

I. Formalisme

II. Méthodes d'études électrophysiologiques des canaux ioniques

1) Généralités sur la membrane biologique et les canaux ioniques

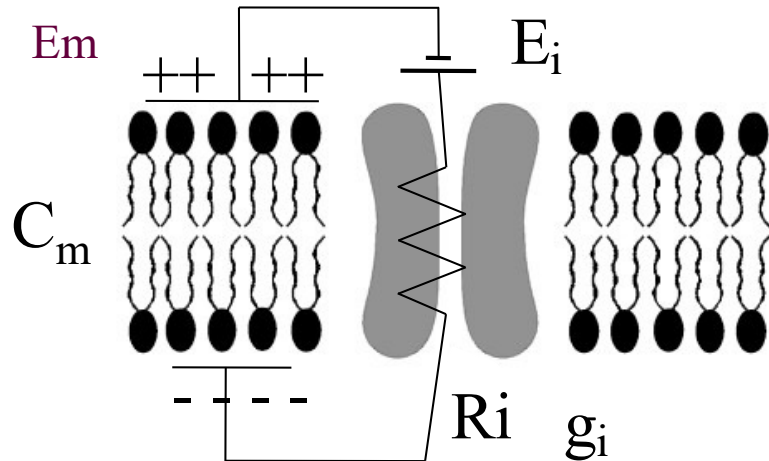
2) Les méthodes d'études électrophysiologiques des canaux ioniques
le patch clamp, le voltage clamp, méthode de la double électrode
les bicouches lipidiques planes, le patch perforé
méthodes adaptées aux canaux recombinants (in vivo et in vitro)

3) Les paramètres d'études des canaux ioniques

la nature de la stimulation qui contrôle l'équilibre entre états
conductance
sélectivité
cinétique
pharmacologie

III- Etude de quelques grandes familles de canaux ioniques

La membrane biologique a les propriétés d'un circuit électrique



Circuit équivalent:

la membrane a des propriétés électriques similaires à celles d'un circuit électrique doté d'une résistance électrique R ($1/g$), d'une capacité électrique C et d'une pile qui est la force électromotrice ΔE ($E_m - E_i$)

$$g = 1/R$$

la conductance membranaire traduit la facilitation du passage des ions
unité: pS

$$C_m = \Delta Q / E_m$$

la capacité membranaire traduit la faculté de la membrane plasmique à accumuler des charges unité F

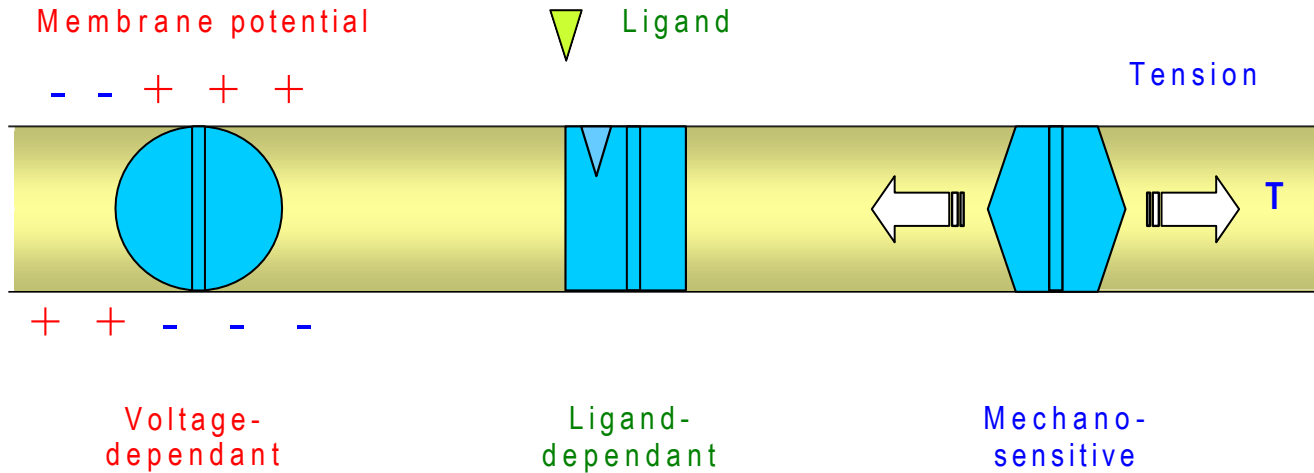
Dans un circuit électrique métallique le courant est porté par les électrons

Dans une membrane il sera porté par des ions

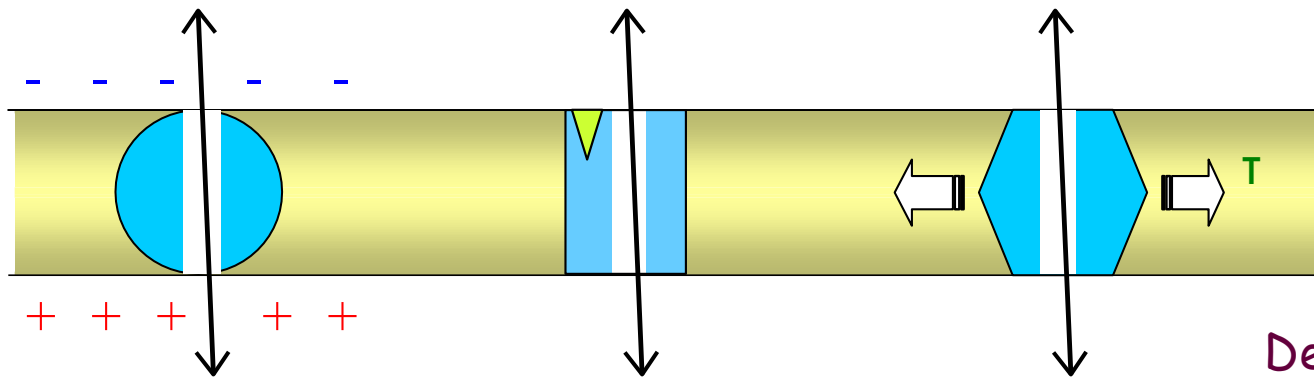
$I = -$ quantité d'é déplacés par unité de temps et $I > 0$ désigne le sens inverse de celui des électrons

Trois grandes catégories de canaux ioniques

A



B



Il manque une catégorie laquelle ?

I. Formalisme

II. Méthodes d'études électrophysiologiques des canaux ioniques

1) Généralités sur la membrane biologique et les canaux ioniques

2) Les méthodes d'études électrophysiologiques des canaux ioniques le patch clamp, le voltage clamp, méthode de la double électrode les bicouches lipidiques planes, le patch perforé méthodes adaptées aux canaux recombinants (in vivo et in vitro)

3) Les paramètres d'études des canaux ioniques

la nature de la stimulation qui contrôle l'équilibre entre états

conductance

sélectivité

cinétique

pharmacologie

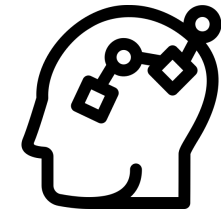
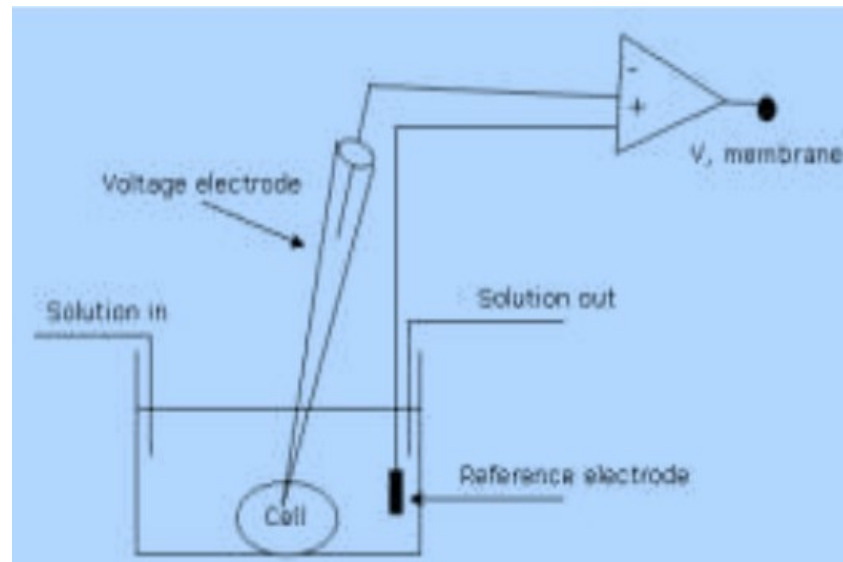
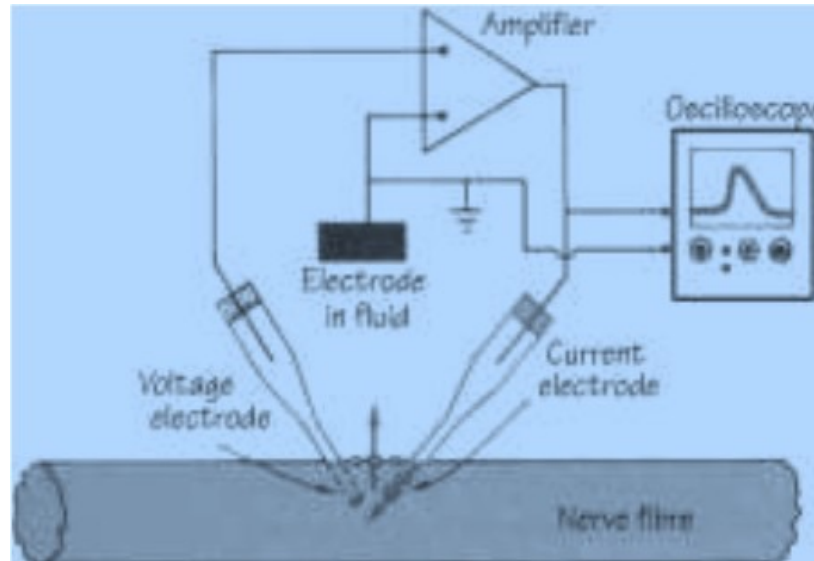
III-Etude de quelques grandes familles de canaux ioniques

La double micro-électrode et le principe du potentiel imposé (voltage clamp)
Mesure de I macroscopique (mA)

Les Années 50
Hodgkin et Huxley

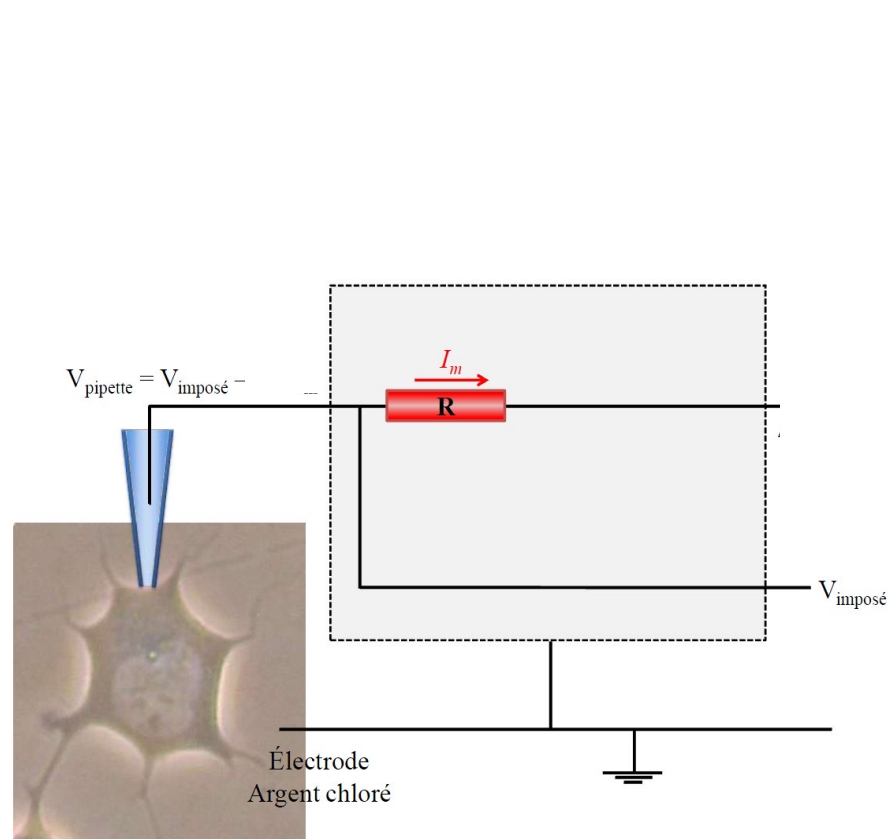
Le patch-clamp qui utilise aussi le principe du potentiel imposé
Mesure de I microscopique (pA)

