



**Inserm**



Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



# ELECTROPHYSIOLOGIE PRINCIPES ET TECHNIQUES

*ijpmsc*

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

**Octobre 2009**

# 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**

# **LES PHENOMENES ELECTRIQUES EN BIOLOGIE**



# Les phénomènes électriques en biologie

L'anguille électrique



La torpille



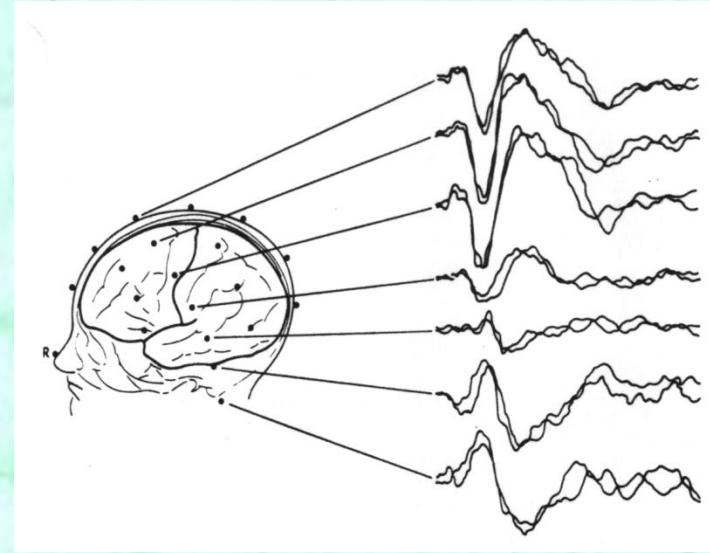
# **ETUDE DES PHENOMENES ELECTRIQUES D 'ORIGINE BIOLOGIQUE**



# Animal entier: EEG

E.E.G.: Electroencephalogramme

Electrodes externes



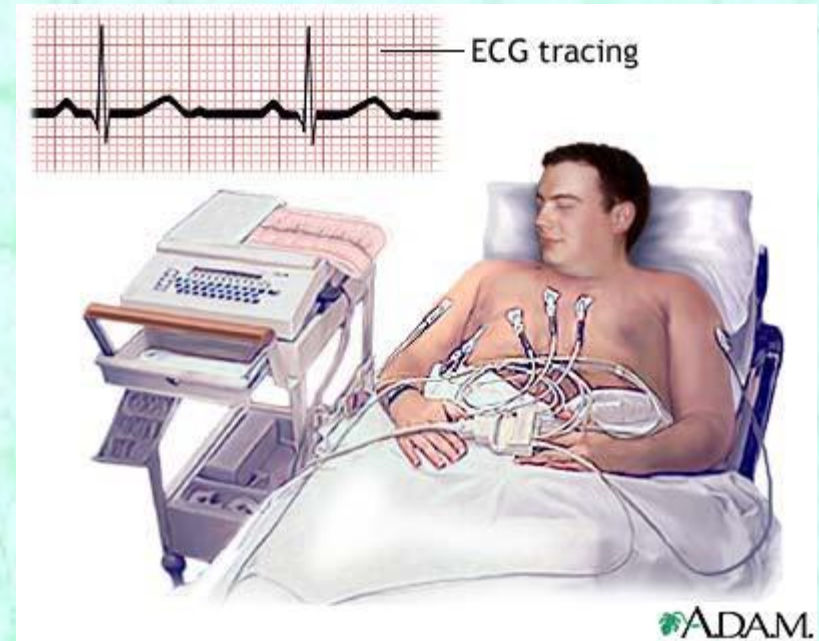
Electrodes implantées





# Animal entier: ECG

E.C.G.: Electrocardiogramme



Electrodes externes

# Organe entier: coeur

## Cœur entier



Cœur isolé perfusé de souris



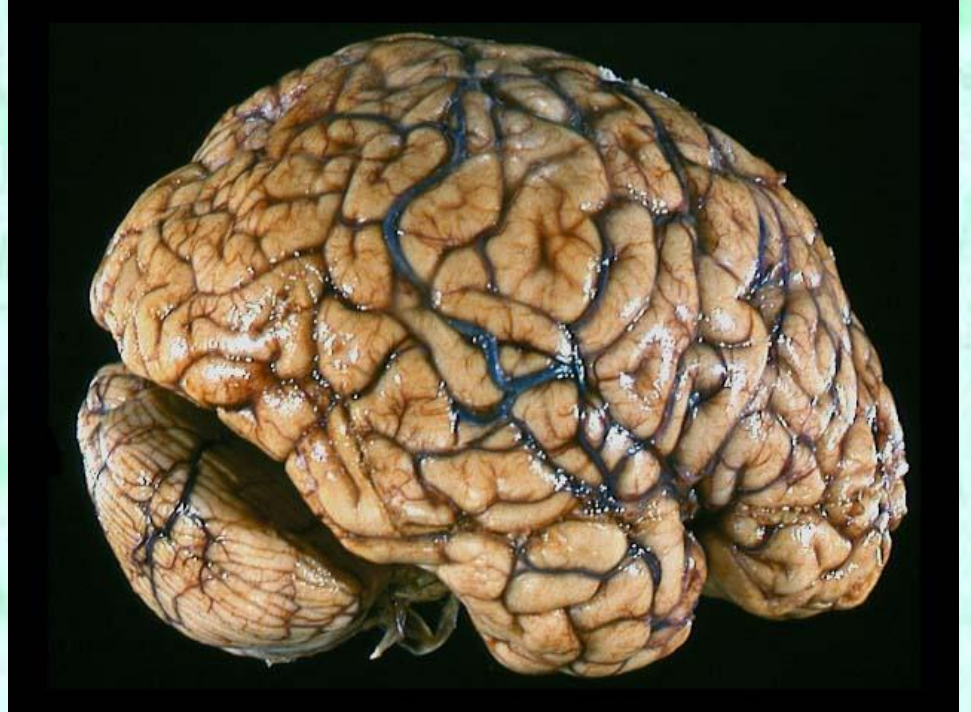
Electrodes

*Drici et al Circulation 2002*



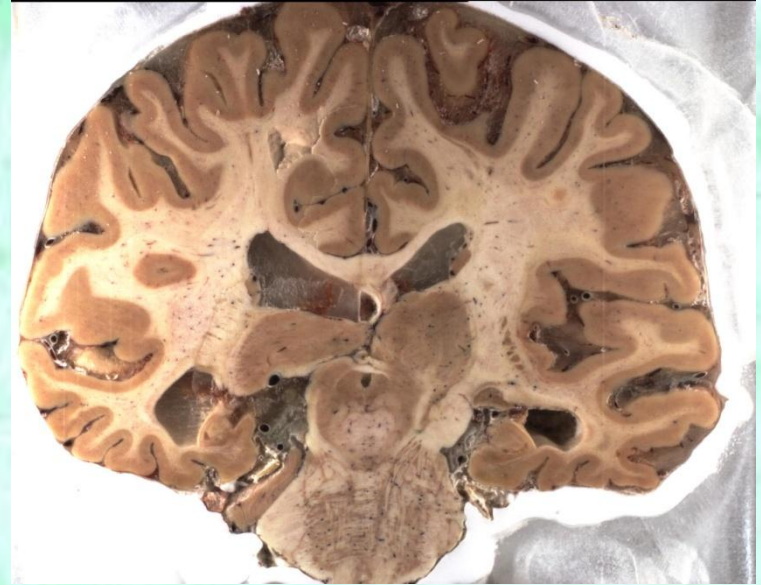
# Organe entier: cerveau

Microélectrodes

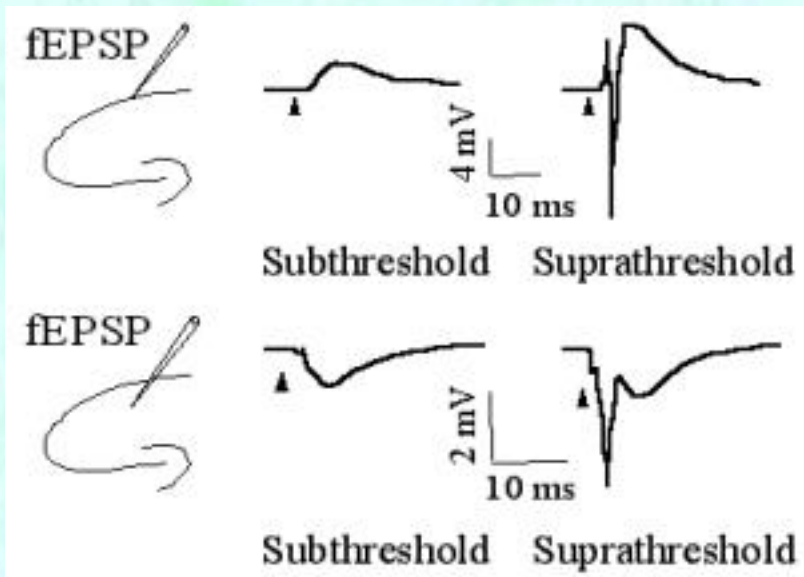




# Tissus: tranche de cerveau

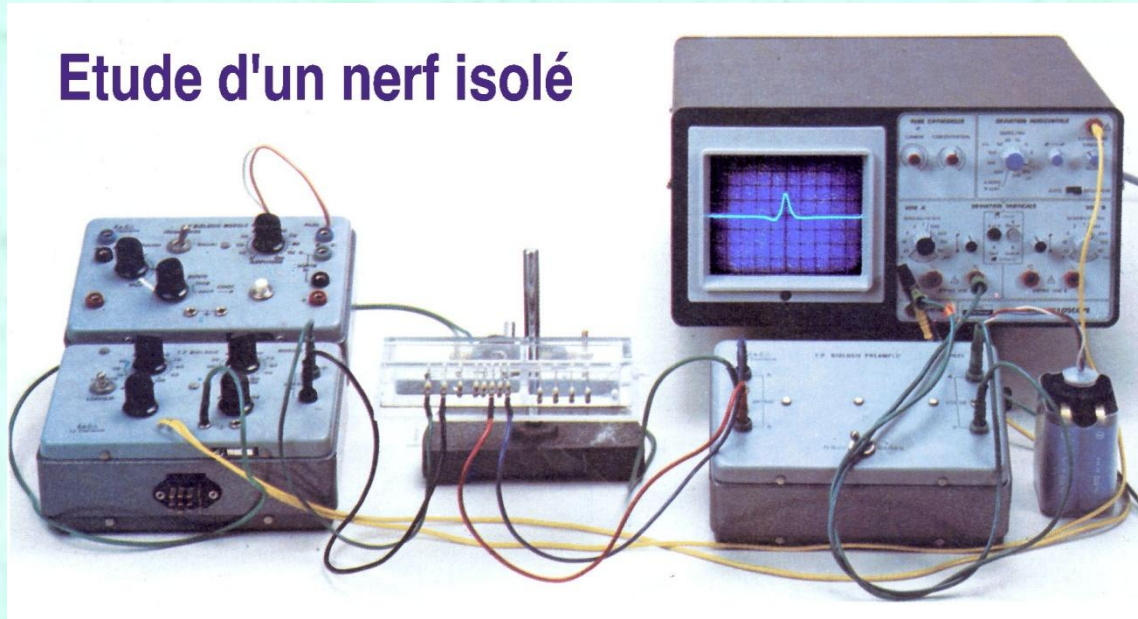


Electrodes



# Tissus: nerf isolé

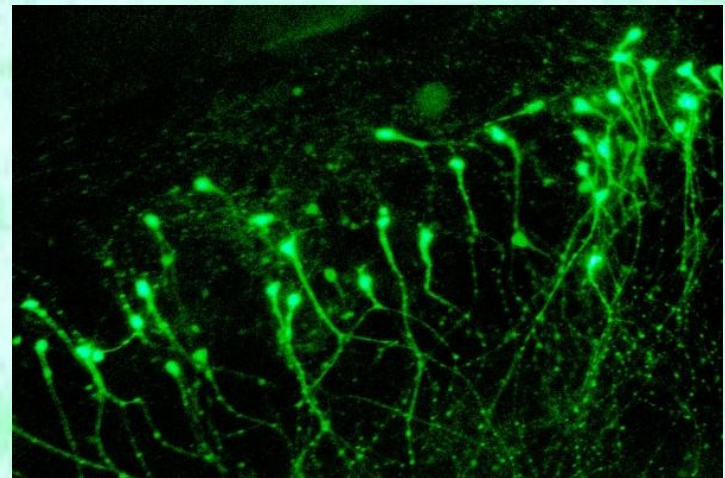
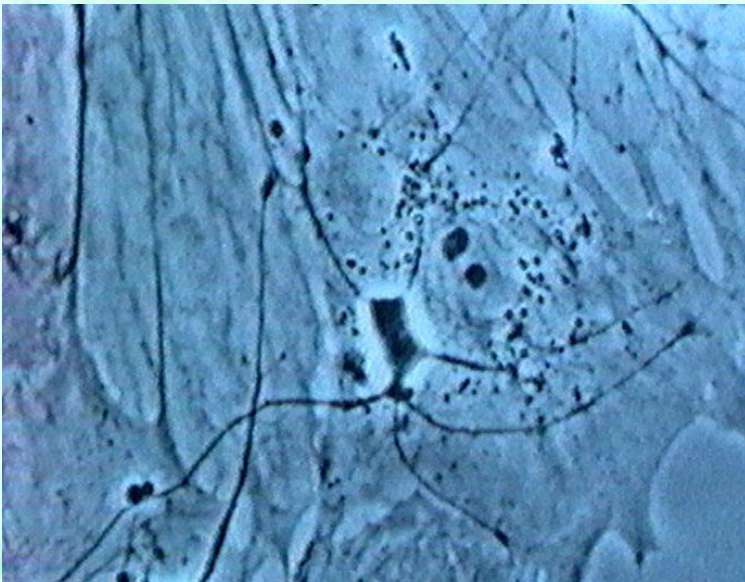
## Etude d'un nerf isolé





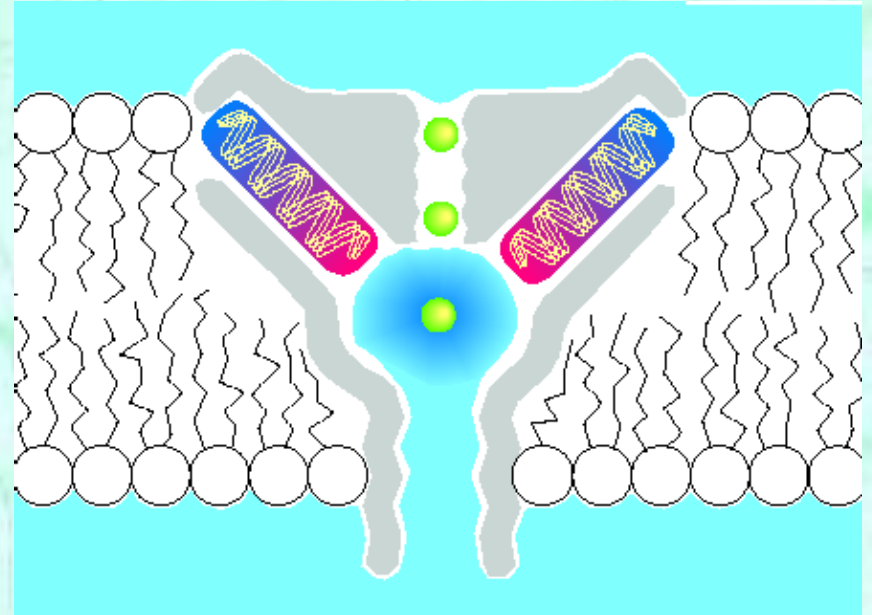
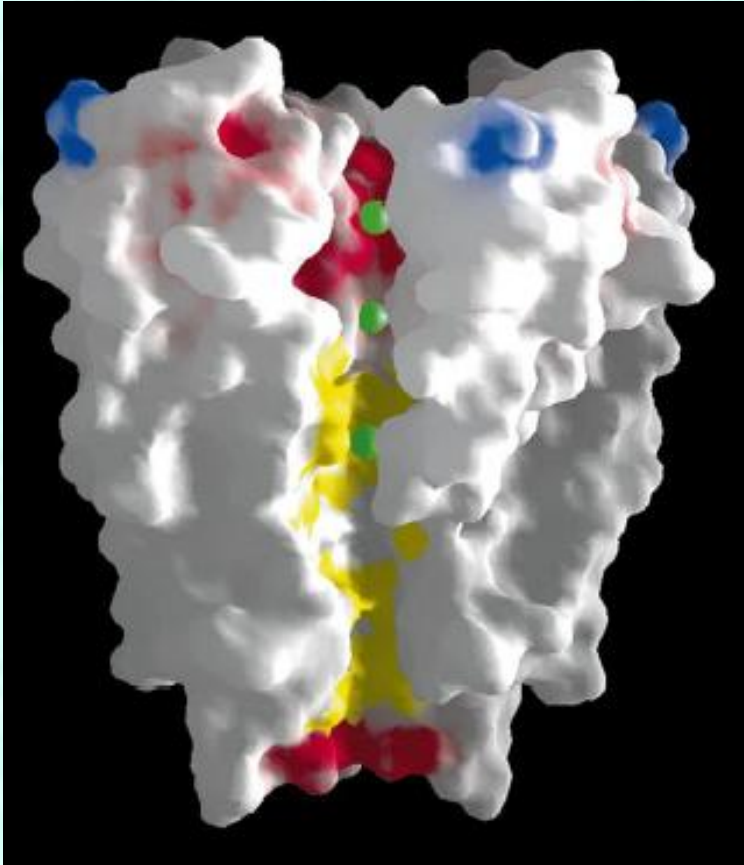
# Cellules: Neurones en culture

Microélectrode  
Pipette de patch clamp





# Protéine canal



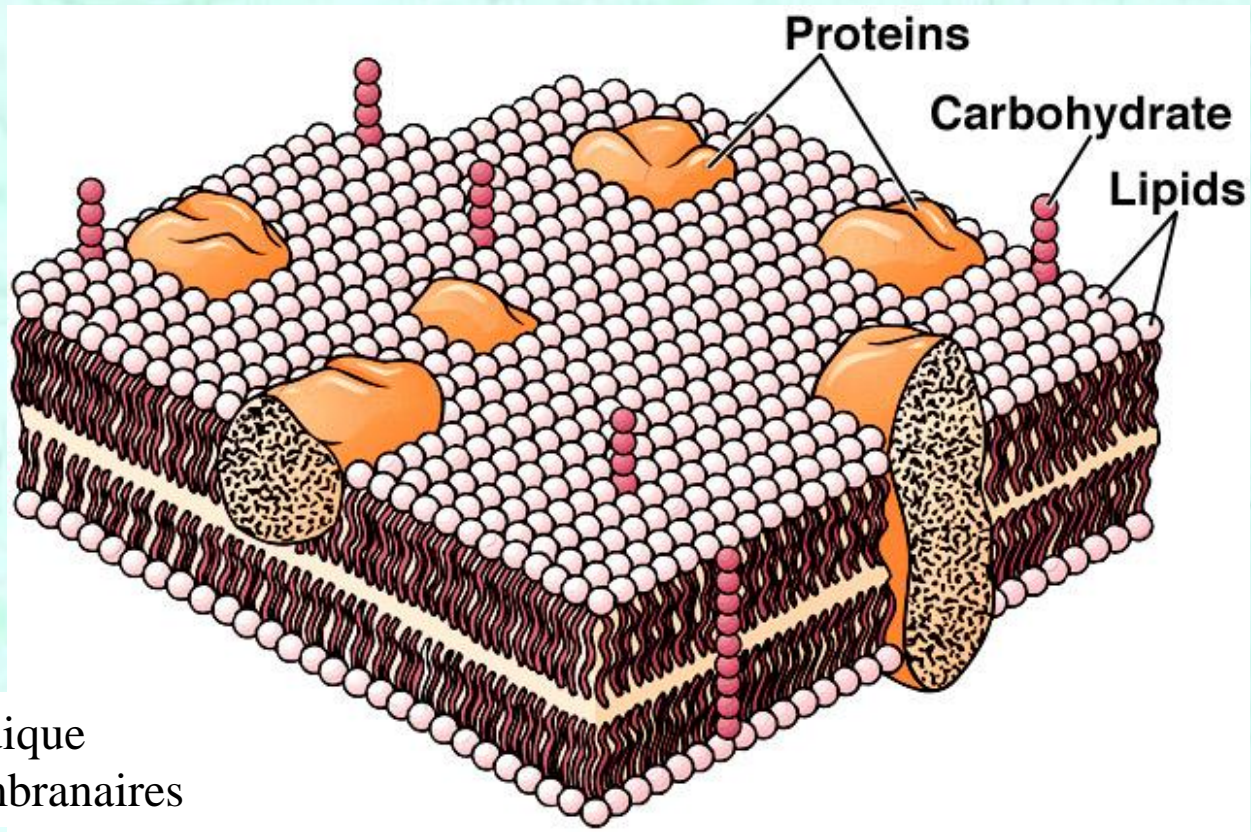
**KcsA**

*Doyle et al., (1998) Science*

# **TRANSPORTS MEMBRANAIRES**



# Assymétrie de la membrane plasmique



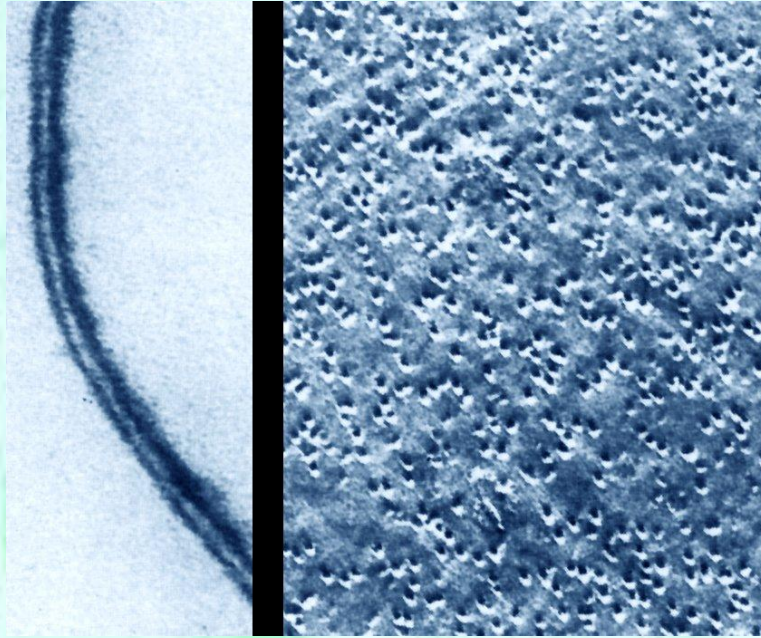
Bicouche lipidique  
Protéines membranaires

Concentrations ioniques  
dans les cellules de vertébrés

	Interne	Externe
<b>Na<sup>+</sup></b>	14	140
<b>K<sup>+</sup></b>	160	3
<b>Ca<sup>++</sup></b>	10 <sup>-4</sup>	1
<b>Cl<sup>-</sup></b>	14	150



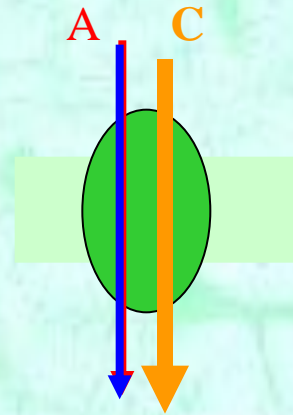
# Protéines de la membrane plasmique



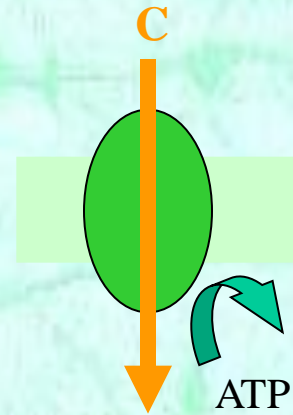
x75000

# Notions générales sur les transports membranaires

**Transports passifs**



**Diffusion facilitée**



**Gradient de [A]**

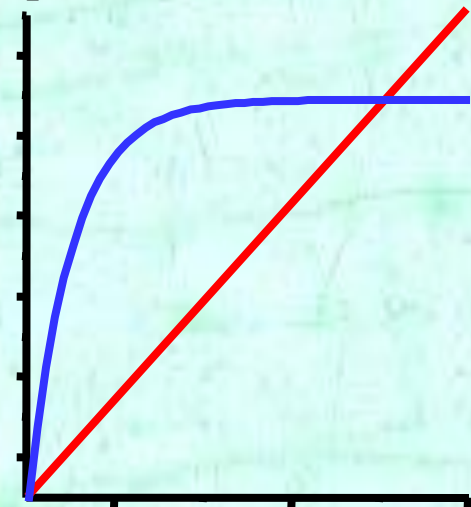


**Gradient de [C]**

**Transports actifs secondaires**

**Transports actifs avec consommation d'ATP**

Qté transportée

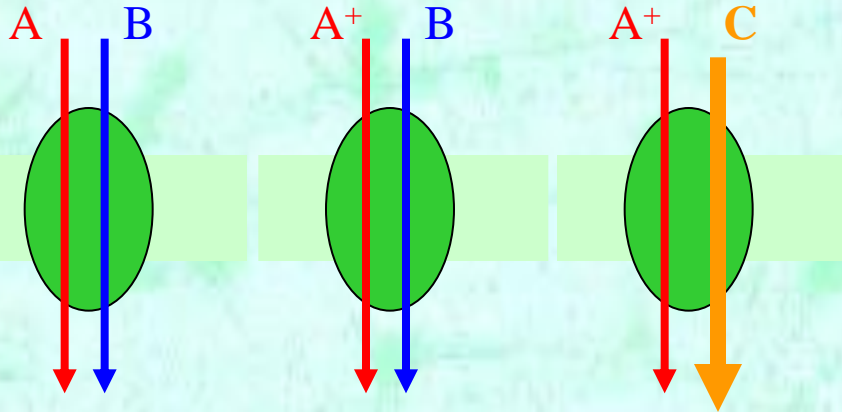


Gradient de [ ]



