

50376
1985
277

*50376
1985
277

n° d'ordre 13

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

Spécialité : Biologie cellulaire

par Hassan J D A I A A



ETUDE DE LA CONDUCTANCE AUX IONS Ca^{2+}

DES MEMBRANES IMPLIQUEES DANS

LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES DE CRUSTACÉ

Soutenue le 18 Juillet 1985 devant la Commission d'Examen

Président	M. ROUSSEAU
Rapporteurs	M. GUILBAULT
	M. DUROIS
	M. RAYMOND



D 030 176421 5

50376
1985
277

50376
1985
277

N° d'ordre 13

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

Spécialité : Biologie cellulaire

par Hassan J D A I A A



ETUDE DE LA CONDUCTANCE AUX IONS Ca^{2+}

DES MEMBRANES IMPLIQUEES DANS

LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES DE CRUSTACÉ

Soutenu le 18 Juillet 1985 devant la Commission d'Examen

Président	M. ROUSSEAU
Rapporteurs	M. GUILBAULT
	M. DUBOIS
	M. RAYMOND

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : ANALYSE DE LA CONDUCTANCE CALCIQUE DE MEMBRANES DE SURFACE
ET TUBULAIRE

INTRODUCTION

PREMIER CHAPITRE : POSITION DU PROBLEME

- A. Problème d'imposition du potentiel
- B. Obtention du courant de calcium à partir du courant global
- C. L'inactivation du courant de calcium
- D. Difficulté de la détermination du potentiel apparent d'équilibre aux ions Ca^{2+} (E_{Ca})
- E. Existence possible de plusieurs composantes de courant entrant
- F. Conclusion

DEUXIEME CHAPITRE : MATERIEL ET METHODE

- A. Matériel
- B. Enregistrement du courant de membrane dans les conditions de potentiel imposé
- C. Milieu

TROISIEME CHAPITRE : RESULTATS

I - ETUDE DES PHENOMENES DE RECTIFICATION

- A. Etude de la rectification dans le sens entrant
 - 1. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire de potassium (90 %)
 - 2. Effets de la réduction de la concentration extracellulaire d'ions Cl^- (90 %)
 - 3. Effets de l'acide niflumique
 - 4. Conclusion sur la rectification dans le sens entrant

- B. Etude de la rectification dans le sens sortant
 1. Effets des ions TEA⁺ (60 mM) sur la rectification dans le sens sortant
 2. Effets des ions Cs⁺ (10 mM) sur la rectification dans le sens sortant
 3. Conclusion

II - ETUDE DU COURANT (I_{Ca}) ET DE LA CONDUCTANCE (G_{Ca}) DE MEMBRANE AUX IONS Ca^{2+}

- A. Etude du courant entrant de calcium en présence d'ions Mn^{2+}
- B. Etude de I_{Ca} et G_{Ca} en présence de procaïne
 1. Analyse de I_{Ca}
 2. Influence de la procaïne (2 mM) sur le courant capacitif et stationnaire
 3. Mise en évidence de deux composantes de courant entrant de calcium I_{Ca_1} et I_{Ca_2}
 4. Mise en évidence de I_{Ca_2} en absence de I_{Ca_1} inhibé par une prédépolarisation conditionnante
 5. Analyse des conductances G_{Ca_2} et G_{Ca_1} en fonction du temps et du potentiel
 - a. G_{Ca_2}

α/ Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture du canal calcique correspondant à la 2ème composante

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

b. G_{Ca_1}

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

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

c. Conclusion

QUATRIEME CHAPITRE : PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSION GENERALE

- A. Les phénomènes de rectification
- B. Etude de la conductance calcique
- C. Conclusion

DEUXIEME PARTIE : POSSIBLE EXISTENCE DE CANAUX CALCIQUES DEPENDANT DU VOLTAGE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

INTRODUCTION

PREMIER CHAPITRE : ROLE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- A. Structure du réticulum sarcoplasmique
- B. Perméabilité du RS
- C. La prise de calcium par le RS
- D. La capacité de charge du RS
 - 1. "Depolarization induced Ca release"
 - a. Effet de la pression osmotique sur la libération de Ca
 - α - *au niveau des fibres musculaires pelées*
 - β - *au niveau des vésicules de réticulum sarcoplasmique isolé*
 - b. Relation entre le potentiel de membrane et la perméabilité calcique du RS
 - α - *au niveau des fibres musculaires*
 - β - *au niveau des vésicules du réticulum isolé*
 - 2. "Calcium induced calcium release"
 - a. Effets de $[Ca]_{er}$ sur le mécanisme de CICR
 - b. Possible existence de canaux calciques activés par la $[Ca]_{er}$ au niveau de la membrane du RS

DEUXIEME CHAPITRE : MATERIEL ET METHODE

- A. Préparation des vésicules du réticulum sarcoplasmique isolé (VRSI)
- B. Pureté des VRSI
 - 1. Contrôle en microscopie électronique
 - 2. Contrôle biochimique
- C. Dosage spectrophotométrique des protéines
- D. Standardisation des résultats
 - 1. Condition de référence
 - 2. Mesure de la prise et de la libération du Ca par les VRSI
 - 3. Polarisation du RS

TROISIEME CHAPITRE : RESULTATS

- A. Effets de la polarisation de membrane sur les mouvements de Ca à travers la membrane du RS
 - 1. Effets du potentiel de membrane du RS sur le transport actif de Ca dépendant de l'hydrolyse de l'ATP
 - 2. Effets de la polarisation sur la libération de Ca
- B. Modulation des canaux calciques de la membrane réticulaire par les substances pharmacologiques
 - 1. Effets de la caféine
 - 2. Effets de la procaïne
 - 3. Effets de l'AMP_c, l'AMP et la forskoline sur la libération de Ca

QUATRIEME CHAPITRE : PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSION

RESUME

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE

ABREVIATIONS UTILISEES

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

m_0 : variable d'activation au potentiel HP.
 m_∞ : valeur stationnaire de m en fin de transformation d'un nombre de sites de l'état β à l'état α .
 Q_β : charges intramembranaires de type β .
 r_i : résistance du milieu intracellulaire par unité de longueur (en $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).
 R_i : résistivité du milieu intracellulaire (en $\Omega \cdot \text{cm}$)
 R_{ds} : résistance du volume intracellulaire
 R_e : résistance d'entrée
 R_a : résistance d'accès
 RP (ou E_r) : potentiel de repos
 SITS : 4-acetamido-4'isothiocyanostilbène -2, 2'disulfonic
 x : nombre de particules impliquées dans l'activation du canal.
 λ : constante d'espace
 τ_m : constante de temps d'activation
 τ_h : constante de temps d'inactivation
 RS : réticulum sarcoplasmique
 CICR : "Calcium induced Ca release"
 DICR : "Depolarization induced Ca release"
 VRSI : vésicules du réticulum sarcoplasmique isolé
 π : pression osmotique
 STT : système tubulaire transverse
 $[]_{er}$: concentration extraréticulaire
 $[]_{ir}$: concentration intraréticulaire

P R E M I E R E P A R T I E

ANALYSE DE LA CONDUCTANCE CALCIQUE DE MEMBRANES DE SURFACE
ET TUBULAIRE

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A - PROBLEME D'IMPOSITION DU POTENTIEL

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

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

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

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

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

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

C - L'INACTIVATION DU COURANT ENTRANT DE CALCIUM

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

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

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

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

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

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

Ba²⁺ et le Sr²⁺ seraient moins efficaces que les ions Ca²⁺ pour initier ce courant de K⁺ (HAGIWARA et al., 1975 ; GORMAN et HERMAN, 1979 ; HAGIWARA et OHMORI, 1982). Cependant sur les fibres musculaires d'insecte, cette inactivation ne semble pas être liée à une activation d'un courant sortant dépendant du calcium, mais plutôt due à la fixation des ions Ca²⁺ sur des sites membranaires lors de leur passage à travers le canal calcique (ASHCROFT et STANFIELD, 1980, 1982 b).

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

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

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

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

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

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

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

E - EXISTENCE POSSIBLE DE PLUSIEURS COMPOSANTES DE COURANT ENTRANT

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

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

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

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

F - CONCLUSION

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

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



A - MATERIEL

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

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

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

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

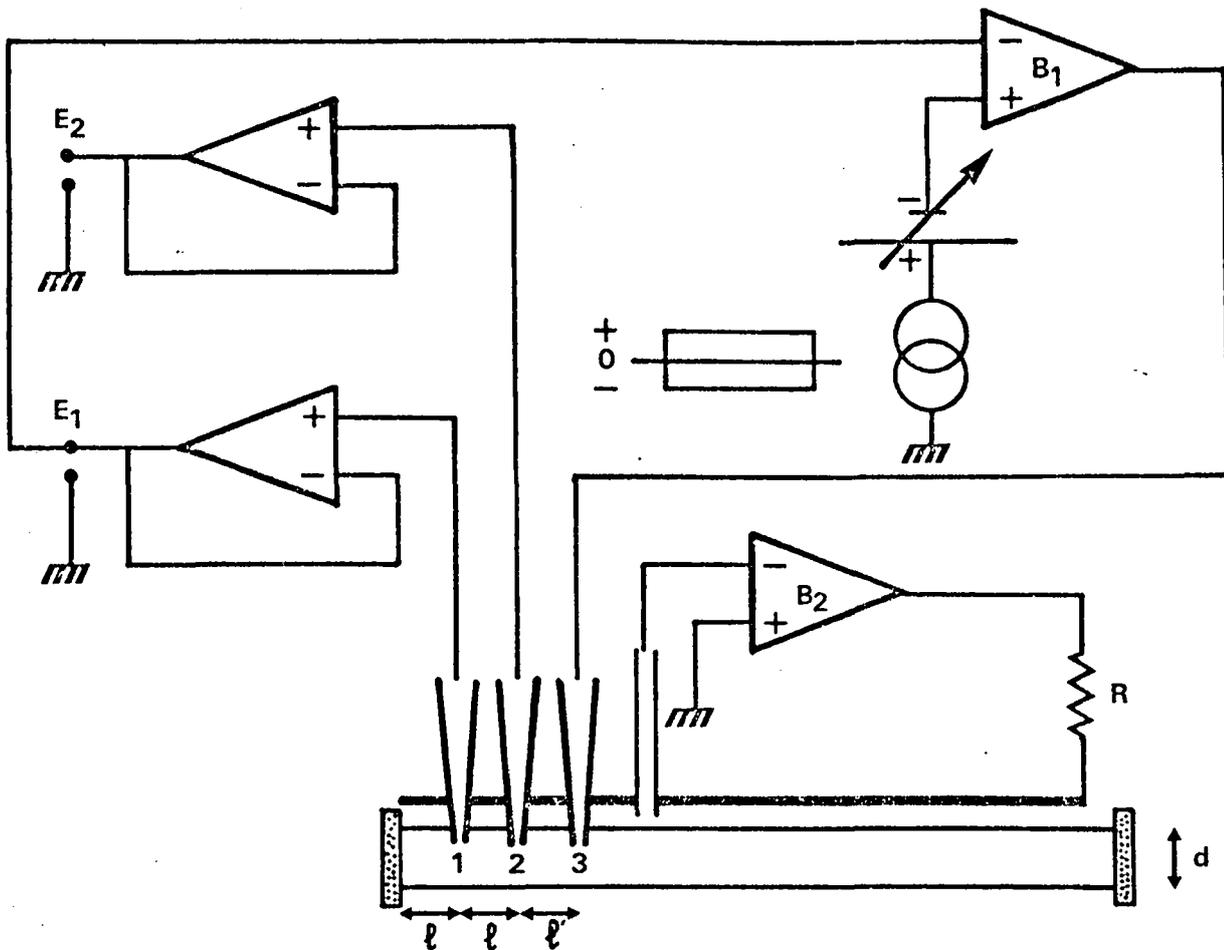


Figure 1 :

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

Les microélectrodes 1, 2, 3 sont implantées respectivement à une distance l , $2l$, $2l+l$ de l'une des extrémités de la fibre dont le diamètre (d) est compris entre 150 et 400 μm . E_i : potentiel transmembranaire imposé à une distance l ($E_i = E_1$) ; $(E_2 - E_1)$ = différence de potentiel proportionnelle à I_m .

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

B_1 = Amplificateur opérationnel à contre réaction totale externe.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

avec

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

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

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

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

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

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

$$R_e = \lambda r_i$$

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

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

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

R_i, a correspondent aux termes définis ci-dessus.

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

C - MILIEU

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

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

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



COMPOSITIONS ET DENOMINATIONS DES
DIFFERENTES SOLUTIONS PHYSIOLOGIQUES

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

TABLEAU.1

TROISIEME CHAPITRE

RESULTATS

PREMIERE PARTIE
ETUDE DES PHENOMENES
DE RECTIFICATION

A - ETUDE DE LA RECTIFICATION DANS LE SENS ENTRANT *

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

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

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

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

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

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

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

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

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

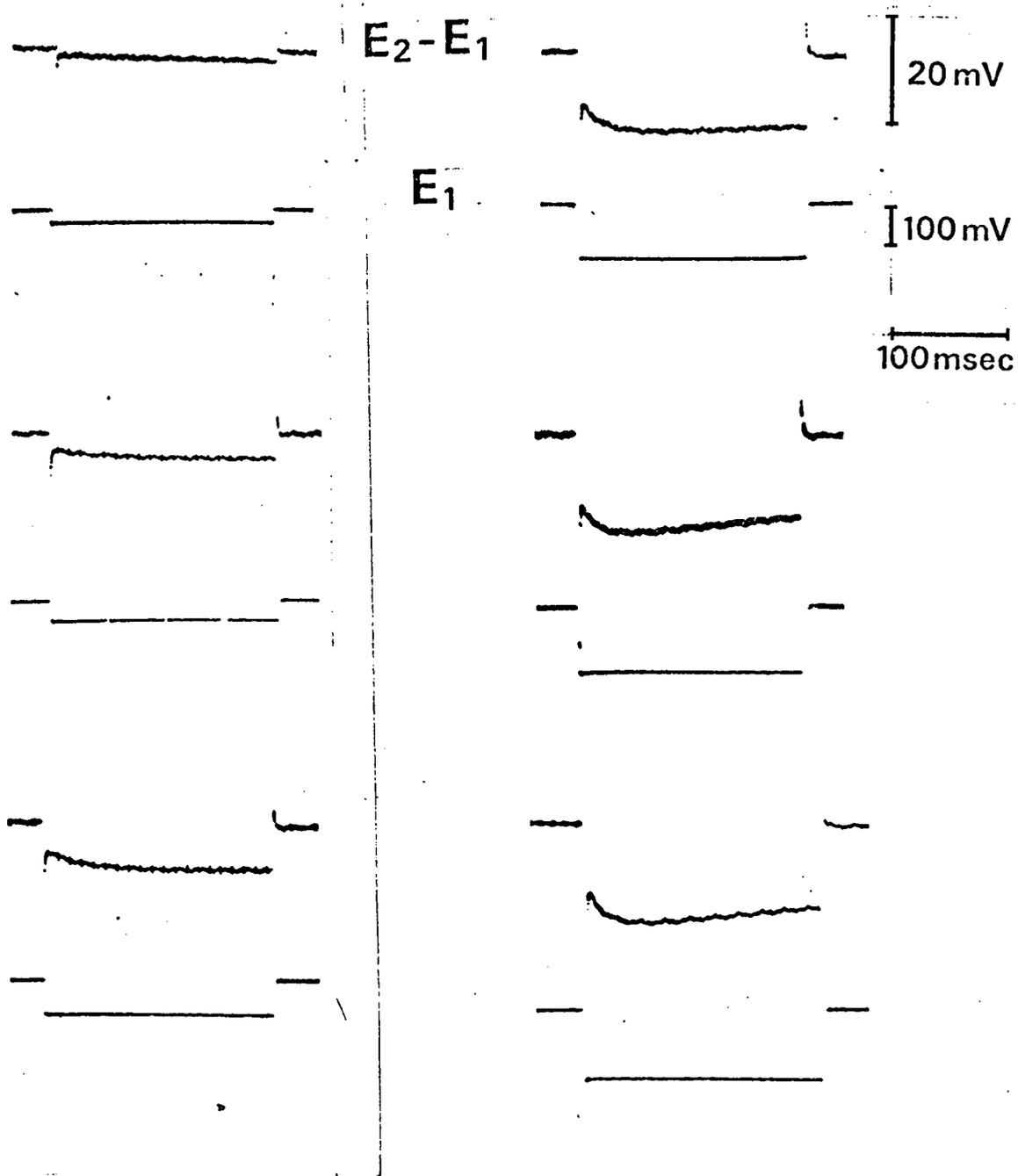


Figure 2 :

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

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

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

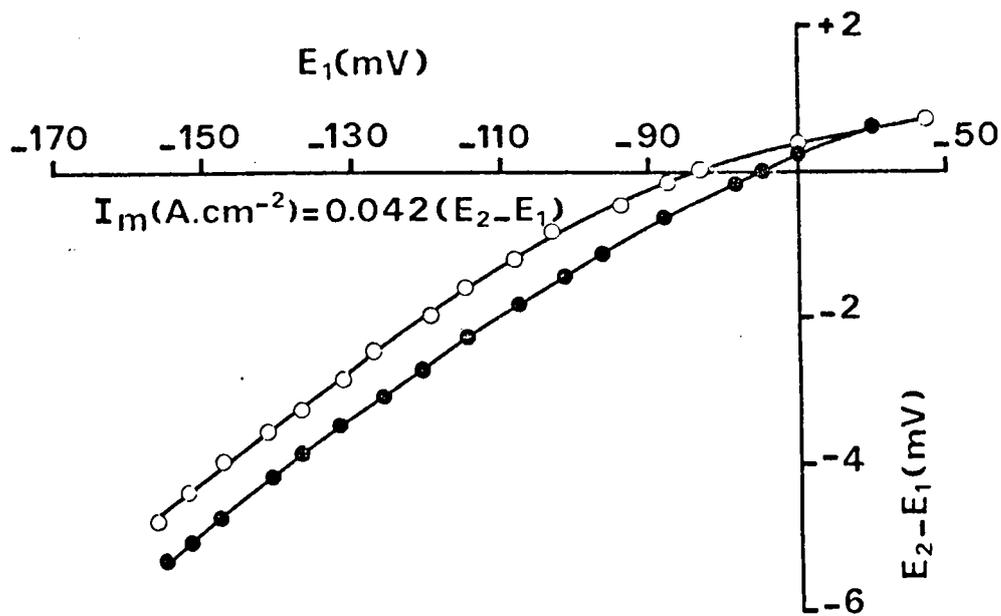


Figure 3 :

Relations courant-potentiel établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (200 msec) en milieu normal (●) et après 20 mn d'action du milieu appauvri en ions K^+ (○) ; 90 % des ions K^+ sont remplacés par les ions Cs^+ (milieu II). RP = - 74 mV (référence) et - 83 mV après 20 mn d'action du milieu appauvri en ions K^+ ; HP = - 70 mV ; $l = 312,5 \mu\text{m}$; $l' = 312,5 \mu\text{m}$; $d = 312,5 \mu\text{m}$.

Le phénomène de rectification dans le sens entrant est maintenu.

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

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

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

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

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

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

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

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

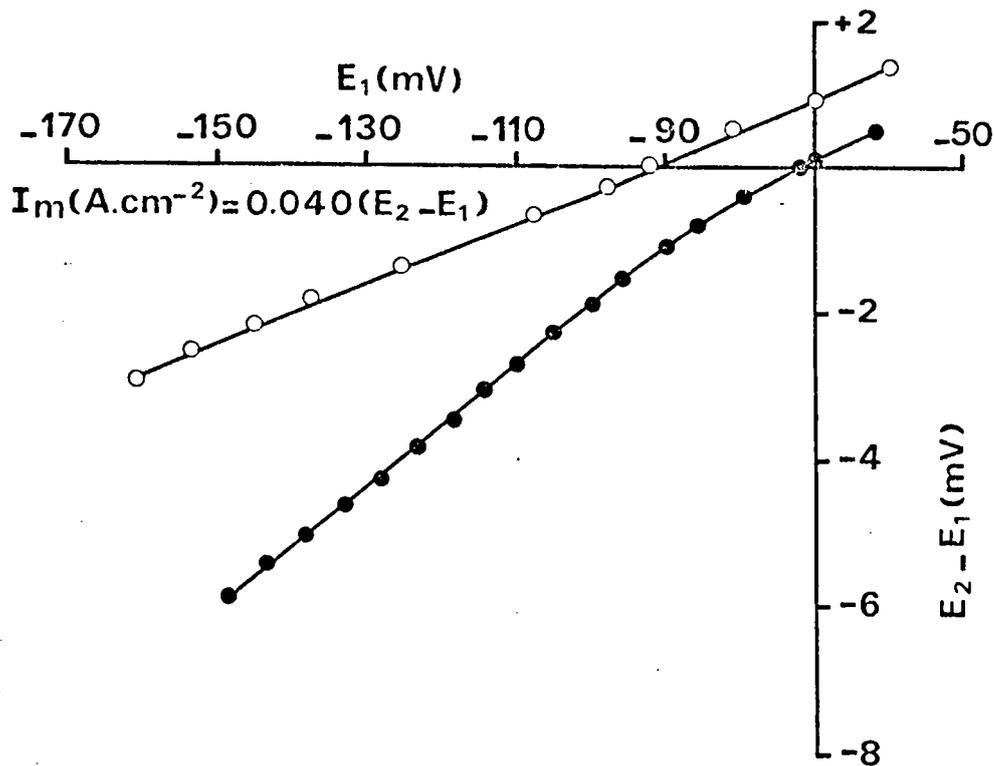


Figure 4 :

Relations courant-potentiel établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (200 msec) en milieu de référence (●) et après 20 mn d'action du milieu appauvri en ions Cl^- (○) ; 90 % d'ions Cl^- du milieu externe sont remplacés par les ions méthylsulfate (milieu III).

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

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

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

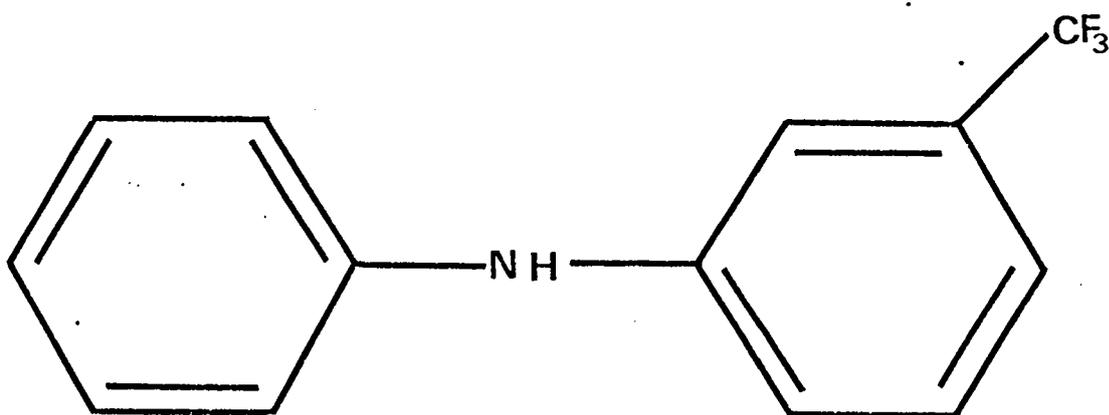
En conclusion, la persistance de la rectification dans le sens entrant

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

3. Effets de l'acide niflumique

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

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



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

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

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

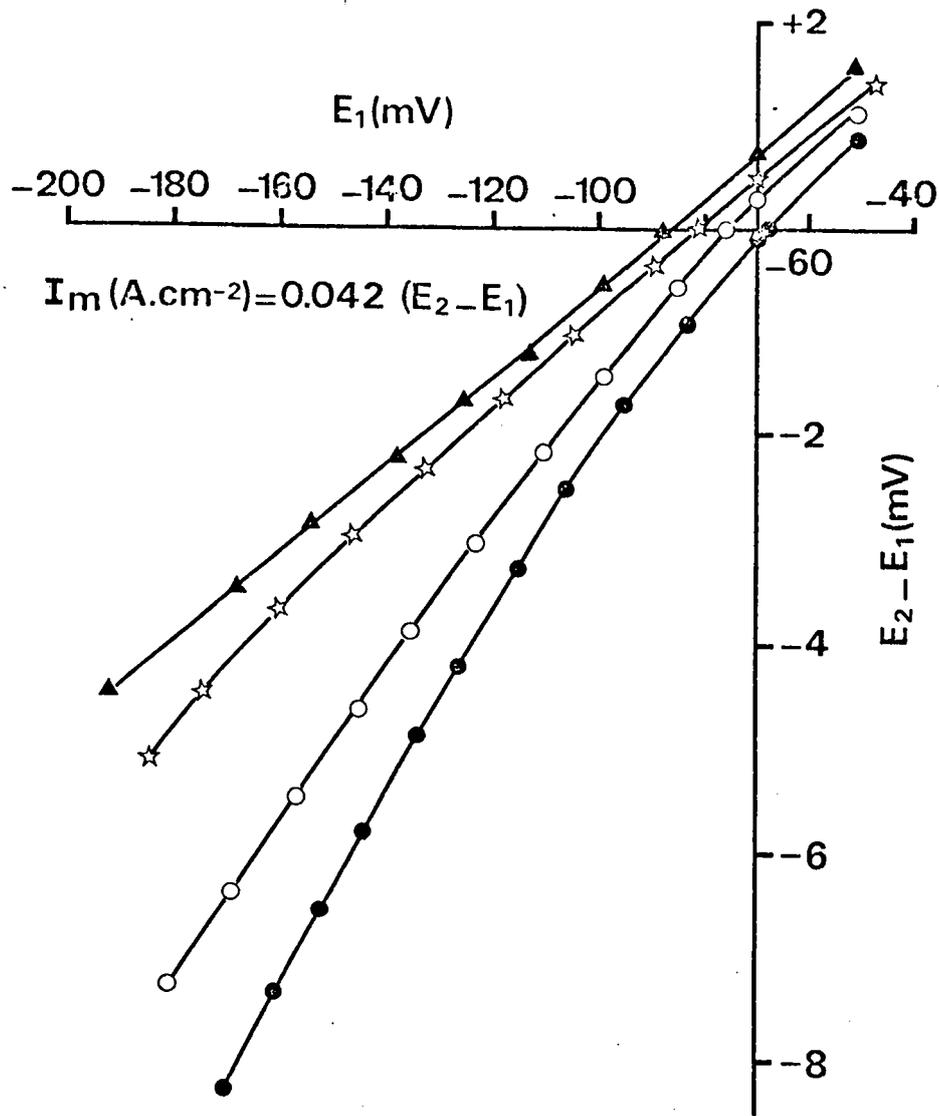


Figure 5 :

Relations courant-potentiel établies en fin d'impulsion (200 msec) dans les conditions de potentiel imposé, sur une fibre placée dans les conditions normales (●) (milieu I) et après action, à intervalle de temps de 15 mn, du milieu contenant de l'acide niflumique aux concentrations de 10^{-9} M.l^{-1} (○) ; 10^{-7} M.l^{-1} (★) et 10^{-6} M.l^{-1} (▲) (milieu IV).

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

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

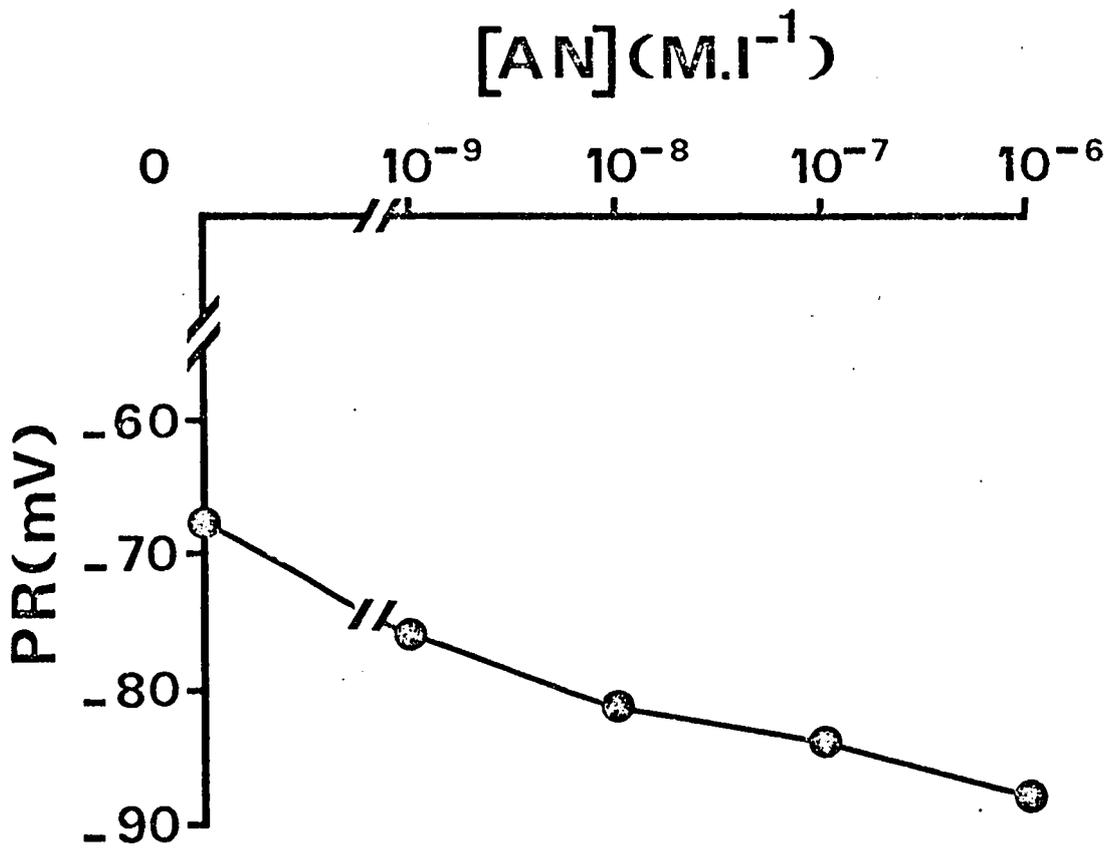


Figure 6 :

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

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

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

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

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

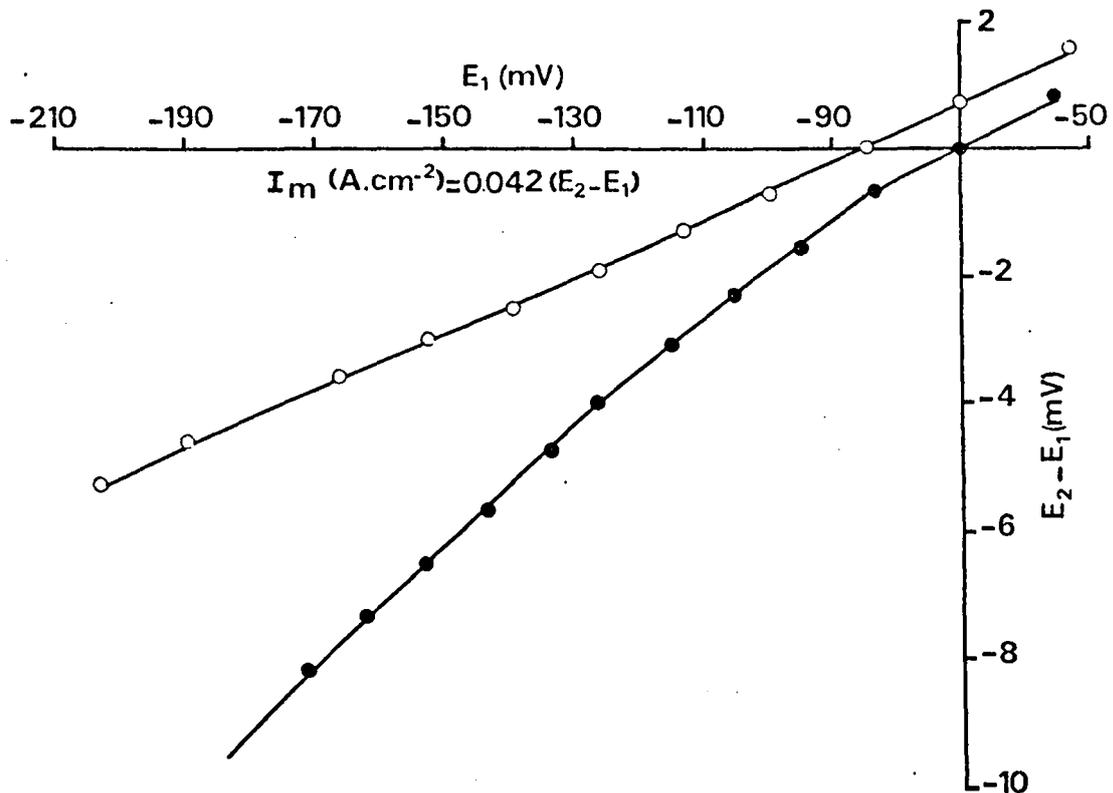


Figure 7 :

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

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

L'acide niflumique à 10^{-6} M abolit entièrement la rectification dans le sens entrant.

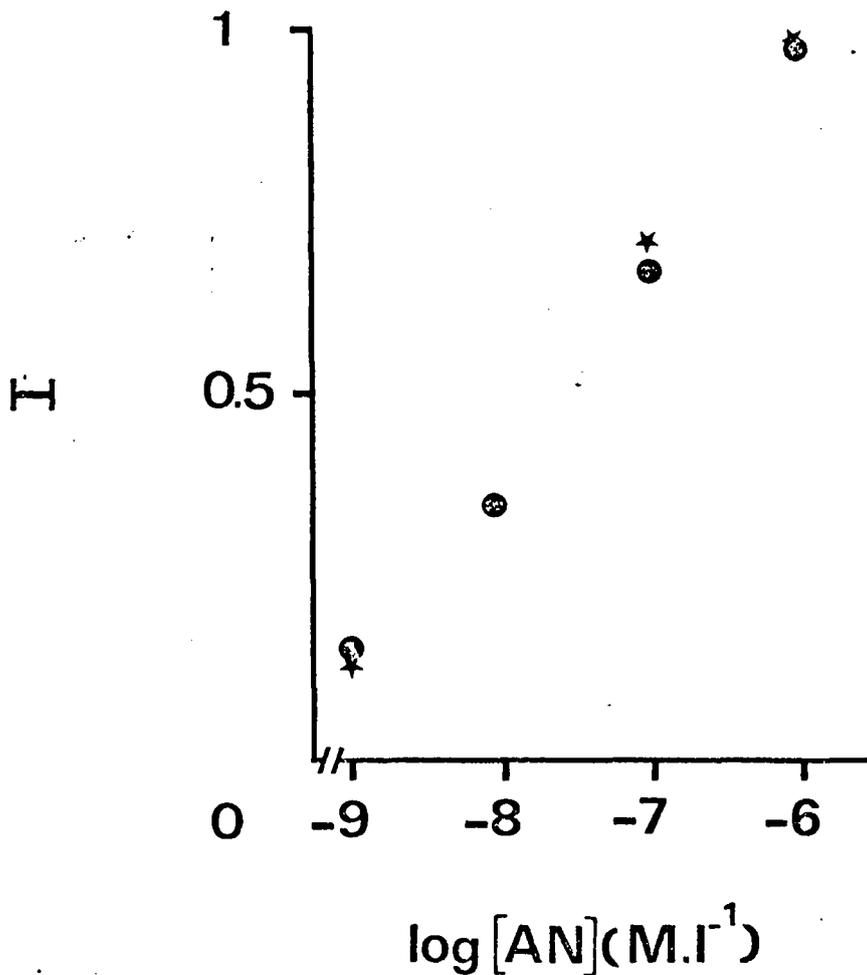


Figure 8 :

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

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

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

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

4. Conclusion sur la rectification dans le sens entrant

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

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

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

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

Les résultats illustrés aux figures 4 et 5 permettent pour les différents paramètres de l'équation ci-dessus, de donner les valeurs suivantes : $E_r = -70$ mV, $E_f = -86$ mV, $G_r = 0,93 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}$, $G_f = 1,826 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}$, $G_m = 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ S.cm}^{-2}$, ainsi le potentiel $E_x = -40$ mV.

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

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

B - ETUDE DE LA RECTIFICATION DANS LE SENS SORTANT

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



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

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

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

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

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

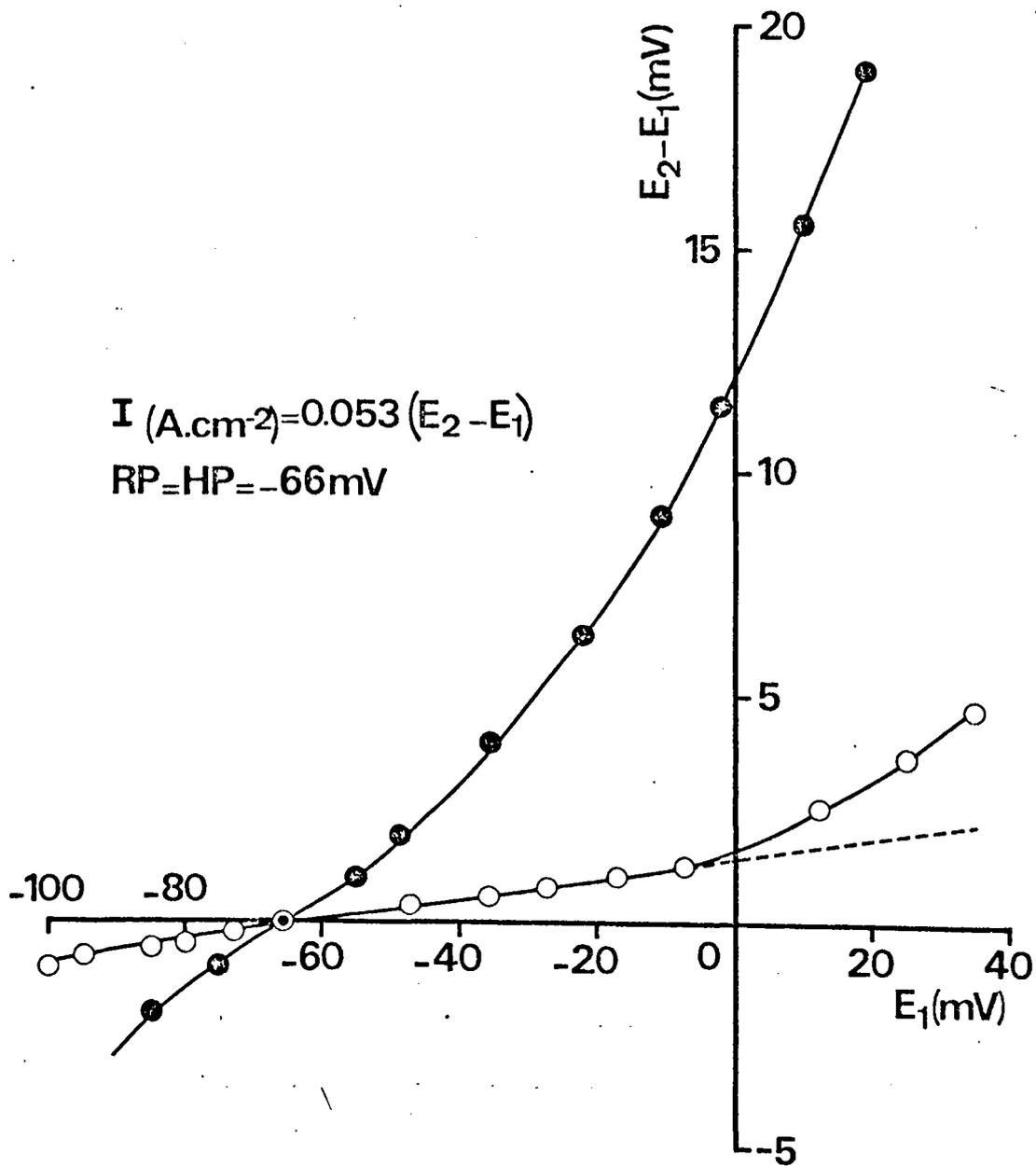


Figure 9 :

Relations courant-potentiel établies dans les conditions de potentiel imposé en fin d'impulsion (500 ms) sur une fibre placée depuis 20 min en milieu de VH contenant les ions CO_2^{2+} (10 mM) (●) - milieu V₃, et dans ce même milieu additionné de TEA^+ (60 mM) et d'AN (10^{-3} mM) - milieu VI - après 20 mn d'action (○).

