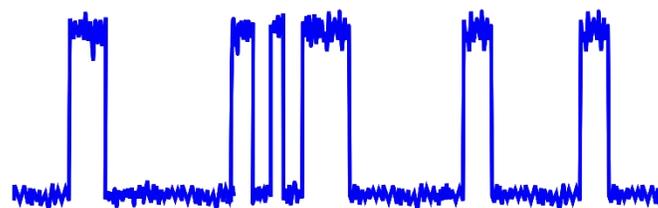
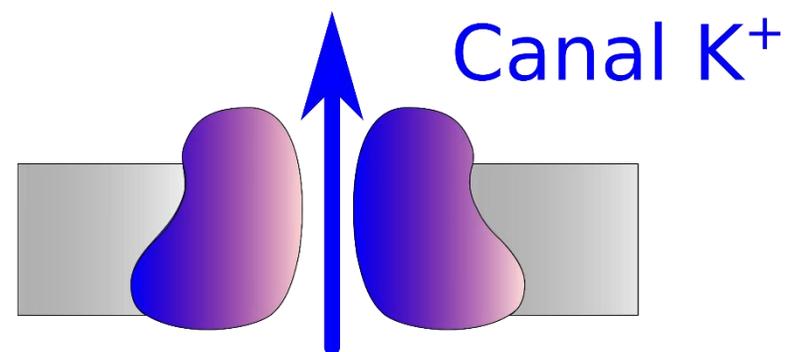


Stéphane EGEE - Maître de conférence – Enseignant chercheur UPMC  
PRESENTATION DU PATCH MONOCANAL SUR GLOBULE ROUGE HUMAIN  
Station Biologique de Roscoff - 21 mars 2018



Globule rouge

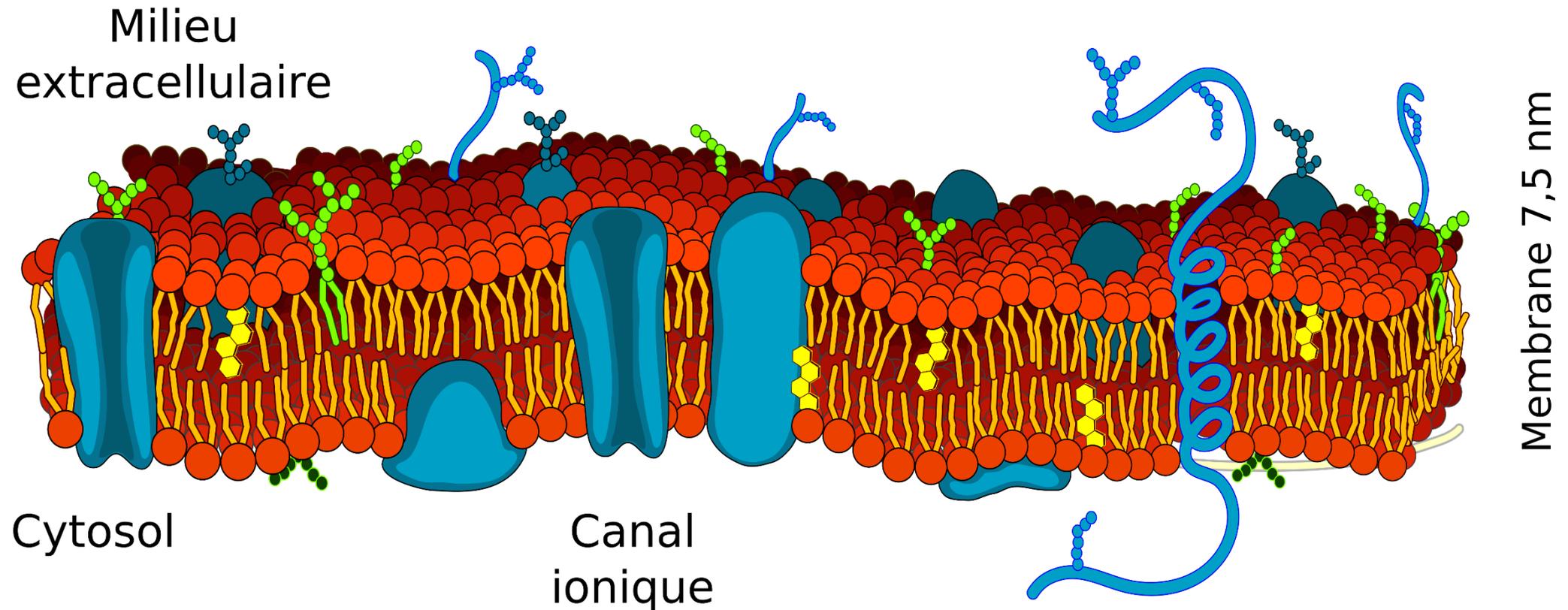


Courants K<sup>+</sup>



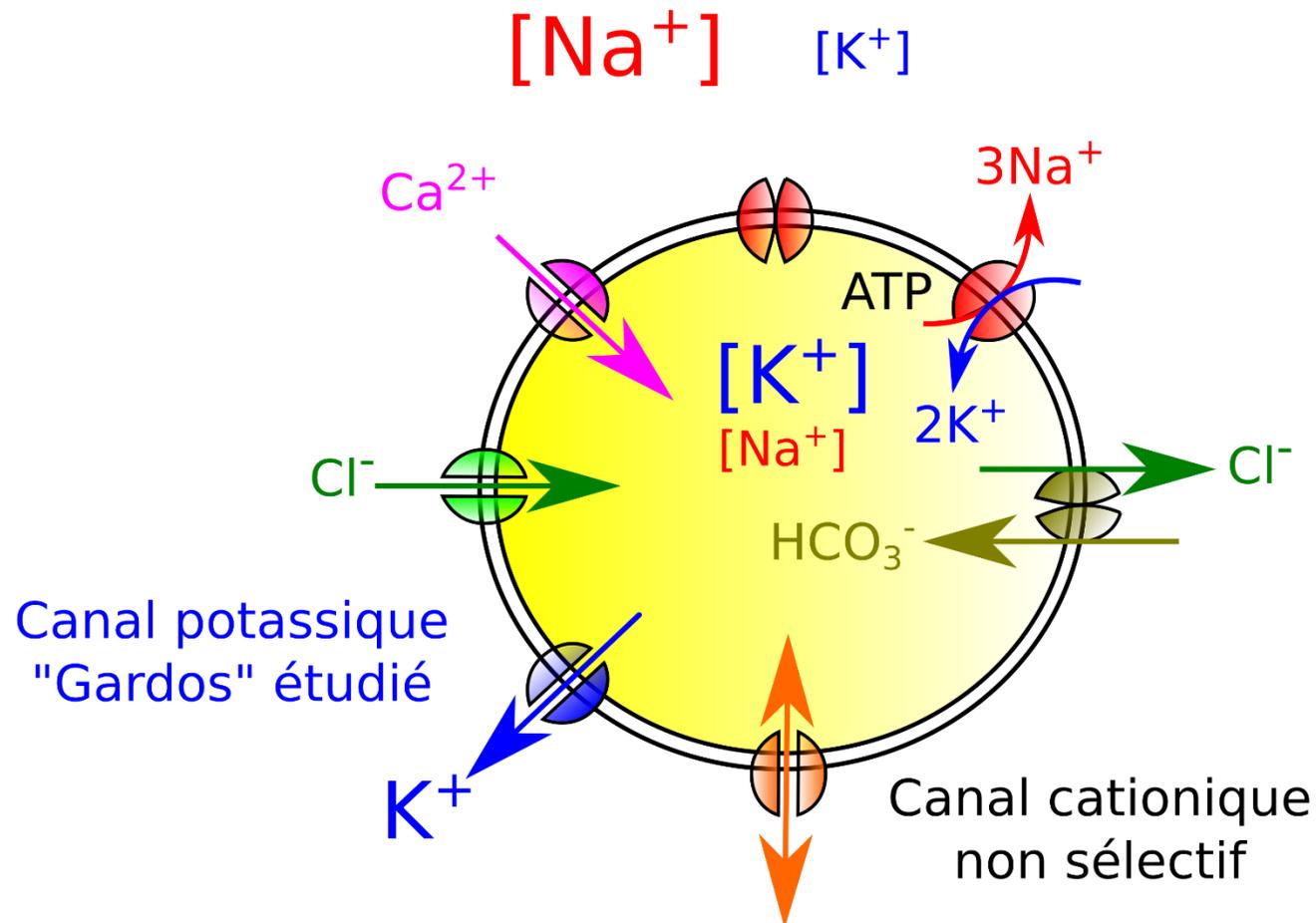
# STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA MEMBRANE

La membrane cytoplasmique est une bicouche fluide plane de **phospholipides** intégrant des **protéines membranaires** dont des **canaux ioniques**



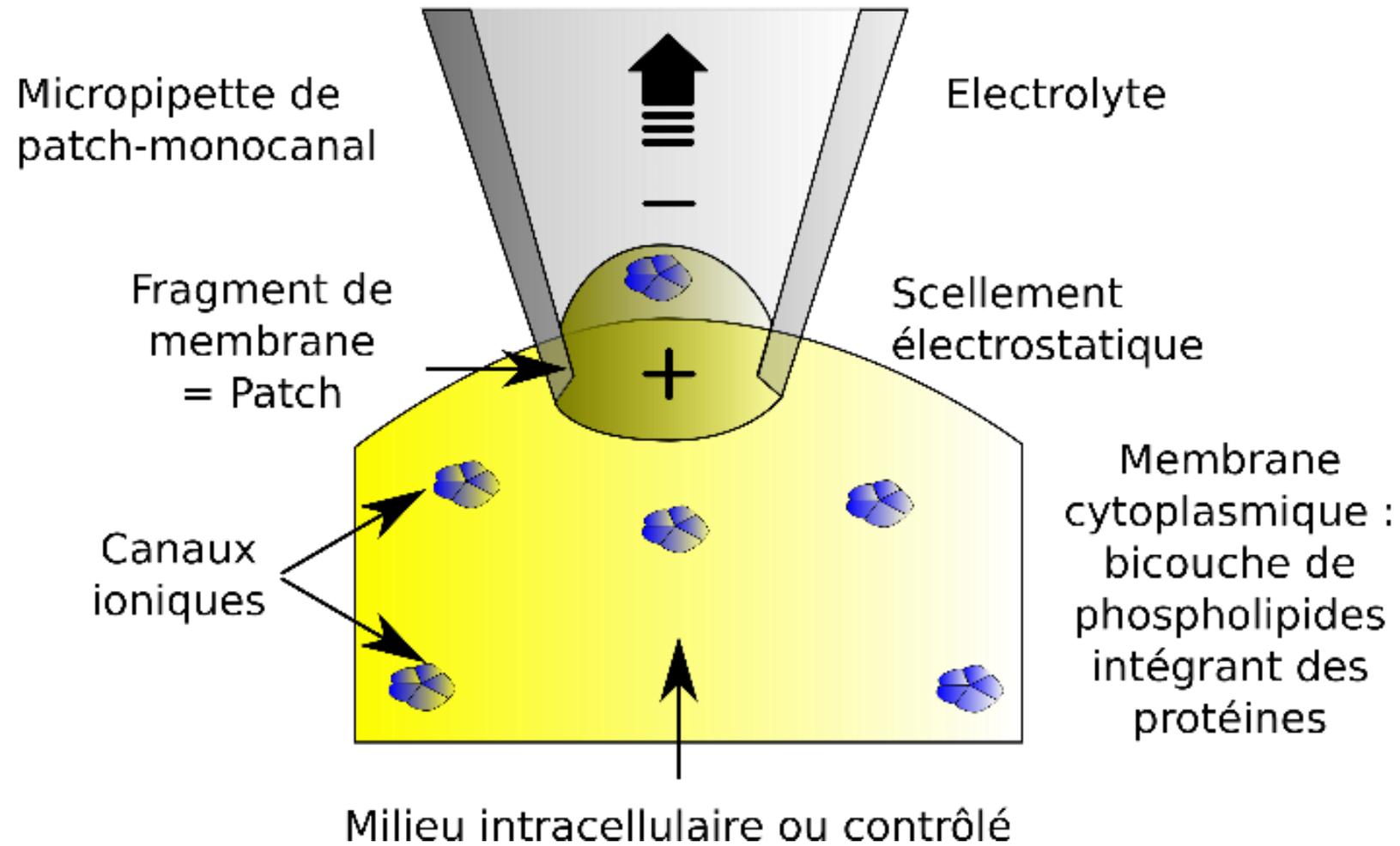
# DIFFERENTS CANAUX DU GLOBULE ROUGE

Les différents canaux-ioniques de la membrane du globule rouge humain contrôlent les échanges ioniques entre le GR et le plasma sanguin



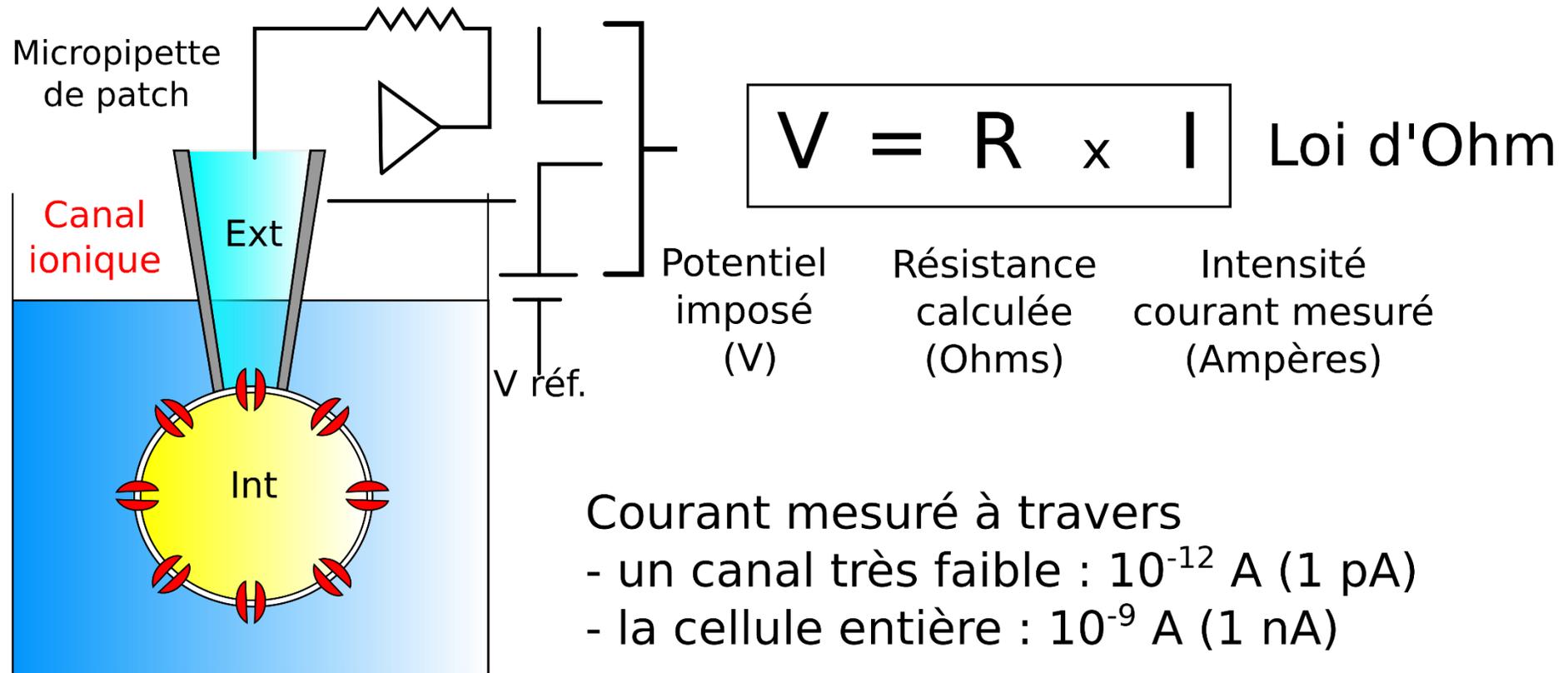
# PRINCIPE DU PATCH-CLAMP: ISOLER UN SEUL CANAL

