



**HAL**  
open science

## Méthodologies en électrophysiologie et imagerie

Patrice Congar

► **To cite this version:**

Patrice Congar. Méthodologies en électrophysiologie et imagerie. Licence. UE de Neurophysiologie appliquée du M1 (Méthodologies en électrophysiologie et imagerie), 2015. hal-02795277

**HAL Id: hal-02795277**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02795277>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Méthodologies en électrophysiologie et imagerie

Etudier/comprendre le fonctionnement des organes / tissus / cellules / composants cellulaires et moléculaires d'un organisme

Exemple des neurones et des cellules gliales du système olfactif



Deux approches possibles en physiologie :

"mesurer" les communications entre les neurones/cellules par des **enregistrements électrophysiologiques** des signaux électriques/synaptiques

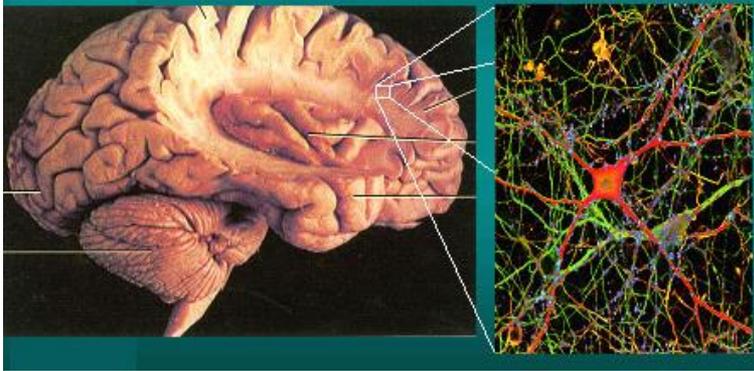
"visualisation" de ces communications neuronales/cellulaires par des **techniques d'imagerie**

(radiologie, explorations fonctionnelles, imagerie bio-médicale, microscopie)



Dans les deux cas, différents niveaux de résolutions

# Le système nerveux central



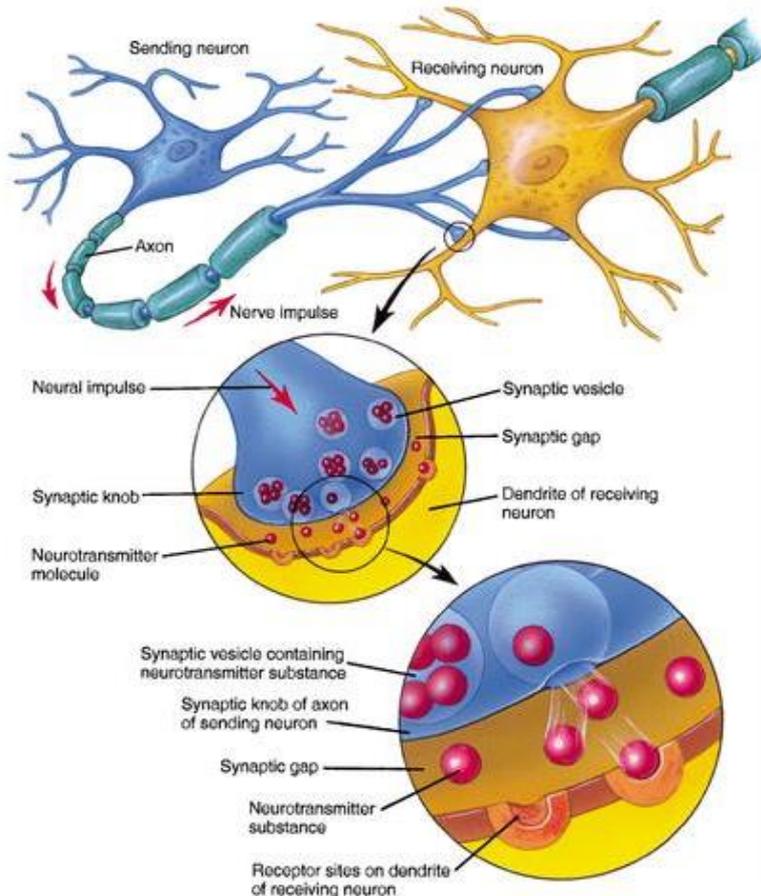
## Le cerveau

- $\approx$  100 milliards de neurones et 10 à 50 fois plus de cellules gliales
- Chaque neurone entretient de 1000 à 10000 connexions avec ses voisins : les synapses.
- $10^{14}$  à  $10^{15}$  synapses dans le cortex cérébral humain.

## Les neurones

- Les neurones sont des cellules excitables qui transmettent les informations qu'ils reçoivent sous forme de signaux électriques;
- Ce sont aussi des cellules sécrétrices de neurotransmetteur (au niveau des synapses);
- Ils reçoivent simultanément des milliers d'informations synaptiques. Ils doivent les intégrer et transmettre l'information nerveuse sous la forme de potentiels d'actions (PA), qui vont se propager pour induire une sécrétion de neurotransmetteur vers les cellules voisines :

- 1) les dendrites reçoivent les informations;
- 2) le corps cellulaire intègre ces informations;
- 3) l'axone émet/propage le signal résultant.



Influx nerveux (PA)  
dans le neurone "émetteur" présynaptique

Dépolarisation de la membrane  
pré-synaptique



Augmentation de la concentration  
de calcium intracellulaire

Libération par exocytose du  
neurotransmetteur dans la fente synaptique

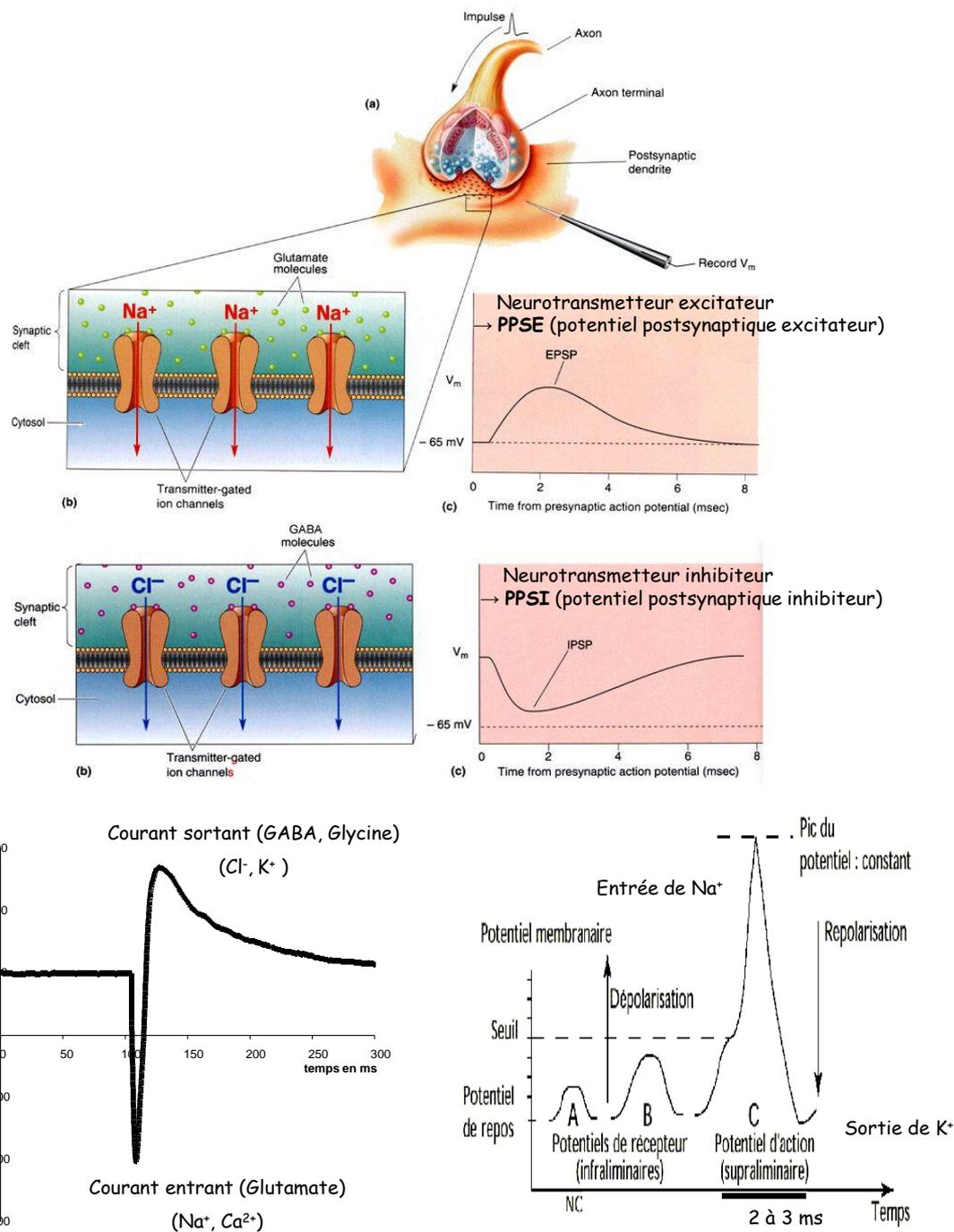


La fixation du neurotransmetteur provoque  
l'ouverture de canaux ioniques directement  
(récepteurs ionotropes)  
ou via l'activation de second-messagers  
(récepteurs métabotropes)



Dépolarisation/hyperpolarisation de la  
membrane post-synaptique

Génèse d'un influx nerveux (PA)



# Quelques méthodes d'électrophysiologie

Influx nerveux (PA)  
dans le neurone "émetteur" présynaptique

Dépolarisation de la membrane  
pré-synaptique



Augmentation de la concentration  
de calcium intracellulaire

Libération par exocytose du  
neurotransmetteur dans la fente synaptique



La fixation du neurotransmetteur provoque  
l'ouverture de canaux ioniques directement  
(récepteurs ionotropes)  
ou via l'activation de second-messagers  
(récepteurs métabotropes)



Dépolarisation/hyperpolarisation de la  
membrane post-synaptique

Génèse d'un influx nerveux (PA)



Variations  
du potentiel membranaire



Exocytose du  
neurotransmetteur



Flux ioniques



Variations  
du potentiel membranaire

# Quelques méthodes d'électrophysiologie

Electroencéphalographie (EEG)



Variations  
du potentiel membranaire

Ampérométrie

Voltamétrie



Exocytose du  
neurotransmetteur

Patch-clamp (s)



Flux ioniques

Extracellulaire  
(Potentiel de champ - Single-unit)

Intracellulaire

Patch-clamp



Variations  
du potentiel membranaire

# Quelques méthodes d'électrophysiologie

Electroencéphalographie (EEG)

**MACROSCOPIQUE**  
Non invasif  
Organisme / organe entier

Ampérométrie

Voltamétrie

**Microscopique**  
Multicellulaire

Extracellulaire  
(Potentiel de champ - Single-unit)

Extracellulaire  
(Potentiel de champ - Single-unit)

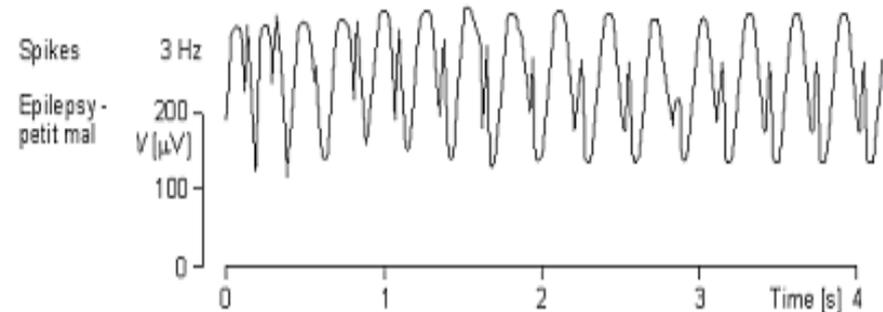
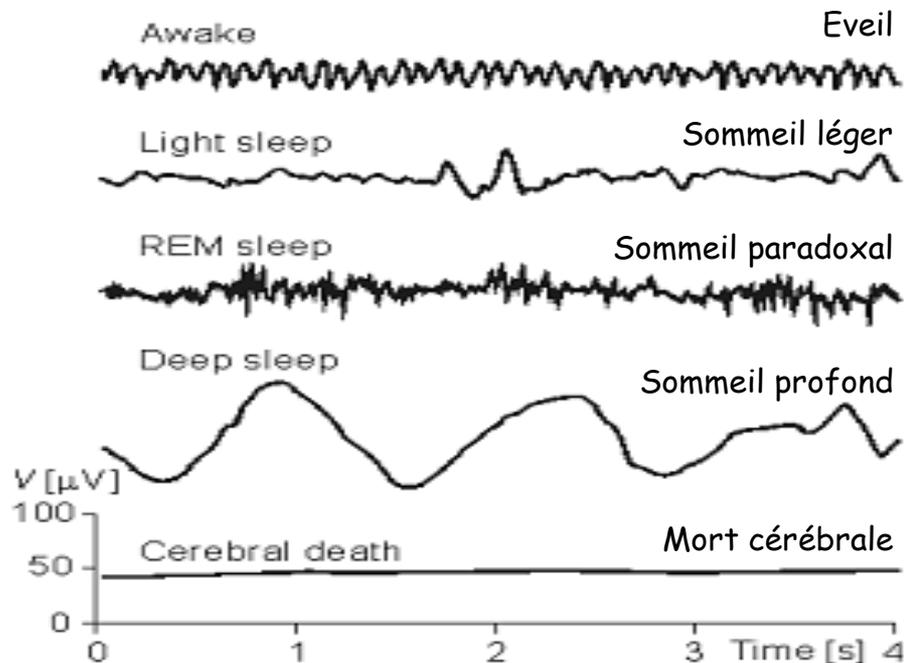
Intracellulaire

Patch-clamp

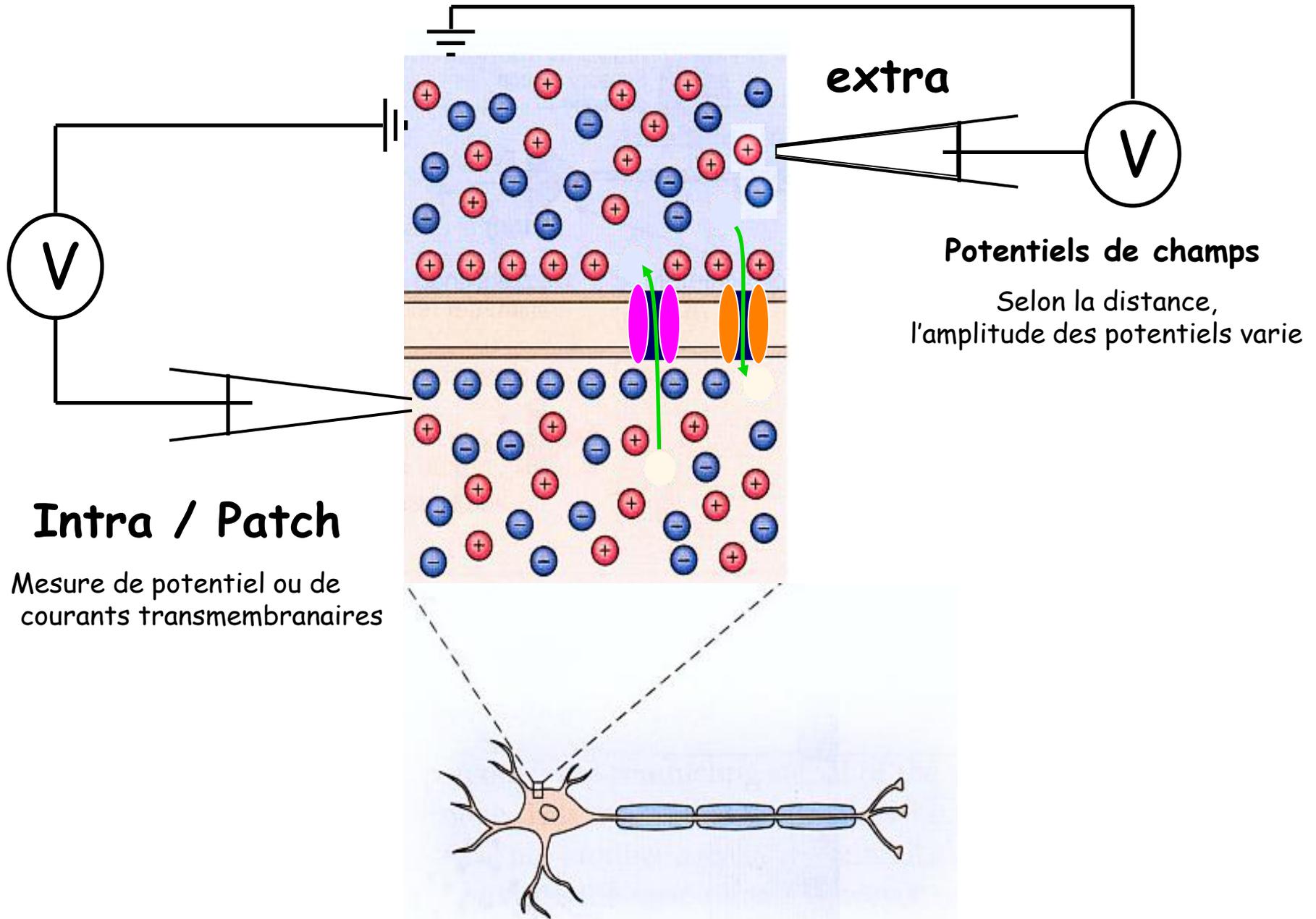
**Microscopique**  
Unicellulaire / Moléculaire

# L'électrophysiologie "fonctionnelle"

L'électroencéphalographie (EEG) est une mesure directe de l'activité électrique du cerveau en appliquant des électrodes sur le cuir chevelu. On amplifie le signal plus de  $10^6$  fois. L'EEG est peu précise spatialement mais elle offre une bonne résolution temporelle. L'EEG est utilisée pour le diagnostic en neurologie, notamment pour l'épilepsie, et à l'étude des conséquences d'un traumatisme crânien ou d'une ischémie cérébrale transitoire, conjointement avec d'autres techniques d'investigation et d'imagerie médicale (scanner, IRM).



