

ELECTROPHYSIOLOGIE PRINCIPES ET TECHNIQUES

ijpmc

Fabrice DUPRAT
Chargé de Recherche INSERM
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Université de Nice Sophia-Antipolis

Octobre 2008

Objectifs de ce cours

- **Comprendre le fonctionnement des canaux ioniques.**
- **Comprendre les données présentées dans un article scientifique.**

Lecture des représentations classiques

(courbes courant/potentiel, inactivation, ...)

Signification des paramètres mesurés en électrophysiologie

(conductance, seuil d'activation, probabilité d'ouverture, ctes de temps...)

<http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/cyberfac/index.htm>

Déroulement du cours

Durée du cours

- 4 h sur les principes et techniques de l'Electrophysiologie (F. Duprat).
- 2h sur la pharmacologie des canaux K⁺ (E. Honoré)
- 2 h sur la pharmacologie des canaux Na⁺ (E. Deval)
- 2 h sur la pharmacologie des récepteurs canaux (E. Deval)

Evaluation:

- Etude d'un ou plusieurs cas concrets (articles de littérature scientifique en Anglais).
- Questions de cours sur les principales notions.
- Prévoir un dictionnaire Anglais/Français et une calculatrice.

Plan du cours

LES PHENOMENES ELECTRIQUES EN BIOLOGIE
ETUDE DES PHENOMENES ELECTRIQUES D 'ORIGINE BIOLOGIQUE
TRANSPORTS MEMBRANAIRES
LES CANAUX IONIQUES
NOTIONS DE BIOPHYSIQUE
TECHNIQUES D 'ETUDE: LE POTENTIEL IMPOSE
GATING DES CANAUX IONIQUES
LE PATCH CLAMP
TECHNIQUE D 'ETUDE: LE COURANT IMPOSE
CANAUX ENDOGENES ET EXOGENES
POINTS DE REPERES

A microscopic image of a neural network, showing a dense web of interconnected neurons. The neurons are stained in shades of green and blue, with some cells appearing more brightly green. The overall structure is complex and interconnected, typical of biological tissue.

LES PHENOMENES ELECTRIQUES EN BIOLOGIE

Les phénomènes électriques en biologie

L'anguille électrique



La torpille

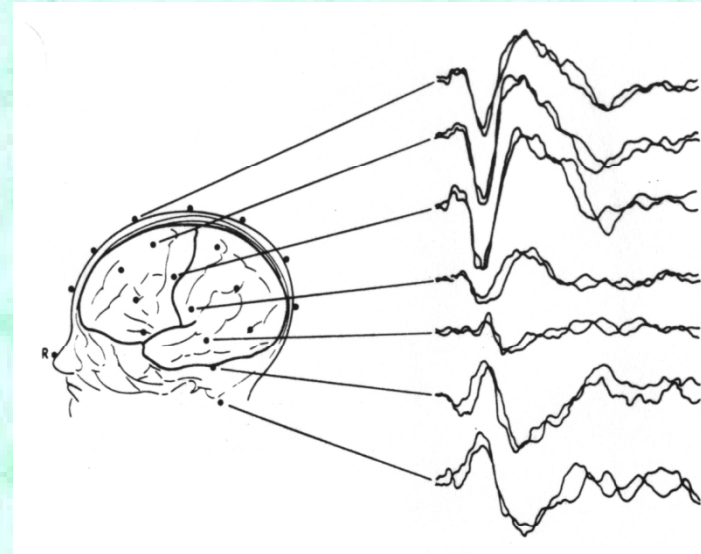


**ETUDE DES PHENOMENES
ELECTRIQUES D 'ORIGINE
BIOLOGIQUE**

Animal entier: EEG

E.E.G.: Electroencephalogramme

Electrodes externes



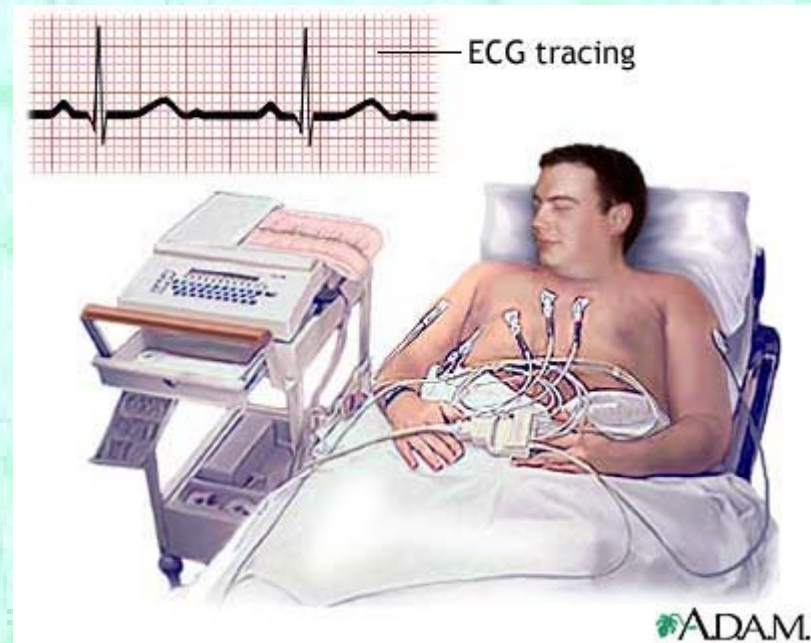
Electrodes implantées



Animal entier: ECG

E.C.G.: Electrocardiogramme

Electrodes externes



Organe entier: coeur

Cœur entier



Cœur isolé perfusé de souris



Electrodes

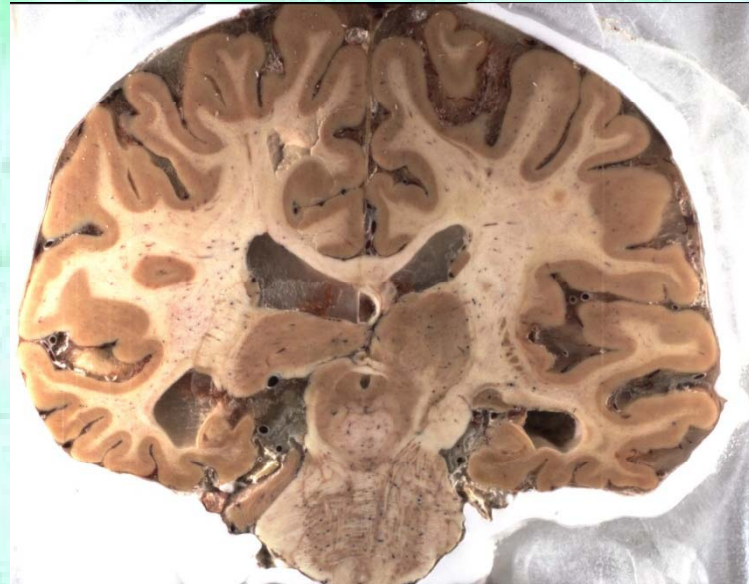
Drici et al Circulation 2002

Organe entier: cerveau

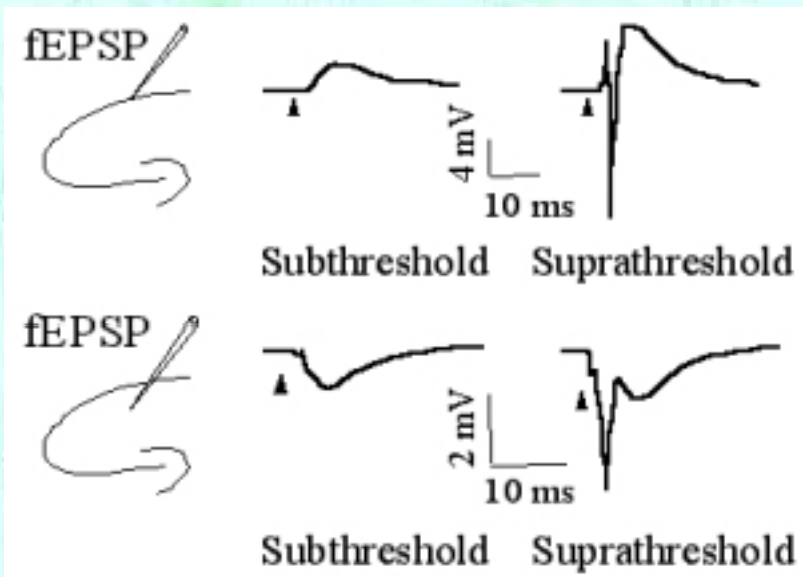
Microélectrodes



Tissus: tranche de cerveau

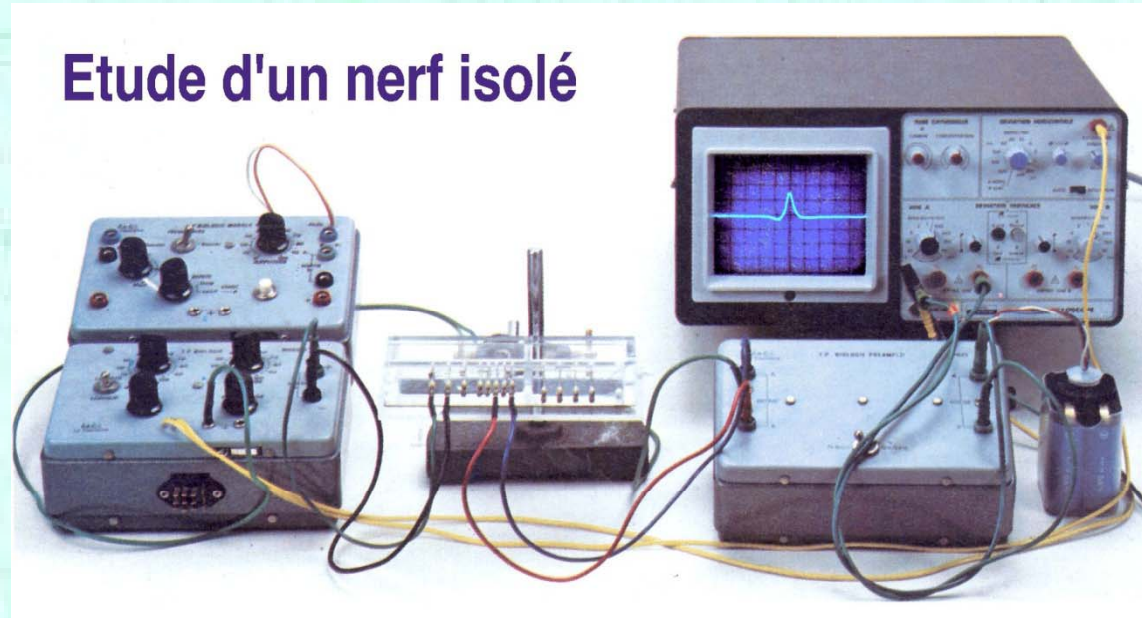


Electrodes



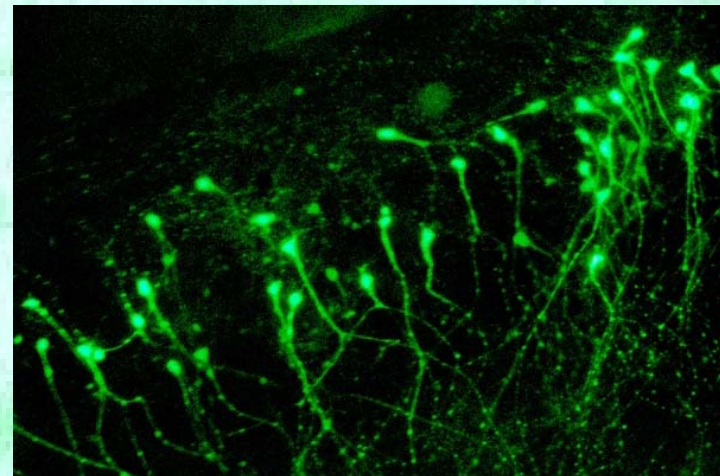
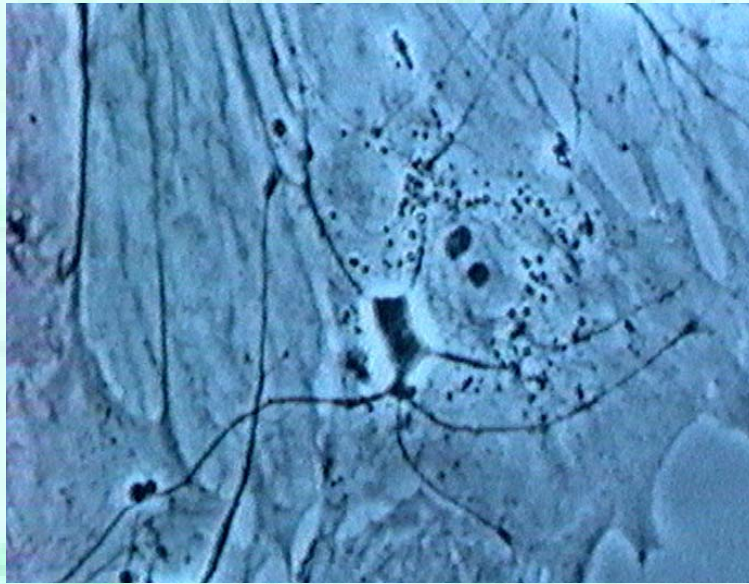
Tissus: nerf isolé

Etude d'un nerf isolé

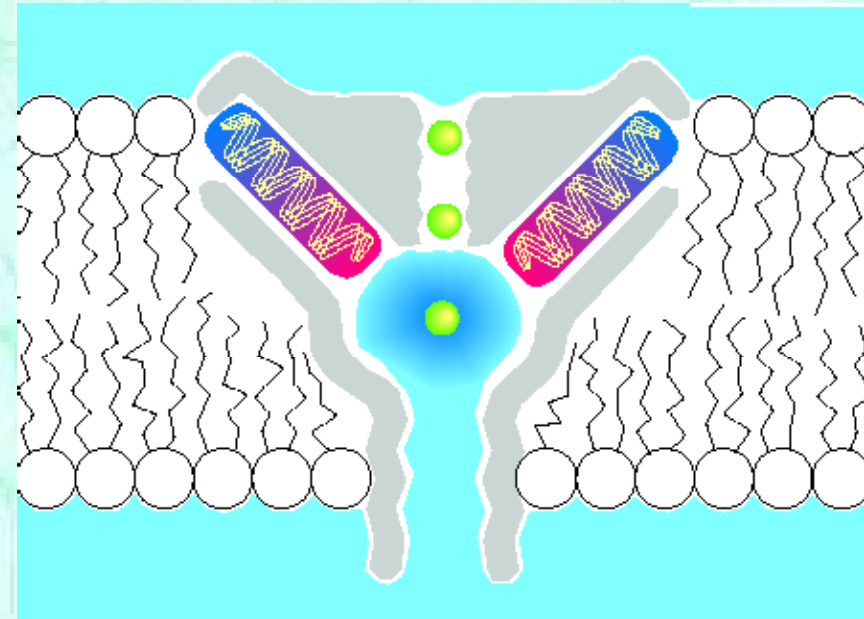
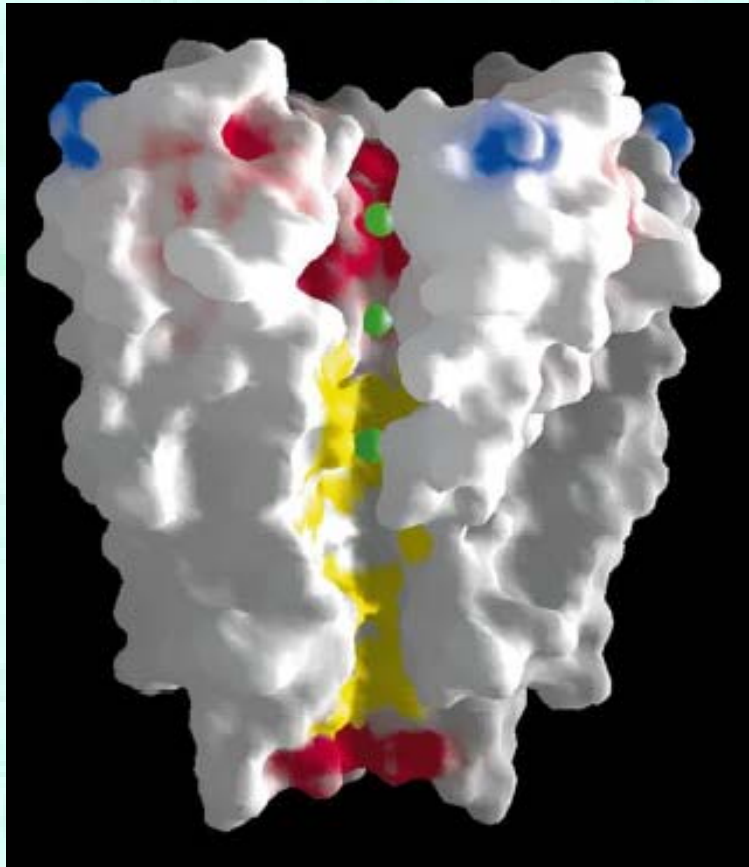


Cellules: Neurones en culture

Microélectrode
Pipette de patch clamp



Protéine canal

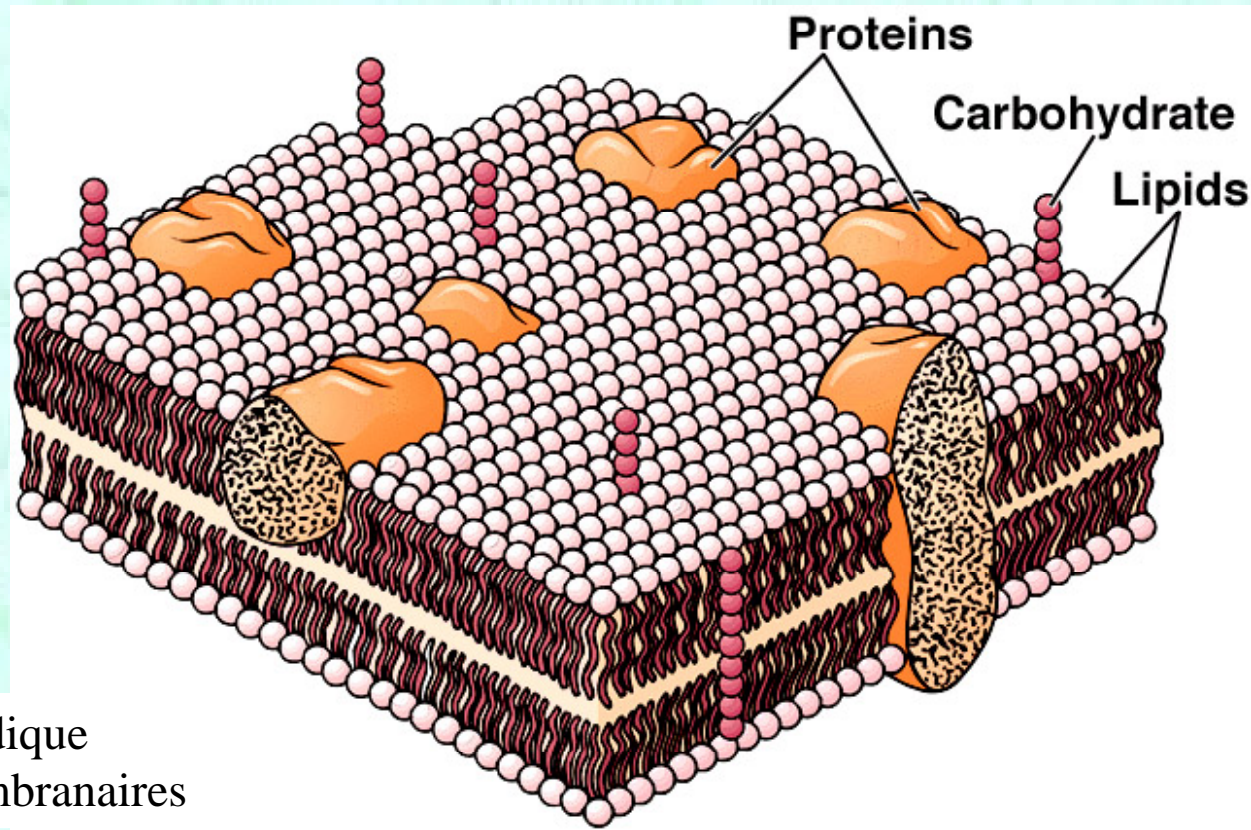


KcsA

Doyle et al., (1998) Science

TRANSPORTS MEMBRANAIRES

Assymétrie de la membrane plasmique

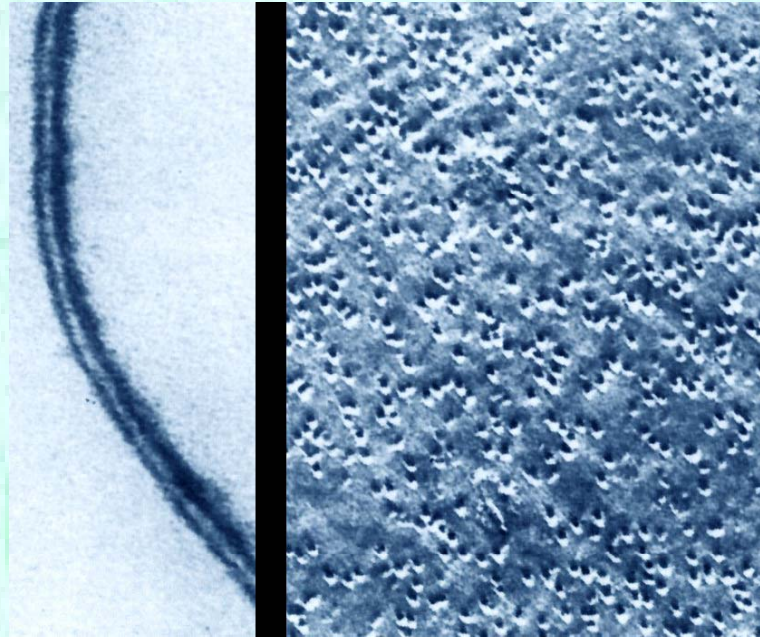


Bicouche lipidique
Protéines membranaires

Concentrations ioniques
dans les cellules de vertébrés

	Interne	Externe
Na⁺	14	140
K⁺	160	3
Ca⁺⁺	10 ⁻⁴	1
Cl⁻	14	150

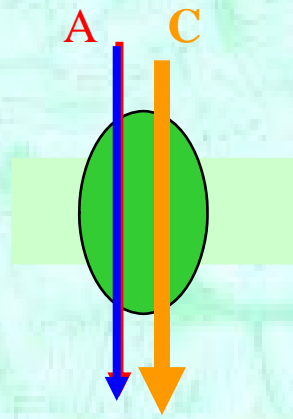
Protéines de la membrane plasmique



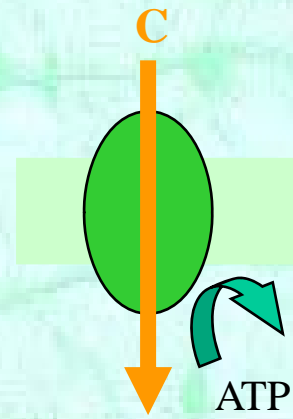
x75000

Notions générales sur les transports membranaires

Transports passifs



Diffusion facilitée



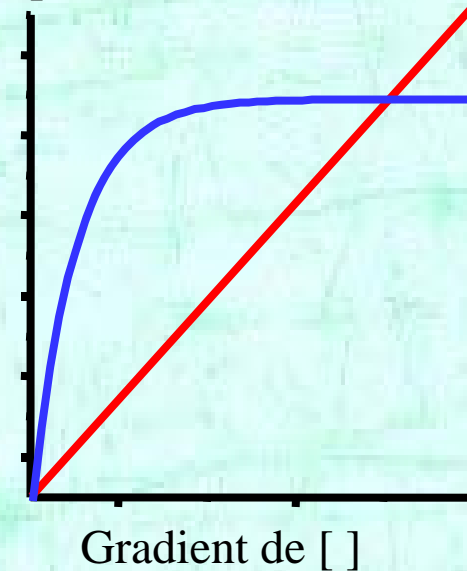
Gradient de [A]



Transports actifs secondaires

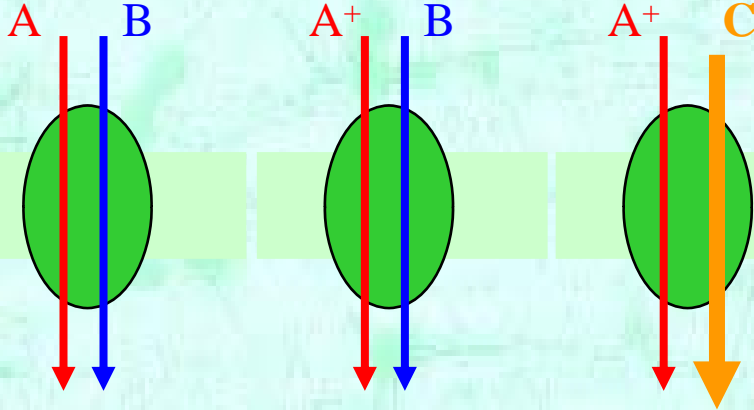
Transports actifs avec consommation d'ATP

Qté transportée



Transports membranaires

Symports

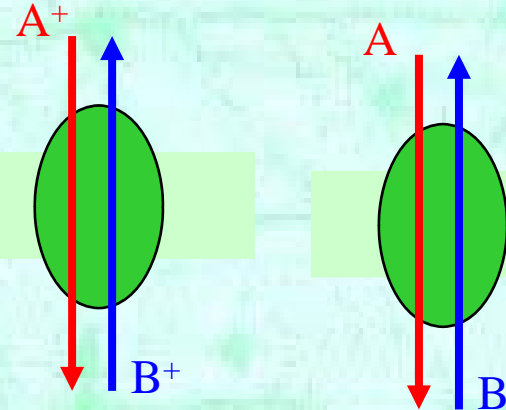


Electroneutre

Electrogène

Electrogène

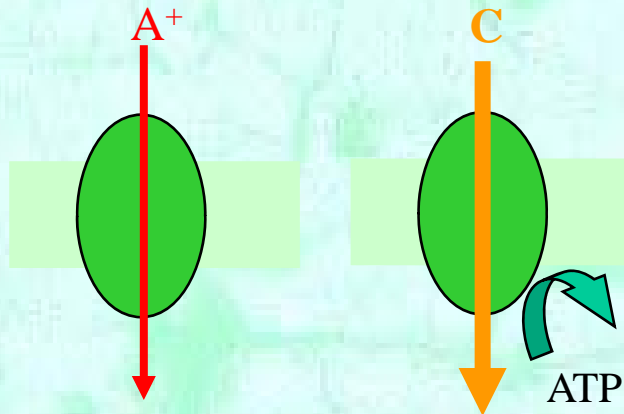
Antiports



Electroneutre

Electroneutre

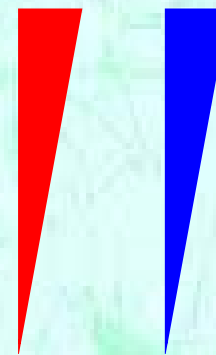
Uniports



Electrogène

Electroneutre

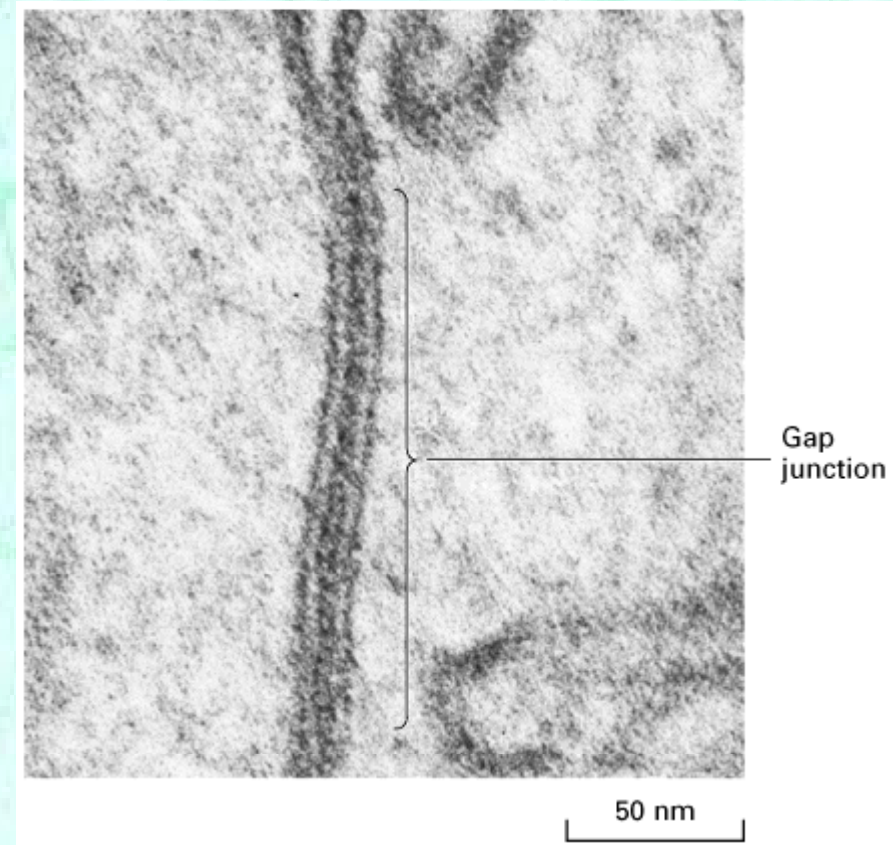
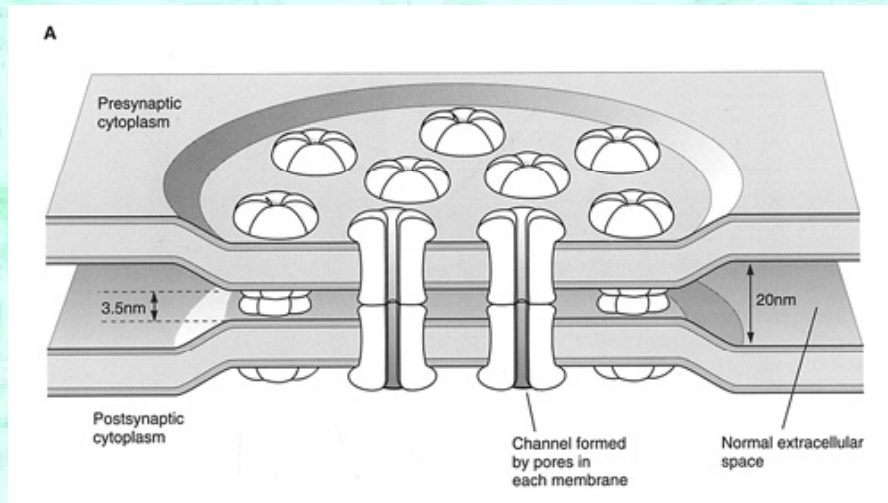
Gradients de A et B



