

50376  
1984  
84

50376.  
1984.  
84.

N° d'ordre : 1155

# THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ 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

Vincent STAL



## **MECANISME D'INACTIVATION DU CANAL CALCIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE**

Soutenue le 10 Mai 1984 devant la Commission d'Examen

Président	M. ROUSSEAU	Professeur à l'Université de Lille I
Rapporteur	Mme MOUNIER	Professeur à l'Université de Lille I
Examineurs	M. DUPUIS	Professeur à l'Université de Lille II
	M. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille I
	M. MIRONNEAU	Professeur à l'Université de Bordeaux

**Travail réalisé au laboratoire Physiologie des structures  
contractiles de l'Université des Sciences et Techniques de Lille  
Laboratoire associé au CNRS n° 308**

MECANISME D'INACTIVATION DU CANAL CALCIQUE

DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE

# SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION - POSITION DU PROBLEME	
- Le calcium dans les cellules excitables .....	1
- Inactivation du canal calcique .....	3
MATERIEL ET METHODES	
A - <u>MATERIEL BIOLOGIQUE</u> .....	11
I - Animaux d'expériences .....	11
II - Isolement des fibres musculaires .....	11
III - Préparation des fibres pour l'expérimentation .....	12
B - <u>SOLUTIONS EXPERIMENTALES</u> .....	13
I - Solution de base : ASW .....	13
II - Solution de dissection : ASW - Cs .....	13
III - Solution de référence : ASW-TEA-4AP-Cs = Solution "SR" .....	14
IV - Solutions modifiées .....	15
C - <u>ENREGISTREMENT DES RESULTATS EXPERIMENTAUX</u> .....	17
I - Double pont de saccharose : Descriptif .....	17
II - Cuve expérimentale .....	18
III - Dispositifs de mesure .....	19
1) Courant imposé	
2) Potentiel imposé	
D - <u>PROTOCOLE DU DOUBLE PULSE</u> .....	21

	Page
E - <u>CONTROLE DES MESURES - LIMITE DES TECHNIQUES</u> .....	22
I - Mesure du courant de membrane .....	22
II - Critères de validité .....	23
F - <u>EXPRESSION DES RESULTATS</u> .....	25

## RESULTATS

A - <u>LE COURANT CALCIQUE</u> .....	27
I - Activité électrique .....	27
II - Courants ioniques .....	28
III - Méthode de lecture du courant calcique .....	29
B - <u>INACTIVATION DU COURANT CALCIQUE</u> .....	33
I - <u>DIMINUTION DE <math>I_{Ca}</math></u> .....	34
1) Cinétiques .....	34
2) La diminution de $I_{Ca}$ : activation d'une conductance sortante ou décroissance de la conductance calci- que ? .....	35
II - <u>ETUDE DE L'INACTIVATION DE <math>I_{Ca1}</math></u> .....	37
1 - Mesure du degré d'inactivation .....	37
2 - Inactivation et cinétiques .....	40
3 - Rôle de l'influx d'ions calcium .....	41
a - Parallélisme $I/I_{max}$ et $I_{Ca}$ .....	41
b - Influence de la durée du pulse conditionnant .....	43
c - Influence de la concentration calcique extracellulaire .....	44

III - <u>ETUDE DE <math>I_{Ca2}</math></u> .....	46
1 - Existence de $I_{Ca2}$ .....	46
a - Biexponentialité .....	46
b - Isolement de $I_{Ca2}$ .....	46
2 - Nature ionique de $I_{Ca2}$ .....	48
a - Effet du cobalt .....	48
b - Effet de la variation du calcium extracellulaire .....	48
3 - Inactivation de $I_{Ca2}$ .....	49
a - Degré d'inactivation .....	49
b - Cinétiques d'inactivation .....	50
IV - <u>ROLE DE L'ACCUMULATION</u> .....	51
1 - Substitution du $Ca^{++}$ par le $Sr^{++}$ .....	51
2 - Substitution du $Ca^{++}$ par le $Ba^{++}$ .....	53

DISCUSSION - CONCLUSION

INTRODUCTION

POSITION DU PROBLEME

## LE CALCIUM DANS LES CELLULES EXCITABLES

Historiquement, un des premiers physiologistes à avoir noté l'influence du calcium dans les tissus excitables fut sans doute RINGER (1883, cité par SANDOW, 1965), qui remarqua que le coeur de grenouille isolé cessait de battre dans un milieu de survie dépourvu de calcium. Pour les fibres squelettiques, MINES (1913, cité par SANDOW, 1965) démontra que la disparition de l'activité mécanique des fibres musculaires de grenouille soumises à un milieu sans calcium était liée à celle des potentiels d'action membranaires. Il était donc suggéré que, en plus d'un site d'action précis (les protéines contractiles), le calcium intervenait à un stade antérieur du couplage excitation-contraction, c'est-à-dire au niveau membranaire.

Bien plus tard, HODGKIN et HUXLEY (1952) mettaient en place une théorie de l'excitabilité cellulaire, élaborée principalement à partir de données électrophysiologiques obtenues sur l'axone géant de calmar, théorie détaillant les processus ioniques membranaires responsables de l'activité électrique de l'axone, et impliquant le sodium et le potassium. Pendant de nombreuses années, ces deux ions ont quasiment monopolisé le devant de la scène de l'électrophysiologie. Malgré cela, l'évidence s'est fait jour progressivement que le calcium était impliqué, en tant que porteur de courants membranaires, dans de très nombreux processus excitatoires. En plus du couplage excitation-contraction des fibres musculaires cardiaques, squelettiques ou lisses, le premier étudié en raison sans doute du rôle du calcium dans le couplage mécano-chimique, le calcium s'est avéré être à la base du couplage excitation-sécrétion, de l'activité des cellules nodales cardiaques, ainsi que de

celle de certains neurones centraux de mollusques, de ciliés (Paramécies), de cellules visuelles, ou encore des oeufs de coelentérés.

L'évidence s'est donc imposée de l'existence d'un canal calcique, au même titre que les canaux sodiques ou potassiques, mais la connaissance de ce canal a longtemps témoigné d'un certain retard par rapport à celle des canaux  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . A ce retard, plusieurs raisons sont avancées par TSIEN (1983).

D'abord, aucune préparation connue n'est au canal calcique ce que l'axone de calmar fut au canal sodique, à savoir une préparation "type", relativement simple d'accès, dont les études électrophysiologiques ont permis de jeter les bases d'une théorie qui, pour le sodium, semble, sinon universelle, du moins décrire parfaitement les faits expérimentaux.

De plus, l'arsenal pharmacologique manque toujours d'un inhibiteur véritablement spécifique du canal calcique, à l'inverse de la tétradotoxine pour le canal sodique.

Enfin, du fait de sa nature de cation divalent, le calcium participe de manière importante aux mécanismes régissant le champ électrique membranaire, ceci étant souvent compliqué par l'existence d'un gradient de concentration exceptionnel entre l'intérieur et l'extérieur de la plupart des cellules excitables. Ce gradient confère aux courants calciques certaines propriétés qui rendent plus délicate son étude (rectification de la relation instantanée courant-potentiel, absence vraisemblable d'inversion des courants de calcium...).

Malgré cela, la connaissance du canal calcique a progressé, et nous savons que c'est un canal à part entière, relativement spécifique aux ions  $\text{Ca}^{++}$ , mais dont il semble, au demeurant, exister plusieurs

variétés. Ceci est basé sur la constatation que son inactivation, lors d'expériences de potentiel imposé, pourrait dépendre, soit du potentiel, soit de l'influx calcique, suivant la préparation étudiée.

Cette disparité fonctionnelle, sinon structurale, mobilise les travaux de nombreux chercheurs depuis environ dix ans. Il semble aujourd'hui se dégager de ces travaux une sorte de classification des types cellulaires basée sur le type d'inactivation du canal calcique.

Nous évoquerons ici les différents types d'inactivation décrits, en citant les principaux types cellulaires concernés.

### Inactivation du canal calcique.

#### Réduction de la force électromotrice (ou "driving force") des ions calcium

La diminution du courant entrant lors de dépolarisations de longues durées peut ne pas être une véritable inactivation, mais essentiellement une diminution due à la décroissance du facteur "driving force" des ions calcium :  $V - V_{Ca}$ . Cette fausse inactivation prenant la forme d'une déplétion tubulaire a été démontrée par ALMERS et al. (1981) sur la fibre musculaire du muscle semitendineux de grenouille, en conditions de potentiel imposé par pont de vaseline.

#### Absence d'inactivation

Certains courants calciques ( $I_{Ca}$ ) semblent ne pas s'inactiver du tout, ou si lentement que c'est vraisemblablement la diminution

de la "driving force" qui provoque le déclin du courant lors de potentiels imposés extrêmement longs (TSIEN, 1983). C'est le cas particulièrement pour certaines préparations où le calcium intervient dans le couplage excitation-sécrétion, telle la cellule chromafine ou encore des cellules spécialisées comme certains photorécepteurs.

#### Inactivation dépendant du potentiel.

A l'origine, une grande partie des préparations semblaient posséder ce type d'inactivation du canal calcique dépendant du potentiel de membrane, c'est-à-dire conforme à ce que HODGKIN et HUXLEY (1952) ont décrit pour le canal sodique. Depuis peu, différents travaux ont restreint le nombre de cellules excitables où l'inactivation semble purement dépendante du potentiel.

C'est le cas des oeufs immatures du polychète marin *Neanthes*, (FOX, 1981), où l'inactivation augmente régulièrement avec le potentiel conditionnant, lors d'expériences par double pulse, sans que l'on assiste à une levée d'inactivation pour des prépulses très élevés (jusqu'à + 260 mV, soit  $E_m = + 180$  mV), responsables d'un courant  $I_{Ca}$  très réduit. De plus, l'inactivation s'amorce pour des potentiels conditionnants qui sont trop peu élevés pour déclencher un courant calcique. Enfin, la substitution du calcium extracellulaire par le strontium ou même le baryum n'affecte, ni le degré d'inactivation, ni ses cinétiques.

C'est également le cas, semble-t-il, pour la fibre musculaire du sartorius de grenouille, étudiée en potentiel imposé par micro-électrodes (SANCHEZ et STEFANI, 1983), en présence de 155 mM de TEA et de 5 mM de 3,4 diaminopyridine. Ces auteurs démontrent que l'on peut représenter les variables d'activation et d'inactivation de la conduc-

tance calcique par les équations classiques introduites par HODGKIN et HUXLEY en utilisant le facteur  $m^3h$ . En effet, dans ce cadre, si l'on considère un canal spécifique à une espèce ionique donnée,  $i$ , le courant porté par ces ions est sous la dépendance :

- de la force électromotrice ("driving force"), résultante de la différence de potentiel transmembranaire,  $E_m$ , et du potentiel d'équilibre de l'ion considéré,  $E_i$ .

$$\text{Driving force} = E_m - E_i$$

- de la conductance présentée par la membrane vis à vis de cet ion :  $G_i$

$$\text{d'où : } I_i = G_i (E_m - E_i)$$

en particulier, pour le calcium :

$$I_{Ca} = G_{Ca} (E_m - E_{Ca}).$$

Or, lors de l'application d'un potentiel imposé,  $V$ , la conductance calcique subit une modification qui peut être schématisée ainsi :

$$G_{Ca(V)} = \bar{G}_{Ca} \cdot m^x h$$

où :  $\bar{G}_{Ca}$  : conductance maximale

$m^x$  : facteur d'activation, affecté d'un exposant  $x$  traduisant en pratique le retard entre l'imposition du crêneau de potentiel et l'établissement de la nouvelle valeur de conductance

$h$  : facteur d'inactivation

les facteurs  $m$  et  $h$  sont sous la dépendance du potentiel.

Ce modèle, développé à l'origine pour le canal sodique de l'axone de calmar par HODGKIN et HUXLEY, a été appliqué au canal calcique :

- par HENCEK et ZACHAR (1977), sous la forme  $G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} m^6 h$ , pour la fibre musculaire d'écrevisse.
- par SANCHEZ et STEFANI (1983), sur la fibre musculaire de grenouille, avec le même exposant pour m que dans le modèle original de HODGKIN et HUXLEY :  $G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} m^3 h$ .
- par KOSTYUK et KRISHTAL (1977) sur le neurone d'escargot, sous la forme :

$$G_{Ca} = \bar{G}_{Ca} m^2 h.$$

#### Inactivation dépendant de l'influx calcique.

BREHM et ECKERT (1978) et BREHM, ECKERT et TILLOTSON (1980) proposent l'idée que l'inactivation du courant  $I_{Ca}$  puisse dépendre du flux de calcium, et plus précisément de l'action spécifique de cet ion à la face interne de son canal.

En effet, par potentiel imposé sur la paramécie, et en particulier par l'utilisation du protocole du double pulse, ces auteurs démontrent que l'inactivation de  $I_{Ca}$  ne dépend pas particulièrement du potentiel, mais plutôt de l'entrée de calcium. Les évolutions de l'inactivation et de  $I_{Ca}$  s'effectuent en effet de façon parallèle : l'inactivation passe par un maximum puis diminue pour des prépulses élevés, même très longs. Un prépulse avoisinant le potentiel d'équilibre aux ions calcium, même de longue durée, ne provoque pratiquement aucune inactivation de la conductance mise en jeu lors de l'application consécutive d'un pulse test.

Ceci est associé au fait que les courants entrants portés par le barium sont très peu inactivés chez la paramécie, (le  $Ba^{++}$

pourrait emprunter le canal, mais serait peu efficace à provoquer son inactivation). De plus, l'injection d'un chélateur d'ions calcium, l'EGTA, ralentit fortement l'inactivation.

Tout ceci conduit les auteurs à conclure que l'entrée de calcium dans la cellule produit sa propre inactivation, par un processus de régulation par rétroaction négative.

Parallèlement à ces travaux sur la paramécie, TILLOTSON (1979) et ECKERT et TILLOTSON (1981) mettent en évidence le même phénomène, sur des neurones d'Aplysie pour lesquels d'autres auteurs avaient conclu à une inactivation de la conductance calcique dépendante du potentiel (ADAMS et GAGE, 1979). Une des raisons de cette différence réside dans l'emploi de césium, incorporé au cytoplasme par l'action de la nystatine, afin de bloquer les courants sortants de potassium. Ce blocage permet en effet une mesure plus précise des courants entrants de calcium et de leur inactivation. Dans ces conditions, le degré d'inactivation s'avère être une fonction linéaire de l'intégrale du courant entrant déclenché par le pulse conditionnant, et ceci, quelle que soit l'amplitude absolue des courants calciques.

De nouveau, l'EGTA et la substitution du  $Ca^{++}$  par le  $Ba^{++}$  réduisent l'inactivation du  $I_{Ca}$ .

Ces auteurs émettent donc l'hypothèse d'une interaction des ions calcium avec un site du canal calcique, site accessible depuis la face cytoplasmique de la membrane. Cette interaction entrainerait soit la décroissance du nombre de canaux disponibles soit une diminution de la conductance de chaque canal, soit encore un phénomène mixte.

Cette analyse du rôle de l'influx calcique dans l'inactivation a également été réalisée sur une cellule musculaire. ASHCROFT et

STANFIELD (1981, 1982), étudient ce rôle de  $I_{Ca}$  dans sa propre inactivation, sur la fibre musculaire squelettique du phasme (*Carausius morosus*). Ces fibres sont étudiées par potentiel imposé à l'aide de 3 microélectrodes (ADRIAN, CHANDLER et HODGKIN, 1970) en présence de 120 mM/l de TEA, et la solution est rendue hypertonique par addition de saccharose, afin d'éliminer les contractions, principal obstacle à l'analyse du courant calcique des fibres musculaires.

Dans ces conditions, le courant déclenché par des potentiels dépolarisants est purement calcique, du moins pour des  $V$  imposés inférieurs à + 80 mV. L'inactivation du courant calcique peut alors être décrite par un modèle théorique classique, de type HODGKIN-HUXLEY, mettant en jeu le potentiel de membrane comme facteur déterminant. Si une telle modélisation permet de décrire la phase d'inactivation croissante pour des  $V$  imposés conditionnants de 0 à + 70 mV, elle ne peut rendre compte de la levée d'inactivation ayant lieu pour des  $V$  conditionnants supérieurs à + 70 mV ou + 80 mV. Il faut donc admettre une autre cause à l'inactivation de  $I_{Ca}$ .

D'autres résultats expérimentaux permettent à ASHCROFT et STANFIELD d'écarter l'hypothèse d'une inactivation dépendante du potentiel :

\* les valeurs des constantes de temps d'inactivation de  $I_{Ca}$  semblent insensibles au potentiel qui a provoqué ce courant ; par contre, l'existence d'un pré-pulse générateur d'inactivation affecte les cinétiques d'inactivation d'un pulse test.

\* un changement de concentration externe en calcium affecte le degré et les cinétiques de l'inactivation : une augmentation de  $Ca^{++}_e$  accélère l'inactivation, une diminution la ralentit.

De plus, quelle que soit la concentration calcique externe, il existe une relation constante entre les cinétiques d'inactivation de  $I_{Ca}$  et leur amplitude. Le canal calcique de la fibre musculaire de phasme semble donc, lui aussi, s'inactiver en réponse à l'influx d'ions  $Ca^{++}$ .

L'inactivation du courant lent cardiaque a également fait l'objet d'une analyse détaillée (MENTRARD et al., 1984). Les résultats, très variables suivant l'espèce animale à laquelle appartient le tissu cardiaque étudié (Mc DONALD, 1982), semblent tout de même être en faveur d'une inactivation dépendante de l'influx calcique. Par exemple, FISCHMEISTER et HORACKOVA (1982), démontrent par l'utilisation d'un modèle membranaire, et comparaison avec les courants expérimentaux, que le potentiel de membrane ne peut être invoqué pour expliquer la décroissance du courant lent calcique du coeur de grenouille.

Enfin, récemment, PLANT et al. (1983) ont étudié l'effet d'injection intracellulaire de calcium et d'un agent chélateur du calcium (EGTA) sur l'inactivation du courant calcique des neurones d'escargot. (*Helix Aspersa*). Une injection de calcium, qui élève la concentration calcique intracellulaire de  $1,9 \cdot 10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M, fait décroître l'amplitude des courants calciques, alors que cette diminution n'est prévue ni par la théorie du champ constant ni par la théorie d'EYRING. Cette diminution semble donc être une inactivation du canal calcique. Par contre, l'injection d'EGTA augmente l'amplitude des courants calciques, ralentit et diminue le taux de l'inactivation. Néanmoins, l'inactivation n'est pas totalement supprimée. Ces auteurs proposent même un modèle de l'inactivation calcique dépendant du calcium, qui recoupe leur données expérimentales.

En conclusion, des types cellulaires de plus en plus nombreux, et d'origine variée, semblent posséder une inactivation dépendante du calcium.

C'est donc à partir de ces données que nous nous sommes fixés dans ce travail l'objectif d'étudier le processus responsable de l'inactivation du courant calcique réglant l'activité électrique de la fibre musculaire striée du crabe *Carcinus maenas*. Il est en effet maintenant bien connu que l'activité électrique de cette préparation est réglée par un influx d'ions calcium (FATT et KATZ, 1953 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 ; MOUNIER et VASSORT, 1975 a).

MATERIEL ET METHODES

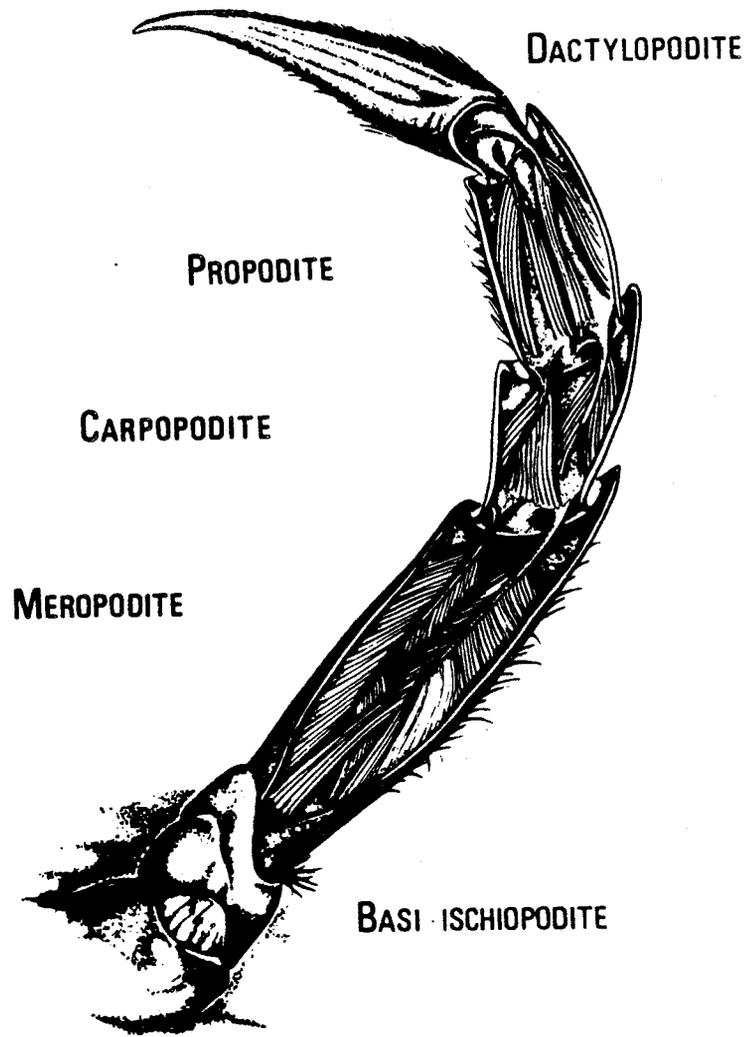


Figure 1

*Organisation des fibres musculaires utilisées au sein du mēropodite.*

## A - MATERIEL BIOLOGIQUE

### I - Animaux d'expériences

Les expériences sont réalisées sur des fibres musculaires du crabe *Carcinus maenas* récoltés sur le littoral Nord et fournis par la Station Marine de Wimereux.

Après arrivage, les animaux sont conservés en vie dans de l'eau de mer d'origine, régulièrement renouvelée, le tout à une température constante de 10°C.

Les animaux employés pour les expériences ne le sont jamais avant un délai minimum de 24 heures à compter de leur arrivée, afin de permettre à leur équilibre de se rétablir du voyage.

### II - Isolement des fibres musculaires

Les fibres musculaires utilisées sont isolées du muscle extenseur du méropodite issu d'un des péréiopodes P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, ou P<sub>4</sub>, gauche ou droit. (Fig. 1).

Après section suivant les deux arêtes du méropodite, la moitié contralatérale (péréiopode droit : côté gauche du méropodite, et vice versa) est fixée au moyen d'épingles dans une cuve à dissection et baignée dans la solution de dissection (Voir paragraphe "Solutions").

Les fibres musculaires utilisées, toujours isolées de la partie centrale du muscle extenseur, ont des diamètres compris entre 150 et 300 µm, (micromètre), et une longueur de 3 à 10 mm.

Elles sont séparées des fibres adjacentes par section des filets nerveux les réunissant, puis prélevées en conservant

leurs deux points d'attache originels : un fragment d'axostyle à une extrémité, et à l'autre, un fragment de carapace.

Après dissection, la fibre est encore laissée quelques minutes dans la cuve, afin de faire apparaître les éventuelles lésions, facilement identifiables par une petite tache opaque sur une fibre normalement translucide lorsqu'elle est intacte. Seules les fibres parfaitement transparentes sont alors utilisées.

### III - Préparation des fibres pour l'expérimentation

Comme on le verra plus loin, les fibres musculaires sont soumises, dès la dissection, à l'action de solutions visant à éliminer le plus complètement possible les courants de potassium. Ainsi, la dissection est effectuée dans une eau de mer artificielle modifiée, le chlorure de potassium, normalement présent, étant remplacé intégralement par du chlorure de césium, CsCl. (Solutions "ASW-Cs"). Après la dissection, les fibres subissent une imbibition d'une heure dans une solution physiologique où le potassium est également remplacé par du césium. En outre cette solution contient deux substances pharmacologiques : le tétraéthylammonium (TEA) et la 4 aminopyridine (4AP). (Voir paragraphe B).

Après cette heure d'imbibition, la fibre est transportée jusqu'au dispositif expérimental, dans une goutte de solution de traitement, sur une lamelle de verre.

Le traitement et les expériences sont effectuées à une température ambiante de 15 à 20°C.

Sel (mM) Solution	NaCl	KCl	CsCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	TEA	4AP	CoCl <sub>2</sub>	SrCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	LiCl
ASW	513	12,9	-	11,8	23,6	2,6	-	-	-	-	-	-
ASW - Cs	513	-	12,9	5	23,6	2,6	50	0,5	-	-	-	-
SR	513	-	12,9	5	23,6	2,6	50	0,5	-	-	-	-
SR - Co <sup>++</sup>	513	-	12,9	5	23,6	2,6	50	0,5	20	-	-	-
SR - Sr <sup>++</sup>	513	-	12,9	-	23,6	2,6	50	0,5	-	5	-	-
SR - Ba <sup>++</sup>	513	-	12,9	-	23,6	2,6	50	0,5	-	-	5	-
SR - Ca 5	513	-	12,9	25	23,6	2,6	50	0,5	-	-	-	-
SR - Li <sup>+</sup>	171	-	12,9	5	23,6	2,6	50	0,5	-	-	-	342

TABLEAU 1

Composition ionique, en millimoles par litre, des différentes solutions utilisées.

B - SOLUTIONS EXPERIMENTALES

I - Solution de base : ASW

Cette solution est utilisée en substitution du milieu interne du crabe, d'où son nom d'eau de mer artificielle (Artificial Sea Water = ASW).

Sa composition est conforme à celle donnée par FATT et KATZ (1953) :

NaCl	513	mM
KCl	12,9	mM
CaCl <sub>2</sub>	11,8	mM
MgCl <sub>2</sub>	23,6	mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,6	mM

De fait, l'ASW a été peu utilisée dans le cadre de ce travail, compte tenu de la volonté d'éliminer au maximum les courants potassiques. L'ASW n'est donc pas à proprement parler notre solution de référence.

II - Solution de dissection : ASW-Cs

Cette solution, évoquée au paragraphe A, diffère de l'ASW par la substitution du potassium par du césium. Le contact de la fibre avec les ions Cs<sup>+</sup> est donc prolongé du temps que dure la dissection. Les ions Cs<sup>+</sup> sont ajoutés à la solution dès la dissection en raison de leur action imbibitrice sur les mouvements de potassium (BAKER et al., 1963 ; CARMELIET, 1980). Le temps d'imbibition permet un mécanisme de chargement de la fibre en Cs<sup>+</sup>, par l'intermédiaire

d'un processus d'échange membranaire (BEAUGE et al., 1973).

III - Solution de référence : ASW TEA-4AP-Cs :

Solution "SR"

Cette solution, dite solution de référence, utilisée pour le prétraitement des fibres (1 heure) et les expériences, contient deux substances pharmacologiques connues pour leur propriété imbibitrice des courants potassiques dans les membranes excitables : le chlorure de tétraéthylammonium, et la 4-aminopyridine.

Le TEA est en effet réputé depuis longtemps bloquer les courants potassiques : sur la fibre musculaire de grenouille (HAGIWARA et WATANABE, 1955), ou sur l'axone géant de Calmar (TASAKI et HAGIWARA, 1957), et en particulier sur la rectification retardée (ARMSTRONG et BINSTOCK, 1965). De même, la 4AP exerce un effet inhibiteur sur les mouvements potassiques, à des doses plus faibles que le TEA (GILLEPSIE et HUTTER, 1975 ; ULBRICHT et WAGNER, 1976 ; PELHATE et PICHON, 1974 ; YEH et al., 1976).

De plus, le césium remplace le potassium. La composition de cette solution de référence est la suivante :

NaCl	513	mM/l
KCl	0	mM/l
CsCl	12,9	mM/l
CaCl <sub>2</sub>	5	mM/l
MgCl <sub>2</sub>	23,6	mM/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,6	mM/l

TEA	50 mM/l
4AP	0,5 mM/l

On remarquera plusieurs points particuliers dans la composition de cette solution :

a) La concentration du calcium a été réduite à 5 mM/l, par rapport à 11,6 mM/l dans l'ASW. Ceci a pour but de limiter l'amplitude des contractions consécutives aux très grands courants de calcium. Ces contractions, parfois très violentes, provoquent en effet des déplacements de la fibre musculaire qui détruisent les filets de vaseline, et entraînent le mélange des solutions des différents compartiments de la cuve expérimentale.

b) Le TEA et la 4AP sont ajoutés à la solution. L'hypertonie que ceci entraîne reste cependant assez faible : 1243 milli-osmoles au lieu de 1163, soit 7%.

c) Le pH de cette solution, légèrement basique en raison du pK de la 4AP est toujours ajusté à 7,8 par l'addition d'HCL 0,1 N.

Cette solution, comme les autres, est préparée juste avant l'expérience.

#### IV - Solutions modifiées

Au cours des expériences, certaines modifications ont été apportées à notre solution de référence, dans le but de mettre en évidence tel ou tel phénomène. Dans ce cas, un délai de 10 à 15 minutes est toujours respecté afin de permettre d'atteindre un nouvel état stable. Ces solutions modifiées sont les suivantes :

a) Solution "Cobalt" (SR - Co<sup>++</sup>).

Le chlorure de cobalt a été utilisé, à la concentration de 20 mM/l, pour les propriétés des ions Cobalt d'inhibiteur des courants calciques. (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966, ou HAGIWARA et TAKAHASHI, 1967). Dans ces cas, il était simplement rajouté à la solution de référence "SR" (ASW TEA-4AP-Cs).

b) Substitution du Calcium : "SR - Sr<sup>++</sup>" et "SR - Ba<sup>++</sup>".

Dans certaines expériences, le chlorure de calcium a été intégralement remplacé par le chlorure de strontium (solution SR - Sr<sup>++</sup>) ou par le chlorure de barium (SR - Ba<sup>++</sup>).

c) Modification de la concentration de calcium.

La concentration du calcium a été, dans certaines expériences, multipliée par 5 : 25 mM au lieu de 5 (SRCa5). Dans ce cas encore, le chlorure de calcium est simplement ajouté à la solution, en hypertonie.

d) Remplacement du sodium par le lithium.

Dans une série expérimentale, une partie (2/3) des ions Na<sup>+</sup> a été remplacée par les ions Li<sup>+</sup>, en substitution, sous forme de chlorure de lithium, LiCl. Le tableau 1 récapitule la composition des solutions qui viennent d'être présentées.

