



LV207 – Physiologie cellulaire intégrée
Section AHA

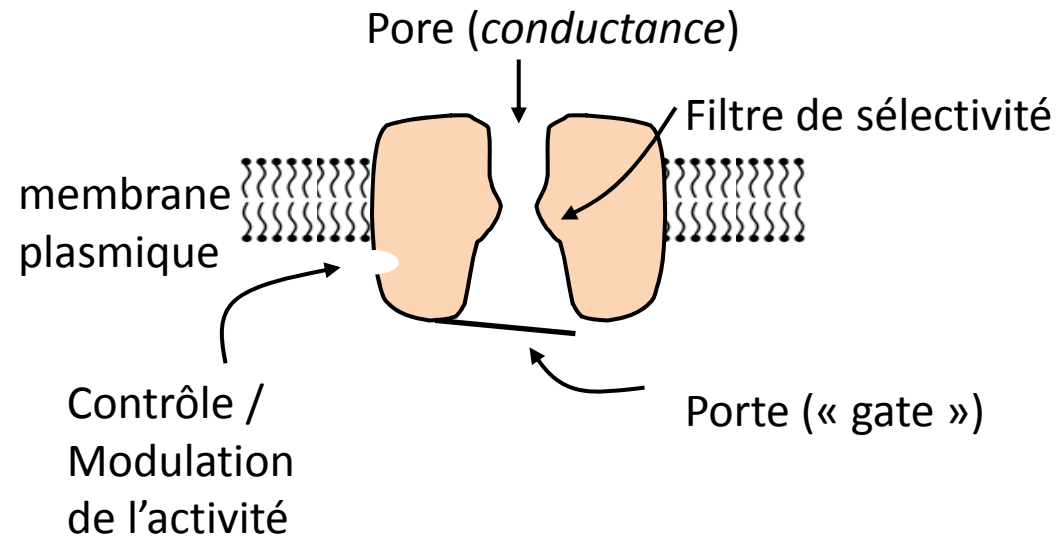
Année 2012-2013

PATCH-CLAMP

Stéphane LOURDEL

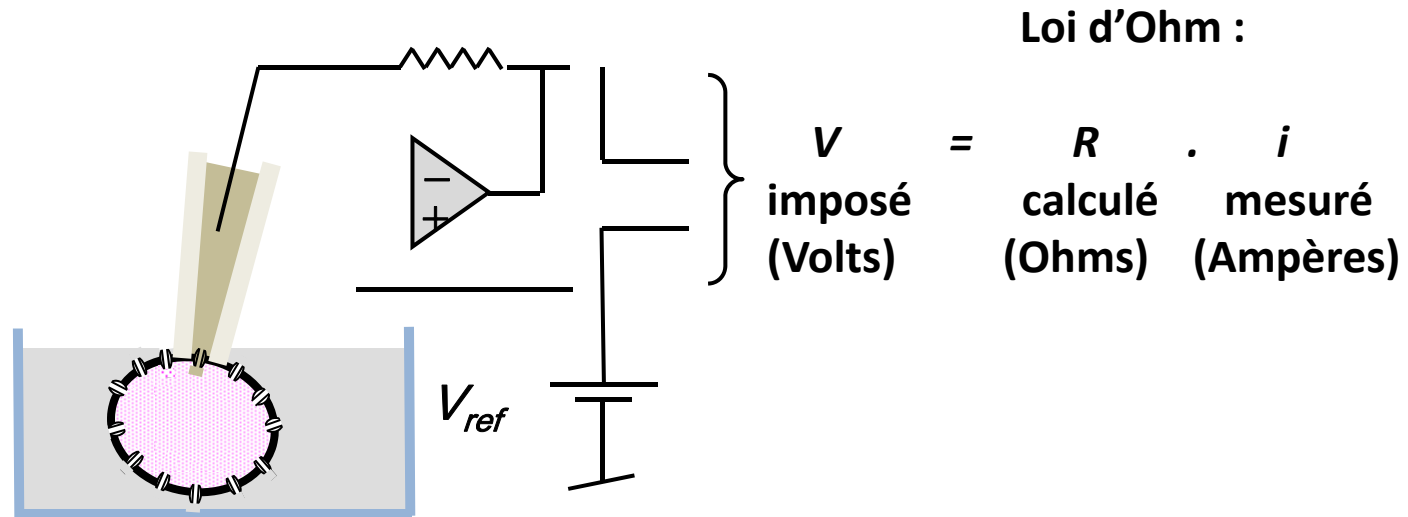
stephane.lourdel@upmc.fr

Canaux ioniques



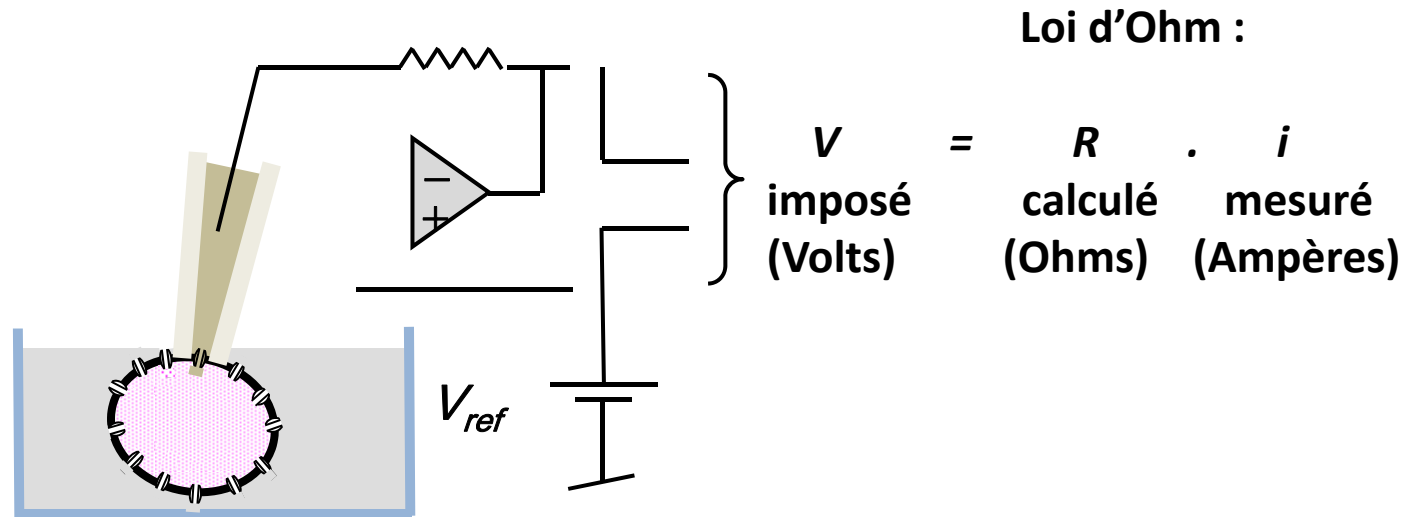
- **Macromolécules ou complexes macromoléculaires formant des pores dans des bicouches lipidiques**
- **L'ouverture du pore provoque un déplacement de charges → courant électrique**