Attachement de la pipette à la membrane par aspiration  
puis scellement avec une forte résistance



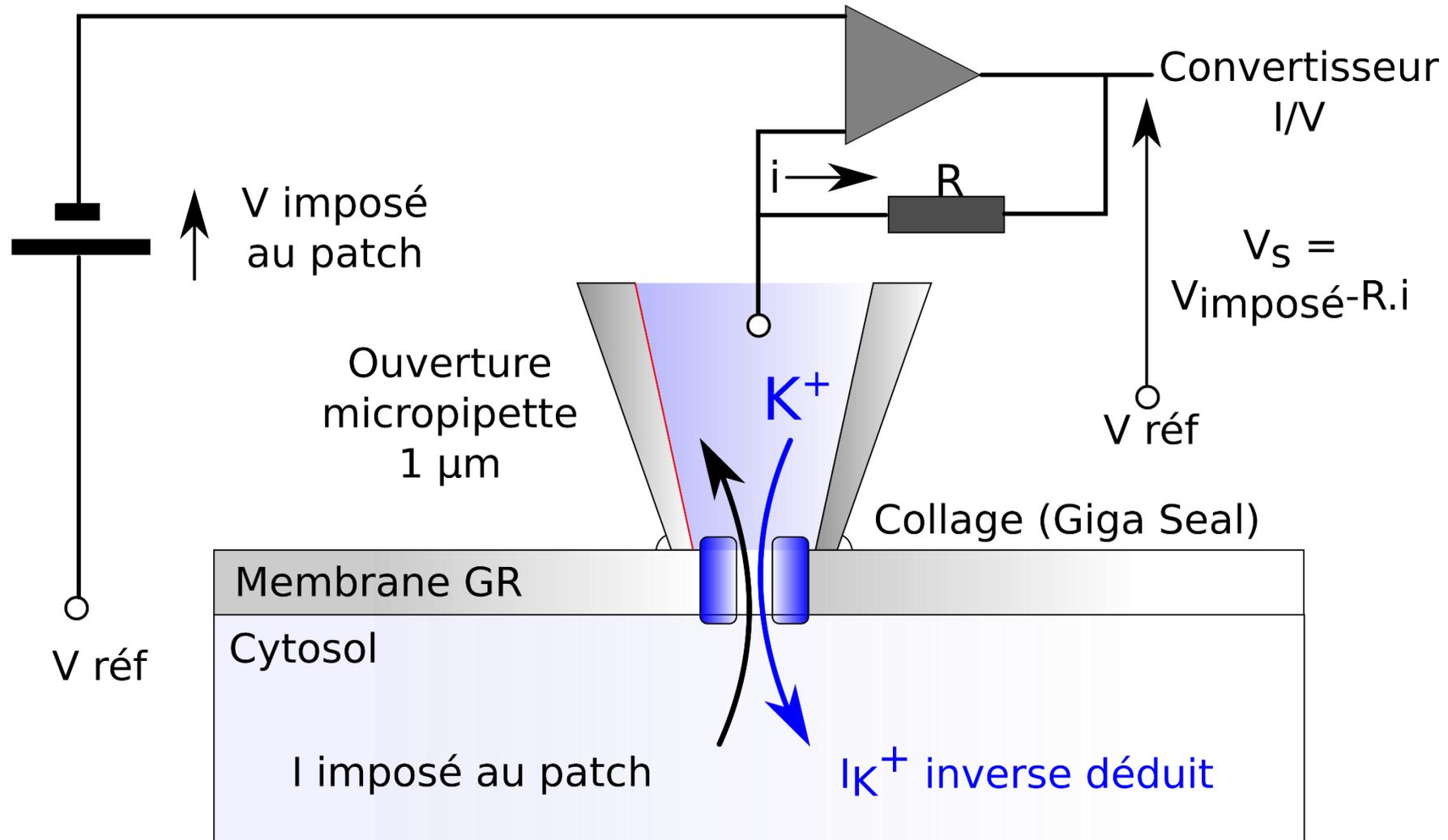
# PRINCIPE DU PATCH-CLAMP : IMPOSER U MESURER I

Imposer une tension au fragment de membrane et mesurer le courant à travers un seul canal ionique d'après la loi d'Ohm :  $V=RI$   
L'intensité du courant mesuré est proportionnelle au voltage imposé



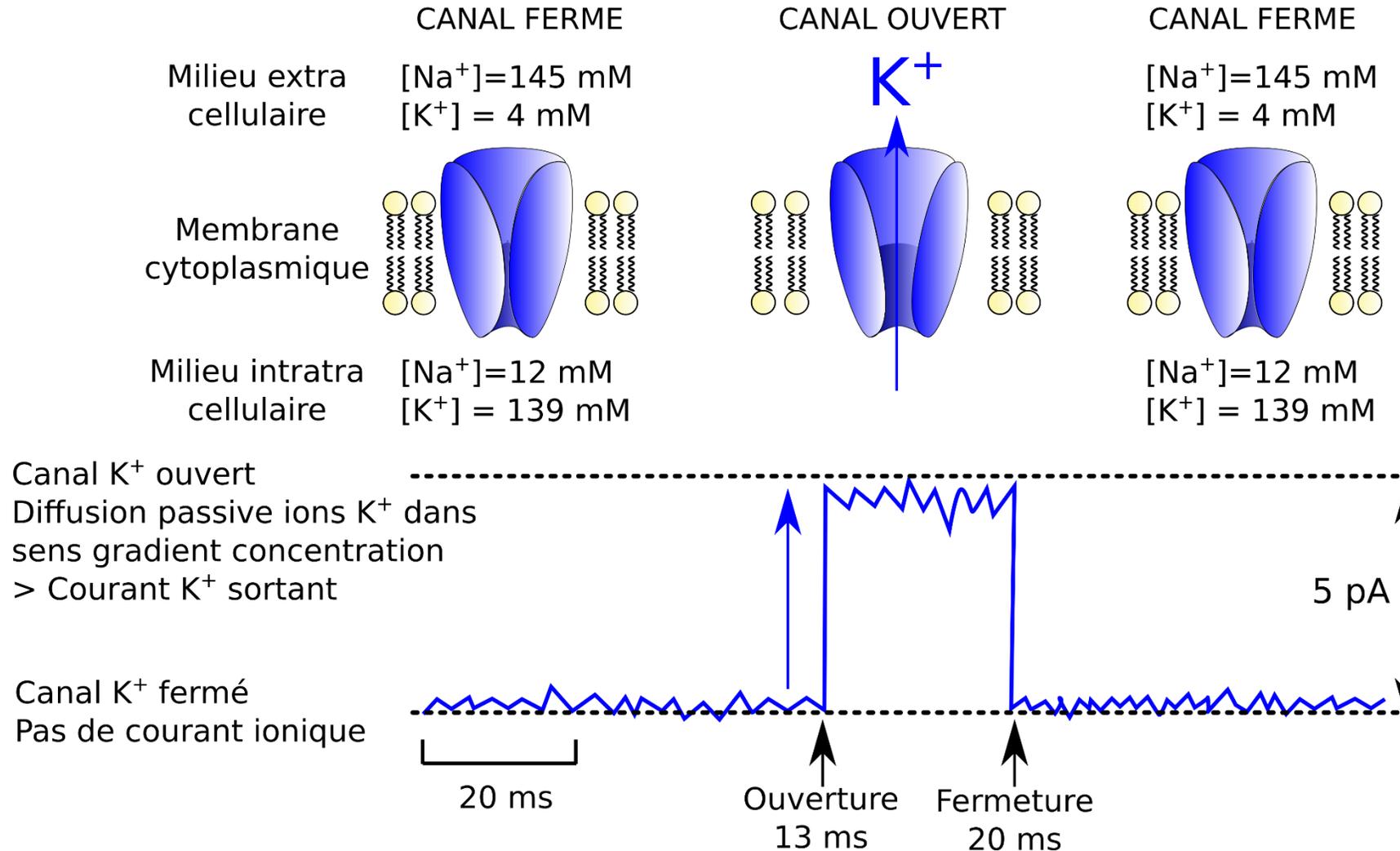
# IMPOSER TENSION MESURER COURANT

Imposer une tension à un fragment de membrane et enregistrer le courant ionique à travers



# LE CANAL POTASSIQUÉ DU GLOBULE ROUGE

Patch monocanal (Single channel) : enregistrement des courants ioniques de  $K^+$  à travers un seul canal potassique ici le canal Gardos du GR



# NEHER –SAKMANN PRIX NOBEL POUR LE PATCH-CLAMP

Mise au point du patch-clamp qui permet d'enregistrer le courant ionique à travers un patch de membrane intégrant un ou plusieurs canaux ioniques

Erwin Neher



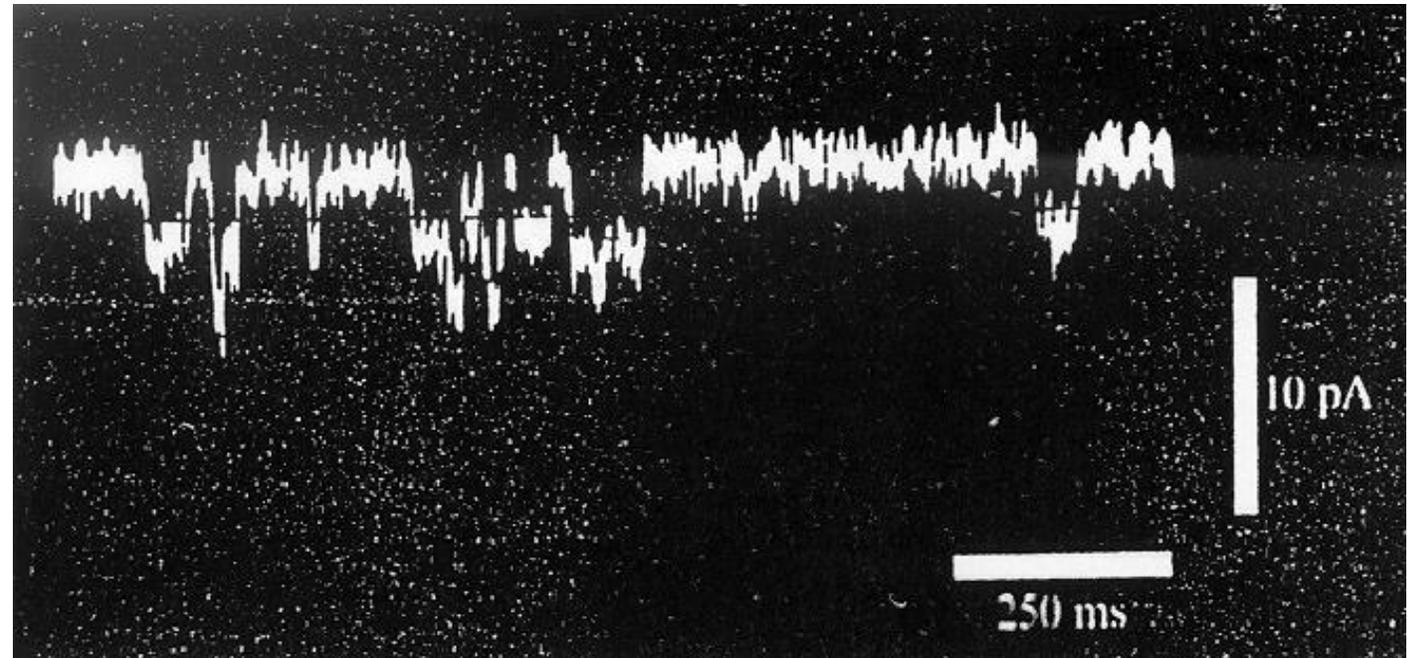
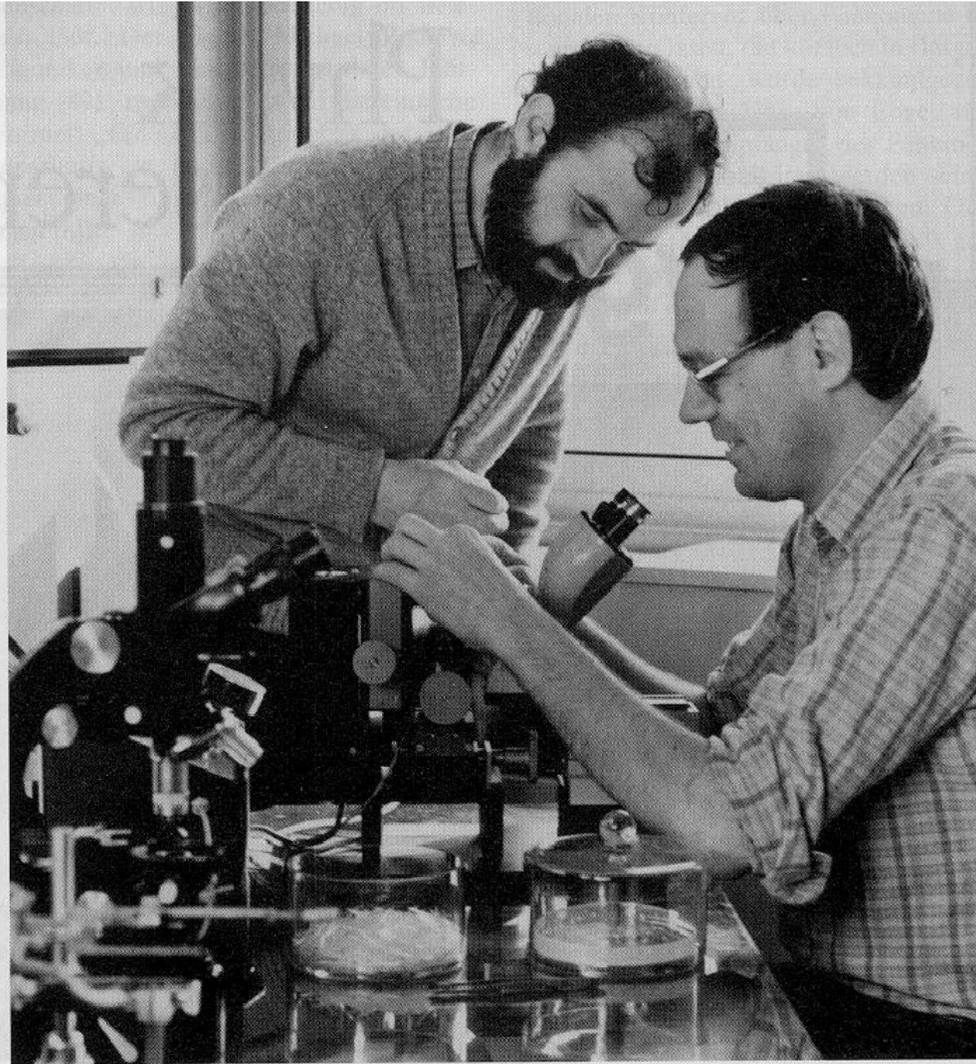
Internet



Bert Sakmann

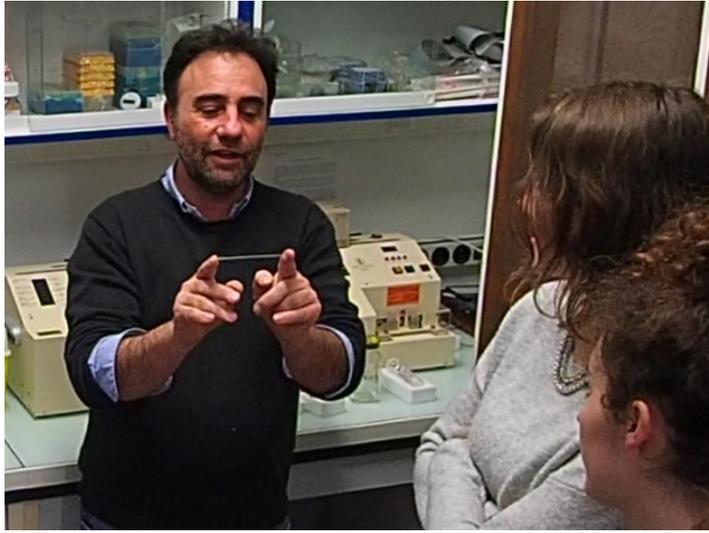
# NEHER –SAKMANN PRIX NOBEL 1991 POUR PATCH-CLAMP