Enfin, la méthode de potentiel imposé utilise une solution de saccharose isotonique : celle-ci a en fait une tonicité de 1,1 fois celle de l'ASW. Elle est préparée par dissolution de saccha-

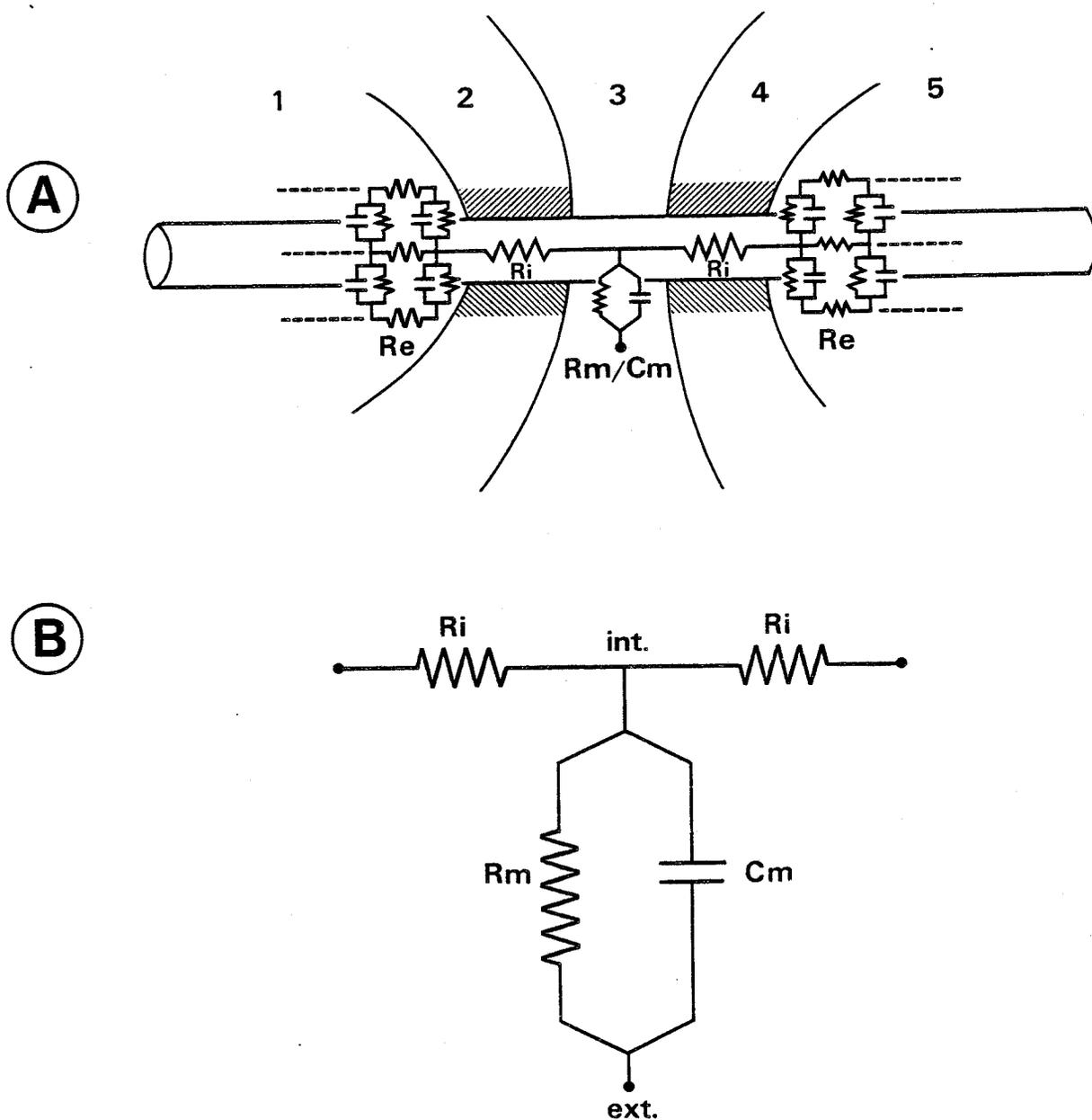


Figure 2

- A - Schéma électrique mettant en évidence les principales résistances et capacités mises en jeu dans les expériences en double pont de saccharose sur la fibre musculaire du crabe.
- B - Schéma équivalent des résistances et du condensateur déterminant de façon essentielle les propriétés de la fibre musculaire en double pont de saccharose.

rosé ultra pur dans de l'eau bipermutée. Sa résistivité est donc maximale.

## C - ENREGISTREMENT DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

### I - Double pont de saccharose : Descriptif.

Cette méthode permet, par l'utilisation d'électrodes externes, et par isolation d'une petite surface de membrane, d'avoir virtuellement accès à l'intérieur de la fibre musculaire. L'isolation électrique est obtenue en lavant la fibre musculaire, par une solution isotonique de saccharose, de part et d'autre de la région de la membrane à tester. La solution de saccharose a en effet une résistivité très élevée, de l'ordre de  $10^5 \Omega \cdot \text{cm}$ , du fait de la quasi absence de molécules ionisées. De ce fait, les courants ioniques ne peuvent pas s'écouler le long de la résistance externe des compartiments de saccharose. On crée ainsi une zone de membrane isolée électriquement.

La figure 2 représente le schéma électrique équivalent d'une fibre musculaire placée dans ces conditions.

Compte tenu des surfaces membranaires présentes dans les compartiments 1 et 5, la résistance effective de cette membrane est négligeable devant la résistance sarcoplasmique  $R_i$ , qui est la résistance interne de la portion de fibre baignée extérieurement par le saccharose.

Ce montage peut donc être caractérisé essentiellement par cette résistance  $R_i$ , ainsi que par le réseau  $R_m, C_m$ , qui présente la résistance de membrane de la portion de membrane à tester, et sa ca-

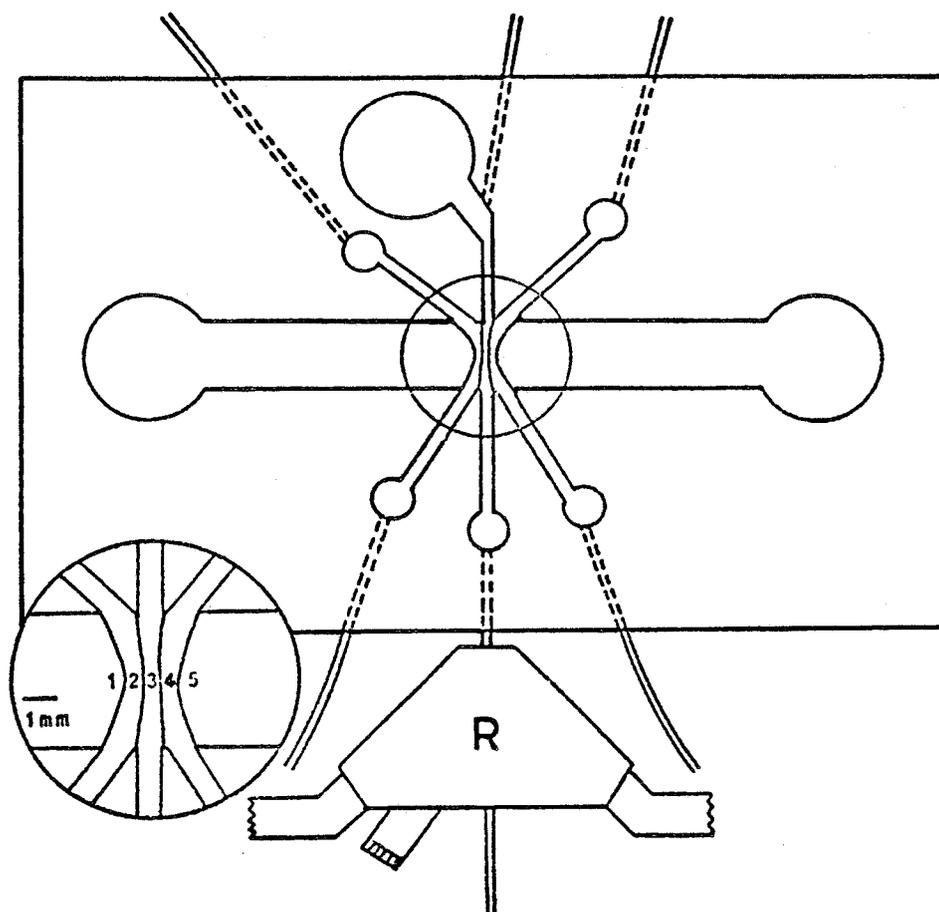


Figure 3

Représentation de la cuve expérimentale du double pont de saccharose.

Dans le médaillon, la partie centrale a été agrandie.

1 et 5 : compartiments de référence

2 et 4 : compartiments saccharose

3 : Compartiment test.

R : robinet de changement de solution.

pacité. Ceci est schématisé à la figure 2.

## II - Cuve Expérimentale

Les fibres isolées sont placées dans une cuve expérimentale dont les caractéristiques, illustrées à la figure 3, sont les suivantes :

a) Les compartiments membranaires sont délimités, sous la fibre, par des cloisons constituées de film photographique, d'environ 60  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, et par des filets de vaseline. Ces filets augmentent ainsi l'étanchéité entre les compartiments, en évitant le mélange des différentes solutions.

b) Le compartiment central (n°3) a une largeur telle que, une fois les filets de vaseline en place, la longueur de fibre en contact avec la solution physiologique soit très inférieure à la constante d'espace de la fibre : cette longueur est d'environ 100  $\mu\text{m}$ , et la constante d'espace de la fibre de crabe, évolue de 700 à 1500  $\mu\text{m}$  au repos à 200  $\mu\text{m}$  lors de l'activité. Ces valeurs sont des estimations basées sur la formule : constante d'espace  $\lambda = \frac{r_m}{r_i}$  et en prenant  $r_i = 70 \Omega \text{ cm}$  et  $r_m = 1000 \Omega$  au repos,  $r_m = 200 \Omega$  lors de l'activité. (BERTRAND, 1977).

c) Les compartiments de saccharose (2 et 4) ont une largeur d'environ 300 à 400  $\mu\text{m}$ , une fois les filets de vaseline en place.

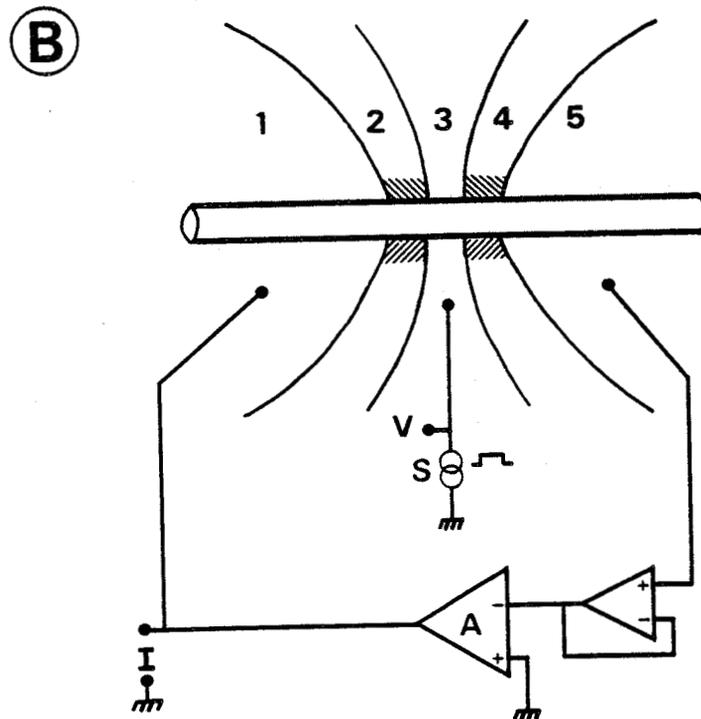
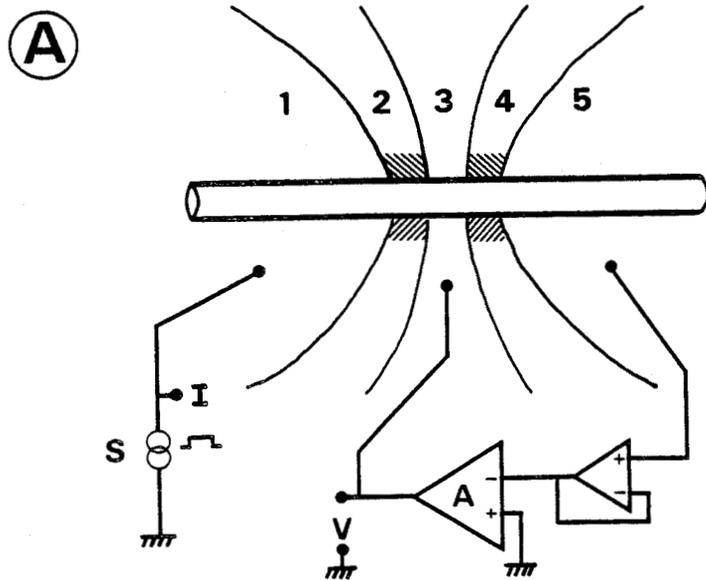


Figure 4

A - Schéma électrique du montage utilisé pour les expériences de courant imposé.

B - Schéma électrique du montage utilisé pour les expériences de potentiel imposé.

S : stimulateur ; A : amplificateur opérationnel ; V : potentiel ;

I : courant.

d) Trois ponts de gélose - KCl 3M réunissent les compartiments externes (1 et 5 et le compartiment test (3) au système électronique de mesure, via trois piles au calomel.

La résistance totale d'un ensemble pont de gélose + pile au calomel est toujours inférieure à 2 K $\Omega$ .

### III - Dispositifs de mesure

Les mesures électrophysiologiques ont été menées à bien par la technique du courant imposé, et principalement par celle du potentiel imposé, dont les schémas sont représentés à la figure 4.

#### 1) Courant imposé

Dans ce montage (Fig. 4), le stimulateur S fait passer un courant, via la résistance de membrane du compartiment 1, très faible vu la surface, (voir paragraphe A II), la résistance interne  $R_i$ , et la résistance de membrane  $R_m$ , du compartiment test (3), en parallèle avec  $C_m$ . Ce courant se reboucle à la masse par la faible résistance de sortie de l'amplificateur opérationnel A (100  $\Omega$ ).

L'amplificateur développe alors une tension, afin de maintenir l'intérieur de la fibre au potentiel de masse.

Cette tension de sortie n'est rien d'autre, au signe près, que la réponse de la membrane du compartiment 3 au passage du courant.

## 2) Potentiel imposé

Afin de réaliser l'imposition d'un potentiel au gré de l'expérimentateur, le montage mis en oeuvre est le suivant (Fig. 4). L'amplificateur maintient l'intérieur de la fibre au potentiel virtuel de la masse. Le courant de contre réaction nécessaire à ce maintien est injecté par le compartiment 1 puis il traverse la résistance longitudinale du compartiment baigné par le saccharose,  $R_i$ , et s'écoule vers la masse via  $R_m$ , la résistance de membrane du compartiment test (3) en parallèle avec  $C_m$ , et la résistance de sortie du stimulateur.

En l'absence de stimulation, le système est à l'équilibre ; pourvu que l'on ait compensé les divers potentiels de jonctions, inévitables, l'amplificateur impose à la fibre son propre potentiel de repos, le courant est nul.

Par contre, lorsque le stimulateur décale le potentiel du compartiment central du potentiel de masse, l'amplificateur va débiter le courant nécessaire au maintien de l'intérieur de la fibre au potentiel zéro.

Ce courant, circulant au travers des résistances  $R_i$  et  $R_m$ , est à l'origine d'une tension  $v$  à la sortie de l'amplificateur :

$$v = e \times \frac{R_i}{R_m}$$

avec  $e =$  tension de sortie de stimulateur.

$$\text{Or, } I_m, \text{ le courant, est égal à : } I_m = \frac{e}{R_m}$$

$$\text{d'où : } v = R_i \times I_m.$$

On mesure donc le courant de membrane par la tension qu'il provoque au travers de  $R_i$ , la résistance longitudinale du compartiment 2.

Les mesures, réalisées en intercalant brièvement une résistance connue, de  $1\text{ K}\Omega$ , dans la boucle de contre réaction, ont donné des valeurs de  $R_i$  de  $20\text{ K}\Omega$  à environ  $100\text{ K}\Omega$ .

Enfin, la présence d'une capacité  $C_m$  en parallèle sur  $R_m$  provoque un bref courant capacitif au début de l'imposition du potentiel, et au retour au potentiel de repos.

#### D - PROTOCOLE DU DOUBLE PULSE

Dans l'étude d'un processus d'inactivation, la méthode expérimentale principalement utilisée est celle du double pulse.

La disponibilité du courant calcique est mesurée par imposition d'un potentiel test, d'amplitude  $V_2$  égale à  $+50\text{ mV}$  ou  $+60\text{ mV}$ . Sa durée est choisie de façon à ce que le courant atteigne un état stable.

La conductance calcique, testée par le pulse  $V_2$ , est (ou non) influencée par un potentiel conditionnant, le précédant, d'amplitude  $V_1$  variable : en général, de  $0$  à  $+150\text{ mV}$ , exceptionnellement  $+175\text{ mV}$ .

Néanmoins, ces deux pulses sont séparés par un bref intervalle, de  $10$  à  $40\text{ msec}$ , pendant lequel le potentiel imposé est le potentiel de repos ( $V = 0\text{ mV}$ ). Ceci permet d'imposer le potentiel test en partant du même niveau de référence, quelle que soit l'amplitude  $V_1$

du pulse conditionnant. Le gradient de potentiel affectant les conductances membranaires lors du pulse test sera donc le même.

On se trouve donc dans des conditions où l'on teste véritablement d'une manière constante la conductance  $G_{Ca}$ , celle-ci ayant été ou non modifiée par des événements conditionnants antérieurs au test. De plus, cet intervalle permet d'obtenir le même courant capacitif au début du courant dû au pulse test : ce courant entraînera donc la même erreur potentielle dans la lecture du courant initial.

Le choix de l'amplitude du pulse test sera justifié dans le chapitre traitant à proprement parler de l'inactivation.

## E - CONTROLE DES MESURES - LIMITES DES TECHNIQUES

### I - Mesure du courant de membrane

Dans le présent travail, ne sont présentées que des mesures de courant global, c'est à dire pour la surface de membrane réellement accessible dans le compartiment test.

Ce courant n'est donc pas rapporté à l'unité de surface, en raison de multiples difficultés à calculer exactement cette surface de membrane. Les principales raisons sont les suivantes.

a) Si les filets de vaseline améliorent sensiblement l'étanchéité entre les compartiments, et éliminent ainsi les potentiels de jonction parasites, ils rendent par contre très imprécise la mesure de la longueur de fibre en contact électrique avec le liquide physiologique du compartiment test.

b) La section des fibres musculaires, parfois à peu près circulaire, mais souvent triangulaire, ou trapézoïdale, est difficilement appréciable exactement.

c) La grande complexité structurale de la surface de la fibre musculaire augmente encore ces difficultés, en raison de la présence de nombreux replis membranaires ("clefts"), de tubules transversaux. Ceci est particulièrement vrai pour la fibre musculaire du crabe (PEACHEY, 1965 ; SELVERSTON, 1967).

Le courant de membrane est donc mesuré par la différence de potentiel qu'il engendre sur la résistance  $R_i$ . Cette d.d.p. est lue entre la sortie de l'amplificateur opérationnel et la masse.

Enfin, il faut signaler que la mesure du courant est entachée d'une légère erreur, dû au facteur de court-circuit  $\frac{R_e}{R_e + R_i}$ ,  $R_e$  étant la résistance externe du compartiment baigné par le saccharose.  $R_e$  n'est jamais infinie, et une fraction du courant s'écoule par l'extérieur de la fibre.

La mesure du courant, qui s'effectue par la lecture de la d.d.p. sur  $R_i$ , ignore donc cette fraction.

Le facteur de court-circuit, évalué pour la fibre de crabe, sur notre cuve expérimentale, par MOUNIER (1975), est fréquemment égal à 0.9, et jamais inférieur à 0.8.

## II - Critères de validité

Compte tenu de l'emploi d'électrodes externes, ainsi que de la fragilité des fibres musculaires, qui interdisent l'emploi systématique de microélectrodes de contrôle interne, il est nécessaire

de se fixer un certain nombre de critères permettant de juger du bon état physiologique de la préparation, et d'une bonne imposition du courant ou du potentiel.

### 1) Courant imposé

Les enregistrements en courant imposé sont jugés valables lorsque leur décours est comparable aux résultats obtenus à l'aide de microélectrodes internes. En particulier, les critères retenant l'attention seront la durée et l'amplitude du potentiel d'action.

### 2) Potentiel de repos

Il a été procédé à des contrôles de potentiel de repos, compte tenu de la singularité du traitement par notre solution de référence (ASW-TEA-4AP-Cs).

Dans ces conditions, le potentiel de repos (PR) a des valeurs comprises entre - 70 mV et - 85 mV, soit une hyperpolarisation d'environ 10 mV par rapport aux PR enregistrés en ASW.

Le potentiel de référence utilisé dans nos expériences (ou HP : holding potentiel) a toujours été fixé à - 75 mV.

### 3) Potentiel imposé

Les critères de validité d'une bonne imposition de potentiel ont été inspirés des travaux de MOUNIER (1975), sur cette préparation.

En particulier, il a été accordé une attention spéciale à l'absence de décrochement entre le courant capacitif et le

début du courant entrant, signe symptomatique d'un potentiel d'action indésirable naissant spontanément dans un des compartiments externes (Voir par exemple tracé f de la figure 17, MOUNIER (1975)).

## F - EXPRESSION DES RESULTATS

Les conventions suivantes ont été utilisées dans les textes et les figures.

### - Courants ioniques

- \* Les courants positifs d'un point de vue électrique sont dits sortants.
- \*  $I_{Ca}$ ,  $I_K$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Cl}$  = courants portés par les ions calcium, potassium, sodium et chlore, respectivement.
- \* Ces courants sont mesurés en  $\mu A$  = microampères

### - Potentiels

- \* Le symbole E est utilisé pour désigner un potentiel par rapport à la masse :  $E_R$  = potentiel de repos (ou PR)
- $E_m$  = potentiel de membrane
- $E_{Ca}$ ,  $E_K$ ,  $E_{Na}$ ,  $E_{Cl}$  = potentiels d'équilibre des ions  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , respectivement
- \* Le symbole V est utilisé pour une variation de potentiel à partir du potentiel de repos. V est

positif pour une dépolarisation, et négatif pour une hyperpolarisation.

D'où les symboles :

$V_{Ca}$ ,  $V_K$ ,  $V_{Na}$ ,  $V_{Cl}$  : qui désignent les potentiels d'inversion des ions  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  : c'est à dire la variation de potentiel à imposer, comptée à partir du PR, pour atteindre  $E_{Ca}$ ,  $E_K$ ,  $E_{Na}$ , ou  $E_{Cl}$ .

#### - Conductances ioniques

Le symbole des conductances,  $G(\Omega)$  est associé au symbole chimique pour désigner les conductances spécifiques de la membrane envers les ions :  $G_{Ca}$ ,  $G_K$ ,  $G_{Na}$ ,  $G_{Cl}$  désigneront donc les conductances au  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Cl^-$ .

#### - Autres symboles

Sont également utilisés dans ce travail :

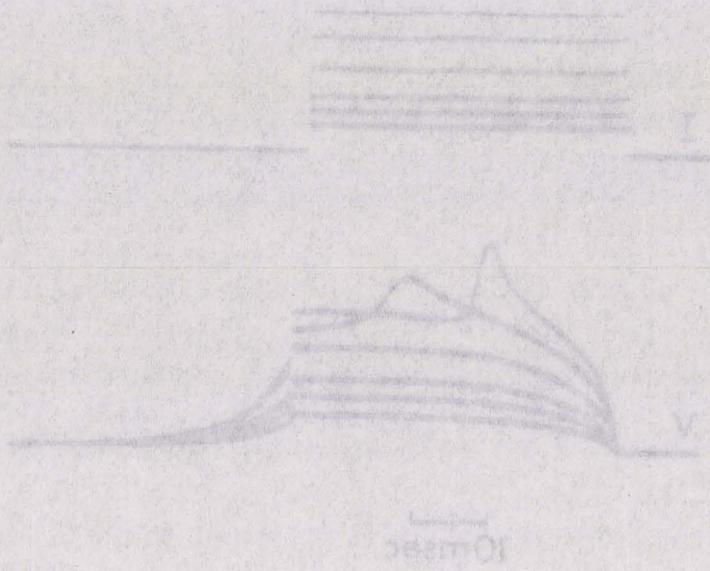
\*  $f_1$ ,  $f_2$  (sans unité) : désignent la variable servant à mesurer le degré d'inactivation d'un courant.

Ceci sera expliqué dans le chapitre B(II).

\*  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  (en millisecondes) : constantes de temps d'inactivation.

200  
A<sub>μ</sub>

50  
V<sub>mV</sub>

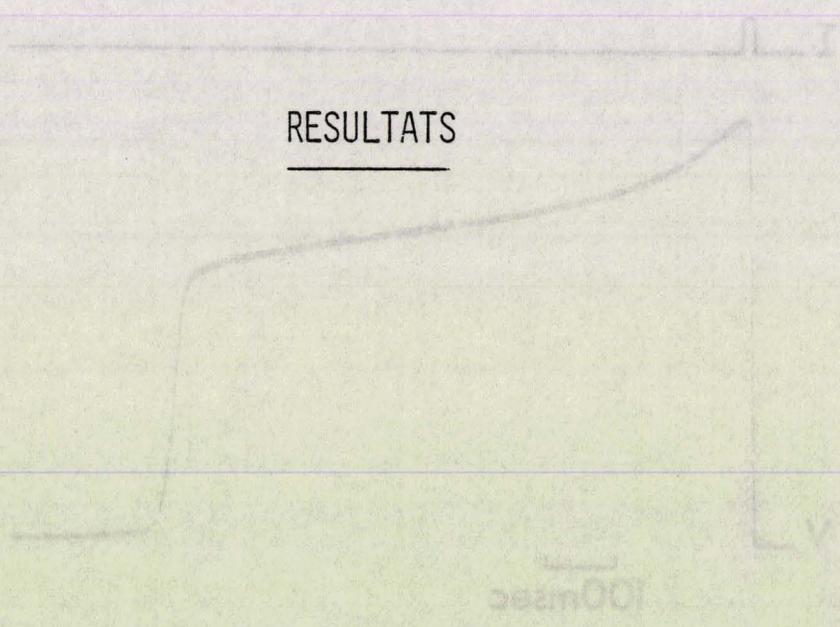


(A)

RESULTATS

20  
A<sub>μ</sub>

50  
V<sub>mV</sub>



(B)

Figura 1

Alguns efectes de les propietats elèctriques de les cèl·lules  
 iòniques, es mostren en les figures A i B.  
 A - A2U (amb un mínim de 100 pA) i B - A2U (amb un mínim de 10 pA).  
 Nota: els diferencials de temps de les corbes.

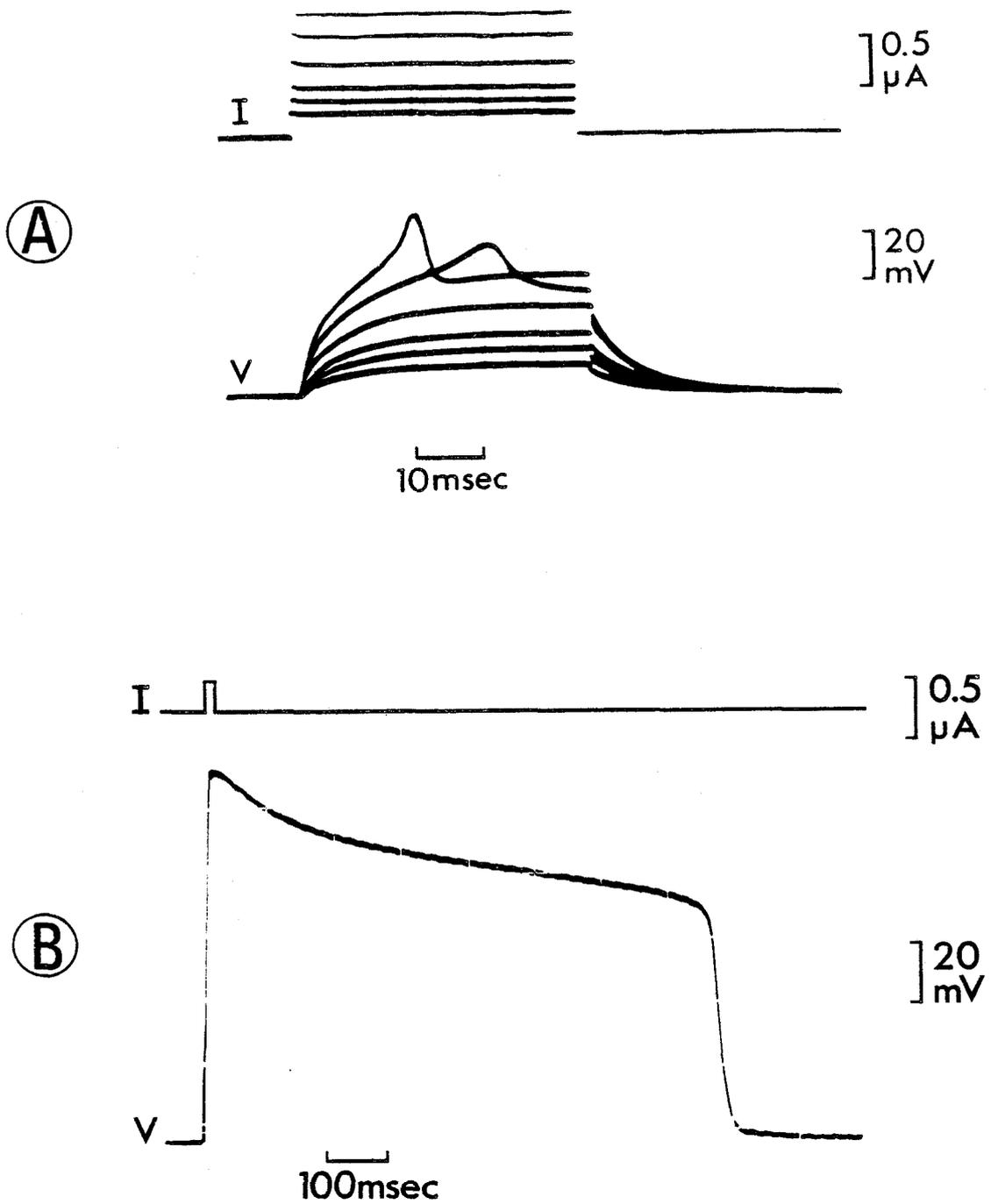


Figure 5

Activité électrique de fibres musculaires interrogées par courant imposé, et placées en solution :

A - ASW (Eau de mer artificielle)

B - SR (ASW - TEA - 4AP - Cs - 0 K) (fibre n° 1933).

Noter la différence de base de temps.

## A - LE COURANT CALCIQUE -

### I - Activité Electrique

Dans des conditions physiologiques standard, la fibre musculaire de crabe étant placée en solution ASW, l'activité électrique est de type gradué. En effet, l'application de courants dépolarisants entraîne d'abord une réponse purement passive, puis donne naissance, pour des stimulations d'intensité croissante, supraliminaire, à des potentiels d'action, PA, dont l'amplitude est fonction de l'intensité du courant qui l'a provoqué (Fig. 5A).

