



Labo

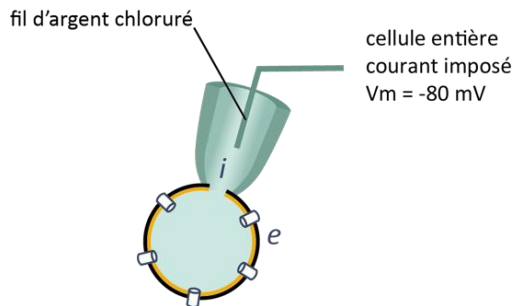
VIDEO 2-1 INJECTER UN COURANT (2:43)

L'objectif de l'expérience est de montrer le comportement ohmique de la membrane neuronale. On enregistre en configuration cellule entière et en mode courant imposé les changements de potentiel de la membrane en réponse à des sauts de courant. J'applique, grâce à l'électrode de patch, des sauts de courant négatif. En réponse à ces sauts de courant, le potentiel de la membrane s'hyperpolarise de plus en plus. Si maintenant j'applique des sauts de courant positif, le potentiel de la membrane se dépolarise de plus en plus. Je vous montre ici l'ensemble des traces obtenues, de courant, en bas, et de potentiel, en haut. À partir de ces traces, j'obtiens cette courbe I-V, qui est la relation entre le courant injecté et le potentiel de la membrane. Cette courbe $V = f(I)$ est proche d'une droite, ce qui montre que, dans cette zone de potentiel, entre -100 et -60 mV, la réponse de la membrane suit la loi d'Ohm: $V = RI$. En conclusion, cette expérience est souvent réalisée en routine au début de chaque enregistrement afin de connaître la résistance de la membrane, R , qui est la pente de la droite $V = f(I)$.

EXPLICATION

Injecter un courant positif ou négatif à travers la pipette d'enregistrement

On enregistre en configuration cellule entière et en mode courant imposé des changements de potentiel en réponse à l'injection d'échelons de courant (à partir de $V_m = -80$ mV).



Un fil d'argent chloruré trempe dans le liquide intrapipette afin d'assurer la continuité électrique entre le liquide intrapipette et les appareils de mesure.

Il se crée un équilibre entre les ions chlorures du fil d'argent chloruré (AgCl) et ceux de la solution (Cl-) tel que :



Lorsque le potentiel de la membrane est de $V_m = -80$ mV, très peu de canaux sont ouverts dans la membrane ; ce sont essentiellement des canaux K^+ et des canaux Cl^- . Le neurone est silencieux.



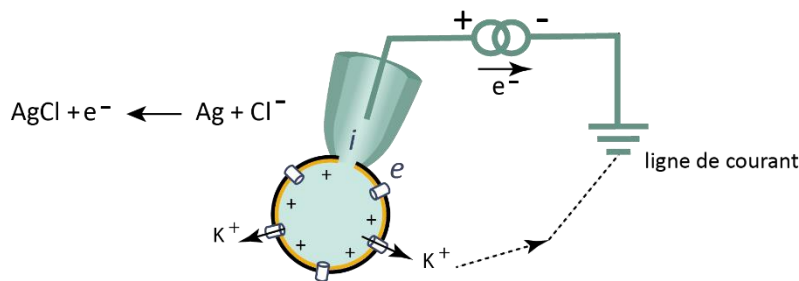
1. On injecte un pulse de courant positif. Celui-ci va dépolariser le potentiel de membrane. Pourquoi?

Lorsque le pôle positif du générateur est connecté vers la pipette, des électrons e^- circulent du fil vers le générateur. L'équilibre ci-dessus est déplacé vers la gauche :

Equation AgCl decalage a gauche

On crée ainsi dans le liquide intrapipette un déficit en ions Cl^- et un excès en ions K^+ par rapport aux ions Cl^- puisque ces derniers se fixent sur le fil d'argent. Des charges positives portées par les ions K^+ du milieu intrapipette s'accumulent momentanément sous la membrane et la dépolarisent. On obtient un état stationnaire lorsque le courant K^+ à travers la membrane devient égal au courant délivré par le générateur.