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

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

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

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

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

3. Conclusion sur la rectification dans le sens sortant

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

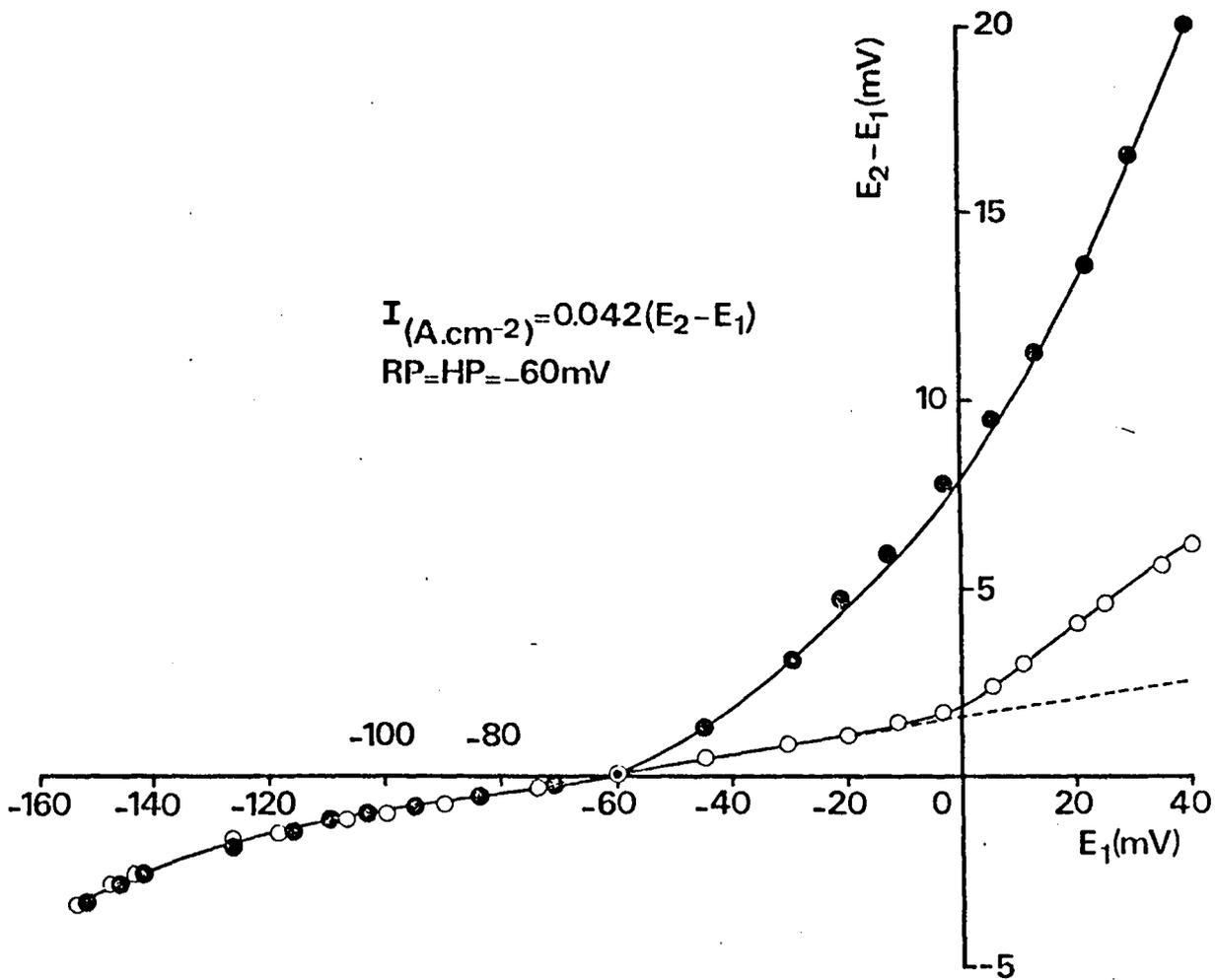


Figure 10 :

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

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

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

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

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



DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU COURANT

ENTRANT (I_{Ca}) ET DE LA CONDUCTANCE

(G_{Ca}) DE MEMBRANE AUX

IONS Ca^{2+}

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

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

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

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

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

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

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

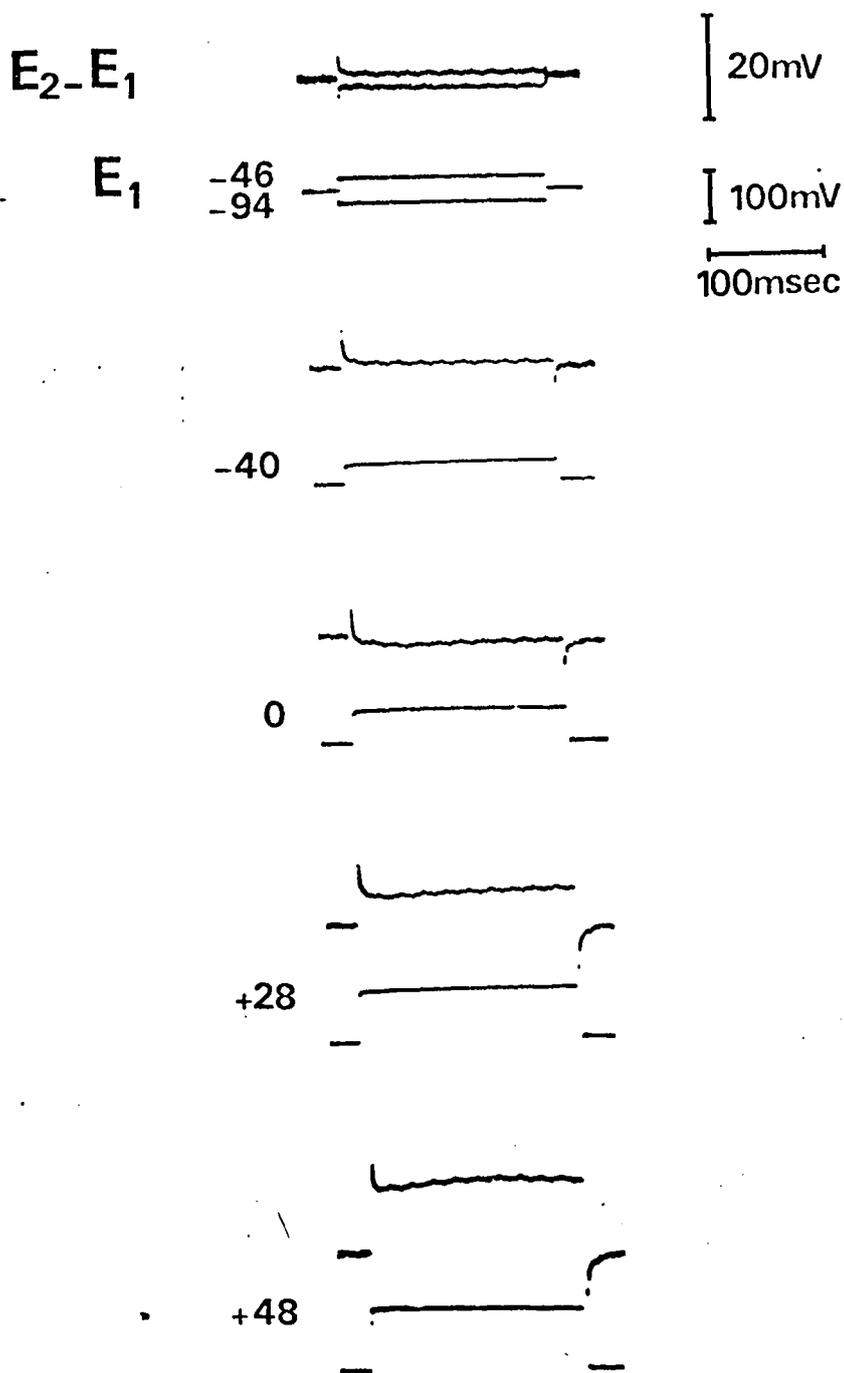


Figure 11 :

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

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

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

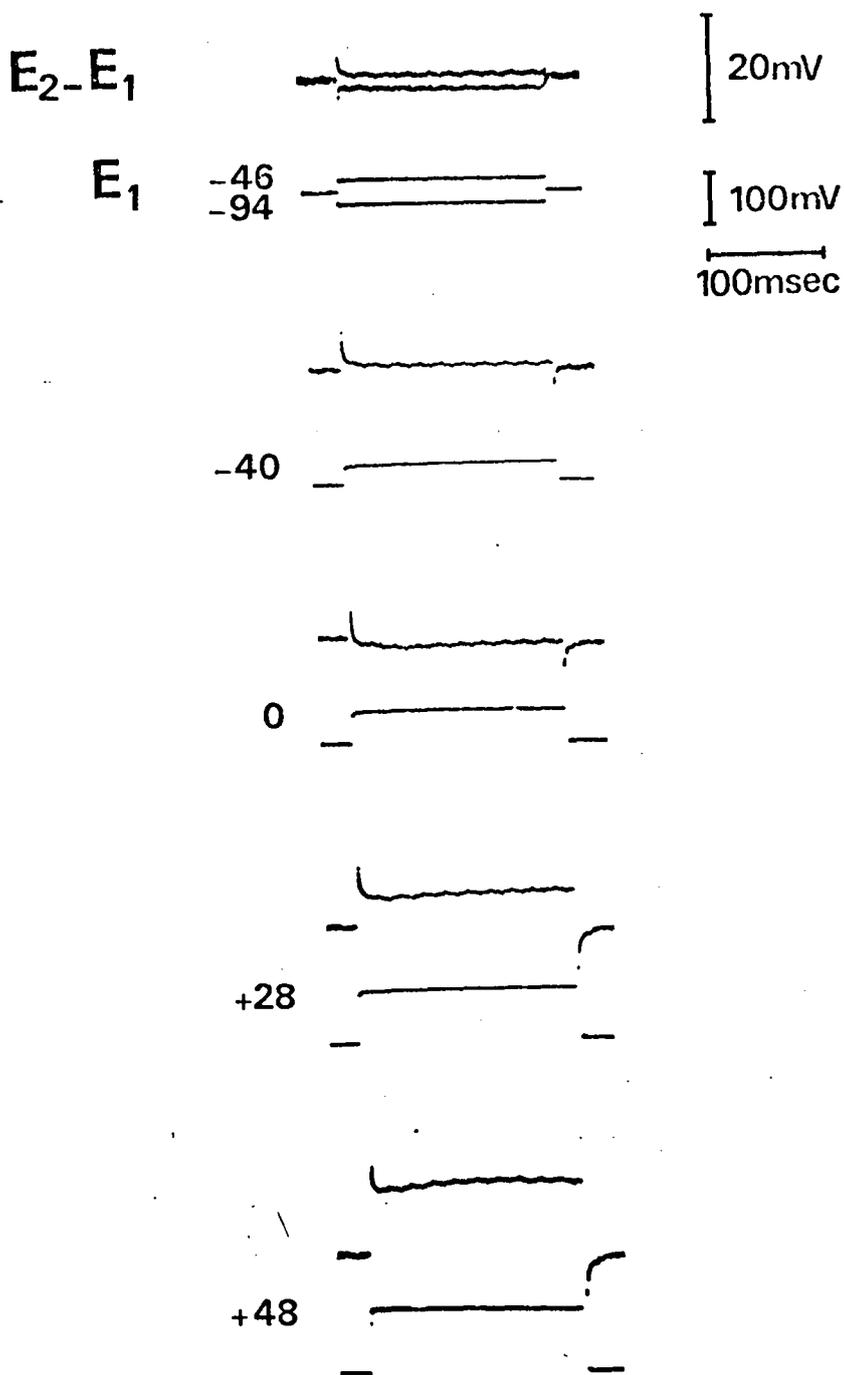


Figure 11 :

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

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

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

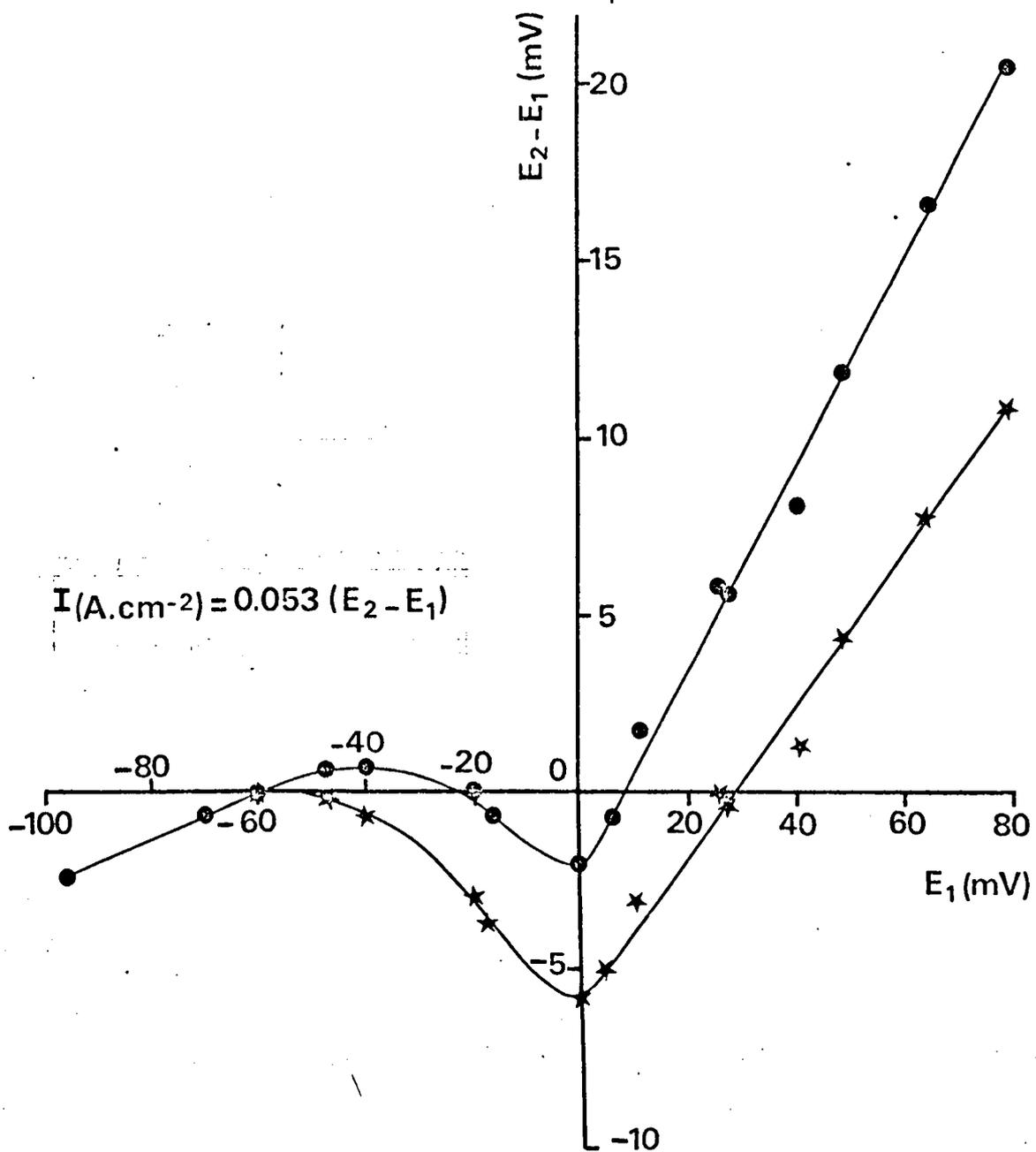


Figure 12 :

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

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

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

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

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

1. Analyse de I_{Ca}

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

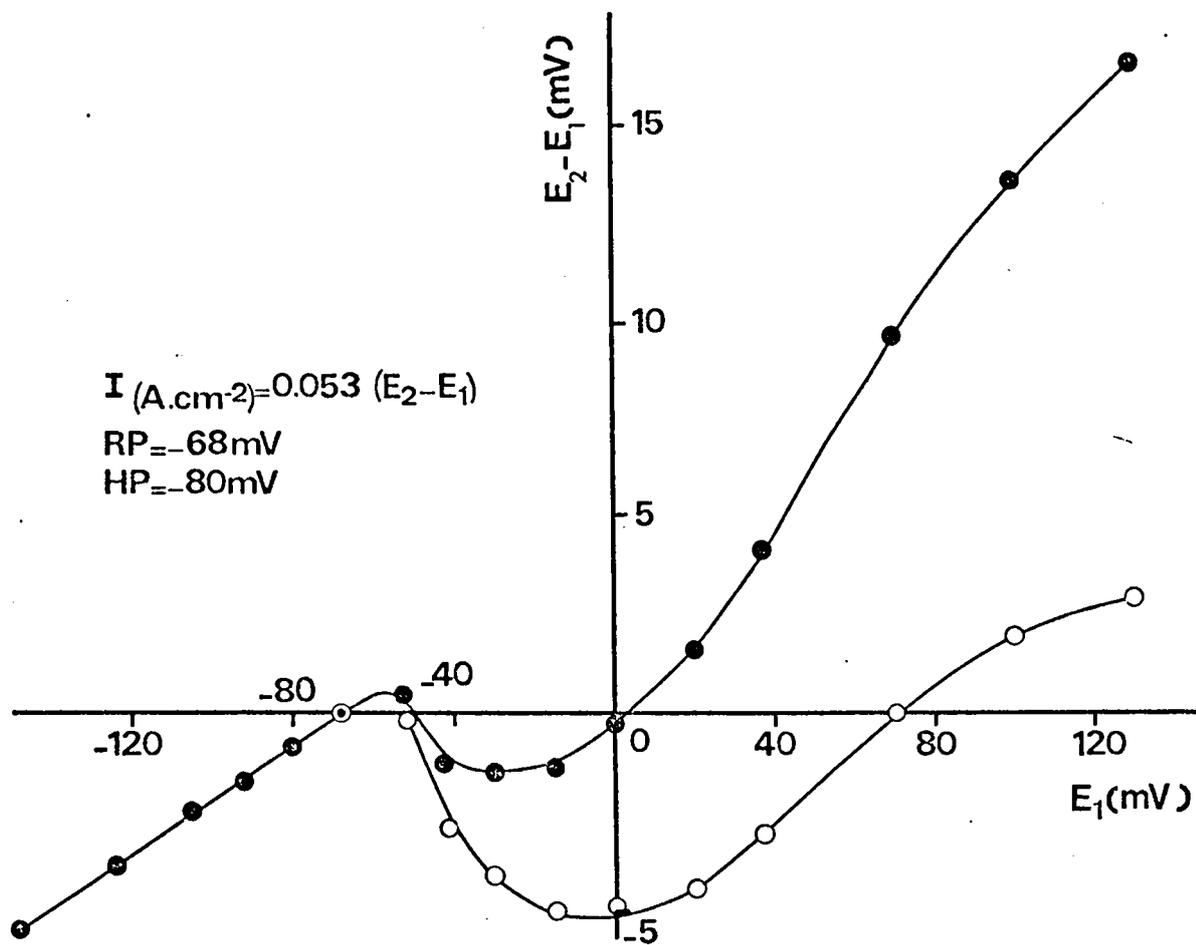


Figure 13 :

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

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

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

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



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

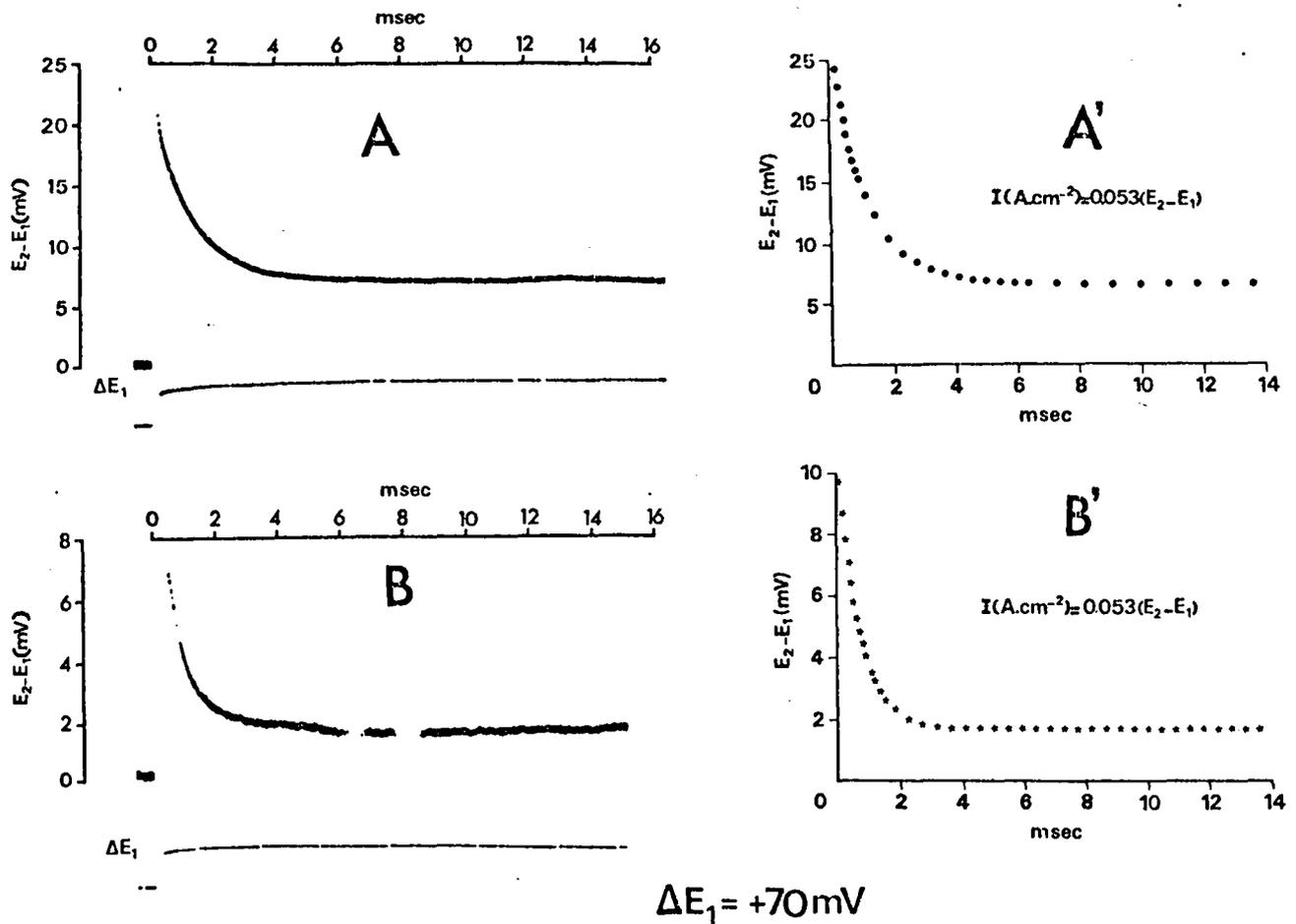


Figure 14 :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A partir des deux valeurs instantanées (au temps $t = 0$) I_{01} et I_{02} ainsi que des constantes de temps τ_1 et τ_2 des deux composantes du courant capacitif et de la valeur du courant stationnaire en absence ou en présence de procaïne, il peut être proposé un schéma électrique équivalent à la membrane correspondant à une portion de membrane externe de 1 cm^2 incluant les membranes profondes sans estimation de leur surface. Ce schéma électrique est constitué en absence de procaïne de deux circuits RC en parallèle (figure 16 a et b) schémas identiques à ceux proposés en 1967 par EISENBERG pour la fibre musculaire squelettique crabe (a) et par MATHIAS et al., 1980 pour la fibre de grenouille (b). Ainsi comme cela est précisé sur le schéma, sous l'influence de la procaïne, un des deux systèmes membranaires (probablement le système profond) pourrait être soustrait à l'analyse.

Il est important de signaler que chaque circuit RC est associé à une résistance d'accès (R_a) qui représente, d'une part la résistance du matériel amorphe constitué par la basale et d'autre part la résistance des invaginations longitudinales du sarcolemme et probablement celle de la lumière des tubules. Aussi les valeurs données pour les résistances et les capacités (figure 16) ne peuvent être que très approximatives étant donné l'incertitude concernant les valeurs instantanées, I_{01} et I_{02} , des deux composantes de courant capacitif. En effet les tracés A et B de la figure 14 montrent que le potentiel imposé n'atteint une valeur stable qu'après un délai de l'ordre de 2 à 3 msec. A l'appui de cette interprétation quant à la détermination appro

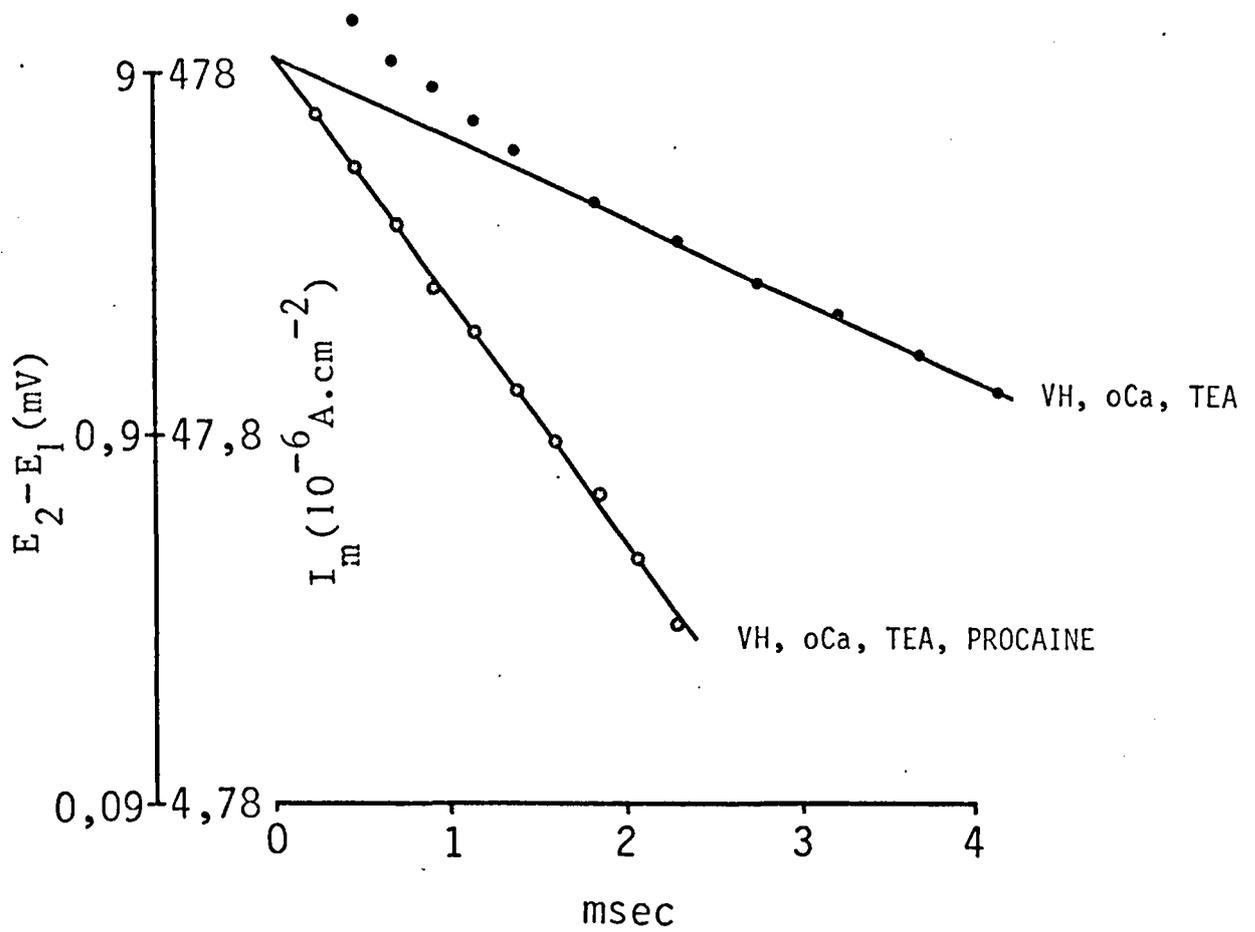
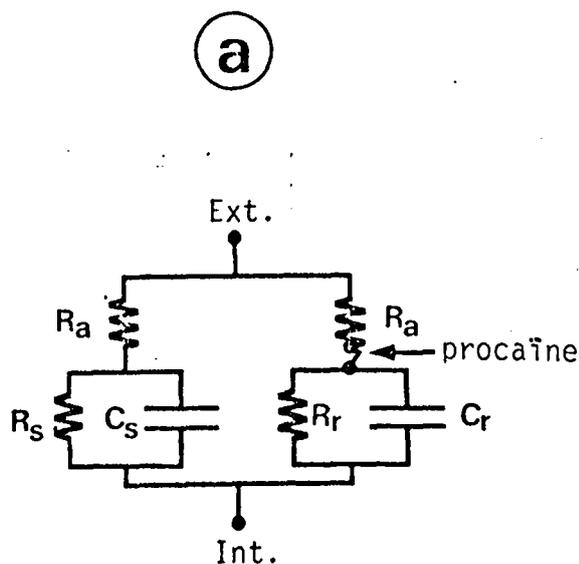


Figure 15 :

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

La procaïne élimine une composante capacitive.



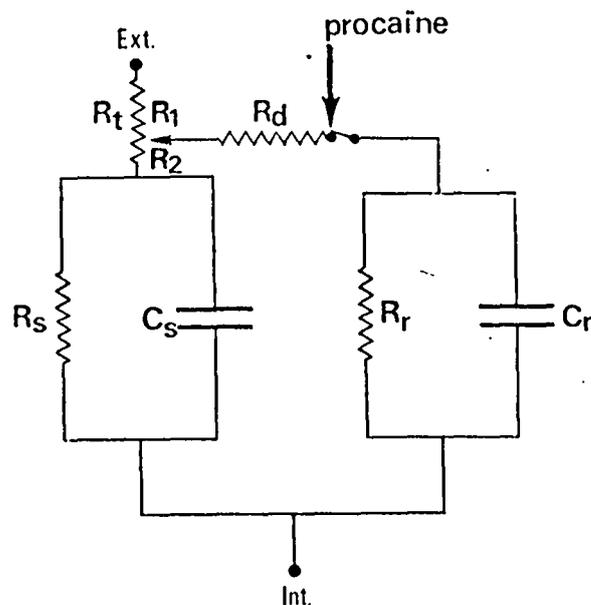
membrane
de surface

$R_a = 168$
 $R_s = 808$
 $C_s = 4,7\mu F$

membrane
profonde

$R_a = 168$
 $R_r = 179$
 $C_r = 21,1\mu F$

(b)



membrane
de surface

$R_t = R_1 + R_2 = 168$
 $R_s = 808$
 $C_s = 4,7\mu F$

membrane
profonde

$R_1 + R_d = 168$
 $R_r ?$
 $C_r ?$

Figure 16 :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

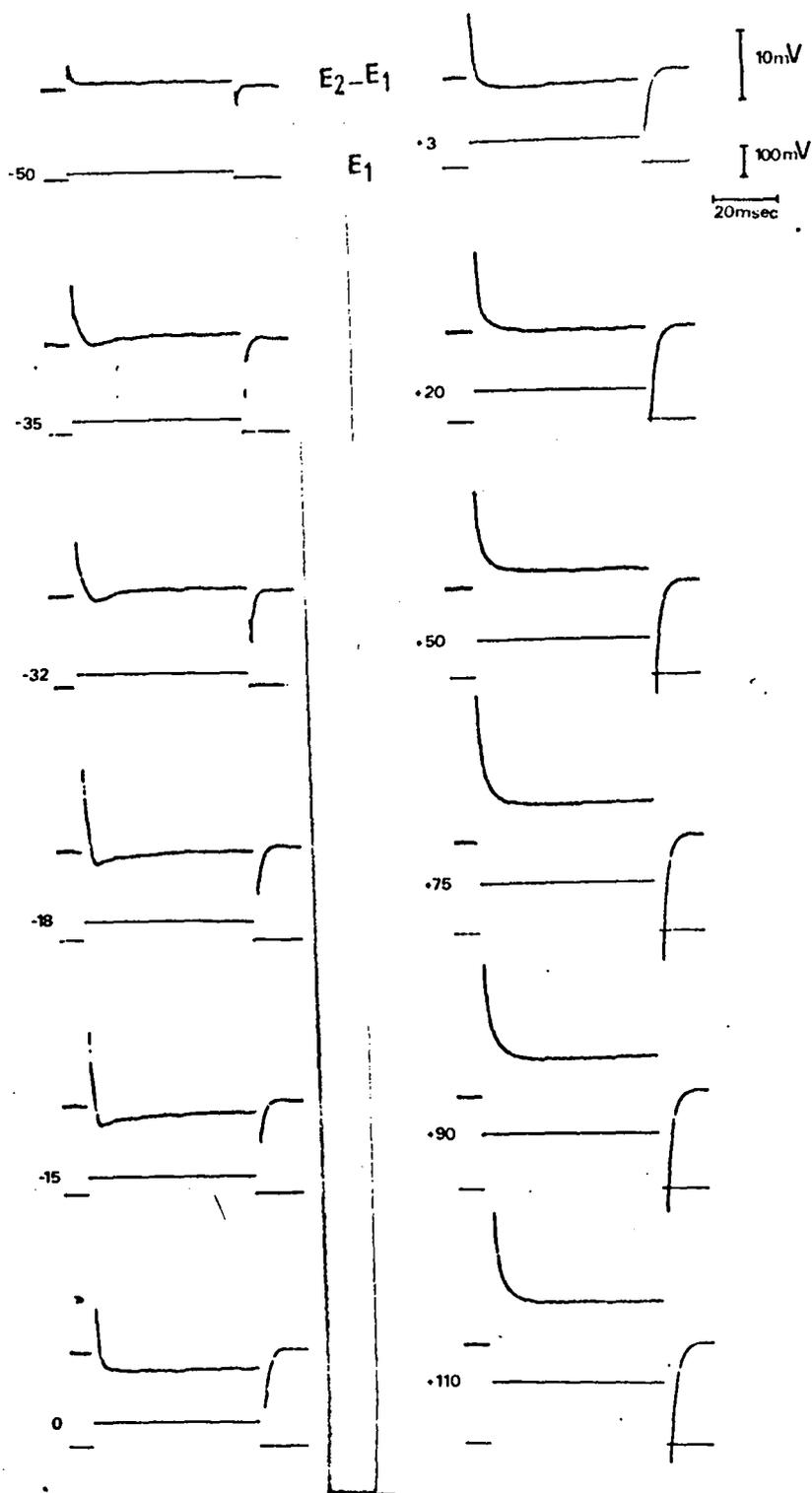


Figure 17 :

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

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

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

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

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

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

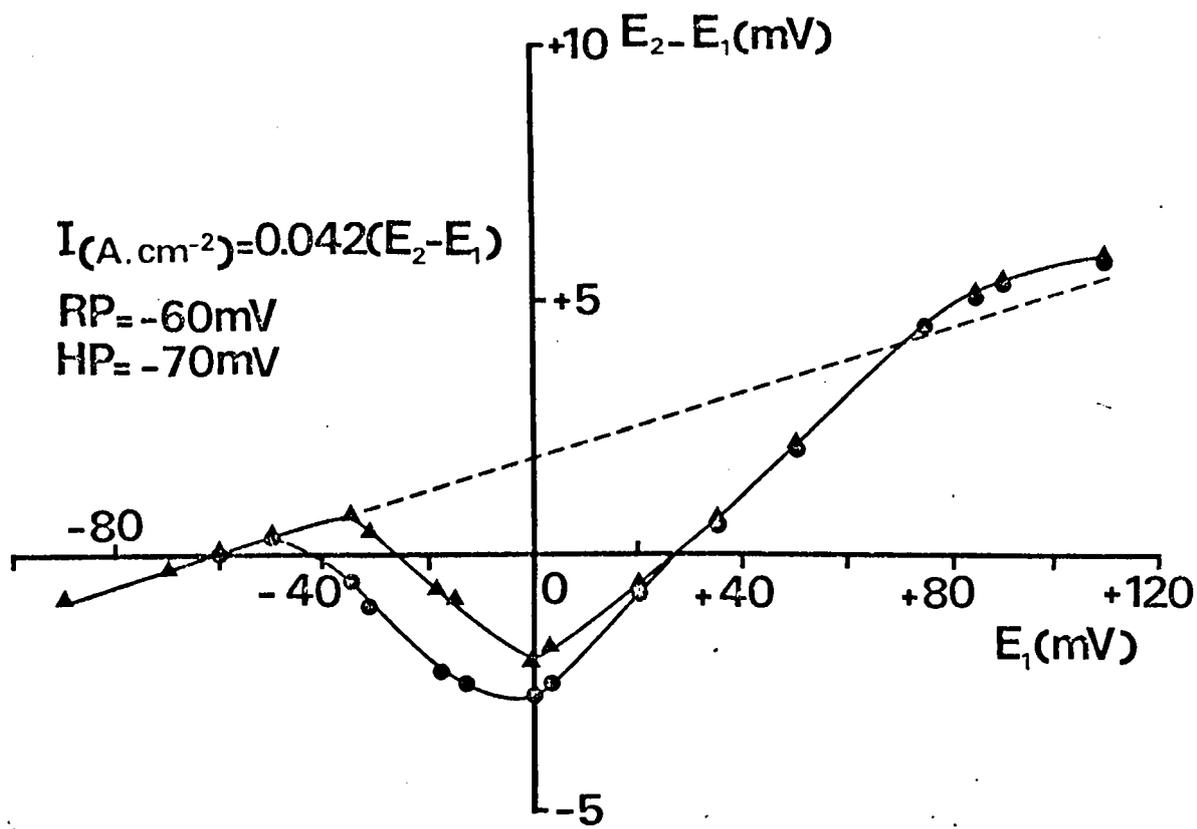


Figure 18 :