Par contre, après une heure d'imbibition en ASW-TEA-4AP-Cs, notre solution de référence (SR) pour ce travail, le potentiel d'action déclenché par un courant supraliminaire de courte durée a des caractéristiques qui ne dépendent plus de l'intensité du courant de stimulation. La figure 5(B) illustre l'aspect d'un tel PA de type "tout ou rien" :

a) sa phase de dépolarisation est extrêmement rapide, par opposition à la relative lenteur d'un PA enregistré en ASW ;

b) sa durée est supérieure à celle d'un PA obtenu en ASW, de plusieurs ordres de grandeur : environ 800 millisecondes pour le PA de la figure 5B, contre 10 à 15 millisecondes en ASW ;

c) enfin, son amplitude est considérablement augmentée.

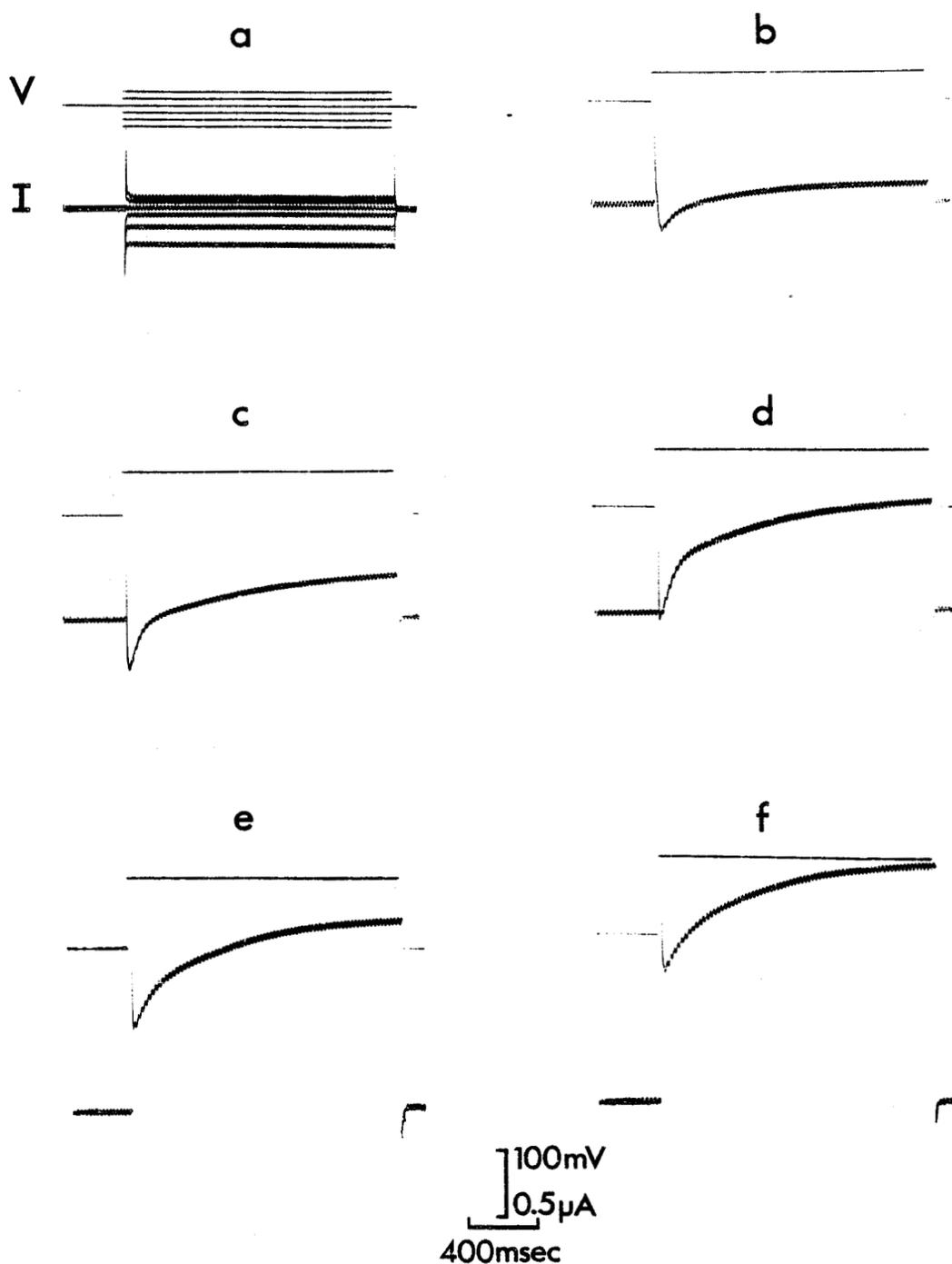


Figure 6

Courants ioniques (I) consécutifs à l'imposition de potentiel (V) croissants pour une fibre baignée en solution SR.

Valeur des potentiels imposés :

en a : - 20, - 10, + 10 et + 20 mV

b : + 40 mV

c : + 60 mV

d : + 80 mV

e : + 100 mV

f : + 120 mV

(fibre n° 2673).

Elle atteint 120 mV à son maximum. Rappelons que la concentration externe en calcium est ici de 5 mM/l.

## II - Courants ioniques

La figure 6 représente les courants ioniques membranaires (I) consécutifs à l'imposition d'un potentiel (V). Ce potentiel, d'une durée égale à 1700 msec, est d'amplitude croissante.

Pour des V imposés d'amplitude faible, généralement inférieure à + 30 mV, de même que pour des V imposés hyperpolarisants (Fig. 6a), la réponse membranaire est relativement simple : elle est composée d'un courant transitoire représentant la charge de la capacité membranaire, suivi d'un courant d'intensité invariable dans le temps, qui représente le courant de fuite.

Par contre, lorsque l'amplitude du V imposé dépolarisant croît, le courant membranaire présente un aspect totalement différent. Immédiatement après le courant capacitif, apparaît un courant s'activant dans le sens entrant (Fig. 6b). Ce dernier devient même net entrant (Fig. 6c, d) c'est à dire qu'il prend des valeurs négatives : ceci malgré l'existence constante d'un courant de fuite, dans le sens sortant.

Au delà de  $V = + 80$  mV (Fig. 6e, f) environ, le courant ne présente plus de partie négative, mais l'écart entre le minimum sortant et le courant en fin d'impulsion demeure très important.

Il faut signaler que de tels potentiels ( $V > + 100$  mV) sont rarement imposés aux fibres musculaires, avec une durée si longue, compte tenu du danger de détérioration que cela implique.

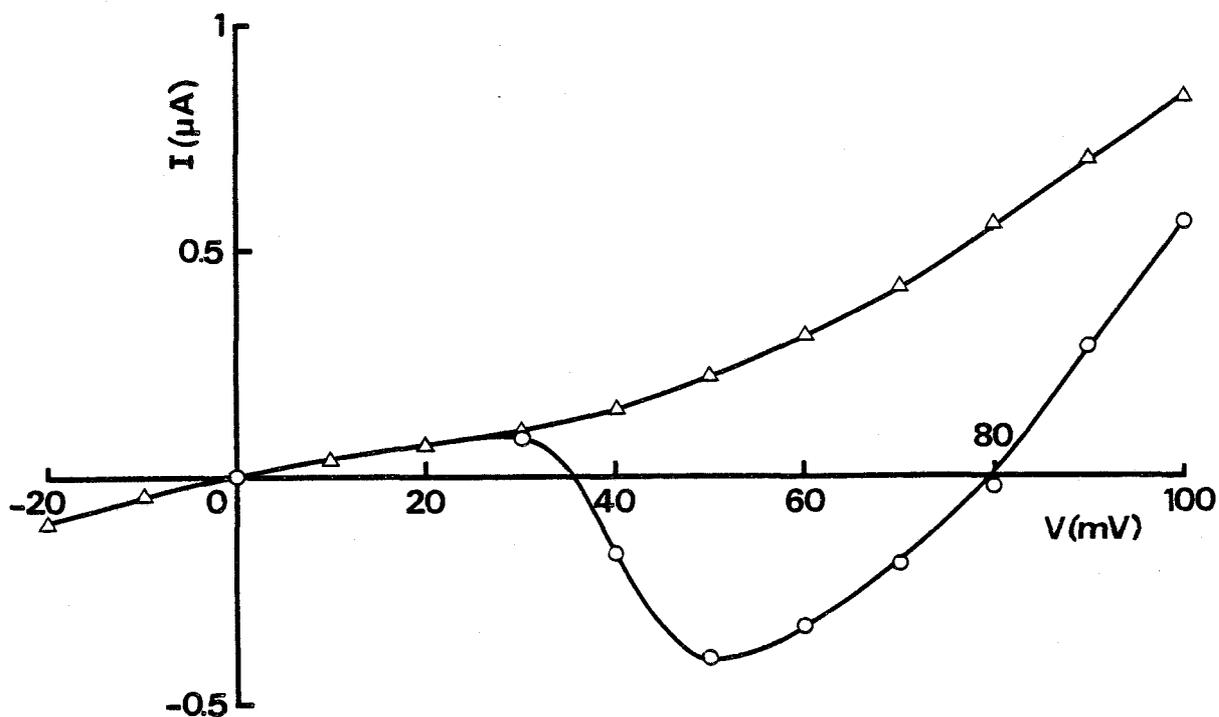


Figure 7

Courbe courant-potentiel représentant les valeurs de courants mesurés :

- au maximum de courant entrant (○) pour une fibre placée en solution SR

- en fin d'impulsion de 1700 msec de durée, en solution SR -  $\text{Co}^{++}$

(Voir figure 10). (▲).

(Même fibre que figure 6).

Ces courants présentent, après une phase d'activation très rapide, une phase de diminution nettement plus longue. Les crêneaux de longue durée (1700 msec ici), permettent en effet tout juste une stabilisation du courant en fin d'impulsion.

Il est d'ores et déjà à noter que la diminution de ce courant entrant s'effectue, dans la majorité des cas, suivant une double exponentielle. Nous reviendrons plus loin sur ce phénomène.

Enfin, à la cessation du crêneau de potentiel imposé, le courant revient à une valeur nulle, après un courant capacitif correspondant à la décharge du condensateur membranaire.

Il est possible de porter sur un graphe les valeurs de courant et de potentiel. La courbe obtenue, qui traduit la relation courant-potentiel (courbe I/V), est illustrée à la figure 7 (cercles).

Les valeurs de courant, portées en ordonnée, représentent les mesures au maximum de courant entrant, ou au minimum de courant sortant. Ce courant est activé pour un V voisin de + 30 mV, passe par un maximum pour un V = + 50 mV, puis diminue et s'annule pour V = + 80 mV. Pour des V supérieurs à + 80 mV, ce courant apparaît sortant.

### III - Méthode de lecture du courant calcique

De façon à déterminer la fraction de courant portée par les ions calcium, une solution cobalt a été appliquée.

Sur la figure 8, on a représenté la superposition des courants ioniques obtenus pour un potentiel de + 60 mV et 1700 msec de durée, en solution de référence, puis en présence de cobalt à la

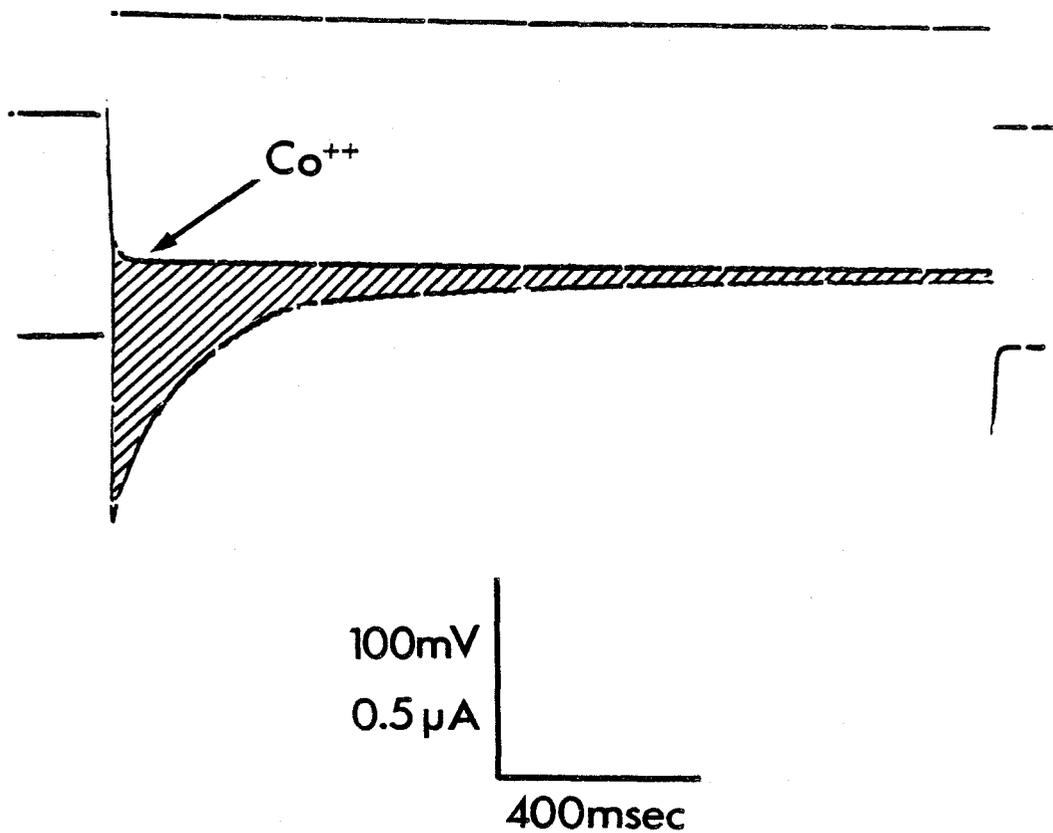


Figure 8

Superposition des courants ioniques obtenus par imposition d'un potentiel de + 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée pour une fibre placée successivement

- en solution SR
- en solution SR -  $\text{Co}^{++}$  ( $\text{Co}^{++}$ ).

La zone hachurée représente l'influx de calcium pendant le pulse.  
(fibre n° 1933).

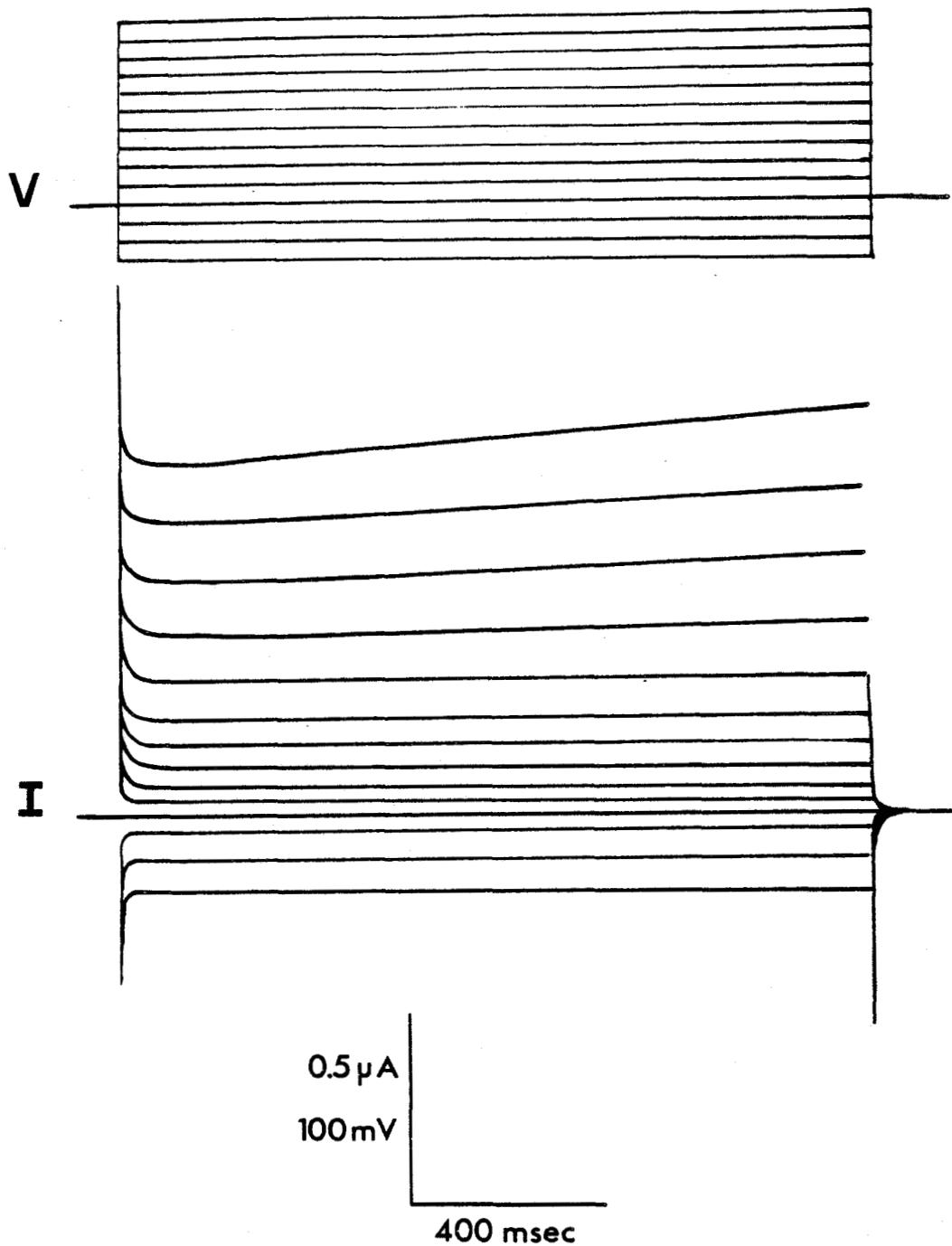


Figure 9

Courants ioniques (I) obtenus pour des V imposés croissants (V) de 1700 msec de durée, pour une fibre en solution SR =  $\text{Co}^{++}$ .

(Courants redessinés d'après le film photographique).

(Même fibre que figure 6 et 7).

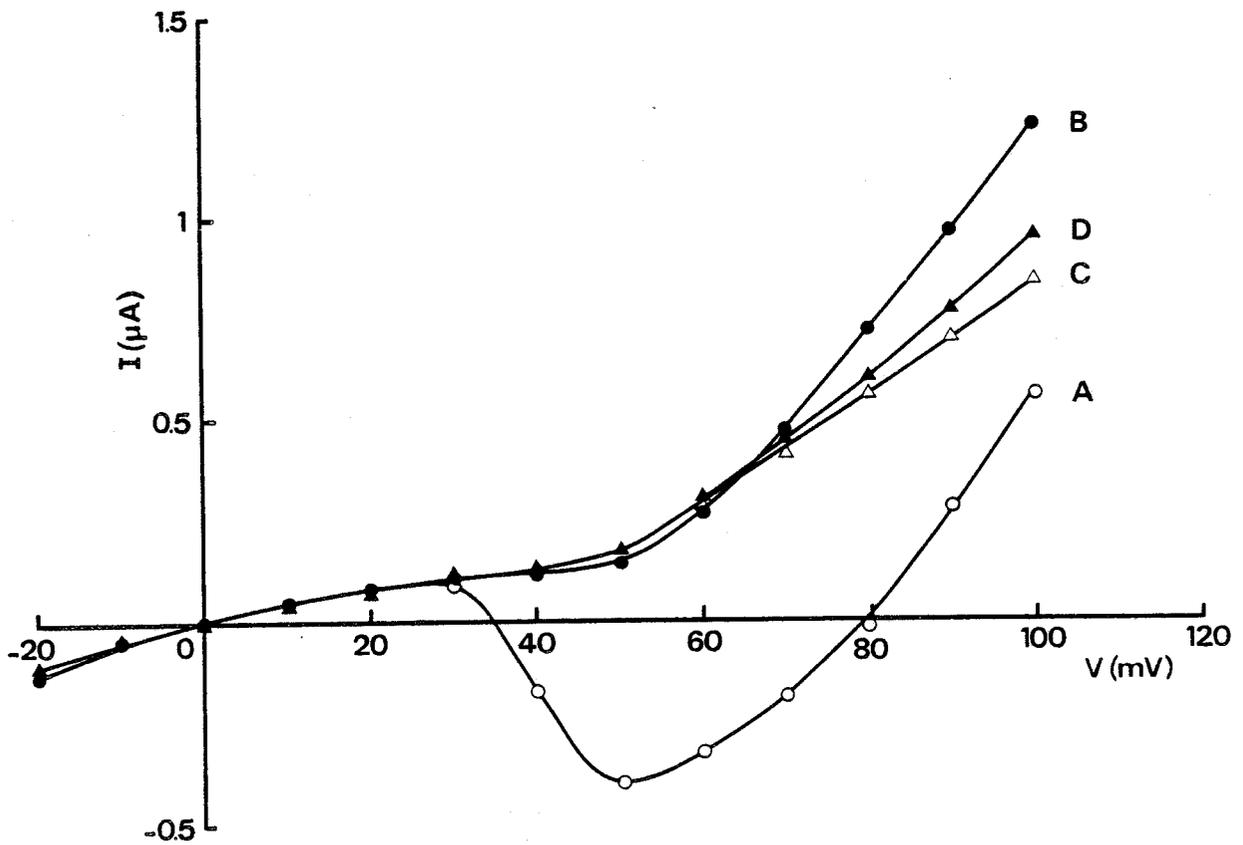


Figure 10

Courbes courant-potentiel représentant en fonction des  $V$  imposés, les courants mesurés :

\* pour une fibre placée en solution SR :

- au maximum de courant entrant : courbe A (○)
- en fin d'impulsion de 1700 msec de durée : courbe B (●)

\* pour cette fibre, placée en solution SR -  $\text{Co}^{++}$  :

- en début d'impulsion : courbe C (△)
- en fin d'impulsion de 1700 msec de durée : courbe D (▲).

(Même fibre que figures 6, 7 et 9).

concentration de 20 mM/l : solution SR -  $\text{Co}^{++}$ . Le courant en présence de cobalt devient stationnaire. La différence entre le courant entrant avant le traitement  $\text{Co}^{++}$  et le courant stationnaire représente l'influx d'ions calcium, (partie hachurée sur cette figure).

La figure 9 représente les courants ioniques obtenus pour différents potentiels imposés en présence de cobalt. Pour des potentiels supérieurs à + 60 mV une légère rectification retardée, dans le sens sortant, est visible.

La figure 10 représente la courbe courant-potentiel obtenue en solution SR, puis en SR -  $\text{Co}^{++}$ , pour des mesures en début et en fin d'impulsions de 1700 msec. La courbe A traduisant l'évolution du courant initial calcique en fonction de V est le report de celle précédemment décrite (Fig. 7). La courbe B correspond aux mesures en fin d'impulsion en solution SR. Pour des potentiels imposés supérieurs à + 60 mV, une rectification sortante apparaît. Il est à noter que cette courbe B présente une inflexion dans la gamme des V compris entre + 30 et + 60 mV, phénomène qui pourrait résulter du fait qu'après 1700 msec le courant entrant n'est pas totalement inactivé. En effet, sur certaines préparations où des durées identiques permettent d'atteindre un état stable apparent, ce phénomène n'apparaît généralement plus (c'est le cas Fig. 11).

En présence de cobalt, les mesures correspondant au courant initial et celles au courant en fin d'impulsion sont respectivement reportées sur les courbes C et D. Les mesures du courant initial en présence de  $\text{Co}^{++}$  (courbe C) sont celles reportées sur la figure 7. Les mêmes mesures ont été effectuées sur une fibre pour laquelle des impulsions de 1600 msec ont permis d'atteindre l'état stable (Fig. 11).

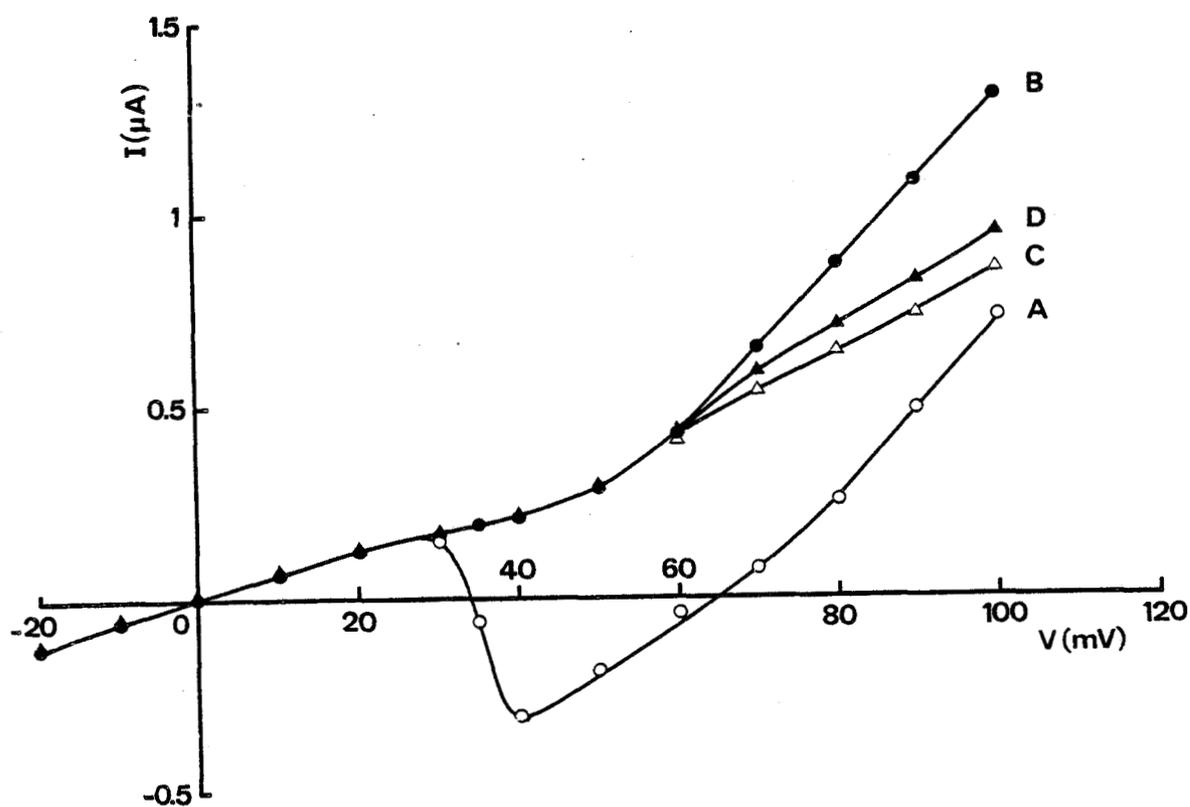


Figure 11

Courbes courant-potentiel représentant, en fonction des  $V$  imposés, les courants mesurés :

\* pour une fibre placée en solution SR :

- au maximum de courant entrant : courbe A (○)
- en fin d'impulsion de 1700 msec de durée : courbe B (●)

\* pour cette fibre, placée en solution SR -  $Co^{++}$  :

- en début d'impulsion : courbe C (△)
- en fin d'impulsion de 1700 msec de durée : courbe D (▲).

(fibre n° 3063).

Dans ce cas, les résultats sont comparables à ceux obtenus sur la figure 10. Sur celle-ci, la comparaison entre les courbes B et D met en évidence un effet du cobalt sur le courant en fin d'impulsion.

La différence entre les courbes C et A permet d'obtenir l'évolution du courant calcique seul, en fonction du potentiel. La figure 12 représente l'évolution de ce courant calcique  $I_{Ca}$ . Il s'active pour des potentiels imposés voisins de + 30 mV. Cette valeur est conforme à celle obtenue comme seuil d'apparition des potentiels d'action en condition de potentiel imposé. L'extrapolation de la courbe  $I_{Ca}/V$  vers les dépolarisations croise l'axe des potentiels pour  $V = + 122$  mV.

Cette valeur de potentiel d'inversion est nettement plus élevée que celle obtenue en ASW (70 à 80 mV), condition où les courants potassiques  $I_{K1}$  et  $I_{K2}$ , dirigés dans le sens sortant, masquent une partie du décours réel du courant calcique. Sur cinq autres préparations, des valeurs comprises entre + 120 et + 140 mV ont été obtenues. Nos mesures de potentiel de repos sont généralement voisines de - 75 mV. Ceci nous permet donc d'évaluer le potentiel d'équilibre calcique  $E_{Ca}$  à des valeurs comprises entre + 45 et + 65 mV. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles proposées par HENCEK et ZACHAR (1977) sur la fibre musculaire d'écrevisse, ( $E_{Ca} \approx + 85$  mV) mais supérieure à celles précédemment obtenues sur notre préparation par MOUNIER et VASSORT (1975) ( $E_{Ca} \approx + 30$  mV). La différence réside dans le fait que nos conditions expérimentales permettent un blocage plus important des courants potassiques antagonisant  $I_{Ca}$ .

L'étude de l'activité électrique, ainsi que celle des courants ioniques, dans les conditions précitées, met donc en évidence les points suivants :

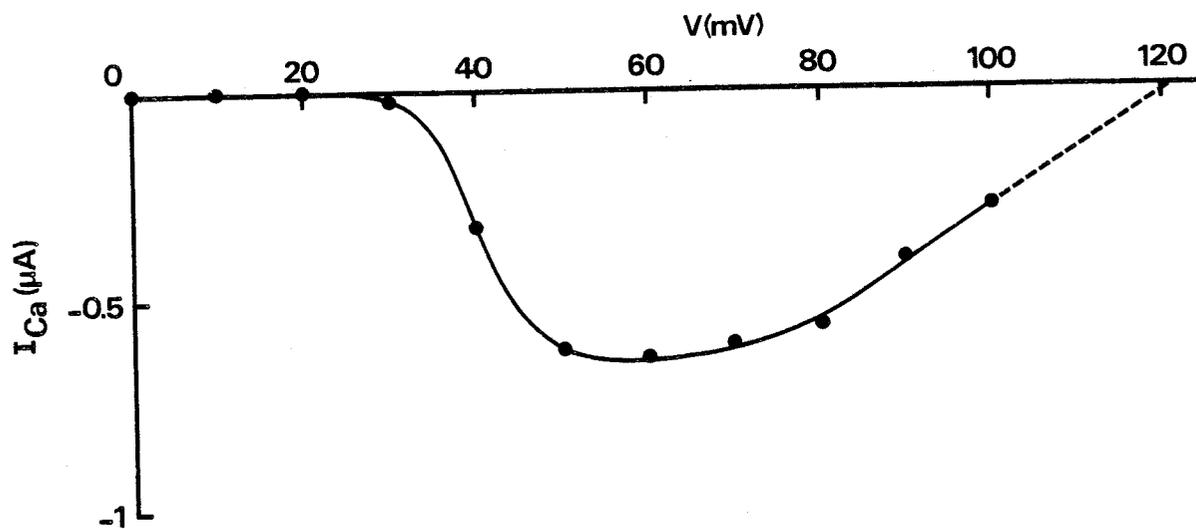


Figure 12

Courbe courant potentiel représentant l'évolution du courant entrant calcique,  $I_{Ca}$ , en fonction du  $V$  imposé.

