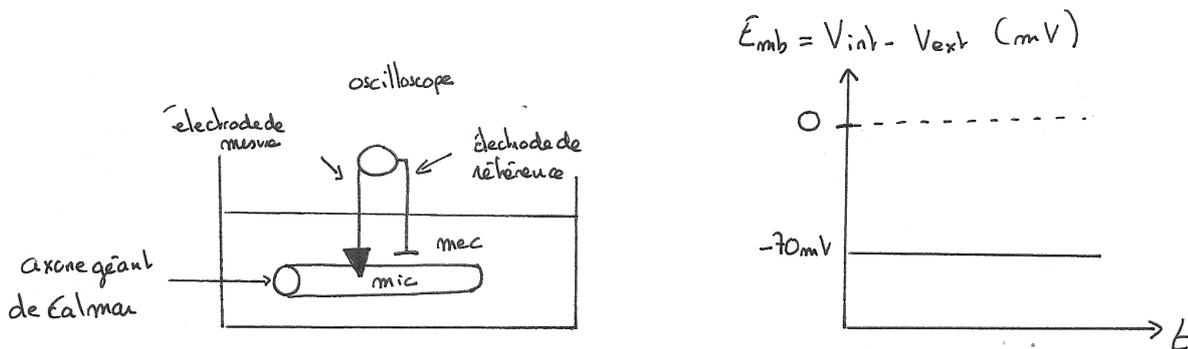


Figure 1 : Enregistrement de la différence de potentiel transmembranaire à l'aide d'électrodes : exemple de l'axone géant de Calmar

Choix du matériel d'étude : on mesure facilement le potentiel de membrane sur **l'axone géant d'un neurone de Calmar** car il constitue un bon matériel d'étude : cellule de grande taille et résistante (diamètre 800 μm , longueur en cm, résistance physiologique : conservation dans le **liquide de Ringer**, résistance mécanique).

Dessin du montage :

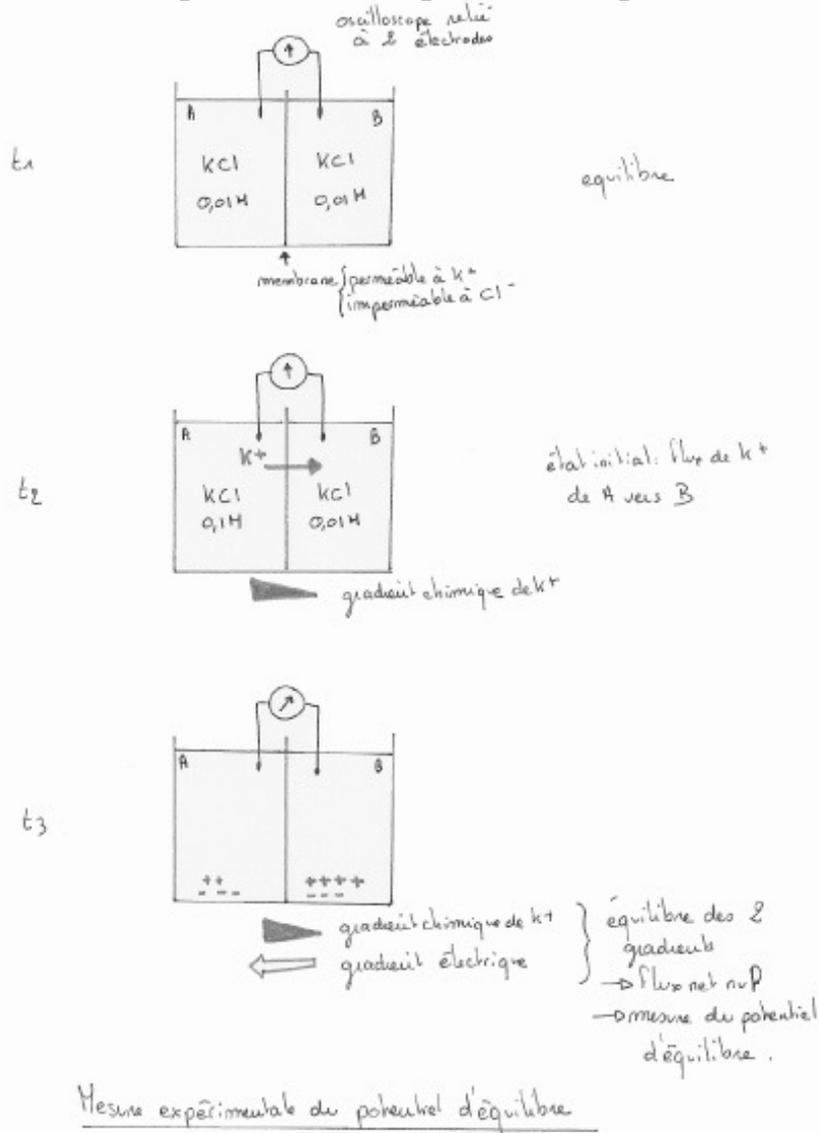


Principe de l'expérience : on mesure de la **différence de potentiel** entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire grâce à des **microélectrodes** reliées à un oscilloscope.

Une microélectrode est un tube de verre que l'on a étiré jusqu'à l'obtention d'une pointe extrêmement fine (l'orifice faisant moins de 1 μm de diamètre) et que l'on a rempli d'un liquide bon conducteur électrique (par ex, une solution saline concentrée). On peut alors relier ce liquide conducteur à un voltmètre (un oscilloscope par ex) et enregistrer le voltage transmembranaire de l'axone.

Par convention, le potentiel électrique à l'intérieur d'une cellule vivante (E_{int}) est exprimé par rapport au potentiel à l'extérieur de la cellule (E_{ext}). Cela signifie que le potentiel de membrane E_m est donné par la différence $E_{int} - E_{ext}$.

