**Biologie cellulaire TD Semestre 5**

La mesure des flux ioniques

Toutes les cellules reçoivent et transmettent des signaux ioniques, à travers des canaux, de part et d’autre de la membrane. Ils ont le même fonction que les ports.

Ils sont rencontrés au niveau de la membrane plasmique, mais aussi au niveau de l’enveloppe nucléaire, de la mitochondrie, des membranes de RE.

Les cellules végétales les présentent dans les vacuoles, les protoplastes (révélés par la digestion de la membrane pectocellulosique).

// Voir tableau historique

# La technique de Voltage imposé

## Principe :

// Voir schéma

Il consiste à maintenir le potentiel de membrane d’une cellule à une valeur constante. Tout cellule vivante présente un potentiel de membrane au repos (-80 mV pour neurone, -50 mV pour cellule musculaire lisse de vaisseau). Il est donc caractéristique de toute cellule vivante.

Quand on le stabilise, on le « clampe ». Le potentiel ne varie plus, sauf si l’on veut le faire varier.

// Voir cours Jean.

On place 2 électrodes intracellulaires, une première est connectée à un circuit électronique, qui permet d’envoyer une stimulation. On applique une stimulation de référence. L’électrode inférieure est connectée au circuit électronique, et mesure Vm, le potentiel de membrane.

Les 2 électrodes (inférieure et supérieure) sont reliées entre elles par une branche de circuit électrique, elles sont indirectement en connexion, via le circuit de mesure.

Quand on va vouloir stimuler la préparation, la valeur de stimulation va être comparée de manière instantanée et continue avec la valeur de potentiel membranaire de la préparation. Pour maintenir constant le potentiel dans la préparation, il faut comparer les 2 potentiels.

Exemple : Si l’on veut stimuler de 20 mV (Vref = ΔV = 20 mV). On part de -80, et on amène à -60. Il faut que ce changement soit bien perçu. Quand on atteint -60, si la préparation n’a réellement que -50, on renvoie une stimulation.

Une troisième électrode, extracellulaire, mesure du courant, Im, courant membranaire. C’est le courant qui va traverser la membrane de l’axone au niveau transmembranaire, et qui passe obligatoirement par les canaux ioniques. C’est ainsi qu’on appréhende le courant lié aux canaux ioniques.

C’est le principe de base développé sur axone de calmar.

## Expérience de voltage imposé standard

Dans le cas d’une préparation plus petite, on utilise des micro-électrodes.

// Voir figure 1

On stimule à -60 mV, pour la deuxième à -40, puis 20, et ainsi de suite jusqu’à +80 mV. Im est représenté sur les enregistrements. Le courant est en mA/cm2, donc en fonction de la surface membranaire, et il est stimulé en fonction du temps.

Le courant mesuré va évoluer selon les stimuli. Quand on stimule de manière croissante, on obtient une réponse, de plus en plus ample. Par convention, quand on a un courant positif, donc supérieur à 0, c’est un courant sortant de cations, et quand il est négatif, entrant de cations, dirigé vers le bas. Pour les anions, c’est l’inverse, vers le haut un courant entrant d’anions, et vers le bas un courant sortant d’anions.

A +20 mV, on a en début de stimulus un courant entrant, qui disparaît, et devient sortant majoritairement.

Par la technique de voltage imposé, on mesure un courant **global**. Il correspond au fonctionnement de l’ensemble des canaux ioniques de la surface membranaire, donc on voit par cette technique que l’on n’est pas capable de discriminer les différentes catégories de canaux.

On peut jouer avec des inhibiteurs pharmacologiques, par inhibition compétitive, grâce à des venins de serpents, de poissons ou de plantes.

La TTX, tétrodotoxine est l’antagoniste spécifique des canaux Na+. La TEA, tétraéthylammonium bloque les canaux potassiques.

Par l’expérience, on retrouve le courant global, et l’on peut superposer les traces. La TTX révelle les courants **potassiques (K+)**. Le courant sodique est entrant, donc on l’a vers le bas, et le courant potassique est sortant, donc vers le haut. On peut alors voir une seule catégorie de canal, en jouant sur les inhibiteurs pharmacologiques.

# La technique de Patch-clamp

C’est une évolution de la précédente, elle permet de travailler sur n’importe quel type cellulaire et de mesurer les canaux ioniques quelque soit leur localisation.

On isole une parcelle de membrane, grâce à une pipette de verre de taille réduite. On va ensuite mesurer le fonctionnement des canaux, situés sous la pipette de verre, mesuré sur quelques canaux, voir un seul canal.