# Enregistrements extracellulaires - intracellulaires



# L'électrophysiologie « cellulaire / moléculaire »

## Extracellulaire

Enregistrement de cellules unitaires (single unit)

ou

Enregistrement de l'activité électrique d'un groupe de cellules (potentiel de champ)



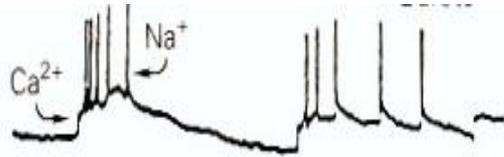
L'électrode d'enregistrement est placée à l'extérieur des cellules

→ potentiels récepteurs, potentiels d'actions et courants synaptiques

## Intracellulaire

Enregistrement d'une seule cellule

Permet d'analyser les courants macroscopiques, mais n'autorise pas un niveau de résolution suffisant pour l'étude du fonctionnement des canaux ioniques individuels.



L'électrode est plantée dans la cellule

→ propriétés macroscopiques des conductances, courants ioniques transmembranaires

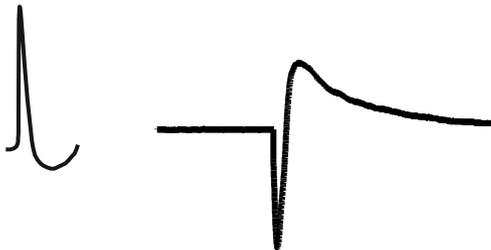
## Patch-Clamp

Enregistrement d'une cellule / d'un ou plusieurs canaux

Permet l'enregistrement de signaux électriques à partir d'un fragment de membrane ou d'une cellule entière, au travers d'un contact très résistant (gigaohms).

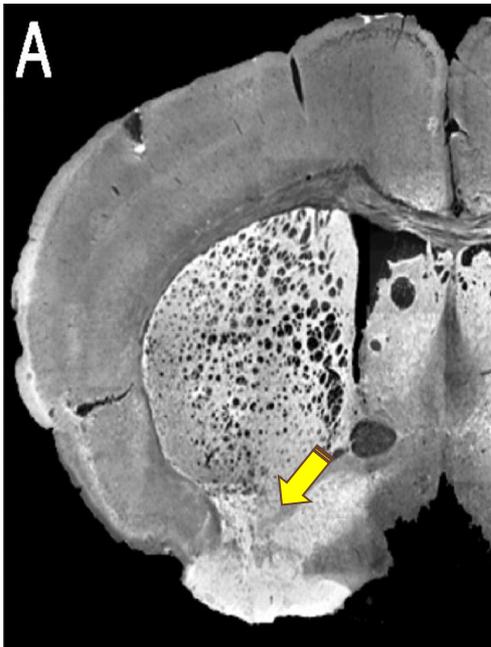
L'électrode est collée sur la membrane qui est conservée (cellule attachée) ou perforée (cellule entière)

→ potentiels récepteurs, potentiels d'actions et courants synaptiques  
propriétés macroscopiques et microscopiques des conductances, et canaux ioniques



# Electrophysiologie du système olfactif

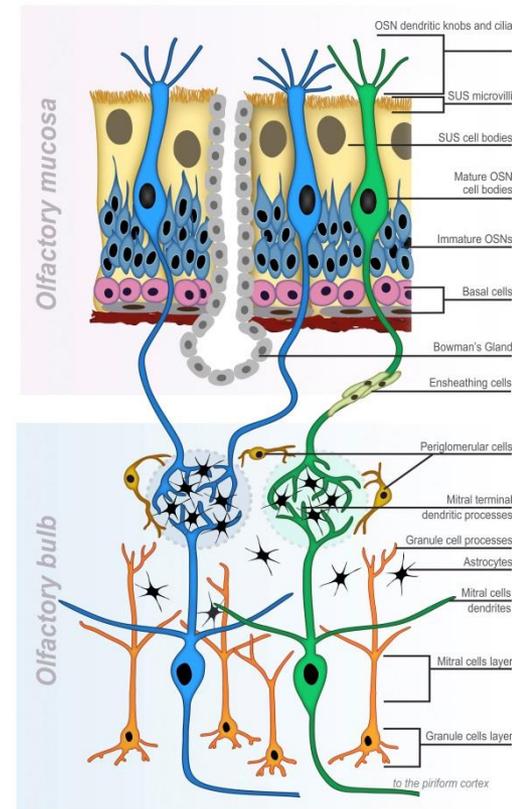
Tubercule olfactif



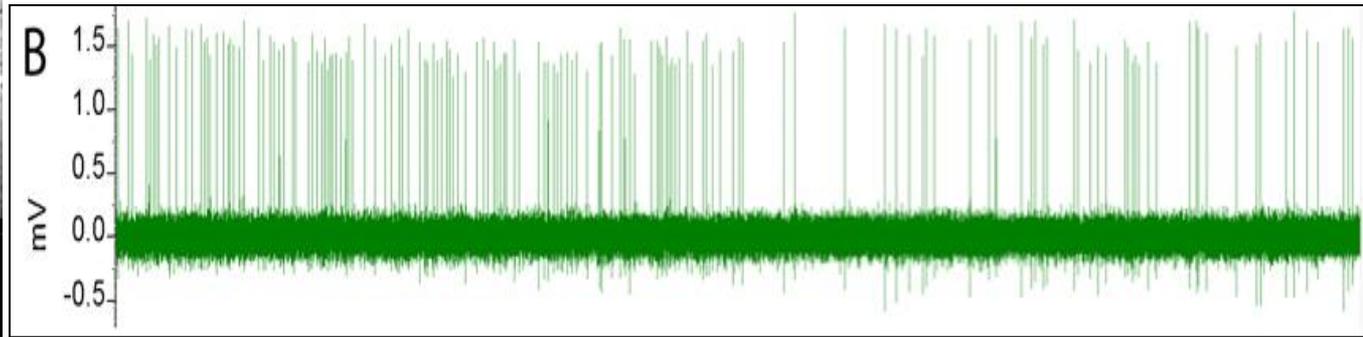
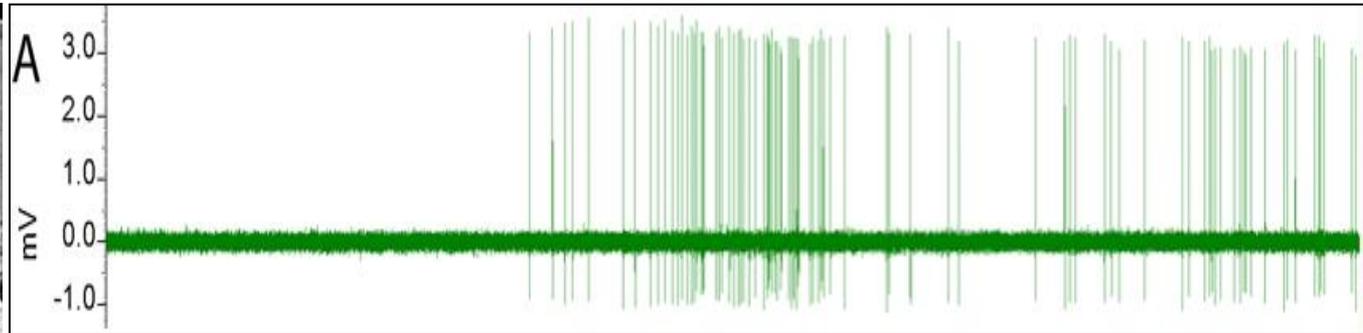
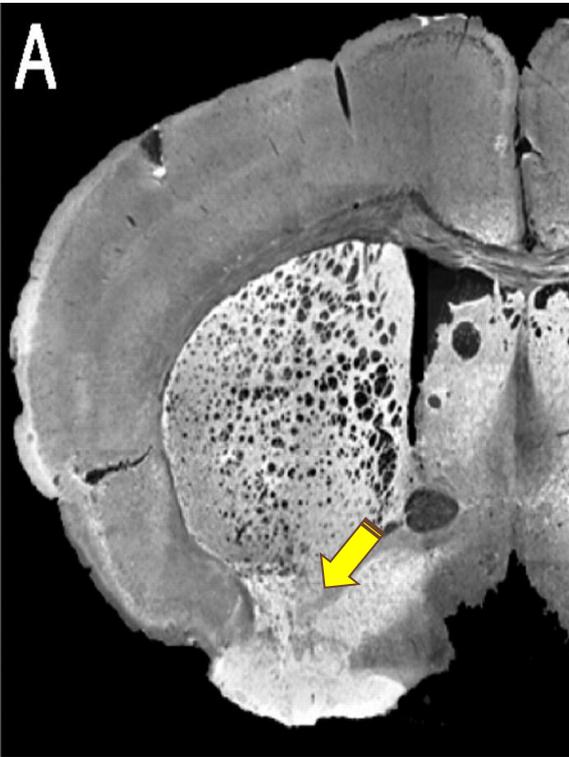
## Enregistrements électrophysiologiques chez le rat / souris:

- MO, BO, Tubercule olfactif
- In vivo, hémi-tête, tranches, cellules isolées, cultures primaires
- PA, potentiels récepteurs et potentiels de champs, courants membranaires
- Neurones et cellules non-neuronales

## MO et BO



# Réponses des neurones du tubercule olfactif à des odeurs naturelles chez un rat anesthésié



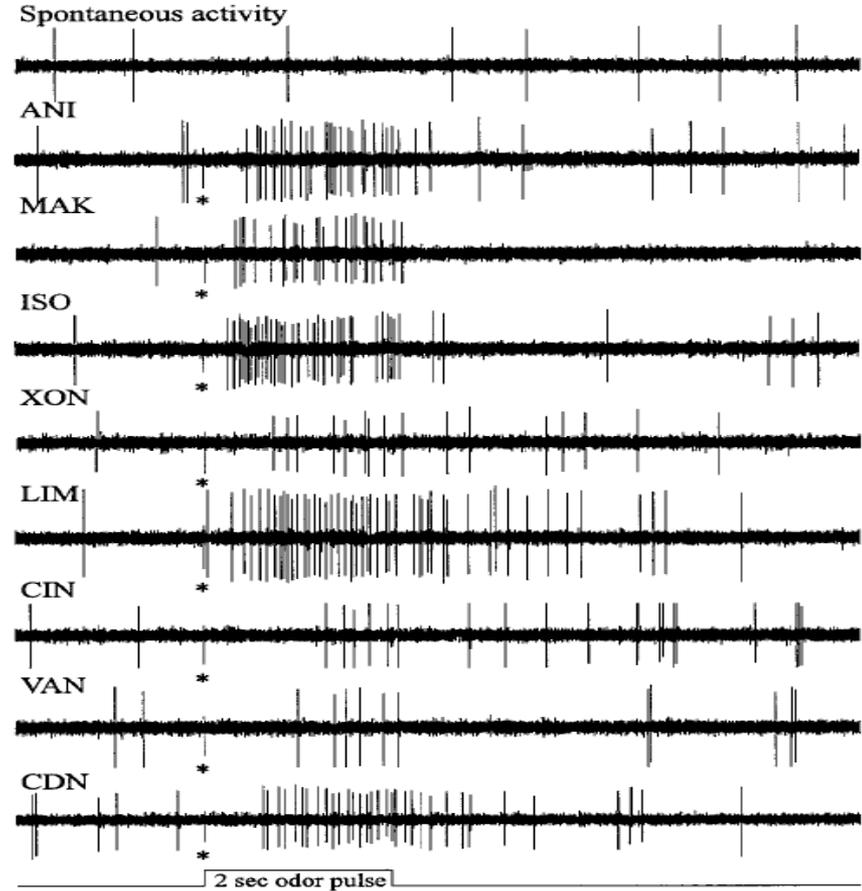
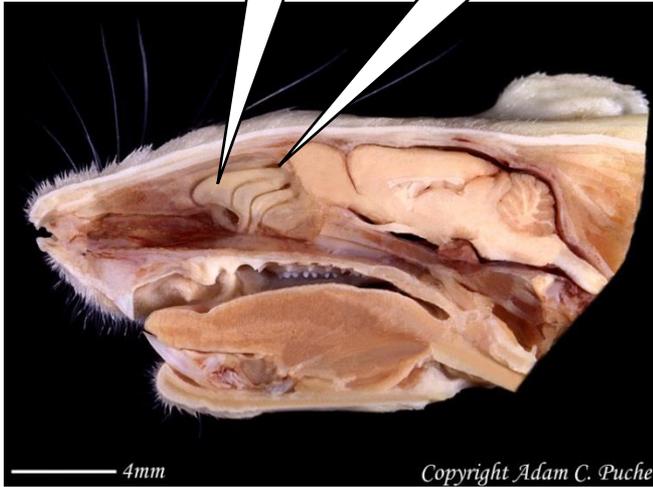
1 s

# Electrophysiologie de la muqueuse olfactive

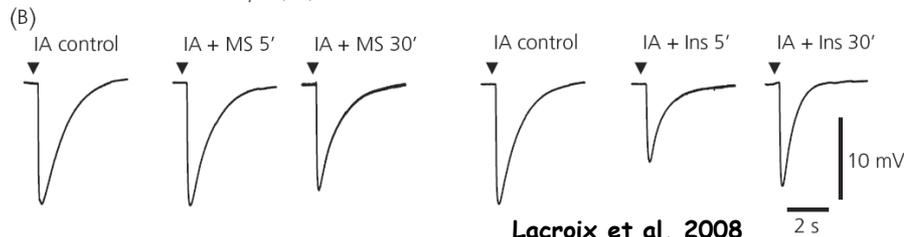
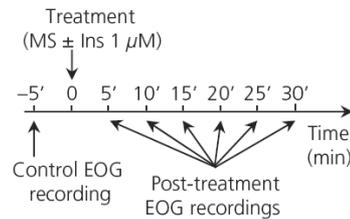
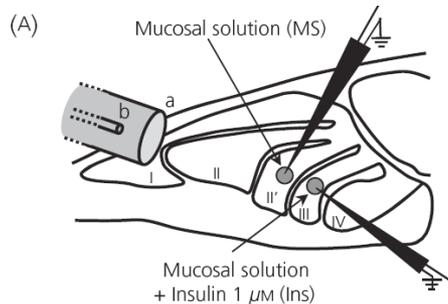
EOG (Muqueuse olfactive hémitête)

Single unit (Muqueuse olfactive in vivo)

