

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

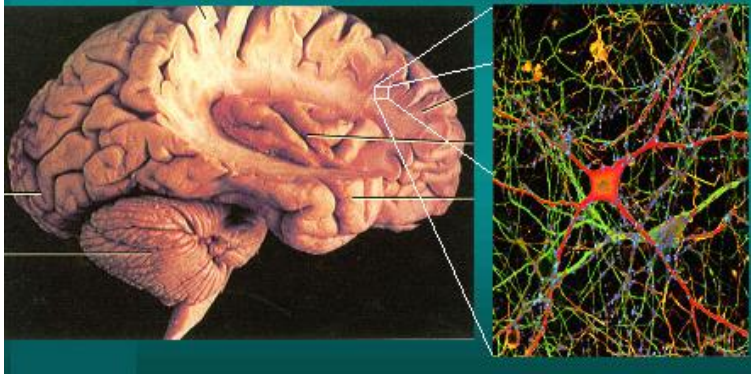
"visualisation" de ces communications neuronales/cellulaires par des **techniques d'imagerie**

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



Dans les deux cas, différents niveaux de résolutions

Le système nerveux central



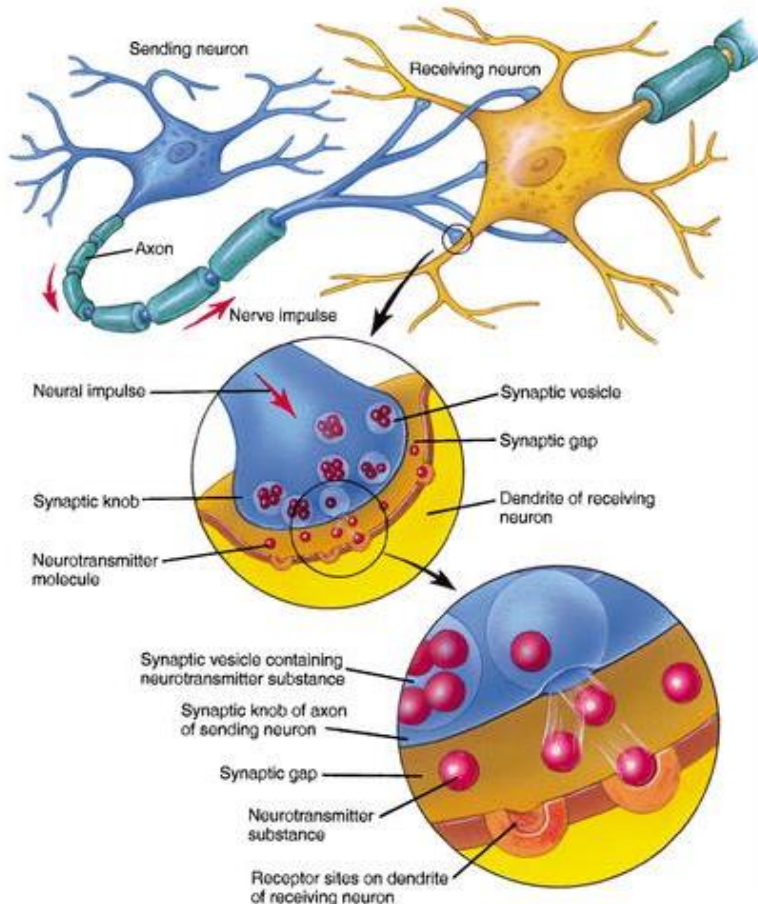
Le cerveau

- \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

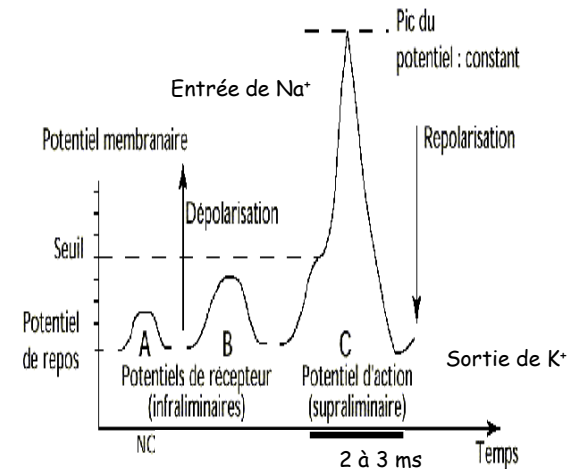
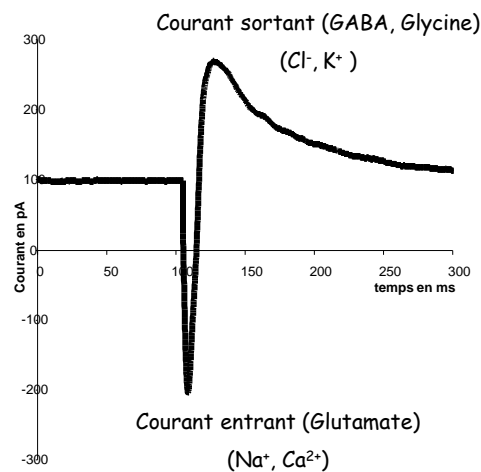
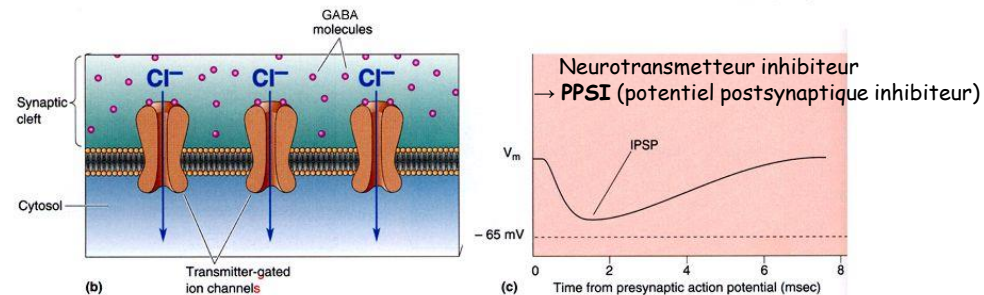
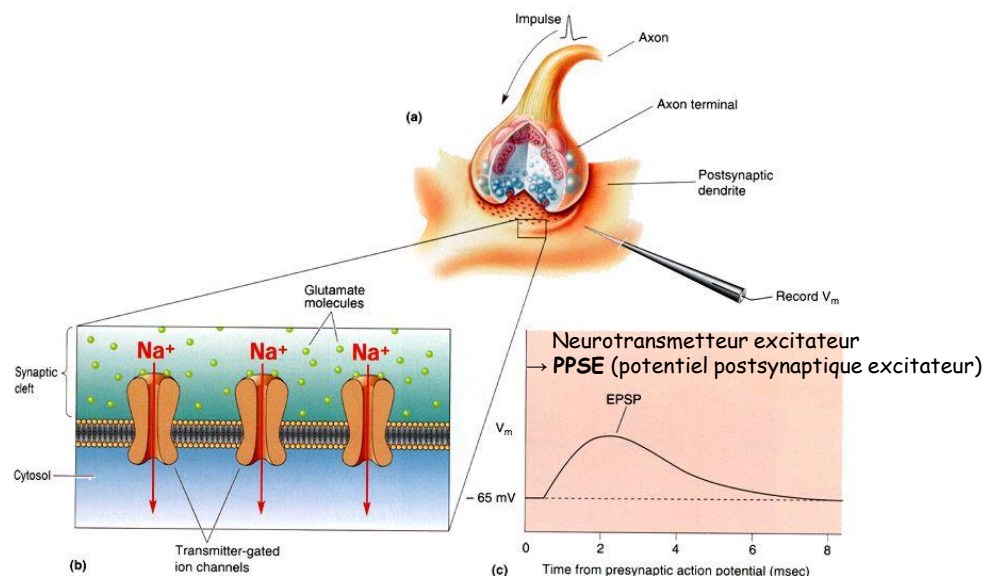


La fixation du neurotransmetteur provoque
l'ouverture de canaux ioniques directement
(récepteurs ionotropes)
ou via l'activation de second-messagers
(récepteurs métabotropes)



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)

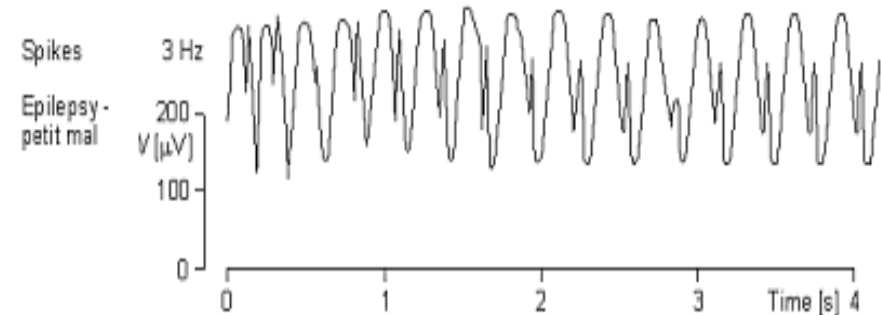
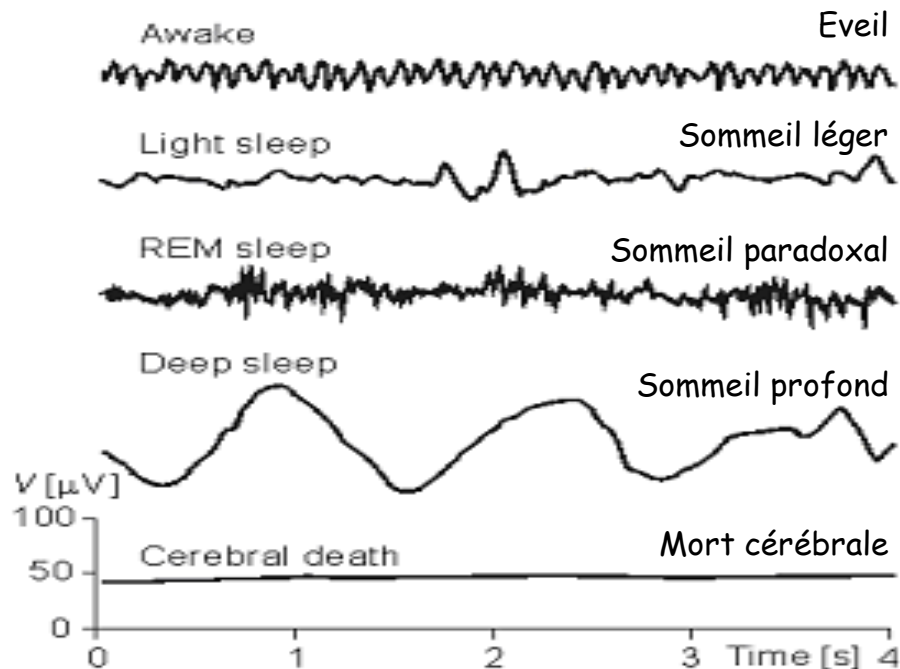
Intracellulaire

Patch-clamp

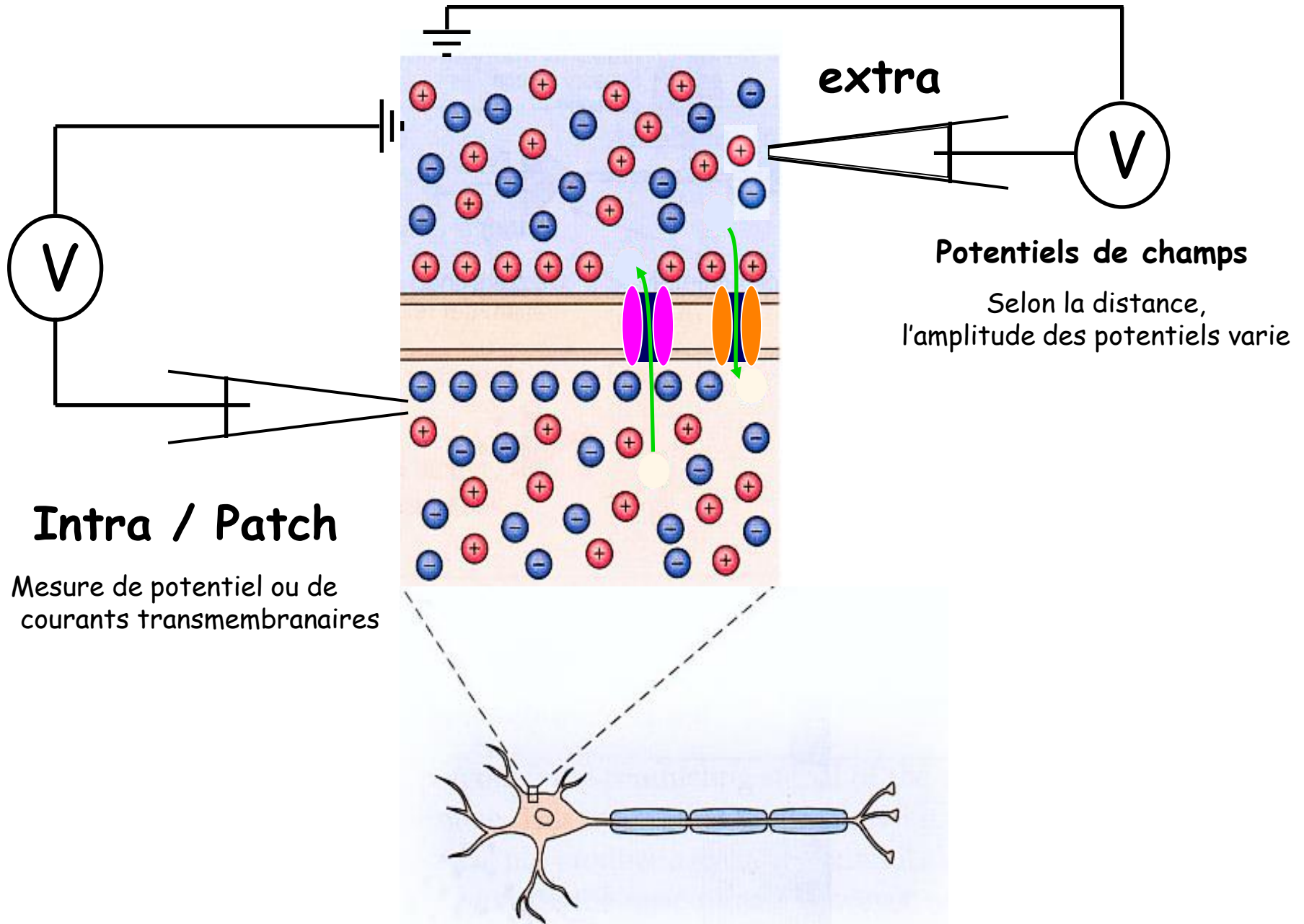
Microscopique
Unicellulaire / Moléculaire

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)



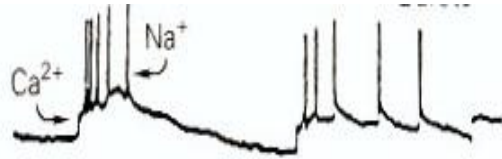
L'électrode d'enregistrement est placée à l'extérieur des cellules

→ 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

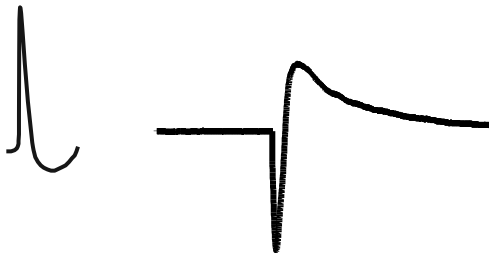
Patch-Clamp

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).