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

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

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

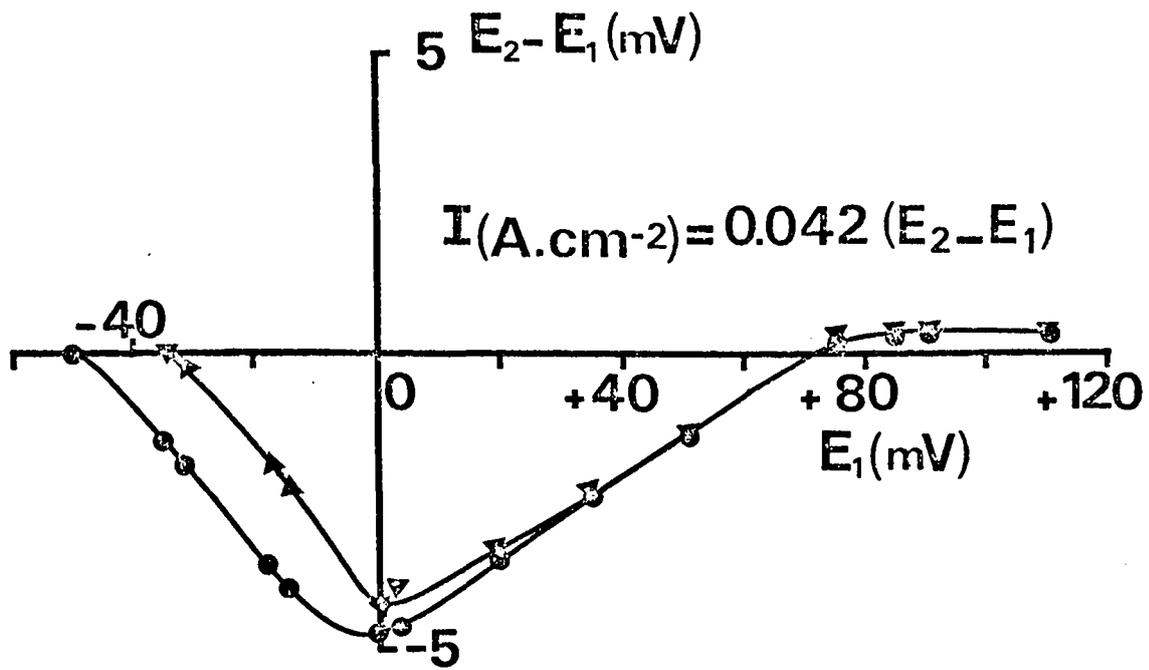


Figure 19 :

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

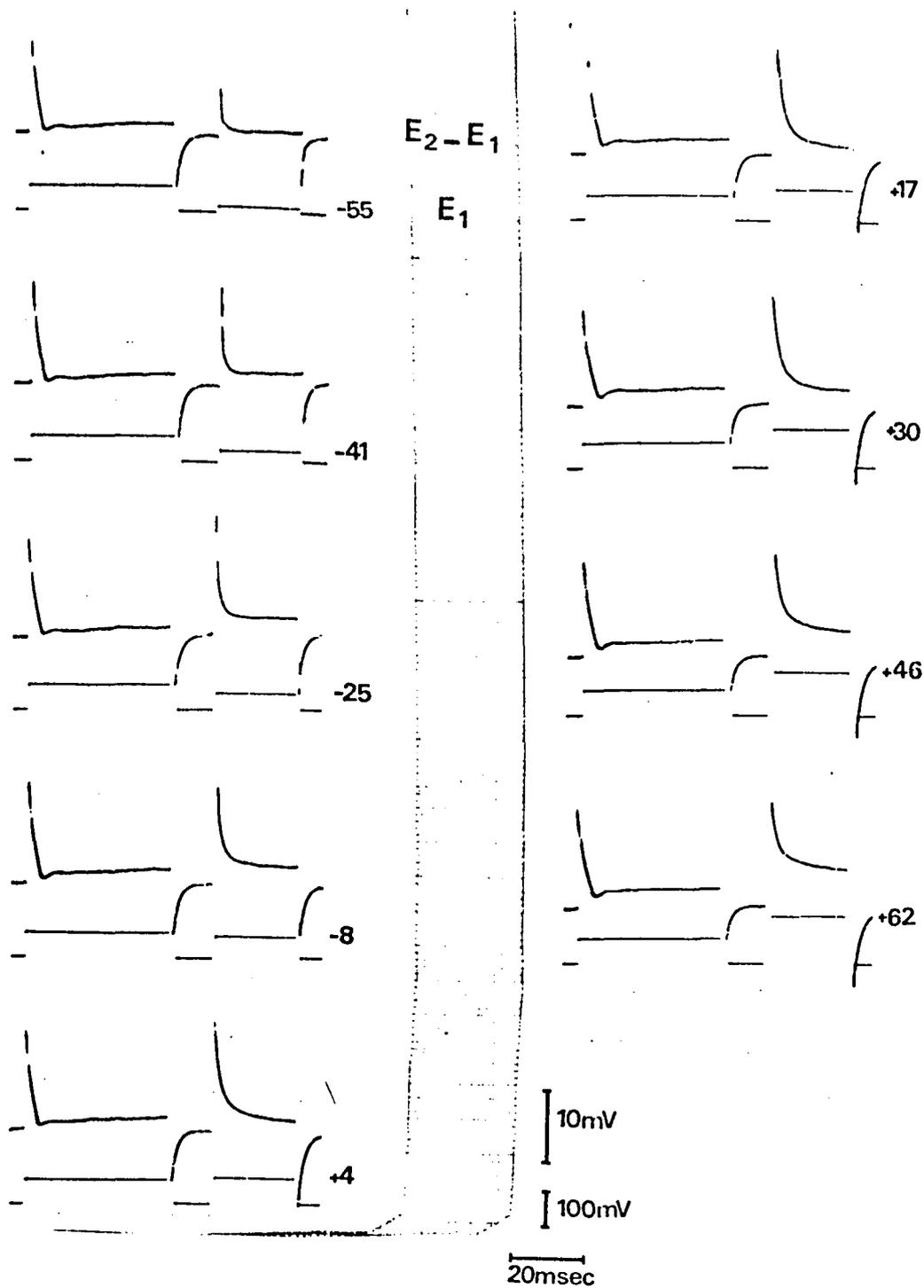


Figure 21 :

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

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

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

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

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

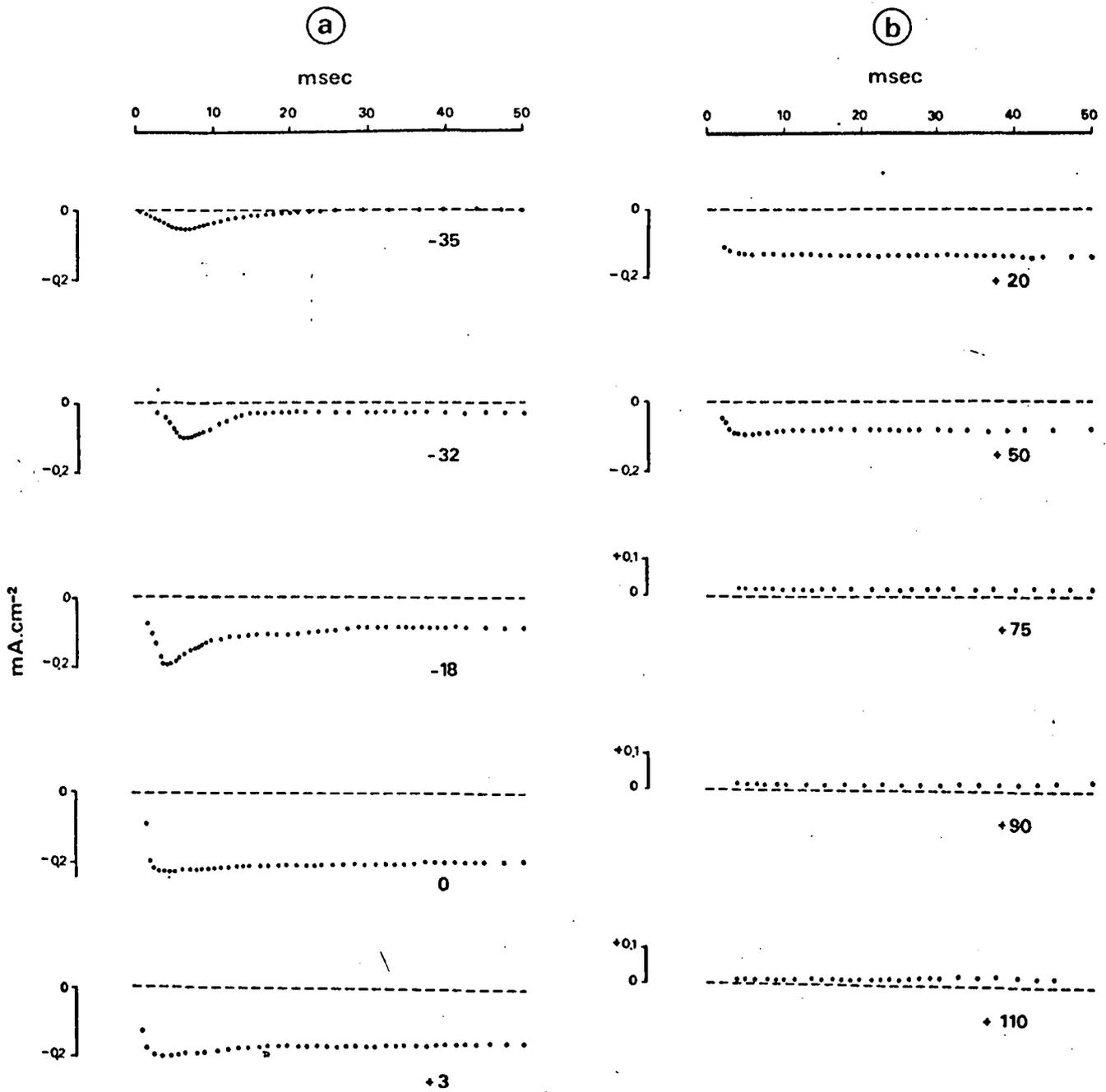


Figure 20 :

Evolution du courant de calcium (I_{Ca}), exprimé en mA.cm^{-2} , en fonction du temps pour différents niveaux de dépolarisation. I_{Ca} est reconstitué point par point à partir des tracés du courant global données à la figure 16, dont sont soustraits I_f et I_c . Les valeurs données au dessous de chaque tracé correspondent aux valeurs de potentiel imposé.

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

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

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

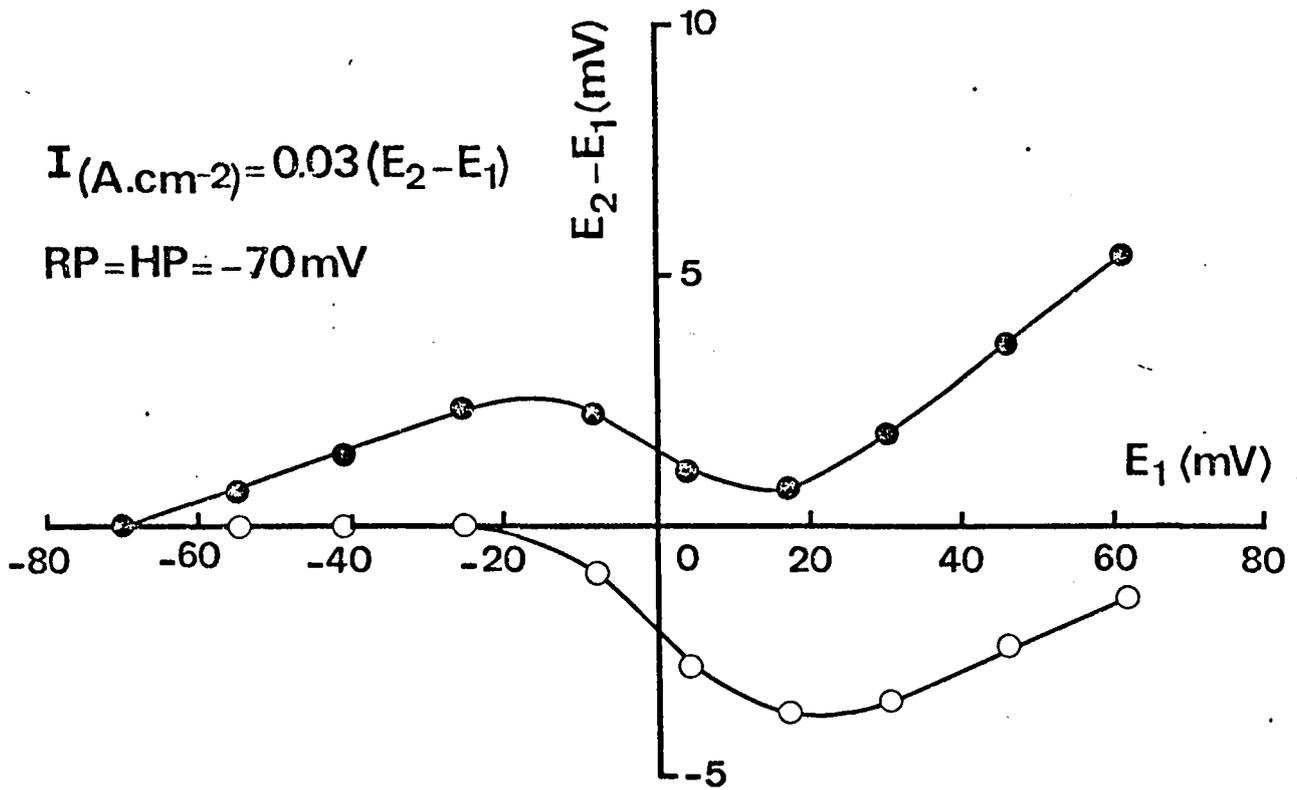


Figure 22 :

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

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

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

a) G_{Ca_2}

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

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

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

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

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

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

d'où

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

en posant

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

il vient

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

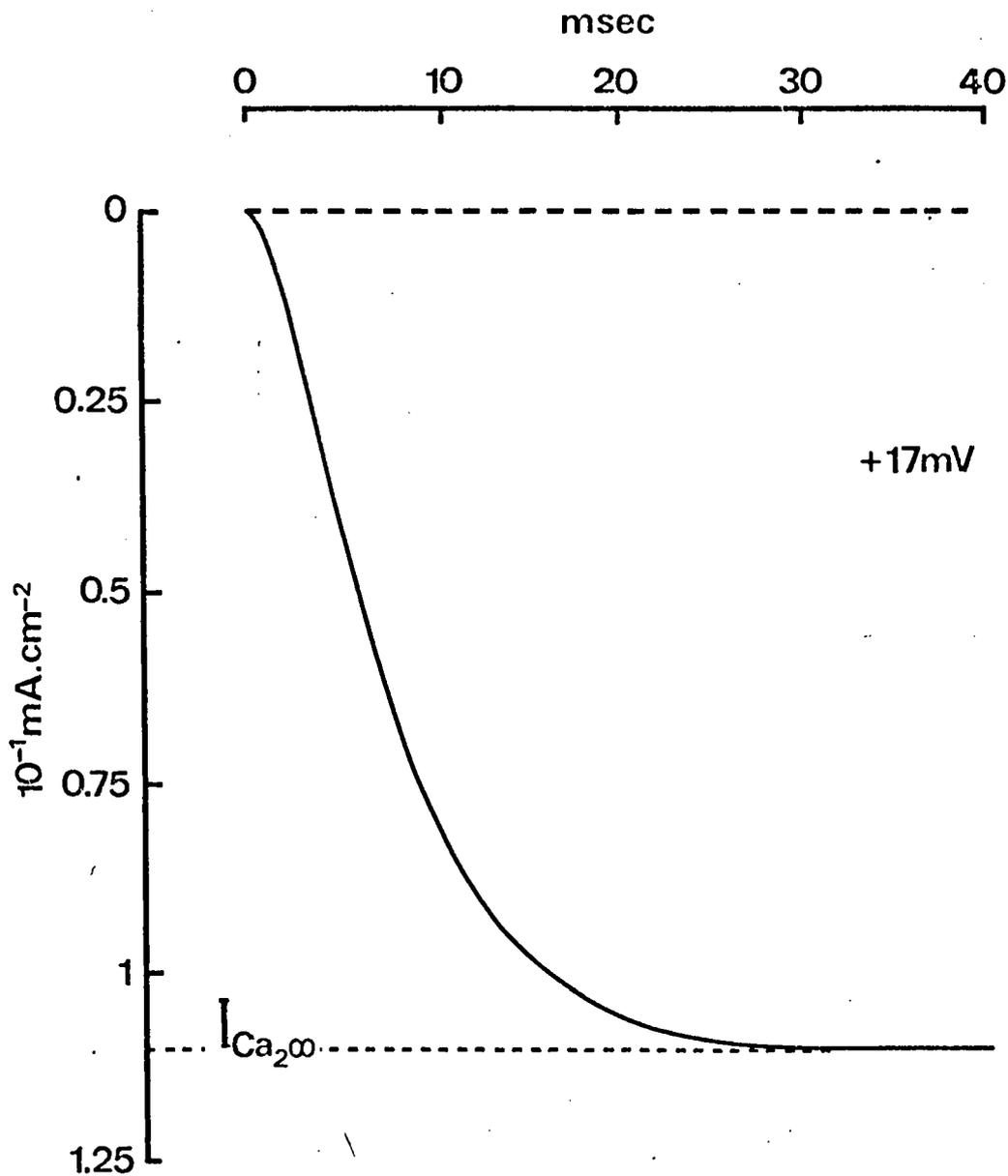


Figure 23 :

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

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

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

avec $\tau_m = 5,10$ msec ; $\alpha_m = 0,18$ msec⁻¹, $\beta_m = 0,016$ msec⁻¹ ; $x = 2$.

comme

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

l'équation (4) devient :

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

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

De l'équation (5) on tire :

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

d'où

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

ainsi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

b) G_{Ca_1}

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

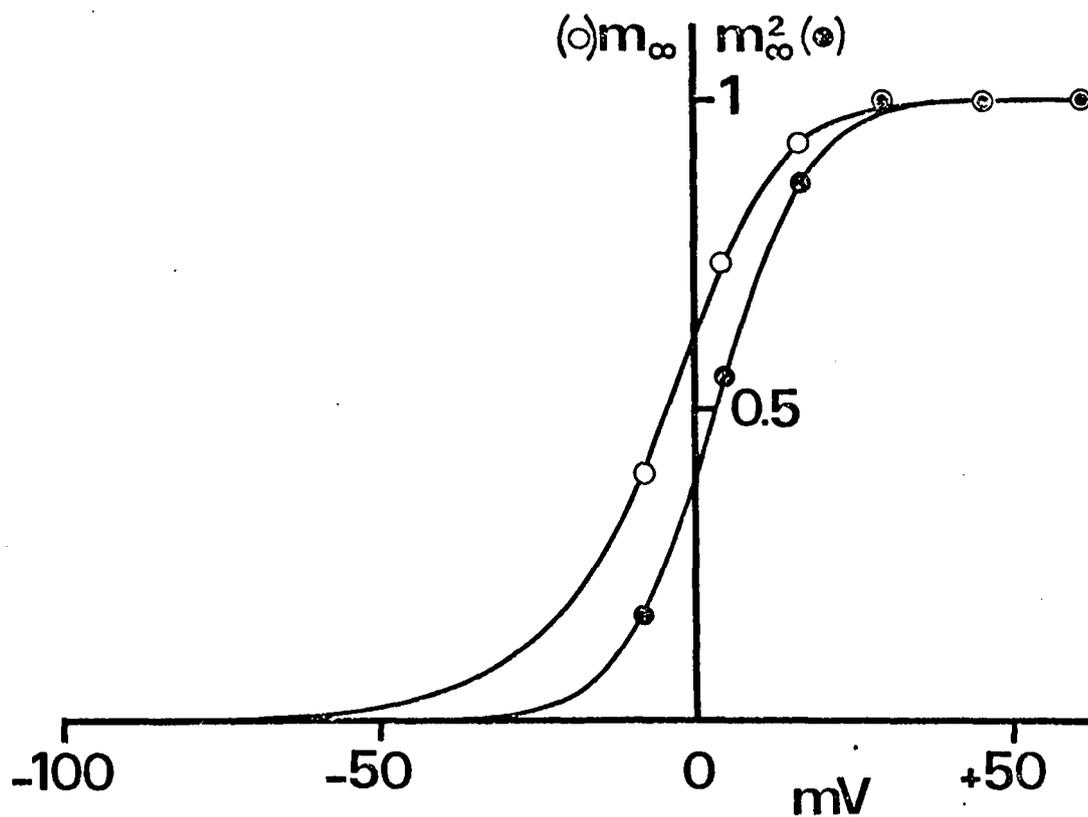


Figure 24 :

Relation liant le potentiel membranaire à la variable d'activation m_{∞} (O) correspondant à I_{Ca_2} . m est calculée à partir de l'égalité m_{∞}^2 (●) = $G_{Ca_2\infty} / \bar{G}_{Ca_2}$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

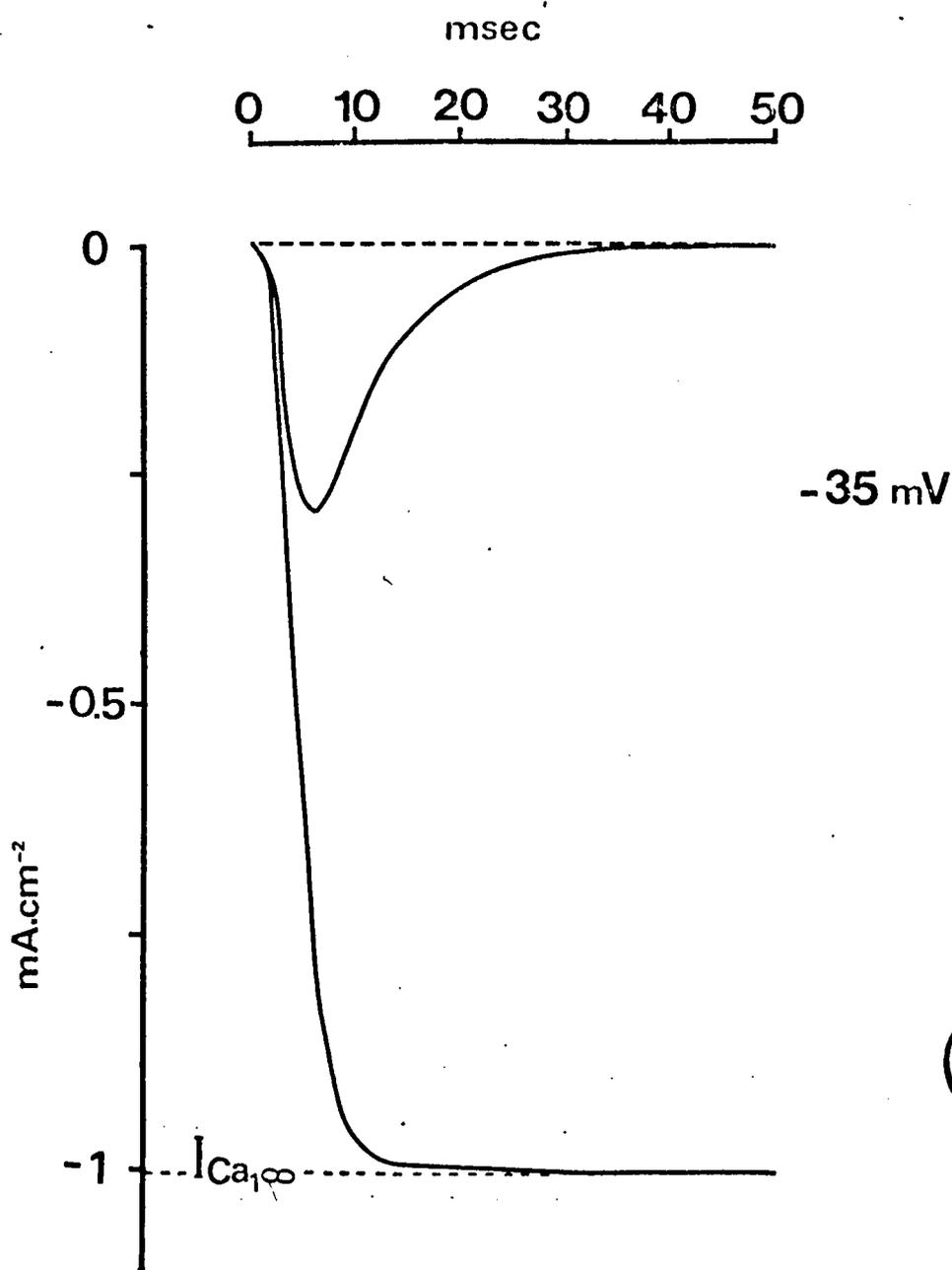


Figure 25 :

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

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

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

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

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

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

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

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

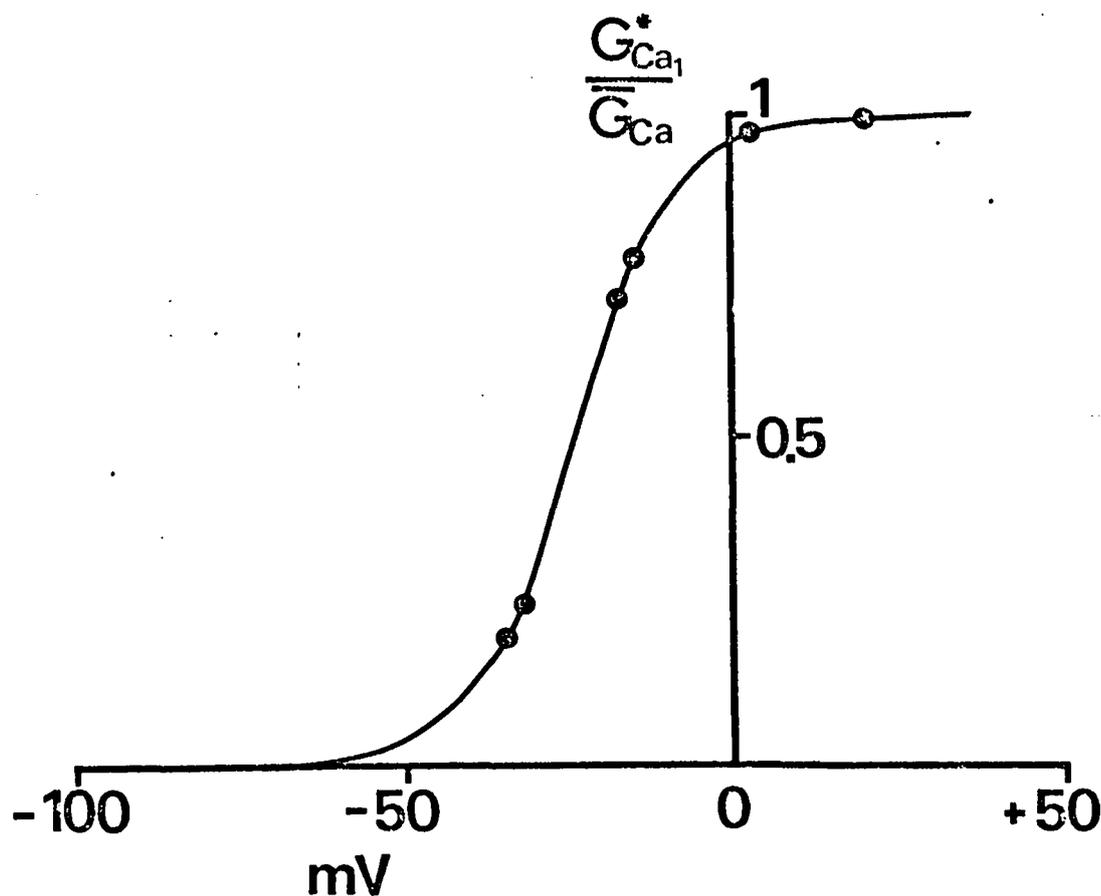


Figure 26 :

Relation entre le potentiel de membrane et le rapport $G_{Ca1}^* / \overline{G}_{Ca}$ déterminé à partir des enregistrements de courant et de potentiel de la figure 20. G_{Ca1}^* est la conductance calcique correspondant au courant I_{Ca} mesuré au maximum entrant. \overline{G}_{Ca} est la conductance maximale atteinte, sa valeur est de $2,9 \text{ mS.cm}^{-2}$.

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

Il est surprenant de constater que la relation liant le rapport $G_{Ca\infty} / \overline{G}_{Ca}$ à E_i , c'est-à-dire $(\frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m})^6$ à E_i , est identique au rapport $G_{Ca1}^* / \overline{G}_{Ca}$ qui est déterminé dans nos conditions expérimentales.

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

γ/ Conclusion

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

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



PRINCIPAUX RESULTATS

ET

CONCLUSION GENERALE

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

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

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

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

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

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

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

A - LES PHENOMENES DE RECTIFICATION

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

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

les ions Cl^- ;

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

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

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

2) Effet de l'acide niflumique (AN)

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

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

B - ETUDE DE LA CONDUCTANCE CALCIQUE

1) Obtention du courant I_{Ca}

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

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

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

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

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

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

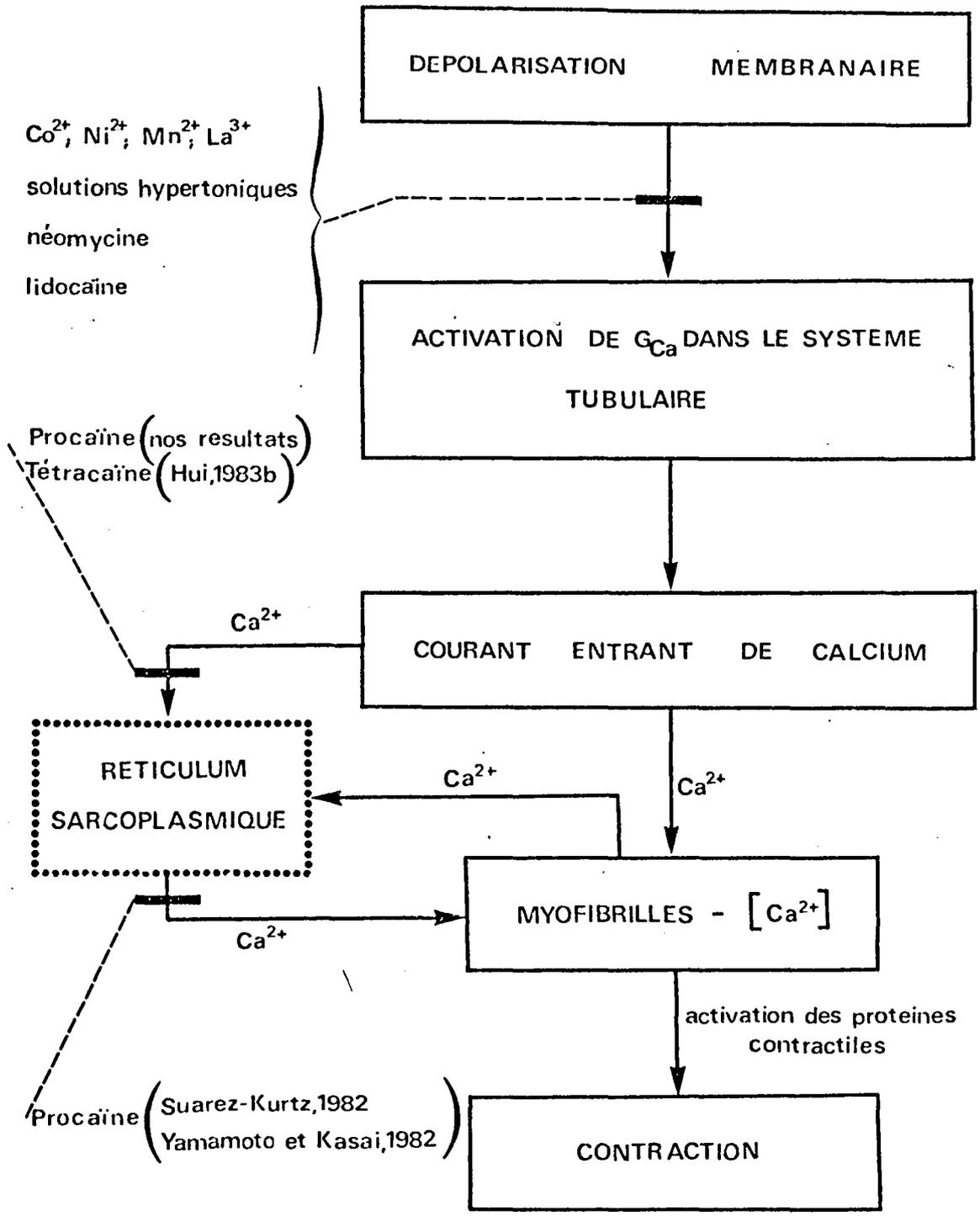


Figure 27 :

Sites possibles d'action de la procaine.

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

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

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

C - CONCLUSION

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



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

TABEAU II

DEUXIEME PARTIE

POSSIBILITE EXISTENCE DE CANAUX CALCIQUES DEPENDANT DU VOLTAGE
AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

INTRODUCTION

La diminution d'environ 70 % des valeurs de la conductance de fuite de celle au calcium et de la capacité membranaire sous l'effet de la procaine conduit à émettre l'hypothèse de la soustraction à l'analyse électrophysiologique par cet anesthésique local d'une structure membranaire profonde, probablement celle du RS. Dans de telles conditions, la membrane réticulaire aurait les propriétés électrophysiologiques similaires à celles des membranes excitables. De plus l'éventuelle réponse électrique de la membrane réticulaire serait dans les conditions normales détectable de part et d'autre de la membrane sarcolemmique. Ceci n'est concevable que dans la mesure où il est supposé l'existence d'une zone de faible résistance (sensible à la procaine) entre le STT et le RS permettant la transmission de l'activité électrique (MATHIAS et al., 1980 ; HUI, 1983 b). De façon à confirmer une telle hypothèse une étude du fonctionnement du RS isolé sous forme de vésicules a été effectuée. Les mouvements entrant et sortant de calcium ont été étudiés dans différentes conditions notamment dans celles d'une "imposition" de potentiel. Pour ce faire, des gradients de K et Cl à travers la membrane sont établis en modifiant la concentration du milieu extraréticulaire en K et Cl à produit K.Cl constant.

L'ensemble des résultats amène à conclure que la membrane du RS présenterait des propriétés de membrane excitable. Le mouvement passif de Ca selon le gradient électrochimique "driving force" (sortant de la vésicule), est mesuré par l'intermédiaire d'un indicateur métallochromique, Arsenazo III. La diminution du flux passif sortant de Ca est en accord avec la diminution de I_{Ca} produite par la procaine sur la fibre intacte. Ainsi l'ouverture des canaux calciques dans la membrane du RS serait contrôlée par le potentiel membranaire comme au niveau de la membrane excitable (REUTER, 1983). Bien que ce mécanisme de "gating" soit très compliqué (REUTER, 1983) il est suggéré actuellement que la présence d'un groupe de protéines ayant les propriétés

d'un dipôle aurait un rôle primordial, il serait ainsi sensible au champ électrique membranaire.

Quoiqu'il en soit, il apparaît que le contrôle du mouvement passif de Ca à travers la membrane du RS par le potentiel peut être interprété en considérant l'existence de canaux calciques au niveau de cette membrane, ayant des propriétés similaires à ceux des membranes excitables. En outre, ces canaux calciques seraient aussi, du point de vue de leur fonctionnement, modulés de la même façon par les drogues.



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

·ROLE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE DANS LE COUPLAGE EXCITATION -
CONTRACTION DU MUSCLE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les études de HEILBRUNN et WIERCINSKY (1947), MARSH (1952), HASSELBACH (1964), WEBER (1966), EBASHI et ENDO (1968), CHEUNG (1982, 1983) sur la régulation de la contraction musculaire par le RS précisent le rôle fondamental des ions Ca. Actuellement, il est généralement admis que la concentration myoplasmique des ions Ca^{2+} des cellules au repos est, de l'ordre de 10^{-7} M, cette concentration étant 1000 à 100 000 fois plus faible que la concentration extracellulaire. Le maintien de ce fort gradient calcique est assuré par des pompes au Ca localisées au niveau de la membrane de surface et de celle du RS (BORLE, 1981 ; CARAFOLI, 1982 ; CARAFOLI et SCARPA, 1982 ; MARTINOSI, 1983).

A - STRUCTURE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

Le réticulum sarcoplasmique occupe environ 9 % du volume intracellulaire ; sa surface est d'environ 2 m^2 par gramme de muscle et contient une concentration intraréticulaire en ions Ca^{2+} , $[Ca]_{ir}$ de 0,5 à 2 mM (HASSELBACH, 1983). Il est subdivisé en deux régions fonctionnellement et morphologiquement différentes (PEACHEY, 1965 ; FRANZINI-ARMSTRONG, 1980 ; SOMMER, 1982).

