

TECHNIQUES D'ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES :

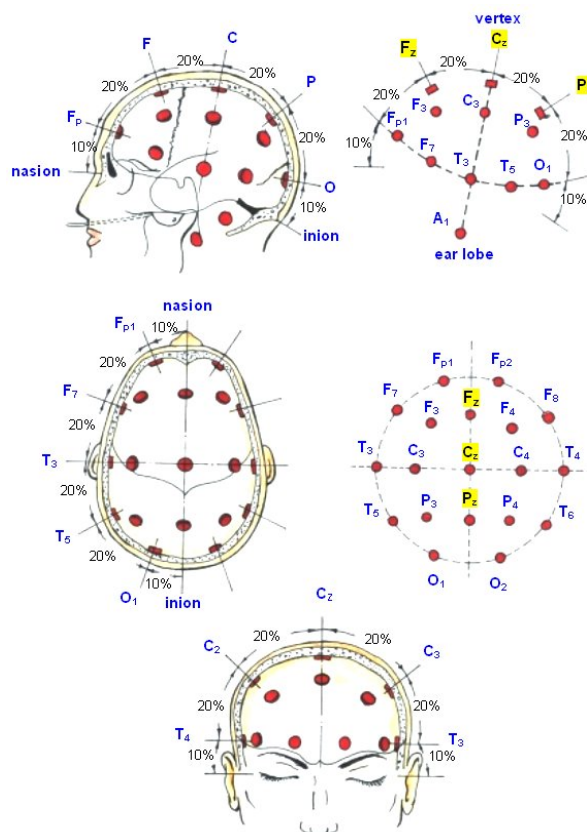
1.ÉLECTROENCÉPHALOGRAPHIE

L'électroencéphalographie est une technique qui permet de mesurer l'activité électrique du cerveau. Créée en 1924 par le neuropsychiatre Hans Berger, cette technique non invasive est largement utilisée chez l'homme et chez l'animal pour l'exploration fonctionnelle du cerveau.

L'enregistrement standard de l'EEG se fait à travers des **macroélectrodes** plaquées à la surface du crâne, contre le cuir chevelu. Au niveau de chaque électrode, on mesure la différence de potentiel par rapport à une électrode de référence commune. Au début, il n'existait aucun consensus sur la place des électrodes sur le crâne, ni sur le nombre standard d'électrodes. Dans les années 1950, le docteur Jasper a introduit un système en vertu duquel les électrodes sont numérotées et placées à des endroits bien précis, les électrodes impaires à gauche et les électrodes paires à droite. Normalement on utilise 19 électrodes (fig.1), mais il est possible d'en utiliser jusqu'à 124.

Souvent les EEG sont accompagnés par l'enregistrement d'autres paramètres: on parle de **polygraphie**. Par exemple dans le cas du sommeil, on enregistre simultanément l'activité du cerveau (EEG), la température, le rythme respiratoire, les mouvements oculaires (electrooculogramme, EOG), l'activité cardiaque (électrocardiogramme, ECG), le tonus musculaire (électromyogramme, EMG). L'étude de ces données combinées est importante car elle favorise l'identification de différentes phases du sommeil.

Fig.1 Position standard pour le placement des électrodes EEG. F frontal, Fp fronto-polaire, T temporal, C central, P pariétal, O occipital, Z ligne médiane, Cz, vertex.



Le potentiel mesuré par l'EEG est extrêmement faible (quelques μV) car le milieu extracellulaire a une faible résistance ohmique et parce que le champ électrique généré par les neurones s'atténue en raison inverse de la distance à la source. Donc les millimètres (méninges, milieu liquide, crâne, peau) qui séparent le cerveau du cuir chevelu représentent un vrai barrage à la détection du signal! Le signal est si faible que les interférences électriques, ou artefacts, provenant d'autres sources (moteurs, lumières, clignements d'oeil) sont souvent aussi fortes que le signal qui provient du cerveau. C'est pour cette raison que les électrodes sont connectées à un amplificateur qui augmente l'amplitude du signal primitif 100-1000 fois. Il y a deux autres facteurs qui jouent un rôle dans le signal EEG: 1) l'**alignement** des cellules et 2) le **synchronisme** des décharges électriques cellulaires. 1) Les dendrites des cellules pyramidales du cortex sont orientées dans une direction perpendiculaire à la surface du scalp (fig.3a) et favorisent l'addition spatiale des potentiels et l'enregistrement de signaux EEG relativement forts. Par contre les interneurons et les cellules gliales du cortex n'ont pas une orientation précise par rapport à la surface du cortex et donc probablement ils ne contribuent pas à l'EEG. 2) Quand un groupe de neurones s'active simultanément, le signal EEG est plus important tandis que l'activité des neurones isolés est trop petite pour être détectée (fig.3b).