Les Années 80
Neher et Sackman

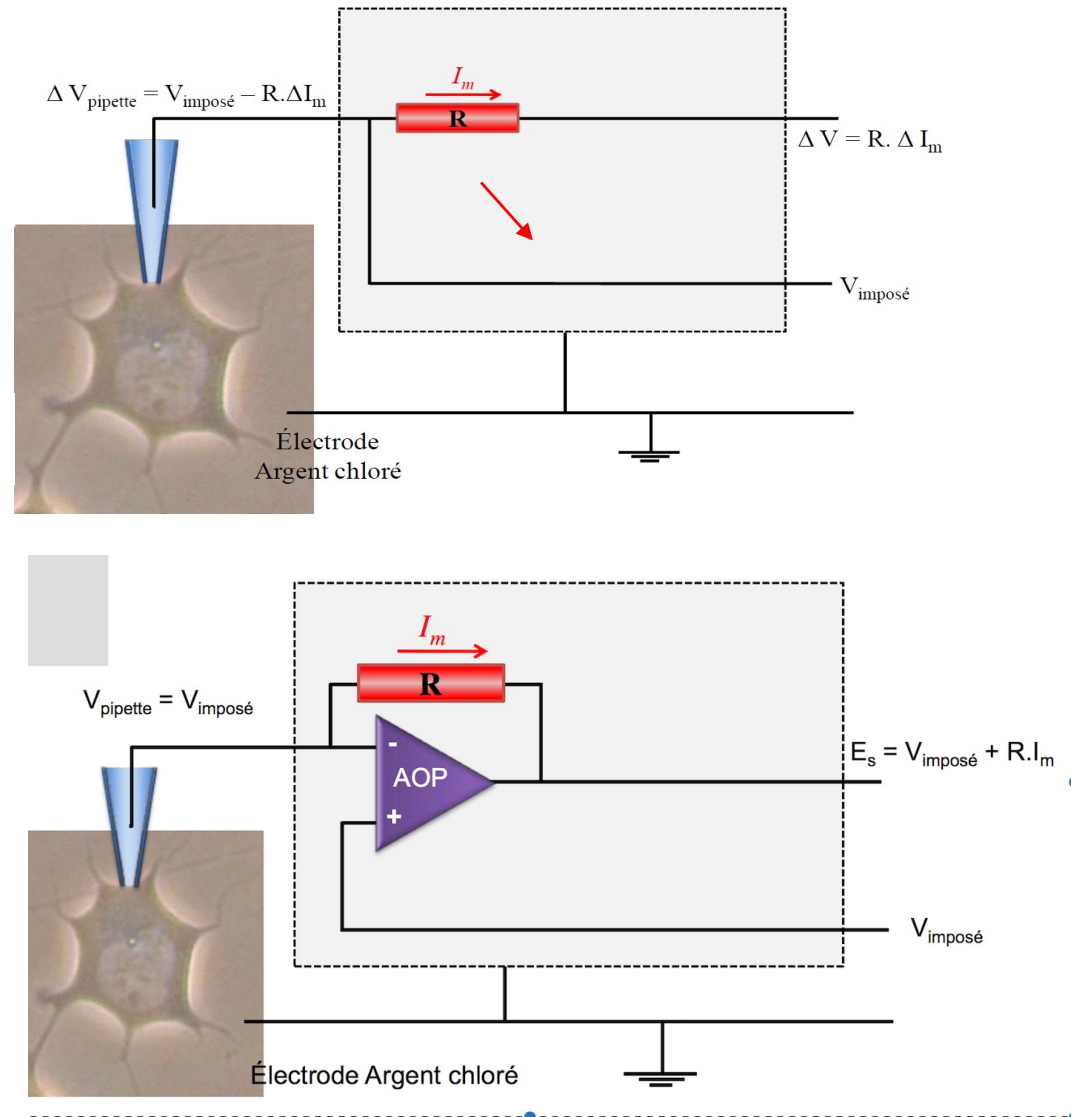


Deux lois en électricité

La technique du patch exploite le principe du potentiel imposé (voltage clamp)

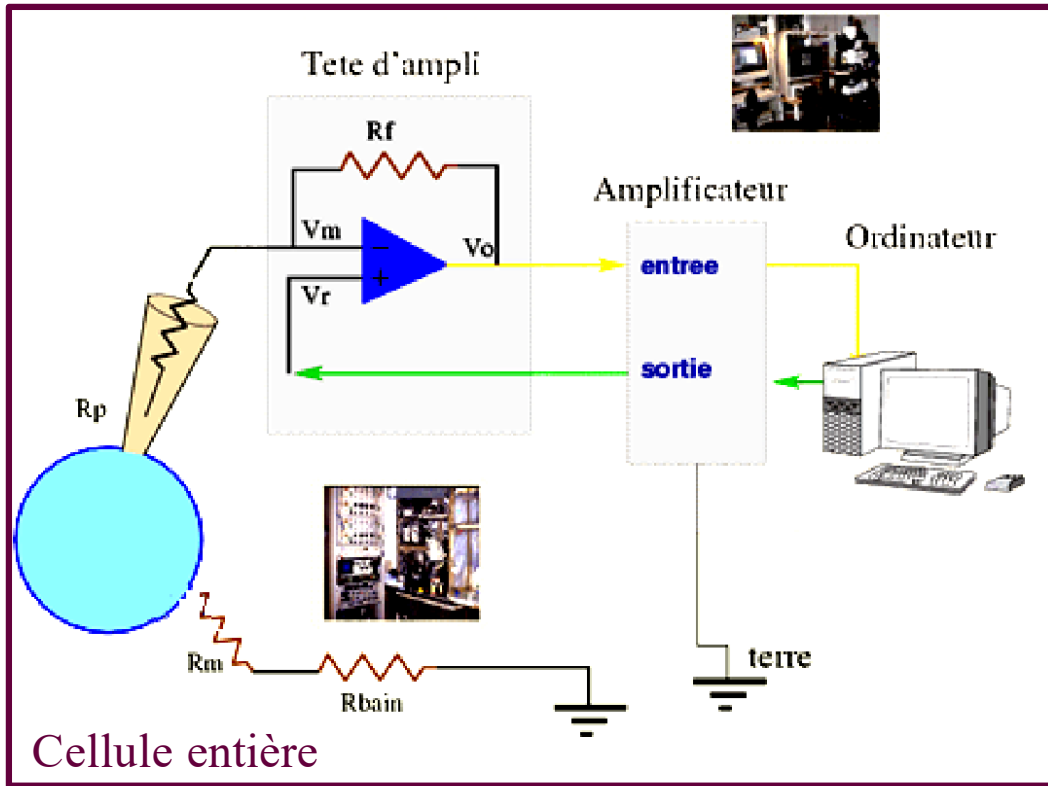


Cellule attachée



La technique du patch clamp

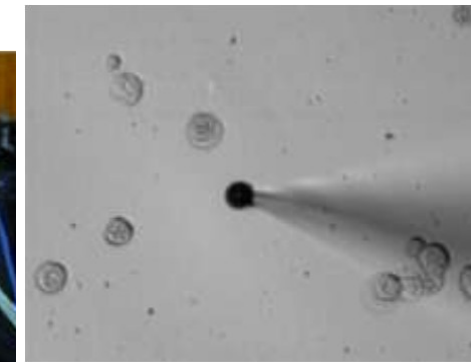
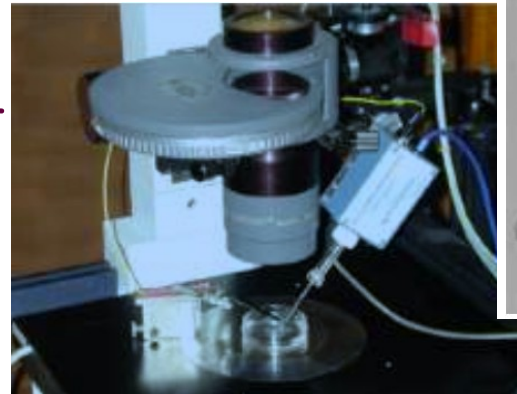
Circuit électrique



Cuvette, micromanipulateur et Microscope sur table anti-vibration sur coussin d'air et cage de faraday

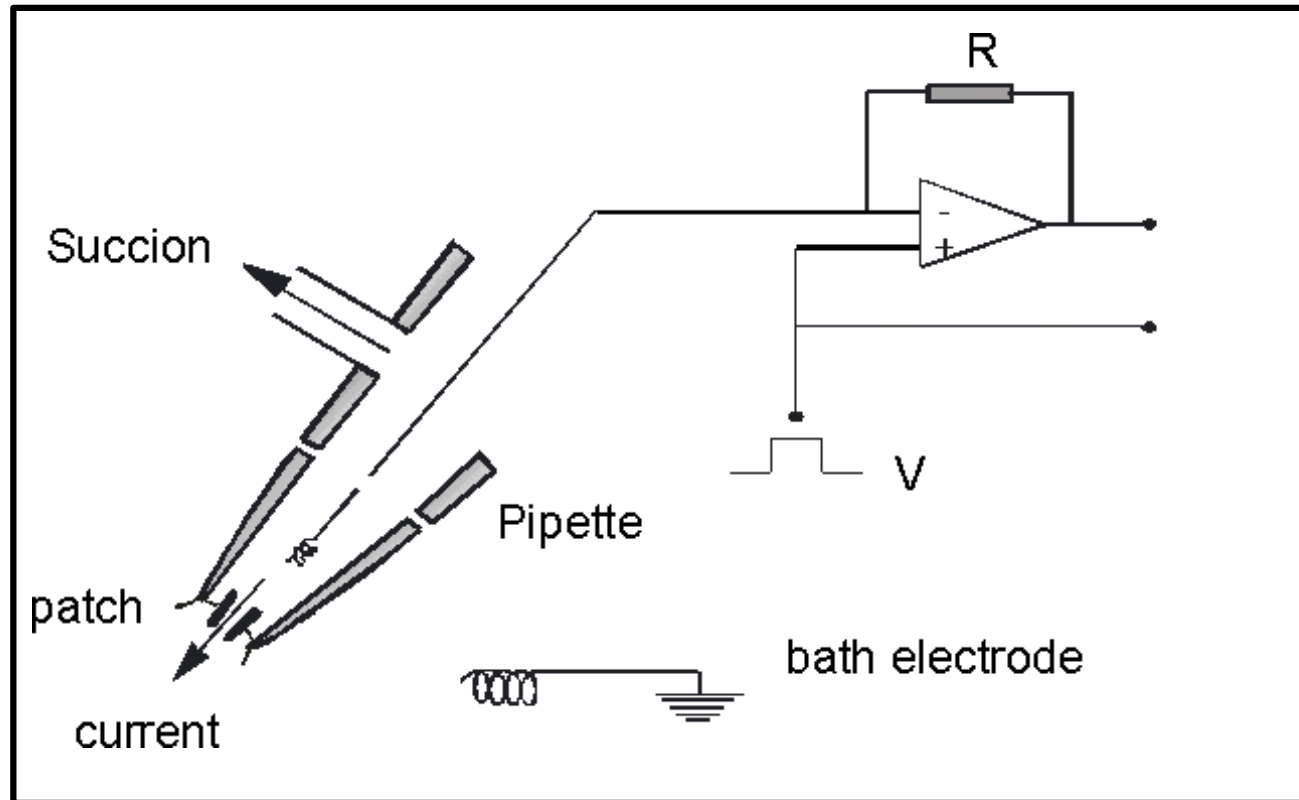
Les électrodes métalliques de chlorure d'argent : des interfaces de relai entre ions et électrons

Au niveau de l'électrode , $e^- Ag^+Cl^- \rightarrow Ag + Cl^-$
 Au niveau de la solution $Cl^- Ag^+ \rightarrow Ag^+Cl^- + e^-$



La technique du patch clamp

La réalisation d'un giga-seal

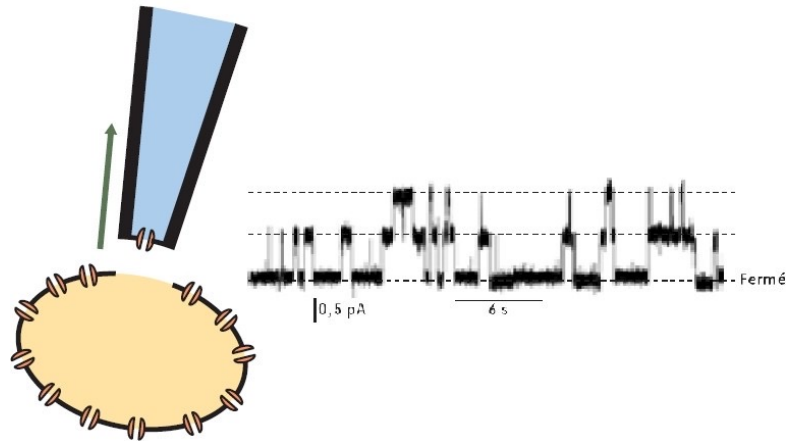


Résistance du scellement très fort 10^{10} ohm

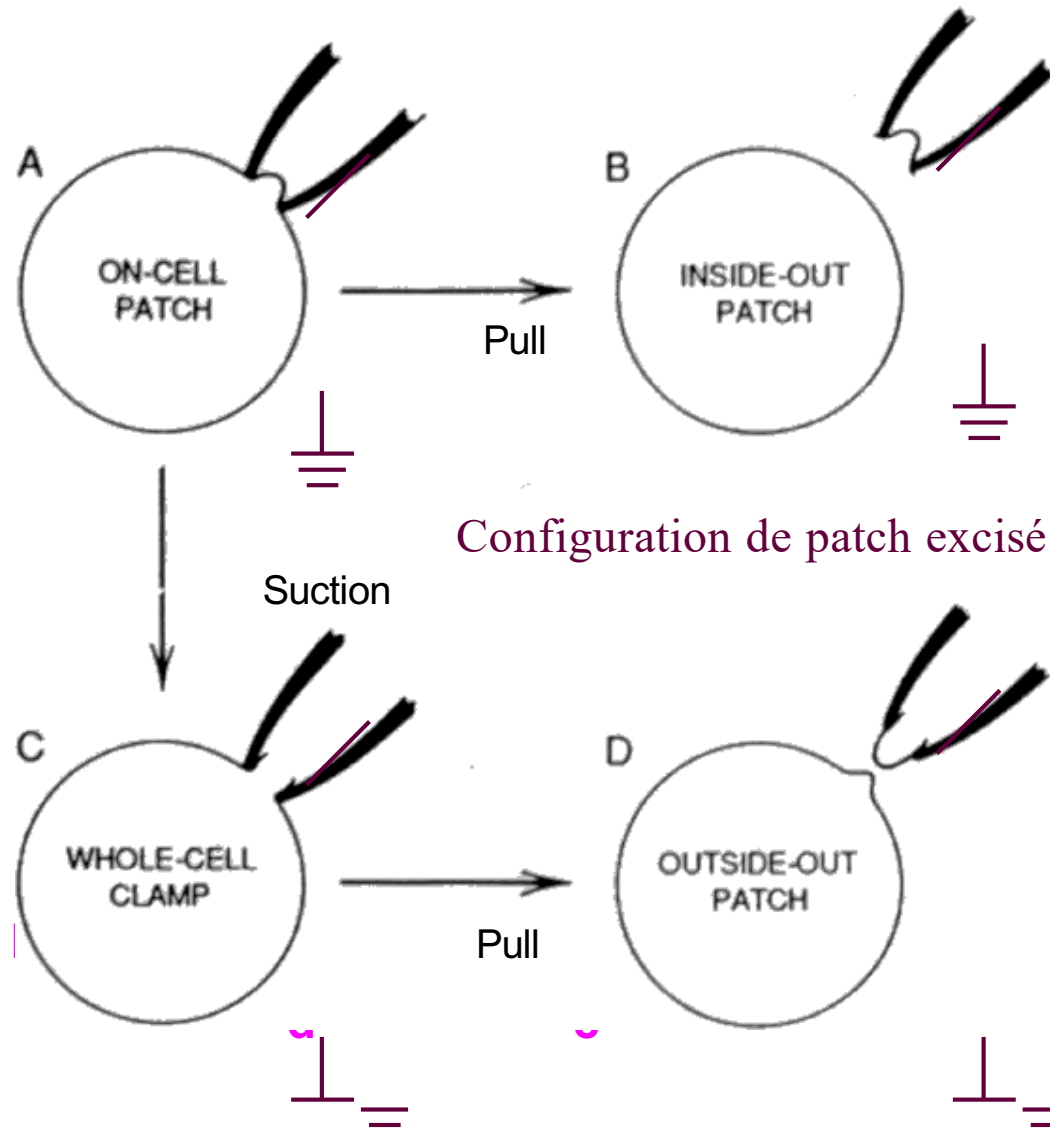
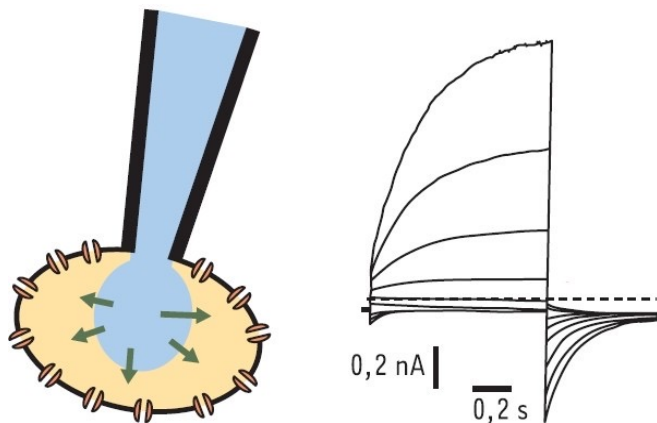
Comment sait on que le giga seal est réalisé?