(Même fibre que figure 6, 7, 9 et 10).

a) Le PA, de type tout ou rien dans nos conditions, est caractérisé par une vitesse de dépolarisation élevée, une durée très grande, et une amplitude nettement supérieure à celle des PA gradués obtenus en ASW.

b) Les courants ioniques obtenus dans une gamme de potentiels imposés dépolarisants inférieurs à + 70 mV, sont pratiquement exempts de courants sortants, et peuvent donc être considérés comme purement calciques. L'addition à la solution physiologique de référence d'ions cobalt permet de déterminer la partie du courant portée par les ions calcium.

Dans l'étude de l'inactivation du canal calcique qui va suivre, les potentiels test utilisés seront choisis égaux à + 50 ou + 60 mV. Comme nous venons de le montrer cette gamme d'amplitude nous permet de mesurer correctement  $I_{Ca}$  sans que notre lecture ne soit sensiblement influencée par les courants sortants.

## B - INACTIVATION DU COURANT CALCIQUE

Lors des expériences de potentiel imposé, la diminution du courant entrant  $I_{Ca}$  peut être due à plusieurs mécanismes intervenant séparément ou conjointement, et que nous avons décrit en introduction de ce mémoire. Rappelons les brièvement :

a) une inactivation de la conductance calcique,  $G_{Ca}$ , dépendant du potentiel imposé, et du temps, selon le schéma type décrit par HODGKIN et HUXLEY pour le canal sodique. (HODGKIN et HUXLEY, (1952 ) ;

b) une inactivation de la conductance calcique, dépendant du courant de calcium lui-même, selon un processus proposé par BREHM et ECKERT (1978) ;

c) une diminution du potentiel d'équilibre des ions  $Ca^{++}$ , due à une accumulation de ces ions à l'intérieur de la fibre musculaire ou encore à leur déplétion dans l'espace péricellulaire. Ceci se traduirait par une diminution du facteur  $V-V_{Ca}$  ("Driving-force") ;

d) enfin, une activation d'un courant sortant retardé, qui masquerait le courant calcique, mimant ainsi une diminution de  $I_{Ca}$ . Ce courant sortant serait probablement de nature potassique, incomplètement bloqué par les inhibiteurs utilisés.

Les expériences décrites auront donc pour but

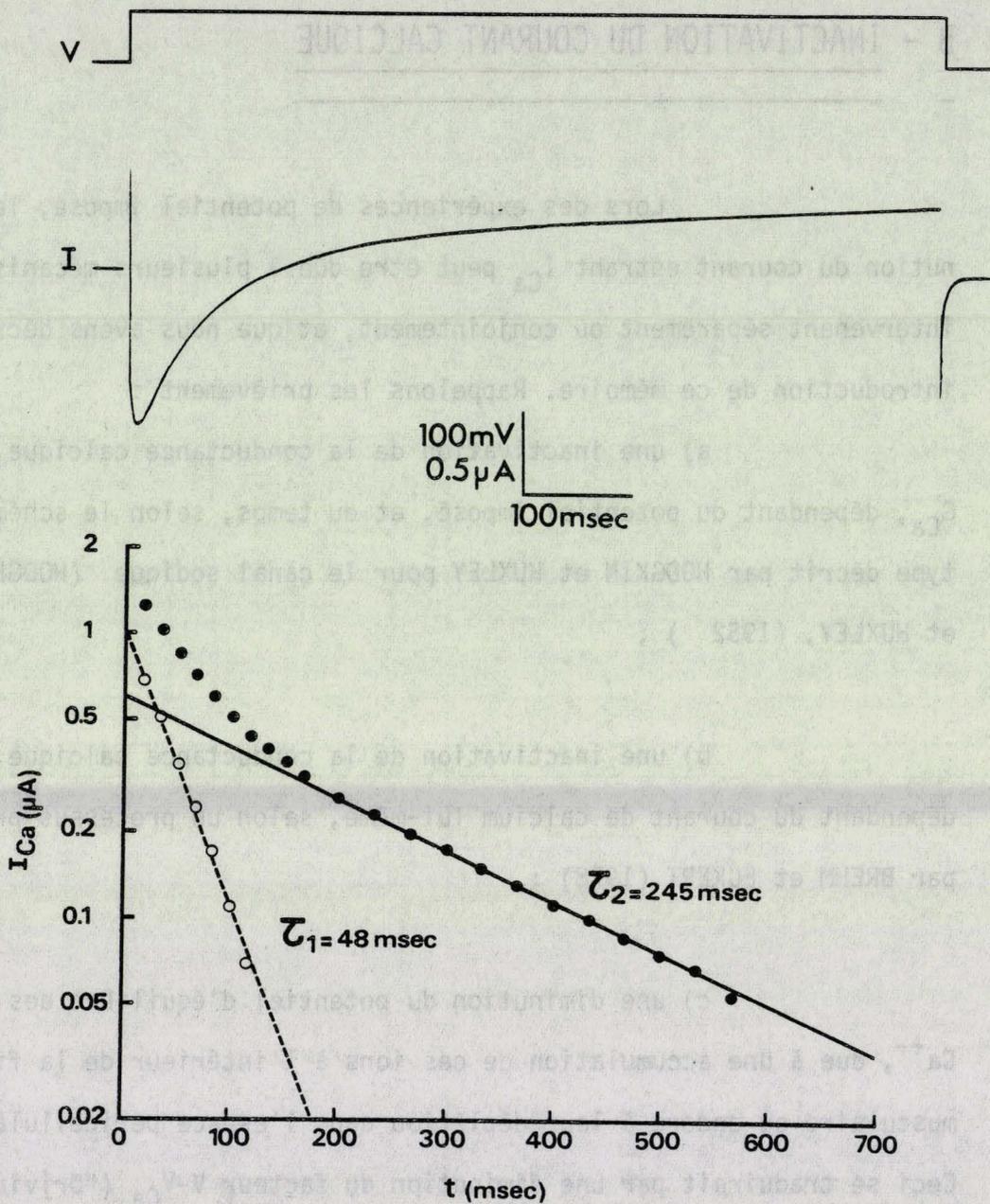


Figure 13

Mise en évidence des deux constantes de temps d'inactivation :

- \* en haut : courant calcique obtenu par imposition d'un potentiel de + 60 mV d'amplitude
- \* en bas : report semilogarithmique de la diminution du courant en fonction du temps

Symboles :

- : amplitude du courant global
- : différence calculée entre les points expérimentaux et l'extrapolation de la droite de pente  $\tau_2$ .

(fibre n° 12103).

d'élucider la cause de la diminution du courant  $I_{Ca}$ , ainsi que ses modalités.

## I - DIMINUTION DE $I_{Ca}$

### 1) Cinétiques

Il convient d'ores et déjà de préciser un fait très important quant à la cinétique de diminution de  $I_{Ca}$ . En effet, sur la plupart des préparations, cette diminution s'effectue suivant une double exponentielle, comme le montre la figure 13, traduisant l'évolution de  $I_{Ca}$  en fonction du temps, en coordonnées en semi-logarithmiques.

Le calcul de la pente de la droite reliant les points de mesure du courant en fin d'impulsion donne la valeur de la constante de temps lente,  $\tau_2$ .

La différence entre les points expérimentaux du début et l'extrapolation de la droite de pente  $\tau_2$  donne une série de points qui, reportés sur l'échelle semi-logarithmique, permettent de calculer la constante de temps rapide,  $\tau_1$ .

Le tableau 2 regroupe différentes valeurs des constantes de temps  $\tau_1$  et  $\tau_2$  obtenues lors de différentes expériences :

- la constante du temps  $\tau_1$  a des valeurs comprises entre 30 et 71 millisecondes : ( $m \pm s.e.m. = 48,2 \pm 4,1$  msec) pour des impulsions de 50 à 60 mV d'amplitude ;

- la constante  $\tau_2$  s'échelonne de 145 à 500 msec ( $381,2 \pm 44$  msec).

Néanmoins, sur certaines préparations, et plus particulièrement lorsque le courant  $I_{Ca}$  est de faible amplitude, sa

numéro de fibre	$\tau_1$ (msec)	$\tau_2$ (msec)	Amplitude du pulse test (mV)
2042	54	210	60
1052	28	363	50
2772	71	272	60
133	42	145	50
433	30	335	60
1533	30	289	60
2243	50	462	50
2653	50	410	60
2063	53	610	60
3063	58	617	60
19103	64	490	60

Tableau 2

Récapitulatif des deux constantes de temps d'inactivation de différentes fibres.

diminution s'effectue suivant une seule exponentielle. Dans ce cas, la constante de temps a une valeur proche de la constante  $\tau_1$  (rapide) des fibres présentant une double exponentielle.

La signification physiologique de cette double cinétique sera discutée plus loin, mais il faut dès maintenant montrer qu'il ne s'agit pas là d'un artéfact expérimental dû à l'activation transitoire d'un courant sortant. Si tel était le cas ce courant sortant pourrait s'activer sous l'effet du potentiel, ou du courant entrant  $I_{Ca}$  lui-même.

2) La diminution de  $I_{Ca}$  : activation d'une conductance sortante ou décroissance de la conductance calcique ?

L'hypothèse de l'activation d'un courant sortant se greffant sur le vrai décours du courant  $I_{Ca}$  et rendant compte d'une décroissance bi-exponentielle a été étudiée par divers protocoles expérimentaux dont les résultats sont exposés ici.

a) L'addition à la solution de référence SR de cobalt à la concentration de 20 mM/l ne laisse subsister qu'un courant d'allure monotone, et supprime totalement les deux composantes, alors que nous avons vu que pour des V imposés de 50 ou 60 mV, le cobalt n'a pas d'effet propre sur le courant en fin d'impulsion.

b) Lorsque, après un créneau de potentiel imposé d'amplitude  $V_1 = + 60$  mV, de durée croissante, la fibre est repolarisée à  $V_2 = + 15$  mV, les courants de désactivation (courants de queue, ou "Tail Currents") doivent révéler le comportement, et la nature, des

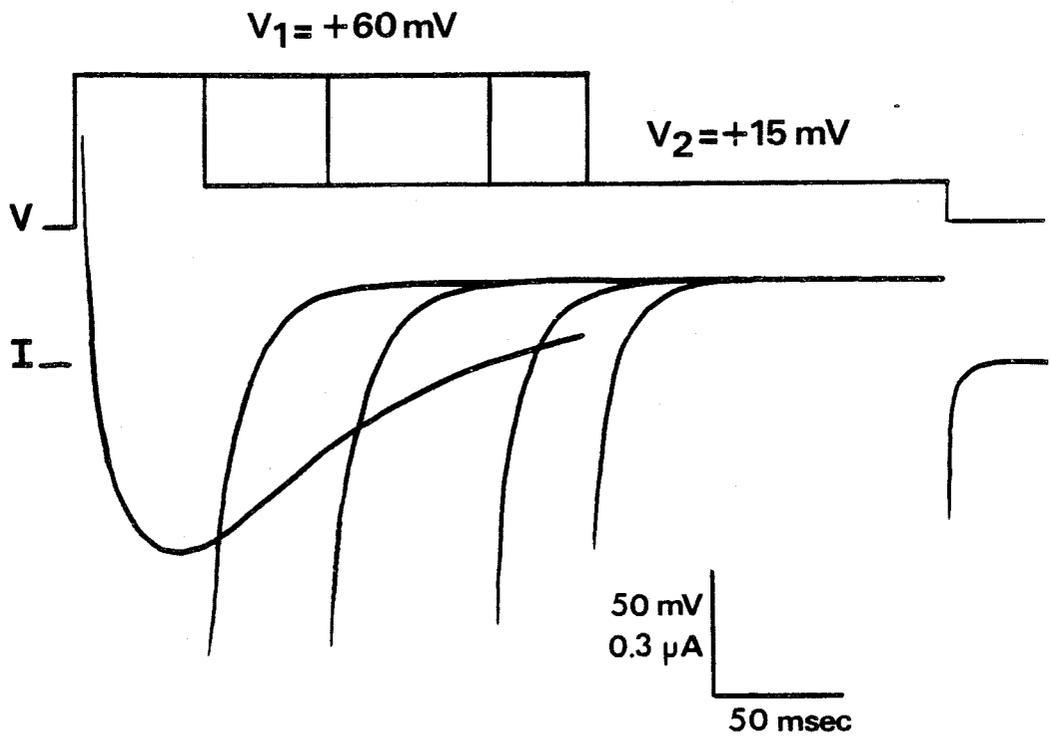


Figure 14

Courants de d activation de la conductance calcique lors du retour à  $V_2 = +15 \text{ mV}$  après un cr neau imposé  $V_1$  de  $+60 \text{ mV}$ .  
(fibre n  13103).

conductances activées par le premier crêneau de potentiel  $V_1$ .

Le potentiel  $V_2$ , de + 15 mV, a été choisi pour favoriser au maximum un éventuel courant sortant d'ions potassium. En effet, pour  $V = + 15$  mV, la force électromotrice (driving-force)  $V - V_K$  est plus importante que si l'on repolarisait à  $V_2 = 0$  mV sachant que  $E_K$  est très proche du potentiel de repos ( $E_R = HP$ ) (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, 1970).

La figure 14 montre que les courants de désactivation enregistrés pendant le pulse  $V_2$  sont régulièrement de moins en moins entrants, et non de plus en plus dans le sens sortant. La diminution de  $I_{Ca}$  suivant une double exponentielle ne semble donc pas imputable à l'activation d'un courant sortant, que ce soit  $I_{K1}$ , courant rapide, ou  $I_{K2}$ , courant lent (MOUNIER, 1975).

Par conséquent, la conductance en cause dans la phase de diminution de  $I_{Ca}$  semble bien être la conductance calcique : ce serait  $G_{Ca}$  qui, en diminuant, provoquerait le déclin du courant entrant, en admettant pour l'instant que le facteur driving force reste constant, ce que nous vérifierons.

c) Si la diminution de  $I_{Ca}$  est due à l'activation d'un courant sortant de nature potassique, dépendant de  $I_{Ca}$  lui-même ou du potentiel, on peut s'attendre à ce que le remplacement du  $Ca^{++}$  par le  $Sr^{++}$  supprime ou réduise fortement ce courant sortant. L'effet résulterait, soit de l'absence des ions  $Ca^{++}$ , soit de l'action inhibitrice des ions  $Sr^{++}$  sur les courants sortants potassiques (MOUNIER et VASSORT, 1975 ).

En fait, l'allure des courants en SR- $Sr^{++}$  n'est pas

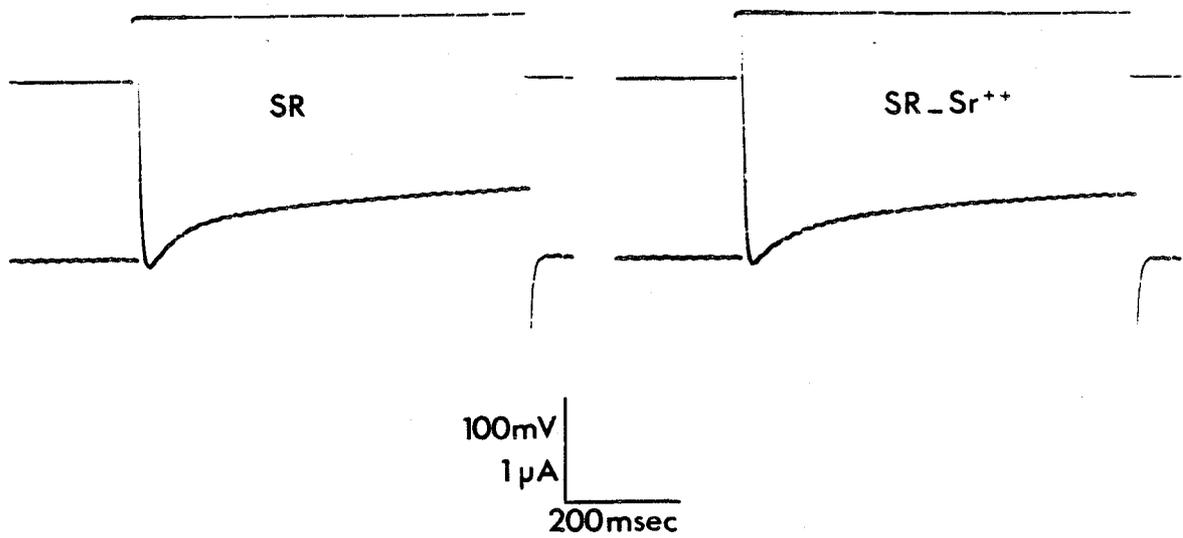


Figure 15

Comparaison des courants ioniques obtenus, pour un potentiel imposé de 60 mV d'amplitude et 700 msec de durée, sur une fibre baignée successivement en solution SR puis en solution SR - Sr<sup>++</sup>.

(même fibre que figure 32, n° 1533).

modifiée. L'inactivation du courant entrant s'effectue encore suivant une double exponentielle (Fig. 15 et 32).

L'existence de ces deux exponentielles ne peut donc être imputée à l'activation d'un courant sortant potassique.

Les caractéristiques du courant  $I_{Ca}$  ayant été décrites, nous allons aborder maintenant l'étude du processus d'inactivation. Ceci se fera en deux temps. En effet, l'analyse portera d'abord sur la fraction de  $I_{Ca}$  qui s'inactive rapidement, que l'on nommera  $I_{Ca1}$ , puis sur la fraction à inactivation lente,  $I_{Ca2}$ .

## II - ETUDE DE L'INACTIVATION DE $I_{Ca1}$

### 1) Mesure du degré d'inactivation

La méthode expérimentale utilisée pour détermination du taux d'inactivation de  $I_{Ca}$  est celle du double pulse. Un pulse test, d'amplitude  $V$  généralement égale à + 50 ou + 60 mV, teste la disponibilité du courant  $I_{Ca}$ . Sa durée est choisie de façon à ce que le courant en fin d'impulsion atteigne un état stable.

L'amplitude a été fixée à + 50 ou + 60 mV pour plusieurs raisons déjà évoquées :

a) c'est à ces potentiels que la conductance  $G_{Ca}$  est activée pratiquement à son maximum, et que le courant  $I_{Ca}$  apparaît maximal. (Cf. Fig. 12)

b) dans cette gamme de potentiels, le courant est exempt de rectification dans le sens sortant (Cf. chapitre A). Ceci

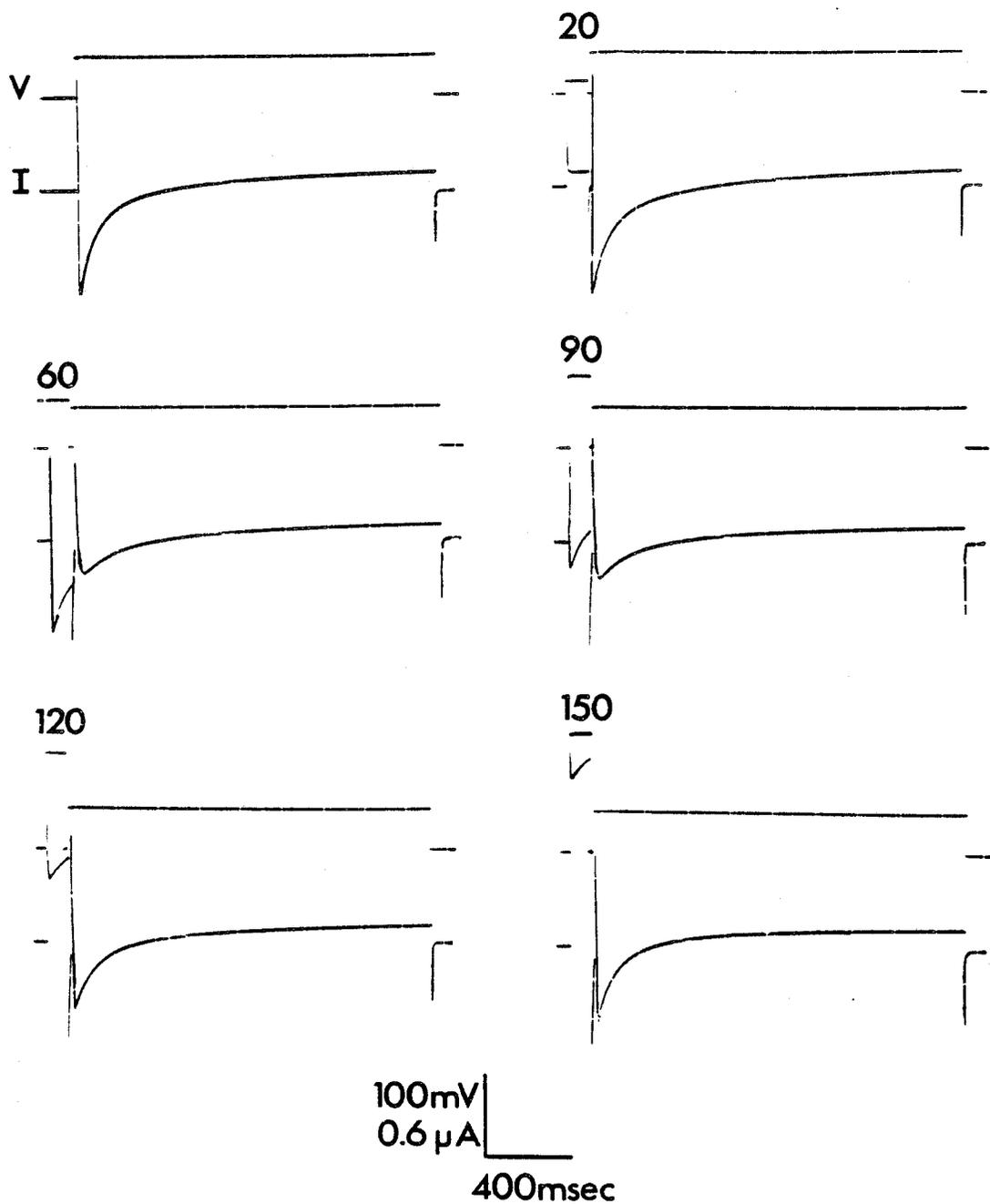


Figure 16

Effet d'un pulse conditionnant de 100 msec de durée et d'amplitude variable (indiquée au dessus du tracé) sur les courants ioniques (I) dus à un V imposé de 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée. (fibre n° 1933).

permet une lecture de  $I_{Ca}$  par la mesure de la différence entre le courant stationnaire en fin de pulse et le courant maximum entrant, sans avoir à utiliser systématiquement les ions cobalt. Les valeurs de  $I_{Ca2}$ , obtenues par extrapolation de la droite de pente  $\tau_2$  en coordonnées semi-logarithmiques, sont retranchées du courant total  $I_{Ca}$ , fournissant ainsi  $I_{Ca1}$  seul.

Le rapport  $\frac{I_{Ca1}}{I_{Ca1 \max}}$ , c'est à dire  $I_{Ca1}$  restant disponible après un pulse conditionnant divisé par notre valeur de référence " $I_{Ca1 \max}$ " obtenue sans pulse conditionnant, pour une mesure du taux d'inactivation, désigné par  $f_1$ .

$$f_1 = \frac{I_{Ca1}}{I_{Ca1 \max}} \quad \Rightarrow \quad 0 < f_1 < 1$$

Signalons de plus qu'un bref intervalle, de durée comprise entre 10 et 40 msec, sépare les deux pulses. (Cf. chapitre Matériel et Méthodes).

La figure 16 présente les résultats obtenus lors d'une expérience mettant en oeuvre ce protocole du double pulse.

Un pulse test d'amplitude  $V_2$  égale à + 50 mV, d'une durée de 1700 msec est ou non précédé d'un pulse conditionnant d'une durée de 100 msec, les deux pulses étant séparés par un intervalle de 20 msec où le potentiel est égal au potentiel de repos. Les valeurs portées au dessus des tracés représentent l'amplitude du pulse conditionnant.

En absence de pulse conditionnant ( $V_1=0$ ) le pulse test déclenche un grand courant entrant qui sera pris comme référence : il est pleinement disponible. Puis, lorsque le pulse test est

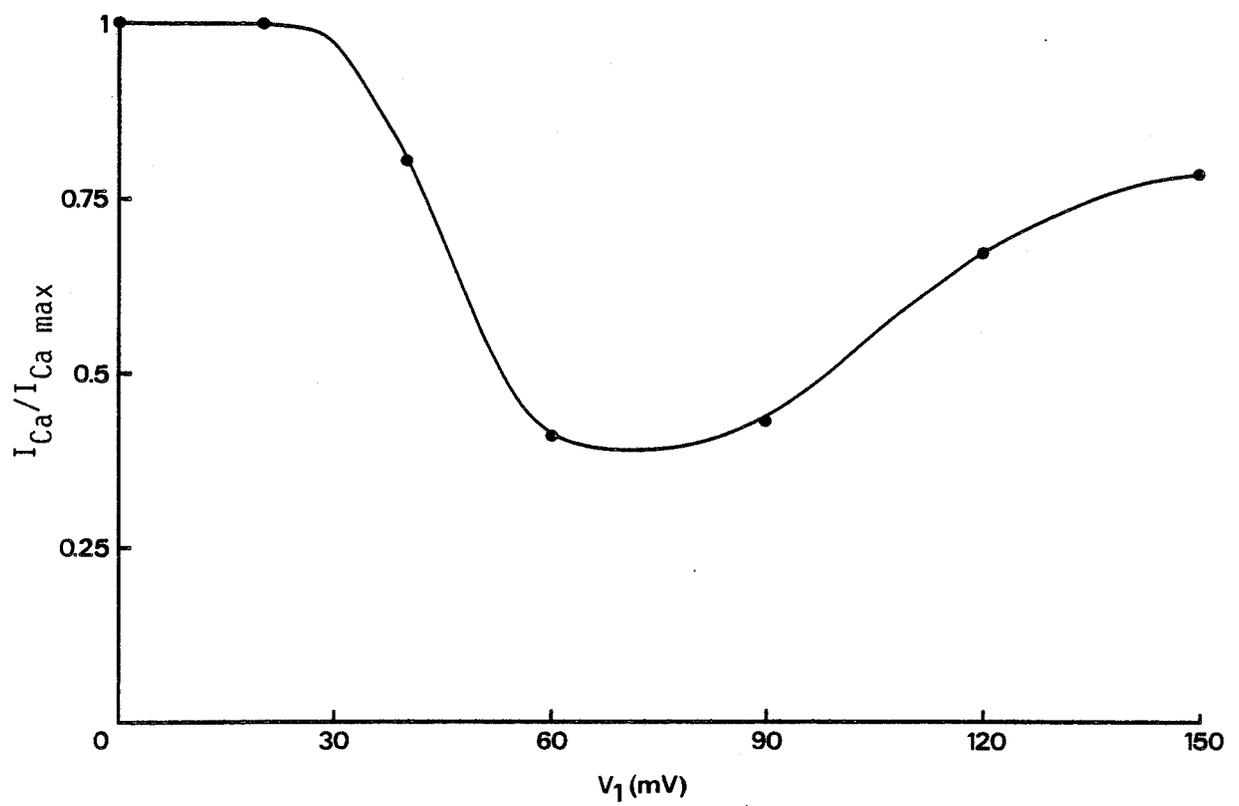


Figure 17

Courbe traduisant l'évolution du rapport  $I_{Ca} / I_{Ca \text{ max}}$  ou degré d'inactivation, en fonction de l'amplitude  $V_1$  du pulse conditionnant. (courbe tracée à la main).  
(même fibre que figure 16, n° 1933).

précédé d'un pulse conditionnant non nul, plusieurs événements prennent place. Pour  $V_1 = + 20$  mV, aucun courant  $I_{Ca}$  n'est déclenché par le pulse conditionnant. Le courant  $I_{Ca}$  dans le test est encore maximal. Par contre, quand  $V_1$  croît ( $V_1 = + 60$  mV) ce prépulse provoque l'apparition d'un grand courant entrant, et le  $I_{Ca}$  dans le test est nettement inférieur à sa valeur de référence : il est moins disponible. Cette diminution est encore nette au tracé suivant, lorsque  $V_1 = + 90$  mV, valeur qui provoque encore un courant net entrant pendant le pulse conditionnant. Par contre, lorsque  $V_1$  croît encore, pour des valeurs égales à  $+ 120$  et  $+ 150$  mV (tracés suivants), et que le courant  $I_{Ca}$  dû au pulse conditionnant diminue, (voir chapitre A, fig. 12) on constate que le courant dans le test ne diminue plus, mais au contraire augmente, et finit, pour  $V_1 = + 150$  mV, par approcher l'amplitude du courant de référence sans toutefois l'égaliser. En définitive, plus le potentiel conditionnant provoque un  $I_{Ca}$  ample, moins le  $I_{Ca}$  dans le test est disponible. L'ensemble de ces résultats est reporté sur la figure 17 traduisant l'évolution du rapport  $I_{Ca}/I_{Ca_{max}}$  en fonction des potentiels conditionnants.

Du courant total  $I_{Ca}$ , il est possible d'extraire la part de courant qui nous intéresse ici,  $I_{Ca1}$ , par la méthode exposée plus haut. C'est ce que représente la figure 18, où l'on voit les tracés semi-logarithmiques des courants test de la figure 16 ainsi que des courants  $I_{Ca1}$  ainsi extraits. A côté de chaque tracé est indiquée l'amplitude du pulse conditionnant  $V_1$  correspondant, ainsi que la valeur des constantes de temps  $\tau_1$  et  $\tau_2$ .

