

# Méthodes d'études des canaux ioniques et des récepteurs par les techniques électrophysiologiques.

Conférence de M. le Professeur B.DUFY  
Laboratoire de Neurophysiologie CNRS UNR 5543 (Université Bordeaux II)

(Compte-rendu : B.Pajot)

## Sommaire

- . De l'intracellulaire aux techniques de « patch-clamp »
- . Du « patch-clamp » à la biochimie intracellulaire.
- . Apports des techniques de patch dans l'étude des mécanismes endocrine.

**La voie des phospholipides**

**La voie de l'AMP cyclique**

**La voie des tyrosines kinases**

Toute fonction cellulaire (transmission de l'information, sécrétion, contraction, ..) s'accompagne de mouvements ioniques à travers la membrane plasmique de la cellule. L'activation d'un récepteur, dans les cellules excitables comme dans les cellules inexcitables, s'accompagne également de mouvements ioniques transmembranaires. Les techniques électrophysiologiques permettent l'étude de ces mouvements . Elles permettent l'étude des voies de transduction et éventuellement de leurs anomalies (mutations des canaux et des récepteurs).

### 1) De l'intracellulaire aux techniques de « patch-clamp »

Les techniques électrophysiologiques d'enregistrement intracellulaire, telles qu'elles étaient utilisées au cours des dernières années pour l'étude des propriétés électrophysiologiques des cellules excitables , utilisaient des microélectrodes intracellulaires très fines (et donc d'une résistance élevée : 80 à 100 mégohms). L'électrolyte remplissant l'électrode était généralement du KCl 3 M dont la diffusion lors de la manipulation était très faible (pointe de l'électrode très fine) et qui n'influait que peu la réponse à un stimulus donné. Ces techniques ont permis la description des propriétés macroscopiques des conductances et des courants ioniques transmembranaires. Dans ces conditions, les effets des différents stimuli sur les propriétés électrophysiologiques de la cellule étaient reproductibles tout au moins lorsque n'intervenaient pas des processus de désensibilisation au niveau du récepteurs ou à tout autre niveau.

Si les techniques d'enregistrement intracellulaire classique permet d'analyser les courants macroscopiques, elle n'autorise pas un niveau de résolution suffisant pour l'étude du fonctionnement des canaux ioniques individuels .

Neher et Sakmann (1976) ont mis au point les techniques permettant d'étudier les courants circulants au travers de canaux individuels d'un petit morceau de membrane (« patch »), ceci au moyen d'électrodes dont le diamètre est supérieur à celui des électrodes utilisées jusqu'ici ( Cf. : Graphique inséré dans le compte rendu de Mme Taupignon).

L'électrode est placée au contact de la membrane et l'application d'une dépression dans la pipette permet d'obtenir un scellement très fin. On obtient alors des isolations au niveau du « patch » de l'ordre du Gigaohm (Gigaseal des auteurs anglo-saxons). Ensuite, les courants ioniques circulants au travers des canaux ioniques inclus dans le patch peuvent être isolés et étudiés. Il est évident que suivant la dimension du « patch », le morceau de membrane peut renfermer un ou plusieurs canaux ioniques (de nature éventuellement différente ...).

Notons enfin, que les mêmes auteurs ont montré qu'il était possible de perforer le morceau de membrane situé sous l'électrode et d'établir ainsi une connexion électrique entre la pipette et l'intérieur de la cellule, ce qui permet d'obtenir une configuration très semblable à l'enregistrement intracellulaire classique : c'est l'enregistrement dit « en cellule entière ».

## 2) Du « patch-clamp » à la biochimie intracellulaire.

L'enregistrement en cellule entière a révolutionné l'approche électrophysiologique. En effet, cette technique offre l'accès au milieu intérieur de la cellule par l'intermédiaire de la pipette de patch. La pipette est alors remplie d'une solution saline de composition proche de la composition du milieu cytoplasmique (concentration en ions  $K^+$  de 140 mM). Néanmoins, si dans cette configuration, les réponses électrophysiologiques ne sont pas différentes de celles observées lors d'un enregistrement intracellulaire, de nombreuses réponses électrophysiologiques disparaissent rapidement. Cette disparition correspond à la diffusion dans la cellule de la solution contenue dans la pipette ce qui dilue des composés cytoplasmiques (notamment des molécules second messagers qui interviennent dans ces réponses). Cet inconvénient peut être tourné en avantage, car l'on peut perfuser à l'intérieur de la cellule les composants que l'on suppose intervenir dans la réponse et obtenir ainsi une étude biochimique du même niveau de résolution que les études électrophysiologiques, c'est à dire au niveau de résolution d'une seule cellule.