La technique du patch clamp plusieurs configurations

Patch excisé inside-out patch



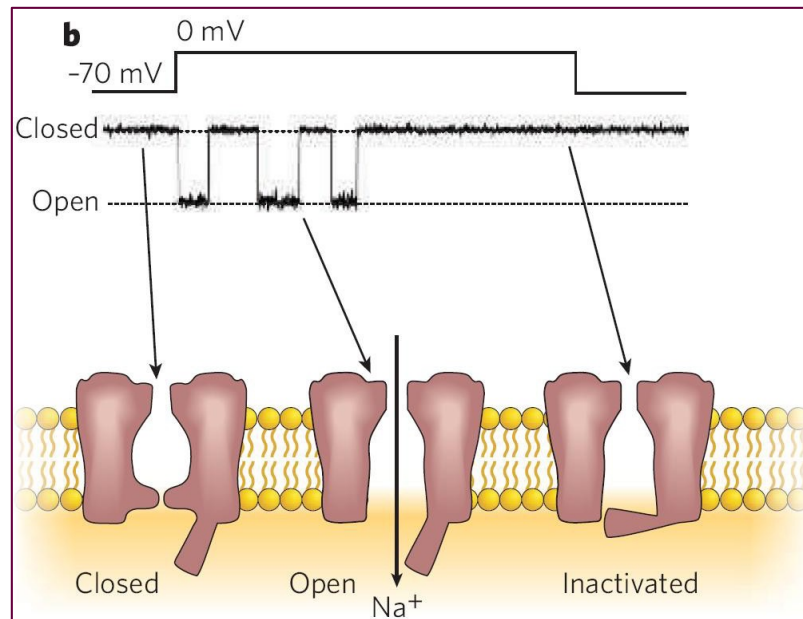
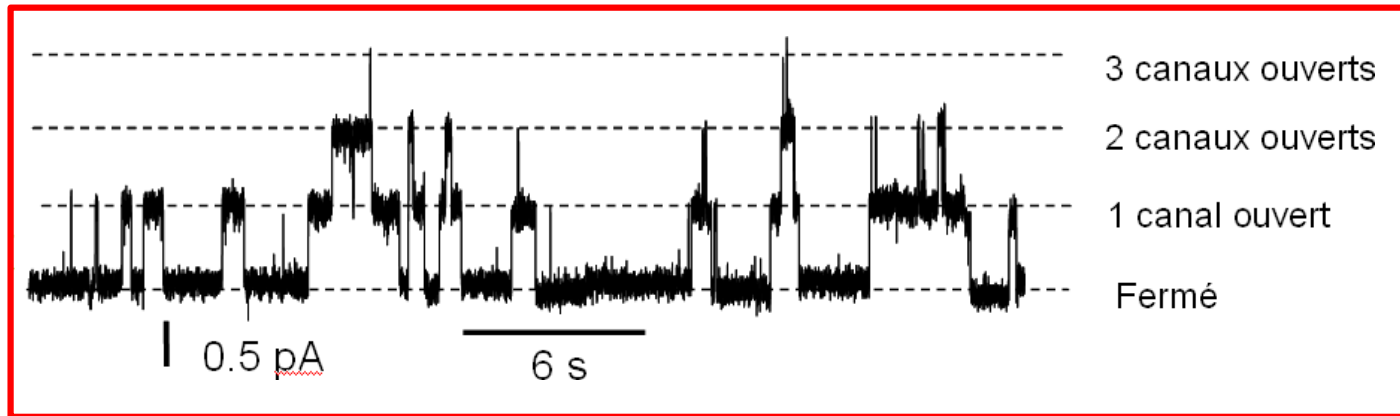
Cellule entière



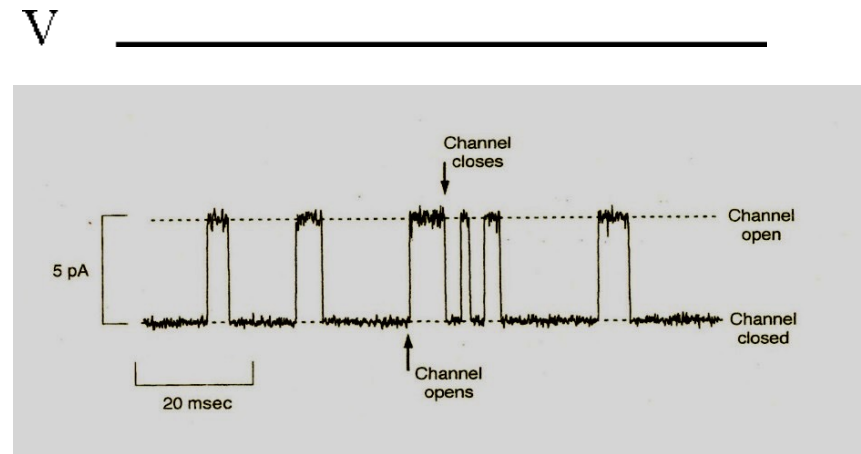
From Hamill *et al.*, 1981. *Pflugers Arch.*

La technique du patch clamp

Les signaux de courants unitaires enregistrés

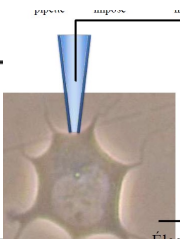
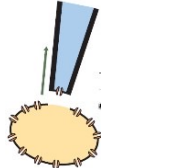
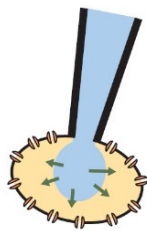
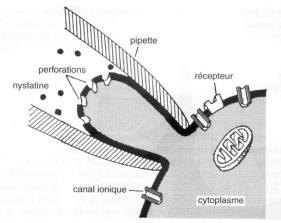


Exemple du canal voltage dépendant sodique



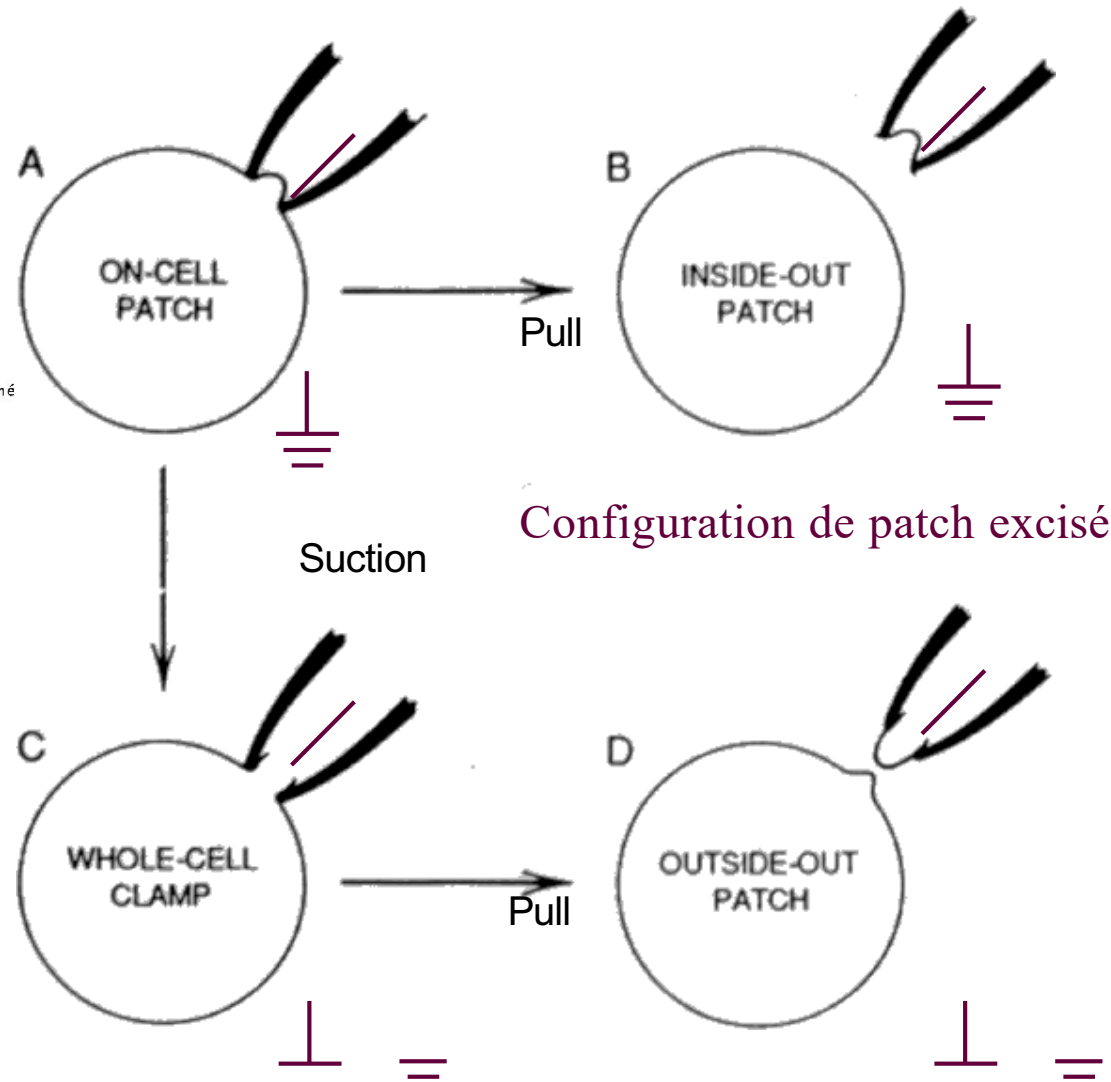
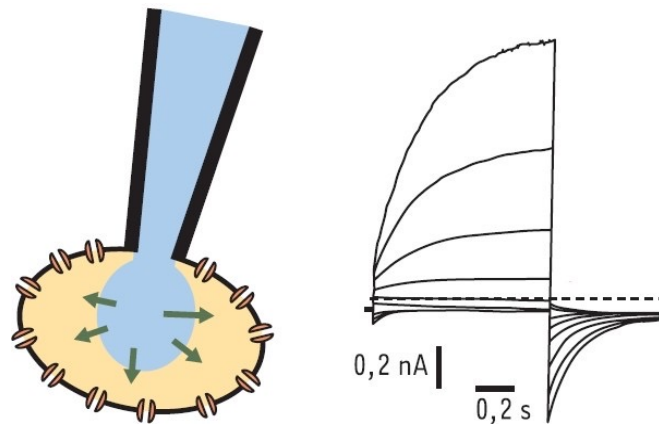
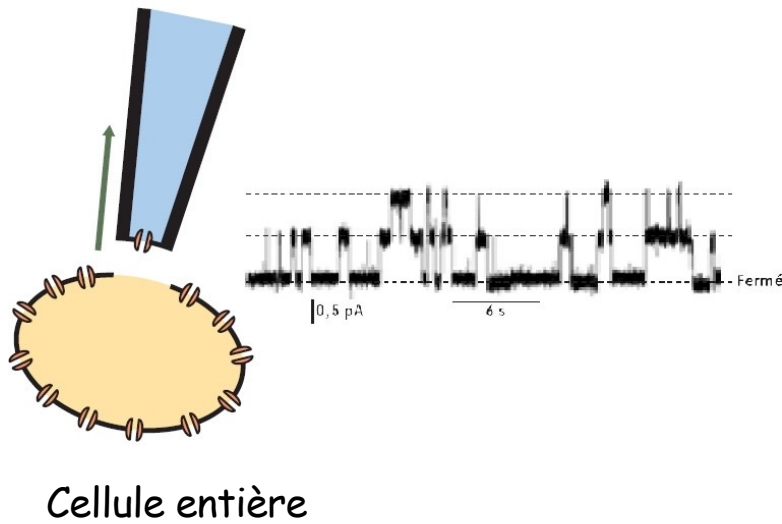
A permis l'étude des courants unitaires
A validé l'existence entre deux états
A permis l'étude des petites cellules

Avantages et inconvénients des différentes configurations du patch clamp

Configurations	Avantages	Inconvénients
<p><i>Cellule-attachée</i></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu interne de la cellule conservé - Mesure de courant unitaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Potentiel transmembranaire inconnu - Milieu interne non contrôlé
<p><i>Patch excisé</i></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieux interne et externe parfaitement contrôlés - Mesure de courant unitaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte d'éventuels facteurs régulateur du canal
<p><i>Cellule-entière</i></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu externe parfaitement contrôlé - Milieu interne relativement bien contrôlé - Mesure d'un courant global 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal
<p><i>Patch perforé</i></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule moins abîmée - Milieu interne de la cellule préservé - Mesure d'un courant global - Milieu externe parfaitement contrôlé 	<ul style="list-style-type: none"> - La perforation est lente - Mise au point nécessaire pour certaines cellules - Milieu interne non contrôlé