Cette figure met bien en évidence l'effet du potentiel conditionnant sur le courant  $I_{Ca1}$ ,  $I_{Ca1}$  a une amplitude maxima-

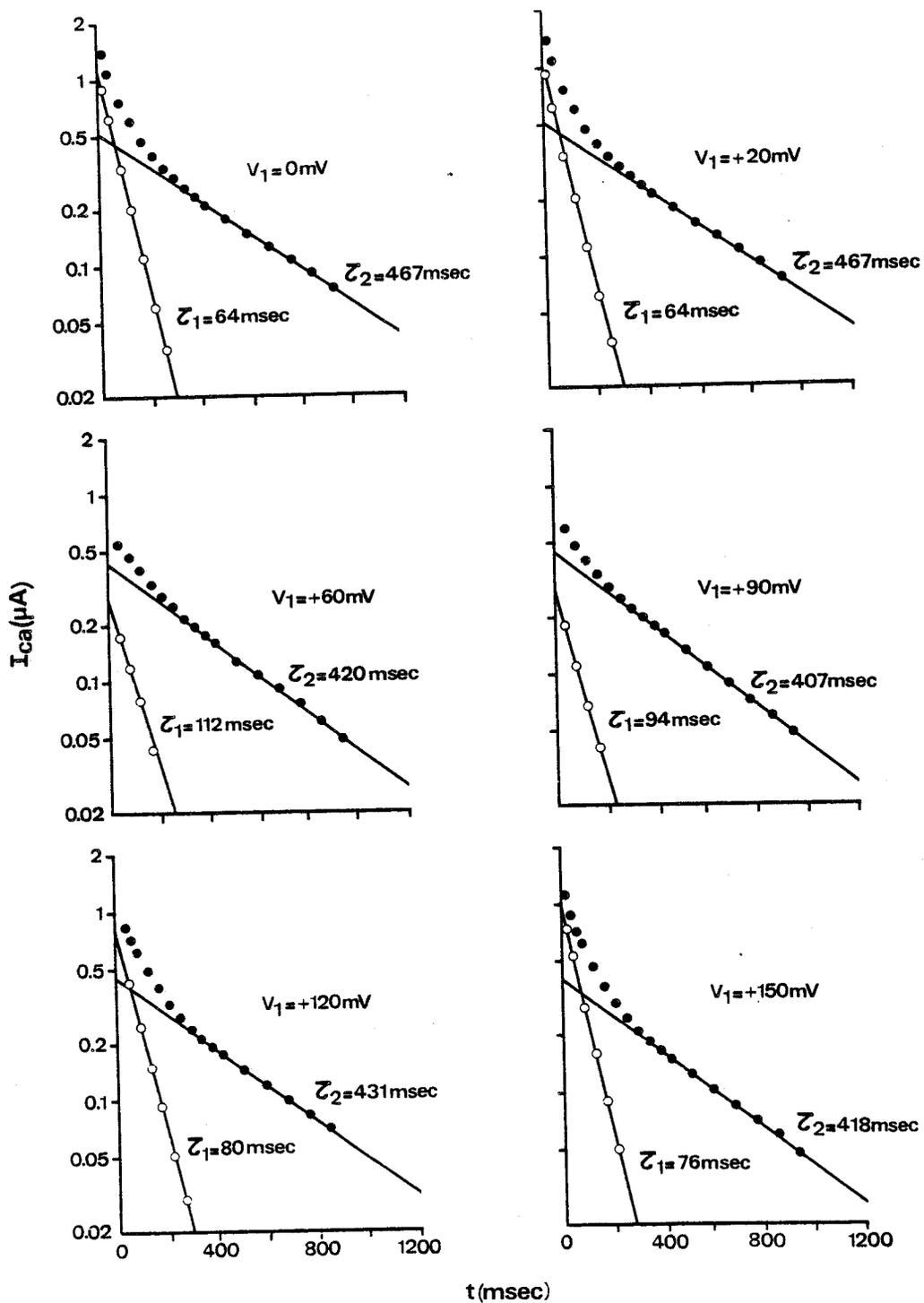


Figure 18

Influence d'un prépulse d'amplitude variable sur le courant calcique :  
reports semi-logarithmiques des courants de la figure 16.

Courant calcique total

Différence calculée entre les points expérimentaux et  
l'extrapolation de la droite de pente  $\tau_2$ .

(même fibre que figures 16 et 17, n o 1933).

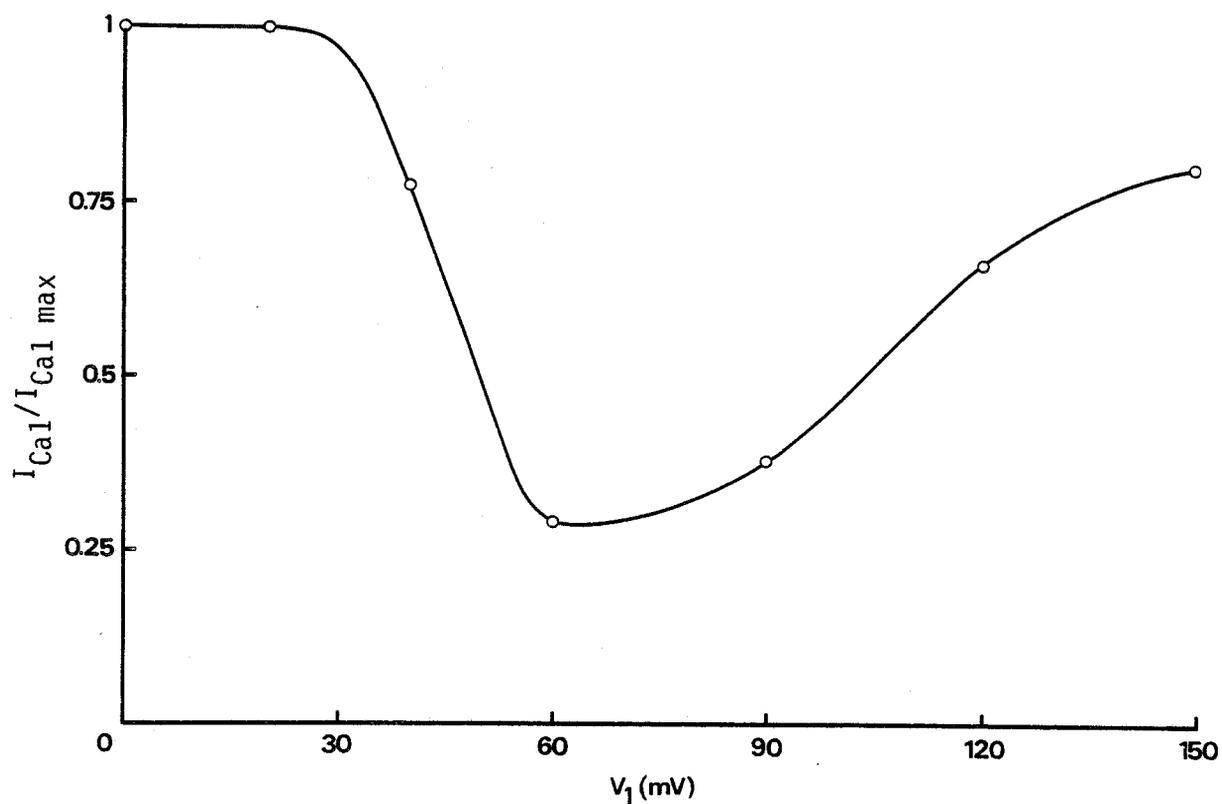


Figure 19

Courbe traduisant l'évolution du degré d'inactivation du courant  $I_{Ca1}$  en fonction du potentiel conditionnant  $V_1$ .  
 (courbe tracée à la main).  
 (même fibre que figures 16, 17 et 18, n° 1933).

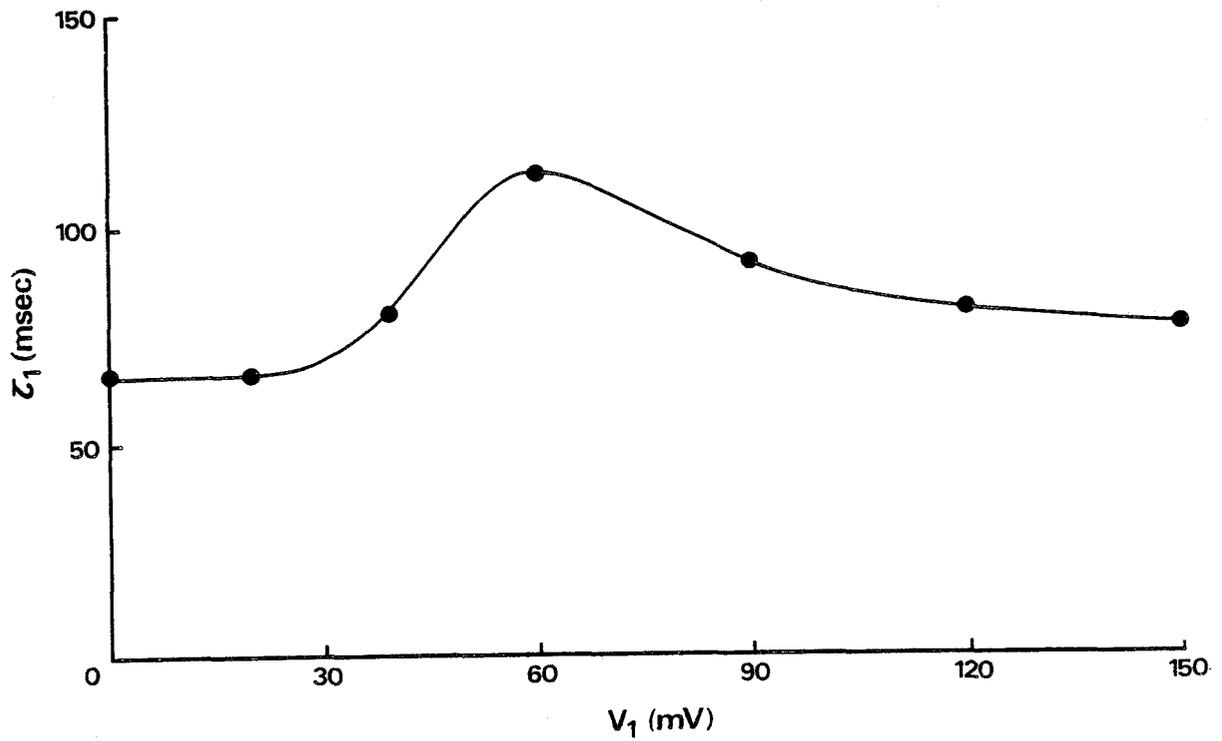


Figure 20

Courbe traduisant l'évolution de la constante de temps d'inactivation,  $\tau_1$ , en fonction du potentiel conditionnant  $V_1$ .

(Courbe tracée à la main).

(même fibre que figures 16, 17, 18 et 19, n° 1933).

le lorsque  $V_1 = 0$  et  $V_1 = + 20$  mV, puis décroît fortement lorsque  $V_1 = + 60$  ou  $+ 90$  mV. Il augmente ensuite pour  $V_1 = + 120$  et  $+ 150$  mV. On retrouve donc pour la composante  $I_{Ca1}$  la levée d'inactivation dans la gamme des  $V_1$  élevés décrite pour le courant  $I_{Ca}$  global. Les valeurs du rapport  $f_1 = \frac{I_{Ca1}}{I_{Ca1max}}$  obtenues lors de cette expérience donnant le taux d'inactivation de  $I_{Ca1}$ , sont reportées en fonction de l'amplitude de  $V_1$  sur la figure 19. Cette courbe présente un décours comparable à celui décrit pour le courant  $I_{Ca}$  global. Un même résultat a été obtenu sur 7 autres préparations.

## 2) Inactivation et cinétiques

L'influence du potentiel conditionnant sur l'amplitude du  $I_{Ca1}$ , qui vient d'être démontrée, se double d'un effet sur la cinétique d'inactivation de ce courant. Sur la figure 20, on a reporté les valeurs de la constante de temps d'inactivation rapide,  $\tau_1$ , en fonction de l'amplitude du potentiel conditionnant,  $V_1$  (voir Fig. 18). En absence de prépulse,  $\tau_1 = 64$  msec. Lorsque  $V_1 = + 20$  mV, cette valeur de  $\tau_1$  reste inchangée ce qui était déjà vrai pour le degré d'inactivation,  $f_1$ . Par contre, pour un prépulse conditionnant de  $+ 40$  et  $+ 60$  mV,  $\tau_1$  augmente jusqu'à 112 msec. Ainsi, lorsque la disponibilité de  $I_{Ca1}$  est diminuée, son inactivation est ra-

lentie. Lorsque  $V_1 = + 90$  mV, la constante  $\tau_1$  est égale à 91 msec, valeur encore supérieure à la valeur de référence. Pour des valeurs de  $V_1$  supérieures (120 ou 150 mV),  $\tau_1$  diminue et tend vers sa valeur initiale. Sur d'autres préparations le même déroulement de  $\tau_1$  en fonction de  $V$  est observé,  $\tau_1$  retrouvant, pour des  $V$  élevés, strictement sa valeur de référence.

Si l'on compare les figures 20 et 19, on voit donc que l'inverse de la constante de temps  $\tau_1$  subit une évolution parallèle à celle de l'inactivation : des courants calciques fortement inactivés par un pré-pulse conditionnant sont caractérisés par une cinétique d'inactivation plus lente. Ce résultat est en désaccord avec la théorie d'HOGKIN-HUXLEY qui prévoit que la cinétique d'inactivation ne dépende que du potentiel produisant le courant. Ces éléments suggèrent donc l'importance de l'influx d'ions calcium dans le processus d'inactivation de ce courant. Il est donc nécessaire de préciser dans quelles limites l'influx de  $Ca^{++}$  est directement responsable de ce phénomène.

### 3) Rôle de l'influx d'ions calcium

#### a) *Parallélisme $I/I_{max}$ et $I_{Ca}$*

Comme on vient de le voir, l'influence du pré-pulse conditionnant sur la conductance calcique n'est pas simplement liée au potentiel  $V_1$ , comme le proposait la théorie d'HODGKIN-HUXLEY (1952). En effet, si pour des  $V_1$  compris entre + 30 et + 70 mV, l'inactivation augmente, nous avons vu que lorsque  $V_1$  est supérieur (à partir d'environ + 80 mV), l'inactivation diminue. Dans la première gamme de potentiels mentionnée (+ 30 à + 70 mV) le courant

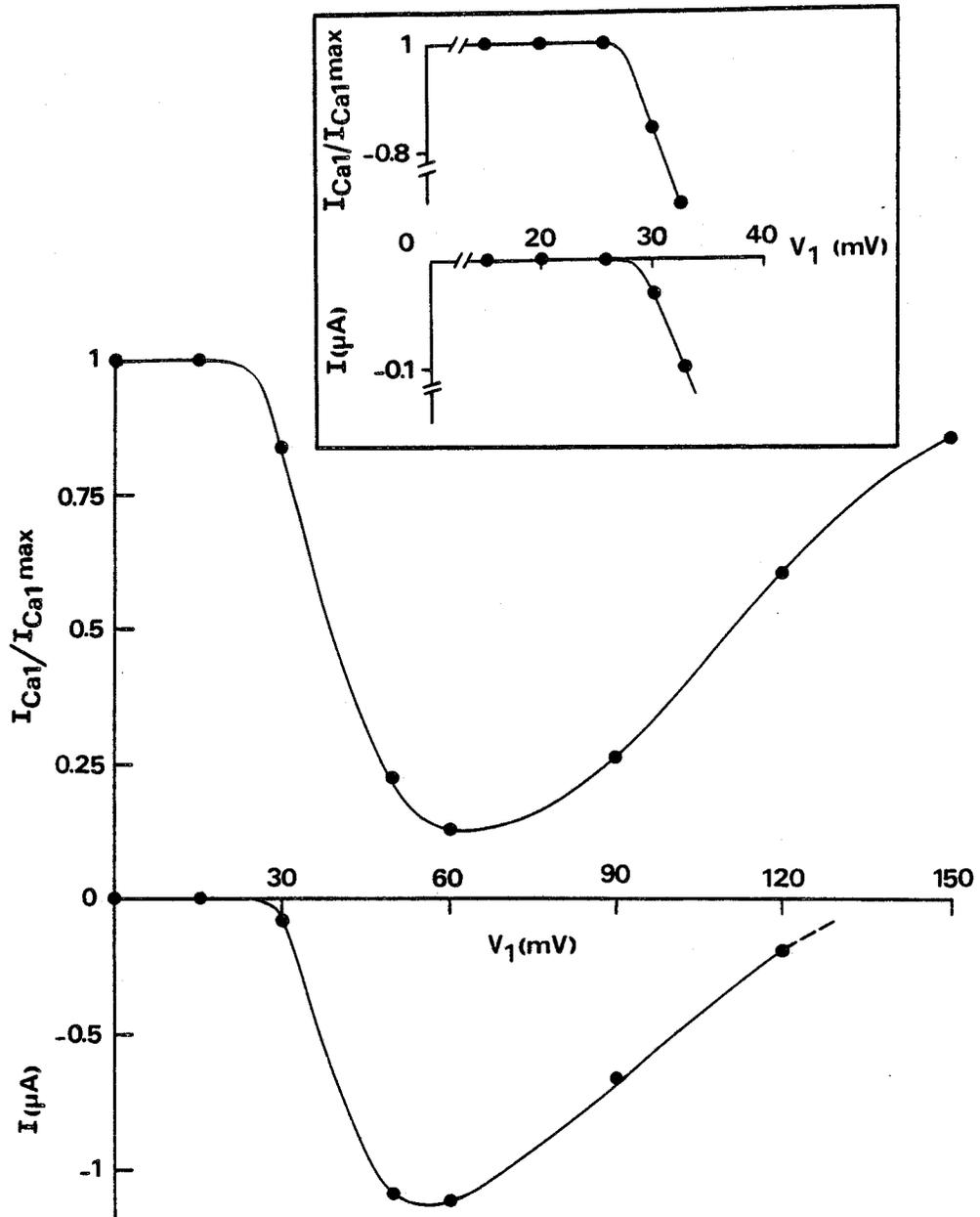


Figure 21

Courbes traduisant l'évolution, en fonction du pré-pulse,  $V_1$ , du degré d'inactivation de  $I_{Ca1}$  dans le pulse test (en haut), et du courant calcique  $I$  produit par le pré-pulse (en bas).

En encadré : détail de la zone seuil de l'inactivation et du courant produit par le pré-pulse.  
(fibre n° 2333).

calcique augmente. Par contre, pour des  $V$  supérieurs, celui-ci diminue (Cf. Fig. 12). Ceci suggère donc la recherche d'une corrélation entre le degré d'inactivation et le courant  $I_{Ca}$  préalablement déclenché dans le prépulse.

Cette corrélation est illustrée à la figure 21, où l'on a superposé :

\* sur le graphe du haut, le rapport  $I_{Ca1}/I_{Ca\max}$ , en fonction du potentiel conditionnant  $V_1$ . Ces valeurs ont été obtenues pour une expérience utilisant le protocole du double pulse, dont les paramètres étaient  $V_{\text{test}} = 50 \text{ mV} - 100 \text{ msec}$ .

\* sur le graphe du bas, l'amplitude des courants entrants mesurés dans le prépulse, par la différence avec le courant obtenu en présence de cobalt (20 mM/l).

Il apparaît nettement que l'inactivation s'amorce lorsque le prépulse a déclenché un courant  $I_{Ca}$ , même faible ( $V_1 = + 30 \text{ mV}$ ). De façon à rendre ce point plus clair, les différentes mesures autour du seuil ont été reprises en encart. Un tel résultat a été obtenu sur 4 préparations. De plus le maximum d'inactivation est obtenu pour un potentiel  $V_1$  donnant le  $I_{Ca}$  maximum, généralement voisin de  $+ 60$  à  $+ 80 \text{ mV}$ . La levée d'inactivation a lieu pour des  $V_1$  supérieurs à  $+ 60 \text{ mV}$ , sur cette fibre. Enfin, le rapport  $I_{Ca1}/I_{Ca\max}$  retrouve une valeur d'environ 0.85 à 0.90 lorsque  $V_1$  devient voisin du potentiel d'inversion calcique,  $V_{Ca}$  (ici égal à  $+ 130 \text{ mV}$ , valeur obtenue par extrapolation de la relation  $I_{Ca}/V_1$ ).

Nos résultats suggèrent donc bien l'existence d'une relation entre le degré d'inactivation et l'amplitude du courant calcique.

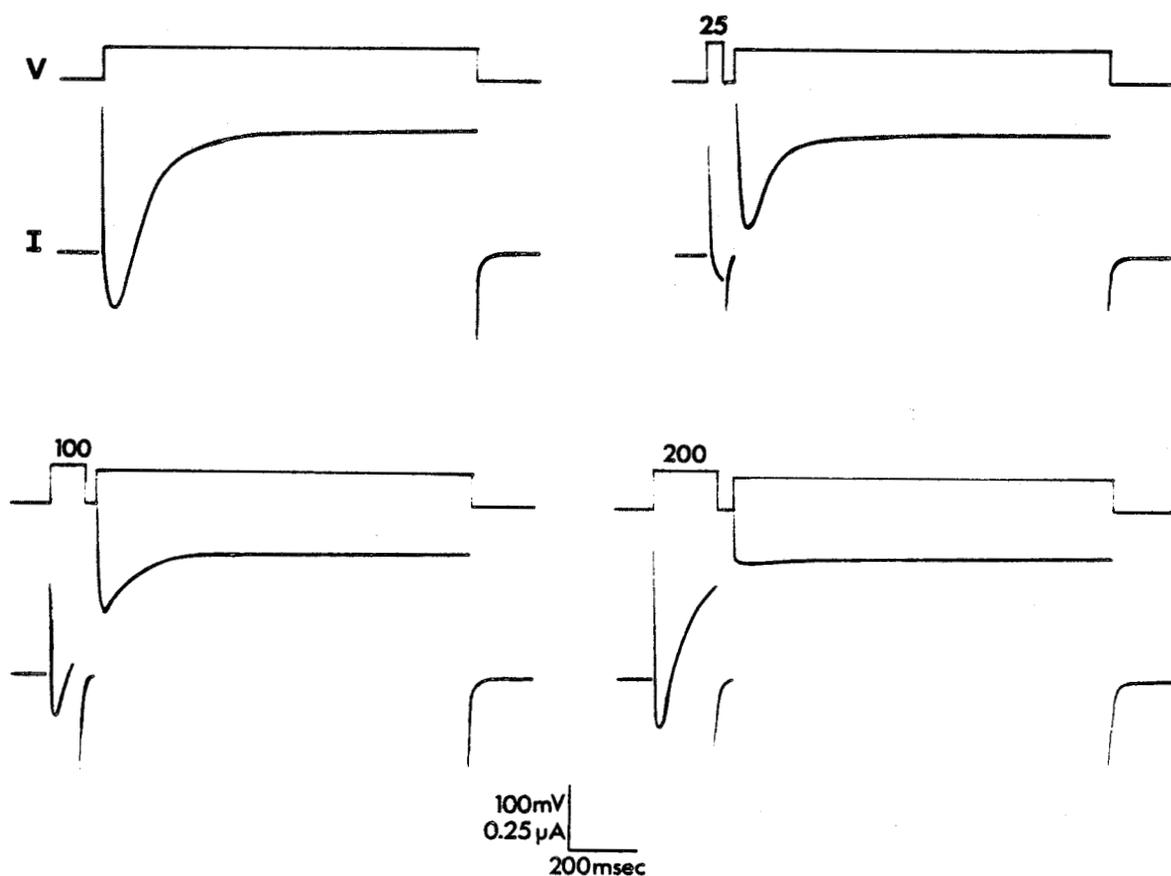


Figure 22

Influence de la durée d'un prépulse conditionnant d'amplitude + 60 mV, sur le courant calcique  $I_{Ca1}$ . (pulse test + 50 mV, 1200 msec). Durées indiquées au dessus de chaque prépulse. (fibre n° 953).

b) *Influence de la durée du pulse conditionnant*

Afin de faire varier, pour un potentiel donné, le courant de calcium ayant traversé la membrane lors du pulse conditionnant, la durée de ce dernier a été changée de 25 à 100 ou 200 millisecondes.

La figure 22 illustre les courants ioniques (I) obtenus lors d'une telle expérience, pour les trois durées différentes de prépulse, avec, pour cette figure,  $V_1 = + 60$  mV et  $V_2 = + 50$  mV, sur une fibre présentant un courant d'inactivation monoexponentielle. On peut y constater d'emblée l'effet de l'allongement du pulse conditionnant : le degré d'inactivation du courant dans le test passe de 0,6 pour un pulse de 25 msec à 0.38 pour 100 msec, et 0.03, soit une inactivation quasi complète, lorsque le pré-pulse dure 200 msec.

Ce type d'expérience a été réalisé avec les trois durées différentes et pour des V conditionnants de 0 à 175 mV ; les valeurs du rapport  $I/I_{max}$  sont rapportées sur les courbes présentées à la figure 23, pour chaque durée de prépulse.

Il est à noter que ces trois courbes contiennent des mesures effectuées pour une même fibre, avec seulement deux durées : les expériences ne peuvent en effet être réalisées, sur toute la gamme des V conditionnants, avec les trois durées de prépulse. Néanmoins, la comparaison peut, dans tous les cas, s'effectuer entre deux durées pour une même fibre (mêmes symboles sur les courbes).

L'effet de la durée du prépulse sur la courbe  $I/I_{max}$  en fonction de  $V_1$  est très sensible : pour des  $V_1$  identiques, l'inactivation est d'autant plus importante que le pulse conditionnant est plus long. Le maximum d'inactivation varie de 0.52 à 0.21 puis 0

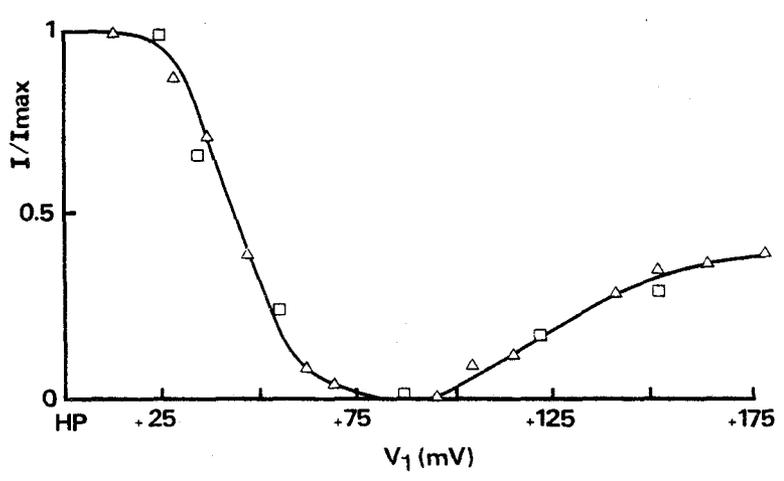
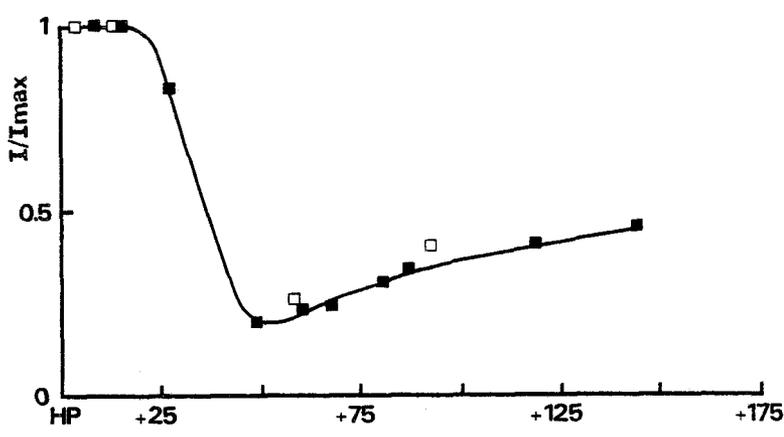
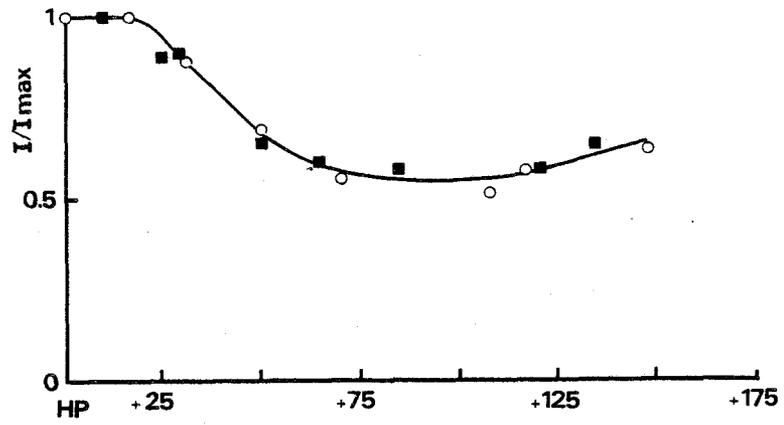


Figure 23

Courbes traduisant l'évolution du degré d'inactivation du courant  $I_{Ca1}$  en fonction de l'amplitude du pulse conditionnant,  $V_1$ , établies pour trois durées de prépulse : 25, 100, et 200 msec.

Résultats obtenus sur des fibres dont le courant entrant  $I$  s'inactivait suivant une exponentielle simple ( $I = I_{Ca1}$ ).

Mesures effectuées sur plusieurs fibres : des symboles identiques entre deux courbes proviennent des mesures effectuées sur une même fibre.

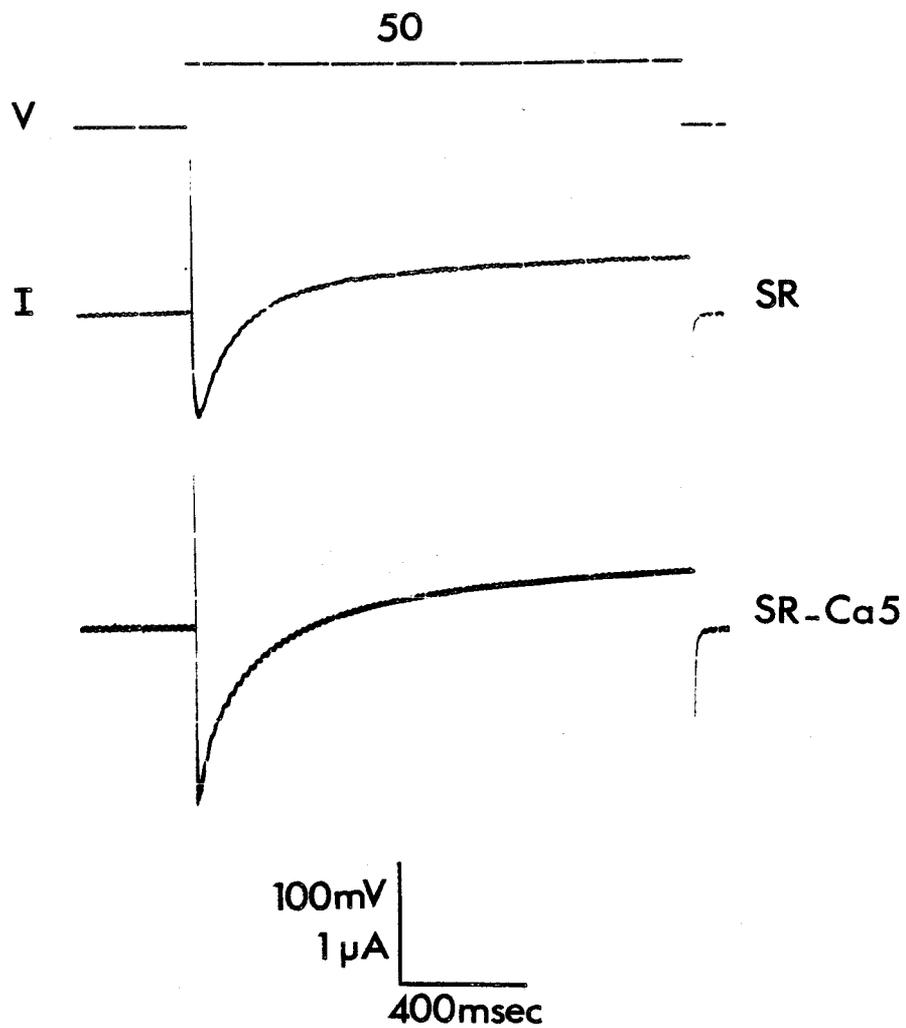


Figure 24

Courants ioniques (I) obtenus pour un V imposé de + 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée, sur une fibre placée en solution SR (en haut) puis SR - Ca5 (en bas).

(fibre n° 3063).

lorsque la durée est égale respectivement à 25, 100 et 200 msec. Enfin, pour des  $V_1$  élevés, on assiste dans tous les cas à une levée de l'inactivation.