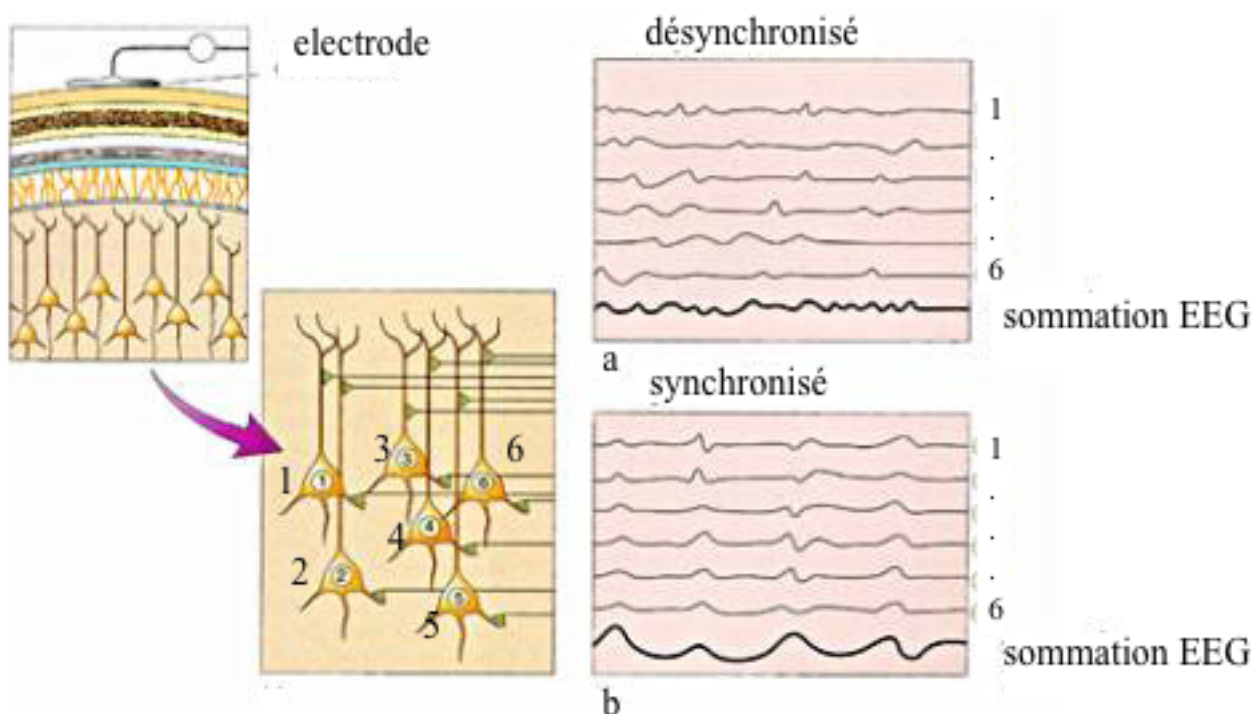


Fig.3 L'organisation des neurones pyramidaux du cortex, avec les dendrites orientées perpendiculairement à la surface du crâne, favorise l'addition des potentiels. Dans une population de neurones corticaux situés sous l'électrode, chaque neurone reçoit de nombreuses afférences synaptiques. Si les afférences déchargent en même temps, les réponses des neurones corticaux sont synchronisées (b) et la sommation résultante sera d'amplitude plus grande que dans le cas désynchronisé (a). Adapté du livre «Neuroscience, à la découverte du cerveau », ed Pradel

Grâce à l'électroencéphalographie, de nombreuses informations sur le fonctionnement cérébral ont été obtenues. La plus remarquable tient à ce que le cerveau génère de l'activité électrique **rythmique** avec une **fréquence** variable. De vastes catégories du comportement, comme l'éveil et l'attention, se trouvent associées aux composantes des principales fréquences des potentiels d'ensemble du cerveau.

Le sommeil et l'éveil

Rythme	Fréquence (Hz)	État de vigilance
Delta δ	0.5-4	Sommeil profond, stades 3 et 4
Thêta θ	4.5-7	Sommeil lent, stades 1 et 2
Alpha α	8-13	Sujet alerte, calme, yeux fermés
Bêta β	13-30	Vigilant, yeux ouverts
Gamma γ	30-80	Perception

Pendant la veille, l'activité alpha, quand le sujet est inactif, alterne avec l'activité bêta pendant les alertes. Pendant le **sommeil** normal, on observe une succession de stades de sommeil lent et de sommeil paradoxal. Le sommeil lent est subdivisé en quatre stades, de profondeur croissante: on peut observer des bouffées d'activité (fuseaux de sommeil) et le complexe K (une onde négative de grande amplitude, suivie d'une onde positive lente) dès les premiers stades du sommeil, tandis que les ondes delta de forte amplitude et de faible fréquence apparaissent en stade 3, pour prédominer en stade 4. Le sommeil paradoxal correspond à une activité EEG de type thêta accompagnée par des mouvements oculaires rapides (on parle de sommeil de type REM = Rapid Eye Movement). Cette phase est également associée à une atonie musculaire et aux rêves. Chez l'homme, plus l'éveil est intense, plus les amplitudes des signaux EEG sont faibles et les fréquences rapides. Ceci peut paraître contradictoire, car l'état d'éveil correspond à une activité cérébrale élevée et donc on pourrait s'attendre à des signaux EEG de grande amplitude mais on vient d'expliquer que l'amplitude du signal mesure la **synchronisation** d'un ensemble de neurones. Pourtant pendant le sommeil aucun neurone particulier n'est activé, ils sont tous synchronisés, et l'amplitude EEG est élevée. Inversement, si un neurone précis entre en activité, il se désynchronise des autres, et l'amplitude électrique décroît.

Il est possible de surveiller l'activité EEG et le comportement d'un sujet pour une longue durée dans le cas de certaines formes d'**épilepsie**. Pour cela une surveillance continue de l'activité EEG et du comportement du malade est nécessaire. On hospitalise le patient dans une chambre équipée d'un système de télémétrie qui permet de mesurer les EEG à distance sans raccords à un électroencéphalographe. L'EEG est enregistré 24 heures sur 24 mais le patient est libre de ses mouvements. L'enregistrement EEG permet l'identification du type de crise et du type de syndrome épileptique, de distinguer entre une crise focale (intéressant une partie des neurones corticaux) ou généralisée (intéressant tous les neurones corticaux), d'évaluer la fréquence et l'intensité des crises ainsi que la possibilité d'une intervention chirurgicale.

Dans les dernières années, d'autres affections du système nerveux central utilisent l'EEG comme moyen d'investigation. Il s'agit de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et d'autres encéphalopathies et de la démence. En général, quand le patient présente les symptômes cliniques de l'encéphalopathie ou d'une démence moyenne, son EEG est anormal cependant, l'enregistrement d'un tracé EEG normal, ne peut pas exclure l'existence d'un déficit neuronal ou d'une épilepsie.

Pour en savoir plus....