Neher et Sakmann en 1976



Enregistrement des 1<sup>ers</sup> courants ioniques sur patch de fibre musculaire de grenouille

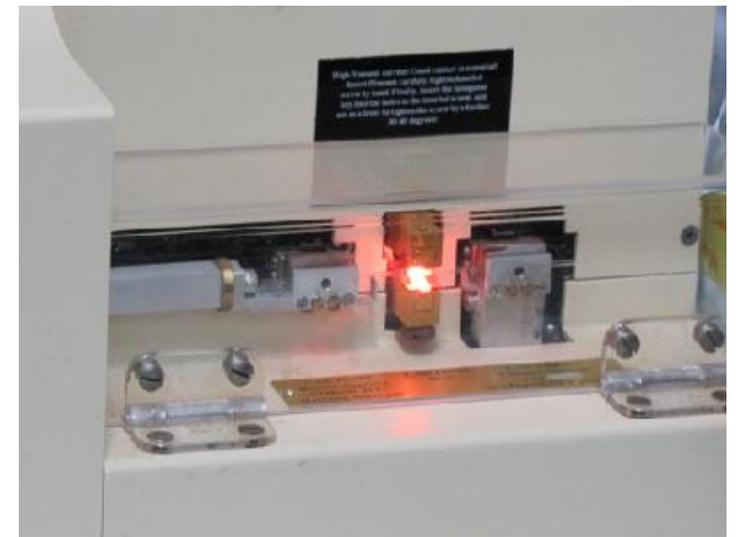
# ETIREMENT DU CAPILLAIRE EN DEUX MICROPIPETTE DE PATCH



Tube en verre creux (capillaire)



Etireuse de tube capillaire



Etirement par chauffage



Micropipette prête à l'emploi



Absence de bulle d'air



Injection électrolyte  $K^+$  150 mM

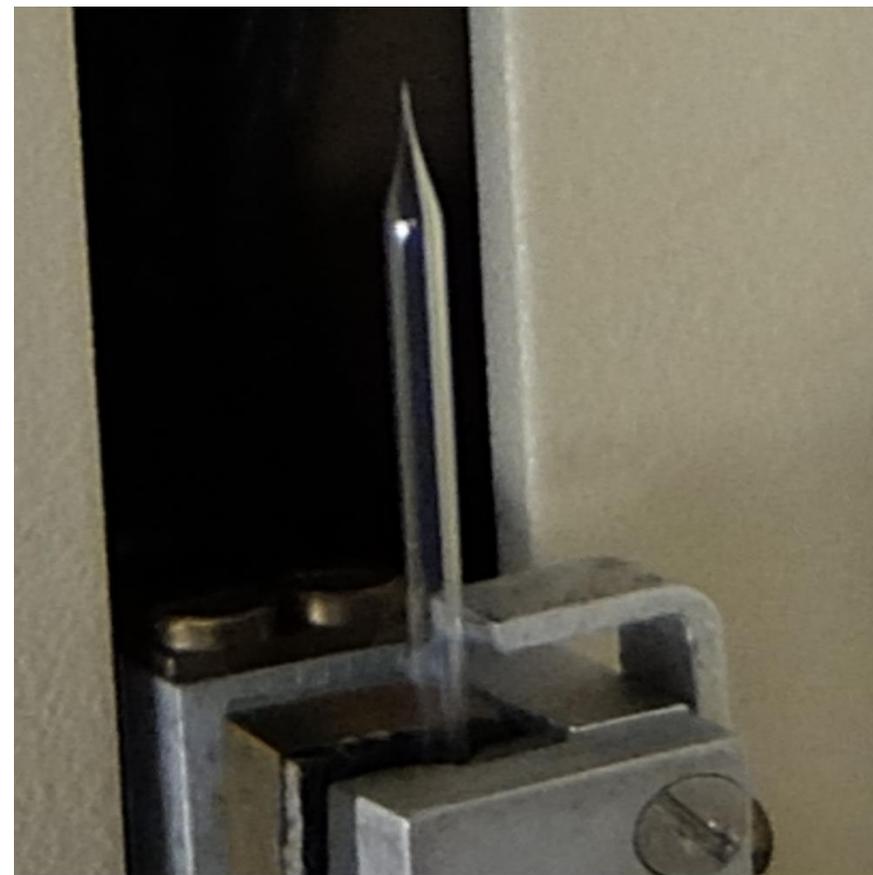
# APPAREIL A ETIRER A CHAUD LES MICROPIPETTES



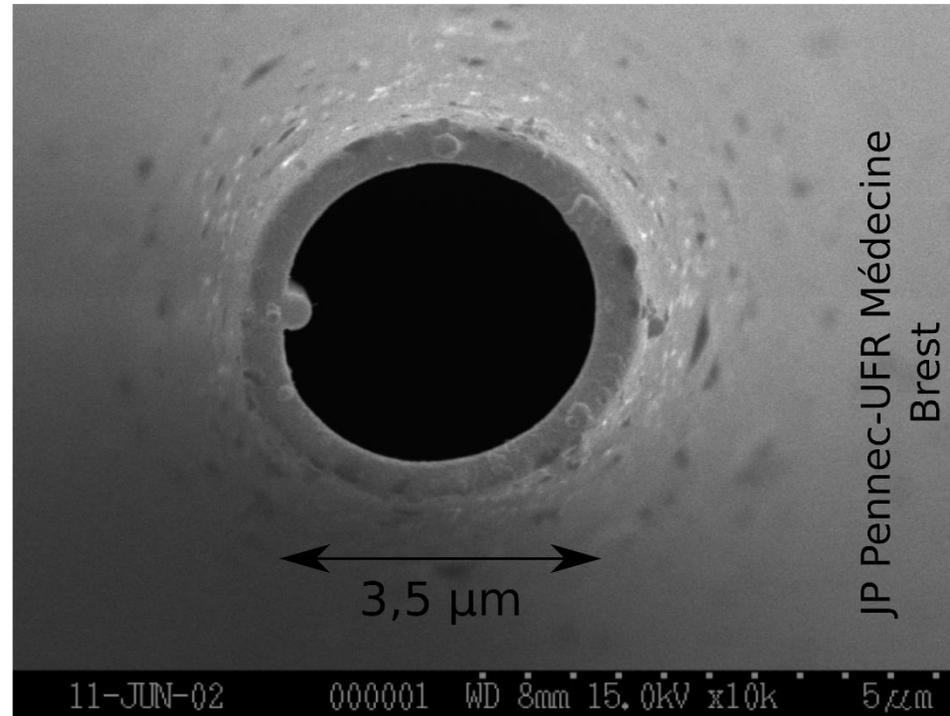
Micropipette étirée et coupée à chaud (Etireuse programmable)

Micropipette de diamètre 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  selon micro ou macropatch

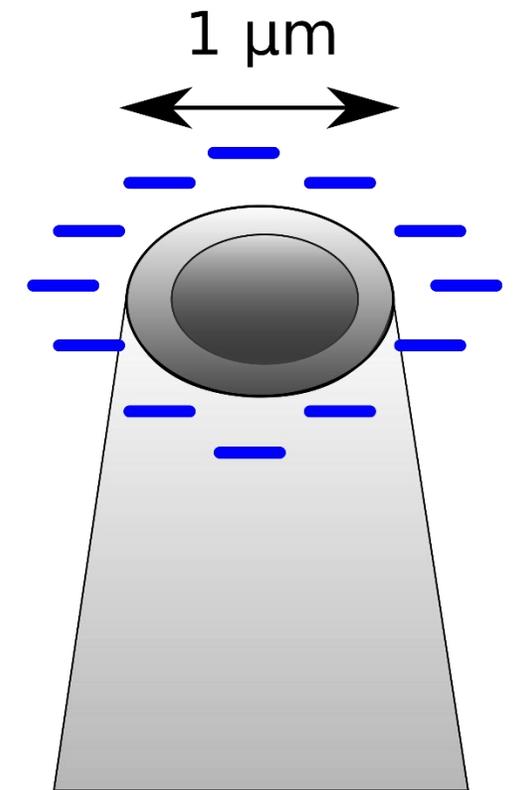
# MICROPIPETTE DE PATCH FINE CREUSE ET CHARGEE -