Figure 2 : mesure expérimentale du potentiel d'équilibre d'un ion



L'équation de Nernst permet de calculer ce potentiel d'équilibre pour un ion, indépendamment de tous les autres :

$$\Delta G = R T \ln (C_{ext}/C_{int}) + z F (V_{ext}-V_{int})$$

À l'équilibre, $\Delta G = 0$.

$0 = R T \ln (C_{ext}/C_{int}) + z F (V_{ext}-V_{int})$: le gradient chimique est égal au gradient électrique.

D'où le **potentiel d'équilibre de l'ion** = $V_{ext}-V_{int} = - R T / (z F) \times \ln (C_{ext}/C_{int})$

$$V_{ext}-V_{int} = - R T / (z F) \times \ln (C_{ext}/C_{int})$$

D'où $V_{int}-V_{ext} = R T / (z F) \times \ln (C_{ext}/C_{int})$ = potentiel d'équilibre de l'ion

Bilan : il est possible de **calculer** le potentiel d'équilibre de l'ion X dans la cellule (axone de Calmar), en mesurant les concentrations intracellulaires et extracellulaires.

$$V_i-V_e = E_x = R T / (z F) \times \ln (C_{ext}/C_{int})$$

Figure 3 : Echanges ioniques responsables du potentiel de repos
(in Segarra *et al.*, Ellipse)

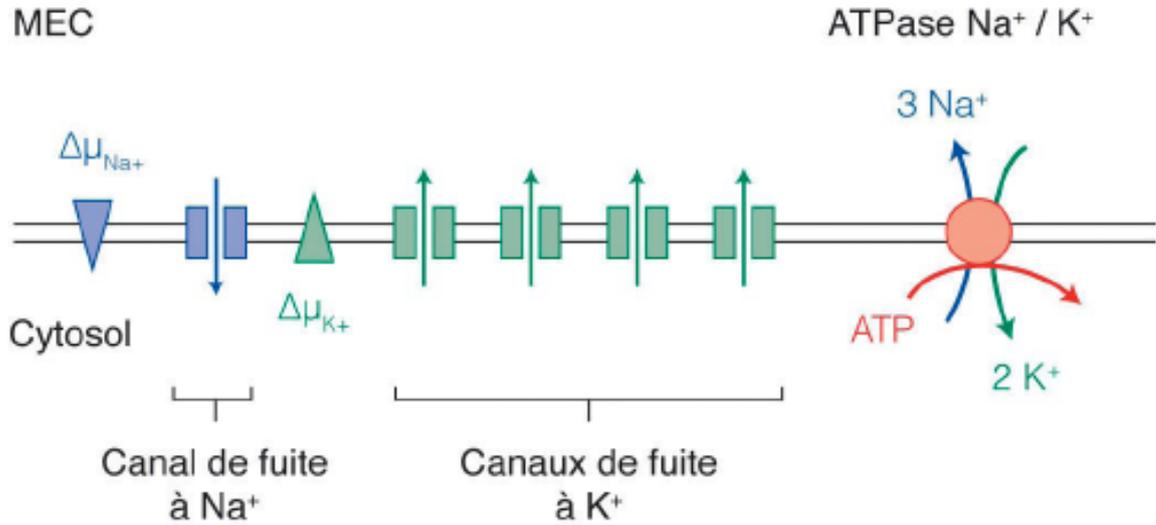


Figure 4 : Le potentiel d'équilibre met en jeu un faible nombre d'ions

Le nombre d'ions qui doivent s'écouler pour créer le potentiel d'équilibre est très faible : environ 10^{-12} moles de K^+ , soit 10^{12} ions K^+ par cm^2 de membrane. Ce constat est important à deux égards :

<p>- Ce faible nombre signifie que, de part et d'autre de la membrane, les concentrations d'ions perméants restent globalement constantes, même après que le flux d'ions a créé le potentiel.</p> <p>- Les minuscules flux ioniques nécessaires pour créer le potentiel de membrane ne perturbent pas l'électroneutralité chimique, car pour chaque ion, il y a un contre-ion, porteur d'une charge opposée (Cl^- dans notre ex) pour maintenir la neutralité des solutions de part et d'autre de la membrane. La séparation des charges créant la différence de potentiel n'est présente qu'au voisinage immédiat de la membrane.</p>	
--	--