*« Neurosciences: à la découverte du cerveau » ch. 19, auteurs: Bear, Connors, Paradiso, Ed. Pradel

*Nature, vol 437, issue 7063, 27 Oct 2005: un numéro spéciale de Nature dédié au sommeil

*<http://sommeil.univ-lyon1.fr> site de Michel Jouvet (il découvrit le sommeil paradoxal chez le chat en 1958 et depuis il a longuement étudié le cycle veille-sommeil).

2.POTENTIELS ÉVOQUÉS

On appelle « potentiels associés aux événements », les changements du signal EEG provoqués par des stimulations électriques ou sensorielles (lumière, son).

Normalement la réponse **évoquée** suite à une stimulation est caractérisée par une faible amplitude qui est noyée dans le EEG. Il est donc nécessaire d'additionner au moins une centaine de réponses au stimulus et en étudier la moyenne: il s'agit de la méthode fondée sur l'extraction du signal à partir du bruit de fond ("moyennage"). Tous les signaux qui ne surviennent pas dans un délai constant après chaque stimulus (on calcule la **latence** comme le temps entre l'artefact de stimulation et le pique de la réponse) se perdent dans la moyenne tandis que les réponses reproductibles seront moyennées et constitueront le potentiel évoqué.

Ces réponses moyennes ont actuellement atteint un niveau de "standardisation" tel que, d'un sujet normal à l'autre, les composantes sont dûment retrouvées, inventoriées et l'objet de nomenclature en général bien accepté par l'ensemble de la communauté scientifique (et, ce qui est aussi essentiel, par celle des cliniciens). Historiquement cette technique a permis de repérer l'organisation des voies afférentes et leurs projections centrales. Plus récemment les potentiels évoqués ont fait preuve de leur utilité pour étudier le fonctionnement du système sensoriel et ses troubles et pour évaluer les maladies de démyélinisation, par exemple la sclérose en plaque.

Dans le cas des **potentiels évoqués auditifs** (PEA), la description comporte à présent un degré notable de détails. Les PEA sont provoqués à l'aide d'écouteurs émettant un son bref (ex.: clic) qui stimule la cochlée de l'oreille interne. La cochlée est la structure responsable de la réception du message sonore et de sa transduction en signal nerveux. Le signal est capté par des électrodes placées sur le cuir chevelu, le meilleur point de dérivation étant, pour des raisons purement physiques, la ligne médiane ou vertex.

Le PEA est un signal complexe constitué d'une succession de déflexions que l'on a groupé d'après leur latence (fig. 6). La latence des divers composants du PEA varie de brève (jusqu'à 10 ms), à moyenne (10 à 100 ms), jusqu'à une latence relativement longue (plus de 100 ms). La première série d'ondes à apparaître est de latence brève: on les désigne habituellement par des chiffres romains numérotés I à VI. Les générateurs nerveux de ces ondes sont situés loin du point d'enregistrement, dans la cochlée et à des niveaux successifs des voies auditives du tronc cérébral. La deuxième série de composantes est probablement en rapport avec l'activité des neurones du thalamus et du cortex auditif.

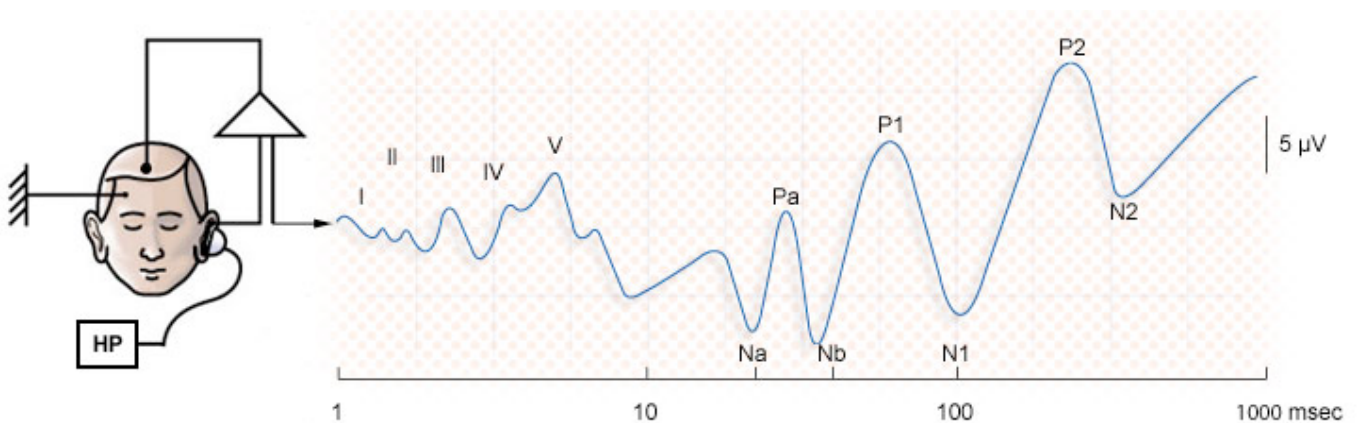


Fig. 6 Potentiel évoqué auditif après le moyennage : L'électrode permet d'enregistrer 6 ondes majeures (I à VI) générées par structures successives à partir de la cochlée; la réponse I a pour origine le nerf auditif. La même électrode permet d'enregistrer des potentiels tardifs provenant de l'activité du thalamo-cortex. (D'après Meunier, ed Masson)

En général, l'évaluation de la réduction de l'amplitude de certaines ondes ou de l'accroissement de leur latence s'est avérée précieuse pour détecter la fonction des structures ou voies auditives profondes et ses anomalies. De plus, vu que ce type d'examen ne demande pas la participation active du patient, il est fondamental pour le dépistage des troubles dans l'audition du bébé.

Pour en savoir plus....