Micropipette de patch  
après étirement

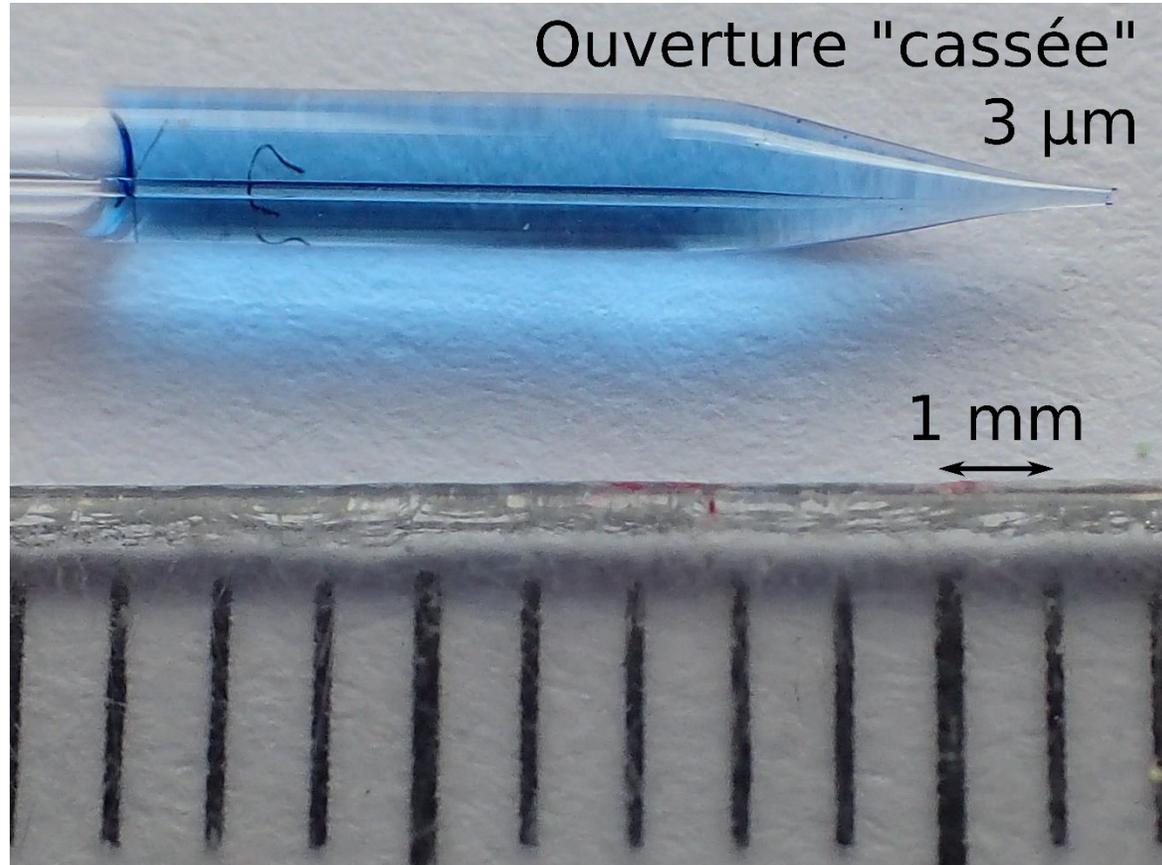


Micropipette de macropatch  
au MEB x 10 000

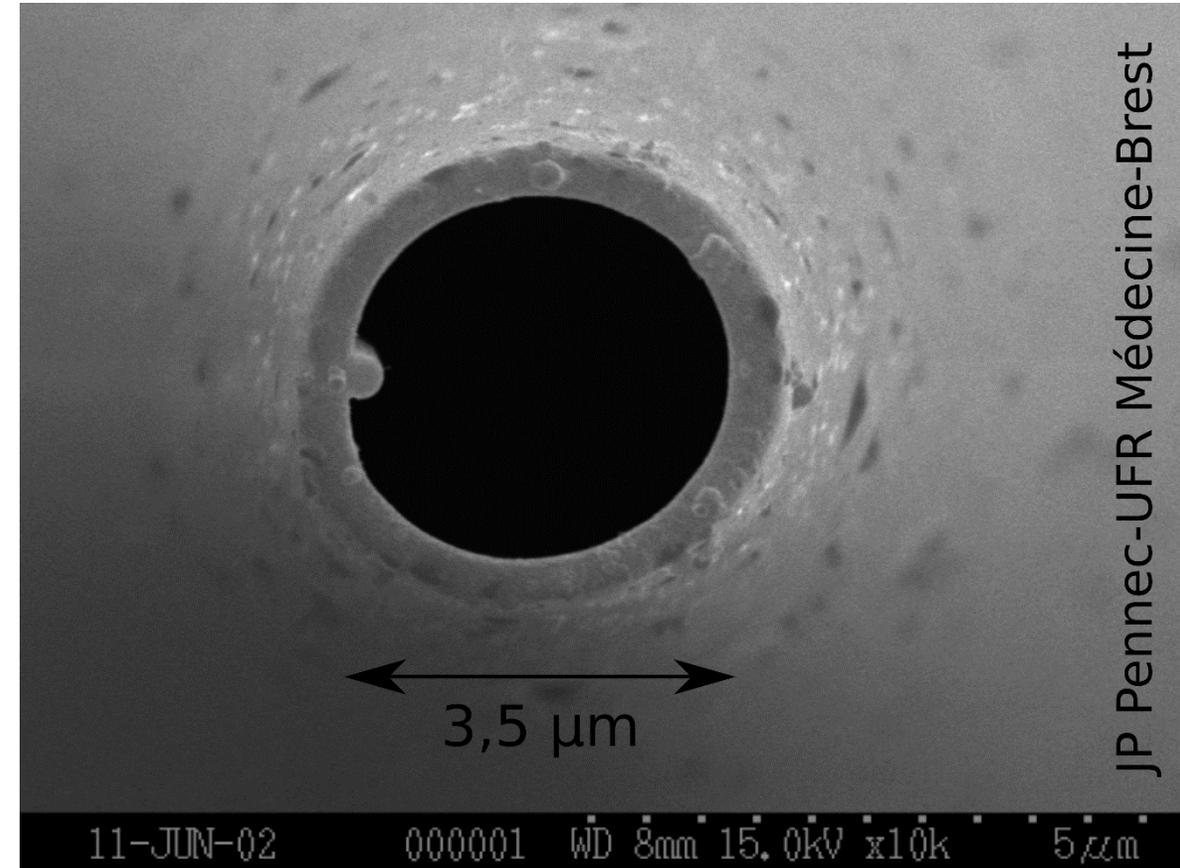


Micropipette de  
patch-clamp monocanal

# MICROPIPETTE DE PATCH FINE CREUSE ET CHARGEE -

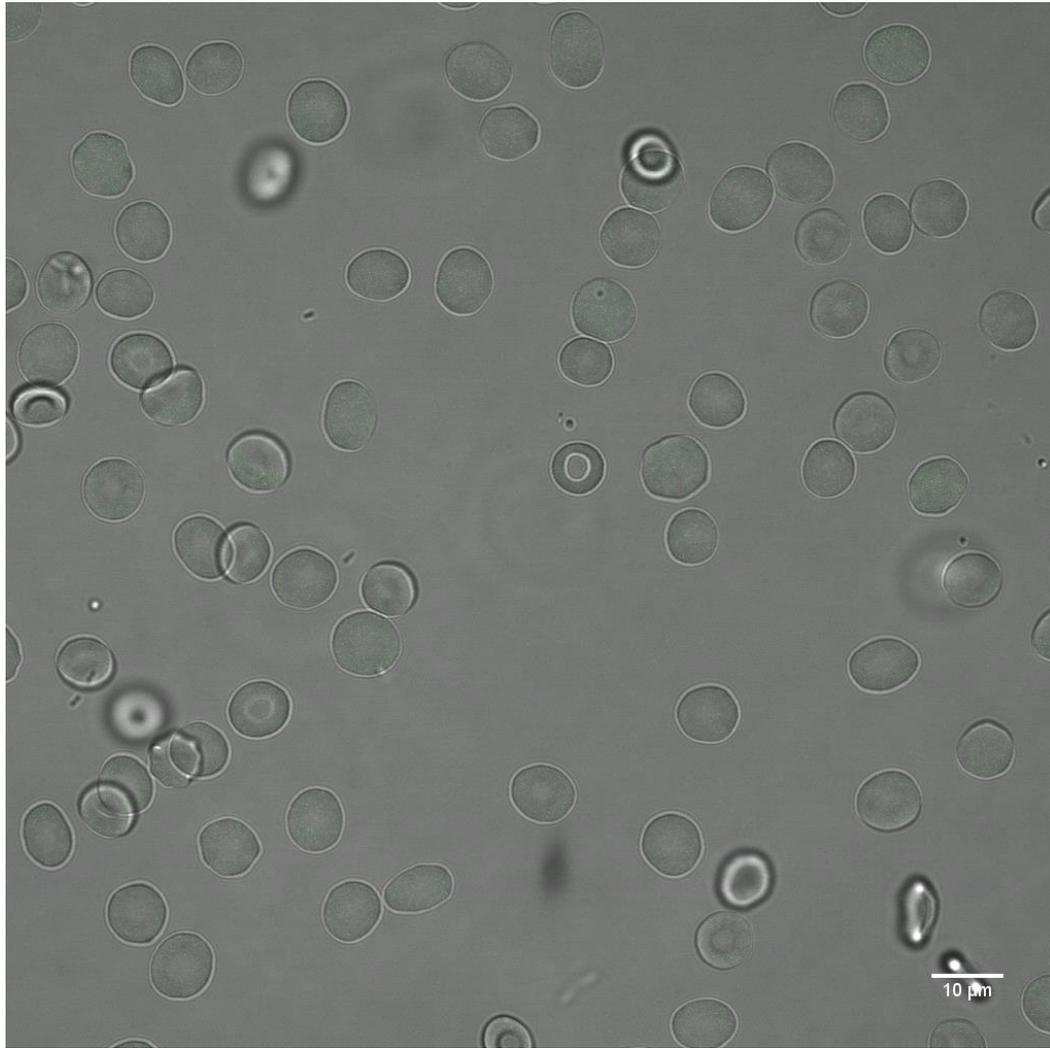


Micropipette avec bleu de méthylène vue de profil x 5,9

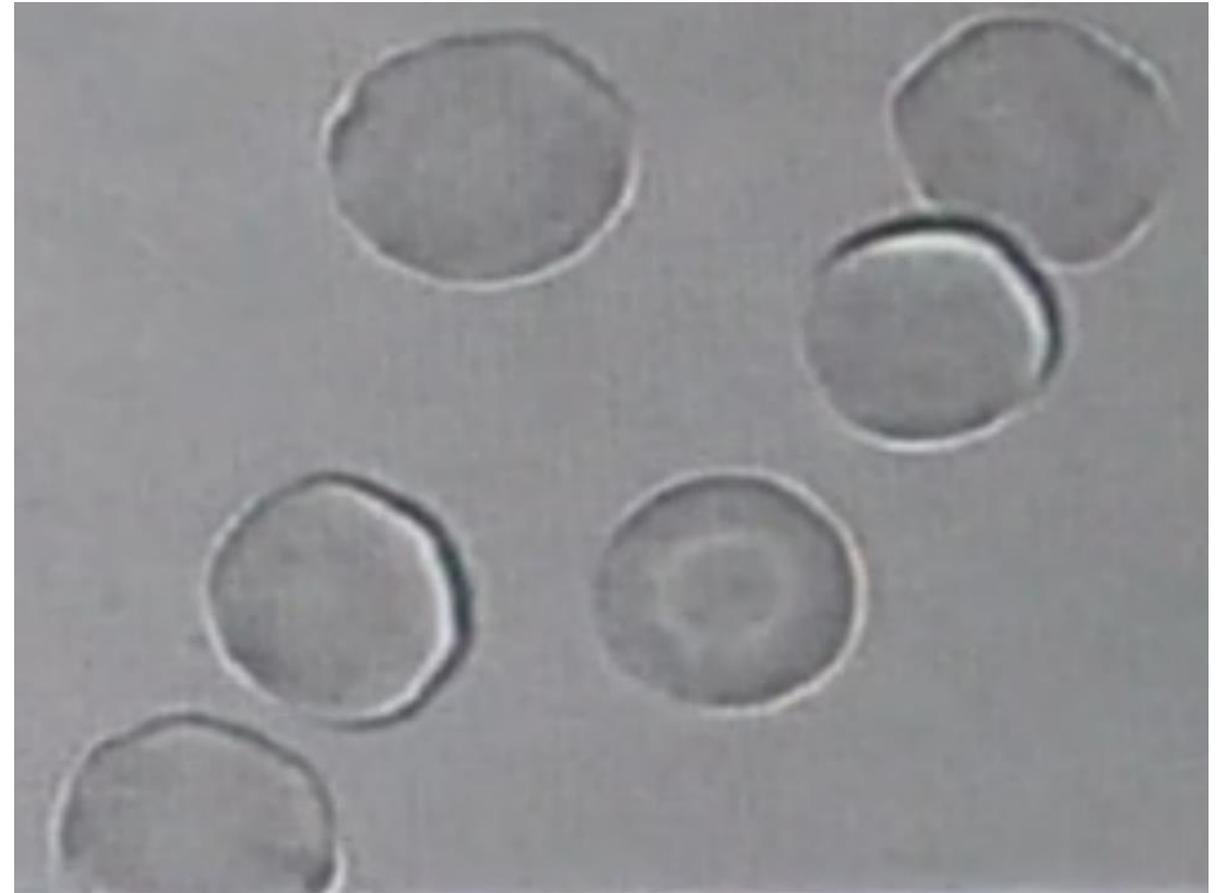


Micropipette de macropatch vue de face au MEB x 10 000

# GLOBULES ROUGES HUMAINS

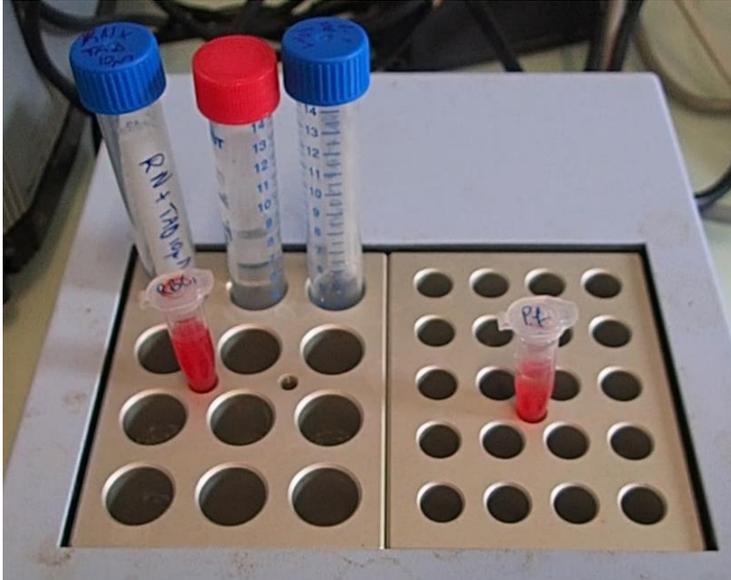


Globules rouges humains MO x 800



Globules rouges humains, cellule anucléée  
en forme de disque biconcave

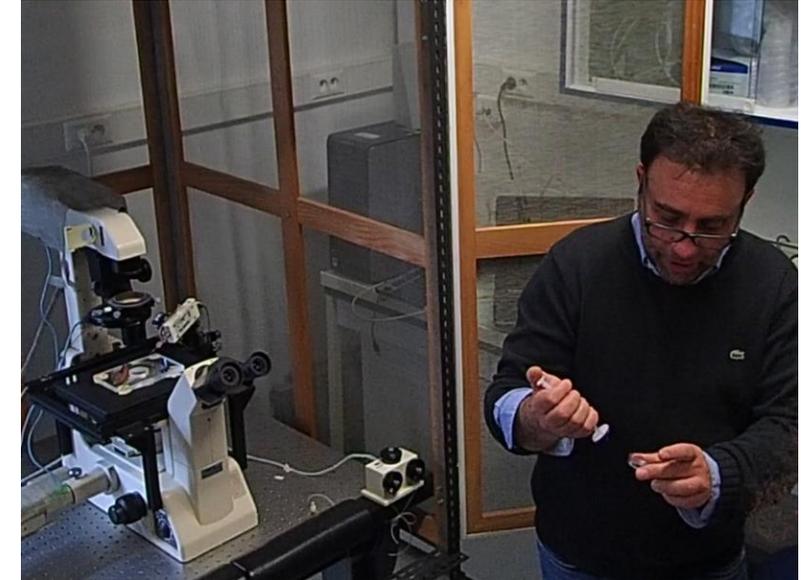
# PREPARATION DES GLOBULES ROUGES HUMAINS