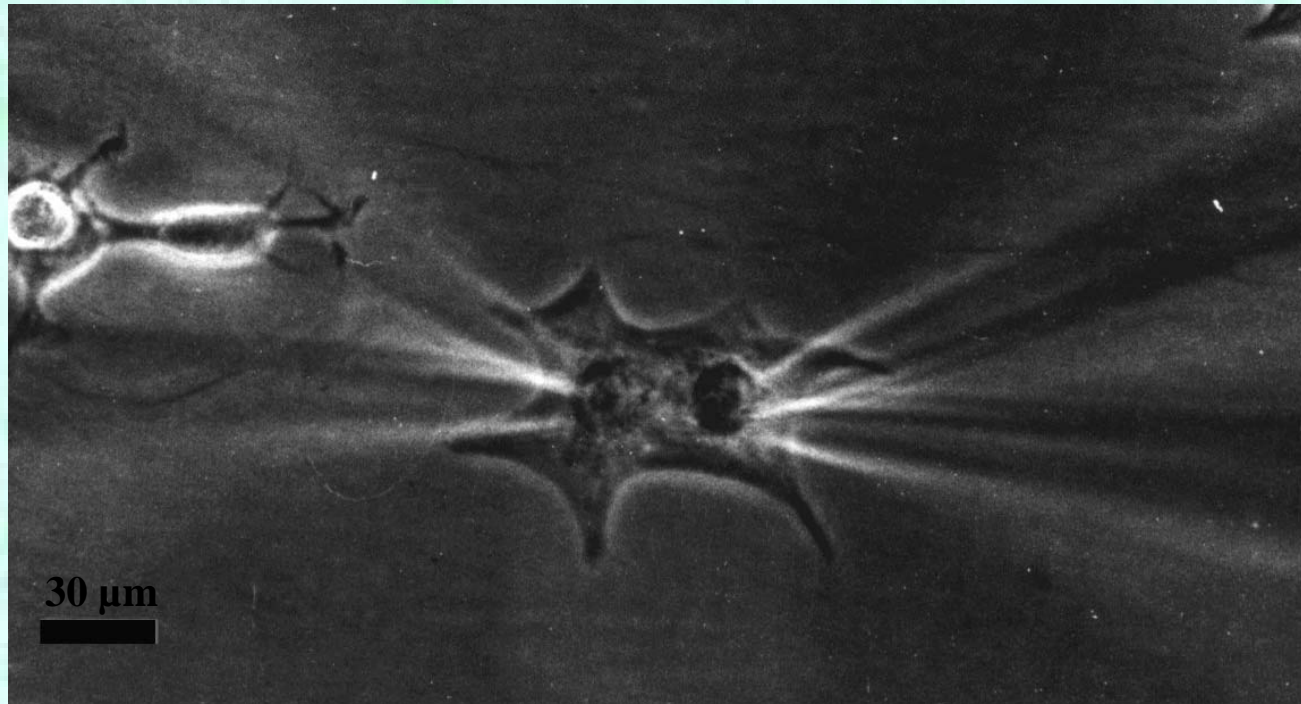
Gradient de C
20



Synapse électrique, jonctions Gap



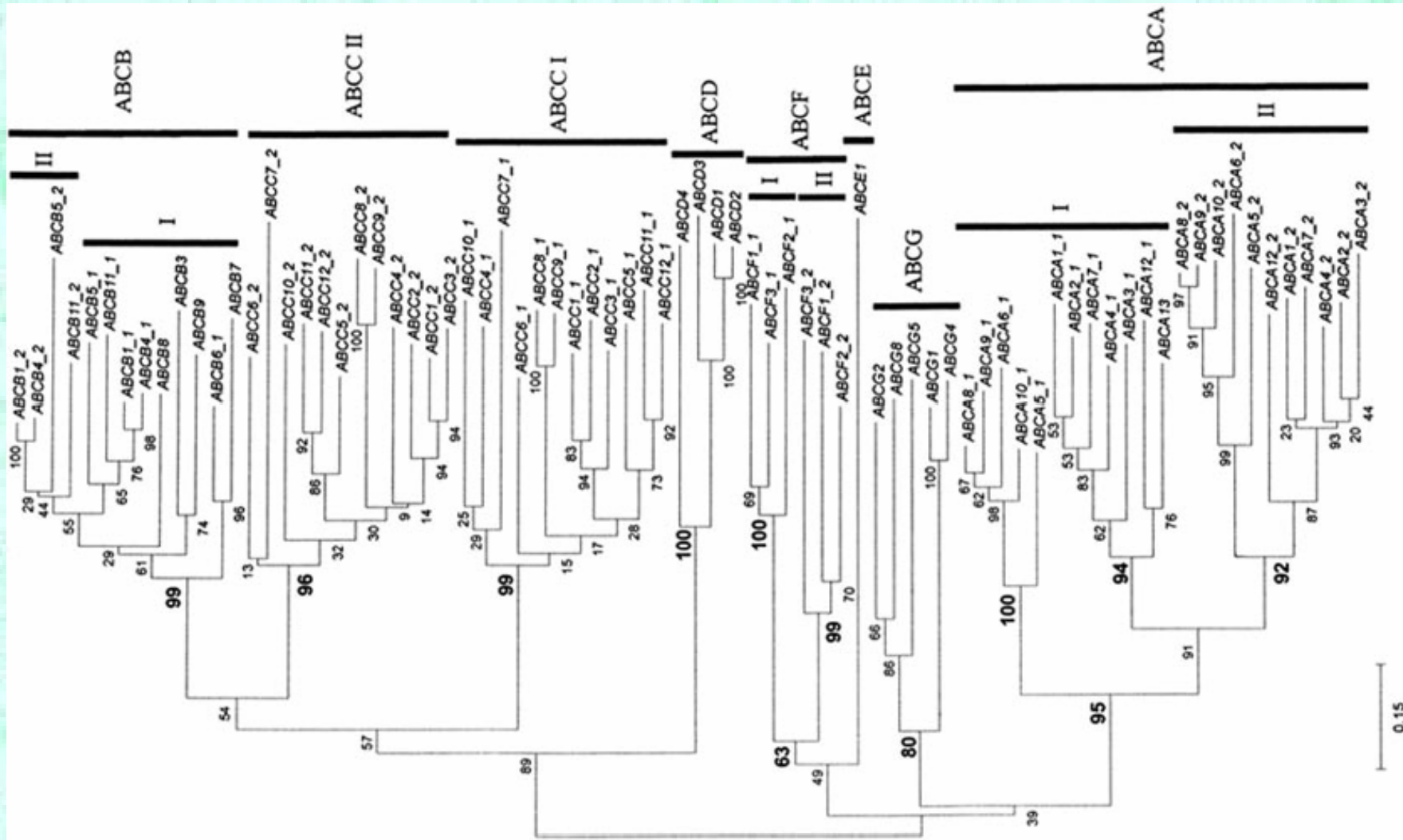
Synapse électrique, jonctions Gap



Transporteurs

- ABC (ATP Binding Cassette) Superfamily
 - family of peptide ABC transporters
 - family of P-glycoproteins :
 - * MDR1a, 1b, 2, 3: organic cation, lipids (PC)
 - * MRP1, 2, 3: organic anions, GSX conjugates
 - * cBAT (canalicular Bile Acid Transporter)
- Facilitator Superfamily
 - OCT (Organic Cation Transporter)
 - RFC (Reduced Folate Carrier)
 - ... (> 1000)

Transporteurs: human ABC genes (49 genes)



Conclusion sur les transports membranaires

Transports électrogènes



Possibilité de mesures électrophysiologiques



Cas des canaux ioniques

LES CANAUX IONIQUES

Les canaux clonés ou exogènes

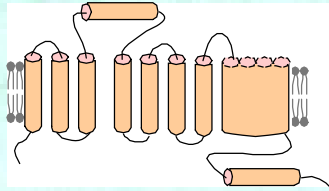
Structure protéique connue

- Nombre de segments transmembranaires
- Homologies de séquence
- Sites consensus
- Réalisation d'anticorps, d'antisens, de sonde d'hybridation, ...

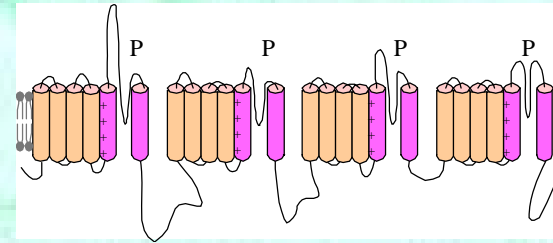


Superfamilles des canaux clonés

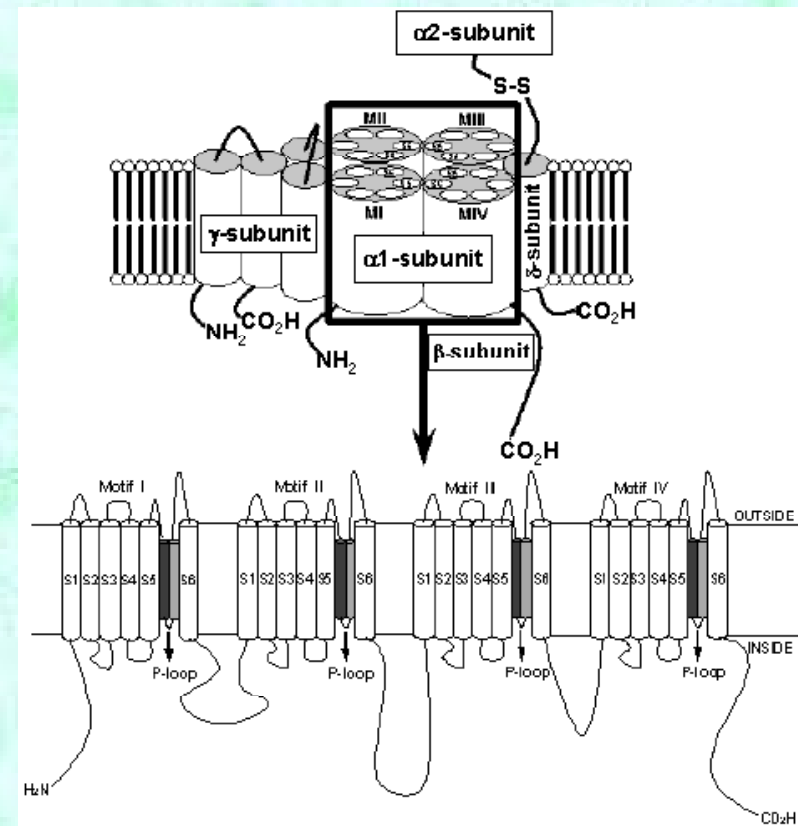
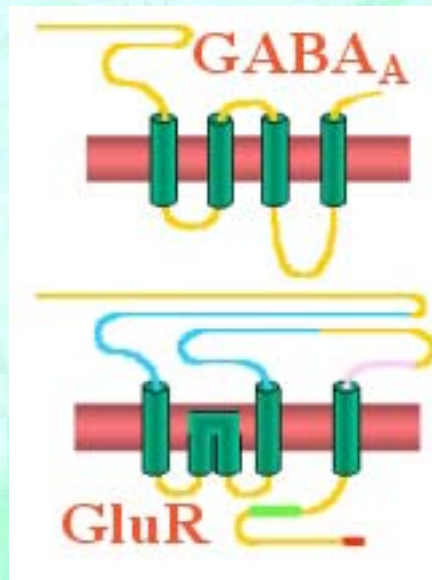
Canaux Cl⁻



Canaux Na⁺

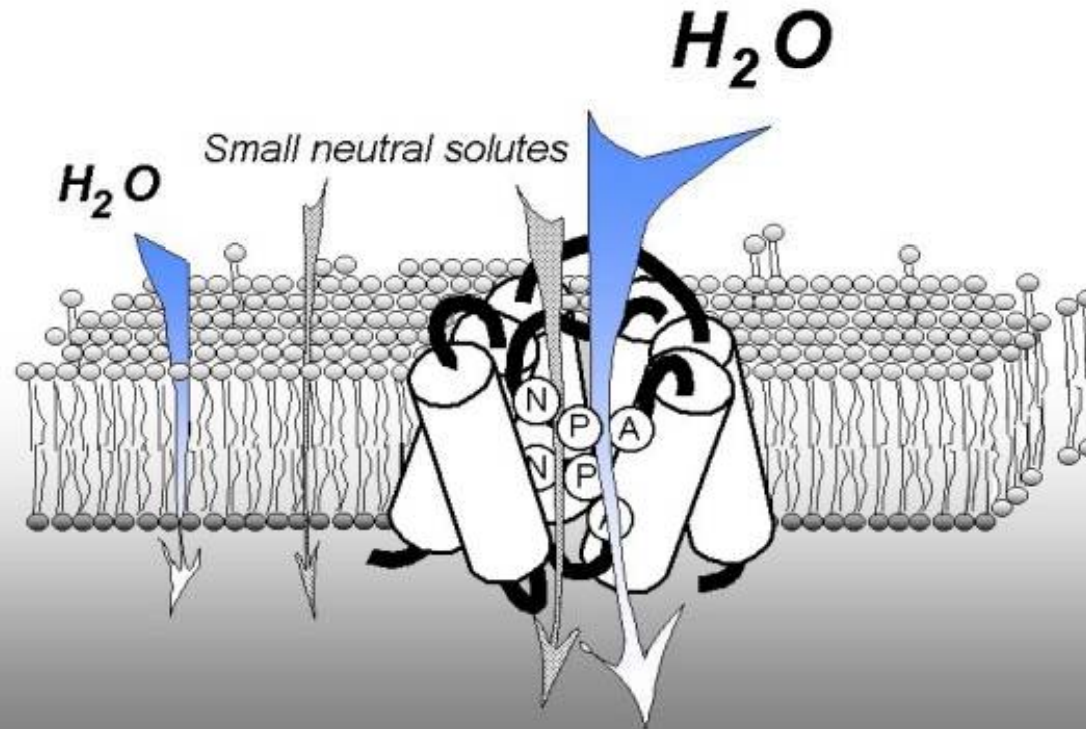


Récepteurs canaux

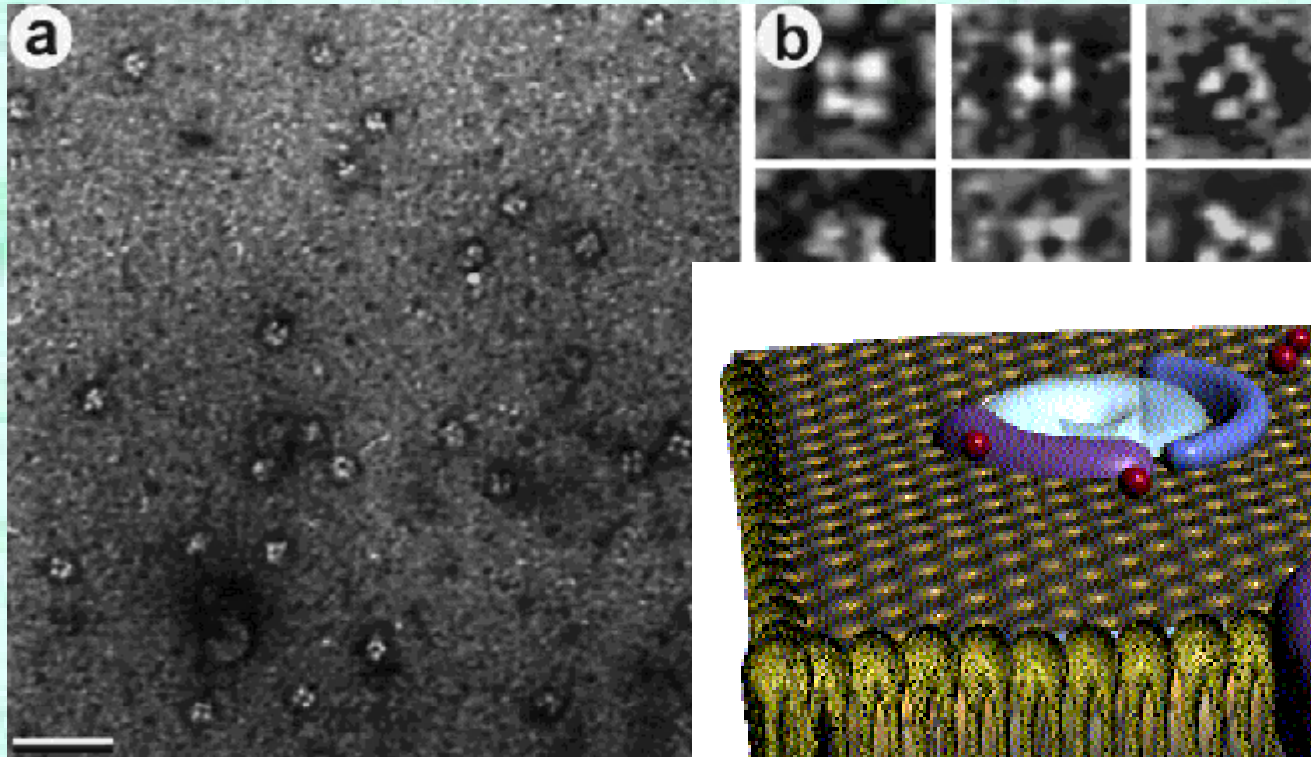


Porines superfamily

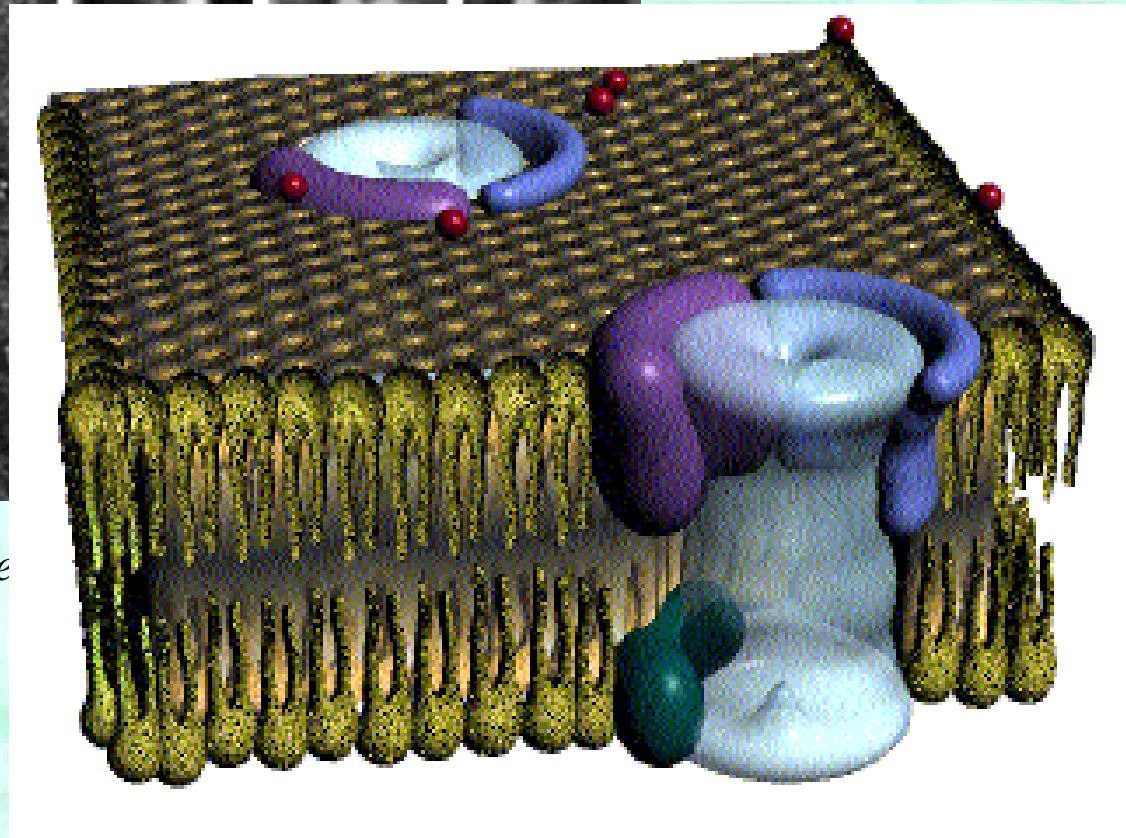
Aquaporins (18 genes)



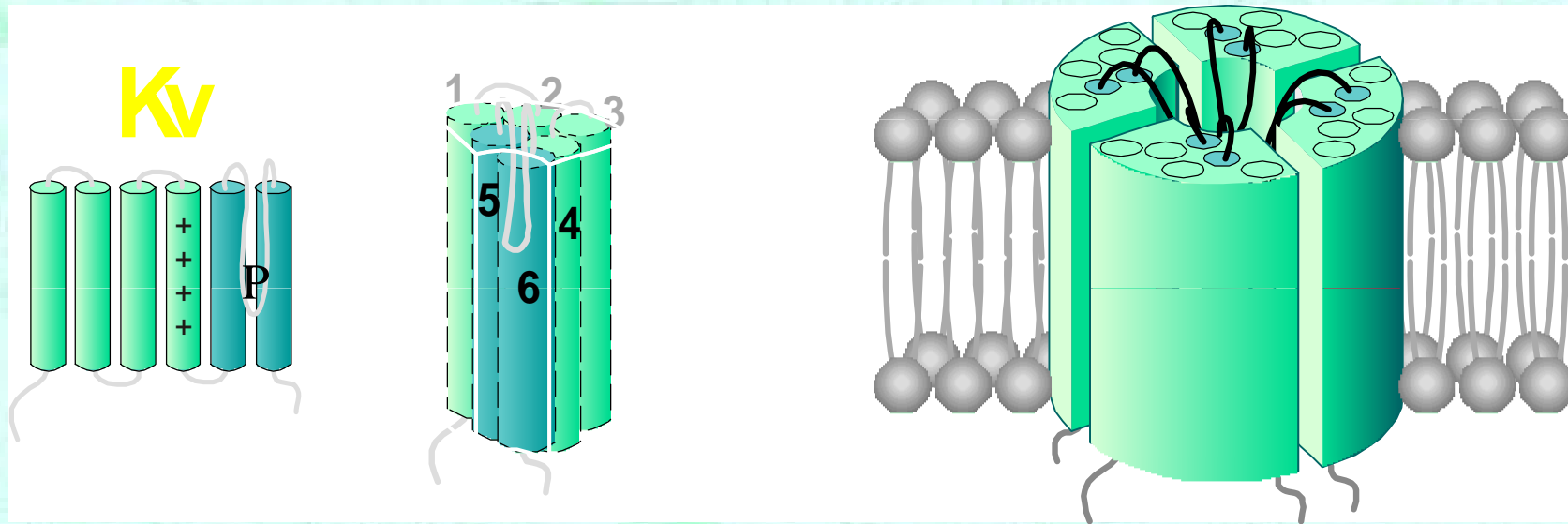
Sous unités auxiliaires: Kv β 2



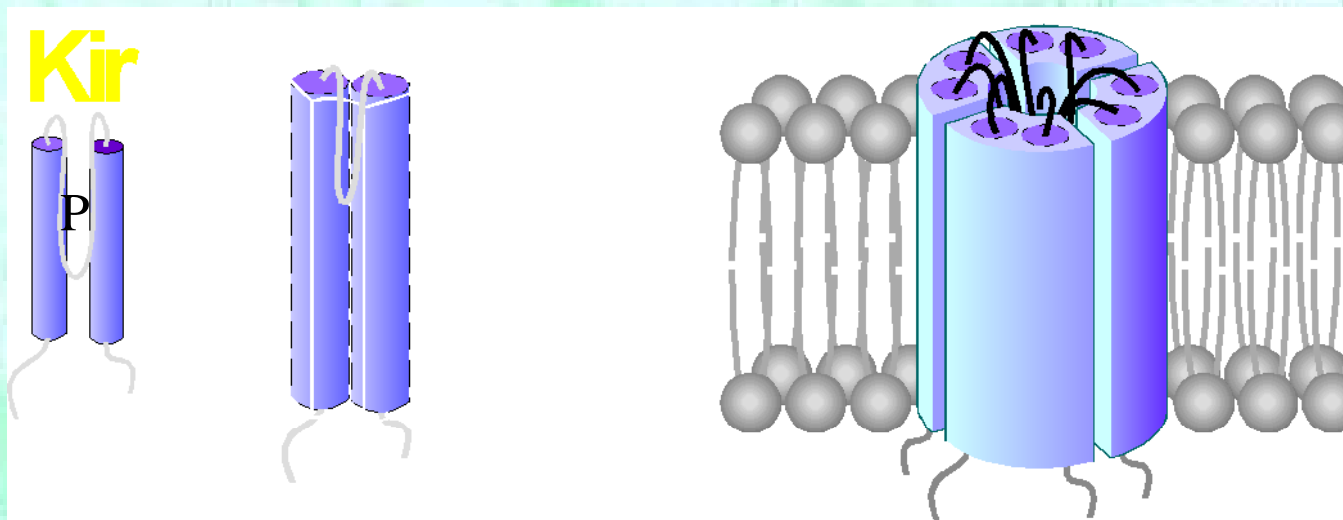
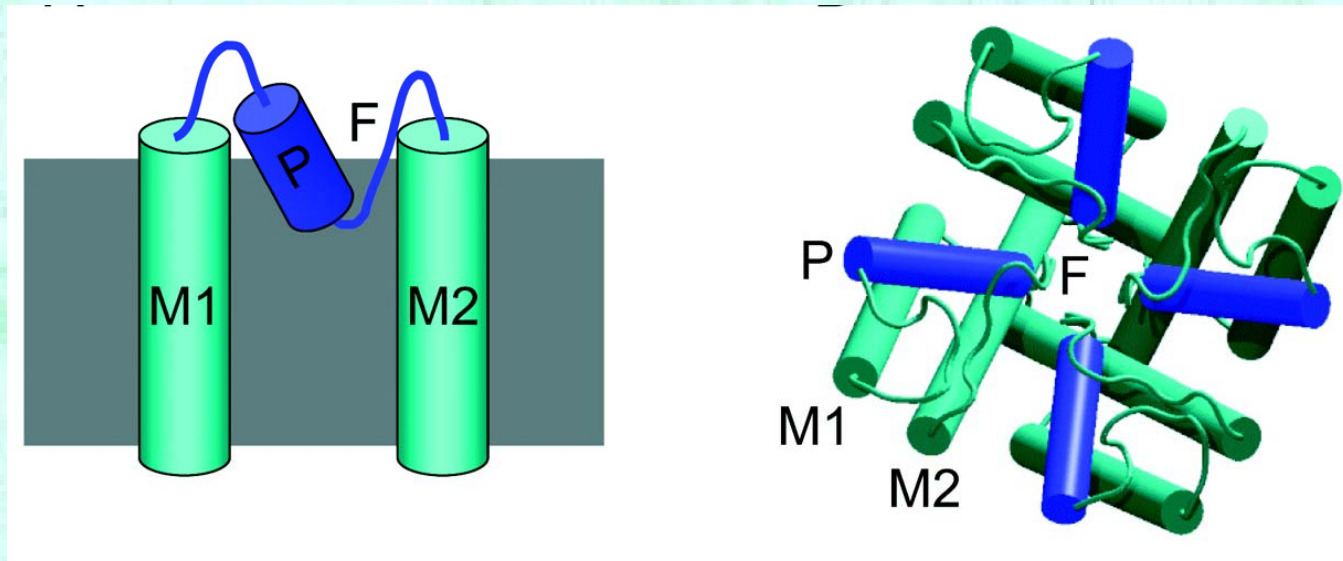
Van Huizen et al. 1999, FEBS Lett



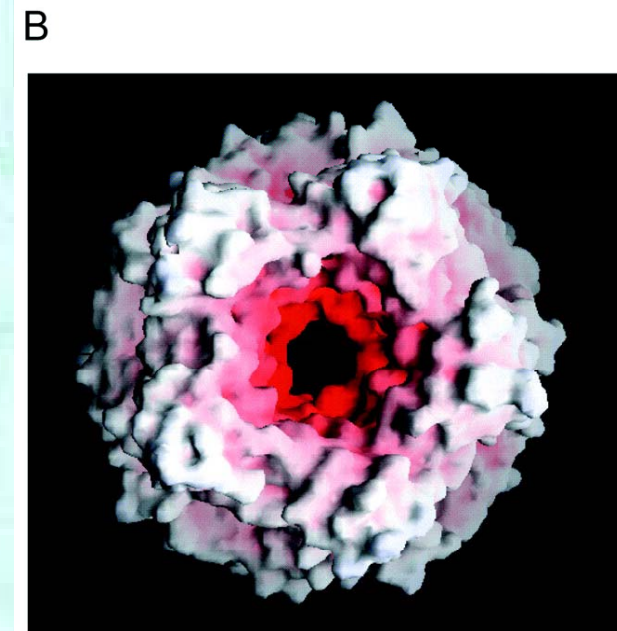
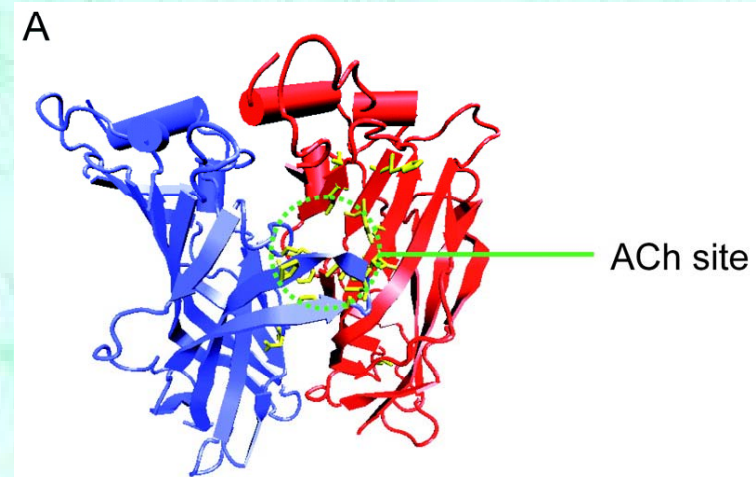
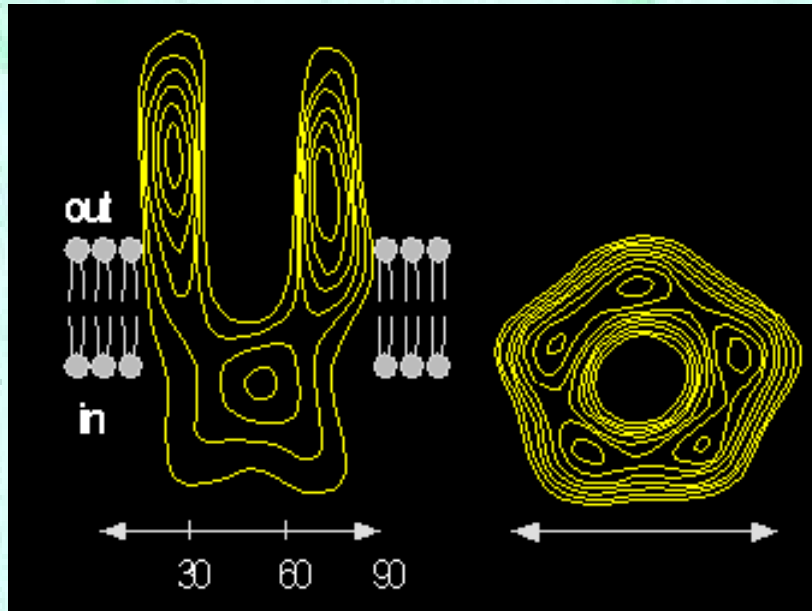
Structure et assemblage des Kv