Figure 5 : Les acteurs moléculaires du potentiel de repos : à savoir par coeur

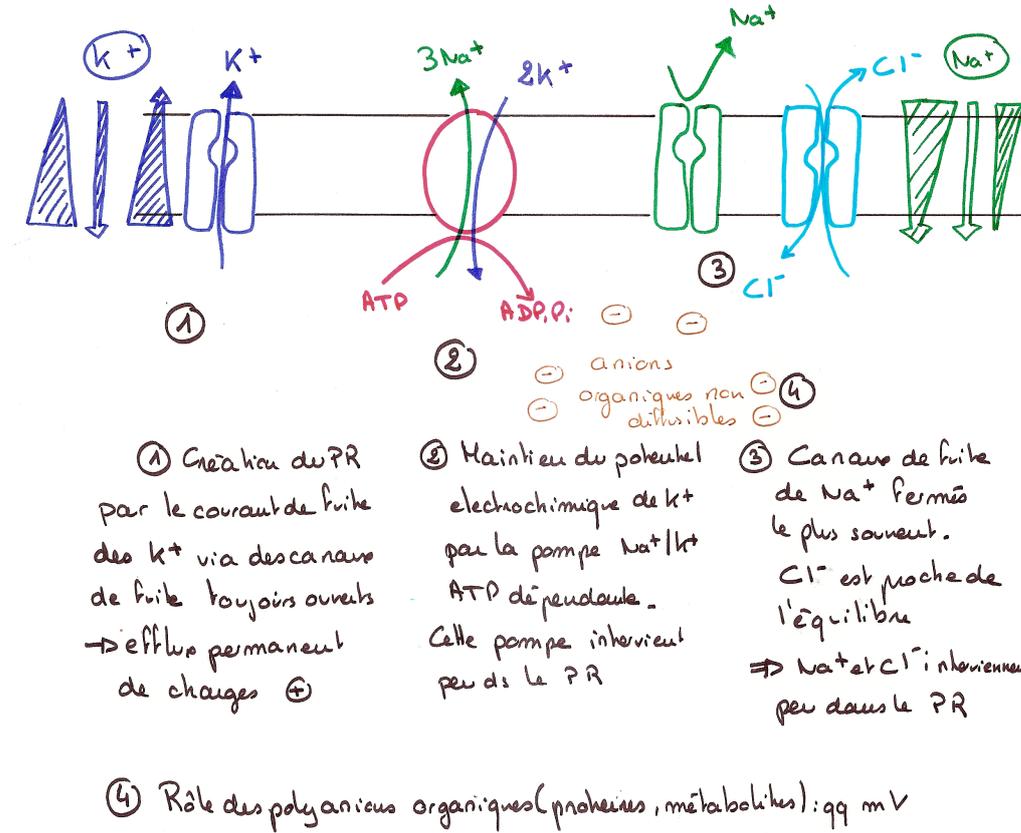
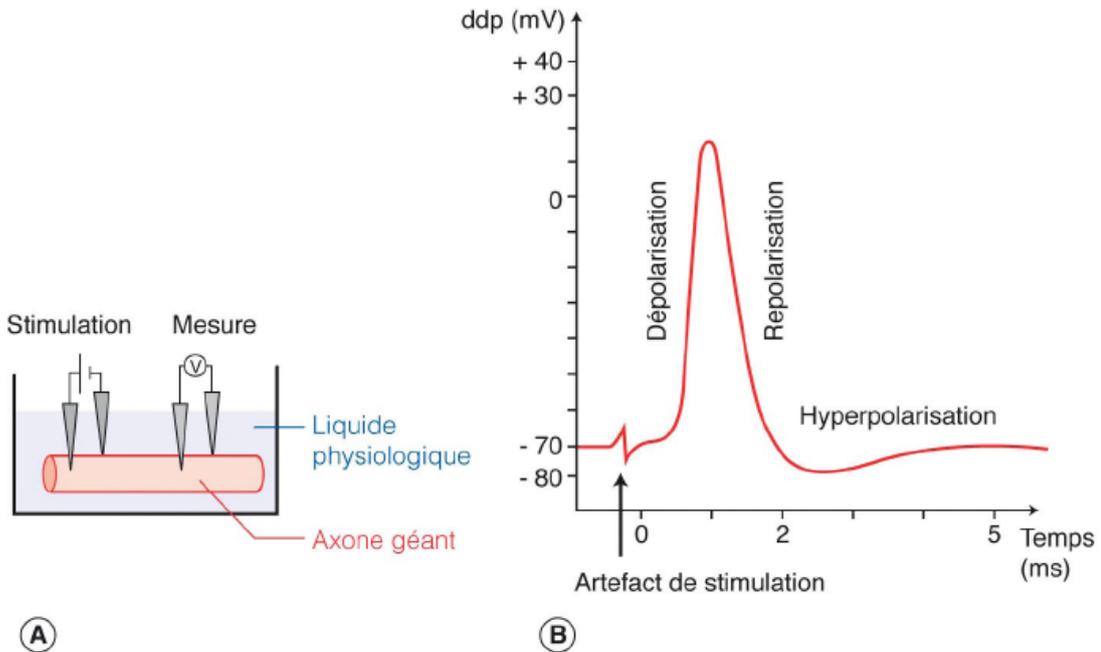


Figure 6 : potentiel d'action

(in Segarra et al., Ellipse)



Réponses obtenues pour différentes stimulations (1 : stimulation dépolarisante (dp) infraliminaire ; 2 : stimulation dp liminaire ou supraliminaire ; 3 : stimulation dp supraliminaire ; 4 : stimulation dp supraliminaire pendant la période réfractaire ; 5 : stimulation hyperpolarisante)

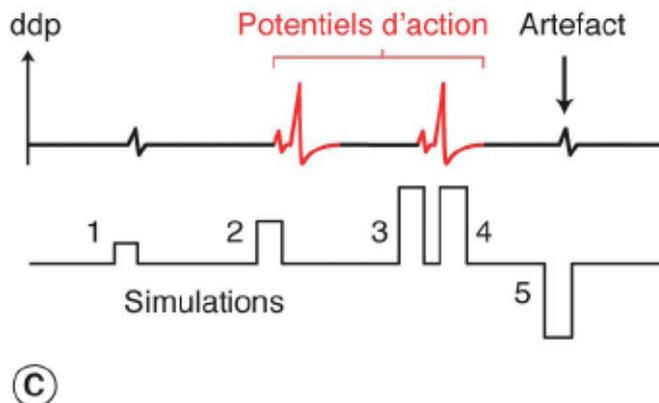


Figure 7 : technique du Voltage clamp/voltage imposé

Inventé par E. Neher et B. Sakmann.

Chaque canal est traversé par un flux ionique élevé ($\sim 10^6$ ions/seconde) et génère un courant électrique. Ce courant est faible (~ 1 picoampère) mais serait mesurable s'il n'était pas noyé dans l'activité électrique globale de la cellule. Le *patch-clamp* consiste donc à **enregistrer l'activité électrique d'un fragment microscopique de membrane cellulaire**, isolé électriquement du reste de la surface cellulaire et ne contenant que quelques canaux. On utilise une électrode de verre, remplie d'une solution conductrice, dont la pointe a un diamètre de l'ordre du micromètre. L'électrode, manoeuvrée à l'aide d'un micromanipulateur, est approchée de la surface d'une cellule, puis «scellée» sur la membrane en imposant une dépression à l'intérieur du capillaire de verre.