Enregistrement unitaire MO



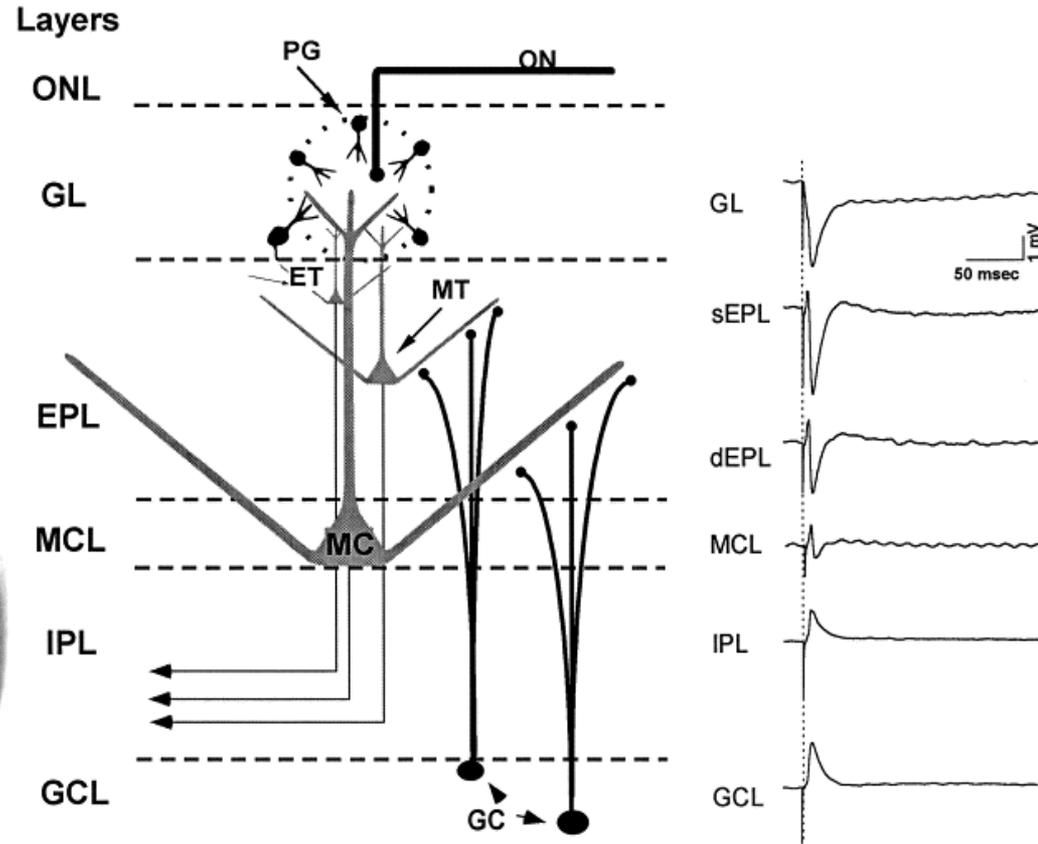
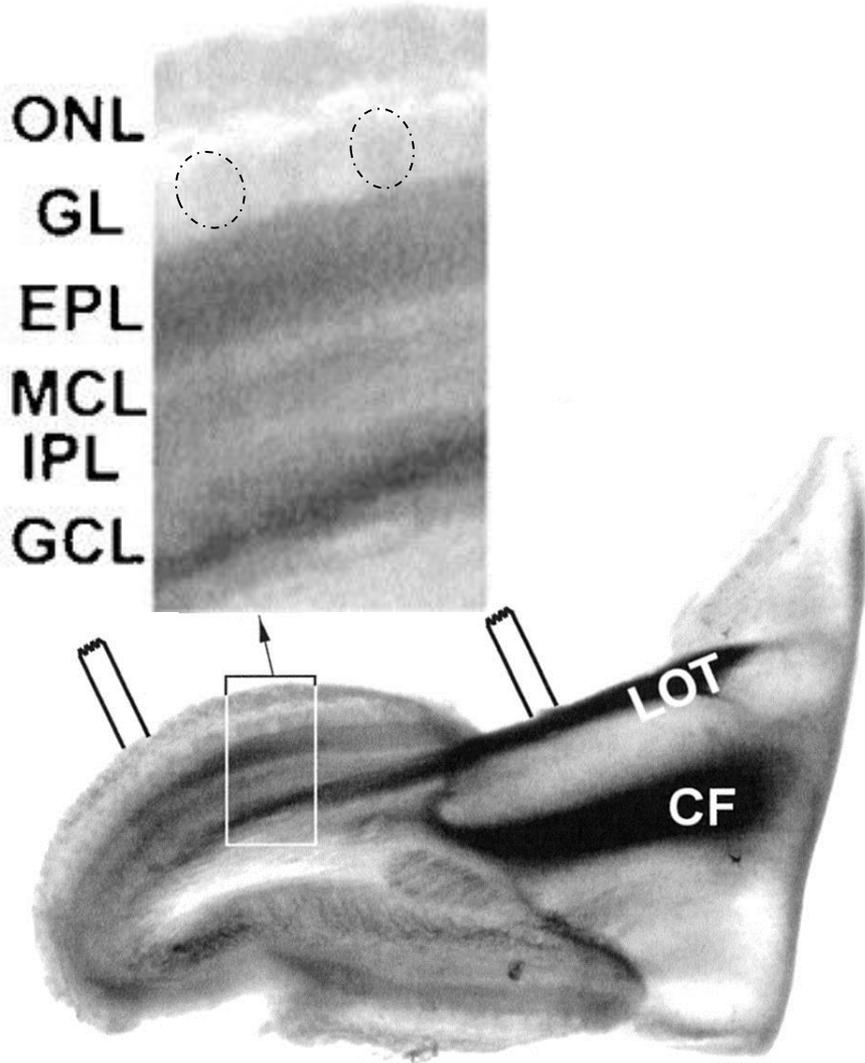
## ElectroOlfactoGramme (EOG) MO



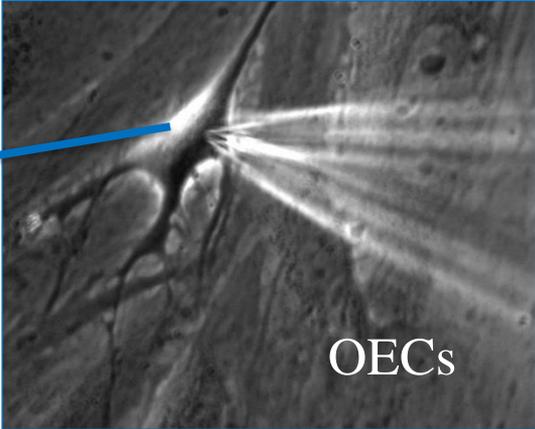
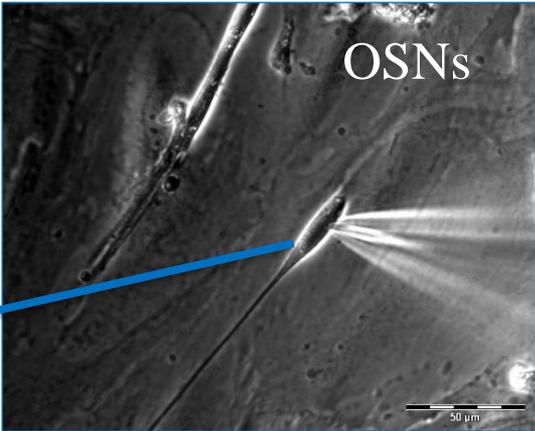
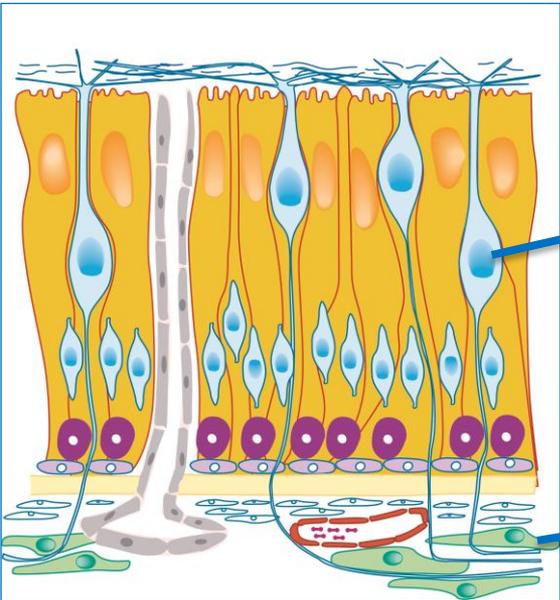
Lacroix et al, 2008

Duchamp-Viret et al, 1999

# Electrophysiology du bulbe olfactif en tranches



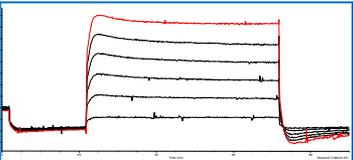
# Patch-clamp sur cellules de la MO en culture primaire



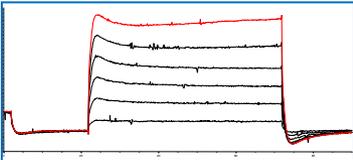
❖ Patch Clamp :

Configuration cellule entière, voltage imposé

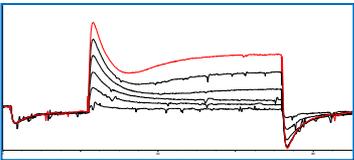
→ Mesure de la résistance membranaire et des conductances, étude des modulation cellulaires (exemple de l'endothéline)



*Contrôle*



*Endothéline*



*Post-Endothéline*

# Quelques méthodes d'imagerie

Influx nerveux (PA)  
dans le neurone "émetteur" présynaptique

Dépolarisation de la membrane  
pré-synaptique



Augmentation de la concentration  
de calcium intracellulaire

Libération par exocytose du  
neurotransmetteur dans la fente synaptique



La fixation du neurotransmetteur provoque  
l'ouverture de canaux ioniques directement  
(récepteurs ionotropes)  
ou via l'activation de second-messagers  
(récepteurs métabotropes)



Dépolarisation/hyperpolarisation de la  
membrane post-synaptique

Génèse d'un influx nerveux (PA)



Afflux sanguin  
Consommation d'oxygène  
Consommation énergétique



Variations de la concentration  
de calcium intracellulaire  
présynaptique



Exocytose du  
neurotransmetteur



Flux ioniques transmembranaires

Variations de la concentration  
de calcium intracellulaire  
postsynaptique



Variations  
du potentiel membranaire

# Quelques méthodes d'imagerie

Imagerie par  
Résonance Magnétique fonctionnelle (fMRI)  
Tomographie par Émission de Positons (PET)



Afflux sanguin  
Consommation d'oxygène  
Consommation énergétique

Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

Imagerie calcique



Variations de la concentration  
de calcium intracellulaire  
présynaptique

Imagerie de l'exocytose



Exocytose du  
neurotransmetteur

Imagerie ionique  
(calcium, chlore, potassium, pH)



Flux ioniques transmembranaires

Variations de la concentration  
de calcium intracellulaire  
postsynaptique

Imagerie du potentiel membranaire  
Imagerie des récepteurs membranaires



Variations  
du potentiel membranaire

# Quelques méthodes d'imagerie

Imagerie par  
Résonance Magnétique fonctionnelle (fMRI)  
Tomographie par Émission de Positons (PET)

Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

Imagerie calcique

Imagerie de l'exocytose

Imagerie ionique  
(calcium, chlore, potassium, pH)

Imagerie du potentiel membranaire  
Imagerie des récepteurs membranaires

**MACROSCOPIQUE**

Non invasif  
Organisme / organe entier



**Microscopique**  
Multicellulaire



**Microscopique**  
Cellulaire / Moléculaire

Imagerie par  
Résonance Magnétique fonctionnelle (fMRI)  
Tomographie par Émission de Positons (PET)

Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

**MACROSCOPIQUE**  
Non invasif  
Organisme / organe entier



Imagerie calcique

Imagerie de l'exocytose

Imagerie ionique  
(calcium, chlore, potassium, pH)

Imagerie du potentiel membranaire  
Imagerie des récepteurs membranaires

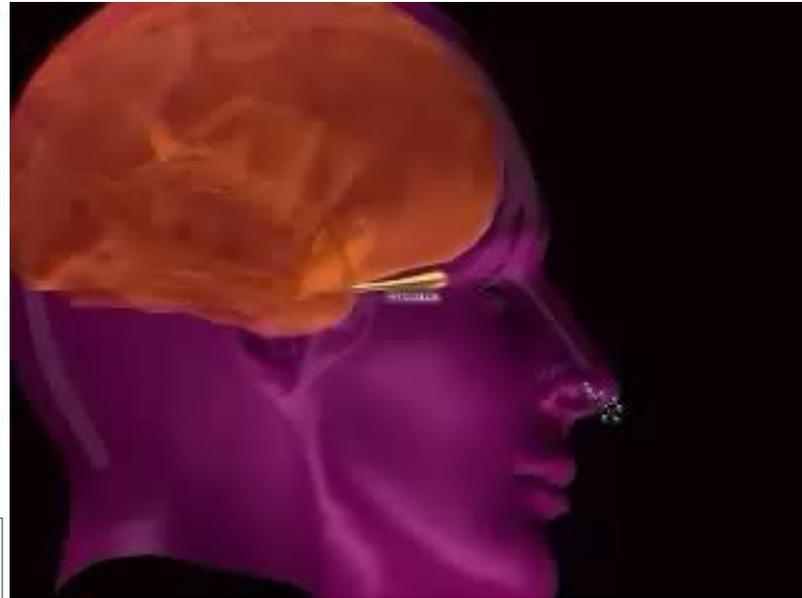
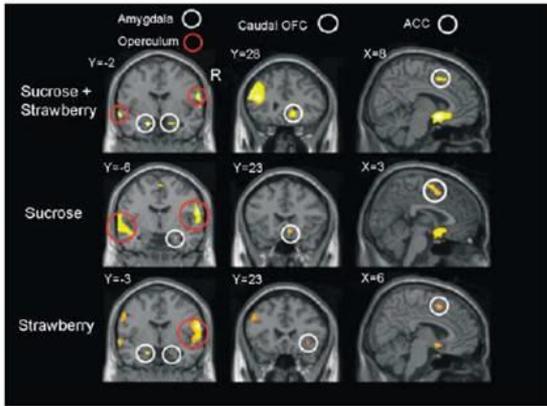
Microscopique  
Multicellulaire



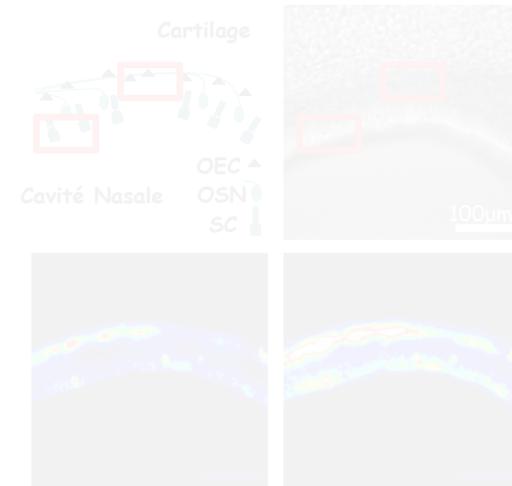
Microscopique  
Cellulaire / Moléculaire

# Imagerie macroscopique du système olfactif

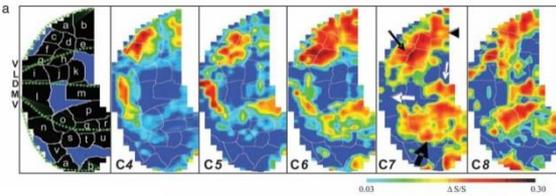
## IRMf cortex



## Tranches de MO



## IRMf BO



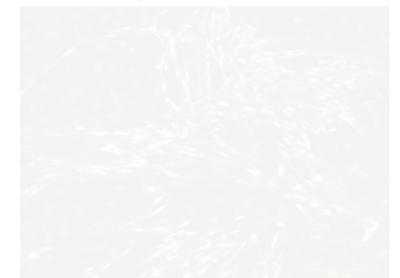
## Neurones dissociés de MO



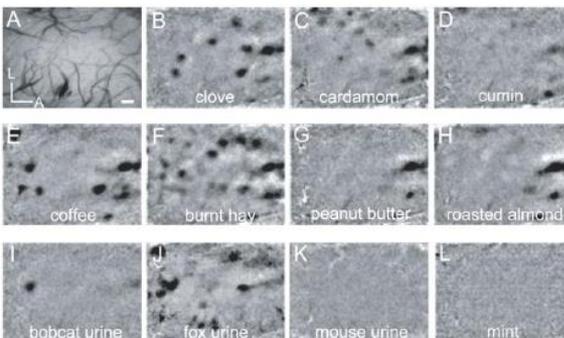
## Tranches de BO



## Cultures primaires de MO



## IOSI du BO



# Neuroimagerie fonctionnelle

## Objectifs de la neuroimagerie fonctionnelle

L'imagerie fonctionnelle cérébrale cherche à caractériser le cerveau en action en 4 dimensions (x, y, z, temps).