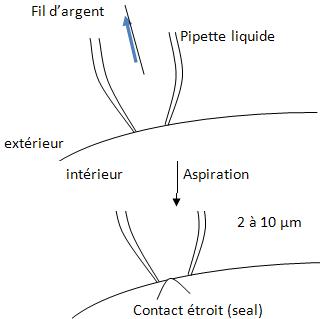
## Les pipettes de verre

// Voir photos

C’est une structure conique, fragile. La pointe fait environ 1 micron de diamètre. L’objectif de cette pipette est d’être posé sur la membrane. Pour éviter de traverser la membrane, on va roder l’extrémité de la pointe, l’arrondir à la chaleur, ce qui permet d’éviter de traverser la membrane cellul

aire. Au contraire, la microélectrode est plantée.

Pour poser cette pipette,



Contact étroit, isolation électrique, augmentation rapport signal/bruit de fond.

## Différentes configurations de la technique

On peut adopter plusieurs configurations de mesure suivant la disposition de la membrane par rapport à la pipette de mesure.

### Configuration « cell-attached » (cellule attachée)

C’est la configuration que l’on obtient en premier, voir schémas. Elle permet de mesurer le fonctionnement d’un ou de quelques canaux, qui sont présents au niveau de la membrane située sous la pipette. On mesure un **courant unitaire**, qui est lié à un canal, dans la condition optimale. L’**intégrité** du milieu intracellulaire n’est **pas perturbée**.

### Configuration « inside-out »

C’est la configuration où l’intérieur de la membrane est situé à l’extérieur. On obtient cette configuration en partant d’une configuration cell-attached, la pipette est soulevée de la cellule, dans une situation où la concentration en calcium est maintenue à un niveau relativement bas. La membrane s’étire et fini par rompre. Dans cette situation, on voit que la face externe de la membrane est à l’intérieur de la pipette, alors que la face interne est à l’extérieur. On mesure encore des **courants unitaires**. La membrane contient un ou quelques canaux. On mesure leur fonctionnement. Ils sont situés sous la pipette de mesure. L’intérêt par rapport à la précédente est qu’ici, **on a accès à la face interne de la membrane et donc des canaux**. On peut alors apporter, dans le milieu de mesure, des seconds messagers. Par exemple, on peut tester l’effet de l’AMPc sur la face interne des canaux. C’est intéressant car de nombreux seconds messagers régulent l’action des canaux.

### Configuration « Whole cell » (cellule entière)

On aspire l’ensemble de la cellule à l’intérieur de la pipette par succion. La pipette est alors en lien direct avec le milieu intracellulaire. On va alors mesurer le fonctionnement de l’ensemble des canaux de la surface membranaire.

On mesure ici un **courant global**.

On va pouvoir **perfuser grâce à la pipette un certain nombre d’agents, qui vont diffuser**. L’inconvénient et que l’on lave le milieu intracellulaire par le milieu intra-pipette. Le volume d’une cellule par rapport au volume du liquide intra-pipette est plus petit. Donc le volume intra-pipette va diffuser, et diluer le milieu intracellulaire, on le dialyse. On perd très rapidement un certain nombre de facteurs intracellulaires, qui seront dilués, et très rapidement, le fonctionnement des canaux ioniques est de plus en plus perturbé.

### Configuration « Outside-Out »

La face externe de la membrane est à l’extérieur. On étire la membrane, qui va se rompre, on va emporter un morceau de membrane, et très rapidement, les morceaux de membrane se ressoudent, et on crée une toute petite vésicule sous la pointe de la pipette, qui va contenir quelques canaux. On mesure alors les courants **unitaires**.

L’intérêt est que dans cette situation, on a accès à la face externe de la membrane. On peut alors y appliquer des agents, pour obtenir les effets de ces agents sur la face externe de ces canaux.

### Configuration de patch perforé

Elle repose sur l’emploi d’antibiotiques ionophores, une catégorie d’antibiotiques qui ont la propriété de créer des pores sur la membrane cellulaire. On retrouve par exemple la mystatine, ou l’amphotericine B. Ces pores formés permettent le passage des ions monovalents, et d’un diamètre inférieur à 10 Å.

On apporte dans le milieu intra-pipette de l’antibiotique ionophore, qui va s’insérer au niveau de la membrane présente sous la pipette de mesure. On ne laisse alors passer que quelques molécules, et on évite la perte de l’AMPc, de l’ATP, présents au niveau intracellulaire. On a alors une configuration qui permet de mesurer un courant **global**, dans laquelle le phénomène de dialyse est contrôlé.

# Les courants ioniques mesurés

Certaines configurations permettent de mesurer le courant unitaire, d’autres le courant global.

## Le courant global

// Voir schéma

On a un enregistrement qui est un courant global, qui travers l’ensemble des canaux qui composent la surface membranaire, comparable au courant mesuré en voltage-clamp. Ce courant global I est exprimé par le résultat du courant qui traverse chacun des canaux (i), multiplié par l’ensemble des canaux présents sur la surface membranaire N.

I = N x i

La formule n’est pas complète, car il faut rajouter un facteur de probabilité P0, qui est la probabilité d’ouverture des canaux. En effet, un canal est une protéine qui a un port. Le port s’ouvre sous l’influence de la stimulation électrique, et on provoque un changement de conformation de la protéine canal. Il est totalement incontrôlable. On peut juste l’évaluer par ce facteur de probabilité. Il est fonction du voltage de stimulation et du temps.