Le patch-clamp, une technique d'étude des canaux ioniques



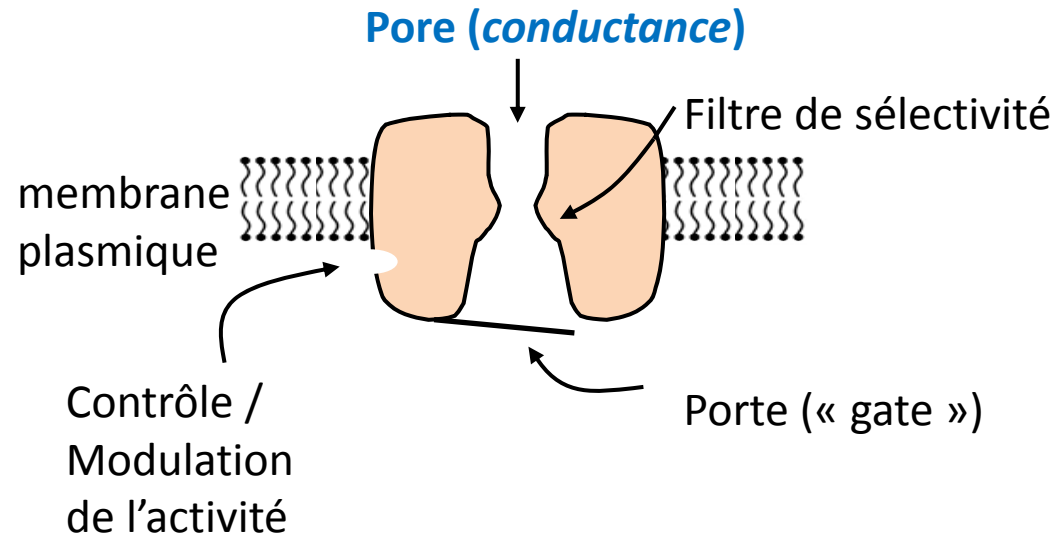
- *Patch* = fragment de membrane
- *Clamp* = maintien

Le patch-clamp, une technique d'étude des canaux ioniques



- On dépose une pipette de verre remplie d'une solution conductrice à la surface d'une membrane cellulaire contenant des canaux ioniques
- La pipette est connectée à un amplificateur
- L'amplificateur permet d'imposer :
 - des potentiels et de recueillir des courants (*voltage-clamp*)
 - des courants et de recueillir des voltages (*current-clamp*)
- Recueil des courants :
 - à travers un seul canal ionique (canal unitaire, *single-channel*)
 - à travers tous les canaux ioniques présents sur la surface de la cellule (courant global, courant macroscopique, *whole-cell*)

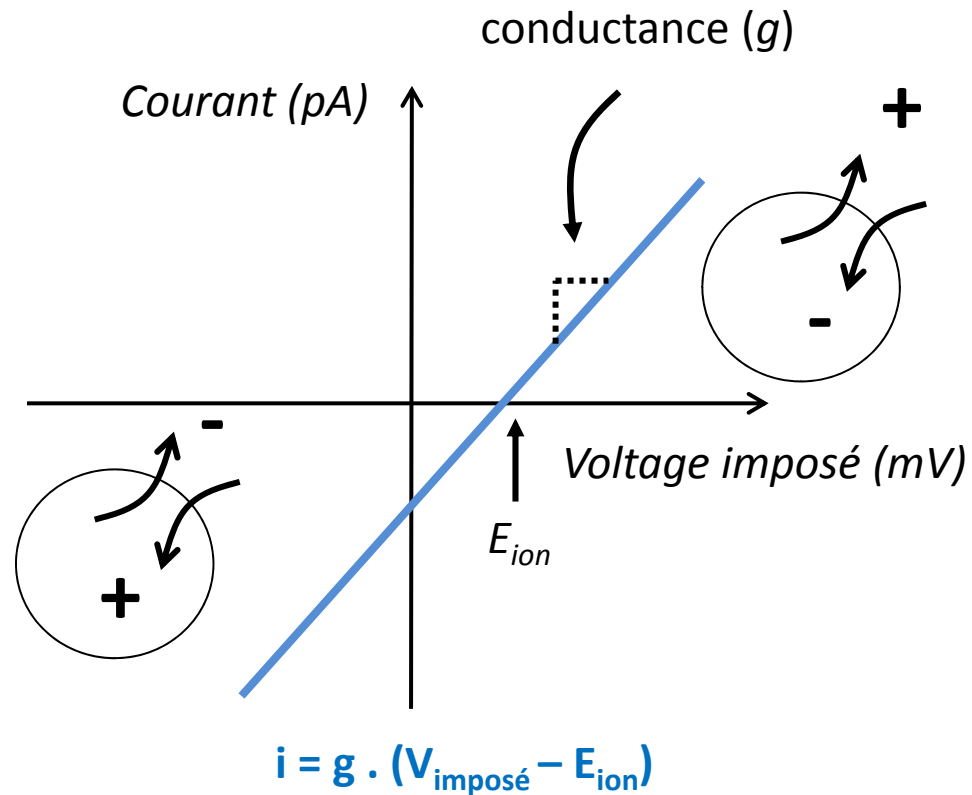
Conductance



$$(V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}}) = R \cdot i \quad \longrightarrow \quad R = 1 / g$$
$$i = g \cdot (V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}})$$