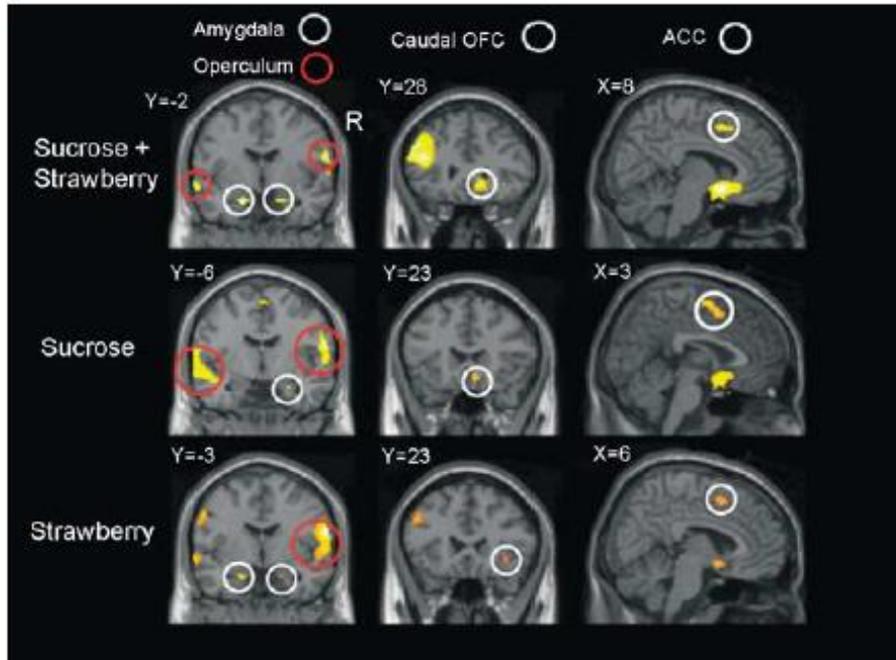
L'usage traditionnel de ces méthodes consiste à faire effectuer une tâche à un individu et à mesurer le signal produit par l'activité cérébrale.

## Principaux outils de la neuroimagerie fonctionnelle

1. L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf / fMRI) : mesure le taux d'oxygénation du sang dans le cerveau (rapport Hb/HbO<sub>2</sub>)
2. Tomographie par Emission de Positons (TEP / PET) : mesure le débit sanguin cérébral ou la localisation de certains neurorécepteurs grâce à l'injection d'un marqueur radioactif.
3. Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI; expérimentation animale) : mesure les changements des propriétés optiques des glomérules du BO activés (volume sanguin / oxygénation).

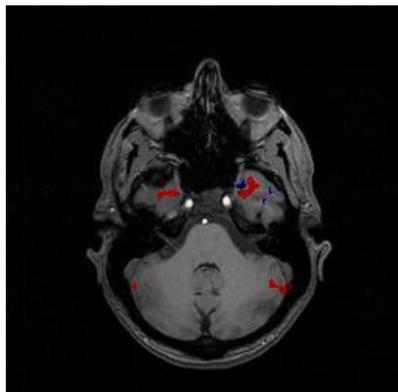
# Imagerie fonctionnelle humaine → cartographie

## IRMf cortex humain

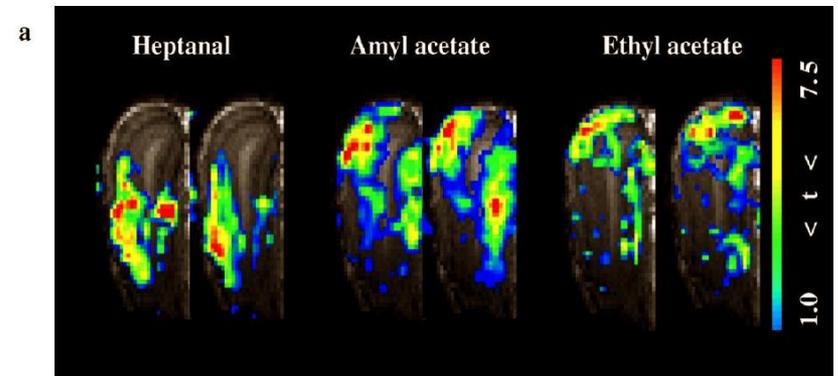


De Araujo et al., *Eur. J. of Neurosci.*, 18:2059-2068 (2003)

## IRMf / scan 3D

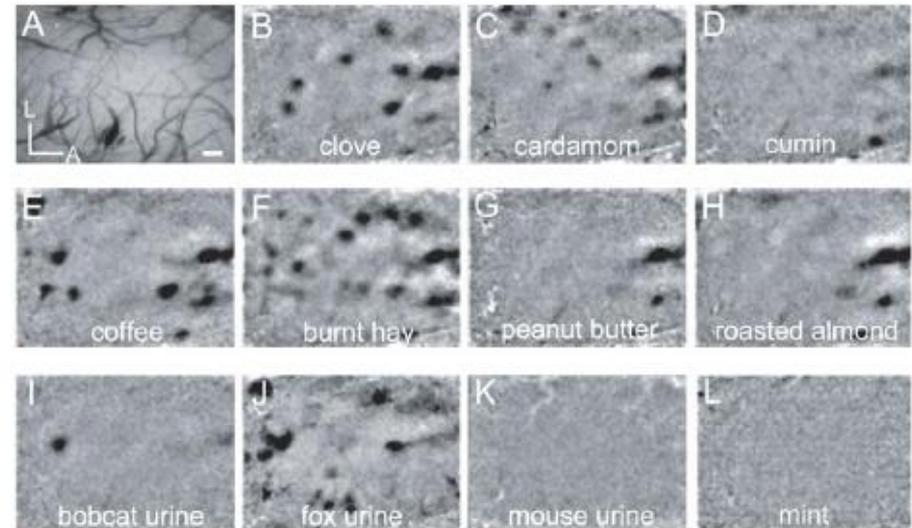


## IRMf BO de rats



Schafer et al., *NeuroImage*, 31:1238 - 1246 (2006)

## IOSI BO de rats



Lin et al., *Neuron*, 50:937-949 (2006)

Imagerie par  
Résonance Magnétique fonctionnelle (fMRI)  
Tomographie par Émission de Positons (PET)

Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

**MACROSCOPIQUE**  
Non invasif  
Organisme / organe entier



**Imagerie calcique**

Imagerie de l'exocytose

Imagerie ionique  
(calcium, chlore, potassium, pH)

Imagerie du potentiel membranaire  
Imagerie des récepteurs membranaires

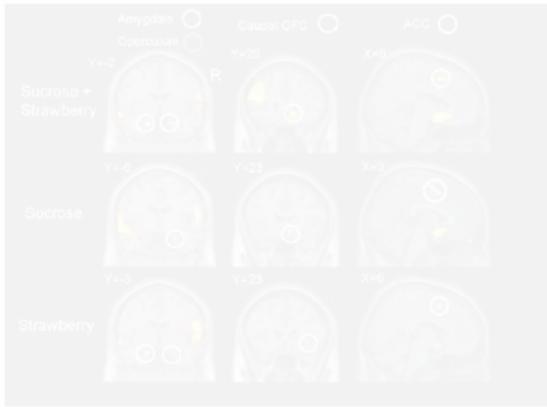
**Microscopique**  
Multicellulaire



**Microscopique**  
Cellulaire / Moléculaire

# Imagerie microscopique ( $Ca^{2+}$ ) du système olfactif

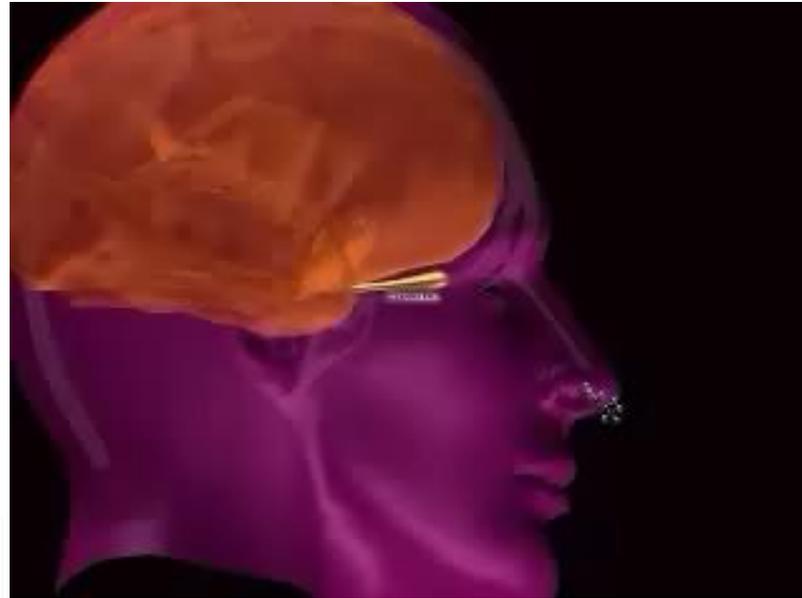
## IRMf cortex



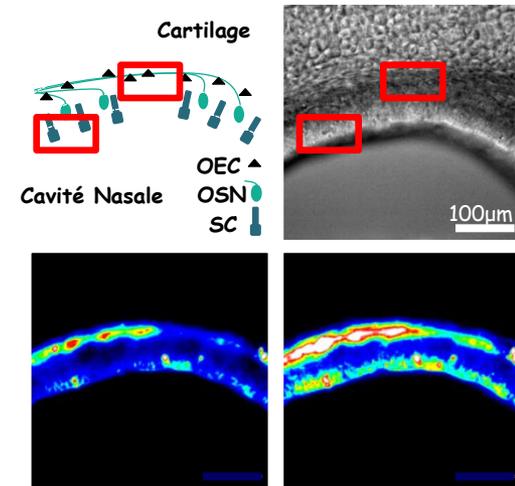
## IRMf BO



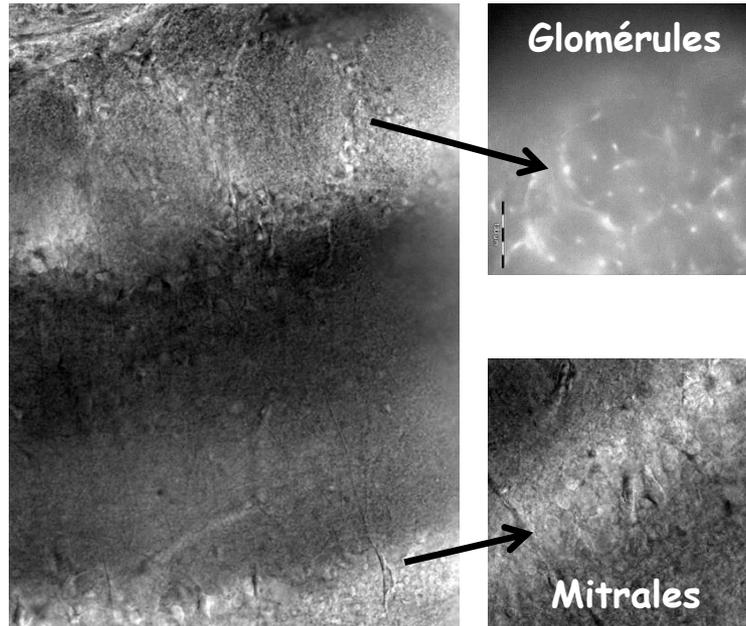
## IOSI du BO



## Tranches de MO



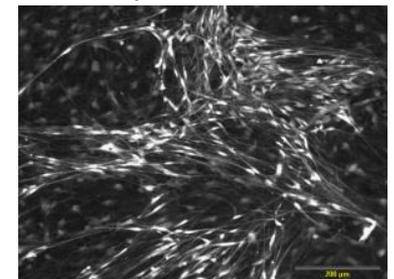
## Tranches de BO



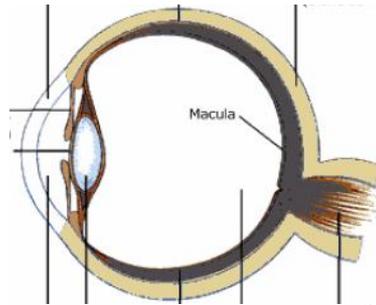
## Neurones dissociés de MO



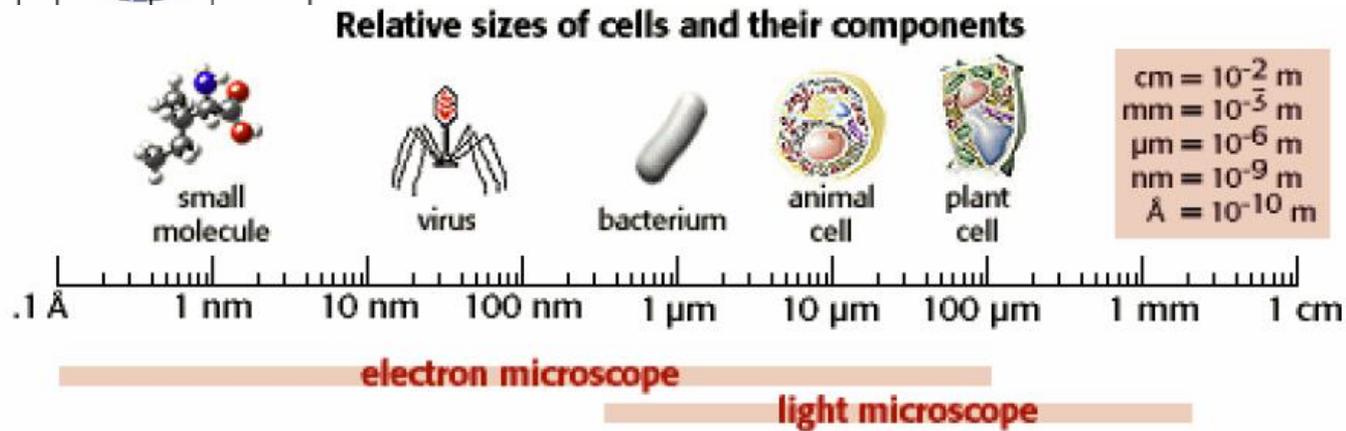
## Cultures primaires de MO



# Besoin de la microscopie : pourquoi ?



L'œil : limite de résolution ~ 0,1mm

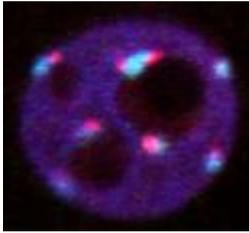


## Principe de la microscopie :

- Former une image grâce à une source lumineuse (illumination);
- Agrandir cette image grâce à un système optique (lentilles) pour rendre les détails visibles à l'œil ou avec une caméra (grossissement);
- Séparer le plus possible les détails de celui-ci sur l'image (résolution)