- *« Neurosciences: à la découverte du cerveau » ch. 19, auteurs: Bear, Connors, Paradiso, Ed. Pradel
- *Nature, vol 437, issue 7063, 27 Oct 2005: un numéro spéciale de Nature dédié au sommeil
- *<http://sommeil.univ-lyon1.fr> site de Michel Jouvet (il découvrit le sommeil paradoxale chez le chat en 1958 et depuis il a longuement étudié le cycle veille-sommeil)
- *<http://www.cochlee.org> promenade autour de la cochlée : audition, oreille, cochlée, PEA...
- * « Techniques en Neurosciences », J-M Meunier, Ed. Masson

3.ENREGISTREMENTS EXTRACELLULAIRES

Les techniques d'enregistrement extracellulaires permettent d'enregistrer les potentiels d'actions au niveau de l'axone ou du corps cellulaire d'un seul neurone ou bien au niveau d'un groupe de neurones (potentiel de champ) selon la taille de l'électrode d'enregistrement utilisé.

Ce type d'enregistrement a permis dans les années 1930 les premières études sur l'excitabilité des fibres nerveuses sur les axones de calmar dont le grand diamètre (~2 mm) a permis des approches techniques impensables dans des autres espèces. C'est sur l'axone géant du calmar que la biophysique classique a posé ses bases: à partir de la fin des années 1930, Cole et Curtis aux USA et Hodgkin et Huxley en Grande Bretagne, ont étudié les propriétés passives et la propagation du potentiel d'action dans l'axone géant du calmar et ils ont donné vie à la théorie ionique de la membrane excitable. Prenons un axone géant de calmar placé dans une solution physiologique conductrice homogène, dont le volume est supposé infini. La résistance de cette solution est très basse. Une microélectrode connectée à un générateur de courant est placée à l'intérieur de l'axone (fig.7). Une deuxième électrode

est placée le plus près possible de la face **externe** de la membrane (B in fig.7). Elle est connectée à un amplificateur qui fait la différence entre le voltage enregistré par cette électrode et une autre électrode placée à distance infinie. Les connexions sont telles que si le courant qui traverse la membrane est sortant, le voltage enregistré sera positif tandis que si le courant est entrant, le voltage sera négatif.

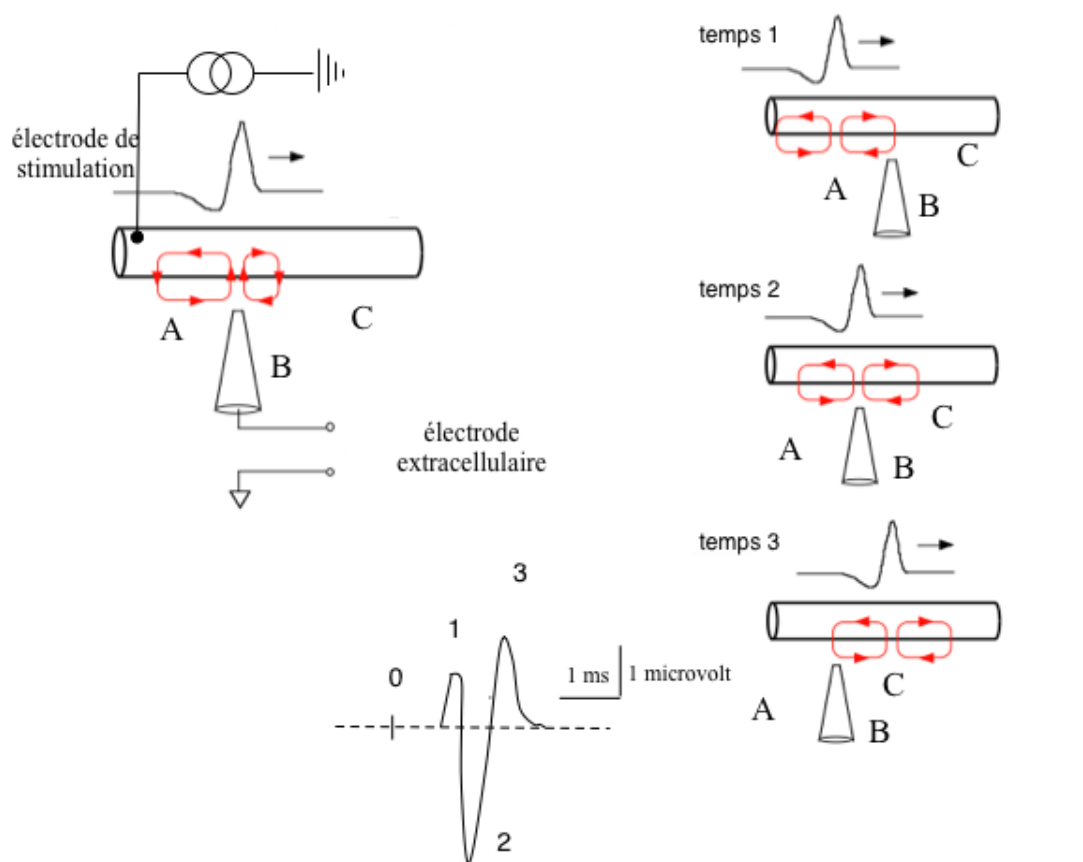


Fig. 7 Enregistré avec une électrode extracellulaire (B) le potentiel d'action est une onde triphasique.