Une nouvelle variante de l'enregistrement en cellule entière permet de modifier le milieu intracellulaire au cours de l'enregistrement, grâce à une technique de perfusion intracellulaire. Un fin cathéter est introduit dans la pipette de « patch » et permet la perfusion de la pointe de la pipette de « patch » et ainsi de modifier le milieu cytoplasmique au cours d'un même enregistrement.

## 3) Apports des techniques de patch dans l'étude des mécanismes endocrines.

Nous prendrons comme exemple les cellules de l'hypophyse antérieure. Rappelons que l'hypophyse antérieure est constituée de six types cellulaires différentes qui libèrent les deux hormones gonadotropes (FSH, LH), l'hormone thyroïdienne (TSH), corticotrope (ACTH), la prolactine PRL) et enfin l'hormone de croissance (GH).

Les sécrétions hormonales sont contrôlées par des facteurs d'origine et de nature variée qui agissent sur des récepteurs différents : neuropeptides hypothalamiques, neurotransmetteurs, et hormones stéroïdes. Les cellules hypophysaires peuvent être cultivées et les laboratoires possèdent des lignées cellulaires (GH3, AT20) qui sont des modèles d'étude des modes d'action des neuropeptides et des facteurs qui régulent les sécrétions.

Enfin, les cellules hypophysaires sont des cellules excitables comme les neurones et possèdent des canaux ioniques voltage-dépendants.

La voie des phospholipides:

L'hormone thyroïdienne (TRH) stimule la libération de PRL par les cellules lactotropes de l'hypophyse.

Le récepteur à l'hormone thyroïdienne est un récepteur à 7 domaines transmembranaires dont l'activation implique la voie des phospholipides membranaires. La TRH provoque des modifications complexes des propriétés électrophysiologiques membranaires qui font intervenir deux phases successives, une hyperpolarisation transitoire

suivie de la génération de potentiels d'actions calciques.

Ces deux phénomènes sont maintenant bien analysés : l'hyperpolarisation est provoquée par l'activation d'une conductance potassique dépendant de l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette augmentation est présente même en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ; et correspond donc à une libération de calcium à partir des vésicules du réticulum endoplasmique.

La deuxième phase est dépendante de calcium externe et correspond à une entrée de calcium. Les techniques de « patch-clamp » en voltage imposé permettent de mesurer les courants correspondants. C'est ainsi que la phase d'hyperpolarisation transitoire induite par la TRH est provoquée par un courant sortant  $\text{K}^+$  activée par une forte augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire.

Des techniques de spectrofluorométrie qui mesurent le calcium libre interne confirment et précisent ces observations électrophysiologiques.

La voie de l'AMP cyclique :

Le CRF dépolarise la membrane cellulaire et provoque le déclenchement de potentiels d'action calciques. Le « patch-clamp » ainsi que les techniques de mesure des variations du calcium intracellulaire en spectrofluorométrie confirme que le CRF modifie l'influx de calcium sans mobiliser celui-ci à partir des réserves internes à la cellule comme le fait le TRH. Ainsi, bien que les effets de ces deux facteurs, qui utilisent deux systèmes de seconds messagers différents, soient semblables, leur « signature électrophysiologique » diffère.

La voie des tyrosines kinases :

Les facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) activent des récepteurs tyrosines kinases. Les récepteurs à la prolactine ou à la GH n'ont pas d'activité tyrosine kinase, mais activent des voies faisant intervenir les tyrosines kinases. Les voies de transduction du signal sont encore imparfaitement inconnues, mais on sait qu'elles font intervenir des variations du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire dues en partie à des influx d'ions calcium par des canaux non voltage dépendants.

En résumé, les techniques d'électrophysiologie sont indispensables à l'étude des récepteurs et des voies de transduction impliquées dans leur activation.