- **Unité de la conductance : Siemens (S)**
- **Représente la facilité avec laquelle les ions traversent le pore**

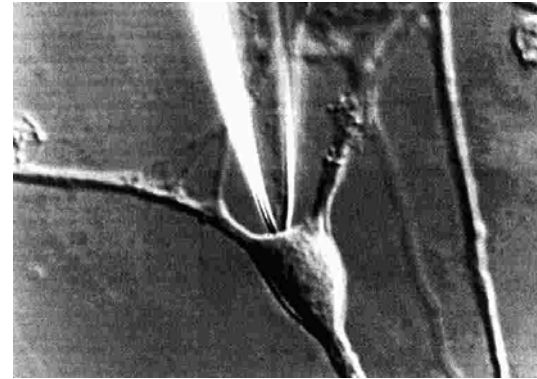
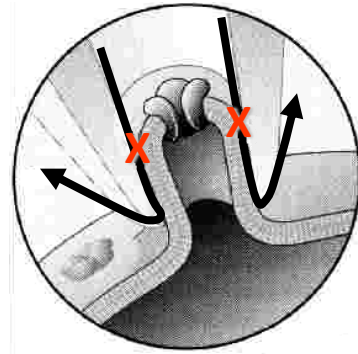
Relation courant - voltage



Le flux des ions dépend du gradient électrochimique ($V_{imposé} - E_{ion}$) :

- Si $(V_{imposé} - E_{ion}) > 0$: flux sortant de cations ou flux entrant d'anions (courant positif).
Hyperpolarisation de la membrane plasmique.
- Si $(V_{imposé} - E_{ion}) < 0$: flux entrant de cations ou flux sortant d'anions (courant négatif).
Dépolarisation de la membrane plasmique.

Réalisation d'un scellement sur la membrane plasmique

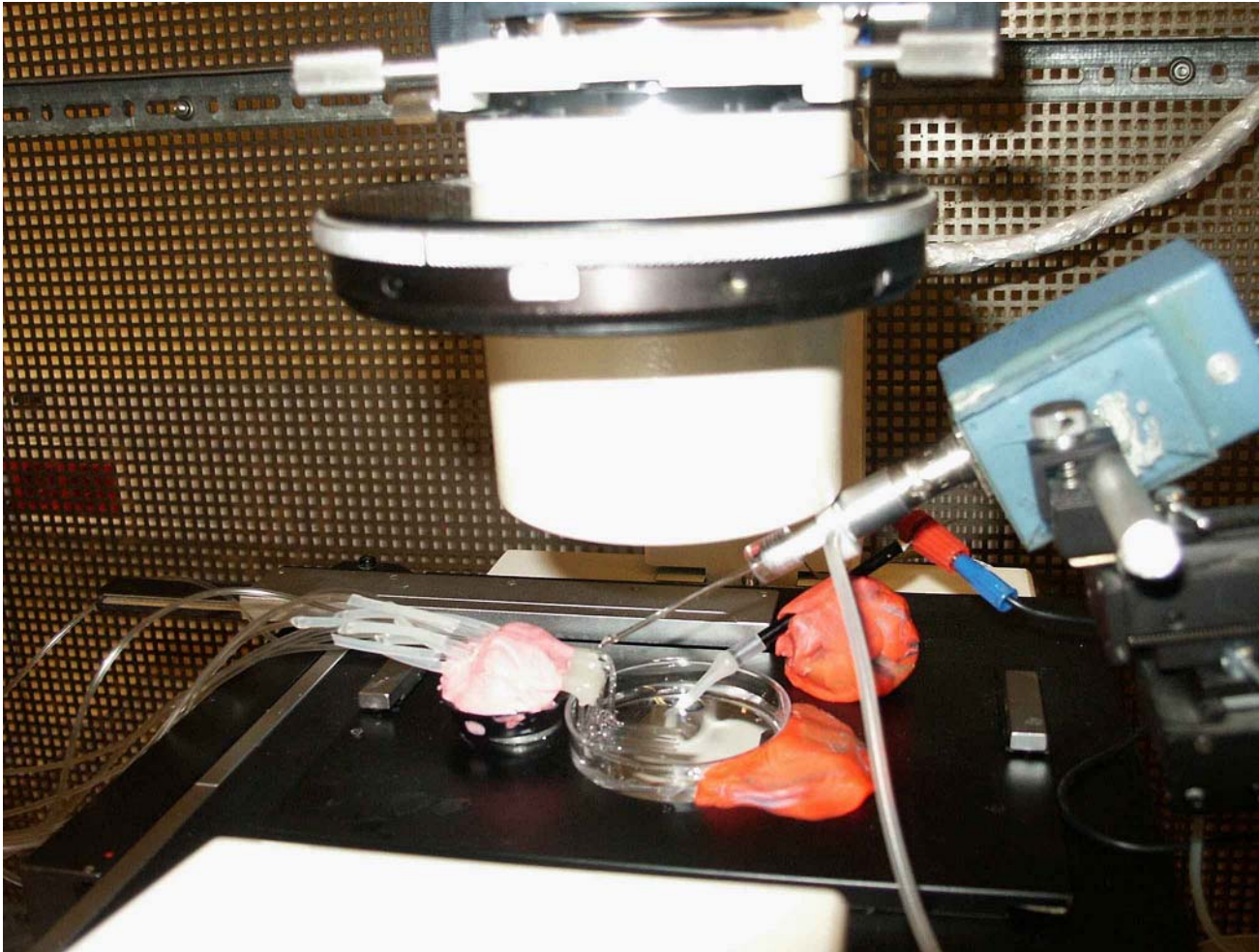


- Les courants générés par un canal sont très faibles ($\sim 10^{-12}$ A, picoampère)
- Il est donc nécessaire de diminuer au maximum le bruit de fond
→ *Seal* (joint) très fort entre la pipette et la membrane plasmique