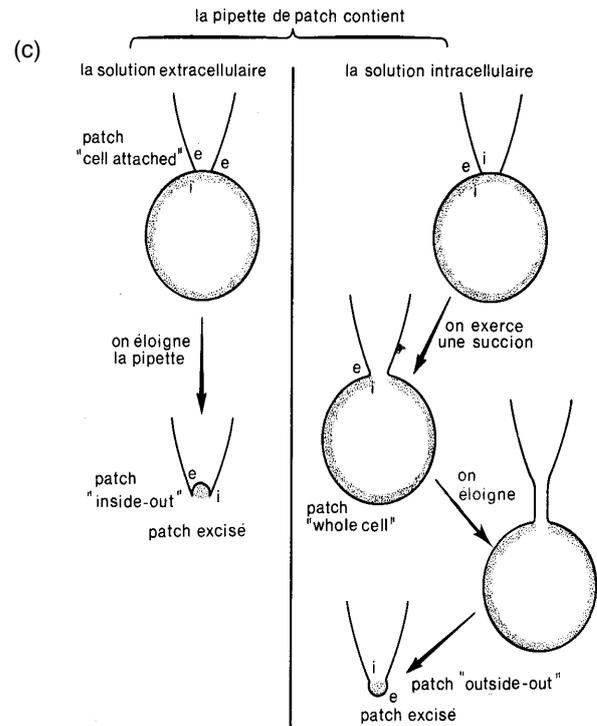
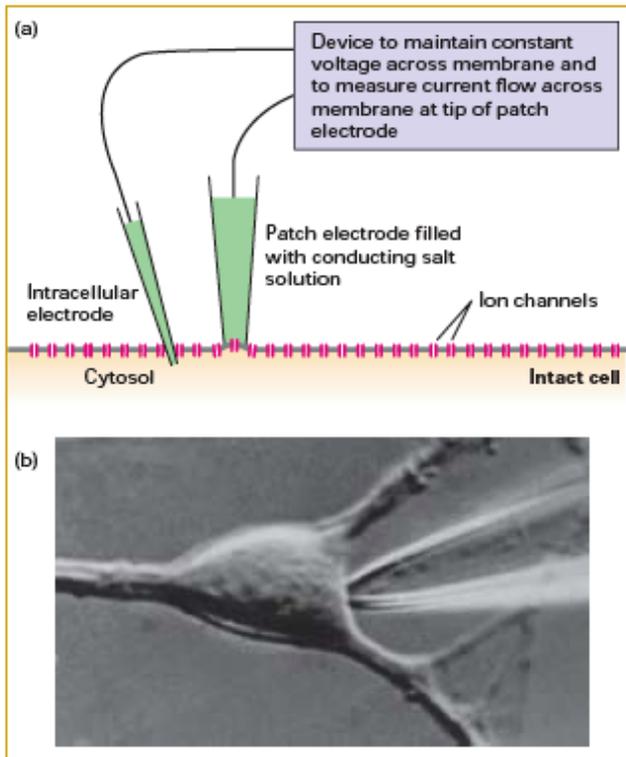
L'arrangement de départ, dans lequel l'orifice de la pipette est scellé sur une cellule intacte, est appelé **configuration «attachée»** (Figure a). Un système électronique enregistre le courant et impose un potentiel électrique transmembranaire.

Une seconde configuration (Figure c) s'obtient en séparant la pipette de la cellule. Lors de cette manoeuvre, le *patch* de membrane reste fixé à la pipette et sa face intracellulaire, dirigée vers l'extérieur de la pipette (d'où l'appellation de **patch inside-out**), devient accessible.

Il existe également une configuration **outside-out** obtenue, à partir de la configuration «attachée», par destruction du *patch* et éloignement de la pipette. On arrache ainsi une collerette de membrane qui, en se rabattant, referme l'orifice de la pipette en orientant sa face extracellulaire vers l'extérieur.

Le hasard de la manipulation permet parfois d'isoler un **fragment contenant un seul canal** : on accède alors aux **courants** ioniques dits **unitaires**, uniquement dus au passage des ions à travers ce canal. La technique permet donc d'étudier le fonctionnement des canaux ioniques.

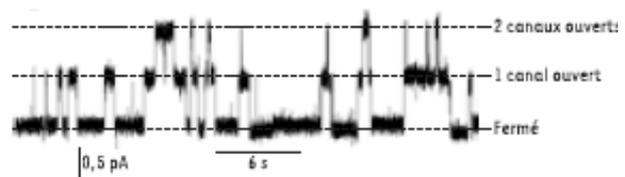
Pour ce faire, on **impose une ddp** qui est maintenue **constante** (d'où le terme de « voltage imposé ») par un dispositif complexe. Celui-ci injecte un courant qui s'oppose exactement à celui provoqué par la ddp imposée. Les courants « injectés » permettent de déduire ceux qui ont eu lieu spontanément, c'est-à-dire ceux dus aux mouvements des ions à travers le canal. En effet, la loi d'Ohm implique que $U = I / G$ avec U la tension (ici la ddp), I le courant (induit par le passage des ions) et G la conductance (ici de la membrane). Or la conductance dépend directement de l'état d'ouverture du canal. En connaissant U et I , on peut ainsi déterminer la conductance du canal en fonction des paramètres de l'expérience.



- (a) Technique d'enregistrement d'un canal dans une cellule entière vivante. Deux électrode : une électrode appliquée sur la membrane plasmique au niveau d'un canal et maintenue par un légère succion, une seconde électrode intracellulaire.
- (b) Photographie du corps cellulaire d'un neurone et de l'extrémité de la pipette
- (c) Différentes configurations en patch clamp.

Résultats :

enregistrement inside-out de canaux chlorure



Intérêt de cette technique : il est possible de mesurer l'activité d'un canal unique en fonction du potentiel de membrane, de la présence de toxines, de neurotransmetteurs etc...

