



Labo

ENREGISTRER DES COURANTS UNITAIRES GABA-A (5:43)

Le but de l'expérience que Roman Tyzio vous présente ici est de vous montrer l'enregistrement d'un courant GABA-A unitaire, c'est-à-dire un courant à travers un seul canal GABA-A, dans un neurone du système nerveux central. L'enregistrement se fait sur des tranches de cerveau. Voici des courants unitaires GABA-A. Ce sont des courants qui sont représentés vers le haut et qui sont de petite amplitude, ici environ 2,5 pA. Si on regarde la trace, on va d'abord voir un courant de très petite durée, puis un courant de durée beaucoup plus longue, ce qui veut dire que les canaux ne s'ouvrent pas toujours suivant la même durée. Et ensuite, on voit des courants qui sont de très faible durée. Comme ils sont de faible durée, on a l'impression qu'ils n'ont pas la même amplitude, mais, en fait, ils ont la même amplitude, mais la faible durée empêche d'enregistrer leur vraie amplitude. Comment est-ce que Roman les a enregistrés ? Donc, ils sont enregistrés en configuration cellule attachée et en mode voltage imposé pour avoir des courants. En configuration cellule attachée, la pipette contient du milieu extracellulaire, petit e ici, et cette pipette est collée très fortement à la membrane. Et on espère que, dans le petit morceau de membrane qui est sous la pipette, il y ait un ou quelques canaux GABA-A. Pour n'activer que ces canaux, on met du GABA dans la pipette. Donc, c'est seulement ces canaux-là, qui sont ouverts par deux molécules de GABA, qui vont s'activer, et on aura un courant porté par les ions chlorures. On a 140 mM de chlorure dans la pipette, on ne sait pas très bien combien il y en a à l'intérieur, il y en a beaucoup moins, mais on ne sait pas exactement puisque le milieu intracellulaire dans cette configuration est le milieu physiologique intracellulaire du neurone. On voit ici deux traces. En haut, c'est la trace de voltage, c'est-à-dire le voltage qui va être imposé à l'électrode, et en bas, on a la trace de courant. Donc, ce qu'on voit, c'est qu'on fait varier le voltage en haut, de potentiels positifs vers des potentiels de plus en plus hyperpolarisés. Et en bas, sur les traces de courant, on voit d'abord des traces de courant vers le haut, donc évidemment ici l'échelle de temps étant très petite, on voit des ouvertures comme des barres, mais si on étire la trace, en fait, ce sont des échelons carrés. Puis, quand le potentiel va vers zéro, et même dans des potentiels négatifs, on voit que le courant s'inverse et qu'il va devenir vers le bas. Il va grandir. Puis, si de nouveau on dépolarise dans la pipette, vous voyez que, de nouveau, il s'inverse, et, de nouveau, on voit des traces de courant vers le haut. Alors, comment fait-on des courbes I-V en cellule attachée, puisqu'on n'a pas accès au milieu intracellulaire ? On peut, quand même, changer le potentiel qui est dans la pipette. Et on l'appelle V_p , pour V pipette. À ce moment-là, le potentiel qui est de part et d'autre du petit morceau de membrane et donc du canal enregistré, est $V_m = V_i - V_e$. Et comme V_e , extracellulaire, c'est V_p , on a $V_m = V_i - V_p$. V_p est imposé, donc il est connu, mais V_i est inconnu. Mais on peut se repérer un petit peu, parce qu'on sait que quand V_m est égal au potentiel d'inversion des ions chlorure, à ce moment-là, le courant unitaire GABA est nul. On a vu, et on verra encore sur l'image suivante, que le courant s'inverse quand le potentiel de la pipette est à 0 mV. À ce moment-là, on a $V_m = V_i - 0$, donc $V_m = V_i$. Regardons de nouveau ces traces voltage courant. Si on élargit la trace pour des potentiels positifs de V_p , on va voir ces échelons de courant positifs. Et vous les voyez encore de durée variable. Si, maintenant, on élargit la trace, quand le potentiel de la pipette est à 0 mV, on va voir qu'on ne voit plus d'échelon de courant. À ce moment-là, $V_m = E_{Cl}$, il y a autant d'ions chlorures qui



entrent et qui sortent et bien que le canal soit ouvert, il n'y a pas de courant unitaire. Si, maintenant, V_p devient négatif, on voit que le courant s'est inversé, il est vers le bas, et vous voyez aussi les ouvertures. On constate sur les courants qui sont vers le bas, qu'en fait, il y avait plus qu'un seul canal dans le patch, puisqu'on voit des ouvertures dont l'amplitude correspond à des multiples d'une seule ouverture. Et ces ouvertures se font presque en même temps, ce qui fait qu'on voit un tout petit peu l'escalier, mais pas tant que ça. La configuration cellule attachée permet d'enregistrer des courants unitaires GABA-A sans changer la composition du milieu intracellulaire.