La technique du patch clamp plusieurs configurations

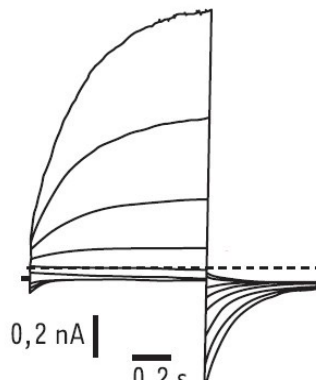
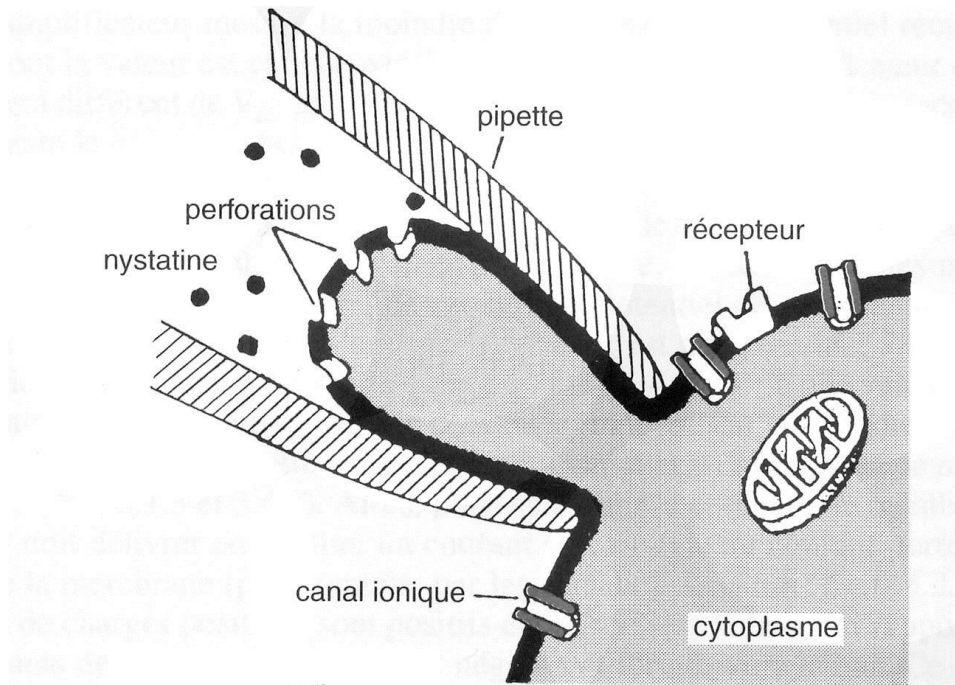
Patch excisé inside-out patch



From Hamill *et al.*, 1981. *Pflugers Arch.*

Le patch perforé

Variante de la configuration de la cellule attachée

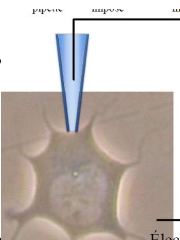
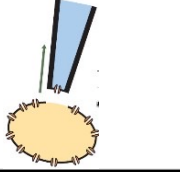
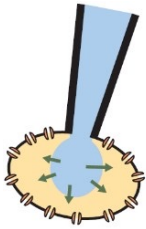
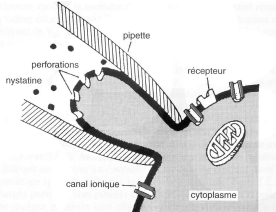


Intérêt: Conserve le milieu intracellulaire avec les messagers secondaires **Avantage de la configuration cellule entière sans dilution du milieu**

Comment ?

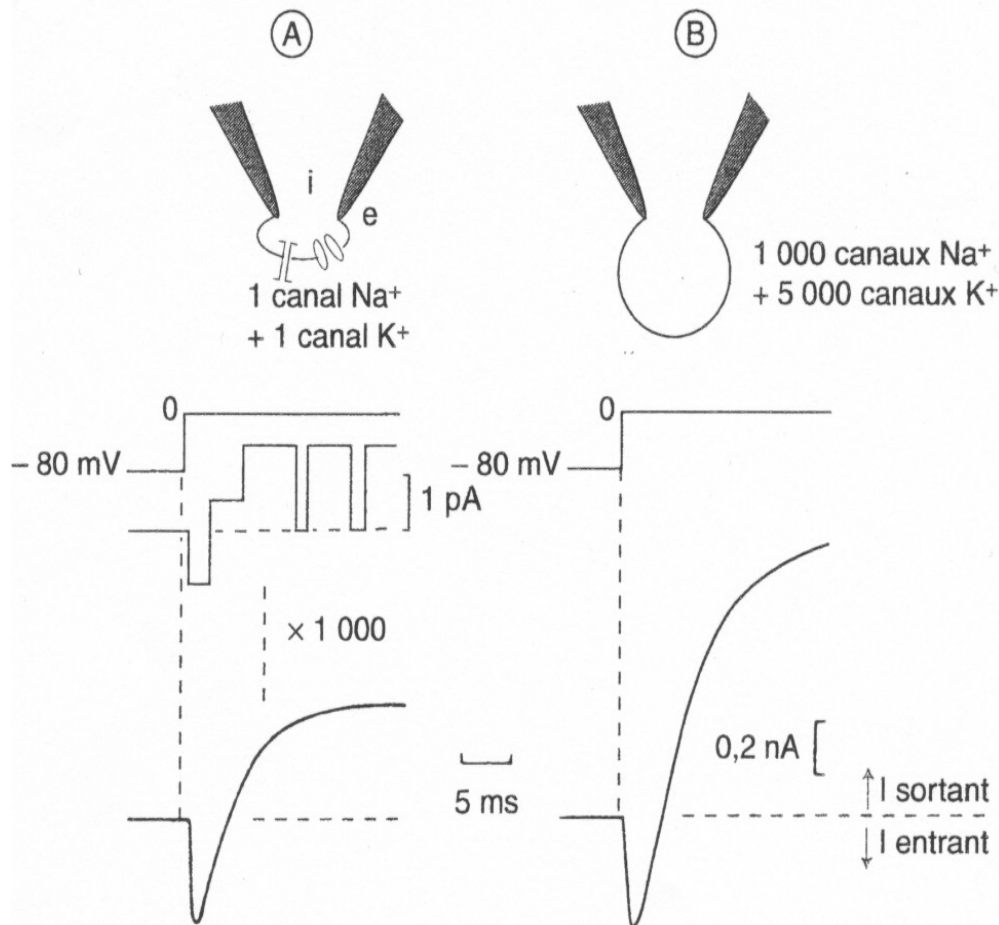
- En configuration cellule attachée
- Formation de pores par la nystatine ou amphotéricine B
- **Perméabilise** le fragment de membrane
- Accès électrique à l'espace intracellulaire donc mesure des courants de l'ensemble de la membrane;
- Donc équivalent de la cellule entière sans diluer le milieu cytoplasmique

Avantages et inconvénients des différentes configurations du patch clamp

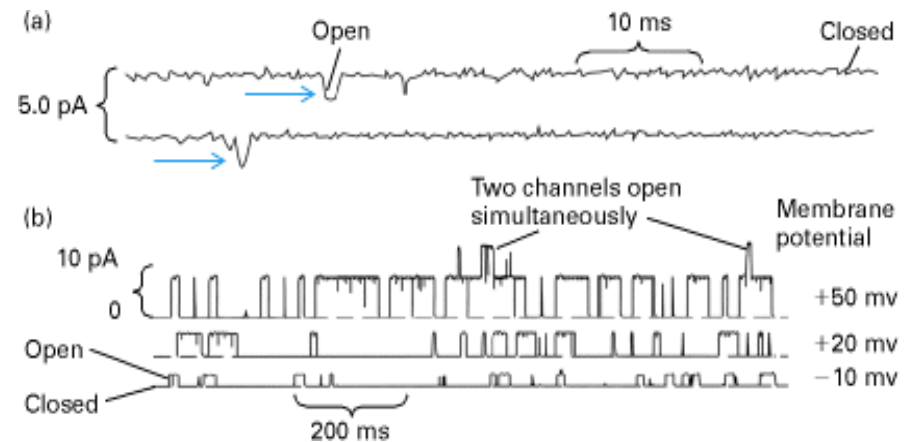
Configurations	Avantages	Inconvénients
<p>Cellule-attachée</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu interne de la cellule conservé - Mesure de courant unitaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Potentiel transmembranaire inconnu - Milieu interne non contrôlé
<p>Patch excisé</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieux interne et externe parfaitement contrôlés - Mesure de courant unitaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte d'éventuels facteurs régulateur du canal
<p>Cellule-entière</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu externe parfaitement contrôlé - Milieu interne relativement bien contrôlé - Mesure d'un courant global 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal
<p>Patch perforé</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule moins abîmée - Milieu interne de la cellule préservé - Mesure d'un courant global - Milieu externe parfaitement contrôlé 	<ul style="list-style-type: none"> - La perforation est lente - Mise au point nécessaire pour certaines cellules - Milieu interne non contrôlé

La technique du patch clamp

Relation entre courant unitaire et courant macroscopique



Enregistrements de courants unitaires à travers (a) les canaux Na⁺ et (b) les canaux K⁺ dépendant du potentiel



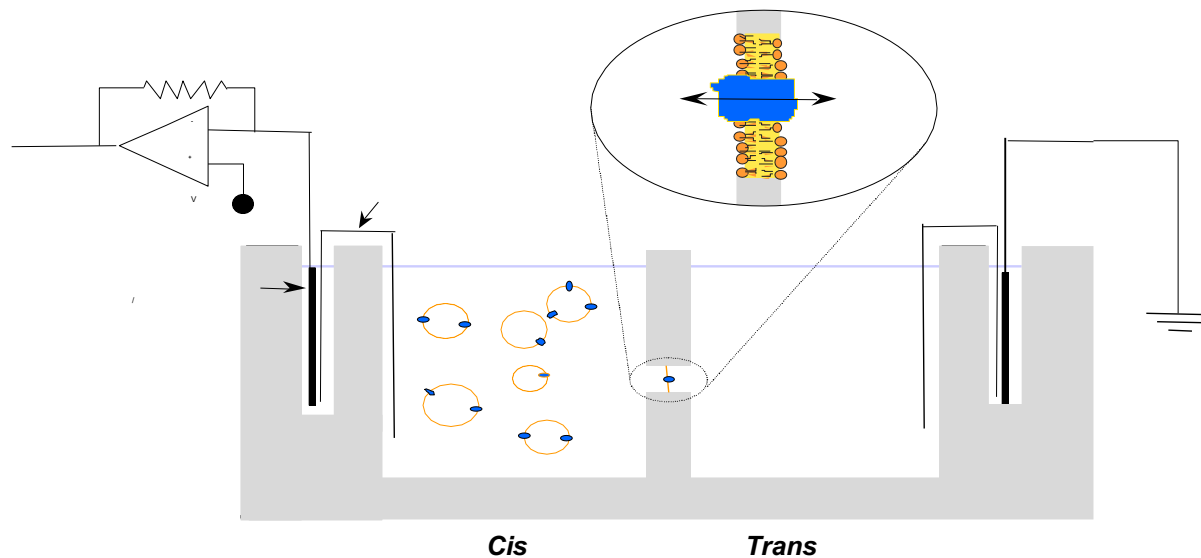
Le problème des courants macroscopiques

Comment distinguer les courants?

Utilisation d'inhibiteurs (TTX et canaux Na⁺, TEA et K⁺)

Manipulation des concentrations ioniques

La technique des bicouches lipidiques planes

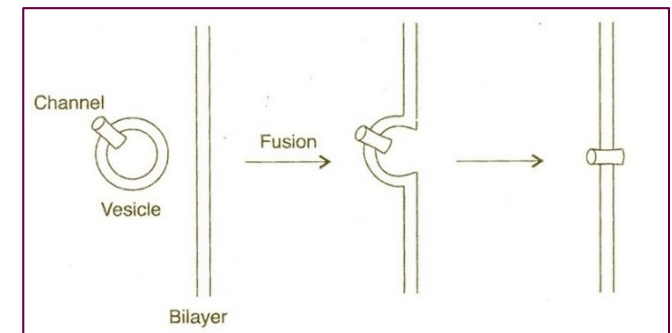


Mesure de courant unitaire ou macroscopique
Selon la concentration de protéines dans la bicouche

Point positif: accessibilité aux deux faces des canaux

Point négatif: impossibilité d'appliquer une pression sur la bicouche
, et perte d'éventuels acteurs moléculaire indispensable à l'activité des canaux

Fusion des vésicules
avec la bicouche



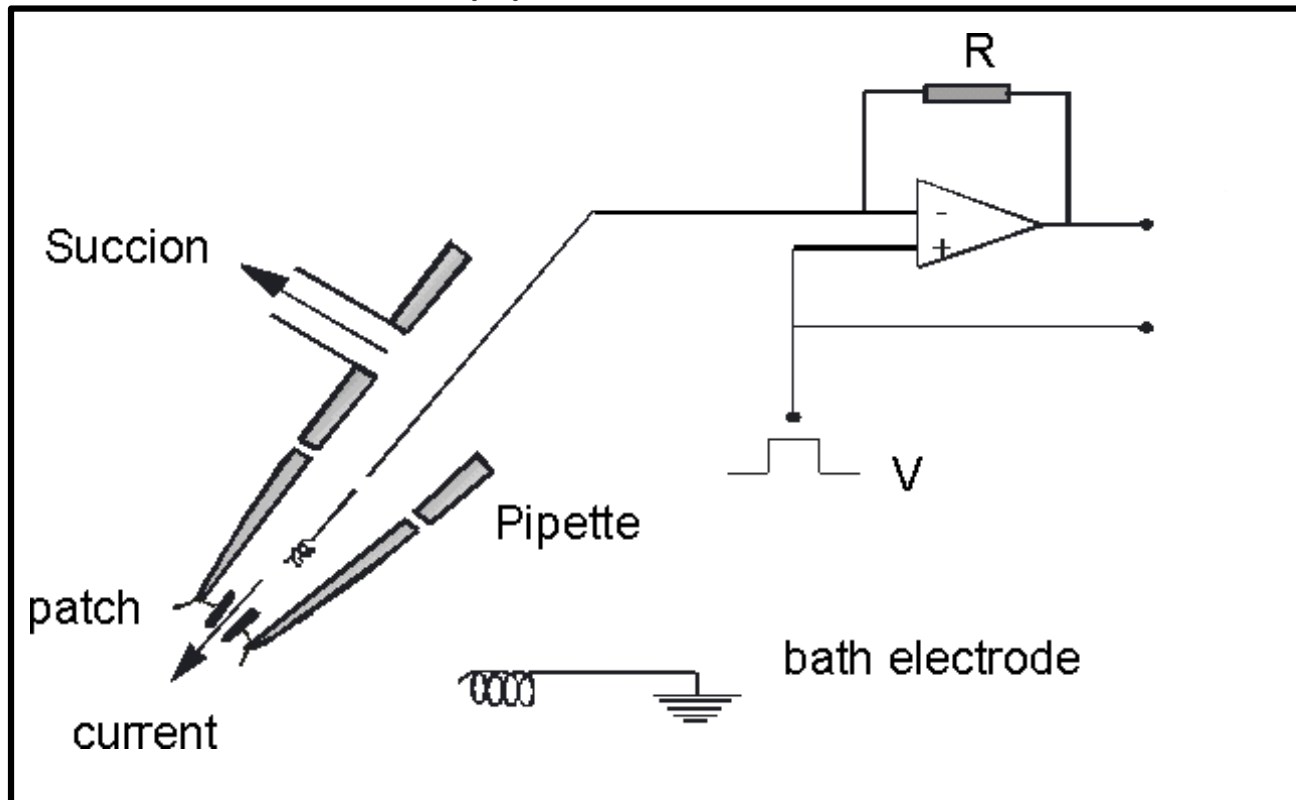
Permet l'étude

de canaux non accessibles (des organites)

