURTZ, G., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1972).
Membrane calcium activation in excitation-contraction coupling.
J. Gen. Physiol., 59, 676-688.

- SUAREZ-KURTZ, G., SORENSON, A.L. (1979).
Dissociation of action potentials from contraction in single crab muscle fibers.
Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 3029-3030.
- TILLOTSON, D., (1979).
Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 76, 1497-1500.
- THORENS, S., ENDO, M. (1975).
Calcium induced calcium release and "depolarization" induced calcium release : then physiological significance.
Proc. Japn. Acad., 51, 473-478.
- THOMPSON, S.H. (1977).
Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones.
J. Physiol., London, 265, 465-488.
- TOMITA, T. (1975).
Electrophysiology of mammalian smooth muscle.
Prog. Biophys. molec. Biol., 30, 185-203.
- WARNER, A.E. (1972).
Kinetic properties of the chloride conductance of frog muscle.
J. Physiol., London, 227, 291-312.
- WHITE, M.M., MILLER, C. (1979).
A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*.
J. Biol. Chem., 254, 10161-10166.
- YAMAMOTO, N., KASAI, M. (1982).
Kinetics of the actions of caffeine and procaine on the Ca²⁺ gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biochem. 92, 477-484.

YANAGIHARA, K., IRISAWA, H. (1980).

Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sino atrial node cell.
Pflügers Arch., 385, 11-19.

YELLEN, G. (1982).

Single Ca^{2+} -activated nonselective cation channels in neuroblastoma.
Nature, 296, 357-359.

ZAHRADNIK, I., ZACHAR, J. (1982).

Calcium currents in the muscle membrane of the crayfish in K^{+} -free internal environment.
Gen. Physiol. Biophys., 1, 457-461.

* REUTER, H. (1973)

Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Progress in biophysics and molecular biology, 26, 1-43.