1. Le RS jonctionnel ("Heavy SR")

Il contient des projections ou pieds de la membrane de la citerne qui interfèrent avec les particules localisées dans la membrane du système tubulaire transverse (STT) formant ainsi la jonction ST-RS (SOMLYO, 1979 ; EISENBERG, 1983 ; FRANZINI-ARMSTRONG, 1975, 1980 ; FERGUSON et al., 1984) Chacun des pieds est composé de 4 particules disposées régulièrement le long du tube, pieds permettant la transmission de l'information électrique de la membrane du STT à celle du RS (FERGUSON et al., 1984).

2. Le RS libre ("Light SR")

Il contient l'ATPase comme constituant principal protéique. Ce RS

LA PERMEABILITE IONIQUE DE LA MEMBRANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE (D'APRES HASSELBACH, 1983)

IONS	AUTEURS	CONDITIONS		PERMEABILITE ($10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$)	RESISTANCE SPECIFIQUE (R_{SR}) ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
		pH	T°C		
K ⁺	Kasai et Kometani (1979)	6,5	23	0,6	42.000
K ⁺	Meissner (1981)	6,0	20	10 - 50	2 500 - 500
K ⁺	Labarca et Miller (1981)	7,0	20	-	17
Na ⁺	Kasai et Kometani (1979)	6,5	23	0,4	62.500
Na ⁺	Labarca et Miller (1981)	7,0	20	-	68
Cl ⁻	Kasai et Kometani (1979)	6,5	23	30	8.300
Cl ⁻	Miller et Racker (1976)	7,3	20	-	3
Mg ²⁺	Kasai et Kometani (1979)	6,5	23	0,02	$2,1 \cdot 10^7$
Ca ²⁺	Kasai et Kometani (1979)	6,5	23	0,024	$2,6 \cdot 10^7$
Ca ²⁺	Hasselbach et al. (1969)	6,5	20	0,002 - 0,01	$3,1 - 0,6 \cdot 10^8$
Ca ²⁺	Hasselbach et al. (1969)	7,0	20	0,02 - 0,1	$3,1 - 0,6 \cdot 10^7$
Ca ²⁺	Hasselbach et al. (1969)	7,0	20	0,02 - 0,1	$3,1 - 0,6 \cdot 10^7$
Ca ²⁺	Hasselbach et al. (1969)	7,0	30	0,06 - 0,3	$10 - 2 \cdot 10^6$
Ca ²⁺	Hasselbach et al. (1969)	8,0	30	0,12 - 0,6	$5 - 1 \cdot 10^6$
H ⁺	Meissner (1981)	6,2 - 7,6	15	10^4	$2,5 \cdot 10^6$

TABLEAU III : Toutes les valeurs de perméabilité sont déterminées sur des vésicules de RS isolé

active du calcium par le RS.

Le contenu calcique du RS traduit finalement le bilan des mouvements entrant et sortant de calcium produit par sa vitesse de pompage, sa libération en direction du cytoplasme et sa fixation sur des sites intraréticulaires dont l'affinité est un facteur important dans la capacité de charge de ce RS. Enfin si pour la prise de calcium par le RS, les résultats obtenus par les auteurs sont relativement concordant *in vitro* et *in vivo* (voir ENDO, 1977), il en est tout autrement en ce qui concerne sa libération (voir ENDO, 1977).

C - LA PRISE DE CALCIUM PAR LE RS

Il est admis actuellement que la prise de calcium par le RS durant la relaxation musculaire est assurée par l'ATPase calcique dont l'activité dépend des ions Mg^{2+} (ATPase Ca-Mg). Cette enzyme a un poids moléculaire de 100 000 daltons et constitue 50 à 80 % des protéines membranaires (voir MARTONOSI, 1984). Le transport actif par le RS est couplé à l'hydrolyse de l'ATP, une mole d'ATP permettant la translocation de deux ions Ca^{2+} venant du milieu extraréticulaire contre un fort gradient électrochimique. Cette ATPase requiert pour son fonctionnement un environnement phospholipidique ; contrairement à l'ATPase calcique de la membrane de surface elle est insensible à la calmoduline.

Il est bien connu que la contraction et la relaxation du muscle squelettique sont accompagnées par des flux importants de calcium à travers la membrane réticulaire. Sans compensation de charge, le transport actif de calcium assuré par l'ATPase-Ca dépendant du Mg^{2+} , peut entraîner la formation d'un potentiel intraréticulaire positif par rapport au potentiel extraréticulaire, une variation de potentiel de signe opposé pouvant intervenir durant la libération de Ca. Ces variations de potentiel

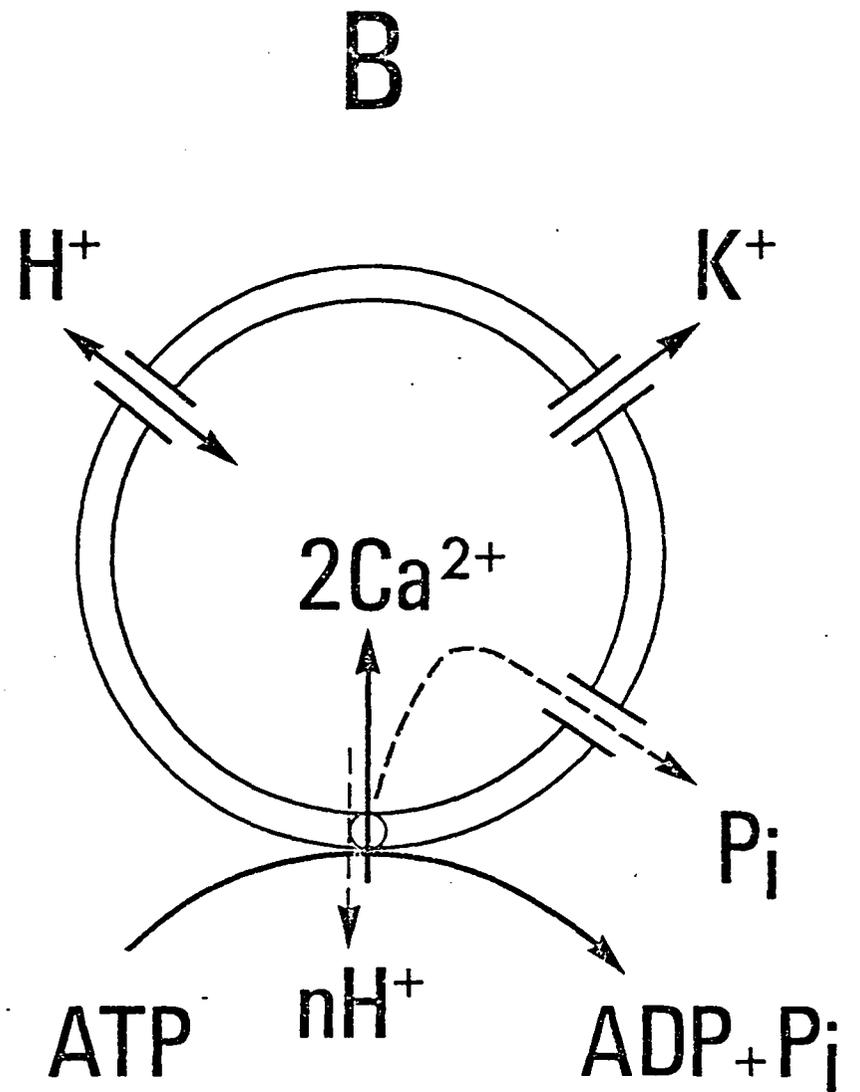
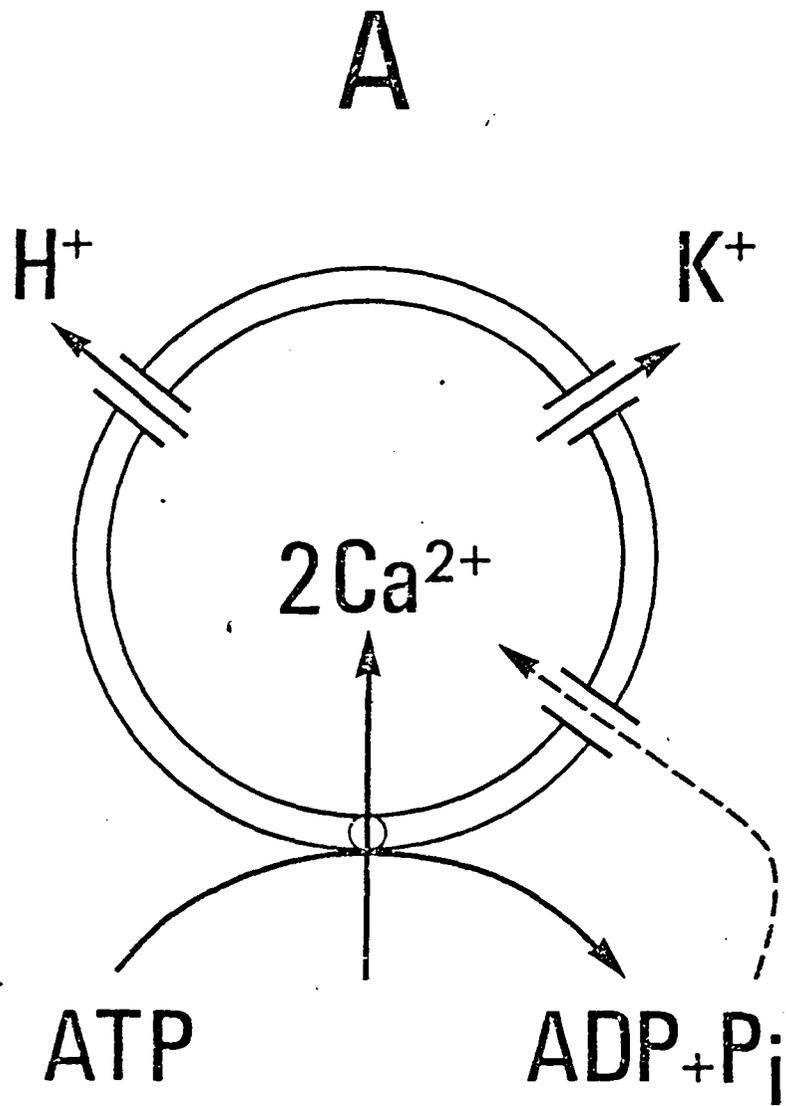


Figure 28 :

Schéma hypothétique d'après MEISSNER (1981) rendant compte de la prise de Ca^{2+} par le RS.

peuvent donc jouer un rôle biologique important dans le couplage excitation-contraction. Dans cette perspective, BEELER et al. (1981) montrent que le transport de Ca par l'ATPase dépendant du Ca-Mg est électrogénique et s'accompagne ainsi de la formation d'un potentiel de membrane réticulaire d'environ 10 mV (intérieur positif) durant la première phase de la translocation de Ca. Cependant ce potentiel ne serait pas maintenu et disparaîtrait rapidement du fait de l'apparition d'un flux ionique passif opposé à travers la membrane (flux de K). L'utilisation d'un indicateur de fluorescence ("8 anilino-1-naphtalene sulfonic acid") par ZIMNIAK et RACKER (1978) permet de montrer, par contre, le maintien d'un potentiel positif interne durant le pompage du calcium par des vésicules de RS reconstituées à l'aide de phosphatidylcholines contenant seulement, comme composé protéique, l'ATPase calcique. En effet, au niveau de ces vésicules ayant une seule composante protéique (l'ATPase purifiée), la perméabilité aux anions et aux cations étant très basse. Un maintien du potentiel membranaire est ainsi rendu possible par les vésicules. De même BEELER (1980) et MEISSNER (1981) ont conduit à conclure que la prise du calcium par le RS entraîne la formation d'un potentiel de membrane traduisant une positivité intraréticulaire par rapport au milieu extraréticulaire (myoplasmique). En effet, l'établissement d'un gradient de pH à travers la membrane du RS (intérieur négatif) augmente la vitesse initiale de prise de Ca. Ce pompage entraîne par la suite, une accélération de la diminution du potentiel induit par les ions H^+ (ou K^+) suggérant que la prise de Ca par le RS entraîne une sortie des ions H^+ (ou K^+). Ainsi lorsque deux ions Ca^{2+} sont transportés lors de l'hydrolyse d'une mole d'ATP (HASSELBACH et MAKINOSE, 1963 ; WEBER et al., 1966) ils agissent sur le mouvement d'autres ions (voir figure 28 d'après MEISSNER, 1981). Cependant MADEIRA

(1978, 1979) montre, contrairement aux travaux de MEISSNER (1981), que la membrane du RS est imperméable aux protons. Durant le pompage du Ca, le gradient transmembranaire pour les ions H^+ ne permet pas la dissipation du potentiel qui serait ainsi maintenu. Ce potentiel de membrane réticulaire pourrait atteindre 50 à 60 mV durant le transport actif de Ca (DUPONT, 1979)

D - LA CAPACITE DE CHARGE DU RS

En absence d'un chélateur de calcium, tel que l'oxalate, la capacité maximale de charge de calcium assurée par l'ATPase réticulaire est supérieure à $50 \mu\text{mole.g}^{-1}$ de protéine (HASSELBACH, 1964). Si on considère que le volume intraréticulaire est compris entre 1 et 5 ml.g^{-1} de protéine, la concentration interne du Ca serait comprise entre 30 et 150 mM dans la mesure où on suppose que tout le calcium est sous forme libre (ionisé). Cependant en présence d'oxalate la concentration intraréticulaire de Ca déterminée par WEBER et al. (1966) et OGAWA (1970) n'est que de 0,5 mM (en prenant comme coefficient de solubilité 2.10^{-9} M^2 pour WEBER et al. et 2.10^{-7} M^2 pour OGAWA). Par ailleurs, le calcul montre qu'une partie importante de Ca peut être fixée sur des sites protéiques ($60 \text{ à } 120 \text{ mM.g}^{-1}$ protéine). Ces sites ont une capacité de fixation du Ca comprise entre 35 et 60 M.M.^{-1} . HASSELBACH (1964) et WEBER et al. (1966) signalent qu'en présence d'oxalate dans le milieu intraréticulaire, le pompage de Ca augmente et atteint 80 mole.g^{-1} protéine. Ainsi selon ces derniers auteurs l'oxalate, traversant la membrane du RS, forme un complexe avec le calcium intraréticulaire et assure le maintien d'une concentration élevée. Ce complexe est visualisé en microscopie électronique sous forme de cristaux d'oxalate de Ca (HASSELBACH, 1964 ; DEMEIS et al., 1974).

E - LIBERATION DU CALCIUM RETICULAIRE

Dans les fibres musculaires, la libération de calcium est un processus rapide qui intervient quelques millisecondes après la phase de dépolarisation du potentiel d'action, et se termine durant le développement de la contraction.

En dépit de nombreux travaux effectués sur les fibres musculaires "intactes" (SCHNEIDER, 1981 ; WINEGRAD, 1982), "coupées" ou "pelées" (ENDO, 1977 ; STEPHENSON, 1981 ; WINEGRAD, 1982) et sur les vésicules isolées du RS (KASAI et MIYAMOTO, 1973, 1976 a et b ; MEISSNER et MCKINELEY, 1976 ; ENDO, 1977 ; MCKINELEY et MEISSNER, 1977, 1978 ; BEELER et al., 1979 ; BAYLOR et al., 1981 ; MARTONOSI, 1981 ; MIYAMOTO et RACKER, 1982) deux mécanismes principaux de libération de Ca sont proposés : i) le potentiel d'action dans le système tubulaire entraînerait la libération de Ca du réticulum grâce à la dépolarisation de la membrane réticulaire mécanisme dit de type "depolarization induced Ca release" ; ii) le calcium qui entre durant le potentiel d'action augmentant localement la concentration myoplasmique de Ca au voisinage des citernes du RS induirait une libération autocatalytique de Ca, mécanisme dit de type "Ca induced Ca release".

1. "Depolarization induced Ca release" (DICR)

Dans ce cas la dépolarisation de la membrane tubulaire est transmise électriquement à celle du réticulum sarcoplasmique par la jonction de couplage. Cette jonction liant le système tubulaire au RS correspondrait à une liaison de type "gap junction" ou "foot" décrit par FRANZINI - ARMSTRONG (1975) et serait constituée de quatre sous unités (FERGUSON et al., 1984) délimitant un "canal" pouvant ainsi permettre le transfert de l'information électrique à la membrane du RS, dépolarisation déclenchant l'ouverture des canaux calciques de la membrane du RS. La libération lente de Ca des VRSI, observée

par de nombreux auteurs, pourrait correspondre à une destruction de la jonction de couplage lors de l'isolement du RS ne permettant plus ainsi la transmission électrique du STT au RS comme dans les conditions physiologiques normales.

Récemment OBA et HOTTA (1984) montrent que les ions Ag^+ entraînent une contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille suite à une activation des canaux calciques localisés au niveau des membranes profondes. Par ailleurs, SALAMA et ABRAMSON (1984) observent que les métaux lourds induisent une libération rapide de Ca des VRSI de lapin. Ainsi après avoir chargé passivement le RS isolé avec ^{45}Ca ou activement en présence d'ATP, l'addition d'ions Ag^+ , à une concentration micromolaire provoque une augmentation rapide de la libération des ions Ca^{2+} . Cette libération est 1000 fois plus grande que la fuite calcique de base ; ceci permet une vidange presque complète du Ca réticulaire. Ces observations sont interprétées en considérant que les ions Ag^+ se fixent au niveau du groupe sulfhydryl de la protéine constituant le canal calcique (SALAMA et ABRAMSON, 1984). Ces résultats de OBA et HOTTA (1984) et SALAMA et ABRAMSON (1984) conduisent à conclure qu'il existerait une jonction de type "gap" entre le STT et le RS.

La dépolarisation de la membrane réticulaire a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, CONSTANTIN et PODOLSKY dès 1967, sur les fibres musculaires pelées isolées en milieu pauvre en Cl, rapportent que l'application d'une solution de KCl ou trispropionate provoque une contraction. La solution de KCl permet une élévation de la concentration intracellulaire des ions Cl^- alors que le tris propionate diminue la concentration des ions K intracellulaires. Dans les deux cas, la membrane du RS verrait son potentiel de diffusion modifié ce qui entraînerait une libération importante de Ca. Des observations similaires sont rapportées dans les mêmes conditions expérimentales sur les fibres pelées par ENDO et NAKAJIMA (1973) ; ENDO et

BLINKS (1973) et STEPHENSON (1981) et sur les VRSI par KASAI et MIYAMOTO (1973, 1976 a et b). Cependant la libération de calcium induite par une "dépolarisation" produite par changement des gradients ioniques est rendue difficile du fait de l'intervention de différents facteurs dont deux sont importants. Le premier est relatif à la méthode de substitution des ions qui peut entraîner : i) une accumulation localisée de Ca suffisante pour induire une activation du mécanisme de CICR (ENDO, 1977) ; ii) une variation de la pression osmotique (π) qui retentit sur la sortie du calcium du RS (KASAI et MIYAMOTO, 1976 a et b ; MEISSNER et MCKINELEY, 1976 ; MCKINELEY et MEISSNER, 1978). Ainsi la libération des ions Ca^{2+} peut être attribuée non à une variation de potentiel mais plutôt à une rupture de la membrane réticulaire. En effet la libération des ions Ca^{2+} peut facilement apparaître en milieu hypotonique aussi bien au niveau des fibres musculaires (ENDO, 1977 ; MOBLEY, 1982) qu'au niveau des VRSI (MEISSNER et MCKINELEY, 1976). Le deuxième facteur concerne la libération de Ca elle même qui peut provoquer : i) la genèse d'un potentiel de diffusion qui, par rétroaction, influence la vitesse de libération et de prise des ions Ca^{2+} (BEELER et al., 1981 ; MARTONOSI, 1981) ; ii) la stimulation de la pompe calcique qui, très activée, pourrait de ce fait masquer le processus de libération (STEPHENSON, 1981, 1982) ; iii) enfin, un changement drastique du potentiel de surface qui conduirait à un changement de l'affinité des sites de fixation et de libération de calcium (RUSSEL et al., 1971 a et b ; BEELER et al., 1981).

a - Effets de la pression osmotique (π) sur la libération du calcium

a/ au niveau des fibres musculaires

MOBLEY (1979) rapporte que l'augmentation de la concentration extracellulaire de Cl, $[Cl]_{er}$, ou la diminution de $[K]_{er}$, en maintenant le produit $[K][Cl]$ constant (conditions permettant de minimiser les variations de pression

osmotique (π) entraîne une libération de Ca du RS des fibres musculaires pelées. Par ailleurs, les ions Mg^{2+} inhibent cette libération calcique induite par les ions Cl^- (STEPHENSON et PODOLSKY, 1977). De ce fait, la variation de π ne peut donc être la cause de libération de Ca lors de l'augmentation de $[Cl^-]_{er}$ comme le confirme plus tardivement STEPHENSON en 1981.

B/ au niveau des VRSI

La contribution de π à la libération du Ca produite par un changement de potentiel membranaire des VRSI suite à l'addition d'ions Cl^- extraréticulaires est étudiée par KASAI et MIYAMOTO (1973, 1976 a et b). Le remplacement du méthylsulfate de K du milieu extraréticulaire de référence par du KCl produit une variation du potentiel associée à un gonflement de vésicules dû à l'entrée des ions Cl^- . Par ailleurs, le saccharose à la concentration de 0,1 à 0,6 M inhibe la libération de Ca induite par l'addition de ces ions Cl^- , remplaçant les ions méthylsulfate (KASAI et MIYAMOTO, 1976 a et b ; MEISSNER et MCKINELEY, 1976 ; BEELER et al., 1979 ; CAMPBELL et SHAMOO, 1980). L'inhibition par le saccharose de la libération de Ca n'est cependant pas observée au niveau de vésicules de RS (HSR) provenant des citernes terminales (CAMPBELL et SHAMOO, 1980 ; CASWELL et BRANDT, 1981). Ces observations amènent à conclure que la libération de Ca induite par une "dépolérisation" du RS serait préférentiellement localisée au niveau des citernes terminales (HSR) alors que le RS libre (LSR) serait spécifiquement sensible aux changements de π .

b - Relation entre le potentiel de membrane et la perméabilité calcique du RS

a/ au niveau des fibres musculaires

La dépolérisation de la membrane du RS par un courant provenant du STT déclencherait l'ouverture de canaux calciques (MATIAS et al., 1980,

1981), ces canaux activés permettant la libération du Ca dans le cytoplasme. La relaxation du muscle, serait en parti produite par la fermeture de ces canaux qui s'inactiveraient, le RS étant repolarisé par la prise du calcium. Les résultats d'OETLIKER(1982) obtenus avec les indicateurs de potentiel membranaire renforcent cette hypothèse. Egalement BEZANILLA et HOROWICZ (1975) observent une augmentation transitoire de la fluorescence (avec le bleu du Nil A) qui correspondrait à une variation de potentiel de la membrane du RS. La genèse d'un potentiel négatif intraréticulaire ("dépolariation") s'accompagnant d'une augmentation de l'intensité de fluorescence (BEELER et al., 1981) ne durant que 50 à 100 msec (BEZANILLA et HOROWICZ, 1975) conduit à envisager que le potentiel de membrane du RS contrôle la libération de Ca. Ce résultat est conforme à celui de KOVACS et al. (1981), ces auteurs observent en effet, que la biréfringence transitoire est liée à la libération de calcium. De plus, la libération de Ca et la biréfringence sont également modifiées dans les mêmes proportions par la caféine et le dantrolène (OETLIKER, 1982).



B/ au niveau des VRSI

Des travaux effectués sur les VRSI montrent également l'apparition d'un potentiel de membrane négatif au cours de la libération de Ca ; ce potentiel pouvant faciliter ultérieurement la prise de Ca durant la relaxation, qui en retour provoquerait la dissipation du potentiel de membrane (BEELER et al., 1981). En effet l'analyse de la composition ionique du contenu du RS montre qu'à la suite d'une contraction, 59 % du Ca réticulaire est libéré (SOMLYO et al., 1981) associé à une prise d'ions Mg^{2+} et K^+ dans les citernes terminales du RS. Comme l'influx d'ions Mg^{2+} et K^+ compensant 1/3 du Ca libéré, les protons et les ions organiques participeraient à cette neutralisation de charge (SOMLYO et al., 1981 ; BAYLOR et al., 1982).

2. "Calcium induced calcium release"

Différents travaux mettent en évidence l'insuffisance de l'entrée de Ca dans la cellule pour permettre le développement de la contraction musculaire. En effet la quantité d'ions Ca^{2+} pénétrant dans le myoplasme est trop faible pour rendre compte de la concentration myoplasmique en Ca nécessaire pour activer les protéines contractiles lorsque le courant I_{Ca} est activé lors de dépolarisations membranaires. Les premiers travaux concernant le mécanisme de libération autocatalytique de Ca (CICR) sont ceux de FORD et PODOLSKY (1970). Au niveau des fibres musculaires cardiaques FABIATO et FABIATO (1979 a et b) FABIATO, (1981, 1982, 1983, 1985) envisagent ce mécanisme de libération pour rendre compte de leurs résultats.

Ce mécanisme est celui également envisagé par ENDO (1981), STEPHENSON (1981) et WINEGRAD (1982) en ce qui concerne les fibres squelettiques pelées et par MIYAMOTO (1981) ; OHNISHI (1981) ; MIYAMOTO et RACKER (1982) pour les vésicules de RS.

L'étude du couplage excitation-contraction du muscle cardiaque dans les conditions de potentiel imposé montre l'existence de deux composantes de tension mécanique qui sont contrôlées par le Ca extracellulaire : i) une tension phasique due au courant entrant de Ca (GOTO et al., 1971 ; VASSORT et ROUGIER, 1972) et une tension tonique (VASSORT, 1973 ; BENNINGER et al., 1976) dépendant du mécanisme d'échange Na-Ca (HORACKOVA et VASSORT, 1979 a). Cependant les travaux de HORACKOVA et VASSORT (1979 b) montrent que la tension phasique est régulée par deux mécanismes : le courant entrant lent et la libération de Ca du RS, correspondant ainsi au mécanisme de CICR. Des travaux ultérieurs effectués par BONVALET et al. (1980, 1985) révèlent contrairement à ceux de HORACKOVA et VASSORT (1979 b) la possibilité d'une libération de Ca par le RS en absence de Ca extracellulaire. En effet en milieu sans cal-

cium (condition où I_{Ca} et l'échange Na-Ca sont fortement diminués (voire abolis) il est encore possible d'observer des contractions en réponse à d'amples dépolarisations imposées de longue durée ; ces contractions étant similaires à celles observées en milieu extracellulaire riche en Ca (2,5 mM).

ENDO (1977) conclut, à partir de ses travaux sur les fibres musculaires squelettiques, que ce processus de libération autocatalytique du Ca réticulaire, n'a aucun rôle physiologique. En effet la contraction de la fibre musculaire squelettique pelée suite à une libération de Ca réticulaire ne peut être obtenue qu'à forte concentration myoplasmique en Ca et Mg, associé à une forte charge en Ca du RS (ENDO, 1975 et 1977).

a. Effets de $[Ca]_{er}$ sur le mécanisme de CICR

Le mécanisme de CICR dépend de la concentration en Ca extraréticulaire ; cette concentration nécessaire pour induire la libération du Ca du RS varie selon les préparations. Au niveau des fibres musculaires squelettiques pelées de Xénope, la libération du Ca est déclenchée lorsque la $[Ca]_{er}$ atteint au moins $10^{-5}M$ en absence de Mg^{2+} à un pH de 7,1 (ENDO, 1981) ; la vitesse maximale de libération étant atteinte pour une $[Ca]_{er}$ de $10^{-4}M$. Par contre, pour une $[Ca]_{er}$ de 1 mM la libération est inhibée. En présence d'ions Mg^{2+} (1 mM), la concentration seuil de Ca nécessaire pour induire la libération de Ca est réduite à $5 \cdot 10^{-6}M$ (ENDO, 1981). Au niveau des fibres musculaires cardiaques pelées, le seuil de $[Ca]_{er}$ nécessaire pour déclencher la libération autocatalytique de Ca est beaucoup plus faible ($0,3 \cdot 10^{-6}M$ à un pH de 7,1) ; cette concentration étant insuffisante pour induire une contraction (FABIATO, 1981). Enfin, sur les VRSI, MORII et TONOMURA (1983), montrent que dans la gamme de $[Ca]_{er}$ comprise entre 0,6 et $0,24 \cdot 10^{-6}M$, en présence d'AMP cyclique, la quantité de Ca libérée par le RS correspond respectivement à 0 et 60 % de la charge calcique du réticulum ; la libération maximale étant obtenue pour une $[Ca]_{er}$ de $3 \cdot 10^{-6}M$ (KIRONO et al., 1983).

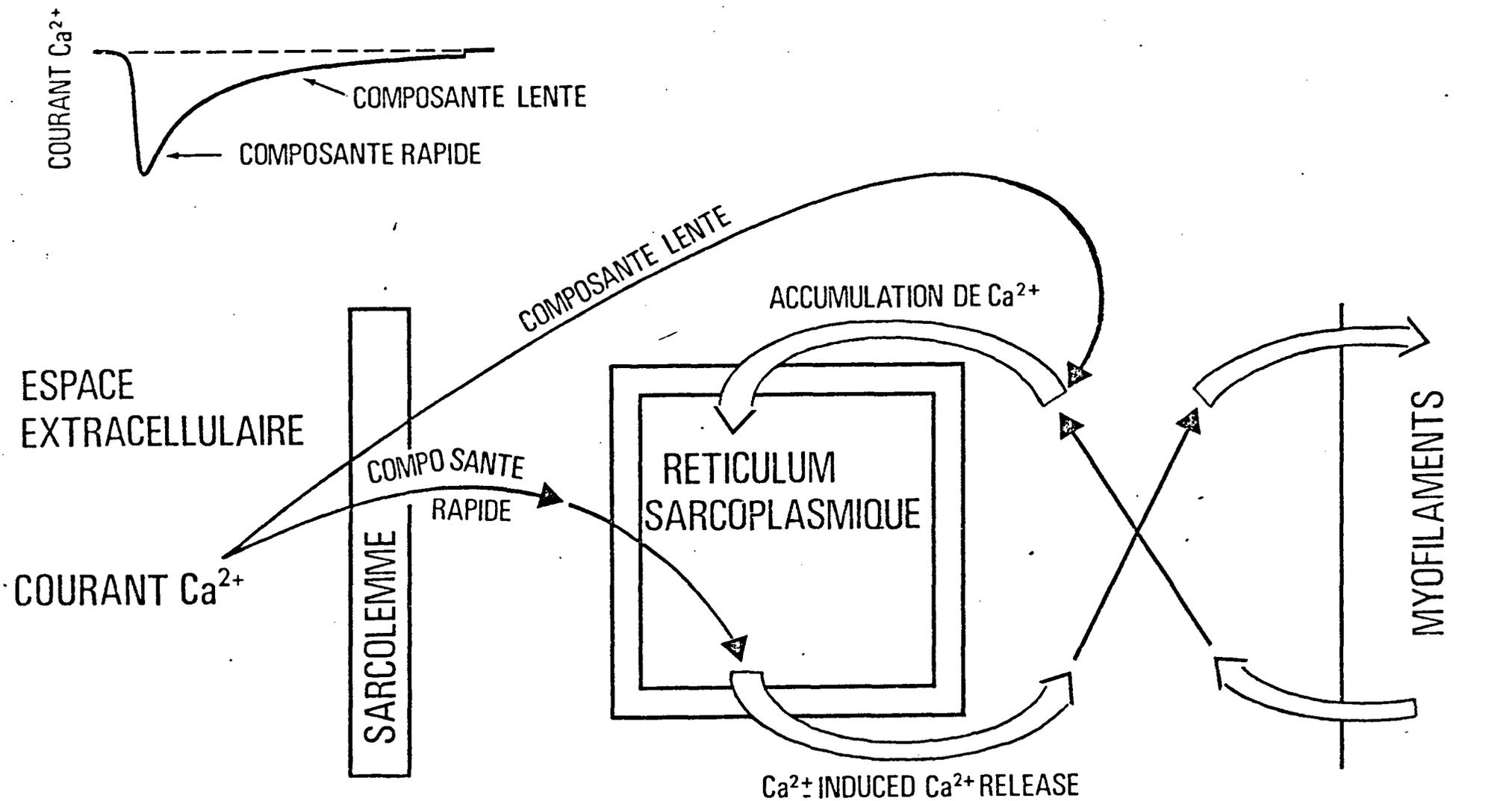


Figure 29 :

Régulation des mouvements de Ca dans le cycle contraction relâchement de la fibre ventriculaire de mammifère (d'après FABIATO, 1983).

En outre, la relation liant $[Ca]_{er}$ à la quantité de Ca libérée permet de conclure à un phénomène de coopérativité ; le coefficient de HILL étant de 4 (MORII et TONOMURA, 1983). La valeur de ce coefficient permet de supposer selon ces derniers auteurs que les ions Ca^{2+} du myoplasme se fixent sur des canaux de la membrane du RS dont l'activation par l'AMP cyclique permet la libération de Ca.

Cependant des travaux plus récents montrent que le mécanisme de CICR n'est pas dû en fait à une variation absolue de $[Ca]_{er}$ mais plutôt à la vitesse de cette variation ($\Delta[Ca^{2+}]_{er}/\Delta t$) selon FABIATO et FABIATO (1979 a) et FABIATO (1982, 1983, 1985). En effet, une augmentation "rapide" de $[Ca]_{er}$ entraîne une libération de Ca du RS alors qu'une augmentation "lente" induit à l'inverse une charge de celui-ci. Ainsi, dans les conditions physiologiques, le courant entrant I_{Ca} formé de deux composantes (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) pourrait être à l'origine de ces deux effets selon FABIATO (1982) et FABIATO et BAUMGARTEN, (1984). La composante rapide, I_{Ca_1} pourrait déclencher le mécanisme de CICR alors que la composante lente du courant calcique, I_{Ca_2} , qui correspondrait en apparence à l'inactivation incomplète de I_{Ca} pourrait permettre, (au moins au niveau du coeur), de charger le RS avec un "pool" de calcium qui allant ainsi du réticulum longitudinal aux citernes, deviendrait disponible pour être libéré lors de la contraction suivante (voir figure 29).

b : Possible existence de canaux calciques activés par la $[Ca]_{er}$ au niveau de la membrane du RS

L'hypothèse de FABIATO (1983) sur le mécanisme de CICR implique la présence dans la membrane réticulaire de canaux calciques dont l'activation est assurée par des "portes" qui nécessiteraient pour leur ouverture des concentrations micromolaires ou submicromolaires de Ca ; les ions Mg^{2+} jouant à ce niveau un rôle inhibiteur, seraient compétitifs des ions Ca^{2+} pour les sites de fixation. Les indicateurs optiques, comme le bleu de Nil A, sensibles aux variations de potentiel membranaire, permettent de déceler un signal

SARCOLEMME

MYOPLASME

RETICULUM SARCOPLASMIQUE

courant Ca^{2+} ($I_{\text{Ca}^{2+}}$)

$[\text{Ca}^{2+} \text{ libre}] \uparrow\uparrow\uparrow$
près du canal Ca^{2+}

DIFFUSION AVEC
FIXATION

$\uparrow [\text{Ca}^{2+} \text{ libre}]$

Activation du
"Ca²⁺-induced Ca²⁺ release"

$\uparrow\uparrow [\text{Ca}^{2+} \text{ libre}]$

Inactivation
partielle de $I_{\text{Ca}^{2+}}$

Activation du canal aux cations
non selectif

$\uparrow \text{GK}^+$

Repolarisation

Inhibition du "Ca²⁺ release"

Réaccumulation Ca^{2+}

—→ Inactivation totale de $I_{\text{Ca}^{2+}}$

Figure 30 :

Schéma d'après FABIATO (1983) précisant, en plus des mouvements de Ca dans la fibre cardiaque, le rôle important de l'activité du Ca myoplasmique dans l'inhibition du mécanisme de "Ca induced Ca release!"

optique rapide et bref qui rend compte d'une diminution absolue de charges positives à la face externe (ou une augmentation de charges positives à la face interne) du RS ; ce signal qui apparaît juste avant la libération de Ca (FABIATO, 1982) est en faveur de l'hypothèse selon laquelle il existerait des canaux calciques dépendant du voltage dont le fonctionnement serait analogue à celui des canaux calciques des membranes excitables. Ces canaux calciques dans la membrane du RS s'inactiveraient (voir figure 30) , cette inactivation pouvant dépendre de $[Ca]_{er}$. En effet l'élévation de $[Ca]_{er}$ entraîne toujours une inhibition de la libération de Ca. Ce mécanisme hypothétique d'inactivation des canaux calciques selon FABIATO serait dû à la fixation des ions Ca^{2+} sur des sites de faible affinité localisés à la face myoplasmique de la membrane du RS, sites correspondant à ceux décrits par HASSELBACH et KOENING (1980).

En résumé, pour les deux principaux mécanismes de libération de Ca par le RS il ressort de l'analyse de la littérature que cette libération de Ca ne peut dépendre uniquement du gradient calcique comme cela a été supposé initialement par FEHER et BRIGGS (1982) mais à un mécanisme plus complexe. Ce mécanisme serait liée à la présence au niveau de la membrane du RS de canaux dont l'activation dépendrait soit de la vitesse de variation de $[Ca]_{er}$ (FABIATO et FABIATO, 1979 a et b) soit de la dépolarisation de la membrane du RS (GERDES et MOLLER, 1983) ou des deux.



DEUXIEME CHAPITRE

MATERIEL ET METHODE

A - PREPARATION DES VESICULES DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE ISOLE (VRSI)

Les VRSI sont obtenues à partir des fibres musculaires squelettiques issues des pattes locomotrices du crabe (*Carcinus maenas*). La technique de préparation des vésicules dérive de celles décrites par de nombreux auteurs (MEISSNER, 1975 ; DUGGAN et MARFONOSI, 1970). Les fragments musculaires sont placés dans une solution de KCl 0,1 M, pH = 6,8 à 0°C pendant 14 heures environ ; après ce temps la solution de KCl 0,1 M est éliminée puis remplacée par une solution dont la composition ionique se rapproche de celle du milieu intravésiculaire (milieu I voir tableau IV). La suspension des fibres musculaires obtenue est homogénéisée pendant 40 secondes à vitesse moyenne (virtis "S" 23). L'ensemble est ensuite centrifugé à 3°C (ultra-centrifugeuse BECKMAN-rotor SW27), dans un premier temps à 1600 g (4000 t/min.) pendant 15 min ensuite à 11.000g (1000 t/min.) durant 15 min également. Le culot est alors éliminé, et le surnageant est centrifugé à 80.000g (24.500 t/min.) pendant 40 min à 3°C. Finalement le surnageant est éliminé et le culot renfermant les vésicules de RS ainsi obtenu est stocké à 0°C.