Eppendorf avec globules rouges humains à 37°C

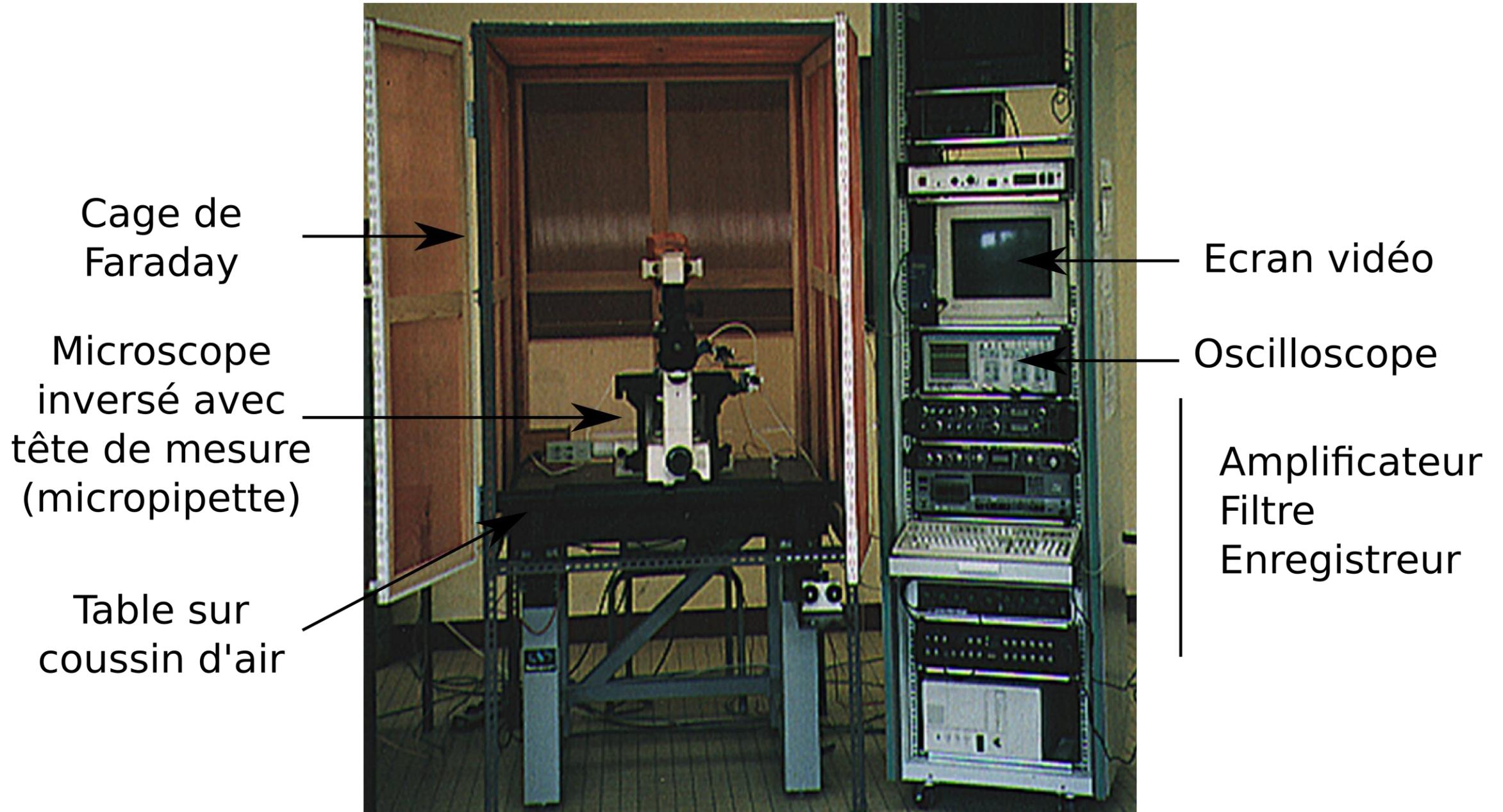


Milieu de culture des globules rouges :  $K^+$ , glucose

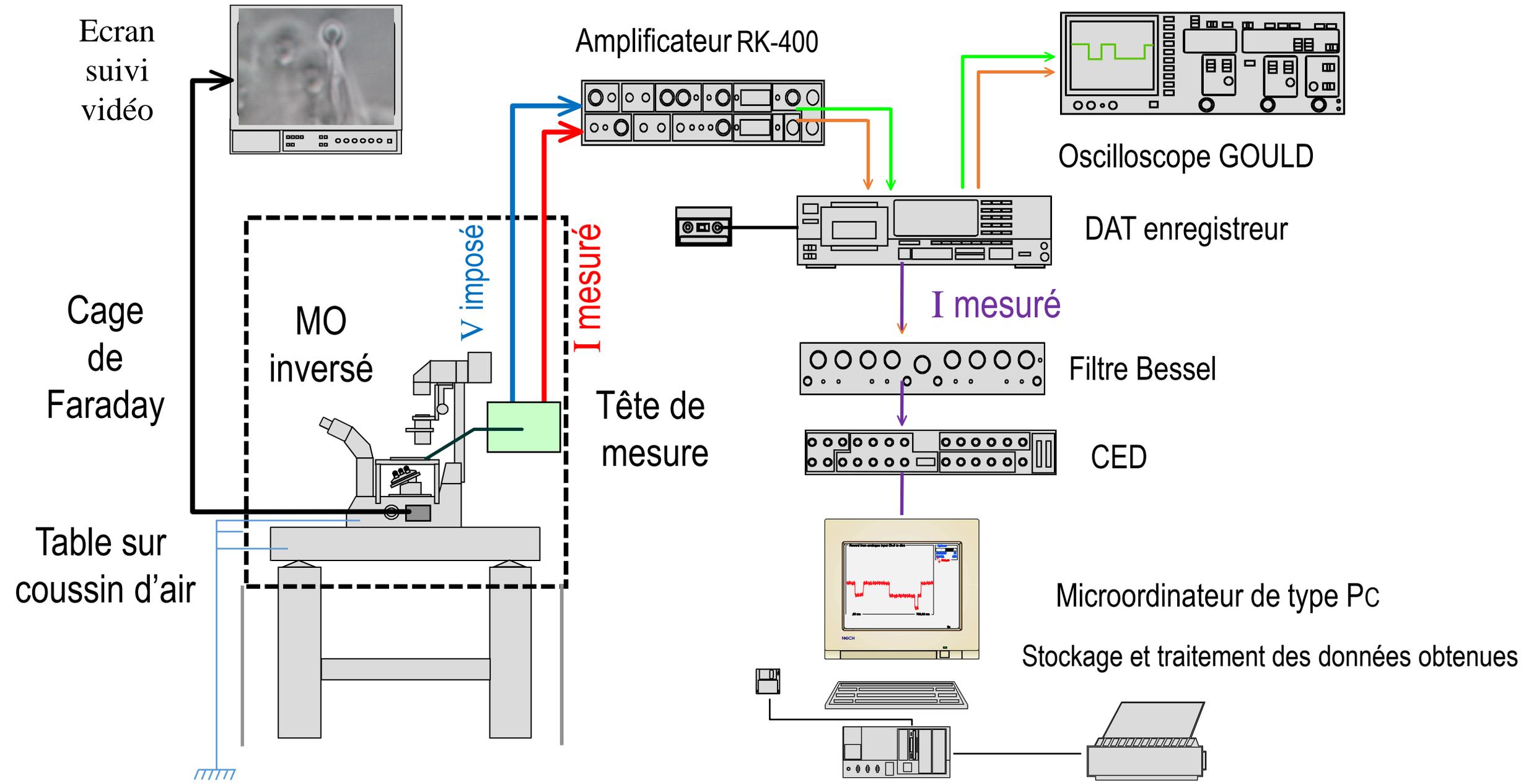


Réducteur avec 10  $\mu\text{L}$  de GR dans 400  $\mu\text{L}$  de milieu

# POSTE DE PATCH-CLAMP



# POSTE DE PATCH-CLAMP

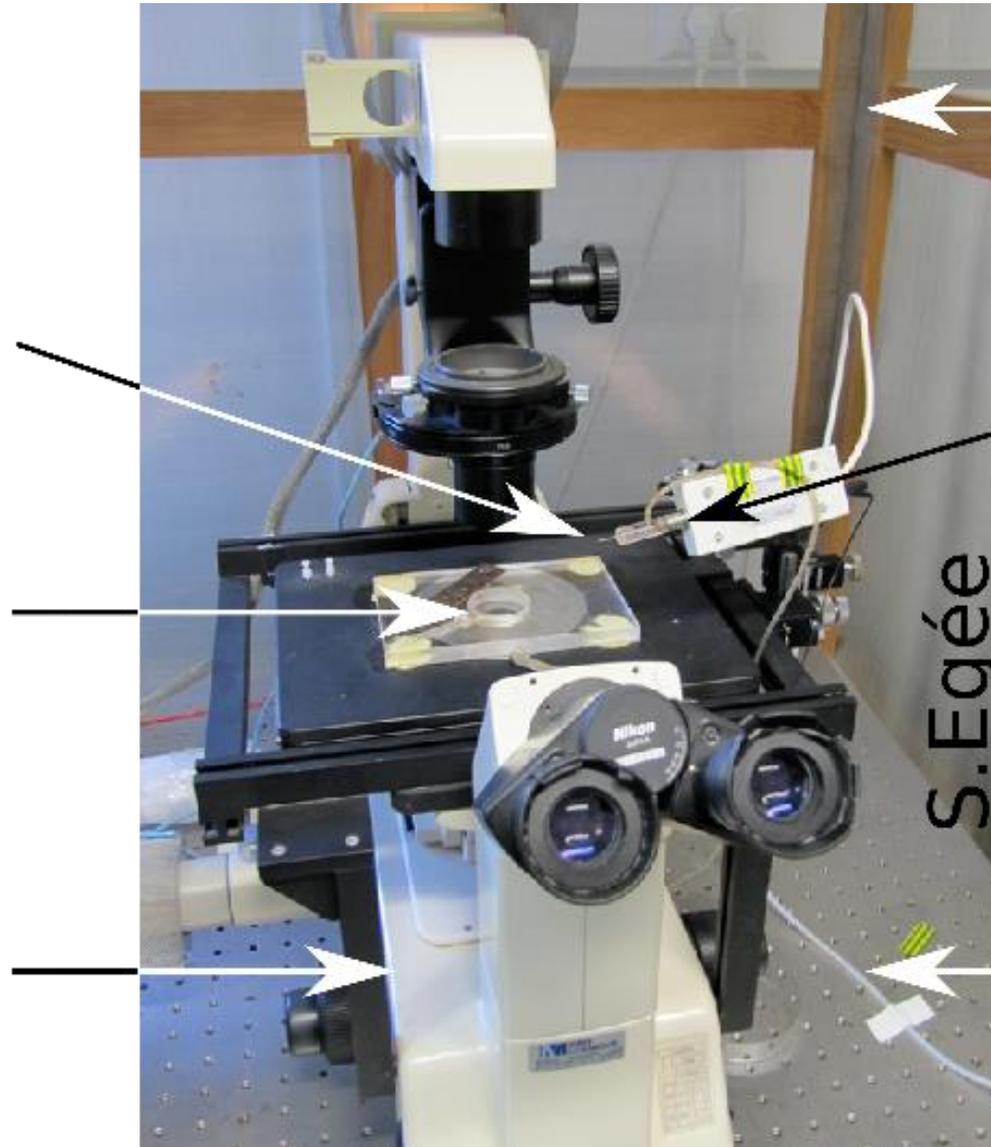


# OPTIQUE ET TÊTE DE MESURE DU POSTE DE PATCH-CLAMP

Micropipette  
de patch

Boîte de pétri  
avec réducteur  
contenant les GR

Microscope  
optique  
inversé



Cage de  
Faraday

Tête de mesure  
sur bras du  
micromanipulateur

S. Egée

Table sur  
coussin d'air

# UNITE MICROPIPETTE– ELECTRODE - CELLULES

Microscope inversé x800



Micromanipulateur avec  
micropipette de patch

Boîte de Pétri avec globules rouges

Electrode de référence

# REGLAGES DE LA TETE DE MESURE ET DU MICROSCOPE



Présentation de la micropipette à proximité des globules rouges



Descente de la micropipette avec le micromanipulateur

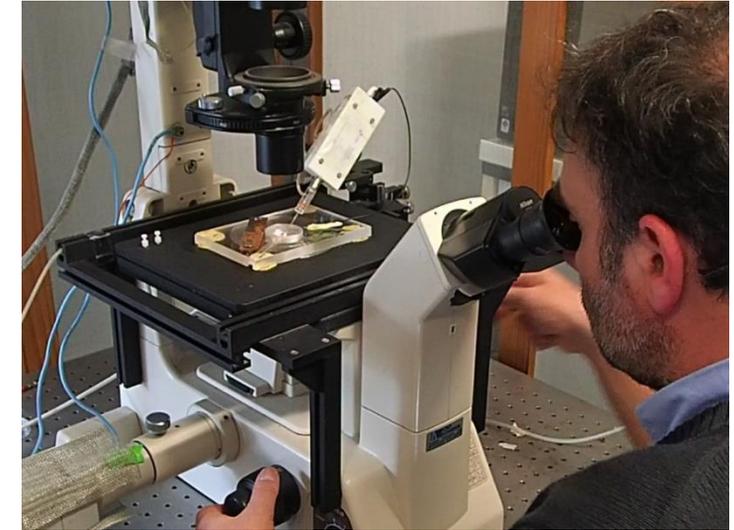
# OPTIQUE ET TÊTE DE MESURE DU POSTE DE PATCH-CLAMP



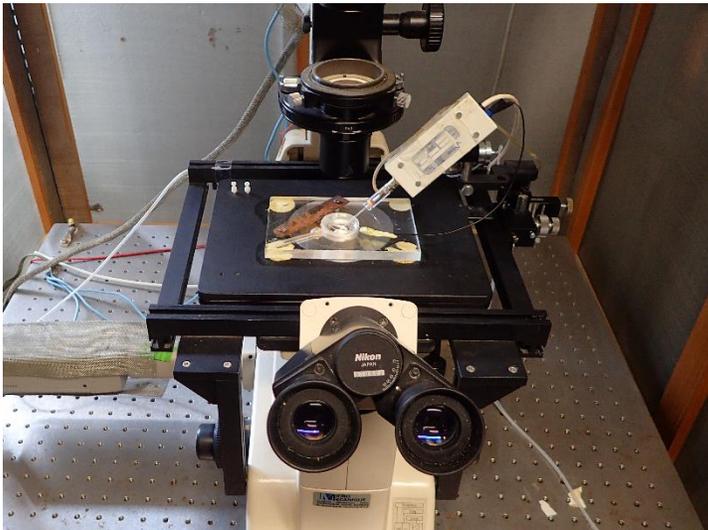
Présentation de la tête de mesure



Mise en place de la tête de mesure



Réglage optique



Tête et optique réglées

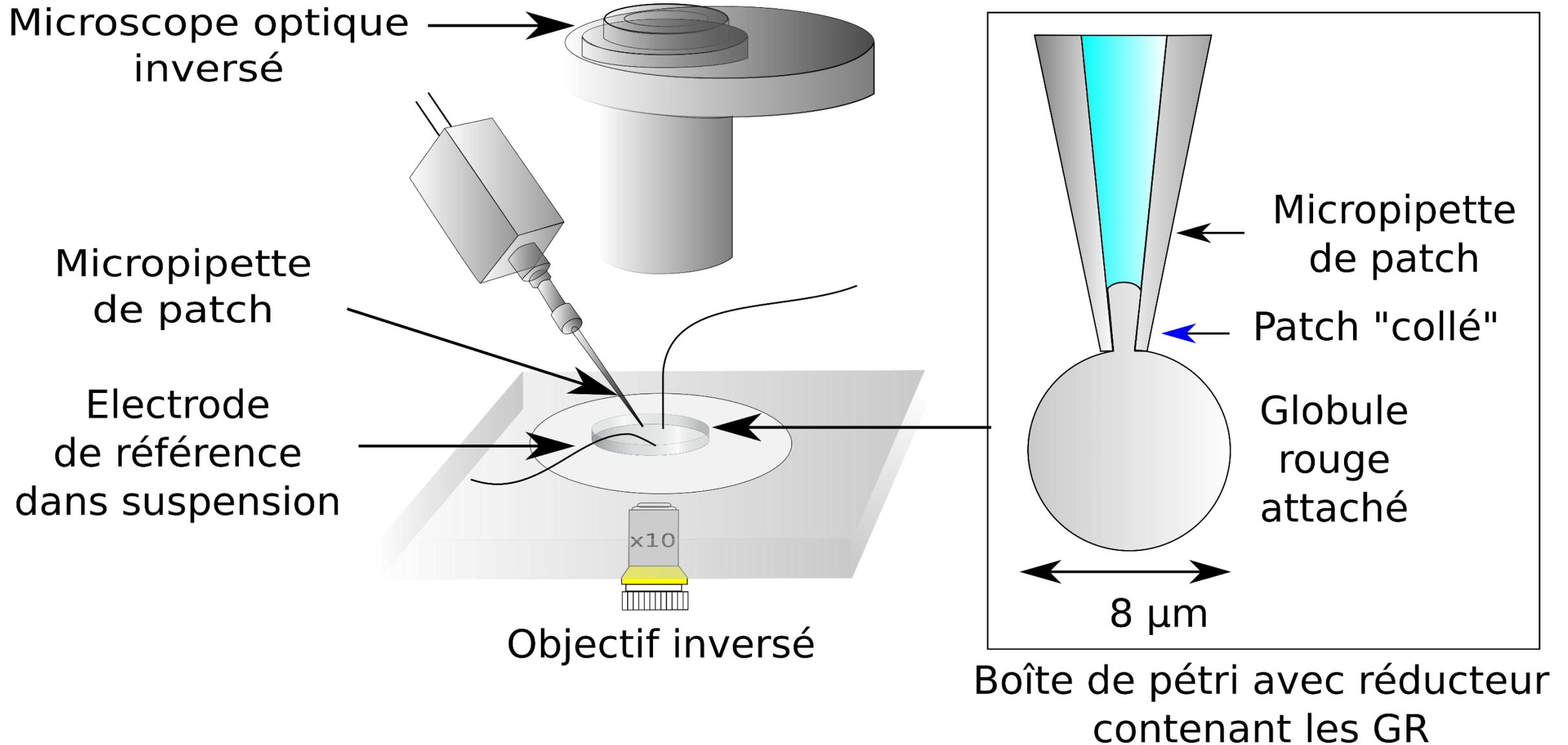


Micropipette et électrode dans suspension



Micropipette sur un GR

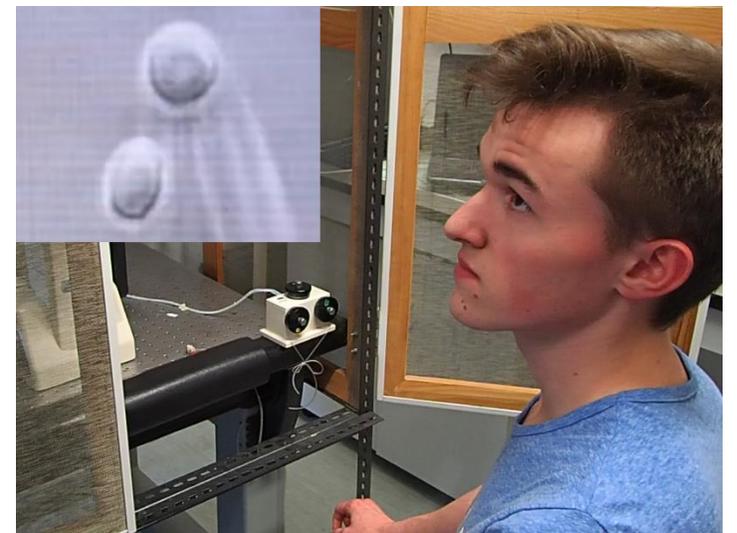
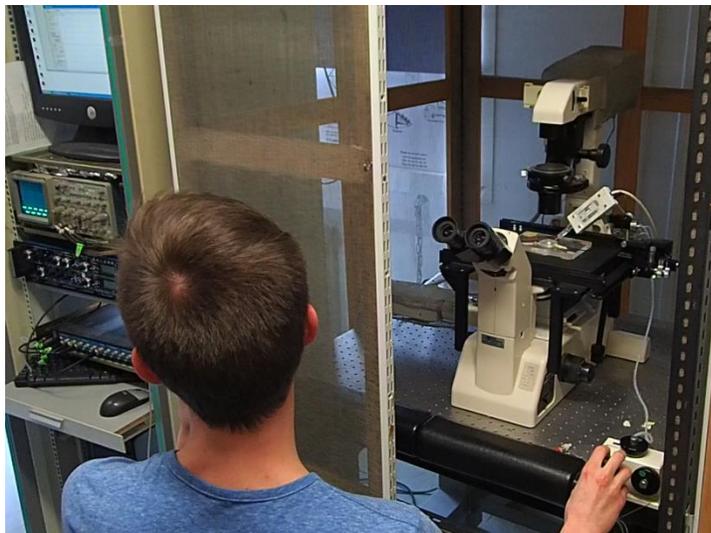
# UNITE OPTIQUE ET TETE DE MESURE