ENREGISTREMENT DES COURANTS SYNAPTIQUES SPONTANES GABA-A EN "CHLORE FAIBLE" (2:41)

Le but de l'expérience que je vais vous présenter est d'enregistrer dans un neurone adulte, les courants synaptiques spontanés GABA-A en conditions physiologiques. J'enregistre en configuration cellule entière et en mode voltage imposé les courants GABA-A. Le potentiel d'inversion des ions chlorures est ici de -60 mV. Je maintiens le potentiel de la membrane à $+10$ mV. Ce potentiel de maintien a un double avantage : tout d'abord, les courants GABA-A sont de grande amplitude et les courants cationiques sont invisibles, car ils s'inversent à ce potentiel de maintien. Remarquons que, dans ces conditions, les courants GABA-A sont sortants, c'est-à-dire qu'ici on a des déflexions de la ligne de base vers le haut, car les ions chlorures entrent dans le neurone. La base de temps d'environ 250 ms donne une indication sur la longue durée des courants et sur leur fréquence d'apparition. On voit ici défiler l'enregistrement des courants spontanés GABA-A au cours du temps. Ces courants ont une amplitude variable de l'ordre de la dizaine de picoampères. Cette amplitude est variable, car il n'y a pas toujours le même nombre de synapses GABA-A actives en même temps. Plus il y a de synapses GABA-A actives en même temps et plus l'amplitude du courant sera importante. On lance l'analyse automatique des courants par le logiciel puis on valide ou non cette analyse manuellement. Les paramètres qui nous intéressent sont, pour chaque courant, son amplitude, c'est-à-dire l'amplitude de la déflexion, ici mesurée entre le point jaune et la croix rouge ; le temps de croissance du courant, que l'on mesure entre le point jaune et la croix rouge; le temps de décroissance, que l'on va mesurer maintenant entre la croix rouge et le point violet. Enfin, on va pouvoir mesurer le temps qu'il se passe entre l'apparition de 2 courants GABA-A consécutifs. En conclusion, des courants synaptiques spontanés GABA-A enregistrés en conditions de concentrations physiologiques en ions chlorures renseigne sur le taux de connexion GABAergique des neurones enregistrés. Ceci permet de comprendre l'activité des synapses GABA-A afférentes aux neurones enregistrés dans des conditions d'activité optimale du réseau.

ENREGISTREMENT DES COURANT SYNAPTIQUES SPONTANES GABAA EN "CHLORE EQUIVALENT" (2:32)

Le but de cette expérience est d'enregistrer dans un neurone adulte les courants synaptiques spontanés GABA-A. Ceci permet de comprendre l'activité des synapses GABA-A afférentes aux neurones enregistrés. Afin de n'enregistrer que l'activité des synapses GABA-A, j'ai ajouté dans le milieu extracellulaire des bloquants des synapses glutamate de type AMPA et NMDA, le CNQX et l'APV. J'enregistre en configuration cellule entière et en mode voltage imposé. Le potentiel d'inversion des ions chlorures est à 0 mV, car j'ai mis la même concentration en ions



chlorures dans le milieu extracellulaire et dans le milieu intrapipette. Je fixe le potentiel de maintien à -60 mV. Dans ces conditions, les ions chlorures sortent du neurone et j'enregistre des courants entrants de charges positives. On voit ici défiler l'enregistrement des courants spontanés GABA-A au cours du temps. Ces courants ont une amplitude variable de l'ordre de la dizaine de picoampères. Cette amplitude est variable, car il n'y a pas toujours le même nombre de synapses GABA-A actives en même temps. En effet, les courants synaptiques GABA-A résultent de l'activation synchrone de nombreux canaux GABA-A postsynaptiques activés par la libération de GABA par les terminaisons axonales afférentes aux neurones enregistrés. Lors de l'analyse, les paramètres intéressants sont, pour chaque courant, leur amplitude, la fréquence, le temps de croissance et le temps de décroissance. Pour vérifier qu'il s'agit bien de courants GABA-A, on ajoute dans le milieu extracellulaire un bloquant spécifique des canaux GABA-A, la gabazine. Au bout de quelques minutes, les courants spontanés disparaissent. En conclusion, les courants synaptiques spontanés renseignent sur le taux de connexion des neurones enregistrés. Ces connexions peuvent varier au cours du développement ou lors de pathologies.