B - PURETE DES VRSI

1. Contrôle en microscopie électronique

Cette étude est effectuée sur de nombreux échantillons de vésicules isolées dans du KCl 0,1M, tris maleate pH = 6,8 fixées immédiatement après leur isolement dans un mélange glutaraldehyde 1 % phosphate pendant 1 minute. Après lavage dans le tampon phosphate, l'échantillon est post-fixé avec un mélange acide osmique-tampon phosphate puis déshydraté deux fois pendant 15 minutes par passage dans des bains d'alcool 25°, 60°, 75°, 95° et 100°. L'ensemble passe ensuite dans deux bains successifs d'oxyde de propylène pendant 30 minutes avant d'être placé pendant une heure dans un mélange d'oxyde

milieux (en mM, pH = 6,8)							
A		B		C		I	
KCH ₃ COO	107	KCH ₃ COO	24,5	KCH ₃ COO	5	KCH ₃ COO	5
KCl	5	Tris HCl	24,8	Tris HCl	107	Tris HCl	101,8
ATP Na ₂	4	ATP Na ₂	4	ATP Na ₂	4	CaCl ₂	10
Mg (CH ₃ COO) ₂	4	Mg (CH ₃ COO) ₂	4	Mg (CH ₃ COO) ₂	4		
		Saccharose	126				

TABLEAU IV

de propylène et d'araldite. Enfin la préparation est mise dans la résine (1 volume d'araldite + 1 volume de durcisseur + quelques gouttes d'accélérateur) pendant 12 heures à 4°C avant d'être mise à l'étuve à 60°C pendant 3 jours.

Les vésicules isolées, observées en microscopie électronique (figure 31) sont bien délimitées et ont une forme arrondie mais se présente sous différentes formes. Ceci témoigne que les vésicules isolées sont en bonne état dès leur isolement et peuvent donc être utilisées en vue d'expériences. La diversité de forme des vésicules peut s'expliquer par l'existence de nombreuses unités (voir figure 31) de vésicules du RS = citerne terminale ou RS jonctionnel, sac latéral et le tubule longitudinal (voir également MARTONOSI, 1984). Malgré cette diversité de forme, il semble que comme le suggère HASSELBACH (1980), ces différentes unités ont la même composition chimique et sont difficiles à différencier. Enfin, il est à noter que contrairement aux travaux de TAKAGI (1971) et ceux de HUDDART et al. (1974) la contamination des VRSI par celles issues de mitochondries ou par les filaments d'actomyosine soit absente.

2. Contrôle biochimique

Pour se rendre compte du degré de pureté des VRSI, un test biochimique est réalisé. En effet le broyage des fibres musculaires in vitro peut entraîner la formation de nombreux types de vésicules provenant de différentes structures cellulaires notamment les mitochondries, la membrane sarcolemmique et tubulaire. Les membranes de ces différentes structures présentent toute une activité ATPasique. Le sarcolemme et le SIT ont une ATPase dépendante du Na et du K inhibée spécifiquement par l'ouabaïne (DUHAM et GLYNN, 1961 ; CHARNOCK et al., 1975) tandis que celle de mitochondries est une ATPase dépendante du Ca inhibée spécifiquement par l'azide de sodium (TAKAGI, 1971). Des tests effectués, il ressort que ni l'ouabaïne

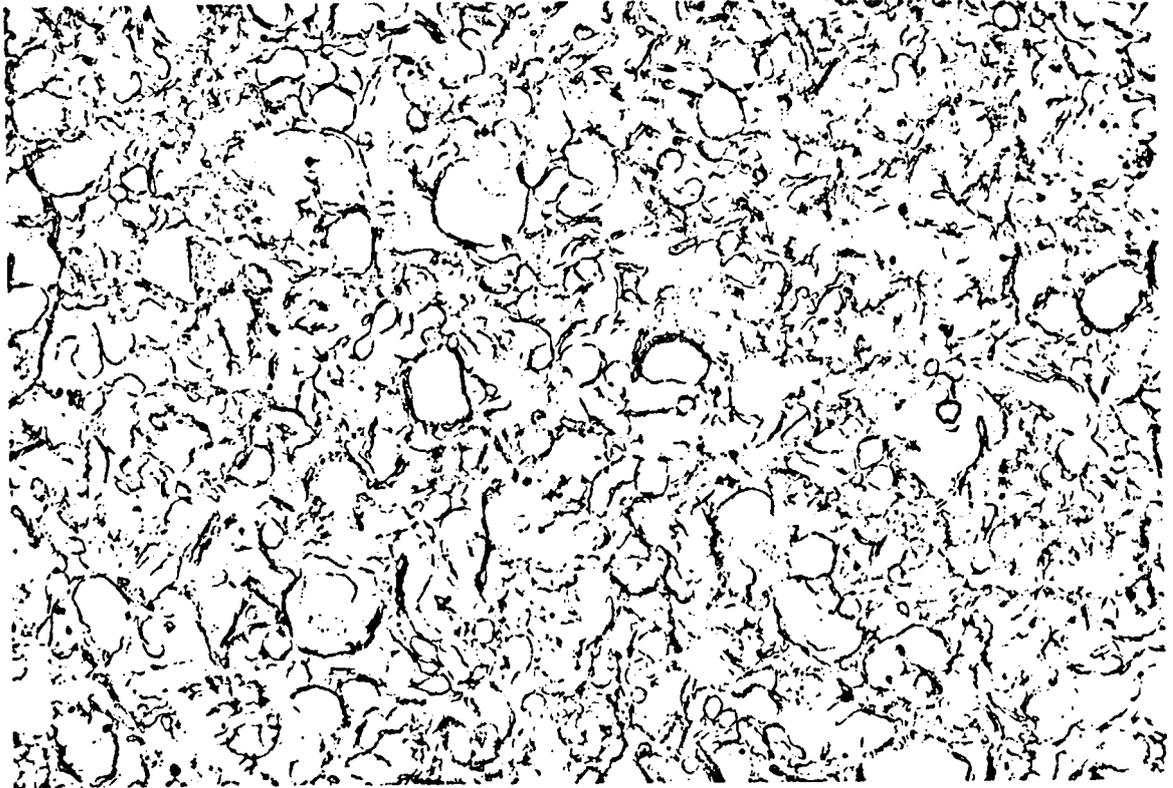


Figure 31 :

Examen en microscopie électronique de vésicules du réticulum sarcoplasmique isolé dans du KCl 0,1 M tris maléate à un pH de 6,8 fixées immédiatement après leur isolement. Il est à noter que cette unité microsomale est dépourvue de myofibrilles et de mitochondries. Le grossissement est de 20 000.

ni l'azide de sodium n'affecte l'activité ATPasique de notre préparation. En résumé, le contrôle de pureté à l'aide des techniques biochimiques ainsi que celles de microscopie électronique ne révèle aucune contamination des VRSI par des vésicules issues de membranes autres que celle du RS.

C - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES PROTEINES

La quantité de protéine membranaire du RS présente dans le culot est dosée selon la méthode de LOWRY et al. (1951). Le dosage s'effectue de la façon suivante : i) 0,05 ml de la suspension de vésicules est mis en présence de 0,2 ml de NaOH 1M pendant 1 heure afin de solubiliser les protéines membranaires ; ii) ensuite 0,15 ml d'eau bidistillée est ajouté au mélange précédent ; iii) puis sont ajoutés 2 ml d'une solution D (correspondant à un mélange de 50 ml de NaCO_3 à 2p.100 avec 1 ml d'une solution B préparée juste avant le dosage). La solution B renferme 1 volume du $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1 % et 1 volume de tartrate double Na, K à 20 % . Après 10 min à 18°C est ajouté 0,2 ml de la solution commerciale de FOLLIN, diluée au 1/2 (réactif de coloration). La lecture s'effectue ensuite, lorsque la coloration est établie en 1/2 heure à l'obscurité, au spectrophoromètre à 750 nm.

Avant chaque série de dosage une courbe étalon est réalisée en partant d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumine) à 500 γ /ml. De manière à conserver la même force ionique que pour le milieu de dilution des VRSI.

D. - STANDARISATION DES RESULTATS :

1. Conditions de référence :

Comme cela a été indiqué antérieurement, le culot de vésicules de RS obtenu par les diverses centrifugations est dilué dans une solution de contenu ionique déterminé de façon à obtenir en conditions finales, un milieu

dépolarisant les membranes des vésicules ; milieu permettant de rendre l'intérieur des vésicules positif par rapport à l'extérieur. Cette polarisation est réalisée par les gradients de K et de Cl à produit K.Cl constant ; condition permettant de pallier à toute variation éventuelle de pression osmotique. La composition ionique du milieu extravésiculaire de référence utilisée est donnée dans le tableau (milieu A).

2. Mesure de la prise et de la libération du calcium par les VRSI

La prise et la libération du Ca des VRSI c'est-à-dire la diminution et l'augmentation de la concentration de Ca extraréticulaire sont mesurées par les variations d'absorbance d'un indicateur métallochromique spécifique du Ca, l'arsenazo III (SCARPA, 1978). L'augmentation de l'absorbance (libération de Ca) ou sa diminution (prise de Ca) en fonction du temps est déterminée par l'intermédiaire d'une courbe étalon établie en partant de la solution ionique utilisée ultérieurement à différentes concentrations de Ca. La valeur de la force ionique est la même pour les solutions étalons utilisées. La concentration de Ca considérée comme nulle d'une des solutions étalons est obtenue en omettant le Ca dans cette solution et en y ajoutant de l'EGTA à 1 mM.

Certaines substances utilisées (le vanadate, la caféine, la procaine...) pour étudier la fuite ou la prise de calcium peuvent interagir avec l'arsenazo III entraînant ainsi un changement apparent d'affinité pour l'indicateur métallochromique. De ce fait, un contrôle nécessaire a été effectué avant l'addition de chaque substance au milieu d'étude afin d'évaluer quantitativement son influence sur la formation du complexe Arsenazo III-Ca.

3. Polarisation du RS

La suspension de VRSI (4 ml) décrite précédemment (conditions de référence)

est divisée et répartie, à raison de 1 ml dans ces milieux A, B, C (voir tableau IV) dont les compositions ioniques correspondent à trois polarisations différentes : pour A : $E_K = E_{Cl} = 80$ mV ; pour B : $E_K = E_{Cl} = 40$ mV ; et pour C : $E_K = E_{Cl} = 0$ mV. La présence de l'ATP (4 mM) et des ions Mg^{2+} (4 mM) permettent l'activation de l'ATPase calcique et par conséquent la prise de calcium peut s'effectuer. Cette activité ATPasique dure en générale 30 min à 20°C. Après ce temps de 30 min les vésicules de RS sont chargées au maximum (constante de charge de 7 min en moyenne) et la libération peut être induite par addition du vanadate à la concentration de 100 μ M ; concentration largement suffisante puisque à 10 μ M de cette substance 50 % de l'activité ATPasique au niveau du réticulum sarcoplasmique est inhibée (ONEAL et al. 1979).



TROISIEME CHAPITRE

RESULTATS

A - EFFETS DE POLARISATION DE MEMBRANE SUR LES MOUVEMENTS DE Ca A TRAVERS LA MEMBRANE DU RS

Il est maintenant bien connu que l'imposition d'un potentiel négatif intraréticulaire augmente et par contre un potentiel positif diminue la vitesse de prise de Ca dépendant de l'activité de l'ATPase calcique (ZIMNIAK et RACKER, 1978 ; BEELER, 1980). Ces observations impliquent que le transport de Ca est électrogénique et qu'en cela il crée un potentiel membranaire positif interne. Les indicateurs optiques sensibles aux variations de potentiel, indiquent en effet que la prise de Ca crée un potentiel de 15 à 30 mV environ (BEELER et al., 1981 ; MARTONOSI, 1981). Cette faible valeur contraste cependant avec celle calculé par OETLIKER (1982) qui serait de 135 mV en ce qui concerne les fibres musculaires squelettiques de grenouille. Même en présence d'anions peu perméants, le potentiel serait rapidement dissipé (BEELER et al., 1981) du fait de l'existence d'une forte perméabilité du RS aux ions K^+ , Cl^- et H^+ (DUGGAN et MARTONOSI, 1970 ; JILKA et al., 1975 ; MCKINLEY et MEISSNER, 1977 ; 1978 ; KASAI et al., 1979 ; MEISSNER et YOUNG, 1980 ; RACKER et al., 1980 ; KASAI, 1981 ; KASAI et TAGUCHI, 1981 ; YAMAMOTO et KASAI, 1981, 1982 a et b ; CARLEY et RACKER 1982 ; MILLER, 1982). A l'appui de ce dernier résultat, ZIMNIAK et RACKER (1978) observent que le potentiel de membrane est stable pour les vésicules reconstituées à partir uniquement de l'ATPase calcique, comme constituant protéique, et de phospholipides. De même il peut être déduit que le potentiel membranaire de vésicules de RS, créé durant le transport de Ca représente une proportion, faible de la valeur théorique calculée à partir d'une valeur de capacité membranaire de $1 \mu F.cm^{-2}$ et d'un transfert de 4 charges positives (2 ions Ca^{2+}) par molécule d'ATP hydrolysée. Du fait d'une haute perméabilité aux cations et aux anions, le flux actif de Ca est compensé par un contre flux ionique d'anions et de cations (DUGGAN et MATONOSI, 1970 ; MARTONOSI, 1972). CARVALHO (1968) CARVALHO

et LEO (1967), MEISSNER (1981) et HAYNES (1982) observent, en effet durant la prise de Ca par le RS la compensation de la variation de potentiel par les mouvements d'ions H^+ , Cl^- et K^+ ..

Ainsi dans nos conditions expérimentales (voir page) sur des vésicules de RS isolé de fibres squelettiques de crabe, divers valeurs de potentiel sont "imposées" par variations des concentrations de K et de Cl extraréticulaires à produit $K.Cl$ constant. En maintenant le produit $[K] [Cl]$ constant, et limiter voire éviter l'effet de la pression osmotique, le milieu intraréticulaire est toujours positif par rapport au milieu extraréticulaire, ce dernier est équivalent au milieu intracellulaire. Cette positivité du milieu intraréticulaire est inverse de celle réalisée par de nombreux auteurs dans des conditions similaires de potentiel "imposé" (BEELER, 1980 ; MEISSNER, 1981).

L'ensemble des résultats amène à conclure que la prise et la libération de Ca seraient modifiées, dans les conditions physiologiques, par le potentiel membranaire. De plus la capacité de charge du réticulum sarcoplasmique en Ca serait dépendante de la polarisation membranaire. L'augmentation de cette capacité de charge sous l'effet d'une dépolarisation peut s'expliquer en terme d'augmentation de l'affinité ou/et du nombre de sites de fixation de Ca. Quant à l'augmentation de la fuite de Ca du RS sous l'effet d'une dépolarisation, elle peut être interprétée en considérant qu'il existe dans la membrane du RS des canaux calciques dépendant du voltage. Le fonctionnement de ces canaux pourrait être modulé par des substances telles que la caféine, la forskoline, l' AMP_c ou l'AMP.

1. Effets du potentiel de membrane du RS sur le transport actif du Ca dépendant de l'hydrolyse de l'ATP :

La prise de calcium par le RS est appréhendée par l'intermédiaire de la diminution de la concentration de Ca du milieu extraréticulaire, $[Ca]_{er}$. Les résultats obtenus sont résumés par les courbes de la figure 32, 3 lots

de vésicules correspondants à $20 \cdot 10^{-3}$ mg de protéine sont dilués dans 1ml de milieu extraréticulaire, A ($E_K = E_{Cl} = 80$ mV) ; B ($E_K = E_{Cl} = 40$ mV) et C ($E_K = E_{Cl} = 0$ mV) entraînant une positivité intraréticulaire par rapport au milieu extraréticulaire. Avant que les vésicules soient placées dans le milieu A, B ou C, elles sont préalablement reprises dans le milieu A pendant 30 secondes. Pendant ce temps les vésicules initialement chargées en Ca le libèrent probablement selon le mécanisme de CICR puisque après 30 sec la $[Ca]_{er}$ est de $200 \mu M$ dans le milieu A, B et C. Cette quantité de Ca ne peut provenir que des vésicules dans la mesure où d'une part ces dernières sont initialement refermées sur un milieu riche en Ca ($[Ca]_{ir} = 10$ mM) et où d'autre part la concentration de Ca dans les 3 milieux de polarisation est de l'ordre de 8 à $10 \mu M$. Cette concentration de Ca est largement suffisante pour induire la libération du Ca du réticulum (voir ci-dessus l'effet de $[Ca]_{er}$ sur le mécanisme de CICR, page). Par ailleurs il est connu que plus la $[Ca]_{ir}$ est élevée moins de Ca est nécessaire dans le milieu extravésiculaire pour induire le mécanisme de libération de Ca (ENDO et al., 1970 ; FORD et PODOLSKY, 1970). Cette forte fuite initiale est ensuite inhibée et un mouvement net entrant de Ca peut alors être observé. Ce mouvement net entrant est le résultat de l'inactivation de canaux calciques qui interviendraient dans le mécanisme de CICR (FABIATO, 1983) et du maintien d'une activité faible de l'ATPase calcique en raison d'une forte $[Ca]_{er}$. En effet, la concentration de $200 \mu M$ de Ca est largement suffisante pour induire une diminution de l'activité ATPasique (ENDO, 1981), dans la mesure où pour des $[Ca]_{er}$ de $0,1$ à $1 \mu M$ le Ca stimule l'activité ATPasique alors que pour des concentrations supérieures à $10 \mu M$ le Ca est inhibiteur (INESI et al., 1967 ; INESI, 1971 ; SCHUURMANS et BONTIG, 1981).

Bien que la prise de Ca au cours du temps soit bien plus faible que dans les conditions physiologiques normales, elle présente cependant l'avantage de pouvoir être mesurée très précisément dans les trois conditions



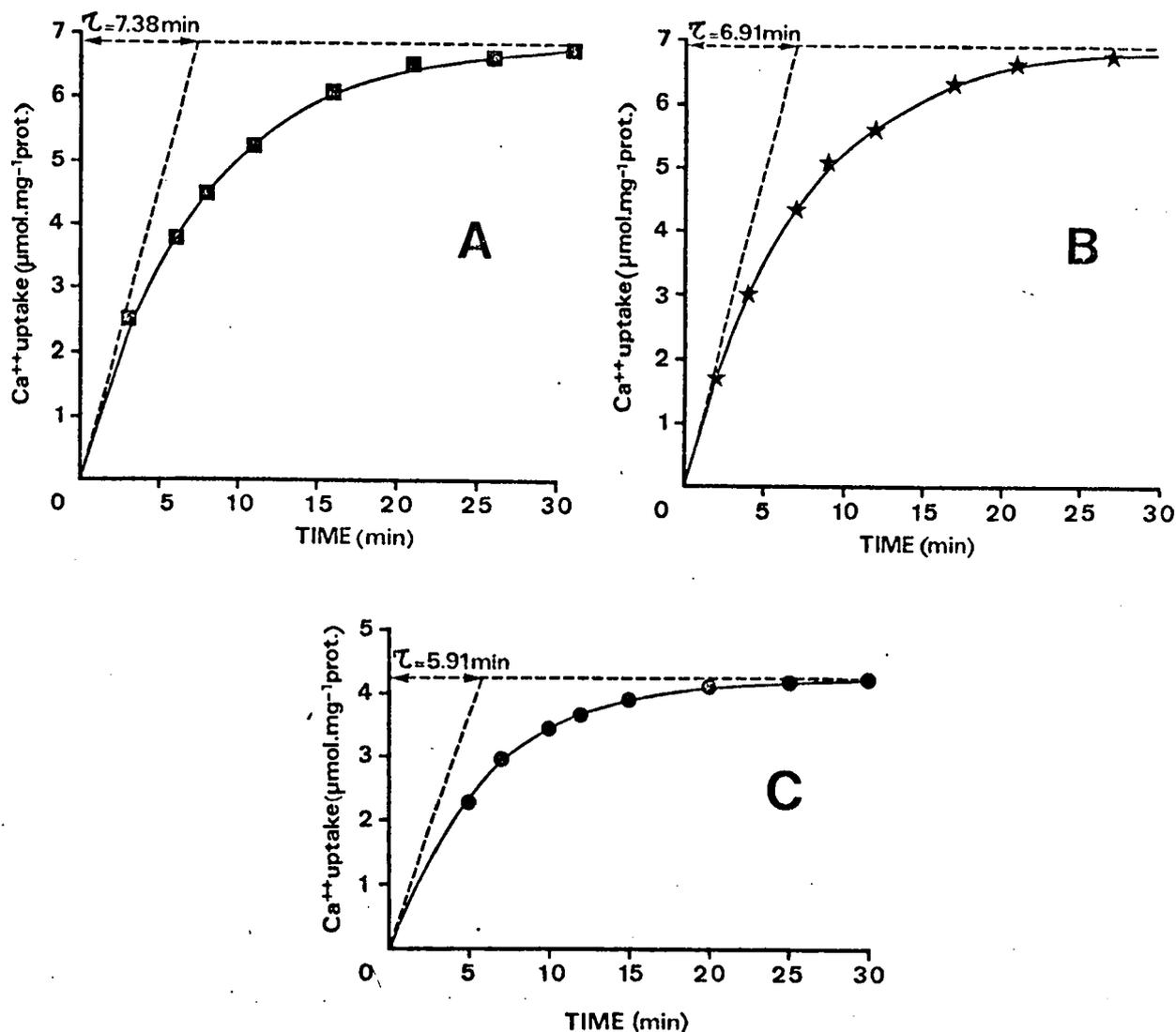


Figure 32 :

Prise active de Ca par le RS déterminée par l'intermédiaire de la mesure de la $[Ca]_{er}$ à l'aide d'un indicateur métallochromique (L'arsenazo III) ; la lecture s'effectue à 660 nm. Les VRSI ($0,02 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont placées dans trois milieux de polarisation à 20°C (A : $E_K = E_{Cl} = 80 \text{ mV}$ et courbe correspondante ■ B = $E_K = E_{Cl} = 40 \text{ mV}$, courbe ★ C : $E_K = E_{Cl} = 0 \text{ mV}$, courbe ●). La prise de Ca, dans les trois cas diminue exponentiellement avec le temps ; la constante de temps de charge étant sensiblement la même alors que la capacité de charge diminue significativement pour A, B ou C.

expérimentales A, B et C dans la mesure où le temps de charge est augmenté et la fuite très faible par rapport à la prise.

La courbe A de la figure 32 montre que la vitesse de prise de Ca décroît exponentiellement avec le temps puisque la relation liant la charge (exprimée par $\mu\text{mole de Ca.mg}^{-1}$ de protéine) au temps est de la forme : $(1 - e^{-t/\tau})$ Comme il peut être observé, avec une forte polarisation (milieu A) ("imposée par les gradients aux ions K^+ et Cl^- à produit $\text{Cl.K} = \text{constant}$) la vitesse initiale de prise de calcium est de $0,93 \mu\text{mole.mg}^{-1}$ de protéine. min^{-1} (soit $6,85 \mu\text{moles}/\tau$). Comme il est généralement admis que les ions Ca^{2+} sont transportés du milieu extraréticulaire vers le milieu intraréticulaire contre un fort gradient de concentration, à raison de 2 ions Ca^{2+} transportés par mole d'ATP hydrolysée, cela conduit à une vitesse d'hydrolyse de $0,46 \mu\text{mole.mg}^{-1}$ protéine. min^{-1} . Cette vitesse est extrêmement faible comparée à celle donnée par MAKINOSE (1969). En effet dans les conditions de stimulation maximale de l'ATPase à pH : 6,8 la valeur qu'il donne est de $8 \mu\text{moles.min}^{-1}$. Ainsi dans nos conditions expérimentales la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP ne correspondrait qu'à 5 % environ de la valeur maximale.

Les effets concernant les deux autres milieux de polarisation révèlent que la constante de temps correspondant à la prise de Ca est sensiblement la même (pour A : 7,38 min, B = 6,91 min et C = 5,91 min ; la moyenne étant de 6,7 min). Ainsi puisque cette constante ne semble pas être modifiée par la polarisation membranaire ; alors qu'à l'inverse cette polarisation influence la capacité maximale de charge du RS, cela montre que la vitesse initiale de prise de Ca par le RS à même $[\text{Ca}]_{\text{er}}$ est dépendante de la polarisation ; la diminution de la polarisation membranaire entraînant une baisse de la vitesse de prise de Ca. En effet pour les milieux A et B, la charge maximale de Ca est respectivement $6,85$ et $6,9 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine alors qu'elle n'est que de $4,25 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine pour le milieu C. Dans ces conditions,

puisque la vitesse initiale de prise de Ca est égale à la valeur de charge maximale divisée par τ cela donne pour les milieux A, B et C (correspondant aux potentiels $E_K = E_{Cl}$ de 80, 40 et 0 mV) les valeurs respectivement de $0,93 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot} \cdot \text{min}^{-1}$; $1 \mu\text{mole} \cdot \text{mg} \text{prot} \cdot \text{min}^{-1}$ et $0,7 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot} \cdot \text{min}^{-1}$.

En résumé, ces résultats relatifs à la prise de Ca par le RS semblent montrer: i) qu'il existerait le mécanisme de CICR au niveau des VRSI de crabe. La fixation des ions Ca^{2+} au niveau des sites de faible affinité localisés à la face myoplasmique de la membrane du RS (HASSELBACH et KOENIG, 1980) rendrait compte de l'inactivation des canaux calciques comme le sont les canaux calciques des membranes excitables (voir HAGIWARA et BYERLY, 1981 ; ECKERT et CHAD, 1984) ; ii) que la vitesse initiale de prise de calcium dépendrait de la polarisation membranaire du RS ; iii) que la capacité maximale de charge du RS diminuerait sous l'effet d'une "dépoléarisation membranaire".

2. Effets de la polarisation sur la libération de Ca :

Cette fuite de Ca est étudiée après avoir bloqué la prise de Ca par le vanadate à la concentration de $100 \mu\text{M}$ (puisque'il est connu qu'une concentration de vanadate de $10 \mu\text{M}$ réduit de moitié l'activité de l'ATPase de transport de Ca ONEAL et al., 1979). $1 \mu\text{l}$ d'une solution de vanadate de $0,1 \text{ M}$ est ajouté à $0,999 \text{ ml}$ de chaque milieu de réaction A, B ou C contenant les VRSI.

La figure 33 montre l'évolution au cours du temps de la libération de Ca dans les trois conditions de polarisation (A, B et C). La courbe A montre que sur une période de 30 min, la libération de Ca varie linéairement avec le temps. Cette variation linéaire durant 30 min indique que probablement le gradient électrochimique des ions Ca^{2+} ne varie sensiblement pas. La valeur de ce gradient ne peut cependant être évaluée dans la mesure où l'on ne peut déterminer précisément, dans nos conditions expérimentales, le rapport de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} sur celle aux ions K^+ ,

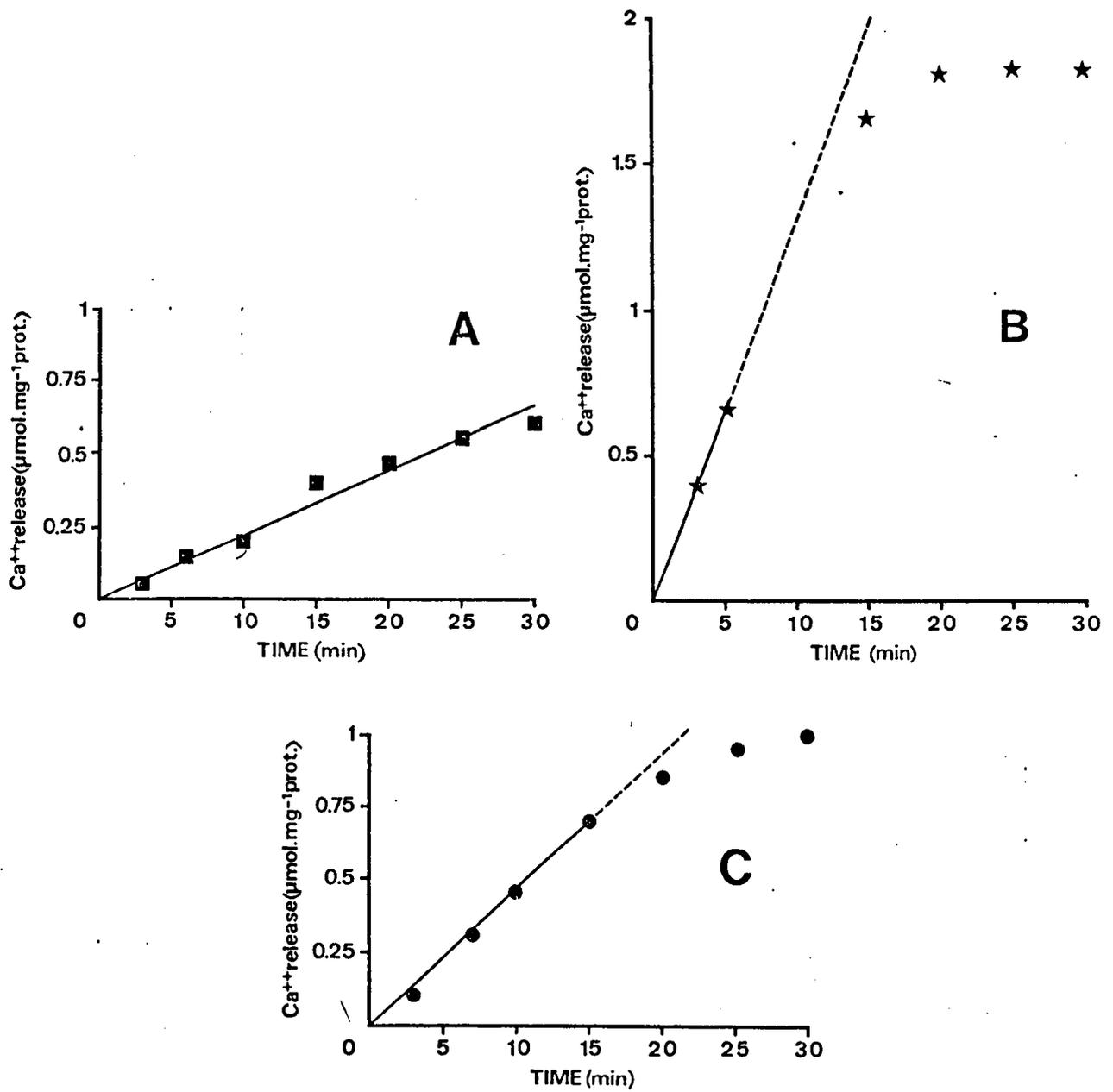


Figure 33 :

Libération de Ca en fonction du temps à partir des VRSI chargées préalablement durant 30 minutes (figure 32). Une fois la prise nette maximale atteinte, 1μM d'une solution de vanadate à forte concentration est additionné au milieu de réaction (1 ml) (concentration finale égale à 100 μM). La vitesse initiale de libération de Ca dépend de la polarisation membranaire (pour A, $E_K = E_{Cl} = 80$ mV ; courbe ■ elle est de $0,93 \mu\text{mole.mg}^{-1} \cdot \text{prot.min}^{-1}$; pour B, $E_K = E_{Cl} = 40$ mV, courbe ★ de $1 \mu\text{mole.mg}^{-1} \cdot \text{prot.min}^{-1}$; pour C = $E_K = E_{Cl} = 0$ mV, courbe ● de $0,7 \mu\text{mole.mg}^{-1} \cdot \text{prot.min}^{-1}$).

Cl^- et H^+ . En effet, la pile aux ions Ca^{2+} (E_{Ca}) est opposée à celle aux ions K^+ et Cl^- (E_{K} et E_{Cl}). La vitesse de la libération de Ca correspondant aux vésicules placées dans le milieu A ($E_{\text{K}} = E_{\text{Cl}} = 80 \text{ mV}$) est faible, elle n'est que de $0,023 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$; cette valeur, comme cela a été précisé ci-dessus, est bien plus que celle correspondant à la prise qui dans les mêmes conditions de polarisation atteint $0,92 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$ (figure 32). Dans ces conditions, en dépit d'un fort gradient électrochimique favorable à la sortie de Ca, la fuite variant linéairement au cours du temps (30 min), témoigne d'une faible perméabilité membranaire aux ions Ca^{2+} du RS isolé.

Dans les conditions où le potentiel "imposé" est de moindre amplitude (courbe B figure 33) la fuite de Ca ne varie plus, sur une période de 30 min, linéairement en fonction du temps, puisque la vitesse de fuite diminue après 15 min. Cependant la vitesse initiale de sortie est très augmentée ($0,13 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$) par rapport aux conditions précédentes ($0,023 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$). Cette importante vitesse de fuite initiale qui diminue est explicable; en effet l'important accroissement de la $[\text{Ca}]_{\text{er}}$ conduirait à une diminution du gradient électrochimique des ions Ca^{2+} . Il est de plus important de souligner que la vitesse de fuite est très augmentée en dépit d'un gradient électrochimique pour les ions Ca^{2+} , plus faible que dans les conditions précédentes (A; $E_{\text{K}} = E_{\text{Cl}} = 80 \text{ mV}$); ceci témoigne donc d'un accroissement de la conductance membranaire aux ions Ca^{2+} .

Enfin en absence de polarisation produite par les ions K^+ et Cl^- (courbe C figure 33; milieu C, $E_{\text{K}} = E_{\text{Cl}} = 0 \text{ mV}$) et donc d'un gradient électrochimique pour les ions Ca^{2+} très petit, la vitesse initiale atteint cependant $0,045 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$; cette valeur est bien plus faible que la vitesse initiale de prise correspondante ($0,7 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot.} \cdot \text{min}^{-1}$).

Dans ces trois conditions expérimentales (milieux A, B et C) en absence du mécanisme de CICR, la polarisation de la membrane réticulaire jouerait

un rôle important dans l'activation de canaux calciques. l'ouverture de ces canaux dépendrait donc du voltage ; quant à leur fermeture, elle correspondrait à une désactivation dans la mesure où sur une longue période, la fuite de Ca varie linéairement avec le temps. Ces canaux sont à différencier de ceux qui interviennent dans le mécanisme de CICR décrits par FABIATO (1983) et de ceux décrits par YAMAMOTO et KASAI (1982 a et b) au niveau des VRSI de lapin.

Ainsi, les canaux calciques, responsables de la fuite de Ca observée dans nos conditions expérimentales pourraient correspondre à ceux décrits par FEHER et BRIGGS (1982) ; ces canaux n'étant pas affectés par l'ATP, le Mg ou les variations de température. Ces canaux seraient à différencier de ceux dont l'existence a été postulée du fait de leur fonctionnement très étroitement lié à l'activité de l'ATPase (SHAMOO et MCLENNAN, 1974). Il pourrait être aussi suggéré que la variation de vitesse de la libération de Ca par le RS au cours du temps, pourrait refléter, non une diminution importante de "driving force" pour les ions Ca^{2+} , mais l'existence de deux populations de vésicules comme cela a été supposé par SORENSON (1983). En effet, cet auteur suggère que les composantes rapide et lente de fuite de Ca du RS seraient dues à la présence de deux populations de VRSI dont les unes seraient 10 à 100 fois plus perméables aux ions Ca^{2+} que les autres. Cependant la séparation de ces deux types de vésicules correspondant aux vésicules HSR et LSR conduit toujours pour chaque lot à deux composantes de libération (FEHER et BRIGGS, 1982). En conclusion, la diminution de la vitesse de la libération de Ca des vésicules isolées de RS au cours du temps que nous observons, serait plutôt liée à une variation du gradient électrochimique aux ions Ca^{2+} . En effet si la vitesse initiale est faible (milieu A) la fuite est linéaire au cours du temps alors que pour une vitesse initiale bien plus grande (milieu B) cette vitesse diminue secondairement.

En résumé, les résultats, relatifs à la fuite de Ca montrent que la création d'un potentiel de part et d'autre de la membrane du RS est de nature à supposer, tout au moins sur ces vésicules de RS isolé, l'existence d'un mécanisme de type "depolarization induced Ca^{2+} release" sans pour autant exclure le mécanisme de "Ca induced Ca release" qui, dans nos conditions expérimentales deviendrait vite inopérant du fait d'un accroissement rapide de la concentration de Ca du milieu extraréticulaire (FABIATO, 1983). En effet, la libération autocatalytique de Ca est produite semble-t-il au moment où les VRSI contenant un milieu riche en Ca (100 mM) dans le culot de centrifugation sont diluées dans le milieu de polarisation (milieu A ; $E_K = E_{Cl} = 80$ mV) contenant peu de Ca ($[\text{Ca}^{2+}]_{er} = 1 \text{ à } 3 \mu\text{M}$). Ce mécanisme de type "CICR" serait par la suite inhibé selon le mécanisme hypothétique décrit par FABIATO (1983) : la fixation de Ca sur les sites de faible affinité décrits par HASSELBACH et KOENING (1980) ; sites localisés à la face myoplasmique de la membrane réticulaire entraînerait la fermeture des canaux calciques. Le pompage calcique observé au cours du temps (figure 32) rend compte d'une diminution importante voire d'une abolition complète du mécanisme de CICR.