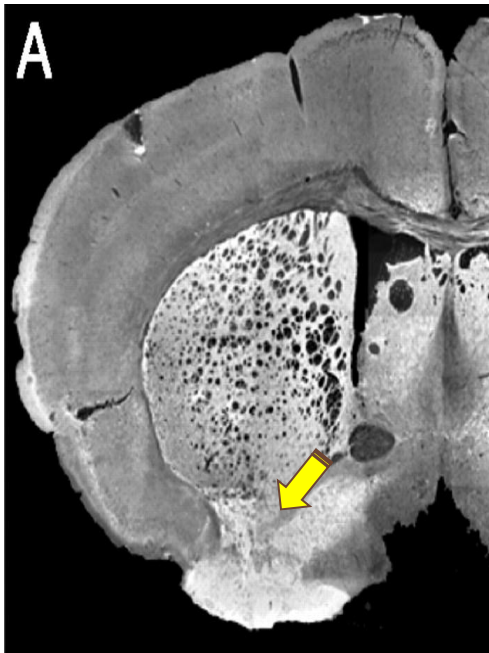
L'électrode est collée sur la membrane qui est conservée (cellule attachée) ou perforée (cellule entière)

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



Electrophysiologie du système olfactif

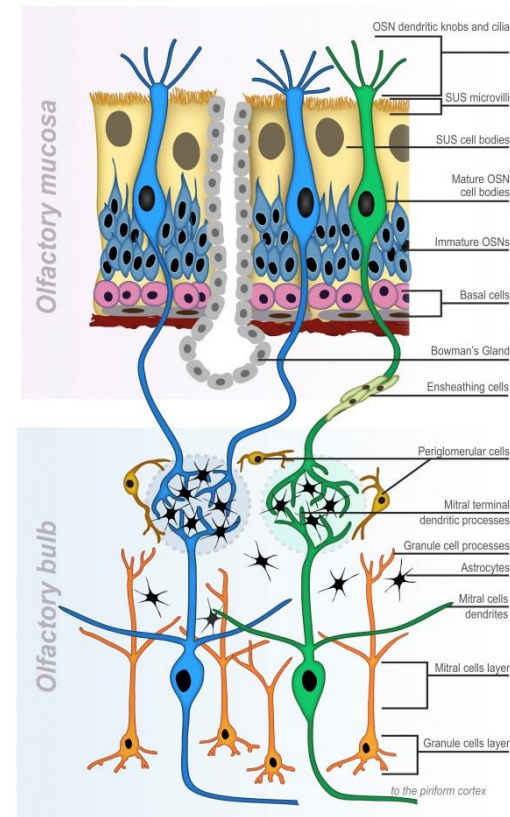
Tubercule olfactif



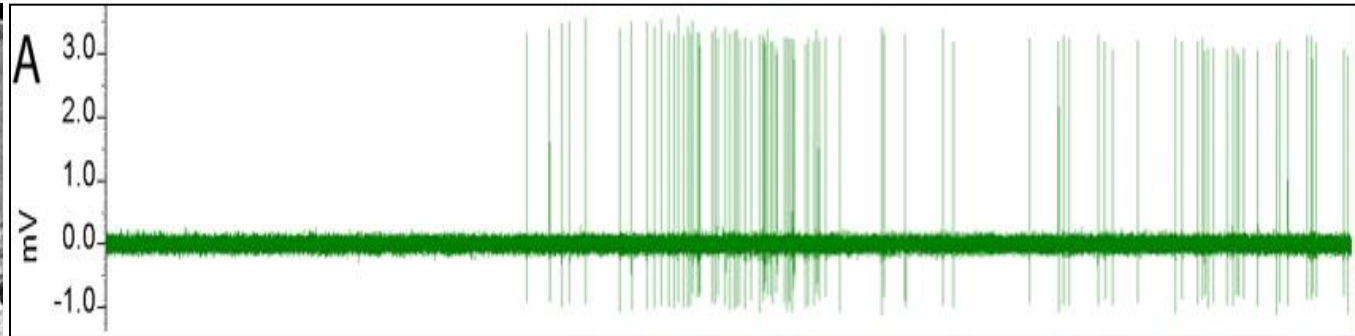
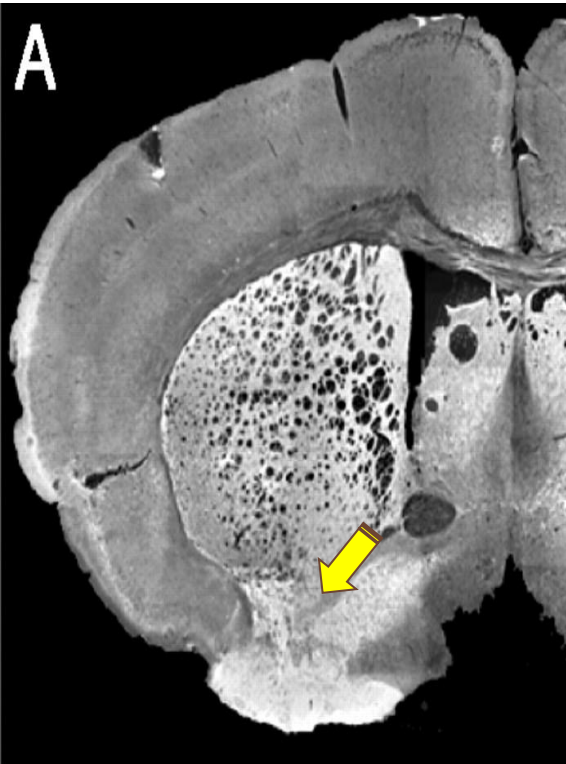
Enregistrements électrophysiologiques chez le rat / souris:

- 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

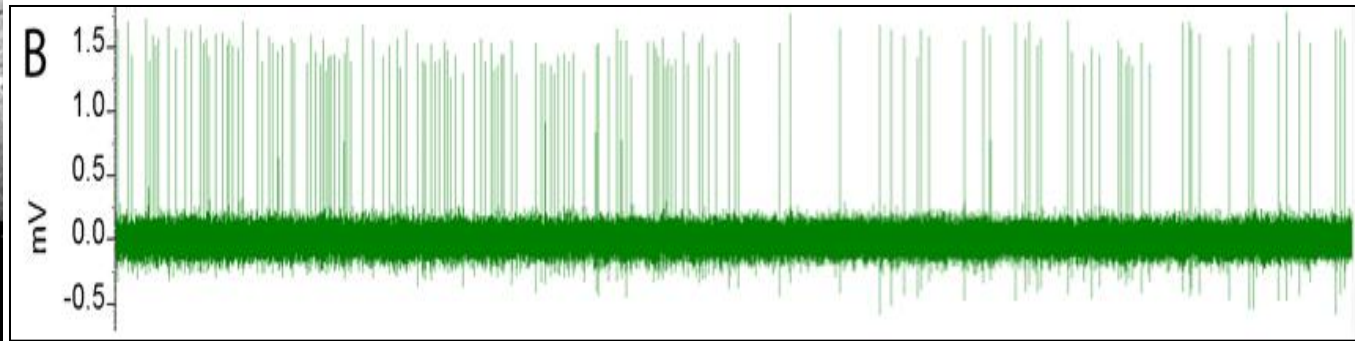
MO et BO



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



odeur



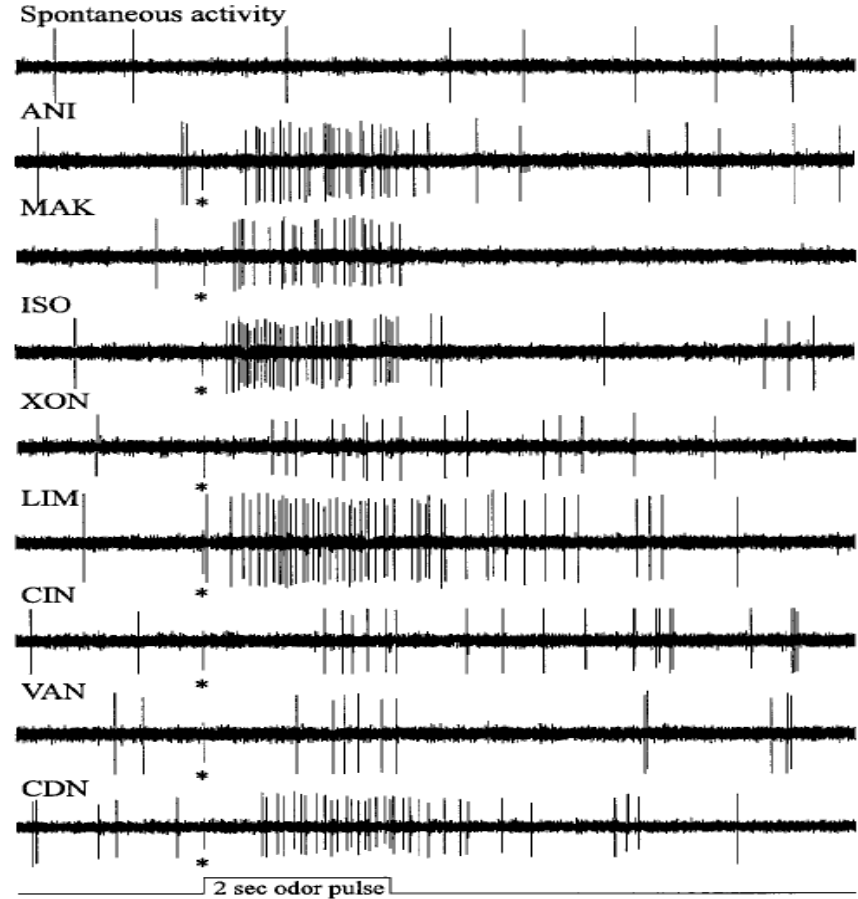
1 s

Electrophysiologie de la muqueuse olfactive

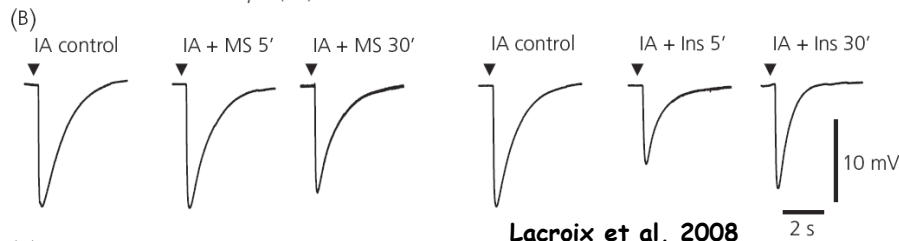
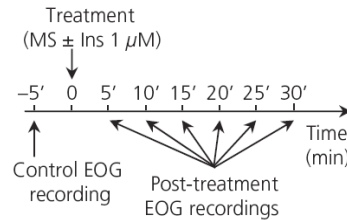
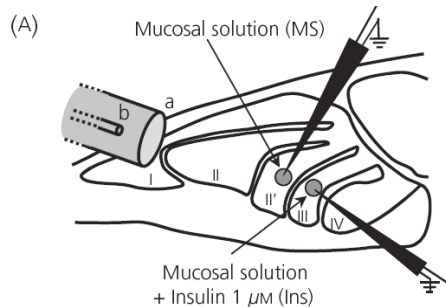
EOG (Muqueuse olfactive hémitête)

Single unit (Muqueuse olfactive in vivo)

Enregistrement unitaire MO



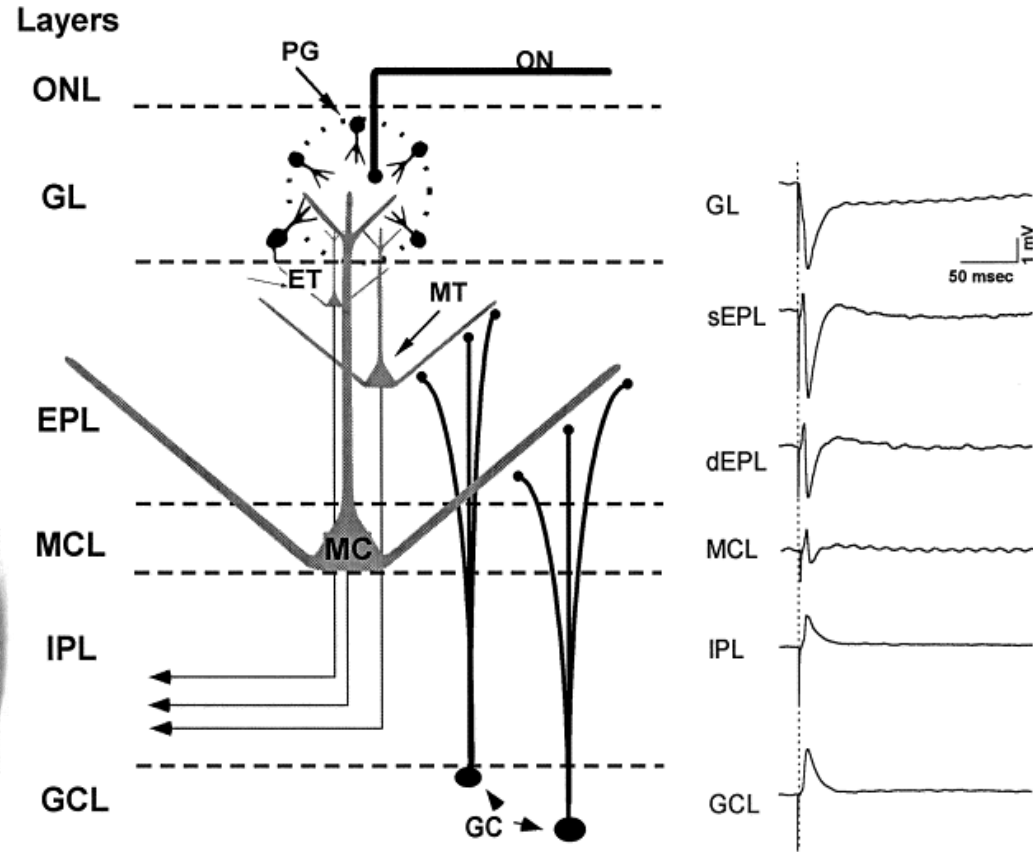
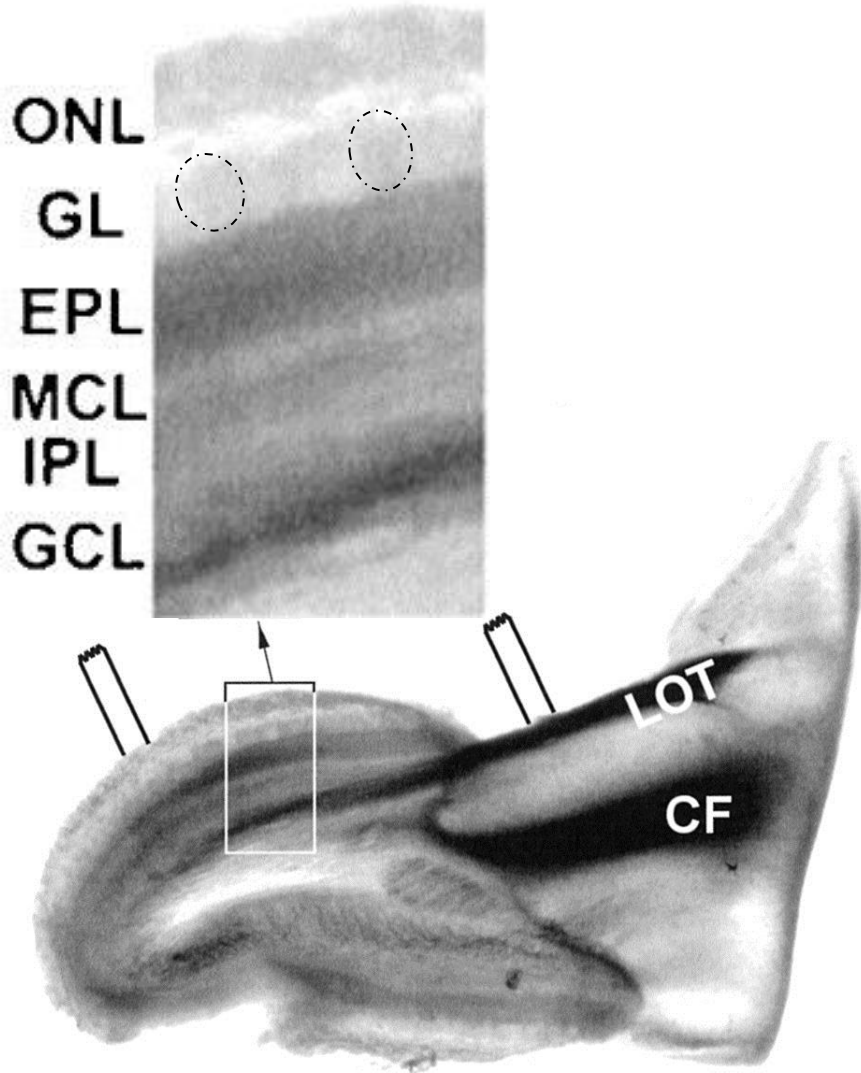
ElectroOlfactoGramme (EOG) MO