Injection d'un courant positif



2. On injecte un pulse de courant négatif.

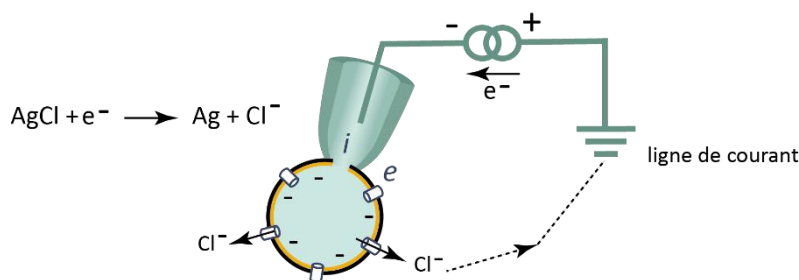
Celui-ci va hyperpolariser le potentiel de la membrane. Pourquoi?

Lorsque le pôle négatif du générateur est connecté vers la pipette, des électrons e^- circulent du générateur vers le fil. L'équilibre ci-dessus est déplacé vers la droite :



On crée dans le liquide intrapipette un excès en ions Cl^- et un déficit en ions K^+ par rapport aux ions Cl^- puisque ces derniers se détachent du fil d'argent. Des charges négatives portées par les ions Cl^- du milieu intrapipette s'accumulent momentanément sous la membrane et l'hyperpolarisent. On obtient un état stationnaire lorsque le courant Cl^- à travers la membrane devient égal au courant délivré par le générateur.

Injection d'un courant négatif





Pour comprendre quels types de courants ioniques sont responsables du potentiel d'action sodique, on enregistre maintenant l'activité d'un neurone en configuration cellule entière et en mode voltage imposé, car dans ce mode, on enregistre des changements de courant et non pas des changements de potentiel. On maintient le potentiel de la membrane à -80 mV, un potentiel très hyperpolarisé auquel la membrane n'est pas spontanément active, comme ça, on n'a aucun potentiel d'action spontané. A partir de -80 mV, on applique des sauts de potentiel de plus en plus dépolarisants afin d'atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action et même au delà. La réponse du neurone au saut de potentiel dépolarisant est un courant entrant, vers le bas, suivi d'un courant sortant, vers le haut. On constate que le courant entrant et le courant sortant augmentent en intensité jusqu'à un maximum en réponse à des sauts de potentiel de plus en plus dépolarisants. Arrêtons-nous maintenant sur la trace en réponse à un saut de -80 à -10 mV. Le courant entrant apparaît en premier, il est très bref, il dure environ 2 ms, il a la forme d'un pic car sa phase ascendante et sa phase descendante sont très rapides. On a ici une amplitude d'environ 3500 pA au pic du courant entrant, ce qui fait 3.5 nA. Le courant sortant, quant à lui, il apparaît avec un délai plus long après le courant entrant. Il dure beaucoup plus longtemps: ici, on voit plus de 40 ms. Il a une phase ascendante lente et une phase descendante très lente, et il a une amplitude d'environ 600 pA à son maximum soit $0,6$ nA. Il est donc plus faible en amplitude que le courant entrant. Nous allons comprendre cette semaine et la semaine prochaine comment identifier les ions et les canaux ioniques impliqués dans le courant entrant et le courant sortant du potentiel d'action et comment les caractéristiques de ces canaux ioniques expliquent les caractéristiques de délais et de durée des courants entrants et sortants décrites ci-dessus.