En évaluant la diminution ou l'augmentation de la concentration de Ca d'un petit volume constant (1 ml) de milieu extraréticulaire à l'aide d'un indicateur métallochromique, l'arsenazo III, en fonction de la polarisation de la membrane du RS induite par des gradients de K et Cl à produit KCl constant, nous observons : i) que la constante de charge du RS en Ca (6,5 min en moyenne) est indépendante de la polarisation membranaire, E_m (E_m est égal au potentiel intraréticulaire moins le potentiel extraréticulaire) ; trois valeurs de E_m ayant été testées correspondant à $E_K = E_{Cl} = 80$ mV, 40 mV ou 0 mV ; ii) que la quantité de Ca pompé par le RS est d'autant plus importante que la polarisation est plus forte en dépit d'un gradient électrique défavorable. iii) que la sortie de Ca après charge des vésicules

en Ca est d'autant plus rapide que la polarisation est plus faible. L'étude de la fuite de Ca est bien sûr faite en présence de vanadate de façon à bloquer l'ATPase dépendant du Ca.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs. En particulier, DUX et MARTONOSI (1983 a) montrent que la cristallisation de l'ATPase calcique du RS apparaît en présence de vanadate. L'inhibition de l'ATPase ainsi produite est expliquée par la fixation du vanadate sur l'enzyme. Cette fixation permet la formation du complexe enzyme-vanadate qui s'accumule et s'accompagne de l'inhibition enzymatique. A un certain niveau de concentration calcique suffisante pour saturer les sites calciques de haute affinité (COHEN et SELINGER, 1969 ; CHEVALLIER et BUTOW, 1971 ; FIHN et NIGALA, 1971), le calcium empêche la formation des cristaux de complexe et même "clive" les cristaux formés antérieurement (DUX et MARTONOSI, 1983 a). De plus, ces auteurs montrent qu'un potentiel de membrane "imposé" négatif retarde et qu'un potentiel positif accélère la cristallisation de l'ATPase calcique ; indiquant un effet certain du potentiel de membrane sur la conformation de l'enzyme (DUX et MARTONOSI, 1983 b). Enfin MARTONOSI (1984) rappelle que la pompe calcique du RS, capable de maintenir un gradient calcique de 1000 fois ou plus à travers la membrane réticulaire, permet un stockage de Ca qui peut atteindre 7 à 8 $\mu\text{moles de Ca} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine dans les conditions de stimulation maximale (saturation physique de l'espace interne en Ca). Cette valeur est proche de celles évaluées dans ce travail : 6,85 ; 6,90 et 4,25 $\mu\text{moles} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine $\cdot \text{min}^{-1}$ pour les milieux A, B et C respectivement. Ainsi, le potentiel de membrane du RS pourrait jouer un rôle important dans la libération de Ca lors du couplage excitation-contraction en diminuant la capacité de charge du RS suite à une "dépolariation".

L'hypothèse de la libération de Ca par dépolariation membranaire se trouve également étayée par de nombreuses expériences. En particulier,

MIYAMOTO et RACKER (1982) observent que la libération de Ca induite par la caféine à partir de vésicules "lourdes" (HSR) est partiellement inhibée par la valinomycine dont les effets se traduisent par une augmentation de la polarisation de la membrane du réticulum dans le sens d'une "hyperpolarisation" ; l'intérieur des vésicules devenant positif. De plus un certain degré d'inhibition du mécanisme de CICR par la valinomycine est aussi observée en présence de $1 \mu\text{moles.l}^{-1}$ de rouge de ruthénium connu pour bloquer la prise de Ca. MIYAMOTO et RACKER (1982) en se basant sur ces faits expérimentaux proposent la séquence des événements suivants : i) le Ca créerait un potentiel négatif intraréticulaire (l'équivalent d'une dépolarisation) ; ii) cette "dépolarisation" permet l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage qui entraînerait une libération des ions Ca^{2+} ; iii) une augmentation du contenu des citernes terminales en K^+ induite par la libération de Ca (DUX et MARTONOSI ; 1983 b ; MIYAMOTO et RACKER, 1982) ; les ions K^+ passeraient par les canaux au K décrits par DUX et MARTONOSI (1983 a). De plus MIYAMOTO et RACKER (1982) montrent que la création d'un potentiel négatif intraréticulaire par gradient de Cl ou K provoque une libération de Ca par les étapes i et ii) de leur mécanisme séquentiel décrit cidessus. Cette hypothèse permet de bien expliquer nos résultats puisque la diminution de potentiel de membrane réticulaire accroît la fuite de Ca (figure 33). Cependant ENDO et al. (1981) observent une inhibition de la libération de Ca induite par la caféine de vésicules ayant un potentiel interne négatif bien que d'autres auteurs ne montrent aucune relation entre le potentiel imposé par le gradient ionique et la vitesse ou l'importance de la libération de Ca des VRSI (BEELER et al., 1979 ; MEISSNER et MCKINLEY, 1976).

D'autres travaux effectués sur les fibres musculaires pelées permettent de proposer également que la polarisation du RS intervient sur le mécanisme de la libération de Ca. En effet durant l'accumulation du Ca sur le RS de fibres musculaires pelées cardiaques les changements de fluorescences de

merocyanine 540 (excitation 540 nm, emission 580 nm) et les changements d'absorbance de NK ou di-SC3 (670 - 700 nm) indiquent une hyperpolarisation c'est à dire que l'intérieur du RS peut devenir positif par rapport à l'extérieur (FABIATO, 1981 ; 1982) ; ceci étant en accord avec la nature électrogène du transport actif de Ca (BEELER, 1980 ; BEELER et al., 1981 ; ZIMNIAK et RACKER, 1978). En effet, lorsque la concentration calcique augmentée, passe à $3.10^{-7}M$, il s'ensuit une libération de Ca selon le mécanisme de CICR accompagné par une large fluorescence et un changement d'absorbance des indicateurs de potentiel. Comme le précise FABIATO (1981, 1982) le sens de ces variations suggère une dépolarisation de la membrane du RS. Ces faits expérimentaux indiquent que le mécanisme de CICR est électrogénique, et qu'il produit aussi une nouvelle distribution de charges de part et d'autres de la membrane réticulaire.

B - MODULATION DES CANAUX CALCIQUES DE LA MEMBRANE RETICULAIRE PAR LES SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES

1. Effets de la caféine

La caféine est une méthylxantine largement utilisée dans l'étude du rôle du RS dans le couplage excitation-contraction. Il est bien connu qu'elle entraîne de fortes contractures des fibres musculaires en ne dépolarisant la membrane que de quelques mV (AXELSSON et THESLEFF, 1958 ; LUTTGAN et OETLIKER, 1968) ; en dépit d'une absence de dépolarisation elle induit cependant une forte libération des ions Ca^{2+} du RS (WEBER, 1968 ; WEBER et HERTZ, 1968). Au niveau du RS des fibres cardiaques ventriculaires, LANGER et al. (1983) observent que cette substance, même à forte concentration (10 à 20 mM) n'induit pas de contracture et n'altère pas la prise de Ca par l'ATPase calcique. La libération de Ca par la caféine étant observée uniquement lorsque la $[Ca]_{er}$ est augmentée (LANGER et al., 1983 ; FINTEL et al., 1984) ou en présence de nucléotides aussi bien au niveau du RS des

fibres musculaires pelées qu'au niveau des VRSI (ENDO, 1975 ; 1981 ; ENDO et al., 1981 ; KIRINO et al., 1983 ; NAGASAKI et KASAI, 1983). L'explication donnée par ces auteurs est la suivante : la caféine entraîne simplement une augmentation de la sensibilité du mécanisme de CICR vis à vis des ions Ca^{2+} . En effet, l'augmentation de l'affinité apparente des sites vis à vis des ions Ca^{2+} en présence de 50 mM de caféine est multipliée par 20. Le seuil de concentration calcique nécessaire pour induire la libération de Ca est dans ce cas réduit à 3 μM (MARTONOSI, 1983).

Les vésicules de type "HSR" sont seules sensibles à la caféine, ce qui permet de proposer l'hypothèse selon laquelle cette drogue agit sélectivement au niveau du RS jonctionnel, jonction STT-RS, (voir MARTONOSI, 1984). A l'inverse pour MORII et TONOMURA (1983) aucun effet de la caféine n'est observé sur les VRSI ; ce résultat négatif laisse supposer que, probablement la caféine agit donc au niveau d'une structure labile, vraisemblablement la jonction RS-STT.

Enfin certains travaux effectués sur les fibres musculaires cardiaques montrent que cette drogue à faible concentration inhibe l'activité des phosphodiesterases et de ce fait empêche la dégradation de l' AMP_c permettant ainsi la phosphorylation des canaux calciques. A la lumière de ces résultats, il peut être supposé que la caféine augmente la libération de Ca du RS par le biais d'une augmentation du taux d' AMP_c (Figure 37).

Dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire dans les trois conditions de polarisation imposée ($E_K = E_{Cl} = 80, 40$ ou 0 mV) l'effet de la caféine à la concentration de 5 mM est étudié sur la libération de Ca de VRSI chargées en Ca. Les courbes de la figure 34 résument les résultats obtenus. Il faut mentionner que les 3 paires de courbes de la figure correspondant aux 3 milieux A, B ou C, ne peuvent être comparées entre elles puisqu'elles correspondent chacune à un lot de VRSI. Pour une forte polarisation du RS (milieu A), la fuite de Ca qui varie linéairement avec le temps

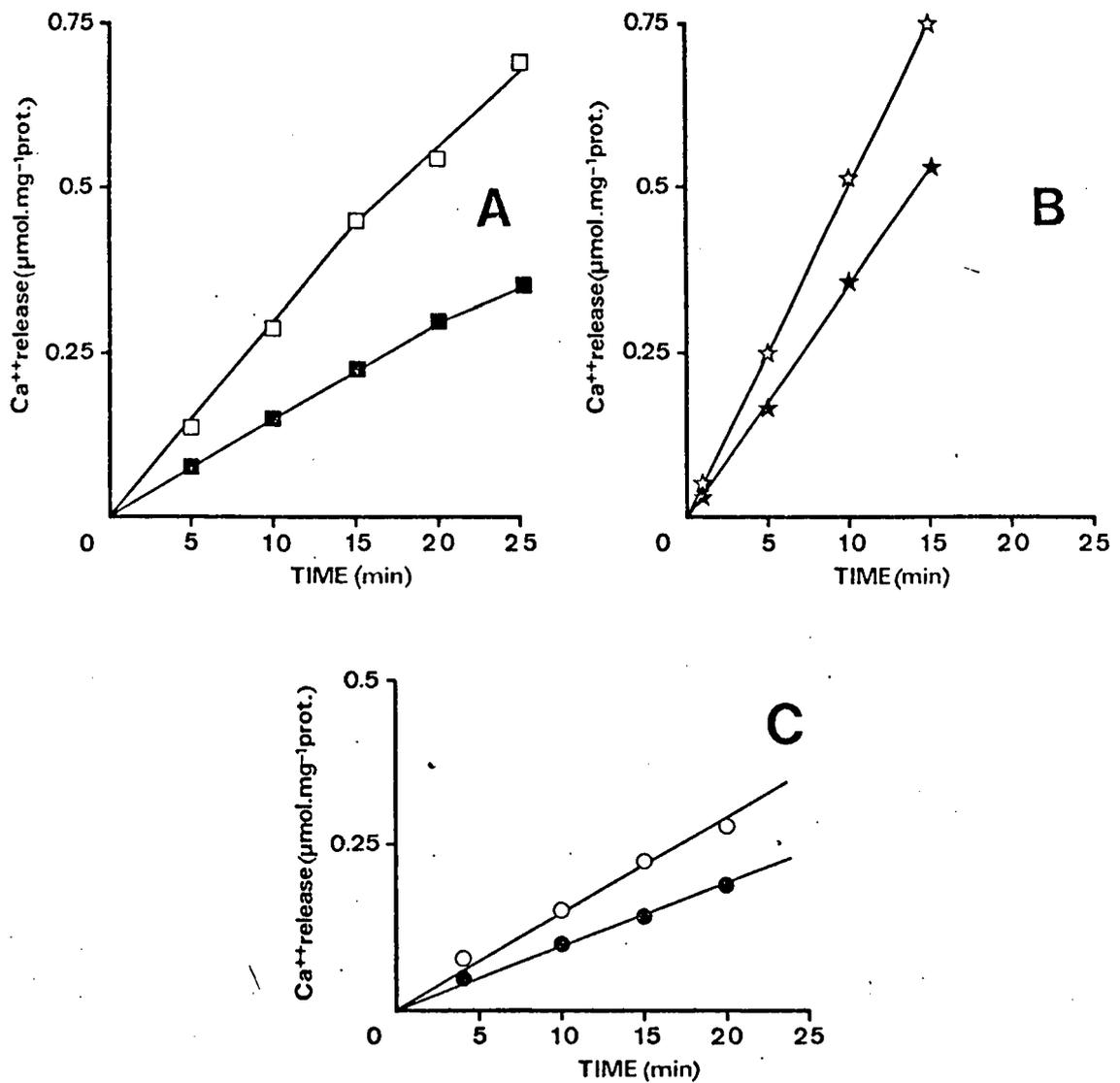


Figure 34 :

Effets de la caféine (5 mM) sur la libération au cours des temps de Ca en fonction de la polarisation membranaire en absence (A, $E_K = E_{Cl} = 80 \text{ mV}$, ■; B, $E_K = E_{Cl} = 40 \text{ mV}$, ★; C, $E_K = E_{Cl} = 0 \text{ mV}$, ●) et en présence de 5 mM de caféine (A, □; B, ☆; C, ○). L'effet de la caféine dépend de la polarisation membranaire, l'augmentation de la vitesse de libération de Ca et d'autant plus grande que la polarisation est plus ample.

pour la période de temps considérée (20 min) double pratiquement en présence de caféine. Pour une polarisation plus faible (milieu B ; $E_K = 40$ mV) la caféine augmente encore la vitesse de fuite de calcium par le RS mais à un degré moindre (seulement 33 % d'augmentation). En absence de polarisation (milieu C) la vitesse de fuite est encore augmentée mais de 30 % seulement.

Ces résultats impliquent donc une augmentation du temps d'ouverture ou/et du nombre des canaux calciques dépendant du voltage sous l'effet de la caféine. En effet, au niveau du myocarde les méthylxanthines (Fig. 36) entrant dans la cellule, via la membrane sarcolemmique, inhibent la phosphodiestérase, enzyme connu pour intervenir dans la destruction de l' AMP_C . En présence de caféine l'élévation du taux d' AMP_C cytoplasmique entraîne une augmentation du nombre de canaux calciques fonctionnels et/ou le temps de leur ouverture (SPERLAKIS, 1984). Par ailleurs les nucléotides augmentent la vitesse du mécanisme de CICR sans changer l'affinité des canaux calciques vis à vis des ions Ca^{2+} (ENDO et al., 1981). Les effets de l'ATP et de la caféine sont additifs suggérant que ces substances agissent sur des sites différents (ENDO, 1981 ; NAGASAKI et KASAI, 1983). Cependant, la caféine n'exercerait aucun effet sur le mécanisme de CICR selon MORII et TONOMURA (1983) ; cette absence d'effet au niveau d'un seul canal peut être expliquée en supposant que, dans les conditions normales, la caféine agirait donc en permettant un recrutement supplémentaire de canaux calciques au niveau de la membrane du RS. Cette interprétation va dans le sens de nos résultats, ils permettent de montrer que la caféine augmenterait le recrutement de canaux calciques dont l'activation dépendrait du voltage.

2. Effets de la procaïne

De nombreux travaux montrent que la procaïne et la tetracaïne inhibent la libération du Ca du RS induite par la caféine et ceci de façon compétitive. En effet les anesthésiques locaux inhibent la libération de Ca aussi bien sur les fibres pelées (FORD et PODOLSKY, 1970 ; OGAWA et EBASHI, 1976 ;



ENDO, 1977, 1981) que sur les VRSI (KIRINO et SHIMIZU, 1982, MORII et TONOMURA, 1983). Cette libération de Ca étant induite aussi bien par la caféine que par le Ca ou par absence de Mg dans le milieu extraréticulaire. Par ailleurs, bien que la procaïne bloque les contractures caféiniques et le mécanisme de CICR, elle ne modifie pas cependant la relation liant la tension mécanique à la dépolarisation de la fibre musculaire (HEILSTRACHER et HUNT, 1969 ; THORENS et ENDO, 1975). De ce fait puisque une libération de Ca sous l'effet de la dépolarisation peut être produite même en présence de ces anesthésiques locaux (voir ALMERS et BEST, 1976 ; ENDO, 1977 ; CAPUTO, 1978) cela laisse supposer que le mécanisme de CICR ne peut être qu'un élément dans les événements du couplage excitation-contraction.

Au niveau des vésicules de RS isolé (VRSI), la caféine augmente l'affinité des sites au calcium d'environ 25 %, sites présentant d'ailleurs une coopérativité positive, le coefficient de HILL étant de 4 (YAMAMOTO et KASAI, 1982 a). Ces sites sont différents de ceux qui interviendraient dans le mécanisme du "Ca induced Ca release" (CICR) puisqu'ils seraient présents au niveau des différentes VRSI (HSR et LSR) (voir LABARCA et al., 1980). De plus, les canaux calciques ouverts normalement par le Ca ou la caféine ne sont pas sensibles à la procaïne dans la mesure où ils n'ont pas été au préalable activés (YAMAMOTO et al., 1979 ; YAMAMOTO et KASAI, 1982 c). En effet l'inhibition de la libération de Ca par la procaïne dépend de la présence de la caféine ou de calcium dans le milieu extraréticulaire (YAMAMOTO et KASAI, 1982 c).

La figure 35 illustre les résultats obtenus sur un lot de VRSI placé préalablement dans nos conditions de polarisation de référence correspondant au milieu A ($E_K = E_{Cl} = 80$ mV) durant 30 minutes en présence d'ATP et de Mg. Ce temps permettant la charge maximale en Ca des vésicules ; Ca intraréticulaire préalablement libéré sous l'influence du mécanisme de CICR. Le lot

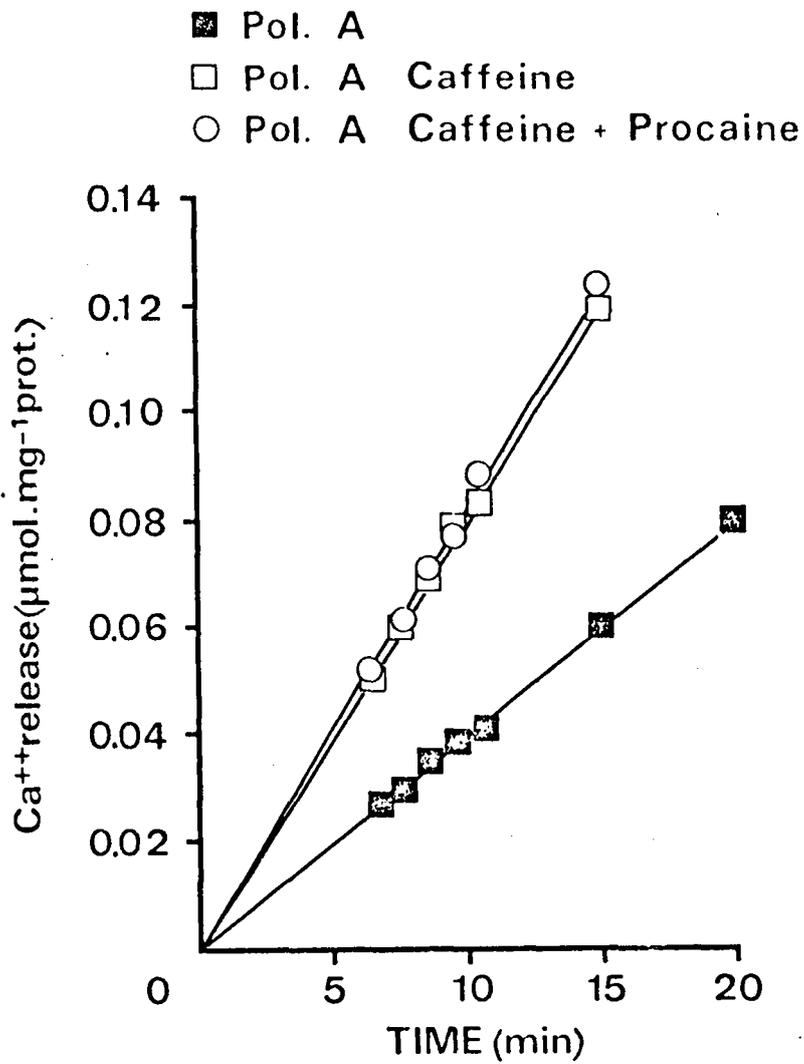


Figure 35 :

Augmentation de la fuite de Ca par la caféine (5 mM) et absence d'effet inhibiteur de la procaine sur la fuite calcique induite par la caféine.

de vésicules est alors séparé en 3 parts identiques (même quantité de protéines). Au premier lot est additionné le vanadate (0,1 μ mole/ml), au deuxième le vanadate (0,1 μ mole/ml) et la caféine (5 μ moles/ml) et au troisième le vanadate (0,1 μ mole/ml) la caféine (5 μ moles/ml) et la procaïne (5 μ moles/ml). En milieu vanadate la libération de Ca varie linéairement avec le temps au moins durant les 20 premières minutes. Cette libération est considérablement augmentée (100 p. 100 d'augmentation) en présence de caféine (5 mM) conformément aux résultats antérieurement décrits (fig. 34). Enfin l'addition de la procaïne au milieu contenant le vanadate et la caféine n'entraîne sensiblement pas de variation de libération de Ca par rapport au milieu ne renfermant que du vanadate et de la caféine. Ceci conduit à considérer que tout au moins dans nos conditions expérimentales, la procaïne n'exerce pas d'effet en dépit d'une possibilité d'inhibition de canaux qui seraient préalablement ouverts par la caféine comme le mentionnent de nombreux auteurs (YAMAMOTO et KASAI, 1982 c). Cette absence d'effet de la procaïne sur la libération de Ca va à l'encontre du résultat de YAMAMOTO et KASAI (1982 c) et de celui de SALAMA et ABRMSON (1984). Ces derniers auteurs observent un effet inhibiteur de la procaïne sur la libération de Ca induite par les ions Ag^+ au niveau des VRSI de muscle de lapin. L'absence d'effet de la procaïne dans nos conditions expérimentales et son effet inhibiteur sur la contraction des fibres musculaires observé par différents auteurs (HEILSTRACKER et HUNT, 1969 ; THORENS et ENDO, 1975), suggèrent que cet anesthésique agirait au niveau d'une structure labile pouvant correspondre à la jonction de couplage entre le STT et le RS. Cette hypothèse va dans le sens des résultats obtenus par certains auteurs en particulier par HUI (1983 a et b) qui observe que la tetracaïne agit spécifiquement au niveau de la jonction STT-RS en inhibant le mouvement d'un groupe de charges intramembranaires (Q_p) impliqué dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de grenouille (HUI, 1983 a et b).

3. Effets de l'AMP_c, l'AMP et la forskoline sur la libération de Ca

L'analyse de la cinétique du courant entrant de Ca (I_{Ca}), de la membrane sarcolemmique en fonction du potentiel en présence de substances stimulant, les cyclases intégrées au niveau membranaire, révèle que ni la relation courant-potentiel, ni le potentiel d'inversion de I_{Ca} ne sont modifiés ; seule la conductance maximale aux ions Ca^{2+} ($\overline{g_{Ca}}$), est fortement augmentée (REUTER et SCOLTZ, 1977). Cette augmentation de $\overline{g_{Ca}}$ est liée à une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux calciques pour un niveau déterminé du potentiel membranaire (REUTER, 1983). En effet, l'isoprénaline qui stimule l'adényl-cyclase, n'affecte pas l'amplitude du courant calcique, passant par un seul canal, mesuré à l'aide de la technique de "patch clamp", mais augmente sa probabilité d'ouverture (REUTER, 1983). Par ailleurs, d'autres travaux montrent que les effets physiologiques des substances activant les cyclases, interviendraient aussi en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux ; ces effets seraient liés à la phosphorylation des canaux ou des protéines régulatrices pouvant intervenir dans l'ouverture des canaux ioniques (REUTER et SCHOLTZ, 1977 ; REUTER, 1983 ; SPERLAKIS, 1984 - voir figure 36). Aussi, la phosphorylation des canaux est assurée par une protéine kinase dont l'activité dépend du taux d'AMP_c myoplasmique (voir revues ou travaux de, SULAKKE et ST LOUIS, 1976 ; WOLLENBERGER et WILL, 1978 ; TADA et KATZ, 1982 ; REUTER, 1983 ; ENGLAND, 1983 ; LAMERS, 1985). En effet, la phosphorylation par l'AMP_c d'une protéine membranaire spécifique, est observée parallèlement à une entrée de Ca dans les vésicules du sarcolemme isolé (RINALDI et al., 1982). Actuellement, certaines protéines kinases membranaires dont l'activité dépend du taux d'AMP_c, interviendraient par le biais d'unités catalytiques dans la phosphorylation des canaux calciques, unités catalytiques présentes aussi bien au niveau du sarcolemme (Lamers, 1985, voir figure 37) qu'au niveau de la membrane réticulaire (TADA et KATZ, 1982). Une unité catalytique (protéine de 9000 daltons) provenant de la protéine kinase membranaire

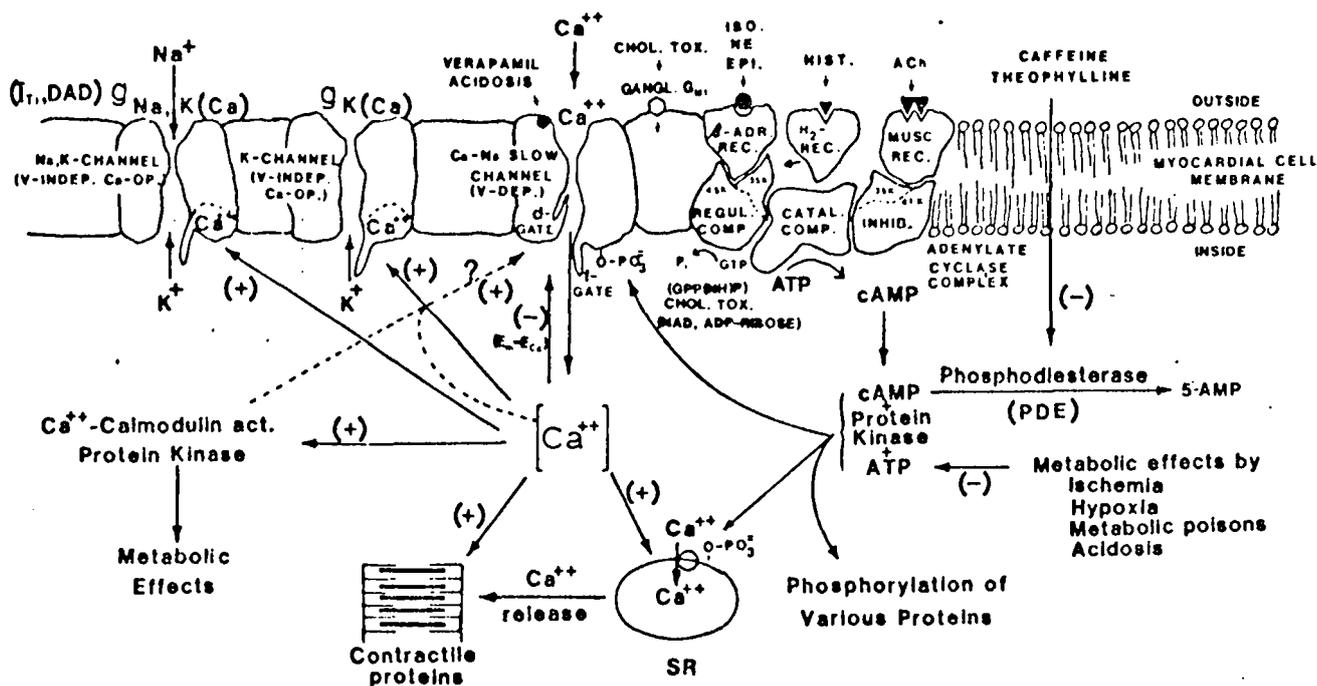


Figure 36 :

Description schématique des propriétés des canaux ioniques de la membrane de la cellule cardiaque impliquant le mode d'action des méthylxanthines telle que la caféine (inhibiteur des phosphodiesterases) d'après SPERLAKIS (1984). L'activation du complexe adénycyclasique stimule la production de l'AMPC. Cette AMPC permet la phosphorylation des canaux calciques qui peuvent ainsi s'ouvrir lors de la dépolarisation membranaire.

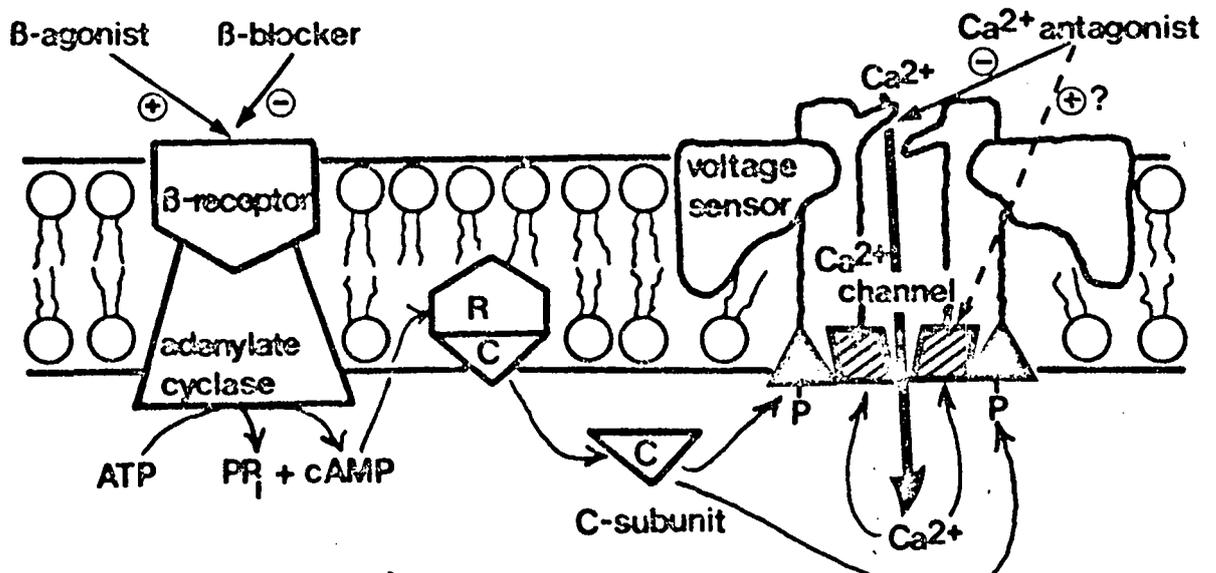


Figure 37 :

Schéma de fonctionnement de la régulation du canal calcique de la membrane sarcolemmique selon LAMERS (1985). R et C sont des unités catalytiques de la protéine Kinase dont l'activité dépend du taux d'AMPc. L'unité catalytique C permet la phosphorylation d'une protéine membranaire localisée au niveau du canal calcique.

a été décrite au niveau du sarcolemme (LAMERS, 1985) et au niveau de la membrane du RS (TADA et KATZ, 1982) ; il s'agit du phospholambane.

La modulation des canaux calciques de la membrane sarcolemmique par phosphorylation permet de supposer qu'un mécanisme équivalent peut être présent au niveau de la membrane réticulaire. Ainsi dans le but de déterminer les caractéristiques fonctionnelles de canaux calciques du RS, nous avons été conduits à étudier les effets éventuels de l'AMP_c et de l'AMP à différentes concentrations sur la fuite de Ca des VRSI dans les conditions de référence ($E_K = E_{Cl} = 80$ mV, milieu A) d'une part et ceux de la forskoline dans nos 3 conditions de polarisation (milieu A, B et C) d'autre part.

La figure 38, donne un exemple de courbes établies à partir de la mesure de la fuite de Ca des VRSI préalablement stockées durant 30 min dans le milieu de référence (milieu A). Une fois les vésicules chargées en Ca, elles sont subdivisées en 3 lots de même concentration, en protéines. Au premier est ajouté le milieu de référence (milieu A) contenant 0,1 μ mole/ml de vanadate ; au deuxième le milieu de référence contenant toujours 0,1 μ mole/ml de vanadate mais aussi 0,004 μ mole/ml d'AMP_c, au dernier le milieu de référence contenant, en plus du vanadate et de l'AMP_c à la même concentration que ci-dessus, l'AMP non cyclique (AMP) à raison de 0,004 μ mole/ml.

La courbe 38 montre que la fuite de calcium du RS durant 25 min varie linéairement avec le temps en absence de nucléotide monophosphate ; cette fuite n'est sensiblement pas modifiée par l'AMP_c à la concentration de 0,004 μ moles.ml⁻¹ alors que l'addition supplémentaire d'AMP à la même concentration, entraîne une nette diminution de la vitesse de fuite de Ca.

Ces résultats conduisent à proposer plusieurs interprétations :

i) l'absence d'effet de l'AMP_c à faible concentration (0,004 μ mole/ml) pouvait être due au fait qu'une cyclase membranaire pourrait permettre la formation d'AMP_c à concentration suffisante à partir de l'ATP présente dans le

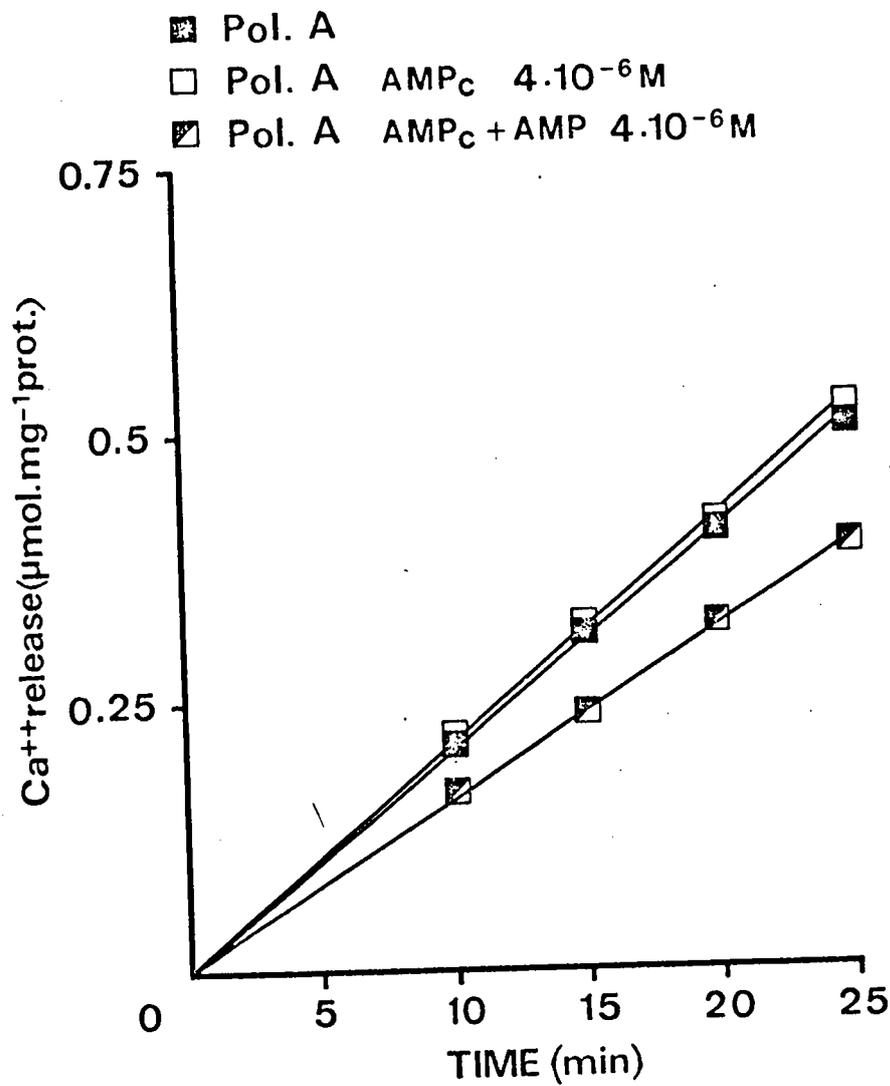


Figure 38 :

Effets de l'AMPc et de l'AMP sur la fuite de Ca, au cours du temps, des VRSI préalablement chargées dans le milieu de polarisation A ($E_K = E_{Cl} = 80$ mV). L'AMPc à la concentration de 4.10^{-6} M est sans effet alors que l'AMP à la même concentration diminue la fuite de Ca.