D'une manière générale, c'est donc toute la courbe  $I/I_{max}$  en fonction de  $V_1$  qui est influencée par la durée du potentiel conditionnant. En plus de son amplitude, il faut donc également tenir compte de la durée du prépulse.

*c) Influence de la concentration calcique extracellulaire*

Afin de varier l'amplitude du courant calcique conditionnant pour des  $V_1$  identiques, la concentration en ions calcium du milieu SR a été changée de 5 à 25 mM/l, lors des expériences utilisant le protocole du double pulse. (Solutions SR et SR-Ca5).

L'effet de l'augmentation de la concentration calcique sur les courants ioniques est illustré à la figure 24, pour un potentiel imposé de + 50 mV d'amplitude et 1500 msec de durée.

En présence de 25 mM de calcium, l'amplitude du courant est considérablement augmentée (par un facteur 1.5 sur cette figure). Par contre, l'amplitude du courant en fin de pulse est sensiblement égale en présence de 5 ou 25 mM de calcium ce qui confirme la non activation d'une conductance sortante dépendante du calcium.

Enfin, une différence essentielle entre les courants obtenus en présence de 5 et 25 mM de calcium réside dans leur cinétique d'inactivation.  $\tau_1$  passe ici de 95 msec en SR à 75 msec en SR-Ca5.

Le courant, plus ample en SR-Ca5, s'inactive donc également plus rapidement.

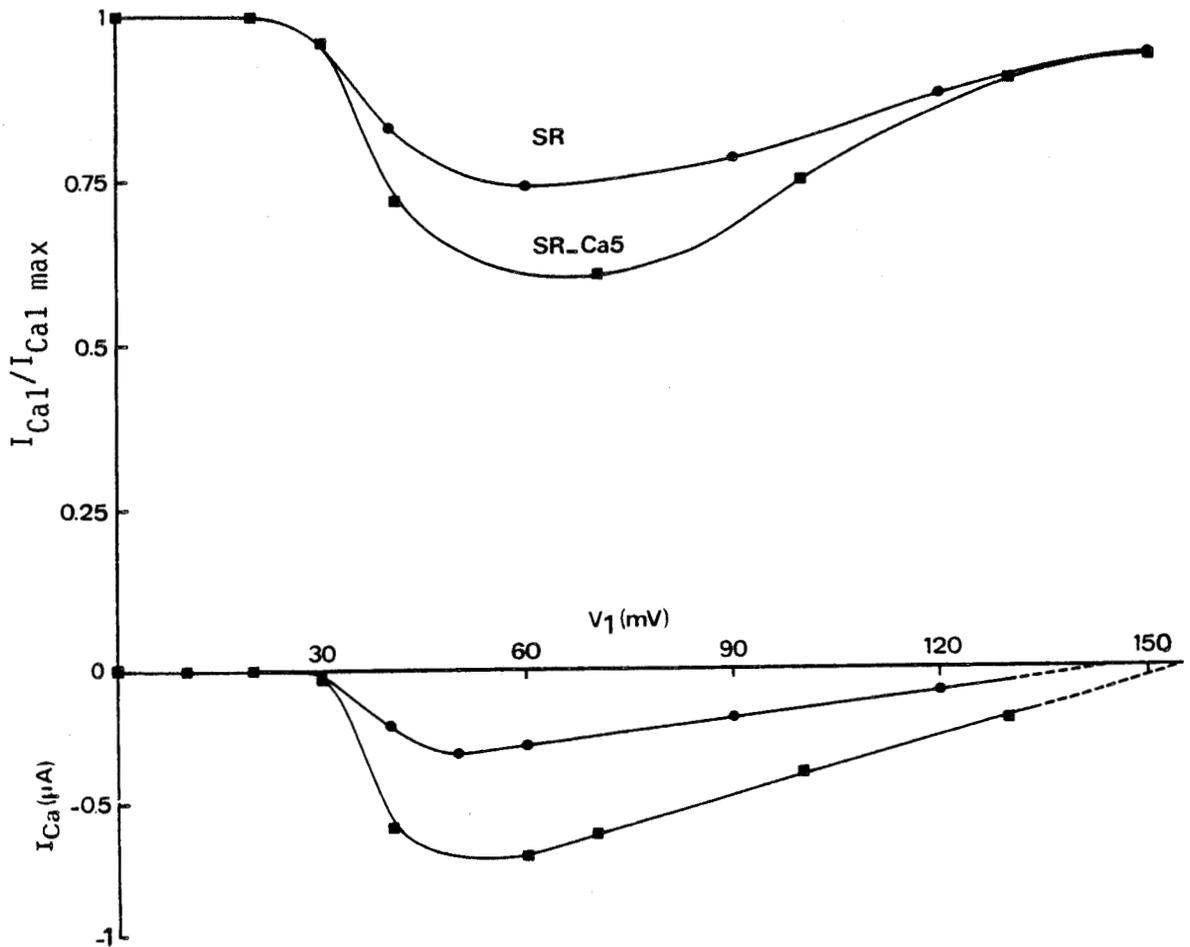


Figure 25

Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du pulse conditionnant,  $V_1$ , du degré d'inactivation du courant  $I_{Ca1}$  (en haut) et du courant  $I_{Ca}$  déclenché par le prépulse (en bas), sur une fibre placée successivement en solution SR (●) puis en solution hypercalcique SR - Ca5 (■).  
(fibre n° 1153).

L'inactivation a été testée par la méthode du double pulse, dans les deux solutions SR et SR-Ca5. Les valeurs du degré d'inactivation  $f_1$  du courant  $I_{Ca1}$ , mesuré au maximum du courant sur les tracés semi-logarithmiques, sont regroupées sur une courbe à la figure 25 en fonction du potentiel conditionnant  $V_1$ . Sur cette figure ont été également reportées, en fonction du potentiel conditionnant, les valeurs du courant  $I_{Ca}$ , évalué pour toutes les mesures par la différence entre les courants en présence ou non de cobalt. On peut y remarquer que toute la courbe  $f_1/V_1$ , à partir du seuil d'inactivation, est globalement plus "basse" en SR Ca5 qu'en solution de référence. Pour un même potentiel imposé, l'inactivation est d'autant plus forte que les courants calciques sont plus amples. En effet, l'examen des courants  $I_{Ca}$  en fonction de  $V_1$  montre bien que c'est dans la gamme des  $V_1$  où les courants en SR Ca5 sont nettement plus amples que ceux en SR, qu'existe la plus grande différence entre les valeurs d'inactivation obtenues en SR Ca5 et en SR.

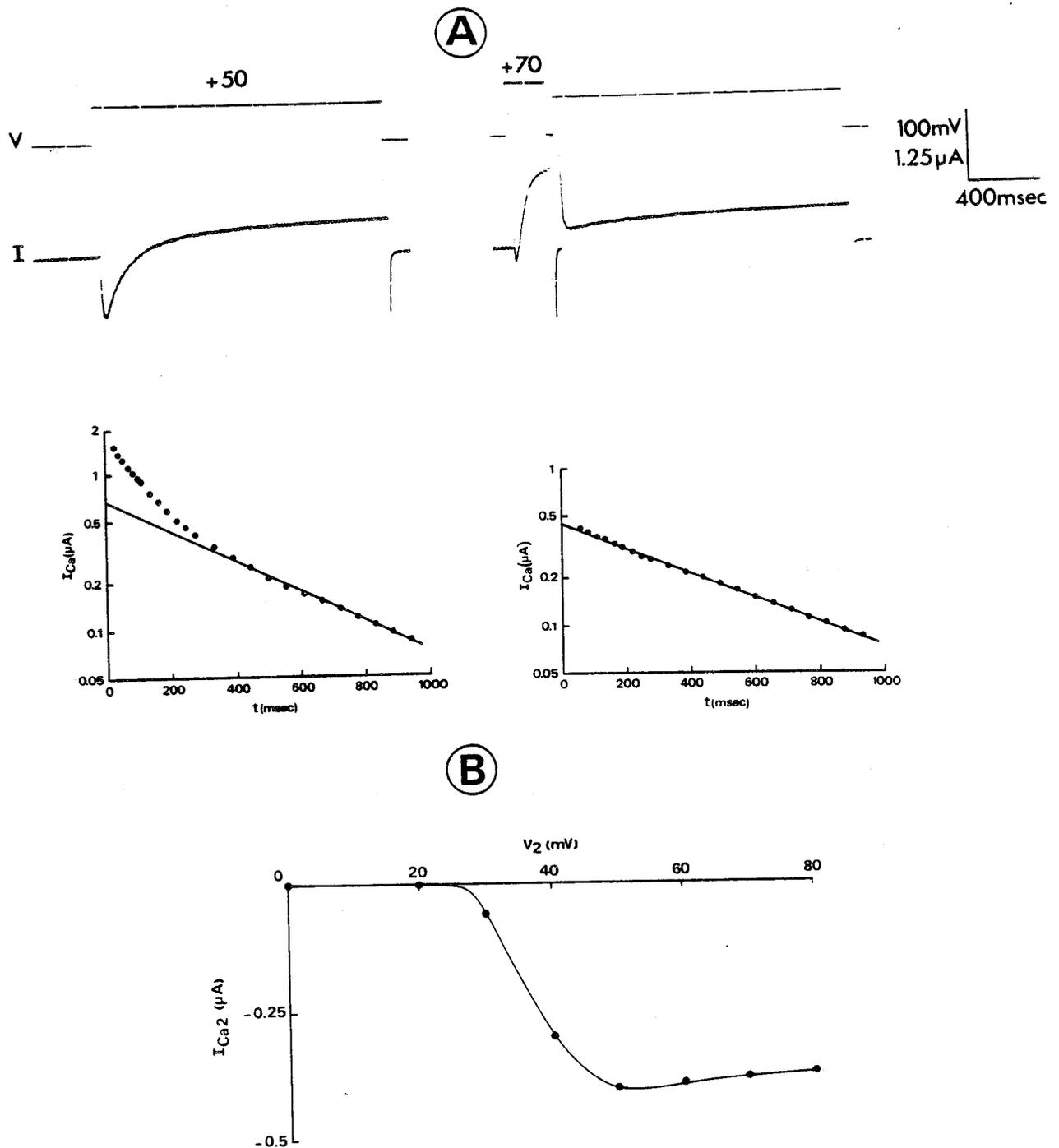


Figure 26

A - Courants ioniques ( $I$ ) obtenus pour un  $V$  imposé de + 50 mV et 1700 msec (partie gauche) précédé d'un pulse conditionnant  $V_1 = + 70$  mV, 200 msec (partie droite).  
Tracés inférieurs : Reports semilogarithmiques de ces courants.

B - Courbe traduisant l'évolution du courant  $I_{Ca2}$ , mesuré au pic de courant lors d'un pulse  $V_2$ , d'amplitude variable, précédé d'un pulse conditionnant  $V_1$  de + 70 mV, 200 msec.  
(fibre n° 3063).

### III - ETUDE DE $I_{Ca2}$

#### 1) Existence de $I_{Ca2}$

##### a) *Biexponentialité*

Lors de l'imposition d'un potentiel dépolarisant d'une amplitude supérieure, en général, à + 30 mV, un courant calcique s'active, puis s'inactive et ceci suivant une double exponentielle (Cf. chapitre ). Ceci nous a amené à étudier séparément les deux composantes de  $I_{Ca}$ . L'existence de  $I_{Ca2}$  en tant que deuxième composante calcique a été démontrée au chapitre précédent, par utilisation des ions  $Co^{++}$ , par étude des courants de désactivation du courant entrant, ou par substitution du  $Ca^{++}$  par le  $Sr^{++}$ . Tout concorde pour démontrer que la deuxième composante n'est pas un artefact dû à l'activation d'un courant sortant, mais reflète bien l'existence d'un deuxième courant calcique qui lui aussi s'inactive.

##### b) *Isolement de $I_{Ca2}$*

Afin de déterminer l'amplitude du courant  $I_{Ca2}$ , et sa dépendance vis-à-vis du potentiel, deux méthodes sont utilisées.

##### i) *Première méthode.*

La figure 26 (A) illustre cette méthode : un pré-pulse d'amplitude  $V_1 = + 70$  mV, de durée égale à 200 msec, a pour rôle d'inactiver le plus complètement possible la première composante,  $I_{Ca1}$ . Nous avons vu en effet qu'un pré-pulse d'environ + 70 mV d'amplitude et 200 msec de durée a pour conséquence d'inactiver complètement  $I_{Ca1}$  (Cf. Fig. 23). Il ne subsiste donc que la deuxième composante,  $I_{Ca2}$ , que l'on peut, dans ce cas, lire directement, par

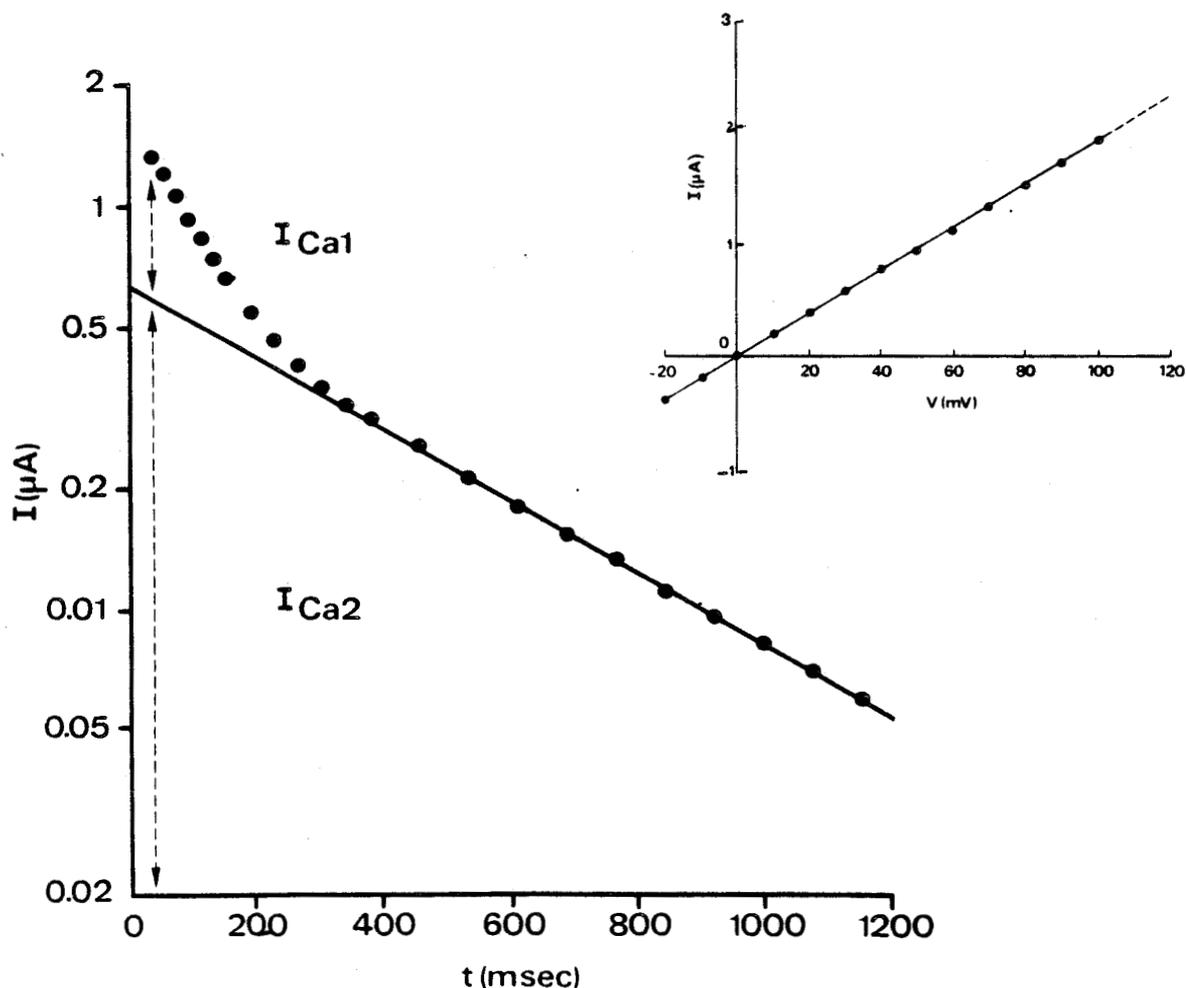
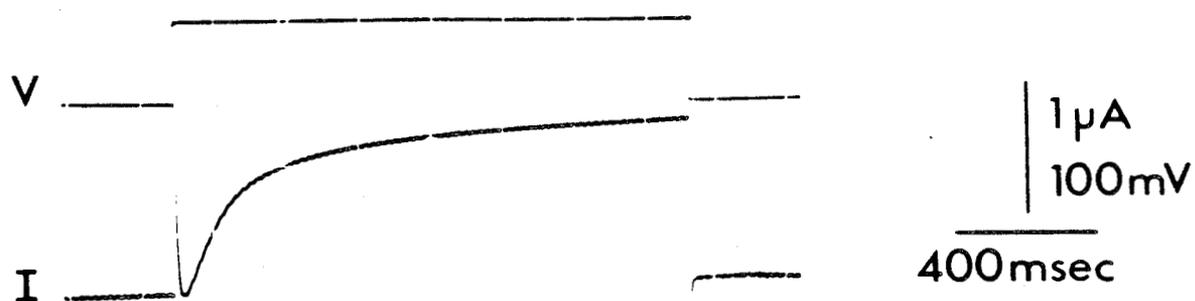


Figure 27

Partie supérieure : courant ionique obtenu, pour un  $V$  imposé de + 60 mV d'amplitude et 1700 msec de durée, sur une fibre en solution SR.

Partie inférieure : report semilogarithmique du courant calcique mesuré par rapport au courant en fin de pulse.

En encart : courbe courant-potentiel traduisant l'évolution du courant en fin d'impulsion en fonction du potentiel. Sur cette fibre, aucune rectification dans le sens sortant n'est visible.

(fibre n° 19103).

différence entre le courant au début de  $V_2$  et le courant en fin de pulse. Le report des courants en coordonnées semi-logarithmiques, représenté sous les images de courant de la figure 26A, confirme ceci. Les différentes valeurs de  $I_{Ca2}$  obtenues par cette méthode sont représentées, en fonction du potentiel, à la partie B de la figure 26. Le courant  $I_{Ca2}$  s'active pour un  $V$  de + 30 mV, atteint un maximum vers + 50 mV, puis conserve une valeur stationnaire jusque  $V = + 80$  mV, potentiel où nous avons limité notre étude. Pour des  $V$  imposés plus élevés, la rectification sortante fausse la lecture. En outre des  $V$  très élevés appliqués trop longtemps entraînent une fatigue de la préparation.

Il est à noter que, une fois atteint son maximum,  $I_{Ca2}$  semble garder une valeur fixe, pour des potentiels croissants.

#### ii) deuxième méthode

A partir du courant total  $I_{Ca}$ , obtenu par imposition de potentiels croissants, il est possible, sur les tracés semi-logarithmiques, de mesurer l'amplitude de  $I_{Ca2}$ . Cette mesure est pratiquée sur l'extrapolation de la droite de pente  $\tau_2$ , au temps  $t$  correspondant au pic de courant total.

Les figures 27 et 28 illustrent les mesures de  $I_{Ca2}$  obtenues par cette méthode : sur la fibre utilisée, l'évolution du courant de fin de pulse en fonction du potentiel est linéaire et donc exempte de rectification sortante (courbe  $I/V$  représentée en encart de la figure 27. Les mesures de  $I_{Ca2}$  sont donc pratiquées par rapport au courant en fin de pulse.

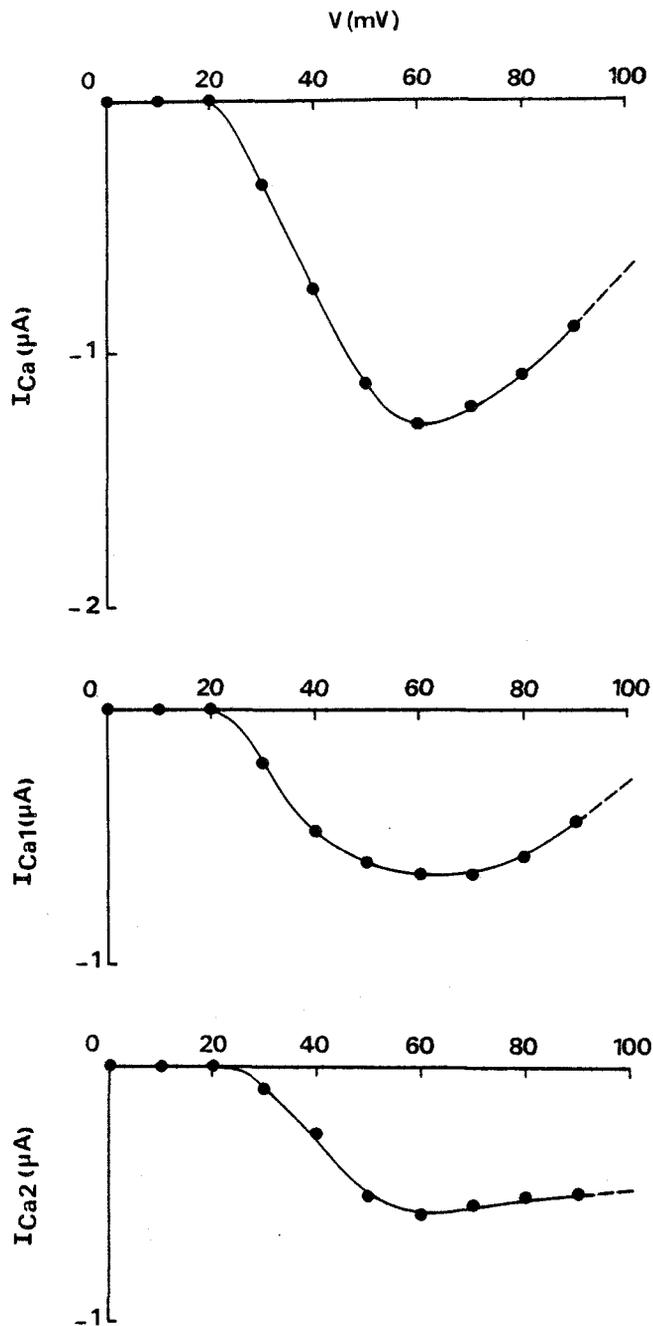


Figure 28

Courbes traduisant l'évolution, en fonction du potentiel, de l'amplitude des courants :

- $I_{Ca}$  : courant calcique global (courbe du haut)
- $I_{Ca1}$  : courant à inactivation rapide (courbe du milieu)
- $I_{Ca2}$  : courant à inactivation lente (courbe du bas).

$I_{Ca1}$  et  $I_{Ca2}$  sont mesurés comme indiqué sur la figure 27. (même fibre que la figure 27, n° 19103).

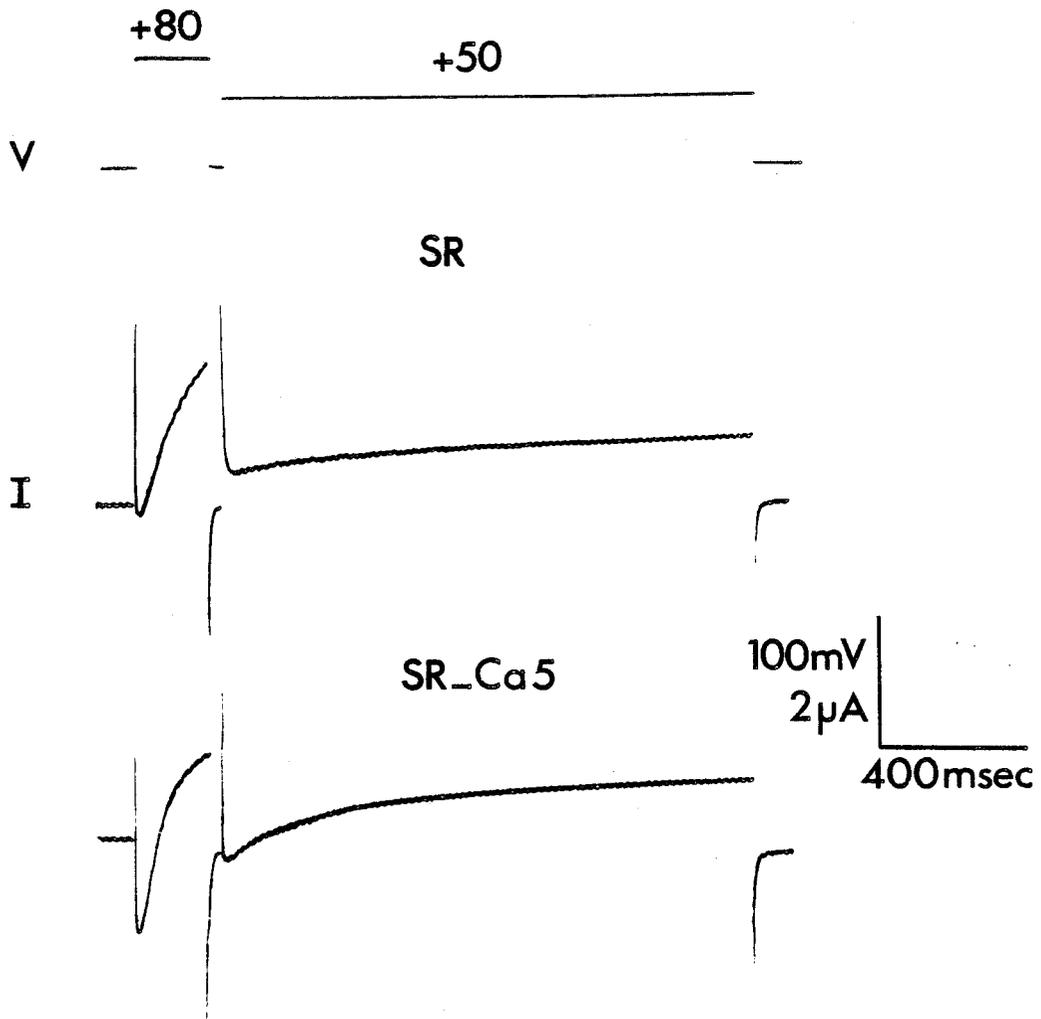


Figure 29

Courant ionique  $I_{Ca2}$ , mis en évidence lors d'un pulse test  $V_2$  de + 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée, après inactivation du courant  $I_{Ca1}$  par un prépulse d'amplitude + 80 mV et 200 msec de durée, pour une fibre placée successivement en solution SR (tracé du haut) et SR Ca5, tracé du bas.  
(fibre n° 3063).

Sur la figure 28, on a reporté, en fonction du potentiel, les valeurs des courants  $I_{Ca}$ , courant calcique total, ainsi que de  $I_{Ca1}$ , et  $I_{Ca2}$ . L'évolution de  $I_{Ca}$  et  $I_{Ca1}$  est conforme à celle décrite pour  $I_{Ca}$ , au chapitre A (Cf. Fig. 12). En ce qui concerne  $I_{Ca2}$ , la méthode de lecture par report logarithmique procure des valeurs qui évoluent de la même façon, que celles obtenues par la première méthode (Cf. Fig. 26 B) : son activation a lieu pour  $V = + 30$  mV, et que une fois sa valeur maximum est atteinte,  $I_{Ca2}$  ne diminue que très peu pour des  $V$  croissants, tout au moins dans la gamme des potentiels explorée.

## 2) Nature ionique de $I_{Ca2}$

Les arguments en faveur de la nature calcique de  $I_{Ca2}$  peuvent être résumés ainsi :

### a) *Effet du cobalt.*

L'addition de cobalt, inhibiteur connu des courants calciques, supprime les deux composantes du courant global  $I_{Ca}$  (Voir Chapitre A).

### b) *Effet de la variation du calcium extracellulaire.*

La figure 29 illustre les courants  $I_{Ca2}$ , pour  $V$  imposé de + 50 mV, après inactivation préalable de  $I_{Ca1}$  à l'aide d'un prépulse de + 80 mV, 220 msec, en solution de référence SR, puis en solution enrichie en calcium (SR - Ca5). Comme on peut le constater, l'amplitude de  $I_{Ca2}$  est considérablement augmentée (1.3  $\mu$ A en SRCa5 contre 0.5  $\mu$ A en SR). L'amplitude de  $I_{Ca2}$  est donc fonction de la con-

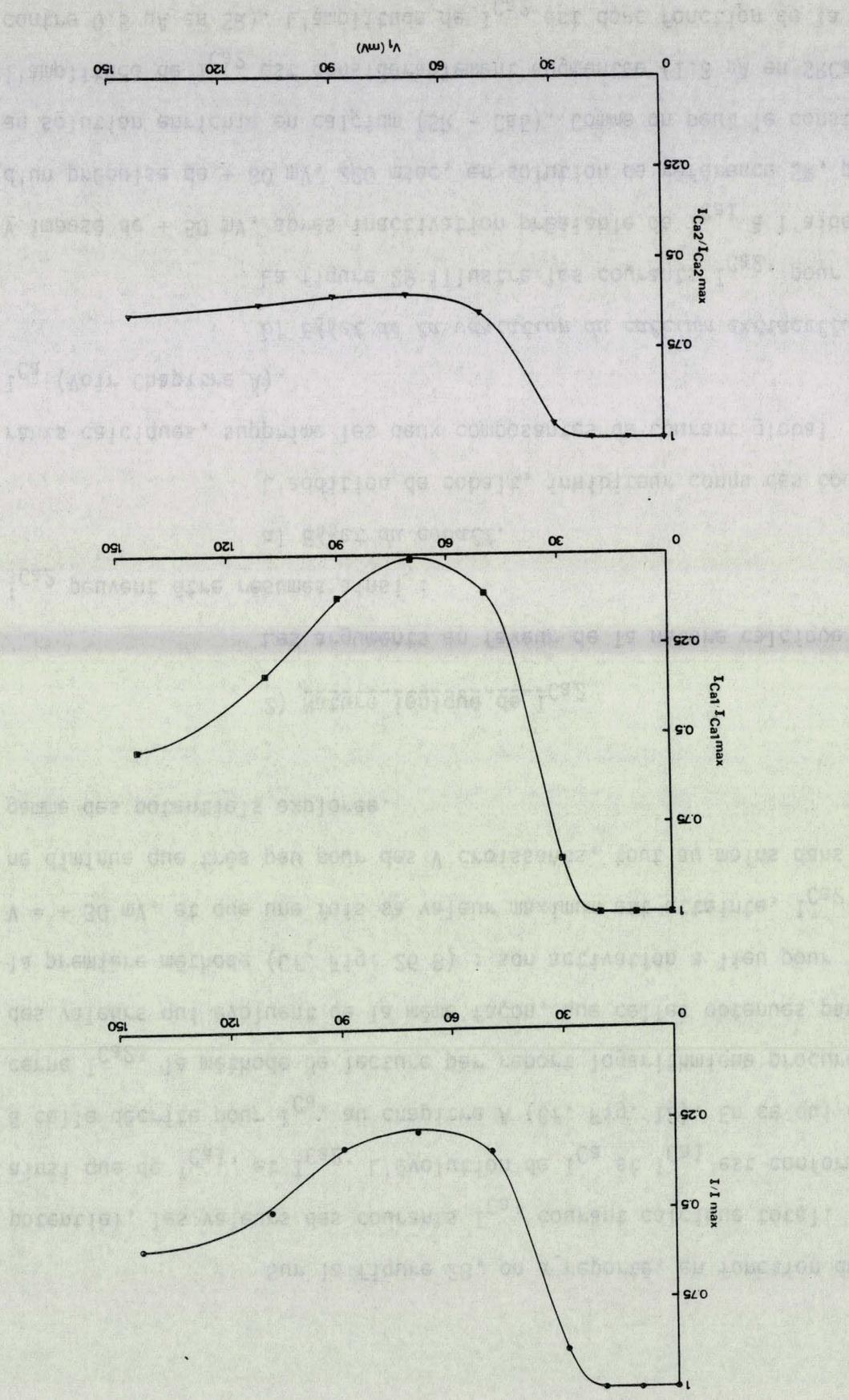
(figure n° 2333).

et  $I_{Ca2}/I_{Ca2max}$  (de haut en bas).

conditionnant,  $V_1$ , des degrés d'inactivation :  $I/I_{max}$ ,  $I_{Ca1}/I_{Ca1max}$ ,

Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du pulse

Figure 30



centration extracellulaire en calcium.

c) *Effet de la variation du sodium extracellulaire*

Afin de tester une possible relation entre  $I_{Ca2}$  et l'existence sur notre préparation de l'échange sodium-calcium, (GOBLET et MOUNIER (1981)), les ions sodium ont été remplacés en grande partie (2/3) par les ions lithium, connus pour bloquer l'échange Na/Ca. Si  $I_{Ca2}$  était dû à cet échange, le  $Li^+$  devrait le supprimer : l'inactivation de  $I_{Ca}$  devrait devenir monoexponentielle.