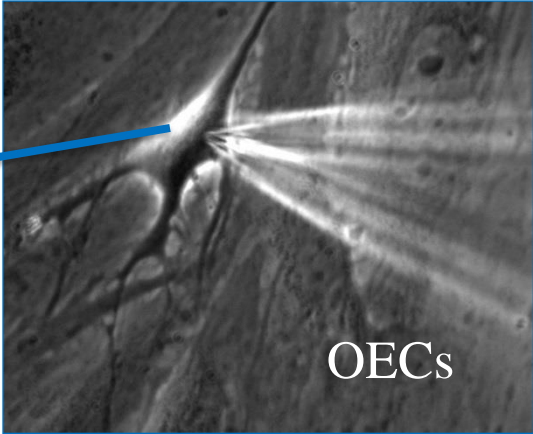
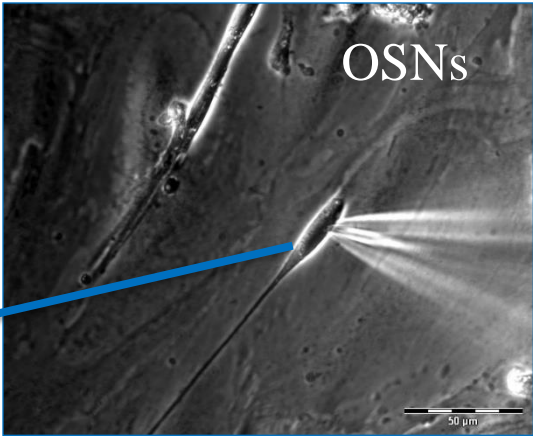
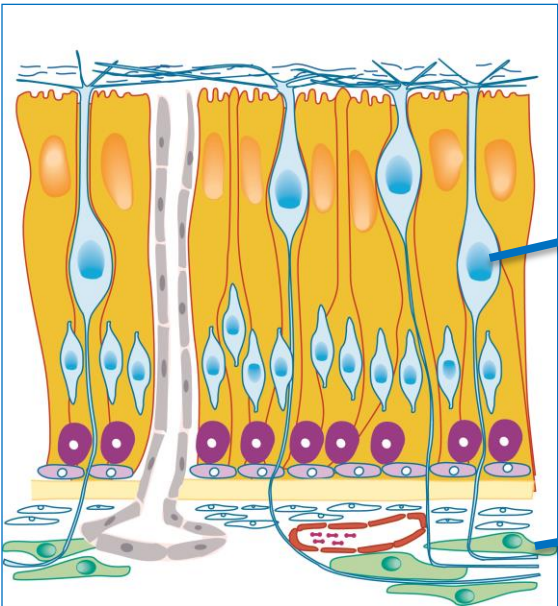
Lacroix et al, 2008

Duchamp-Viret et al, 1999

Electrophysiology du bulbe olfactif en tranches



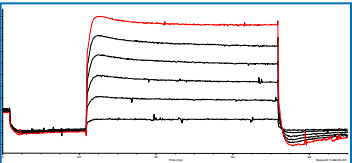
Patch-clamp sur cellules de la MO en culture primaire



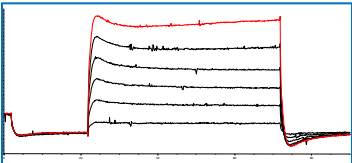
❖ Patch Clamp :

Configuration cellule entière, voltage imposé

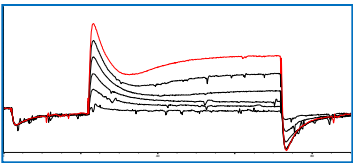
→ Mesure de la résistance membranaire et des conductances, étude des modulation cellulaires (exemple de l'endothéline)



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

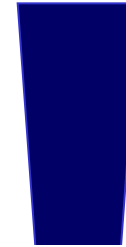
Imagerie de l'exocytose

Imagerie ionique
(calcium, chlore, potassium, pH)

Imagerie du potentiel membranaire
Imagerie des récepteurs membranaires

MACROSCOPIQUE

Non invasif
Organisme / organe entier



Microscopique
Multicellulaire

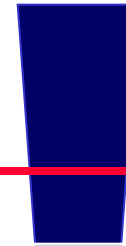


Microscopique
Cellulaire / Moléculaire

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

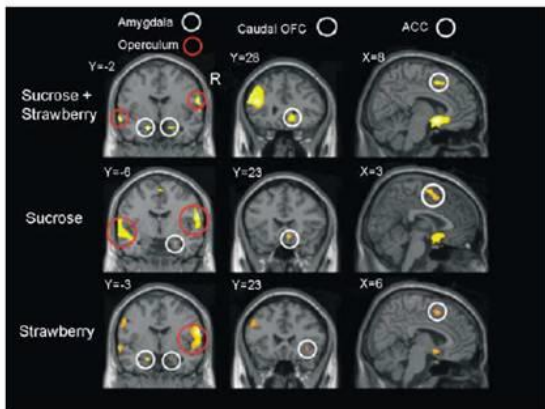
Microscopique
Multicellulaire



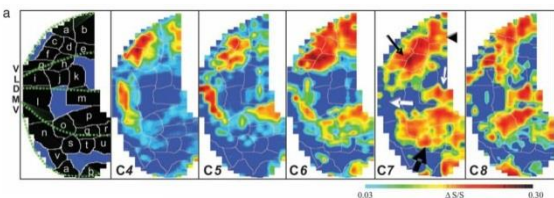
Microscopique
Cellulaire / Moléculaire

Imagerie macroscopique du système olfactif

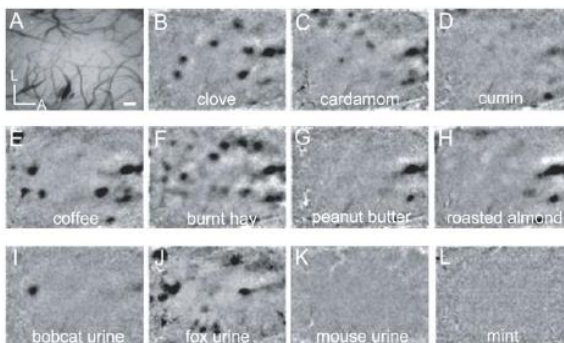
IRMf cortex



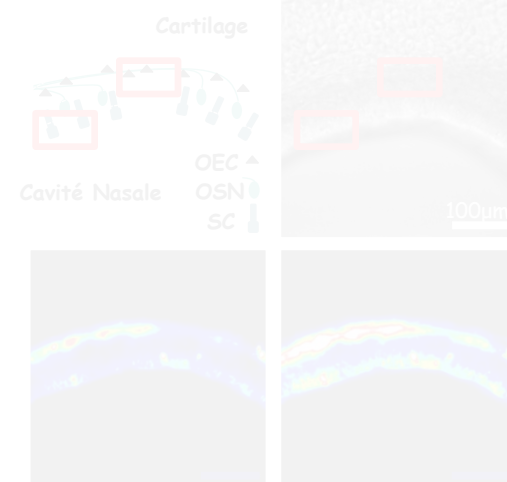
IRMf BO



IOSI du BO



Tranches de MO



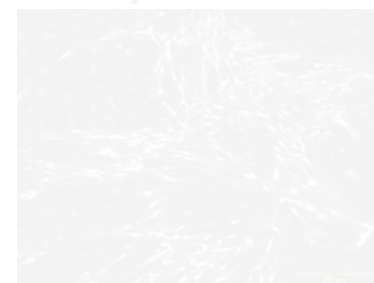
Neurones dissociés de MO



Tranches de BO



Cultures primaires de MO



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).

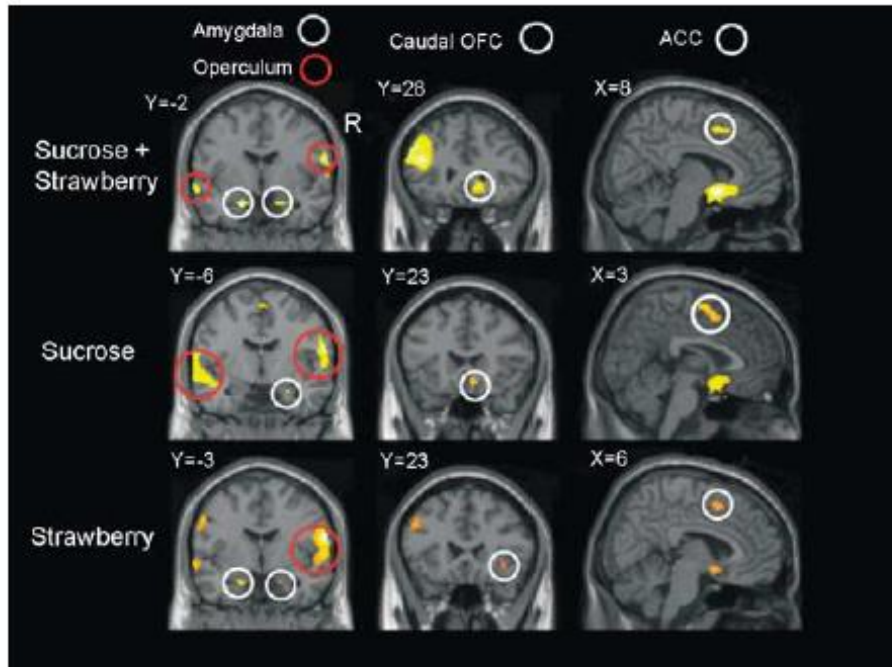
L'usage traditionnel de ces méthodes consiste à faire effectuer une tâche à un individu et à mesurer le signal produit par l'activité cérébrale.

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/HbO₂)
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).

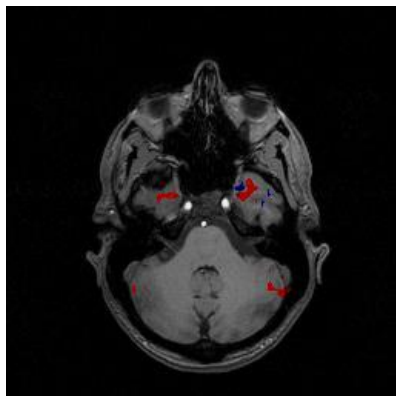
Imagerie fonctionnelle humaine → cartographie

IRMf cortex humain

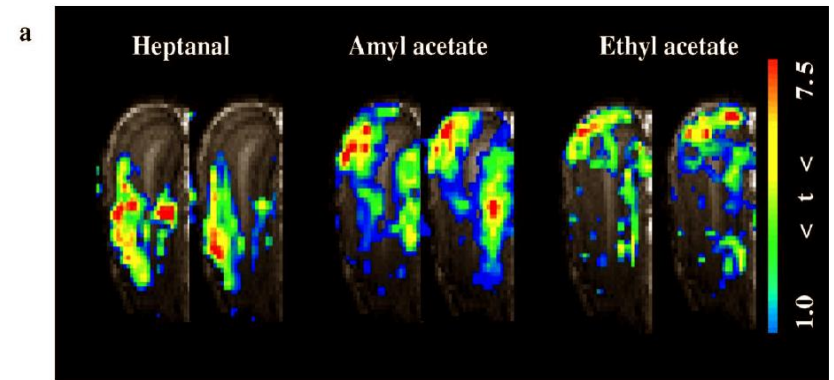


De Araujo et al., Eur. J. of Neurosci., 18:2059-2068 (2003)