# Transports membranaires

## Symports

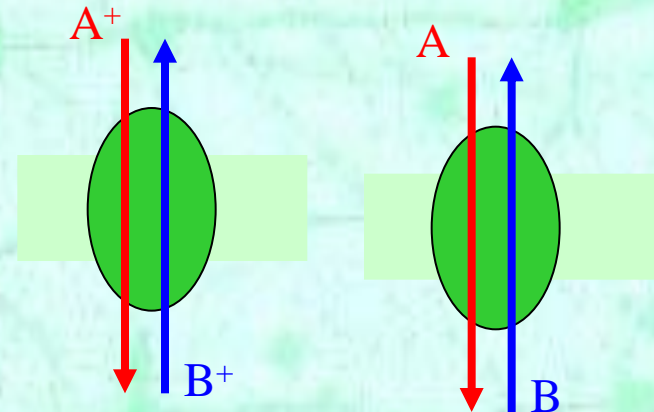


*Electroneutre*

*Electrogène*

*Electrogène*

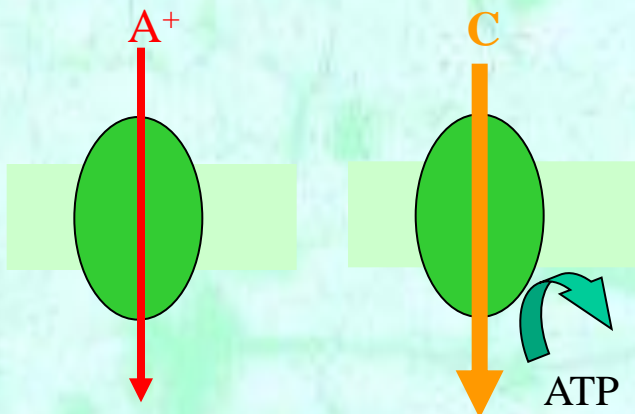
## Antiports



*Electroneutre*

*Electroneutre*

## Uniports



*Electrogène*

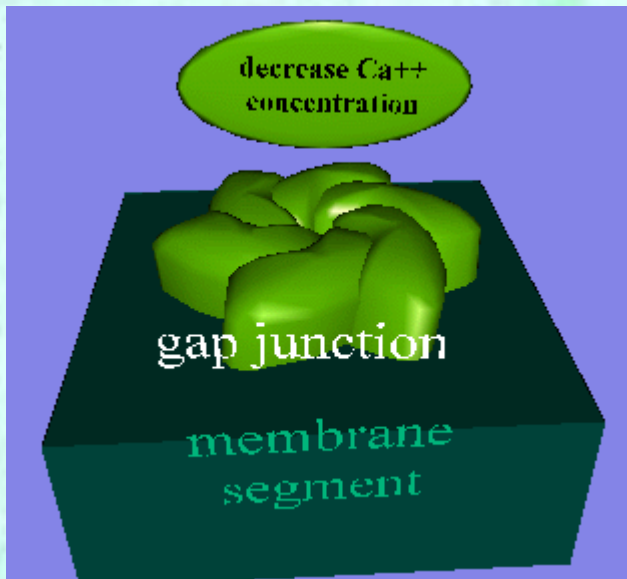
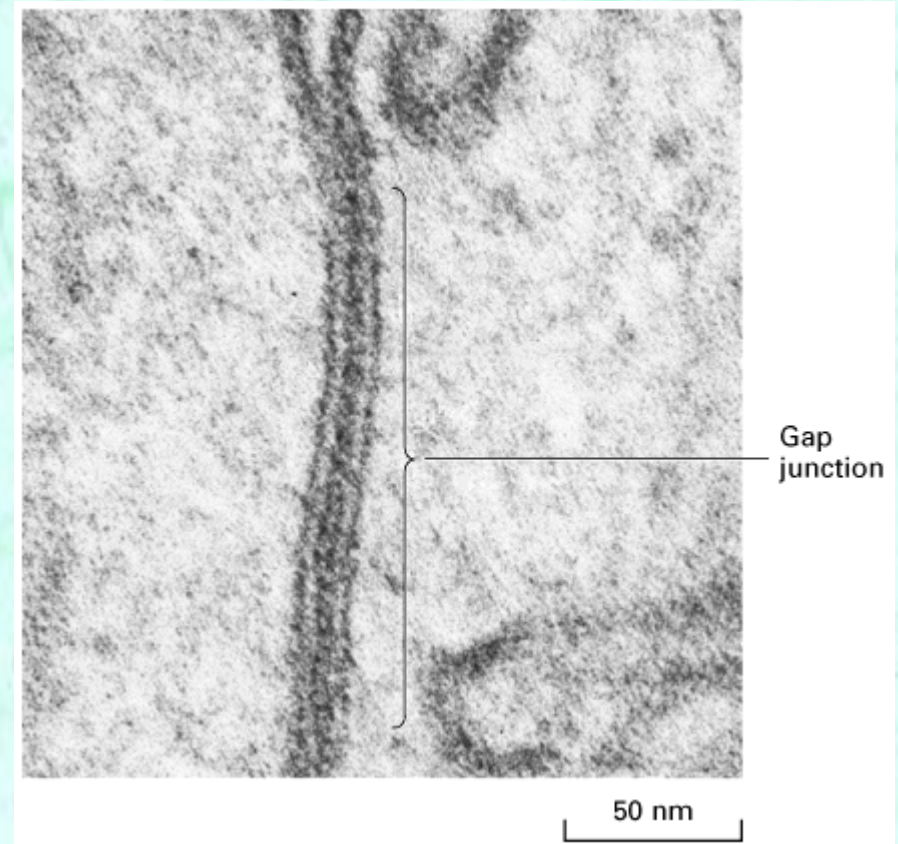
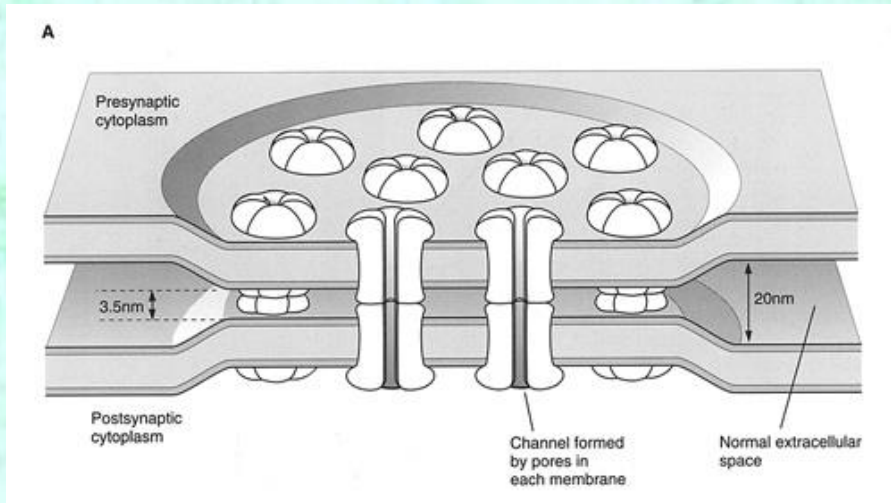
*Electroneutre*

## Gradients de A et B



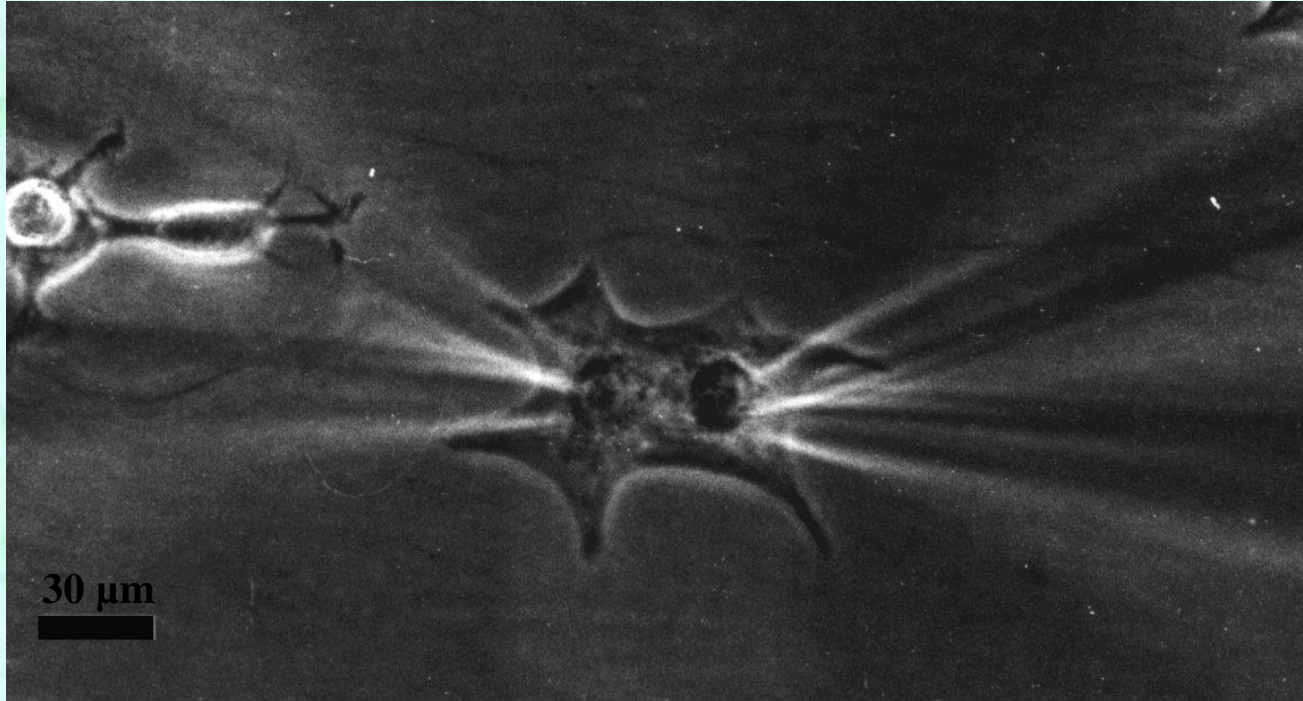
Gradient de C  
20

# Synapse électrique, jonctions Gap





# Synapse électrique, jonctions Gap

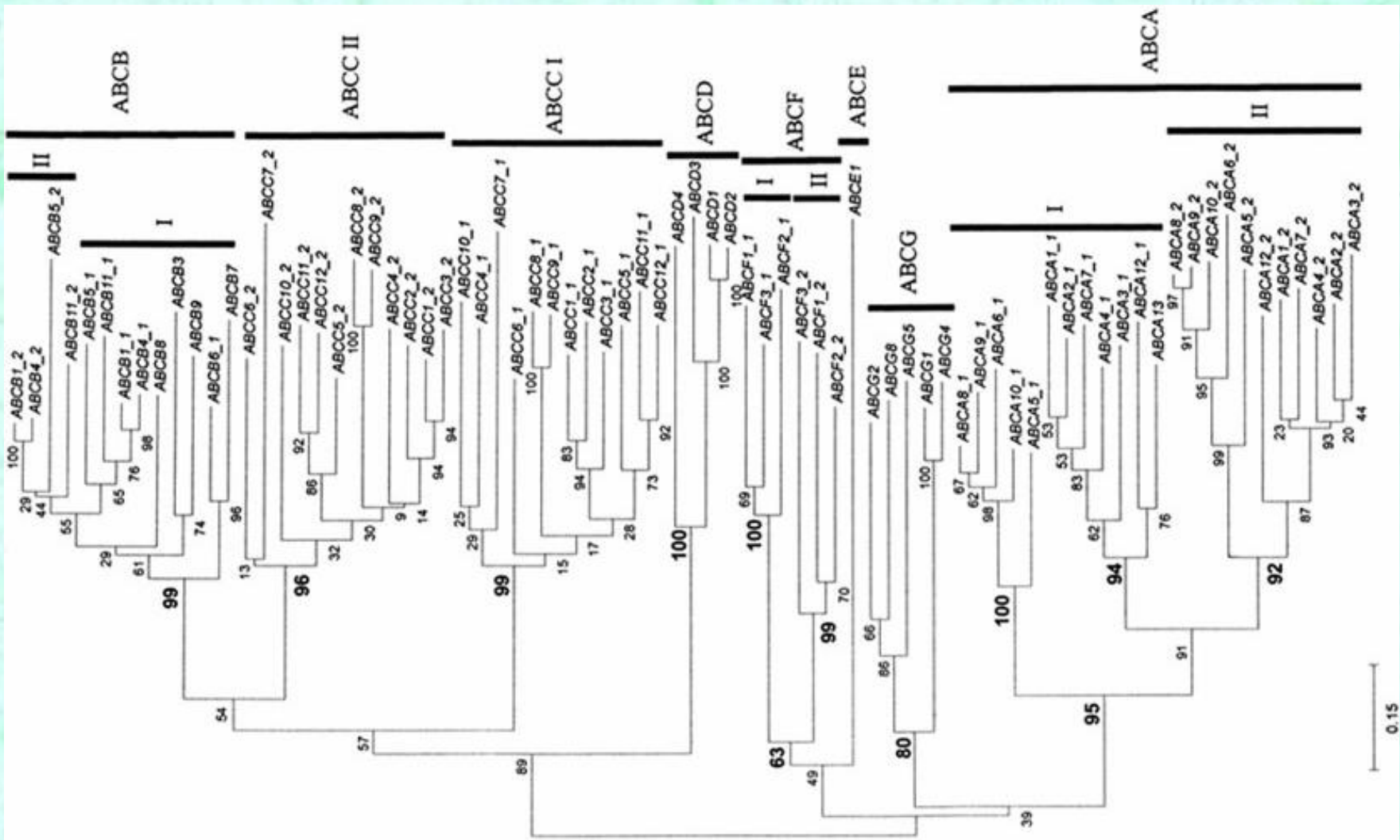


# Transporteurs

- 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 électrogéniques**



**Possibilité de mesures électrophysiologiques**



**Cas des canaux ioniques**



# **LES CANAUX IONIQUES**

# Les canaux clonés ou exogènes

## *Structure protéique connue*

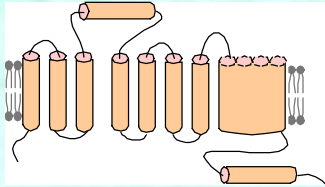
- Nombre de segments transmembranaires
- Homologies de séquence
- Sites consensus
- Réalisation d'anticorps, d'antisens, de sonde d'hybridation, ...



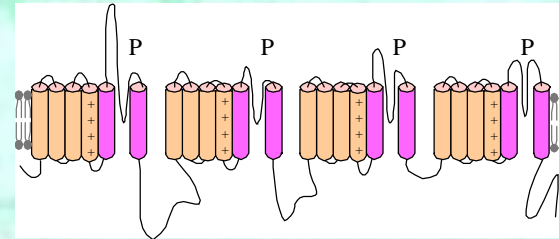


# Superfamilles des canaux clonés

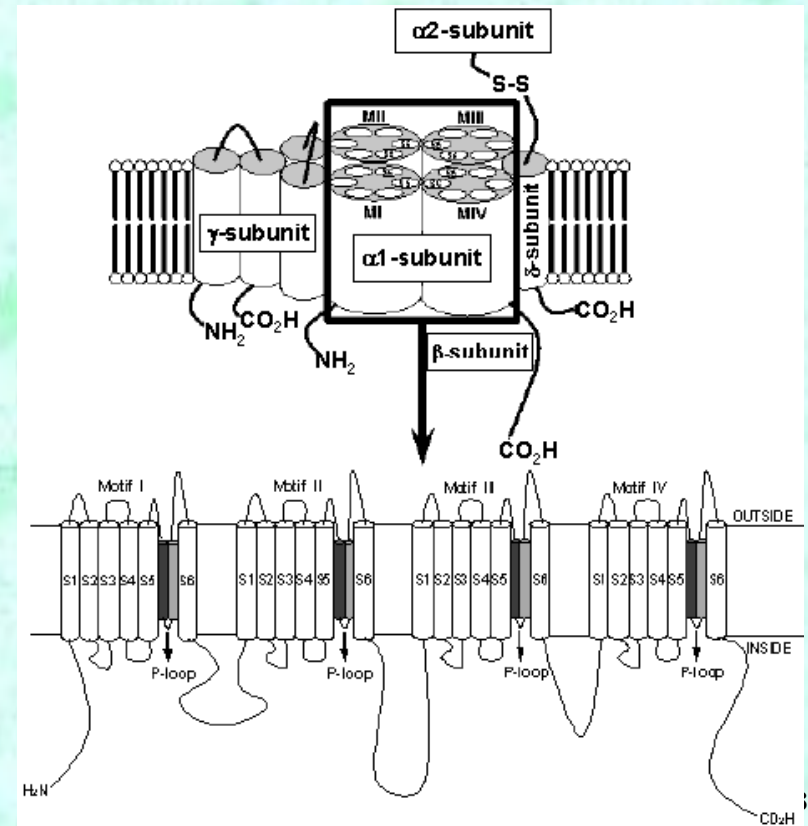
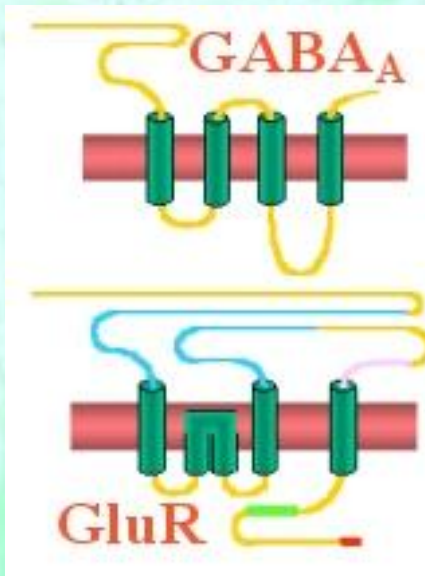
## Canaux Cl<sup>-</sup>



## Canaux Na<sup>+</sup>

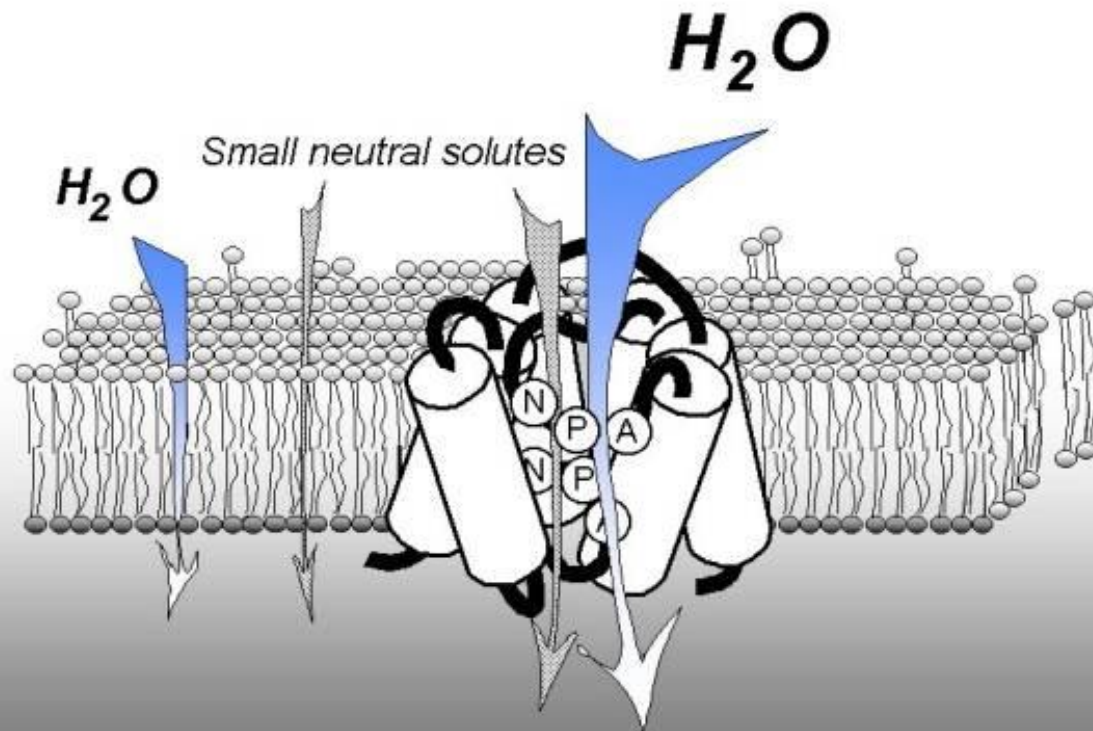


## Récepteurs canaux



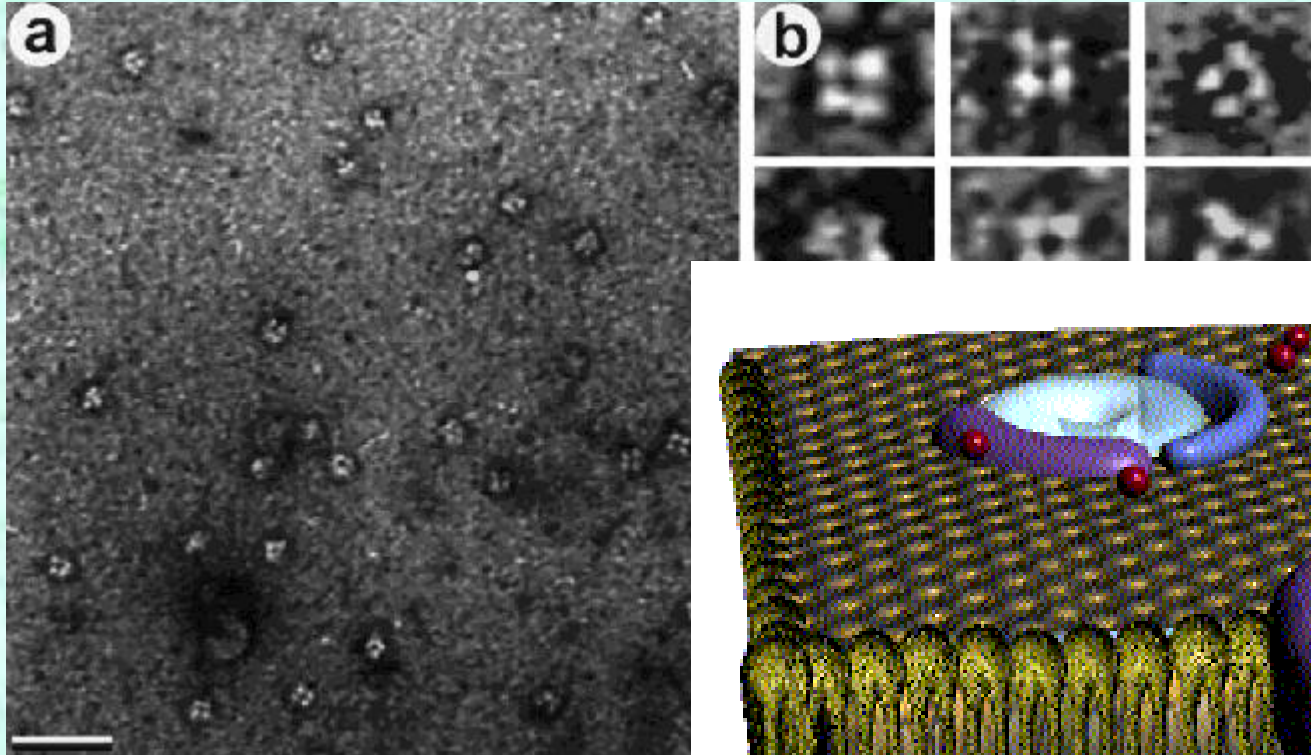
# Porines superfamily

## Aquaporins (18 genes)

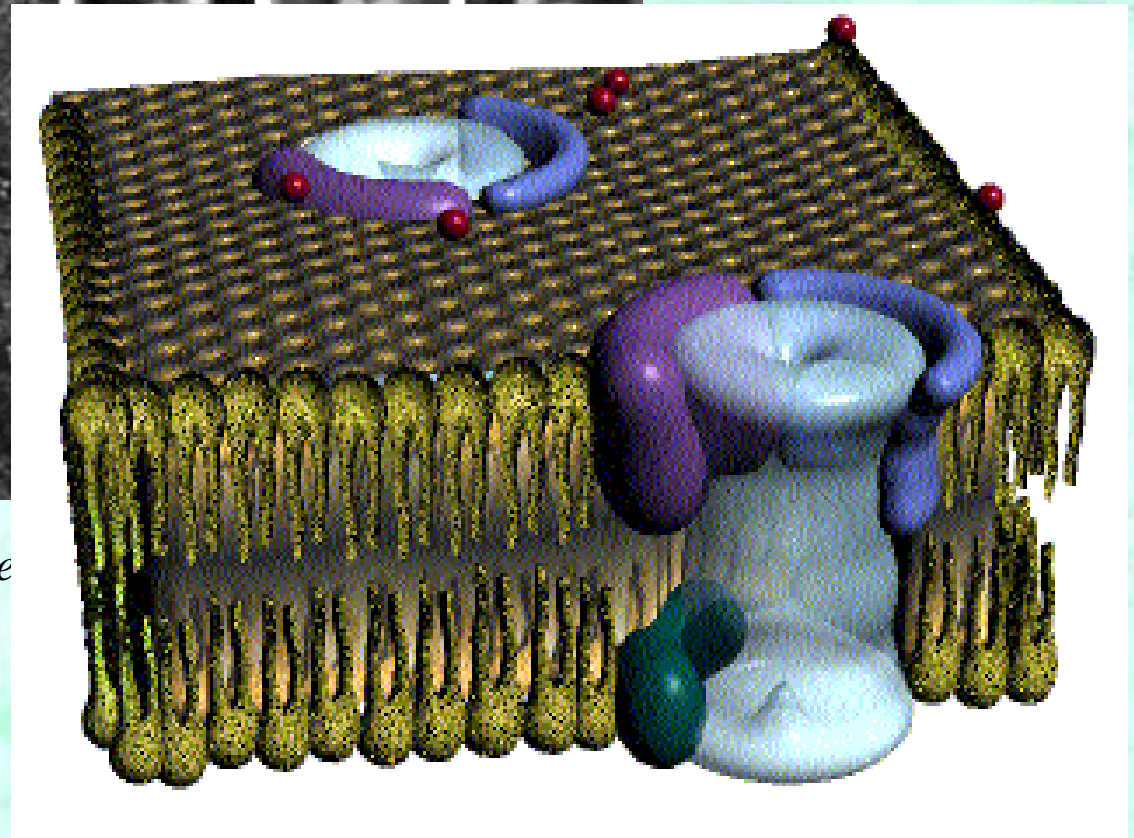




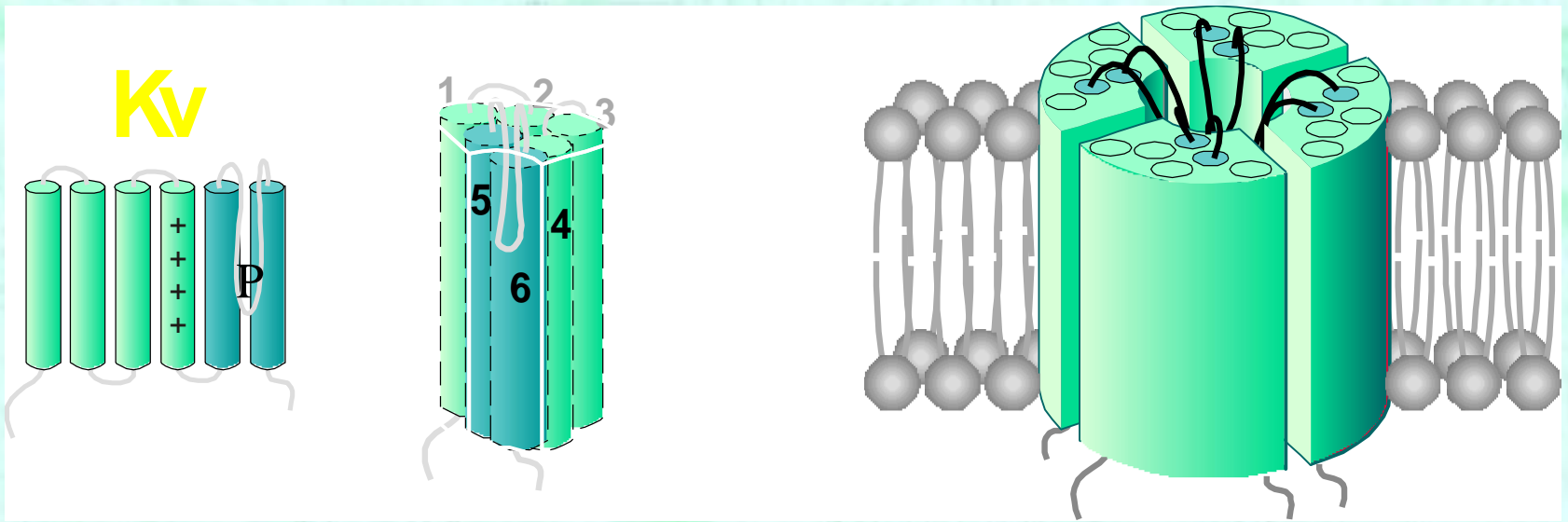
# Sous unités auxiliaires: Kv $\beta$ 2



*Van Huizen et al. 1999, FEBS Lett*

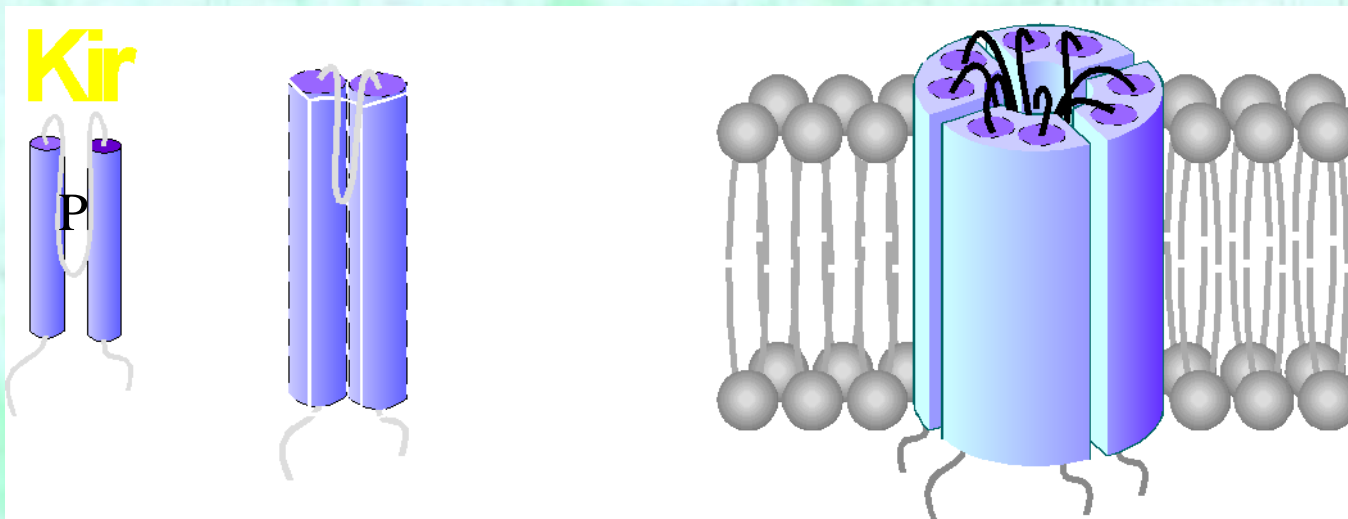
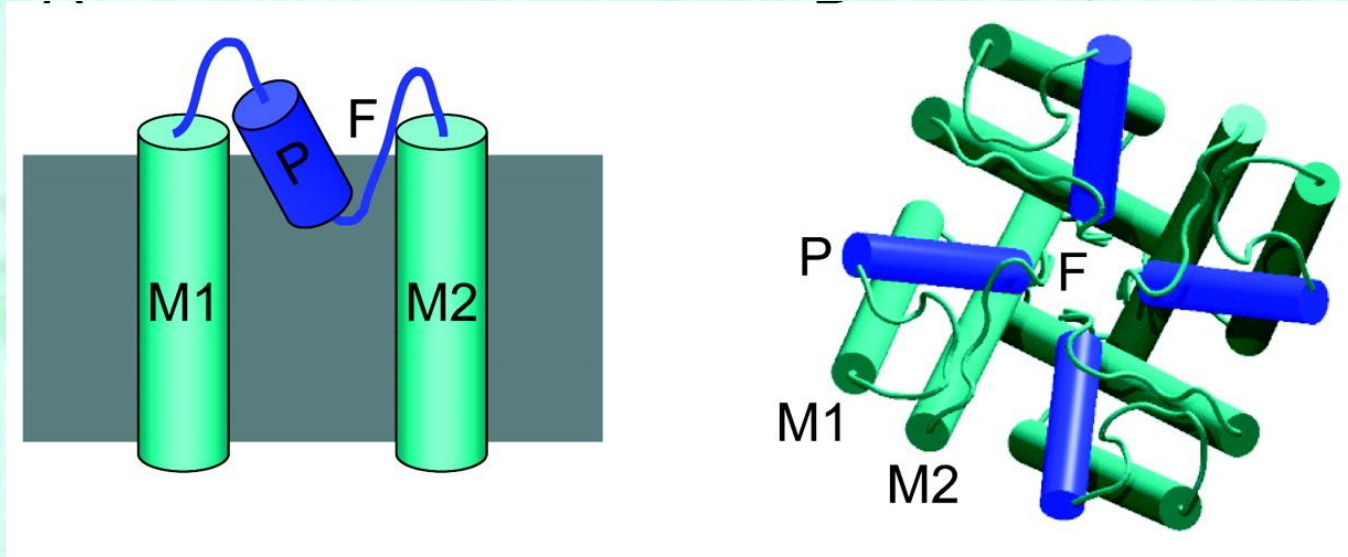