Cette technique peut également être combinée à l'utilisation **d'ovocytes de Xénope**. Les canaux sont ainsi exprimés au niveau de la membrane de l'ovocyte et leur fonctionnement est déterminé par patch clamp. Cette technique repose sur le fait que :

- les ovocytes de Xénope n'expriment pas de canaux ioniques : les seuls canaux présents sont ceux étudiés
- les ovocytes sont de grande taille ce qui facilite les manipulations.

Exemple : le clonage du génome humain a permis d'identifier plusieurs dizaines de gènes pouvant coder pour des canaux K⁺. Les ARNm de ces gènes sont injectés dans un ovocyte de Xénope et son fonctionnement est étudié par patch clamp.

Figure 8 : Enregistrement par Voltage clamp de courants unitaires entrants et sortants (in Peycry et al, 2013)

O : ouverture ; F : fermeture.

Premier enregistrement : le courant unitaire n'est pas enregistré en présence des ions tétra-éthyl-ammonium, qui inhibent les canaux VD à K⁺.

Deuxième enregistrement : le courant unitaire n'est pas enregistré en présence de tétrodotoxine, qui inhibe les canaux voltage-dépendant (VD) à Na⁺.

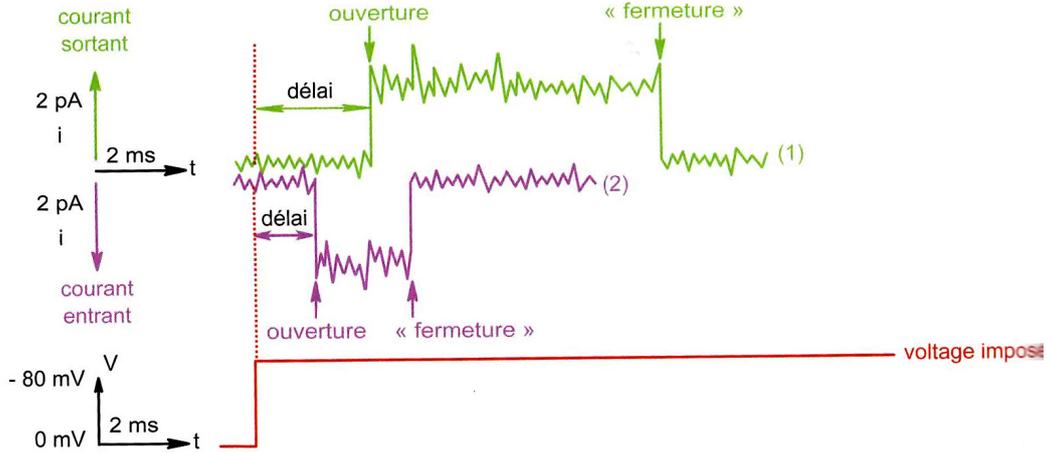
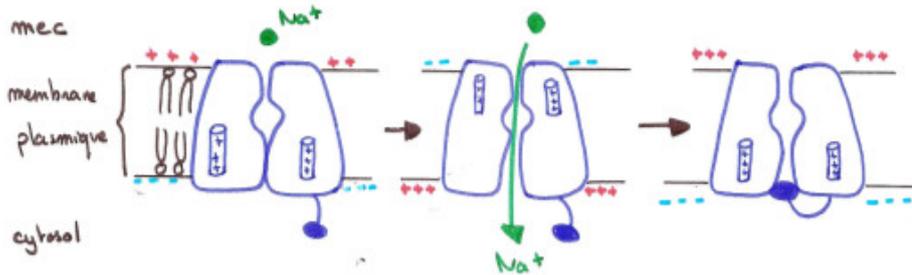


Figure 9 : fonctionnement du canal à Na⁺ voltage dépendant



① Canal à Na⁺ fermé

Les hélices chargées positivement sont attirées par les charges ⊖ du cytosol → le canal est fermé

② Canal à Na⁺ ouvert

La dépolarisation → rotation des hélices chargées vers le mec → le canal s'ouvre

③ Canal à Na⁺ inactivé

Les hélices reviennent rapidement à leur position de départ et le segment inactivateur ferme le canal.

La repolarisation de la membrane entraîne le déplacement du segment inactivateur, le canal se ferme.
→ retour à l'état ①

Figure 10 : Potentiel d'action et variation de la conductance de la membrane aux cations (in Segarra *et al.*, *Ellipse*)

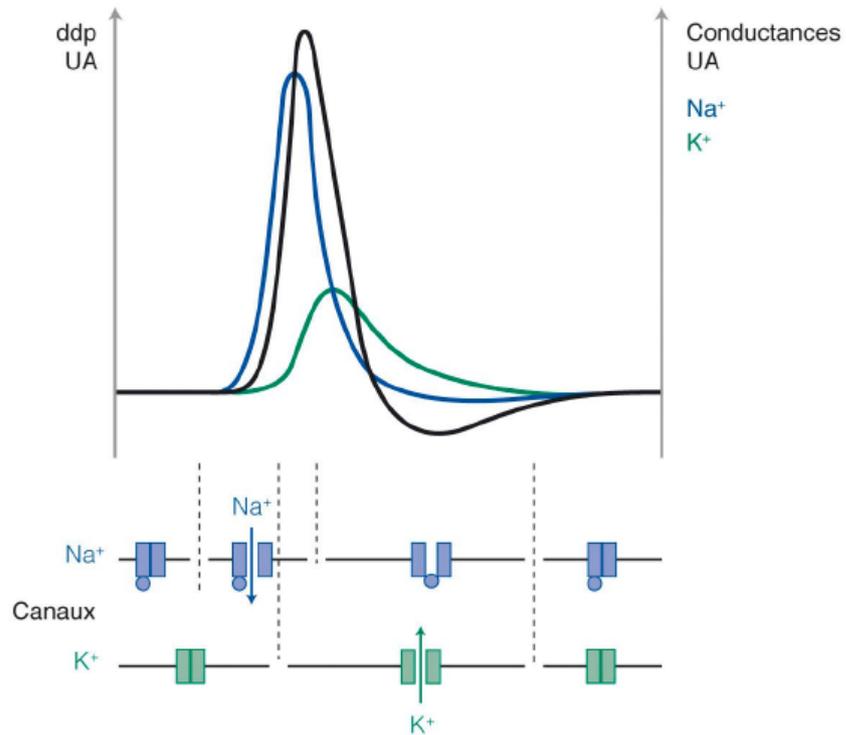


Figure 11 : Mise en évidence de la régénération des potentiels d'action (in Segarra *et al.*, *Ellipse*)

