# ELECTROPHYSIOLOGIE:

# PRINCIPES ET TECHNIQUES

**Fabrice DUPRAT,**
**Chargé de Recherche**

# SOMMAIRE

*I-A-1 Compartiments liquidiens*..... *3*

*I-A-2 Protéines de transport*..... *3*

*I-A-3 Modèle électrique des membranes biologiques*..... *6*

*I-A-4 Potentiel d'équilibre - Loi de Nernst*..... *8*

*I-A-5 Voltage imposé* ..... *12*

*I-A-6 Double microélectrodes*..... *12*

*I-A-7 Patch-clamp*..... *14*

## I-A-1 Compartiments liquidiens

Les organismes vivants sont composés de milieux liquides séparés par des membranes plus ou moins perméables, ceci à l'échelle des cellules et des organes. D'après le modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer (Singer & Nicolson, 1972), les membranes plasmiques sont composées d'une solution bi-dimensionnelle de protéines orientées et de lipides. La plupart des phospholipides et glycolipides constituant la membrane sont assemblés en bicouche, ils ont un rôle de solvant pour les protéines transmembranaires et de barrière de perméabilité qui permet de séparer les composés non lipophiles présents de part et d'autre de la membrane. Les membranes plasmiques ont une composition protéique et lipidique très asymétriques. La composition du milieu intérieur et extérieur des cellules est également très asymétriques, le Tableau 1 présente des exemples de concentrations ioniques auxquelles il faut rajouter les protéines chargées qui participent également au bilan des charges.

**Tableau 1: Concentrations, [Ion], des ions des milieux interne et externe d'une cellule musculaire squelettique de mammifère.**

| **Ion** | **$[Ion]_{ext}$** (mM) | **$[Ion]_{int}$** (mM) |
|---|---|---|
| **$Na^+$** | 145 | 12 |
| **$K^+$** | 4 | 155 |
| **$Ca^{2+}$** | 1,5 | $10^{-7}$ |
| **$Cl^-$** | 123 | 4,2 |

(Hille, 1992)

La perméabilité des membranes seules varie selon les molécules (Alberts *et al.*, 1983) :

- Les petites molécules apolaires diffusent rapidement ($O_2$, $N_2$)
- Les petites molécules polaires non chargées diffusent plus lentement ($CO_2$, $H_2O$, urée)
- Les grosses molécules polaires et chargées ne diffusent pratiquement pas (glucides)
- Les grosses molécules et les ions ne diffusent pas

La présence de transporteurs est donc nécessaire pour permettre aux petites molécules et aux ions non perméants de traverser la membrane. Les macromolécules sont transportées par des phénomènes d'exocytose et d'endocytose qui ne seront pas étudiés ici.

## I-A-2 Protéines de transport

De nombreuses protéines de transport permettent le passage de composés de part et d'autre des membranes. Ces transporteurs (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) fonctionnent soit en :

**Uniport**
Permet le passage d'un seul composé dans un sens.
**Antiport**

Figure 22: Différents types de transporteurs

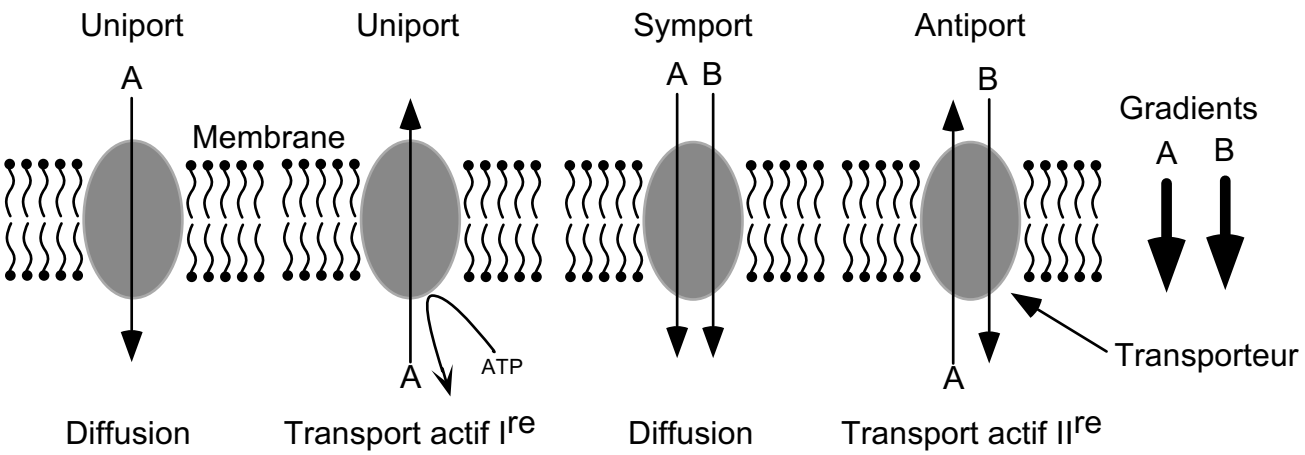
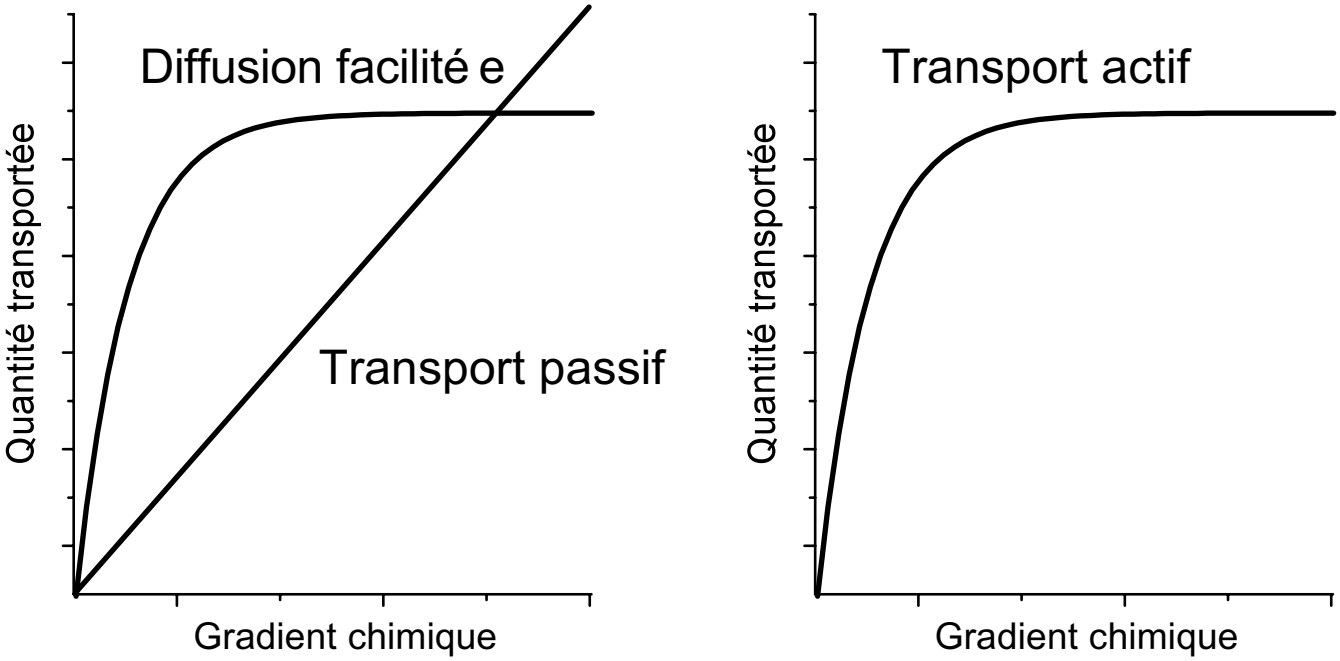



Figure 23: Transports passifs, actifs, diffusion facilitée



Permet le passage de deux ou plusieurs composés en sens opposés.
**Symport**
Permet le passage de deux ou plusieurs composés dans le même sens.

Ces transporteurs sont classés en trois groupes :

**1) Transport passif :**
Les composés traversent la membrane en suivant leur gradient de concentration (composés non chargés) ou en suivant leur gradient électrochimique (composés chargés, voir le chapitre I-A-4, page 8) c'est à dire par diffusion simple. La protéine laisse passer certains composés sans interagir avec eux, le système de transport n'est pas saturable (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), la seule limitation est sur la taille des composés.
Exemples: jonctions gap, composée d'un pore central hydrophile de 2 nm (voir revue de Kumar & Gilula, 1996).

**2) Transport actif :**
La protéine fait traverser le composé contre son gradient de concentration, cela nécessite un apport d'énergie. Il y a interaction entre la protéine de transport et le composé transporté, le système est saturable (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Dans un transport actif primaire, l'apport d'énergie est produit par l'hydrolyse de l'ATP.

*Exemples*: 1) **ATPase $Na^+/K^+$**, c'est un antiport qui permet la sortie de 3 $Na^+$ et l'entrée de 2 $K^+$ par molécule d'ATP hydrolysée. Le bilan des charges transportées n'est pas nul, le transport est électrogène, le courant de cet antiport est donc mesurable (e.g. Vasilets & Schwarz, 1992). Le rôle de cette ATPase est d'entretenir les gradients ioniques de $Na^+$ et de $K^+$ de part et d'autre de la membrane.
2) **ATPase $Ca^{2+}$**, c'est un uniport qui transporte 2 $Ca^{2+}$ par ATP hydrolysé, il est électrogène. Son rôle est de maintenir basse la concentration de $Ca^{2+}$ du cytosol en transportant le $Ca^{2+}$ dans le réticulum endoplasmique.
3) **ATPase $H^+$**, uniport qui permet l'acidification des lysosomes et de l'estomac, il est électrogène.

Dans un transport actif secondaire l'apport d'énergie est fourni par la décharge du gradient chimique d'un autre composé.

*Exemple*: **Pompe à glucose**, symport électrogène présent dans les cellules intestinales, permet le passage du glucose grâce au gradient de $Na^+$.

**3) Diffusion facilitée**
Les composés traversent la membrane en suivant leur gradient de concentration, c'est à dire par diffusion simple. La protéine améliore le passage de certains composés en interagissant avec eux, le système est saturable (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

*Exemples*: 1) **Gramicidine A**, transport de cations monovalents en symport.
2) **Canaux ioniques**, ces transporteurs présentent une très grande diversité, ils permettent le passage des ions au travers de la membrane grâce à un pore hydrophile, ils font l'objet de la présente étude.

Le fonctionnement des canaux ioniques est basé sur l'existence de potentiels d'équilibre et sur la loi de Nernst.