# Structure et assemblage des Kv

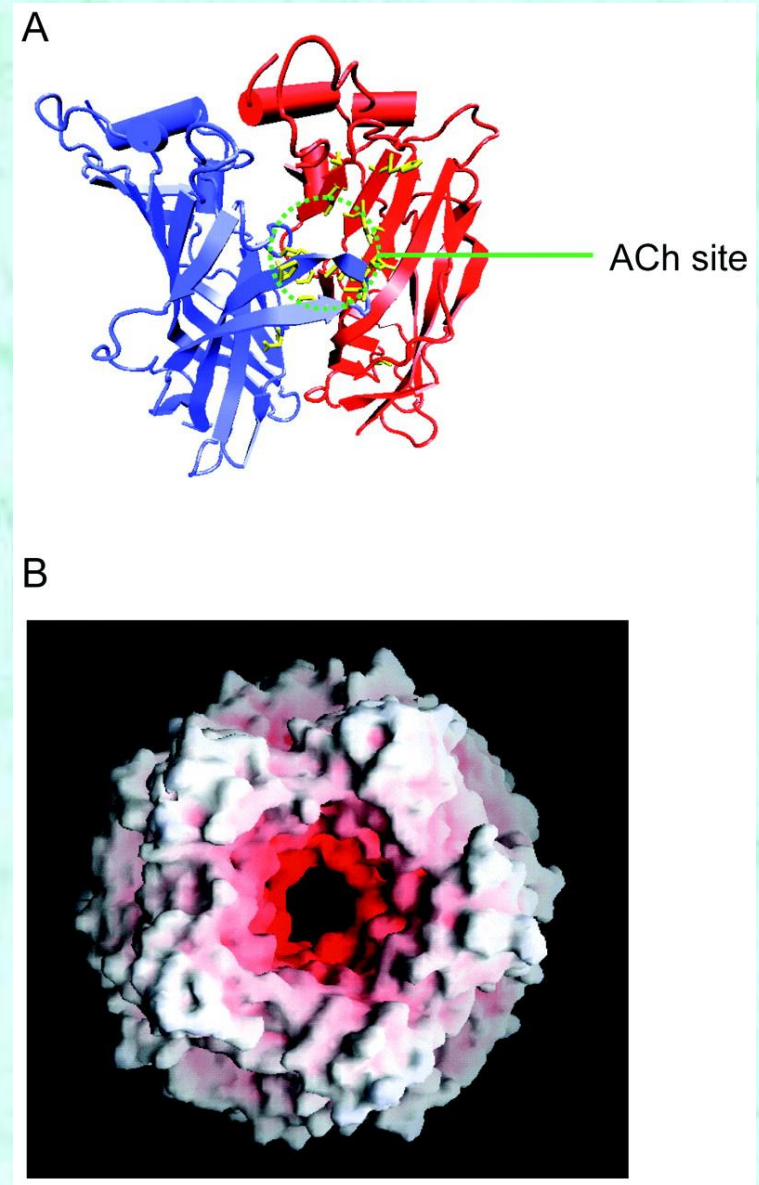
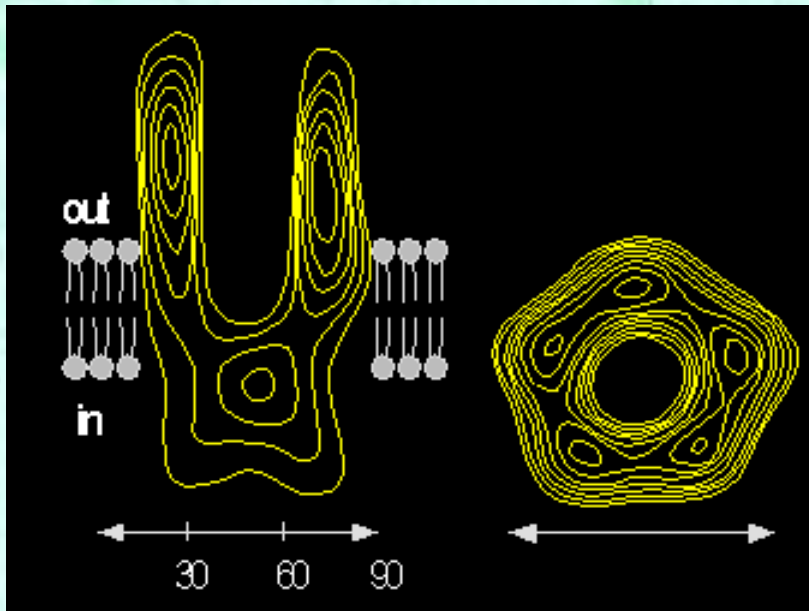




# Structure et assemblage des Kir

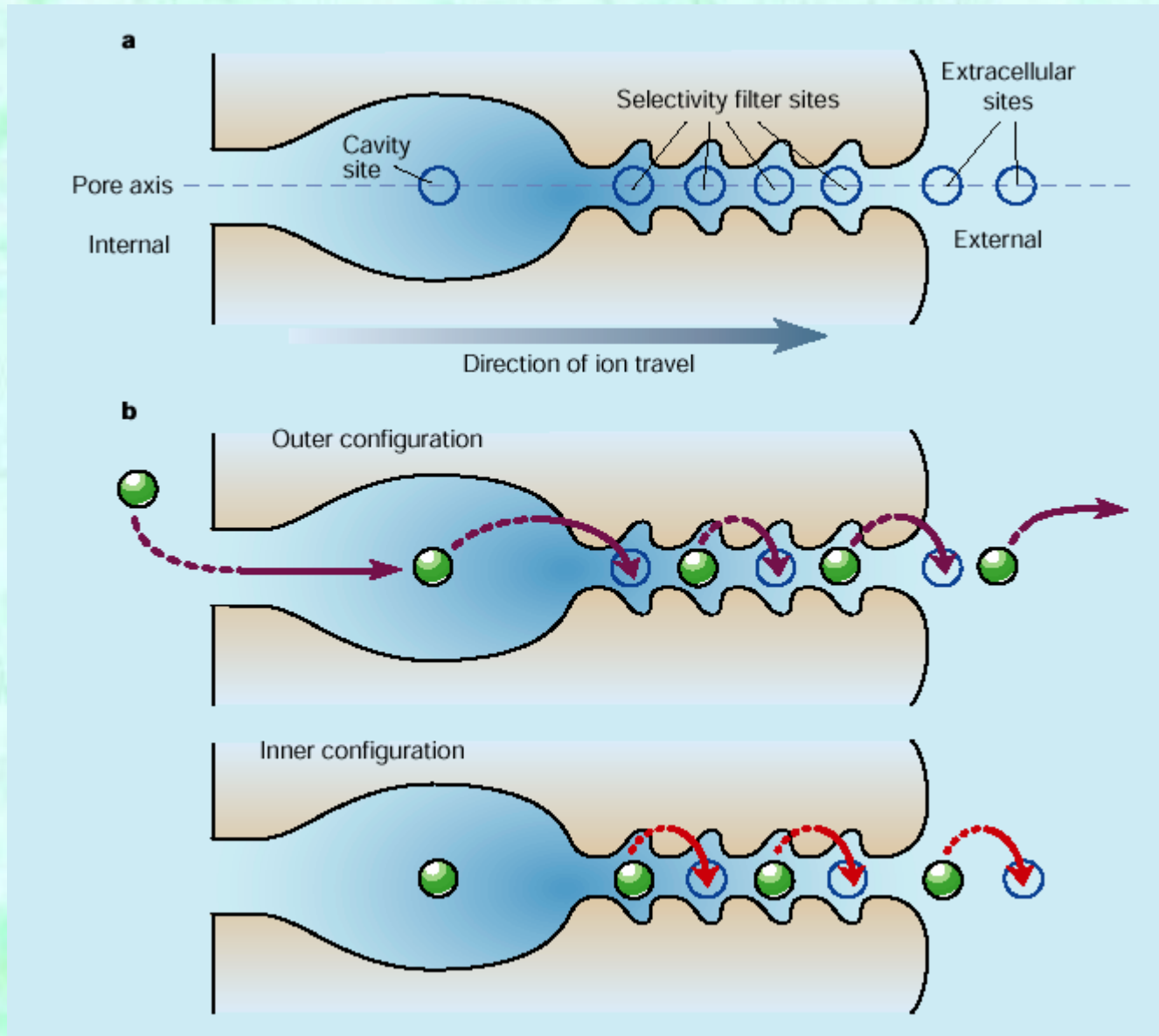


# Structure du récepteur-canal nicotinique



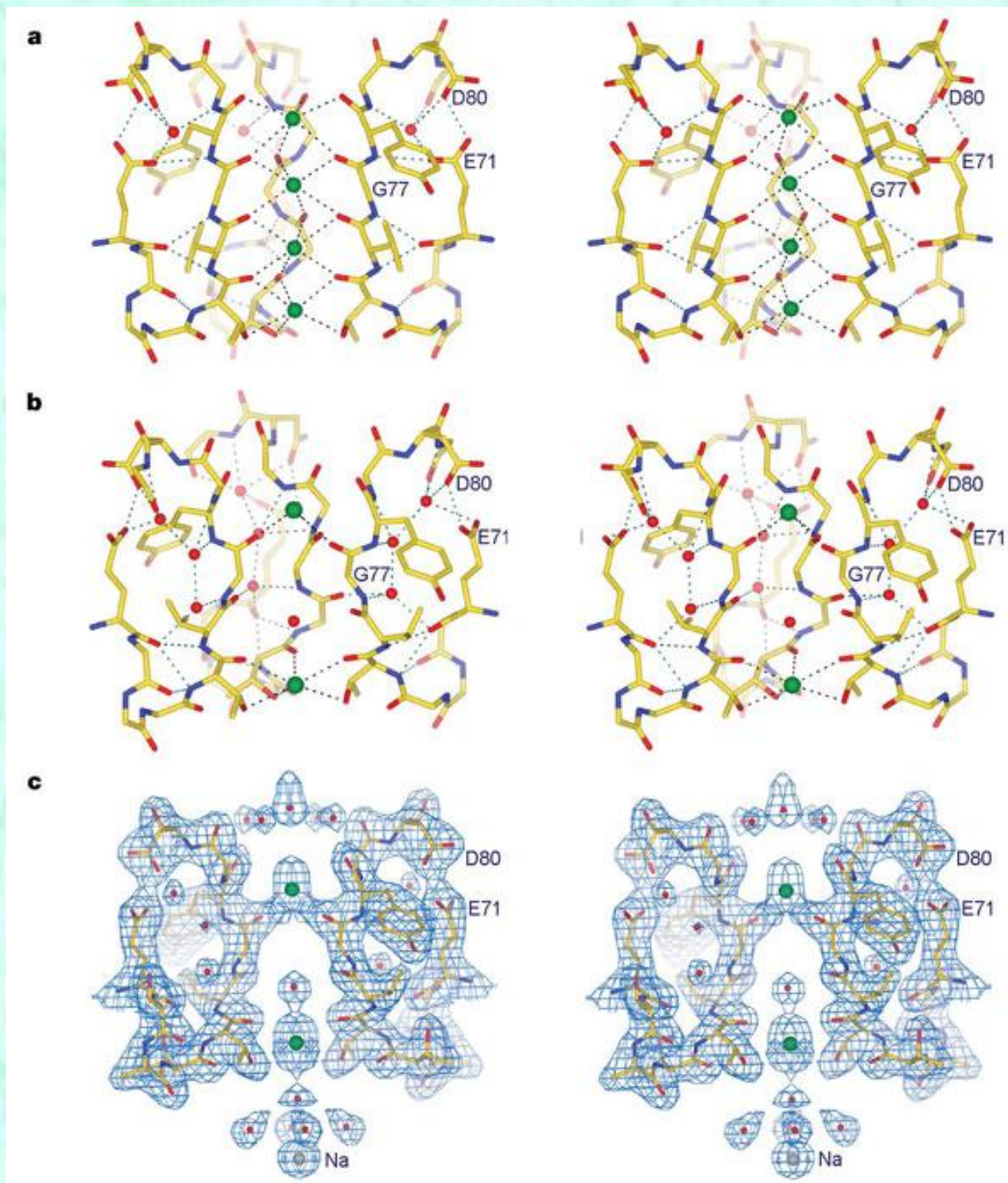


# Passage des ions $K^+$



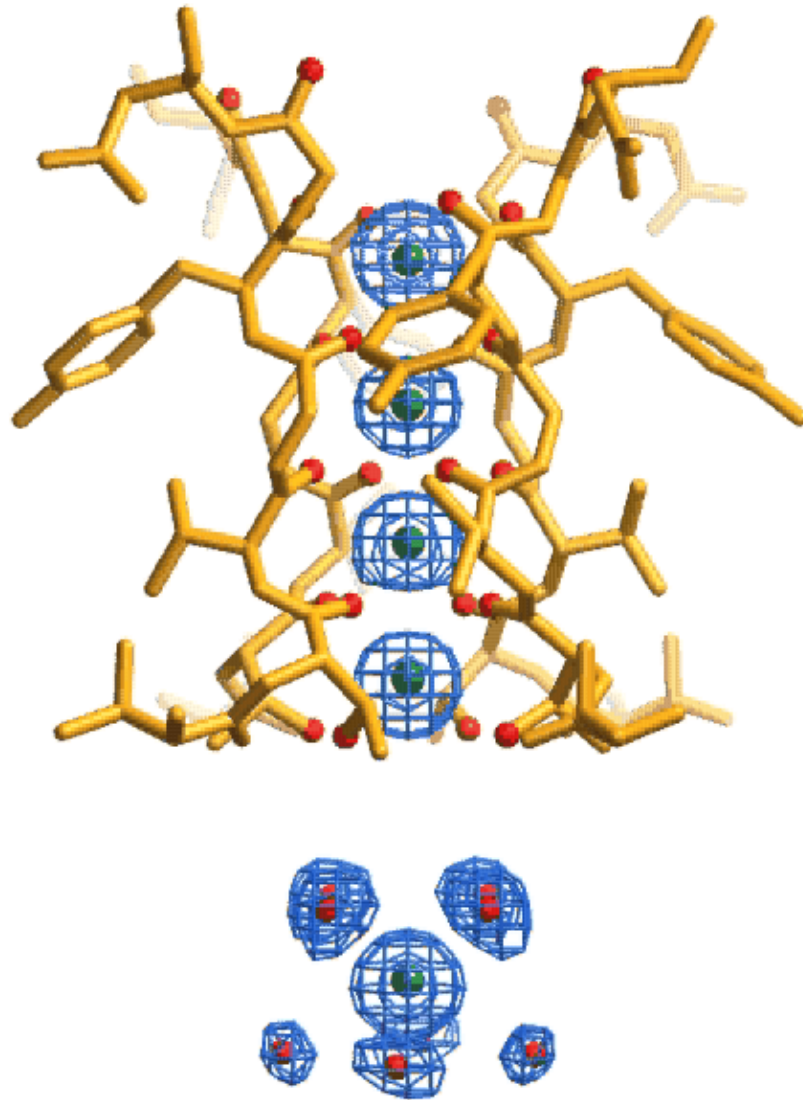
*Miller et al.*

# Filtre de sélectivité



*Zhou et al2001*

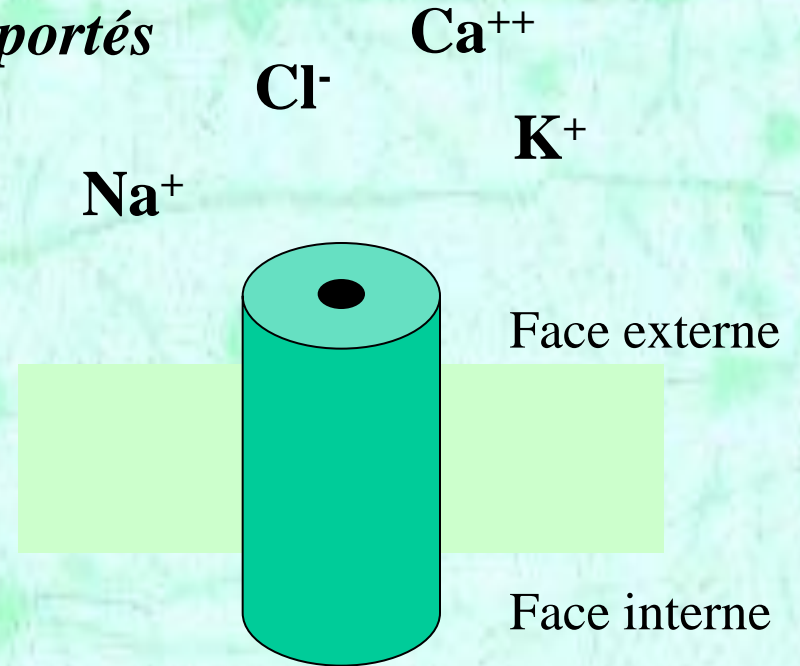
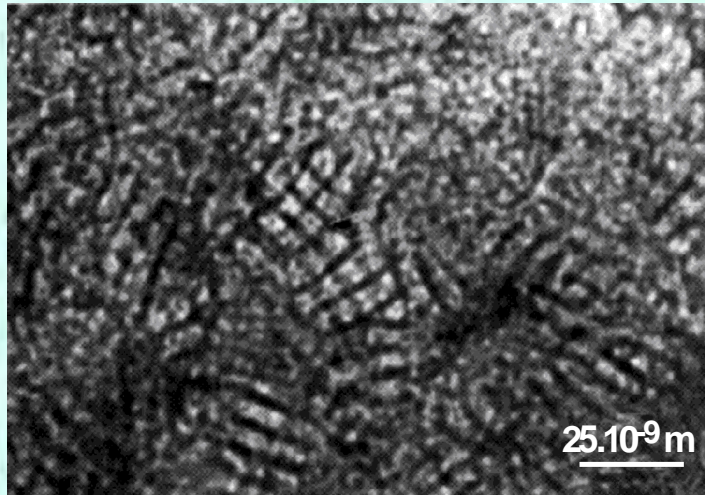
# Deshydration des ions $K^+$





# Classification des canaux ioniques

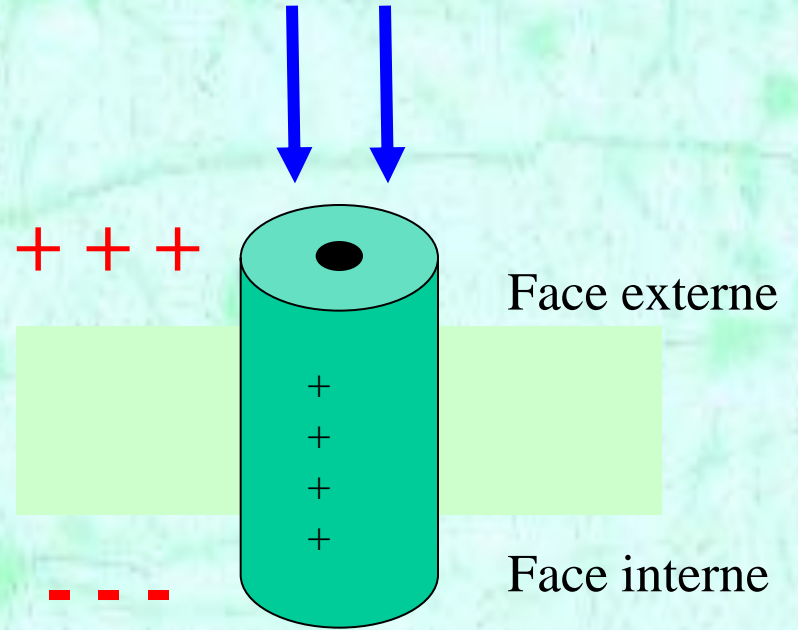
*Nature du/des principaux ions transportés*



# Régulation des canaux ioniques

Régulation par un agoniste (ROC)

AMPA GABA



Régulation par le potentiel (VOC)

Régulation par un ligand intracellulaire (SMOC)

Ca<sup>++</sup> 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)
- Pyréthriinoïdes (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

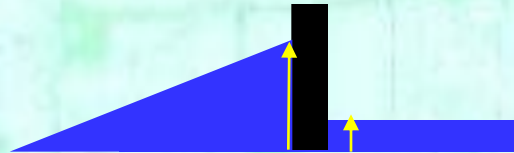
### Courant d'un fleuve

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:  $\Omega$  ( $10^9 \Omega = 1 M\Omega$ )

### Conductance d'un canal:

$$r = 1/g$$

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

= 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)

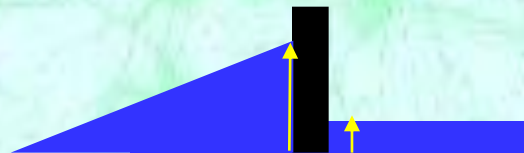
Différence en quantité de charges entre 2 points

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

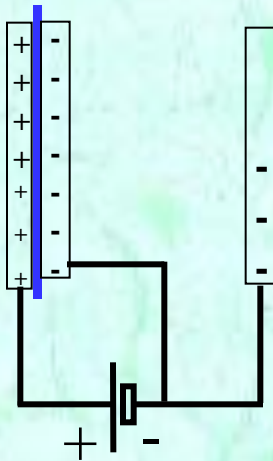
## PHENOMENE ELECTRIQUE

## ANALOGIE AVEC L'EAU

## PHENOMENE IONIQUE

### Capacité: C

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



### 2 réservoirs

### Capacité membranaire

=la membrane plasmique est un isolant entouré de 2 conducteurs

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

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

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

### Loi d'ohm: U = RI

### Barrage:

Si U = constante:

si R  $\nearrow$  alors I  $\searrow$

Si I = constante:

si R  $\nearrow$  alors U  $\nearrow$

### Loi de Poiseuille

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

L = longueur du tube en cm

r = rayon du tube en cm

$\Delta p$  = écart de pression entre les deux extrémités du tube en dynes/cm<sup>2</sup>

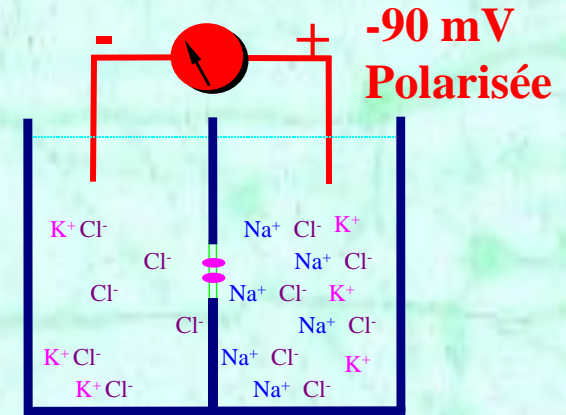
k = coefficient de viscosité en poise (dyne.s/cm<sup>2</sup>)

D = débit en cm<sup>3</sup>/s

# Potentiel d'équilibre - Loi de Nernst

## Potentiers d'inversion dans les cellules de vertébrés

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



**Gradient de [K<sup>+</sup>]**

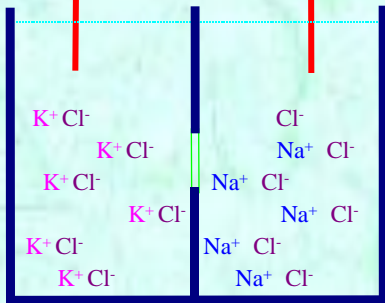
**Gradient de [Na<sup>+</sup>]**

**Gradient de charges**

*Inclusion d'un canal K<sup>+</sup>*

*Inclusion d'un canal Na<sup>+</sup>*

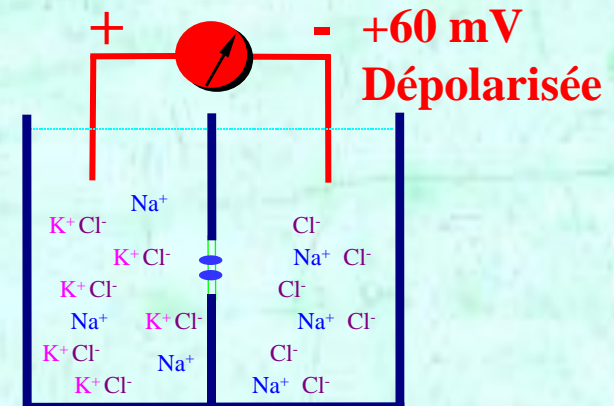
**Voltmètre**  
**0 mV**



**Gradient de [K<sup>+</sup>]**

**Gradient de [Na<sup>+</sup>]**

**Gradient de charges**



**Gradient de [K<sup>+</sup>]**

**Gradient de [Na<sup>+</sup>]**

**Gradient de charges**

# 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  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , +2 pour  $\text{Ca}^{2+}$  et -1 pour  $\text{Cl}^-$ )

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

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

Si  $z = +1$  et à  $20^{\circ}\text{C}$  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**