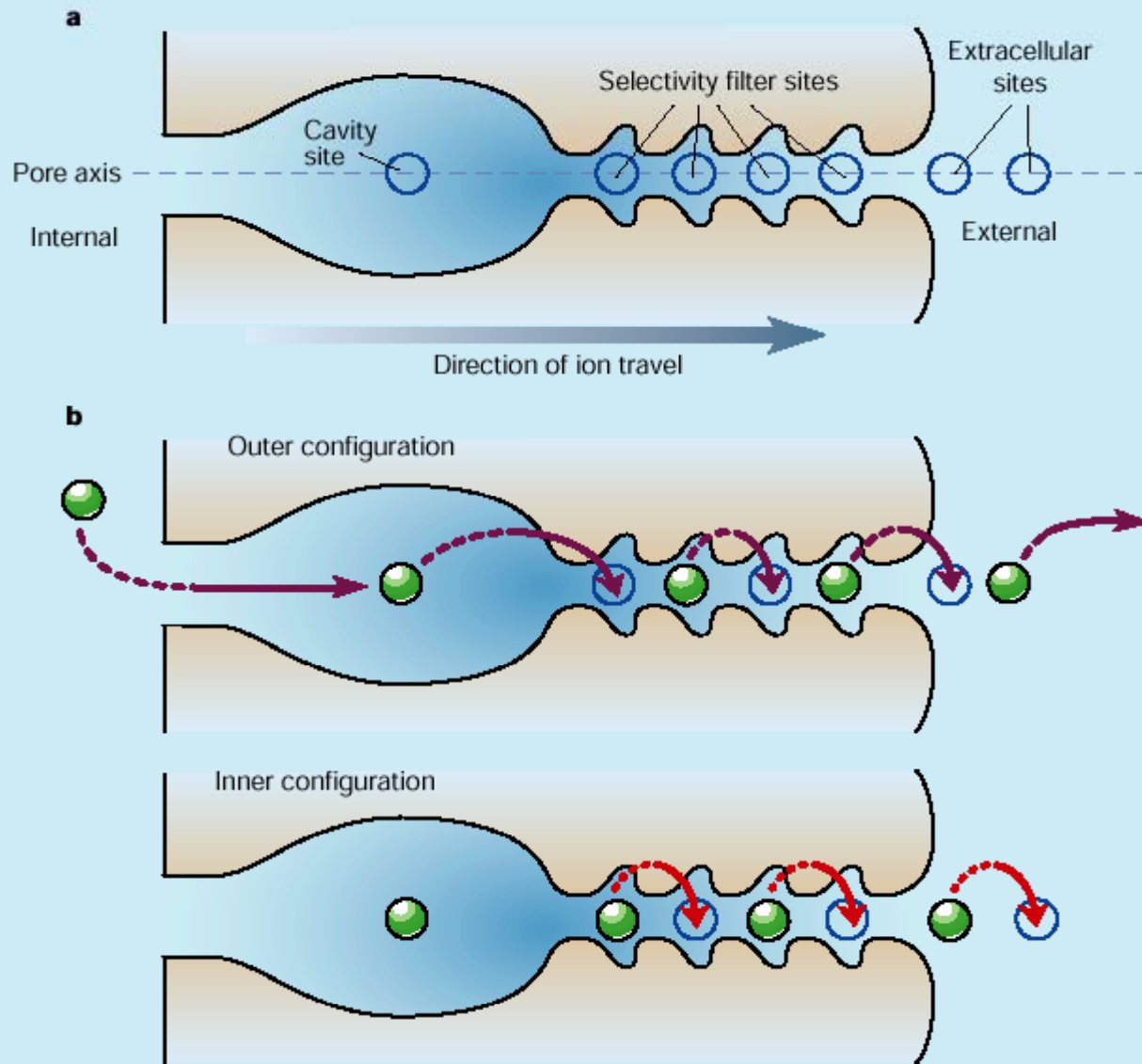
Structure et assemblage des Kir



Structure du récepteur-canal nicotinique

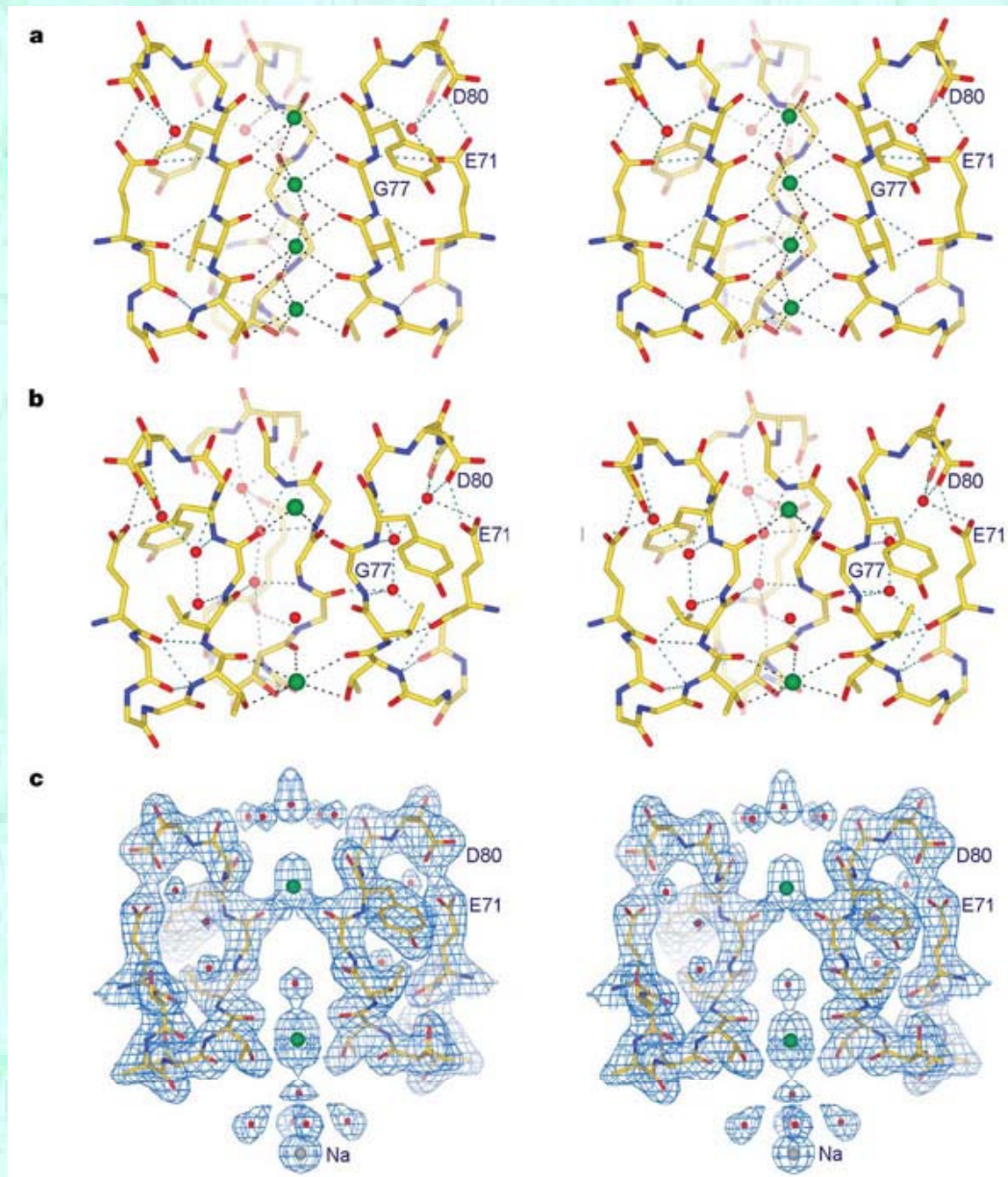


Passage des ions K^+



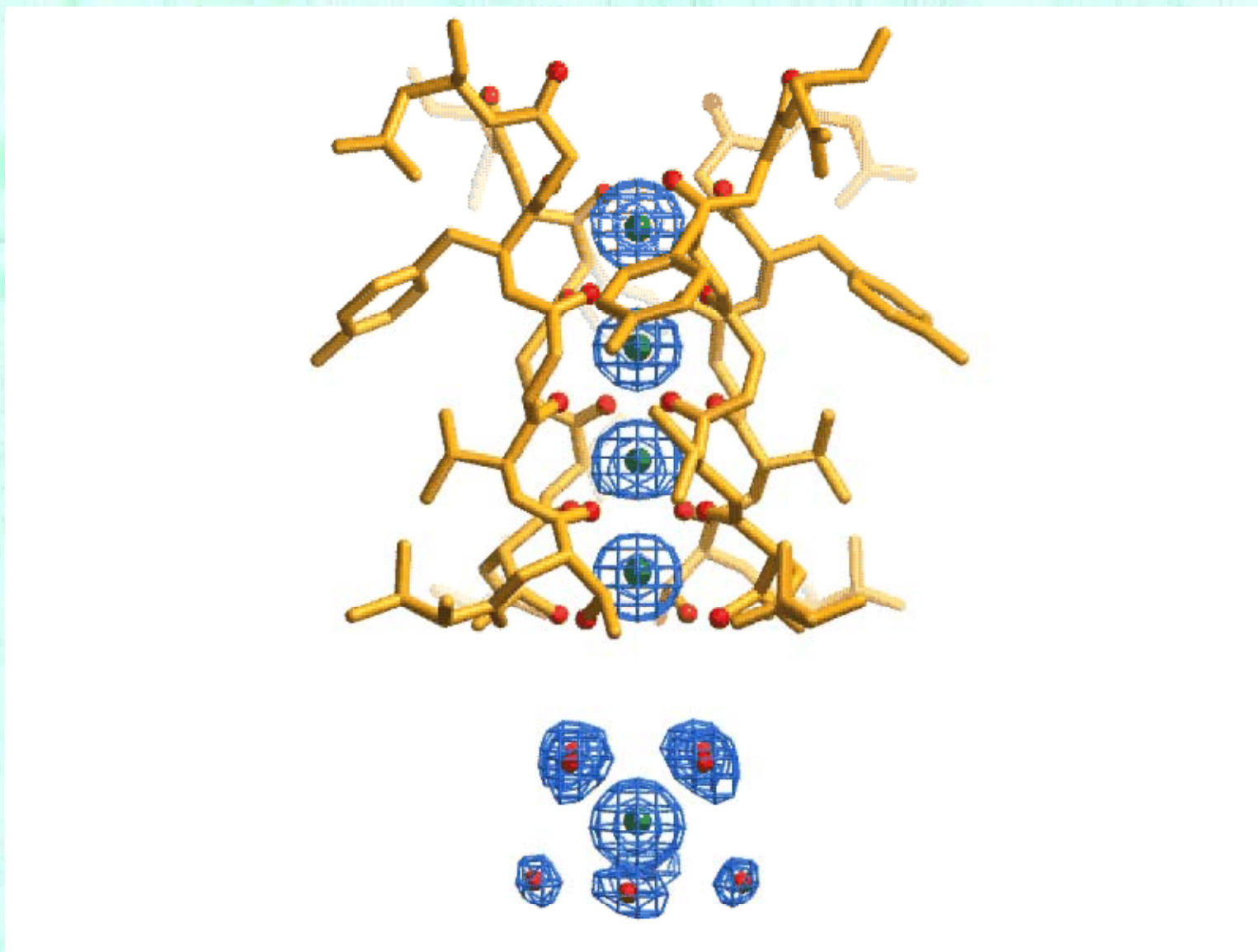
Miller et al.

Filtre de sélectivité



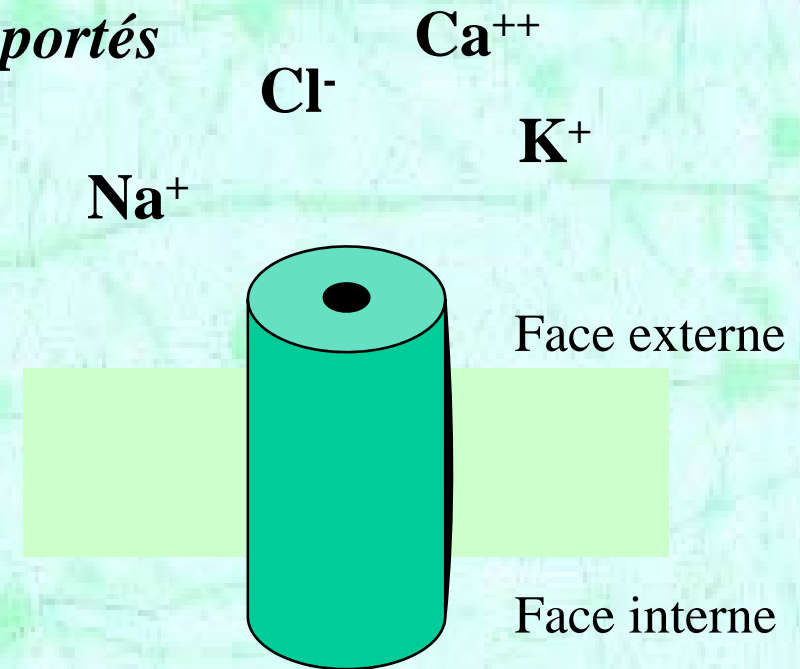
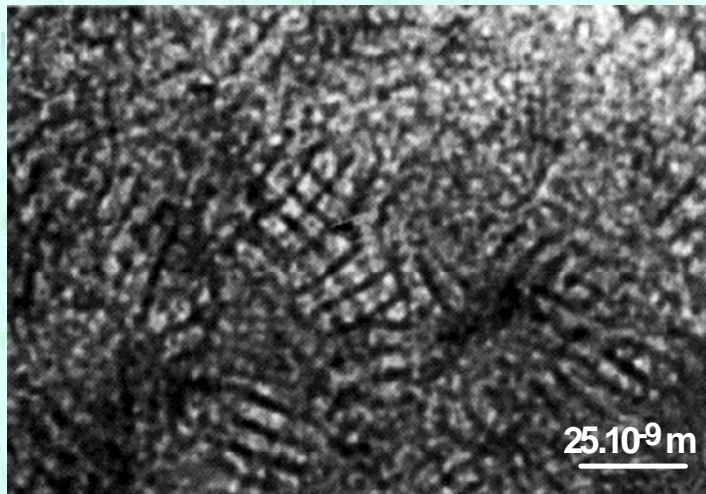
Zhou et al2001

Deshydratation des ions K^+



Classification des canaux ioniques

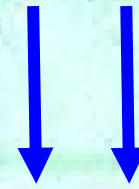
Nature du/des principaux ions transportés



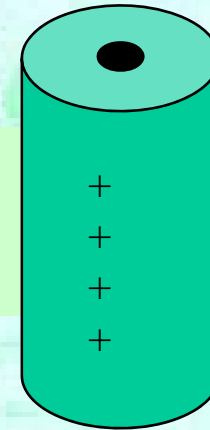
Régulation des canaux ioniques

Régulation par un agoniste (ROC)

AMPA GABA



+ + +



Face externe

Régulation par le potentiel (VOC)

- - -

Face interne

Régulation par un ligand intracellulaire (SMOC)

Ca⁺⁺

AMPC



Biophysique des canaux ioniques

Propriétés biophysiques:

- Canaux à rectification entrante
- Canaux à rectification sortante
- Canaux voltage dépendant
- Canaux avec une inactivation

Pharmacologie des canaux ioniques

Classification selon la sensibilité

Exemple: Canaux apamine sensible (K_{Ca})

Pathophysiologie des canaux ioniques

Canaux potassiques

- ◆ Diabète,
- ◆ Ataxie épisodique de type 1
- ◆ Syndrome du long QT
- ◆ Syndrome de Bartter

Canaux sodiques

- ◆ La paramyotonie congénitale, la paralysie périodique familiale hyperkaliémique
- ◆ Syndrome du long QT
- ◆ Syndrome de Liddle
- ◆ Pseudohypoaldostéronisme de type 1

Canaux calciques

- ◆ La paralysie périodique familiale hypokaliémique
- ◆ L'hyperthermie maligne
- ◆ Syndrome de Lambert-Eaton, sclérose latérale amyotrophique, diabète de type I

Canaux chlore

- ◆ La mucoviscidose
- ◆ La myotonie congénitale et la myopathie pseudohypertrophique de Becker.

Pharmacologie clinique des canaux ioniques

Canaux sodiques

- Anti-arythmiques de la classe IA (quinidine, lidocaïne, encainide)
- Anti-arythmiques de la classe IB (lidocaïne)
- Anti-arythmiques de la classe IC (encainide)
- Pyréthrinoïdes (bioperméthrine)
- Diurétiques (amiloride).

Canaux potassiques

- Anti-arythmiques de la classe III (amiodarone)
- Sulphonylurées (glibenclamide)
- Ouvreurs K_{ATP} (nicorandil).

Canaux calciques

- ◆ Anti-arythmiques de la classe IV (vérapamil).

NOTIONS DE BIOPHYSIQUE

Analogie électricité /eau / ion

PHENOMENE ELECTRIQUE

Courant électrique: i ou I

Qté de charges (e^-) circulant par unité de temps.

Porteurs de charges: électrons

Produit par un générateur de courant:

Sens positif = celui des charges positives

Résistance: R

Obstacle au passage des électrons

Conductance : $g= 1/R$

ANALOGIE AVEC L'EAU

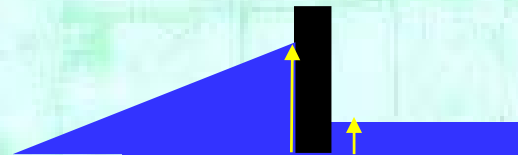
Courant d'un fleuve

Débit d'eau entre 2 points

Pompe péristaltique

Barrage sur un fleuve

Les vannes sont \pm ouvertes



PHENOMENE IONIQUE

Courant ionique: i ou I

Quantité de charges (et non d'ions) par unité de temps

= flux global entre 2 points

Porteurs de charges: ions

Ampères: $10^{-6}A=1\mu A$, $10^{-9}A=1nA$, $10^{-12}A=1pA$

Résistance d'un canal:

Résistance R ou r en ohm: Ω ($10^9\Omega = 1M\Omega$)

Conductance d'un canal:

$r = 1/g$

Conductance g ou γ en siemens: $10^{-12}S = 1pS$

= capacité à laisser passer des ions

Analogie électricité /eau / ion

PHENOMENE ELECTRIQUE

Potentiel électrique: E (U, V)

Quantité de charges en un point

Différence de potentiel ou tension: U, V (E)

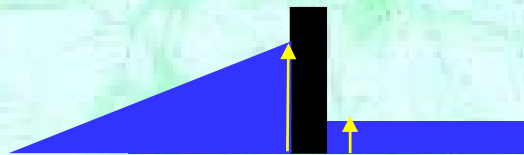
Différence en quantité de charges entre 2 points

Produit par un générateur de tension

ANALOGIE AVEC L'EAU

Quantité d'eau en un point

Différence niveau d'eau



PHENOMENE IONIQUE

Différence de potentiel

Différence de quantité de charges

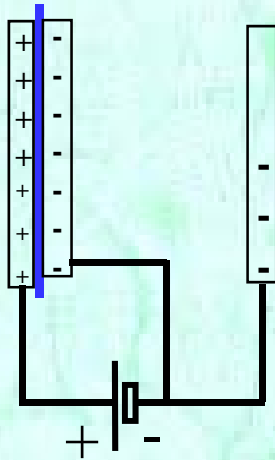
Volts: mV: 10^{-3} V

Analogie électricité / eau / ion

PHENOMENE ELECTRIQUE

Capacité: C

composé d'un isolant entouré de 2 surfaces de conducteur
= capacité d'accumuler des charges



Loi d'ohm: U = RI

Si U = constante:

si R ↗ alors I ↘

Si I = constante:

si R ↗ alors U ↗

ANALOGIE AVEC L'EAU

2 réservoirs

Capacité membranaire

= la membrane plasmique est un isolant entouré de 2 conducteurs

Capacité spécifique ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)

$$\Delta p = (8kL/r^4) \cdot D$$

$$\Delta p = R \cdot I$$

Barrage:

Loi de Poiseuille

$$D = \frac{r^4 \Delta p}{8kL}$$

L = longueur du tube en cm

r = rayon du tube en cm

Δp = écart de pression entre les deux extrémités du tube en dynes/cm²

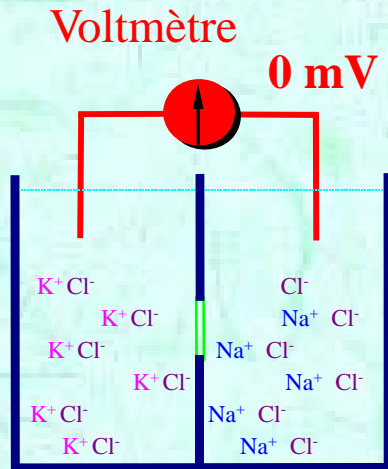
k = coefficient de viscosité en poise (dyne.s/cm²)

D = débit en cm³/s

Potentiel d'équilibre - Loi de Nernst

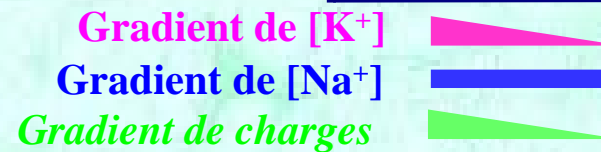
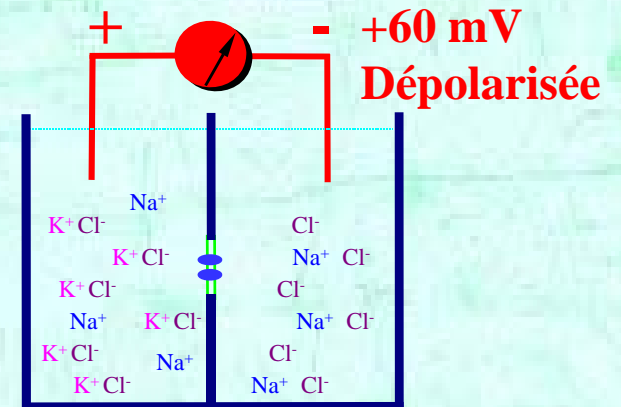
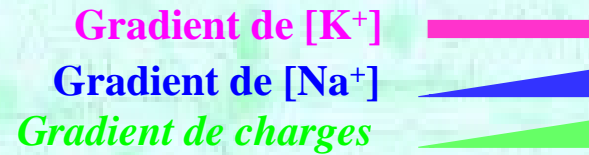
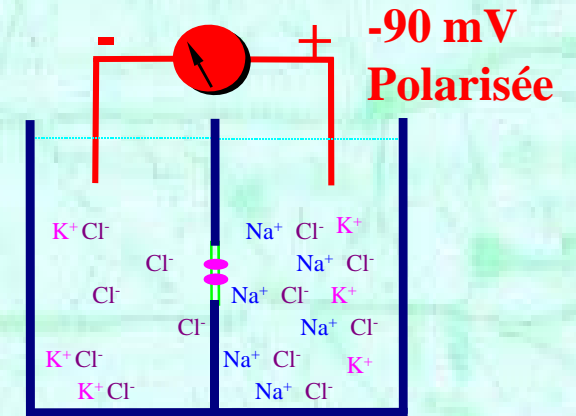
Potentels d'inversion dans les cellules de vertébrés

	Interne	Externe	E_{ion}
Na ⁺	14	140	+ 58 mV
K ⁺	160	3	- 100 mV
Ca ⁺⁺	10 ⁻⁴	1	+ 116mV
Cl ⁻	14	150	- 60 mV



Inclusion d'un canal K⁺

Inclusion d'un canal Na⁺



Enoncé de la loi de Nernst

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{int}}$$

Potentiel d'équilibre d'un ion E_{ion}

R: constante des gaz parfaits: $8,315 \text{ J.K}^{-1}.\text{mole}^{-1}$ ($1 \text{ J} = 1 \text{ V.C}$)

T: température absolue en °K ($^{\circ}\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273,16$)

z: valence de l'ion (+1 pour Na^+ et K^+ , +2 pour Ca^{2+} et -1 pour Cl^-)

F: constante de Faraday: $9,648.10^4 \text{ C.mole}^{-1}$

$\text{Ln} = 2,303 \text{ Log}$

Si $z = +1$ et à 20°C on a:

$$E_{ion} = 58 \log \frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{int}}$$

Valeurs de RT/F selon la température:

Température (°C)	RT/F (mV)
0	23,54
5	23,97
10	24,40
15	24,83
20	25,26
25	25,69
30	26,12
35	26,55
37	26,73

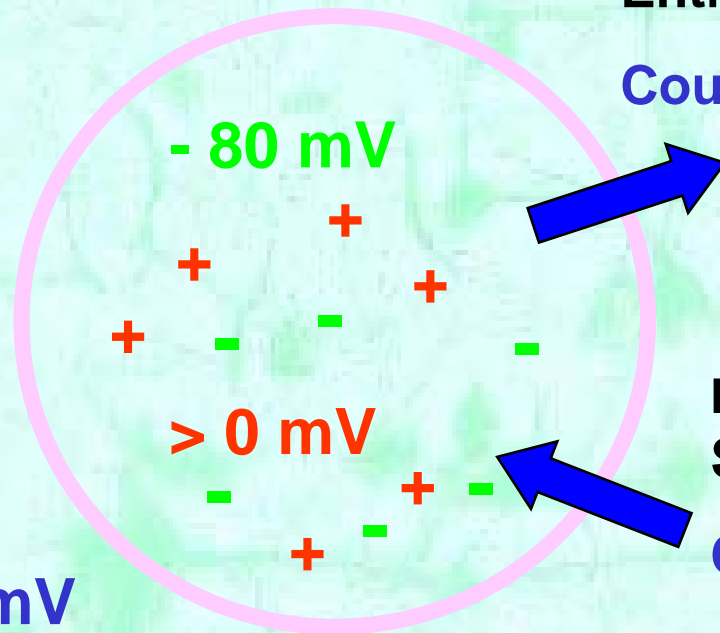
Conventions et vocabulaire

Activité = dépolarisée

Repos = polarisée

Sortie de charges + ou
Entrée de charges -

Courant sortant polarisant (positif)



0 mV

Entrée de charges + ou
Sortie de charges -

Courant entrant dépolarisant (négatif)

Membrane plasmique

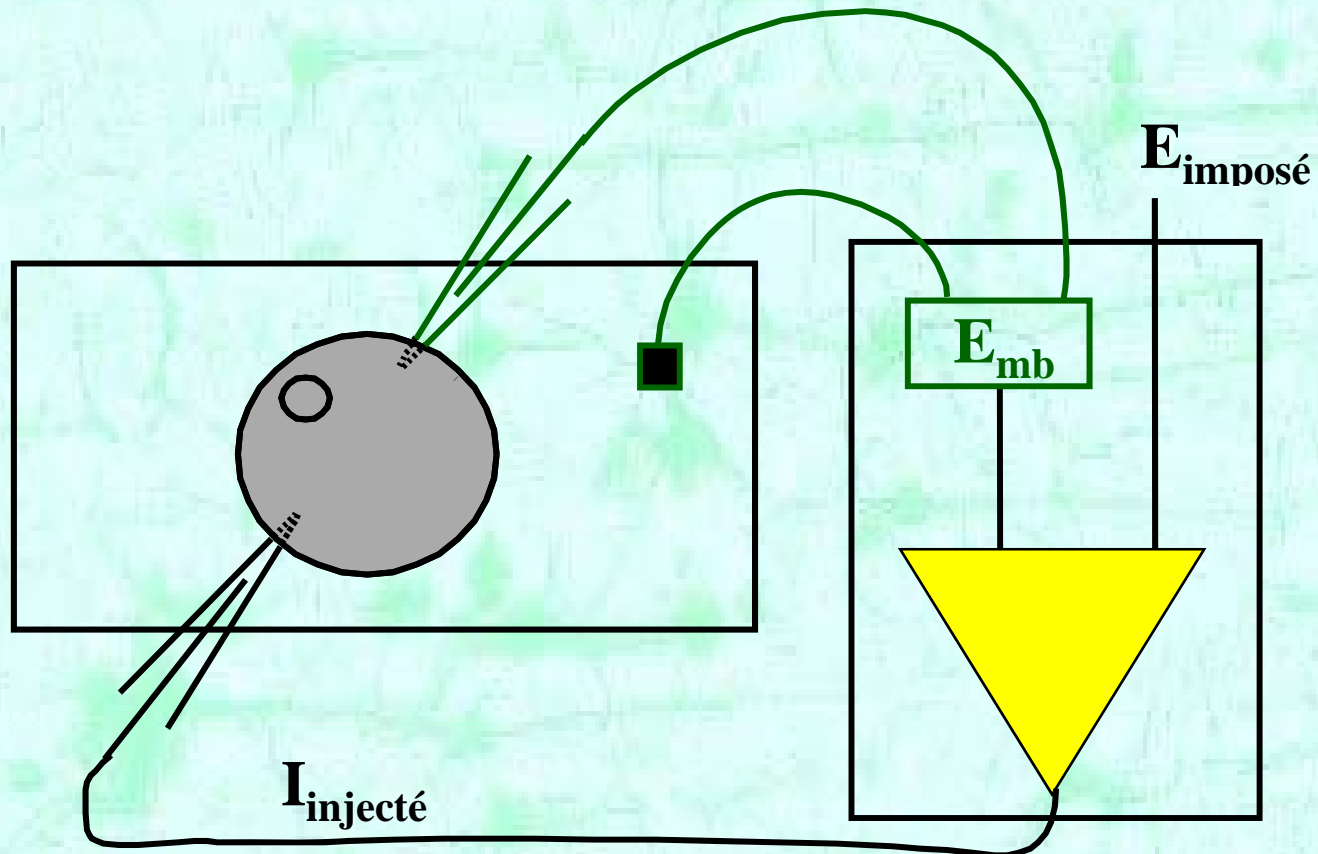


TECHNIQUES D'ETUDE LE POTENTIEL IMPOSE

Aspect technique du potentiel imposé

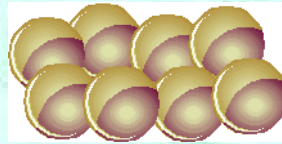
Double microélectrodes

$$I / E = g$$



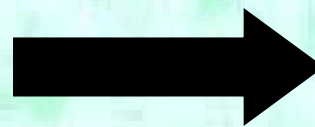
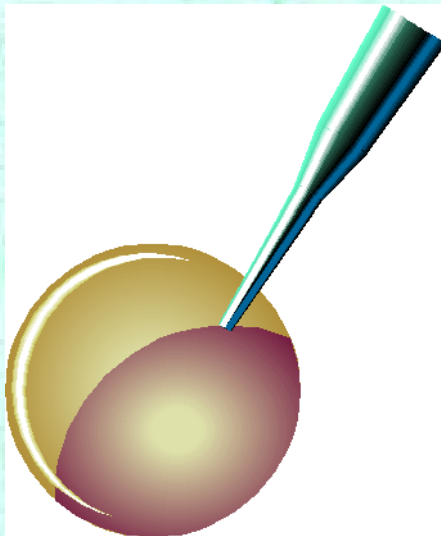
Le modèle de l'ovocyte de xénope