IRMf / scan 3D

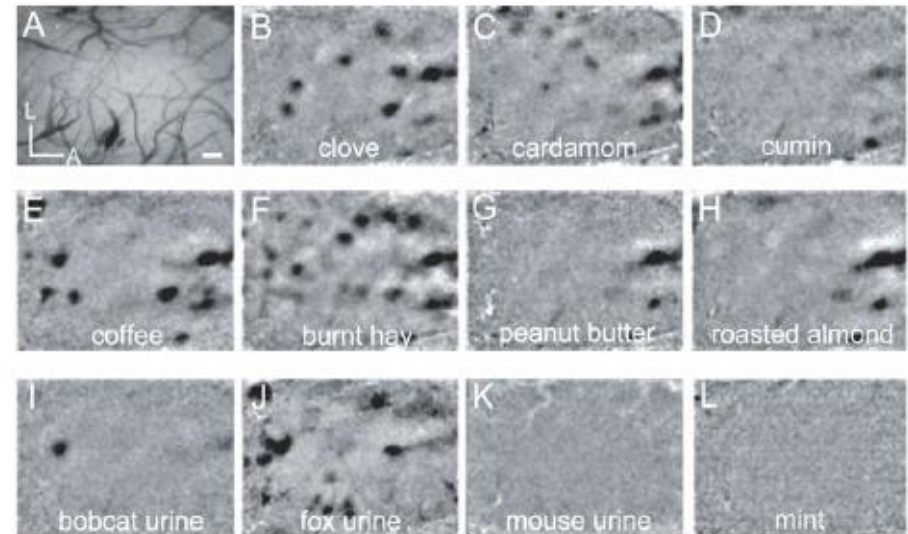


IRMf BO de rats



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

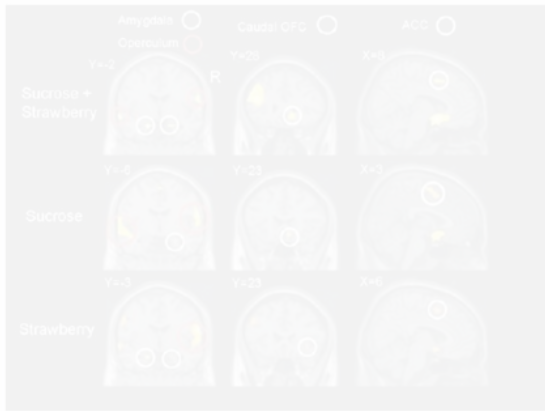
Microscopique
Multicellulaire



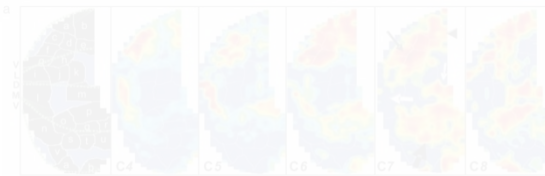
Microscopique
Cellulaire / Moléculaire

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

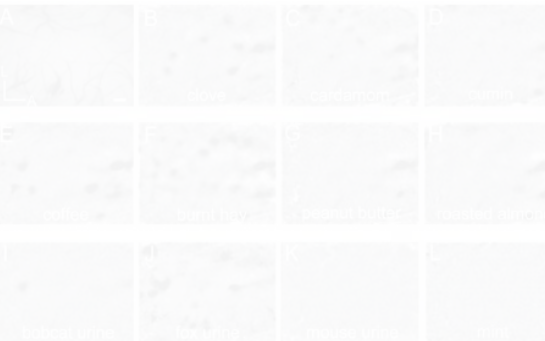
IRMf cortex



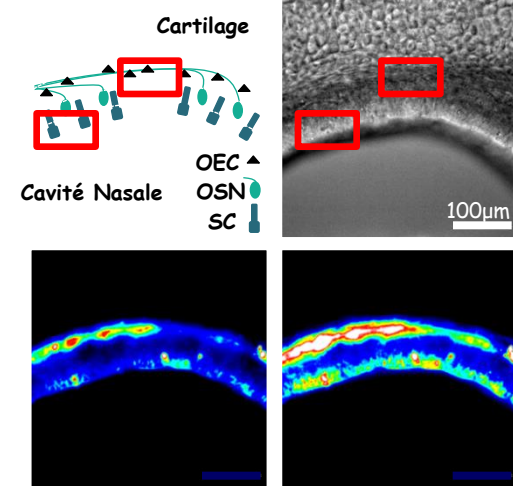
IRMf BO



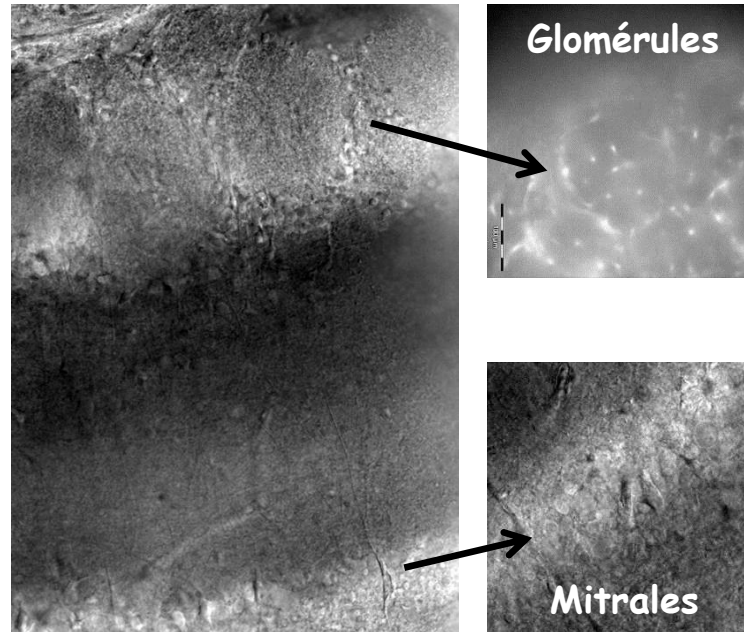
IOSI du BO



Tranches de MO



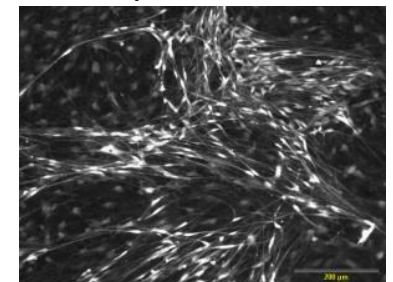
Tranches de BO



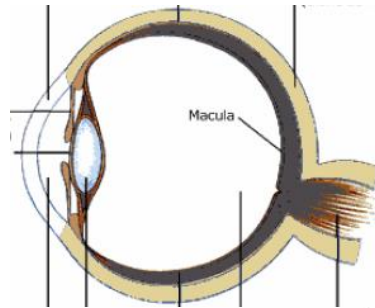
Neurones dissociés de MO



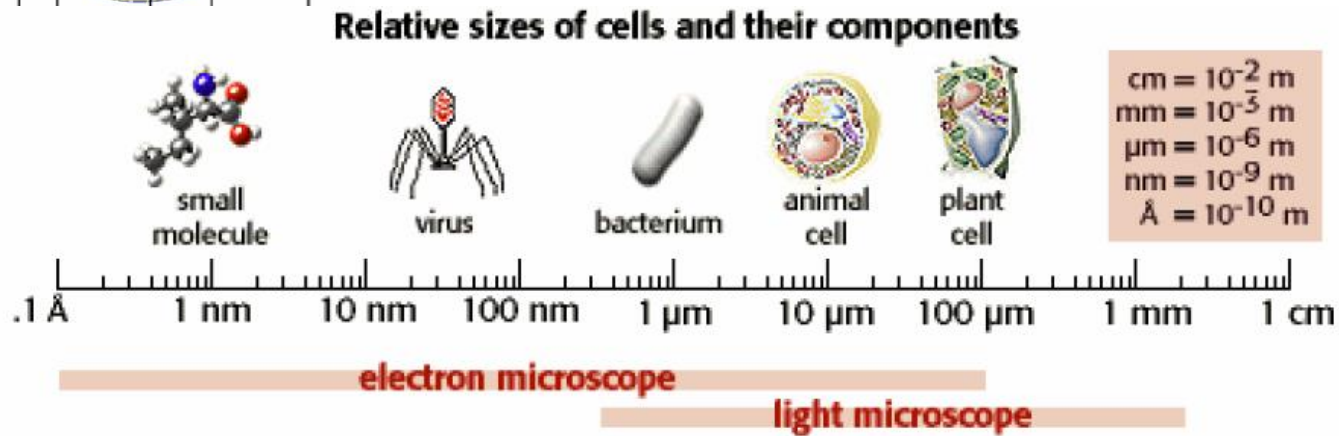
Cultures primaires de MO



Besoin de la microscopie : pourquoi ?



L'œil : limite de résolution $\sim 0,1\text{mm}$

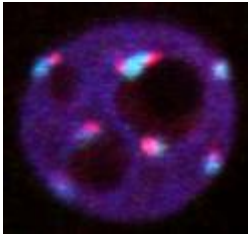


Principe de la microscopie :

- 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)

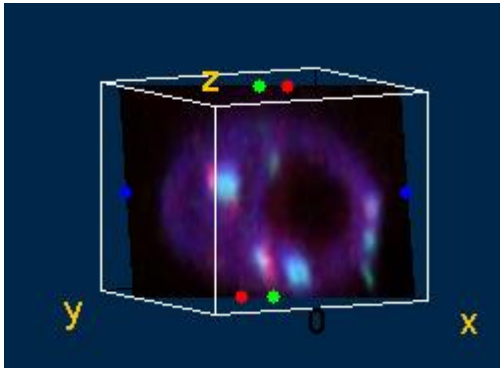
Utilisations de la microscopie

2D



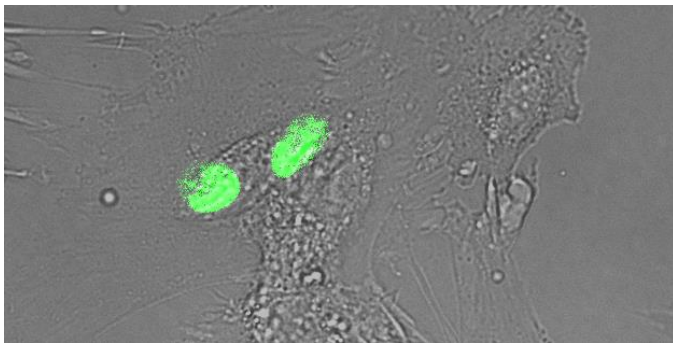
Observer une scène fixe (x,y)

3D



Observer un volume (x,y,z)

Etudes structurales

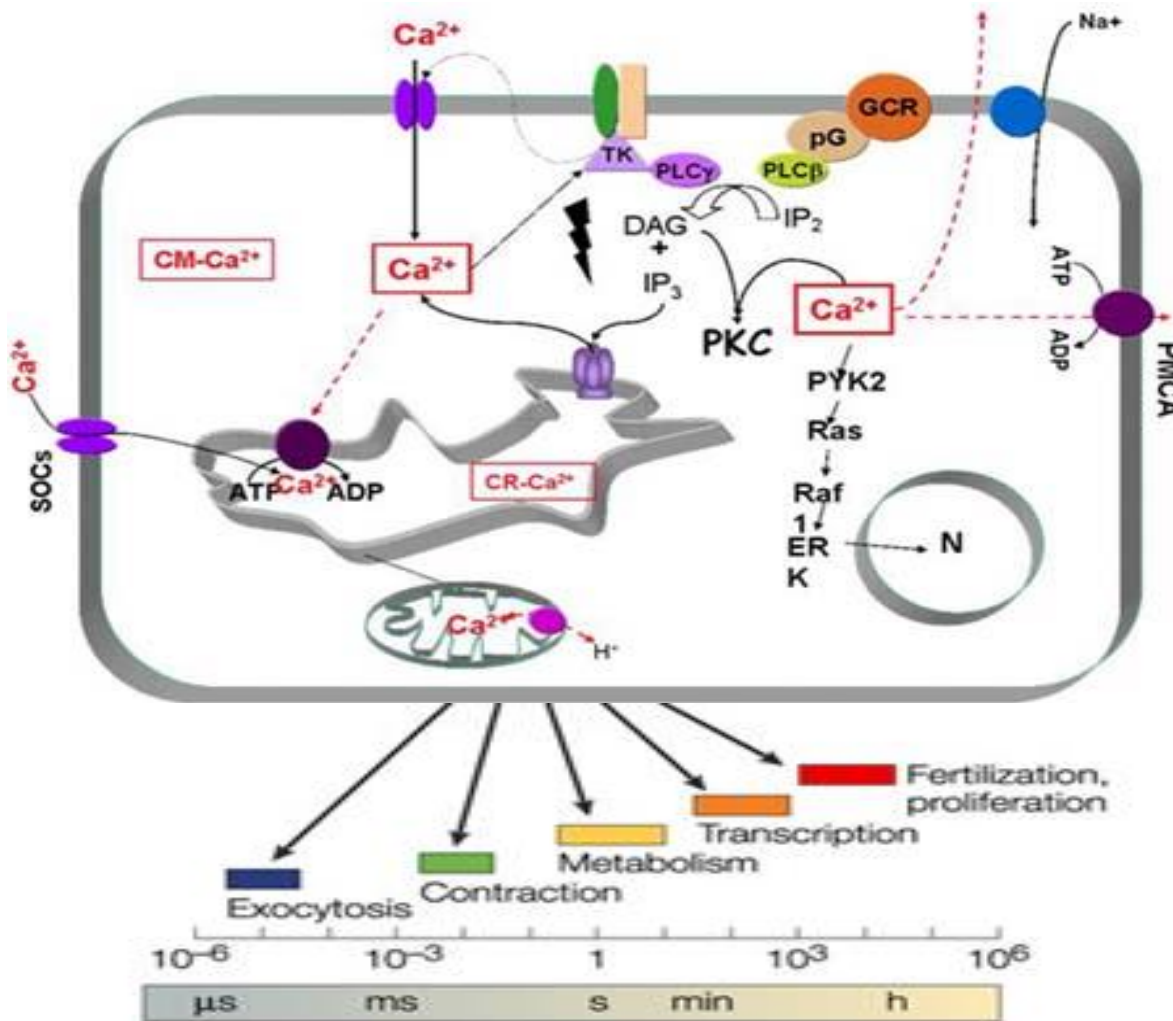


Observer une scène dans le temps (x,y,z,t)

Etudes dynamiques ...