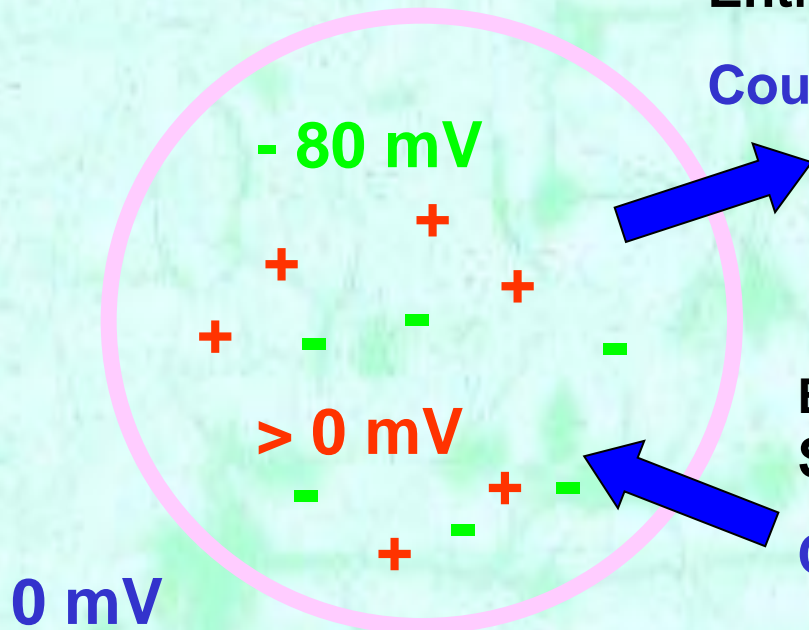
**Repos = polarisée**

Sortie de charges + ou  
Entrée de charges -

**Courant sortant polarisant (positif)**

Entrée de charges + ou  
Sortie de charges -

**Courant entrant dépolarisant (négatif)**



0 mV

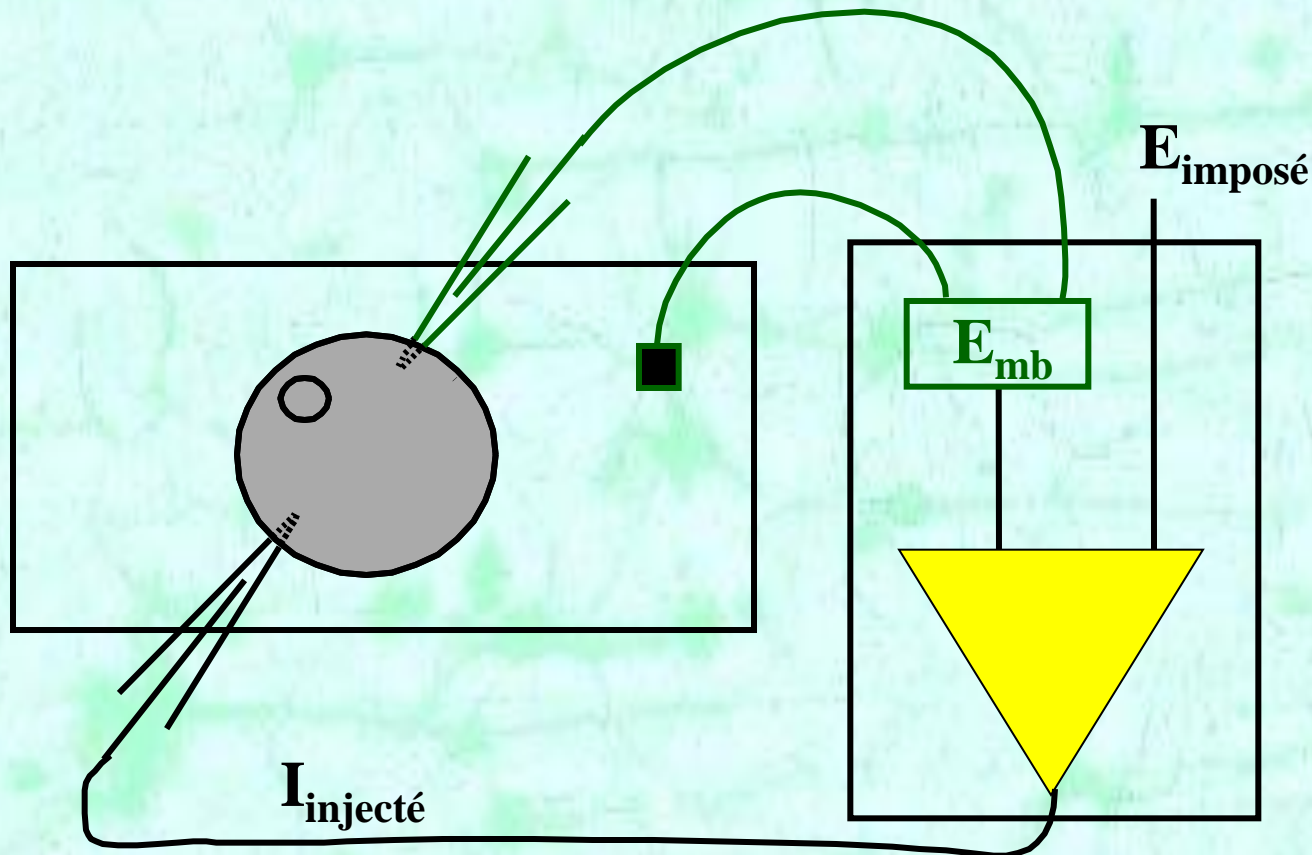
Membrane plasmique

# **TECHNIQUES D 'ETUDE LE POTENTIEL IMPOSE**

# Aspect technique du potentiel imposé

Double microélectrodes

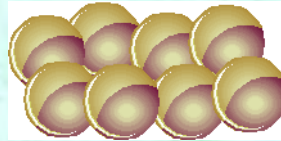
$$I / E = g$$





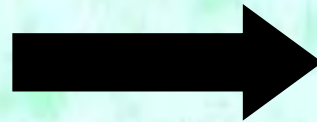
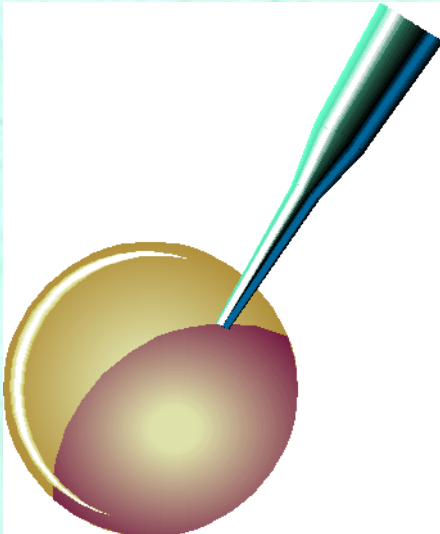
# Le modèle de l'ovocyte de xénope

Ovocytes de xénopes

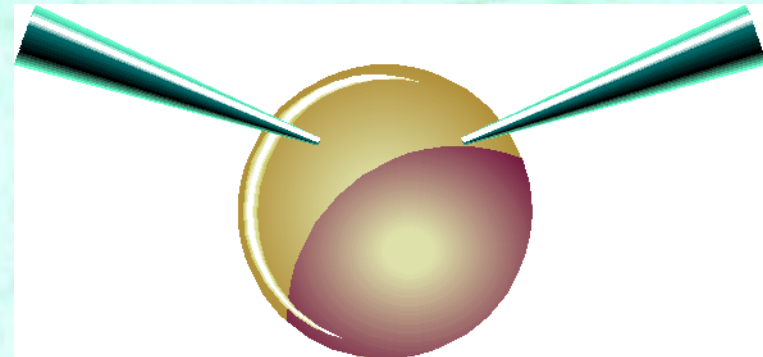


Etude des canaux clonés ou exogènes

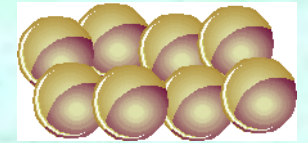
Injection d'ARN ou d'ADN



Double microélectrodes

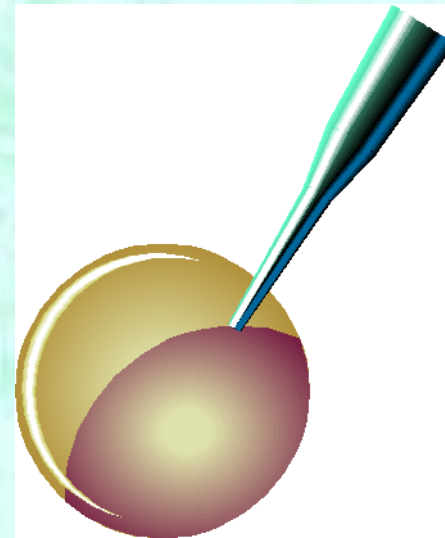
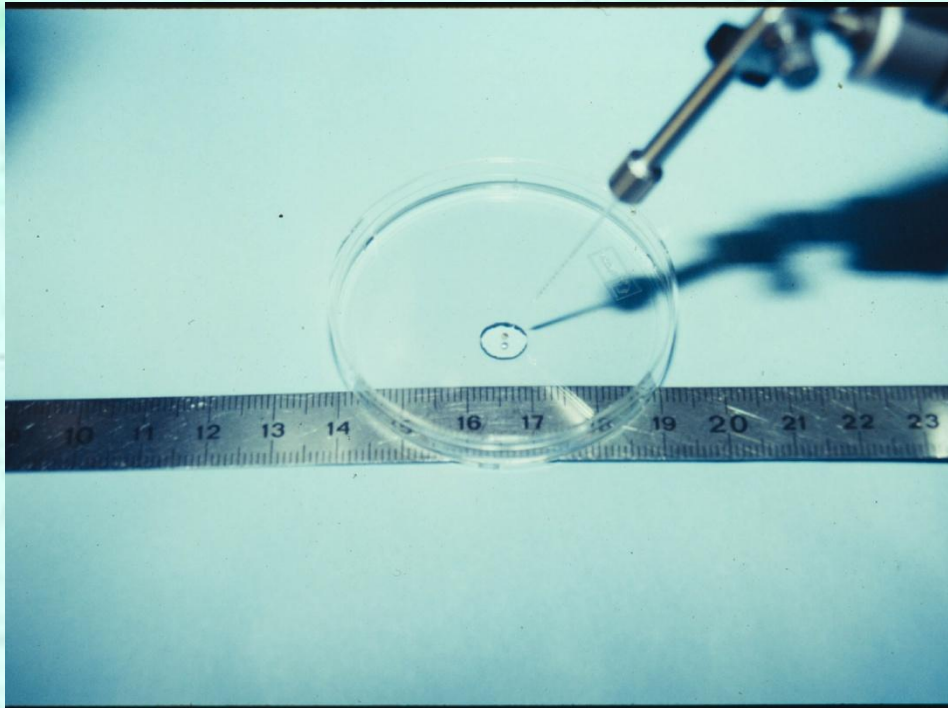


# Préparation des ovocytes de xénopes



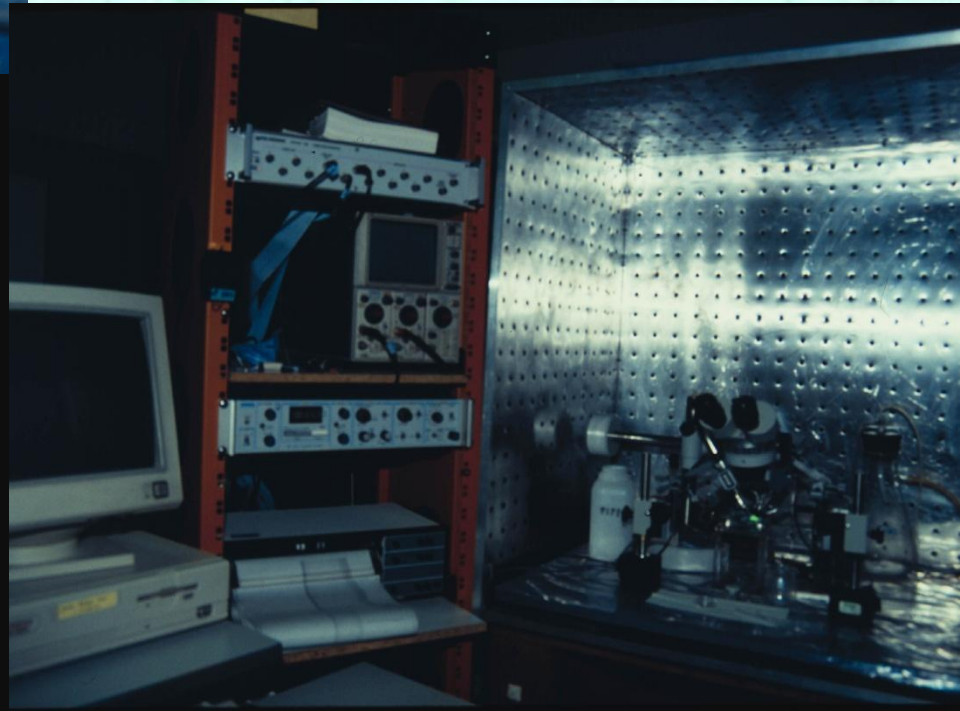
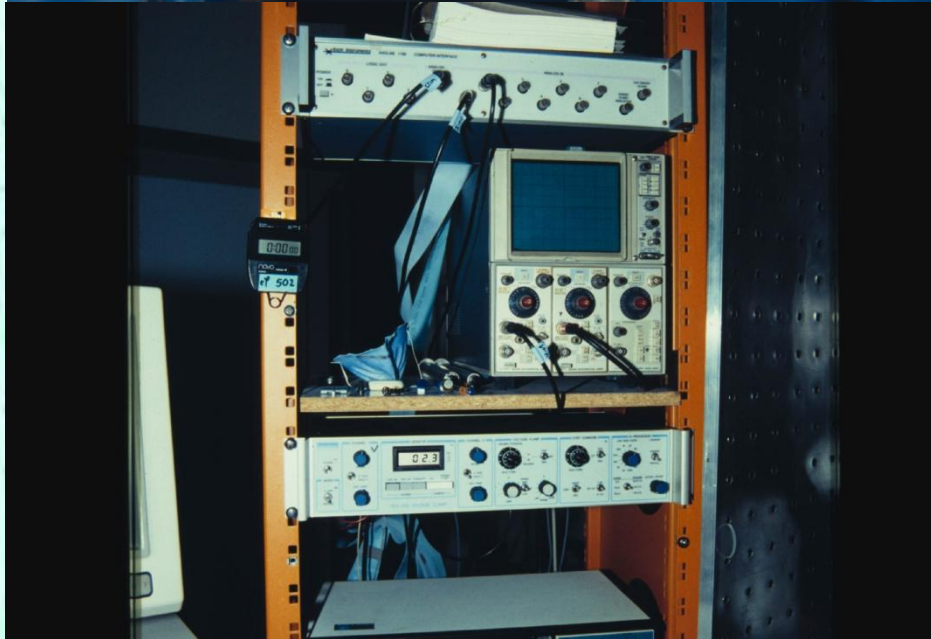
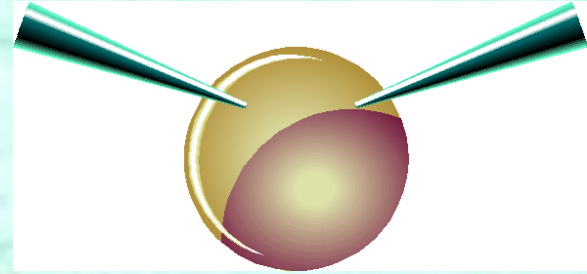
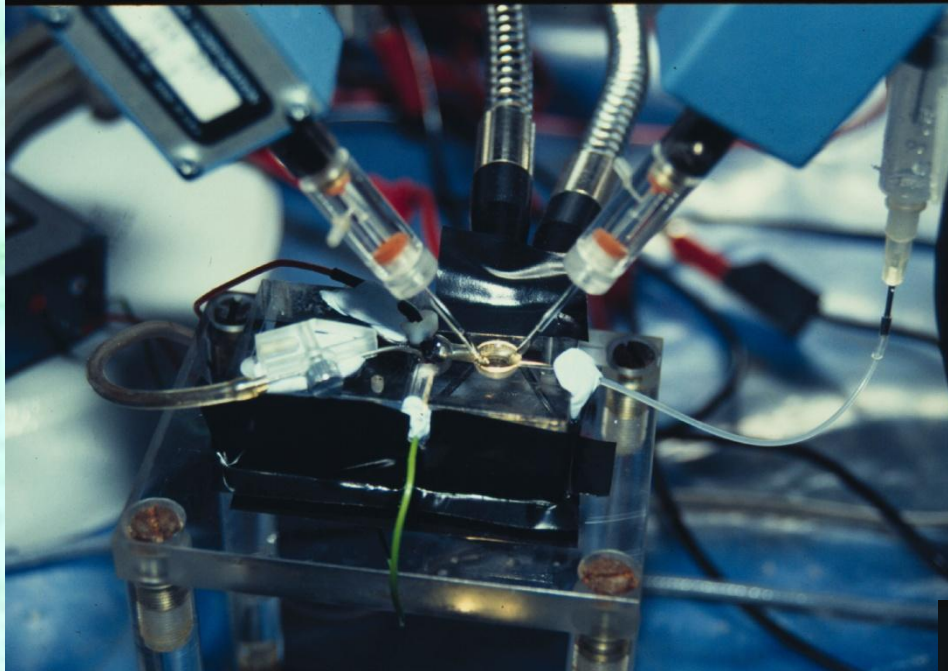


# Ovocytes: Injection d'ARN ou d'ADN

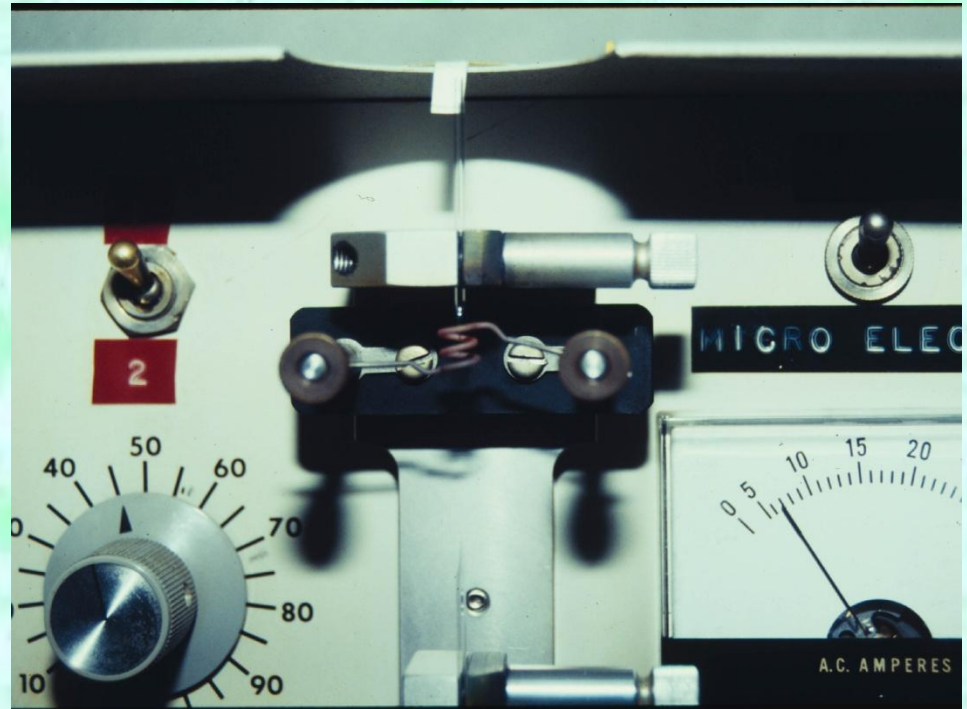
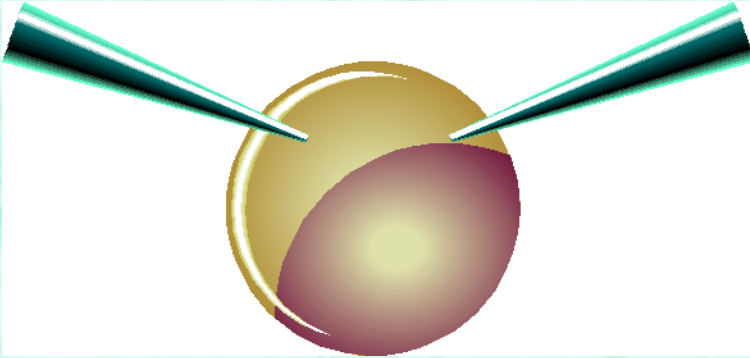




# Le poste d'enregistrement en double microélectrodes



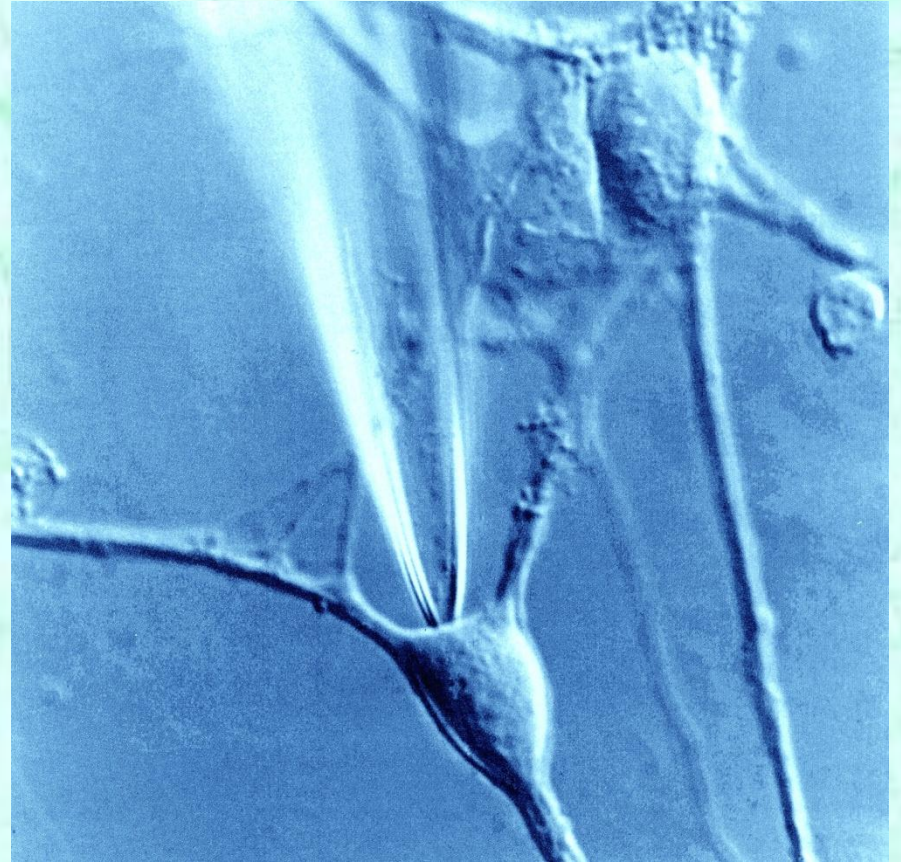
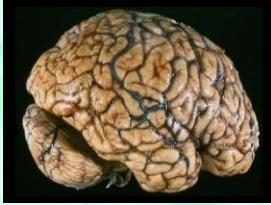
# Préparation des pipettes





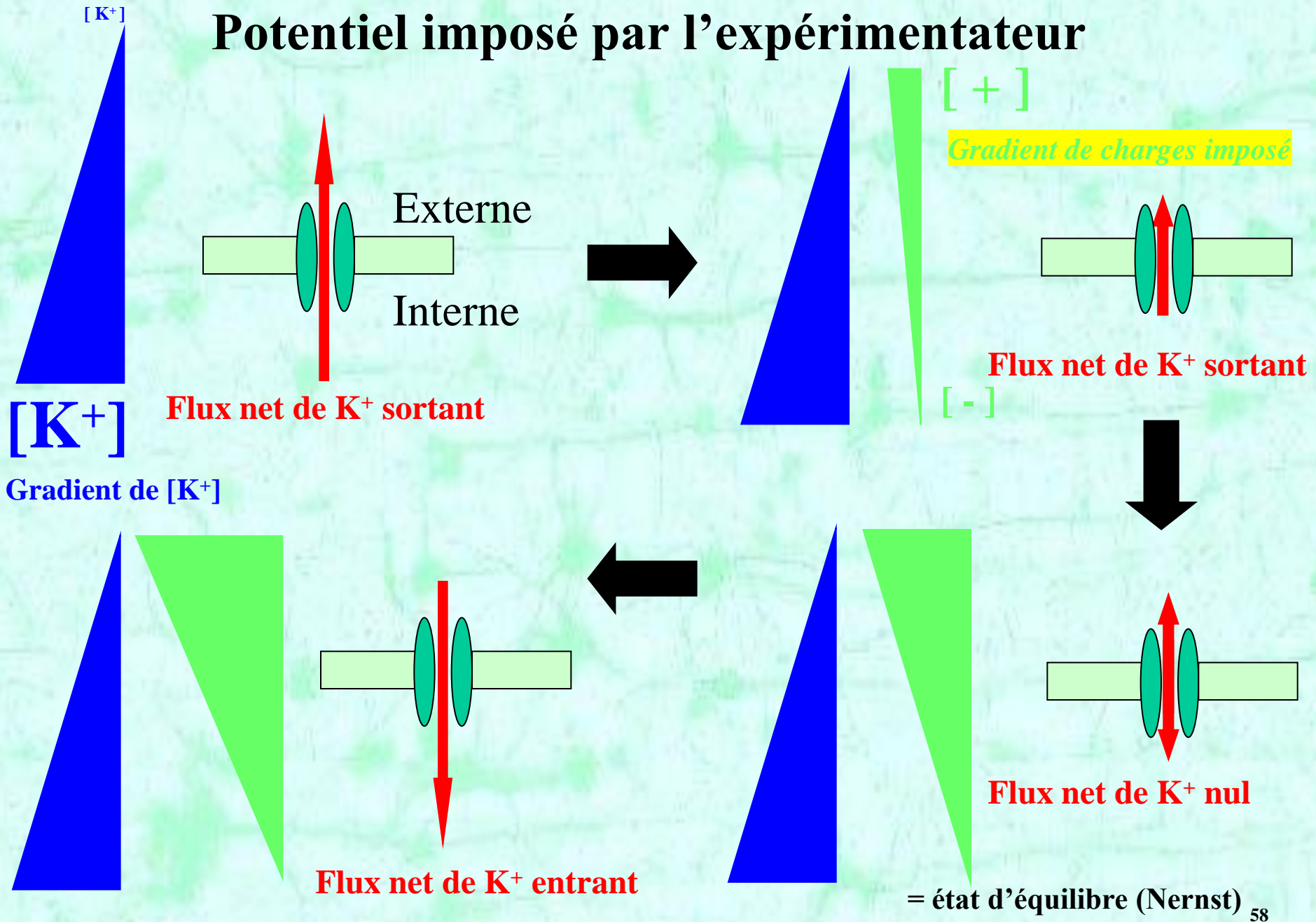
# Etude des courants natifs ou endogènes

Preparation d'un tissu





# Potentiel imposé par l'expérimentateur



# Potentiel imposé

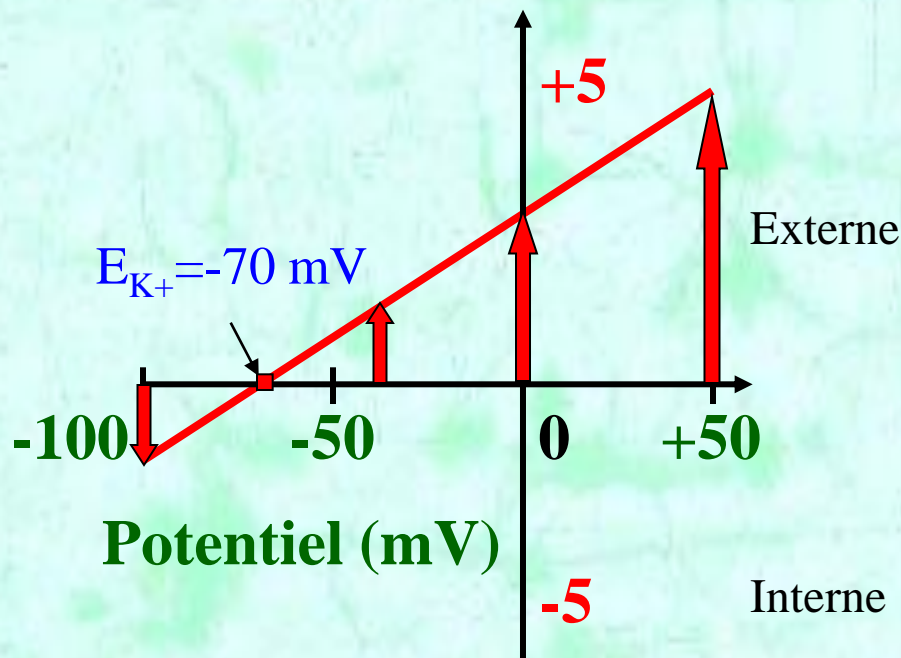
$$\mathbf{E} = \mathbf{R} \times \mathbf{I}$$