Ovocytes de xénopes

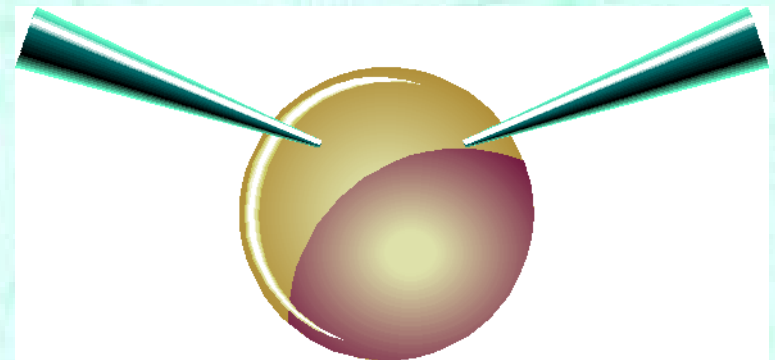


Etude des canaux clonés ou exogènes

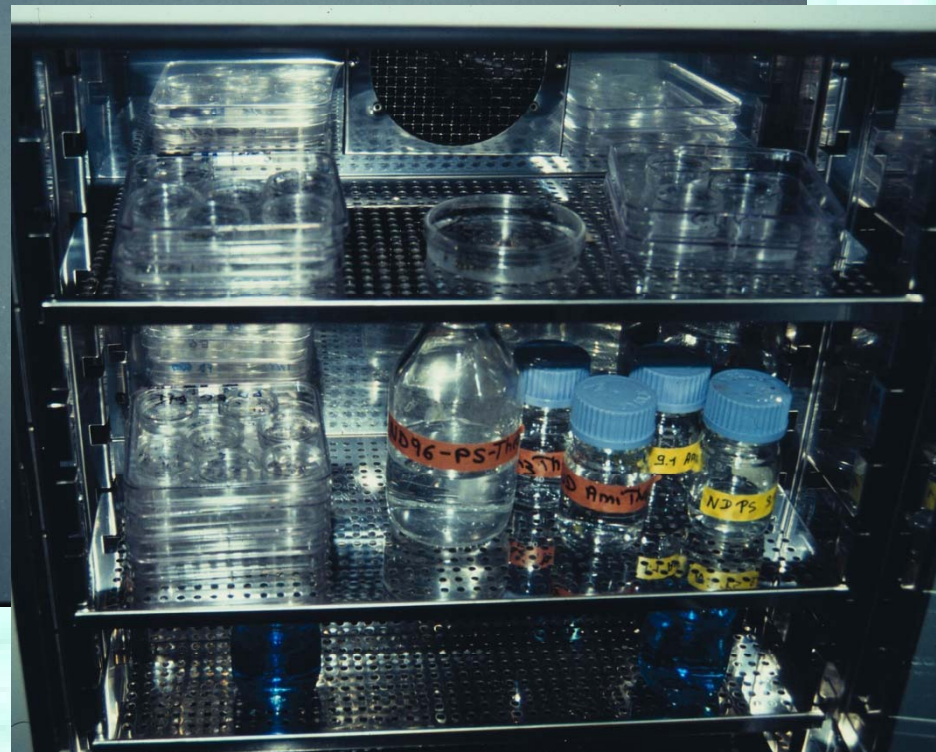
Injection d'ARN ou d'ADN



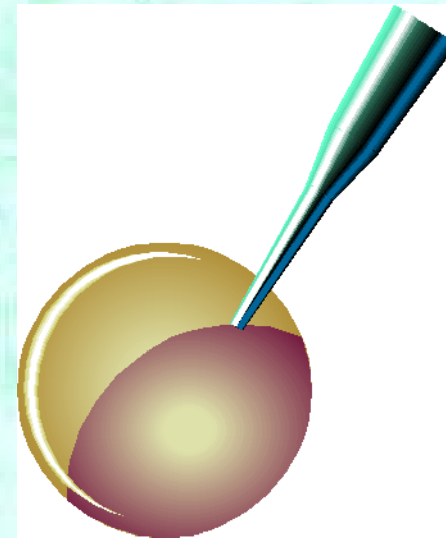
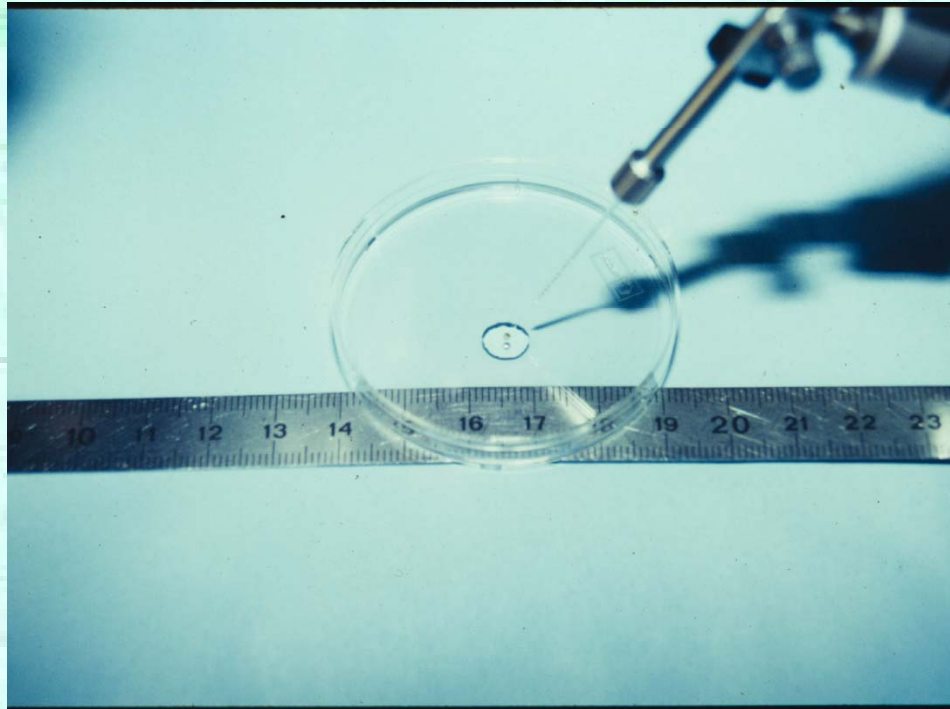
Double microélectrodes



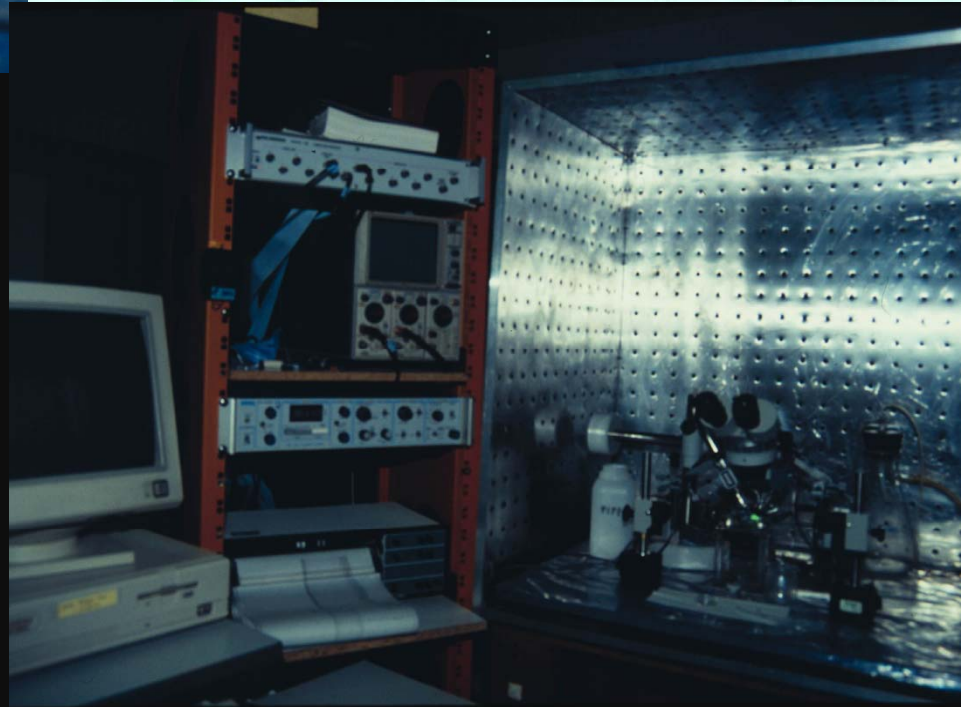
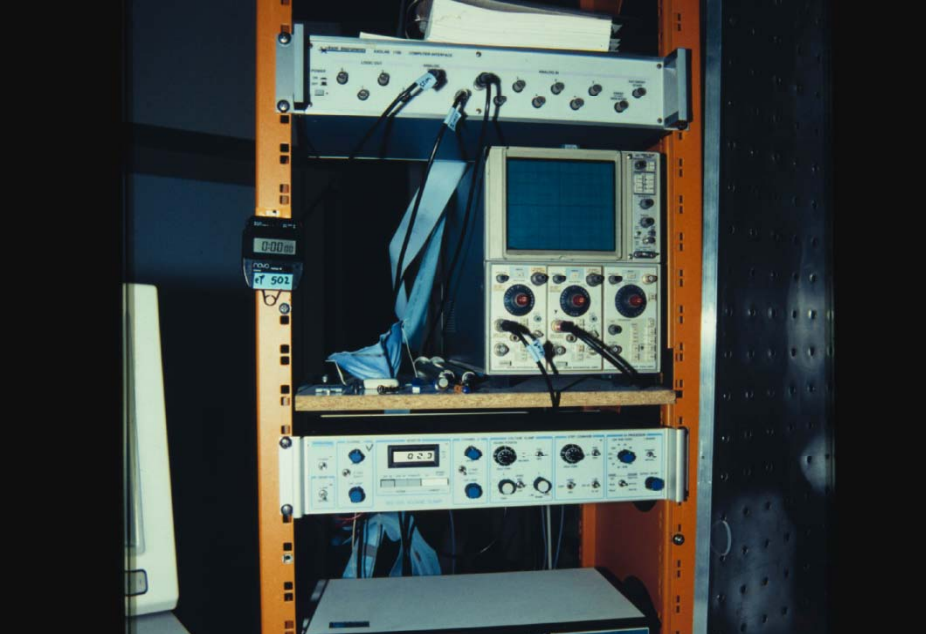
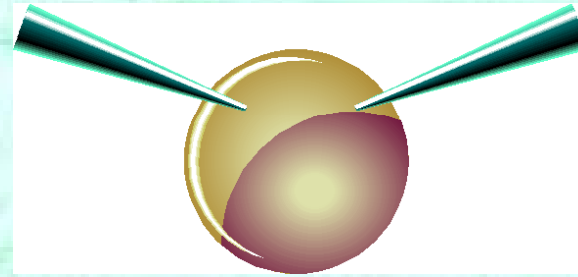
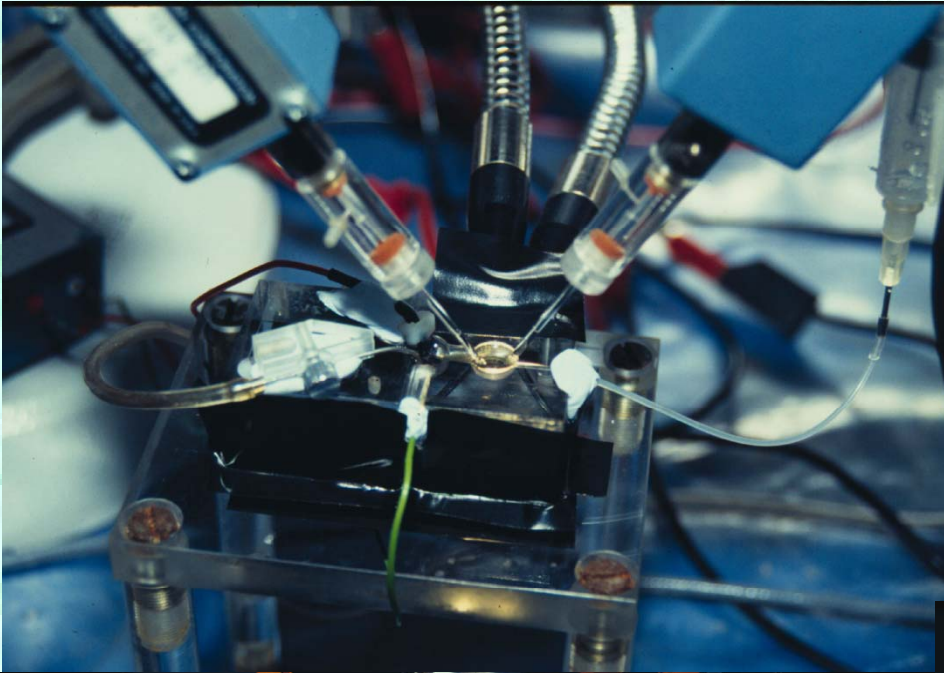
Préparation des ovocytes de xénopes



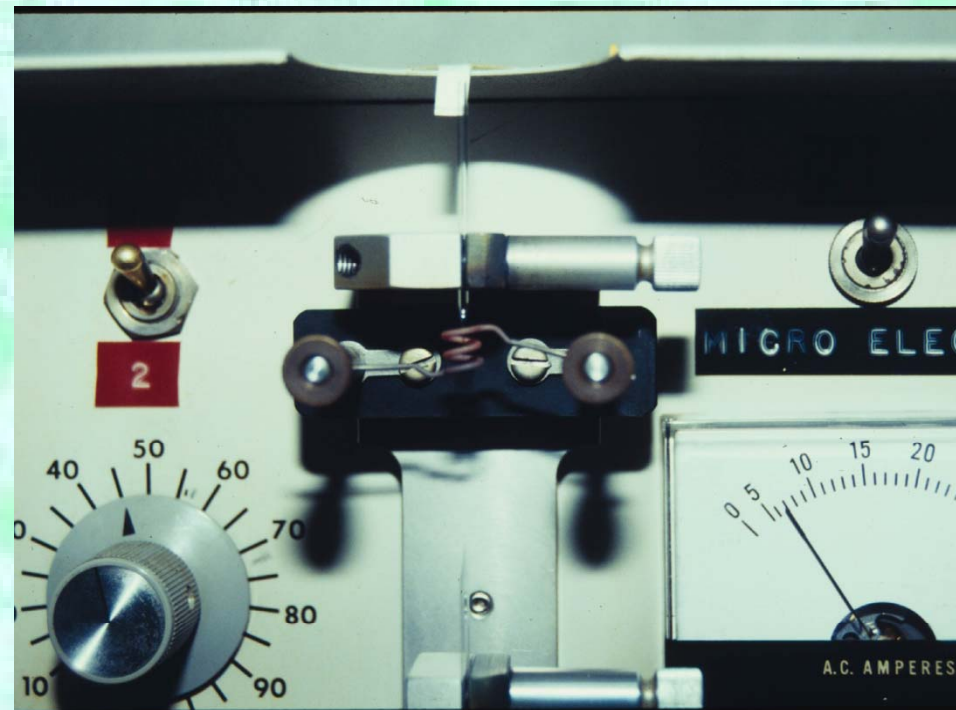
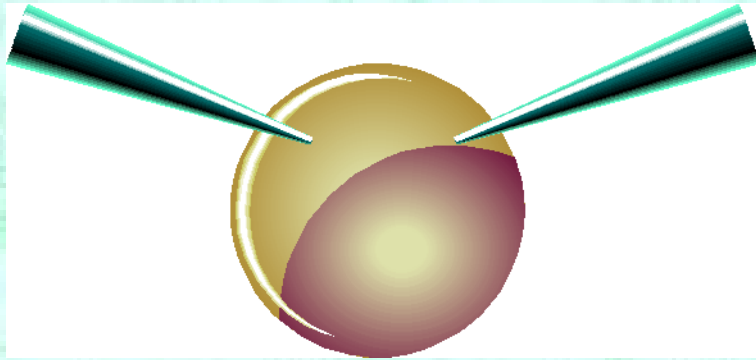
Ovocytes: Injection d'ARN ou d'ADN



Le poste d'enregistrement en double microélectrodes

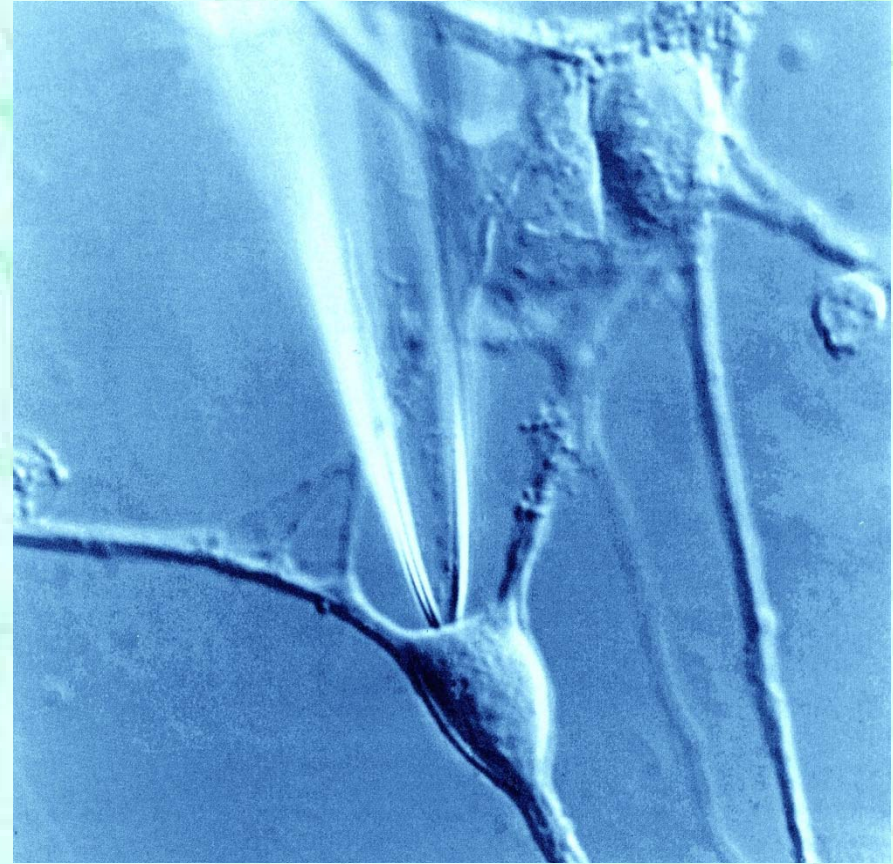


Préparation des pipettes

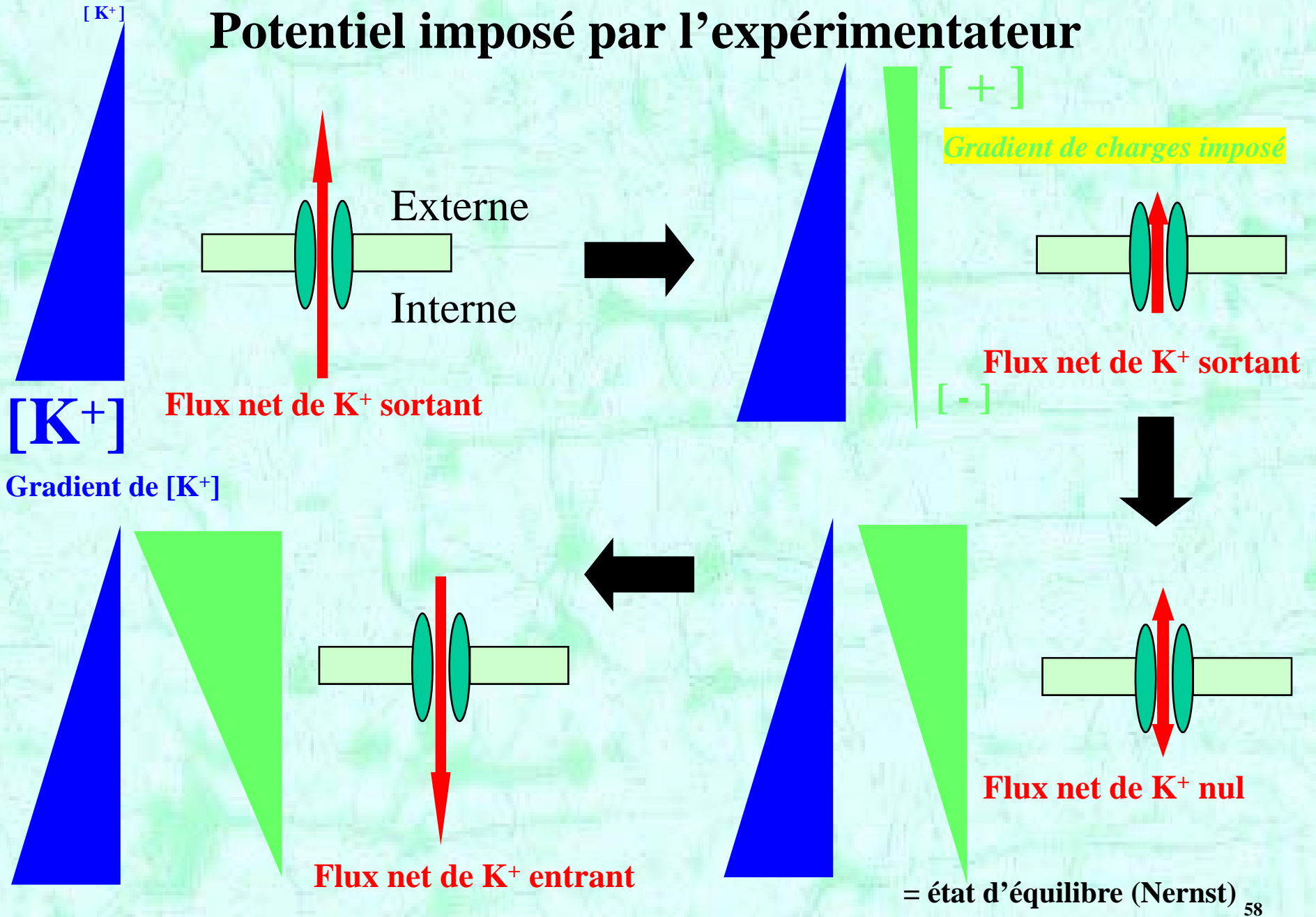


Etude des courants natifs ou endogènes

Préparation d'un tissu



Potentiel imposé par l'expérimentateur

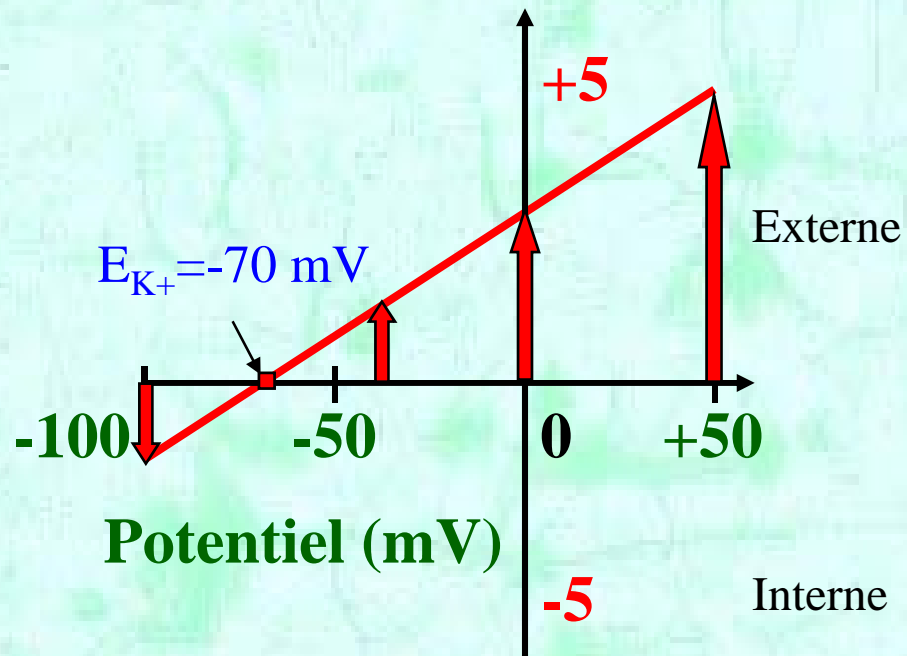


Potentiel imposé

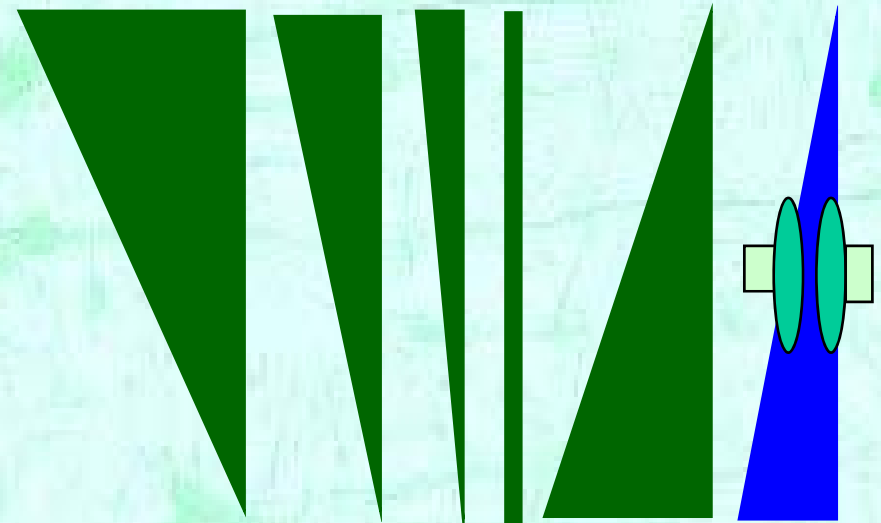
$$E = R \times I$$

Imposé Calculé Mesuré

Courant (μA , nA , pA)