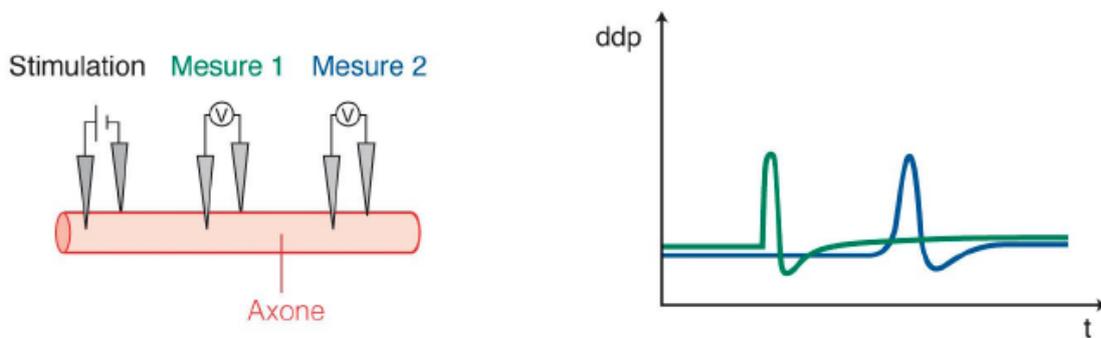


Figure 12a : Conduction du message électrique dans un axone amyélinisé
(in Segarra *et al.*, *Ellipse*)

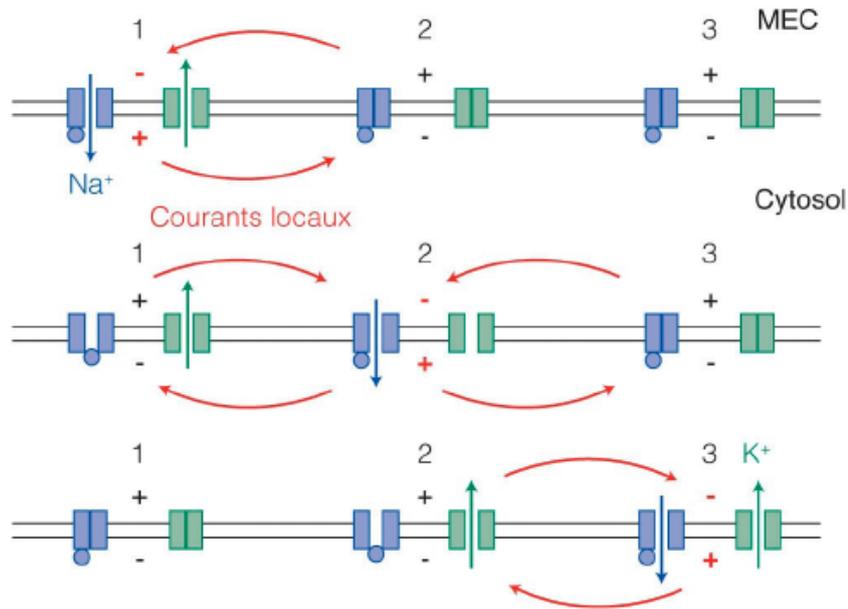


Figure 12b : Conduction du message électrique dans un axone myélinisé
(in Segarra *et al.*, *Ellipse*)