Imposé

Calculé

Mesuré

**Courant ( $\mu\text{A}$ ,  $\text{nA}$ ,  $\text{pA}$ )**

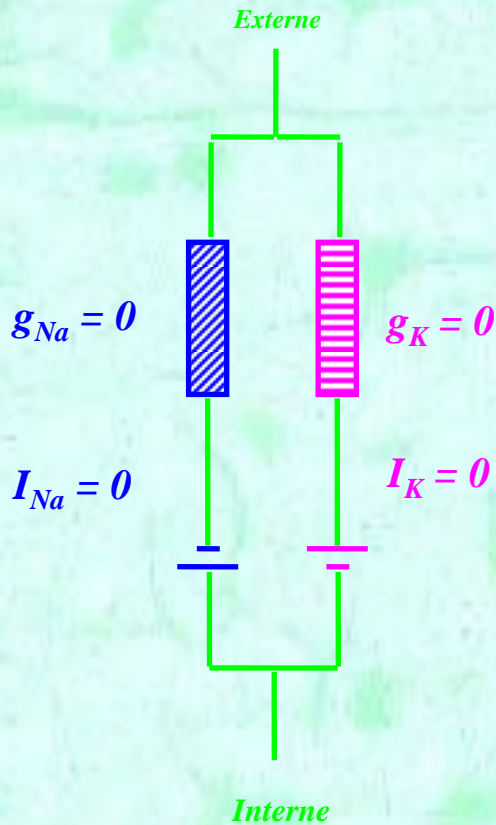


Potentiel imposé

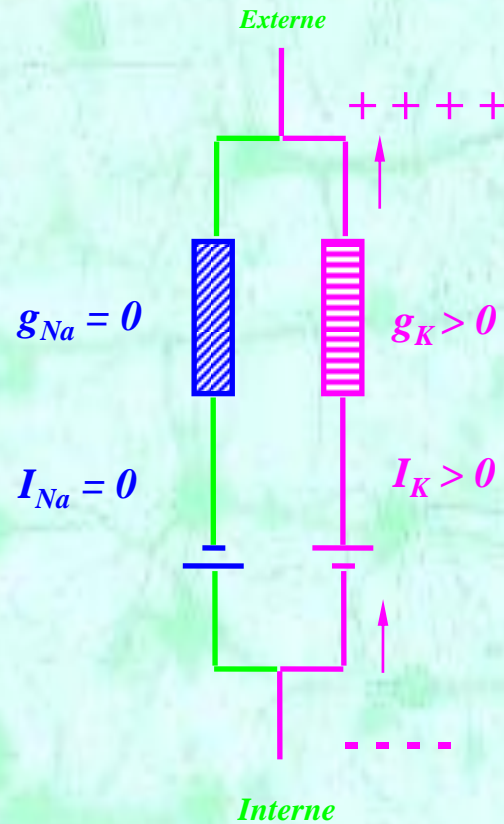


Gradient  $[\text{K}^+]$

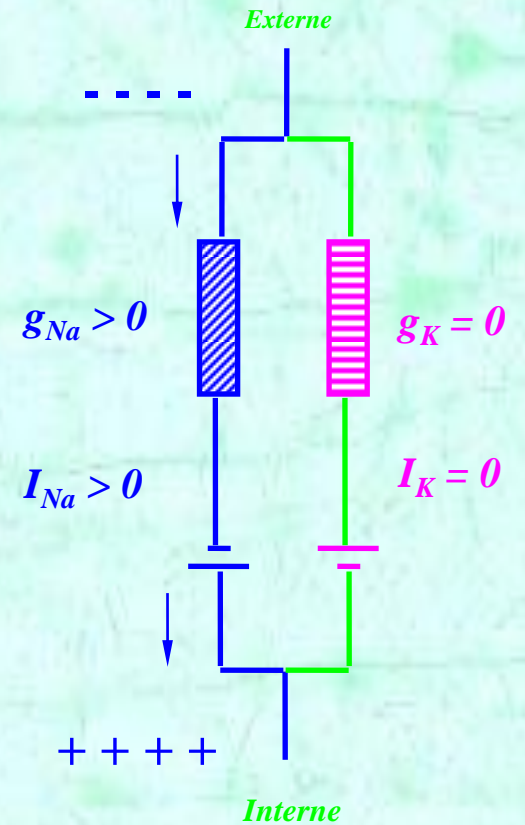
# Représentation schématique d'un canal



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



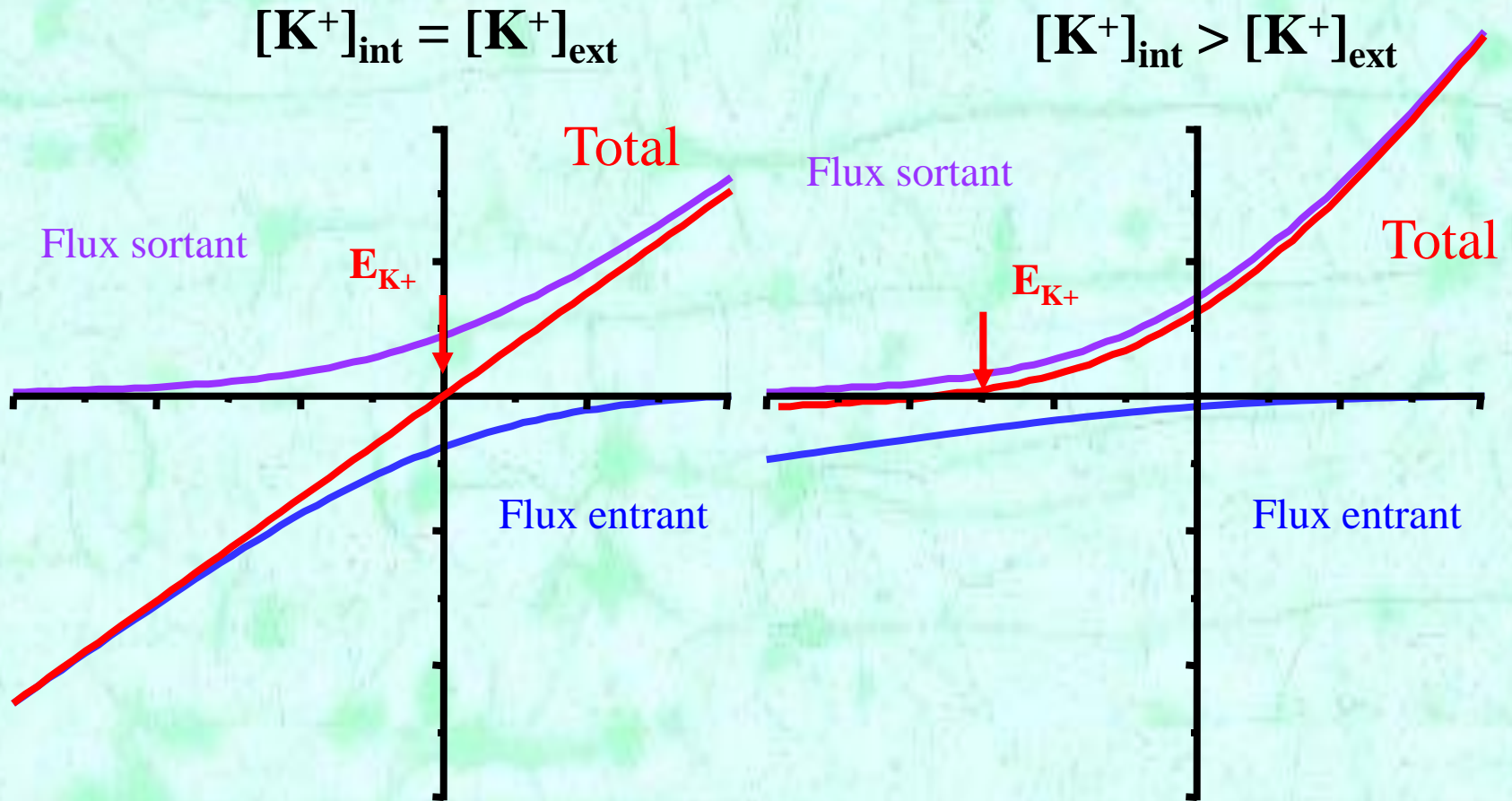
$$V_m = E_K = -84 \text{ mV}$$



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

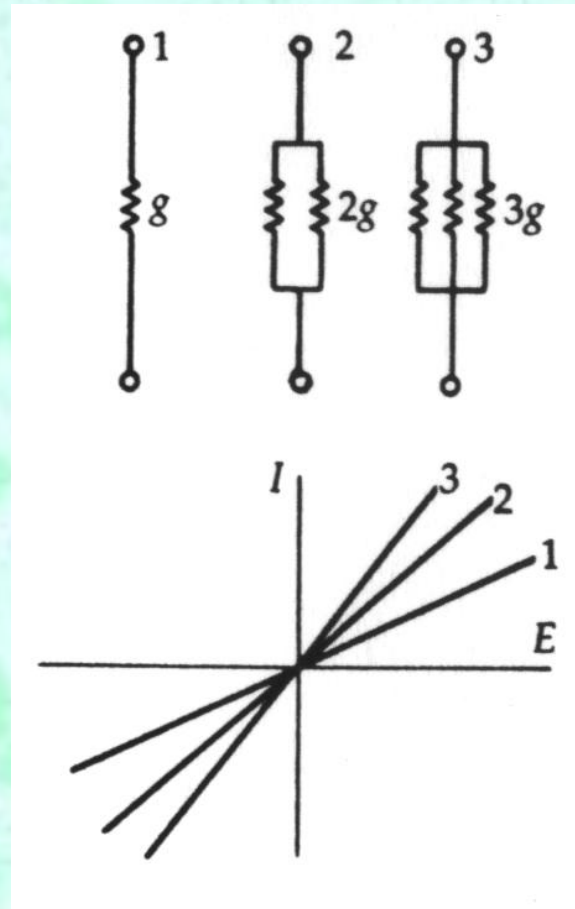


# Loi de Goldman Hodgkin Katz



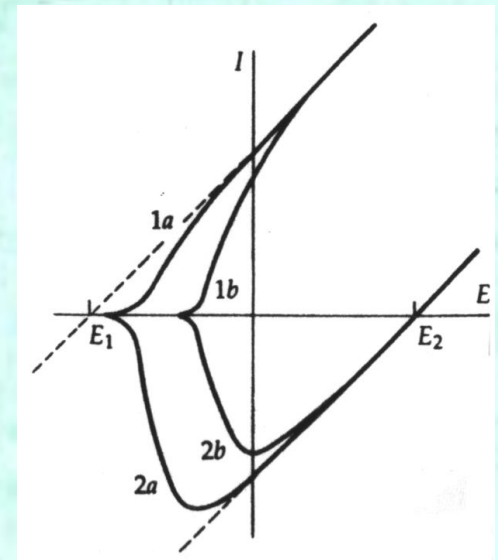
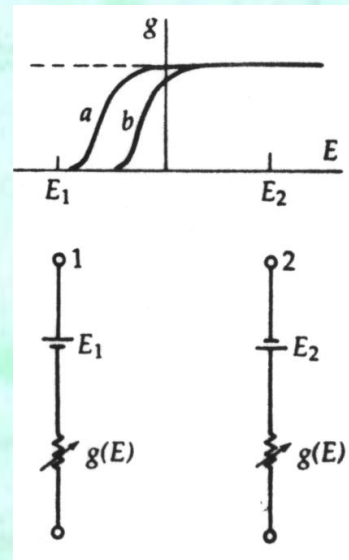
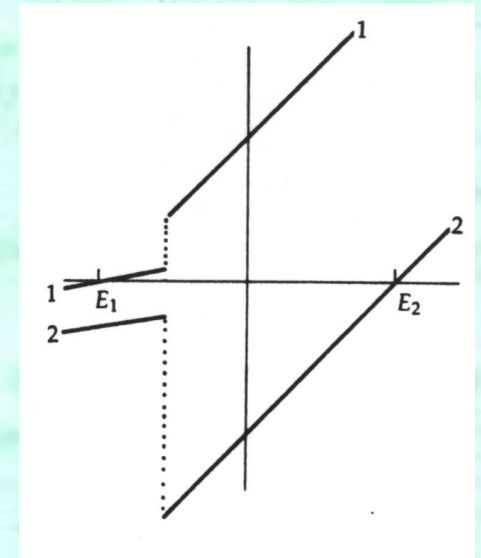
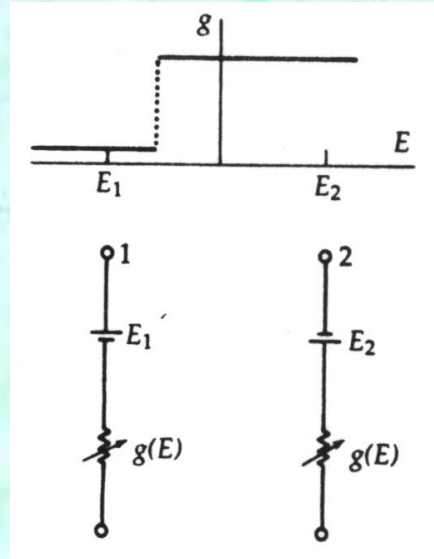
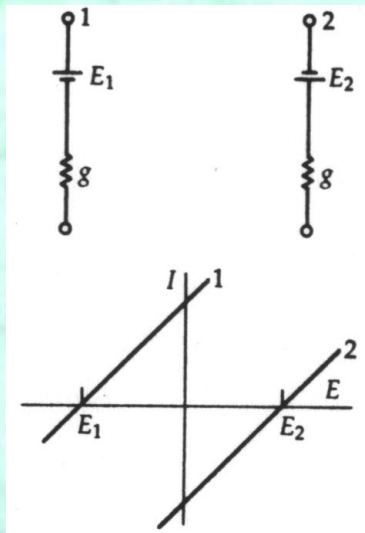
# Technique d'étude: le voltage clamp

## Courants totaux



# Technique d'étude: le voltage clamp

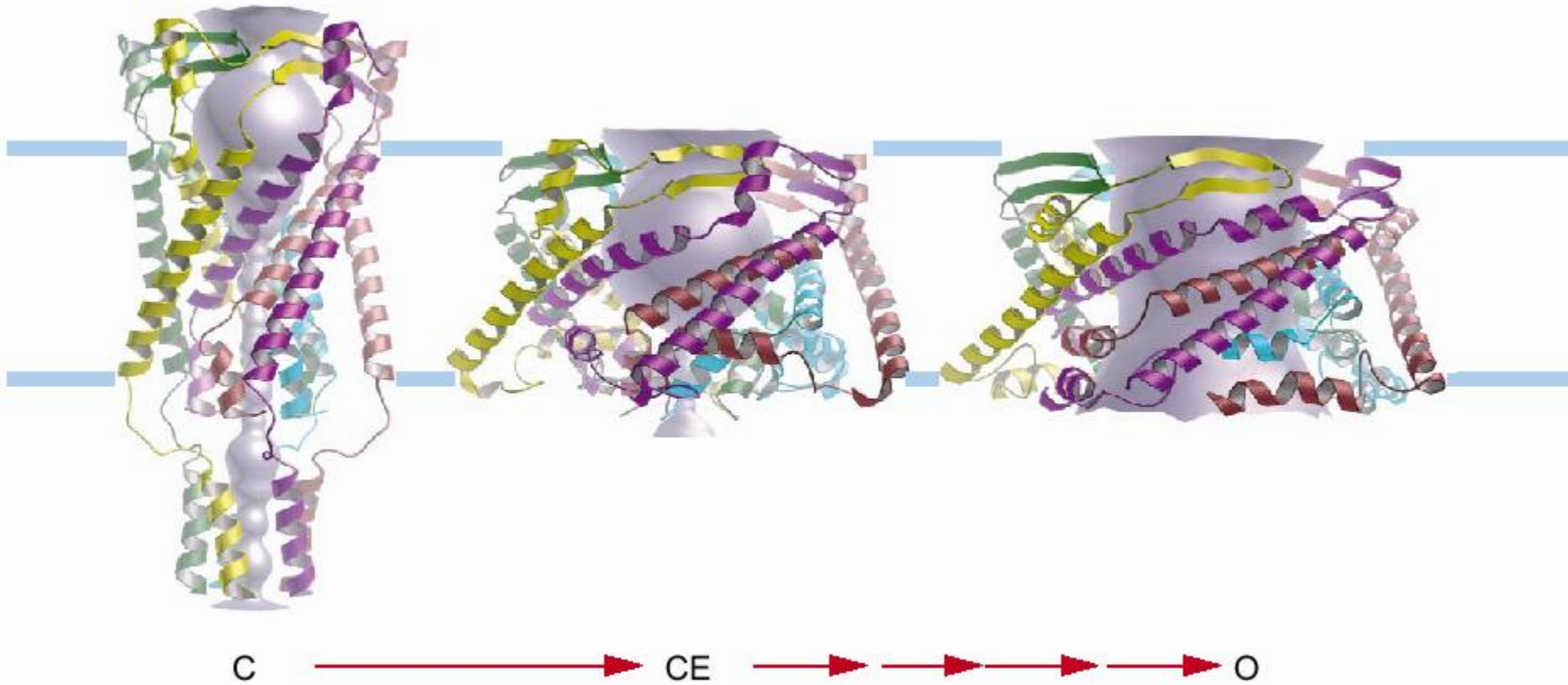
## Courants totaux





# **GATING DES CANAUX IONIQUES**

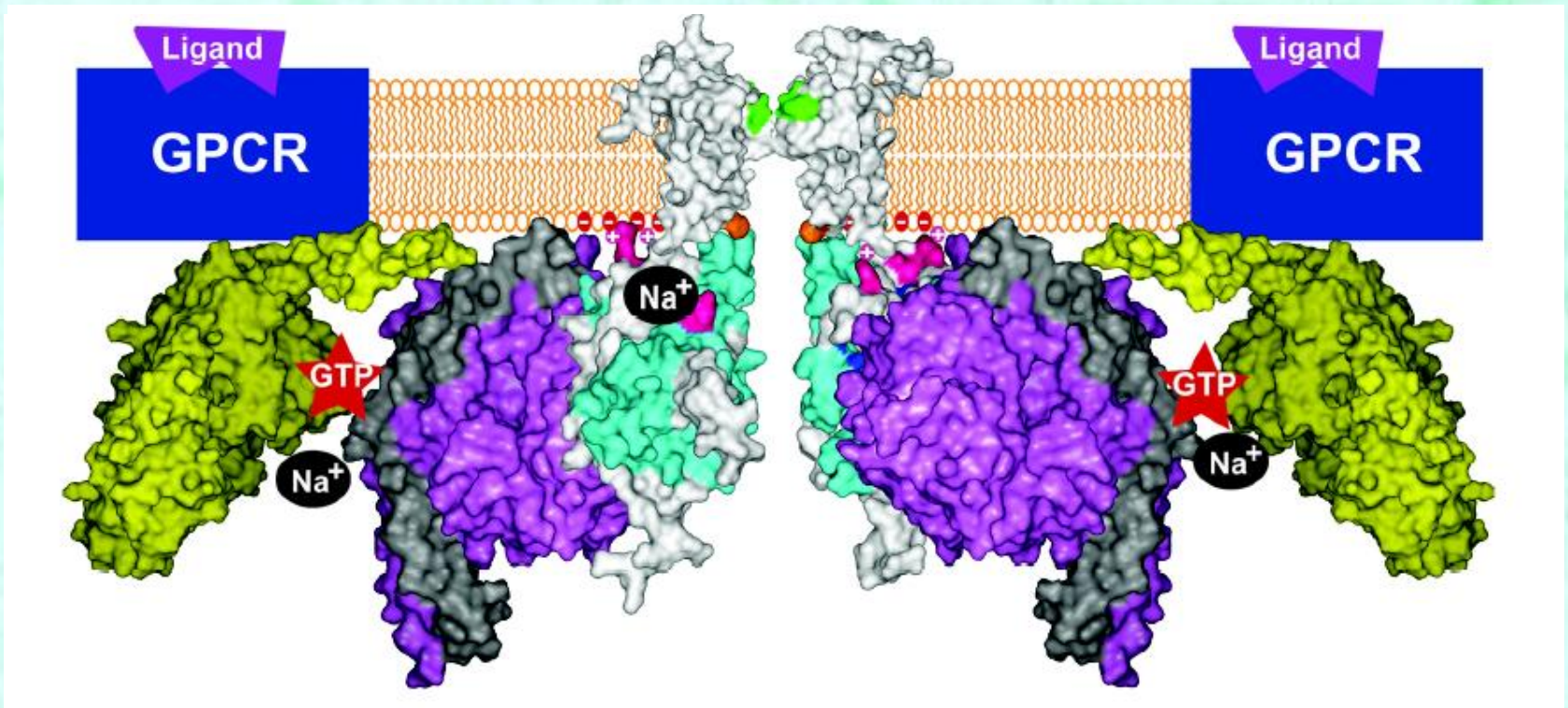
# Structure et gating des canaux clonés



*Biggin & Sansom 2001*



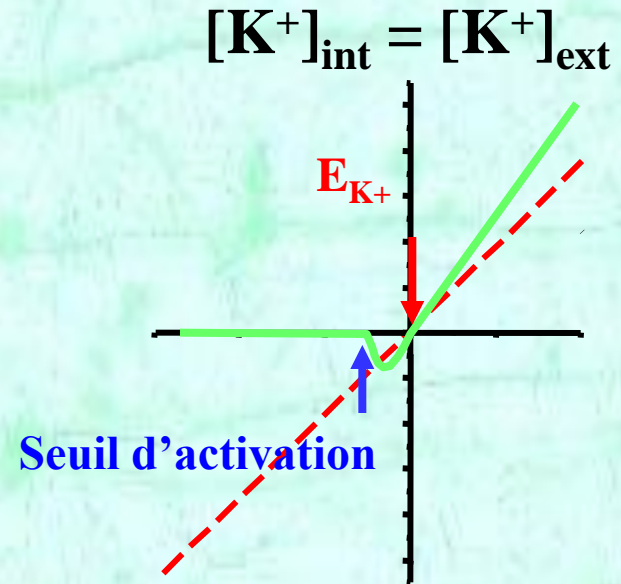
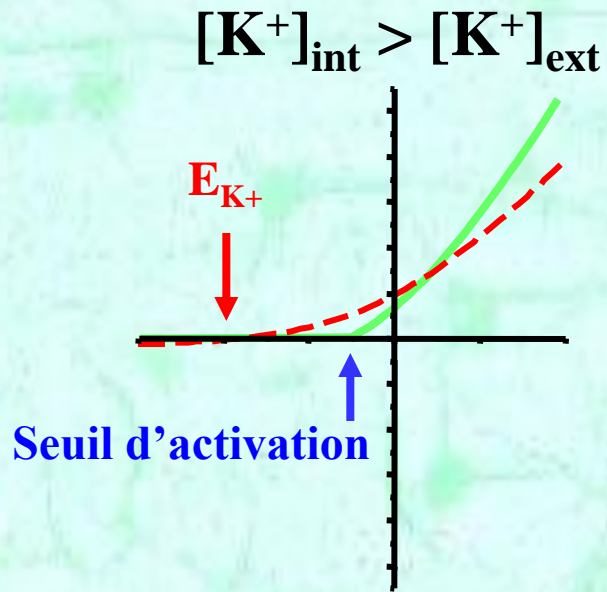
# Structure et gating des canaux clonés



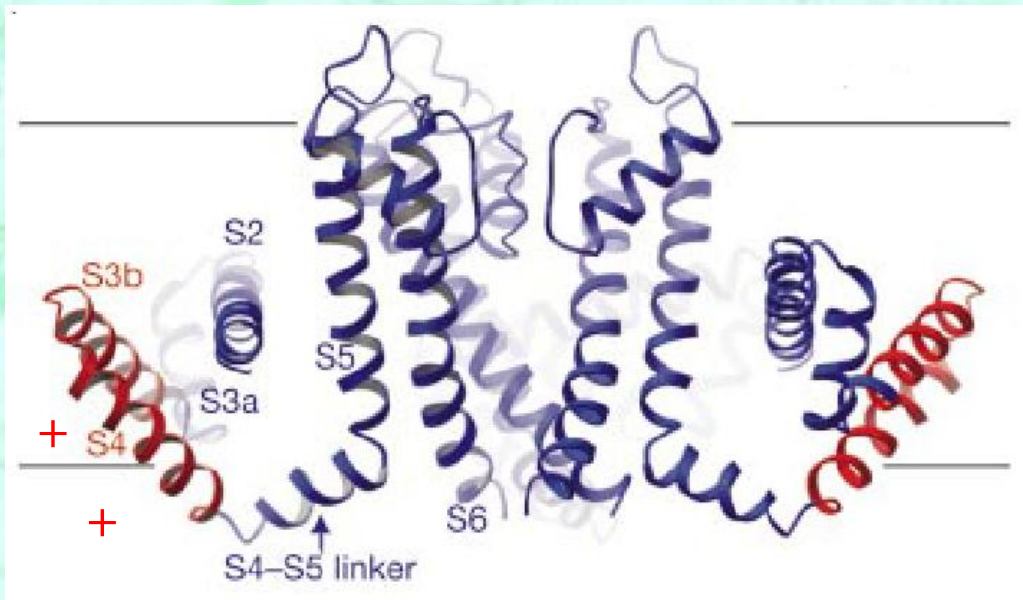
*Biggin & Sansom 2001*



# Canaux voltage-dépendant



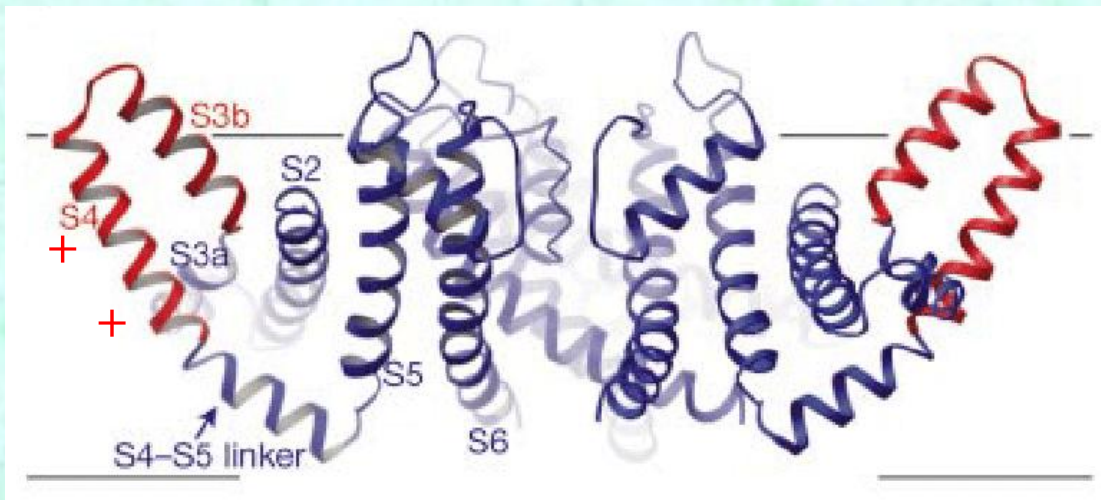
# Interactions senseur au voltage et pore (KvAP)



Externe:

**FERME**

Interne: - -



Externe:

**OUVERT**

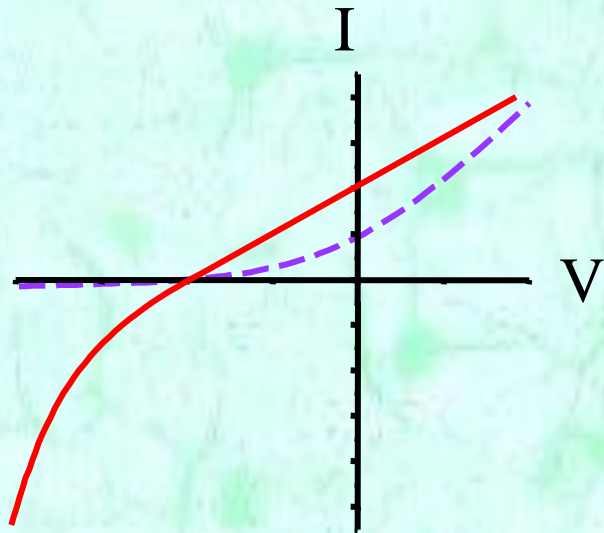
Interne: + +

**Effet de levier**

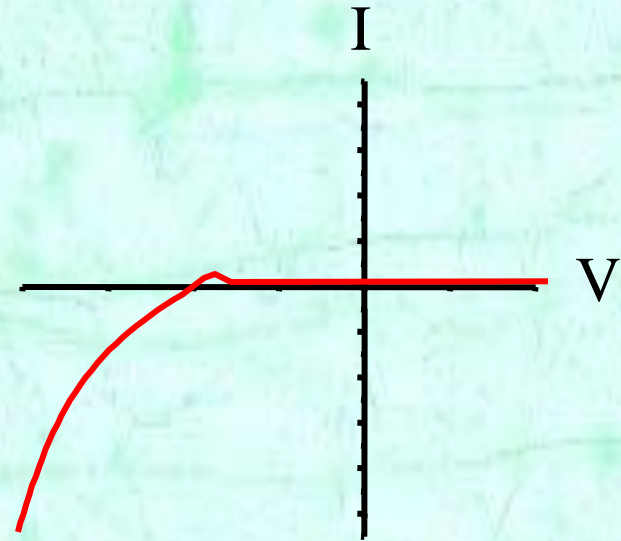
# Gating des canaux ioniques

## Rectification entrante

**Diffusion facilitée**

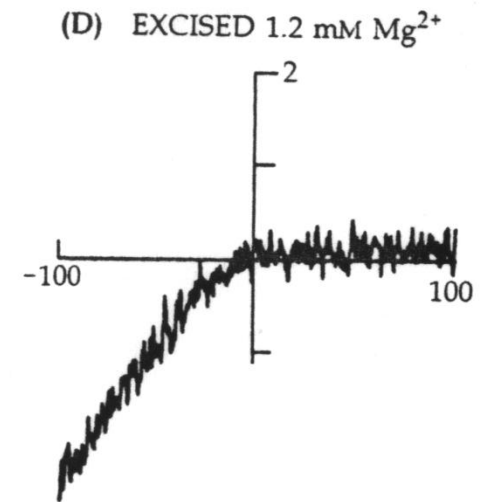
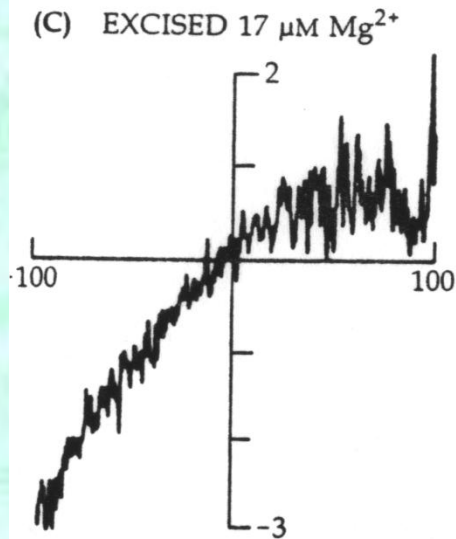
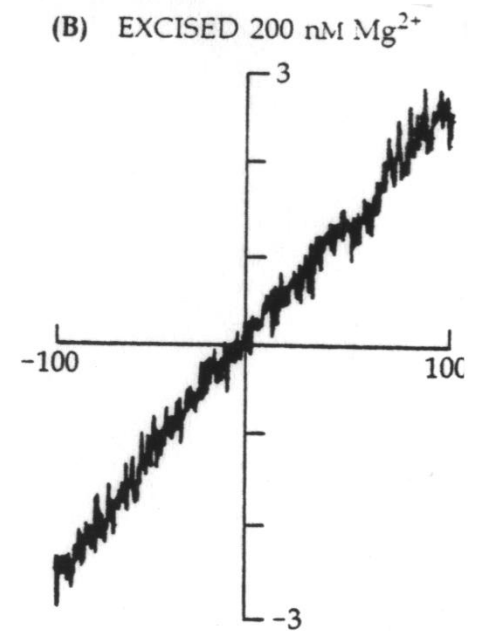
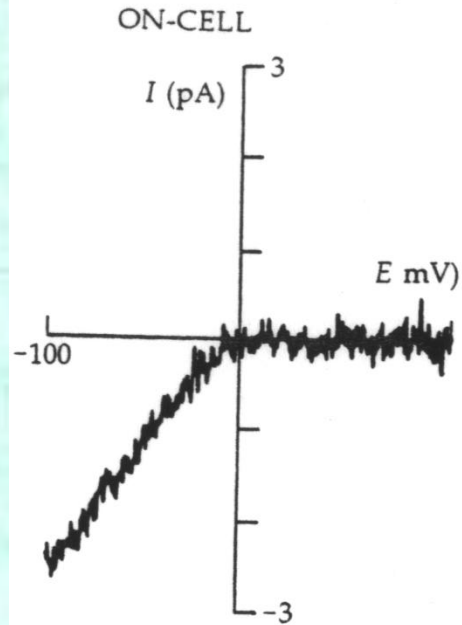
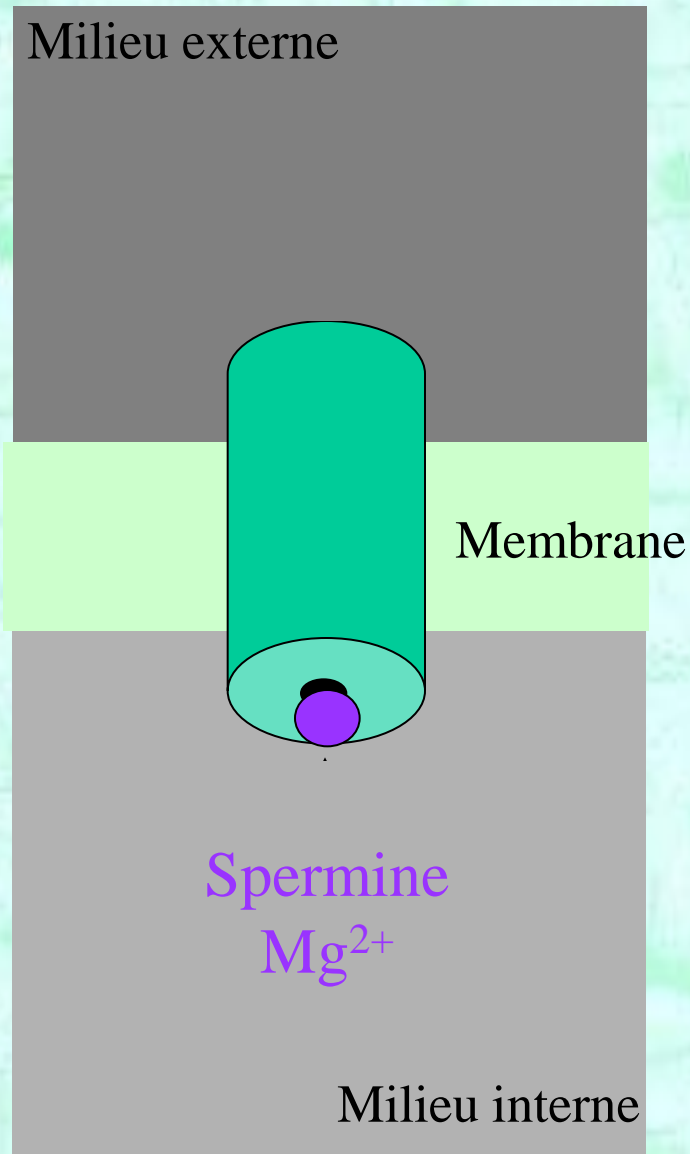