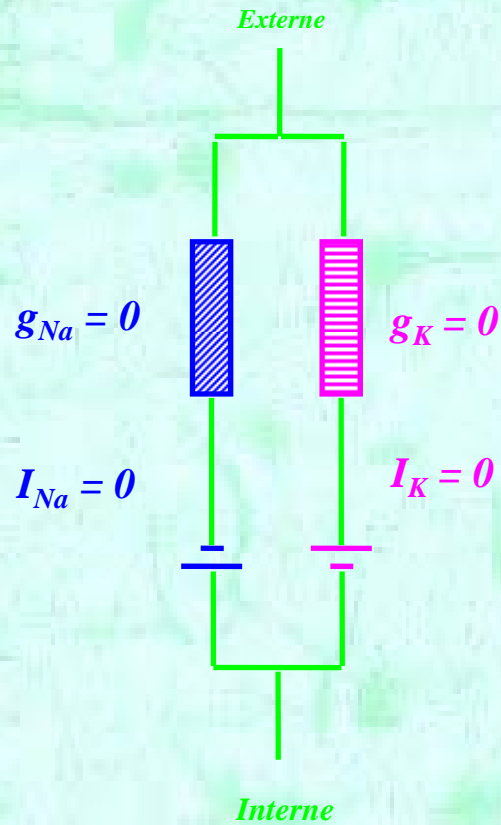


Potentiel imposé

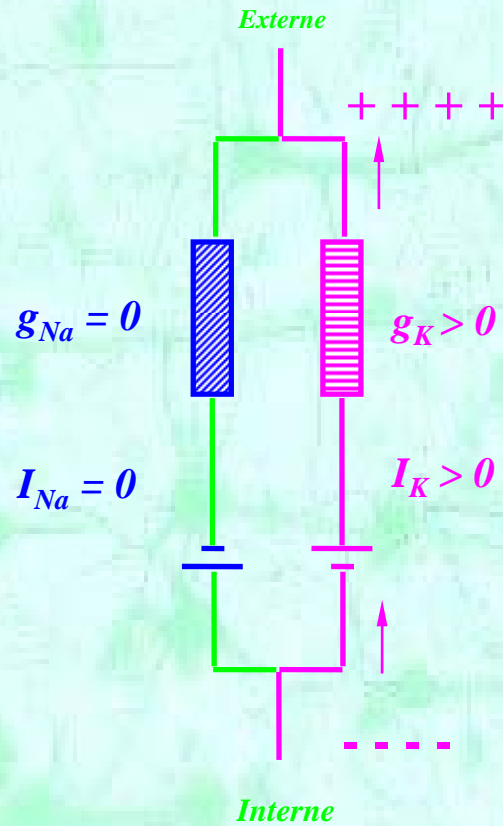


Gradient $[K^+]$

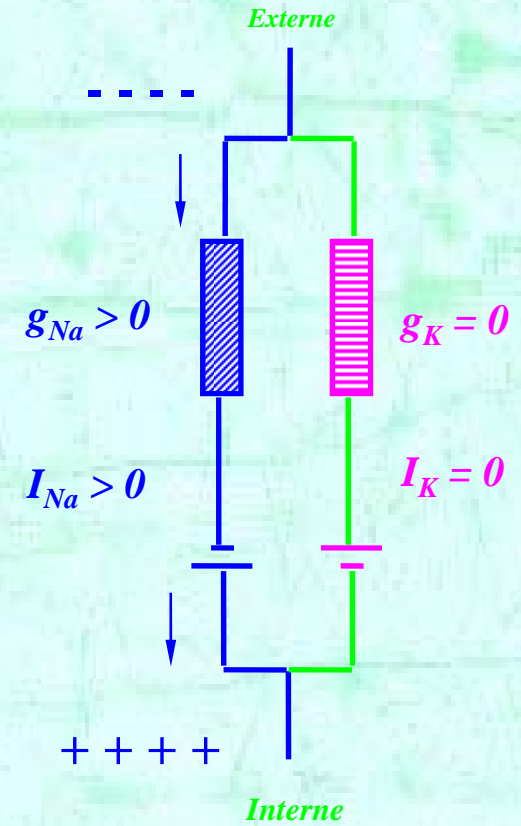
Représentation schématique d'un canal



$$V_m = 0 \text{ mV}$$

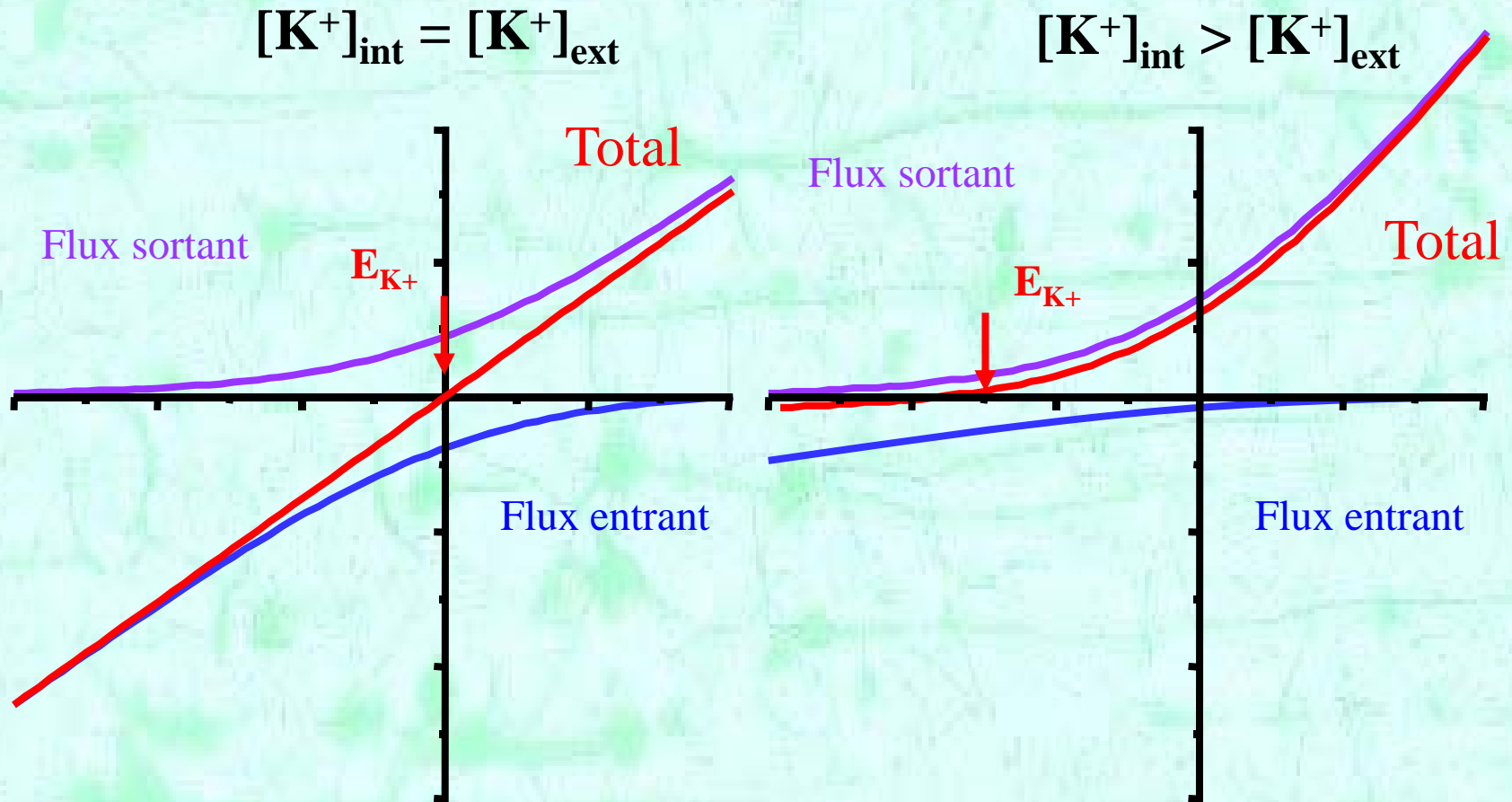


$$V_m = E_K = -84 \text{ mV}$$



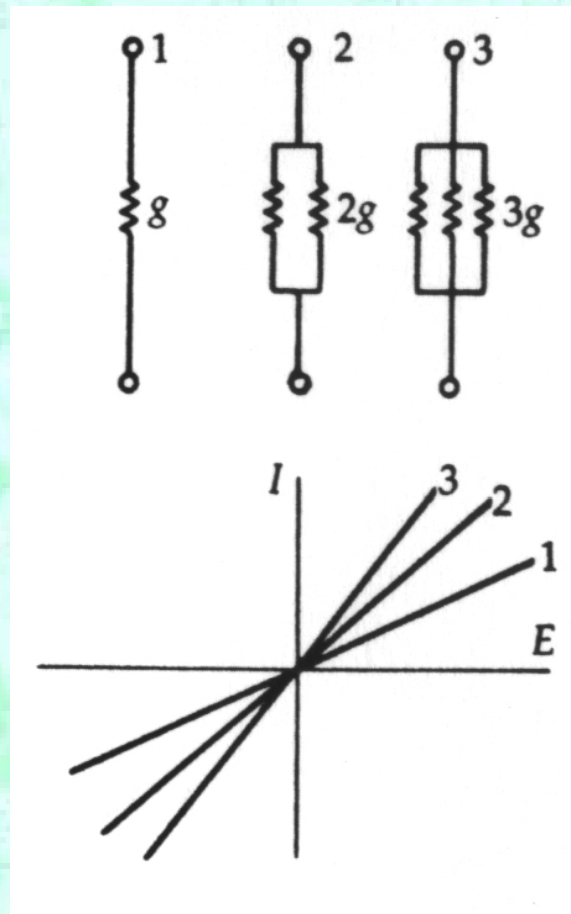
$$V_m = E_{Na} = +58 \text{ mV}$$

Loi de Goldman Hodgkin Katz



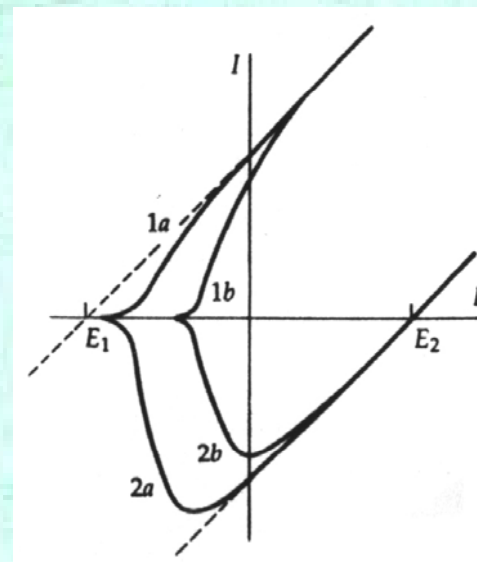
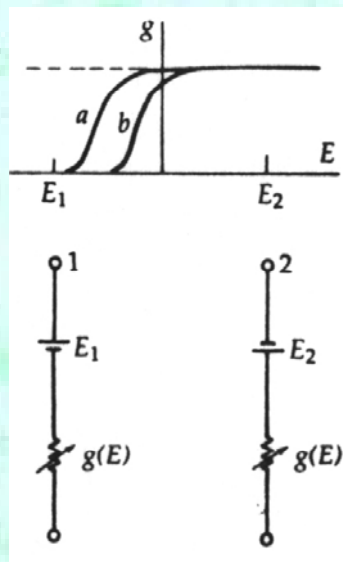
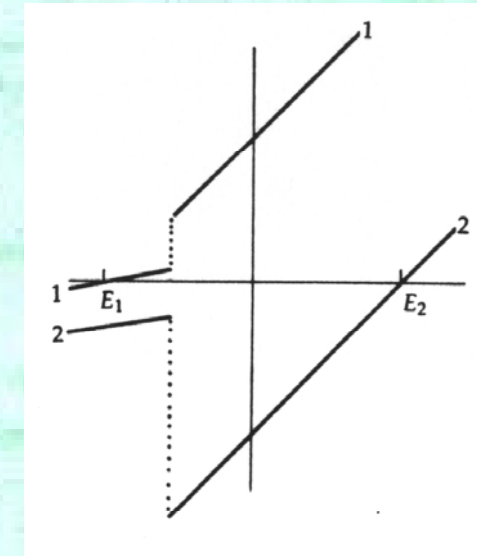
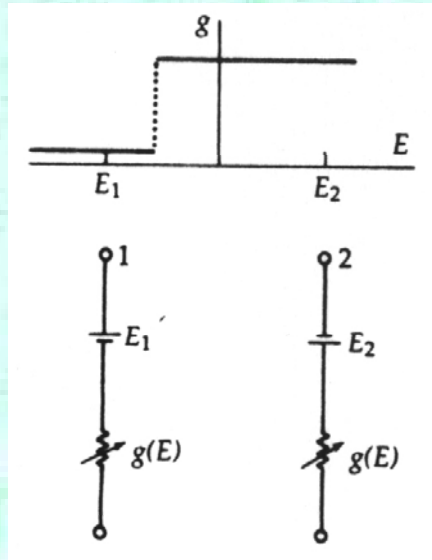
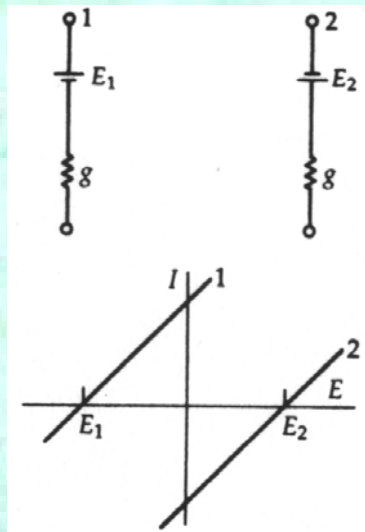
Technique d'étude: le voltage clamp

Courants totaux



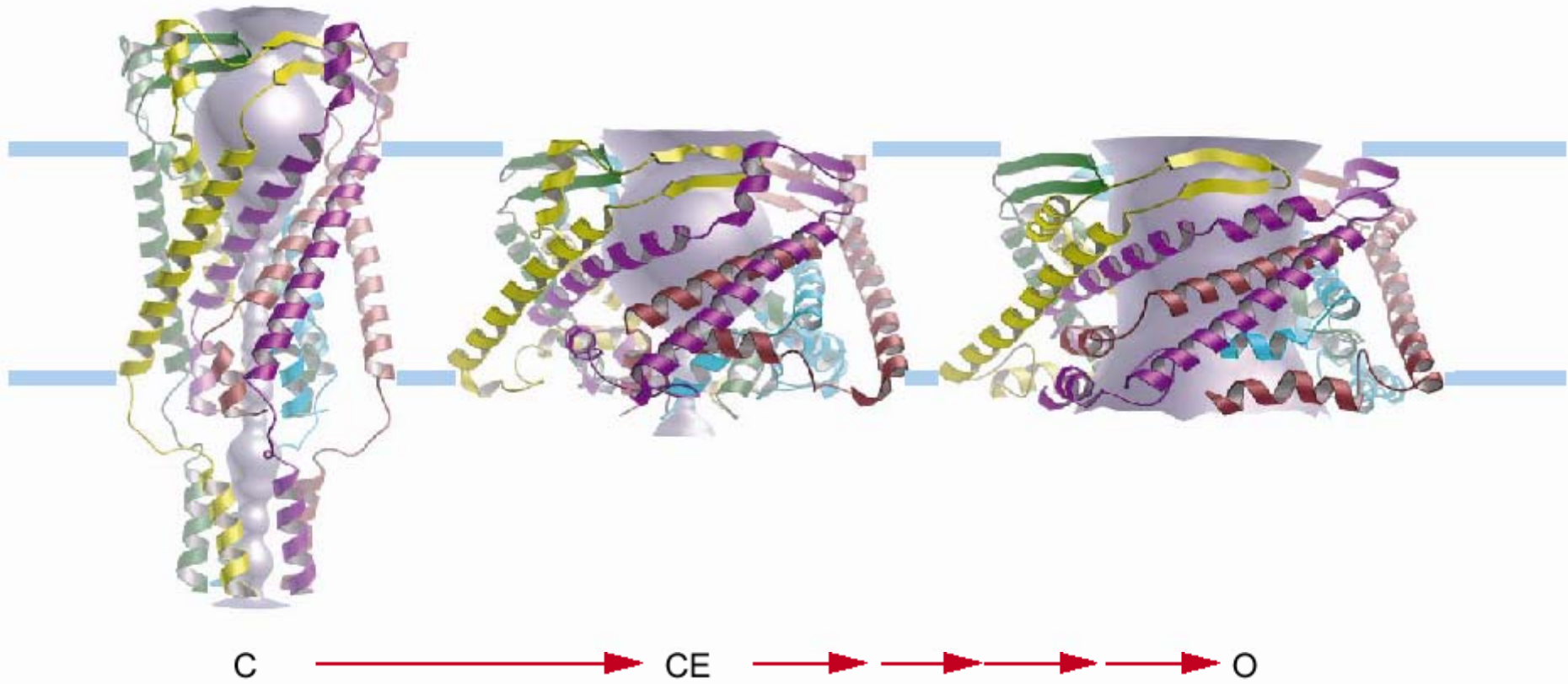
Technique d'étude: le voltage clamp

Courants totaux



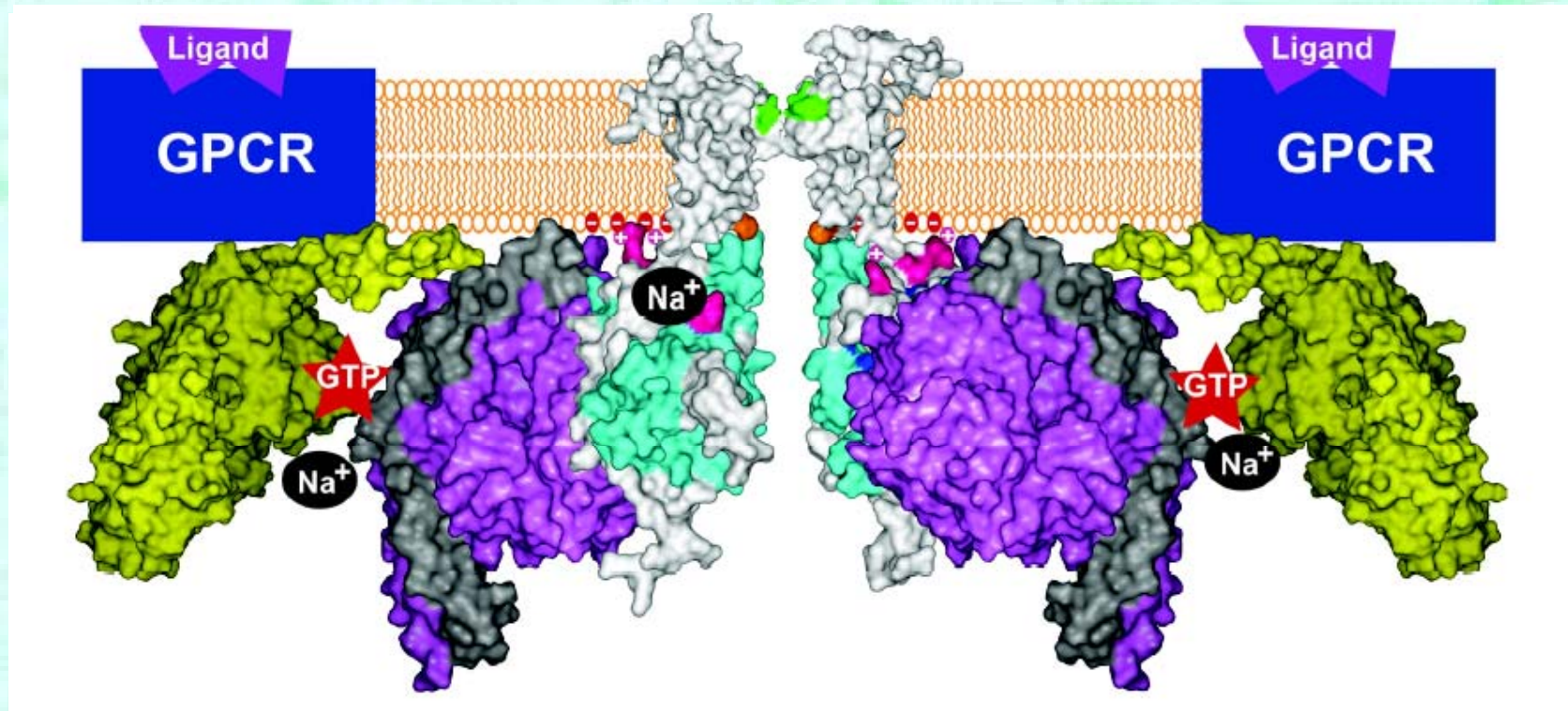
GATING DES CANAUX IONIQUES

Structure et gating des canaux clonés



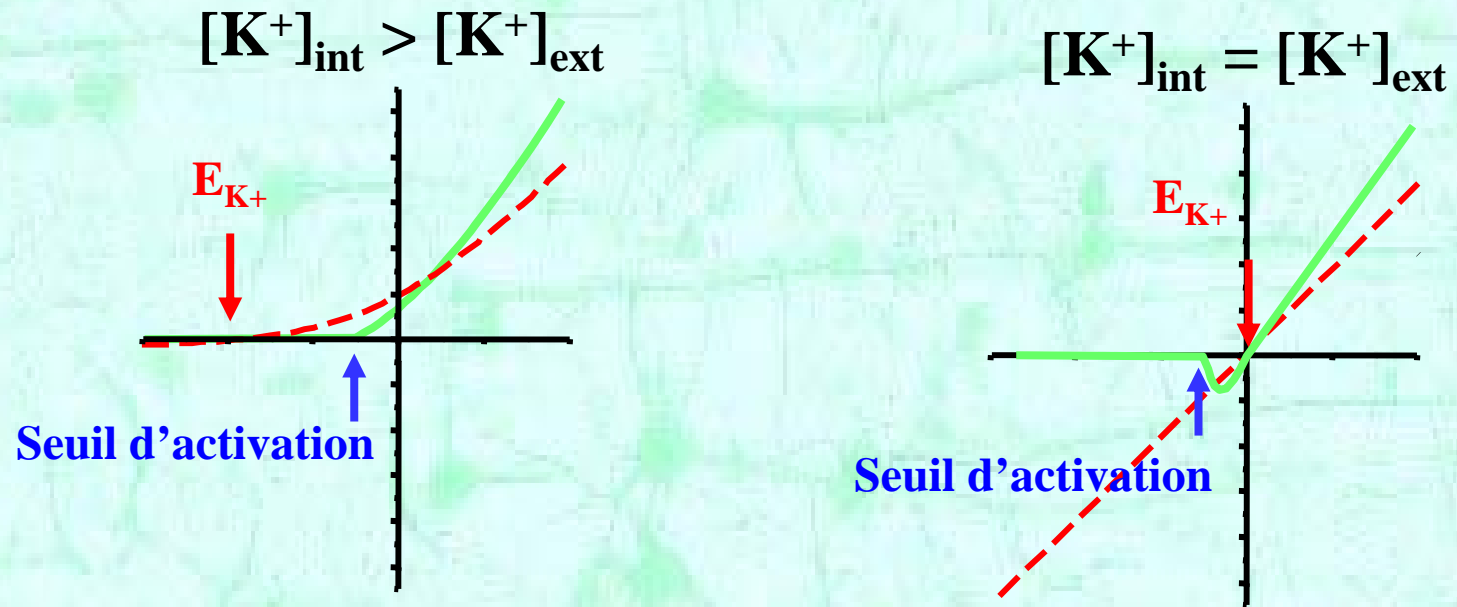
Biggin & Sansom 2001

Structure et gating des canaux clonés

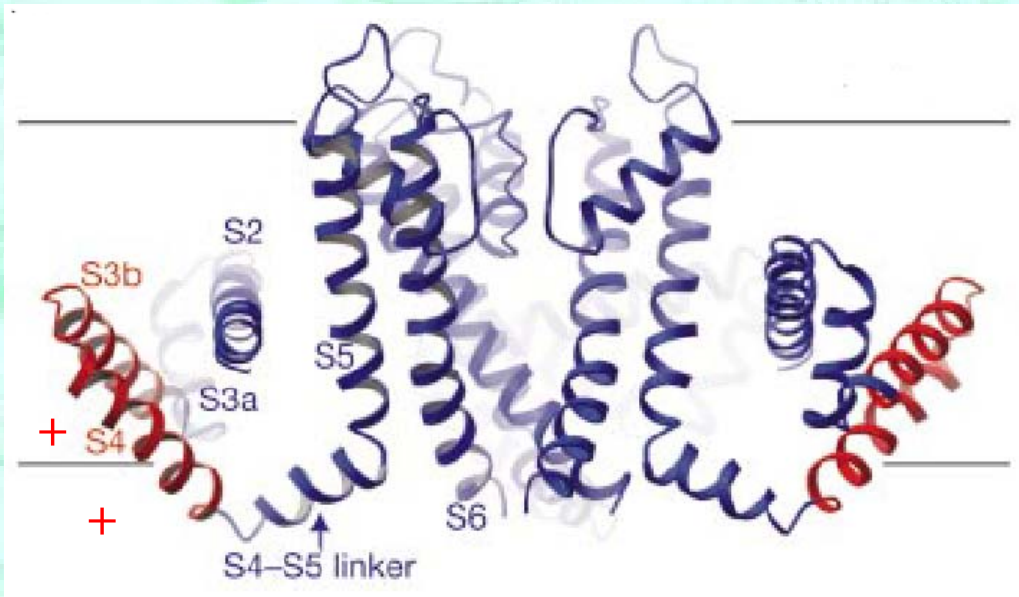


Biggin & Sansom 2001

Canaux voltage-dépendant



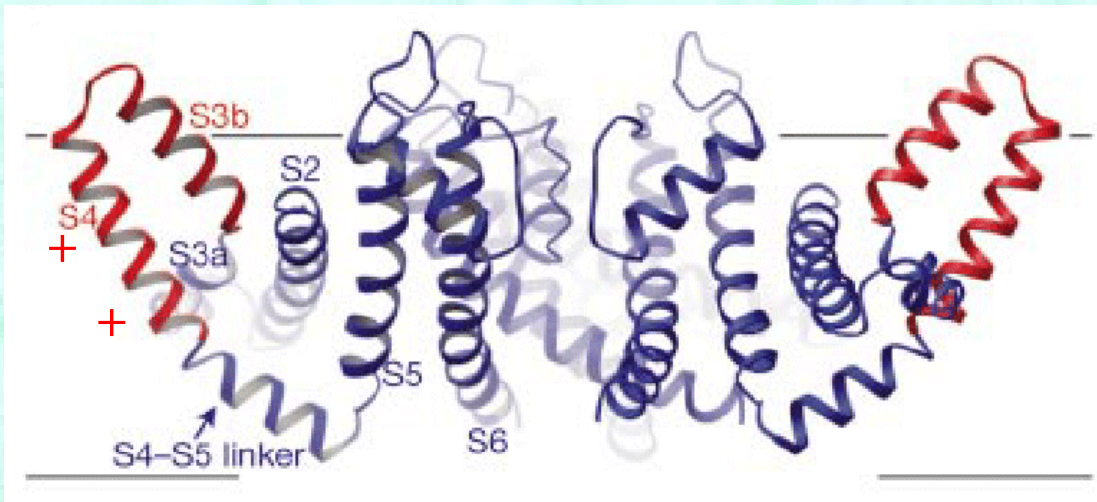
Interactions senseur au voltage et pore (KvAP)



Externe:

FERME

Interne: - -



Externe:

OUVERT

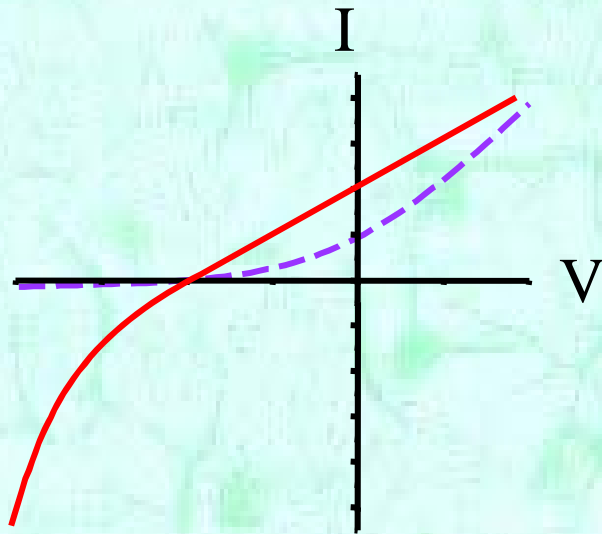
Interne: + +

Effet de levier

Gating des canaux ioniques

Rectification entrante

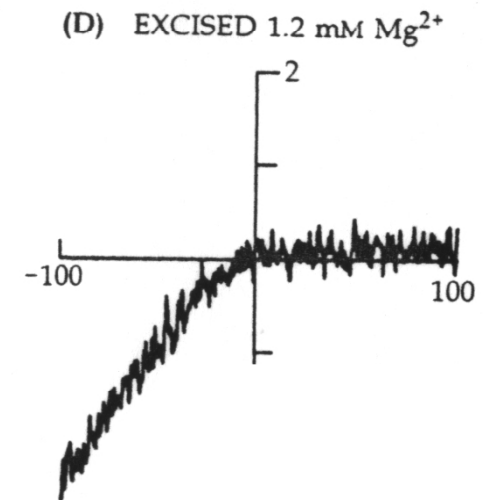
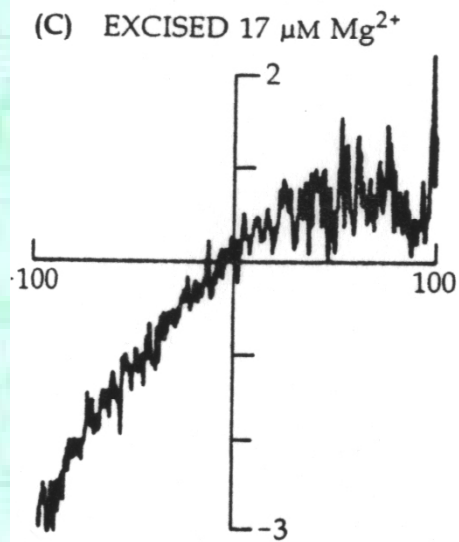
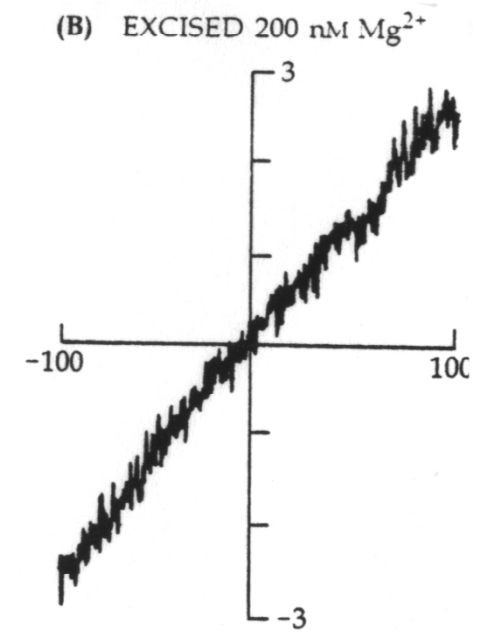
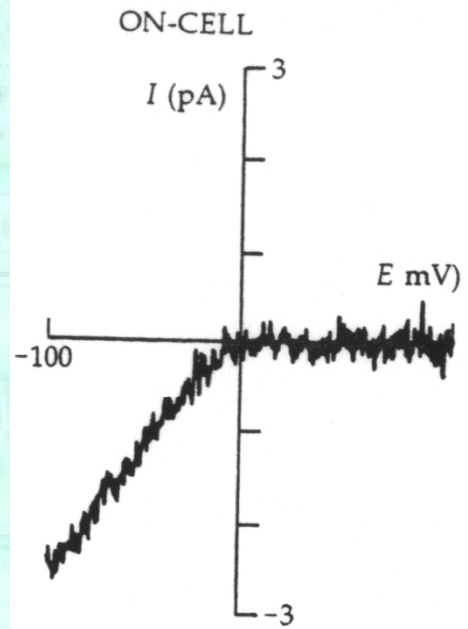
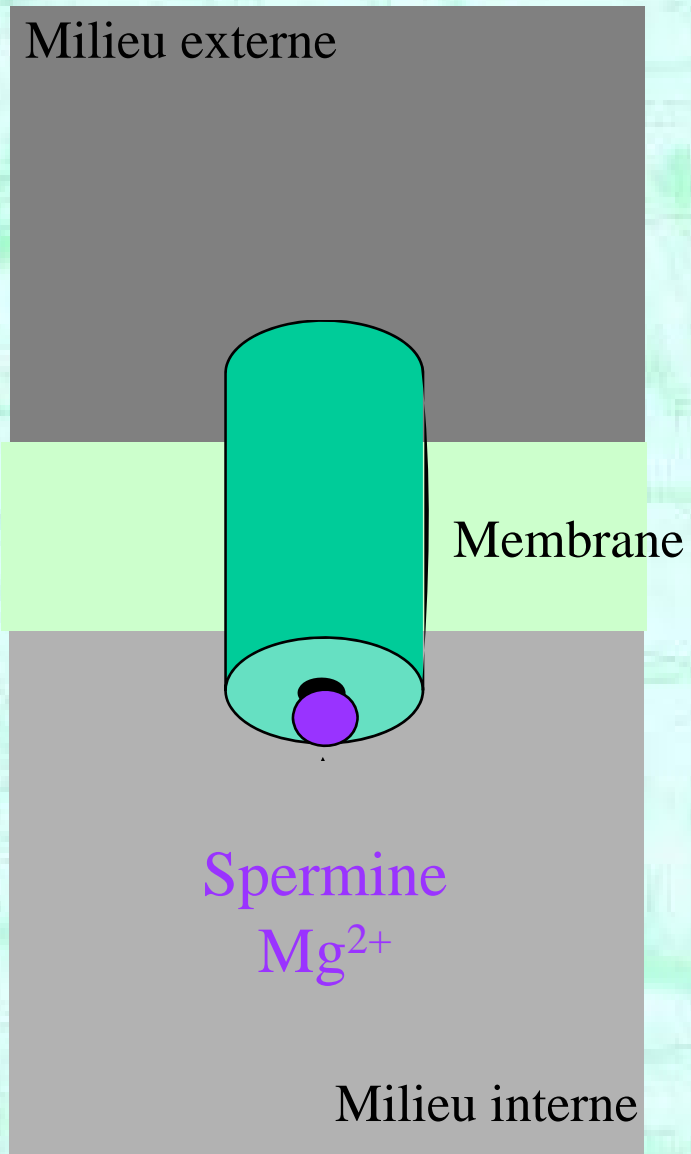
Diffusion facilitée



