

NEUROSCIENCES & comportements

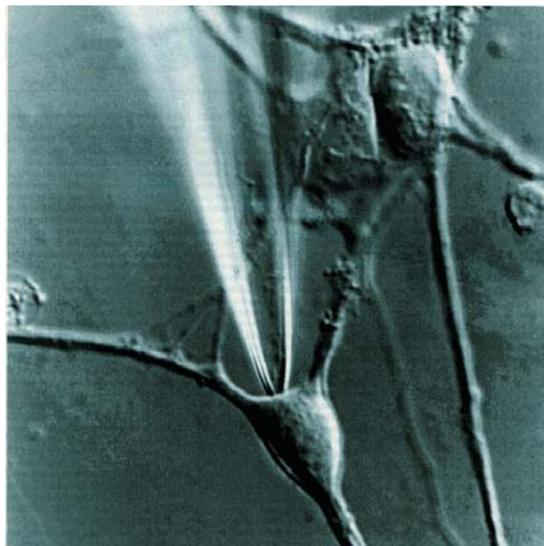
La technique du patch-clamp

ERWIN NEHER & BERT SAKMANN

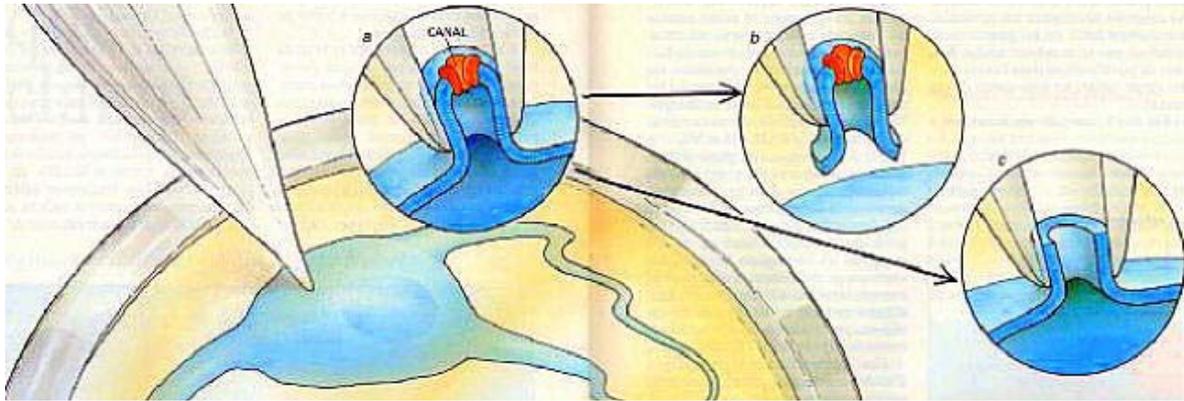
Cette technique d'étude des signaux cellulaires a valu le prix Nobel à ses inventeurs en 1991 : en arrachant un fragment de membrane à l'aide d'une micropipette, on isole les canaux ioniques de la membrane cellulaire et l'on mesure les courants d'ions qui traversent ces canaux.

La plupart des cellules de l'organisme reçoivent et transmettent des signaux grâce à des canaux ioniques, c'est-à-dire des protéines qui forment des pores dans la membrane plasmique et commandent les mouvements des ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Dans les neurones comme dans les cellules musculaires, ces canaux ioniques assurent l'émission et la propagation des influx électriques activateurs ; dans les organes sensoriels, ils transforment les stimuli physiques ou chimiques en signaux électriques, qui se propagent vers le système nerveux ; dans les cellules qui ne sont pas connectées au système nerveux central (comme les cellules du sang, du système immunitaire ou du foie), ils assurent les communications avec le milieu extérieur.

Vers les années 1950, les biologistes ont appris à mesurer les courants électriques qui résultent de l'activité de groupes de canaux ioniques. Depuis les années 1970, grâce à la technique du patch-clamp - pour laquelle nous avons reçu le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1991 - on sait même détecter les courants ioniques qui s'écoulent par chaque canal individuel. Bien que nous ayons mis plusieurs années à mettre au point et à perfectionner la technique du patch-clamp, son principe est simple : en posant une fine pipette en verre de forme adéquate sur une membrane cellulaire, on isole un petit morceau (*patch*, en anglais) de membrane, avec les canaux ioniques qu'il contient, puis on étudie individuellement les propriétés chimiques et électriques des canaux. On peut aussi détacher ce morceau de membrane de la cellule, ou encore créer une «fenêtre» dans une cellule vivante et changer la composition du cytoplasme. Toutes les variantes de la technique initiale permettent de comprendre comment les canaux ioniques modifient le potentiel transmembranaire (la différence de potentiel électrique entre la face interne et la face externe de la membrane plasmique), et comment ils gouvernent certaines activités cellulaires comme la sécrétion et la contraction. Depuis que nous avons introduit la technique du patch-clamp, en 1976, plusieurs centaines de laboratoires du monde entier l'ont adoptée et perfectionnée. Chacun d'eux apporta sa pierre à l'exploration des canaux ioniques et de leurs fonctions.



EN POSANT UNE PIPETTE à la surface d'un neurone, on étudie les canaux ioniques de la face externe de la membrane plasmique. La pipette, de diamètre égal à un micromètre, isole physiquement et électriquement quelques canaux ioniques. Grâce à cette technique de patch-clamp, on étudie l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques. Des biologistes du monde entier l'utilisent aujourd'hui pour élucider le fonctionnement des réseaux de signalisation cellulaire, notamment dans les tissus cérébraux.



TROIS FORMES DE PATCH-CLAMP

En appliquant une pipette de patch-clamp à la surface d'une cellule, préalablement nettoyée avec des enzymes, puis en aspirant doucement, on crée une résistance de plusieurs giga-ohms, entre un petit fragment de membrane plasmique - avec les canaux ioniques qu'il contient - et le reste de la cellule (a). On peut ensuite stimuler le fragment isolé à travers la pipette, et mesurer l'effet produit sur les canaux de ce fragment. On peut aussi détacher le fragment de membrane du reste de la cellule, afin d'exposer la face cytoplasmique des canaux (b). Enfin, quand on parvient à détacher le fragment de membrane sans diminuer la résistance (c), on peut modifier la composition cytoplasmique des cellules vivantes.

Le rôle des canaux ioniques

Nous nous sommes initialement intéressés aux canaux ioniques au cours de notre thèse sur la biophysique des membranes, à l'Institut Max Planck de psychiatrie, à Munich. Deux articles passionnants, publiés en 1969 et en 1970, rapportaient que les membranes lipidiques artificielles, isolantes lorsqu'elles sont pures, deviennent électriquement conductrices lorsqu'on y ajoute des quantités infimes d'antibiotiques ou de protéines. Les variations discontinues des courants qui traversent ces membranes indiquaient que les protéines créent des canaux semblables à des pores, qui s'ouvrent et se ferment individuellement ; les ions traversent la membrane à travers les canaux ouverts.