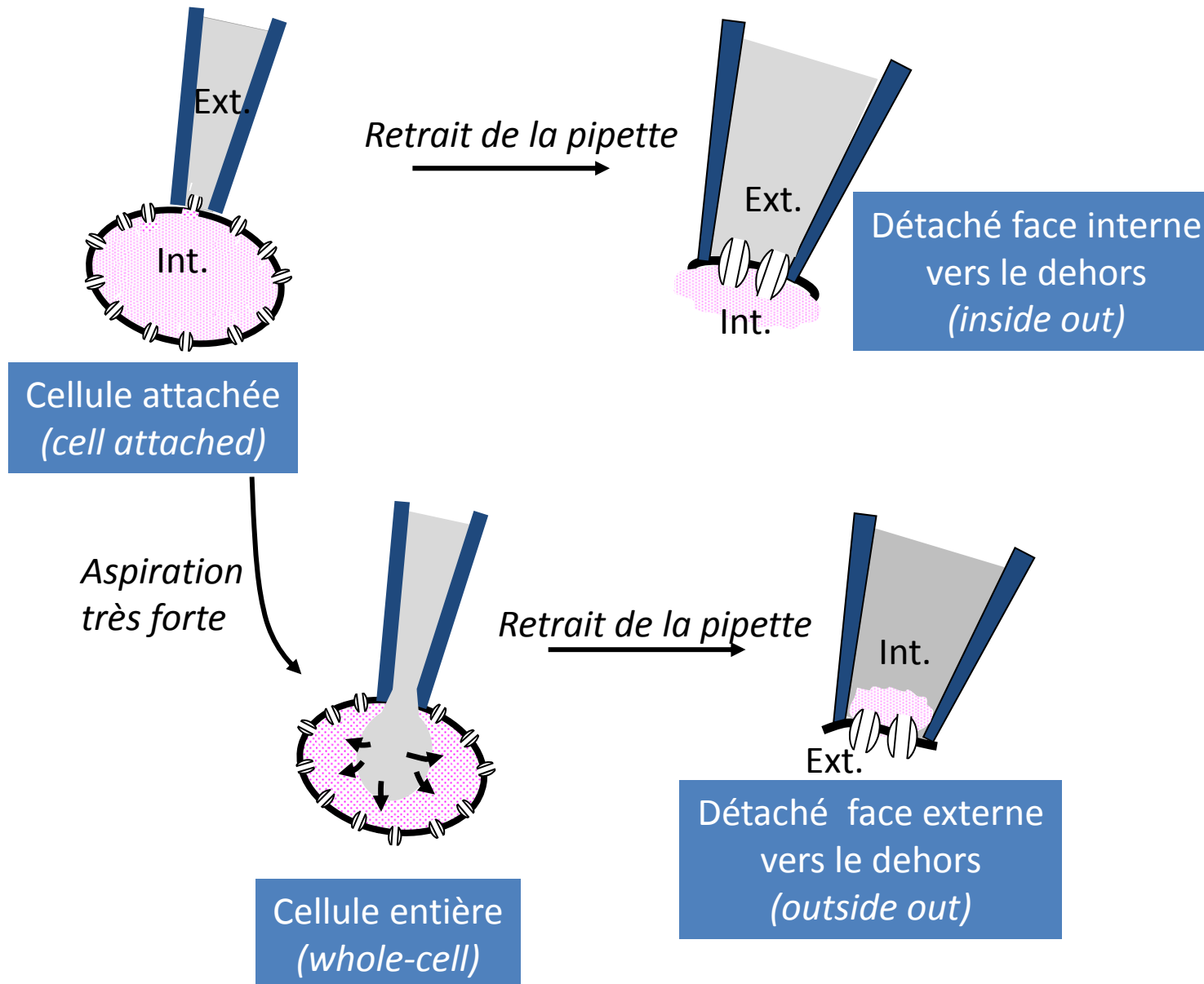
Le poste de patch-clamp



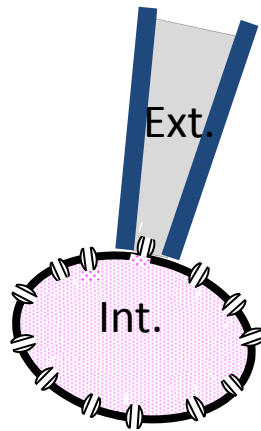
La chambre de perfusion



Les configurations de base du patch-clamp



Configuration cellule attachée



Cellule attachée
(cell attached)

AVANTAGES :

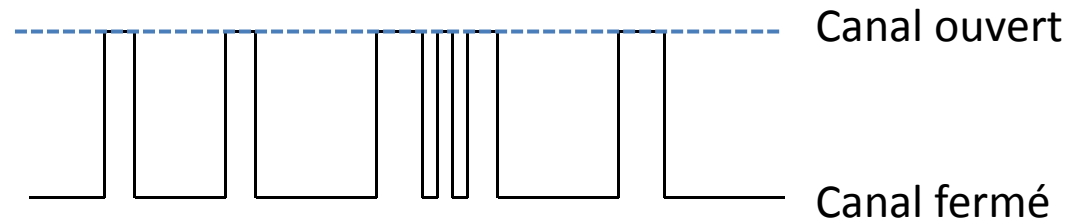
- Milieu interne de la cellule conservé. Méthode non invasive

INCONVENIENTS :