- Soit par fusion des membranes
- Soit après purification des canaux

La technique du patch clamp

La réalisation d'un giga-seal et application d'une dépression supplémentaire



Le patch clamp des liposomes géants

Les méthodes

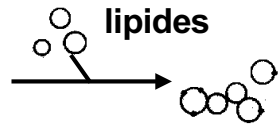
In vivo



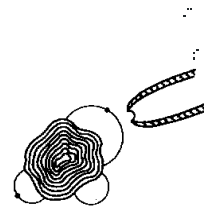
↓ Presse de French

In vitro 1

Vésicules membranaires



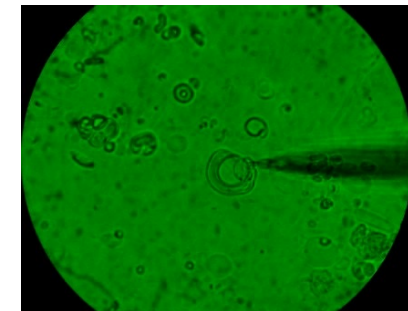
- , + H₂O



Patch-clamp

Protéoliposomes géants

50 μm



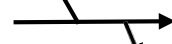
↓ détergent

In vitro 2

Purification sur colonne

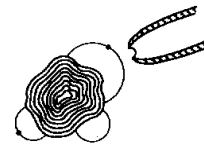
Canaux purifiés

lipides



↓ détergent

- , + H₂O



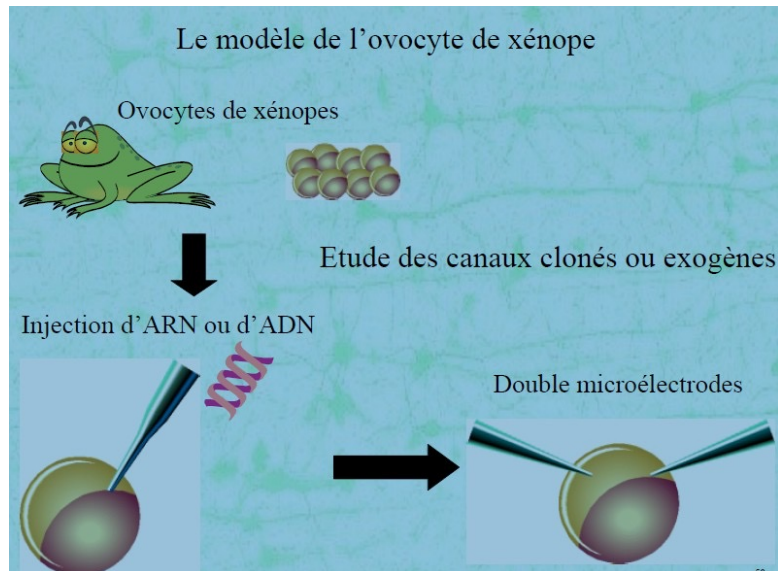
Patch-clamp

Protéoliposomes géants

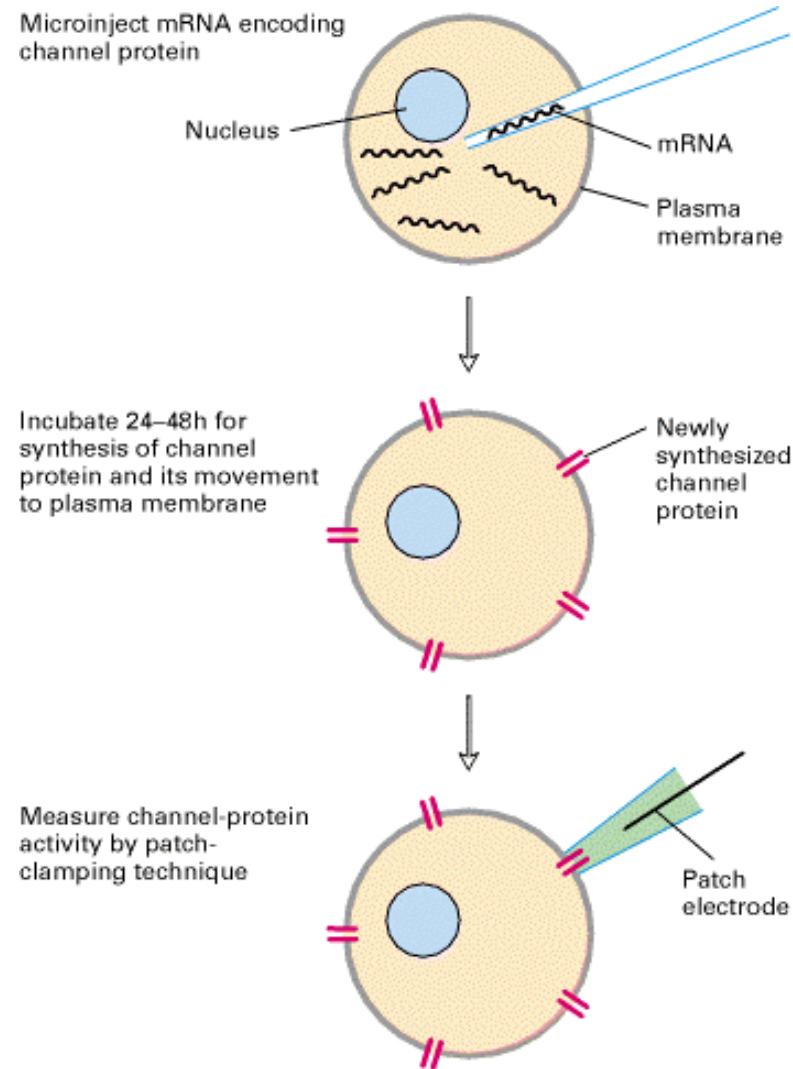
Comment étudier un canal dont le gène est connu?

1) Expression hétérologue dans l'ovocyte du xénope

Micro-Injection du matériel génétique dans ovocyte de xénope suivie de l'analyse Électrophysiologique



2) Transfection de lignées cellulaires animales tumorales

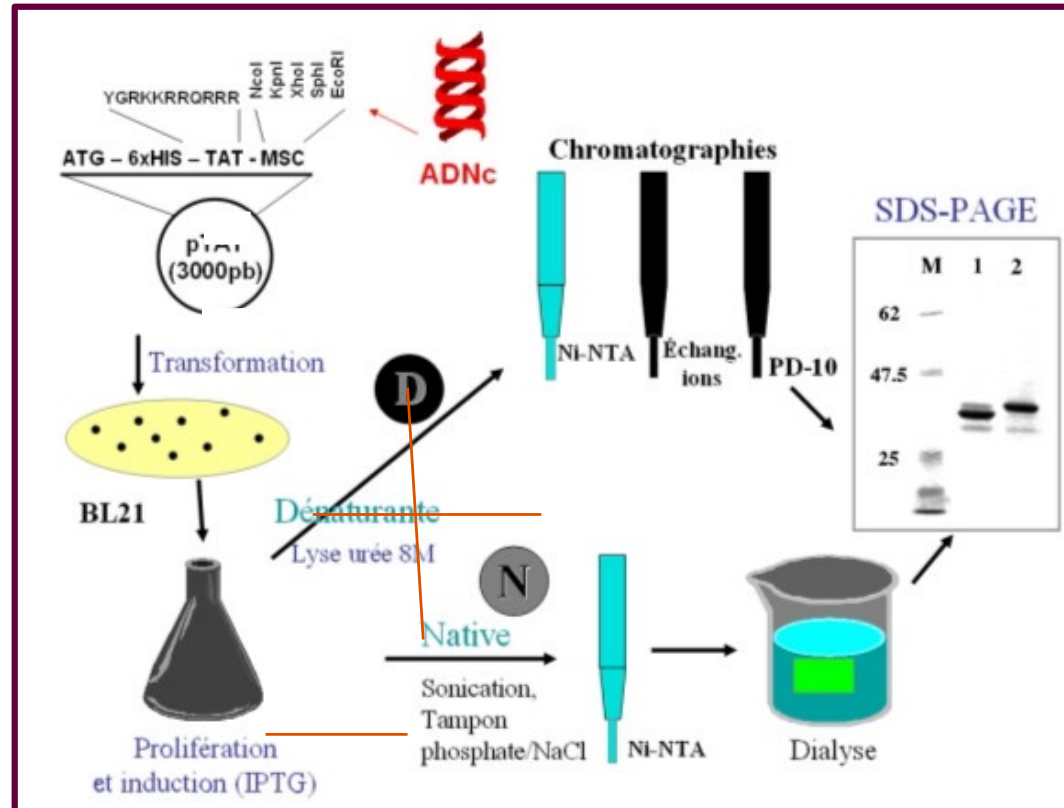


After Molecular Biology of the cell Lodish et al.

•3 La production de protéines recombinantes en bactérie

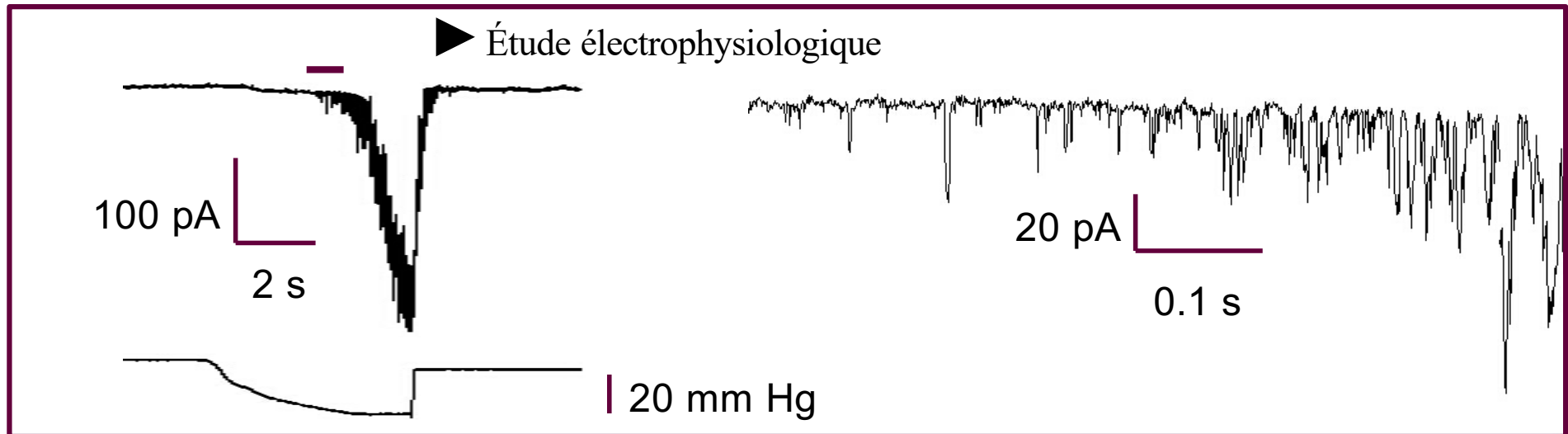
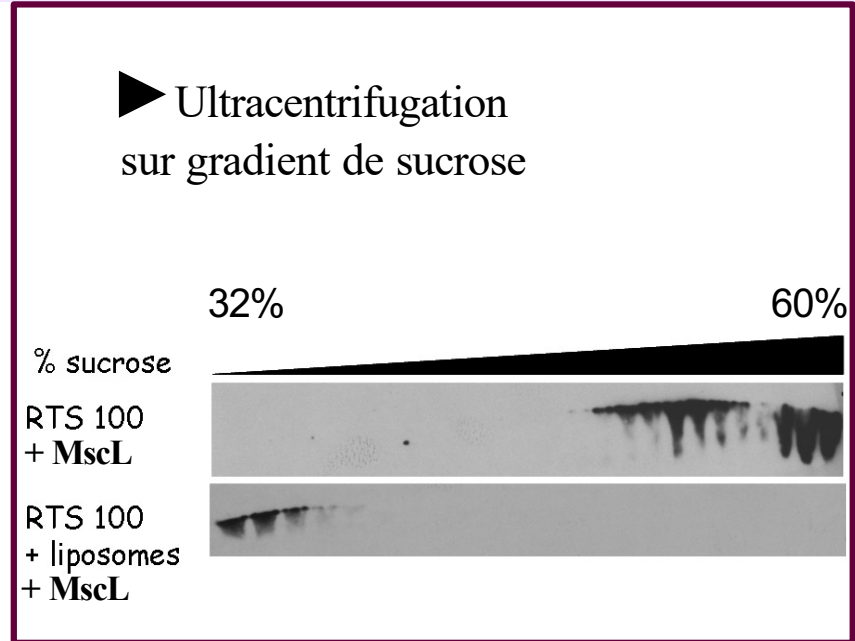
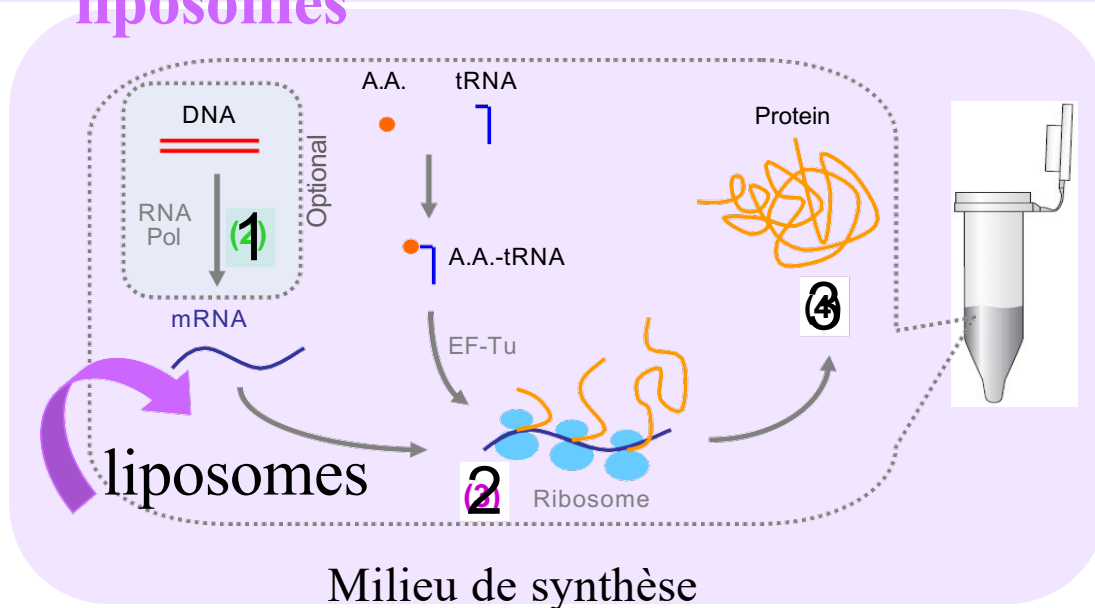
Pour les protéines membranaires