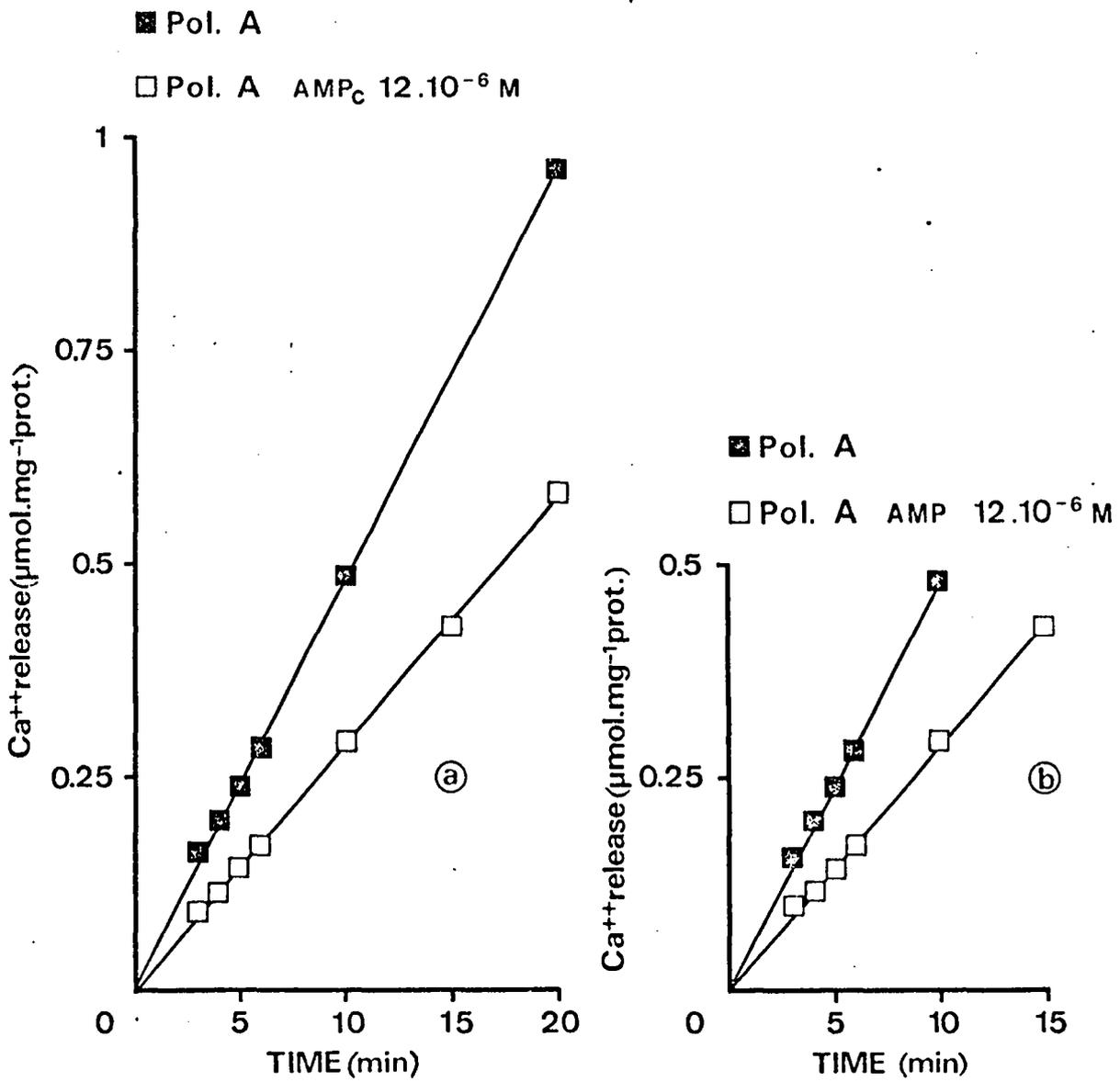


Figure 39 :

Effet comparable de l'AMPc et de l'AMP à forte concentration ($12.10^{-6}M$) par rapport aux effets de ces deux nucléotides à plus faible concentration ($4.10^{-6}M$ voir figure précédente).

milieu, cette formation qui nécessite des traces de Ca et de Mg, serait largement suffisante pour permettre dans les conditions de référence, une phosphorylation satisfaisante des canaux calciques présents dans la membrane des VRSI ; il se peut aussi qu'une concentration d'AMP_c de 0,004 μmole.ml⁻¹ serait trop faible pour modifier de façon significative la fuite de Ca ; ii) la diminution de la fuite de Ca en présence à la fois de 0,004 μmole.ml⁻¹ d'AMP_c et de 0,004 μmoles.ml⁻¹ d'AMP, serait plutôt en faveur d'une diminution de phosphorylation des canaux calciques par inhibition compétitive entre l'AMP et l'AMP_c. Ceci prouverait qu'effectivement, dans les conditions de référence (absence d'apport d'AMP_c) à partir d'ATP, serait synthétisé de l'AMP_c à une concentration permettant une phosphorylation maximale des canaux calciques. En faveur de cette dernière interprétation, nos résultats (figure 39) montrent qu'effectivement le taux d'AMP_c synthétisé dans les conditions de référence serait à son niveau maximal puisque l'addition d'une forte concentration d'AMP_c ou d'AMP (0,012 μmole.ml⁻¹) entraîne dans les deux cas, une forte diminution de la fuite de Ca ce qui correspondrait à une inhibition par excès de substrat.

Ainsi les résultats concernant les effets de l'AMP_c et de l'AMP sur les canaux calciques de la membrane du RS renforcent l'hypothèse selon laquelle il existerait une cyclase membranaire permettant la synthèse de l'AMP_c à partir d'ATP, cette adénine monophosphate cyclique "phosphorylerait" des canaux calciques.

Dans le but d'apporter des arguments supplémentaires en faveur de cette dernière interprétation, une étude relative aux effets de la forskoline sur la fuite de Ca a été effectuée. Cette substance connue pour stimuler les cyclases membranaires est testée sur les VRSI à différentes concentrations (10⁻⁹, 10⁻⁷, 10⁻⁶ et 10⁻⁵M). Les résultats ci-dessus concernant les effets de l'AMP_c et de l'AMP vont effectivement dans le sens d'une possible phosphorylation de canaux calciques par l'intermédiaire d'AMP_c synthétisé à partir de l'ATP en présence bien sûr de Ca et de Mg.

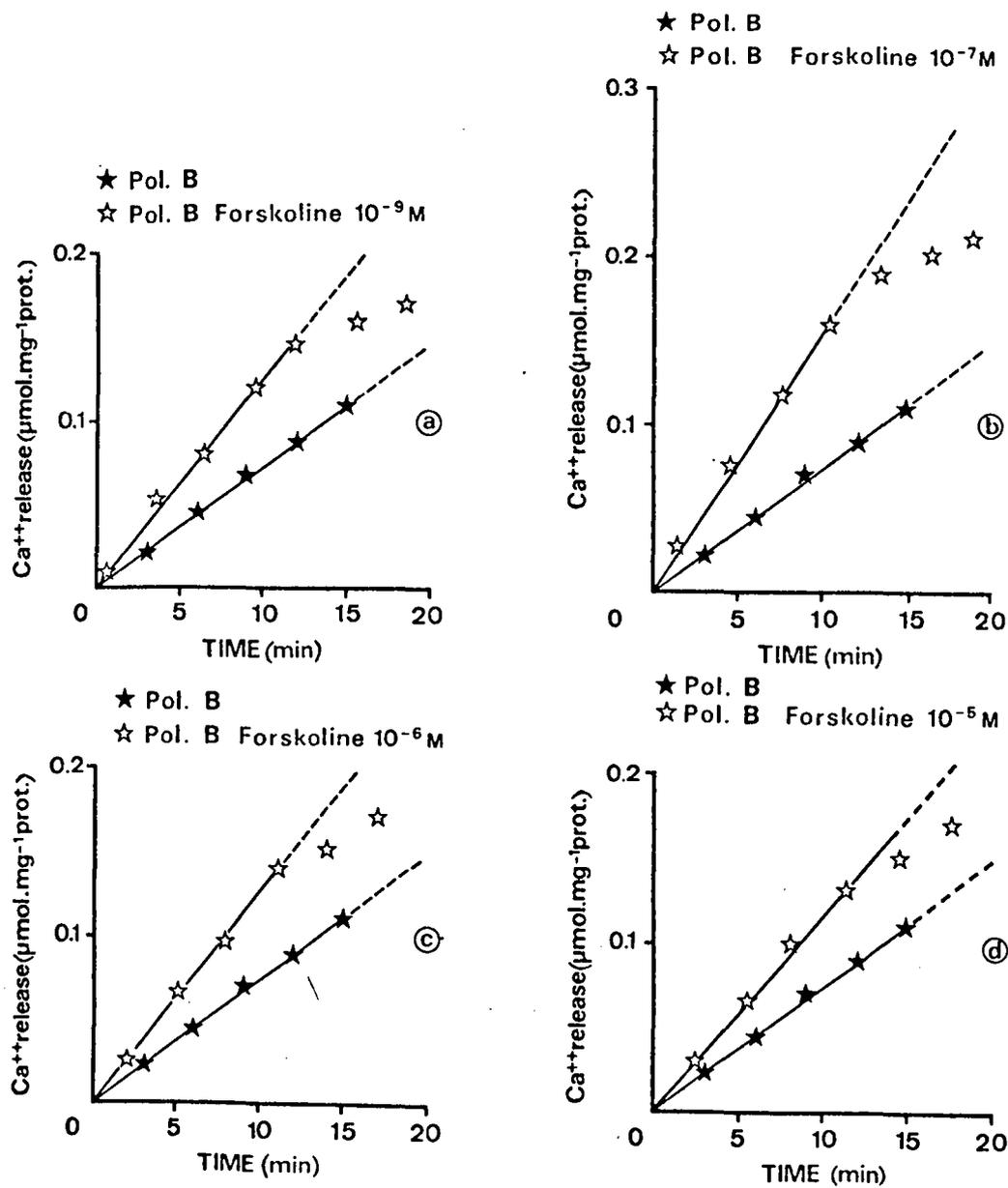


Figure 40 :

Effets de différentes concentrations de forskoline activateur des cyclases membranaires (10^{-9} M , a ; 10^{-7} M , b ; 10^{-6} M , c ; 10^{-5} M , d) sur la fuite de Ca au cours du temps de VRSI préalablement chargées en milieu A puis placées dans le milieu de polarisation B ($E_K = E_{Cl} = 40 \text{ mV}$) en présence du vanadate ($100 \mu\text{M}$).

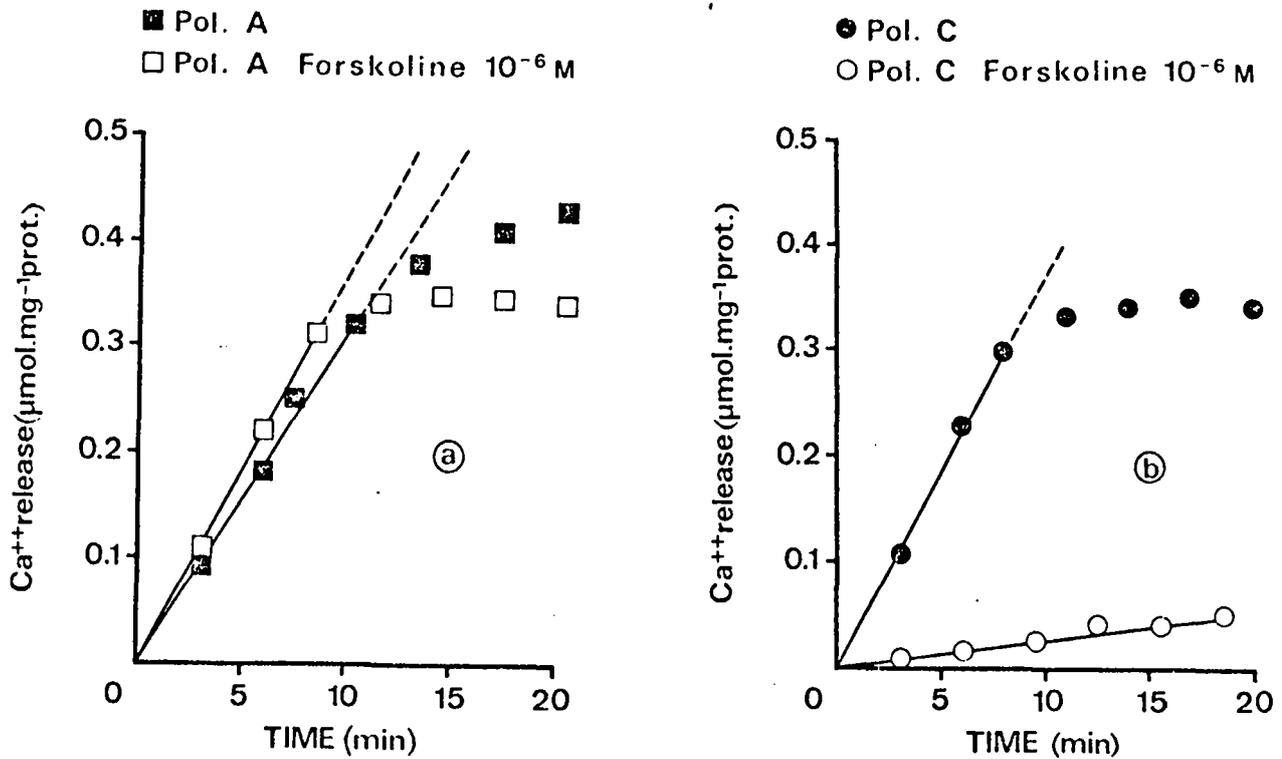


Figure 41 :

Effets de la forskoline (10⁻⁶M) sur la fuite de calcium au cours du temps des VRSI préalablement chargées dans le milieu A et placées soit dans le milieu A (E_K = E_{Cl} = 80 mV, courbe a) soit dans le milieu C (E_K = E_{Cl} = 0mV, courbe b). La forskoline à 10⁻⁶M n'entraîne aucune modification de la fuite de calcium des VRSI placées en milieu A, courbe a, alors qu'elle entraîne une diminution très importante de cette fuite en milieu C, courbe b, et une faible augmentation pour le milieu B (E_K = E_{Cl} = 40 mV, voir figure précédente). Ces effets sont en faveur d'un contrôle des canaux calciques par le potentiel membranaire, canaux nécessitant une phosphorylation. La diminution importante de fuite en milieu C s'explique par l'augmentation importante de la conductance calcique par rapport aux autres conductances ioniques et par la diminution voir l'annulation du gradient électrochimique pour les ions Ca²⁺

Les courbes de la figure 40 sont établies en ce qui concerne les effets de la forskoline conformément au protocole expérimental ayant permis de décrire les effets de substances précédemment utilisées (AMP_C , AMP, caféine, procaïne) dans l'étude de la fuite de Ca. Pour toutes les concentrations de forskoline utilisées, le milieu dans lequel les VRSI étaient placées, après leur charge en Ca, correspond au milieu B ($E_K = E_{Cl} = 40$ mV). Ces courbes révèlent que la forskoline augmente la vitesse de fuite de Ca ; l'effet maximal apparent étant observé pour une concentration de forskoline de 10^{-7} M. Cette augmentation de la vitesse de fuite de calcium par la forskoline renforce bien l'hypothèse formulée ci-dessus selon laquelle il pourrait exister dans la membrane du réticulum sarcoplasmique une cyclase, stimulée par la forskoline, qui augmenterait la synthèse de l' AMP_C à partir d'ATP, provoquant aussi un accroissement de la fuite de Ca.

En ce qui concerne les effets de la forskoline pour les deux autres milieux de polarisation (figure 41; $E_K = E_{Cl} = 80$ mV milieu A et $E_K = E_{Cl} = 0$ mV milieu C) il est à noter que cette substance agit, en apparence, différemment sur la fuite de calcium. Pour le lot de vésicules placé dans le milieu de polarisation correspondant au milieu A ; $E_K = E_{Cl} = 80$ mV), aucun effet n'est observé. Par contre cette substance entraîne une diminution importante de la vitesse de fuite de Ca pour les vésicules placées dans le milieu de polarisation C ($E_K = E_{Cl} = 0$ mV) ; cette diminution reflète à première vue une inhibition de la fuite de Ca. Cependant si on tient compte du fait que sous l'effet de la forskoline la conductance aux ions Ca^{2+} augmente considérablement (conductance importante en milieu de polarisation C ($E_K = E_{Cl} = 0$ mV, figure 40, b)) le gradient électrochimique très faible dans ce cas rend compte d'une fuite de Ca beaucoup plus faible en dépit d'une forte augmentation de conductance calcique.



QUATRIEME CHAPITRE

PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSION

Le but de cette deuxième partie du travail était d'analyser une éventuelle activité électrique de la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) des fibres musculaires squelettiques de crustacé en particulier du fait de la richesse de ces fibres en RS. Cette étude concerne les mouvements entrant et sortant de Ca, à travers la membrane de vésicules de RS isolé par centrifugation et placés dans différentes conditions notamment dans celle où une "imposition de potentiel" est réalisée. Cette polarisation du RS permet d'appréhender les mécanismes de prise et de libération de Ca lors du cycle contraction-relâchement de la fibre musculaire.

Le pompage ou la fuite de Ca des VRSI est étudié par l'intermédiaire de la diminution ou de l'augmentation de la concentration de Ca d'un petit volume (1 ml) du milieu extraréticulaire (milieu correspondant au milieu intracellulaire) ; cette variation de $[Ca]_{er}$ est mesurée à l'aide d'un indicateur métallochromique, l'arsenazo III, en fonction de la polarisation de la membrane réticulaire induite par des gradients de K et de Cl à produit $[K] \cdot [Cl]$ constant. Trois milieux de polarisation ont été testés (milieu A : $E_K = E_{Cl} = 80$ mV ; milieu B : $E_K = E_{Cl} = 40$ mV et le milieu C : $E_K = E_{Cl} = 0$ mV). Dans tous les cas, la polarisation correspond à une positivité du milieu intraréticulaire par rapport au milieu extraréticulaire.

A. PRISE DE CALCIUM

Avant que les vésicules soient placées dans les milieux de polarisation A, B ou C, une fois isolées, elles sont reprises dans le milieu A durant 30 secondes. Après ce temps, le milieu extraréticulaire, ne contenant que très peu de Ca (omission du Ca des milieux) se trouve brusquement enrichi (200 μ M). La quantité de Ca qui apparaît ne peut provenir que des vésicules qui, probablement par le mécanisme de "Ca induced Ca release" l'ont libéré. Ce mécanisme est par la suite inactivé du fait d'une

forte $[Ca]_{er}$ et d'une absence de variation rapide de celle-ci (voir FABIATO, 1983). Ainsi la prise peut être observée et un mouvement net entrant de Ca peut alors être détecté. Cette prise de Ca, dont la vitesse est faible du fait de son inhibition relative (due à la présence d'une forte $[Ca]_{er}$), permet cependant de montrer que : i) la constante de temps de charge (τ) en Ca du RS est indépendante de la polarisation membranaire E_m ($\tau = 7$ min en moyenne. Trois valeurs de E_m ont été étudiées : $E_K = E_{Cl} = 80$ mV ; 40 mV ou 0 mV ; ii) la quantité pompée de Ca, par le RS, est par contre d'autant plus importante que la polarisation est plus forte en dépit d'un gradient électrique défavorable (elle est de $6,85 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine pour le milieu A : $E_K = E_{Cl} = 80$ mV ; de $6,9 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine pour le milieu B : $E_K = E_{Cl} = 40$ mV et de $4,25 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine pour le milieu C : $E_K = E_{Cl} = 0$ mV).

Ces résultats concernant la prise de Ca indiquent un effet certain de la polarisation sur la prise de Ca se traduisant par une diminution de l'activité de l'ATPase dépendante de Ca.

B. LIBERATION DE CALCIUM

Cette étude est réalisée après avoir bloqué l'ATPase dépendante du Ca par le vanadate ($100 \mu\text{M}$). L'ensemble des résultats montre que : i) la vitesse de libération de Ca des VRSI, chargées en Ca, est d'autant plus rapide que la polarisation est plus faible (c'est à dire que les VRSI sont dépolarisées). La vitesse initiale de libération du Ca est respectivement pour les milieux de polarisation A, B et C de $6,85$; $6,90$ et $4,25 \mu\text{moles.mg}^{-1}$ protéine.min⁻¹ ; ii) en présence d'une forte polarisation (milieu A, $E_K = E_{Cl} = 80$ mV), la caféine à la concentration de 5 mM augmente considérablement la fuite de Ca (100 % d'augmentation en milieu A, 33 % en milieu B et seulement 30 % en milieu C). Ces résultats suggèrent que l'activation de canaux calciques de la membrane du RS dépendrait du voltage et que la caféine est d'autant plus efficace, à un potentiel déterminé que les canaux

sont préalablement ouverts ; iii) la procaine (4 mM) ne réduit pas la fuite de Ca induite par la caféine laissant supposer que cet anesthésique local agit probablement au niveau d'une structure labile détruite au moment de l'isolement, cette structure pouvant correspondre à la jonction ST - RS ; iii) la phosphorylation de canaux calciques de la membrane réticulaire peut être assurée par l'AMP_c ; en effet l'addition de cette AMP_c à la concentration de 4 mM ne modifie sensiblement pas la fuite de Ca alors qu'à une concentration plus élevée (12 mM) elle entraîne une diminution importante de la fuite de Ca, comme d'ailleurs l'AMP à la même concentration. A la concentration de 12 μM, l'AMP_c réduit la fuite probablement en provoquant une inhibition par excès de substrat. Ainsi, dans les conditions normales, l'ATP transformée par une cyclase membranaire, en AMP_c entraînerait une phosphorylation de canaux calciques dépendant du voltage. Cette hypothèse est rendue plausible puisque nous montrons que les effets d'une substance activatrice de toutes les cyclases membranaires : la forskoline. En effet, dans les conditions de polarisation B ($E_K = E_{Cl} = 40$ mV) l'addition de forskoline à différentes concentrations (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M) entraîne toujours une augmentation de la libération de Ca par les VRSI. En ce qui concerne les effets de la forskoline pour les deux autres milieux de polarisation (milieu A : $E_K = E_{Cl} = 80$ mV et milieu C : $E_K = E_{Cl} = 0$ mV), il est à noter que cette substance activatrice agit en apparence différemment sur la fuite de Ca. En milieu A, la fuite de Ca n'est pas modifiée alors qu'en milieu C ; la vitesse de libération de Ca est fortement diminuée. Ces effets contraires ne sont qu'apparents, en effet, si, il est tenu compte du fait que, la forskoline augmente fortement la conductance aux ions Ca^{2+} , cela a pour conséquence de réduire le gradient électrochimique pour les ions Ca^{2+} puisque dans ces conditions, le potentiel réticulaire intermédiaire entre $E_K = E_{Cl}$ et E_{Ca} serait très proche du potentiel d'équilibre aux ions Ca^{2+} .

C. CONCLUSION

Le contrôle du mouvement passif à travers la membrane du RS par le potentiel peut être interprété en considérant l'existence de canaux calciques au niveau de cette membrane, ayant des propriétés similaires à ceux des membranes excitables. La modulation du fonctionnement de ces canaux par des substances serait comparable à celle établie pour les canaux calciques au niveau de la membrane de surface ; canaux calciques dépendant du voltage. Enfin la libération de Ca par le réticulum sarcoplasmique peut être aussi sous la dépendance de la vitesse de la variation de $[Ca]_{er}$ permettant ainsi la libération du Ca par le mécanisme du "Ca induced Ca release".



RESUME

L'étude des mouvements des ions Ca^{2+} à travers la membrane sarcolemmique d'écrevisse et à travers celle du réticulum sarcoplasmique (RS) de crabe, s'intègre dans un travail d'ensemble visant à expliquer les mécanismes impliqués dans le couplage excitation-contraction des fibres musculaires squelettiques de crustacé.

1) L'analyse de la conductance membranaire de surface et tubulaire des ions Ca^{2+} est effectuée à l'aide de la technique de potentiel imposé par microélectrodes dans des conditions permettant d'extraire, du courant global, le courant porté par les ions Ca^{2+} . En effet en présence de TEA (60 mM), d'acide niflumique (10^{-3} mM) et de procaïne (2 mM) et avec une concentration extracellulaire faible ($1/5^{\text{e}}$ de la concentration normale), il est possible de mettre en évidence deux composantes du courant entrant de Ca (I_{Ca_1} et I_{Ca_2}) : i) I_{Ca_1} s'active au seuil de potentiel de - 45 mV ; son inactivation dépend du voltage ; son activation nécessite le déplacement de 6 particules ; ii) I_{Ca_2} , s'active au potentiel de - 30 mV ne présente pas ou peu d'inactivation pour des impulsions dépolarisantes de l'ordre de 100 msec ; son activation ne nécessite le déplacement que de 2 particules.

2) L'étude concernant les mouvements entrant et sortant de Ca à travers la membrane de vésicules du RS isolé par ultracentrifugation, montre que ces mouvements calciques sont au moins en partie contrôlé par le potentiel membranaire laissant à penser qu'il existe des canaux calciques dépendant du voltage au niveau de la membrane réticulaire. Le fonctionnement de ces canaux est modulé par des substances telles que la caféine; l'AMP, l'AMP_c, la forskoline. Enfin la libération de Ca à partir du RS est aussi sous la dépendance de la vitesse de variation de la concentration de Ca extraréticulaire, cette rapide variation permettant la libération du Ca par le mécanisme de "Ca induced Ca release". En conclusion

au niveau des fibres musculaires squelettiques de crustacé deux mécanismes de libération de Ca du RS peuvent rendre compte de nos résultats : i) "Ca induced Ca release" et ii) "depolarization induced Ca release".



BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, D.J., GAGE, P.W. (1979).
Characteristics of sodium and calcium conductance produced by membrane depolarization in *Aplysia* neurone.
J. Physiol., London, 289, 141-161.
- ADRIAN, R.H. (1964).
The rubidium and potassium permeability of frog muscle membrane.
J. Physiol., London, 175, 134-159.
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. (1970).
Voltage clamp experiments in striated muscle fibers.
J. Physiol., London, 208, 607-644.
- AKAIKE, N., LEE, K.S., BROWN, A.M. (1978).
The calcium current of *Helix* neuron.
J. Gen. Physiol., 71, 509-531.
- ALMERS, W., BEST, P.M. (1976).
Effects of tetracaine on displacement currents and contraction in frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 262, 583-611.
- ALMERS, W., FINK, R., PALADE, P.T. (1981).
Calcium depletion in muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization.
J. Physiol., London, 312, 177-207.
- ANDERSON, M. (1979).
 Mn^{2+} ions pass through Ca^{2+} channels in myoepithelial cells.
J. exp. Biol., 82, 227-238.
- ANDERSON, M., CASTILLO, J. (1976).
Electrical activity of the proventriculus of the polychaete worm *Syllis spongiphila*.
J. exp. Biol., 64, 691-710.
- ANDERSON, M., MOROSE, H. (1978).
Chemical excitation of the proventriculus of the polychaete worm *Syllis spongiphila*.
J. exp. Biol., 75, 113-122.
- ASHCROFT, F.M. (1981).
Calcium-dependent action potentials in skeletal muscle fibres of the stick insect, *Carausius morosus*.
J. exp. Biol., 93, 257-267.

- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1980).
Inactivation of calcium currents in skeletal muscle fibres of
an insect depends on calcium entry.
J. Physiol., London, 308, 36 P.
- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1982 a).
Calcium and potassium currents in muscle fibres of an Insect
(*Carausius morosus*).
J. Physiol., London, 323, 93-115.
- ASHCROFT, F.M., STANFIELD, P.R. (1982 b).
Calcium inactivation in skeletal muscle fibres of the stick insect
Carausius morosus.
J. Physiol., London, 330, 349-372.
- ATWOOD, H.L. (1963).
Differences in muscle fibre properties as a factor in "fast" and "slow"
contraction in *Carcinus*.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 17-32.
- ATWOOD, H.L. (1965).
Excitation and inhibition in crab muscle fibres.
Comp. Biochem. Physiol., 16, 409-426.
- AXELSSON, J., THESLEFF, S. (1958).
Activation of the contractile mechanism in striated muscle.
Acta physiol. scand., 44, 55-56.
- BAKERT, P.F., RINK, T.J. (1975).
Catecholamine release from bovine adrenal medulla in response
to maintained depolarization.
J. Physiol., London, 253, 593-620.
- BAYLOR, S.M., CHANDELER, W.K., MARSHALL, M.W. (1981).
Studies in skeletal muscle using optical probes of membrane potential.
In : The regulation of muscle contraction : Excitation-contraction
coupling, edited by A.D. Grinnell and M.A.B. Brazier. New York :
Academic, 97-130.
- BAYLOR, S.M. CHANDELER, W.K., MARSHALL, M.W. (1982).
Optical measurements of intracellular pH and magnesium in frog
skeletal muscle fibres.
J. Physiol., London, 331, 105-137.
- BEELER, T.J. (1980).
 Ca^{2+} uptake and membrane potential in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biol. Chem. 255 : 9156-9161.

- BEELER, T.J., FARMEN, R.H., MARTONOSI, A.N. (1981).
The mechanism of voltage sensitive dye responses on sarcoplasmic reticulum.
J. Memb. Biol. 62, 113-137.
- BEELER, T.J., JONA, I., MARTONOSI, A. (1979).
The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes.
J. Biol. Chem., 254, 6229-6231.
- BEELER, G.W., REUTER, H. (1970).
The relation between membrane potential, membrane currents, and activation of contraction in ventricular myocardial fibres.
J. Physiol., London, 207, 211-229.
- BENNINGER, G., EINWACHTER, H.M., HAAS, H.G., KERN, R. (1976).
Calcium-sodium antagonism on the frog's heart : a voltage clamp study.
J. Physiol., London, 259, 617-645.
- BERTRAND, F., BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1979).
Experiences de potentiel imposé à l'aide de microélectrodes sur la fibre squelettique de crabe. Etude du courant membranaire global.
J. Physiol., Paris, 75, 851-860.
- BEZANILLA, F., HOROWICZ, P. (1975).
Fluorescence intensity change associated with contractile activation in frog muscle stained with Nile Blue A.
J. Physiol., London, 246, 709-735.
- BONVALLET, R., CHRISTE, G., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O. (1985).
Possible role of Na⁺ ions in intracellular Ca²⁺ release in frog auricular trabeculae.
Gen. Physiol. Biophys., 4, 167-183.
- BONVALET, R., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O. (1980).
Mise en évidence d'une libération intracellulaire de calcium induite par les ions sodium au niveau de trabécules auriculaires de grenouille.
C.R. Acad. Sci. (Paris). D.291, 557-560.
- BORLE, A.B. (1981).
Control, modulation and regulation of cell calcium.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 90, 13-153.

- BRANDT, P.W., REUBEN, J.P., GIRARDIER, L., GRUNDFEST, H. (1965).
Correlated morphological and physiological studies on isolated single muscle fibers. I. Fine structure of the crayfish muscle fiber.
J. Cell. Biol., 25, 233-261.
- BREHM, P., ECKERT, R. (1978).
Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium.
Science N. Y., 202, 1203-1206.
- BROCKLEHURST, L. (1975).
Dantrolène sodium and "skinned" muscle fibers.
Nature, London, 254, 364.
- BROWN, A.M., MORIMOTO, K., TSUDA, Y., WILSON, D.L. (1981).
Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspersa*.
J. Physiol., London, 320, 193-218.
- BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1976).
Delayed rectification in the skeletal muscle fiber of the crab.
J. Physiol., London, 263, 251-252.
- BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1977).
Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
J. Physiol., Paris, 73, 633-674.
- BRULE, G., HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1983a)
Ionic nature of the outward-going rectification in crab skeletal muscle fibres.
Gen. Physiol. Biophys., 2, 137-151.
- BRULE, G., HAUDECOEUR, G., JDAIAA, H., GUILBAULT, P. (1983b)
Inhibition par une substance amphiphile : l'acide niflumique de la rectification dans le sens entrant de la fibre musculaire de Crustacé.
Arch. Inter. Physiol. Biochim., sous presse.
- CAMPBELL, K.P., SHAMOO, A.E. (1980).
Chloride-induced release of actively-loaded calcium from light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Membr. Biol., 54, 73-80.

- CAPUTO, C. (1968).
Volume and Twitch tension changes in single muscle fibers in hypertonic solutions.
J. Gen. Physiol., 52, 793-809.
- CAPUTO, C. (1976).
The effects of caffeine and tetracaine on the time course of potassium contractures of single muscle fibres.
J. Physiol., London, 255, 191-207.
- CAPUTO, C. (1978).
Excitation and contraction processes in muscle.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 63-83.
- CAPUTO, C., DIPOLO, R. (1978).
Contractile activation phenomena in voltage-clamped barnacle muscle fiber.
J. gen. Physiol., 71, 461-488.
- CASTEELS, R., KITAMURA, H., KURIYAMA, H., SUZUKI, H. (1977).
The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery.
J. Physiol., London, 271, 41-61.
- CASWELL, A.H., BAKER, S.P., BOYD, H., POTTER, L.T., GARCIA, M. (1978).
 β -Adrenergic receptor and adenylate cyclase in transverse tubules of skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 253, 3049-3054.
- CASWELL, A.H., BRANDT, N.R. (1981).
Ion-induced release of calcium from isolated sarcoplasmic reticulum.
J. Membr. Biol., 58, 21-33.
- CARAFOLI, E. (1982).
Membrane transport of calcium.
Edited by E. CARAFOLI, New York : Academic.
- CARAFOLI, E., SCARPA, A. (1982).
Transport ATPases.
Ann. N Y. Acad. Sci, 402, 1-604.

- CARLEY, W.W., RACKER, E. (1982).
ATP-dependent phosphate transport in sarcoplasmic reticulum and reconstituted proteoliposomes.
Biochim. Biophys. Acta, 680, 187-193.
- CARVALHO, A.P. (1968).
Calicum binding properties of sarcoplasmic reticulum as influenced by ATP, caffeine, quinine and local anesthetics.
J. Gen. Physiol., 52, 622-642.
- CARVALHO, A.P., LEO, B. (1967).
Effects of ATP on the interaction of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^{+} with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 50, 1327-1352.
- CHARNOCK, J.S., ALMEIDA, A.F., TO, R. (1975).
Temperature-activity relations of cation activation and ouabain inhibition ($\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}$) - ATPase.
Arch. Biochim. Biophys., 167, 480-487.
- CHESNOY-MARCHAIS, D. (1982).
A Cl^{-} conductance activated by hyperpolarization in Aplysia neurones.
Nature, London, 299, 359-361.
- CHESNOY-MARCHAIS, D. (1983).
Characterization of a chloride conductance activated by hyperpolarization in Aplysia neurones.
J. Physiol., London, 342, 277-308.
- CHEUNG, W.Y. (1982).
Calcium and cell function.
New York: Academic, vol. 2.
- CHEUNG, W.Y. (1983).
Calcium and cell function.
New York: Academic, vol. 3.
- CHEVALLIER, J., BUTOW, R.A. (1971).
Calcium binding to the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle.
Biochemistry, 10, 2733-2737.

- CHIARANDINI, D.J., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1970).
Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. I. Activation of contraction and induction of Ca-spike electrogenesis.
J. Gen., Physiol., 55, 640-664.
- COHEN, A., SELINGER, Z. (1969).
Calcium binding properties of sarcoplasmic reticulum membranes.
Acta, 183, 27-35.
- COLQUHOUN, D., NEHER, E., REUTER, H., STEVENS, C.F. (1981).
Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells.
Nature, London, 294, 752-754.
- CONSTANTIN, L.L., PODOLSKY, R.J. (1967).
Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 50, 1101-1124.
- CONSTANTI, A., GALVAN, M. (1983).
Fast inward rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones.
J. Physiol., London, 335, 153-178.
- CORBIER, A., DUBOIS, J.M. (1983).
Two transient Na currents in the frog node of Ranvier.
J. Physiol. London, 345, 79 p.
- COUSIN, J.L., MOTAIS, R. (1979).
Modification de la perméabilité des membranes biologiques par des composés amphiphiles d'intérêt pharmacologique.
Colloques nationaux du CNRS. N° 938, Physicochimie des composés amphiphiles, p. 243.
- COUSIN, J.L., MOTAIS, R. (1982).
Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. II. Chemical properties of the flufenamate-binding site on the band 3 protein.
Biochim. Biophys. Acta , 687, 156-164.



- DUPONT, Y. (1979).
Cation flux across biomenbranes.
Edited by Mukohata, Y. and Packer, L. Academic Press, New York, 141-160.
- DUX, L., MARTONOSI, A. (1983 a).
Two dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca^{2+} -ATPase vesicles treated with vanadate.
J. Biol. Chem., 258, 2599-2603.
- DUX, L., MARTONOSI, A. (1983 b).
 Ca^{2+} -ATPase membrane crystals in sarcoplasmic reticulum. The effect of trypsin digestion.
J. Biol. Chem., 258, 10111-10115.
- EBASHI, S., ENDO, M. (1968).
Calcium ion and muscle contraction.
Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 123-183.
- ECKERT, R. (1972).
Bioelectric control of ciliary activity.
Science N.Y., 176, 473-481.
- ECKERT, R., CHAD, J. (1984).
Inactivation of Ca channels.
Prog. Biophys. molec. Biol., 44, 215-267.
- EISENBERG, R.S. (1967).
The equivalent circuit of single crab muscle fibers as determined by impedance measurements with intracellular electrodes.
J. Gen. Physiol., 50, 1785-1806.
- EISENBERG, B.R. (1983).
Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle.
In : Handbook of physiology skeletal Muscle, edited by L.D. Peachey and R.H. Adrian. Bethesda, MD : Am. Physiol. Soc., sect. 10, 73-112.
- ENDO, M. (1975).
Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.
Proc. Jpn. Acad., 51, 479-484.

- DEITMER, J.W. (1983).
Ca channels in the membrane of the hypotrich ciliate *Stylonychia*.
Physiol. Excit. Cel., 51-63.
- DELORME, P.; BRULE, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1978).
Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-
contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
J. Physiol., Paris, 74, 387-407.
- DE MEIS, L., HASSELBACH, W., MACHADO, R.D. (1974).
Characterization of calcium oxalate and calcium phosphate deposits
in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Cell. Biol., 62, 505-509.
- DIFRANCESCO, D. (1981).
A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf
Purkinje fibres.
J. Physiol., London, 314, 377-393.
- DIFRANCESCO, D. (1982).
Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje
fibres : effects of potassium, caesium and rubidium.
J. Physiol., London, 329, 485-507.
- DIFRANCESCO, D., OJEDA, C. (1980).
Properties of the current I_f in the sino-atrial node of the rabbit
composed with those of the current I_{K_2} in Purkinje fibres.
J. Physiol., London, 308, 353-367.
- DUGGAN, P.F., MARTONOSI, A. (1970).
Sarcoplasmic reticulum. IX. The permeability of sarcoplasmic reticulum
membranes.
J. Gen. Physiol., 56, 147-167.
- DUNHAM, E.T., GLYNN, I.M. (1961).
Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali
metal ions.
J. Physiol., London, 156, 274-293.

- ENDO, M. (1977).
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.
Physiol. Rev., 57, 71-108.
- ENDO, M. (1981).
Mechanism of calcium induced calcium release in the SR membrane.
In : the Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological
Membranes, edited by S.T. ohnishi and M. Endo. New-York : Academic,
257-264.
- ENDO, M., BLINKS, J.R. (1973).
Inconstant association of aequorin luminescence with tension during
calcium release in skinned muscle fibres.
Nature, London, New Biol., 246, 218-220.
- ENDO, M., KAKUTA, Y., KITAZAWA, T. (1981).
A further study of the Ca^{2+} induced Ca release mechanism.
In the regulation of Muscle contraction : Excitation-Contraction cou-
pling, edited by A.D.Grinnell and M.A.B. Brazier, New-York :
Academic, 181-195.
- ENDO, M., NAKAJIMA, Y. (1973).
Release of calcium induced by depolarization of the sarcoplasmic
reticulum membrane.
Nature, London, New Biol., 246, 216-218.
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970).
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum
of skinned skeletal muscle fibres.
Nature, London, 228, 34-36.
- ENGLAND, P. (1983).
Cardiac function and phosphorylation of contractile proteins.
Phil. Trans. R. Soc. London, B. 302, 83-90.
- FABIATO, A. (1981).
Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an
intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of
calcium from sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from
the adult rat or rabbit ventricle.
J. Gen. Physiol., 78, 457-497.