**Blocage des courants sortants**





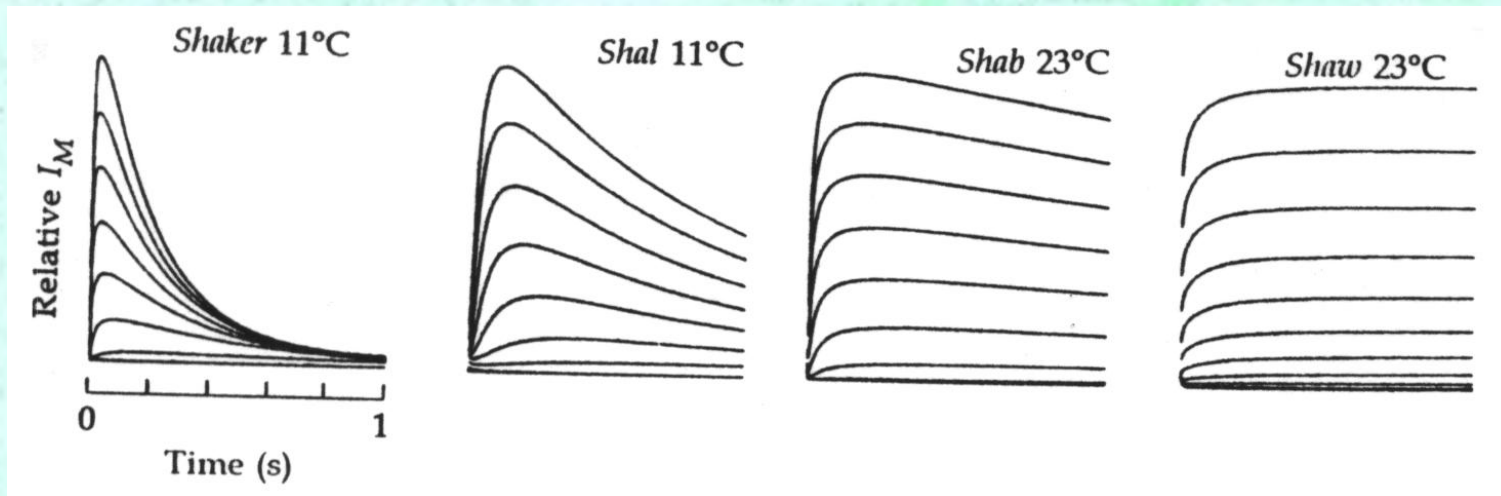
# Rectification entrante



# Canaux temps-dépendant

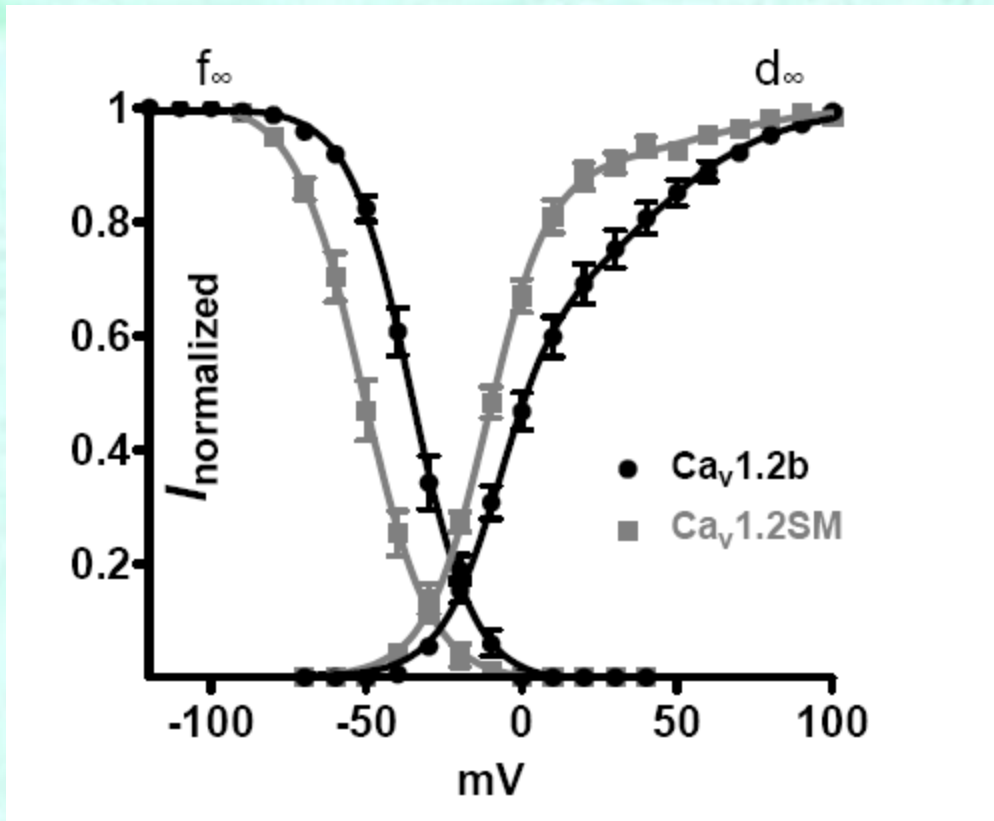
**Activation**

**Inactivation**



# Courants en fonction du temps

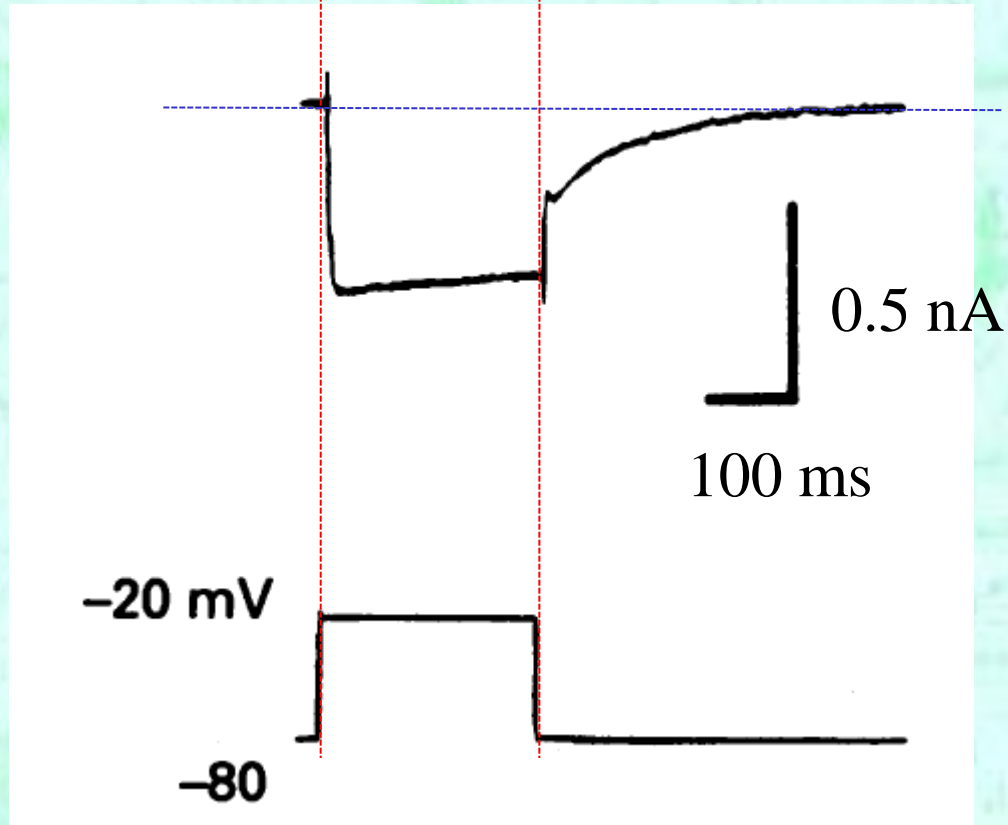
Inactivation



Notion de courant de fenêtre

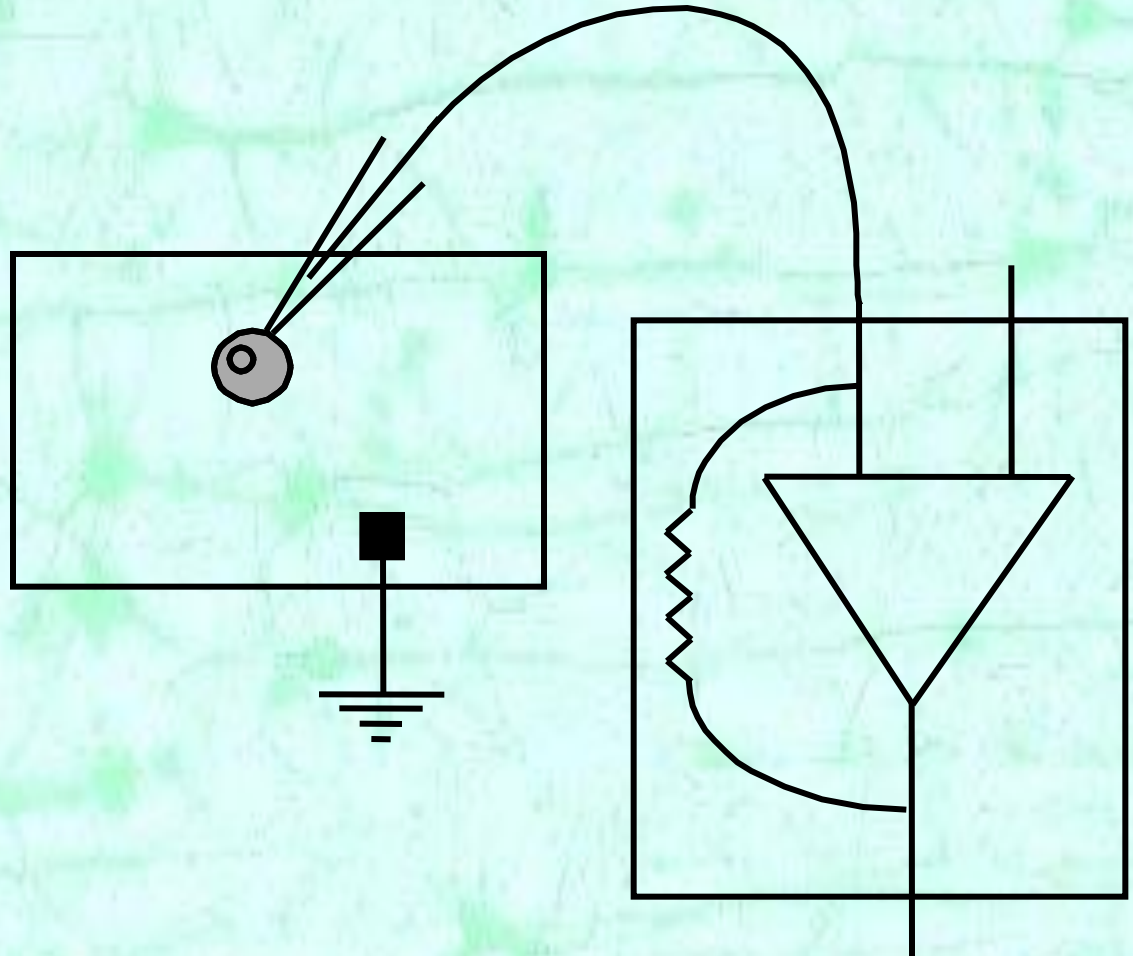
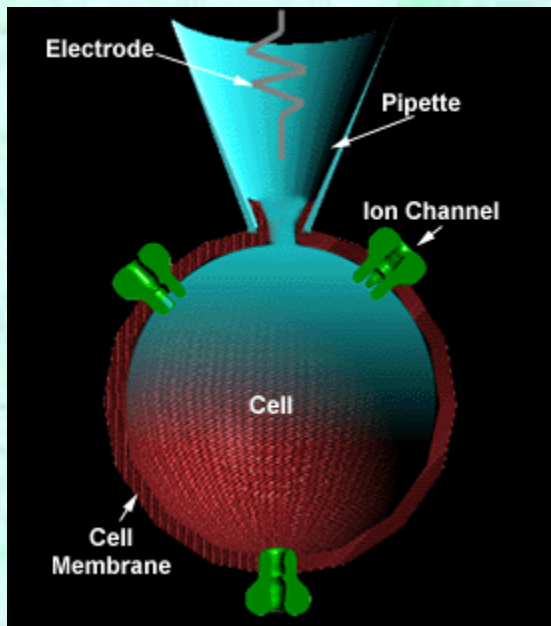


# Notion de désactivation



# Patch Clamp

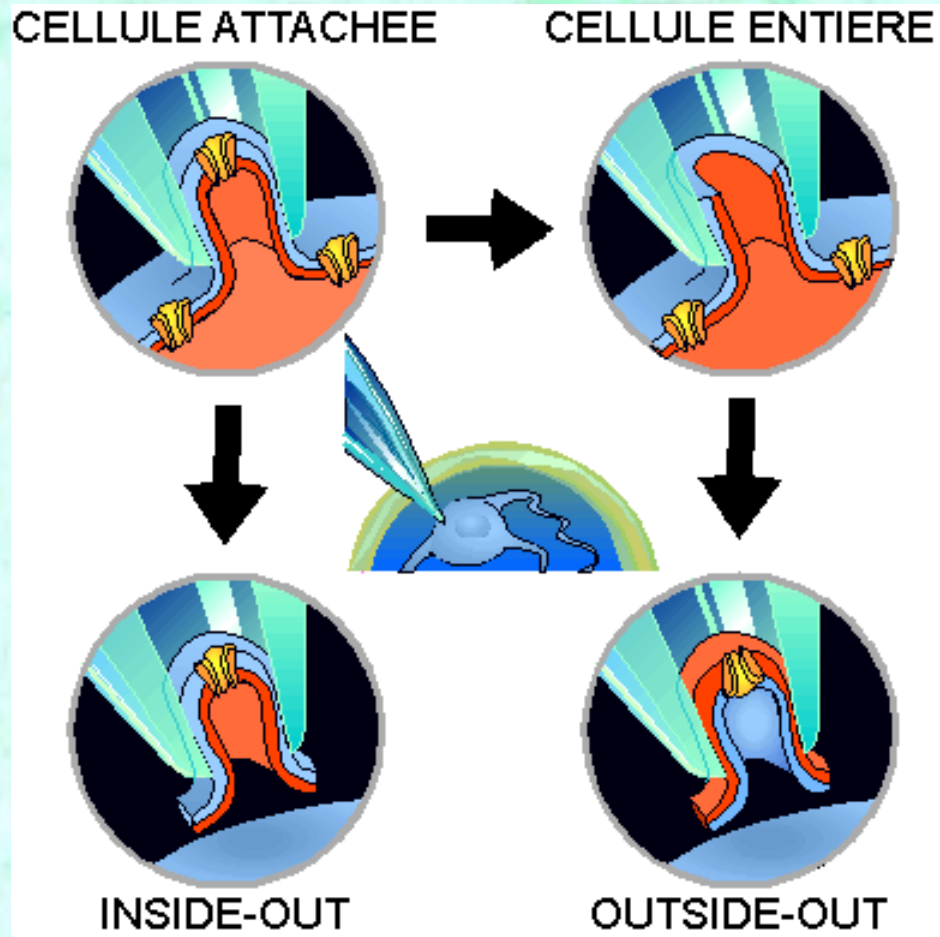
## Enregistrements de courants unitaires



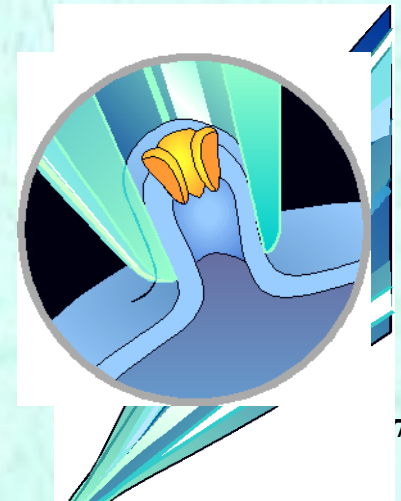
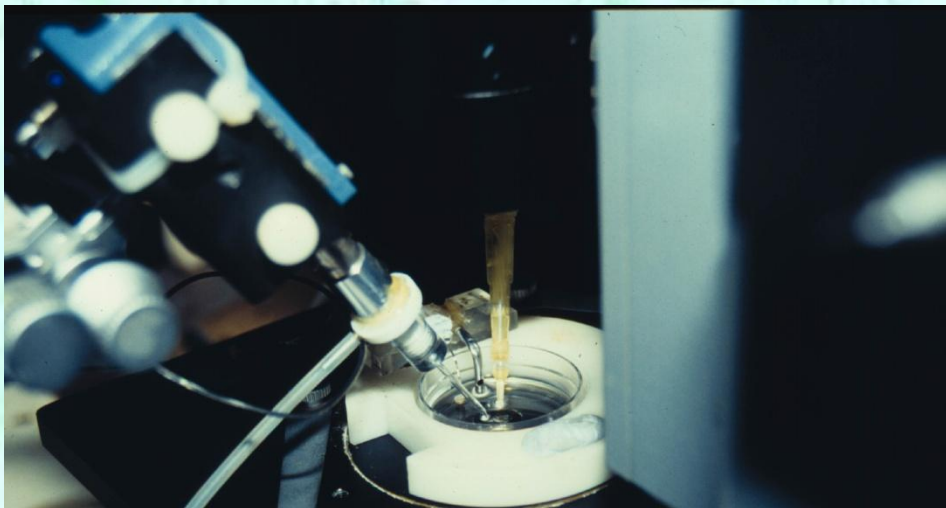
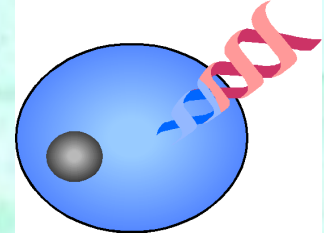
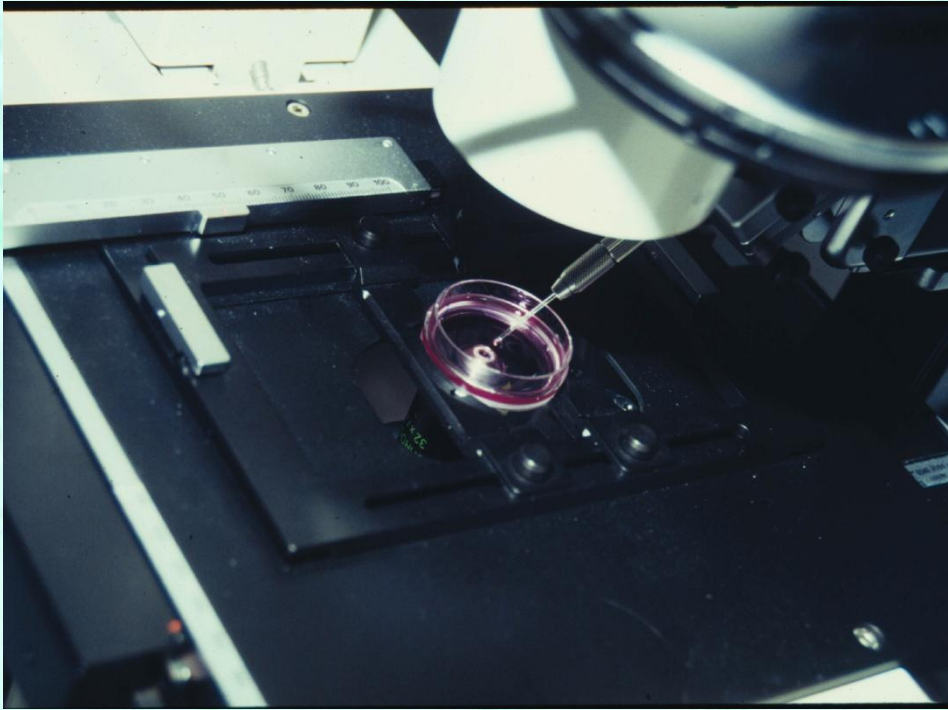
# LE PATCH CLAMP