## I-A-3 Modèle électrique des membranes biologiques

Toutes les notions définies pour les électrons peuvent être appliquées aux particules chargées que sont les ions et qui peuvent circuler de part et d'autre des membranes biologiques (forte résistance) aux travers des canaux ioniques (forte résistance pour les canaux fermés et faible résistance pour les canaux ouverts).

Le courant ionique I ou i (exprimé généralement en µA, nA ou pA) représente le "débit" des ions circulant de part et d'autre d'une membrane. Par convention, des cations ($K^+$, $Ca^{2+}$, $Na^+$) entrant dans une cellule représentent un **courant négatif**, et des cations sortant de la cellule un **courant positif**, et inversement pour les anions ($Cl^-$).

Le potentiel électrique V représente la quantité de charges en un point, c'est à dire le bilan global en quantité de charges portées par les ions positifs et négatifs. Par convention le potentiel du milieu externe $V_{ext}$ est pris comme référence, la différence de potentiel transmembranaire $E_m$ (exprimé en mV) est donc donné par la relation :

$$E_m = V_{int} - V_{ext}$$

Avec $V_{int}$, potentiel du milieu interne de la cellule.

Une cellule au repos est caractérisée par un excès de charges négatives à l'intérieur par rapport à l'extérieur. Le potentiel transmembranaire $E_m$ est donc négatif, on dit que la cellule est polarisée. Si le potentiel devient plus négatif la cellule est dite hyperpolarisée, si le potentiel devient plus positif la cellule est dépolarisée.

La notion de résistance membranaire R ou $R_m$ (exprimé en MΩ ou GΩ) d'une membrane traduit l'opposition au passage des ions. La résistance membranaire spécifique $R_M$ est la résistance par unité de surface de membrane (exprimé en $\Omega.cm^2$). Inversement, la notion de conductance membranaire g ou γ (exprimé en µS, nS ou pS) traduit la facilitation du passage des ions. Les deux sont reliés par la relation : $R = 1/g$.

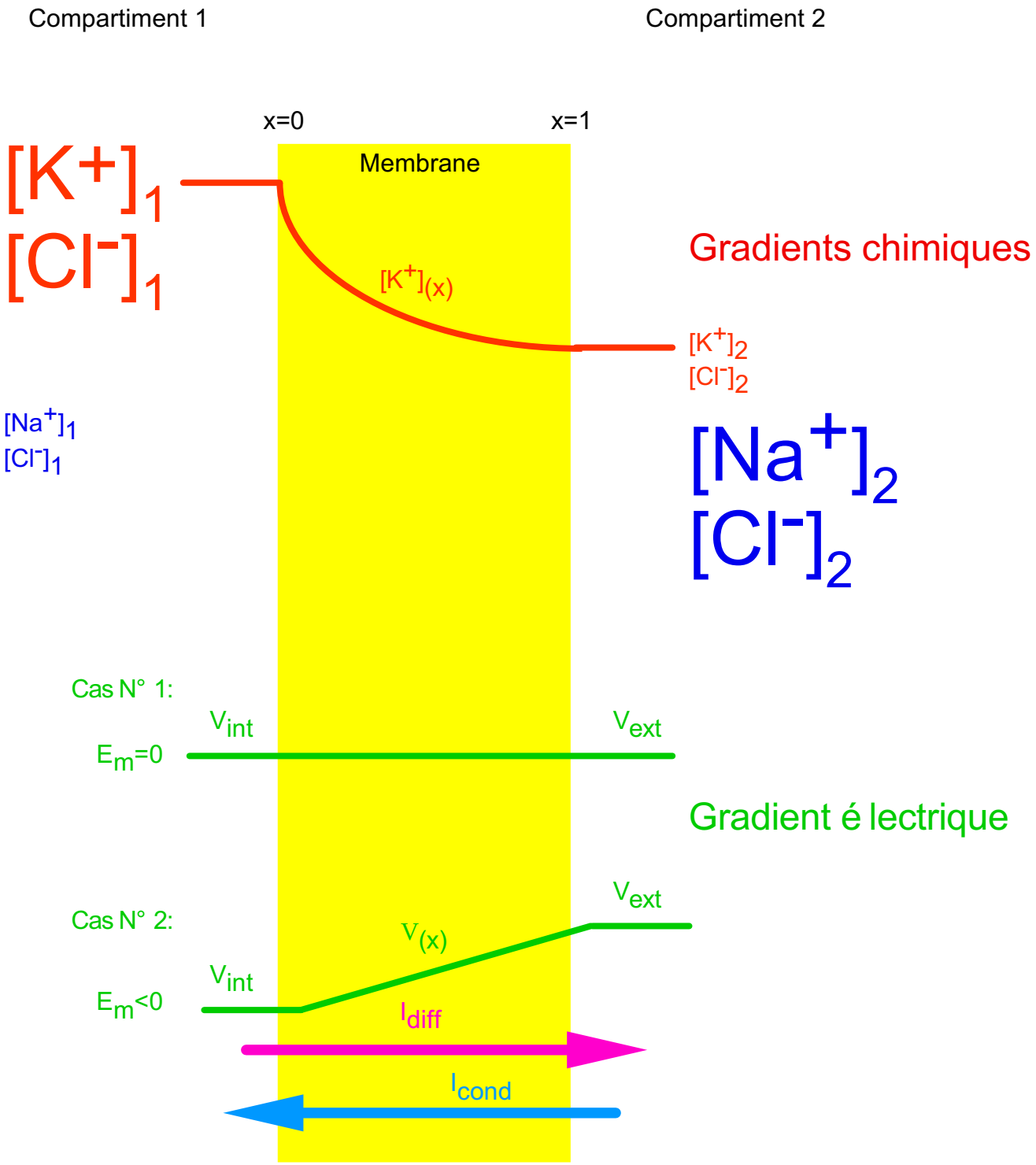
La loi d'ohm relie le potentiel, le courant et la résistance : $E_m = R.I$

et respectivement $I = g.E_m$

Chaque charge électrique produit un champ électrique qui va interagir avec les charges présentes dans ce champ, cela se traduit par une force inversement proportionnelle au carré de la distance, dont le signe dépend du sens du champ et du signe de la charge subissant l'effet. Ceci se traduit par le fait que deux charges de même signe se repoussent et que deux charges de signe contraire s'attirent. Un gradient de charges (une différence de potentiel) produit un champ électrique que l'on considère comme homogène.

La notion de capacité C (exprimé en farads F) traduit la faculté de certains éléments d'accumuler des charges. Une capacité est composée d'une fine couche très résistante (isolant) séparant deux conducteurs sur une surface assez importante. Les charges positives et négatives peuvent s'accumuler dans chaque conducteur car elles s'attirent mutuellement au travers de la surface résistante grâce au champ électrique produit. La capacité membranaire C (exprimé en pF) traduit la

Figure 24: Électrodiffusion dans une membrane



faculté des membranes d'accumuler des charges. La capacité membranaire spécifique $C_M$ est la capacité par unité de surface de membrane (exprimé en µF/cm$^2$).

# I-A-4 Potentiel d'équilibre - Loi de Nernst

## *I-A-4-a Modèle de l'électrodiffusion*

Ce modèle est le point de départ de la quantification des phénomènes d'électrodiffusion, il repose sur plusieurs hypothèses:

- La membrane est considérée comme un milieu homogène dans lequel les ions se partitionnent instantanément depuis les solutions extra- et intracellulaires.
- Les ions traversent la membrane de façon indépendante, c'est à dire sans interagir les uns avec les autres.
- Le champ électrique au travers de la membrane est constant.

Le potentiel et la concentration de l'ion au sein de la membrane suivent les profils indiqués dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**.

Soit deux compartiments liquidiens séparés par une membrane avec des milieux de composition différentes, proches des milieux interne (compartiment 1) et externe (compartiment 2) d'une cellule. L'électroneutralité est respectée dans chaque compartiment, ils ont chacun un potentiel électrique nul car les charges positives ($Na^+$, $K^+$) sont compensées par les charges négatives ($Cl^-$) (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ensuite nous avons plusieurs possibilités:

Cas N°1: La membrane est imperméable aux ions, le bilan net des charges de part et d'autre de la membrane, c'est à dire le potentiel transmembranaire, est nul.

Cas N°2: Si un transporteur ne laissant passer que le potassium est présent dans la membrane, un canal potassique ouvert en permanence par exemple, les ions potassiques vont diffuser selon leur gradient chimique. Ce flux d'ions est appelé courant de diffusion, $I_{diff}$. Les autres ions ne pouvant pas traverser la membrane, il se développe alors un excès de charges négatives sur la face 1 de la membrane et un excès de charges positives sur la face 2, c'est à dire à un gradient de charges qui produit un mouvement d'ions $K^+$ en sens inverse, c'est le courant de conduction, $I_{cond}$. Le courant global d'ions traversant la membrane est la somme de ces deux courants:

$$I_{K^+} = I_{diff} + I_{cond}$$

Ce courant est décrit par l'équation de l'électrodiffusion de Nernst - Planck (Hille, 1992) :

$$I_{ion} = -z.F.D.\left(\frac{d[ion]}{dx} + \frac{F.z.[ion]}{RT}.\frac{dV}{dx}\right) \qquad \textbf{Équation 1}$$

Avec: $I_{ion}$: densité de courant de l'ion (A/cm$^2$)
z: valence de l'ion
F: constante de Faraday (9,648.10$^4$ C)
D: coefficient de diffusion de l'ion (cm$^2$/s), voir le Tableau 2
$[Ion]_{(x)}$: concentration de l'ion à la distance x (M)
x: distance dans le pore (cm)
R: constante des gaz parfaits (8,315 J.K$^{-1}$.mole$^{-1}$) (1 J = 1 V.C)
T: température absolue (°K = °C + 273,16)

$V_{(x)}$: potentiel à la distance x (V)

**Tableau 2: Coefficient de diffusion de quelques ions à 25°C.**

| Ion | D ($10^{-5}$ $cm^2/s$) |
|---|---|
| $Na^+$ | 1,33 |
| $K^+$ | 1,96 |
| $Rb^+$ | 2,07 |
| $Cs^+$ | 2,06 |
| $TMA^+$ | 1,19 |
| $TEA^+$ | 0,87 |
| $Mg^{2+}$ | 0,71 |
| $Ca^{2+}$ | 0,79 |
| $Ba^{2+}$ | 0,85 |
| $Cl^-$ | 2,03 |

(Hille, 1992)

Tant que les deux gradients chimique et électrique sont différents, c'est à dire que le **gradient électrochimique** n'est pas nul, il y a passage d'ions potassium, c'est à dire un courant ionique potassique. On aboutit à un équilibre où le gradient chimique et le gradient électrique sont égaux et opposés, soit un gradient électrochimique nul, d'où un courant ionique nul. A l'équilibre, la valeur du gradient électrique est appelée le potentiel d'équilibre de l'ion $K^+$, $E_{K^+}$.