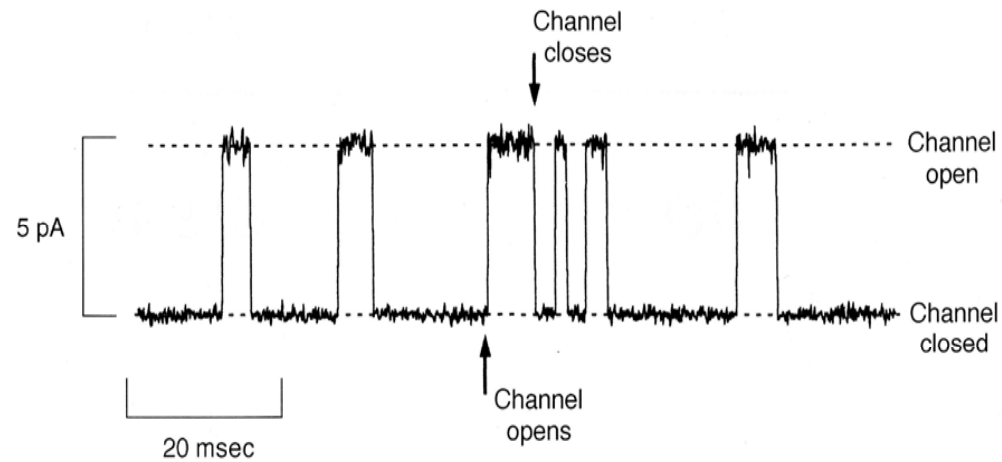
- Milieu interne de la cellule non contrôlé

Enregistrement en canal unitaire (*single-channel*)

Enregistrement théorique

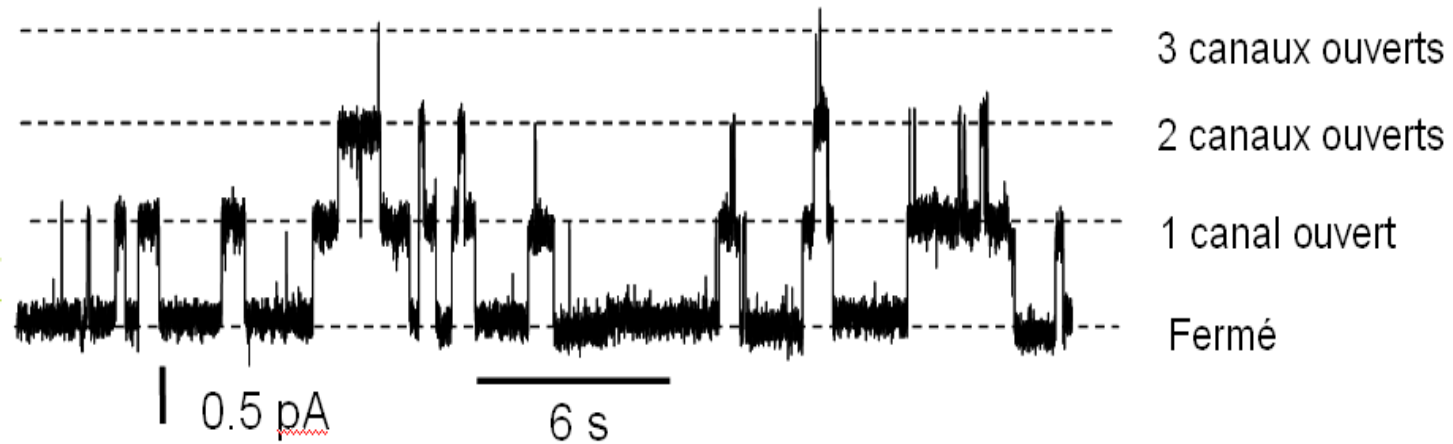


Enregistrement pratique



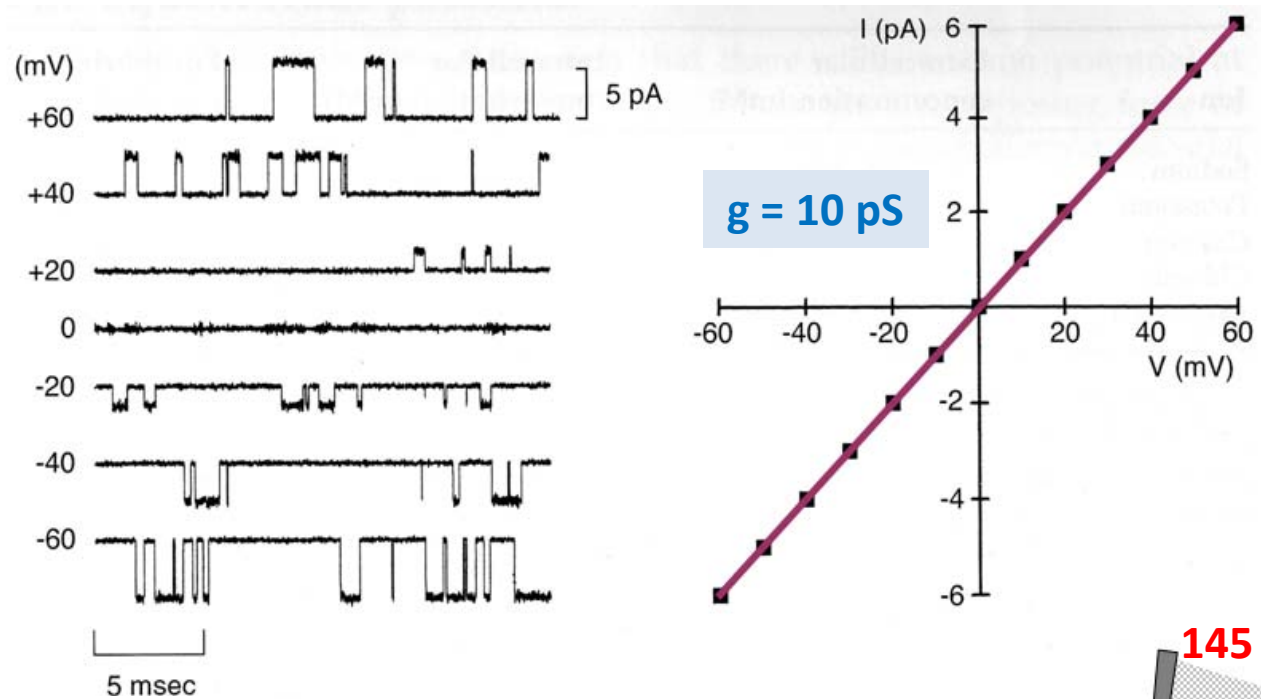
Un seul créneau de courant → Un seul canal actif sous la pointe la pipette