- Cassage des cellules
- Isolement des membranes
- Solubilisation des membranes en présence de détergent
- Purification sur colonne NiNTA
- Reconstitution en liposomes
- Étude électrophysiologique
 - En bicouche lipidique plane
 - En protéoliposomes géants



Autres systèmes d'expression hétérologue pour produire des canaux: levures

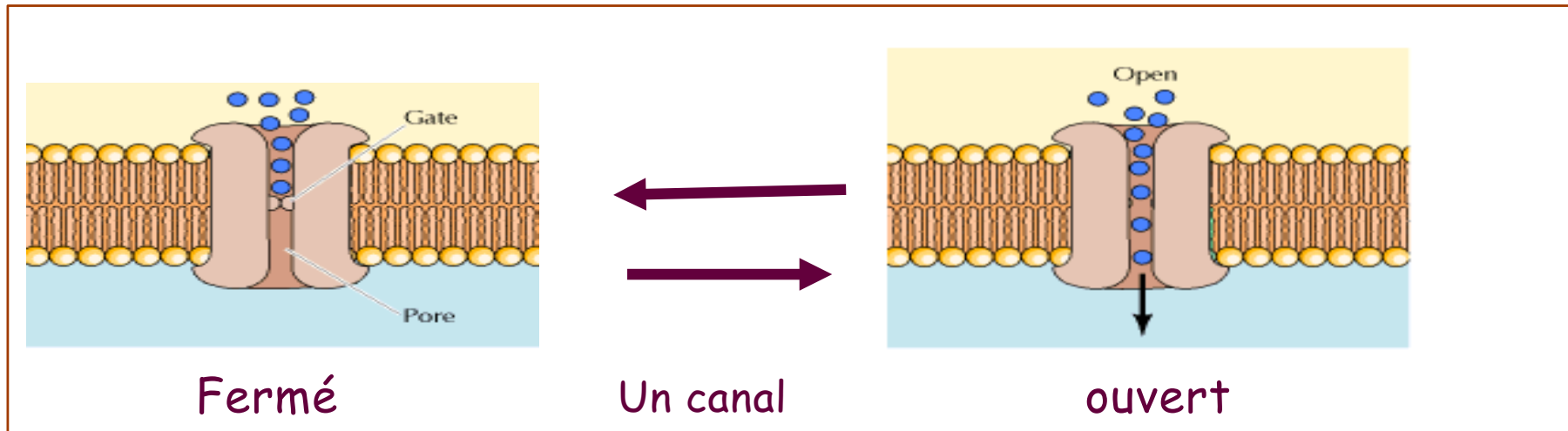
4 Synthèse a-cellulaire du canal ionique en présence de liposomes



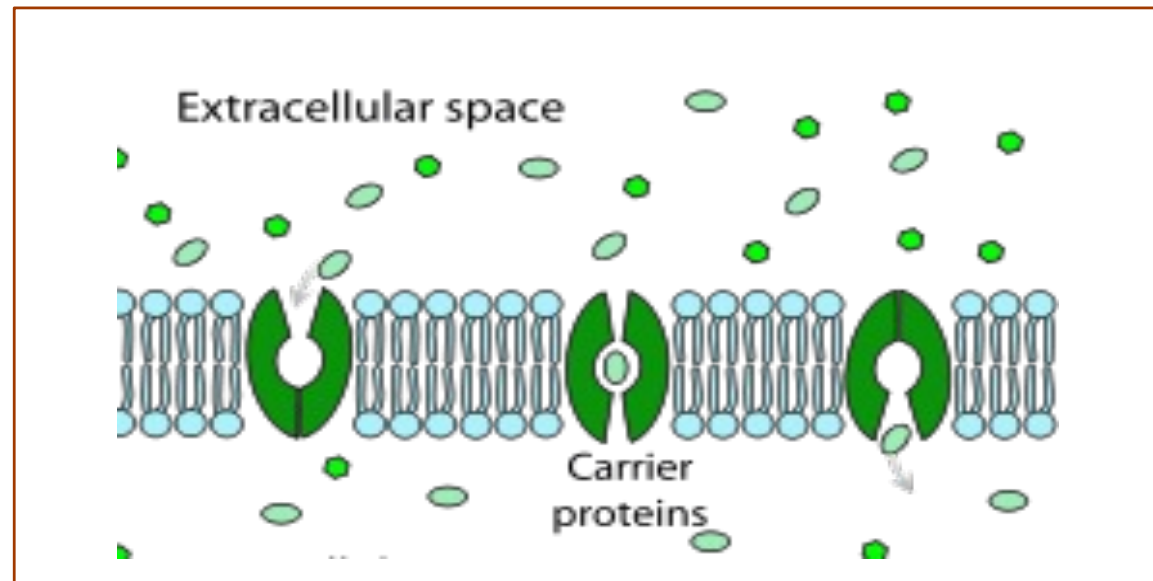
Les caractéristiques d'un canal ionique établir la fiche signalétique

- La nature de la stimulation qui contrôle l'état d'ouverture (probabilité d'ouverture)
- La conductance
- La rectification
- La sélectivité
- La cinétique
- La pharmacologie

Différence mécanistique entre canaux et transporteurs



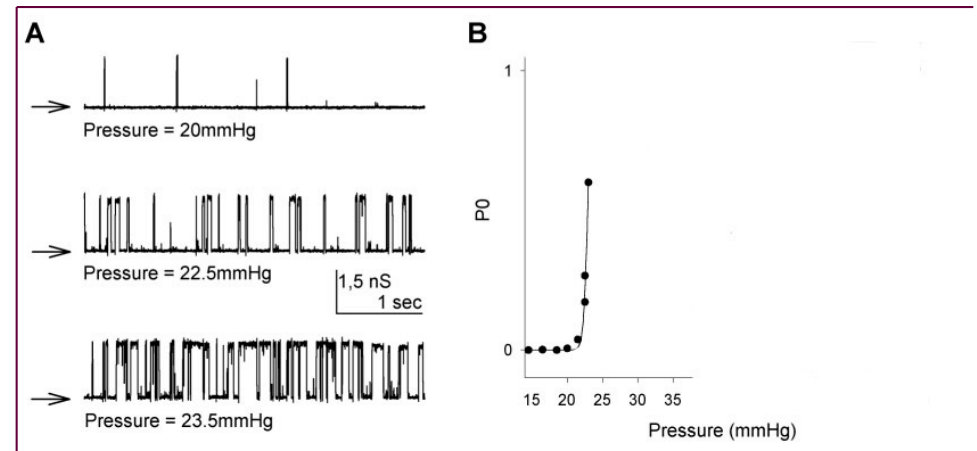
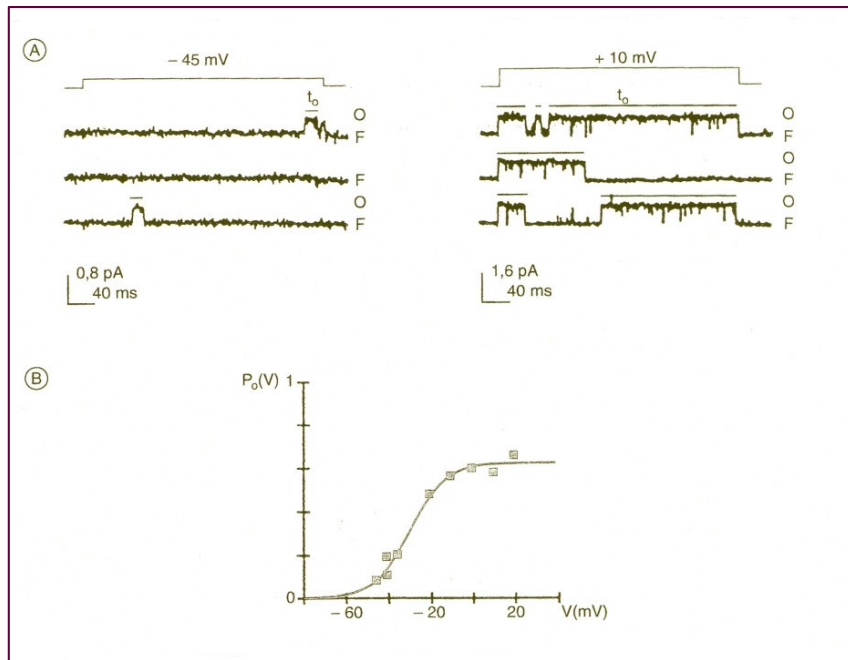
un transporteur



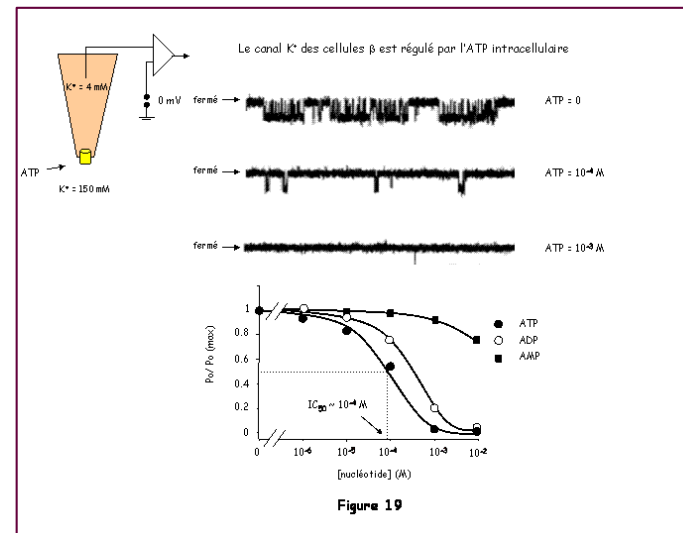
Qu'est ce qui contrôle l'équilibre entre les deux états d'un canal?

Le potentiel électrique transmembranaire

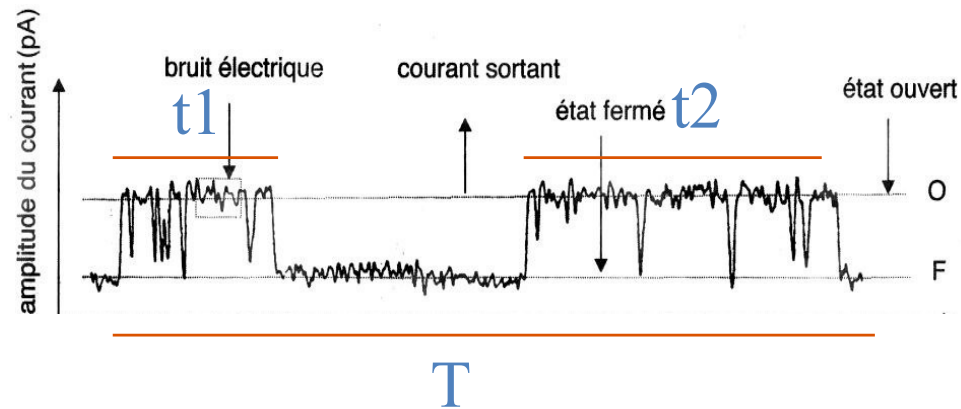
La tension membranaire



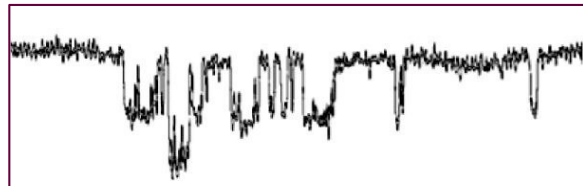
La présence d'un ligand



Calcul de la probabilité d'ouverture



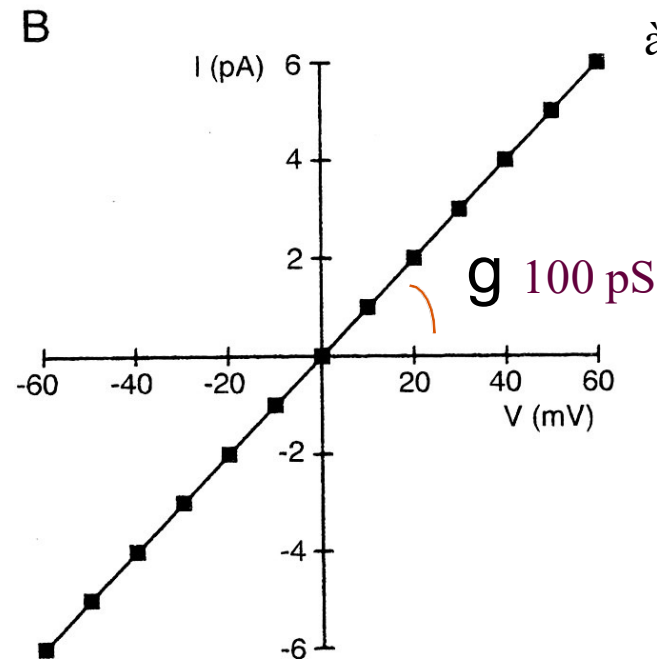
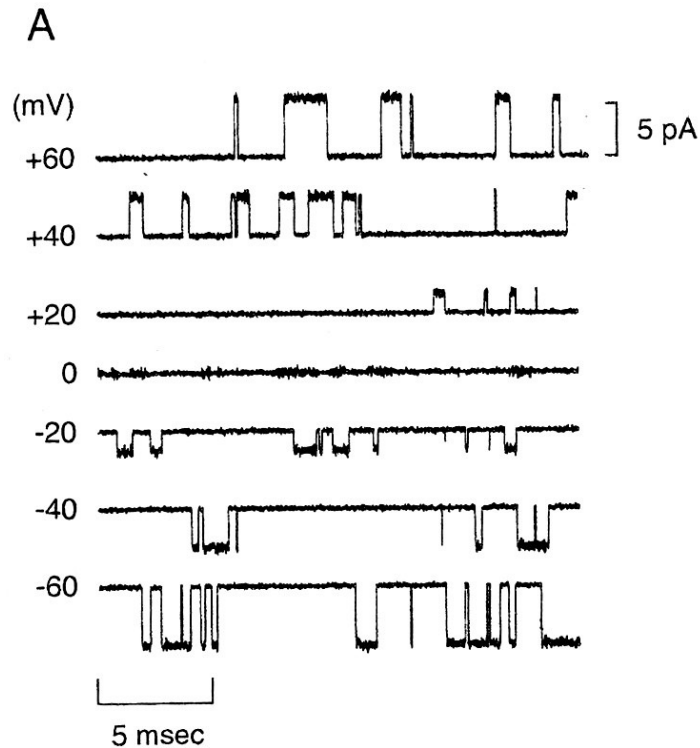
$$\text{Probabilité d'ouverture} = t1 + t2 / T$$