## *I-A-4-b Énoncé de la loi de Nernst*

Le potentiel d'équilibre d'un ion ne dépend que de la nature de l'ion et des concentrations de part et d'autre de la membrane, il est défini par la loi de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{R.T}{z.F}.Ln\frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{\text{int}}} \qquad \textbf{Équation 2}$$

(pour les anions $[Ion]_{ext}$ et $[Ion]_{int}$ sont inversées)

Cette équation correspond à l'équation 1 avec $I_{ion} = 0$.

Si z = +1 et à 20°C on peut simplifier l'équation en :

$$E_{ion} = 58.\log\frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{\text{int}}} \qquad \textbf{Équation 3}$$

Le Tableau 3 présente des exemples de potentiels d'équilibres pour quelques ions.
Remarques : d'après cette équation, (i) le potentiel d'équilibre d'un ion doit être nul lorsque $[Ions]_{ext}$ et $[Ions]_{int}$ sont égales, (ii) le potentiel d'équilibre varie de 58 mV par décade du log $[Ions]_{ext}$ .

**Tableau 3: Exemple de concentrations en ions (en mM) dans les milieux interne et externe et potentiels d'équilibre correspondants.**

| | Interne | Externe | $E_{ion} = 58 \log [Ion]_{ext} / [Ion]_{int}$ |
|---|---|---|---|
| $Na^+$ | 14 | 140 | + 58 mV |
| $K^+$ | 160 | 3 | - 100 mV |
| $Ca^{++}$ | $10^{-4}$ | 1 | + 232 mV |
| $Cl^-$ | 14 | 150 | - 60 mV |

Nota: pour les ions $Cl^-$, le rapport des concentrations est inversé.

### *I-A-4-c Implications de la Loi de Nernst*

La loi de Nernst est fondamentale en physiologie des canaux ioniques car lorsque des canaux sont ouverts le potentiel transmembranaire tend vers le potentiel d'équilibre de l'ion correspondant. Ainsi, les canaux potassiques entraînent le potentiel transmembranaire vers des valeurs négatives polarisantes et les canaux calciques et sodiques vers des valeurs positives dépolarisantes. Par conséquent en régulant l'ouverture et la fermeture des canaux présents sur sa membrane, c'est à dire par des modifications biochimiques des protéines canal, une cellule peut faire varier son potentiel de membrane sur une gamme d'environ 150 mV. L'exemple type est l'état de repos polarisé de la plupart des cellules qui est du à la présence de canaux potassiques ouverts.

### *I-A-4-d Courants ioniques*

Nous avons vu, au chapitre I-A-4-a (page 8), qu'un gradient électrochimique se traduit par un courant ionique (en présence de canaux ioniques ouverts). En effet, un potentiel membranaire plus négatif que le potentiel d'équilibre d'un ion a tendance à faire entrer les cations (sortir les anions) et un potentiel plus positif fait sortir les cations (entrer les anions). Un potentiel membranaire égal au potentiel d'équilibre d'un ion aboutit à un flux net nul. Le modélisation de ce phénomène est dû à Goldman (Goldman, 1943) et à Hodgkin et Katz (Hodgkin & Katz, 1949) et est basée sur le modèle de l'électrodiffusion.

### *I-A-4-e Équations de Goldman-Hodgkin-Katz*

Les équations de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) reposent sur plusieurs hypothèses déjà utilisées dans le modèle de l'électrodiffusion :

- La membrane est homogène.
- Les ions se partitionnent instantanément dans la membrane depuis les solutions externes et internes.
- Les ions traversent la membrane indépendamment les uns des autres.
- Le champ électrique est constant au travers de la membrane.

Ceci aboutit à la relation courant-voltage ou <u>équation de courant</u> de Goldman-Hodgkin-Katz et à l'<u>équation de potentiel</u> pour plusieurs ions de GHK.

<u>L'équation de courant de GHK</u> indique que le courant porté par des ions (de même nature) est le produit de leur perméabilité par une fonction non linéaire du potentiel:

Figure 25: Principe d'une mesure en potentiel imposé

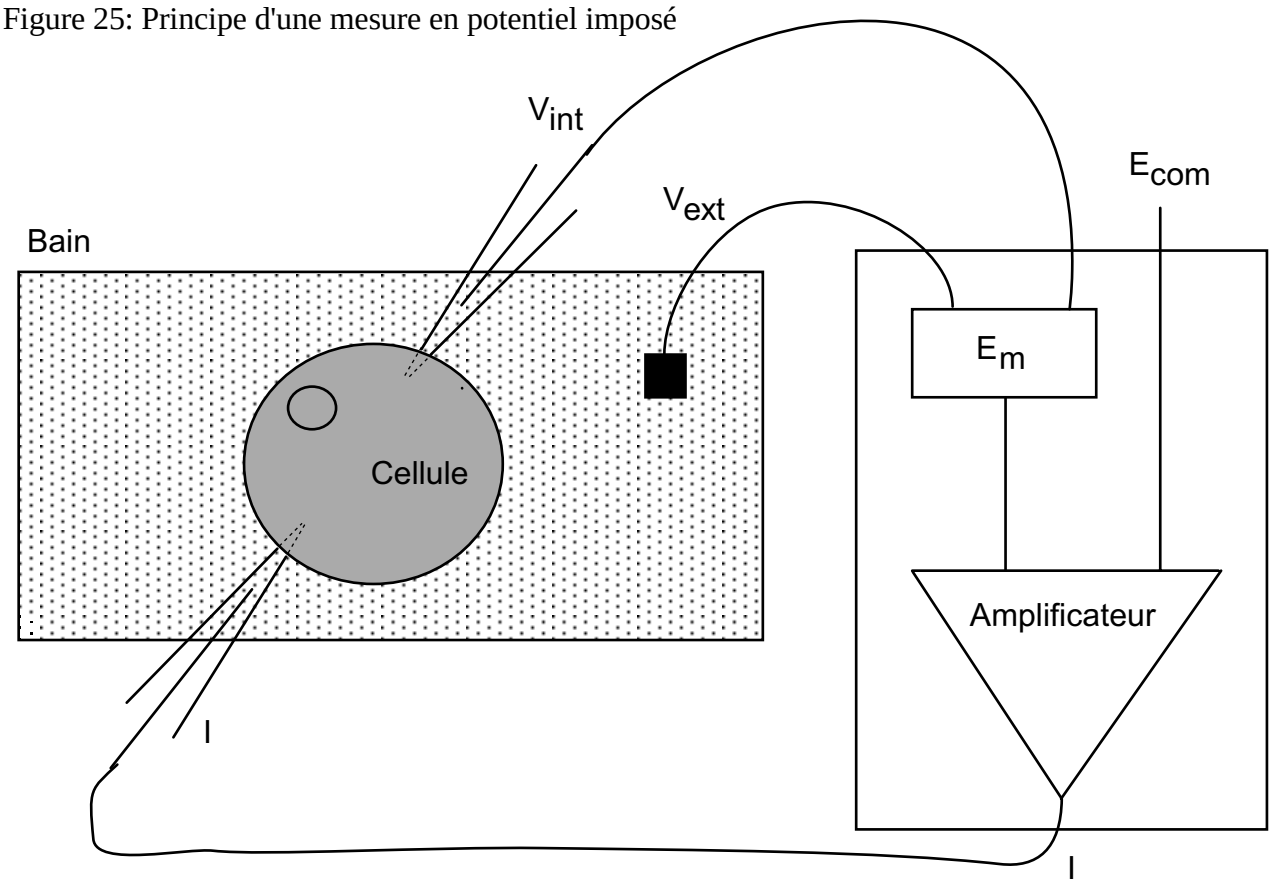
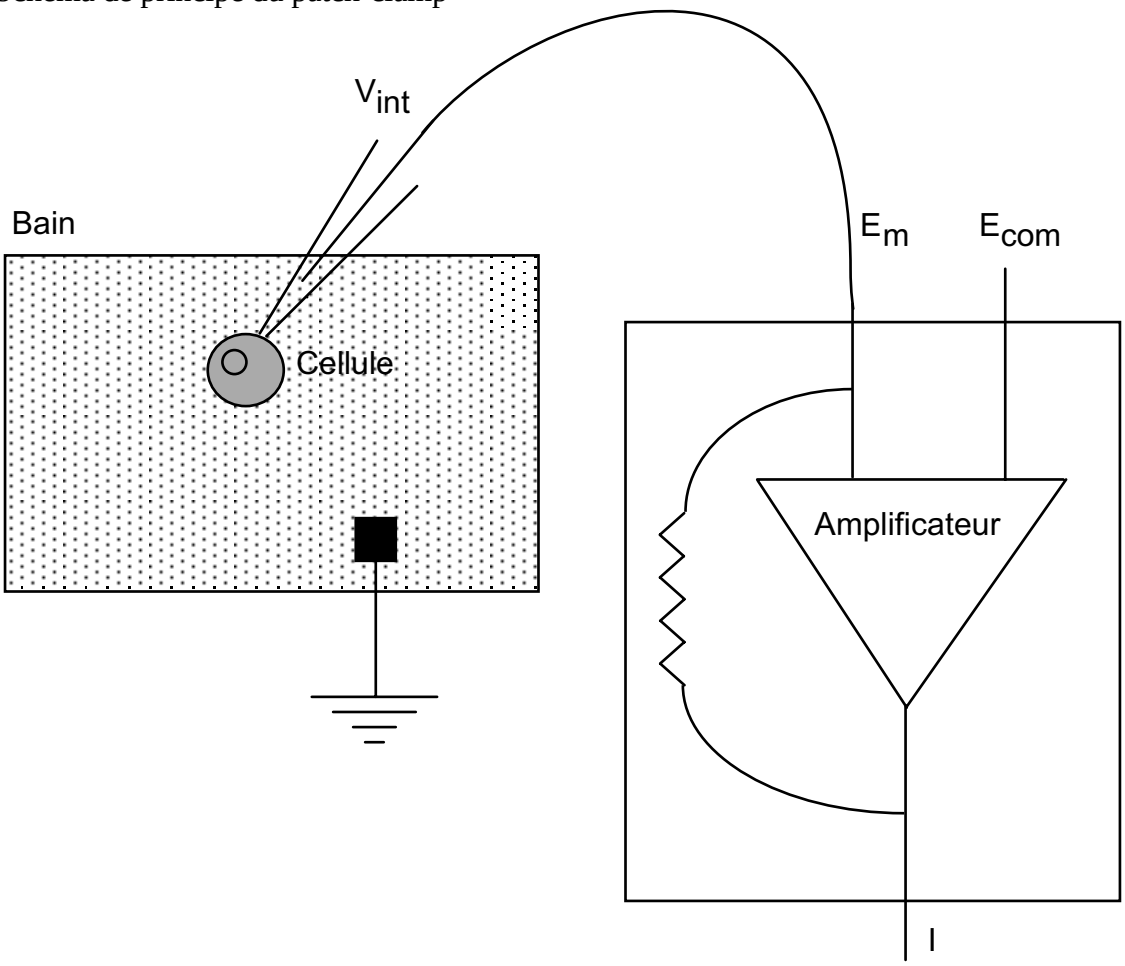