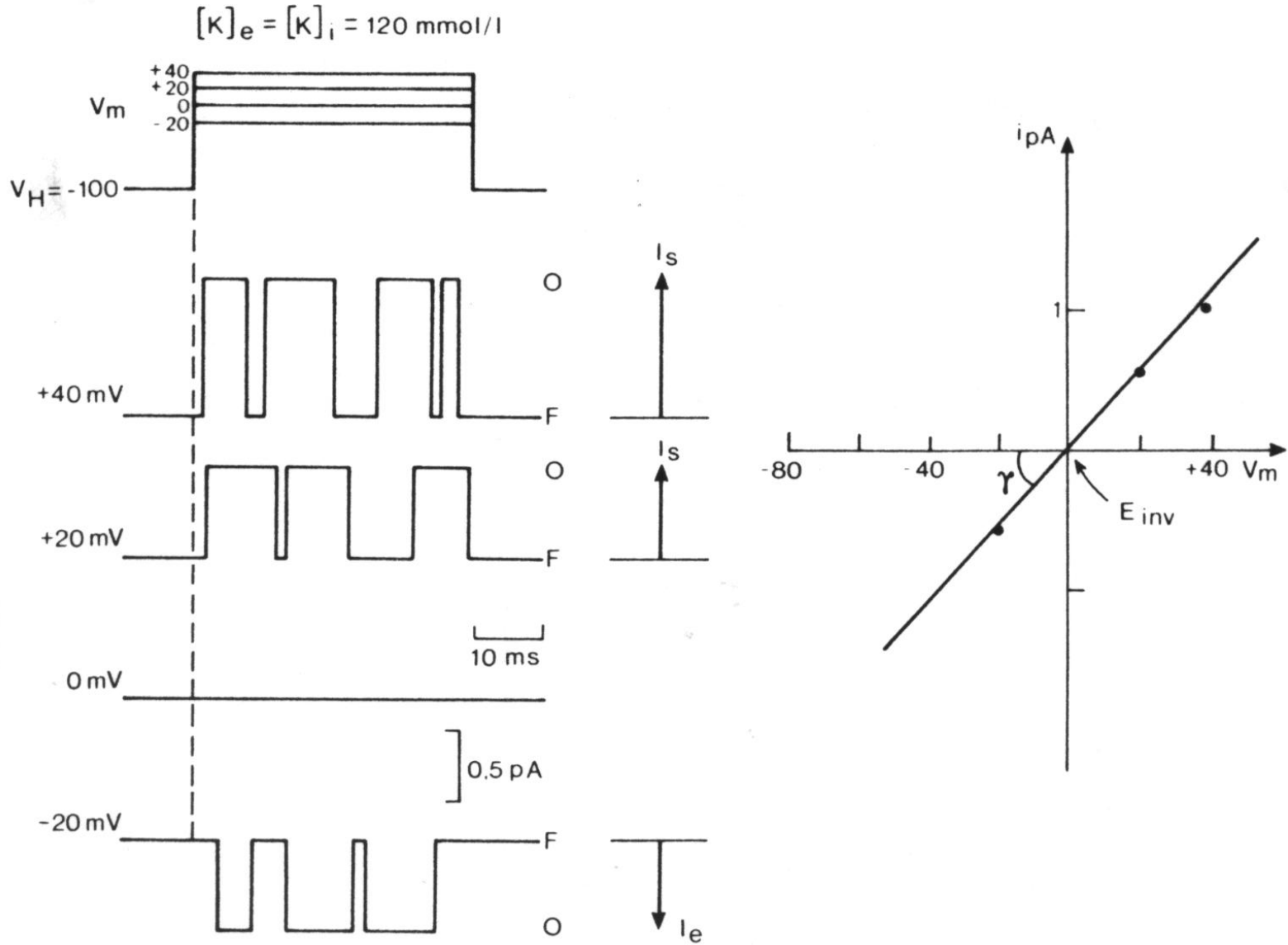
# Configurations du Patch Clamp



# Poste de Patch clamp

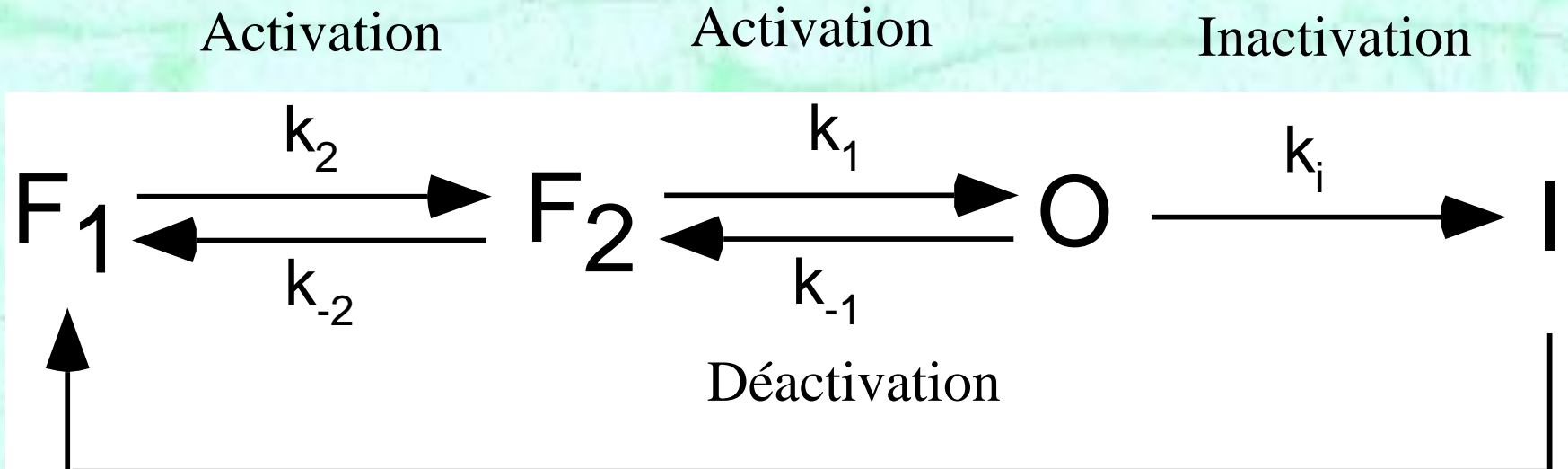


# Courant unitaire

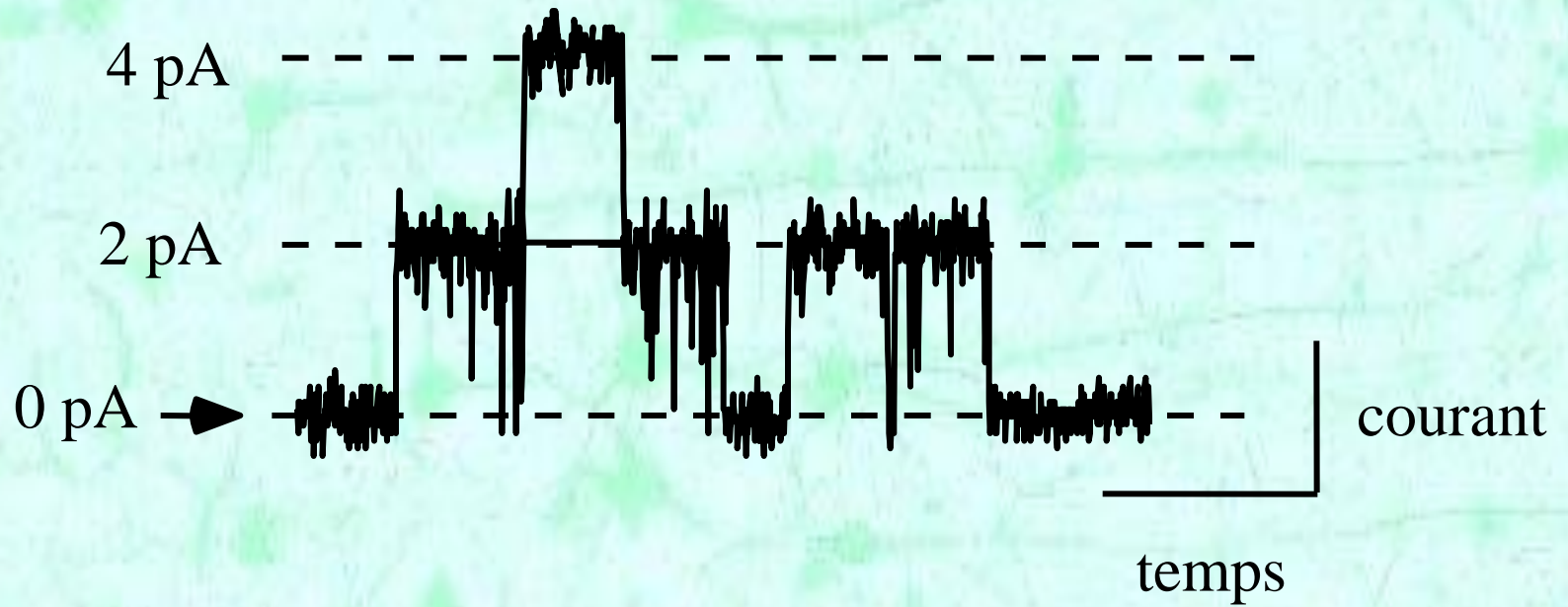




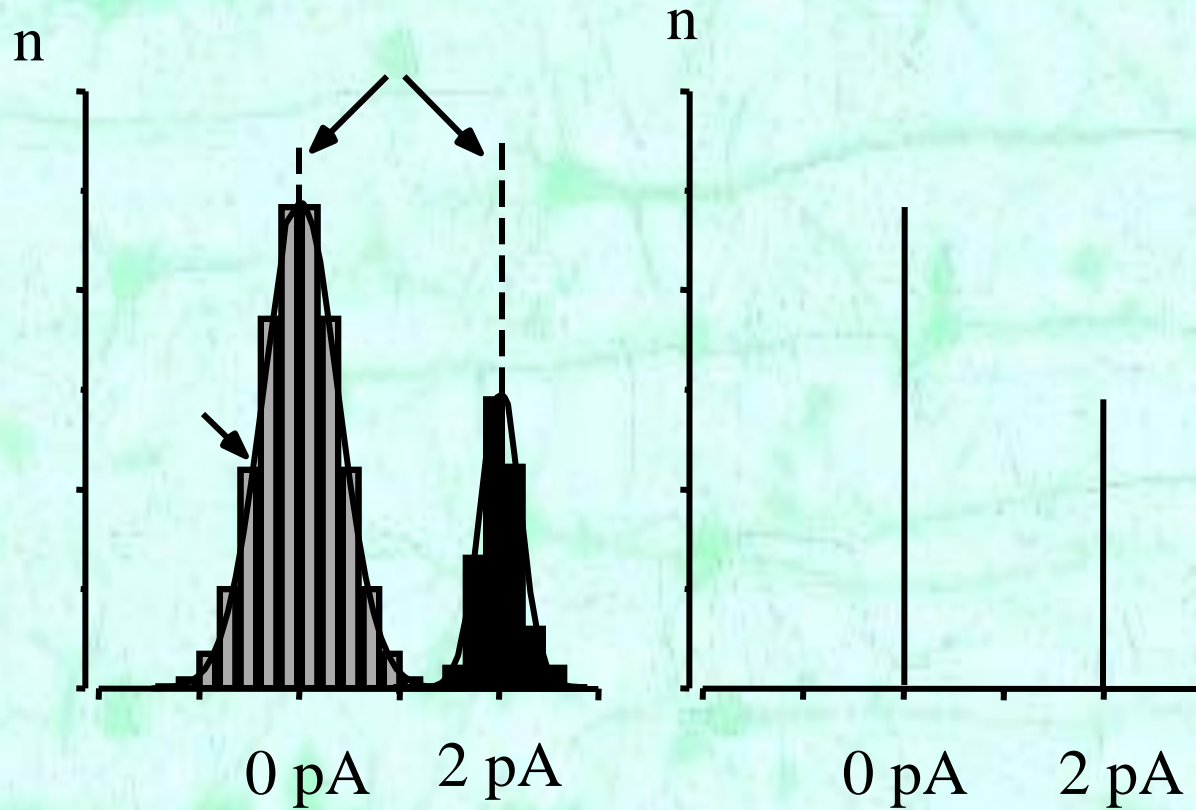
# Modèle



# Courant unitaire

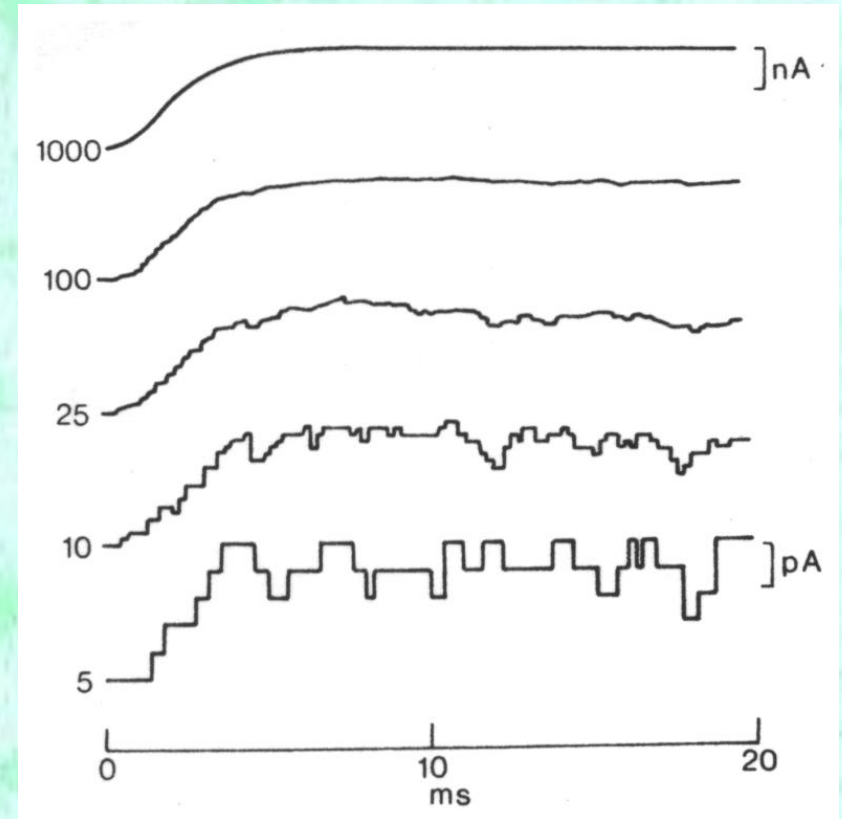
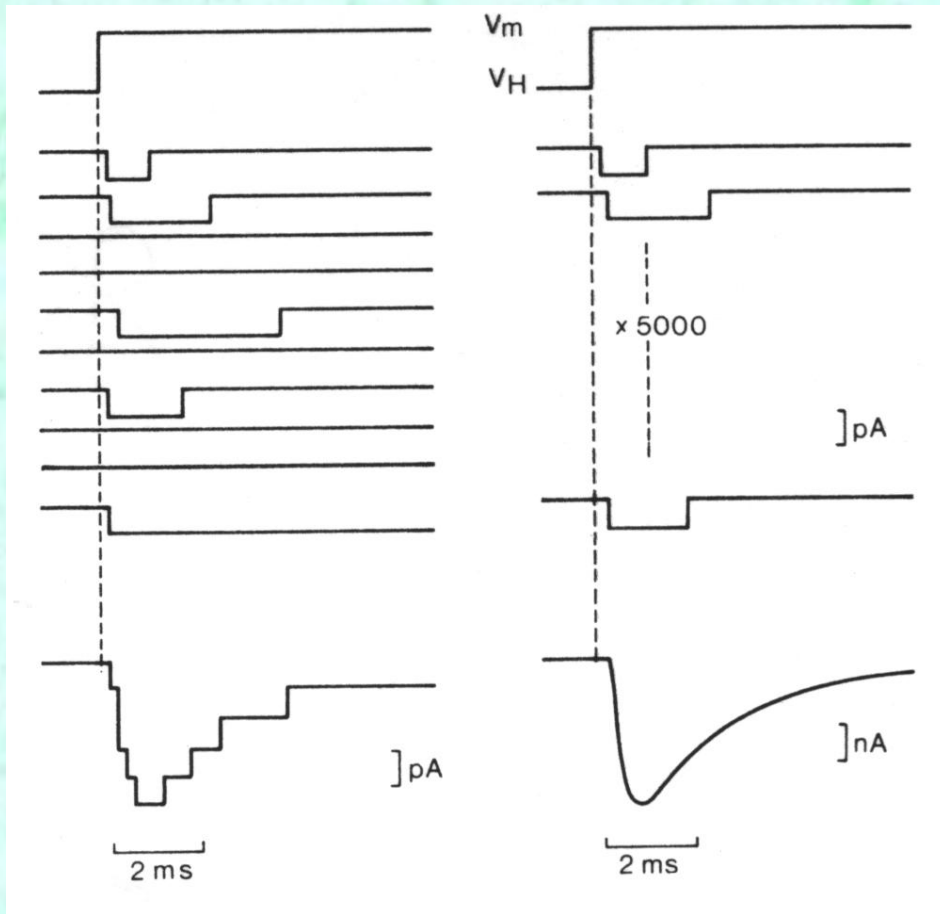


# Histogramme d'amplitude

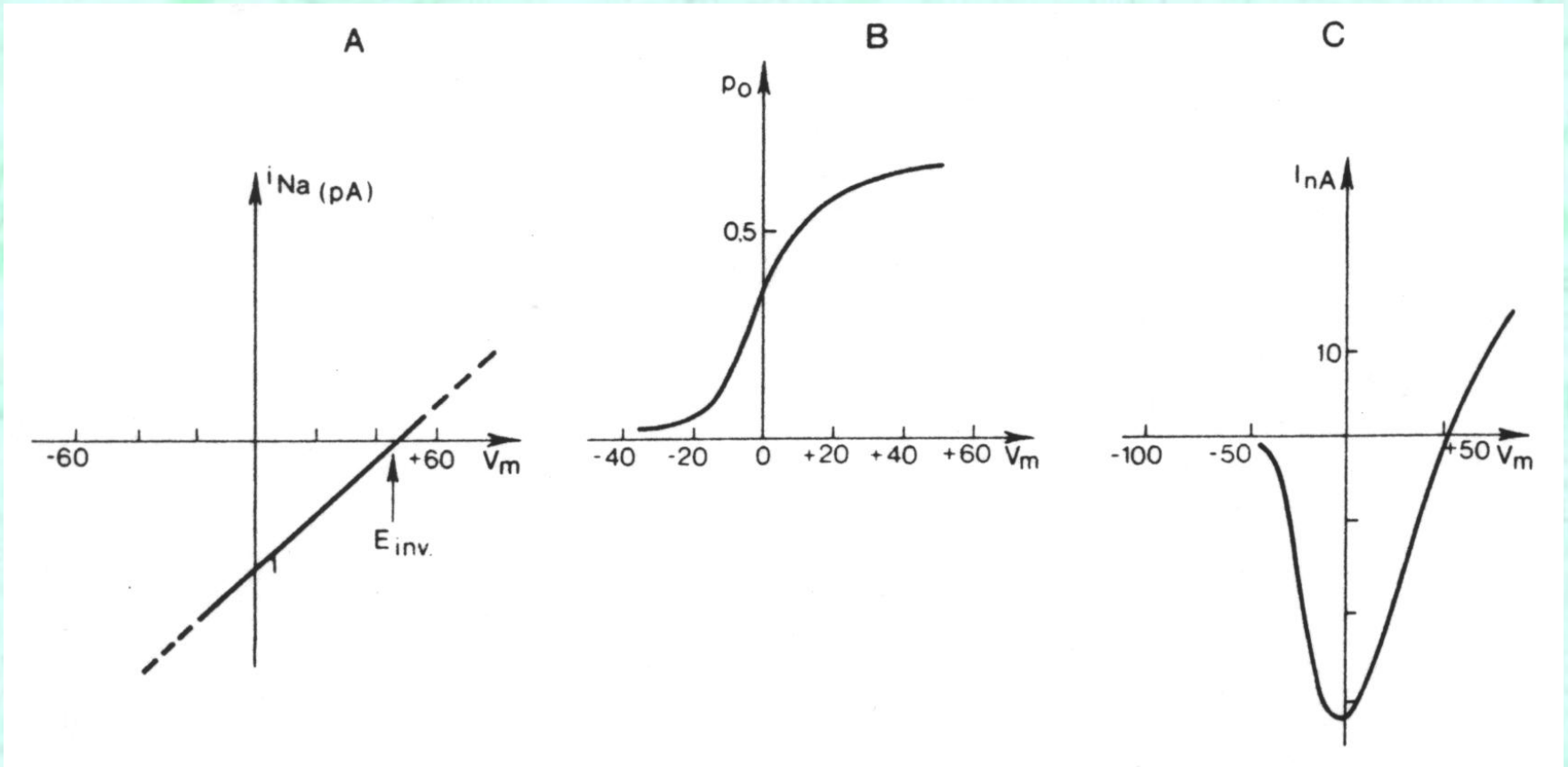




# Sommation des courants unitaires



# Courant total



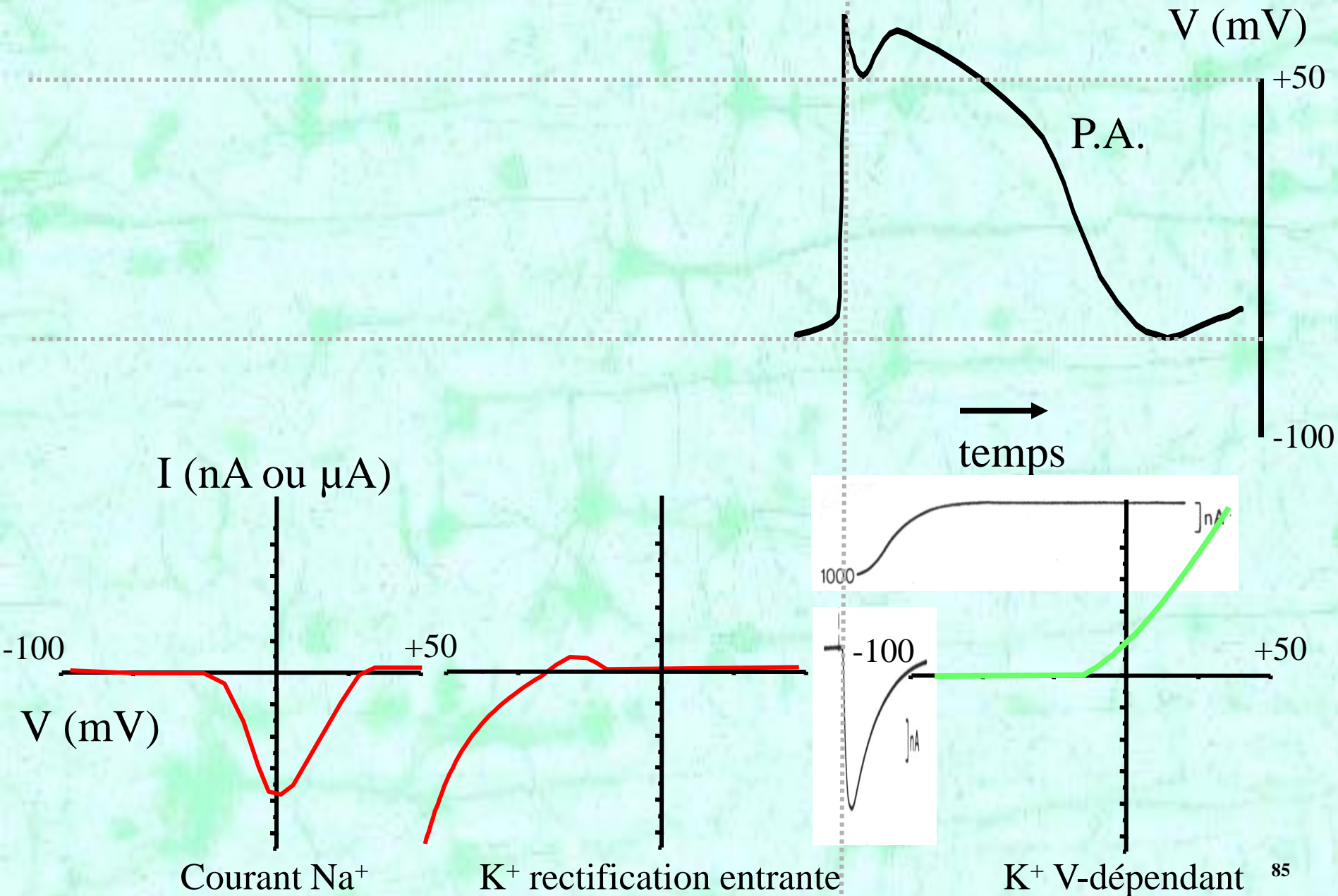
$$i_{\text{unitaire}} = \gamma_{\text{ion}} \cdot (V_m - E_{\text{ion}})$$

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

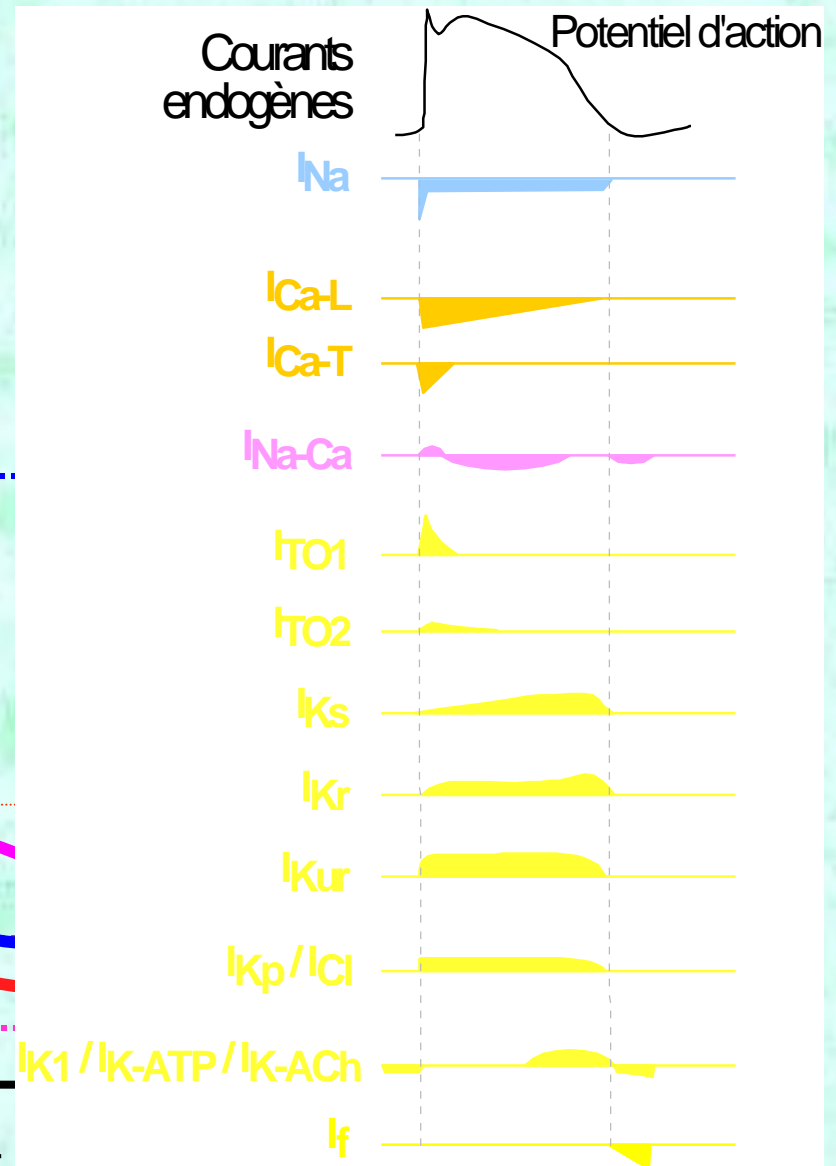
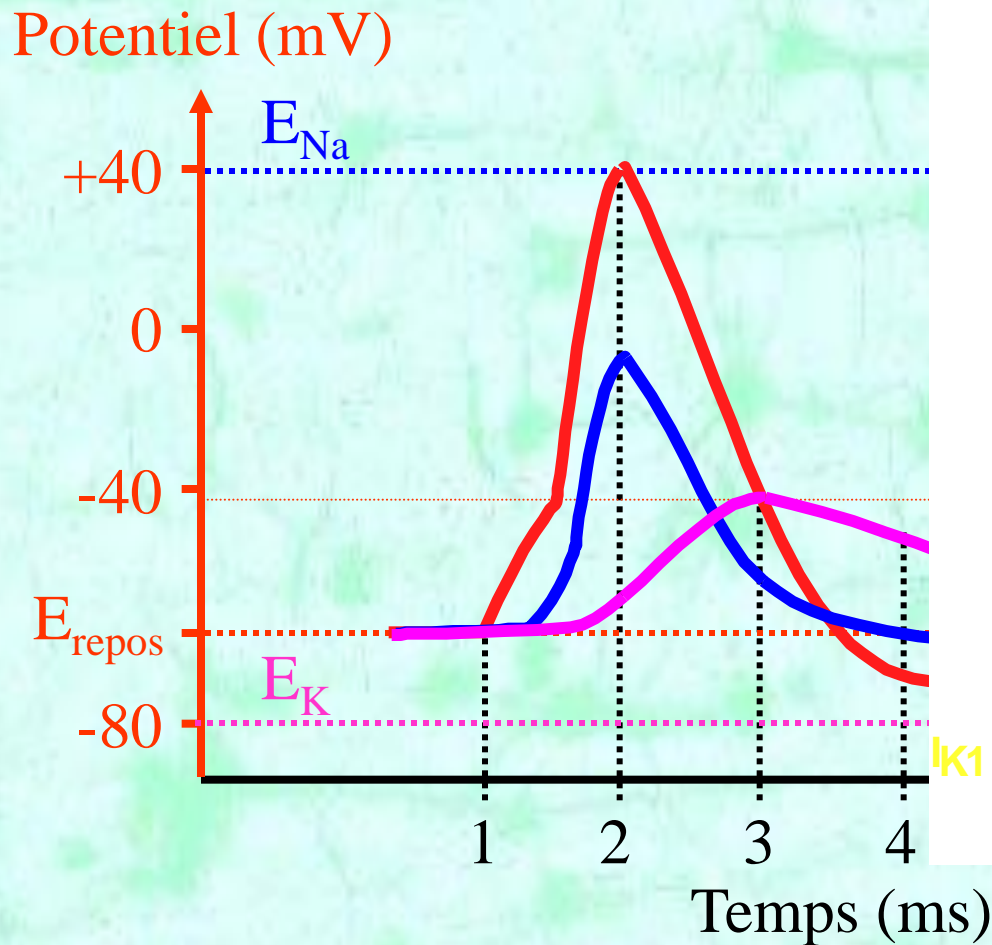
# **TECHNIQUE D 'ETUDE LE COURANT IMPOSE**



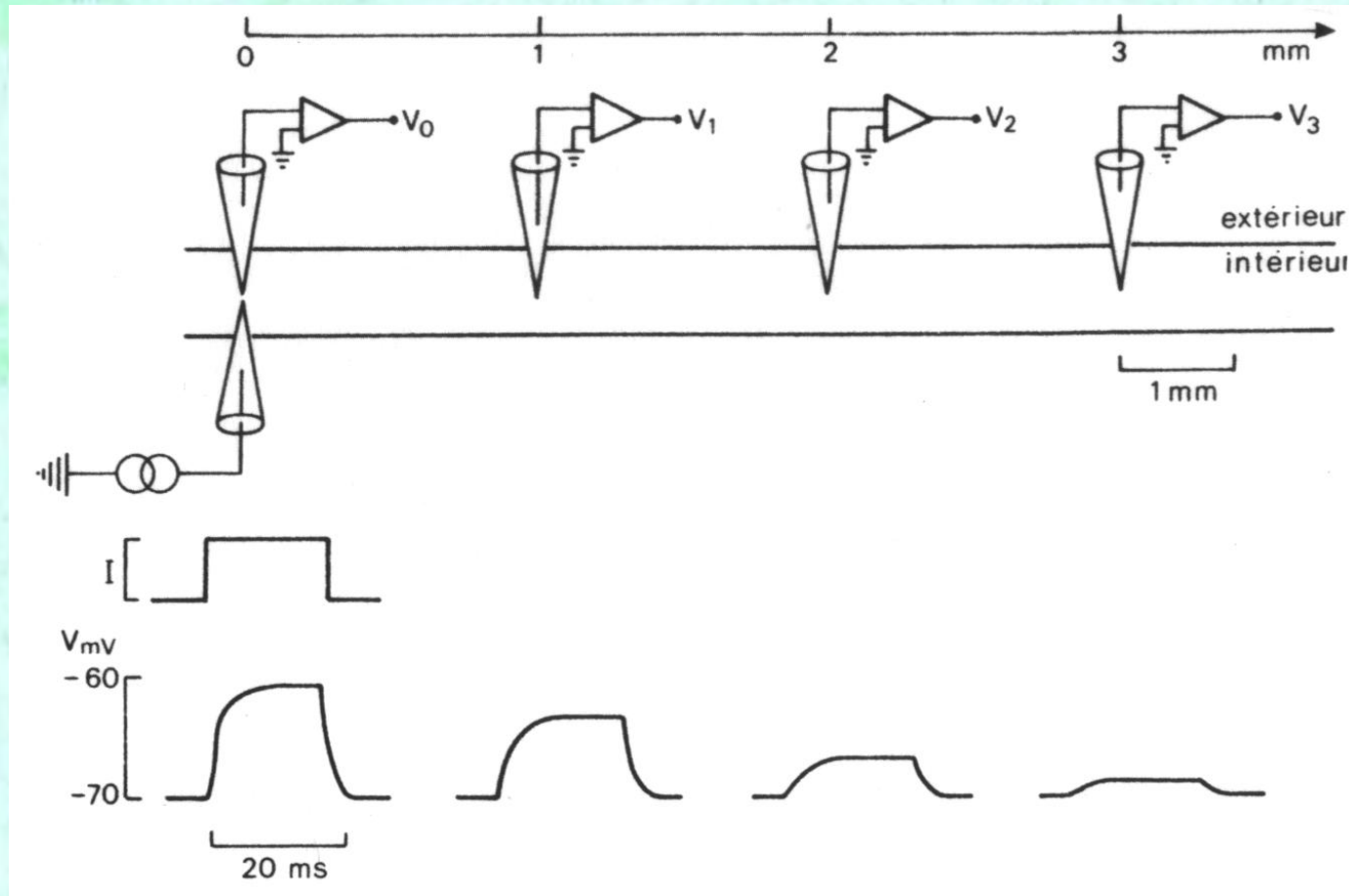
# Intégration de la courbe IV et des cinétiques