- FABIATO, A. (1982).
Calcium release in skinned cardiac cells : variations with species, tissues, and development.
Federation Proc., 41, 2238-2244.
- FABIATO, A. (1983).
Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.
Am. J. Physiol., 245, C1-C14.
- FABIATO, A. (1985).
Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.
J. Gen. Physiol., 85, 189-320.
- FABIATO, A., BAUMGARTEN, C.M. (1984).
Methods for detecting calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells and the relationships between calculated transsarcolemmal calcium movements and calcium release.
In Physiology and Pathophysiology of the Heart, N. Sperlakis, editor Martinus Nijhoff , Publishing, Boston, The Hague, 215-254.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1979 a).
Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.
J. Physiol. London, 276, 233-255.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1979 b).
Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells.
J. Physiol. Paris, 75, 463-505.
- FAHRENBACH, W.H. (1967).
The fine structure of fast and slow crustacean muscles.
J. Cell. Biol., 35, 69-79.
- FATT, P., GINSBORG, B.L. (1958).
The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres.
J. Physiol., London, 142, 516-543.

- FEHER, J.J., BRIGGS, F.N. (1982).
The effect of calcium load on the calcium permeability of sarcoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem., 257, 10191-10199.
- FEINSTEIN, M.B. (1963).
Inhibition of caffeine rigor and radiocalcium movements by local anesthetics in frog sartorius muscle.
J. Gen. Physiol., 47, 151-172.
- FERGUSON, D.G., SCHWARTZ, H.W., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1984).
Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle : A freeze - drying, rotary-shadowing study.
J. Cell. Biol., 99, 1735-1742.
- FIHN, W., NIGALA, A. (1971).
Calcium binding to sarcoplasmic membranes.
European J. Biochem., 20, 245-248.
- FINTEL, M., LANGER, G.A., DUENAS, C. (1984).
Effects of low sodium perfusion on cardiac caffeine sensitivity and calcium uptake.
J. Mol. Cell. Cardiol., 16, 1037-1045.
- FORD, L.E., PODOLSKY, R. (1970).
Regenerative calcium release within muscle cells.
Science, 167, 58-69.
- FRANK, G.B. (1980).
The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in Vertebrate skeletal muscle.
Biochem. Pharmacol., 29, 2399-2406.
- FRANK, G.B., TREFFERS, R.C. (1977).
Calcium antagonism of the block in excitation-contraction coupling produced by a urea exposure removal treatment.
Jpn. J. Physiol., 27, 215-224.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1975).
Membrane particles and transmission at the triad.
Federation Proc., 34, 1382-1389.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1980).
Structure of sarcoplasmic reticulum.
Federation Proc., 39, 2403-2409.
- GAY, L.A., STANFIELD, P.R. (1977).
Cs⁺ causes a voltage-dependent block of inward K currents in
resting skeletal muscle fibres.
Nature, 267, 169-170.
- GERDES, U., MOLLER, J.V. (1983).
The Ca²⁺ permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles. II. Ca²⁺
efflux in the energized state of the calcium pump.
Biochim. Biophys. Acta, 734, 191-200.
- GERDES, U., NAHKLA, A.M., MOLLER, J.V. (1983).
The Ca²⁺ permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles. I. Ca²⁺
outflow in the non-energized state of the calcium pump.
Biochim. Biophys. Acta, 734, 180-190.
- GORMAN, A.L.F., HERMANN, A. (1979).
Internal effects of divalent cations on potassium permeability
in molluscan neurones.
J. Physiol., London, 296, 393-410.
- GOTO, M., KIMOTO, Y., KATO, Y. (1971).
A study on the excitation-contraction coupling of the bullfrog
ventricle with voltage clamp technique.
Jpn. J. Physiol., 21, 159-173.
- HAGIWARA, S., BYERLY, L. (1981).
Calcium channel.
Ann. Rev. Neurosci., 4, 69-125.
- HAGIWARA, S., HAYASHI, H., TAKAHASHI, K. (1969).
Calcium and potassium currents of the membrane of a barnacle
muscle fiber in relation to the calcium spike.
J. Physiol., London, 205, 115-129.

- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., KRASNE, S., CIANI, S. (1977).
Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of a starfish
in K^+ - Tl^+ mixtures.
J. Gen. Physiol., 70, 269-281.
- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., ROSENTHAL, N.P. (1976).
Potassium current and the effect of cesium on this current during
anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish.
J. Gen. Physiol., 67, 621-638.
- HAGIWARA, S., OHMORI, H. (1982).
Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with
patch electrode voltage clamp.
J. Physiol., London, 331, 231-252.
- HAGIWARA, S., HAKA, K. (1964).
The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under
low intracellular Ca^{2+} .
J. Gen. Physiol., 48, 141-162.
- HAGIWARA, S., OZAWA, S., SAND, O. (1975).
Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the
egg cell membrane of a starfish.
J. Gen. Physiol., 65, 617-644.
- HAGIWARA, S., TAKAHASHI, K. (1967).
Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle
muscle fiber membrane.
J. Gen. Physiol., 50, 583-601.
- HARA, Y., KITAMURA, K., KURIYAMA, H. (1980).
Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of
the guinea-pig.
Br. J. Pharmacol., 68, 99-101.
- HASSELBACH, W. (1964).
Relaxing factor and the relaxation of muscle.
Progr. Biophys. Chem., 14, 167-222.
- HASSELBACH, W. (1980).
Quantitative aspects of the calcium concept of excitation-contraction
coupling. A critical evaluation.
Basic. Res. Cardiol., 75, 2-12.

- HASSELBACH, W. (1983).
Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump.
Ann. Rev., 45, 325-339.
- HASSELBACH, W., FIEHN, W., MAKINOSE, M. (1969).
Calcium fluxes across isolated sarcoplasmic membranes in the presence and absence of ATP.
In : The Molecular Basis of Membrane Function, edited by D.C. Tosteson. Englewood cliffs, N.J. : Prentice-Hall, 299-316.
- HASSELBACH, W., KOENING, V. (1980).
Low affinity calcium binding sites of the calcium transport ATPases of sarcoplasmic reticulum membranes.
Z. Naturforsch., 35C, 1012-1018.
- HASSELBACH, W., MAKINOSE, M. (1963).
Über den Mechanismus des calcium-transports durch die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums.
Biochem, Z., 339, 94-111.
- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974 a).
Etude des phénomènes de rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe (*Carcinus maenas*).
C.R. Acad. Sci., Paris, 278, 2457-2460.
- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974 b).
Effets du TEA sur la rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe étudiée dans les conditions de courant imposé en présence d'ions chlorure.
C.R. Sci., Paris, 279, 175-178.
- HAYNES, D.H. (1982).
Relationship between H^+ , anion, and monovalent cation movements and Ca^{2+} transport in sarcoplasmic reticulum : further proof of a cation exchange mechanism for the Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase pump.
Arch. Biochem. Biophys., 215, 444-461.

- HEILBRUNN, L.V., WIERCINSKY, F.G. (1947).
Action of various cations on muscle protoplasm.
J. Cell. Comp. Physiol., 29, 15-32.
- HEISTRACHER, P., HUNT, C.C. (1969).
The effect of procaine on snake twitch muscle fibres.
J. Physiol. London, 201, 627-638.
- HENCEK, M., ZACHAR, J. (1977).
Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish.
J. Physiol., London, 268, 51-71.
- HENCEK, M., ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. (1978).
Membrane currents in a calcium type muscle membrane under voltage clamp.
Physiologia bohemoslov., 27, 457.
- HEYER, C.B., LUX, H.D. (1976).
Control of the delayed outward potassium currents in bursting pacemaker neurones of the snail, *Helix pomatia*.
J. Physiol., London, 262, 349-382.
- HILLE, B. (1967).
The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ions.
J. Gen. Physiol., 50, 1287-1302.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. (1952).
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation-contraction in nerve.
J. Physiol., London, 117, 500-544.
- HORACKOVA, M., VASSORT, G. (1979 a).
Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility. Evidence for an electrogenic, voltage-dependent mechanism.
J. Gen. Physiol., 73, 403-424.
- HORACKOVA, M., VASSORT, G. (1979 b).
Slow inward current and contraction in frog atrial muscle at various extracellular concentrations of Na and Ca ions.
J. Moll. Cell. Card., 11, 733-753.



- HOYLE, G. et SMYTH, T. Jr. (1963).
Neuromuscular physiology of giant muscle fibers of a barnacle,
Balanus nubilus Darwin.
Comp. Biochem. Physiol., 10, 291-314.
- HUDDART, H., GREENWOOD, M., WILLIAMS, A.J. (1974).
The effect of some organophosphorus and organochlorine compounds on
calcium uptake by sarcoplasmic reticulum isolated from insect and
Crustacean skeletal muscle.
J. Comp. Physiol., 93, 139-150.
- HUI, C.S. (1983 a).
Differential properties of two charge components in frog skeletal
muscle.
J. Physiol., London, 337, 531-552.
- HUI, C.S. (1983 b).
Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 337, 509-529.
- HUTTER, O.F., WARNER, A.E. (1972).
The voltage dependence of the chloride conductance of frog muscle.
J. Physiol., London, 227, 275-290.
- HUTTER, O.F., WILLIAMS, T.L. (1979).
A dual effect of formaldehyde on the inwardly rectifying potassium
conductance in skeletal muscle.
J. Physiol., London, 286, 591-606.
- IMAIZUMI, Y., WATANABE, M. (1982).
Effect of procaine on potassium permeability of canine tracheal
smooth muscle.
Pflügers Arch., 394, 144-149.
- INESI, G. (1971).
P-Nitrophenylphosphate hydrolysis and calcium ion transport in frag-
mented sarcoplasmic reticulum.
Science, 171, 901-903.
- INESI, G., GOODMAN, J., WATANABE, S. (1967).
Effect of diethylether on the adenosine triphosphatase activity and
the Ca uptake of fragmented sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal
muscle.
J. Biol. Chem., 242, 4637-3643.

- ISENBERG, G. (1976).
Cardiac Purkinje fibers : cesium as a tool to block inward
rectifying potassium currents.
Pflügers Arch., 365, 99-106.
- ITO, Y., SUZUKI, H., KURIYAMA, H. (1977).
Effect of caffeine and procaine on the membrane and mechanical
properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmo-
nary artery.
Jpn. J. Physiol., 27, 467-481.
- JILKA, R.L., MARTONOSI, A.N., TILLACK, T.W. (1975).
Effect of the purified ($Mg^{2+} + Ca^{2+}$)-activated ATPase of sarcoplasmic
reticulum upon the passive Ca^{2+} permeability and ultrastructure of
phospholipid vesicles.
J. Biol. Chem., 250, 7511-7524.
- JACOBS, A., KEATINGE, W.R. (1974).
Effects of procaine and lignocaine on electrical and mechanical
activity of smooth muscle of sheep carotid arteries.
Br. J. Pharmacol., 51, 405-411.
- JAIMOVICH, E., CHICHEPORTICHE, R., LOMBET, A., LAZDUNSKI, M., ILDEFONSE, M.,
ROUGIER, O. (1983).
Differences in the properties of Na^{+} channels in muscle surface
and T-tubular membranes revealed by tetrodotoxin derivatives.
Pflügers Arch., 397, 1-5.
- KASAI, M. (1981).
Inhibition of the anion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles
by some stilbene derivatives.
J. Biochem. Tokyo, 89, 943-953.
- KASAI, M., KANEMASA, T., FUKUMOTO, S. (1979).
Determination of reflection coefficients for various ions and neutral
molecules in sarcoplasmic reticulum vesicles through osmotic volume
change studied by stopped flow technique.
J. Membr. Biol., 51, 311-324.
- KASAI, M., KOMETANI, T. (1979).
Ionic permeability of sarcoplasmic reticulum membranes.
In cation flux across Biomembranes, ed. Y. Mukohata, L. Packer,
N Y. : Academic, 167-177.

- KASAI, M., MIYAMATO, H. (1973).
Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment.
FEBS Lett., 34, 299-301.
- KASAI, M., MIYAMOTO, H. (1976 a).
Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. I. Release of calcium taken up upon using ATP.
J. Biochem. Tokyo, 79, 1053-1066.
- KASAI, M., MIYAMOTO, H. (1976 b).
Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. II. Release of calcium incorporated without ATP.
J. Biochem. Tokyo, 79, 1067-1076.
- KASAI, M., TAGUCHI, T. (1981).
Inhibition of anion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles by stilbene derivatives and the identification of an inhibition-binding protein.
Biochim. Biophys. Acta, 643, 213-219.
- KATZ, B. (1949).
Les constantes électriques de la membrane de muscle.
Arch. Sci. Physiol., 3, 285-300.
- KEYNES, R.D., ROJAS, E., TAYLOR, R.E., VERGARA, J. (1973).
Calcium and potassium systems of a giant barnacle muscle fibre under membrane potential control.
J. Physiol., London, 229, 409-455.
- KIRINO, Y., SHIMIZU, H. (1982).
Ca²⁺ - induced Ca²⁺ release from fragmented sarcoplasmic reticulum : a comparison with skinned muscle fiber studies.
J. Biochem. Tokyo, 92, 1287-1296.
- KIRINO, Y., OSAKABE, M., SHIMIZU, H. (1983).
Ca²⁺ - induced Ca²⁺ release from fragmented sarcoplasmic reticulum.
Ca²⁺ - dependent passive Ca²⁺ efflux.
J. Biochem. Tokyo, 94, 1111-1118.

- KOSTYUK, P.G. (1980).
Calcium ionic channels in electrically excitable membrane.
Neuroscience, 5, 945-960.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 a).
Outward currents in isolated snail neurones. I. Inactivation kinetics.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 259-263.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 b).
Outward currents in isolated snail neurones. II. Effect of TEA.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 265-268.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., DOROSHENKO, P.A. (1975 c).
Outward currents in isolated snail neurones. III Effect of
verapamil.
Comp. Biochem. Physiol., 51C, 269-274.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., PIDOPLICHKO, V.I., SHAKHOVALOV, Y.A. (1979).
Kinetics of calcium inward current activation.
J. Gen. Physiol., 73, 675-677.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A., SHAKHOVALOV, Y.A. (1977).
Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane
of mollusc neurones.
J. Physiol., London, 270, 545-568.
- KOVACS, L., SCHUMPERLI, R.A., SZUCS, G. (1981).
Calcium transients and birefringence signals in voltage clamped
cut skeletal muscle fibres.
J. Physiol. London, 318, 35-66.
- KURIHARA, S. (1975).
The effect of procaine on the mechanical and electrical activities
of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder.
Jpn. J. Physiol., 25, 775-788.
- KURIHARA, S., SAKAI, T. (1976).
Relationship between effects of procaine and Ca on spontaneous
electrical and mechanical activities of the smooth muscle cells
of the guinea pig urinary bladder.
Jpn. J. Physiol., 26, 487-501.

- LABARCA, P., CORONADO, R., MILLER, C. (1980).
Thermodynamic and kinetic studies of the gating behaviour of a K⁺ selective channel from the sarcoplasmic reticulum membrane.
J. Gen. Physiol., 76, 397-424.
- LABARCA, P., MILLER, C. (1981).
A K⁺-selective, three-state channel from fragmented sarcoplasmic reticulum of frog leg muscle.
J. Memb. Biol., 61, 31-38.
- LAMERS, J.M.J. (1985).
Calcium transport systems in cardiac sarcolemma and their regulation by the second messengers cyclic AMP and calcium-calmodulin.
Gen. Physiol. Biophys., 4, 143-154.
- LANGER, G.A., RICH, T.L., NUDD, L.M. (1983).
Calcium compartmentalization in cultured and adult myocardium : Activation of a caffeine - sensitive component.
J. Moll. Cell. Cardiol., 15, 459-474.
- LAU, Y.H., CASWELL, A.H., BRUNSCHWIG, J.P. (1977).
Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle.
J. Biol. Chem., 252, 5565-5574.
- LAU, Y.H., CASWELL, A.H., BRUNSCHWIG, J.P., BAERWALD, R.J., GARCIA, M. (1979).
Lipid analysis and freeze fracture studies on isolated transverse tubules and sarcoplasmic reticulum subfractions of skeletal muscle.
J. Biol. Chem., 254, 540-546.
- LEA, T.J., ASHLEY, C.C. (1981).
Carbon dioxide or bicarbonate ions release Ca²⁺ from internal stores in crustacean myofibrillar bundles.
J. Memb. Biol., 62, 115-125.
- LLINAS, R., HESS, R. (1976).
Tetrodotoxin-resistant dendritic spikes in avian Purkinje cells.
Proc. natl. Acad. Sci., USA, 73, 2520-2523.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951).
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- LUTTGAU, H.C., OETLIKER, H. (1968).
The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres.
J. Physiol., London, 194, 51-74.

- MADEIRA, V.M.C. (1978).
Proton gradient formation during transport of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum.
Arch. Biochem. Biophys., 185, 316-325.
- MADEIRA, V.M.C. (1979).
Alkalinization within sarcoplasmic reticulum during the uptake of calcium ions.
Arch. Biochem. Biophys., 193, 22-27.
- MAGURA, I.S. (1977).
Long-lasting inward current in snail neurons in barium solutions in voltage-clamp conditions.
J. Membr. Biol. 35, 239-256.
- MAKINOSE, M. (1969).
The phosphorylation of the membranal protein of the sarcoplasmic vesicles during active calcium transport.
Eur. J. Biochem., 10, 74-89.
- MARTONOSI, A. (1972).
Biochemical and clinical aspects of sarcoplasmic reticulum function.
Curr. Top. Membr. Transp., 3, 83-197.
- MARTONOSI, A. (1981).
The relationship between membrane potential and Ca^{2+} fluxes in sarcoplasmic reticulum.
In : The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes, edited by S.T. Ohnishi and M. Endo, New-York : Academic, 207-218.
- MARTONOSI, A. (1983).
The regulation of cytoplasmic Ca^{2+} in muscle and non-muscle cells.
In : Muscle and Non-Muscle Motility, edited by A. Stracher. New-York : Academic, 1, 233-358.
- MARTONOSI, A.N. (1984).
Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.
Physiol. rev., 64, 1240-1320.

- MATHIAS, R.T., LEVIS, R.A., EISENBERG, R.S. (1980).
Electrical models of excitation contraction coupling and charge movement in skeletal muscle.
J. Gen. Physiol., 76, 1-31.
- MATHIAS, R.T., LEVIS, R.A., EISENBERG, R.S. (1981).
An alternative interpretation of charge movement in muscle.
In : the regulation of muscle contraction : Excitation-contraction coupling, edited by A.D. Grinnell and M.A.B. Brazier. New-York, Academic, 39-51.
- MATSUBARA, S., SAKAI, T., HASHIZUME, K. (1977).
Chloride-induced contraction in a skinned fiber of toad striated muscle.
Jpn. J. Physiol., 27, 501-509.
- MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L. (1982).
'Anomalous' rectification in mouse spinal sensory neurones generated by a time-and voltage-dependent inward current.
J. Physiol., London, 332, 24-25 P.
- MCKINLEY, D., MEISSNER, G. (1977).
Sodium and potassium ion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles.
FEEBS LETT., 82, 47-50.
- MCKINLEY D., MEISSNER, G. (1978).
Evidence for a K^+ , Na^+ permeable channel in sarcoplasmic reticulum.
J. Membr. Biol., 44, 159-187.
- MEECH, R.W. (1978).
Calcium dependent K-activation in nervous tissues.
A. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 1-18.
- MEECH, R.W., STANDEN, N.B. (1975).
Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp : A component mediated by calcium influx.
J. Physiol., London, 249, 211-239.

- MEISSNER, G. (1975).
Isolation and characterization of two types sarcoplasmic reticulum vesicles.
Biochim. Biophys. Acta, 389, 51-68.
- MEISSNER, G. (1981).
Calcium transport and monovalent cation and proton fluxes in Sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biol. Chem., 256, 636-643.
- MEISSNER, G., MCKINLEY, D. (1976).
Permeability of sarcoplasmic reticulum membrane.
J. Memb. Biol., 30, 79-98.
- MEISSNER, G., YOUNG, R.C. (1980).
Proton permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biol. Chem., 255, 6814-6819.
- MEVES, H. (1968).
The ionic requirements for the production of action potentials in *Helix pomatia* neurones.
Pflügers Arch., 304, 215-241.
- MEVES, H. (1978).
Inactivation of the sodium permeability in squid giant nerve fibers.
Prog. Biophys. Mol. Biol., 33, 207-230.
- MEVES, H., VOGEL, W. (1973).
Calcium inward currents in internally perfused giant axons.
J. Physiol., London, 235, 225-265.
- MILLER, C., WHITE, M.M. (1980).
A voltage-dependent chloride conductance channel from *Tropedac* electroplax membrane.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 341, 534-551.

- MILLER, C. (1982).
Bis-quaternary ammonium blockers as structure probes of the sarcoplasmic reticulum K^+ channel.
J. Gen. Physiol., 79, 869-892.
- MILLER, C., RACKER, E. (1976).
 Ca^{2+} -induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers.
J. Membr. Biol., 30, 283-300.
- MIYAMOTO, H. (1981).
 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release as a trigger mechanism of membrane potential dependent Ca release.
In : The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes, edited by S.T. Ohnishi and M. Endo. New York : Academic, 295-303.
- MIYAMOTO, H., RACKER, E. (1982).
Mechanism of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum.
J. Membr. Biol., 66, 193-201.
- MIYAZAKI, S., OHMORI, H., SASAKI, S. (1975).
Action potential and nonlinear current-voltage relation in starfish oocytes.
J. Physiol., London, 246, 37-54.
- MIYAZAKI, S., TAKAHASHI, K., TSUDA, K. (1972).
Calcium and sodium contributions to regenerative responses in the embryonic excitable cell membrane.
Science, 176, 1441-1443.
- MOBLEY, B.A. (1979).
Chloride and osmotic contractures in skinned frog muscles.
J. Membr. Biol., 46, 315-329.
- MOBLEY, B.A. (1982).
Chloride and osmotic contractions in skinned frog muscles.
J. Membr. Biol., 66, 193-210.
- MORII, H., TONOMURA (1983).
The gating behavior of a channel for Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in fragmented sarcoplasmic reticulum.
J. Biochem. Tokyo, 93, 1271-1285.

- MOUNIER, Y., VASSORT, G. (1975).
Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions.
J. Physiol., London, 251, 589-608.
- NAGASAKI, K., KASAI, M. (1983).
Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence.
J. Biochem. Tokyo, 94, 1101-1109.
- NAITOH, Y., KANEKO, H. (1972).
Reactivated triton-extracted models of Paramecium : modification of ciliary movement by calcium ions.
Science, N.Y., 176, 523-524.
- NAKAJIMA, Y., ENDO, M. (1973).
Release of calcium induced by "depolarization of the sarcoplasmic reticulum membrane."
Nature New Biol., 246, 216-218.
- NICOLA, S.L., SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1980).
Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 305, 87-96.
- OBA, T., HOTTA, K. (1984).
Transient tension development induced by silver ion in Ca²⁺ channel blocked skeletal muscle fibers.
Jap. J. Physiol., 34, 187-191.
- OETLIKER, H. (1982).
An appraisal of the evidence for a sarcoplasmic reticulum membrane potential and its relation to calcium release in skeletal muscle.
J. Muscle Res. Cell. Motil., 3, 247-272.
- OGAWA, Y. (1970).
Some properties of fragmented frog sarcoplasmic reticulum with particular reference to its response to caffeine.
J. Biochem., 67, 667-683.

- OGAWA, Y., EBASHI, S. (1976).
Ca-releasing action of β , -methylene adenosine triphosphate on
fragmented sarcoplasmic reticulum.
J. Biochem. Tokyo, 80, 1149-1157.
- OHNISHI, S.T. (1981).
Calcium induced calcium release as a gated calcium transport.
In : The Mechanism of Gated Calcium transport Across Biological
Membranes, edited by S.T. Ohnishi and M. Endo, New-York : Academic,
275-293.
- OKAMOTO, H., TAKAHASHI, K., YOSHII, M. (1976).
Two components of the calcium current in the egg cell membrane of
the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate.
J. Physiol., London, 255, 527-561.
- ONEAL, S.G., RHOADS, D.B., RACKER, E. (1979).
Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and other
ATPases.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 89, 845-850.
- ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H., BRANDT, P.W. (1974).
Calcium binding and tension development in detergent-treated
muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 63, 168-186.
- PEACHEY, L.D. (1965).
The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of frog sartorius.
J. Cell. Biol., 25, 209-231.
- PEACHY, L.D. (1967).
Membrane systems of crab fibers.
Amr. Zool., 7, 505-513.
- PLANT, T.D., STANDEN, N.B. (1982).
Effect of injection of EGTA/Ca buffers on calcium currents in
Helix aspersa neurones.
J. Physiol., London, 329, 29 P.
- POLEDNA, J., ZACHAROVA, D., HENCEK, M. (1983).
The effect of temperature on ionic currents in the muscle membrane
of the crayfish.
Gen. Physiol. Biophys., 2, 129-132.

- POLEDNA, J., ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. (1978).
Electrical properties of the surface and the T system membranes
determined from the voltage transients.
Biologia (Bratislava), 33, 12, 929-938.
- RACKER, E., BELT, J.A., CARLEY, W.W., JOHNSON, J.H. (1980).
Studies on anion transporters.
Ann. N.Y. Acad. Sci, 341, 27-36.
- REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, H., GRUNDFEST, H. (1967).
Excitation-contraction coupling in crayfish.
Am. Zool., 7, 623-645.
- REUTER, H. (1973)
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Progress in biophysics and molecular biology, 26, 1-43.
- REUTER, H. (1983).
Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs.
Nature, 301, 569-574.
- REUTER, H., SCHOLZ, H. (1977).
The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by
adrenaline.
J. Physiol. London, 264, 49-62.
- RINALDI, M.L., CAPONY, J.P., DEMAILLE, J.G. (1982).
The cyclic AMP-dependent modulation of cardiac slow calcium channels.
J. Mol. Cell. Cardiol., 14, 279-289.
- ROSENBLUTH, J. (1969).
Sarcoplasmic reticulum of an unusually fast-acting crustacean muscle.
J. Cell. Biol., 42, 543-547.
- RUSSELL, J.T., BEELER, T., MARTONOSI, A. (1979 a).
Optical probe responses on sarcoplasmic reticulum Oxocarboxyanines.
J. Biol. Chem., 254, 2040-2046.
- RUSSEL, J.T., BEELER, T., MARTONOSI, A. (1979 b).
Optical probe responses on sarcoplasmic reticulum. Merocyanine and
oxonol dyes.
J. Biol. Chem., 254, 2047-2052.



- SABADINI, R.A., OKAMOTO, V.R. (1983).
The distribution of ATPase activities in purified transverse tubular membranes.
Arch. Biochem. Biophys., 223, 107-119.
- SALAMA, G., ABRMSON, J. (1984).
Silver ions trigger Ca^{2+} release by acting at the apparent physiological release site in sarcoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem., 259, 13363-13369.
- SALKOFF, L.B., WYMAN, R.J. (1983).
Ion currents in *Drosophila* flight muscles.
J. Physiol., London, 337, 687-709.
- SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1978).
Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog.
J. Physiol., London, 283, 197-209.
- SANCHEZ, J.A., STEFANI, E. (1983).
Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog.
J. Physiol., London, 337, 1-17.
- SCALES, D.J., SABADINI, R.A. (1979).
Microsomal T system. A stereological analysis of purified microsomes derived from normal and dystrophic skeletal muscle.
J. Cell. Biol., 83, 33-46.
- SCARPA (1978).
Measurement of cation transport with metallochromic indicators.
Methods Enzymol., 56, 301.
- SCHNEIDER, M.F. (1981).
Membrane charge movement and depolarization-contraction coupling.
Ann. Rev. Physiol., 43, 507-517.
- SCHUURMANS STEKHOVEN, F., BONTIG (1981).
Transport adenosine triphosphatases : properties and functions.
Physiol. Rev., 61, 1-76.
- SEYAMA, I. (1979).
Characteristics of the anion channel in the sino-atrial node cell of the rabbit.
J. Physiol., London, 294, 447-460.

- SHAMOO, A.E., MACLENNAN (1974).
A Ca^{2+} dependent and selective ionophore as part of the $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ dependent adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 71, 3522-3526.
- SHEU, S.S., BLAUSTEIN, M.P. (1983).
Effects of calcium on membrane potential and sodium influx in barnacle muscle fibers.
Amer. Physiol. Soci., C297-C302.
- SHEN, S., STEINHARDT, R.A. (1976).
Electrophysiological study of the membrane properties of the immature and mature oocyte of the batstar, *Patiria miniata*.
Dev. Biol., 48, 148-162.
- SOMLYO, A.V. (1979).
Bridging structures spanning the junctional gap at the triad of skeletal muscle.
J. Cell. Biol., 80, 743-750.
- SOMLYO, A.V., GONZALES-SERRATOS, H.G., SHUMAN, H., SOMLYO, A.P. (1981).
Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle : an electron-probe study.
J. Cell. Biol., 90, 577-594.
- SOMMER, J.R. (1982).
The anatomy of the sarcoplasmic reticulum in vertebrate muscle : its implications for excitation-contraction coupling.
Z. Naturforsch. Teil, C37, 665-678.
- SORENSEN, M.M. (1983).
Calcium control of passive permeability to calcium in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biol. Chem., 258, 7684-7690.
- SPERLAKIS, N. (1984).
Hormonal and neurotransmitter regulation of Ca^{2+} influx through voltage-dependent slow channels in cardiac muscle membrane.
Memb. Biochem., 5, 131-166.

- STANDEN, N.B., STANFIELD, P.R. (1978).
A mechanism for the fall in resting potassium conductance of
frog skeletal muscle fibres occurring under extreme hyperpolarization.
J. Physiol., London, 282, 18-19 P.
- STANFIELD, P.R. (1970).
The effect of the tetraethylammonium ions on the delayed currents
of frog skeletal muscle.
J. Physiol., London, 209, 209-229.
- STEFANI, E., CHIARANDINI, D.J. (1982).
Ionic channels in skeletal muscle.
Ann. Rev. Physiol., 44, 357-372.
- STEPHENSON, E.W. (1981).
Activation of fast skeletal muscle : contribution of studies on
skinned fibers.
Am. J. Physiol., 240, C1-C19.
- STEPHENSON, E.W. (1982).
The role of free calcium ion in calcium release in skinned muscle
fibers.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 60, 417-426.
- STEPHENSON, E.W., PODOLSKY, R.J. (1977).
Influence of Mg on chloride induced calcium release in skinned
muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 69, 17-35.
- SUAREZ-KURTZ, G. (1982).
The role of calcium in excitation-contraction coupling in crustacean
muscle fibers.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 60, 446-458.
- SUAREZ-KURTZ, G., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1972).
Membrane calcium activation in excitation-contraction coupling.
J. Gen. Physiol., 59, 676-688.

- SUAREZ-KURTZ, G., SORENSON, A.L. (1979).
Dissociation of action potentials from contraction in single crab muscle fibers.
Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 3029-3030.
- SULAKHE, P.V., ST. LOUIS, P.J. (1976).
Membrane phosphorylation and calcium transport in cardiac and skeletal muscle membranes.
Gen. Pharmac., 7, 313-319.
- TADA, M., KATZ, A.M. (1982).
Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma.
Annu. Rev. Physiol., 44, 401-423.
- TAKAGI, A. (1971).
Lipid composition of sarcoplasmic reticulum of Human skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 248, 12-20.
- TILLOTSON, D., (1979).
Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 76, 1497-1500.
- THORENS, S., ENDO, M. (1975).
Calcium induced calcium release and "depolarization" induced calcium release : then physiological significance.
Proc. Japn. Acad., 51, 473-478.
- THOMPSON, S.H. (1977).
Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones.
J. Physiol., London, 265, 465-488.
- TOMITA, T. (1975).
Electrophysiology of mammalian smooth muscle.
Prog. Biophys. molec. Biol., 30, 185-203.
- VASSORT, G. (1973)
Influence of sodium ions on the regulation of frog myocardial contractility.
Pflügers Arch., 339, 225-240.

- VASSORT, G., ROUGIER, O. (1972).
Membrane potential and slow inward current dependence of frog cardiac mechanical activity.
Pflügers Arch., 331, 191-203.
- WARNER, A.E. (1972).
Kinetic properties of the chloride conductance of frog muscle.
J. Physiol., London, 227, 291-312.
- WEBER, A. (1966).
Energized calcium transport and relaxing factors.
Curr. Top. Bionerg., 1, 203-254.
- WEBER, A. (1968).
The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum.
J. Gen. Physiol., 52, 760-772.
- WEBER, A., HERZ, R. (1968).
The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum.
J. Gen. Physiol., 52, 750-759.
- WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1966).
Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum.
Biochem. Z., 345, 329-369.
- WHITE, M.M., MILLER, C. (1979).
A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*.
J. Biol. Chem., 254, 10161-10166.
- WINEGRAD, S. (1982).
Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum.
Ann. Rev. Physiol., 44, 451-462.
- WOLLENBERGER, A., WILL, H. (1978).
Protein kinase-catalyzed membrane phosphorylation and its possible relationship to the role of calcium in the β -adrenergic regulation of cardiac contraction.
Life Sci., 22, 1159-1178.

- YAMOMOTO, N., KASAI, M. (1981).
Kinetic analysis of the inhibition of anion transport in sarcoplasmic reticulum vesicles by a disulfonic stilbene derivative : Measurement of the change in chloride-diffusion potential by using a fluorescent cyanine dye.
J. Biochem. Tokyo, 89, 1521-1531.
- YAMOMOTO, N., KASAI, M. (1982 a).
Characterization of the Ca^{2+} -gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biochem. Tokyo, 92, 465-476.
- YAMOMOTO, N., KASAI, M. (1982 b).
Mechanism and function of the Ca^{2+} -gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biochem. Tokyo, 92, 485-496.
- YAMAMOTO, N., KASAI, M. (1982).
Kinetics of the actions of caffeine and procaine on the Ca^{2+} -gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biochem. 92, 477-484.
- YAMOMOTO, T., TAKISAWA, H., TONOMURA, Y. (1979).
Reaction mechanism for ATP hydrolysis and synthesis in the sarcoplasmic reticulum.
Curr. Top. Bioenerg., 9, 179-236.
- YANAGIHARA, K., IRISAWA, H. (1980).
Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sino atrial node cell.
Pflügers Arch., 385, 11-19.
- YELLEN, G. (1982).
Single Ca^{2+} -activated nonselective cation channels in neuroblastoma.
Nature, 296, 357-359.
- ZAHRADNIK, I., ZACHAR, J. (1982).
Calcium currents in the muscle membrane of the crayfish in K^{+} -free internal environment.
Gen. Physiol. Biophys., 1, 457-461.
- ZIMNIAK, P., RACKER, E. (1978).
Electrogenicity of Ca^{2+} transport catalyzed by the Ca^{2+} ATPase from sarcoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem., 253, 4631-4637.

ANNEXE

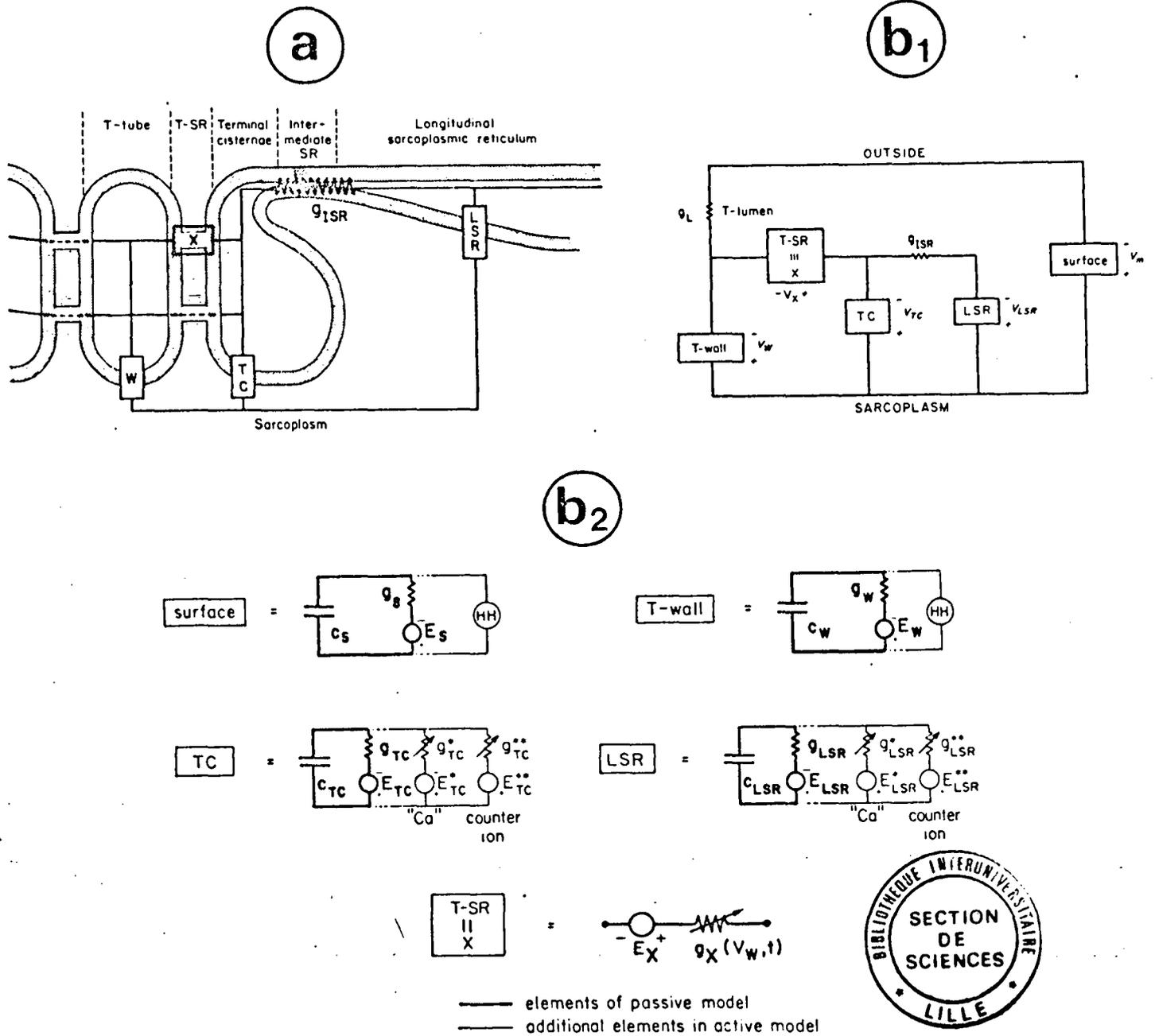


Figure 28 : a - circuit membranaire du modèle. Schéma membranaire représentant la membrane tubulaire (W) en relation avec la citerne terminale (TC) et le réticulum sarcoplasmique longitudinal (LSR). X est la conductance entre W et TC. b₁ et b₂ - Descriptions des différents circuits membranaires équivalents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