# MATHILDE AUX MANETTES POUR DESCENTE ET COLLAGE



# TRISTAN AUX MANETTES POUR DESCENTE ET COLLAGE



# L'OSCILLOSCOPE IMPOSE VOLTAGE MESURE TENSION



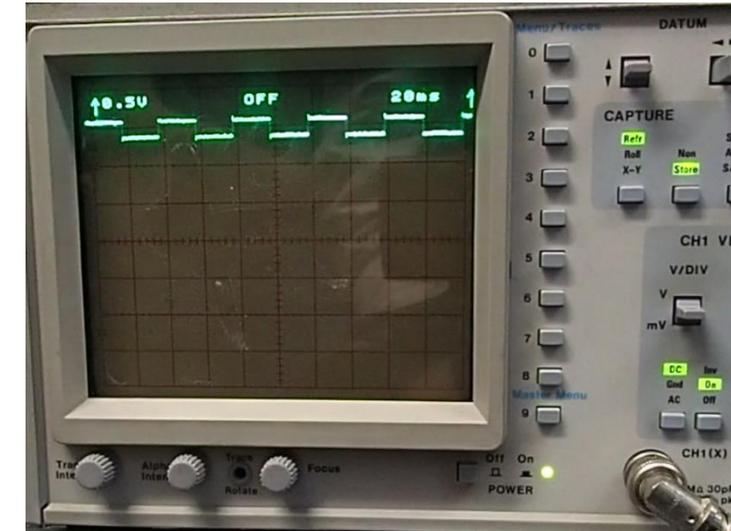
Oscilloscope

Courant mesuré

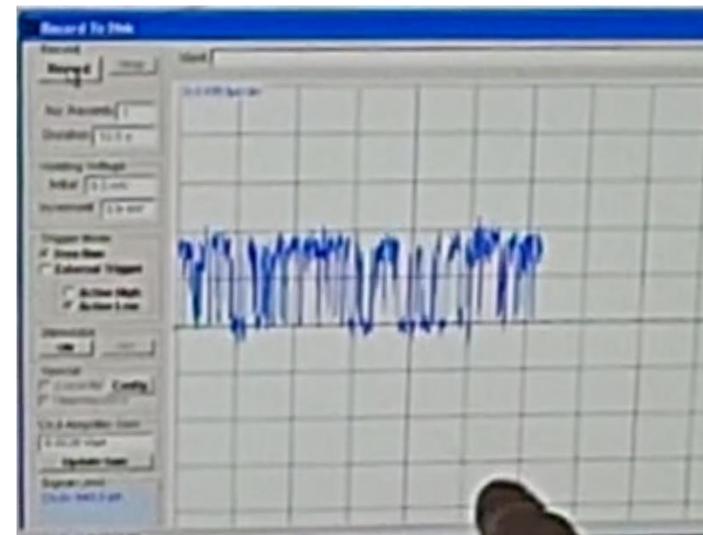


Voltage imposé

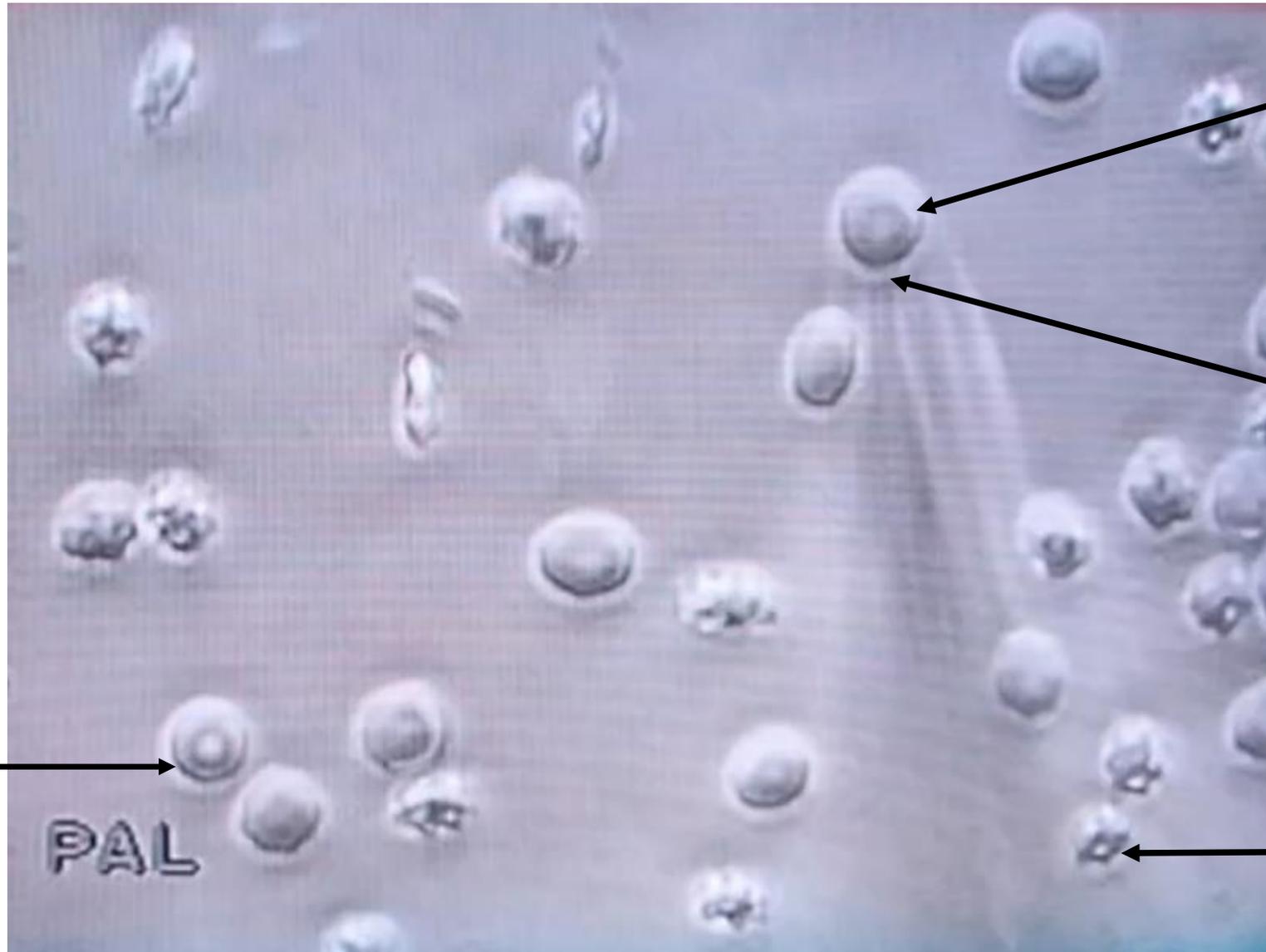
Courant K+ à travers un canal



Voltage imposé



# APPROCHER LA MICROPIPETTE D'UN GLOBULE ROUGE



Globule rouge 8  $\mu\text{m}$

Micropipette ouverture 1  $\mu\text{m}$

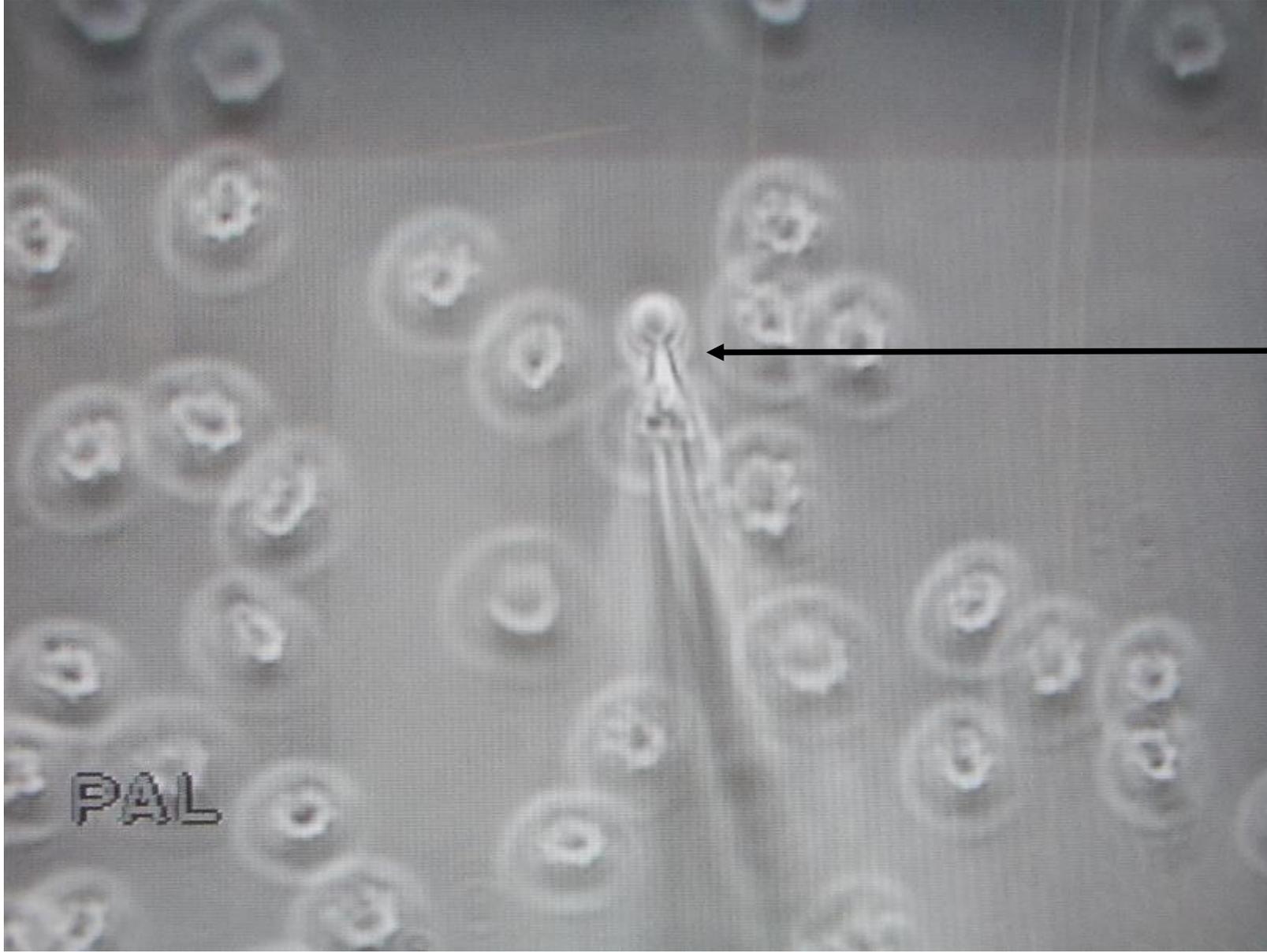
GR disque anucléé biconcave

Echinocyte

Suspension de GR au MO inversé x 800

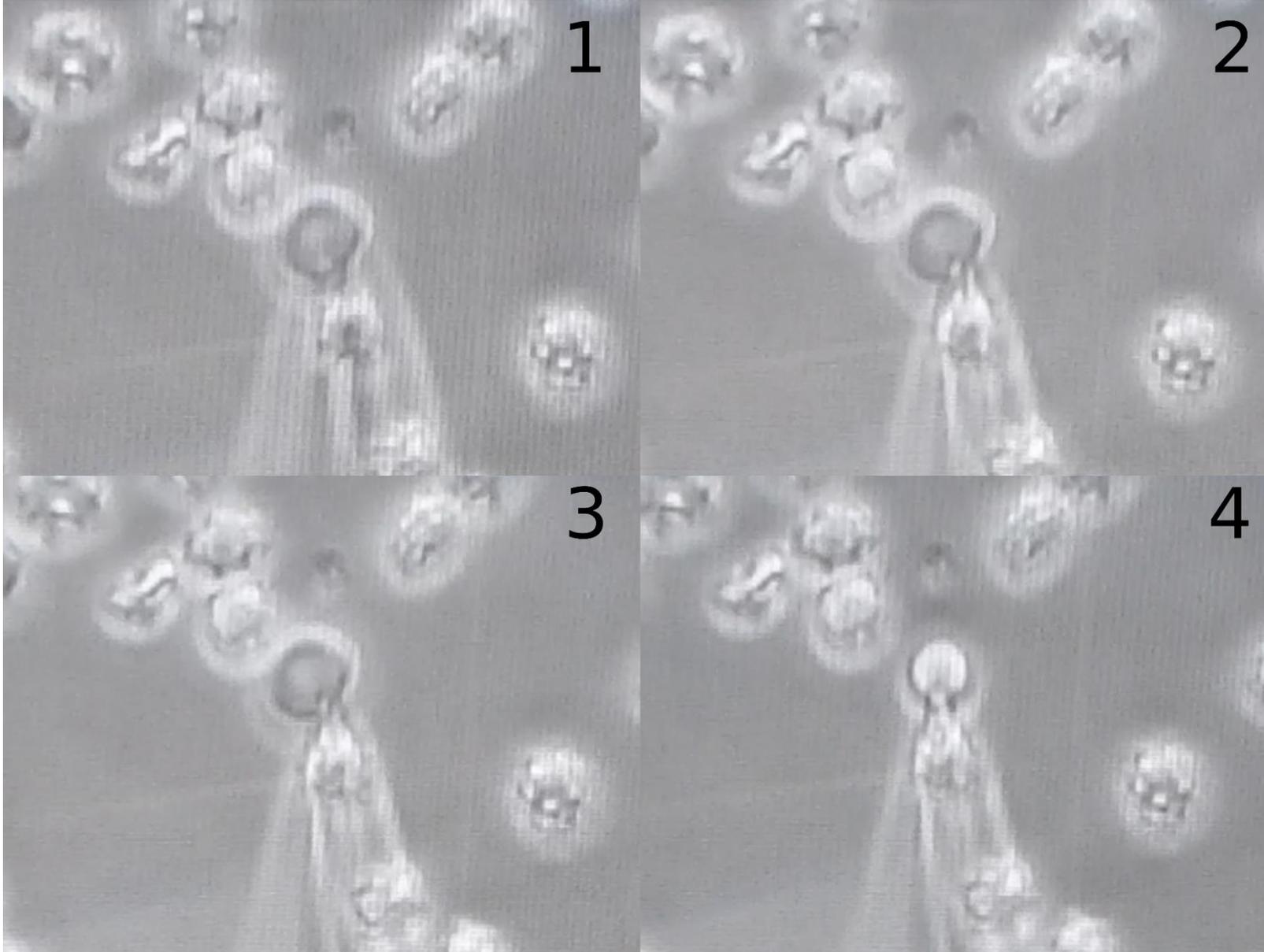
# ATTACHER ET COLLER LA MICROPIPETTE A LA MEMBRANE

Suspension de GR au MO inversé x 800



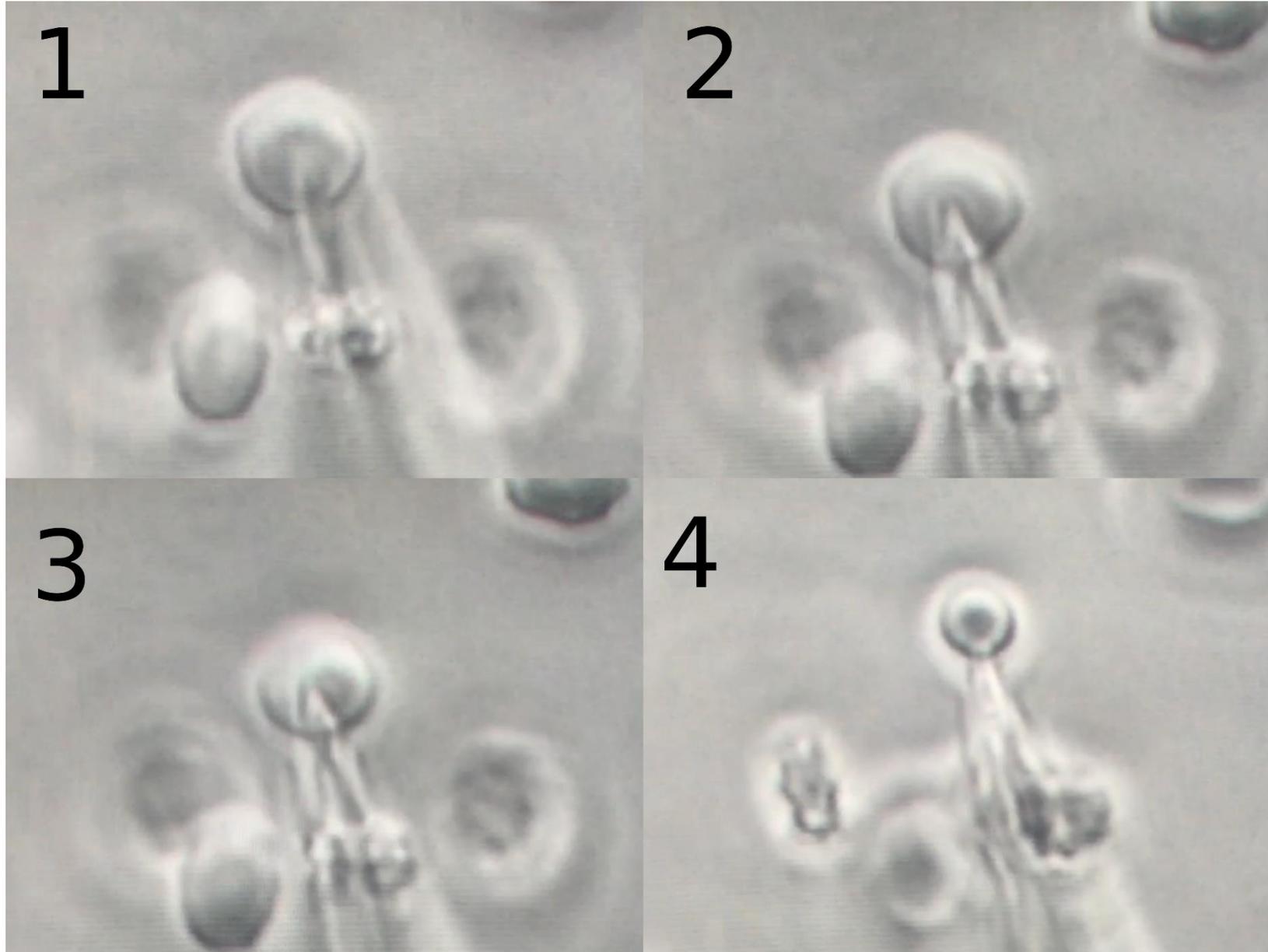
Micropipette  
collée au  
patch de  
membrane