Figure 26: Schéma de principe du patch-clamp



$$I_{ion} = P_{ion}.z^2.\frac{E_m.F^2}{R.T}.\frac{[ion]_{\text{int}} - [ion]_{ext}.\exp(-z.{}^{E_m.F}\!/_{R.T})}{1-\exp(-z.{}^{E_m.F}\!/_{R.T})}$$ **Équation 4**

Avec: $I_{ion}$: courant de l'ion (A)
z: valence de l'ion (sans dimension)
[Ion]: concentrations de l'ion à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (M)
F: constante de Faraday ($9{,}648.10^4$)
R: constante des gaz parfaits ($8{,}315\ J.K^{-1}.mole^{-1}$)
T: température absolue (°K)
$P_{ion}$: perméabilité de la membrane pour l'ion (cm/s) avec $P_{ion} = D.\beta/l$:
D: coefficient de diffusion de l'ion ($cm^2/s$), voir le Tableau 2, page 9.
β: coefficient de partition eau/membrane de l'ion (sans dimension)
l: épaisseur de la membrane (cm)

Cette équation permet de calculer la perméabilité absolue d'un ion au travers d'une membrane.

L'équation de potentiel de GHK indique le potentiel d'inversion de la membrane en présence de plusieurs conductances, c'est à dire le potentiel pour lequel le courant net est nul (toutes les conductances s'annulent). Si les ions perméants sont le potassium, le sodium et le chlore, l'équation est:

$$E_{inv} = \frac{R.T}{F}.\ln\frac{P_{K^+}[K^+]_{ext} + P_{Na^+}[Na^+]_{ext} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{\text{int}}}{P_{K^+}[K^+]_{\text{int}} + P_{Na^+}[Na^+]_{\text{int}} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{ext}}$$ **Équation 5**

Cette équation permet de calculer des rapports de perméabilité entre deux ions.

# I-A-5 Voltage imposé

La loi d'ohm $E_m=R_m.I$ est centrale.

Si l'on impose un potentiel $E_m$ et que l'on mesure un courant I on en déduit facilement la résistance $R_m$ qui traduit l'activité des canaux, c'est la base de la technique de potentiel imposé.
La technique de potentiel imposé est attribuable à Cole, Hodgkin et Huxley (Cole & Curtis, 1938; Hodgkin & Huxley, 1952).
Pour pouvoir imposer un potentiel transmembranaire (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), il faut :

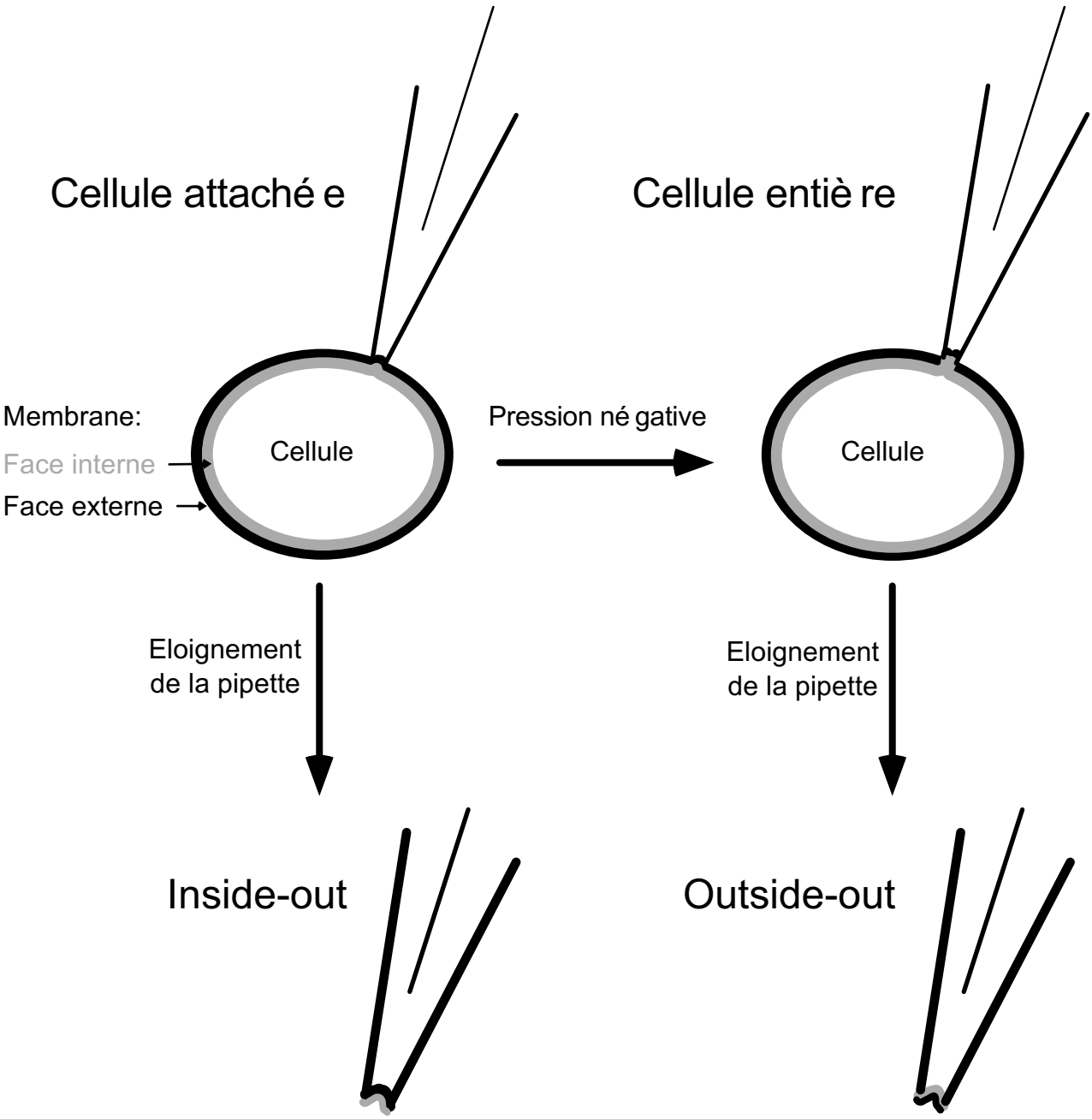
1) Un accès à l'intérieur de la cellule pour pouvoir mesurer le potentiel transmembranaire $E_m$ et pour pouvoir injecter un courant, d'où l'utilisation d'une microélectrode ou d'une pipette.
2) Un potentiel de commande choisi par l'expérimentateur $E_{com}$.
3) Un appareil capable de comparer $E_m$ et $E_{com}$ et d'injecter le courant nécessaire pour que $E_m$ soit maintenu à une valeur aussi proche que possible de $E_{com}$, ce sont les amplificateurs.

# I-A-6 Double microélectrodes

## *I-A-6-a Schéma de principe*

Le potentiel membranaire est mesuré à l'aide d'une première microélectrode intracellulaire et d'une microélectrode extracellulaire présente dans le bain (référence). Une seconde microélectrode intracellulaire permet d'injecter un courant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Figure 27: Configurations du patch-clamp



### *I-A-6-b Avantages et inconvénients*

La technique de double microélectrodes permet d'imposer un potentiel à une cellule de grande dimension (près de 1 mm de diamètre pour un ovocyte) et d'enregistrer de grands courants (de l'ordre de plusieurs µA) avec peu de bruit. Elle est relativement facile à mettre en œuvre et ne coûte pas très cher.
L'inconvénient majeur est qu'il y a lésion de la cellule d'où l'impossibilité d'utiliser cette technique sur de petites cellules et sur les préparations fragiles. Les courants enregistrés ne sont que des courants globaux et le milieu interne de la cellule est peu ou pas contrôlé.

## I-A-7 Patch-clamp

L'amélioration des amplificateurs à permis d'utiliser la même électrode ou pipette pour mesurer un potentiel et imposer un courant sur des petites préparations (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). La technique du patch-clamp à value un prix Nobel à Edwin Neher et Bertil Sakmann (Hamill *et al.*, 1981). Le principe est basé sur la propriété des pipettes en verre de coller aux membranes biologiques formant ainsi une zone de très forte résistance ("gigaseal") qui isole électriquement la portion de membrane ("patch") présente sous la pipette. Pour obtenir le "gigaseal" plusieurs astuces sont utilisées : arrondissement de la pipette à l'aide d'une microforge, utilisation d'huile minérale, légère aspiration, etc. .

Plusieurs configurations peuvent être utiliser en patch clamp (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).
Lorsque la pipette est collée sur la membrane c'est la configuration cellule-attachée ("cell-attached"). Si l'on éloigne la pipette de la membrane on obtient la configuration "inside-out" avec la face interne de la membrane dans le bain.
A partir de la configuration cellule-attachée on peut rompre la membrane sous la pipette par aspiration et l'on obtient la configuration cellule-entière ("whole-cell") à partir de laquelle on peut réaliser un "outside-out" si l'on éloigne la pipette de la membrane.
Les configurations "inside-out" et "outside-out" sont regroupées sous l'appellation patch excisé. La révolution provoquée en électrophysiologie par cette technique est due au fait qu'elle permet d'enregistrer des courants unitaires, c'est à dire le courant traversant un seul canal.
Le patch perforé, est obtenu à partir de la configuration cellule attachée en ajoutant dans la pipette un antibiotique (nystatine, amphotericine B) qui va former des canaux dans les membranes contenant du cholesterol ou de l'ergostérol. Ceci permet un accès électrique à l'intérieur de la cellule, de plus les molécules de masse supérieure au glucose ne sont pas perméantes et les ions multivalents tels le $Ca^{2+}$ sont peu ou pas perméants (Axon, 1993).