... des concentrations
de calcium intracellulaire, par exemple

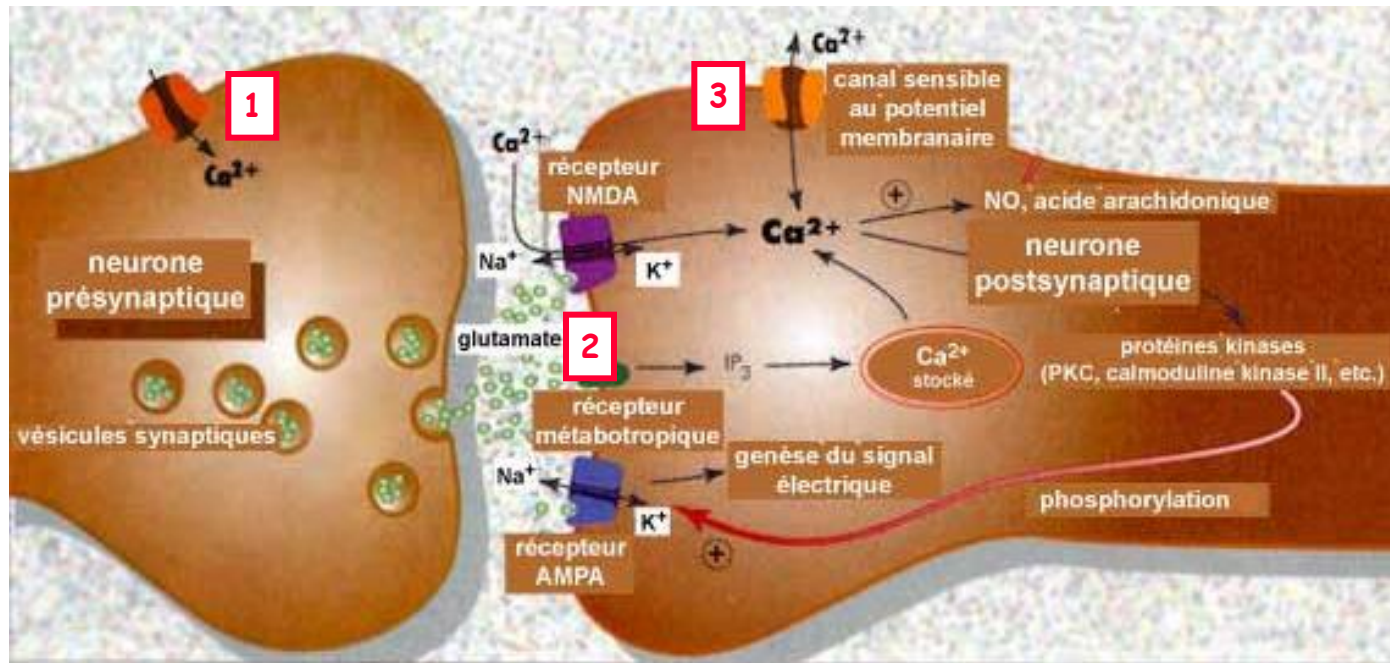
Pourquoi s'intéresser au calcium intracellulaire



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 Ca²⁺ intracellulaires)
3. Entrée de calcium dans le neurone postsynaptique par les canaux calciques voltage-dépendants



Augmentation du Ca²⁺ 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 Ca^{2+} ne peut pas directement être visualisé dans les cellules vivantes. Pour mesurer les variations des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire, il faut donc avoir recours à des molécules spécifiques dont les propriétés optiques changent en fonction de leur interaction avec le 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 :**

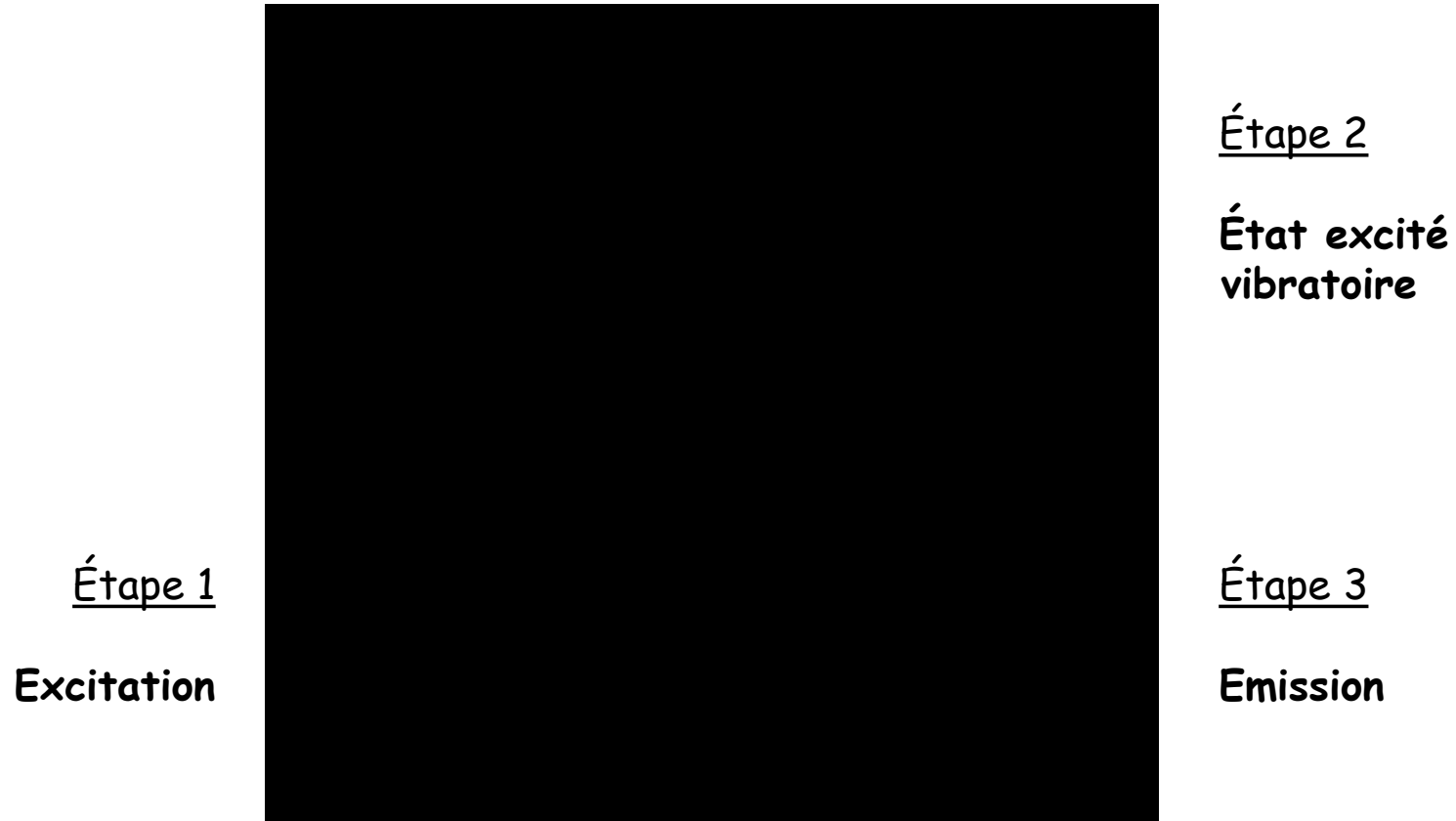
- en fonction de la préparation expérimentale, des intensités et des cinétiques des variations étudiées

- ✓ **Epifluorescence**

- ✓ **Confocal / Multiphoton**

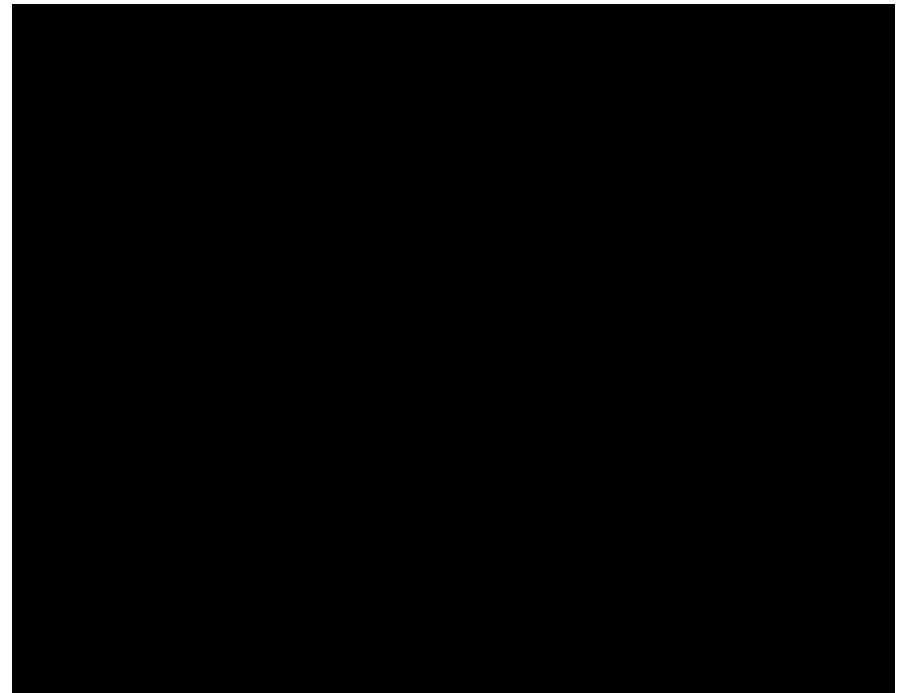
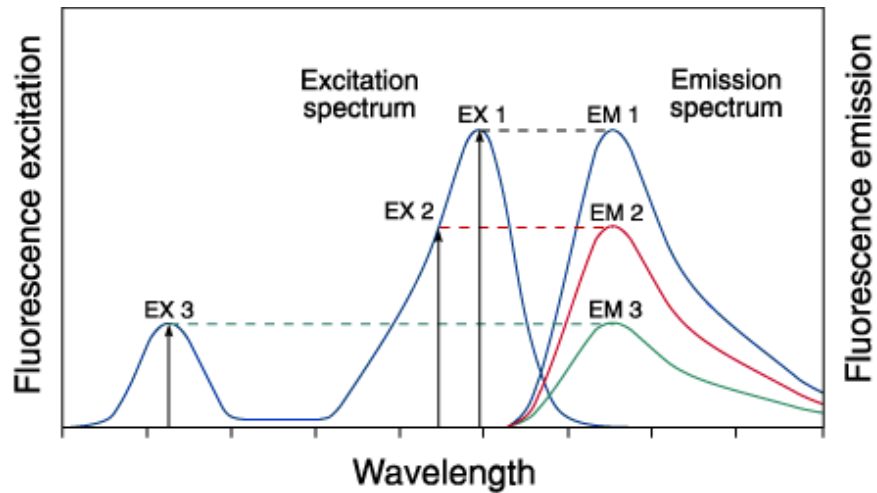
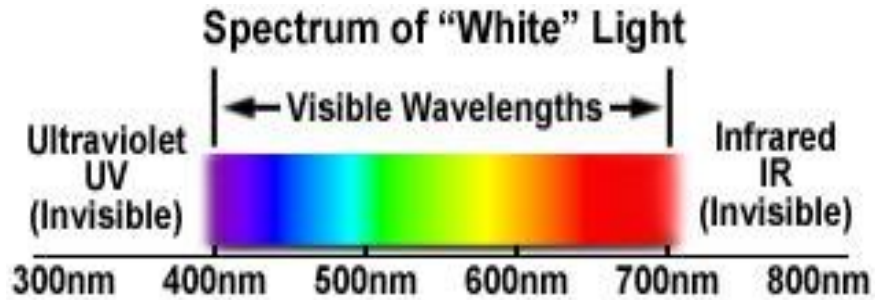
Imagerie calcique par fluorescence

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



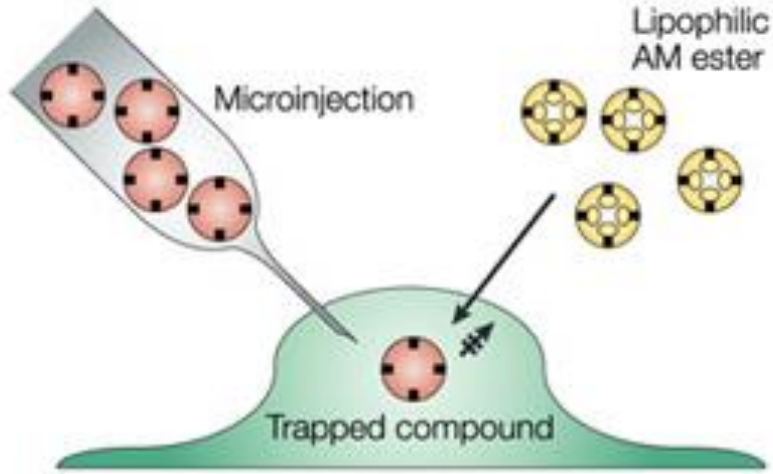
Longueur d'onde d'excitation < longueur d'onde d'émission

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



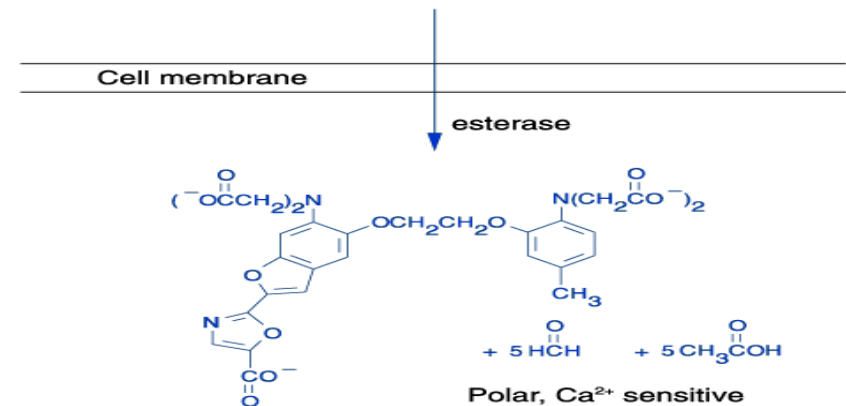
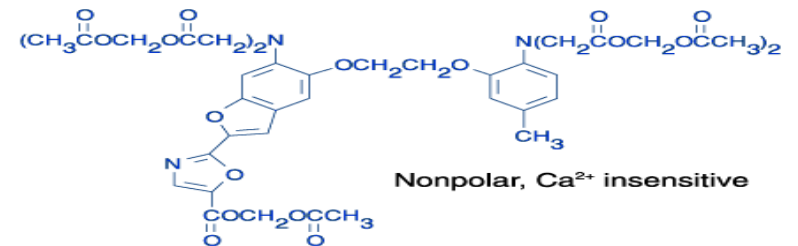
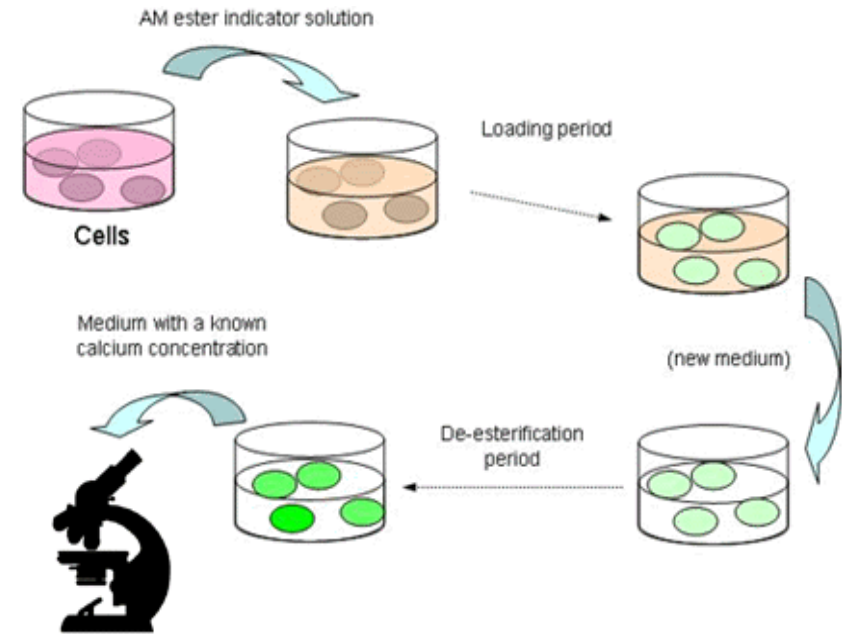
Injection intracellulaire (patch / μ -injection):