De nombreux travaux indiquaient alors que les signaux électriques, dans les neurones et dans d'autres cellules, sont gouvernés par des protéines analogues, présentes dans la double couche lipidique des membranes plasmiques. Le concept de canal ionique avait déjà été évoqué par Alan Hodgkin et Andrew Huxley, de l'Université de Cambridge, qui reçurent le prix Nobel en 1963 pour leur étude des courants à travers la membrane des cellules nerveuses. Les biophysiciens qui étudiaient les membranes comprirent alors que si l'on parvenait à mettre au point des techniques de mesure suffisamment sensibles, on découvrirait un «monde» de molécules assurant la transmission des signaux cellulaires.

Le fonctionnement des canaux ioniques fut beaucoup étudié dans les années qui suivirent. En 1972, à l'Université de Londres, Bernard Katz et Ricardo Miledi analysèrent statistiquement les variations du potentiel électrique de la jonction neuromusculaire (la synapse entre un neurone moteur et une fibre musculaire), et ils conclurent que les signaux synaptiques étaient de faibles courants électriques, de même amplitude que les courants des canaux artificiels. Cependant B. Katz et R. Miledi ne pouvaient pas mesurer directement les courants élémentaires qui composaient le signal synaptique, car le bruit de fond des techniques de mesure du courant électrique à travers les membranes cellulaires, égal à un dix-millionième d'ampère, était 100 fois plus intense que le courant élémentaire résultant de l'ouverture d'un canal : il masquait ce dernier. Les deux biophysiciens britanniques étaient réduits à déduire les propriétés des canaux ioniques à partir de plusieurs hypothèses.

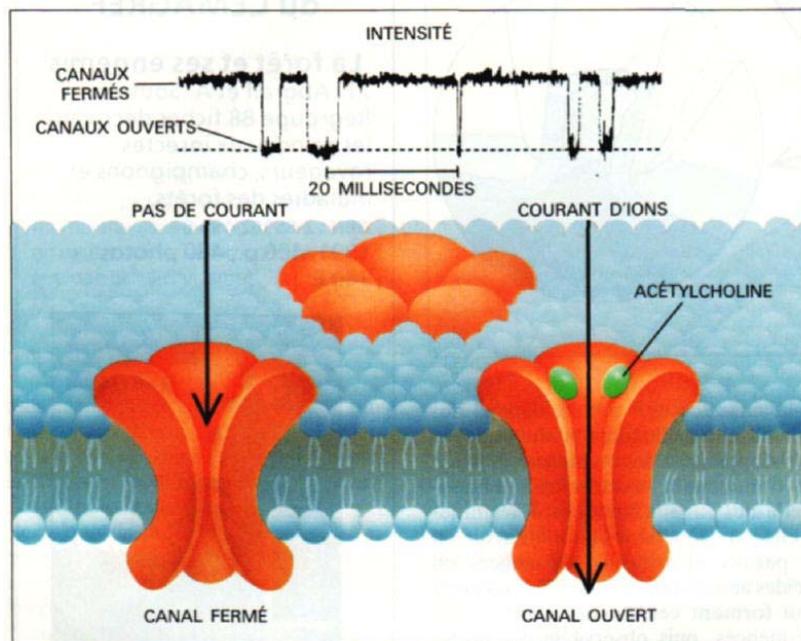
Nous avons voulu réduire ce bruit de fond. Nous savions que, si nous parvenions à isoler un petit morceau de membrane du reste de la cellule, les systèmes électroniques seraient assez sensibles pour détecter le courant associé à un canal ionique unique. Nous avons donc appliqué une micro-pipette en verre sur des fibres musculaires préalablement traitées par des enzymes, espérant que la pipette isolerait quelques canaux ioniques et permettrait ainsi de mesurer des courants élémentaires. Malheureusement les pipettes en verre adhéraient mal à la membrane des cellules ; comme dans les expériences antérieures d'autres chercheurs, l'intérieur de la pipette et le milieu extracellulaire étaient mal isolés électriquement. Néanmoins, en nettoyant soigneusement la surface cellulaire et en améliorant la forme et la taille de la pipette, nous avons finalement détecté des courants élémentaires induits par l'acétylcholine, le neuromédiateur de la jonction neuromusculaire (un neuromédiateur est une molécule qui transmet des signaux nerveux). Nos premières expériences confirmèrent de nombreuses hypothèses sur les courants élémentaires à travers les canaux ioniques, indiquant notamment que ces courants sont des impulsions d'amplitude constante et de durée variable. L'adhérence médiocre de la pipette contre la membrane provoquait initialement un bruit de fond qui nous empêchait d'étudier précisément d'autres canaux que ceux de la jonction neuromusculaire, mais, quelques années plus tard, nous découvrièmes fortuitement qu'une légère aspiration dans la pipette et d'autres modifications de la technique initiale augmentaient la résistance électrique de la jonction pipette-membrane jusqu'à plus d'un milliard d'ohms. En tirant délicatement sur la pipette fixée à la cellule, nous pouvions même détacher de minuscules fragments de membrane pour les étudier isolément. L'enregistrement des courants élémentaires devenait alors très simple.

Les canaux de la jonction neuromusculaire

L'étude de la jonction neuromusculaire des muscles squelettiques révéla alors le rôle précis des canaux ioniques dans la transmission synaptique. À cette jonction, les neurones présynaptiques libèrent de petits paquets (ou «quanta») de molécules d'acétylcholine, lesquelles se lient transitoirement à des récepteurs protéiques spécialisés, situés sur la membrane postsynaptique, où elles déclenchent alors le passage d'un courant transmembranaire. Le courant total est la somme des courants élémentaires circulant à travers des centaines de milliers de canaux.

Pour mesurer ces courants élémentaires, on applique l'extrémité d'une pipette en verre sur la région postsynaptique (la «plaque motrice») d'une fibre musculaire, et l'on isole les canaux récepteurs de l'acétylcholine qui se trouvent dans cette région. Après avoir ajouté de l'acétylcholine dans la solution de la pipette, on enregistre un courant électrique qui oscille entre deux états : en l'absence de potentiel transmembranaire, aucun courant ne passe, car tous les canaux ioniques sont fermés, mais, lorsqu'on applique une différence de potentiel de part et d'autre du fragment de membrane, les canaux s'ouvrent et un courant d'environ 2,5 picoampères apparaît rapidement ; après un délai variable, les canaux se referment et le courant cesse.

Un canal s'ouvre lorsque l'acétylcholine se lie à son récepteur, et il se referme lorsque l'acétylcholine s'en détache. La variabilité des durées d'ouverture et de fermeture du canal résulte du caractère aléatoire des interactions de molécules d'acétylcholine et de récepteurs. L'intensité des courants est caractéristique de la capacité de transport des ions (sodium et potassium dans le cas du canal récepteur de l'acétylcholine). En comparant les prévisions théoriques aux intensités et aux durées des courants, on détermine comment les ions interagissent avec un canal, et comment les neuromédiateurs, liés aux récepteurs, commandent l'ouverture ou la fermeture du canal.