On commence l'expérience en délivrant par l'électrode de stimulation des courants positifs d'une faible amplitude qui ne provoquent pas l'émission d'un potentiel d'action dans l'axone. La petite déflexion verticale enregistrée correspond à ce que l'on appelle « l'artefact de stimulation ». L'artefact est dû à une petite interférence entre le générateur de courant et l'amplificateur. Il dépend aussi de la position des électrodes sur le nerf et si cet artefact n'est pas trop grand, il est très utile car il marque le temps "t" où la stimulation a été appliquée. Au temps $t=0$ l'intensité de stimulation est sous le seuil du potentiel d'action, donc on n'enregistre aucune déflexion (seulement l'artefact 0). En augmentant l'intensité de stimulation en A, on atteint au temps $t=1$, le seuil pour le potentiel d'action, autrement dit la dépolarisation a été suffisante pour que les canaux Na^+ sensibles au voltage s'ouvrent. Un fort courant entrant se produit en A (la flèche noire indique le flux entrant des charges $+$ du au potentiel d'action). Mais tout courant qui entre dans le neurone doit nécessairement sortir du neurone et cela se fait à travers les canaux K^+ de fuite qui sont des canaux pas sensibles au voltage et qui normalement sont ouverts au potentiel de repos. Ces canaux sont responsables pour les courants locaux (lignes rouges). Donc en correspondance du potentiel d'action en A, en B il y a des courants qui sortent de la cellule donc en B on enregistre une déflexion positive (voir trace à droite, 1). Cette dépolarisation ouvre les canaux sodiques voltage dépendants, ce qui porte la membrane en B à se dépolariser encore plus jusqu'au seuil pour le potentiel d'action en B ($t=2$). Ici il y a donc l'entrée d'ions Na^+ et au niveau extracellulaire on enregistre une grande déflexion négative (voir trace à droite, 2). Le courant qui traverse la membrane en B se propage à l'intérieur de l'axone, et retransverse la membrane au point C et si la dépolarisation est assez importante, un potentiel d'action se déclenche au point C. En correspondance du potentiel d'action en C, au point B on enregistre les courants locaux qui sortent de

la membrane et donc une onde positive (voir trace à droite,3). Le phénomène global est une onde triphasique qui donne une image ponctuelle et localisée du potentiel d'action.

De nos jours, l'enregistrement extracellulaire est très utilisé *in vivo* et *in vitro* chez les invertébrés comme chez les vertébrés.

Pour en savoir plus....

*« Physiologie du neurone », Tritsch , Chesnoy-Marchais, Feltz, annexe 6,1 (p. 223)

*« Techniques en Neurosciences », J-M Meunier, Ed. Masson

*<http://www.acnp.org/g4/GN401000005/CH005.html>

4.ENREGISTREMENTS INTRACELLULAIRES

Une expérience historique

Cette technique a été introduite pour la première fois par Cole et Curtis et Hodgkin et Huxley en 1939. Ils ont introduit électrode dans l'axone géant de calmar (fig.8). La différence de potentiel transmembranaire était mesurée par un voltmètre entre cette électrode interne et une autre électrode placée dans le bain extracellulaire. Pour un axone de calmar, la différence de potentiel au repos est d'environ -60mV. Quand une stimulation électrique était délivrée par une paire d'électrodes externes, l'électrode interne enregistrait un signal qui a la forme illustrée dans la fig.8B: un potentiel d'action. C'est le premier enregistrement intracellulaire qui a été obtenu avec une seule fibre nerveuse et, à partir de cette étude, la nature du potentiel d'action a commencé d'être décelée et une théorie ionique du potentiel d'action a été élaborée.

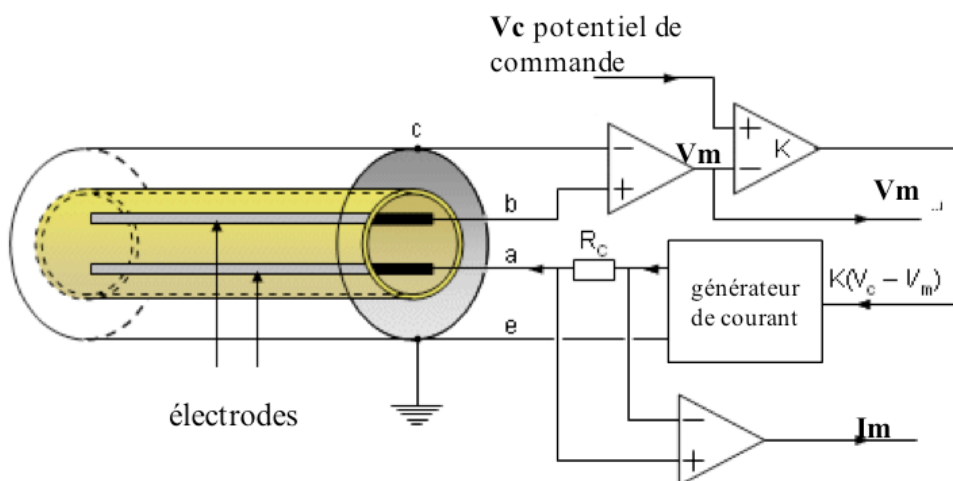


Fig. 8 Exemple d'enregistrement en voltage imposé du potentiel membranaire V_m de l'axone géant de calmar. Les électrodes sont introduites dans l'axone, l'électrode intracellulaire est connectée à un amplificateur opérationnel qui enregistre le potentiel de membrane V_m par rapport à une électrode de référence externe.

Le voltage clamp:

Deux microelectrodes: axone géant du calmar

Le principe de cette technique consiste à maintenir le potentiel de membrane à une valeur constante, choisie par l'expérimentateur. Le voltage ne peut plus changer librement avec le temps et suivant la région de la membrane, comme lors d'un enregistrement de potentiel (comme celui qu'on vient de décrire dans l'axone de calmar) donc cette technique ne peut pas être utilisée pour enregistrer le potentiel d'action. Avec cette technique, on peut imposer une valeur constante de potentiel (voltage imposé) et mesurer le courant qui traverse la membrane quand on impose à celle-ci des valeurs de potentiel variables. Pour éviter que des courants locaux ne se produisent et faussent la valeur du courant mesuré, il est important que le potentiel soit uniforme sur toute la surface membranaire. Ce contrôle spatial du potentiel dans le cas de l'axone géant de calmar est assuré par l'introduction d'une deuxième électrode axiale insérée à l'intérieur de l'axone. Cette disposition permet de court-circuiter l'axone et donc d'éviter la propagation des signaux.