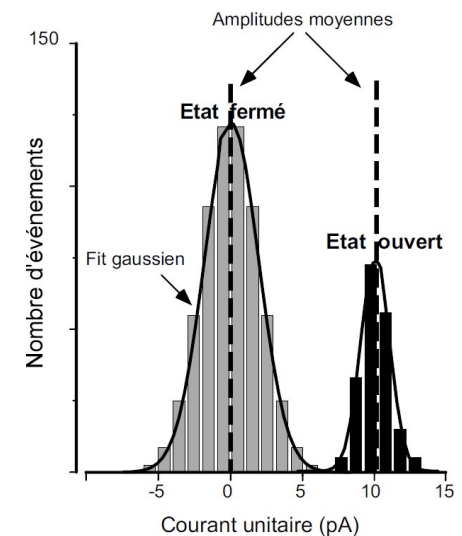
Si 2 canaux:

$$\text{Probabilité d'ouverture} = t1 + 2t2 + t3 + t4 / 2T$$

La conductance ionique la relation entre I et V (courbe I/V)



Histogramme d'amplitudes
à un potentiel donné



La surface sous pic
représente le temps passé
dans chacun des états

Le rapport des
Surfaces indique la
Probabilité d'ouverture

$$V = R i$$

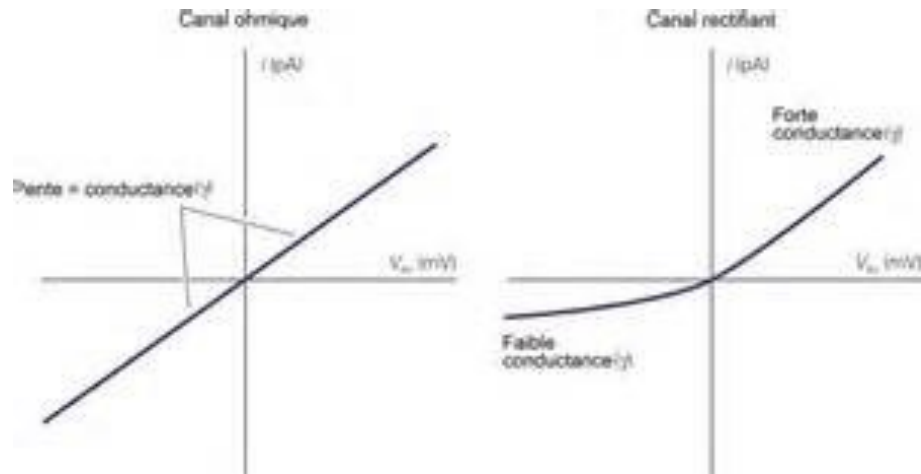
$$i = V/R$$

$$i/V = 1/R = g$$

Unité de la conductance
Le siemens S

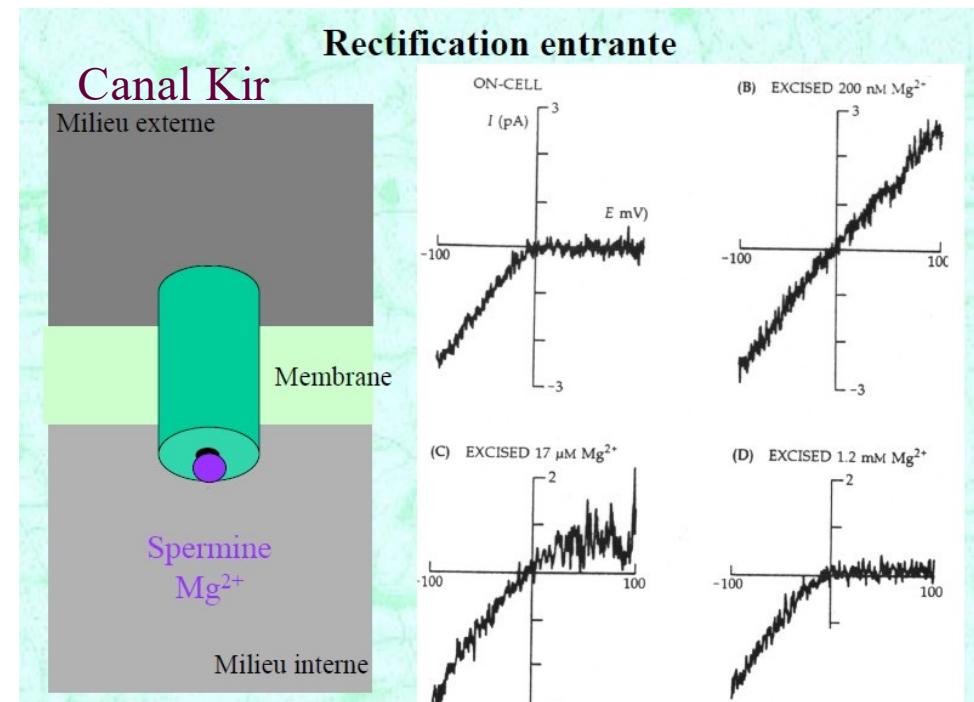
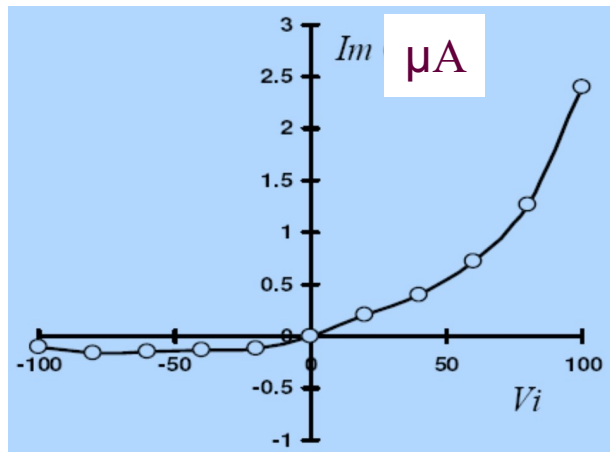
After Frances ASHCROFT
ION CHANNELS AND DISEASE Academic Press

Quand la loi d'ohm n'est pas respectée: la rectification



Courant sortant > courant entrant
= rectification sortante

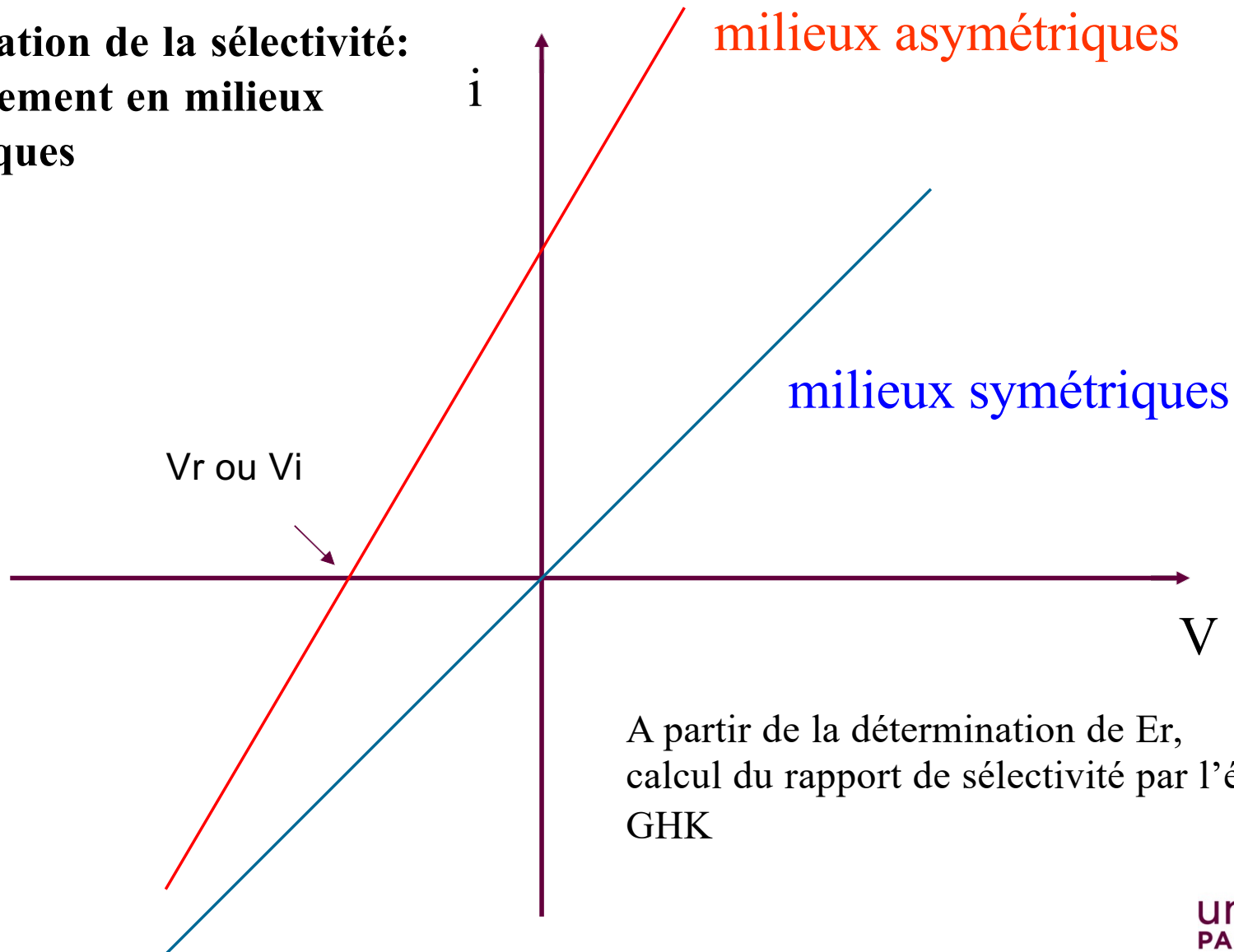
A ne pas confondre avec ceci



La sélectivité ionique

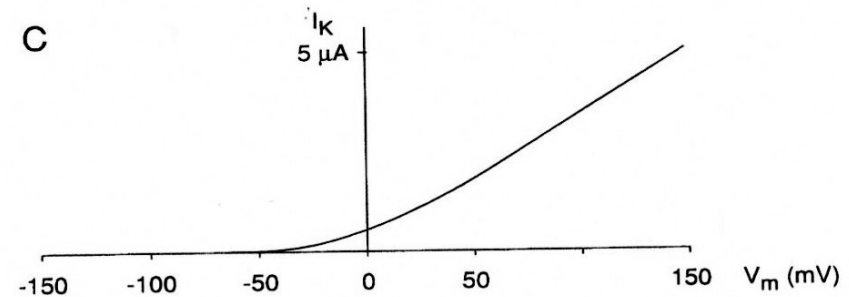
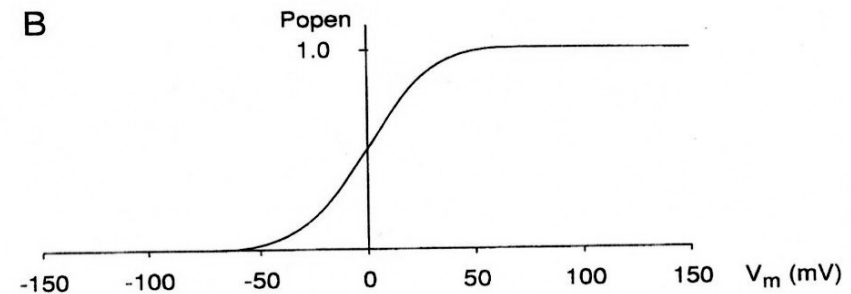
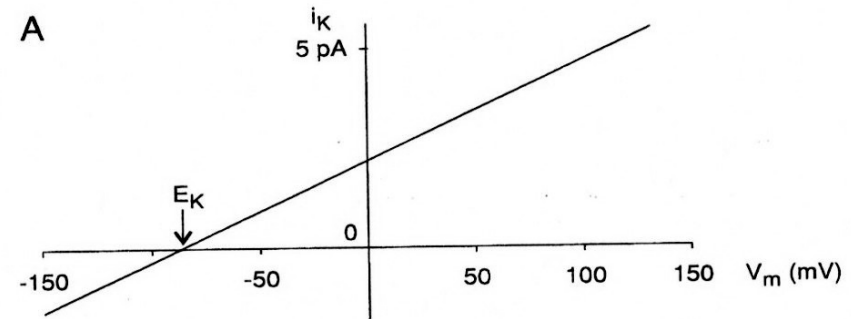
courbe I/V en conditions asymétriques