LES CANAUX RÉCEPTEURS de la plaque motrice (la zone de la membrane des cellules musculaires située en face d'une terminaison axonale, à la jonction neuromusculaire) s'ouvrent en réaction à la présence d'un neuromédiateur, l'acétylcholine. En absence d'acétylcholine, aucun courant ne traverse le canal. Quand l'acétylcholine se lie au récepteur, un courant élémentaire de quelques picoampères apparaît. La durée de ces courants et les intervalles entre deux courants successifs varient, parce que les molécules d'acétylcholine se fixent aléatoirement sur les récepteurs.

Les canaux du système nerveux central

Dans les synapses du système nerveux central, les acides aminés comme la glycine, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et le L-glutamate sont les neuromédiateurs qui assurent les communications les plus rapides. Les canaux qui fixent ces neuromédiateurs ont une réaction impulsionnelle qui révèle que leur ouverture et leur fermeture est aléatoire, comme celle des canaux à l'acétylcholine dans la plaque motrice. Toutefois les canaux sensibles aux neuromédiateurs, dans le système nerveux central, sont plus complexes : ils peuvent être partiellement ouverts ou fermés, et se présentent sous des types variés dans les différentes zones cérébrales.

Les animaux sont avantagés si la transmission de l'information est très rapide, du système nerveux central à la plaque motrice. Chez les vertébrés, le transport rapide des signaux est assuré par des axones myélinisés dont les canaux, sensibles aux variations du potentiel transmembranaire, réagissent plus rapidement que les canaux sensibles aux neuromédiateurs. Les canaux sodium sensibles au potentiel assurent la transmission rapide du potentiel d'action dans les neurones. L'analyse des courants élémentaires d'ions sodium indique que ces canaux oscillent entre deux états et conservent une forte probabilité de s'ouvrir après une variation de potentiel. L'influx nerveux est la somme de dizaines de milliers de courants élémentaires d'ions sodium. D'autres canaux sensibles au potentiel laissent passer d'autres ions, comme les ions potassium et calcium ; ils semblent fonctionner comme les canaux sodium et avoir une structure

analogue. Les études de patch-clamp ont révélé les phénomènes moléculaires qui règlent l'activité des canaux sensibles aux neuromédiateurs ou aux potentiels transmembranaires avec une extrême précision. Ainsi, dans presque tous les canaux ioniques étudiés, les réactions élémentaires ne sont pas des impulsions, mais des séries d'impulsions transitoires et rapprochées. Lorsqu'un récepteur fixe l'acétylcholine dans la plaque motrice, par exemple, le canal associé s'ouvre et se ferme plusieurs fois avant que l'acétylcholine ne s'en détache.

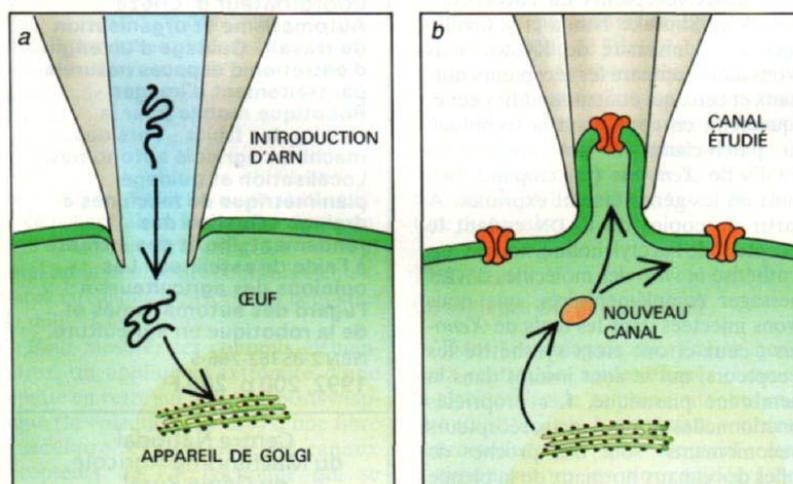
Avec David Colquhoun, de l'Université de Londres, nous avons étudié la nature de ces transitions. En appliquant la théorie des probabilités, nous avons estimé le nombre d'états susceptibles d'être adoptés par un canal récepteur de l'acétylcholine au cours de ces variations de courant, et nous avons calculé les constantes de vitesse de transition entre ces états. Ces études ont indiqué que chaque récepteur possède deux sites de fixation de l'acétylcholine. Lorsque ces deux sites sont occupés par des molécules d'acétylcholine, la probabilité d'ouverture du canal est presque de 100 pour cent. En raison des concentrations élevées en acétylcholine dans la fente synaptique, les canaux de la plaque motrice se comportent comme des «commutateurs» de courant rapides, à déclenchement chimique.

Les canaux membranaires semblent variés : dans un même fragment membranaire, on active souvent au moins deux types de canaux similaires simultanément. Les pharmacologues connaissent depuis longtemps l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs, mais les techniques de recombinaison de l'ADN ont montré que la diversité de ces sous-types était bien plus grande que prévu. Chaque type de canal - sensible à un neuromédiateur ou à un potentiel -comporte plusieurs sous-types, caractérisé chacun par une conductance ou par une cinétique d'ouverture particulière. La répartition des sous-types de canaux, à la surface d'une cellule, dépend des stimuli extracellulaires et du stade de développement des organismes.

Comment la structure tridimensionnelle des canaux ioniques détermine-t-elle leurs fonctions? Pour le savoir, on a parfois identifié les séquences en acides aminés importantes des protéines qui forment ces canaux, modifié ces séquences, puis observé le comportement des canaux ainsi modifiés.