Blocage des courants sortants



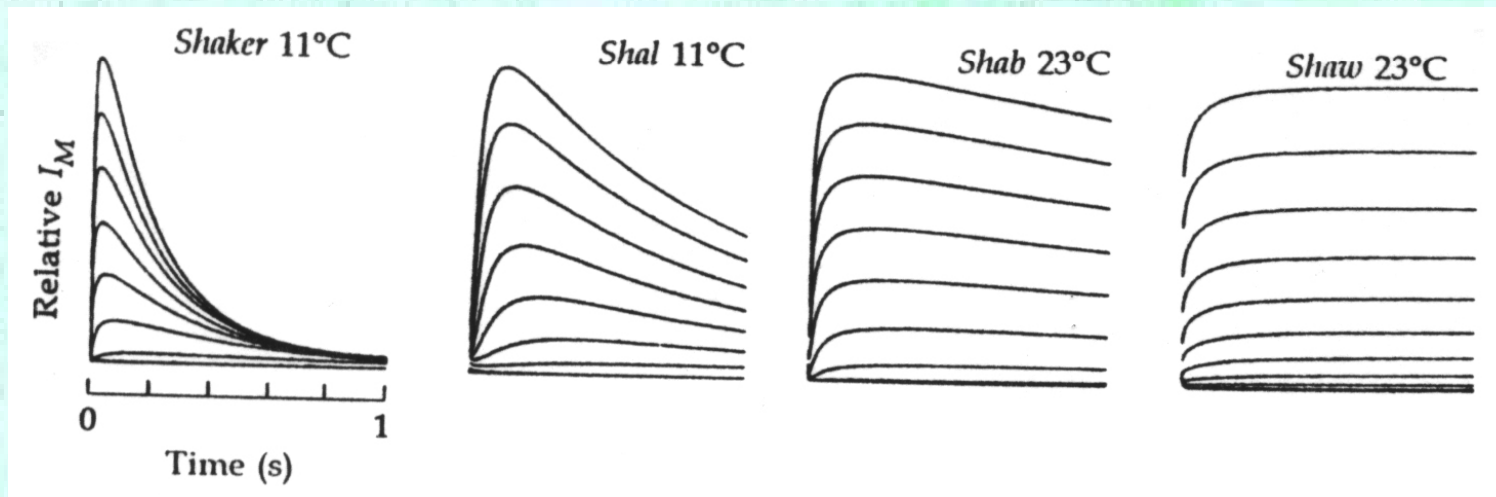
Rectification entrante



Canaux temps-dépendant

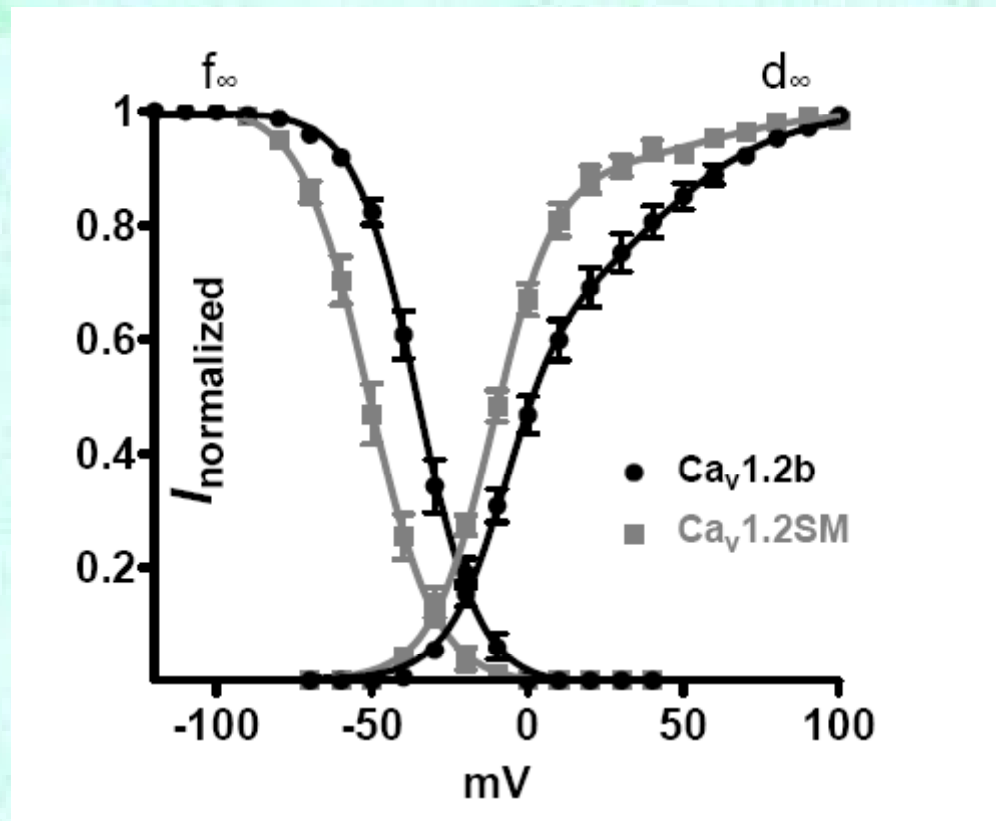
Activation

Inactivation



Courants en fonction du temps

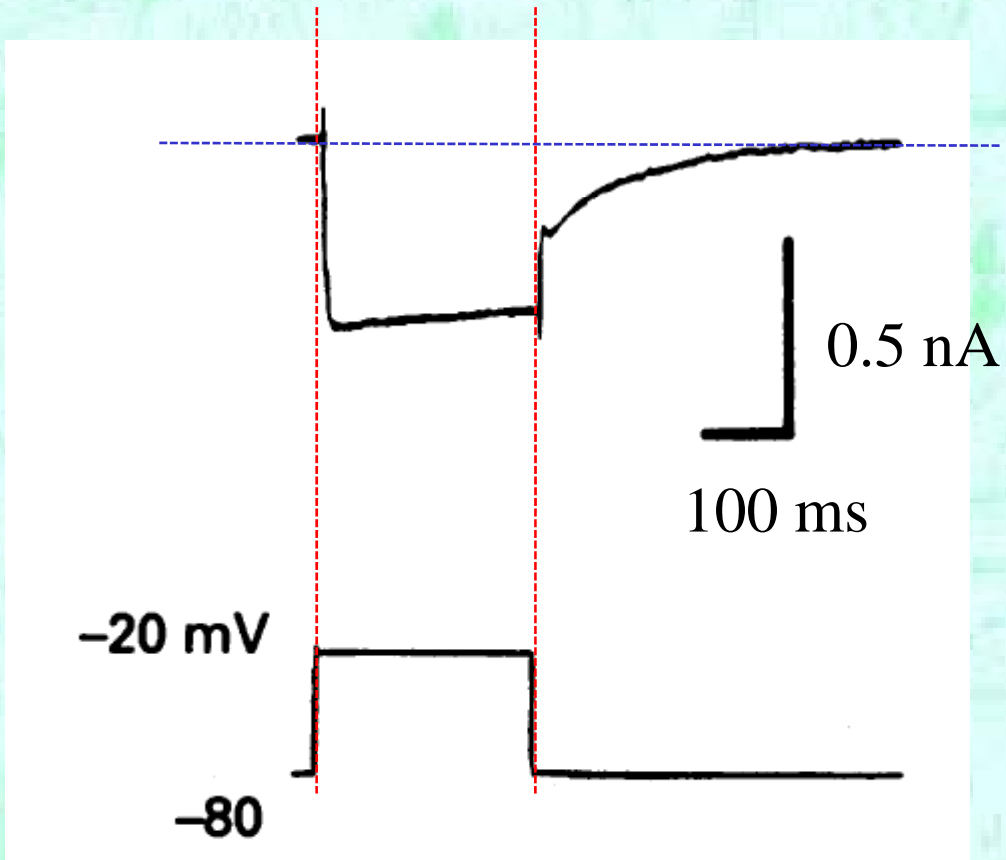
Inactivation



Notion de courant de fenêtre

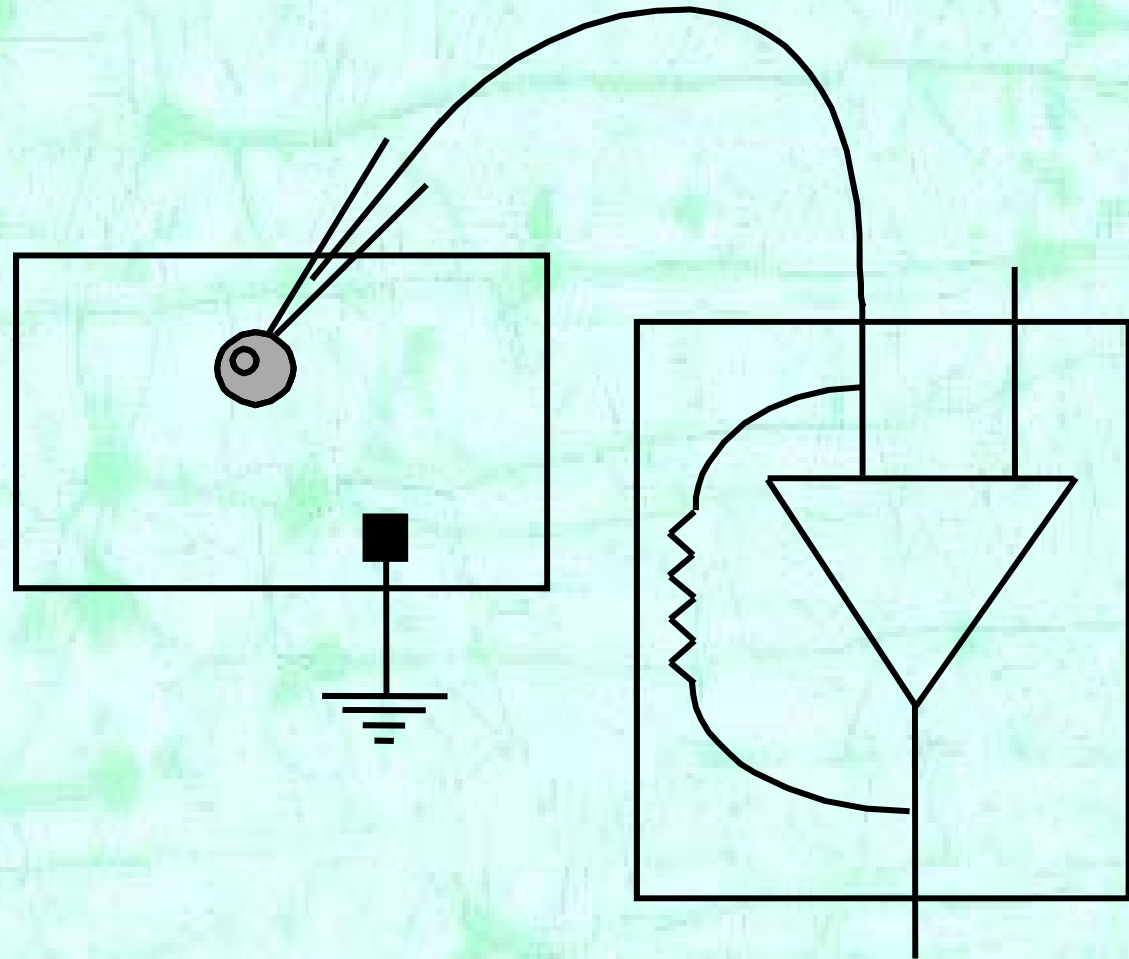
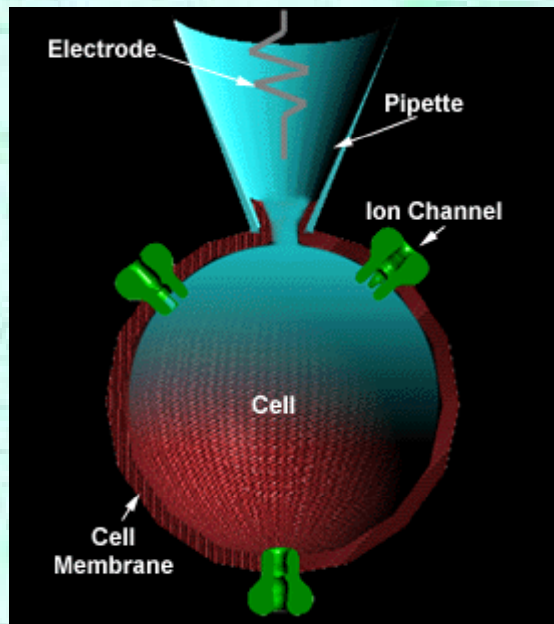
Liao JBC 2007)

Notion de désactivation



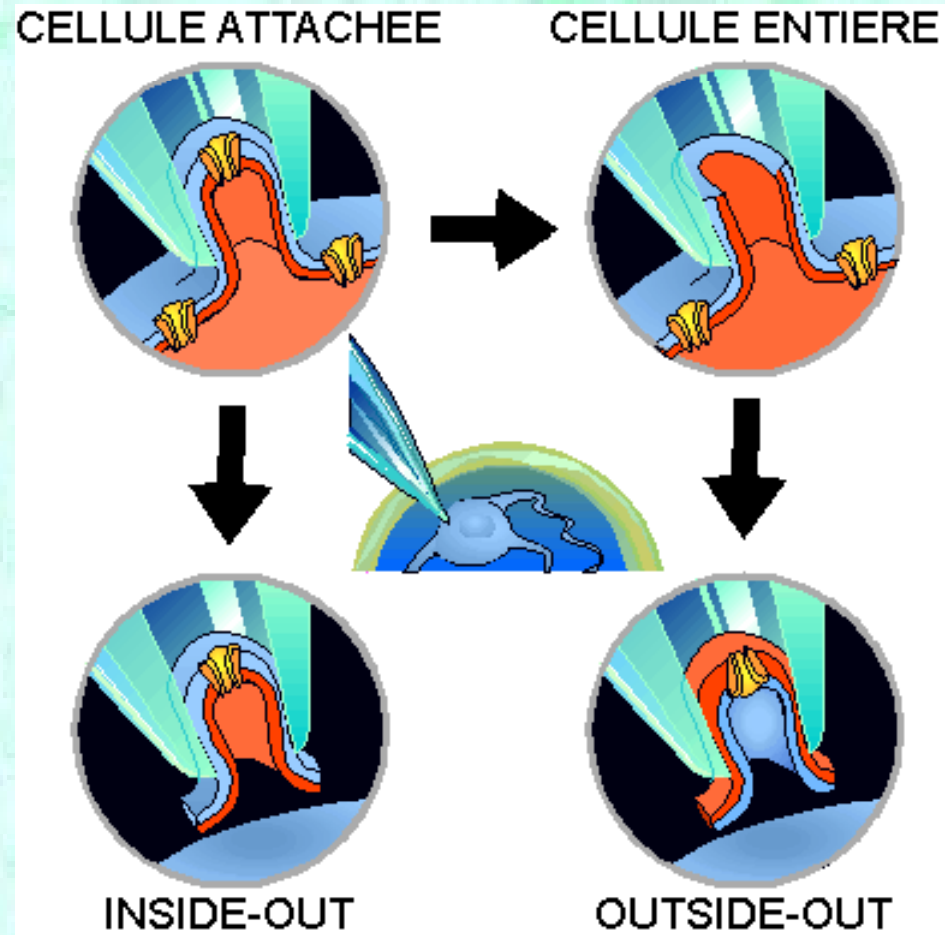
Patch Clamp

Enregistrements de courants unitaires

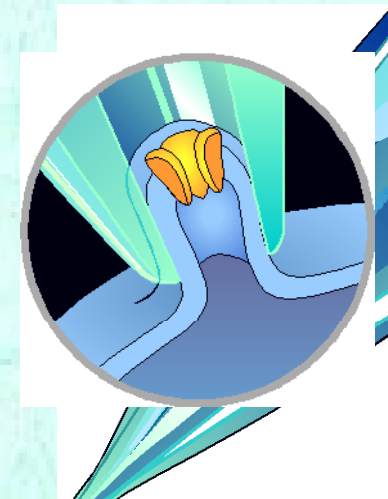
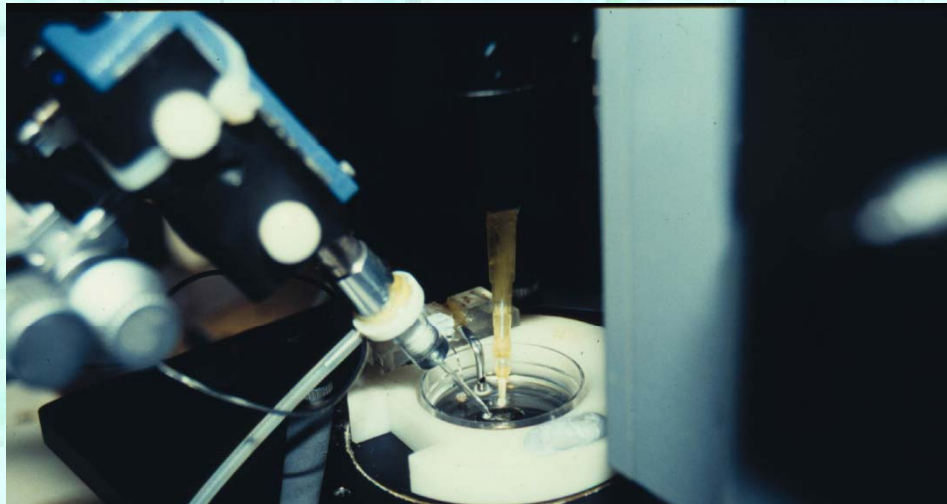
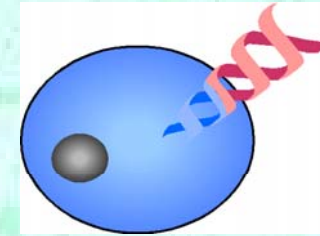
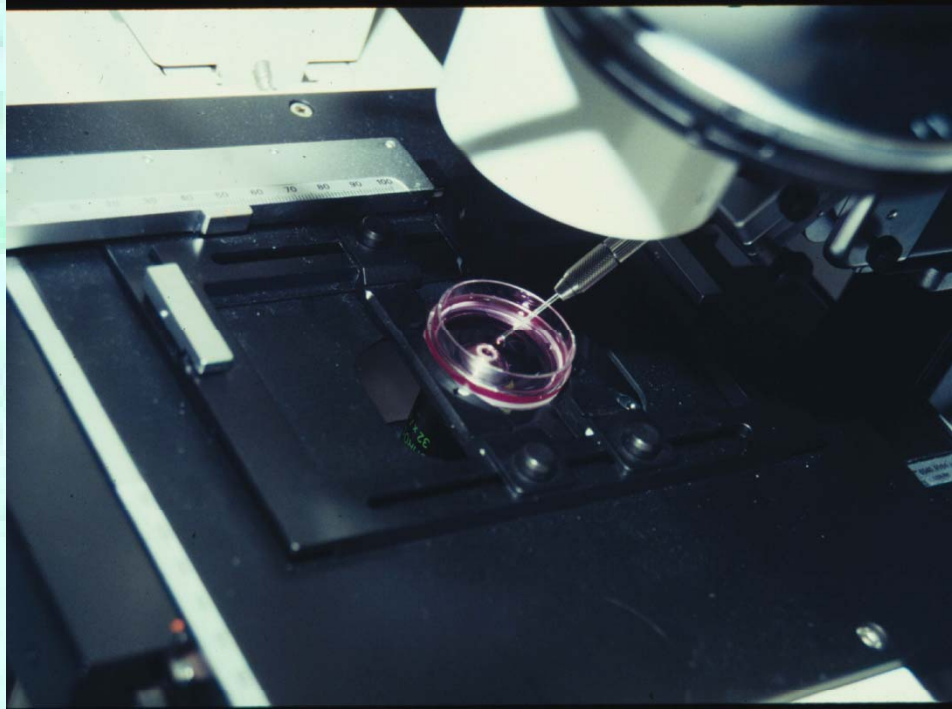