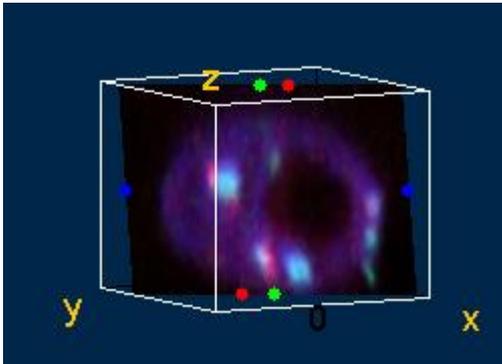
# Utilisations de la microscopie

2D



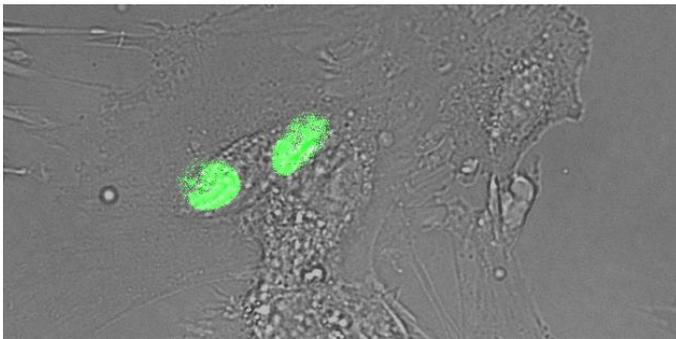
Observer une scène fixe  $(x,y)$

3D



Observer un volume  $(x,y,z)$

Etudes structurales

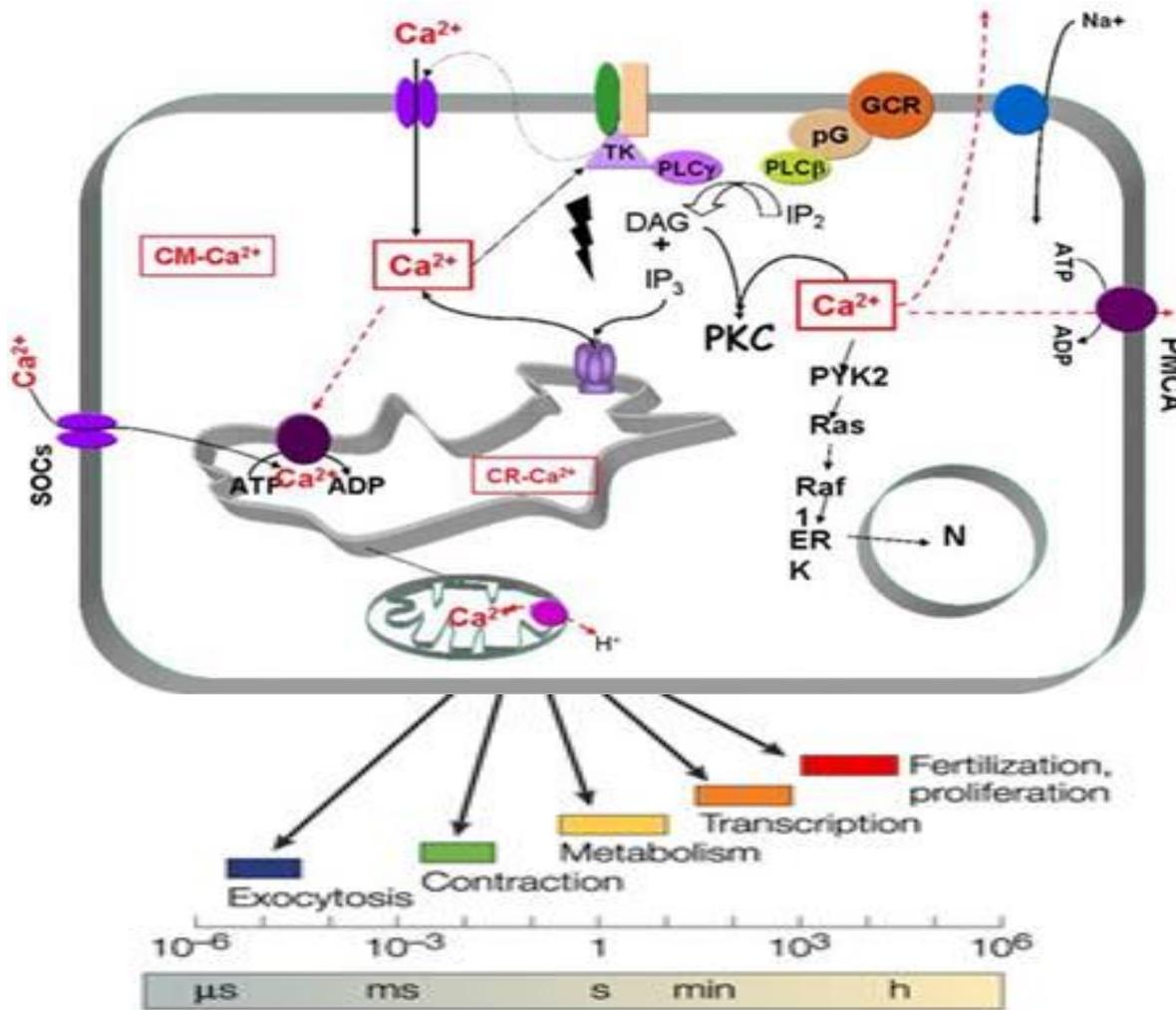


Observer une scène dans le temps  $(x,y,z,t)$

Etudes dynamiques ...

... des concentrations  
de calcium intracellulaire, par exemple

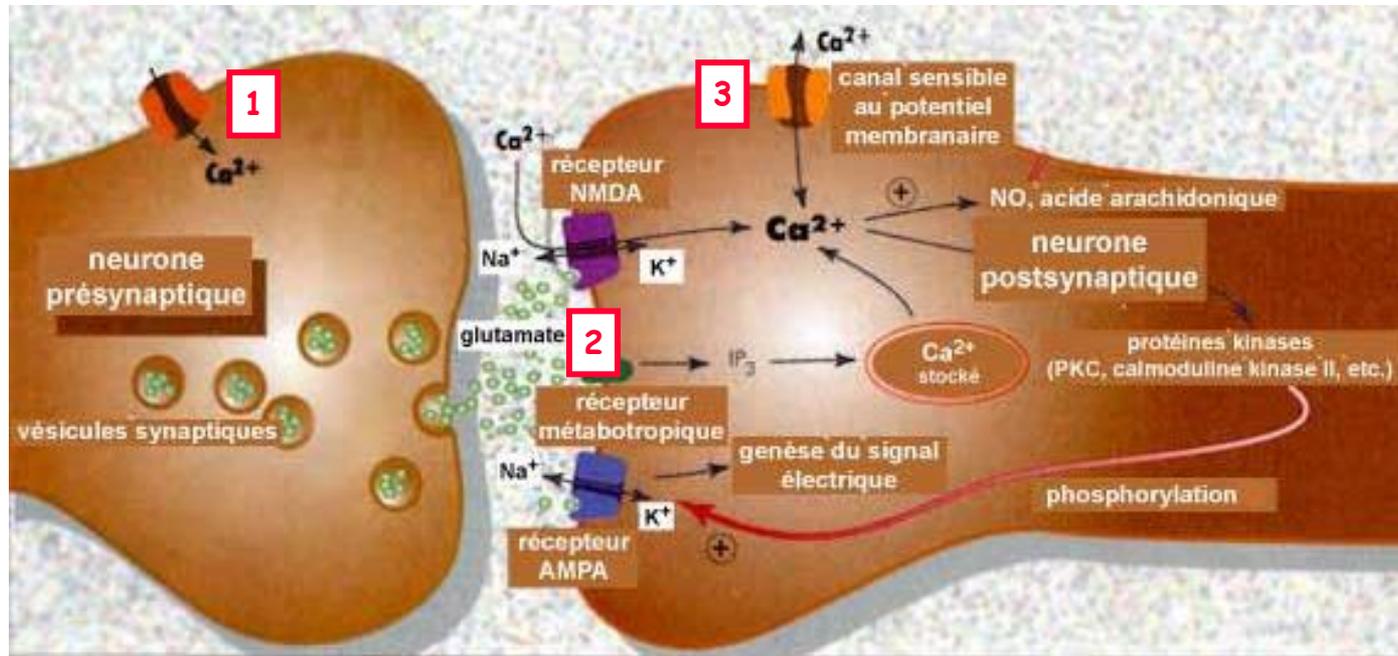
# Pourquoi s'intéresser au calcium intracellulaire



Le calcium est un second-messager universel impliqué dans les régulations spécifiques d'un très grand nombre de processus cellulaires :

- physiologiques ( $10^{-7}$  /  $10^{-8}$ M)
- pathologiques ( $10^{-4}$  /  $10^{-3}$ M)

# Le calcium et la transmission synaptique



1. Augmentation du calcium présynaptique indispensable à l'exocytose du glutamate
2. Entrée de calcium dans le neurone postsynaptique par l'intermédiaire des récepteurs glutamatergiques activés (et stocks  $Ca^{2+}$  intracellulaires)
3. Entrée de calcium dans le neurone postsynaptique par les canaux calciques voltage-dépendants



Augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les neurones, mais également dans les cellules non-neuronales (MO) et les astrocytes (BO, cortex, ...)

# Principales techniques de mesure du calcium intracellulaire

Le  $\text{Ca}^{2+}$  ne peut pas directement être visualisé dans les cellules vivantes. Pour mesurer les variations des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, il faut donc avoir recours à des molécules spécifiques dont les propriétés optiques changent en fonction de leur interaction avec le  $\text{Ca}^{2+}$ , et à des techniques de détection adaptées :

1) la Bioluminescence;

2) la **Fluorescence** : - Cytométrie de flux  
- Spectrofluorimétrie  
- **Microscopie à fluorescence**

- **Préparation expérimentale :**

- en fonction du niveau de résolution souhaité

- ✓ **In situ / In vivo**

- ✓ **Organe entier**

- ✓ **Tranches / Explants**

- ✓ **Cultures primaires**

- ✓ **Cellules isolées (dissociées aiguës, lignées cellulaires)**

- **Fluorophores :**

- molécules spécifiques dont les propriétés optiques changent en fonction de leur interaction avec le  $Ca^{2+}$ ; choisis en fonction de la préparation expérimentale (mode d'incorporation dans les cellules), des intensités et des cinétiques des variations étudiées, et du système de mesure.

- **Système de mesure :**

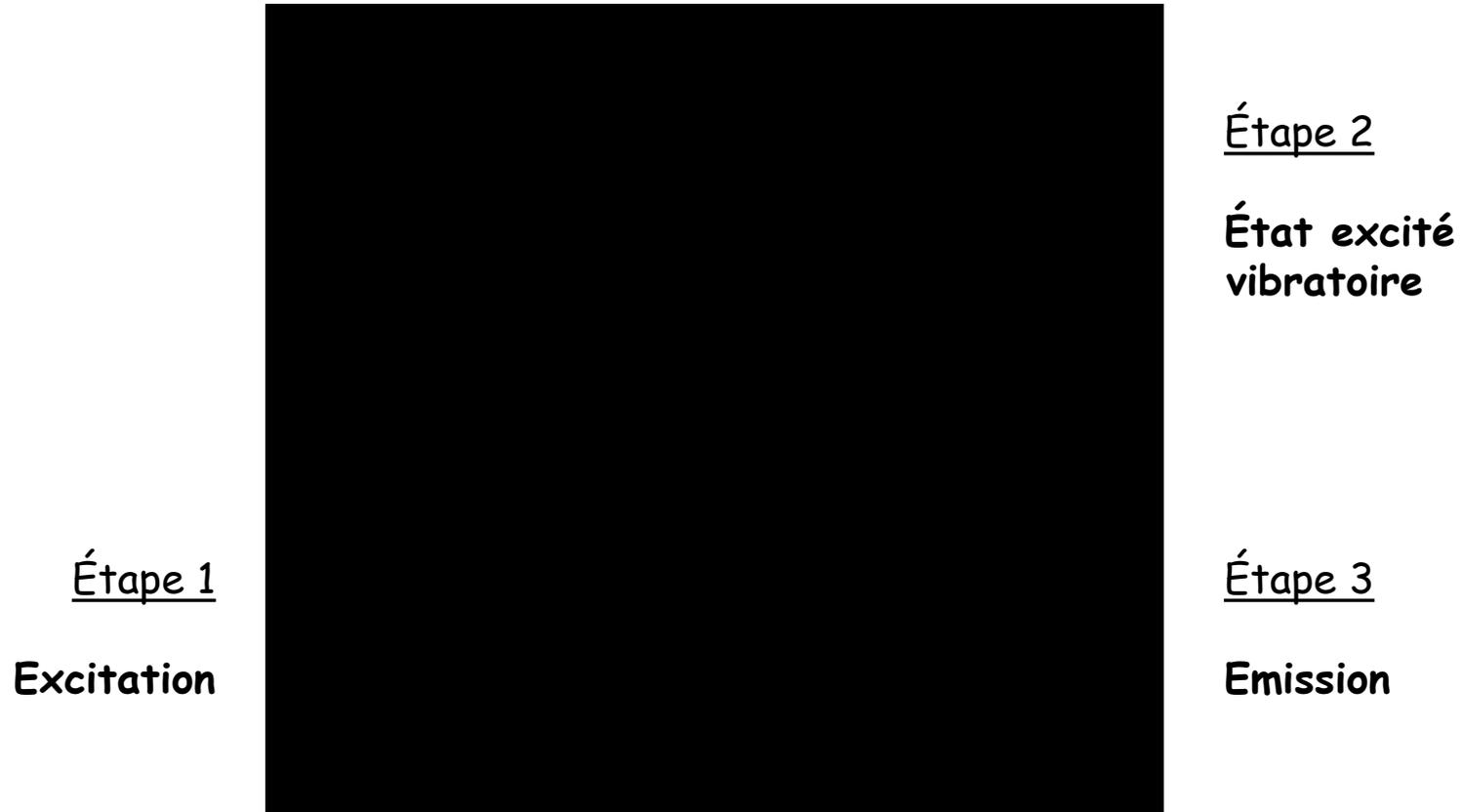
- en fonction de la préparation expérimentale, des intensités et des cinétiques des variations étudiées

- ✓ **Epifluorescence**

- ✓ **Confocal / Multiphoton**

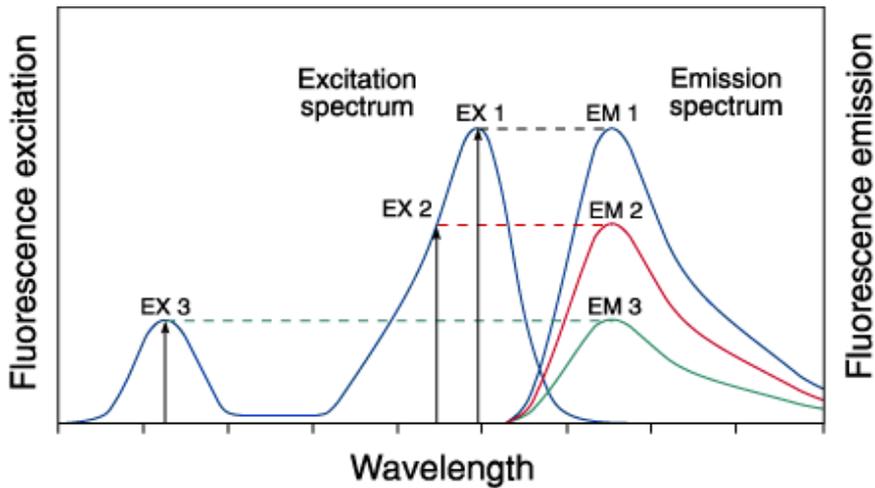
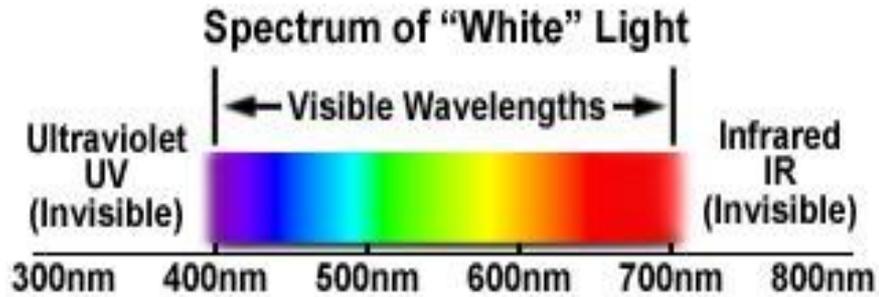
# Imagerie calcique par fluorescence

La fluorescence résulte de **trois étapes** par lesquelles passe un fluorophore (diagramme de Jablonski)



$$\text{Rendement quantique de fluorescence} = \frac{\# \text{ fluorescence émise (Étape 3)}}{\# \text{ fluorescence absorbée (Étape 1)}}$$

# Principes de fluorescence



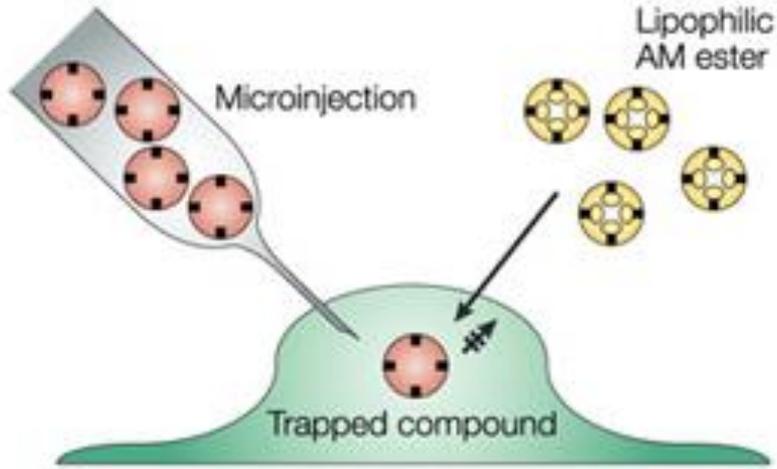
Longueur d'onde d'excitation < longueur d'onde d'émission

# Quel fluorophore pour mesurer le calcium intracellulaire ?

- *Gamme des concentrations de  $Ca^{2+}$  étudiées*  
(constante de dissociation  $K_d$ ; réponses détectables de  $0.1K_d$  à  $10K_d$ )
- **Méthode d'incorporation du fluorophore dans les cellules**
- **Méthode de mesure**
- Intensité de fluorescence émise par le fluorophore
- Cinétiques des réponses étudiées
- Méthode de mesure : contrainte de la préparation expérimentale et d'enregistrements simultanés d'autres paramètres physiologiques