Le récepteur de l'acétylcholine

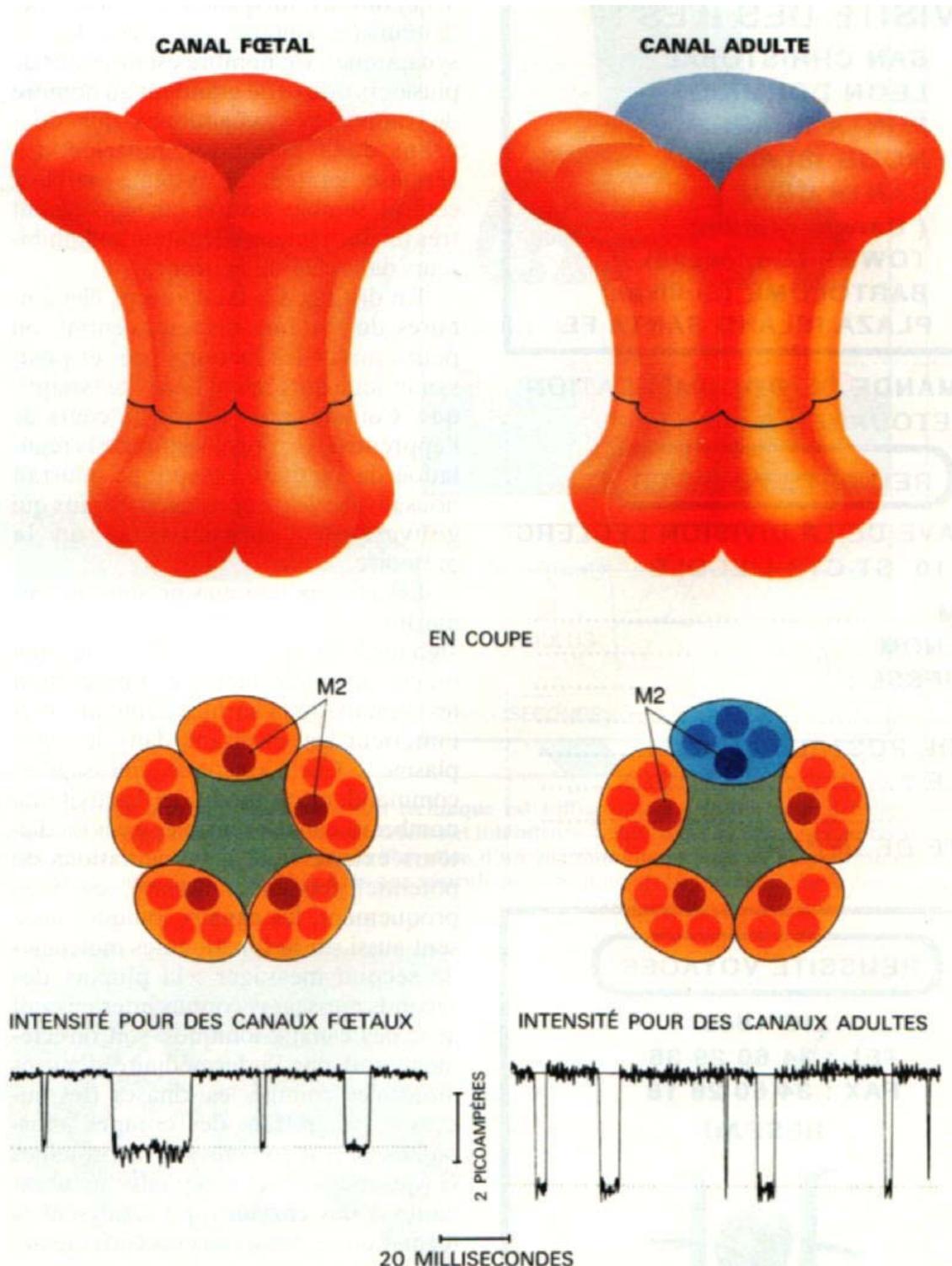
Le clonage et le séquençage de l'ADN codant chaque sous-unité du récepteur de l'acétylcholine, en 1983, permirent l'étude des relations structure/activité des canaux récepteurs de l'acétylcholine. Avec Shosaku Numa et ses collègues de l'Université de Kyoto, nous avons alors comparé les récepteurs normaux et ceux qui étaient modifiés génétiquement, en appliquant la technique du patch-clamp à des membranes d'œufs de *Xenopus* (un crapaud africain) où les gènes étaient exprimés. À partir de copies de l'ADN codant le récepteur de l'acétylcholine, nous avons synthétisé *in vitro* des molécules d'ARN messager complémentaires, que nous avons injectées dans les œufs de *Xenopus* ; ceux-ci ont alors synthétisé les récepteurs, qui se sont insérés dans la membrane plasmique. Les propriétés fonctionnelles de ces canaux récepteurs «recombinants» sont très proches de celles des canaux normaux de la plaque motrice. On a aussi élucidé les différences structurales entre les différents sous-types de canaux de la plaque motrice.



DES ŒUFS de grenouille modifiés génétiquement ont été utilisés pour l'étude du fonctionnement des canaux ioniques. On y a injecté des séquences d'ARN codant différentes sous-unités protéiques des canaux ioniques (a). Ils ont alors synthétisé les canaux ioniques correspondants et les ont insérés dans la membrane plasmique, où on les a étudiés par la technique du patch-clamp (b).

L'enregistrement des courants élémentaires a révélé que les muscles des mammifères possèdent deux sous-types de canaux récepteurs de l'acétylcholine : un sous-type de faible conductance, surtout présent dans les muscles fœtaux et néo-nataux, et un sous-type de forte conductance et de cinétique particulière, présent dans les muscles adultes. Au cours du développement postnatal, le sous-type fœtal est progressivement remplacé par le sous-type adulte, à la suite de modifications dans l'expression des gènes codant les sous-unités de ces canaux. Par des techniques similaires, on a localisé, dans le récepteur de l'acétylcholine, les séquences en acides aminés qui forment la paroi interne du canal transmembranaire. Ce récepteur est formé de cinq sous-unités parallèles les unes aux autres, comme les douves d'un tonneau ; chaque sous-unité est composée de quatre segments transmembranaires nommés M1, M2, M3 et M4.

de deux espèces différentes (les bovins et le poisson-torpille). Le patch-clamp a alors montré que le segment M2 et les régions avoisinantes contiennent des éléments clés pour le transport des ions sodium. Puis, en substituant certains acides aminés de ces régions, par des mutations, nous avons dressé la carte de ces éléments clés. Ces éléments sont trois groupes d'acides aminés chargés négativement, qui forment des anneaux aux extrémités intra- et extracellulaire du canal, et certains acides aminés polaires, qui forment un anneau dans la région transmembranaire proche de l'extrémité intracellulaire (les acides aminés polaires, de charge électrique globalement nulle, présentent deux pôles de charge électrique opposée). Les anneaux négativement chargés déterminent la vitesse et la sélectivité des canaux ioniques : ils laissent passer les ions sodium et potassium, chargés positivement, mais repoussent les ions chlorure, chargés négativement. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'anneau d'acides aminés polaires situé près de l'extrémité intracellulaire du segment M2 forme un goulot d'étranglement dans le canal.



LA STRUCTURE DES CANAUX RÉCEPTEURS de l'acétylcholine dépend de leur fonction. Chaque canal comporte cinq sous-unités, composées chacune de quatre segments transmembranaires. Ses sous-unités sont disposées comme les douves d'un tonneau, avec le segment M2 de chaque sous-unité à l'intérieur du canal. Les récepteurs fœtaux des mammifères, dans la plaque motrice, diffèrent des récepteurs adultes par une des cinq sous-unités. Avec leur segment M2 particulier, les récepteurs fœtaux laissent circuler des courants élémentaires moins intenses.