LE PATCH CLAMP

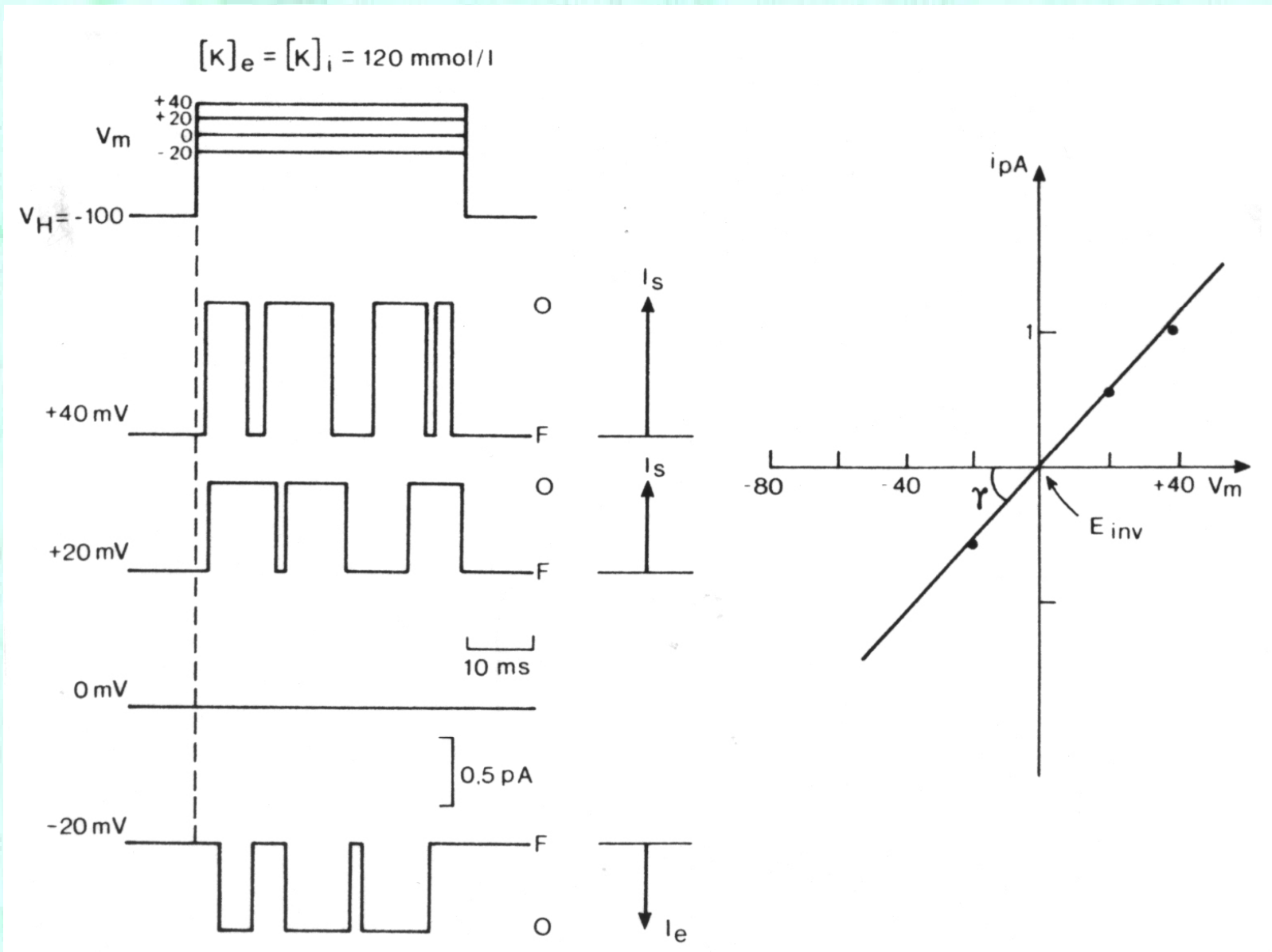
Configurations du Patch Clamp



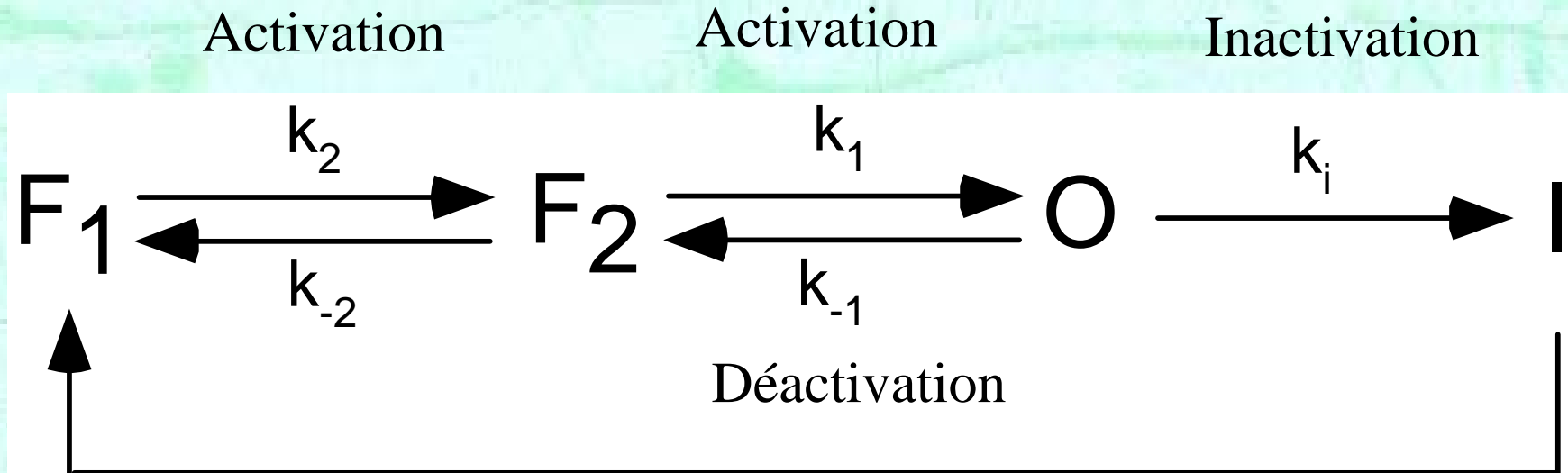
Poste de Patch clamp



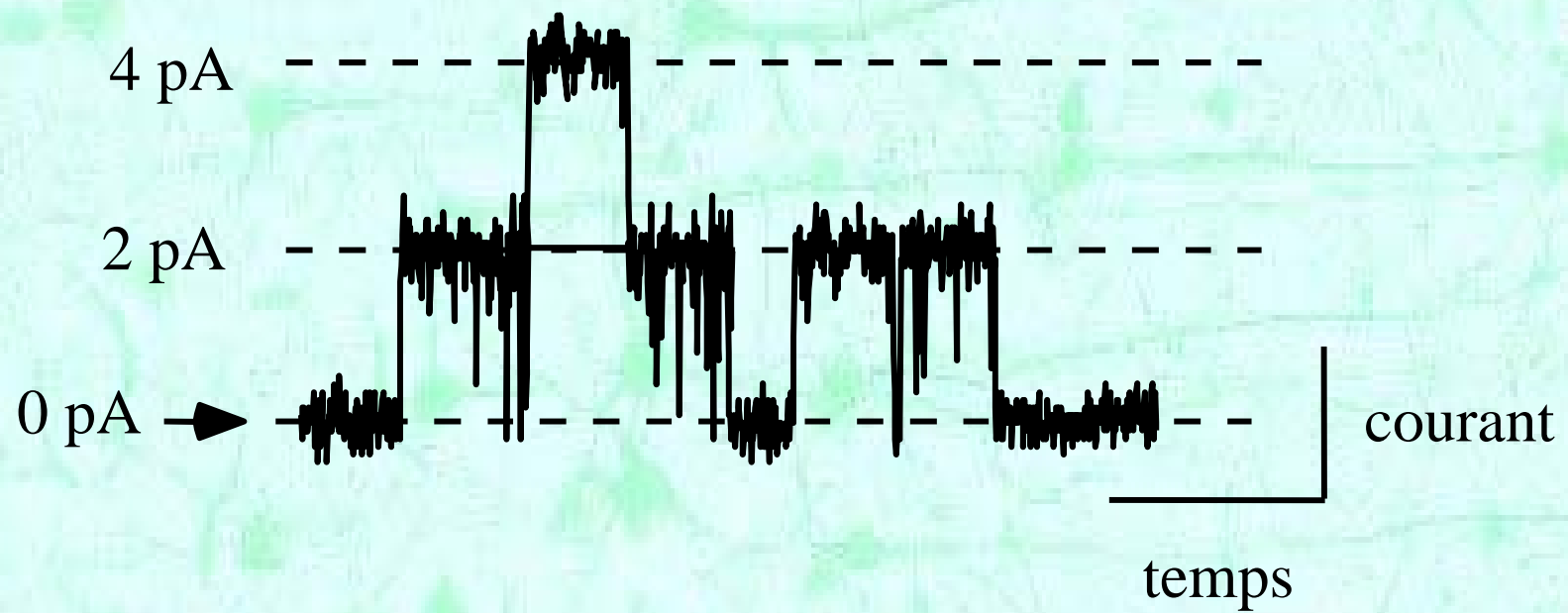
Courant unitaire



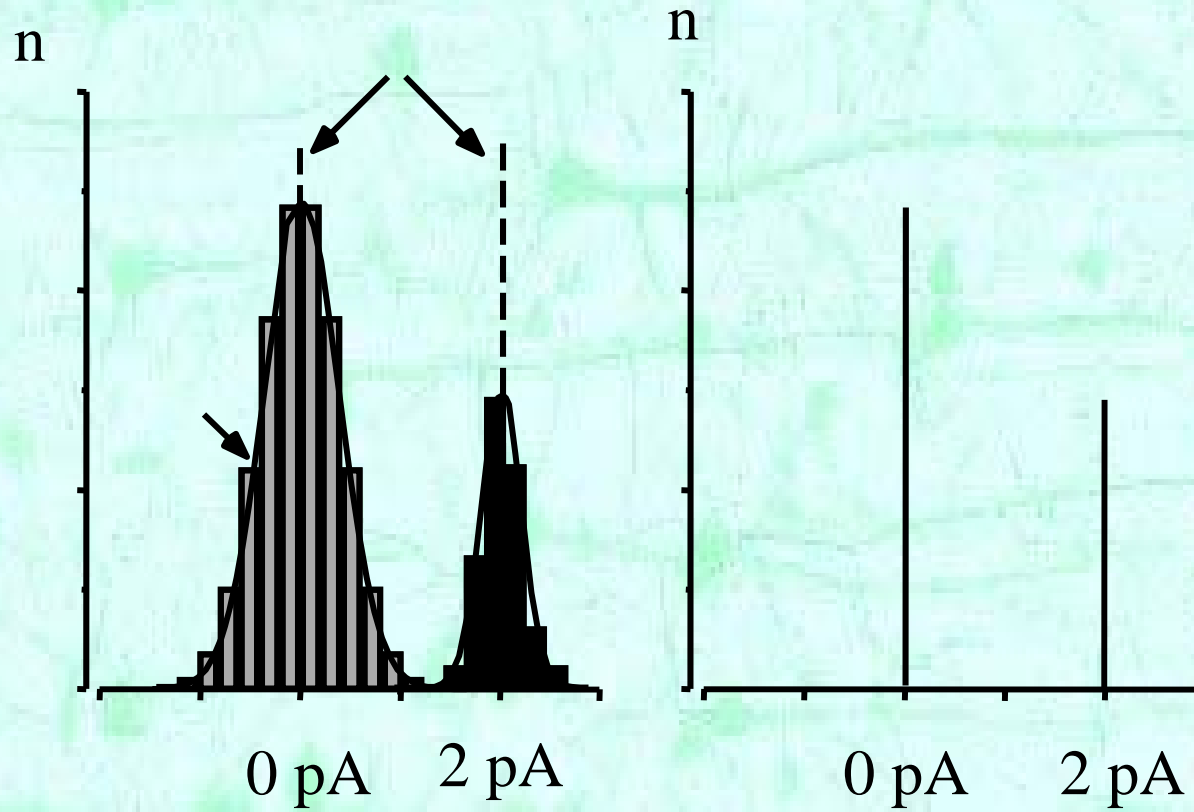
Modèle



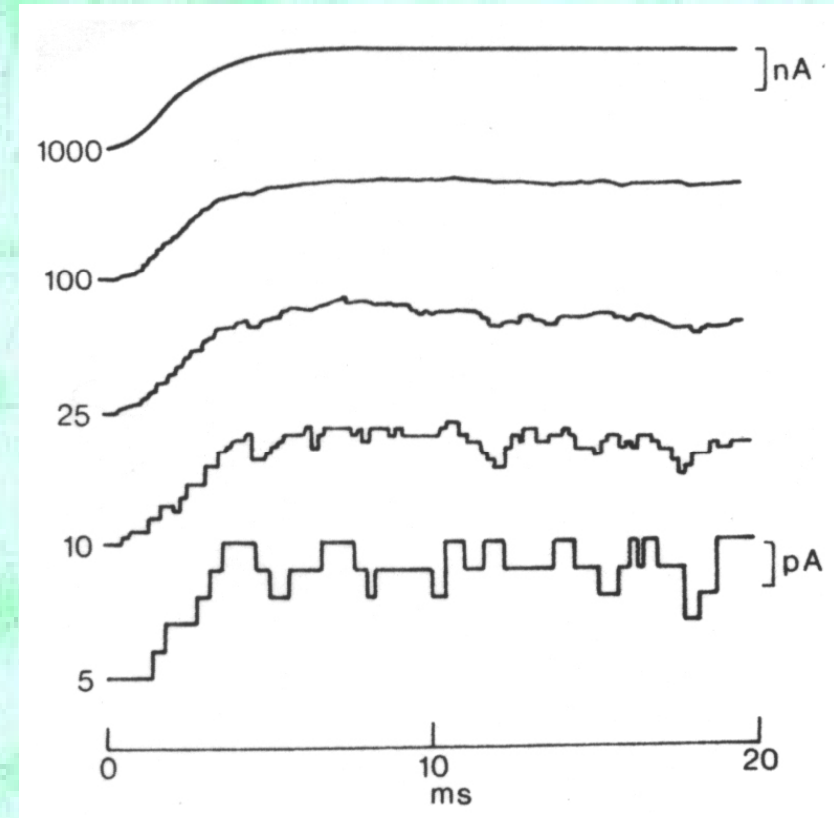
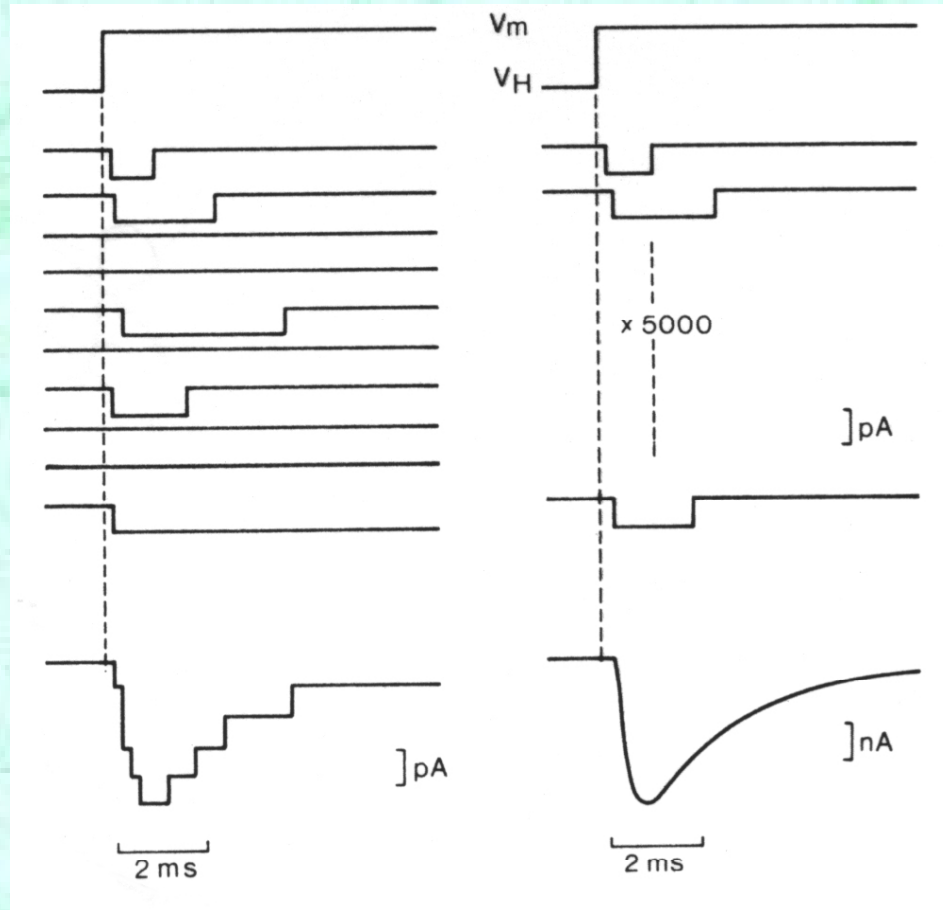
Courant unitaire



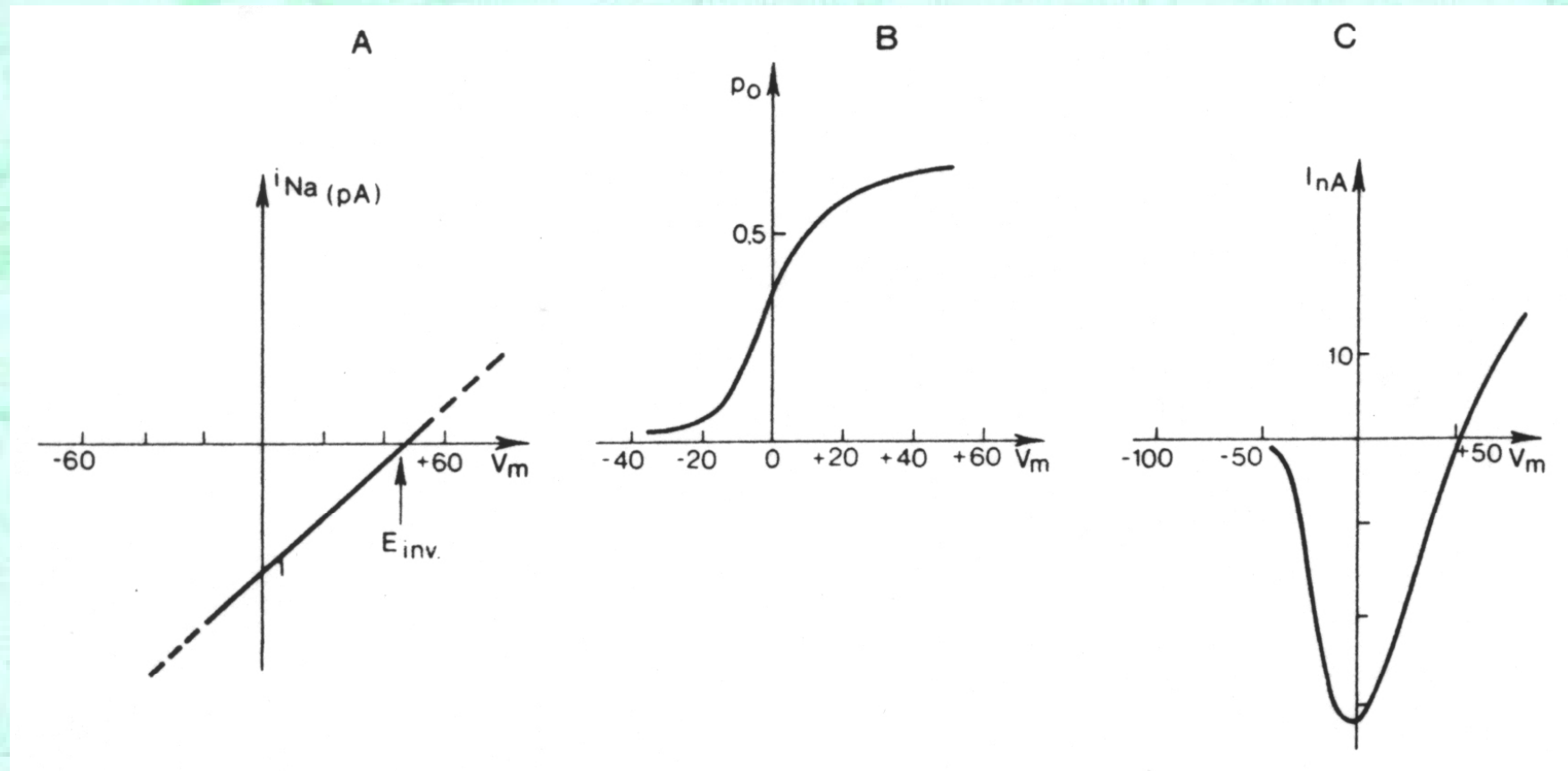
Histogramme d'amplitude



Sommation des courants unitaires



Courant total



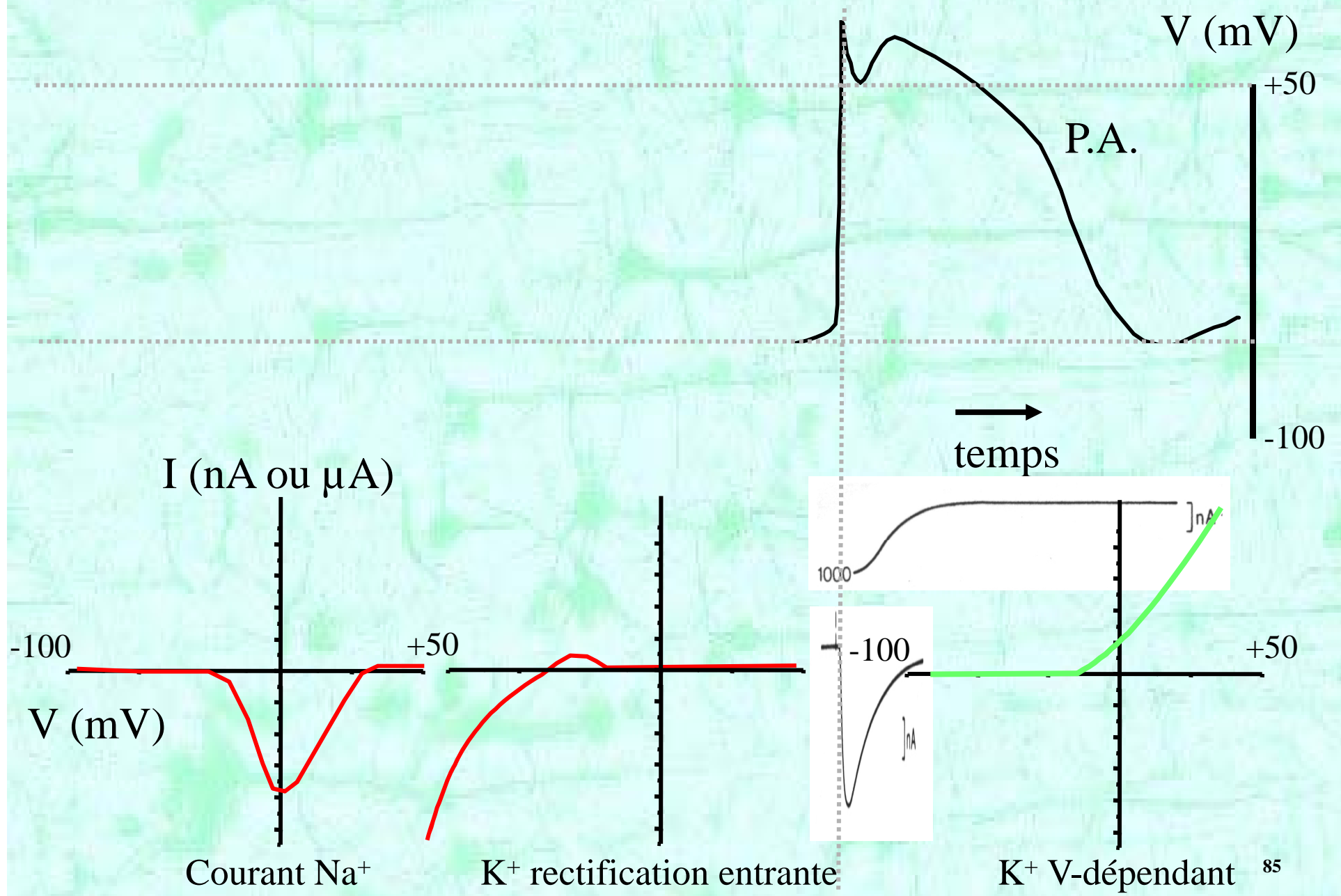
$$i_{\text{unitaire}} = \gamma_{\text{ion}} \cdot (V_m - E_{\text{ion}})$$

$$I_{\text{total}} = i_{\text{unitaire}} \cdot N \cdot P_o = g_{\text{ion}} \cdot (V_m - E_{\text{ion}})$$

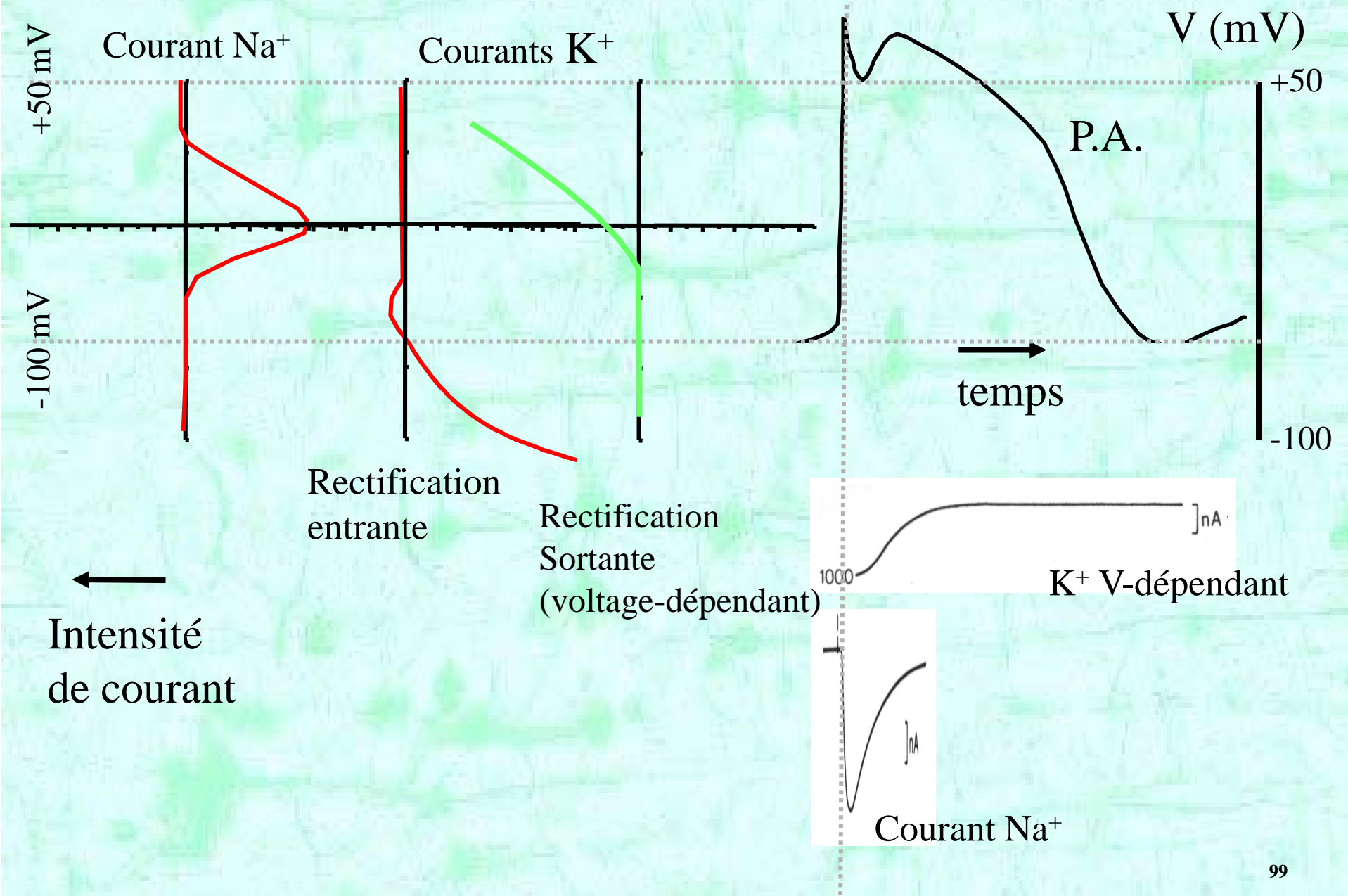
The background of the slide is a map of France with a red grid overlay. The grid consists of vertical and horizontal lines that create a coordinate system across the map. The map itself is in a light, muted color, possibly a pale green or blue, and the grid lines are a distinct red color.

TECHNIQUE D 'ETUDE LE COURANT IMPOSE

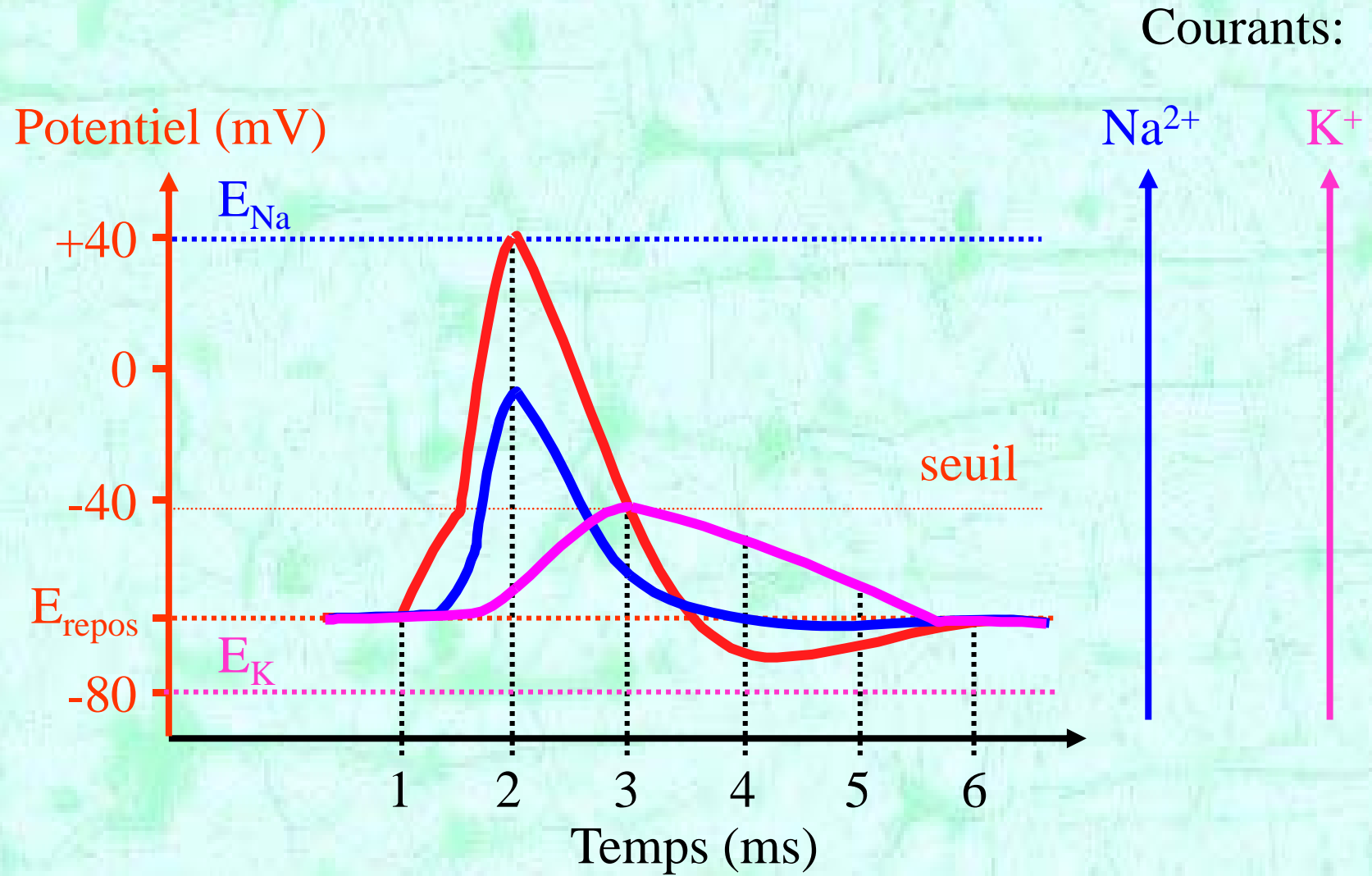
Intégration de la courbe IV et des cinétiques



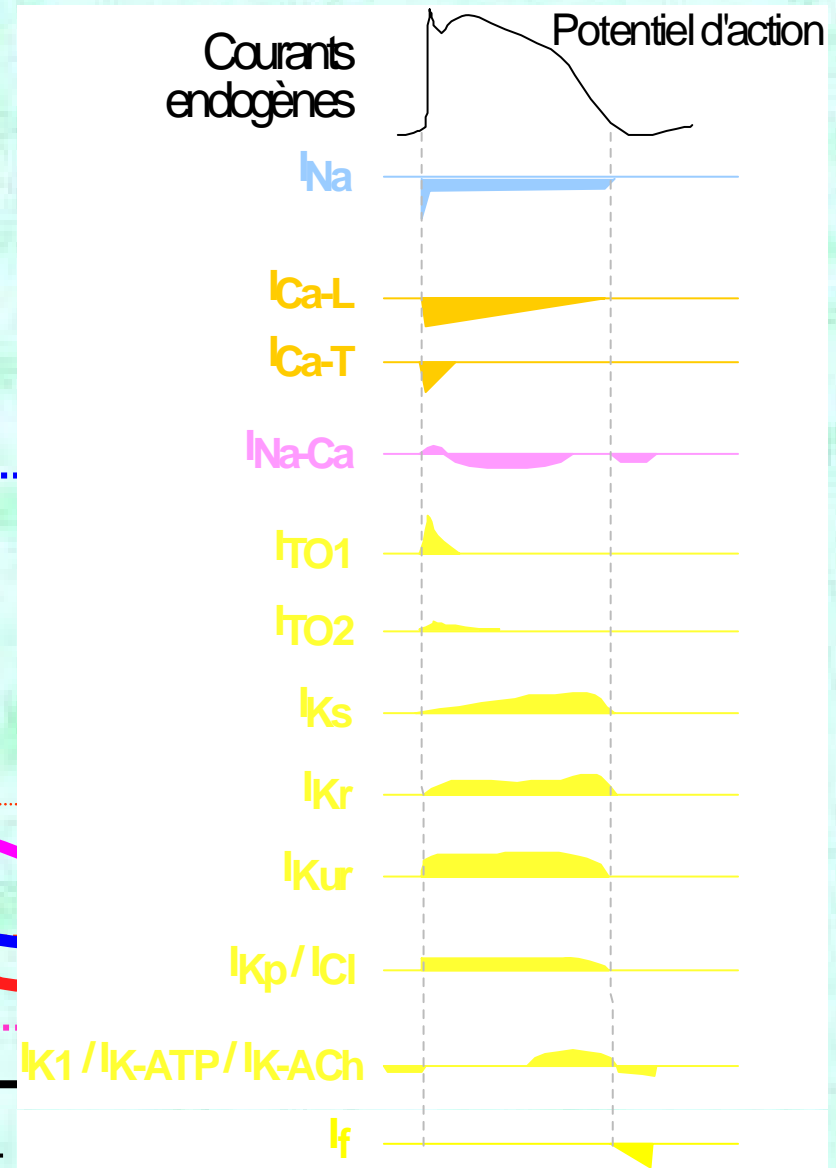
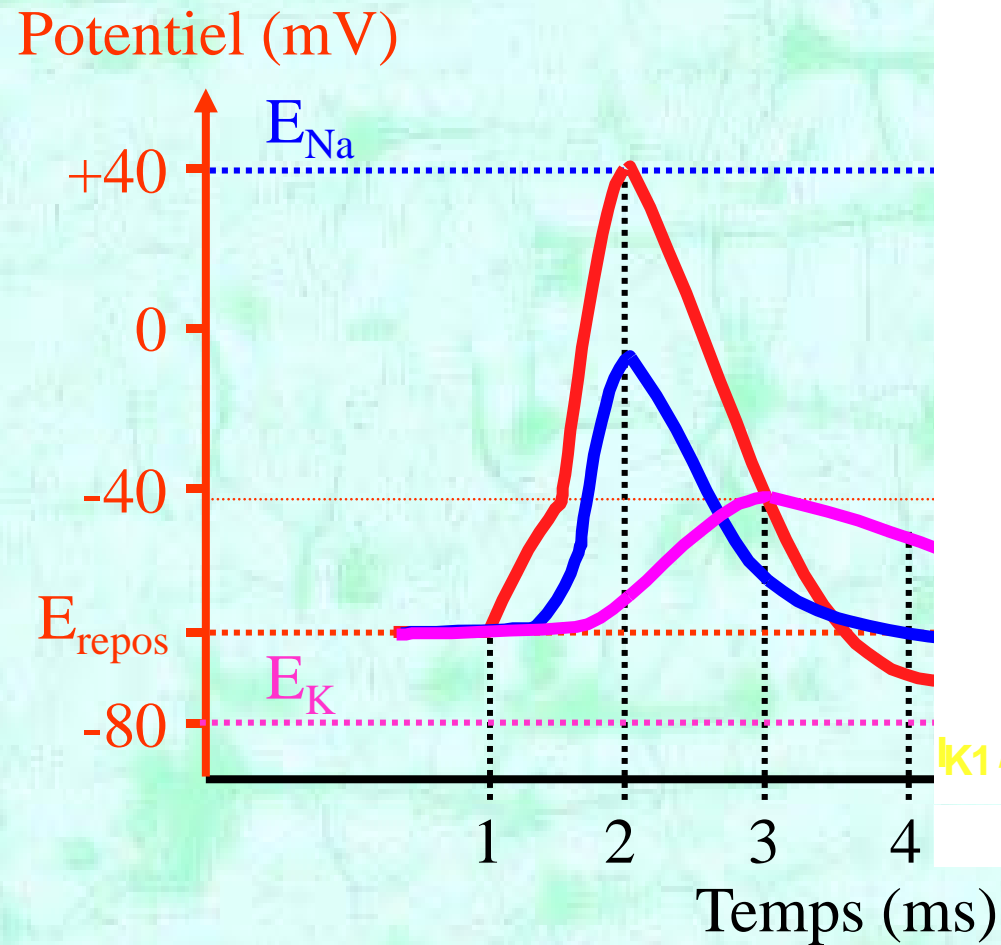
Intégration de la courbe IV et des cinétiques