Les avantages et inconvénients de chaque configuration sont résumés dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Avantages et inconvénients des configurations du patch-clamp.**

| Configurations | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|
| ***Cellule-attachée*** | - Milieu interne de la cellule conservé<br>- Mesure de courant unitaire | - Potentiel transmembranaire inconnu<br>- Milieu interne non contrôlé |
| ***Patch excisé*** | - Milieux interne et externe parfaitement contrôlés<br>- Mesure de courant unitaire | - Perte d'éventuels facteurs régulateur du canal |
| ***Cellule-entière*** | - Milieu externe parfaitement contrôlé<br>- Milieu interne relativement bien contrôlé<br>- Mesure d'un courant global | - Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal |
| ***Patch perforé*** | - Cellule moins abîmée<br>- Milieu interne de la cellule préservé<br>- Mesure d'un courant global<br>- Milieu externe parfaitement contrôlé | - La perforation est lente<br>- Mise au point nécessaire pour certaines cellules<br>- Milieu interne non contrôlé |

Figure 28: Modèle de fonctionnement des canaux ioniques

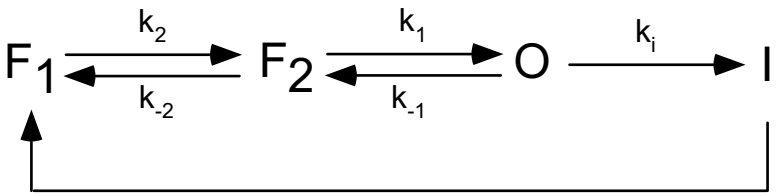
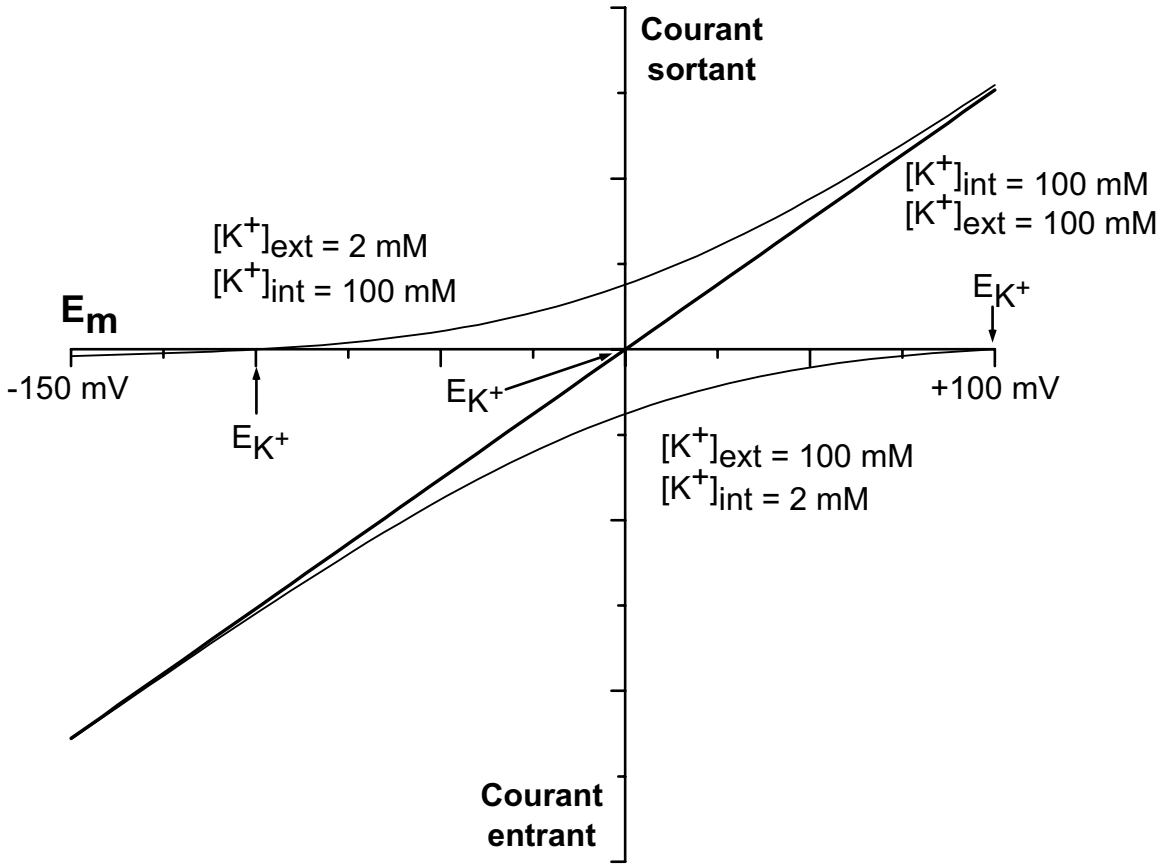



Figure 29: Courbes I-V des courants de fond ($I_{GHK}$)



Propriétés biophysiques d'un courant ionique
Pour décrire les propriétés biophysique d'un courant ionique plusieurs paramètres sont étudiés en potentiel imposé, soit sur le courant global, soit sur le courant unitaire. Nous ne présenterons que les caractéristiques des canaux potassique sachant que la plupart de ces principes sont valables pour les autres canaux ioniques.
NOTA: Les descriptions et les schémas de ce chapitre sont des modèles théoriques qui permettent de simplifier la présentation de ces notions.

Le modèle classique de fonctionnement des canaux ioniques décrit trois états (Hille, 1992):
- État fermé (F): le canal est fermé, il n'y a pas de courant, mais il peut être ouvert par un stimulus approprié. Il y a souvent plusieurs états fermé en cascade ce qui induit un délai avant d'atteindre l'état ouvert.
- État ouvert (O): le canal est ouvert et laisse passer un courant, il peut passer dans un état fermé ou bien dans un état inactivé.
- État inactivé (I): le canal est fermé, il n'y a pas de courant, cet état suit l'état ouvert. Le canal doit passer dans un état fermé avant de pouvoir être activé de nouveau.

Les passages entre les différents états dépendent ou non du potentiel et du temps selon les constantes de vitesse k (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), c'est cette dépendance qui est quantifiée dans l'étude biophysique.
Nous allons voir les différents paramètres biophysiques mesurés lors de notre étude avec les relations courant-potentiel, les relations courant-temps, les notions de réactivation, déactivation et inactivation et l'analyse du courant unitaire. Ce survol des propriétés est réalisé sur trois familles de courant $K^+$: les courants de fond, les courants à rectification sortante et ceux à rectification entrante.

## *I-A-7-a Relation courant-potentiel (I-V)*

Elle indique si le canal n'obéit qu'aux lois de l'électrodiffusion ou bien si il y a une diffusion facilitée (augmentation de la conductance). Les relations courant-potentiel sont la représentation des courants I obtenus lors de variations de potentiel membranaire E en voltage clamp. D'après la loi d'Ohm (chapitre I-A-3, page 6) la pente de la courbe I-V est égale à la conductance du canal. La relation I-V, en potassium symétrique, indique si le canal est voltage-dépendant, c'est à dire si sa conductance varie selon le potentiel ce qui implique un mécanisme voltage-dépendant de régulation du courant, intrinsèque au canal.

### *I-A-7-a-i Courants de fond*

L'équation de courant de GHK (voir chapitre I-A-4-e, page 10) permet de tracer la courbe courant-potentiel de ces canaux qui n'obéissent qu'à la loi de l'électrodiffusion (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Nous voyons que lorsque les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane sont identiques, le canal se comporte comme une résistance ohmique avec une relation I-V linéaire. Ces canaux ne sont pas voltage-dépendant. Notons qu'une différence de concentration entre les deux faces de la membrane se traduit par une différence entre les flux de courant entrant et sortant, d'où un courant sortant supérieur au courant entrant ou inversement.

Figure 30: Courbes I-V des courants $K^+$ à rectification entrante (Iinward)

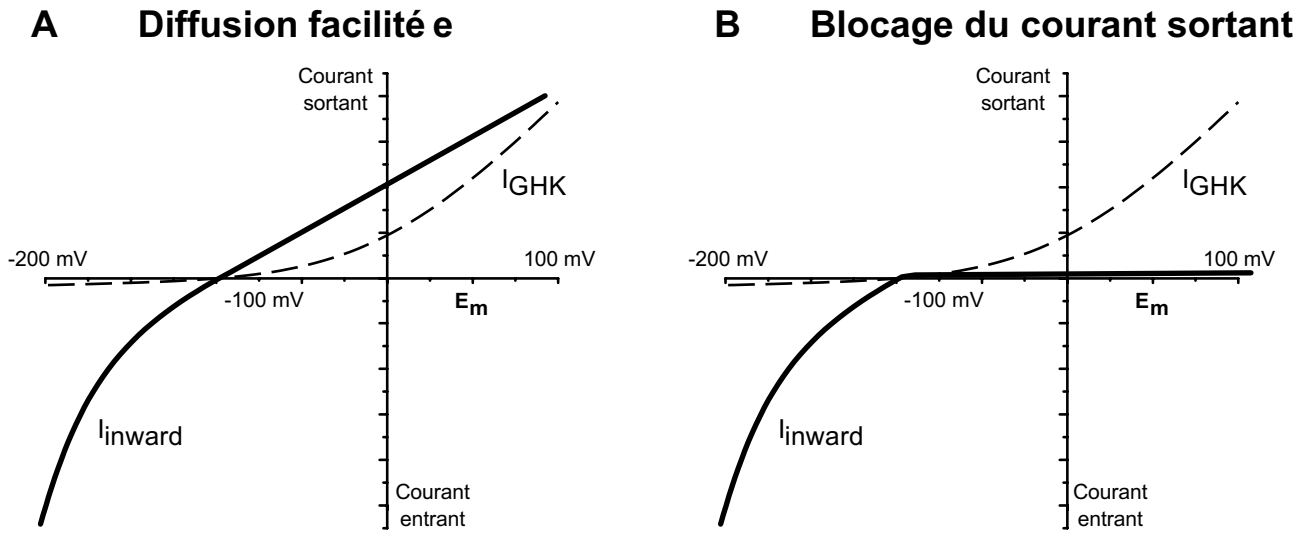
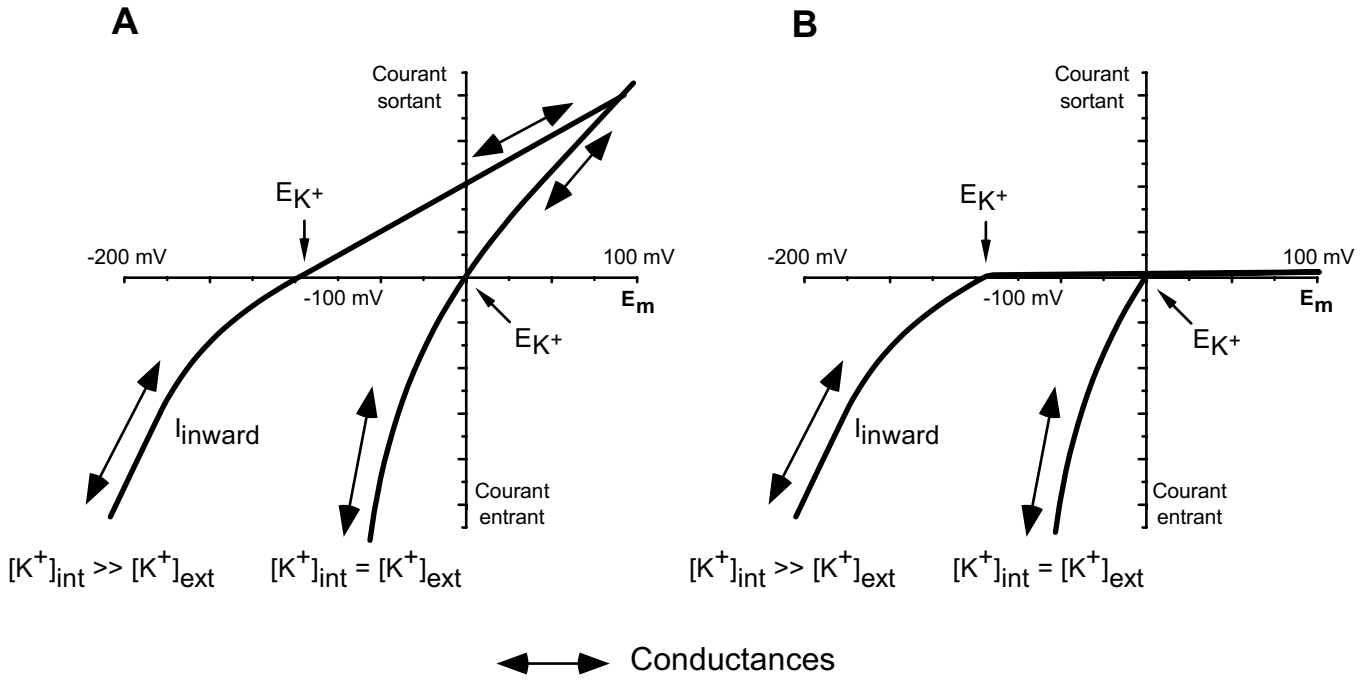