## Injection intracellulaire

### a Dye loading



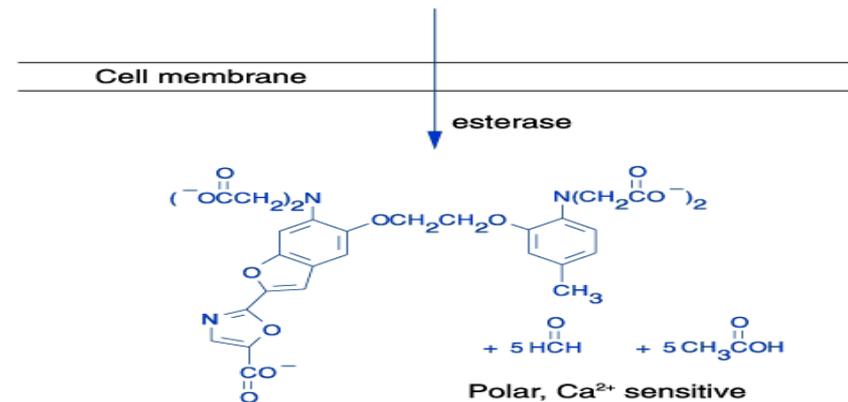
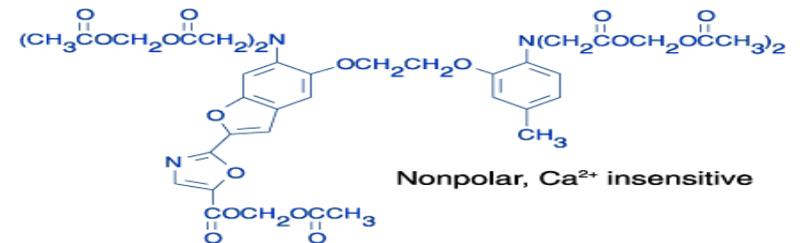
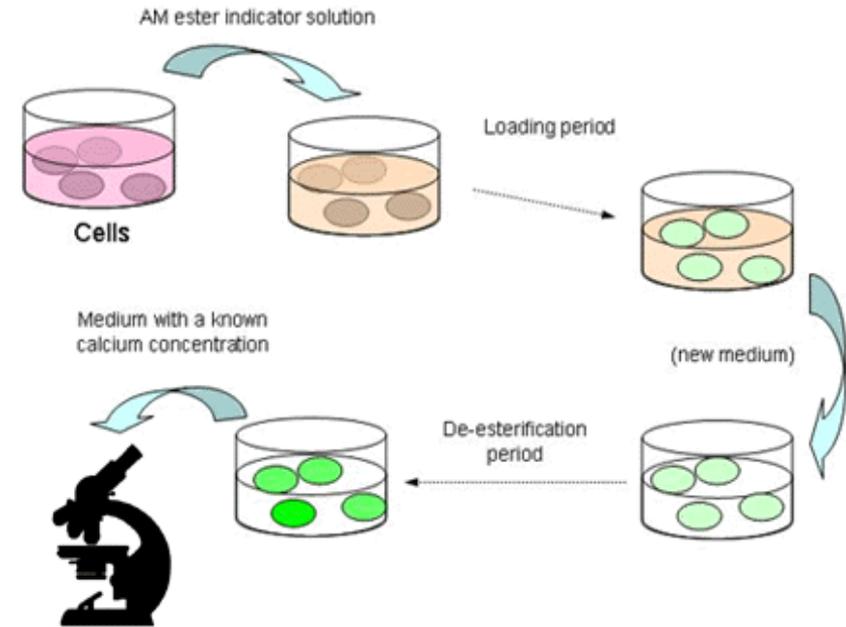
## Injection intracellulaire (patch / $\mu$ -injection):

- Injection active
- 1 ou 2 cellules
- Difficulté expérimentale supplémentaire
- Multiples fluorophores possibles

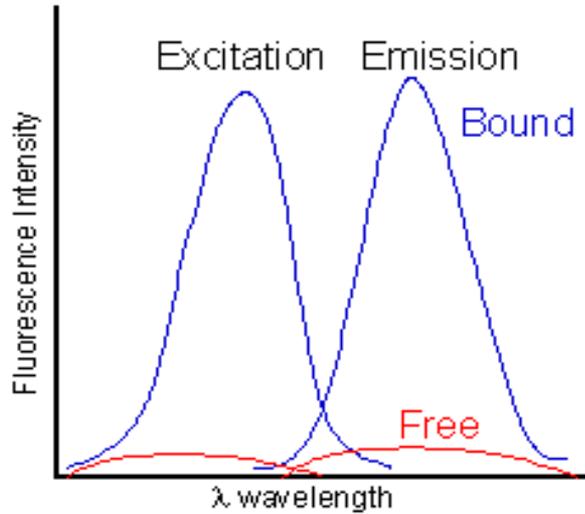
## Chargement AM (AcétoxyMéthyl ester) :

- Chargement passif
- Multiples cellules chargées simultanément
- Facilité expérimentale

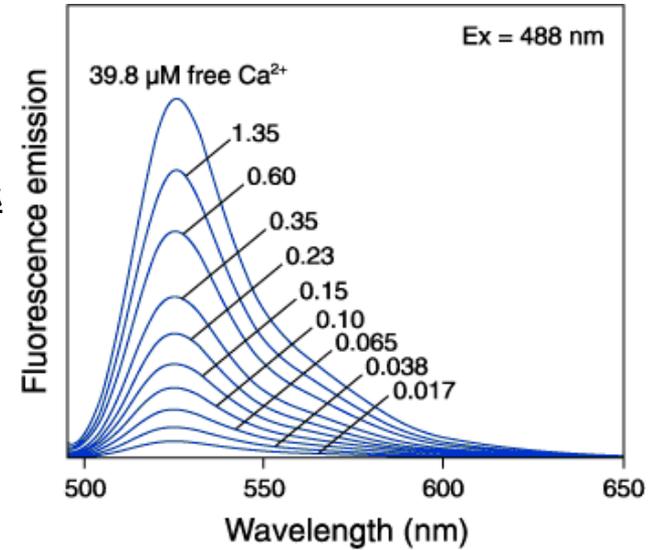
## Chargement d'un AM ester



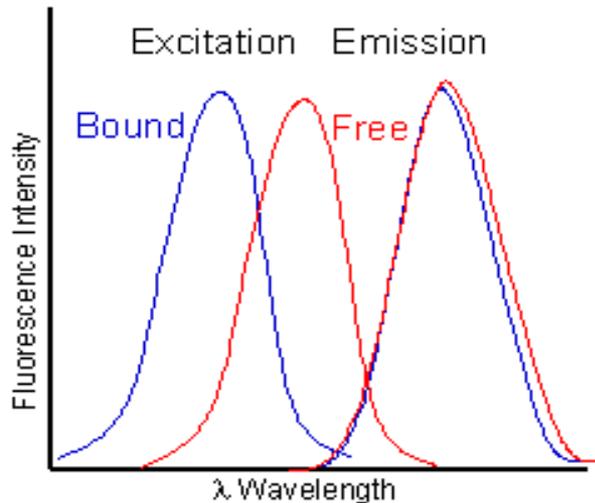
## Augmentation d'intensité en présence de calcium : mesures non-ratiométriques



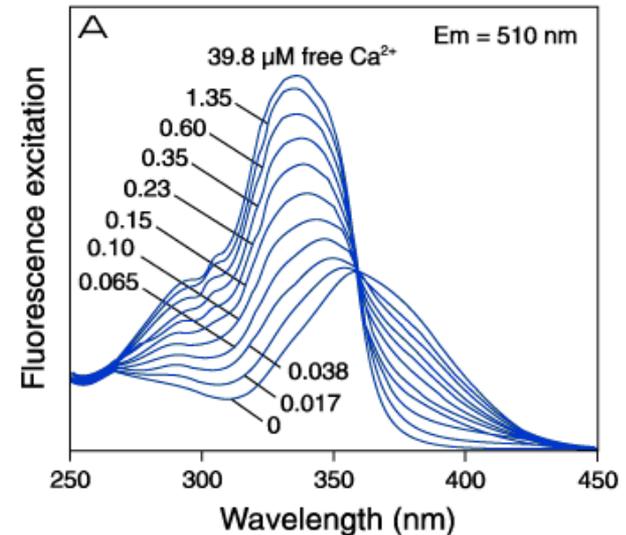
Fluo3 / Fluo4  
Oregon green Bapta



## Glissement du spectre d'excitation en présence de calcium : mesures ratiométriques



FURA-2



**Source  
de lumière**

Lampes  
Laser  
(UV, visibles, IR)

**Agents de  
contraste**

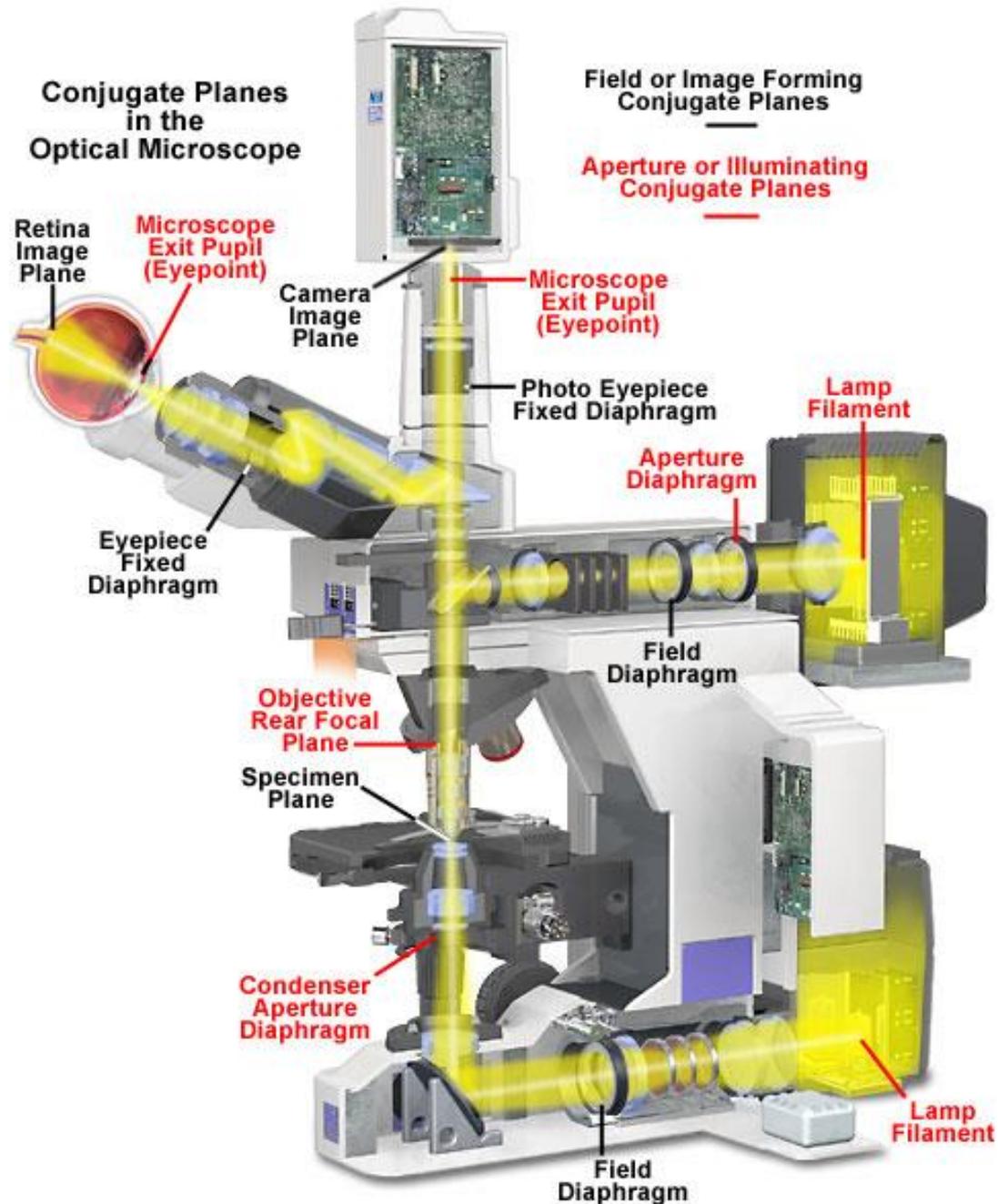
Colorants  
Absorbants  
Diffusants  
Dépolarisants  
Fluororophores

**Optique**

Objectifs  
Lentilles  
Filtres

**Détecteur**

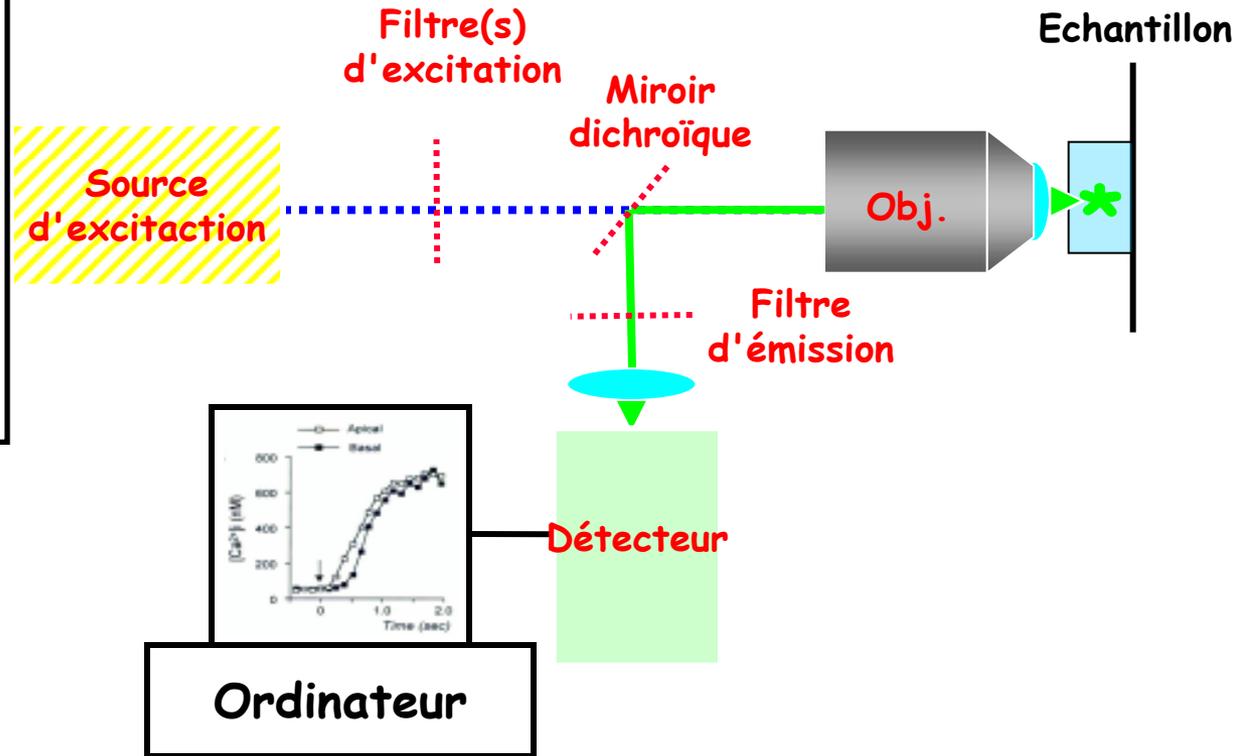
Oeil  
App. photo  
Caméras num.  
Photodiodes  
PMT



# Mesures de fluorescence

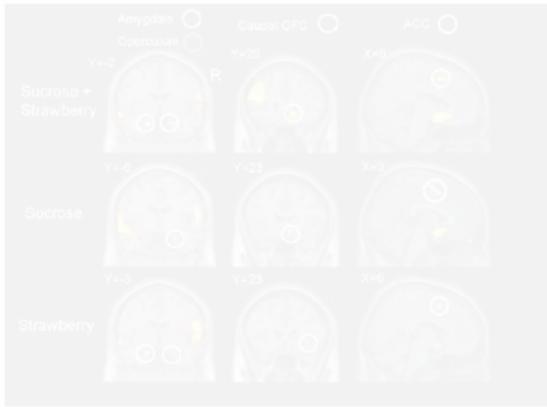
## Système de détection de fluorescence:

- 1) Fluorophore
- 2) Source d'excitation (lampe, laser)
- 3) Filtres de longueurs d'onde / Miroir dichroïque
- 4) Optiques (Objectifs)
- 5) Détecteur (Caméra / PMT)