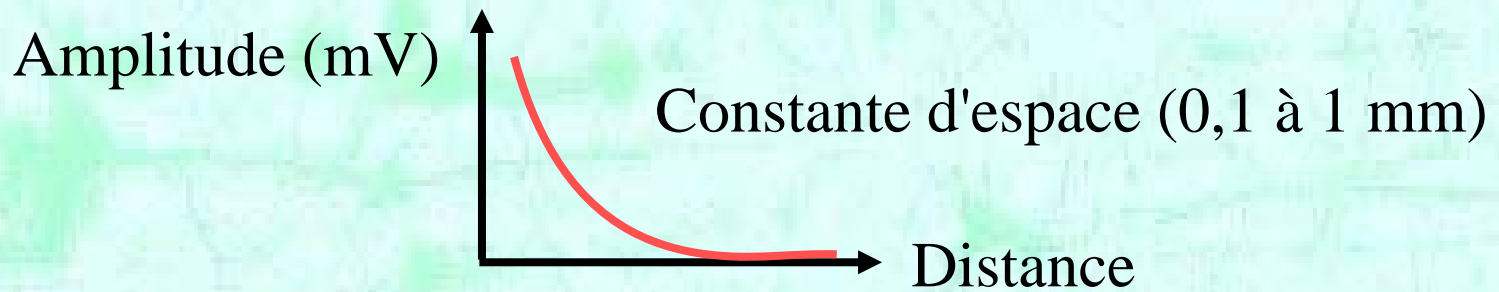
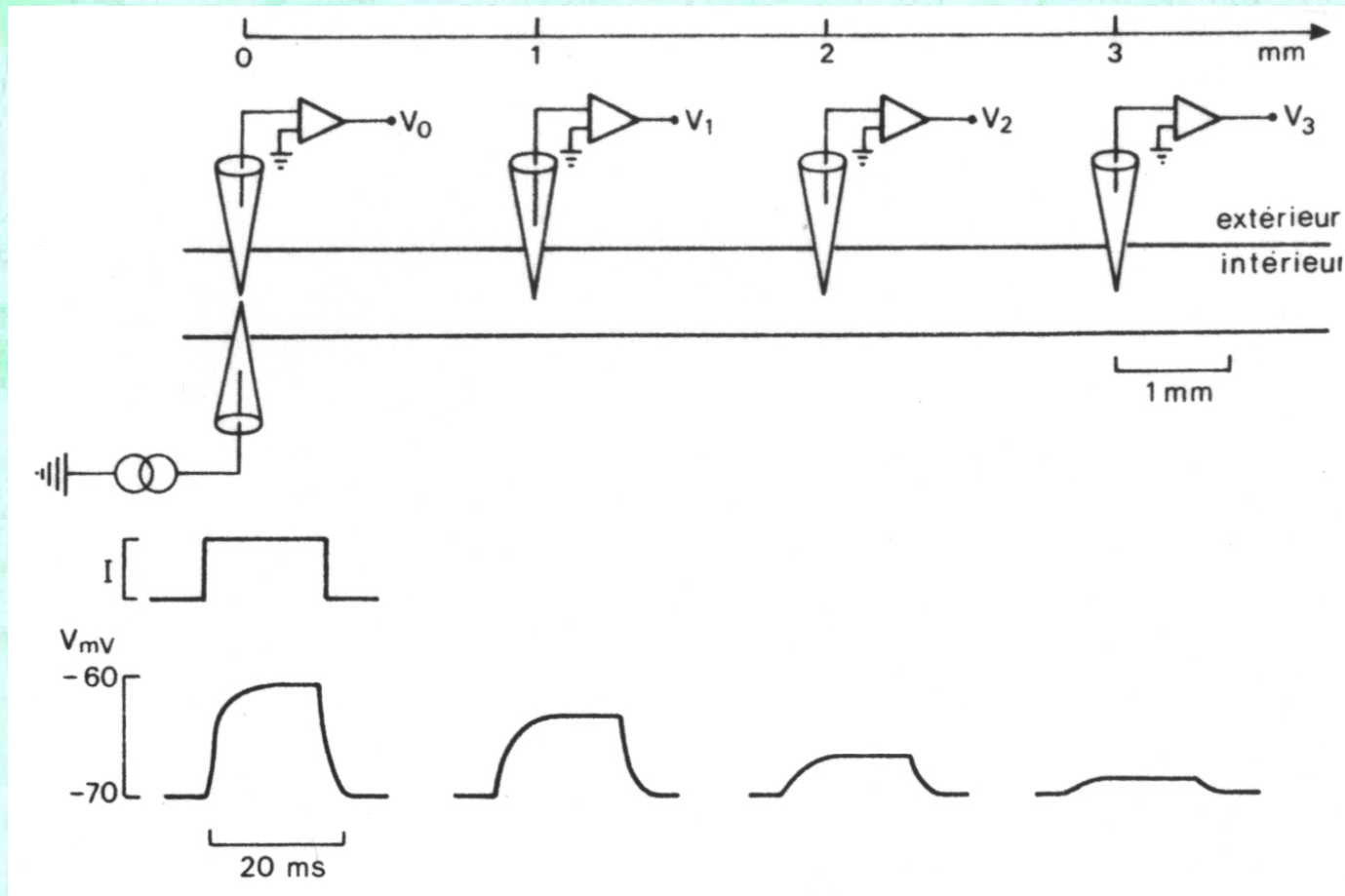
Potentiel d'action en current-clamp



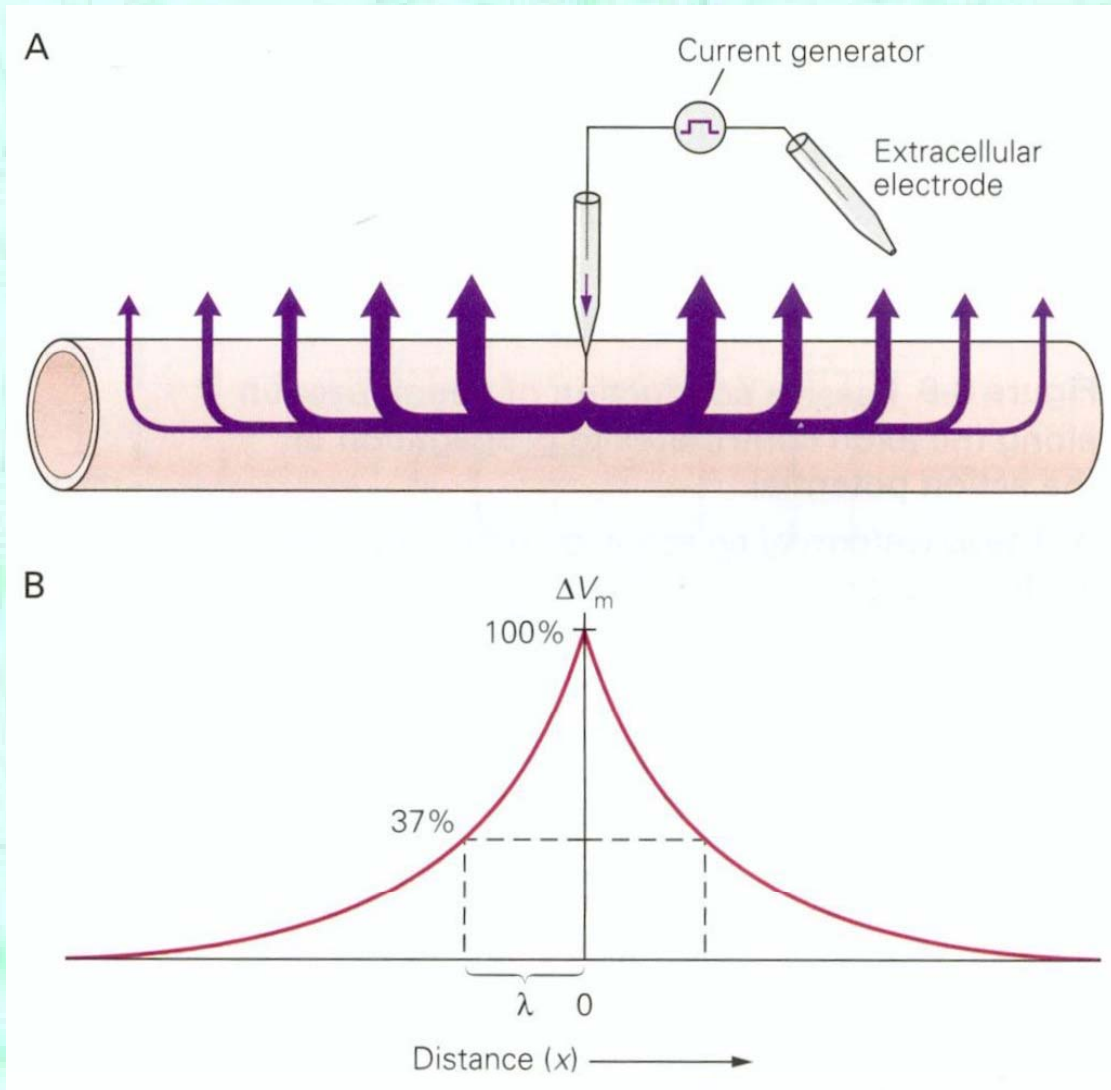
Potentiel d'action en current-clamp



Potentiel électrotonique



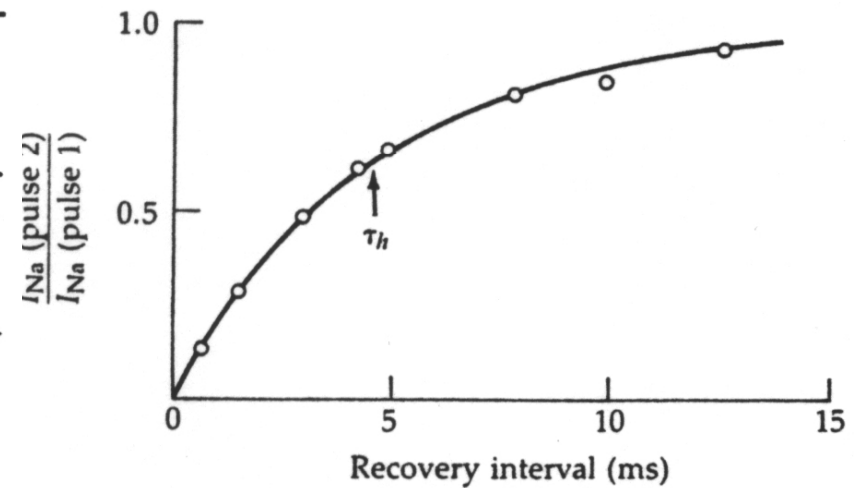
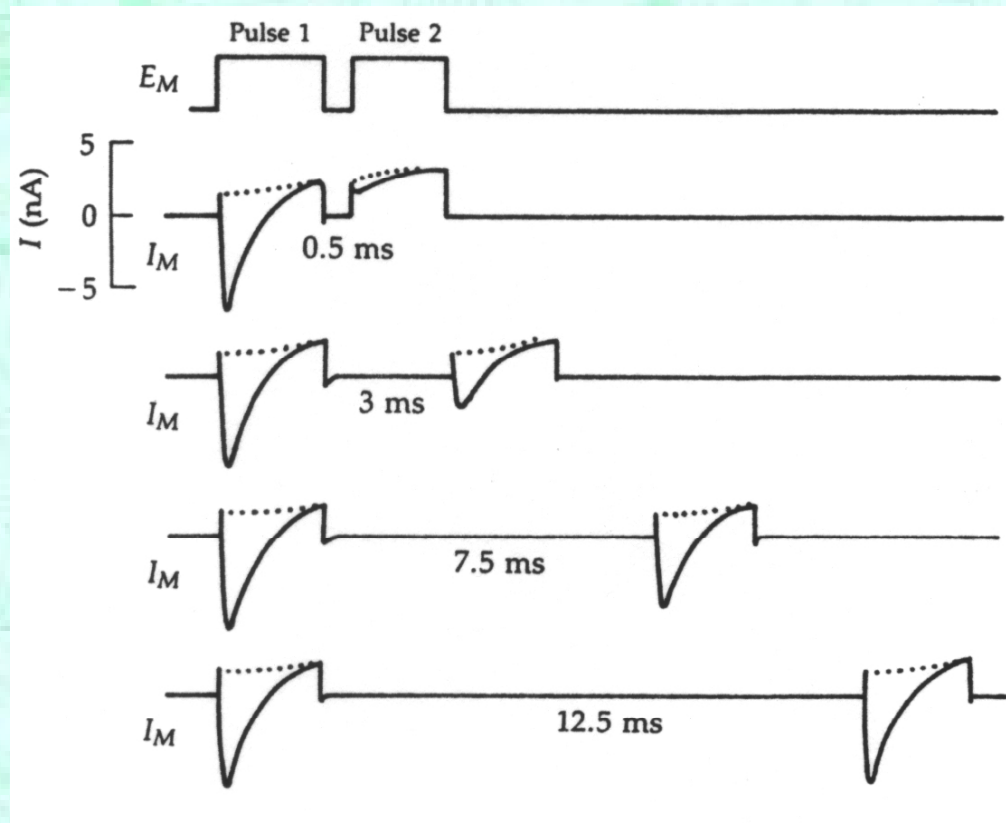
Propagation bidirectionnelle



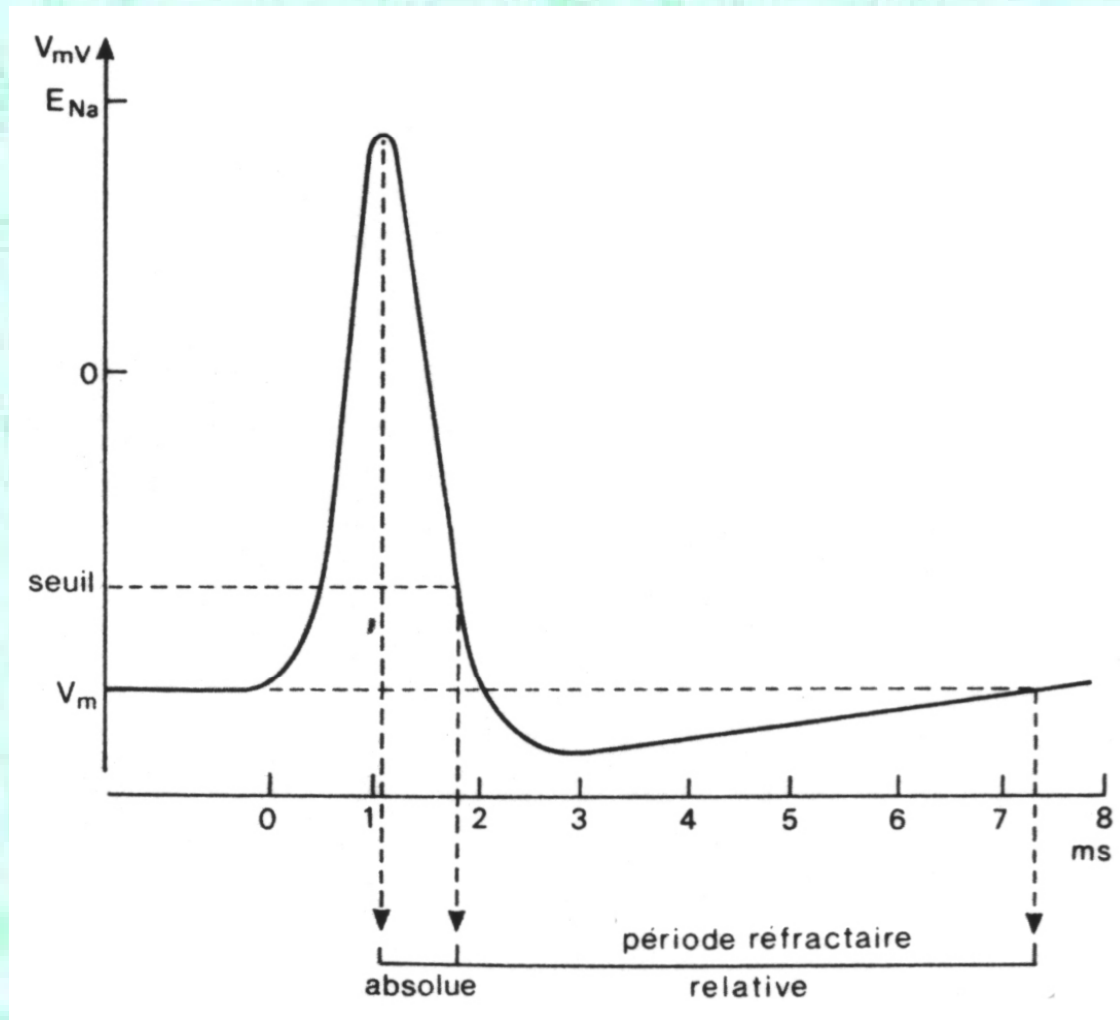
Seeley "Anatomy & Physiology", Mc Graw-Hill

Conséquences de l'inactivation

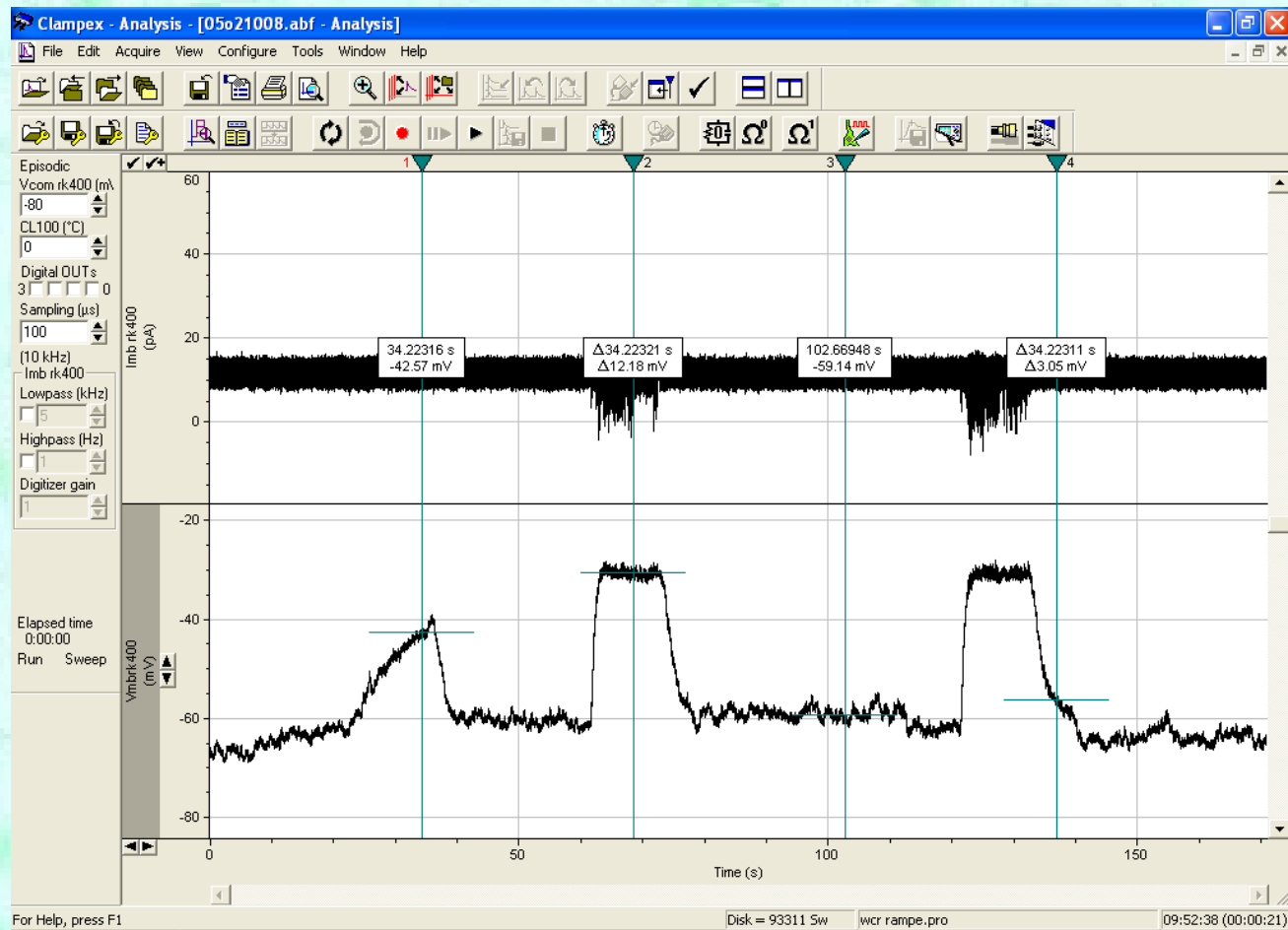
Période réfractaire



Périodes réfractaires (courant Na^+)



Une "manip" en direct

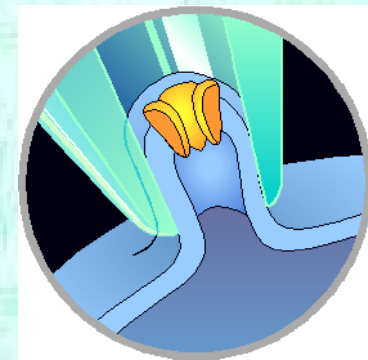
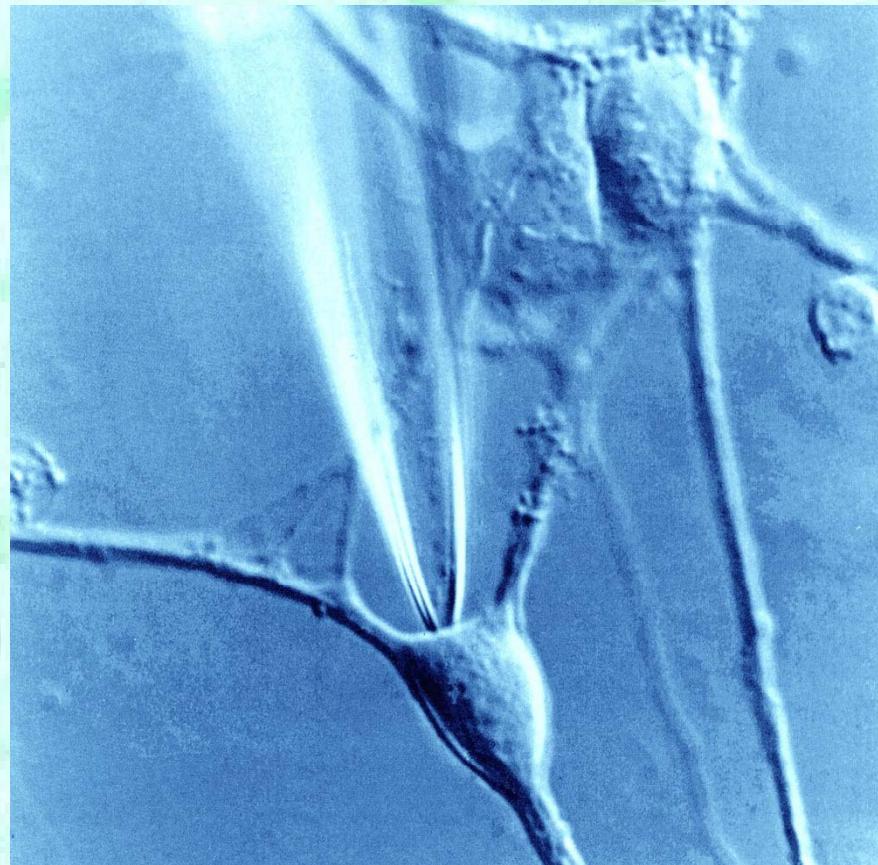
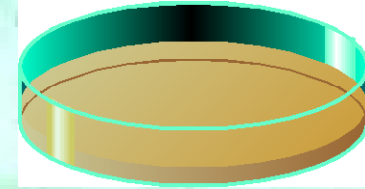




CANAUX ENDOGENES ET EXOGENES

Etude des canaux natifs ou endogènes

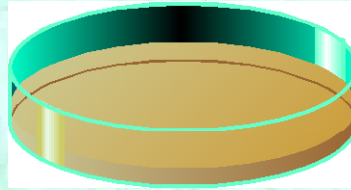
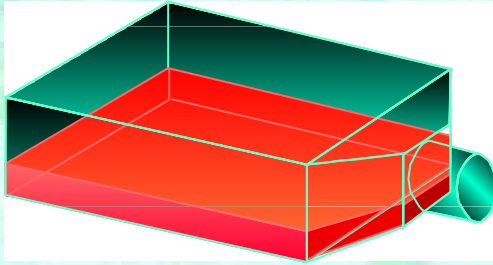
Dissociation mécanique et enzymatique



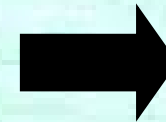
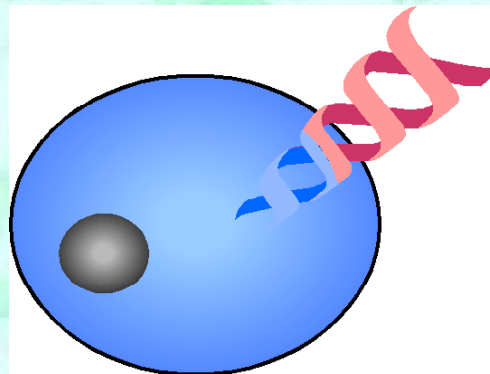
Patch clamp

Etude des canaux clonés ou exogènes

Cultures de cellules



Transfection, infection, injection

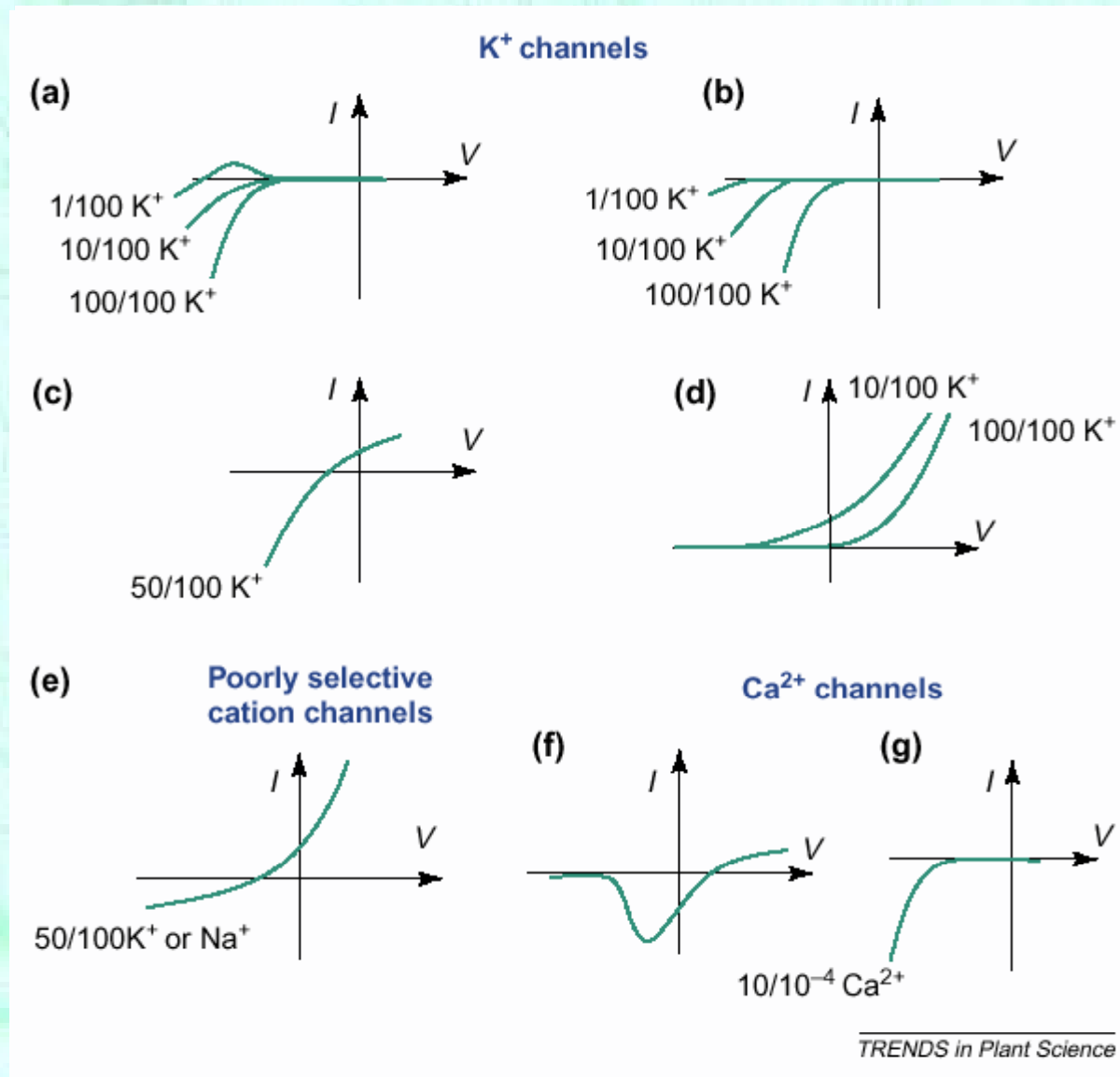


Patch clamp



POINTS DE REPERES

Canaux ioniques des végétaux: *Arabidopsis thaliana*



Historique 1

2600 ans avant JC

Les Egyptiens étudient les phénomènes liés à l'anguille électrique.

1790 GALVANI:

Existence de phénomènes électriques au niveau de la matière vivante.

1827: Loi d'OHM.

1848 DU BOIS REYMOND:

Propriétés électrogénique de la peau de grenouille.

1868 BERNSTEIN:

L'intérieur et l'extérieur des cellules sont composés d'électrolytes de différentes concentrations séparées par une membrane perméable à ces électrolytes.

1888 NERNST:

Loi de Nernst donnant le potentiel d'équilibre d'un ion.

1902 BERNSTEIN: Théorie de la membrane:

- le potentiel de repos est du à la membrane,
- notion de membrane électrique et de membrane biologique,
- les concentrations ioniques sont différentes de part et d'autres de la membrane
- au repos la membrane n'est perméable qu'au potassium.

Historique 2

1910 EINTHOVEN:

Naissance de l'ECG (électrocardiogramme)

1920-1945:

Naissance de l'électrophysiologie, due aux améliorations techniques après la II^{nde} guerre mondiale .

1935: Microélectrode intracellulaire.

1937 HODGKIN:

Des courants locaux peuvent dépolariser la membrane.

1948 ROSENBERG-USSING:

Différence entre les transports actifs et les transports passifs, au niveau des épithéliums.

1949 LING-GERARD:

Première microélectrode de verre.

1952 HODGKIN-HUXLEY:

Technique du voltage clamp

1952 CORABOEUF:

Naissance de l'électrophysiologie en France.

1958 USSING:

Etude des différentes perméabilités (K^+ et Na^+) sur les épithéliums, chambre de Ussing.

1981 NEHER - SAKMANN:

Technique de patch clamp.

2000 NEHER - SAKMANN :

Prix Nobel de Médecine.