Si la taille du corps cellulaire des neurones le permet (diamètre > 100 µm), comme pour l'axone de calmar, deux microélectrodes sont placées dans le corps cellulaire. La fig.8 synthétise le principe du voltage clamp. Une électrode intracellulaire est connectée à un amplificateur (K) qui mesure la différence de potentiel V_m entre l'intérieur et l'extérieur du neurone. Sa sortie est comparée avec la valeur de commande V_c (choisie par l'expérimentateur) à l'entrée de l'amplificateur opérationnel. La différence entre V_m et V_c est amplifiée par un gain important afin de donner en sortie un signal délivré à l'électrode intracellulaire de façon à annuler $V_m - V_c$. Ce signal, converti en courant, est injecté dans la cellule avec la deuxième électrode. Ce rétrocontrôle se produit très rapidement et avec précision. Le courant mesuré représente le courant total qui traverse la membrane.

Ce courant peut être séparé dans une composante capacitive (I_c) due au chargement de la capacité de membrane et une composante ionique (I_i) due au passage de charges électriques à travers les canaux ioniques et les pompes.

$$I_m = I_c + I_i = C_m \frac{dV}{dt} + I_i$$

Quand V_m est constant, C_m est constant et I_c est nul: les courants capacitifs sont présents seulement lorsque V_m est en train de changer. Dans une expérience standard de voltage imposé, les potentiels de commande sont le plus souvent du type « échelons rectangulaires » (dont on peut fixer le nombre, l'amplitude et la durée) donc quand on dépolarise un neurone avec un échelon dépolarisant, on enregistrera un courant capacitif seulement en correspondance du début et de la fin de l'échelon. Ce courant capacitif I_c est rapide et transitoire car il dépend de la variation dV/dt . Donc très rapidement après le début de l'échelon, le courant de membrane I_m est seulement dû au courant (I_i) qui traverse les canaux ioniques.

Une seule microélectrode

Beaucoup de cellules n'ont pas un corps cellulaire assez grand pour que deux microélectrodes soient introduites à l'intérieur du corps cellulaire. On peut réaliser des expériences de voltage imposé avec une seule microélectrode. Cette technique implique l'utilisation d'un amplificateur qui travaille en mode discontinu (à une vitesse de 3-20 kHz) ce qui lui permet pendant un temps d'imposer le potentiel choisi et dans le temps suivant, d'enregistrer le courant. La qualité des microélectrodes est fondamentale: elles doivent présenter une pointe de petite taille (de l'ordre du micron pour ne pas trop altérer la membrane) et leur résistance ne doit pas être trop élevée afin d'obtenir un enregistrement de bonne qualité. Une fois la micropipette en contact avec le neurone (étape que l'on obtient par contrôle visuel à l'aide du microscope et par contrôle electrophysiologique en enregistrant les variations de résistance de la pipette) l'on applique à travers l'amplificateur des courants ou des voltages élevés pour une période transitoire: ces manœuvres permettent de rompre le fragment de membrane dans la pipette et d'avoir accès à l'intérieur du neurone. On parle de « **empalement** » de la cellule. Une fois l'empalement effectué correctement, le potentiel passe de 0 mV (deux électrodes initialement externe) à une valeur négative qui se stabilise au niveau du potentiel de repos (une électrode interne et l'autre externe).

Pour en savoir plus....

*« Physiologie du neurone », Tritesch , Chesnoy-Marchais, Feltz, ch. 6

*<http://www.science.smith.edu/departments/NeuroSci/courses/bio330/squid.html> dissection et manip en voltage imposé de l'axone de calmar (on-line video by Hodgkin)

*<http://www.acnp.org/g4/GN401000005/CH005.html>

5. LE PATCH CLAMP

La technique du patch-clamp a été mise au point à partir du 1975 par Erwin Neher et Bert Sakmann, qui ont reçu le prix Nobel en 1991 pour leurs recherches sur les canaux membranaires. Cette technique est une variante de la technique du voltage clamp et c'est la seule qui permet d'étudier l'activité d'**un seul canal** directement localisé dans la membrane biologique. Cette technique conduit à isoler un fragment de membrane ("patch") en pressant contre la surface d'une cellule une micropipette en verre remplie d'une solution ionique dans laquelle plonge une électrode métallique. Cette **micropipette** a un

diamètre de l'ordre du μm et a été polie par la chaleur. Dans des conditions techniques parfaites, en imposant une dépression à l'intérieur du capillaire de verre, on obtient une résistance de contact entre le capillaire et la membrane qui peut atteindre le GigaOhm. On parle donc de « gigaseal ». Cette très grande résistance est indispensable à l'étude du courant traversant un seul canal (courant élémentaire) car, par exemple, elle permet d'avoir un bon rapport signal sur bruit de fond. De plus, une fois obtenu, le gigaseal entraîne la stabilité mécanique de l'ensemble pipette–cellule. L'approche expérimentale en patch clamp s'effectue selon quatre configurations membranaires différentes (fig.11).

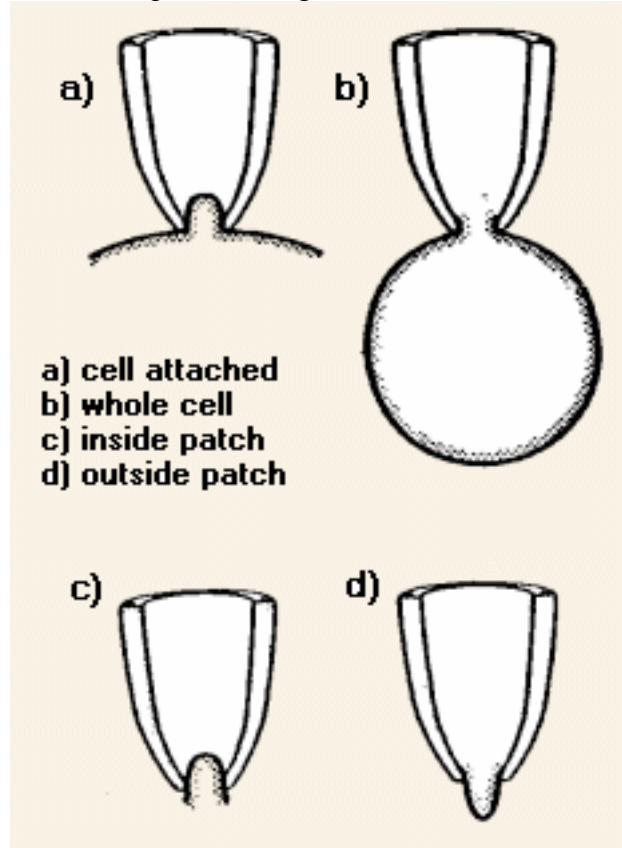


Fig. 11 Les différentes configurations d'enregistrement en patch clamp.