# Imagerie microscopique ( $Ca^{2+}$ ) du système olfactif

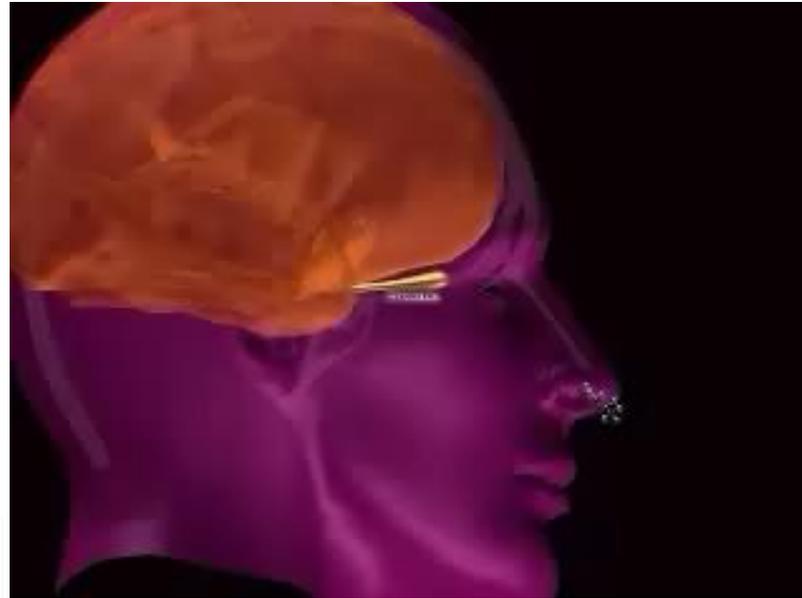
## IRMf cortex



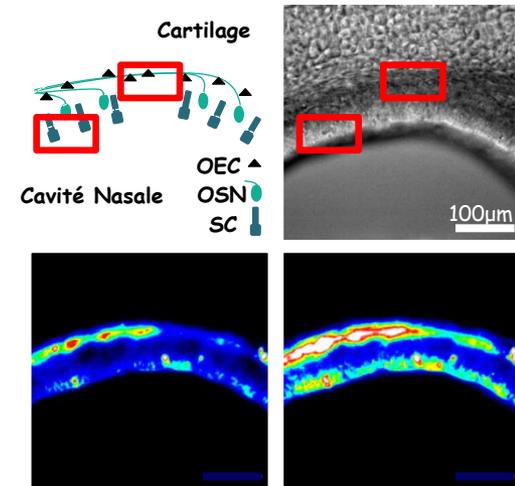
## IRMf BO



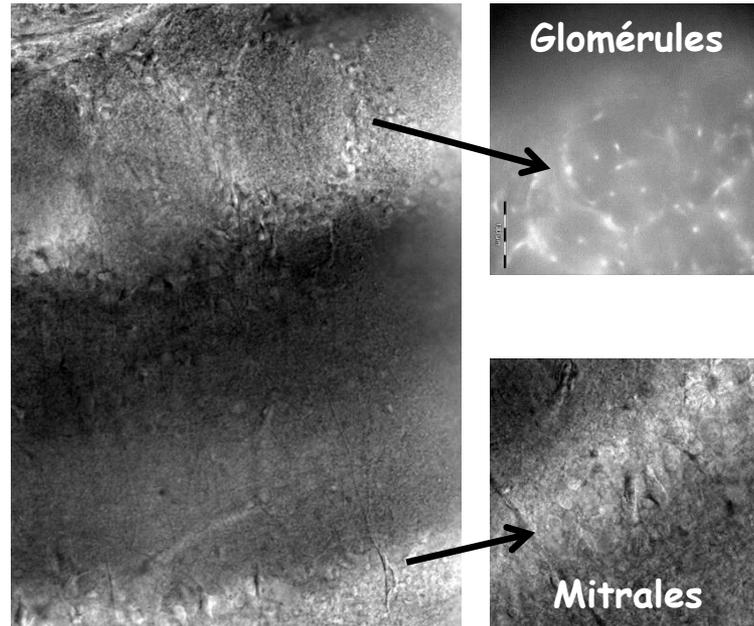
## IOSI du BO



## Tranches de MO



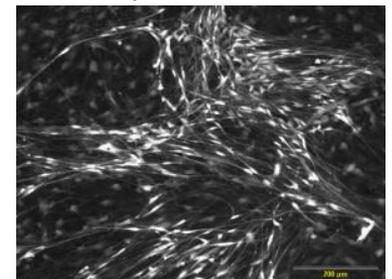
## Tranches de BO

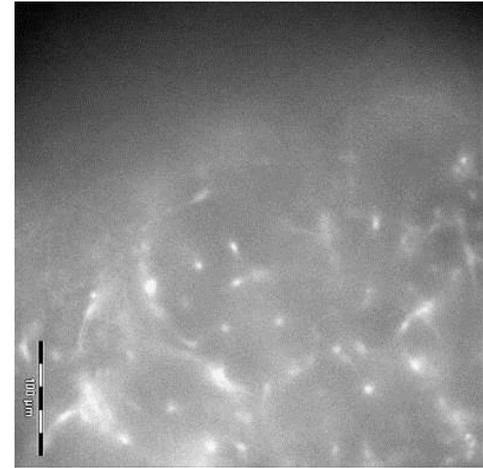
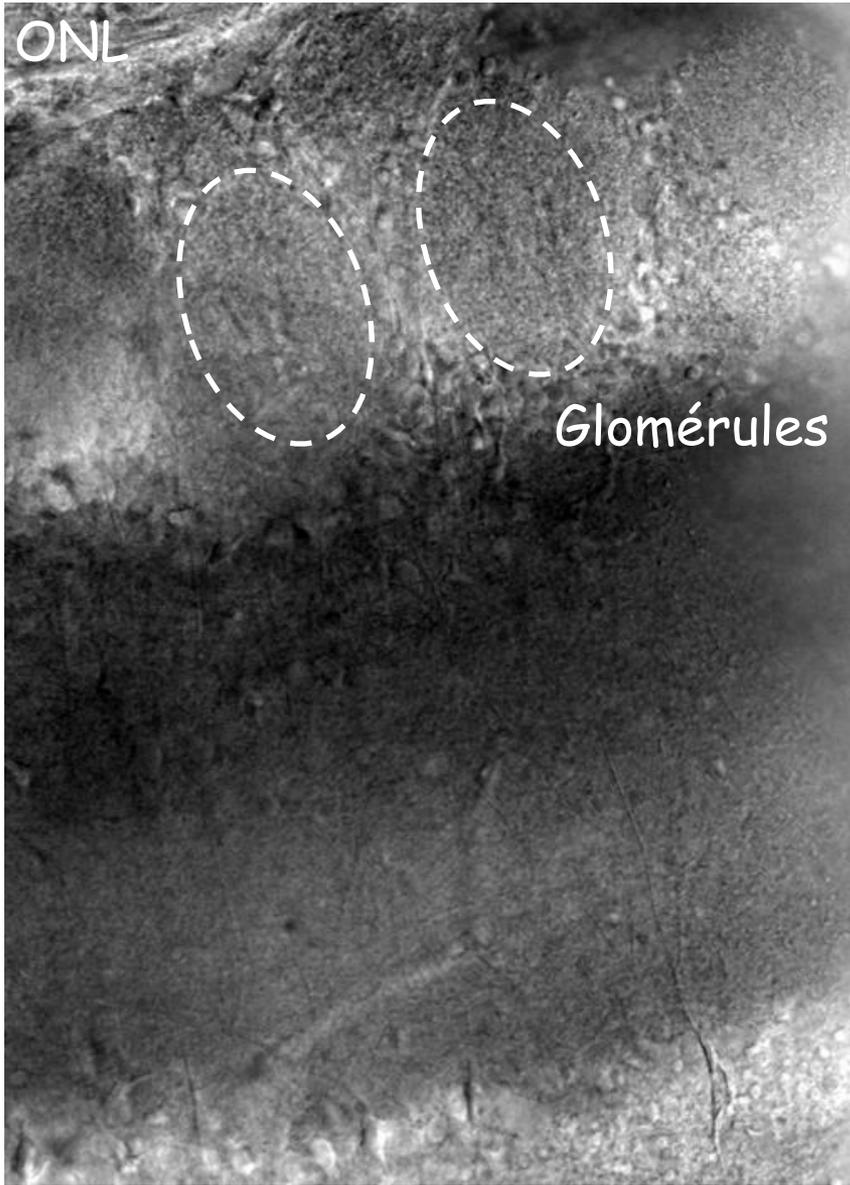


## Neurones dissociés de MO

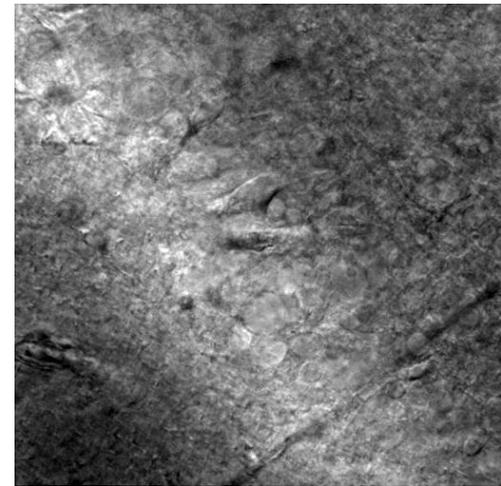


## Cultures primaires de MO





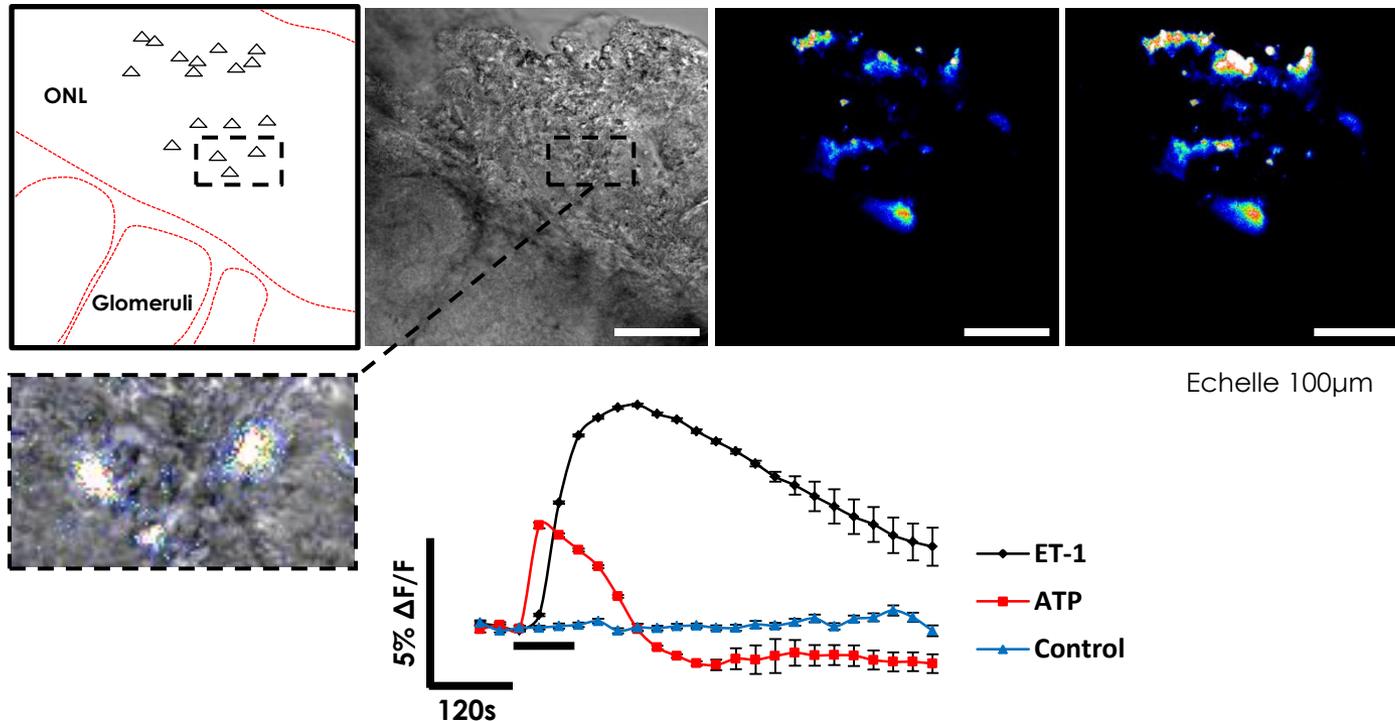
Neurones périglomérulaires  
et astrocytes



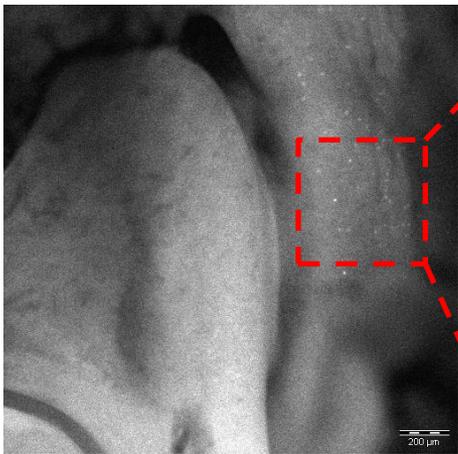
Cellules mitrales

# Etude en imagerie calcique sur tranches de BO

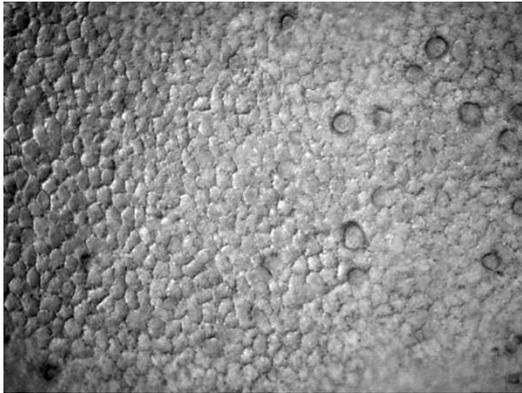
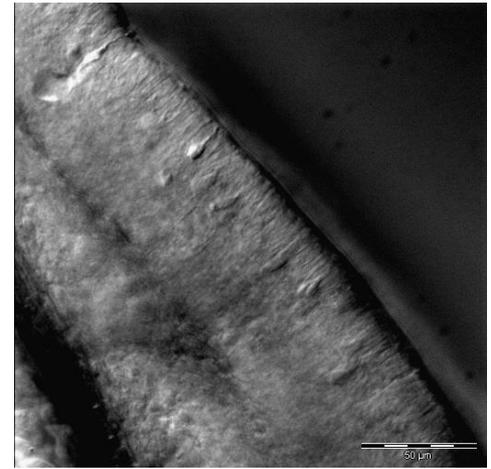
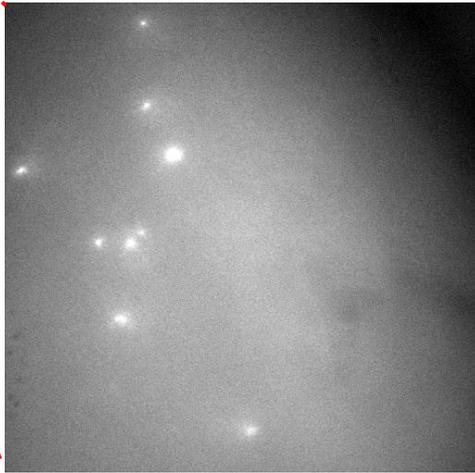
Tranche de BO, Imagerie Calcique : Oregon Green, ET-1 :  $10^{-7}M$ , ATP :  $10^{-4}M$



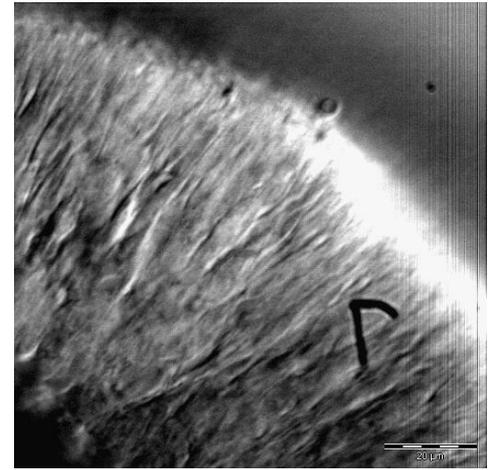
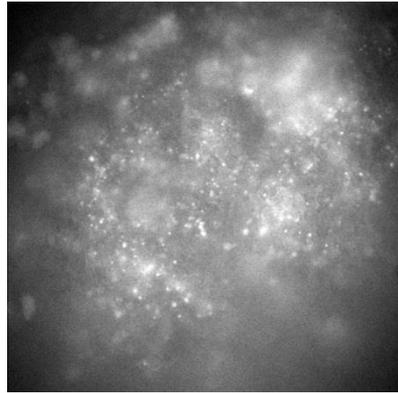
- **Activation calcique au niveau des cellules OECs par l'ET-1**
  - Effets sur le message transmis au BO?
  - Quid des autres cellules gliales du BO?