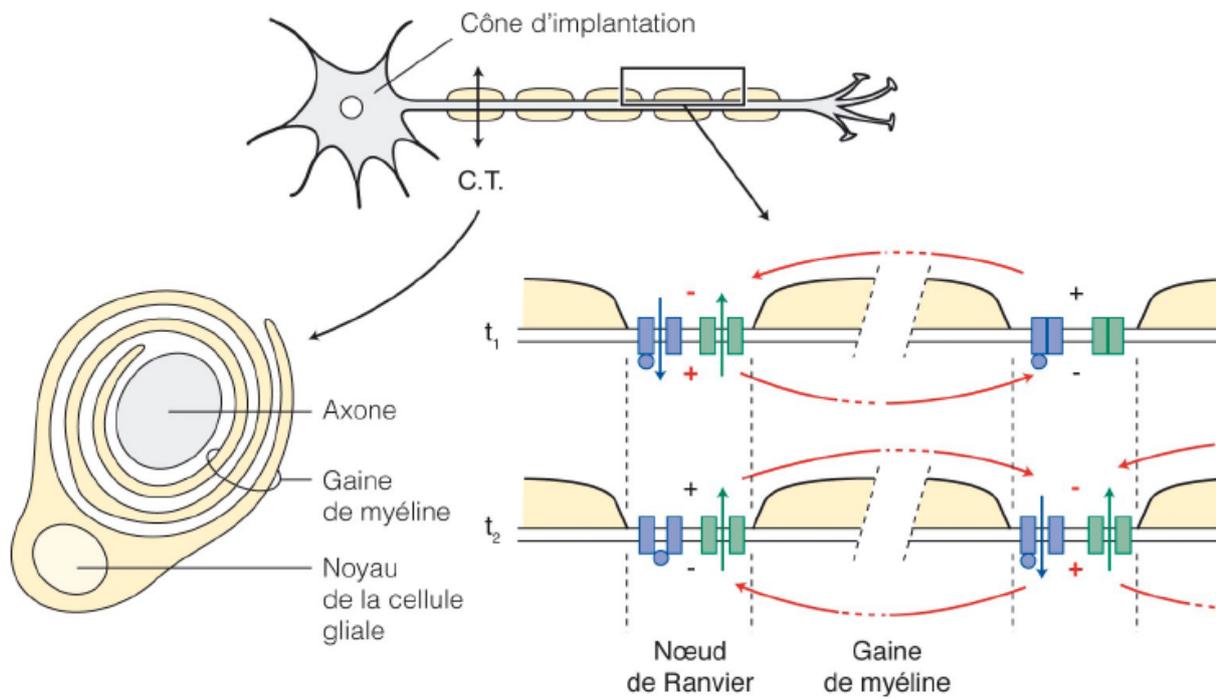


Figure 13 : modèle de fonctionnement d'un synapse neuromusculaire

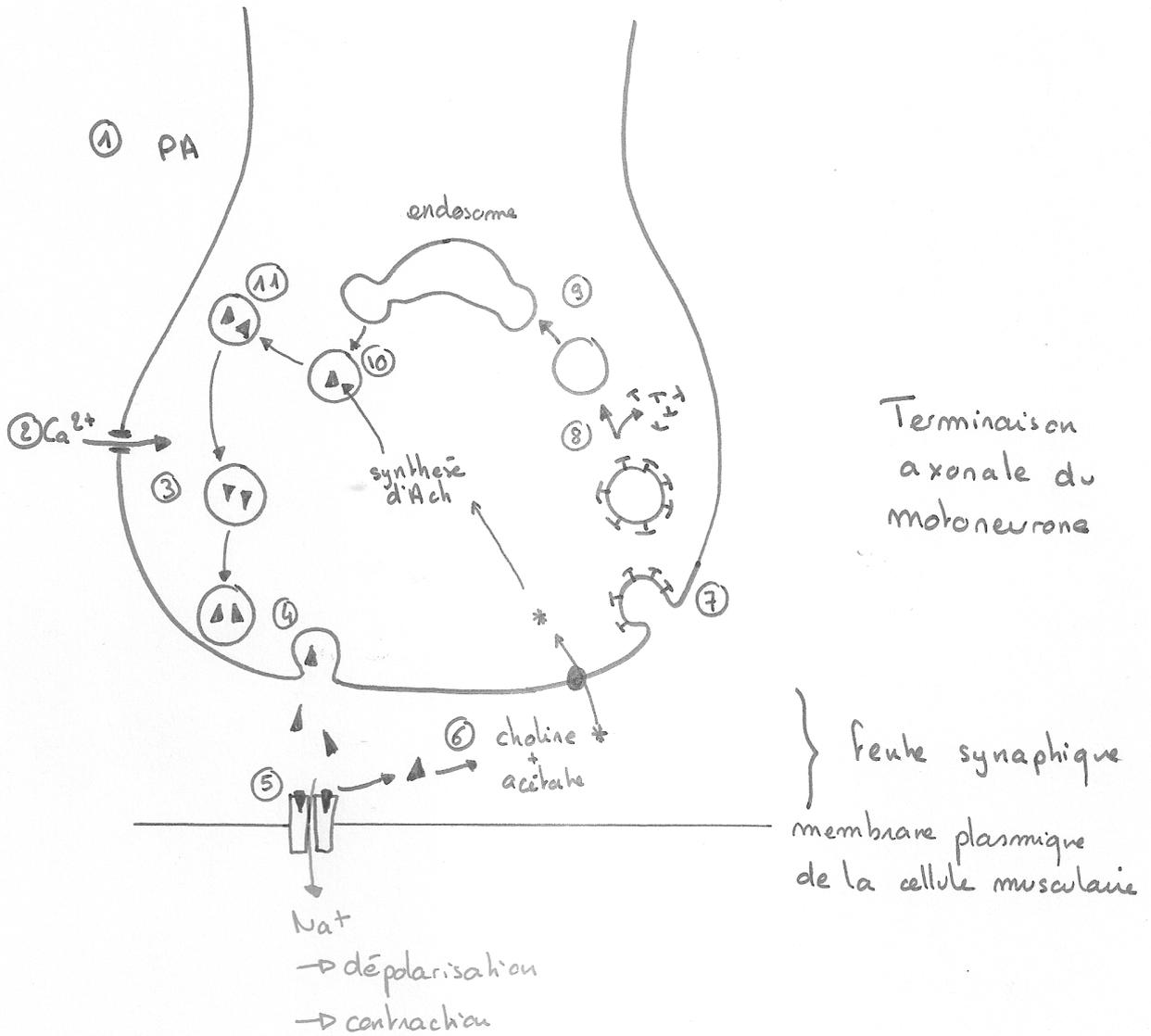
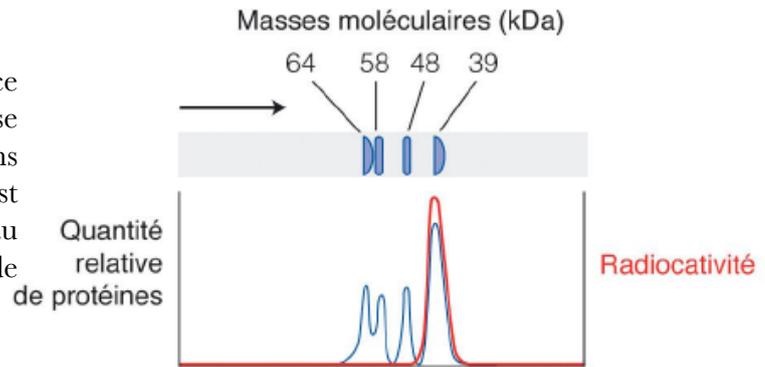