# CHRONOLOGIE DE L'ATTACHEMENT ET DU COLLAGE



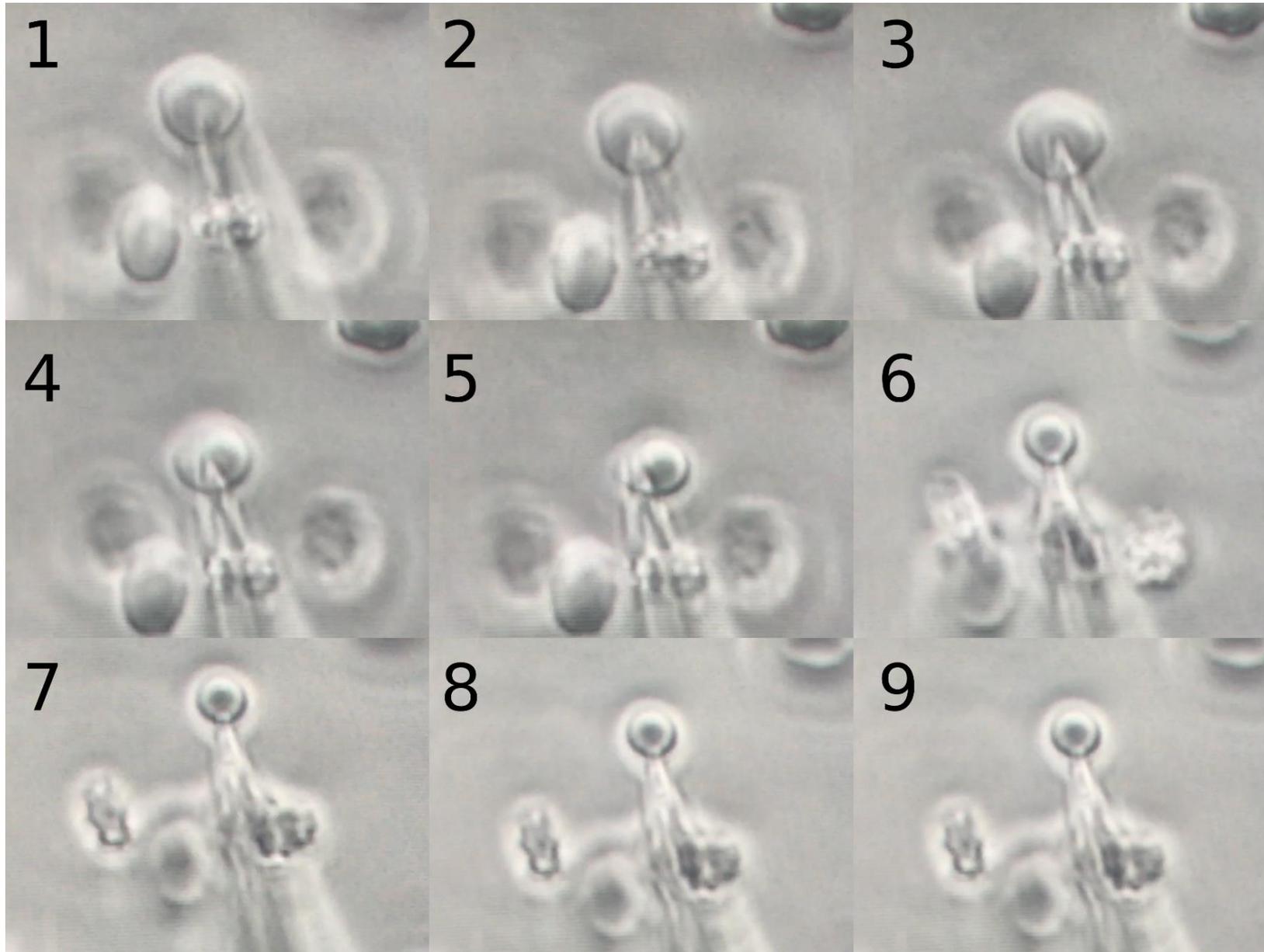
Suspension de GR au MO inversé x 800

# CHRONOLOGIE DE L'ATTACHEMENT ET DU COLLAGE



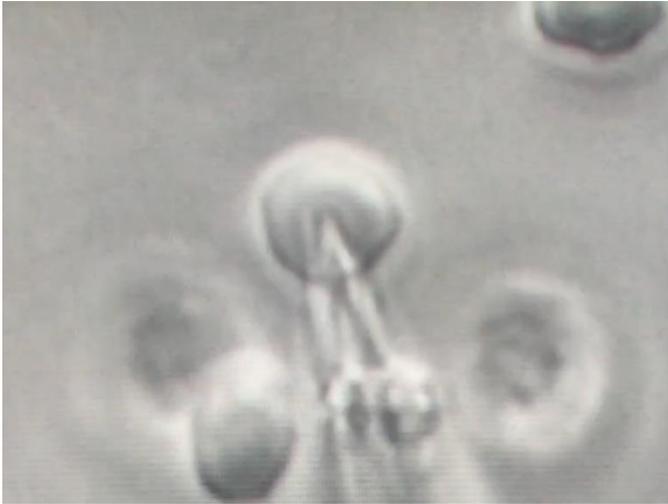
Suspension de GR au MO inversé x 800

# CHRONOLOGIE DE L'ATTACHEMENT ET DU COLLAGE

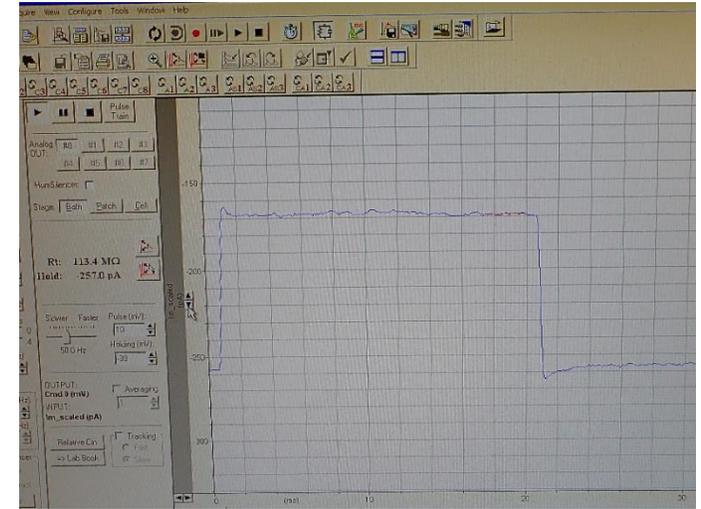
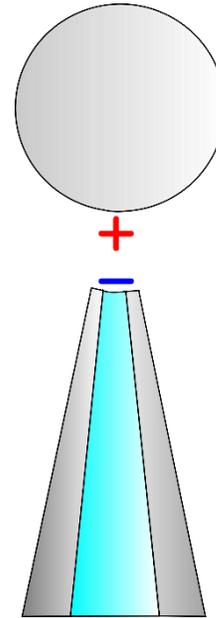


Suspension de GR au MO inversé x 800

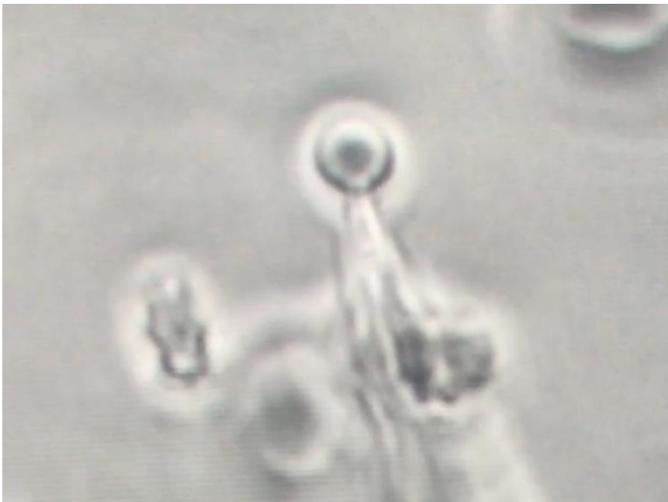
# MICROPIPETTE SCLEE AU GLOBULE ROUGE



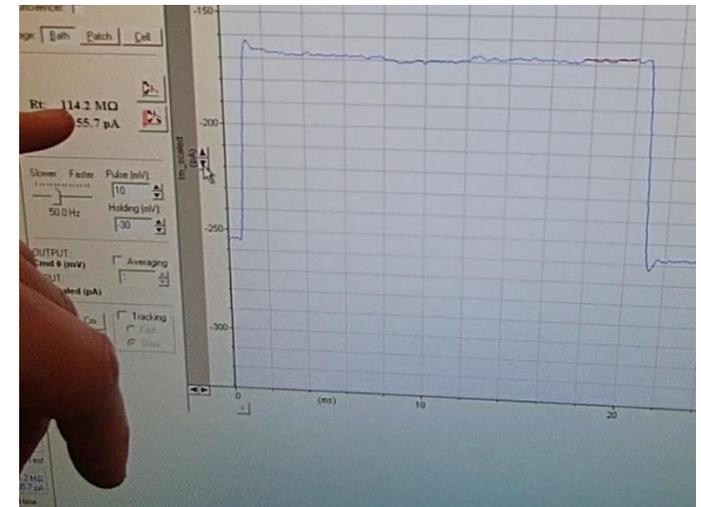
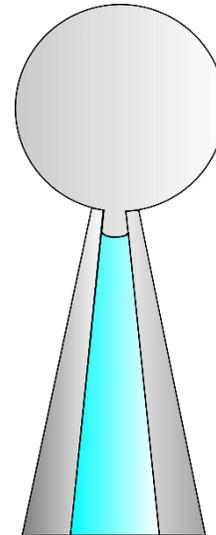
Attachement électrostatique



R=114 Méga Ohm



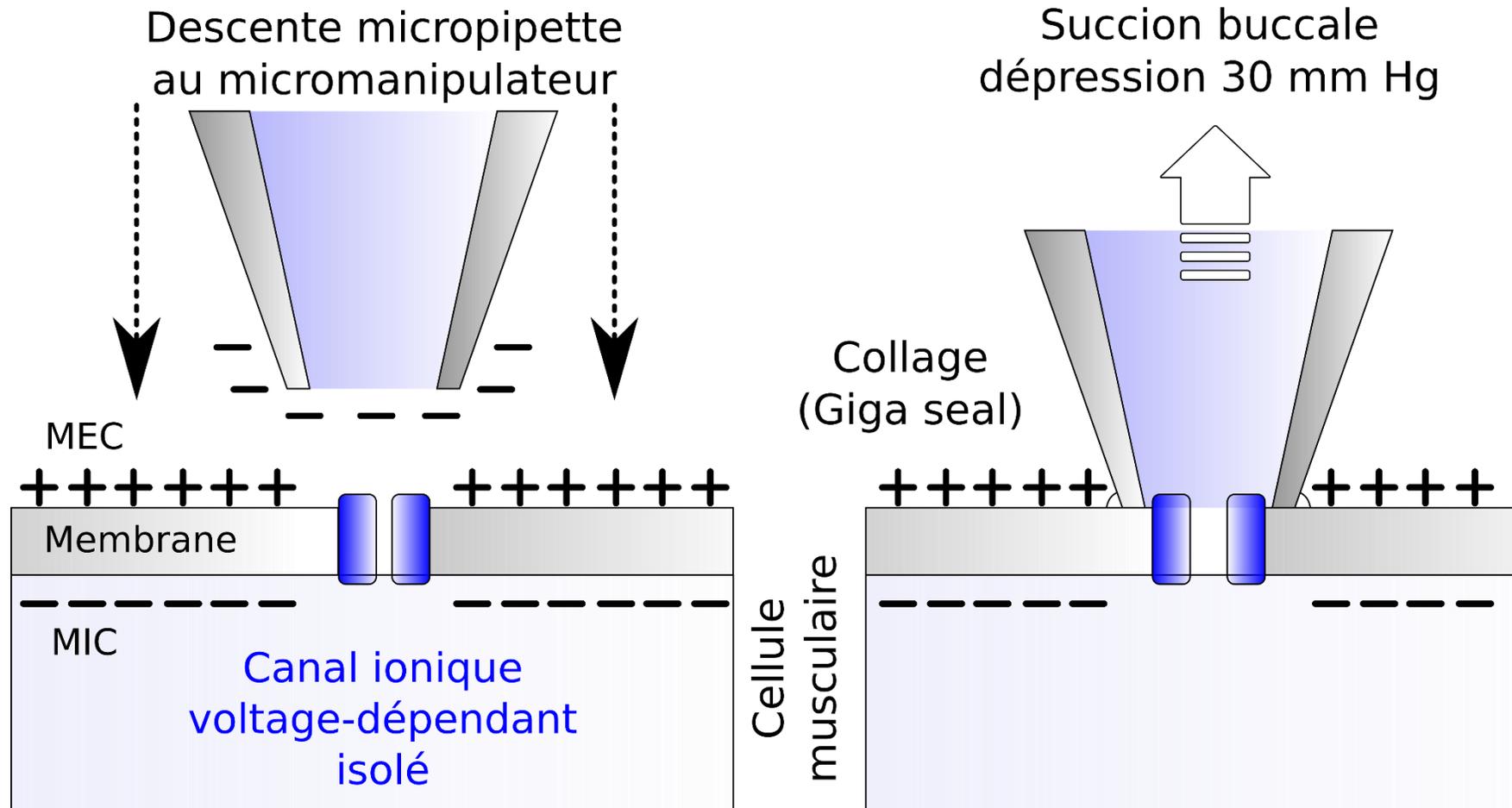
Scellement micropipette - membrane



R=1 Giga Ohm

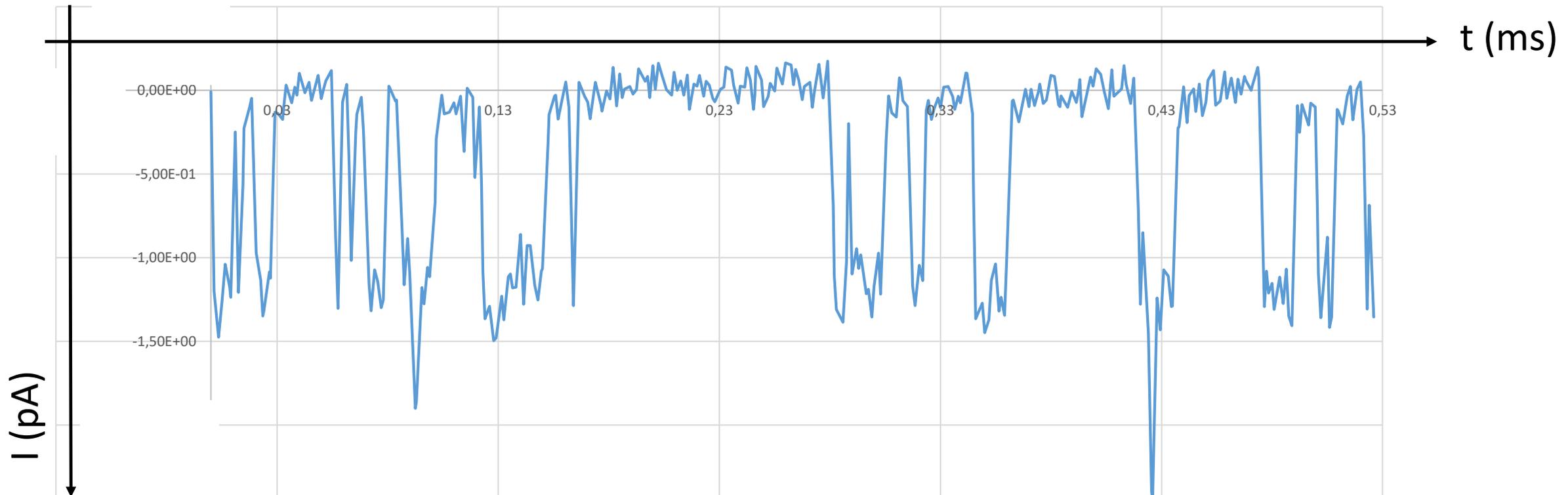
# COLLAGE ELECTROSTATIQUE MICROPIPETTE-FIBRE