En fait, aucune différence dans la cinétique d'inactivation de  $I_{Ca}$  n'a été enregistrée en présence de  $Li^+$  (Solution SR- $Li^+$ ). Le courant  $I_{Ca}$  conserve deux composantes  $I_{Ca1}$  et  $I_{Ca2}$ , aux propriétés inchangées. Il semble donc bien que  $I_{Ca2}$  soit un courant calcique membranaire, au même titre que  $I_{Ca1}$ .

Il est donc possible d'étudier maintenant son mécanisme d'inactivation.

3) Inactivation de  $I_{Ca2}$

a) *Degré d'inactivation*

Le processus d'inactivation de  $I_{Ca2}$  a été étudié, comme celui de  $I_{Ca1}$ , par le protocole du double pulse, déjà décrit. La mesure de  $I_{Ca2}$  a été effectuée sur les tracés semi-logarithmiques des courants test, au temps  $t$  correspondant au pic du courant global.

La figure 30 regroupe les courbes donnant les valeurs de  $I/I_{max}$  en fonction du prépulse  $V_1$  pour une expérience où :  $V_2 = + 60$  mV, 1400 msec, durée de  $V_1$  : 200 msec, intervalle  $V_1-V_2 = 40$  msec. Sont illustrées les trois courbes que l'on peut extraire d'une

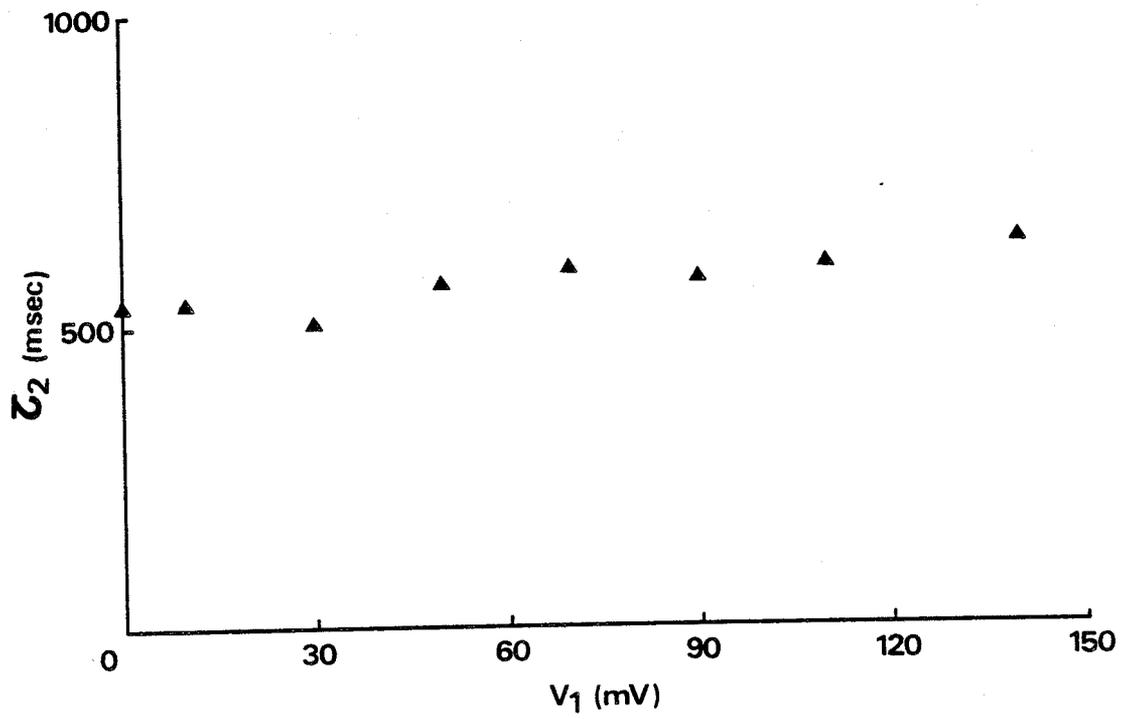


Figure 31

Evolution de la constante de temps d'inactivation lente,  $\tau_2$ , en fonction de l'amplitude du pulse conditionnant,  $V_1$ .

telle expérience :  $I/I_{\max}$  ,  $I_{Ca1}/I_{Ca1\max}$ , déjà décrite au chapitre B et  $I_{Ca2}/I_{Ca2\max}$ . Cette dernière présente un aspect différent des deux autres : après la phase d'augmentation de l'inactivation, la valeur minimale de  $I_{Ca2}/I_{Ca2\max}$  atteinte (ici, 0.60) est conservée, même pour des  $V_1$  très élevés, (jusqu'à + 140 mV).

Notons que, sur certaines préparations, une faible levée d'inactivation de  $I_{Ca2}$  est constatée pour des valeurs élevées de  $V_1$ . Néanmoins, cette faible récupération n'est jamais aussi ample que dans le cas de  $I_{Ca1}$ , et ne constitue pas la règle. Sur la majorité des fibres où l'inactivation de  $I_{Ca2}$  a été étudiée, le rapport  $I_{Ca2}/I_{Ca2\max}$  reste quasiment constant pour  $V_1 > + 80$  mV.

#### *b) Cinétiques d'inactivation*

L'influence du pulse conditionnant sur la constante de temps lente,  $\tau_2$ , est illustrée à la figure 31, pour la fibre ayant servi à illustrer les figures 27 et 28. Comme on peut le voir,  $\tau_2$  reste pratiquement constante que que soit  $V_1$ . Cette courbe doit être comparée à celle de la figure 20, où est illustrée la courbe donnant  $\tau_1$  en fonction du prépulse, qui révèle la dépendance de  $\tau_1$  vis à vis de  $V_1$  :  $\tau_1$  est corrélé au courant pendant le prépulse. Visiblement,  $\tau_2$  ne l'est pas.  $\tau_2$  ne dépend pas des événements qui se sont déroulés durant le prépulse.

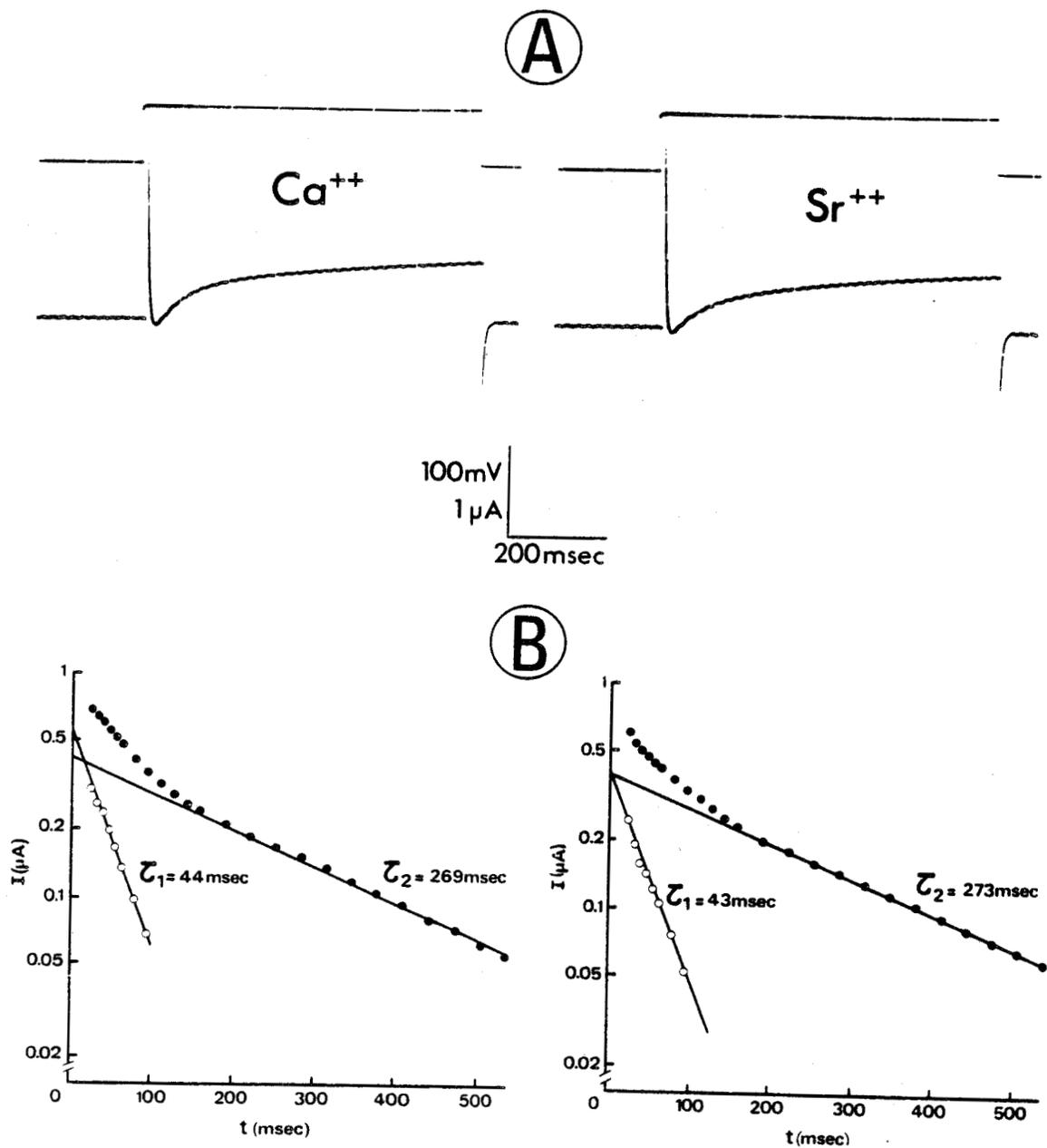


Figure 32

A - Courants ioniques ( $I$ ) obtenus, pour un  $V$  imposé de + 50 mV d'amplitude et 700 msec de durée, sur une fibre placée successivement en solution de référence SR, puis en solution de référence où le  $Sr^{++}$  remplace  $Ca^{++}$  : solution SR -  $Sr^{++}$ .

B - Reports semilogarithmiques des courants de la partie A. (fibre n° 1533).

#### IV - ROLE DE L'ACCUMULATION

Il a été démontré que la diminution du courant calcique n'était pas causée par l'activation d'un courant sortant. Elle peut par contre être due à la diminution du facteur driving-force :  $V - V_{Ca}$ . Une telle diminution pourrait résulter, soit d'une accumulation des ions calcium à l'intérieur de la fibre musculaire, soit de leur raréfaction dans l'espace péricellulaire.

Afin de trancher entre la diminution de la driving-force et une véritable inactivation (diminution de la conductance  $G_{Ca}$ ), il a été procédé à une substitution du calcium extracellulaire par deux cations susceptibles d'emprunter le canal calcique : le strontium, et le baryum.

En effet, si l'inactivation du canal calcique est due à un processus d'accumulation ou de déplétion, ce mécanisme doit dépendre de la taille des courants et non de l'espèce ionique. Dans ce cas les trois cations divalents  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$  et  $Ba^{++}$  doivent provoquer une diminution identique du courant entrant par diminution concomitante de la driving-force.

##### 1) Substitution du $Ca^{++}$ par le $Sr^{++}$

Lorsque la totalité des ions calcium du milieu extracellulaire est remplacée par les ions strontium, ceux-ci se comportent en porteurs de charge : il y a un courant entrant de  $Sr^{++}$  (HAGIWARA et al., 1974 ; MOUNIER et VASSORT, 1975a).

La figure 32 (A) reproduit les courants ioniques enregistrés, pour un potentiel imposé de + 50 mV d'amplitude, et

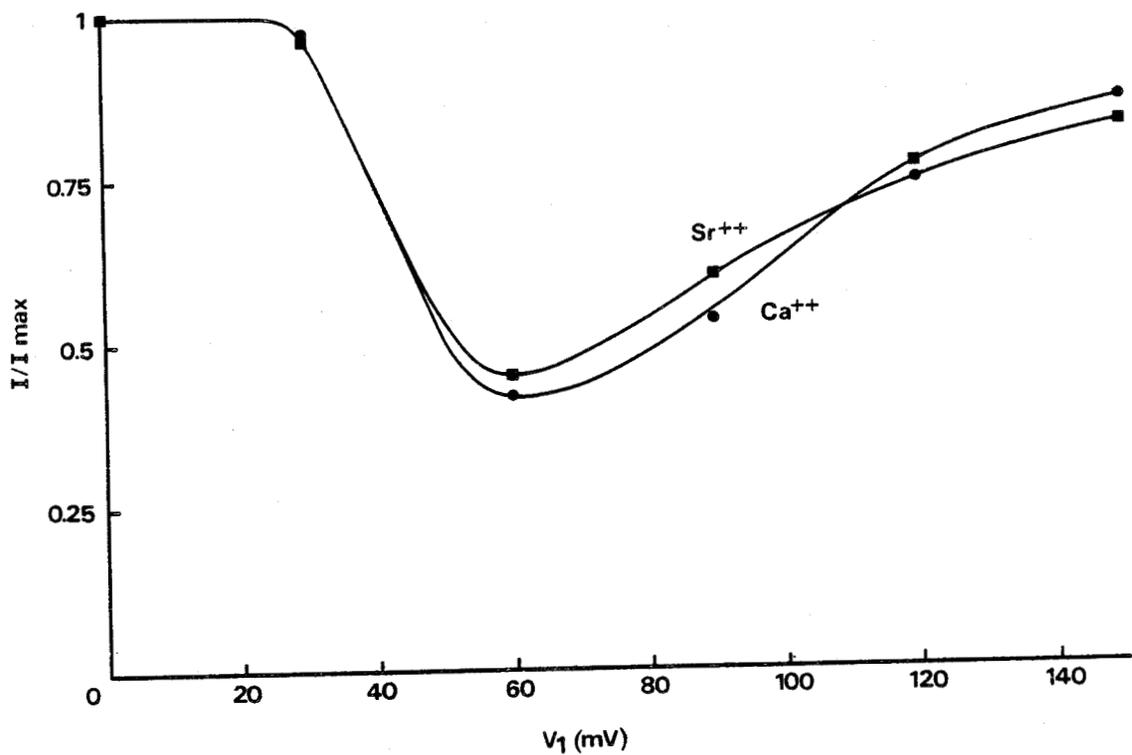


Figure 33

Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du pré-pulse,  $V_1$ , du degré d'inactivation du courant entrant obtenu sur une fibre placée successivement en solution SR puis SR - Sr<sup>++</sup>.  
(même fibre que figure 32, n° 1533).

700 msec de durée, en milieu de référence d'une part (SR) et en milieu où le calcium est remplacé par le strontium (SR-Sr<sup>++</sup>) d'autre part.

Comme on peut le constater, les courants ont des amplitudes très similaires. Il apparaît donc que la membrane présente vis-à-vis du strontium une perméabilité comparable à celle qu'elle présente vis-à-vis du calcium. De même, les cinétiques d'inactivation (Fig. 32/B) sont identiques. Les valeurs de la constante de temps rapide  $\tau_1$  sont 44 msec en SR, et 43 msec en SR.Sr<sup>++</sup>.  $\tau_2$ , la constante de temps lente, passe, elle, de 269 à 273 msec (Fig. 32 B). Ces cinétiques, extrêmement comparables, indiquent donc également la similitude de comportement de la membrane envers les ions calcium et strontium.

L'inactivation du courant entrant a été étudiée, suivant le protocole du double pulse, déjà décrit, en solution SR et en solution SR-Sr<sup>++</sup> (V test = + 50 mV, durée du prépulse : 100 msec, intervalle entre les pulses : 40 msec).

Les résultats sont illustrés à la figure 33, par la courbe représentant la variation du taux d'inactivation, du courant entrant,  $I/I_{max}$ , en fonction du potentiel conditionnant  $V_1$ , mesuré sur la même fibre que celle illustrée à la figure 32, et ceci en solution SR ("Ca<sup>++</sup>") et SR-Sr<sup>++</sup> ("Sr<sup>++</sup>"). Les deux courbes traduisant l'évolution de  $I/I_{max}$  en fonction de  $V_1$  sont pratiquement identiques : même seuil d'inactivation, + 30 mV ; même potentiel d'inactivation maximale, + 60 mV, avec  $I/I_{max} = 0,42$  en Ca<sup>++</sup> et 0,45 en Sr<sup>++</sup>. Enfin, la diminution d'inactivation est toujours pratiquement la même, pour les potentiels élevés : ainsi, pour un prépulse de 150 mV,  $I/I_{max} = 0,86$  en Ca<sup>++</sup> et 0,82 en Sr<sup>++</sup>. Sur 7 autres préparations, une superposition

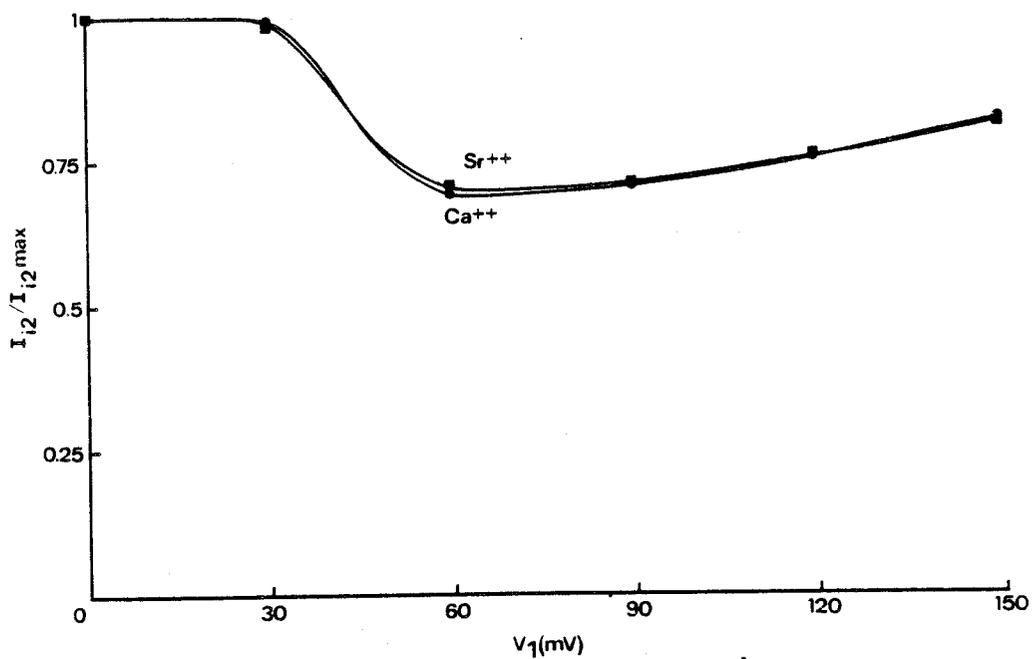
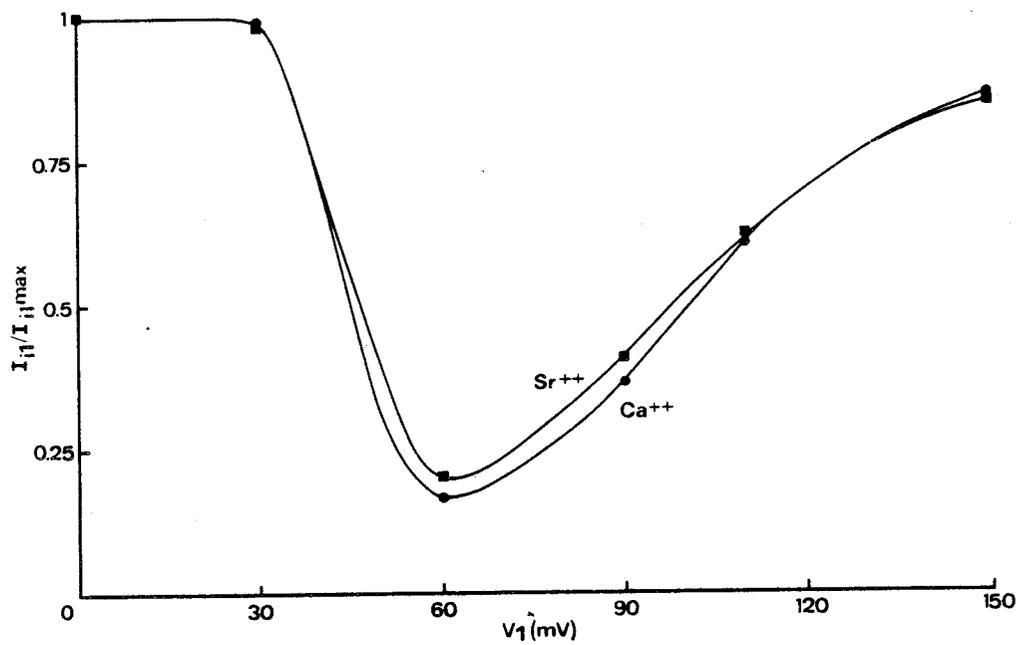


Figure 34

Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du pré-pulse,  $V_1$ , du degré d'inactivation du courant entrant à inactivation rapide (en haut) et à inactivation lente (en bas), pour une fibre placée successivement en solution de référence ( $Ca^{++}$ ) puis en solution  $Sr^{++}$ .

Les courants entrants sont désignés par  $I_{i1}$  et  $I_{i2}$  (respectivement courants à inactivation rapide et lente), qu'ils soient portés par les ions  $Ca^{++}$  ou  $Sr^{++}$ .

(même fibre que figures 32 et 33).

comparable des deux courbes a été obtenue. La mesure de l'inactivation pour chacune des deux composantes ( $f_1$  et  $f_2$ ) confirme ce résultat (Fig. 34). Aucune différence significative n'apparaît dans l'inactivation de la première ou de la deuxième composante entre le milieu  $\text{Ca}^{++}$  ou le milieu  $\text{Sr}^{++}$ . Les caractéristiques précédemment décrites pour  $f_1$  et  $f_2$  en solution de référence sont parfaitement valables en solution  $\text{Sr}^{++}$ .

## 2) Substitution du $\text{Ca}^{++}$ par le $\text{Ba}^{++}$

Comme pour le strontium, les ions baryum sont susceptibles de servir de porteurs de charges au travers de la membrane de la fibre musculaire de crabe. Il y a donc un courant entrant de baryum (HAGIWARA, FUKUDA et EATON, 1974).

La figure 35 présente les courants ioniques enregistrés lors de l'imposition d'un potentiel de 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée, en solution de SR, puis en solution SR- $\text{Ba}^{++}$ , où les ions calcium ont été remplacés par le baryum.

Le courant en SR- $\text{Ba}^{++}$  est nettement plus ample qu'en solution de référence puisque de 0.34  $\mu\text{A}$  il passe à 0.47  $\mu\text{A}$ , soit près de 40% d'augmentation. En outre, l'inactivation de la première composante est nettement ralentie en présence de  $\text{Ba}^{++}$ . L'analyse en coordonnées semi-logarithmiques fournit les valeurs des constantes de temps suivantes :  $\tau_1$  passe de 75 à 110 msec, tandis que  $\tau_2$  passe de 560 à 500 msec.

Ceci est en général le cas sur l'ensemble des expériences réalisées avec le  $\text{Ba}^{++}$  en substitution du  $\text{Ca}^{++}$ .

La méthode du double pulse a été appliquée afin

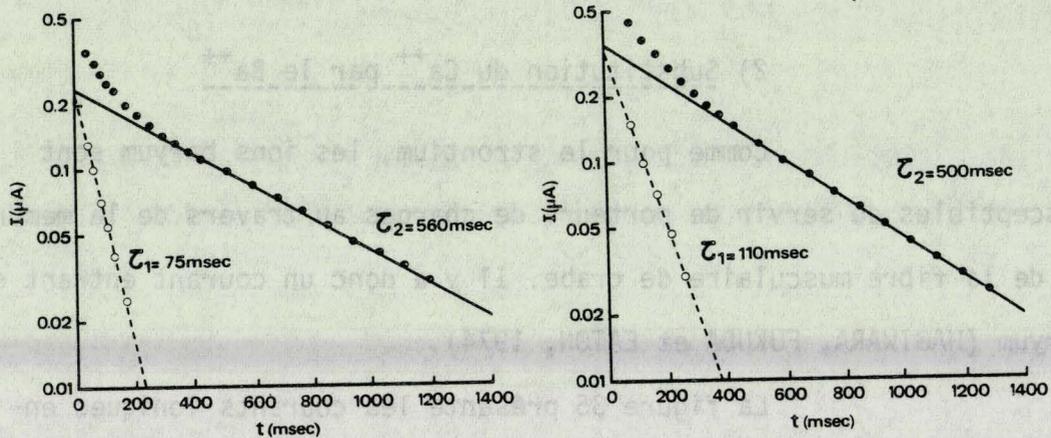
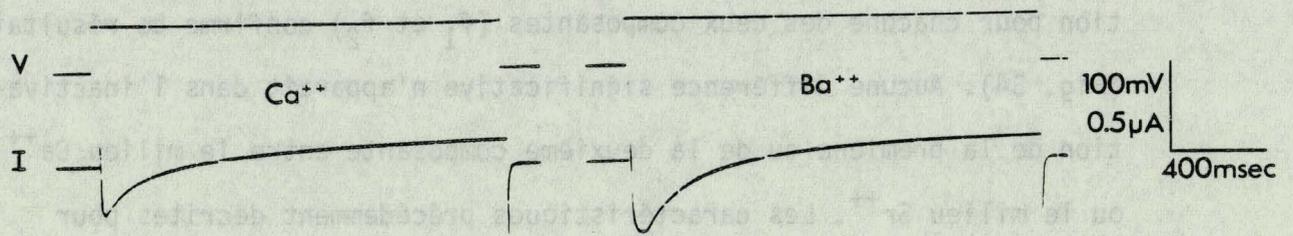


Figure 35

Partie supérieure : courants ioniques (I), obtenus pour un potentiel imposé de + 50 mV d'amplitude et 1700 msec de durée, sur une fibre placée successivement en solution de référence ("Ca<sup>++</sup>") puis en solution de référence où les ions Ca<sup>++</sup> sont remplacés par Ba<sup>++</sup>.

Partie inférieure : reports semilogarithmiques des courants entrants. (fibre n° 543).

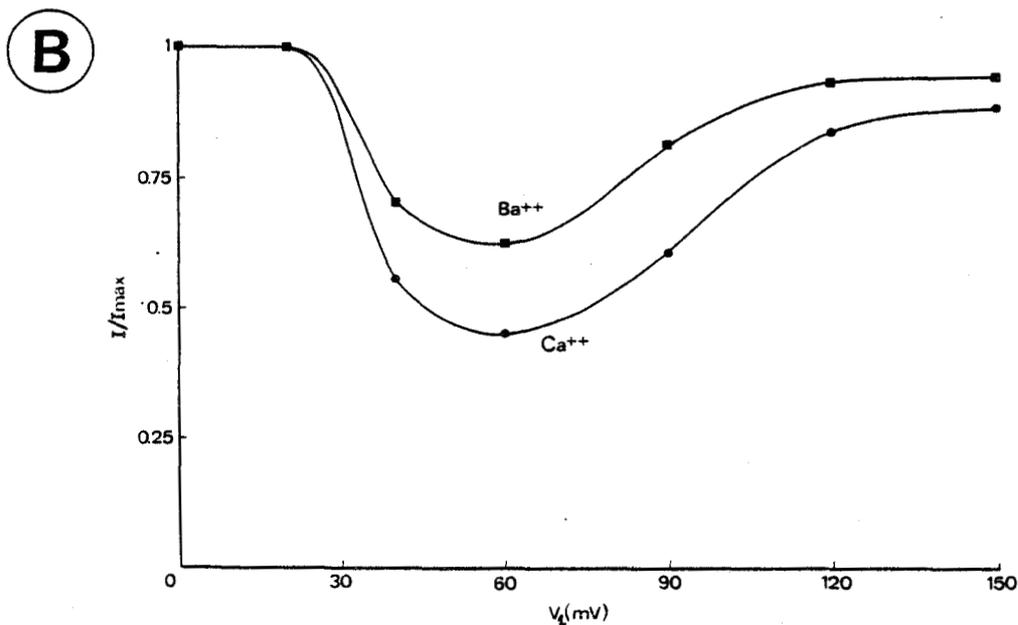
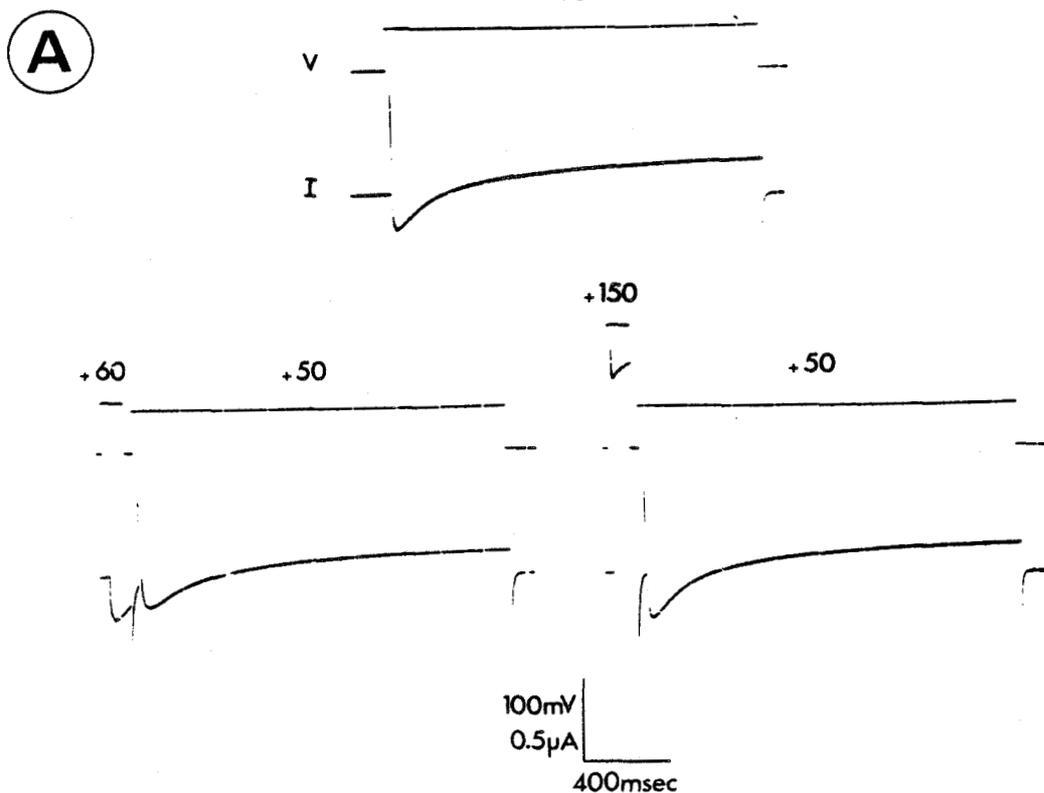


Figure 36

A - Courants ioniques (I) obtenus sur une fibre placée en solution  $Ba^{++}$ , pour un pulse test ( $V_2 = + 50$  mV, 1700 msec, tracé supérieur), précédé d'un pulse conditionnant de 100 msec de durée, d'une amplitude de + 60 mV ou + 150 mV (tracés inférieurs).

B - Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du prépulse ( $V_1$ ), du degré d'inactivation du courant entrant ( $I/I_{max}$ ), pour une fibre placée successivement en solution de référence ( $Ca^{++}$ ) puis en solution baryum sans calcium ( $Ba^{++}$ ).  
(fibre n° 643).

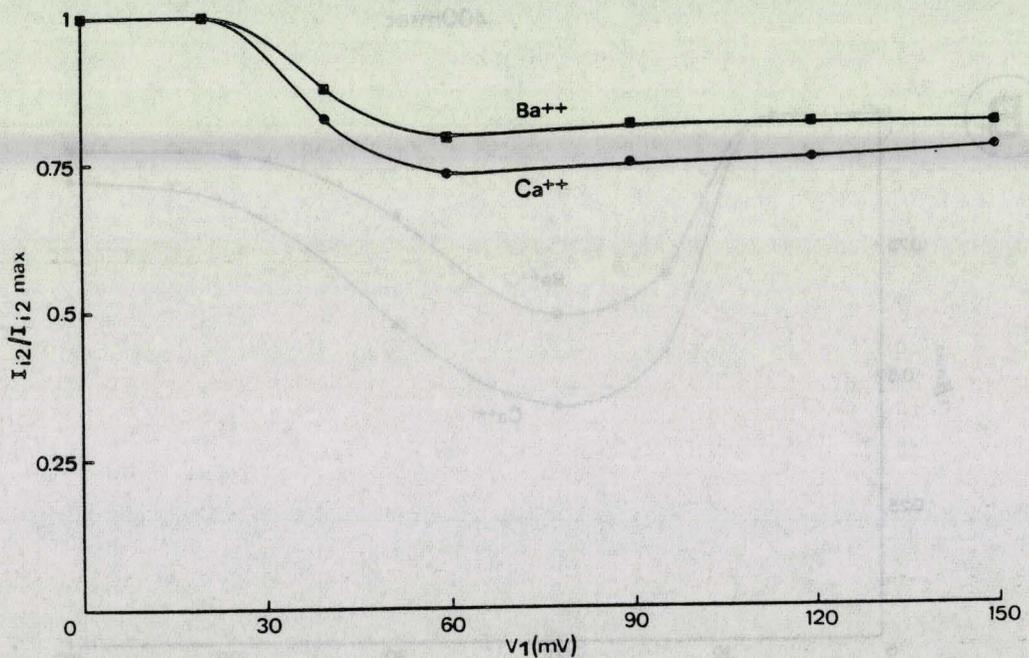
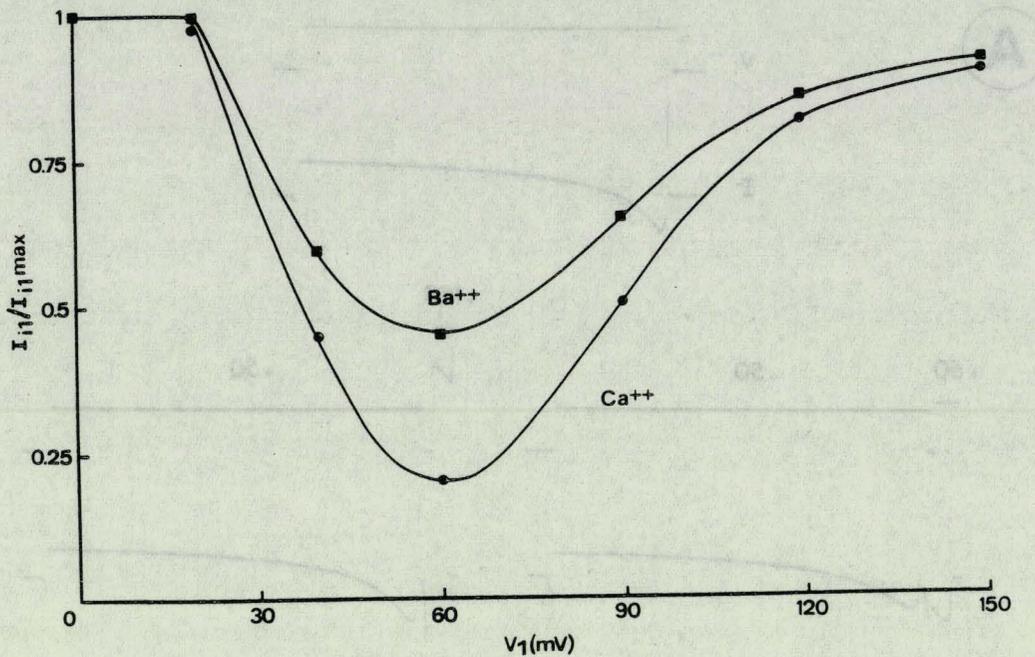


Figure 37

Courbes traduisant l'évolution, en fonction de l'amplitude du pulse conditionnant ( $V_1$ ) du degré d'inactivation des courants à inactivation rapide (en haut) et à inactivation lente (en bas), pour une fibre placée successivement en solution de référence ( $Ca^{++}$ ), puis  $Ba^{++}$ .

Les courants entrants sont désignés par  $I_{i1}$  et  $I_{i2}$  (respectivement courants à inactivation rapide et lente), qu'ils soient portés par les ions  $Ca^{++}$  ou  $Ba^{++}$ .

d'étudier l'inactivation du courant entrant lorsque c'est le  $Ba^{++}$  qui emprunte le canal calcique ( $V_{test} = + 60$  mV, durée du prépulse : 200 msec). Les tracés de la figure 36 (A) montrent l'influence de deux prépulses,  $V_1 = + 70$  et  $V_1 = + 150$  mV inactivant au maximum  $I_{Ba}$  dans le premier cas et produisant la plus forte levée d'inactivation dans le second. La figure 36 (B) représente la courbe de variation du rapport  $I/I_{max}$ , pour différentes valeurs de  $V_1$ , pour une fibre baignée successivement en milieu SR puis SR- $Ba^{++}$ .

Contrairement aux résultats obtenus en  $Sr^{++}$ , l'inactivation du courant entrant est modifiée par le remplacement du  $Ca^{++}$  par le  $Ba^{++}$ .

En présence de  $Ba^{++}$  nous observons une nette diminution de l'inactivation maximale :  $I/I_{max} = 0.62$  en  $Ba^{++}$  contre 0.45 en  $Ca^{++}$ .

L'analyse de l'inactivation des deux composantes du courant entrant de  $Ba^{++}$  est donnée à la figure 37. On y retrouve, pour la première composante, une différence marquée dans le degré d'inactivation maximum : 0.45 en SR- $Ba^{++}$ . La première composante est nettement moins inactivée lorsque c'est le  $Ba^{++}$  qui porte le courant au travers du canal calcique. En ce qui concerne la deuxième composante, les deux courbes présentent le même décours, à savoir une valeur du rapport  $I/I_{max}$  quasiment constante pour des  $V_1$  supérieurs à + 50 mV, que ce soit en SR ou en SR- $Ba^{++}$ .

En conclusion ces expériences permettent de montrer que l'inactivation du courant à inactivation rapide dépend de la nature ionique du courant entrant, contrairement au courant à inactivation lente.

DISCUSSION - CONCLUSION

Dans le travail qui vient d'être exposé, différents éléments de réponse ont été apportés à la question que nous nous posons quant à la nature du processus d'inactivation du courant calcique.

Les principaux résultats obtenus lors de ce travail peuvent se résumer comme suit.

### I) Le courant calcique

Le remplacement du potassium extracellulaire par du césium, ainsi que l'addition à la solution physiologique de TEA et de 4AP, ont un effet remarquable sur les courants ioniques obtenus pour des dépolarisations imposées.

En effet, dans ces conditions, les courants semblent essentiellement de nature calcique. L'utilisation du cobalt en tant qu'inhibiteur des courants calciques confirme ceci, en fournissant de plus une mesure du potentiel d'inversion du courant entrant très élevée (+ 130 mV en moyenne). Cette valeur de potentiel d'inversion, correspondant à un potentiel d'équilibre  $E_{Ca}$  voisin de + 60 mV (potentiel de référence fixé à - 70 mV), est encore inférieure à la valeur maximum citée par HENČEK et ZACHAR (1977) de + 85 mV sur la fibre d'écrevisse. Néanmoins, cette valeur est supérieure à celle précédemment déterminée sur notre préparation par MOUNIER (1975) dans des conditions où les courants potassiques n'étaient bloqués que par du TEA, de façon imparfaite vraisemblablement. Nos conditions expérimentales nous permettent donc d'estimer que le courant calcique enregistré semble relativement pur. Cependant, les courants obtenus pour des V imposés supérieurs à en-

viron + 70 mV sont fréquemment additionnées d'un courant de rectification dans le sens sortant, dont la présence est particulièrement visible dans l'amplitude des courants en fin d'impulsion, en solution de référence. (Cf. Fig. 10 et 11, courbes B).

Notons que cette rectification sortante, dont la nature ionique n'a pas été définie, est affectée par la présence des ions  $\text{Co}^{++}$  (Fig. 10 et 11, courbes D) comme cela avait déjà été décrit pour les ions  $\text{Mn}^{++}$  (MOUNIER et VASSORT, 1975). Un tel effet peut être imputé à la nature électrochimique du cobalt, cation divalent, qui, en tant que tel, est susceptible d'exercer un effet de charge au niveau de la membrane musculaire. Ainsi, la pente de la courbe I/V serait diminuée pour des dépolarisations importantes, en présence de  $\text{Co}^{++}$ . Il est intéressant de noter que ce changement irait dans le sens d'une sous-évaluation de  $I_{\text{Ca}}$  lors du calcul de la différence : I en présence de cobalt - I sans cobalt, si l'on suppose que le courant de rectification est déjà un peu activé au moment du maximum de  $I_{\text{Ca}}$ . Ce fait peut rendre compte de la valeur de  $E_{\text{Ca}}$  légèrement inférieure à la valeur théorique maximale.

Toutefois, dans l'étude du processus d'inactivation, le potentiel test étant fixé dans une gamme de + 50 à + 60 mV, ce phénomène n'entraîne pas d'erreur notable dans la lecture du courant calcique. Nous pouvons donc considérer que ce potentiel test nous procure l'image véritable du courant calcique  $I_{\text{Ca}}$ , pour les mesures nécessaires à l'étude de l'inactivation de  $I_{\text{Ca}}$ .

La diminution du courant entrant lors d'un potentiel imposé dépolarisant n'est pas due à l'activation concomitante d'un

courant sortant, mais bien à la diminution du courant  $I_{Ca}$  lui-même.

Il a donc été nécessaire de déterminer si cette diminution était le reflet d'une véritable inactivation (diminution de la conductance  $G_{Ca}$ ) ou bien le reflet d'un phénomène de réduction du facteur driving-force,  $V-V_{Ca}$ , consécutive à l'accumulation intracellulaire des ions  $Ca^{++}$ , ou à leur raréfaction dans l'espace péri-cellulaire (déplétion).

A cet égard, une expérience probante consiste à changer les ions divalents porteurs de courant entrant. Sur notre préparation, si les ions strontium semblent se comporter d'une manière très comparable aux ions  $Ca^{++}$ , les ions baryum, par contre, portent des courants nettement plus amples, mais dont l'inactivation est sensiblement ralentie. Corrélativement, l'inactivation est moins importante en  $Ba^{++}$ . Cette diminution d'inactivation du courant global est d'ailleurs essentiellement due à celle de sa première composante dont l'inactivation dépend de l'influx de cations. Ce résultat tend donc à prouver que l'accumulation intracellulaire des ions  $Ca^{++}$  ne peut être invoquée. En effet des courants plus amples devraient provoquer une réduction de driving-force plus prononcée ; l'inactivation devrait s'accélérer et augmenter. Un résultat analogue : effet nul des ions  $Sr^{++}$  et effet marqué du  $Ba^{++}$  sur l'inactivation avait été observé par BREHM et ECKERT (1978) sur la paramécie. Par contre, ALMERS et al. (1981) observent une inactivation plus rapide des courants portés par les ions  $Ba^{++}$  ou  $Sr^{++}$ , par rapport à celle mesurée sur les courants calciques et attribuent ceci à une raréfaction des cations externes. Enfin,

lorsque l'inactivation dépend du potentiel, comme pour l'oeuf de *Neanthes* (FOX, 1981), aucune différence d'inactivation n'est notée que le courant soit porté par  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Ba}^{++}$ .

En ce qui concerne notre préparation, le ralentissement et la diminution du processus d'inactivation en présence de  $\text{Ba}^{++}$  indiquent donc une certaine spécificité des ions  $\text{Ca}^{++}$  dans ce processus, notamment en ce qui concerne le courant  $I_{\text{Ca}1}$ , et rendent donc improbable une réduction de force électromotrice des ions calcium comme cause du déclin de  $I_{\text{Ca}}$  : il s'agit bien d'une inactivation au sens strict.

## II) Processus d'inactivation de $I_{\text{Ca}1}$

Comme cela a été dit, un résultat fondamental dans l'étude de l'inactivation de  $I_{\text{Ca}}$  consiste en l'existence de deux exponentielles dans le décours de la diminution de  $I_{\text{Ca}}$ . Ce fait ne peut être interprété, nous l'avons vu, comme résultant de l'activation d'une conductance sortante. (Cf. Chapitre BI).

Ceci nous a donc amené à étudier séparément la fraction de courant à inactivation rapide,  $I_{\text{Ca}1}$ , et celle à inactivation lente,  $I_{\text{Ca}2}$ .

Notons que cette étude séparée a été justifiée finalement par les nettes différences rencontrées au niveau des processus d'inactivation de  $I_{\text{Ca}1}$  et  $I_{\text{Ca}2}$ .

Le degré d'inactivation du courant  $I_{\text{Ca}1}$  dépend au premier abord du potentiel conditionnant, du moins pour une gamme de prépulses de + 30 à + 60 ou + 70 mV. Par contre, pour des V conditionnants plus élevés, l'inactivation diminue (Cf. Fig. 19). Ceci nous a

donc amené à corrélérer l'inactivation, non plus au V conditionnant lui-même, mais plutôt au courant calcique qu'il a provoqué. De fait, il existe un parallélisme très net entre l'amplitude du courant calcique produit par le prépulse et le degré d'inactivation de  $I_{Ca1}$  dans le pulse test. (Cf. Fig. 21).

En outre, si l'influx calcique dû au prépulse est modifié, pour une même valeur de  $V_1$ , l'inactivation de  $I_{Ca1}$  dans le pulse test est modifiée dans le même sens. Ainsi, un allongement du prépulse provoque-t-il une inactivation accrue de  $I_{Ca1}$ . (Cf. Fig. 22 et 23). De même, l'augmentation du courant dû au prépulse par accroissement de la concentration du calcium extracellulaire a pour conséquence une inactivation plus prononcée de  $I_{Ca1}$ , et ceci pour des  $V_1$  identiques entre les solutions SR et SRCa5 (Cf. Fig. 25).

Ce type de parallélisme entre le courant calcique "conditionnant" et le degré d'inactivation du courant test est également décrit par les auteurs démontrant le rôle du calcium dans l'inactivation du canal calcique : ASHCROFT et STANFIELD (1982, sur la fibre musculaire de phasme, ou BREHM et al. (1980) sur la paramécie, ou ECKERT et TILLOTSON (1981) sur le neurone d'aplysie.

A l'inverse, FOX (1981), démontre que l'inactivation commence bien avant qu'un courant calcique ne soit mesurable (Cf. sa figure 5c). Sur l'oeuf de polychète cet auteur démontre la dépendance vis à vis du potentiel de l'inactivation ; en effet, des potentiels conditionnants aussi élevés que 180 mV n'entraînent aucune levée d'inactivation, bien qu'étant voisins du potentiel d'inversion de  $I_{Ca}$ .

Enfin, nous avons montré que la cinétique d'inac-

tivation de  $I_{Ca1}$  subit également l'influence de l'influx calcique conditionnant. (Cf. Fig. 20) : des courants fortement inactivés sont caractérisés par une constante de temps  $\tau_1$  plus élevée que celle du courant de référence ; l'évolution de  $\tau_1$  en fonction du prépulse  $V_1$  est strictement opposée à celle du degré d'inactivation,  $I_{Ca1}/I_{Ca1max}$ .

Ceci est en contradiction avec ce que prévoit la théorie de HODGKIN et HUXLEY.

Toutefois, les résultats présentés concernant le rôle de  $I_{Ca}$  dans l'inactivation du courant  $I_{Ca1}$  imposent une remarque. La levée d'inactivation n'est qu'exceptionnellement complète ( $I_{Ca1}/I_{Ca1max} = 1$ ) pour des valeurs très élevées de  $V_1$  (+ 150 mV ou plus) voisines ou même supérieures à celles de  $V_{Ca}$ . En effet si  $V_1 = V_{Ca}$ , le courant conditionnant devrait être nul, et le courant  $I_{Ca1}$  dans le test, pleinement disponible. Or, ce n'est presque jamais le cas.

Deux explications au moins peuvent être avancées à cela. D'une part, une certaine imprécision dans la détermination du courant calcique conditionnant, en particulier pour des  $V_1$  élevés, peut amener à considérer un courant calcique comme nul, alors qu'il ne l'est pas. L'effet du cobalt sur la rectification dans le sens sortant, déjà évoqué, pourrait expliquer cette erreur. D'autre part, il est possible qu'après un prépulse d'amplitude  $V_1 = V_{Ca}$ , où la conductance  $G_{Ca}$  a été pleinement activée, le retour de 20 à 40 msec de durée à un potentiel  $V = 0$  induise un courant de désactivation qui sera d'autant moins négligeable que, pour  $V = 0$ , la force électromotrice des ions calcium est très élevée. Le temps que  $G_{Ca}$  se désactive, un courant  $I_{Ca}$  peut donc se développer, produisant ainsi une légère inac-

tivation de  $I_{Ca1}$ . Ce phénomène, déjà envisagé par ASHCROFT et STANFIELD (1982), pourrait expliquer, lui aussi une levée d'inactivation de  $I_{Ca1}$  incomplète pour des  $V_1$  égaux ou supérieurs à  $V_{Ca}$ .

En ce qui concerne la constante de temps rapide d'inactivation,  $\tau_1$ , celle-ci augmente pour des  $I_{Ca1}$  fortement inactivés, donc de faible amplitude. Les données bibliographiques ne sont pas très explicites quant à la relation entre le degré d'inactivation et sa constante de temps, dans les expériences de double pulse. Si certains auteurs mettent bien en évidence une relation inverse entre l'amplitude du courant  $I_{Ca}$  et, soit la constante de temps unique (ALMERS et al., 1981), soit la constante de temps rapide (ASHCROFT et STANFIELD, 1982) mesurées lors de l'imposition d'un simple pulse, ces derniers auteurs signalent simplement que leurs deux constantes de temps sont augmentées, par rapport à celles mesurées en simple pulse, lorsque un pulse test de + 80 mV est précédé par un pulse conditionnant de même amplitude. De même, BROWN et al. (1981) constatent un ralentissement de l'inactivation dans un pulse test lorsque celui-ci est précédé d'un pulse conditionnant ( $\tau_c$  et  $\tau_h$  dans leur figure 5 A), mais ces auteurs ne considèrent pas cette variation comme significative.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus plaident bien en faveur de l'hypothèse d'une inactivation de  $I_{Ca1}$  intimement liée à l'influx calcique. En particulier, la levée d'inactivation constatée pour des préimpulsions faisant entrer peu de calcium dans la cellule est le point fondamental permettant de réfuter la théorie de HODGKIN et HUXLEY pour décrire l'inactivation de  $I_{Ca1}$ . La variation de la constante de temps  $\tau_1$  liée à l'influx calcique conditionnant est, de même, en contradiction avec cette théorie.

### III) Processus d'inactivation de $I_{Ca2}$

La fraction de courant à inactivation lente,  $I_{Ca2}$ , est bien un courant calcique. Elle n'est pas le reflet d'un courant sortant s'additionnant au courant entrant calcique et n'est pas non plus liée au mécanisme d'échange actif Na-Ca.

Ce courant dépend du potentiel : il s'active dans la même gamme de V imposés que  $I_{Ca1}$ . Au contraire de ce dernier,  $I_{Ca2}$  ne semble pas montrer de diminution après avoir atteint son maximum (pour  $V = + 60$  mV), du moins dans la gamme de potentiels utilisés, gamme limitée volontairement en raison des courants de rectification sortante s'activant pour des V imposés élevés, lors de pulses longs. Néanmoins, la dépendance de  $I_{Ca2}$  vis-à-vis du potentiel présente une différence marquée par rapport à celle de  $I_{Ca1}$ .

L'inactivation de la fraction de courant  $I_{Ca2}$ , est, elle, plus conforme au modèle décrit par HODGKIN et HUXLEY. En particulier, l'inactivation augmente avec l'amplitude du prépulse, jusqu'à une valeur maximale, mais reste constante pour des prépulses plus élevés, jusqu'à + 150 mV. De plus, la constante de temps  $\tau_2$ , pour un pulse test donné, semble insensible à l'amplitude du prépulse  $V_1$  ; ceci que  $I_{Ca2}$  soit ou non inactivé. Ces résultats sont semblables à ceux décrits par FOX (1981). L'inactivation de  $I_{Ca2}$  n'est donc pas reliée à l'influx calcique. Elle semble ne dépendre que du potentiel et serait conforme au modèle décrit par HODGKIN et HUXLEY. Ceci constitue par conséquent une différence essentielle par rapport à l'inactivation de  $I_{Ca1}$ .

#### IV) Conclusion générale

L'étude de l'inactivation du courant calcique, menée sur un courant  $I_{Ca}$  pratiquement pur, a donc révélé l'existence de deux processus.

i) Une fraction du courant calcique s'inactive rapidement, en réponse à l'influx d'ions  $Ca^{++}$  au travers du canal calcique.

Nous avons donc retrouvé le phénomène décrit pour des préparations diverses par des auteurs de plus en plus nombreux. (Voir le chapitre d'introduction). Cette inactivation déclenchée par le courant lui-même constitue un phénomène de rétro-action négative qui limite donc l'amplitude et la durée du courant.

ii) Une seconde fraction du courant calcique s'inactive à un taux qui est sous la dépendance du potentiel transmembranaire, conformément à la théorie d'HODGKIN - HUXLEY.

Notons que ceci entraîne également une rétroaction négative puisque lors d'un potentiel d'action, plus la dépolarisation sera ample, plus l'inactivation tendra à diminuer ce courant.

L'existence de ces deux courants à vitesses d'inactivation différentes et relevant de mécanismes différents pourrait être reliée à l'existence de deux populations distinctes de canaux calciques localisés différemment au sein de la membrane musculaire (membrane de surface et membrane des tubules transverses, par exemple), ou encore dotées de propriétés différentes, malgré une répartition homogène ou enfin de populations distinctes à la fois par leur localisation et leurs propriétés.

Néanmoins, ces deux processus d'inactivation du courant calcique trouvent leur place dans un schéma général de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe, activité électrique elle-même partie intégrante du couplage excitation-contraction.

Ce travail avait été entrepris dans le but d'apporter une contribution à une meilleure connaissance des processus élémentaires à la base de ce couplage excitation-contraction. Puisse-t-il avoir réussi, ne serait-ce qu'en partie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

ADAMS, D.J. & GAGE, P.W. (1979)

Characteristics of sodium and calcium conductance changes produced by membrane depolarization in an *Aplysia* neurone. *J. Physiol.* 289, 143-161.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGINK, A.L. (1970)

Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. *J. Physiol.* 208, 607-644.

ALMERS, W., FINK, R. & PALADE, P.T. (1981)

Calcium depletion in frog muscle tubules : the decline of calcium current under maintained depolarization. *J. Physiol.*, 312, 177-207.

ARMSTRONG, C.M. & BINSTOCK, L. (1965)

Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol.*, 48, 859-872.

ASHCROFT, F.M. & STANFIELD, P.R. (1981)

Calcium dependance of the inactivation of calcium currents in skeletal muscle fibers of an insect. *SCIENCE* 213, 224-226.

ASHCROFT, F.M. & STANFIELD, P.R. (1982)

Calcium inactivation in skeletal muscle fibres of the stick insect, *CARAUSIUS MOROSUS*. *J. Physiol.* 330, 349-372.

BAKER, P.F., HODGKIN, A.L. & MEVES, H. (1963)

Internal potassium concentration and the action potential of giant axons of *loligo*. *J. Physiol.*, 167, 56-57 P.

- BEAUGE, L.A., MEDICI, A. & SJODIN, R.A. (1973)  
The influence of external calcium ions on potassium efflux  
in frog skeletal muscle.  
J. Physiol., 228, 1-11.
- BERTRAND, F. (1977)  
L'application de la technique du potentiel imposé par micro-  
électrodes de la fibre musculaire squelettique de crabe  
(Carcinus Maenas).  
DEA LILLE
- BREHM, P. & ECKERT, R. (1978)  
Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in  
Paramecium.  
SCIENCE 202, 1203-1206.
- BREHM, P., ECKERT, R. & TILLOTSON, D. (1980)  
Calcium mediated inactivation of calcium current in Paramecium.  
J. Physiol. 306, 193-203.
- 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., 320, 193-218.
- CARMELIET, E. (1980)  
Decrease of K efflux and influx by external Cs ions in  
cardiac Pinkinje and unisele cells.  
Pflügers Arch. 383, 143-150.
- ECKERT, R. & TILLOTSON, D.L. (1981)  
Calcium - mediated inactivation of the calcium conductance in  
caesium-loaded giant neurones of Aplysia Californica.  
J. Physiol., 314; 265-280.
- FATT, P. & KATZ, B. (1953)  
The electrical properties of crustacean muscle fibres.  
J. Physiol., 120, 171-204.

FISCHMEISTER, R. & HORACKOVA, M. (1982)

Slow inward Ca current in frog heart : theoretical evidence against a voltage-dependent inactivation.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 60, 1185-1192.

FOX, A.P. (1981)

Voltage-dependent inactivation of a calcium channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(2), 953-956.

GILLEPSIE, J.I. & HUTTER, O.F. (1975)

The action of 4 aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres.

J. Physiol. 252, 70-71 P.

GOBLET, C. & MOUNIER, Y. (1982)

Contractility in relation with excitability in voltage clamped crab muscle fibres : evidence for two components of tension.

Gen. Physiol. Biophys., 1, 233-253.

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

The effect of TEA chloride on the muscle membrane examined with an intracellular microelectrode.

J. Physiol., 129, 513-527.

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

Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxine, procaine and manganese ions.

J. Gen. Physiol., 49, 793.

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

Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle membrane.

J. Gen. Physiol., 50, 583.

HAGIWARA, S., FUKUDA, J. & EATON, D.C. (1974)

Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp.

J. Gen. Physiol., 63, 564-578.

HAUDECOEUR, G. & GUILBAULT, P. (1972)

Contribution à l'étude de l'activité électrique de la fibre musculaire de crabe (*Carcinus Maenas*). Effets sur le potentiel d'action de solutions de contenu ionique modifié.

J. Physiol., Paris, 64, 367-386.

HENCEK, M. & ZACHAR, J. (1977)

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

J. Physiol., 268, 51-71.

HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952)

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.

J. Physiol., 177, 500-544.

KOSTYUK, P.G. & KRISHTAL, O.A. (1977)

Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones.

J. Physiol., 270, 545-568.

Mc DONALD, T.F. (1982)

The slow inward calcium current in the heart.

Ann. Rev. Physiol., 44, 425-434.

MENTRARD, D., VASSORT, G. & FISCHMEISTER, R. (1984)

Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in cesium-loaded frog heart cells.

J. gen. Physiol., 53, 105-131.

MOUNIER, Y. (1975)

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

Thèse d'Etat, LILLE.

- MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975)  
Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions.  
J. Physiol., 251, 589-608.
- PEACHEY, G.D. (1975)  
Transverse tubules in excitation-contraction coupling.  
Fed. Proc., 24, 1124-1134.
- PELHATE, M. & PICHON, Y. (1974)  
Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach.  
J. Physiol., 242, 90-91.
- PLANT, F.D., STANDEN, N.B. & WARD, T.A. (1983)  
The effects of injection of calcium ions and calcium chelators on calcium channel inactivation in Helix neurones  
J. Physiol., 334, 189-212.
- SANCHEZ, J.A. & STEFANI, E. (1983)  
Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog.  
J. Physiol., 337, 1-17.
- SANDOW, A. (1965)  
Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.  
Pharmacol. Rev., 17(3), 265-320.
- SELVERSTON, A. (1967)  
Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers.  
Am. Zool., 7, 515-525.
- TASAKI, I. & HAGIWARA, S. (1957)  
Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride.  
J. Gen. Physiol., 40, 859-885.

TILLOTSON, D. (1979)

Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75(3), 1497-1500.

TSIEN, R.W.

Calcium channels in excitable cell membranes.

Ann. Rev. Physiol., 45, 341-368.

ULBRICHT, W. & WAGNER, H.H. (1976)

Block of potassium of the nodal membrane by 4 aminopyridine and its partial removal on depolarization.

Pflüger Arch., 367, 77-87.

YEH, J.Z., OKFORD, G.S., WU, C.H. & NARAHASHI, T. (1976)

Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes.

Biophys. J. 16, 77-81.