Figure 14 : Analyse de document : Etude du récepteur nicotinique à acétylcholine

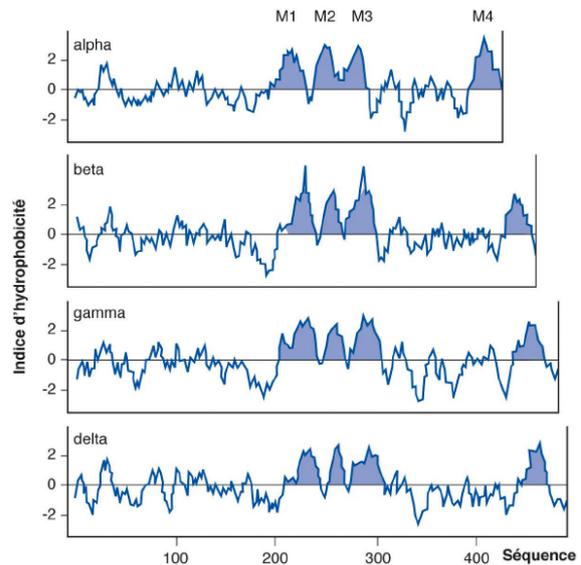
L'organe électrique de la torpille, un poisson cartilagineux, contient de très grandes quantités de ce récepteur : c'est donc un matériel biologique de choix pour son étude.

Dégager quelques éléments structuraux et fonctionnels du récepteur nicotinique à partir de l'étude des documents suivants.

Des canaux purifiés sont mis en présence d'acétylcholine radioactive. On réalise ensuite une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le gel est ensuite découpé en bandes très fines au sein desquelles on mesure la quantité de protéines, ainsi que la radioactivité.



On réalise le profil d'hydrophobicité des différentes chaînes peptidiques du récepteur.

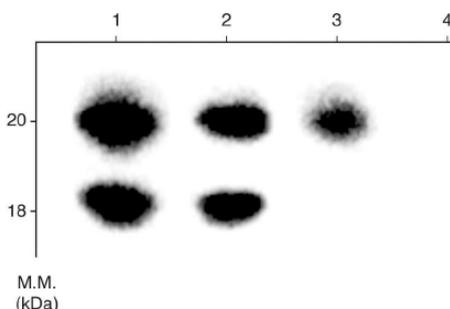


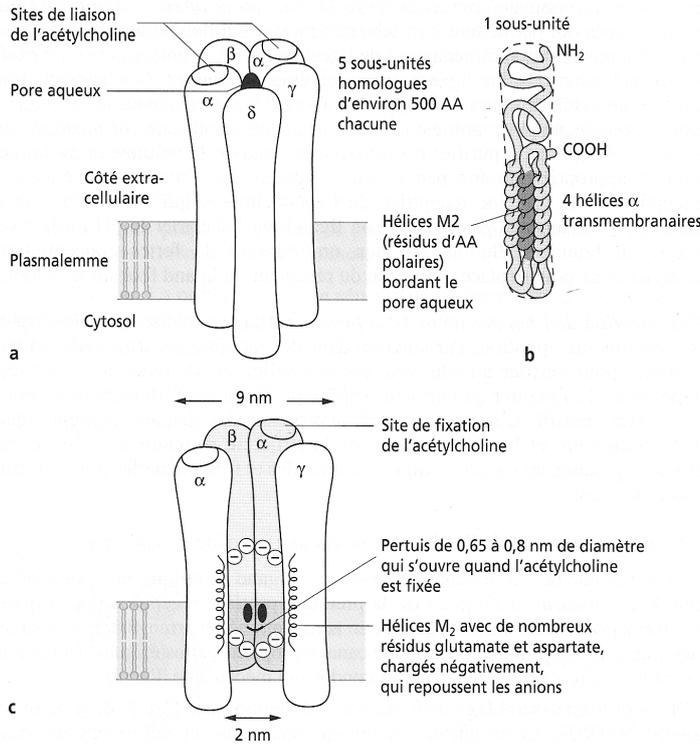
Le tubocurare est un antagoniste compétitif de l'acétylcholine, c'est-à-dire qu'il inhibe ses effets en se liant de façon compétitive à son site de fixation. Des membranes riches en canaux sont traitées avec du tubocurare radioactif. Les canaux sont ensuite extraits et leurs sous-unités séparées de façon à isoler les sous-unités alpha.

Le traitement avec une enzyme hydrolytique permet de générer deux fragments : l'un, de 20 kDa, contenant l'extrémité N-terminale ; l'autre, de 18 kDa, contient l'extrémité C-terminale.

Les résultats des digestions sont soumis à électrophorèse.

Les membranes sont incubées avec le tubocurare radioactif en absence (1 et 3) ou présence (2 et 4) d'un inhibiteur spécifique de sa fixation. Pistes 1 et 2 : gel coloré au bleu de Coomassie. Pistes 3 et 4 : autoradiogramme du gel





Structure du récepteur à l'acétylcholine.

Figure 15 : le neurone, une cellule polarisée

La polarité fonctionnelle des neurones.

Le compartiment somato-dendritique d'un neurone reçoit de nombreuses informations venant d'autres neurones auxquels il est connecté par des synapses. Au niveau de chacune de ces synapses, le neurone élabore des potentiels post-synaptiques en réponse aux neurotransmetteurs.

Ces potentiels post-synaptiques se propagent et se somment dans le compartiment somato-dendritique. Ils sont ainsi conduits jusqu'au segment initial de l'axone appelé aussi cône axonique au niveau duquel le neurone génère ou non des potentiels d'action.

Les potentiels d'action se propagent le long de l'axone et des collatérales axonales jusqu'aux terminaisons axonales où ils provoquent la libération du neurotransmetteur.