Enregistrements en potentiel imposé

La technique du patch-clamp sert non seulement à étudier les bases moléculaires du fonctionnement des canaux membranaires, mais aussi à analyser la transmission des signaux à l'échelle cellulaire, lorsqu'on impose (*clamp*, en anglais) la valeur du potentiel transmembranaire. Dans l'étude des petites cellules, cette technique est plus performante que l'utilisation de microélectrodes.

Les enregistrements en potentiel imposé ont fourni des renseignements précieux sur la transmission des signaux dans le système nerveux. C'est en 1949 que Kenneth Cole, du Laboratoire de biologie marine de Woods Hole, mit au point cette technique, qui fut ensuite appliquée à l'étude de l'excitabilité nerveuse par A. Hodgkin et par A. Huxley. On applique un potentiel transmembranaire à l'axone d'un neurone, puis on mesure et on interprète les courants membranaires résultants. Malheureusement la plupart des techniques de mesure en potentiel imposé nécessitent l'introduction d'électrodes métalliques le long d'un axone, ou de deux micro-électrodes au travers de la membrane plasmique, ce qui n'est généralement possible que dans les cellules animales ou végétales les plus grosses. Les cellules des mammifères, dont le diamètre est souvent inférieur à 30 micromètres, résistent mal à l'introduction d'une micro-électrode standard. C'est pourquoi, avant l'utilisation du patch-clamp, on connaissait mieux le potentiel d'action de l'axone géant du calmar que les influx nerveux du cerveau humain, et l'on avait davantage étudié les signaux de l'algue géante que ceux du maïs, du blé ou de la betterave.

L'établissement d'une résistance supérieure à un giga-ohm, entre la pipette de patch-clamp et la membrane cellulaire, ouvrit la voie à l'étude des petites cellules de mammifères ou d'autres espèces : on put détecter les courants élémentaires qui traversent les canaux membranaires et effectuer des enregistrements en potentiel imposé. Pour ces études, la micro-pipette de patch-clamp sert d'abord d'«emporte-pièce» : on rompt le petit fragment de membrane qui est délimité par la pipette, sans affaiblir la liaison entre le verre et la membrane cellulaire, puis on effectue l'enregistrement sur cellule entière» proprement dit, lequel ressemble à un enregistrement classique par une micro-électrode, mais présente l'avantage d'être applicable à de petites cellules et de permettre le contrôle du milieu intracellulaire.

L'enregistrement sur cellule entière s'est rapidement imposé dans la plupart des laboratoires où l'on étudie les cellules de mammifères en culture. On l'a même appliqué aux plaquettes et aux globules rouges humains, dont le diamètre est de quelques micromètres seulement. Ainsi on a étudié la biophysique de la plupart des types cellulaires présentant un intérêt clinique, et l'on a découvert que certaines maladies, telle la mucoviscidose, résultent du dysfonctionnement de certains canaux ioniques. La précision des enregistrements sur cellule entière fut précieuse pour l'étude des signaux électriques du système nerveux central. Les techniques classiques d'enregistrement sont si lourdes qu'on ne les applique souvent qu'à des neurones isolés : l'interprétation biologique des résultats est alors difficile, parce que, lorsque les cellules sont privées de leur environnement naturel, les propriétés des canaux diffèrent de celles qu'ils ont dans les organes intacts. Ces incertitudes sont particulièrement gênantes dans le cas des cellules du système nerveux central, dont l'architecture est complexe et les connexions spécialisées.

Neurones et seconds messagers

Grâce au patch-clamp, nous avons mis au point une méthode d'exploration des cellules entières dans leur environnement nerveux naturel. Nous nous sommes fondés sur des résultats de Per Andersen, de l'Université d'Oslo, et de Tomo Takahashi, de l'Université de Kyoto, qui ont montré comment on pouvait prélever de minces tranches de tissu cérébral d'un centimètre de diamètre environ. On débarrasse la surface des neurones des cellules gliales et d'autres tissus qui y adhèrent en appliquant un microjet de fluide extracellulaire à la surface de la tranche. Puis on applique l'extrémité d'une pipette de patch-clamp sur le corps cellulaire d'un neurone et l'on ôte le fragment de membrane qui obture la pipette pour effectuer l'enregistrement sur cellule entière. La précision des enregistrements est ainsi 10 à 50 fois supérieure à celle des enregistrements réalisés avec des micro-électrodes intracellulaires classiques.

Lorsqu'un neurone présynaptique libère du glutamate ou un autre neuromédiateur, il déclenche le passage des courants excitateurs ou inhibiteurs dans les neurones postsynaptiques. Les courants excitateurs favorisent l'émission d'un potentiel d'action et la libération de neuromédiateurs par le neurone postsynaptique, tandis que les courants inhibiteurs empêchent cette émission et cette libération. L'enregistrement sur cellule entière montre que l'amplitude des courants excitateurs et inhibiteurs varie de façon aléatoire d'une stimulation présynaptique à l'autre : ces courants semblent être la somme de courants élémentaires quasi simultanés, un peu comme ceux qui composent les courants de la plaque motrice. Toutefois, dans le système nerveux central, seuls 20 ou 30 canaux récepteurs postsynaptiques s'ouvrent en réaction à la libération d'un quantum de neuromédiateurs (le contenu d'une vésicule présynaptique). Ce nombre est inférieur de plusieurs ordres de grandeur au nombre de canaux postsynaptiques qui s'ouvrent dans la plaque motrice. La réponse limitée du système nerveux central semble assurer un ajustement très fin des signaux excitateurs et inhibiteurs dans chaque neurone.

En distinguant les courants élémentaires du système nerveux central, on peut étudier les facteurs pré- et postsynaptique qui régulent l'activité synaptique. Comme celle-ci varie au cours de l'apprentissage, l'exploration de la régulation de l'activité synaptique pourrait nous révéler les processus cérébraux qui gouvernent l'apprentissage ou la mémoire.