Détermination de la sélectivité:
enregistrement en milieux
asymétriques



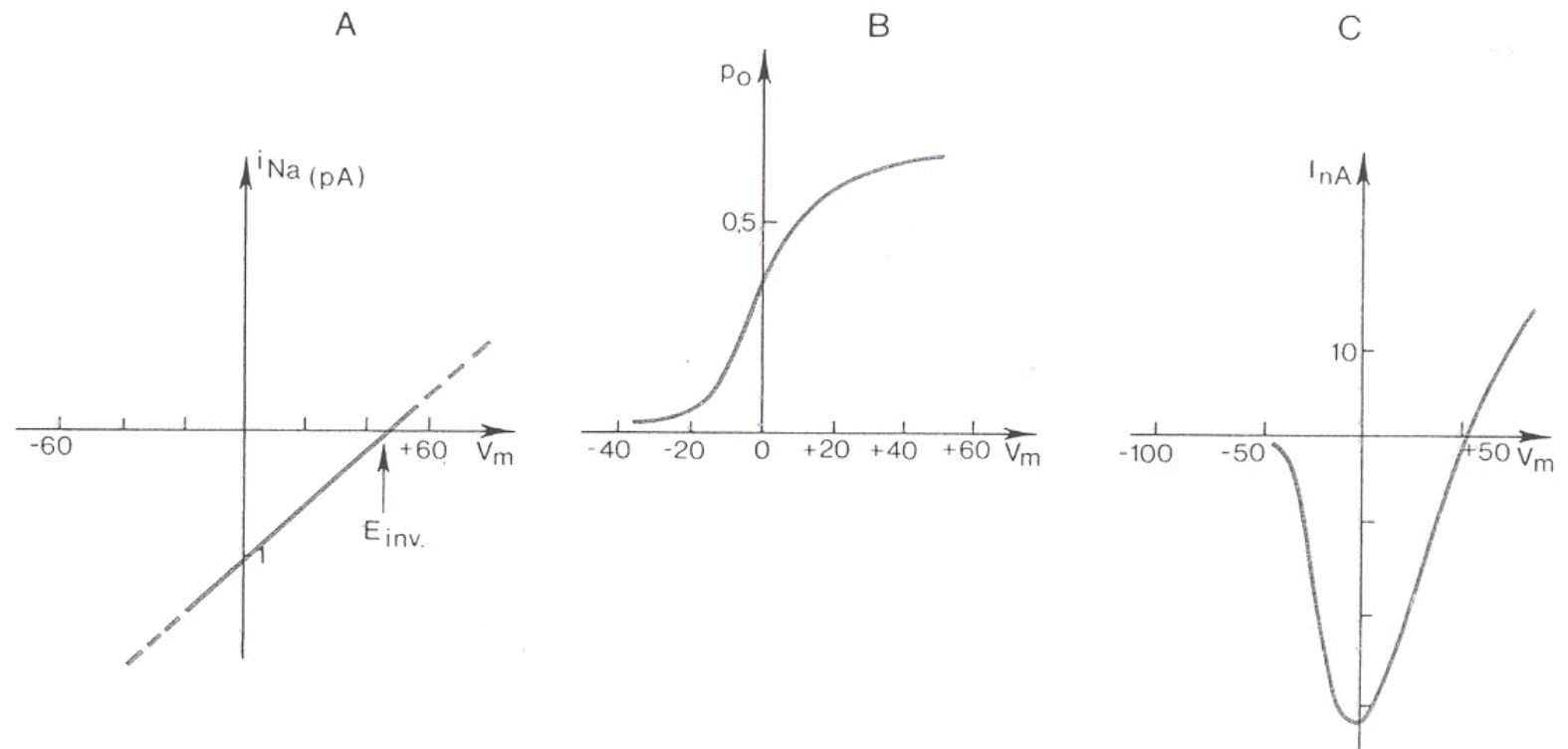
Relation entre courant unitaire et courant macroscopique

Cas du canal potassique
Potentiel dépendant



$$I = N \cdot p \cdot i$$

Relation entre courant unitaire et courant macroscopique



Cas du canal sodique
Potentiel dépendant

$$I = N \cdot p \cdot i$$

Étude cinétique

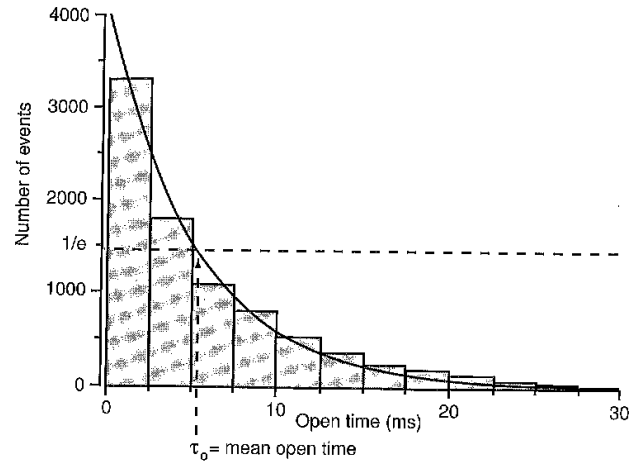


FIGURE 3.6 OPEN-TIME HISTOGRAM

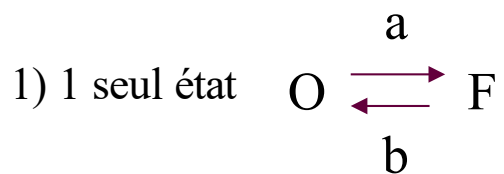
The time a channel spends open is variable. The mean open time (τ_o) can be obtained from the open-time histogram. This is produced by sorting the open times into bins of constant width (here 2.5 ms). In this example, the open times show a single exponential distribution. This means that the channel has only a single open state. The time at which the number of events falls to $1/e$ of its maximal value is the mean open time (τ_o). Figure supplied by Paul Smith.



histogramme des temps d'ouverture d'un canal



Temps moyen d'ouverture du canal



Distribution des temps d'ouverture est décrite par une fonction mono-exponentielle

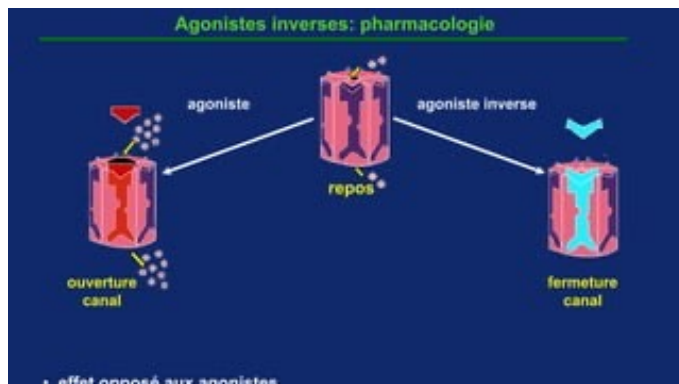
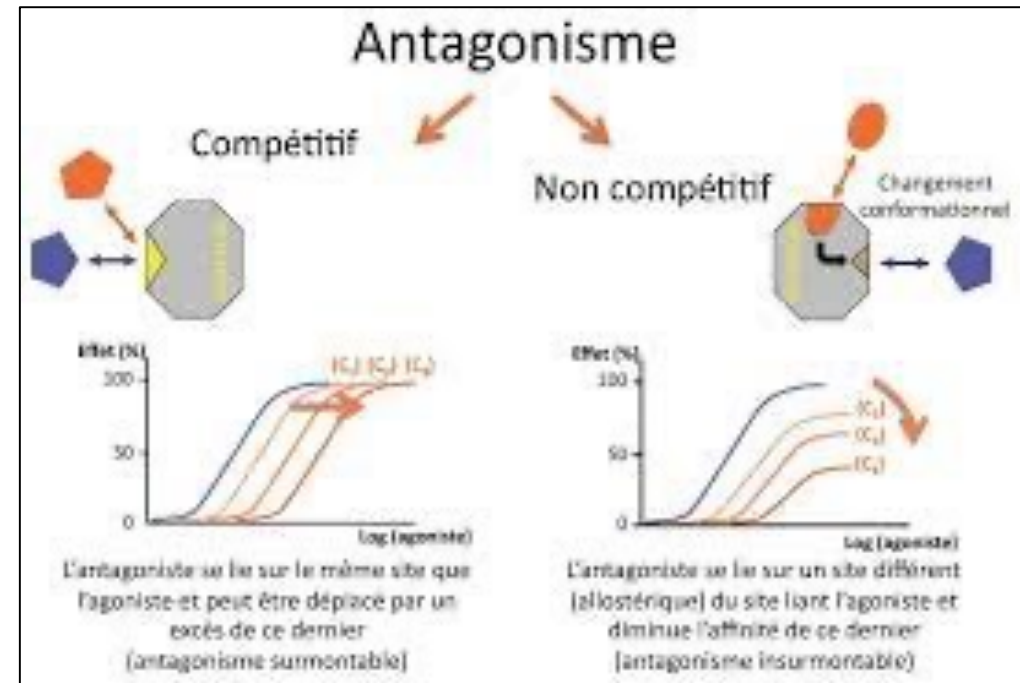
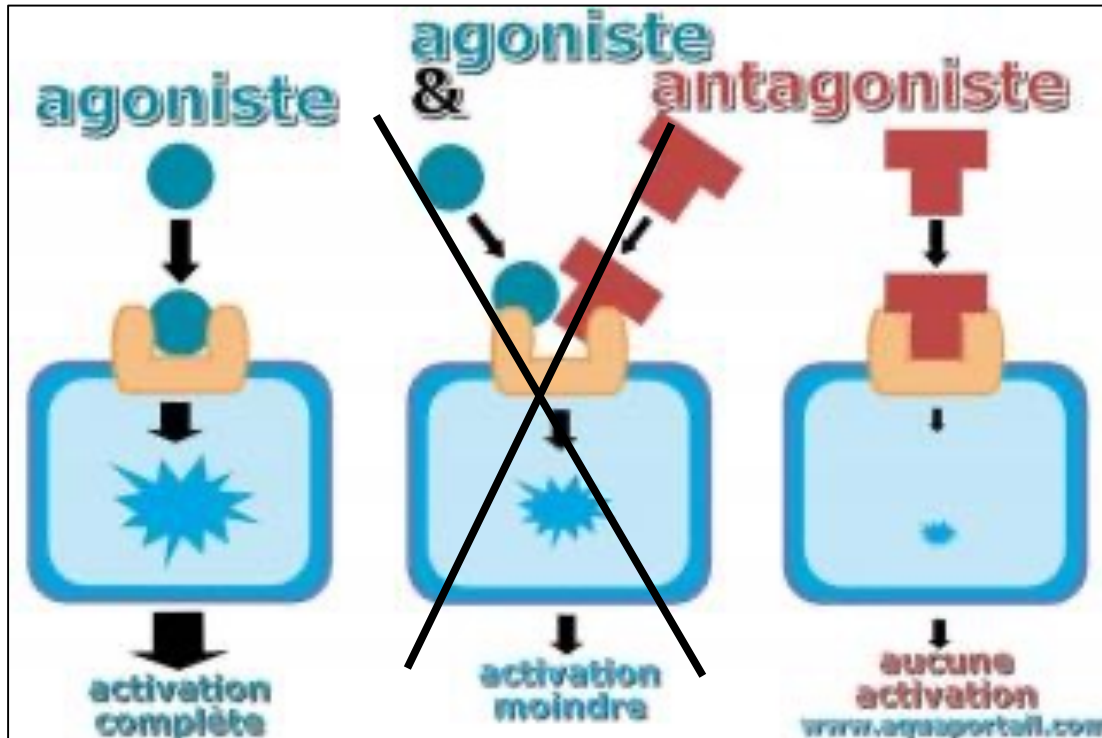
$$f(t) = a \exp(-a.t)$$

$$t_o = \text{temps ouvert moyen} = 1/a$$



Distribution des temps d'ouverture est écrite par une fonction bi-exponentielle

La pharmacologie



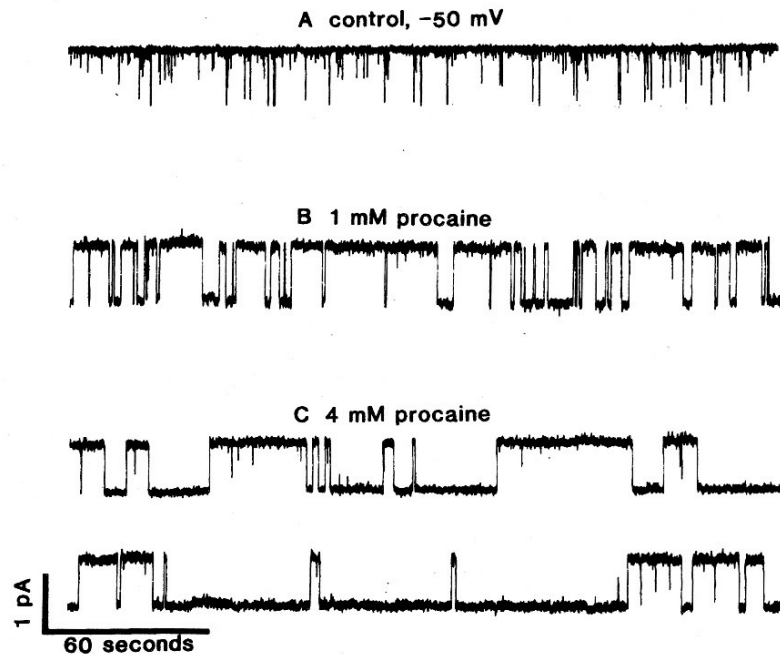
Activateur /inhibiteur

La conductance

La probabilité d'ouverture

La pharmacologie

Les toxines naturelles du canal Na voltage dependant



Un exemple: inhibitor effect of procaine on a BTX-activated sodium channel 1900 (novocaïne Premier anesthésique local synthétisé /dérivé de la cocaïne)

Anesthésiques locaux : la lidocaïne (Xylocaïne®)
Molécule synthétique 1950

Cibles et mécanismes d'action

bloqueurs Na_v des neurones périphériques ($Na_v 1.7$)
site de liaison intracellulaire (S6 domaines I, III, IV)
=> accès au site de liaison par le canal ouvert
stabilisent l'état fermé / inactivé



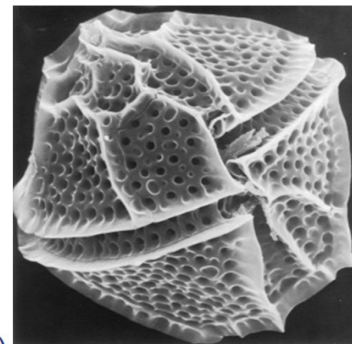
BTX batrachotoxin
Activateur (PO)

Grenouille d' Amérique



TTX tétrodotoxine
inhibiteur
(diminution de la g unitaire)

Poisson Tétrodon



STX saxitoxine
Inhibiteur
(diminution de la g unitaire)

Algue unicellulaire dinoflagellés
Gonyaulax catenella

After Moczydlowski et al. In Ion Channel
Reconstitution
edited by Chris Miller