

Les limites de l'enregistrement intracellulaire

La lésion due à l'électrode

L'électrode pénètre dans la membrane plasmique : elle crée une fuite du milieu intracellulaire, plus ou moins importante, préjudiciable au fonctionnement du neurone. **Dans un neurone géant, on comprend que le préjudice est minime.** On en prend pour preuve la stabilité dans le temps de son potentiel de membrane.

Dans un neurone de très petite taille, il en va tout autrement et en général, la fuite entraîne une diminution progressive et rapide du potentiel de repos qui rend l'enregistrement inexploitable au bout de quelques minutes. (Si le neurone fuit, la perte de K^+ change E_K , donc change le potentiel de membrane. Pendant l'activité dynamique, les PA, les driving force, pour les principaux ions K^+ et Na^+ sont changées à cause de la variation de E_m , de E_{Na} et de E_K . Donc les courants ioniques voltage dépendants, dont le moteur est la driving force, $E_m - E_{Na}$ ou $E_m - E_K$, s'affaiblissent. L'électrogénèse ne peut se maintenir, les PA diminuent d'amplitude, la repolarisation se fait mal, la déinactivation de canaux qui nécessitent un passage prolongé en hyperpolarisation devient impossible et la cellule exprime transitoirement une activité qui n'a plus rien à voir avec son activité normale.

Le coût des étireuses performantes

Il est très difficile de pénétrer dans des cellules de petite taille, dont le soma a un diamètre inférieur à 10μ .

Fabriquer des électrodes très fines et reproductibles a eu pour conséquence de faire croître le prix des machines à étirer les électrodes dans des proportions démesurées, rendant difficile leur acquisition par la plupart des laboratoires. Le réglage des paramètres de la machine est fastidieux, coûteux en temps et il est très difficile de conserver les mêmes caractéristiques d'électrodes dans le temps. Ces paramètres purement techniques interdisent l'emploi de ces machines par plus d'un utilisateur en raison de la difficulté d'aboutir à un réglage personnalisé. A la limite il faut autant d'étireuses que de postes de travail différents.

Le coût des amplificateurs adaptés à des électrodes très fines et les problèmes de stabilité mécanique.

La finesse des électrodes fait augmenter leur résistance dans des proportions considérables. De 10 à 15 mégohms pour une électrode ordinaire de 0.7 à 1μ , on monte à 80 à 100 mégohms pour une électrode très fine, de 0.4μ de diamètre. Cette augmentation de résistance complique le dispositif d'enregistrement en rendant difficile la transmission du signal. Des amplis perfectionnés doivent être couplés à ces électrodes fines et leur coût, comme celui de l'étireuse est prohibitif.

Electrodes plus fines, + cellules plus petites : la stabilité mécanique du poste d'enregistrement doit être améliorée sous peine de perdre rapidement la cellule. Il est indispensable d'investir dans des tables antivibratiles suspendues et isolant la préparation des vibrations du bâtiment et du plancher. Remarque : au Max Planck Institut de Starnberg en Allemagne, Une structure de poutres horizontales a été érigée sur des fondations

extrêmement profondes et isolées des vibrations. Le bâtiment de recherche a été construit ensuite autour de cette structure, sans jamais la toucher. Des trappes, dans les planchers permettent d'accéder aux poutres sous-jacentes sur lesquelles on pose les tables antivibratiles pesant 1 tonne. Aucune vibration du plancher ne peut se communiquer aux tables.

Les marquages intracellulaires

Compte tenu de la grande diversité morphologique des neurones de vertébrés supérieurs, l'usage s'est répandu de placer dans les électrodes un marqueur que l'on doit faire passer dans le neurone où il diffuse (Jaune lucifer, biocytine etc...). Après révélation et/ou sous un éclairage spécial (UV), il permet de voir la forme du neurone et d'attribuer tel type d'activité à une catégorie identifiée de neurones. Ces substances font augmenter considérablement la résistance de l'électrode et gênent l'enregistrement préalable de l'activité cellulaire.

Dans la pratique on commence par enregistrer l'activité normale de la cellule selon les protocoles prévus. Le marquage de la cellule se fait en fin d'expérience. Pour faire sortir le produit de l'électrode, il faut que celui ci présente une charge électrique. Le courant que l'on applique dans l'électrode doit être de même signe que la substance à éjecter de la pipette. Plusieurs minutes sont nécessaires, ce qui est peu compatible avec le temps pendant lequel il est possible de rester dans le neurone enregistré. De nombreuses tentatives de marquage échouent. On se rappelle ici que si l'on fait passer du courant dans la cellule on crée selon le signe une hyperpolarisation ou une dépolarisation. La cellule supporte assez bien les hyperpolarisations mais les dépolarisations engendrent des décharges soutenues de PA qui, dans les petites cellules, conduisent rapidement à faire changer les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Les pompes Na/K qui fonctionnent lentement finissent par être dépassées et la cellule qui perd du K⁺ se dépolarise et se bloque en dépolarisation. Toute activité disparaît et si le processus n'est pas interrompu, la cellule meurt.

Conclusion

Dans la pratique, seules quelques équipes ont réussi des enregistrements épisodiques de cellules très petites, **au prix d'un investissement matériel et en temps considérable.** Cependant on ne peut pas considérer que cette technique a permis de faire des avancées très importantes dans la connaissance des très petits neurones.