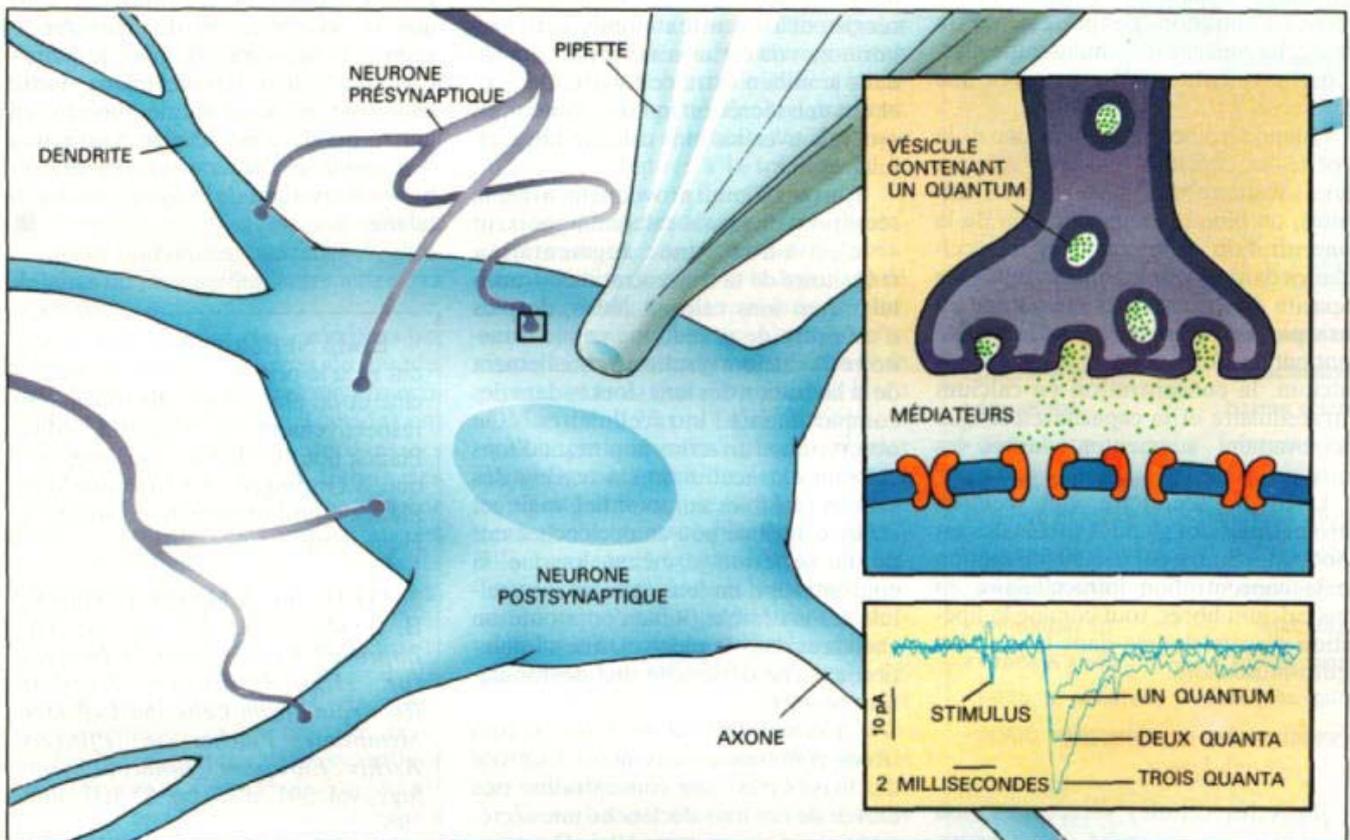
Les canaux ioniques ne sont que les maillons d'une chaîne complexe de signalisation cellulaire, qui met aussi en œuvre des molécules qui transmettent les signaux de la surface cellulaire vers l'intérieur en diffusant dans le cytoplasme. Ces «seconds

messagers» commandent ou modulent l'activité de nombreux canaux sensibles à des médiateurs externes ou à des variations du potentiel transmembranaire, et, réciproquement, les canaux ioniques agissent aussi sur la fonction des molécules de second messenger : la plupart des seconds messagers connus interagissent avec des canaux ioniques, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres molécules comme les kinases (les enzymes qui greffent des groupes phosphates sur les protéines) ou les protéines G (qui couplent les récepteurs membranaires à des enzymes qui catalysent la formation de nombreux seconds messagers). Par exemple, de nombreux canaux potassium des neurones réagissent à la fois au potentiel transmembranaire et à la concentration en ions calcium libres intracellulaires. Quand la concentration en ions calcium intracellulaires est faible, les canaux potassium ne s'ouvrent que lorsque la membrane plasmique se dépolarise beaucoup (quand le potentiel transmembranaire, initialement négatif, s'annule) ; en revanche, quand la concentration en ions calcium est élevée, les canaux s'ouvrent même si la dépolarisation membranaire est modérée, voire si le potentiel reste égal au potentiel de repos.

Les canaux qui transportent spécifiquement les ions calcium sont eux-mêmes commandés par les concentrations en ions calcium. Ils s'ouvrent à la suite d'une dépolarisation, mais certains types se referment lorsque des ions calcium pénètrent dans la cellule. Cette fermeture est une rétro-inhibition qui ajuste les concentrations en calcium libre intracellulaire, l'ion calcium étant un second messenger de nombreuses activités cellulaires.

On comprend qu'un réseau d'interactions mutuelles aussi complexe, avec des rétroactions négatives ou positives, soit difficile à décrypter. Pour préciser le fonctionnement de ce réseau, on a dû enregistrer l'activité électrique des cellules après des stimulations, tout en contrôlant la composition en molécules régulatrices du milieu intracellulaire. L'enregistrement sur cellule entière a notamment permis des modifications à volonté des concentrations en composés intracellulaires variés.

Comme le diamètre de la pipette de patch-clamp est assez large, les molécules diffusent rapidement entre l'intérieur de la pipette et l'intérieur de la cellule. Cette diffusion fut initialement gênante et, au cours des premières expériences, certains mécanismes de régulation disparaissaient totalement : de nombreux régulateurs se diluaient dans le liquide de la pipette de mesure, dont le volume était bien supérieur à celui des cellules ; seuls certains canaux très résistants gardaient leur intégrité fonctionnelle. Après plusieurs années de tâtonnements, on a identifié la composition du liquide qui, placé dans la pipette, respecte les propriétés fonctionnelles des différents types de canaux. On a alors progressivement déterminé le réseau d'interactions entre les récepteurs, les seconds messagers et les canaux ioniques, et l'on a reconstitué certaines voies de signalisation cellulaire.



L'ENREGISTREMENT SUR CELLULE ENTIÈRE, avec une pipette de patch-clamp au lieu d'une micro-électrode classique, a révolutionné l'étude des cellules de mammifères. On peut analyser des tranches minces de tissu nerveux où les neurones conservent leurs connexions naturelles. La technique est suffisamment sensible pour détecter les courants excitateurs et inhibiteurs induits dans les neurones postsynaptiques par la libération d'un quantum (un paquet) de neuromédiateurs stockés dans une vésicule présynaptique (voir les cartouches à droite).

Le rôle des ions calcium

Très souvent, les canaux ioniques transmettent des signaux en modifiant la concentration intracellulaire en ions calcium. Pour comprendre comment ce signal déclenche des réactions cellulaires, nous avons commencé par étudier le rôle des ions calcium sur la sécrétion cellulaire. Pour mener à bien cette étude, nous devons mesurer simultanément les courants ioniques, la concentration intracellulaire en ions calcium libres et la sécrétion d'une cellule isolée. Aussi avons-nous combiné l'enregistrement sur cellule entière avec une mesure de la concentration en ions calcium fondée sur l'utilisation d'un colorant dont la fluorescence change quand il se lie au calcium (le fura-2) : l'intensité de la fluorescence indiquait la concentration en ions calcium libres.