Enregistrement en canal unitaire (*single-channel*)



3 créneaux de courant de MÊME amplitude → 3 canaux identiques

Détermination de la conductance : relation courant-voltage

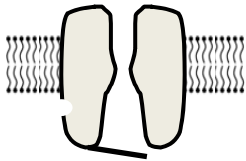


Solutions identiques des deux côtés



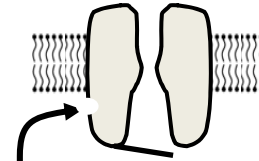
Quelques régulations possibles des canaux ioniques

A - Facteurs physiques



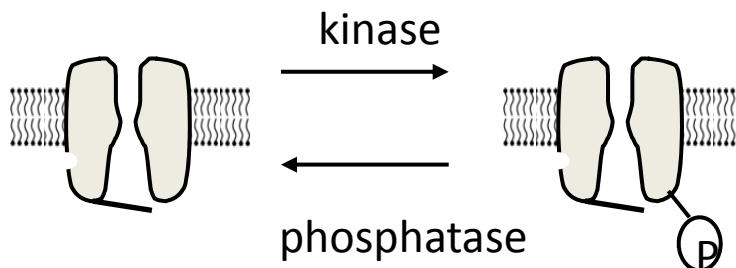
potentiel électrique
tension membranaire

B - Facteurs intracellulaires



H⁺, Ca²⁺, ATP ...

C – Phosphorylation - déphosphorylation

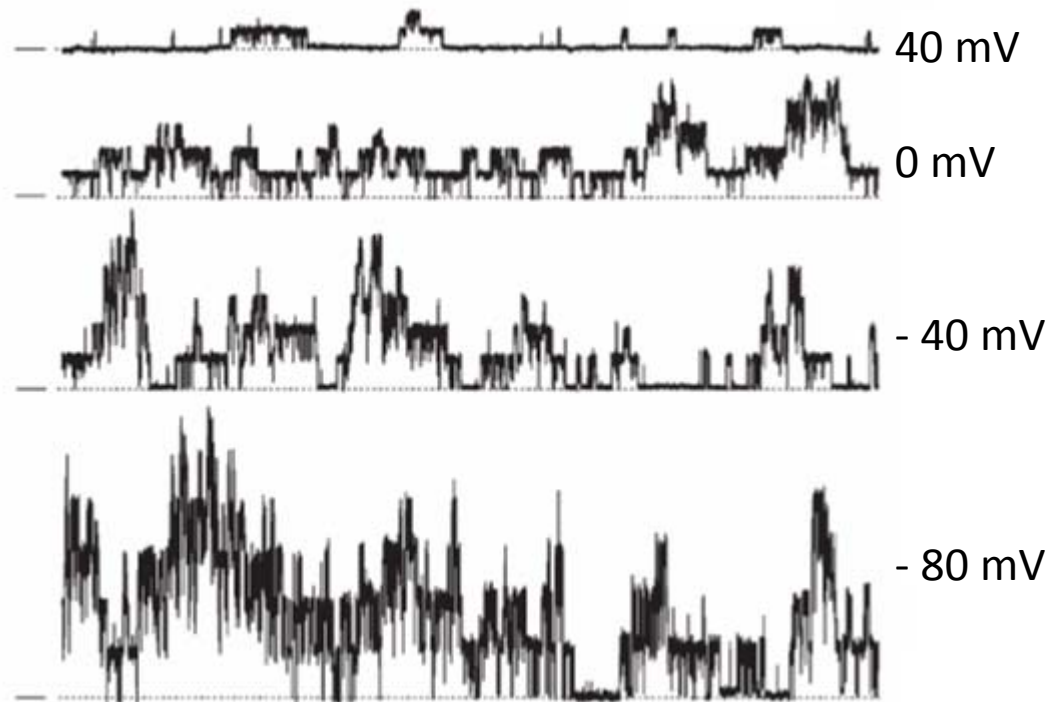


D – Protéines G

E – Canaux récepteurs

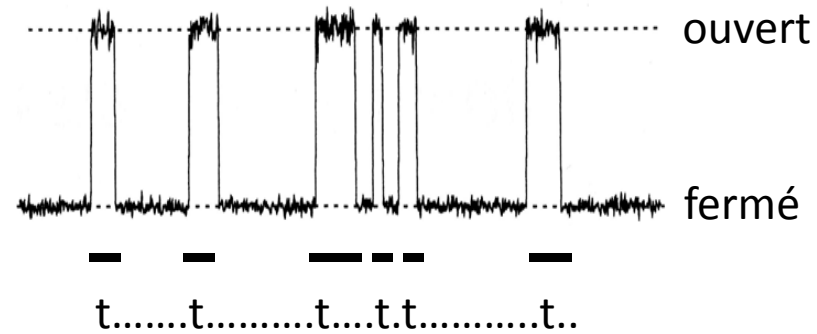
Récepteur nicotinique de l'acétylcholine...