Figure 31: Effet de $[K^+]$ext sur les courants $K^+$ à rectification entrante (Iinward)



### *I-A-7-a-ii Courants $K^+$ à rectification entrante*

Certains canaux favorisent le passage des ions dans le sens entrant au détriment du sens sortant, ceci est appelé la rectification entrante. La rectification est due à deux phénomènes:

1) Il y a augmentation du passage des ions, principalement dans le sens entrant, c'est à dire une diffusion facilitée par rapport à un courant de type GHK (voir I-A-4-e, page 10) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A).
2) Un mécanisme de blocage empêche ou diminue le passage des ions dans le sens sortant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**B).

Le mécanisme principal de blocage du courant sortant n'est pas intrinsèque au canal (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, page **Erreur ! Signet non défini.**), ainsi ces canaux ne sont pas voltage-dépendant au sens strict du terme.

Une autre caractéristique des canaux $K^+$ à rectification entrante est l'augmentation de leur conductance en fonction de la concentration en potassium externe (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

### *I-A-7-a-iii Courants $K^+$ à rectification sortante*

Inversement, certains canaux facilitent la sortie des ions, ils présentent une rectification sortante. Ceci est caractérisé par une augmentation de la conductance dans le sens sortant (diffusion facilitée) et par un seuil d'activation. Ce seuil à partir duquel le canal s'ouvre nécessite un mécanisme intrinsèque sensible au potentiel , ces canaux sont voltage-dépendant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A).
On peut tracer la courbe d'activation en représentant la conductance g (= I / $E_m$-$E_K$) en fonction du potentiel. Cette courbe est fittée par une loi de Boltzman de la forme:

$$g = g_{max} - \frac{g_{max}}{1 + e^{\frac{Em - E_{1/2acti}}{k_{acti}}}} \qquad \textbf{Équation 6}$$

On obtient le potentiel de demi-activation $E_{1/2acti}$ et le facteur de pente $k_{acti}$ (en mV).

Si le potentiel d'inversion $E_{K+}$ est supérieur au seuil d'activation (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** B) il peut y avoir un courant entrant pour certains canaux, d'autres ne laissent strictement passer que des courants sortant

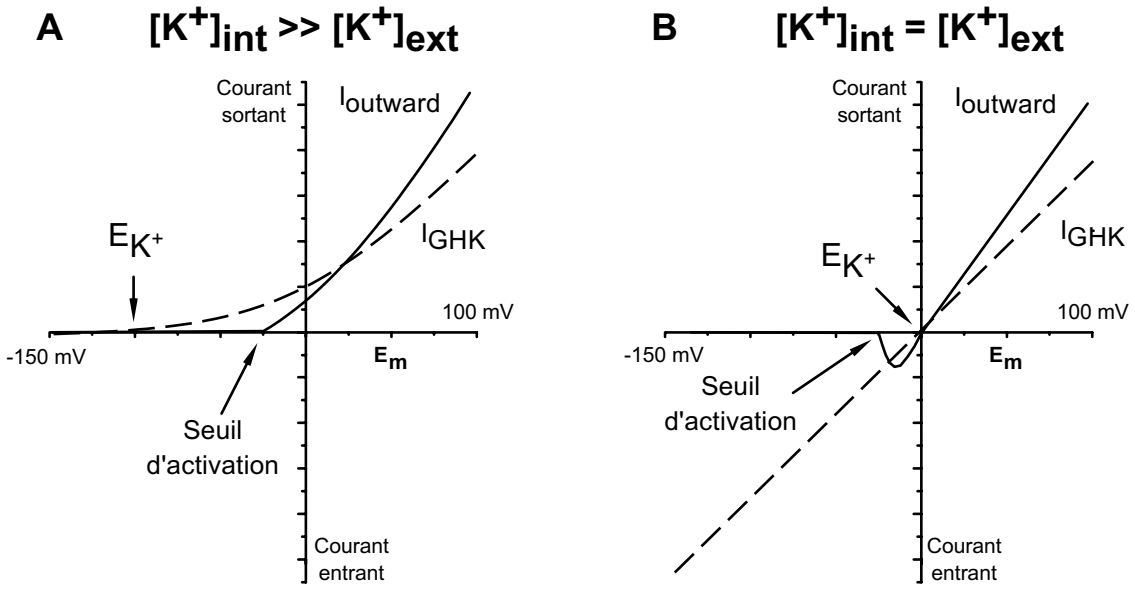
## *I-A-7-b Relation courant global - temps*

Les figures représentent des enregistrements de courant théoriques obtenus avec des variations de potentiel membranaire $E_m$ en voltage imposé. Les variations de courant en fonction du temps peuvent être approchées par des équations mathématiques ("fit"), en général une ou plusieurs exponentielles, ce qui permet d'obtenir des constantes de temps pour quantifier ces variations.

### *I-A-7-b-i Courants de fond*

Les courants de fond sont caractérisés par des cinétiques d'activation très rapide (non résolues par les techniques de mesure actuelle) et par l'absence d'inactivation (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A).

Figure 32: Courbes I-V des courants $K^+$ à rectification sortante (Ioutward)



### *I-A-7-b-ii Courants à rectification entrante*

Les canaux à rectification entrante ont des activations rapides ou très rapides (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** B) et présentent parfois une inactivation lente non voltage dépendante (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** C). On peut mesurer des constantes de temps d'activation $\tau_{acti}$ et des constantes de temps d'inactivation $\tau_{inac}$.

### *I-A-7-b-iii Courants à rectification sortante*

Les canaux à rectification sortante présentent une grande variété de cinétiques d'activation, avec des activations rapides, lentes ou retardées (il y a un délai entre la stimulation et le début de l'activation). On mesure des constantes de temps d'activation $\tau_{acti}$ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A et B).

La notion de déactivation traduit le temps nécessaire pour que les canaux ouverts se referment après l'arrêt de la stimulation. Les courants de déactivation sont également appelé des courants de queue, ils sont plus ou moins rapide (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A et B). On mesure des constantes de temps de déactivation.

Les canaux à rectification sortante présentent soit aucune inactivation, soit une inactivation rapide ou lente (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A et B).

(voir les revues de Deal *et al.*, 1996; Jan & Jan, 1997)

## *I-A-7-c Inactivation et réactivation des courants globaux*

Pour décrire la dépendance de l'inactivation vis à vis du potentiel on trace des courbes d'inactivation qui décrivent le rapport canaux activables / canaux inactivés pour chaque potentiel à l'état stable. Ces courbes sont obtenues en appliquant un prepulse d'amplitude variable et assez long pour atteindre l'état stable de l'inactivation puis un pulse test toujours au même potentiel. La courbe représente les courants obtenus lors du pulse test en fonction du potentiel du prepulse correspondant, c'est à dire la quantité de canaux encore activable à la fin du prepulse. Les courants sont normalisés (courant I à un potentiel $E_m$ donné sur le courant maximum obtenu $I_{max}$) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cette courbe est fittée par une loi de Boltzman de la forme:

$$I = \frac{I_{max}}{1 + e^{\frac{Em - E_{1/2inac}}{k_{inac}}}} \qquad \textbf{Équation 7}$$

On obtient le potentiel de demi inactivation $E_{1/2inac}$ et le facteur de pente $k_{inac}$ (en mV).

La notion de réactivation traduit le temps nécessaire pour que les canaux à l'état inactivé repassent à l'état activable (état fermé). On représente le rapport courant obtenu lors d'une première stimulation (pulse 1) divisé par le courant obtenu lors d'une deuxième stimulation (pulse 2) en fonction du temps séparant les deux stimulations (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). On fit cette courbe avec une exponentielle qui permet d'obtenir le temps de demi-réactivation $\tau_{½réac}$. Ceci permet de connaître le temps minimum nécessaire pour pouvoir restimuler tous les canaux présents.