Le patch-clamp sur cellule entière révélait à la fois l'intensité des courants ioniques et l'activité sécrétoire. En effet, la sécrétion cellulaire nécessite la fusion des vésicules de stockage intracellulaires avec la membrane plasmique, avant l'expulsion du contenu de ces vésicules dans le milieu extérieur. Au cours de ce processus d'exocytose, les membranes vésiculaires s'incorporent à la membrane plasmique, dont la surface augmente ; cette augmentation modifie la capacité électrique de la membrane, proportionnelle à la surface membranaire. Les systèmes de mesure de la capacité électrique membranaire sont suffisamment sensibles pour détecter les modifications, même minimales et transitoires, qui résultent de la fusion d'une seule vésicule avec la membrane plasmique. Dans de nombreux types cellulaires, on utilise ces systèmes pour corrélérer l'activité sécrétoire avec la concentration en ions calcium intracellulaires et avec les courants ioniques.

La sécrétion es cellules chromaffines

Nous avons ainsi étudié les cellules chromaffines des glandes surrénales, qui sécrètent l'adrénaline et la noradrénaline (deux hormones) en cas de stress. Nos premières études montraient que les cellules chromaffines possèdent des canaux calcium sensibles au potentiel, semblables à ceux des neurones. Quand on stimule ces cellules par une décharge électrique ou par des molécules d'acétylcholine, les canaux calcium s'ouvrent et la concentration en ions calcium intracellulaires augmente, comme l'indiquent les variations de fluorescence du fura-2. La capacité de la membrane plasmique augmente aussi, ce qui révèle une exocytose. Quand on place dans la solution de la pipette un chélateur des ions calcium (une substance qui piège les ions calcium), on bloque l'augmentation de la concentration en ions calcium intracellulaires dans la cellule chromaffine, et la capacité électrique de la membrane ne varie pas. En revanche, quand la pipette contient une forte concentration en ions calcium, la concentration en calcium intracellulaire et la capacité électrique membranaire augmentent toutes les deux. L'activité sécrétoire des cellules chromaffines des glandes surrénales est donc commandée par une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium libres, tout comme la libération d'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire.

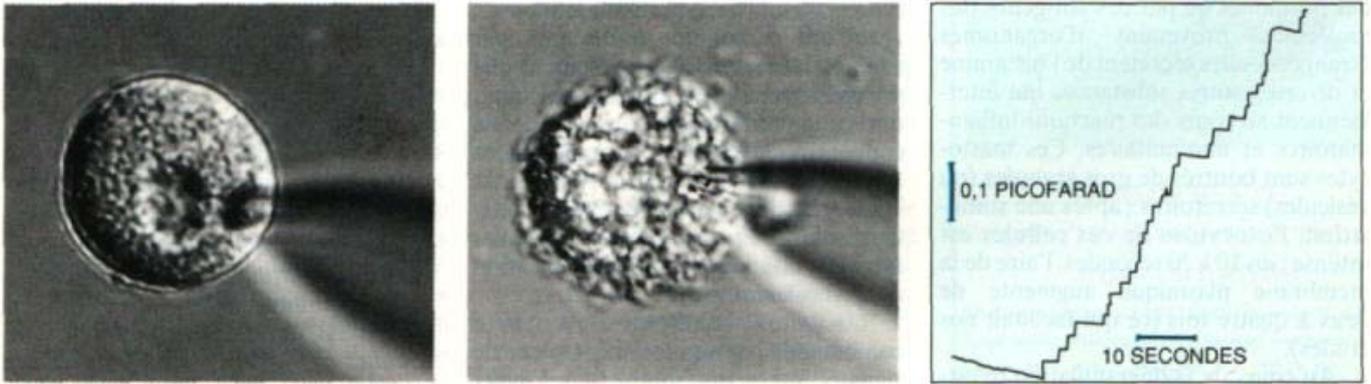
Sécrétion des mastocytes et signal calcium

Dans les cellules sécrétoires non excitables, en revanche, nous avons découvert une relation étonnante entre l'activité sécrétoire et les ions calcium intracellulaires. Nous avons surtout étudié les mastocytes du tissu conjonctif. Lorsque ces cellules sont stimulées par des hormones ou par des antigènes (les molécules provenant d'organismes étrangers), elles sécrètent de l'histamine et diverses autres substances qui interviennent au cours des réactions inflammatoires et immunitaires. Ces mastocytes sont bourrés de gros granules (ou vésicules) sécrétoires ; après une stimulation, l'exocytose de ces cellules est intense : en 10 à 20 secondes, l'aire de la membrane plasmique augmente de deux à quatre fois (ce qui facilitait nos études). Au cours de la dégranulation (c'est-à-dire la libération par exocytose du contenu des granules de stockage), la capacité électrique des mastocytes augmente par paliers qui correspondent chacun à la fusion d'un granule avec la membrane plasmique. Toutefois ces paliers ne sont pas uniformes : leur amplitude, qui varie autour d'une valeur moyenne, dépend de la taille des différents granules. Dans les mastocytes, l'augmentation de la concentration en ions calcium ne déclenche pas de sécrétion, contrairement à ce qui se passe dans les cellules excitables.

Nous avons donc d'abord pensé que cette observation était un artefact dû à la dilution de molécules essentielles, puis nous avons compris que les mastocytes réagissent à un autre stimulus : certaines hormones ou certains antigènes, ajoutés dans le milieu extracellulaire, déclenchent une sécrétion intense, seuls ou en synergie avec les ions calcium intracellulaires. Tous ces stimuli provoquent, avant la sécrétion, un signal calcium important - c'est-à-dire une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en ions calcium libres, de plus d'un ordre de grandeur ; ce pic transitoire de calcium résulte essentiellement de la libération des ions stockés dans des compartiments intracellulaires. On observe aussi un afflux important d'ions calcium extracellulaires à travers des canaux sensibles au potentiel, mais cet afflux contribue peu au déclenchement de la sécrétion : même lorsque la concentration en ions calcium intracellulaires est faible (lorsqu'on ajoute un chélateur dans la pipette), une stimulation externe déclenche une dégranulation normale.

La concentration en ions calcium libres commande néanmoins l'activité des mastocytes : une concentration très élevée de ces ions déclenche une sécrétion, après un certain délai. De nombreux chercheurs ont ainsi décrit une activité sécrétoire des mastocytes après une injection intracellulaire d'ions calcium ou après une addition de molécules qui induisent l'entrée d'ions calcium dans la cellule. En outre, après une stimulation hormonale, par exemple, les mastocytes présentent une sensibilité supérieure aux ions calcium : une augmentation ultérieure de la concentration en ions calcium accélère leur dégranulation. En réalité, la sécrétion des mastocytes est probablement déclenchée par de multiples facteurs, dont l'un est la concentration en ions calcium. L'activité sécrétoire est ainsi commandée par un réseau complexe de signaux interactifs, semblables à ceux qui modulent les canaux ioniques. Dans les deux cas, les signaux élémentaires sont identiques : le plus souvent, ce sont des ions calcium (surtout dans les neurones et dans d'autres types cellulaires), des seconds messagers, des kinases et probablement des protéines G. Cependant on commence tout juste à comprendre les

interactions qui règlent l'activité sécrétaire, alors que celles qui régissent les canaux ioniques sont beaucoup mieux connues, essentiellement grâce à la technique du patch-clamp.