I = N x P0 x i

## Le courant unitaire

C’est le courant que l’on mesure dans les configurations de cellules attachées, d’inside-out ou d’outside-out.

C’est un courant différent du courant global, qui se présente sous la forme de créneaux, d’amplitude très faible. Le courant global est de l’ordre du pA, plus généralement du nA, voir µA. Le courant unitaire est de l’ordre de 1 ou 2 pA.

Le courant part d’un 0, la protéine canal s’ouvre, on atteint un maximum, on est passé d’un état fermé à un état ouvert. On a ensuite maintient de l’état ouvert pendant un certain laps de temps, le canal se referme, pendant un temps court, puis se rouvre, pendant un temps plus long, et ainsi de suite.



La probabilité d’ouverture est dépendante du temps de stimulation, du voltage de stimulation.

i est la conductance du signal (γ), la facilité avec laquelle les ions transitent dans le canal, multiplié par le potentiel Vm, moins le potentiel à l’équilibre de l’espèce ionique qui transite par le canal Eion.

i = γ . (Vm – Eion)

C’est l’équivalent de la loi d’ohm.

# Les évolutions de la technique de Patch-clamp

On a associé cette technique avec d’autres techniques. On a essayé d’étendre l’intérêt de ces mesures.

## Le patch-clamp sur tranches de cerveau

Le problème de la technique de patch-clamp est que l’on travaille sur cellule isolée. C’est limitatif, en particulier pour le cerveau, les neurones du cerveau fonctionnent en réseau, par interconnexion des cellules par les synapses. Donc on ne peut pas étudier ce fonctionnement. On a donc développé la technique de patch sur tranche. On part d’une tranche de cerveau, que l’on obtient en faisant une tranche fine sur un cerveau frais. On travaille pour cela avec un microtome. On se place dans une situation où l’on essaie de garder la tranche vivante.

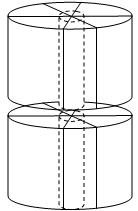
On essaie alors de faire une mesure par technique de patch-clamp sur un neurone. Le problème est que les neurones ne sont pas accessibles, car ils sont emprisonnés entre les cellules gliales et du tissu conjonctif. Il faut donc nettoyer la coupe. On approche dans un premier temps une micropipette dans laquelle on envoie du liquide physiologique à haute pression. On nettoie la coupe en enlevant du tissu conjonctif et toutes les adhérences qui gênent l’accès. On peut alors approcher la pipette de patch.

On fait alors une mesure sur un neurone interconnecté avec d’autres neurones.

Cette technique permet de mesurer le fonctionnement d’un neurone quand il est interconnecté, et donc permet d’appréhender le phénomène d’interconnexion synaptique. On enregistre les courants synaptiques, c’est ce que l’on appelle les PPSE. Signaux synaptiques liés au fonctionnement des récepteurs **canaux**.

## Technique de double patch-clamp

C’est une évolution utilisée quand on veut étudier le fonctionnement de cellules couplées. Quand on cultive des cellules, notamment les cellules cardiaques, établissent des jonctions GAP.



Dans la situation d’une stimulation, on peut mesurer le courant transjonctionnel, et permet de comprendre le fonctionnement des connexines.

## Couplage biologie moléculaire et patch-clamp

On connaît maintenant les gènes qui codent pour les canaux ioniques, on peut les produire artificiellement, et donc on a étudié leur fonctionnement. On a pu comprendre que les protéines canaux sont formées de différentes sous-unités, et on arrive à comprendre dans la séquence protéique, quelles sont les structures qui permettent la fonction de la protéine.

On a pu arriver à cela en couplant les techniques de biologie moléculaire à celle de patch-clamp.

On a placé la protéine qui code pour la protéine canal dans un plasmide. La cellule est un ovocyte (de Xenope), cellule immature, totipotente, qui a la capacité d’exprimer tout ce qu’on va lui envoyer. On fait d’abord une micro-injection du plasmide. L’ovocyte n’a au départ pas de canal ionique. Il va exprimer le gène, les protéines canaux se fixent sur la membrane. On peut alors mesurer le courant avec une technique de patch-clamp, courant plasmique sortant : canaux ioniques sur l’ovocyte.

Si on fait une mutation dans le gène, on voit les modifications.

Chez les mammifères, le principe est le même, mais plus compliqué. Quand la transfection est opérante, les cellules vont exprimer les gènes d’intérêt en même temps que les gènes fluorescents. Il suffit alors de faire une mesure en patch-clamp, on voit encore des courants qui résultent de l’intégration du gène dans la cellule. Ce sont la plupart du temps de cellules CHO, eucaryotes, des cellules Ovariennes de hamster chinois (Ovary Hamster Cells).