

Evolution de la technique d'enregistrement intracellulaire

Enregistrer en intracellulaire sans microélectrode

La théorie ionique élaborée par Hodgkin et Huxley dans les années 1950 a permis de comprendre le mécanisme qui permet à une cellule excitable d'être polarisée au repos, d'émettre un potentiel d'action et de le propager le long de son axone. Sans microélectrodes, ces auteurs ne pouvaient pas pénétrer dans la plupart des cellules excitables. Ils ont donc travaillé sur **l'axone géant de calmar dont l'axone présente un diamètre de plusieurs centaines de microns**. Enregistrer la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane pouvait se faire avec une électrode externe fournissant le potentiel du bain extérieur et une **grosse électrode, une simple plaque métallique enfoncée à l'intérieur de l'axone**.

Enregistrer en intracellulaire avec des microélectrodes

La neurophysiologie ne pouvait se satisfaire des connaissances acquises grâce à cette préparation et la volonté d'étendre les recherches à d'autres cellules excitables a conduit à la *mise au point d'électrodes plus fines*, capables de traverser la membrane plasmique de neurones plus petits qu'un axone géant.

Les microélectrodes obtenues en étirant des tubes de verre, se sont développées à partir des années 55-60. Creuses, d'un diamètre interne de l'ordre du micron, et remplies d'un électrolyte qui ne perturbe pas en diffusant la composition du milieu intracellulaire (KCl 3M), elles ont permis en empalant les neurones au niveau du corps cellulaire, d'étendre l'investigation aux neurones géants d'invertébrés comme l'aplysie ou l'escargot. Cette démarche ouvrait la perspective de *comprendre les bases cellulaires neuronales de comportements simples* : contrôle du rythme cardiaque, contrôle de la motricité intestinale, retrait réflexe de parties du corps fortement stimulées.

L'électrode intracellulaire permettait d'analyser la **polarisation de repos, l'activité spontanée** des neurones ou leur **activité évoquée**. L'activité évoquée peut résulter soit de l'application directe intracellulaire d'un courant électrique dépolarisant, soit d'une stimulation des entrées synaptiques sur la cellule, qu'elles soient la conséquence de stimulus naturels mettant en jeu des afférences à ce neurone ou qu'elles soient artificiellement déclenchées par la stimulation électrique de ces mêmes voies ou par l'application à la synapse des neuromédiateurs responsables de ces transmissions synaptiques.

La grande stabilité interindividuelle de l'organisation de ces systèmes nerveux simples, en particulier celui de l'aplysie, a rendu possible l'identification des neurones et leur caractérisation selon des critères morphologiques, anatomiques, neurochimiques et électrophysiologiques. Sous l'égide de E. Kandel, la neurophysiologie de l'aplysie s'est écrite pendant plus de 20 ans, jusque dans les années 80 et s'est imposée comme la neurophysiologie de référence. Celle qui permettait de comprendre l'électrogénèse, sa modulation par les entrées synaptiques, les processus d'intégration synaptique au sein de réseaux identifiés de neurones, le processus de traitement de l'information, de l'entrée cellulaire à la sortie comportementale. Ces travaux pionniers ne sont pas tombés dans l'oubli. Ils ont su profiter de l'avènement de nouvelles techniques actuelles d'enregistrement, couplées à de la biologie moléculaire comme la RT PCR, permettant d'identifier les gènes qui codent pour les canaux exprimés par la cellule, et ils continuent de produire une masse importante de connaissances qui trouvent maintenant un large écho chez les vertébrés supérieurs.

Des cellules géantes d'invertébrés aux grands neurones de vertébrés

En 20 années de recherche, les électrodes se sont perfectionnées. Verres calibrés, étireuses ultra précises, gestion automatisée des temps de chauffage et de la force d'étirement ont permis de faire des **pointes plus fines et plus reproductibles en diamètre** et donc plus aptes à pénétrer des cellules plus petites. Les limites de finesse atteintes, on a même été jusqu'à développer des techniques d'affûtage donnant aux pointes un profil tronqué et perforant, à la façon d'une aiguille hypodermique pour pouvoir empaler les neurones les plus petits (corps cellulaire inférieur à 10 μ). Les cellules pyramidales et toutes les cellules de taille supérieure à 15 microns chez les vertébrés, ont fini par révéler les particularités de leur fonctionnement grâce à ces micropipettes.

La technique de patch clamp

Elle a été mise au point en 1981 par Neher et Sakmann. Elle révolutionne les conditions d'accès aux cellules et autorise l'enregistrement prolongé de cellules de très petite taille.

Un peu d'histoire. Sans microélectrodes, il était possible d'accéder aux potentiels d'action intracellulaires de cellules excitables en utilisant une technique, l'électrode à succion qui préfigurait ce qui 30 ans plus tard allait devenir le patch clamp sur cellule individuelle et qui consiste à se coller sur une cellule puis à rompre la membrane par une succion. Prenons l'exemple de l'activité des myocytes cardiaques. On descendait sur le ventricule d'un cœur isolé de grenouille, une seringue hypodermique modifiée. La pointe coupée était polie et arrondie de façon à être le moins coupante possible. Un cathéter était glissé dans l'aiguille et servait d'isolant électrique pour l'électrode d'enregistrement, un fil d'argent chloruré qui passait par la lumière du tube et qui affleurait à son extrémité. L'arrière de l'aiguille était relié via un robinet à plusieurs voies à une trompe à vide. Une électrode de référence en argent était placée au contact externe du ventricule.

L'aiguille était descendue au contact du ventricule battant spontanément. D'un diamètre de l'ordre de 0.5 à 1 mm, elle était ainsi positionnée au dessus d'un nombre important de myocytes, qui sont des cellules très allongées. La trompe à vide était mise en marche et créait une succion dans le tube qui faisait éclater de nombreux myocytes dans la lumière du tube, mettant au contact de l'électrode, les milieux intracellulaires. Avec un amplificateur continu on recueillait les PA cardiaques synchrones dans tous les myocytes et dont la forme et l'amplitude mimaient à la perfection le vrai PA intracellulaire que l'on peut enregistrer dans cette préparation avec une microélectrode conventionnelle. Notez au passage que dans ce cas il faut s'affranchir du battement cardiaque qui ferait ressortir au premier battement l'électrode de la cellule. Le cahier des charges impose donc que l'électrode suive le battement. Pratiquement on ne conserve de l'électrode que son extrême pointe à l'intérieur de laquelle on glisse un fil d'argent de 20 μ de diamètre qui assure à la fois son maintien et le contact électrique. Le fil et la pointe, pratiquement sans masse, sont descendus à la volée sur le cœur, jusqu'à se ficher dans une seule cellule. La souplesse du fil de 20 μ permet de conserver un contact qui n'impose aucune contrainte à la pointe, qui monte et descend au gré du battement.