La première configuration est obtenue une fois la pipette scellée à la membrane: on étudie les canaux ioniques inclus dans le fragment de membrane attaché à la pipette et encore relié à la cellule mère (fig.11a). Cette configuration dite « cellule attachée » (cell-attached) maintient l'environnement physiologique du canal.

Une seconde configuration (fig.11c) s'obtient en séparant la pipette de la cellule. Lors de cette manœuvre, le fragment de membrane reste fixé à la pipette et sa face intracellulaire est dirigée vers le milieu extracellulaire d'où l'appellation d'« inside-out » ou « membrane détachée, face interne de la membrane à l'extérieur ».

Il existe également une configuration « outside-out » obtenue, à partir de la configuration « cellule attachée » par rupture de la membrane dans la pipette et éloignement de la pipette. On arrache ainsi un morceau de membrane qui, en se rabattant, referme l'orifice de la pipette en orientant la face extracellulaire de la membrane vers l'extérieur. C'est la configuration membrane inversée (outside-out) décrite dans la fig.11d.

Ces trois configurations permettent d'enregistrer des courants **microscopiques**, ou courant unitaires, à l'échelon individuel. Le courant porté par un canal ionique prend la forme d'un échelon rectangulaire, le canal oscillant entre différents états de conduction. La mesure de l'intensité du courant élémentaire à différents potentiels imposés, en présence de solutions ioniques variées, permet de déterminer la conductance du canal et sa sélectivité ionique. La mesure du temps fractionnel d'ouverture (aussi appelé probabilité d'ouverture P_o) permet d'étudier l'effet d'agents de bloquants pharmacologiques et d'agents modulateurs. Une quatrième configuration, appelée « cellule entière » (whole cell, fig.10b), est d'un principe totalement différent. Si, partant de la configuration attachée, on brise le patch en exerçant une forte aspiration, la solution intrapipette entre en contact avec le milieu intracellulaire. Dans cette

condition, on enregistre des courants **macroscopiques** résultants de l'ouverture de N canaux repartis sur l'ensemble de la membrane cellulaire. Cette configuration permet d'enregistrer le courant traversant tous les canaux ouverts de la membrane cellulaire mais on peut aussi réaliser des expériences en courant imposé. Ces enregistrements s'approchent de ceux qui sont obtenus par microélectrodes intracellulaires mais les pipettes de patch-clamp permettent d'enregistrer des cellules de petite taille qu'il est impossible d'empaler avec les électrodes intracellulaires.

Pour en savoir plus....

*« Neuroscience: à la découverte du cerveau » Bear, Connors, Paradiso, Ed. Pradel, (p.87,88)

*« le patch clamp en bref » accès libre sur site Médecine et Science

*<http://www.neur-one.fr/>

*<http://www.acnp.org/g4/GN401000005/CH005.html>

*<http://www.compneuro.org/hammond/techniques/index.html> ce site montre d'une façon simple les éléments de base de la technique du patch clamp avec schémas et photos.

6.L'OPTOGÉNÉTIQUE: un nouvel outil permettant le contrôle du cerveau par la lumière.

Les neurones sont des cellules excitables qui reçoivent et émettent des informations. Leur excitation ou inhibition dépend en grande partie de l'activation de récepteurs par des neuromédiateurs ou des variations du potentiel membranaire. Le principal neuromédiateur excitateur du cerveau est le glutamate. Lorsque du glutamate est libéré par un neurone au niveau d'une synapse (zone de connexion entre neurones), il active les récepteurs glutamatergiques présents dans la membrane du neurone opposé, ce qui entraîne une dépolarisation du neurone et possiblement la génération de potentiels d'action. Afin de contrôler l'activité d'un neurone ou d'une synapse particulière, une des approches développées au cours de la dernière décennie a consisté à bloquer l'activité des molécules de glutamate à l'aide de cages chimiques sensibles à la lumière. Lors d'une stimulation lumineuse dans l'ultraviolet, la cage se défait, le glutamate est libéré, les récepteurs glutamatergiques sont activés, et le neurone excité. Cette approche permet donc d'activer un neurone, mais peut poser problème lorsque l'expérimentateur cherche à contrôler l'activité d'un ensemble de neurones. Entre autres, cela nécessite la libération de glutamate dans un grand volume contenant les neurones d'intérêt, et entraîne une activation massive, et excessive, de tous les récepteurs glutamatergiques membranaires. Or, cette situation est représentative d'un état pathologique observé, par exemple, lors d'accidents cérébraux vasculaires. Il fallait donc trouver une alternative à l'utilisation de neurotransmetteurs « encagés », qu'ils soient excitateurs ou inhibiteurs, pour activer des ensembles neuronaux.

En 2003 a été isolé un nouveau type de canal sensible à la lumière chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*: le canal rhodopsine-2 (ChR2). Ce canal est constitué d'un dimère comprenant 7 segments transmembranaires liés à un groupement rétinale contenant un chromophore photosensible ($\lambda_{\max}$: 480 nm, lumière bleue).