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

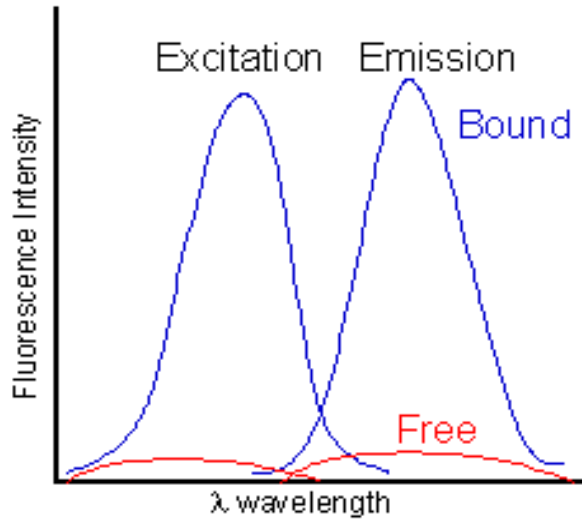
Chargement AM (AcétoxyMéthyl ester) :

- Chargement passif
- Multiples cellules chargées simultanément
- Facilité expérimentale

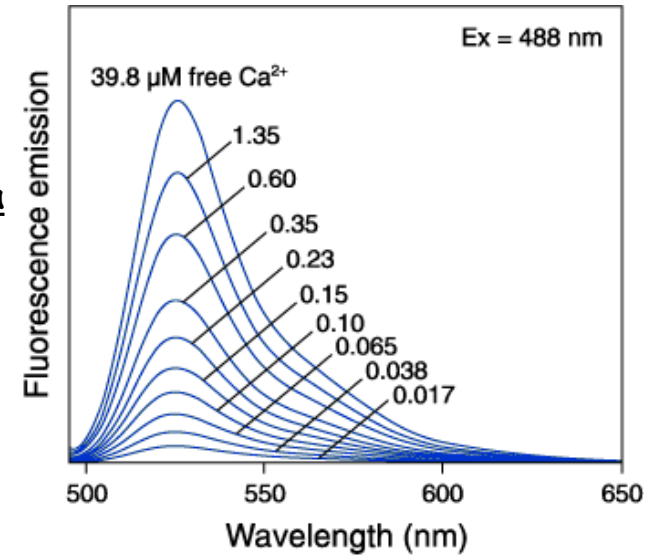
Chargement d'un AM ester



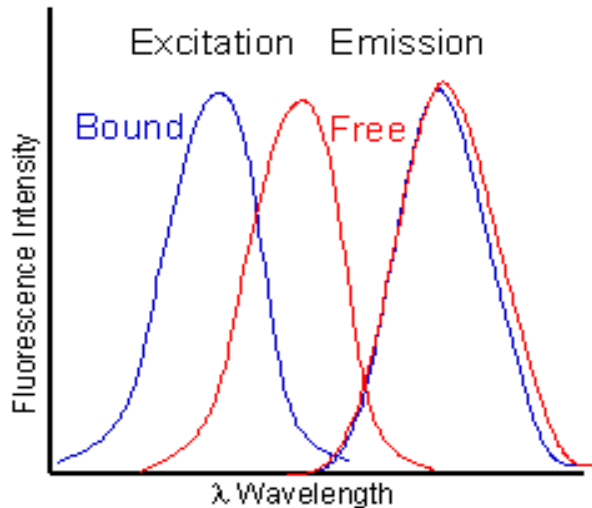
Augmentation d'intensité en présence de calcium : mesures non-ratiométriques



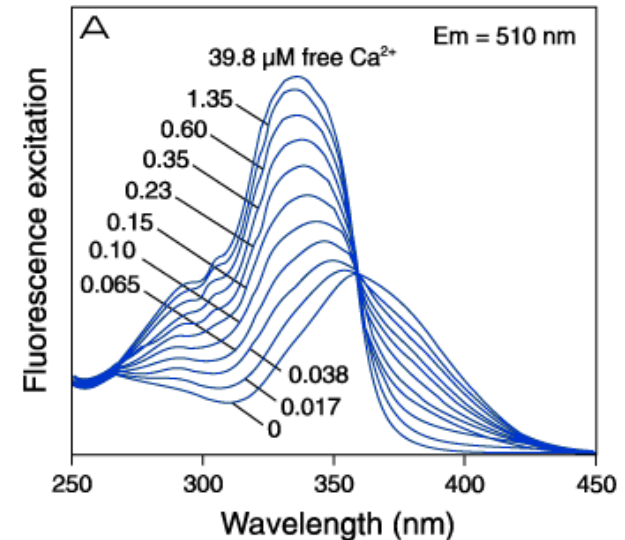
Fluo3 / Fluo4
Oregon green Bapta



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



FURA-2



Source de lumière

Lampes
Laser
(UV, visibles, IR)

Agents de contraste

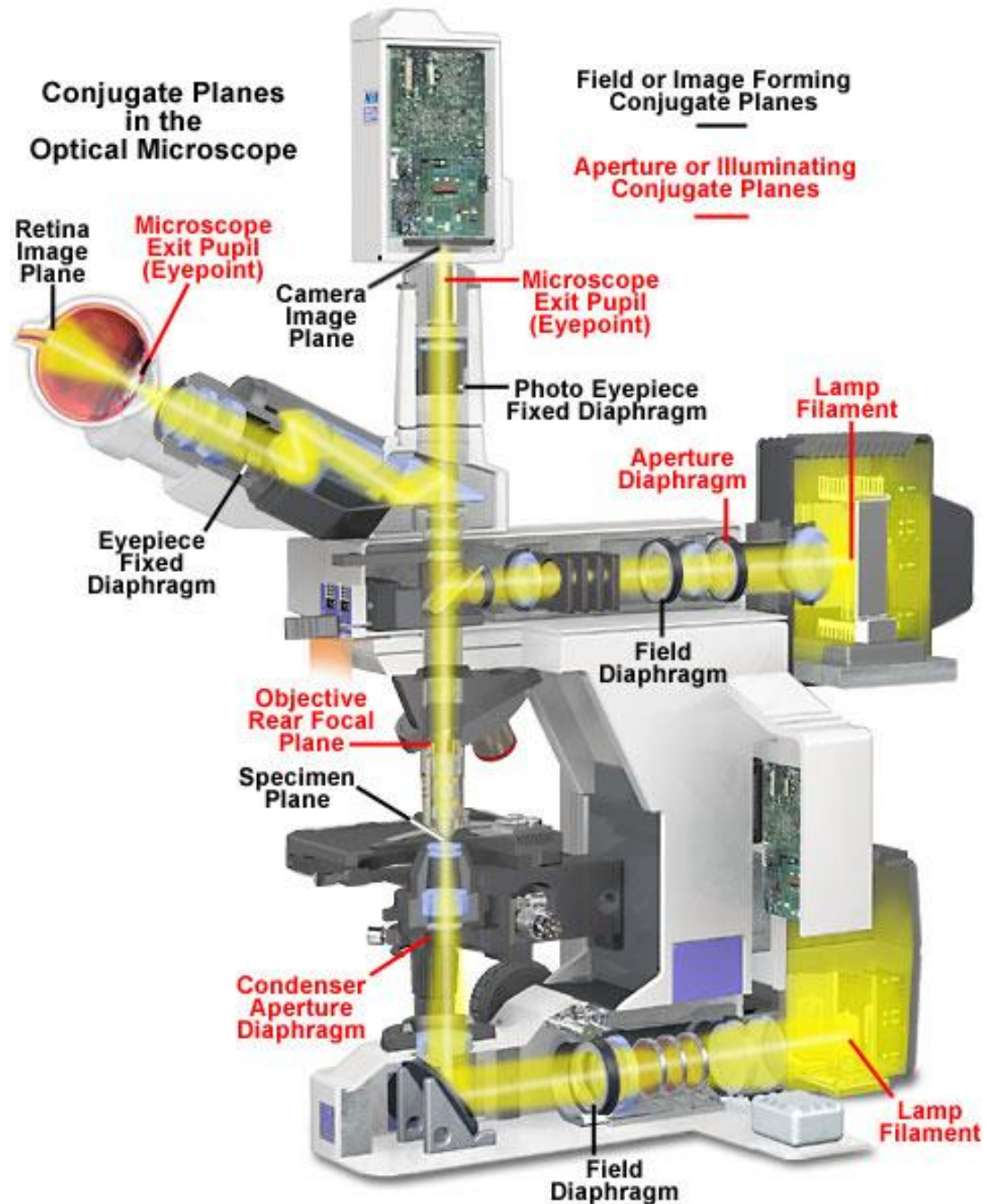
Colorants
Absorbants
Diffusants
Dépolarisants
Fluorophores

Optique

Objectifs
Lentilles
Filtres

Détecteur

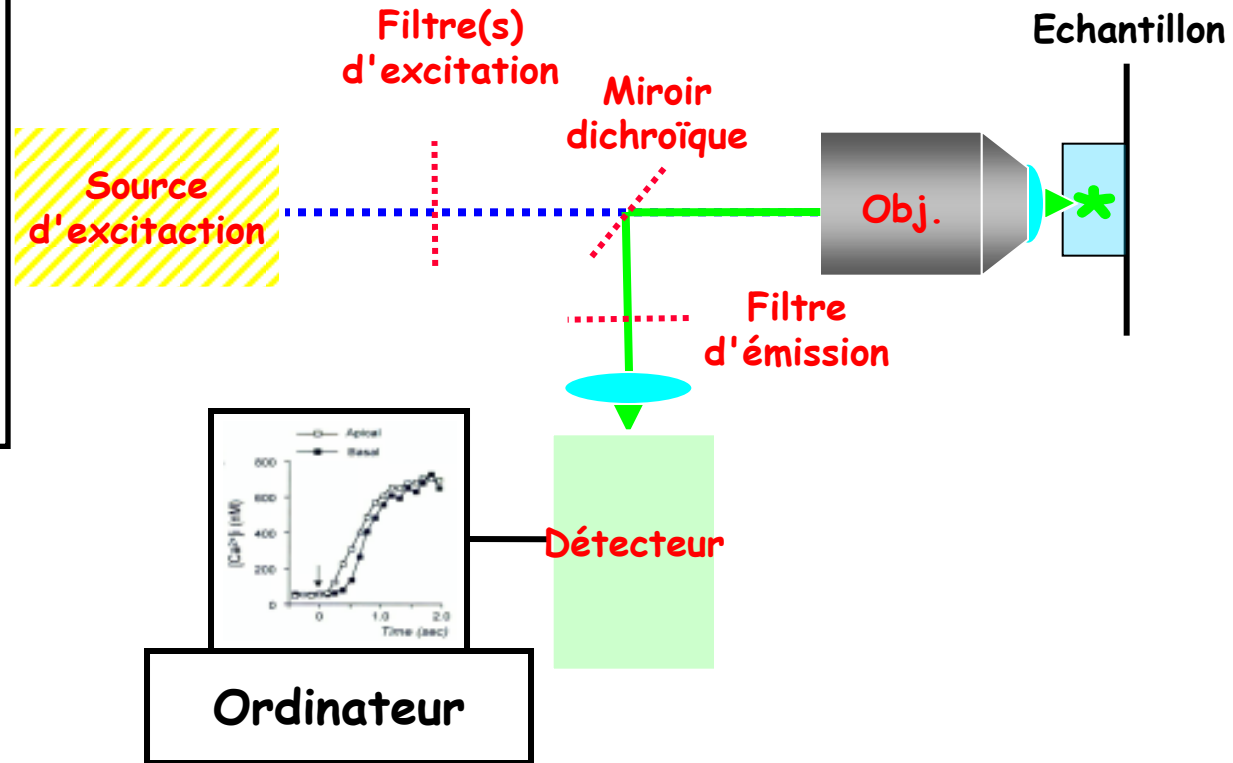
Oeil
App. photo
Caméras num.
Photodiodes
PMT



Mesures de fluorescence

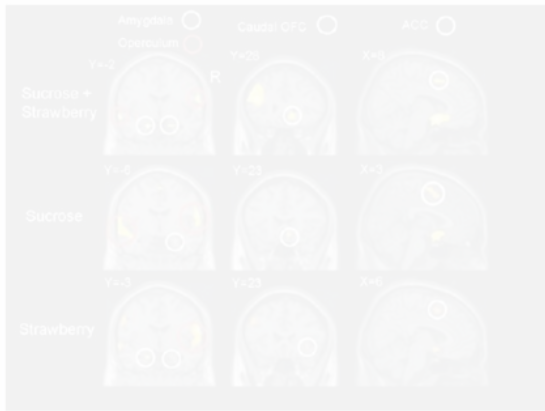
Système de détection de fluorescence:

- 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

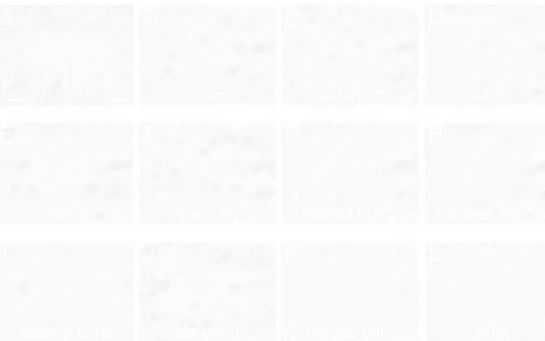
IRMf cortex



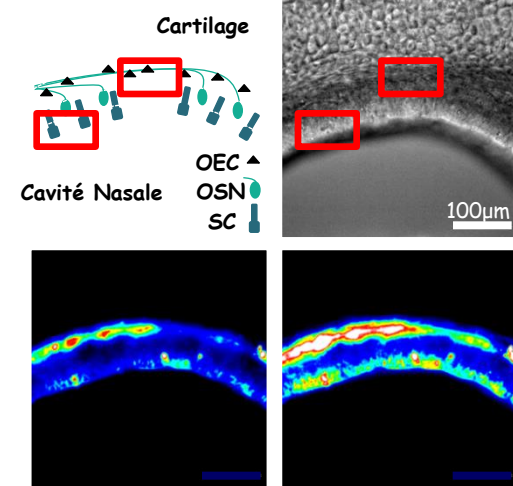
IRMf BO



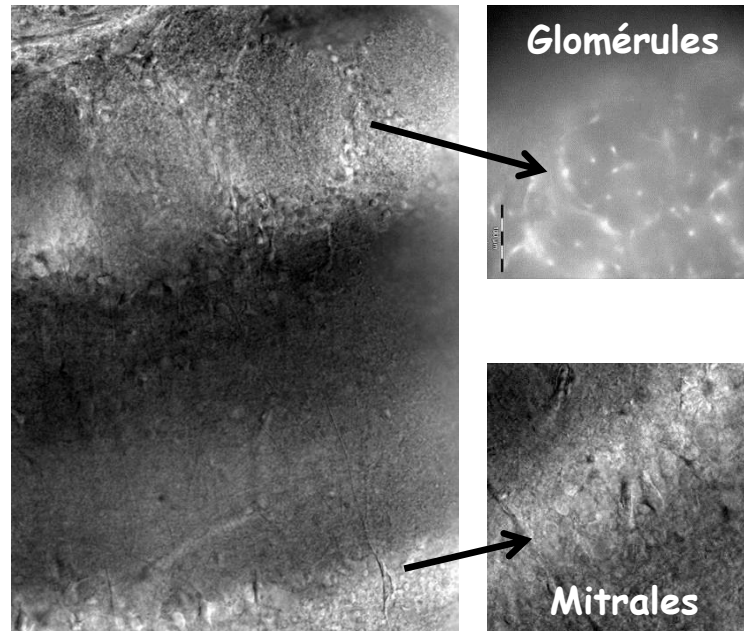
IOSI du BO



Tranches de MO



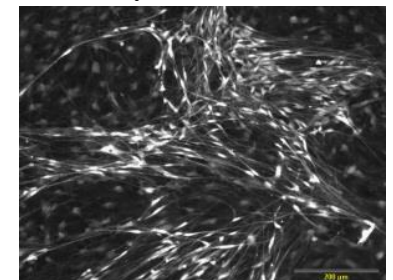
Tranches de BO

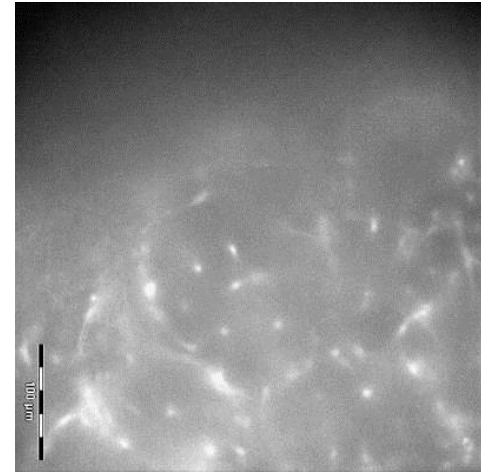
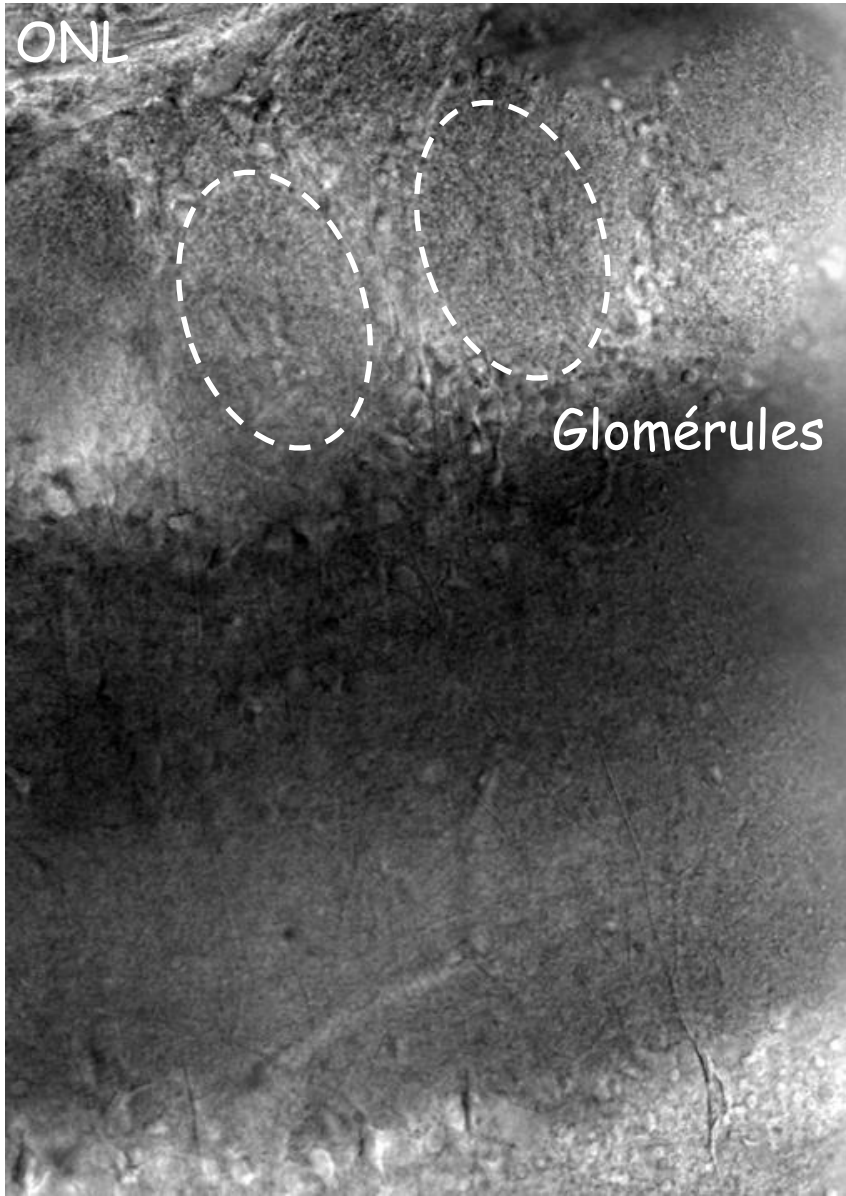


Neurones dissociés de MO

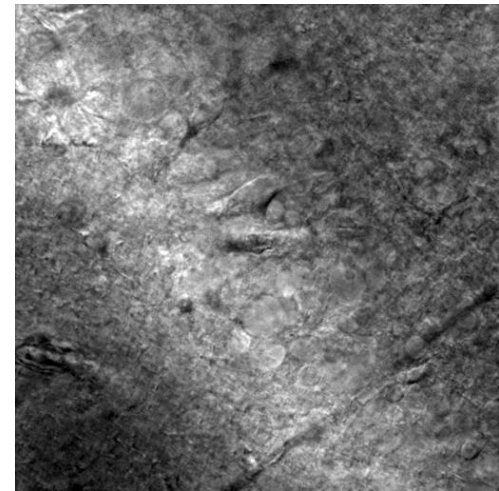


Cultures primaires de MO





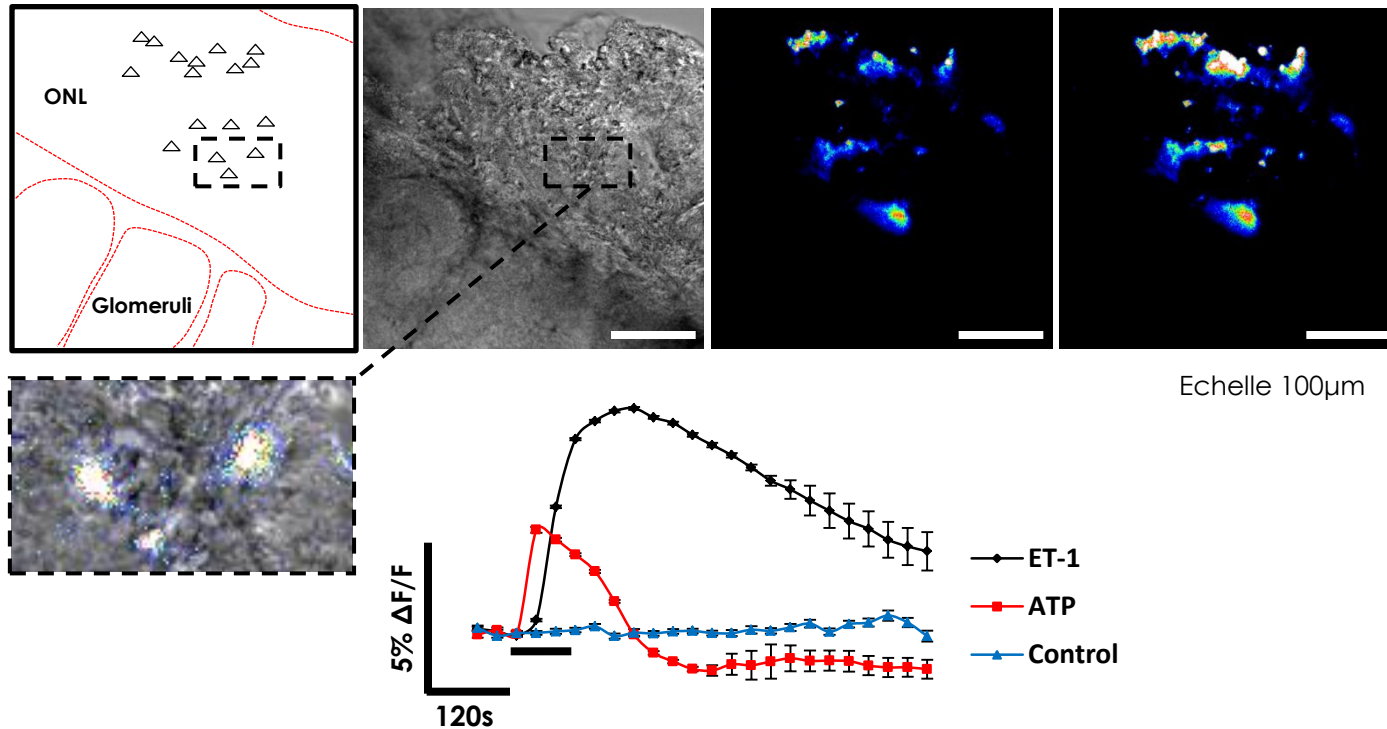
Neurones périglomérulaires
et astrocytes



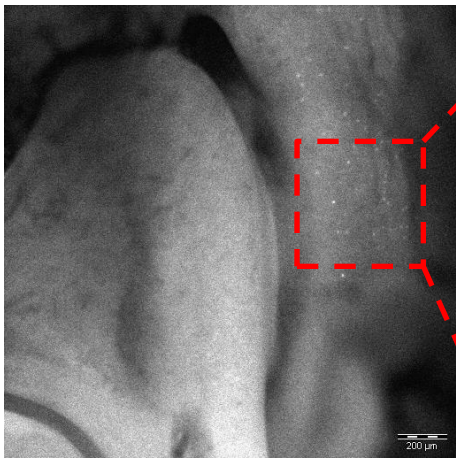
Cellules mitrales

Etude en imagerie calcique sur tranches de BO

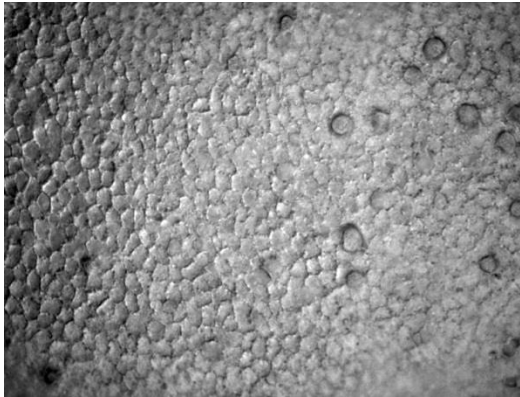
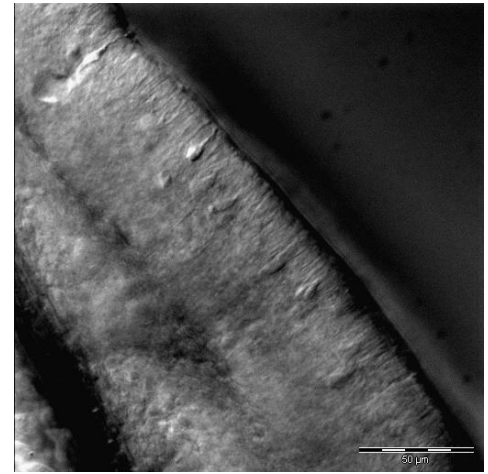
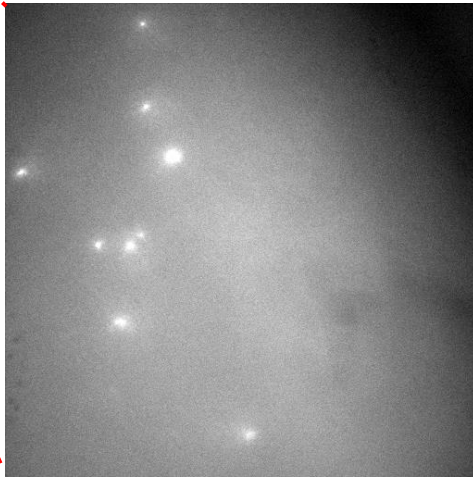
Tranche de BO, Imagerie Calcique : Oregon Green, ET-1 : 10^{-7} M, ATP : 10^{-4} M



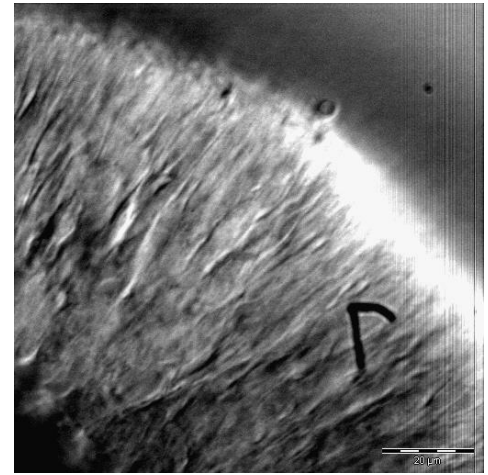
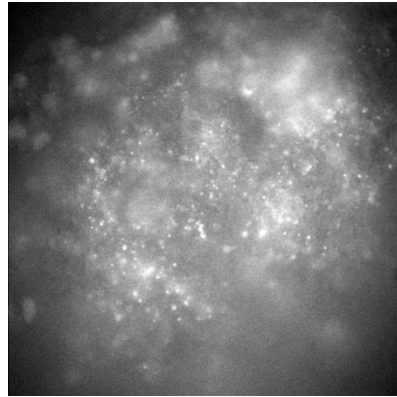
- **Activation calcique au niveau des cellules OECs par l'ET-1**
 - Effets sur le message transmis au BO?
 - Quid des autres cellules gliales du BO?