Figure 33: Cinétique des courants $K^+$ de fond ($I_{fond}$) et à rectification entrante ($I_{inward}$)

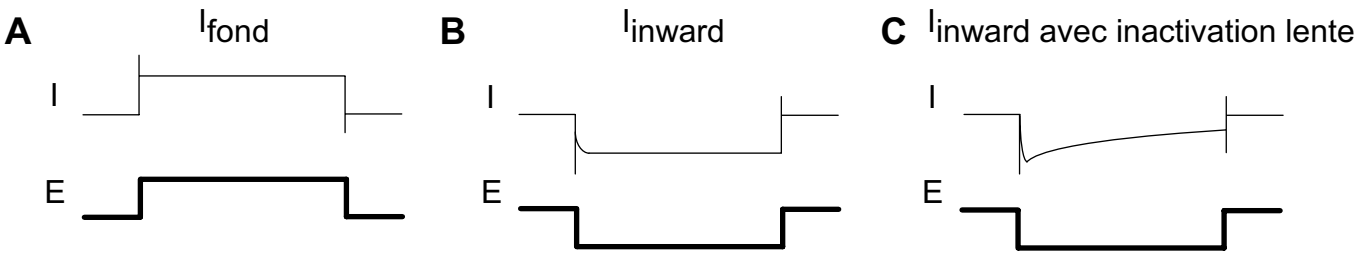



Figure 34: Cinétiques des courants $K^+$ à rectification sortante

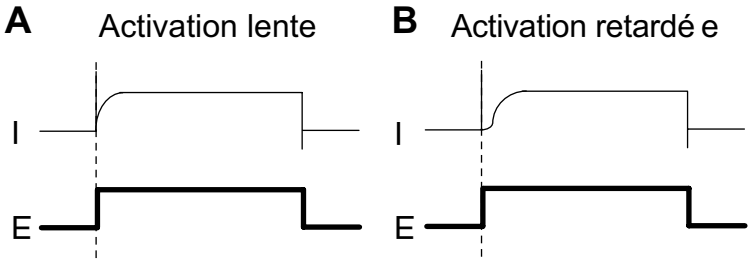



Figure 35: Déactivation des courants $K^+$ à rectification sortante

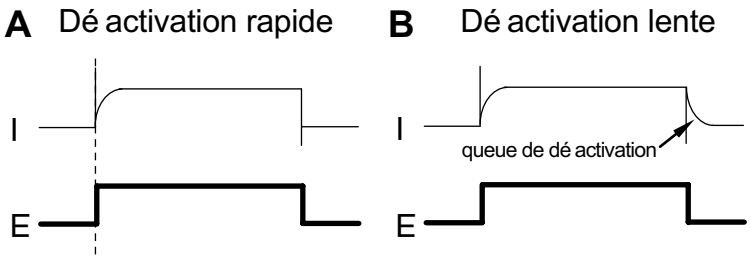
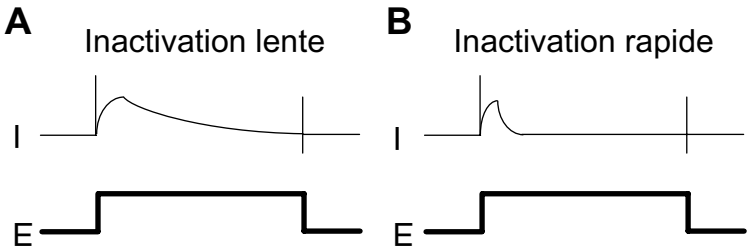



Figure 36: Inactivation des courants $K^+$ à rectification sortante



### *I-A-7-d Analyse du courant unitaire*

On définit le courant unitaire $i_{ion}$ traversant un seul canal ouvert et la conductance unitaire $\gamma_{ion}$ d'un seul canal ouvert.
Par extension, lorsque l'on enregistre plusieurs centaines ou milliers de canaux en même temps, le courant global $I_{ion}$ dépend du nombre N de canaux et de la probabilité d'ouverture $P_O$ de ces canaux. Ceci traduit l'aspect probabiliste de l'analyse des canaux ioniques, en effet il est impossible de savoir si à un instant t un canal sera ouvert ou fermé quel que soit les conditions expérimentales utilisées, nous pouvons par contre déterminer la probabilité du canal d'être ouvert à l'instant t.
Les courants globaux et unitaires dépendent intimement du gradient électrochimique ($E_m$ - $E_{ion}$), et tous ces paramètres sont reliés par les équations suivantes qui découlent de la loi d'Ohm:

$$i_{ion} = \gamma_{ion} \cdot (E_m - E_{ion})$$

$$I_{ion} = i_{ion} \cdot N \cdot P_O$$

Soit

$$I_{ion} = \gamma_{ion} \cdot N \cdot P_O \cdot (E_m - E_{ion})$$

Plusieurs représentations issues de l'analyse du courant unitaire permettent de mesurer ces paramètres. Pour simplifier l'analyse nous considérons uniquement deux états mesurables en patch unitaire, l'état fermé (pas de courant) et l'état ouvert (présence d'un courant), la transition entre les deux se fait selon deux constantes de vitesse $\alpha$ et $\beta$ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).
La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A montre un enregistrement de patch excisé (Kv2.1, canal à rectification sortante). On peut observer plusieurs niveaux de courant traduisant la présence d'au moins deux canaux sous le patch. Certains canaux ont des cinétiques tellement rapide (on parle de "flickering") que l'on ne peut pas discerner très précisément les ouvertures (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** B, TREK, canal de fond). Dans ce cas on utilise le produit des paramètres $N.P_O$ pour décrire l'activité du canal.

L'histogramme d'amplitude est la représentation des courants moyens mesurés lors d'intervalles de temps choisis en fonction du nombre de fois où cette amplitude a été observée (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** A).
Ces histogrammes peuvent être décrit avec des courbes de Gauss, ce qui permet de calculer l'amplitude moyenne du courant à l'état ouvert. L'aire de chaque pic représente le temps passé dans chacun des états ($aire_{ouvert}$, $aire_{fermé}$), ce qui permet d'en déduire la probabilité d'ouverture $P_O$ et la probabilité de fermeture $P_F$.

$$P_O = \frac{aire_{ouvert}}{aire_{ouvert} + aire_{fermé}} \qquad P_F = \frac{aire_{fermé}}{aire_{ouvert} + aire_{fermé}}$$

Nous obtenons une répartition gaussienne lors de ces mesures à cause du bruit contrariant les mesures. Ce bruit est du à l'électronique des instruments de mesure, aux oscillations mécaniques entre la pipette et la cellule, etc…. Un patch idéal donne des pics pour l'histogramme d'amplitude (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** B).

Les canaux restent un certains temps dans chaque état ouvert ou fermé. Les histogrammes des temps moyens d'ouverture, ou respectivement les histogrammes des temps moyens de fermeture, représentent le nombre de fois où le canal est resté ouvert (ou fermé) pour chaque intervalle de temps (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cet histogramme est décrit par une ou plusieurs exponentielles d'où des constantes de temps de l'état ouvert ($\tau_O$) et de l'état fermé ($\tau_F$) (plusieurs constantes de temps de l'état fermé impliquent la présence de plusieurs états fermés). Dans le cas d'un seul état fermé, on a une relation simple avec les constantes de vitesse:

$$\tau_O = 1/\alpha \qquad \tau_F = 1/\beta$$

Figure 37: Courbe d'inactivation des courants $K^+$ à rectification sortante

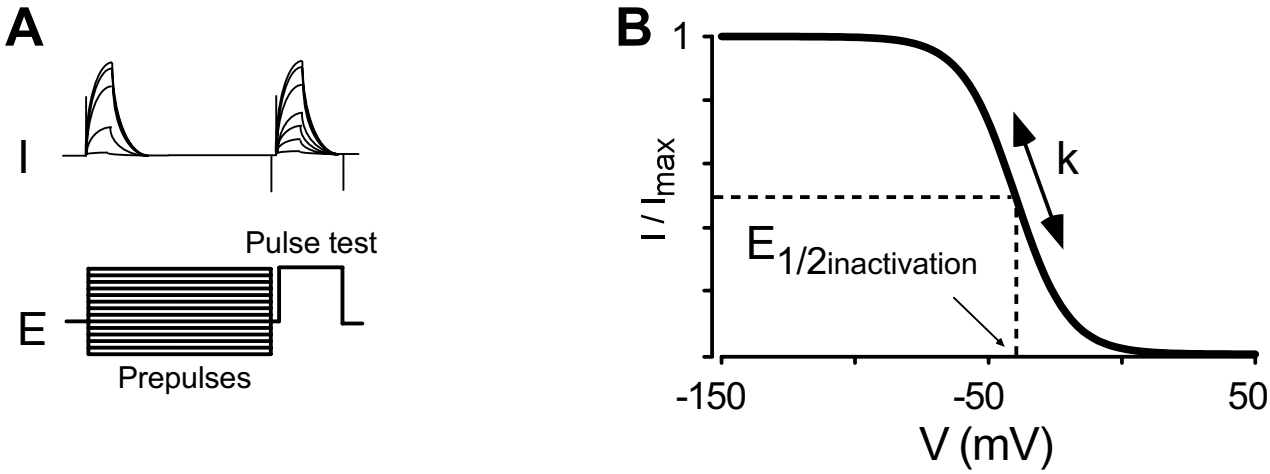



Figure 38: Réactivation des courants $K^+$ à rectification sortante

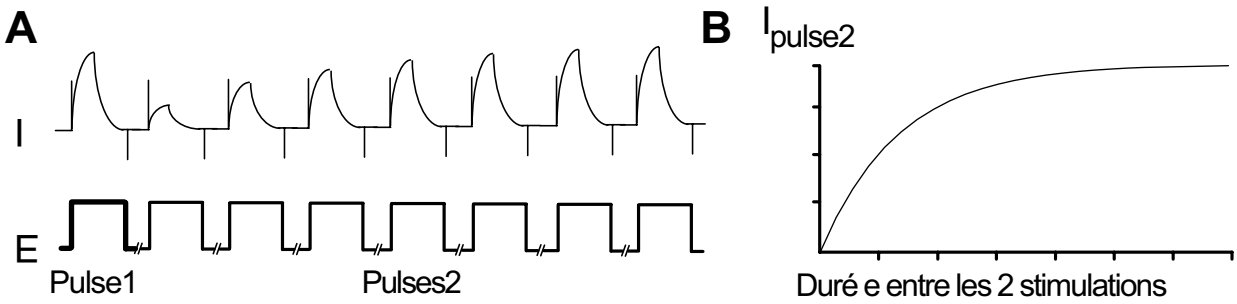



Figure 39: Modèle patch unitaire

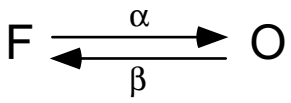


Figure 40: Enregistrement de courant unitaire

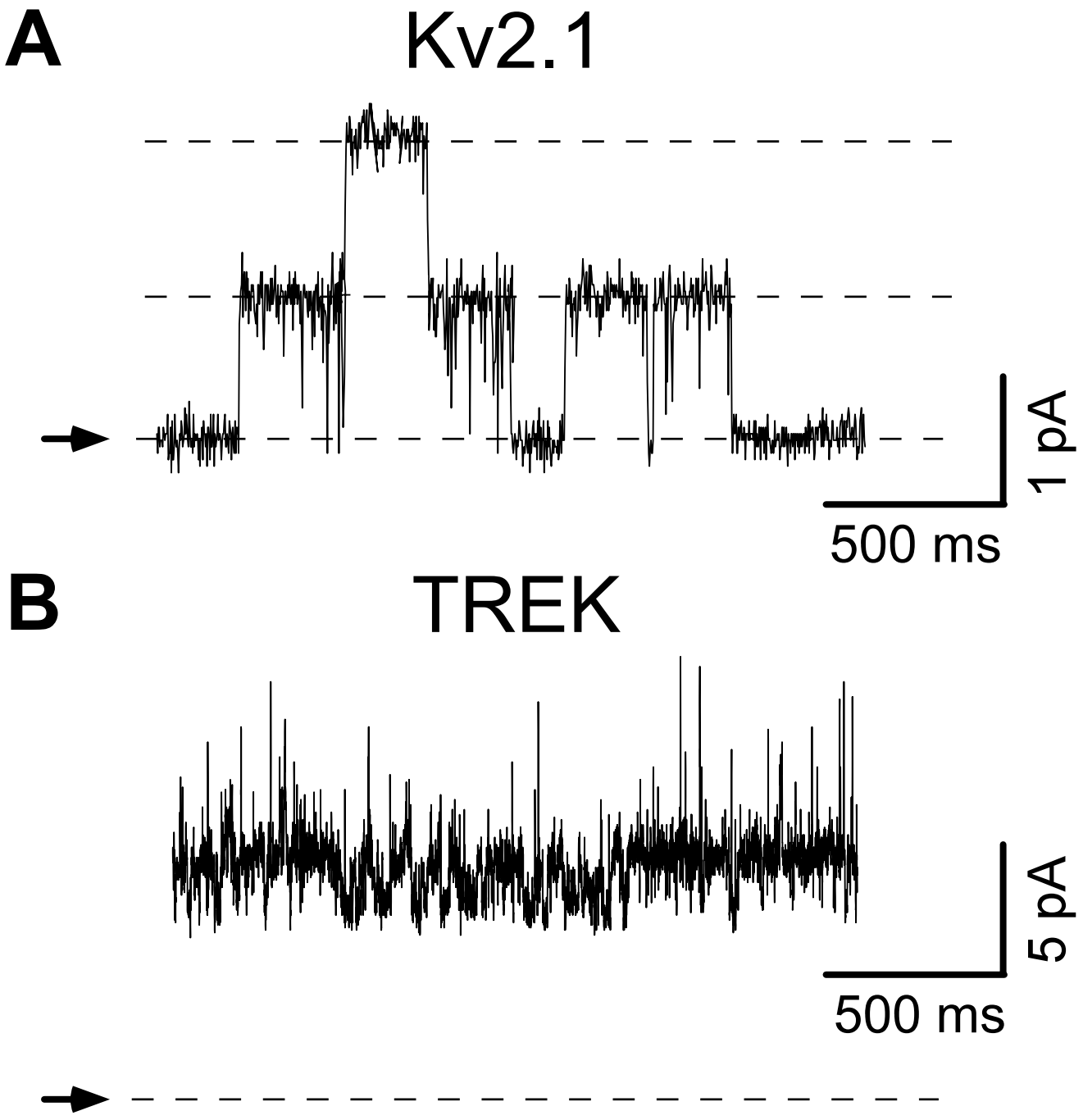


Figure 41: Histogramme d'amplitude

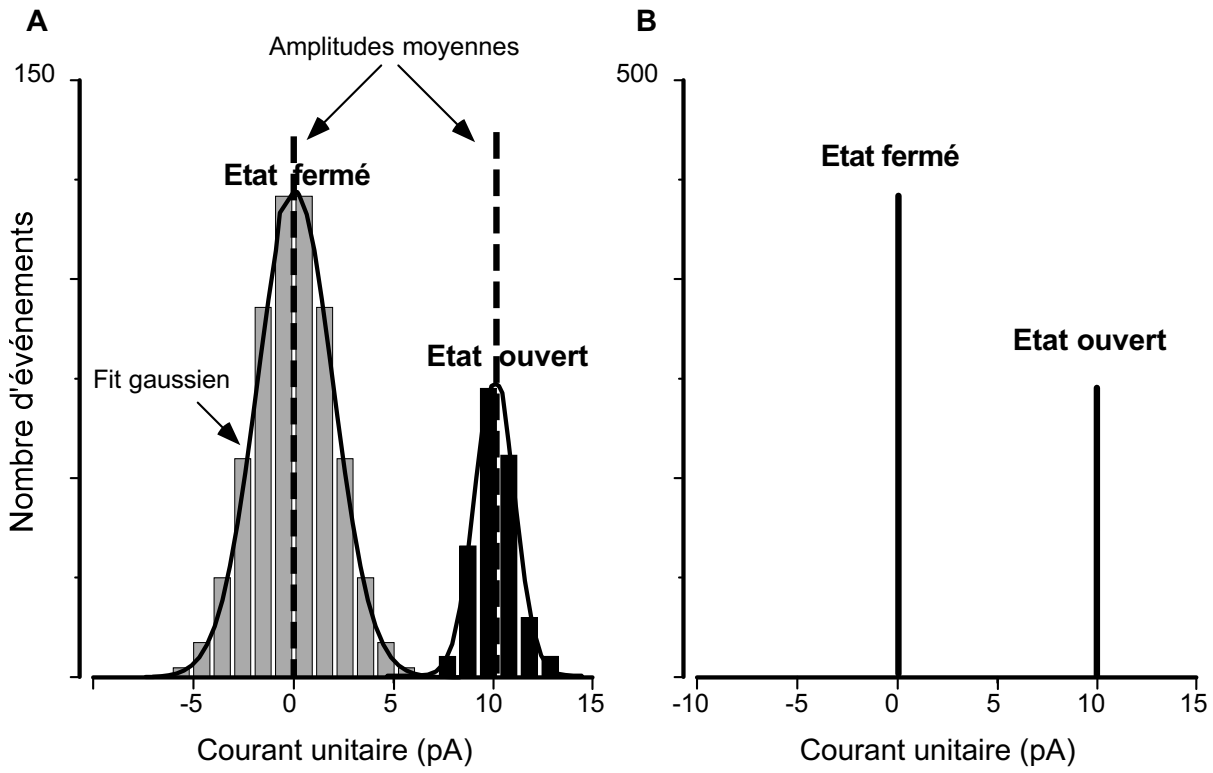
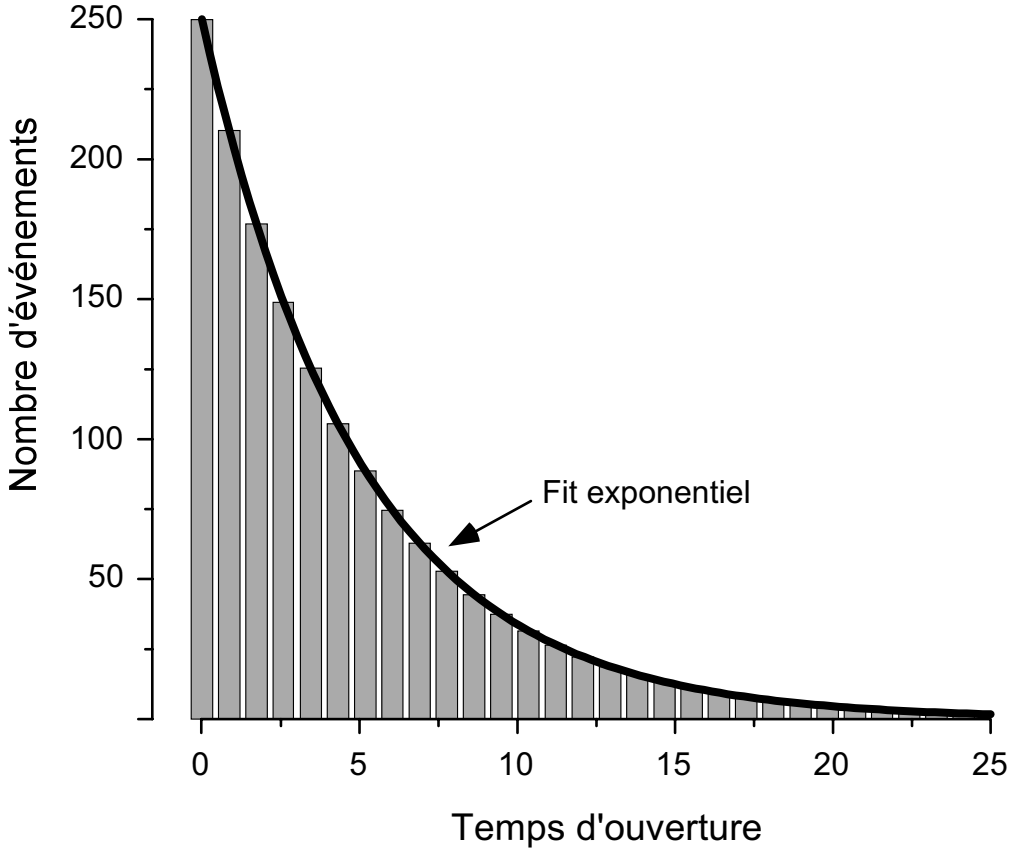



Figure 42: Histogramme des temps moyens d'ouverture



# BIBLIOGRAPHIE


Axon. (1993) The axon guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques. .

Cole, K., S. and Curtis, H., J. (1938) Electric impedance of *Nitella* during activity. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 37-64.

Deal, K.K., England, S.K. and Tamkun, M.M. (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.*, **76**, 49-67.

Goldman, D.E. (1943) Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.*, **27**, 37-60.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membranes patches. *Pffuegers Arch.*, **391**, 85-100.

Hille, B. (1992) *Ionic Channels in Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Hodgkin, A.L. and Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. (London)*, **108**, 37-77.

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol (Lond)*, **505**, 267-82.

Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1996) The gap junction communication channel. *Cell*, **84**, 381-8.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-31.

Vasilets, L.A. and Schwarz, W. (1992) Regulation of endogenous and expressed $Na^+/K^+$ pumps in *Xenopus* oocytes by membrane potential and stimulation of protein kinases. *J. Membr. Biol.*, **125**, 119-132.