Quantification de l'activité d'un canal : la probabilité d'ouverture



Exemple : dépendance au voltage

Quantification de l'activité d'un canal : la probabilité d'ouverture

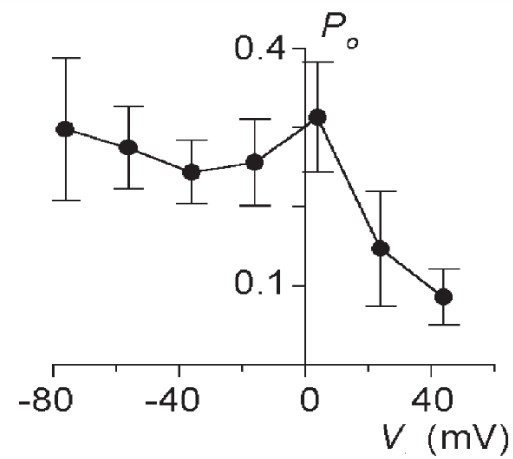
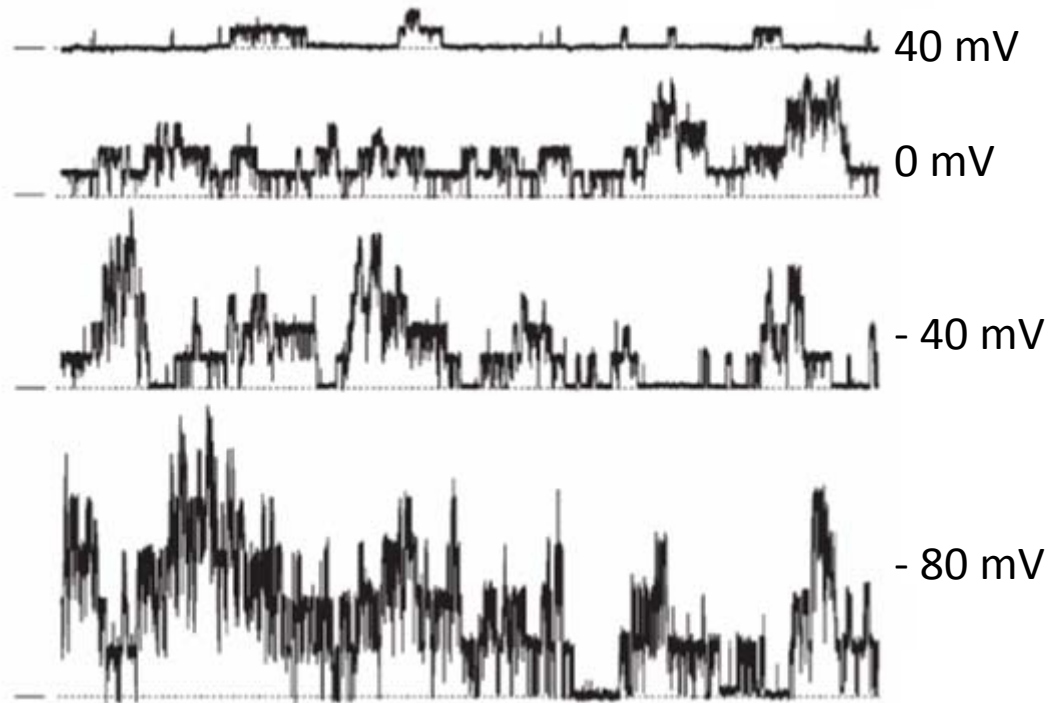


Probabilité d'ouverture : $P_o = \frac{\sum t}{T_{total}}$

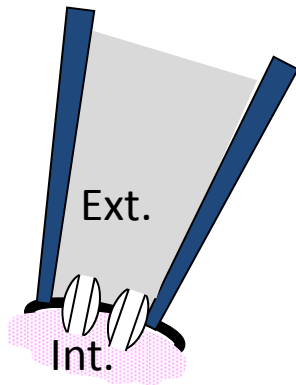
t = temps pendant lequel le canal est ouvert

T = temps total d'enregistrement

Quantification de l'activité d'un canal : la probabilité d'ouverture



Configuration détachée face interne vers le dehors



Détaché face interne
vers le dehors
(*inside out*)

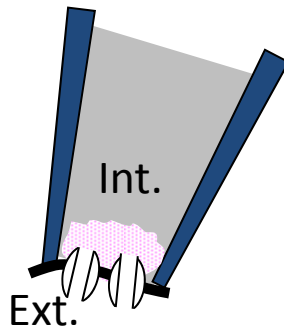
AVANTAGES :

- Milieu interne parfaitement contrôlé

INCONVENIENTS :

- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal

Configuration détachée face externe vers le dehors



Détaché face externe
vers le dehors
(*outside out*)

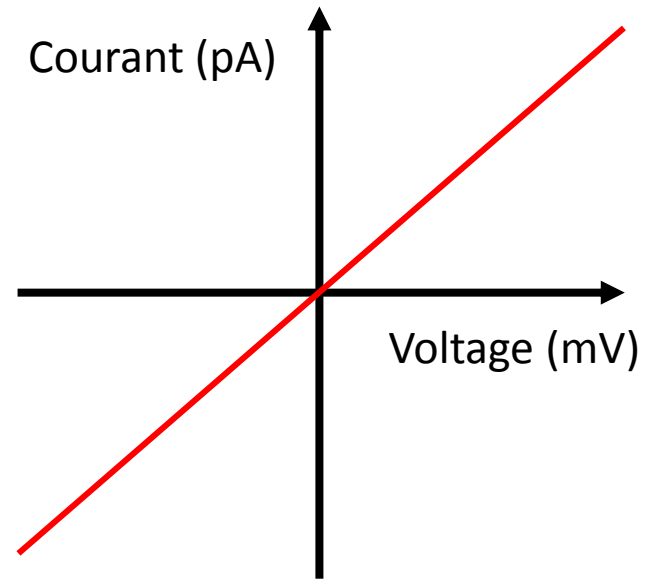
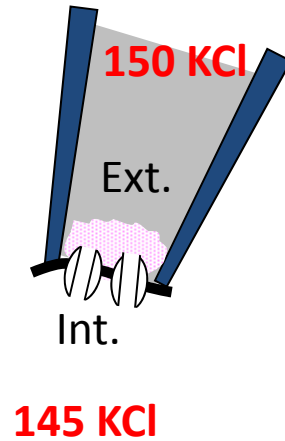
AVANTAGES :

- Milieu externe parfaitement contrôlé

INCONVENIENTS :