Muqueuse olfactive
- intacte -



Muqueuse olfactive
- explant -

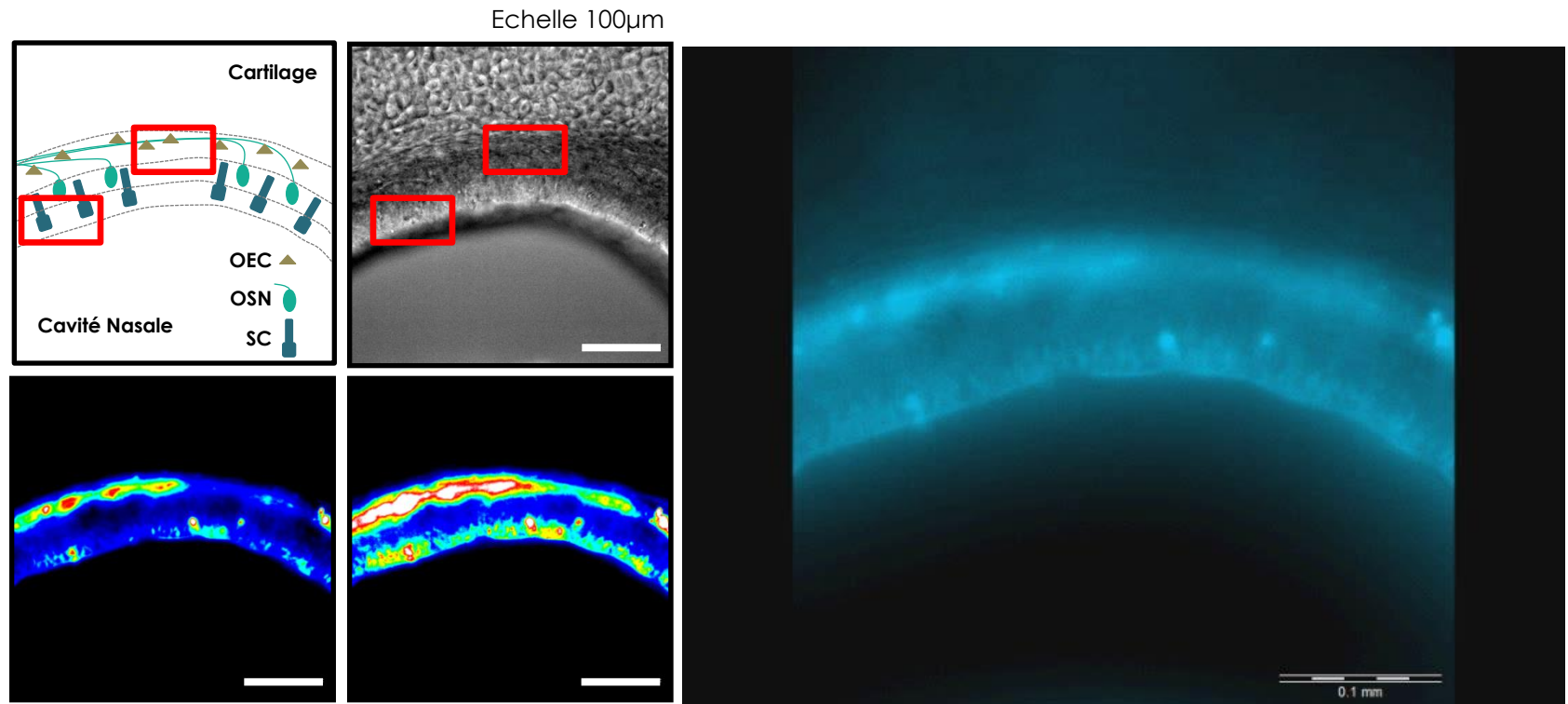


Muqueuse olfactive
- tranche -

Etude en imagerie calcique sur tranches de MO

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

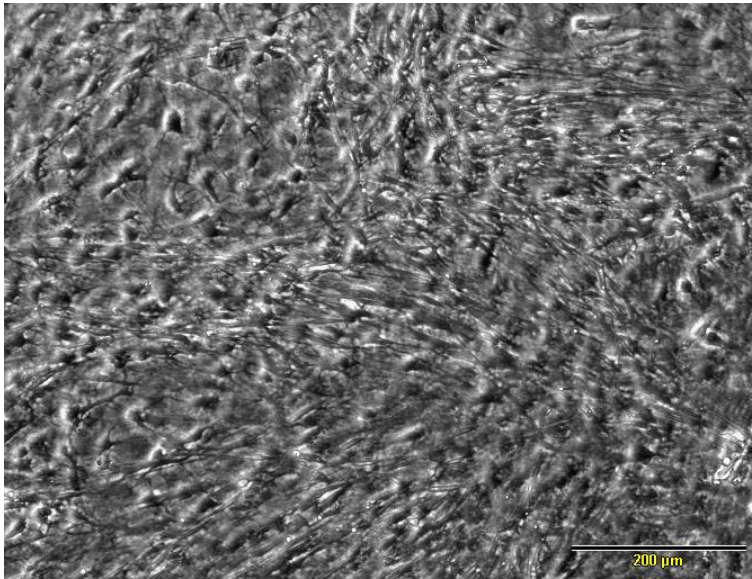
(Le Bourhis et al., 2014)



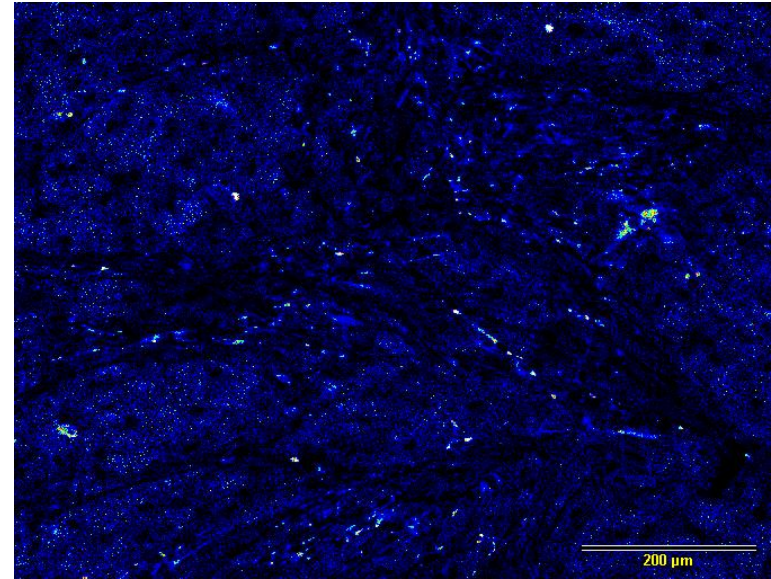
- Une réponse calcique survient dans les cellules gliales de la MO suite à une stimulation à l'ET-1

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

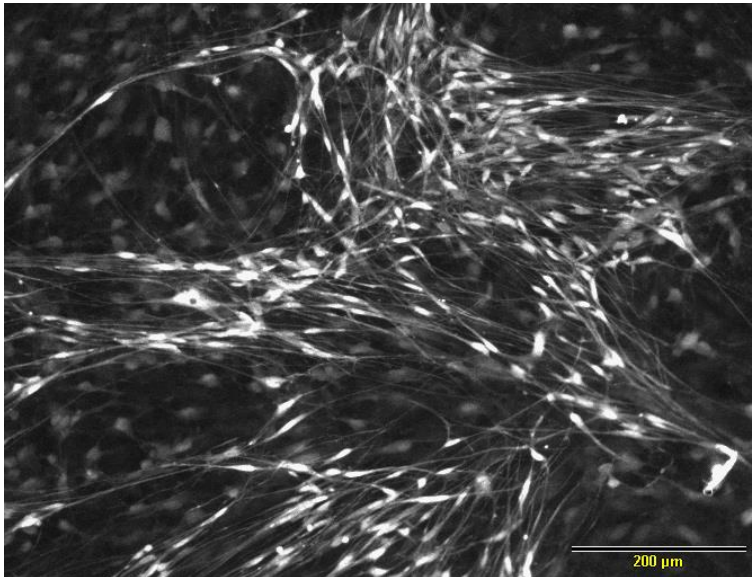
Phase



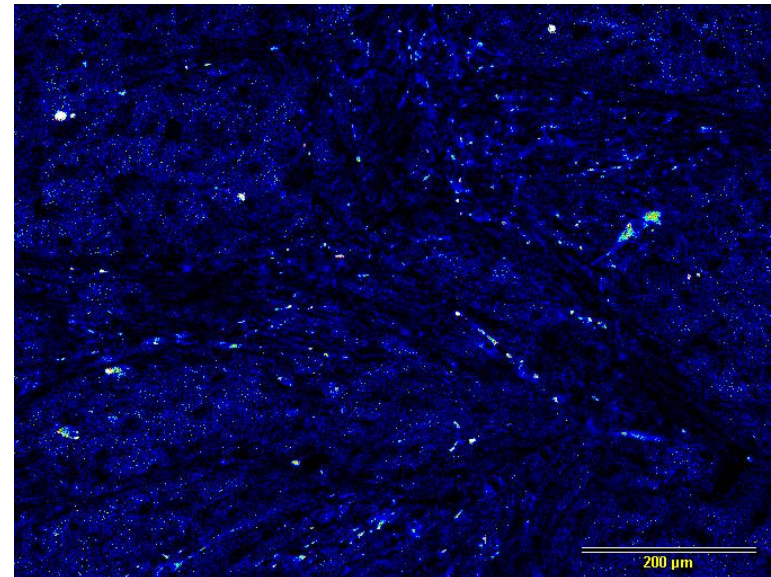
ET-1

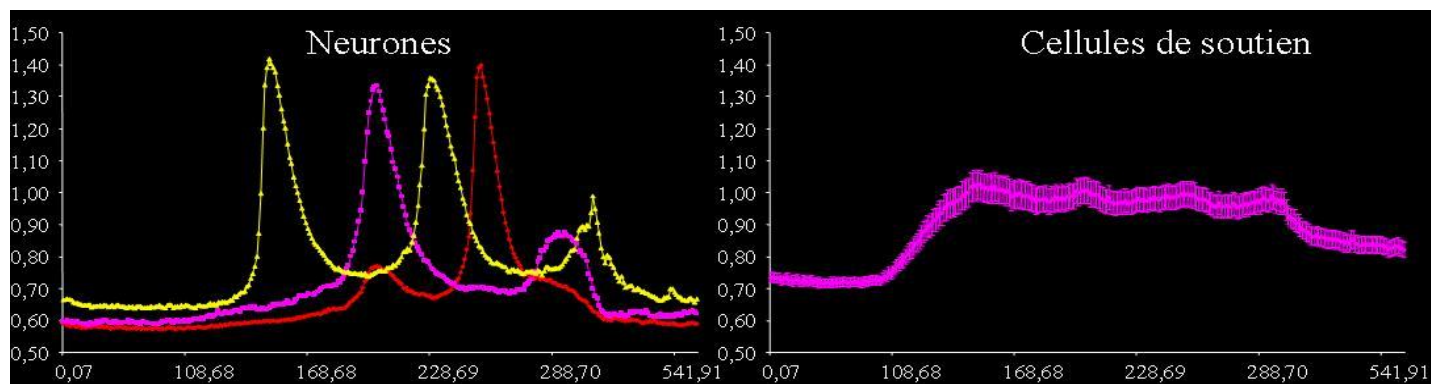
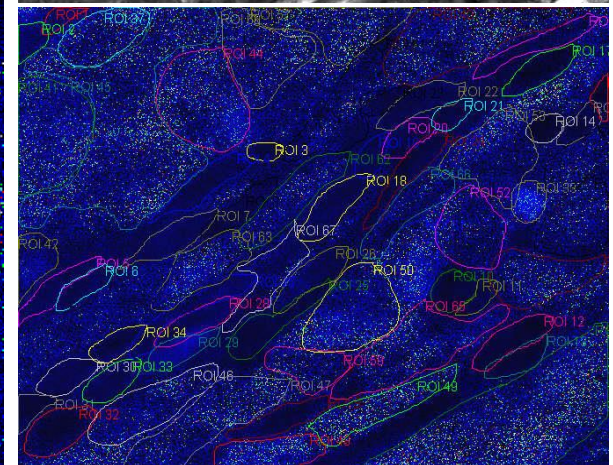
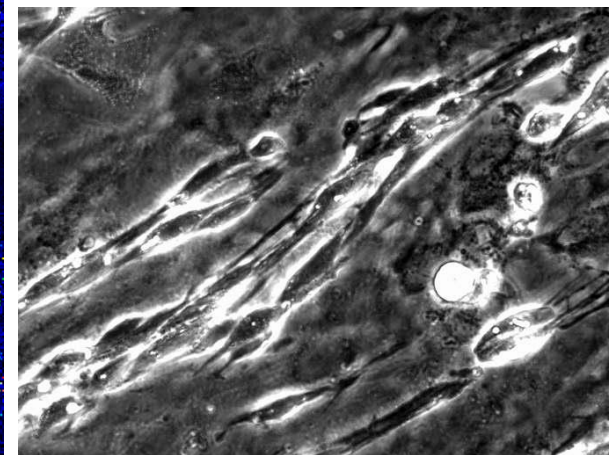
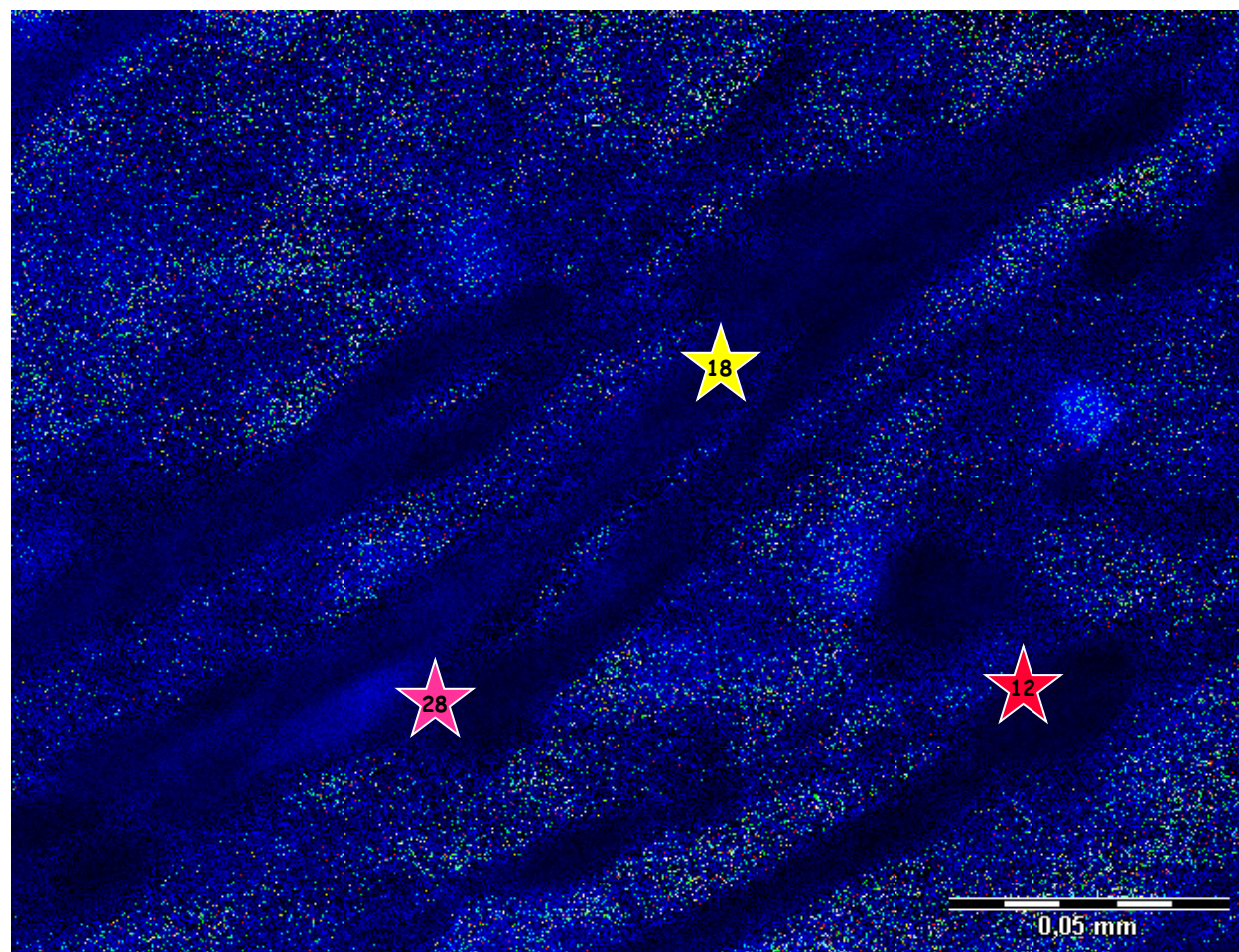


Fura



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 ?**