Coller électrostatiquement la micropipette sur la surface externe de la membrane



# ENREGISTREMENT D'UN CANAL POTASSIQUE

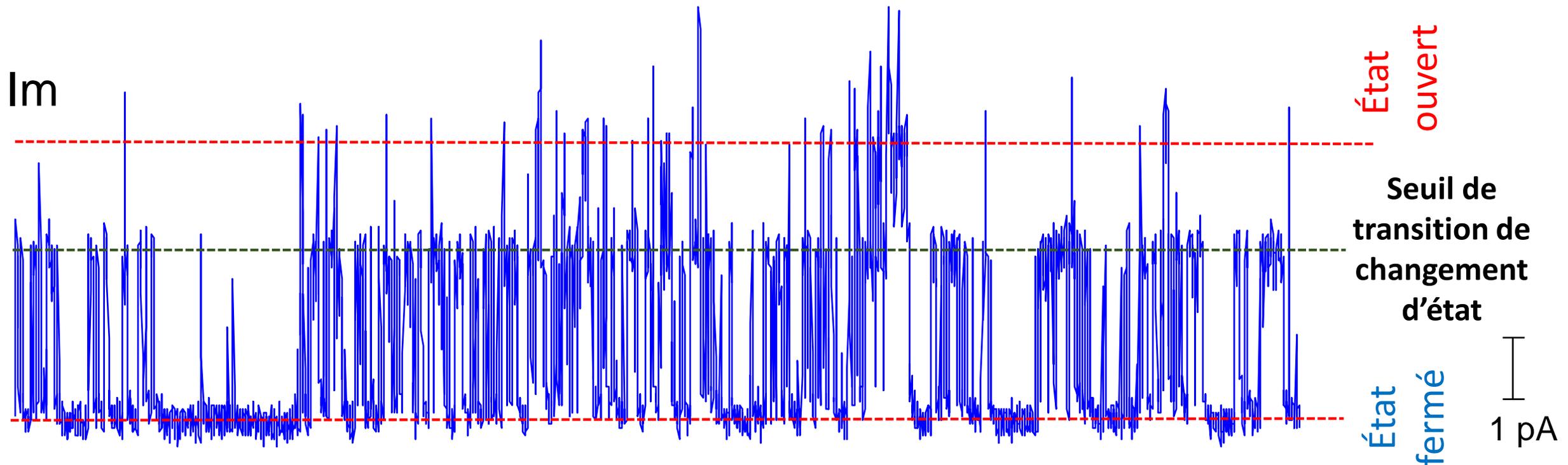
Courant d'ions  $K^+$  à travers un canal potassique Gardos de la membrane du globule rouge, canal activé par les ions  $Ca^{2+}$  intracellulaires.



Enregistrement immédiatement après le scellement. La déformation de la membrane liée à la formation du scellement induit une entrée de  $Ca^{2+}$  qui active le canal  $K^+$  activé par les ions calcium (canal Gárdos). Attention courant  $K^+$  inversé car micropipette avec 150 mM  $K^+$

# ENREGISTREMENT D'UN CANAL POTASSIQUE

Les canaux ioniques fonctionnent selon 2 états (binaires) ouvert ou fermé

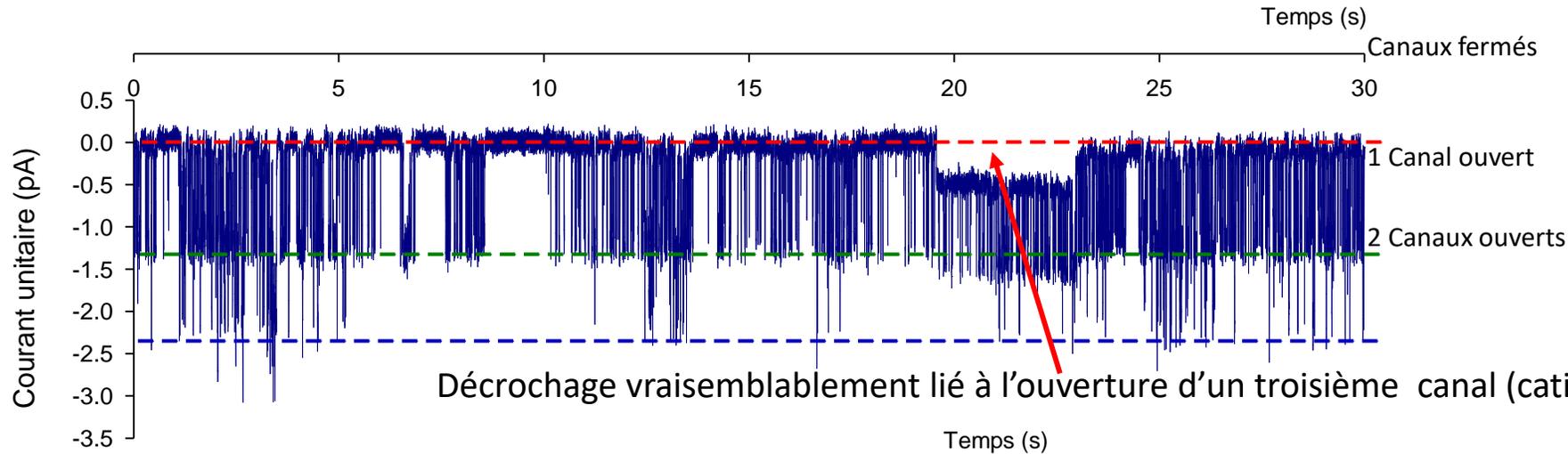


0.5 s

Le temps d'ouverture moyen du canal est de 13 millisecondes  
Le temps de fermeture moyen est de 20 millisecondes

# ENREGISTREMENT D'UN CANAL POTASSIQUE

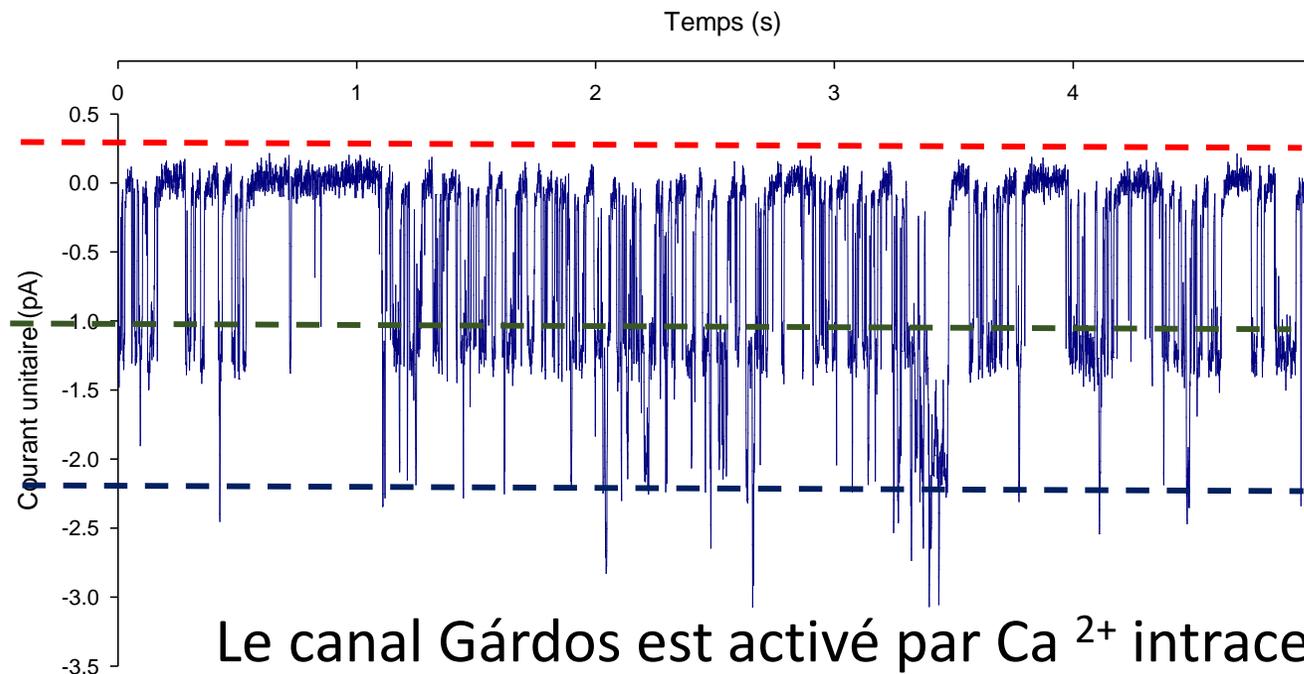
## Enregistrement activité du canal Gárdos en configuration cellule attachée



Enregistrement  
immédiatement après le  
scellement (« seal »)

30 secondes  
correspondent à 20000  
points d'enregistrement

Décrochage vraisemblablement lié à l'ouverture d'un troisième canal (cationique non sélectif).

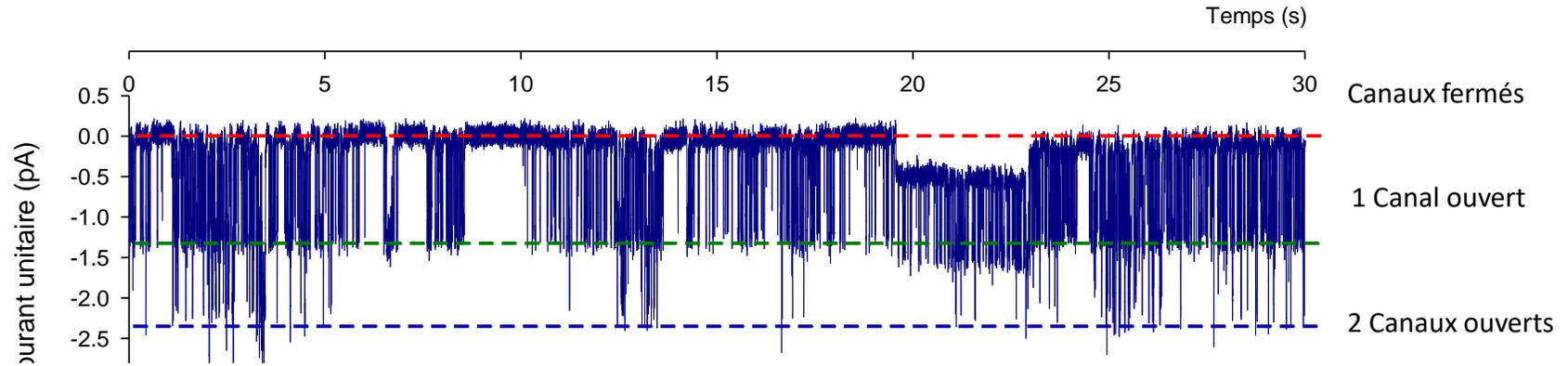


Zoom entre 0 et 5 secondes

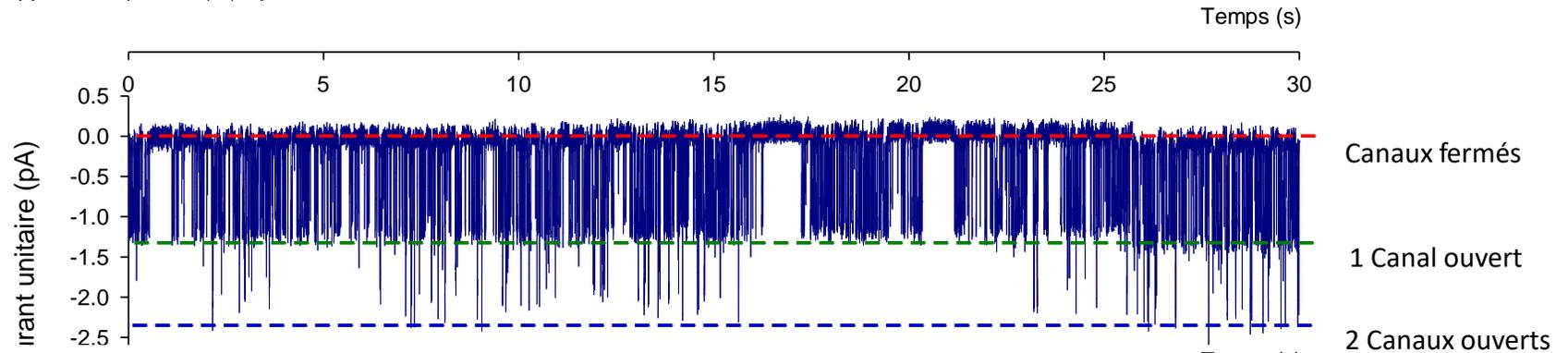
Le canal Gárdos est activé par  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire

# ENREGISTREMENT D'UN CANAL POTASSIQUE

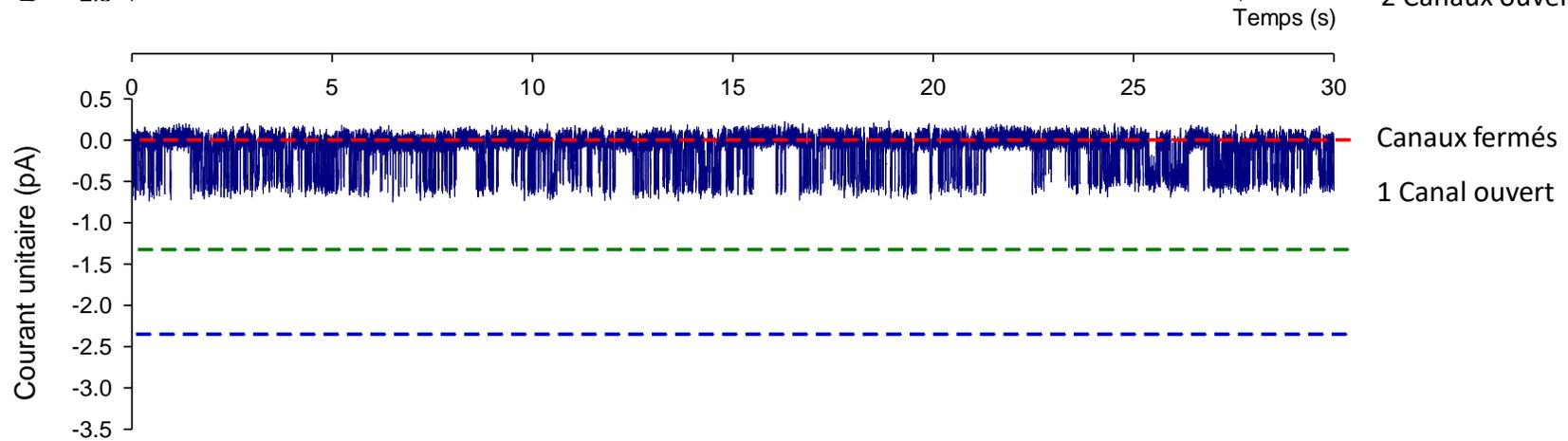
0 minutes  
après scellement



3 minutes  
après scellement



7 minutes  
après scellement



# TRANSMISSION HORIZONTALE – ECHANGES PROF-ELEVES



# EN ATTENTE DU SCHELLEMENT



# MERCI STEPHANE ...et A BIENTOT



Diaporama  
S. Egée - H.Kempf  
21-Mars-2018