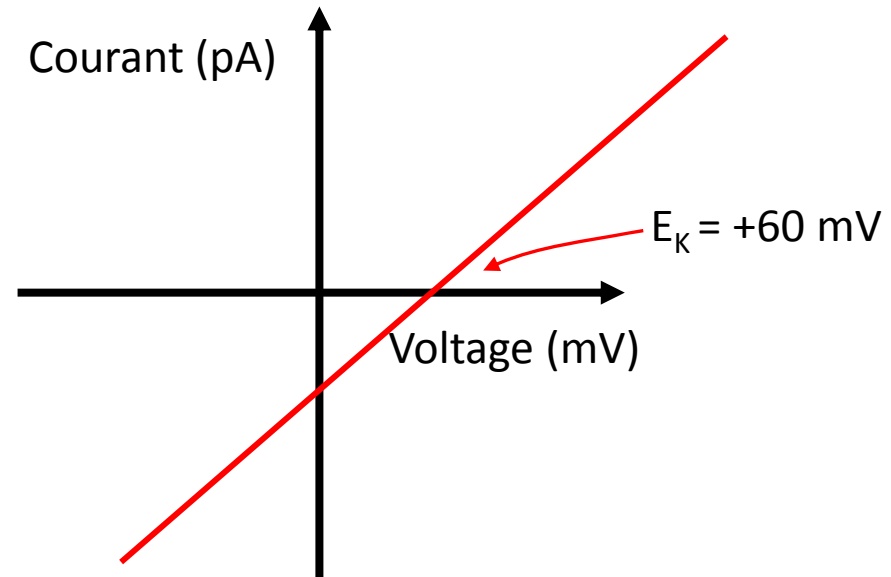
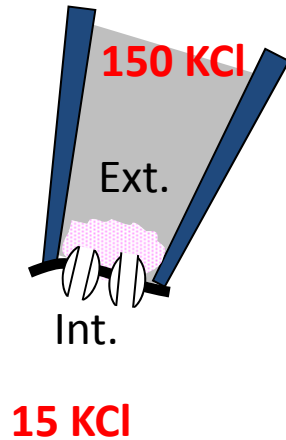
- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal
- Assez difficile à obtenir en pratique...

Détermination de la sélectivité ionique d'un canal



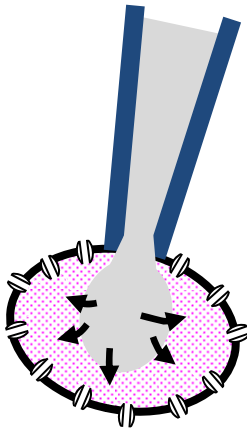
Canal K^+ ou canal Cl^- ???

Détermination de la sélectivité ionique d'un canal



- Le potentiel d'inversion du canal se déplace vers le potentiel d'équilibre de l'ion le plus perméant ($E_K = +60 \text{ mV}$; $E_{Cl} = -60 \text{ mV}$)
- C'est un canal K^+

Configuration cellule entière



Cellule entière
(*whole-cell*)

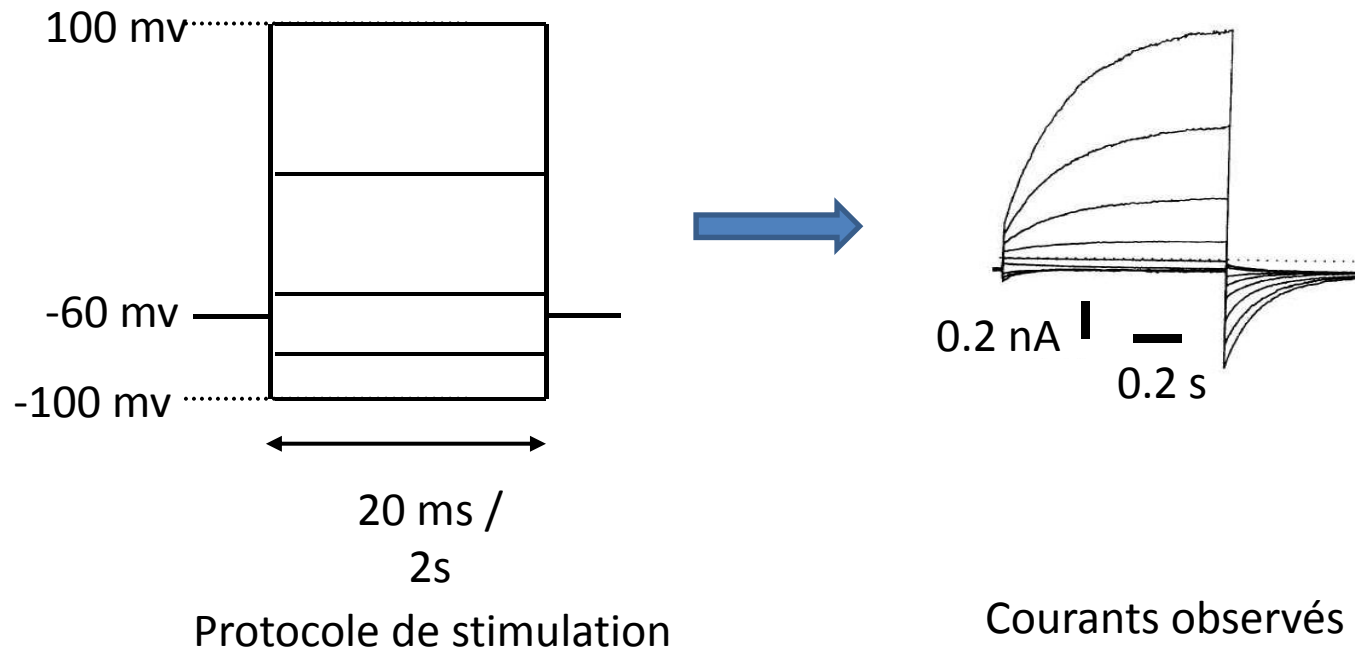
AVANTAGES :

- Milieux externe/interne bien contrôlés
- On enregistre les courants de toute la cellule ($\sim 10^{-9}$ A)

INCONVENIENTS :

- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal

Configuration cellule entière



N canaux du même type



$$I_{\text{global}} = N \cdot P_0 \cdot i_{\text{unitaire}}$$