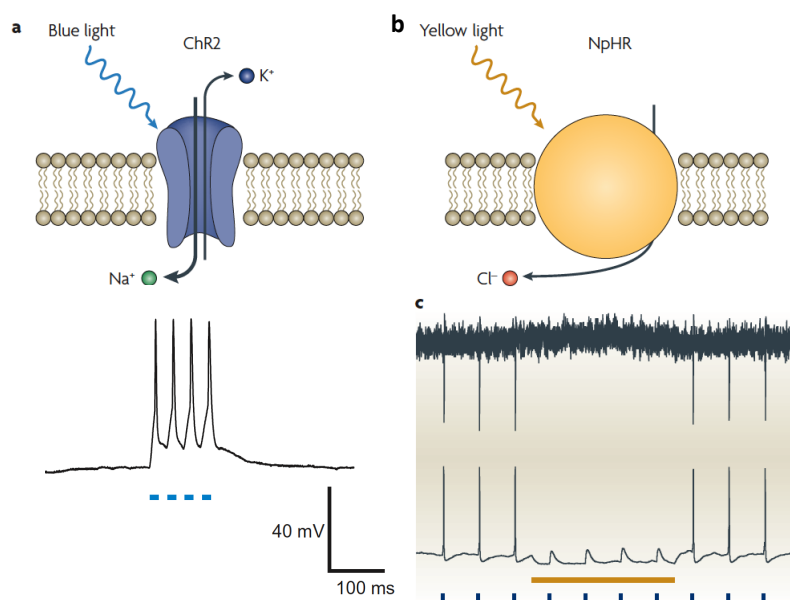


Figure 1 : outils optogénétiques : la ChR2 et la NpHR. (a) suite à une illumination avec de la lumière bleue, ChR2 permet l'entrée majoritaire de Na^+ dans la cellule. Le neurone enregistré en courant-imposé, décharge alors 4 potentiels d'action suite à 4 stimuli lumineux de 15ms de durée. (b) activation de la ChR2 et de la NpHR dans un neurone d'hippocampe montre les potentiels d'action induit par la lumière bleue. Pendant l'activation de la NpHR par de la lumière jaune, l'entrée de Cl^- dans la cellule empêche la décharge de potentiels d'action évoqués par la lumière bleue. Enregistrements simultanés en cellule-attachée et en patch clamp configuration cellule-entière, (Adapté de Zhang et al., 2007 et de Boyden, 2011)

Ce canal, en présence de rétinol (normalement produits par les neurones), répond à une stimulation lumineuse ouvrant un pore qui entraîne une entrée de cations dans les cellules qui l'expriment. Les neurones exprimant le ChR2 répondent à une stimulation lumineuse de très courte durée (~ 15 ms) par une dépolarisation membranaire et la genèse d'un potentiel d'action. L'effet excitateur est immédiat, et surtout réversible puisque l'arrêt de l'illumination conduit à un retour instantané au potentiel (Figure 1 et 2).

ChR2 n'étant pas exprimé dans les neurones, l'équipe de Deisseroth a utilisé des lentivirus contenant l'ADNc codant ChR2 pour infecter et exprimer ChR2 dans les neurones d'intérêt (grâce au système cre/lox ou par utilisation de vecteurs viraux). Cette étape, présente un double avantage : 1) elle permet de cibler une population neuronale spécifique, telle ou telle partie du cerveau par exemple ; 2) un marqueur fluorescent introduit dans la construction ADN permet de visualiser les neurones infectés par ChR2, et donc excitables par un faisceau lumineux.

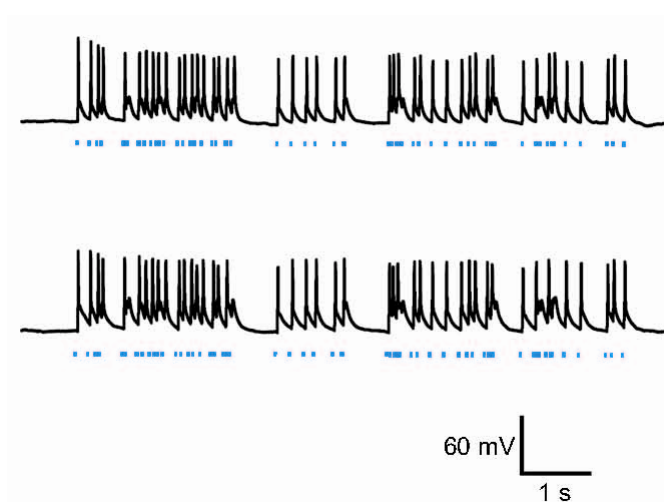


Figure 2 : Exemple de l'utilisation de la ChR2 dans la décharge de potentiels d'action, suite à l'émission d'un pulse lumineux de courte durée. (D'après Boyden, 2011)

D'autres classes de protéines photo-sensibles ont été découvertes par la suite: les canaux ChannelRhodopsine 1, permettant la formation de courants protoniques entrant (induction d'une dépolarisation membranaire) et les pompes Halorhodopsine (NpHR). Ces pompes provoquent une entrée importante de Chlore et sont activées par une lumière qui a une longueur d'onde différente de la lumière pour activer la ChR2 (λ_{max} : 580 nm, lumière jaune). Donc, à l'inverse du canal ChR2, leur activation entraîne une hyperpolarisation rapide et transitoire du potentiel membranaire.

L'expression, au sein d'un même type de neurone, des canaux ChR2 et NpHR permet actuellement de contrôler son potentiel membranaire. L'utilisation de ces outils d'optique et de génétique permettra de disséquer le fonctionnement de nombreux réseaux neuronaux avec une résolution jamais encore observée.

Sources :

* « Quand la lumière contrôle l'activité neuronale et le comportement », L. Groc, D. Choquet, *M/S n° 6-7, vol. 23, 2007*

*<http://f1000.com/reports/b/3/11>

« A history of optogenetics : the development of tools for controlling brain circuits with light ». Edward S. Boyden, *F1000 reports Biology*, 2011.

*« Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel ». Karl Deisseroth & Osamu Nureki, *Nature*, 2012.

Information complémentaires :

1) <http://www.youtube.com/watch?v=fNwts2uQhVE>

2) <http://www.youtube.com/watch?v=QA67v4vSg00&feature=related>