VIDEO 2-2 ENREGISTRER UN POTENTIEL D'ACTION EVOQUE (2:08)

Afin de comprendre les caractéristiques du potentiel d'action, on enregistre en configuration cellule entière et en mode courant imposé les changements de potentiel de la membrane des neurones en réponse à des sauts de courant dépolarisants d'amplitude croissante. La trace du bas indique le saut de courant rectangulaire appliqué à la membrane. Il a une durée de 20 millisecondes et une intensité qui augmente de 2 à 5 picoampères. La trace du haut montre les changements de potentiel de la membrane en réponse à ces sauts de courant. On observe qu'au début, la membrane répond par une légère dépolarisation suivie d'une repolarisation qui représente la réponse passive que l'on appelle ohmique de la membrane. Au 9^e saut de courant, on observe un potentiel d'action ainsi qu'en réponse au onzième saut de courant. En revanche il n'y a pas de potentiel d'action en réponse au 10^e saut de courant. Cela veut dire que les 9^e et 10^e sauts de courant dépolarisent la membrane jusqu'au seuil de déclenchement du potentiel d'action car au seuil, on déclenche un potentiel d'action une fois sur deux. On observe aussi que la réponse de la membrane est tout ou rien: soit le potentiel d'action existe soit il n'existe pas. Il n'y a pas d'intermédiaire. Si maintenant on observe avec une vitesse plus rapide un potentiel d'action évoqué, on peut mieux le décrire. Il comporte une phase ascendante ou phase de dépolarisation, et une phase descendante, ou phase de repolarisation. Il est déclenché ici à partir du potentiel seuil, -35 mV, a une amplitude de 75 mV et une durée à mi-amplitude de $2,5$ ms. C'est le saut de courant appliqué à la membrane



qui dépolarise la membrane jusqu'au seuil de -35 mV. Cette première dépolarisation est une réponse passive de la membrane dite réponse ohmique, car le changement de potentiel enregistré suit la loi d'Ohm. Ensuite le potentiel d'action est une réponse active de la membrane.

VIDEO 2-3 : ENREGISTRER LES COURANTS DU PA EVOQUE EN VOLTAGE IMPOSE (2:16)

Pour comprendre quels types de courants ionique sont responsables du potentiel d'action sodique, on enregistre maintenant l'activité d'un neurone en configuration cellule entière et en mode voltage imposé, car dans ce mode, on enregistre des changements de courant et non pas des changements de potentiel. On maintient le potentiel de la membrane à -80 mV, un potentiel très hyperpolarisé auquel la membrane n'est pas spontanément active, comme ça, on n'a aucun potentiel d'action spontané. A partir de -80 mV, on applique des sauts de potentiel de plus en plus dépolarisants afin d'atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action et même au delà. La réponse du neurone au saut de potentiel dépolarisant est un courant entrant, vers le bas, suivi d'un courant sortant, vers le haut. On constate que le courant entrant et le courant sortant augmentent en intensité jusqu'à un maximum en réponse à des sauts de potentiel de plus en plus dépolarisants. Arrêtons-nous maintenant sur la trace en réponse à un saut de -80 à -10 mV. Le courant entrant apparaît en premier, il est très bref, il dure environ 2 ms, il a la forme d'un pic car sa phase ascendante et sa phase descendante sont très rapides. On a ici une amplitude d'environ 3500 pA au pic du courant entrant, ce qui fait 3.5 nA. Le courant sortant, quant à lui, il apparaît avec un délai plus long après le courant entrant. Il dure beaucoup plus longtemps: ici, on voit plus de 40 ms. Il a une phase ascendante lente et une phase descendante très lente, et il a une amplitude d'environ 600 pA à son maximum soit 0,6 nA. Il est donc plus faible en amplitude que le courant entrant. Nous allons comprendre cette semaine et la semaine prochaine comment identifier les ions et les canaux ioniques impliqué dans le courant entrant et le courant sortant du potentiel d'action et comment les caractéristiques de ces canaux ioniques expliquent les caractéristiques de délais et de durée des courants entrants et sortants décrites ci-dessus.