CE MASTOCYTE (à gauche) sécrète de l'histamine et d'autres composés en réaction à un stimulus appliqué par une pipette de patch-clamp (au centre). Grâce à cette technique, on mesure les modifications de la capacité électrique membranaire qui résultent de la fusion d'une vésicule sécrétaire avec la membrane plasmique. Chaque fusion provoque un nouveau palier de la capacité membranaire (à droite).

L'extrême sensibilité de la technique du patch-clamp a révélé les bases moléculaires du fonctionnement des canaux ioniques. Elle a aussi permis l'étude des petites cellules de mammifères, ainsi que la reconstitution de leurs mécanismes de signalisation, grâce à la maîtrise du milieu intracellulaire. Cette technique est aussi simple à mettre en œuvre qu'elle s'est révélée fructueuse. À l'avenir, elle devrait encore révéler bien des mystères de la signalisation cellulaire.

ERWIN NEHER ET BERT SAKMANN ont reçu le prix Nobel 1991 de médecine et de physiologie. Ils travaillent respectivement à l'Institut Max Planck pour la chimie et la biophysique, à Göttingen, et à l'Institut Max Planck pour la recherche médicale, à Heidelberg.

O.P. HAMIL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN & E.J. SIGWORTH, Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches in *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, vol. 391, n° 2, pp. 85-100, août 1981.

REINHOLD PENNER ET ERWIN NEHER, The Patch-Clamp Technique in the Study of Secretion in *Trends in Neurosciences*, vol. 12, n° 4, pp. 159-163, avril 1989.

F.A. EDWARDS, A. KONNERTH, B. SAKMANN & T. TAKAHASHI, A Thin Slice Preparation for Patch-Clamp Recordings from Neurons of the Mammalian Central Nervous System in *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, vol. 414, n° 5, pp. 600-612, 1er septembre 1989.

NIGEL UNWIN, The Structure of Ion Channels in Membranes of Excitable Cells in *Neuron*, vol. 3, n° 6, pp. 665-676, décembre 1989.

W. STÜHMER, Structure-Function Studies of Voltage-Gated Ion Channels in *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 20, pp. 65-78, 1991.

La technique du patch-clamp fut mise au point en deux temps. La première étape, accomplie au milieu des années 1970 par Erwin Neher et Bert Sakmann, a conduit à la publication, en 1976, des premiers enregistrements de courants élémentaires dans des canaux ioniques d'une membrane biologique.

La deuxième étape, également due aux équipes des deux lauréats du prix Nobel, fut l'établissement d'une version plus puissante et plus facile d'emploi de la méthode initiale. Après la présentation de la seconde version, dans un article publié en 1981, le patch-clamp a été rapidement utilisé dans les laboratoires de biologie du monde entier, et a permis une série de découvertes décisives concernant le mode de fonctionnement de toutes sortes de cellules animales (nerveuses, musculaires, glandulaires ou sensorielles, entre autres) et végétales.

Ces avancées ont été accomplies par de très nombreuses équipes du monde, mais la France et les autres pays francophones (Belgique, Suisse, Canada) ont pris une part si importante dans ces développements, dès le début des années 1980, qu'il paraît impossible de dresser une liste des contributions les plus remarquables sans pratiquer des choix arbitraires.

Au point de vue thématique, on assiste depuis quelques années à une nouvelle concentration des efforts de nombreuses équipes pour l'étude des mécanismes de communication synaptique dans le cerveau. Cette évolution récente succède à une tendance

inverse vers la diversification, au cours des années 1980, pendant lesquelles la plupart des types cellulaires des mammifères ont été examinés par la nouvelle technique. Plusieurs éléments se conjuguent pour favoriser la réorientation actuelle de nombreux laboratoires utilisant les techniques de patch-clamp (dont le nôtre) vers le cerveau.

Tout d'abord, des méthodes simples de préparation de tranches cérébrales et d'adaptation à ces préparations de l'enregistrement de cellule entière ont été établies, notamment dans le laboratoire de B. Sakmann. Deuxièmement des techniques complémentaires d'enregistrement de signaux calciques par des sondes fluorescentes ont été mises au point au cours des années 1980. La combinaison de mesures de courants et de mesures de signaux calciques devrait permettre des progrès rapides dans l'étude des propriétés de petits réseaux neuronaux à l'intérieur de tranches cérébrales.

Enfin l'expérience acquise au cours des années 1980 sur des cellules isolées devrait être utile pour l'étude, par la technique du patch-clamp, des fonctions neuronales impliquant des messagers intracellulaires.

Comme il est expliqué dans l'article de E. Neher et B. Sakmann, les biologistes ont progressivement appris à composer avec les phénomènes de diffusion d'ions ou de molécules entre le milieu intracellulaire et la pipette d'enregistrement, notamment en ajoutant des facteurs solubles appropriés à la solution de la pipette.

Une autre possibilité a été récemment mise au point dans notre laboratoire : au lieu de rompre le fragment de membrane sur lequel repose la pipette, on le perméabilise en ajoutant des canaux ioniques exogènes à l'aide de la pipette (voir J. Gen. Physiol., par Horn et Marty, vol. 92, pp. 145-159, 1988) ; le «patch perforé» ainsi obtenu permet d'établir une connexion électrique entre la pipette et la cellule sans laisser diffuser les cofacteurs solubles hors de la cellule. Les canaux exogènes que nous utilisons sont des canaux nystatine (un antibiotique-antifongique utilisé en dermatologie et pour aseptiser les cultures de cellules), dont le diamètre, égal à 0,8 nanomètres, ne laisse passer que les composés de masse moléculaire inférieure à 1 000 environ. Ils agissent ainsi comme des tamis moléculaires.

La technique du patch-clamp a été conçue pour résoudre des problèmes précis concernant la biophysique des canaux ioniques, mais il se trouve que les solutions adoptées se sont révélées utiles à une série de problèmes qui n'avaient pas grand-chose à voir avec le but initial. Le champ d'application du patch-clamp s'étend aujourd'hui en dehors de la recherche fondamentale au sens strict, dans la mesure où un certain nombre de compagnies pharmaceutiques (notamment les Sociétés Rhône-Poulenc, Servier et Synthelabo, en France) l'utilisent en vue de la mise au point de nouveaux médicaments. Le patch-clamp permet, en effet, d'établir une pharmacologie extrêmement précise de drogues qui interfèrent avec les systèmes de transfert d'information entre les cellules.

Alain MARTY École Normale Supérieure, Paris