**Muqueuse olfactive**  
- intacte -



**Muqueuse olfactive**  
- explant -

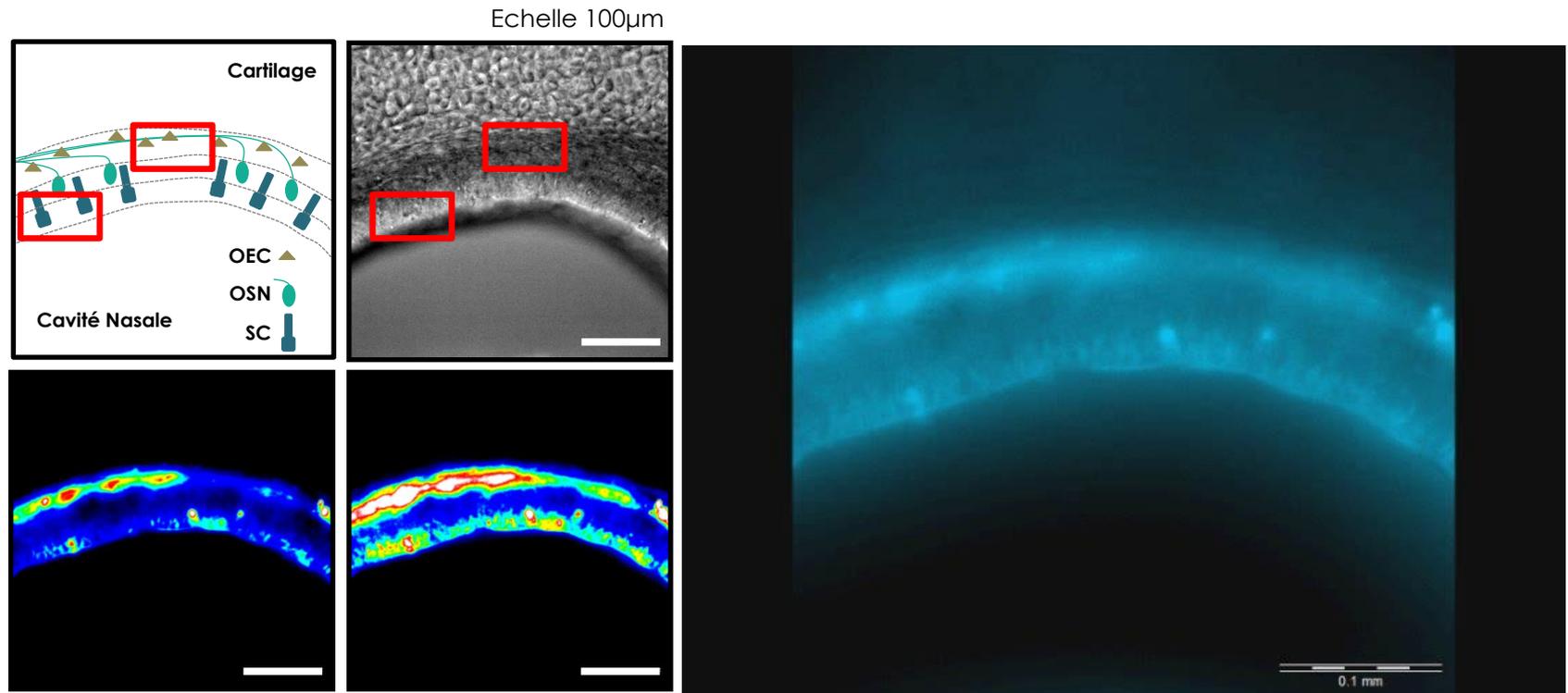


**Muqueuse olfactive**  
- tranche -

# Etude en imagerie calcique sur tranches de MO

Imagerie calcique : Oregon Green, Tranche de MO de ratons (P0-P3): 250  $\mu\text{m}$ ,  
ET-1 :  $10^{-7}\text{M}$  , vitesse film x2

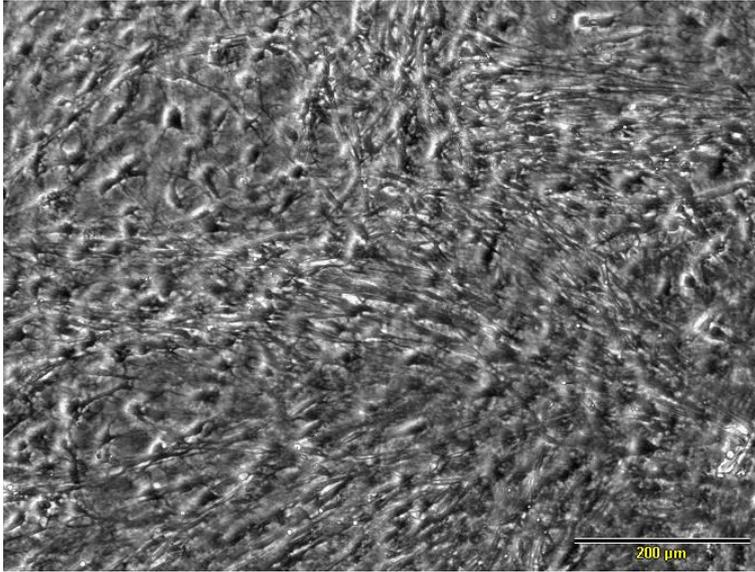
(Le Bourhis et al., 2014)



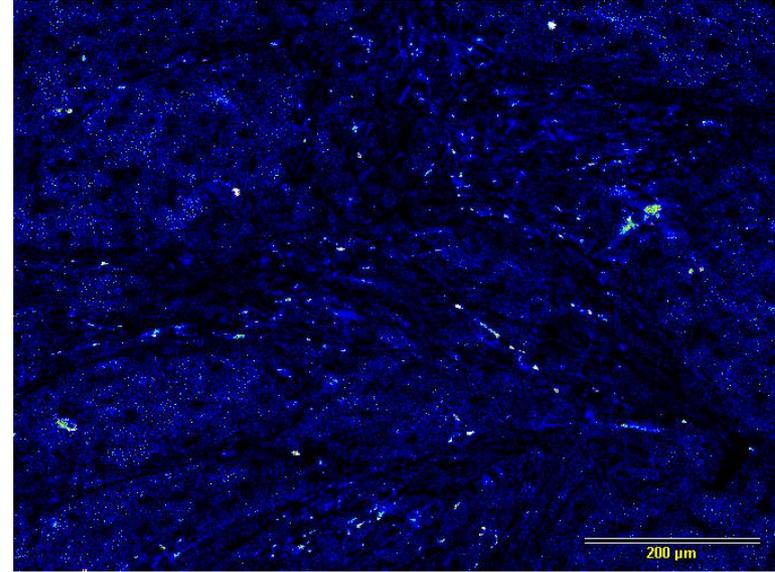
- Une réponse calcique survient dans les cellules gliales de la MO suite à une stimulation à l'ET-1

# Réponse d'une culture primaire de MO à l'endothéline

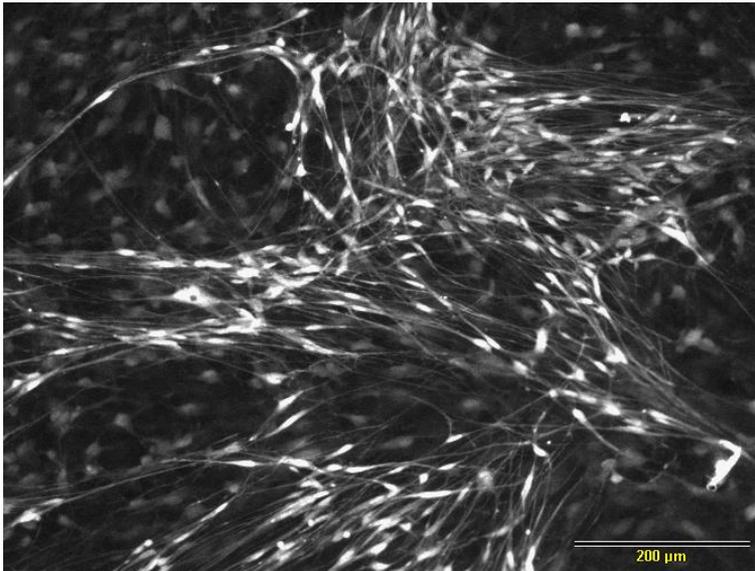
Phase



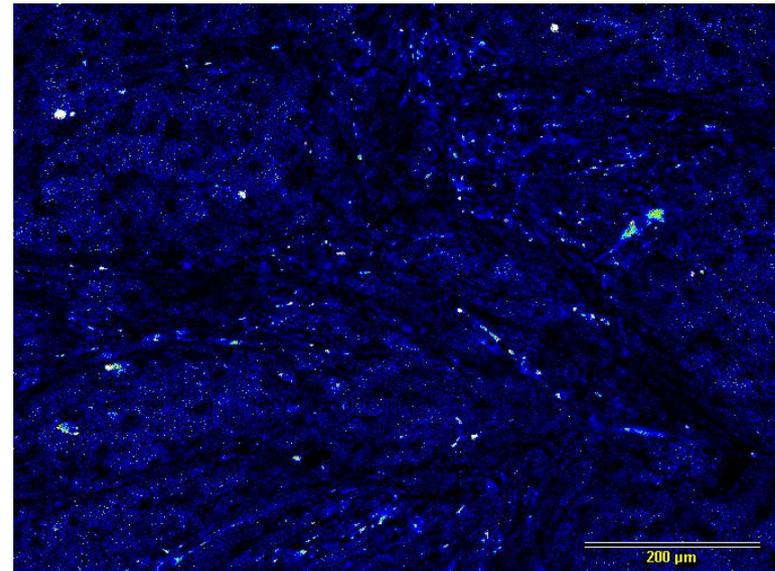
ET-1

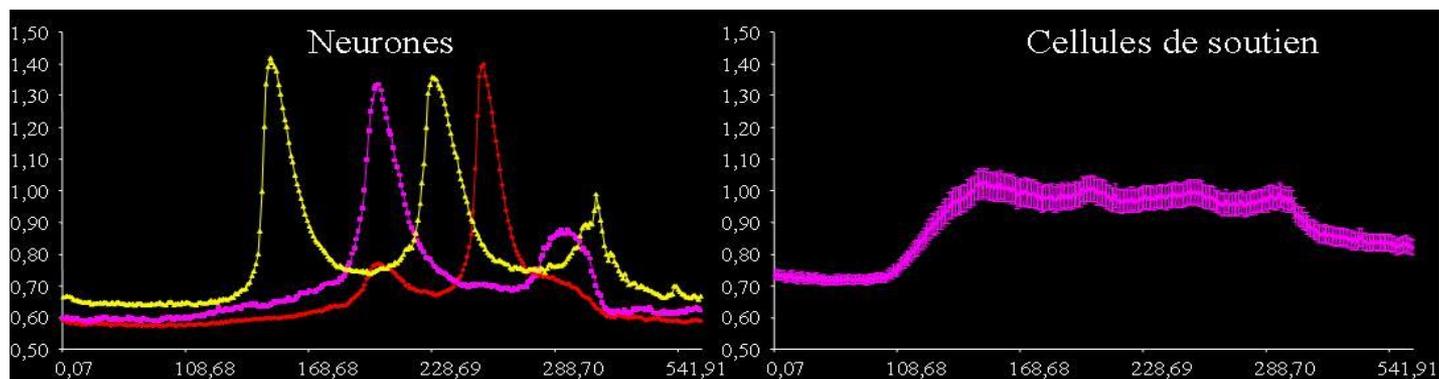
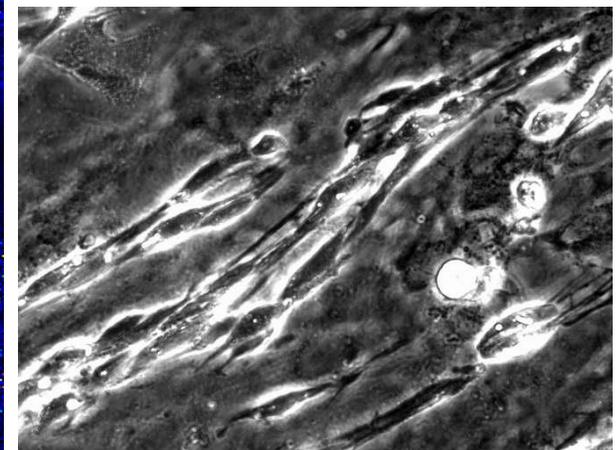
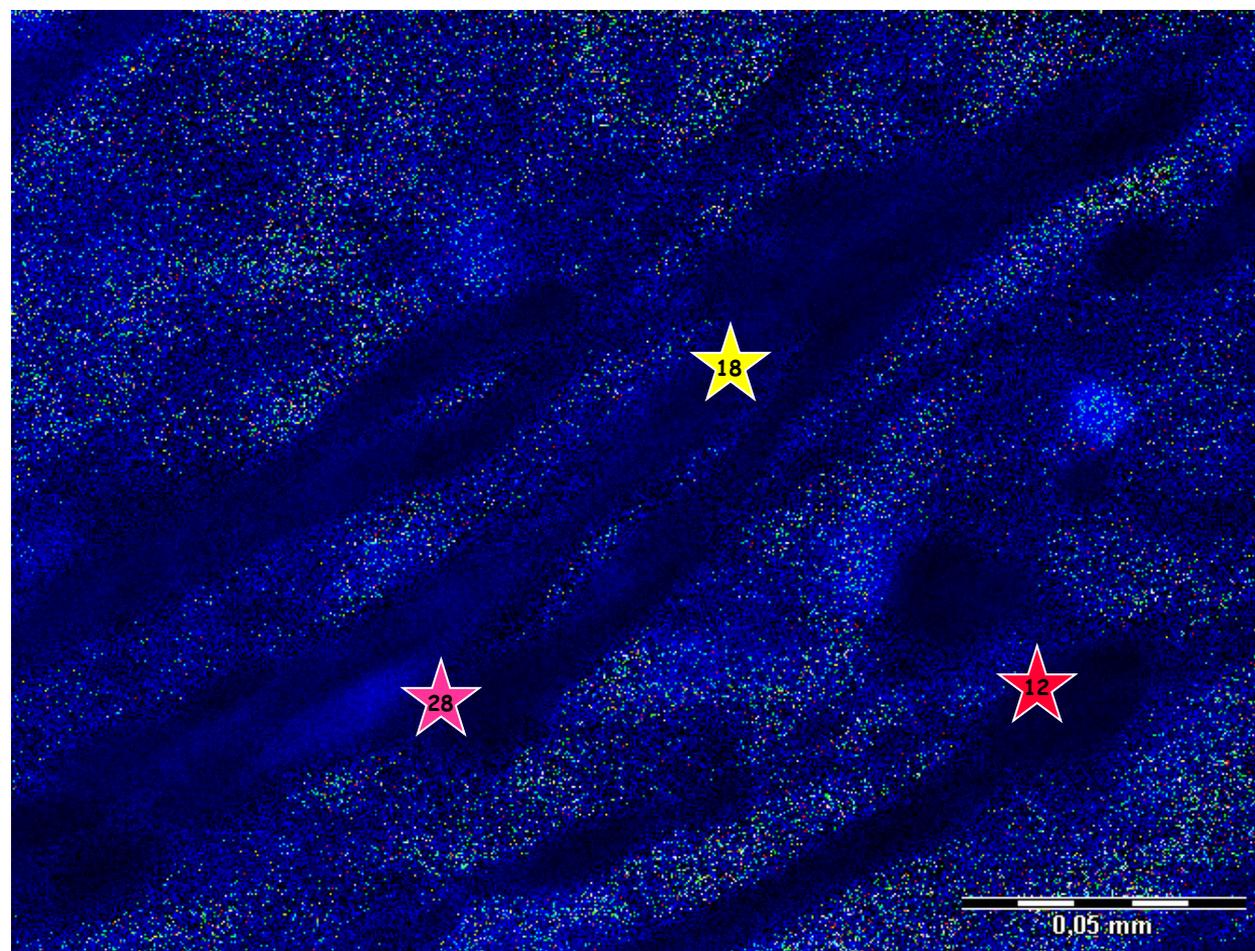


Fura



S6C





## **Question :**

**Que comptez-vous faire avec toutes ces techniques  
et ces préparations expérimentales à votre disposition,  
dans le cadre de votre étude  
des effets du stress sur le système olfactif ?**