# Potentiel d'action en current-clamp



# Potentiel électrotonique



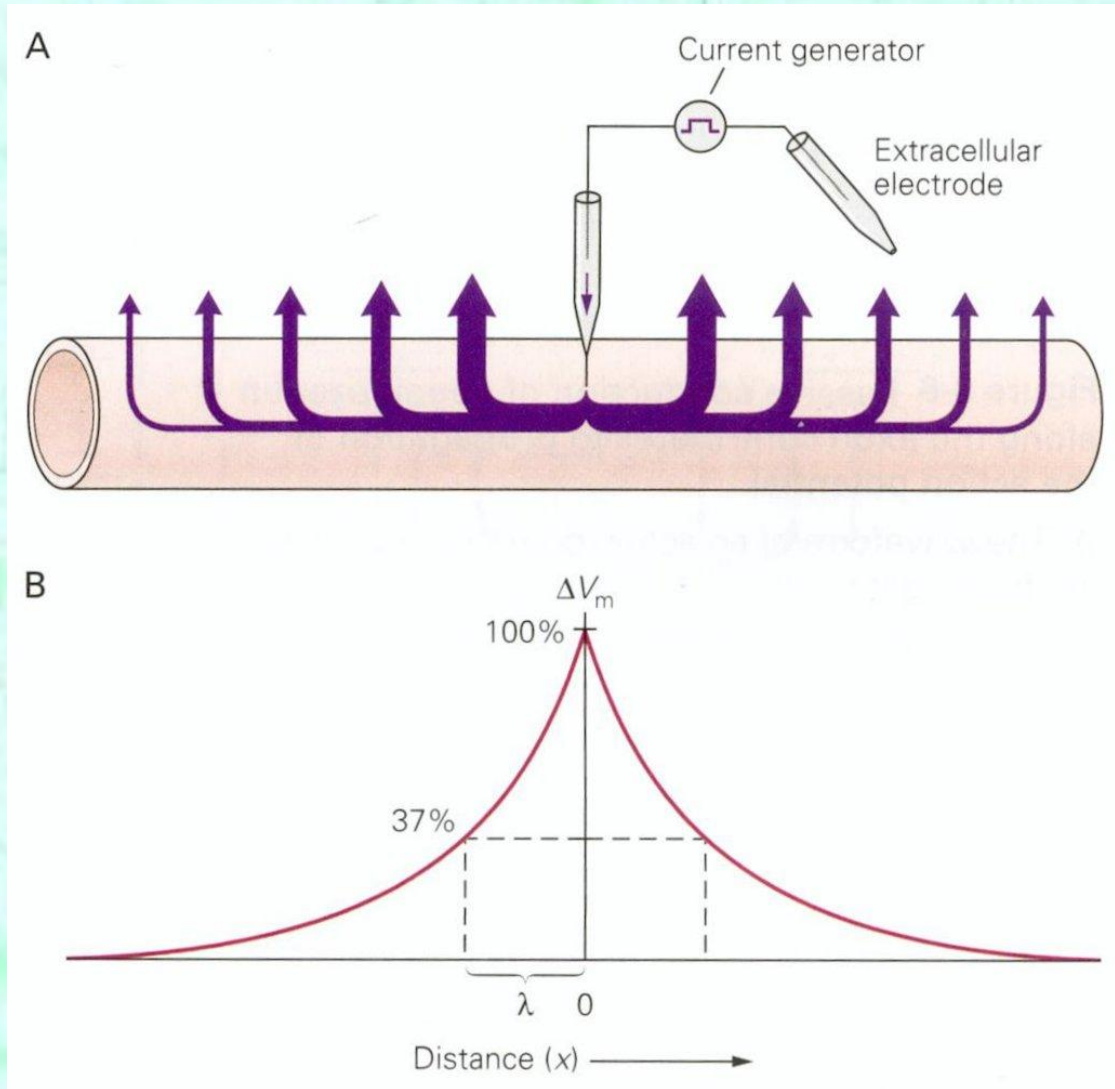
Amplitude (mV)

Constante d'espace (0,1 à 1 mm)

Distance



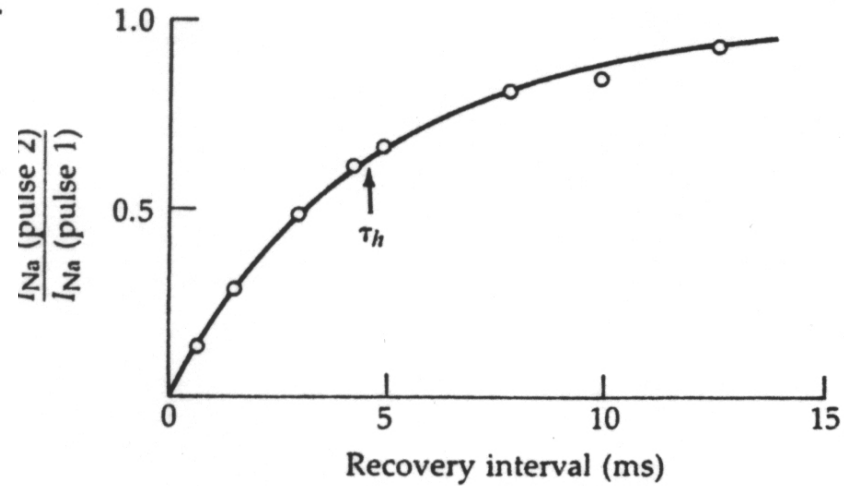
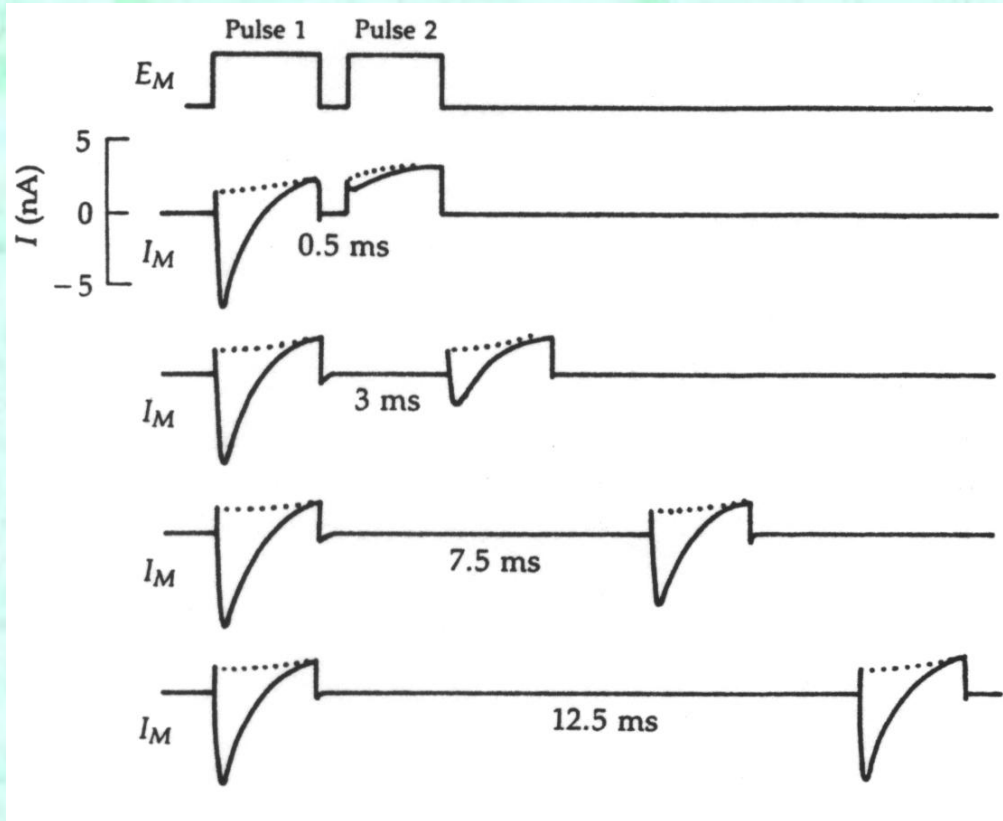
# Propagation bidirectionnelle



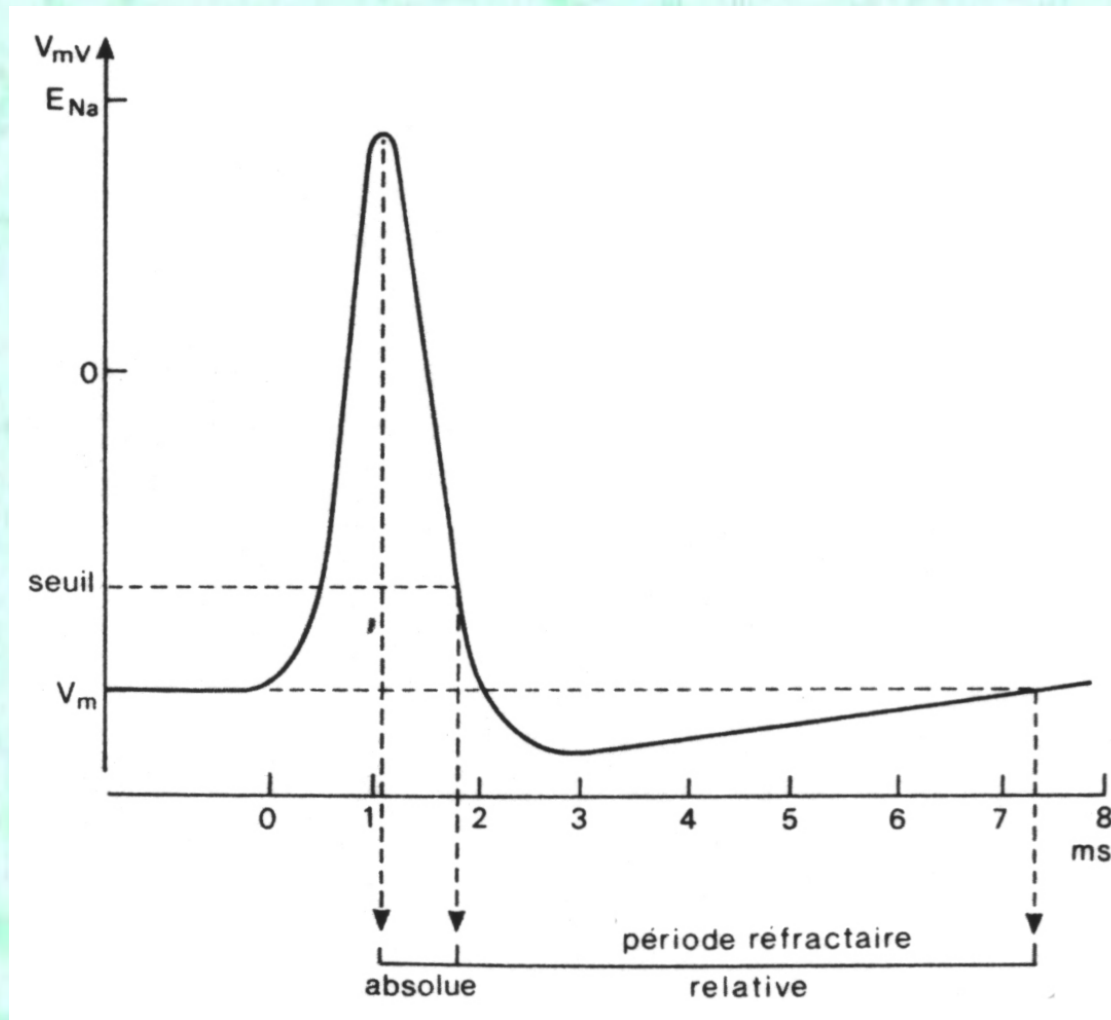
Seeley "Anatomy & Physiology", Mc Graw-Hill

# Conséquences de l'inactivation

## Période réfractaire

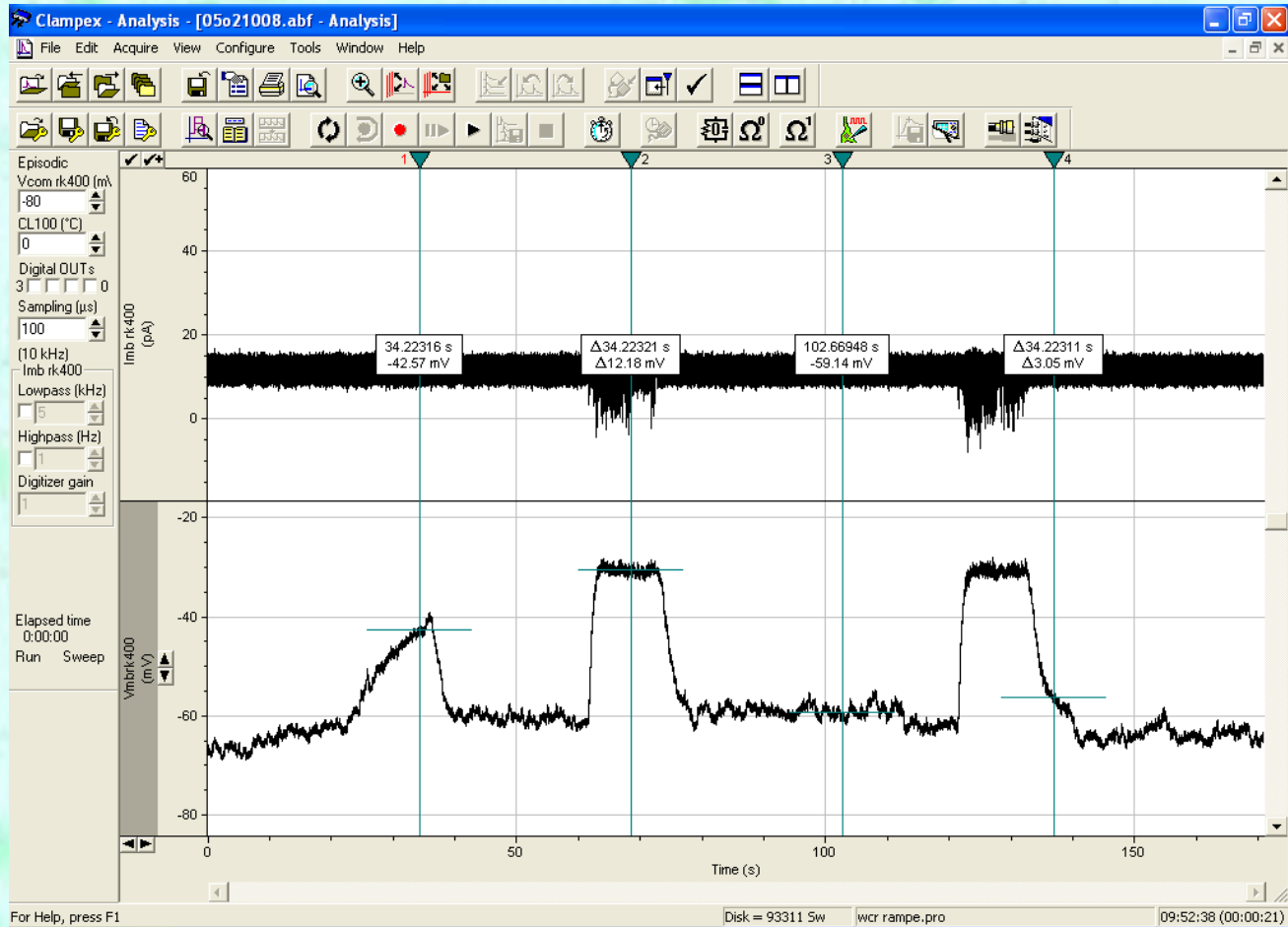


# Périodes réfractaires (courant $\text{Na}^+$ )





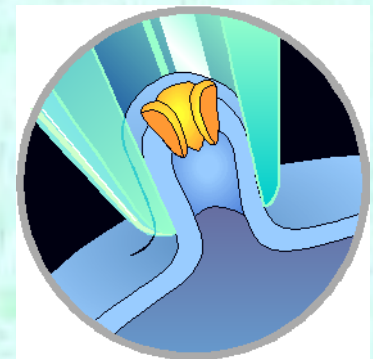
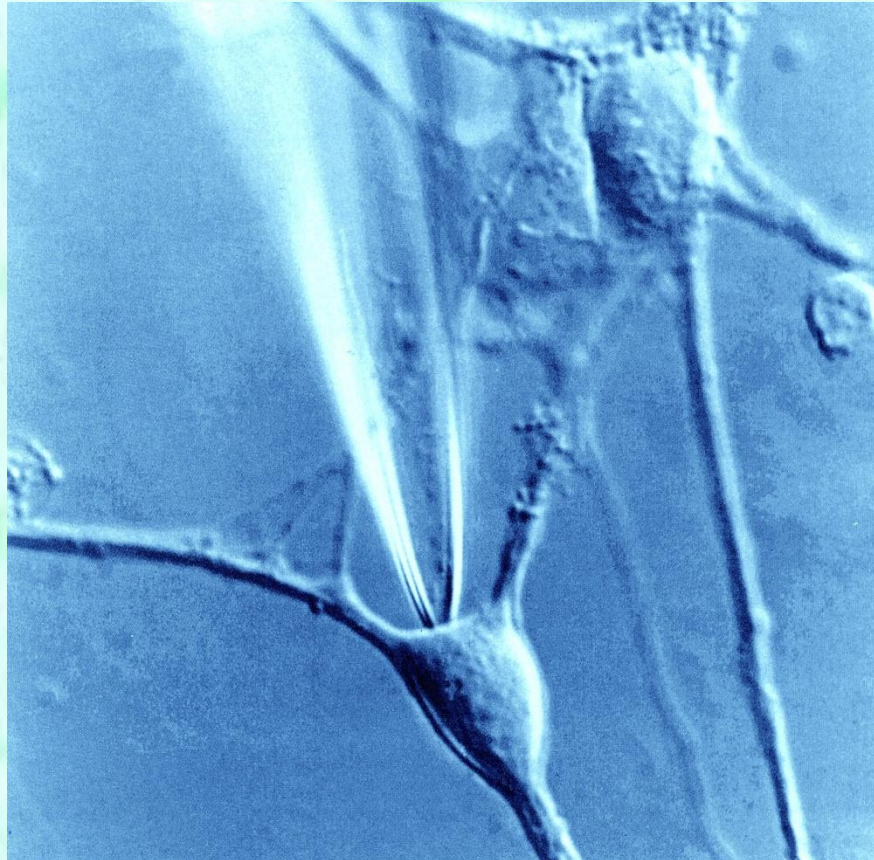
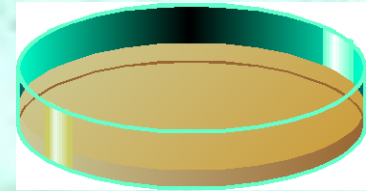
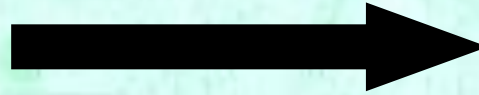
# Une "manip" en direct



# **CANAUX ENDOGENES ET EXOGENES**

# Etude des canaux natifs ou endogènes

Dissociation mécanique et enzymatique

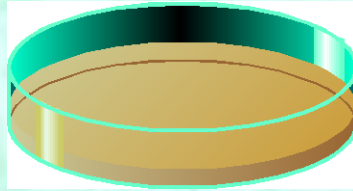
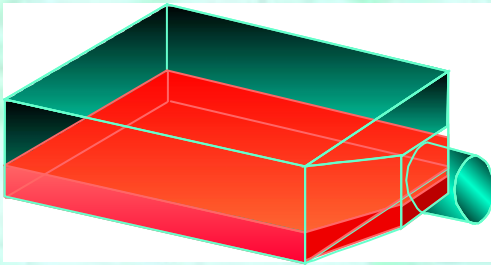


Patch clamp

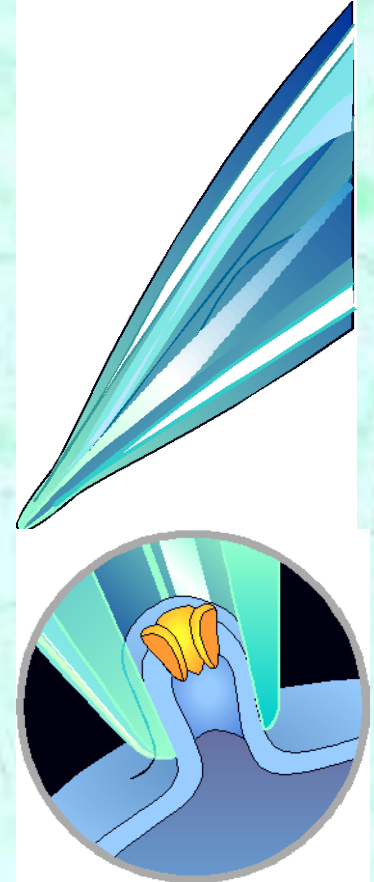
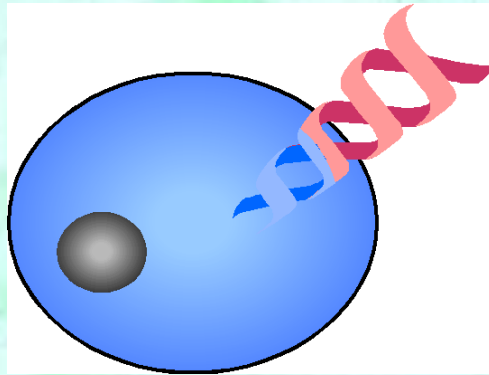


# Etude des canaux clonés ou exogènes

Cultures de cellules



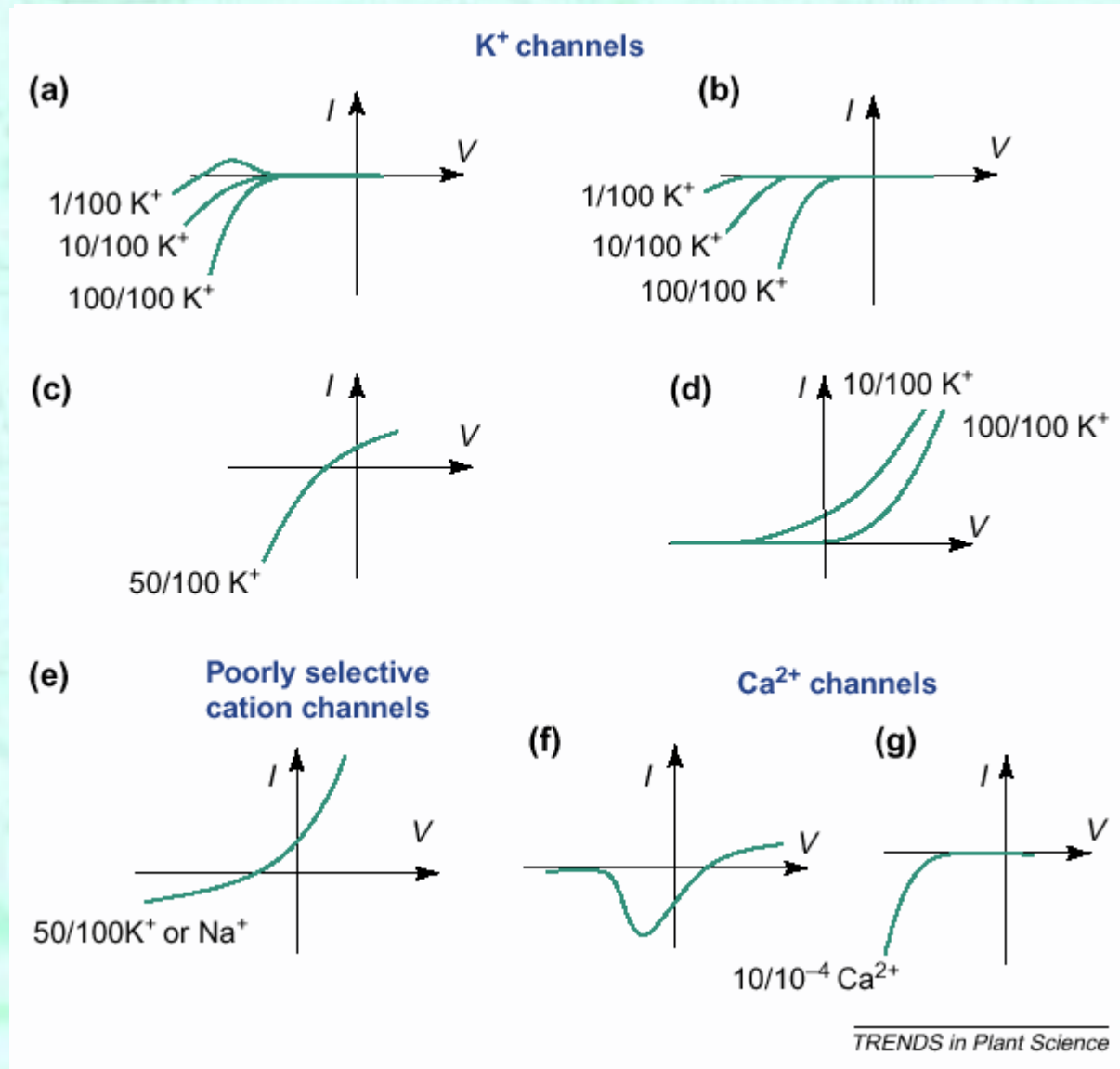
Transfection, infection, injection



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 électrogène 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'autre 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<sup>nde</sup> 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:**

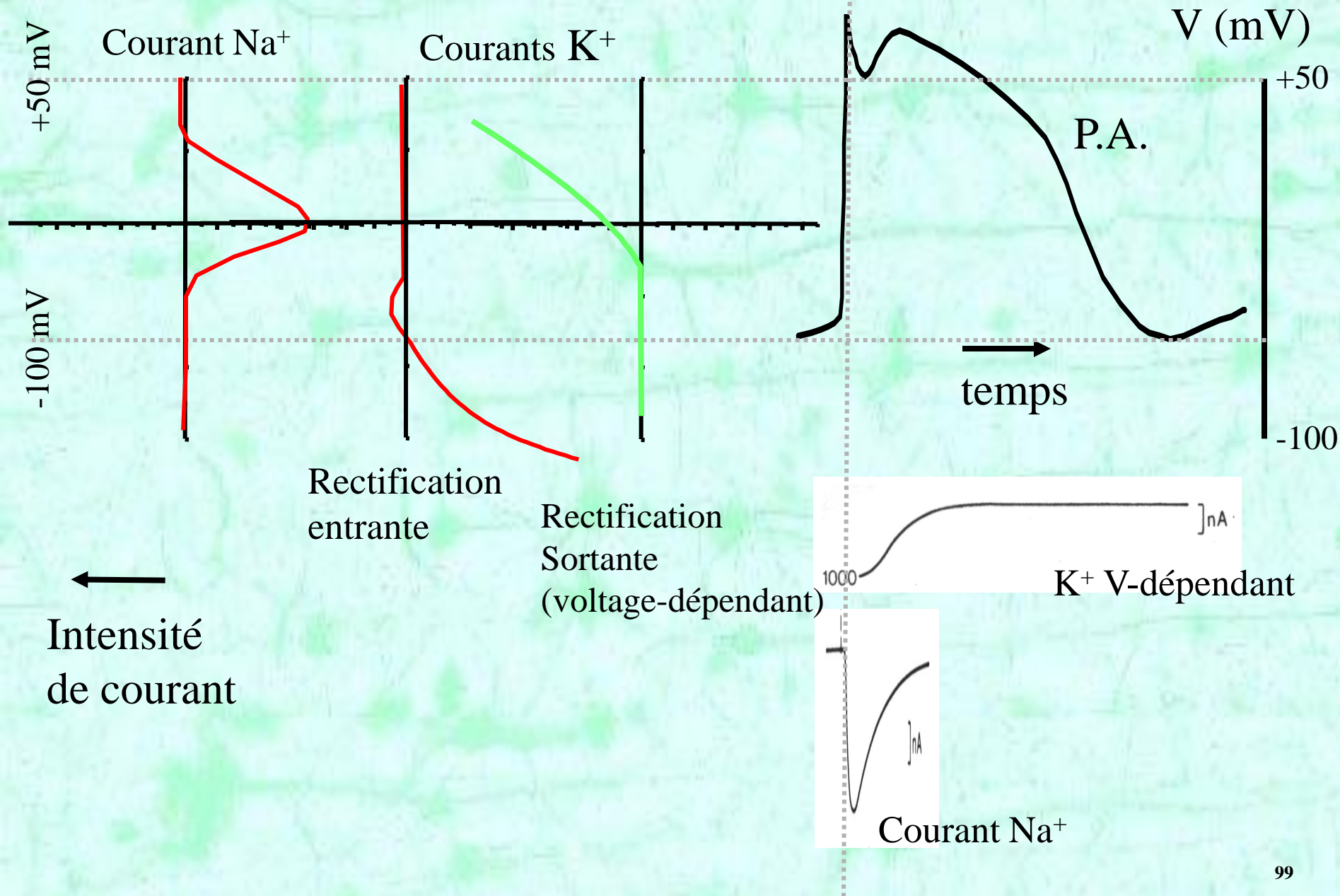
Technique de patch clamp.

## **2000 NEHER - SAKMANN :**

Prix Nobel de Médecine.



# Intégration de la courbe IV et des cinétiques





# Potentiel d'action en current-clamp

