

ENSC Bordeaux

NEUROBIOLOGIE : les bases cellulaires du système nerveux

Liliana Audin-Garcia : 5 Novembre 2018

TP No 2 : Analyses de l'activité synaptique

Poste de travail : \\oberon\A Lire\Liliana Garcia avec votre mot de passe ENSC

Programme : CLAMPFIT

INTRODUCTION

Utilisant des techniques électrophysiologiques la transmission synaptique a été enregistrée sur une préparation in vitro des tranches sagittales de cerveau de rat qui conserve la majorité des connexions entre différents structures sous-corticales impliqués dans le mouvement (les ganglions de la base).

Pour étudier l'activité synaptique des électrodes de stimulation bipolaires (NEX-100 de phymep) sont placés sur les *structures présynaptiques* (globus pallidus GP ou noyau subthalamique NST) ou directement sur les fibres d'entrées (afférences) à la substance noire pars réticulata SNr (*structure post-synaptique*). Ces entrées peuvent être excitatrices ou inhibitrices.

L'électrode d'enregistrement est placée sur les cellules individuelles de la SNr

Vous trouverez 2 types d'enregistrements : cell-attached (extracellulaire) et Whole cell recording WCR (intracellulaire)

Important: Vous trouverez deux types des signaux qu'il faudra bien différencier des:

-**Signaux en voltage** (potentiels d'action ou potentiels synaptiques) enregistrés en **ICLAMP**

-**Signaux en courant** (courant entrants et courants synaptiques) enregistrés en **VCLAMP**

-Le Programme d'analyses est **Clampfit** d'Axon Instruments

-Les datas se trouvent dans le fichier TP No2 potentiel synaptique

EXERCICES

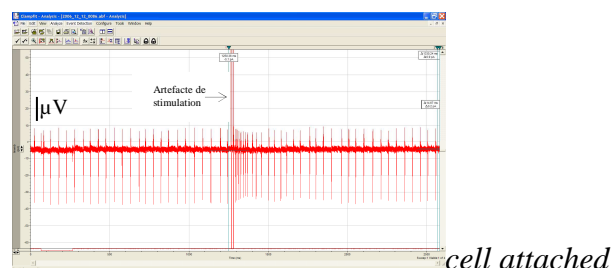
1. ENREGISTREMENTS EXTRACELLULAIRES (configuration cell-attached)

-Dans le dossier cell-attached sélectionnez le fichier « stim afférences excitatrices » : Ouvrez le **file 0087** Sélectionnez un seul canal et un seul *sweep*.

Observez l'enregistrement de l'activité basale spontanée et puis de l'activité évoqué par l'application d'un stimulus externe (un pulse).

Attention : le moment d'application de stimulus est indiqué par un grand artefact bien différencié sur le canal non-filtré

A. STIMULATION DES AFFERENCES EXCITATRICES



Aa. Analysez la réponse à **1** (0087) et **2** (0086) **stimuli**.

- Décrivez le type de réponse évoquée par le stimulus, Combien de temps dure la réponse ?
- Quel est le délai (latence) de la réponse par rapport au début du stimulus ?
- Quel est le nombre des potentiels d'action que sont évoqués ?
- Quel type de neurotransmetteur est impliqué ?

Ab. Dans le fichier 006 «stimulation à 8 Hz » plusieurs stimuli ont été appliqués (10 stimuli).

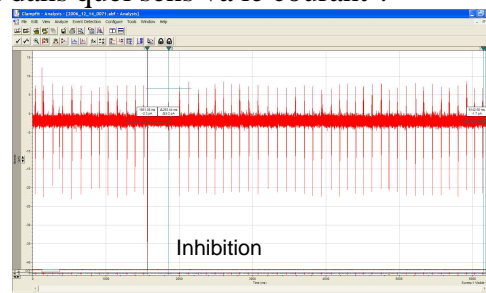
- Quelle est la réponse au stimulus et quelle est la relation stimulus-réponse : 1:1, 1:2 etc.?
- Que se passe-t-il si le stimulus tombe sur un potentiel d'action ? Pour quoi ?
- Existe-t-il une différence entre potentiel d'action spontanés et PA évoqué par le stimulus ?
- Quelle est la différence de fréquence entre la période basale (pré-stim) et la période stimulé ?
- Que diriez-vous sur le stimulus en relation au seuil de potentiel d'action de la cellule ; est-il : liminaire (50% de réponses), infraliminaire (zéro réponses) ou supraliminaire (100% de réponses= $1 \text{ stimulus} : 1 \text{ réponse}$) ?

B. STIMULATION DES AFFERENCES INHIBITRICES

-Sélectionnez le dossier cell-attached puis le fichier « stim des afférences inhibitrices »

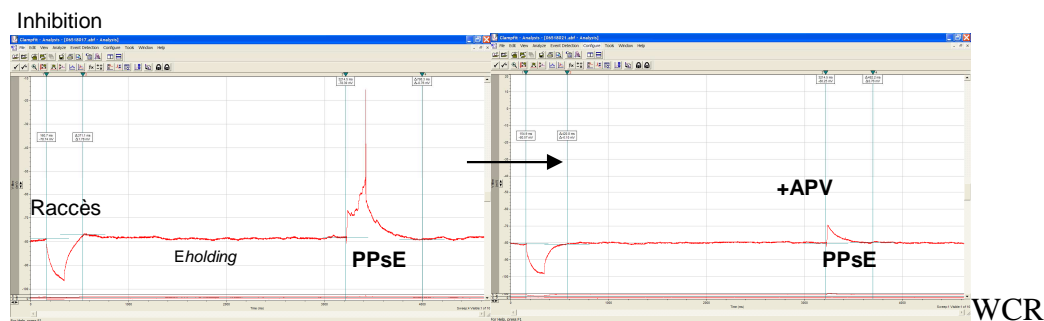
Ouvrez le **file 0071** : celui-ci est l'enregistrement contrôle (dans le premier canal vous observez la réponse à un stimulus); puis ouvrez les files **0072 et 0073** qui sont des enregistrements tests : enregistrements d'activité synaptique de la même cellule après avoir reçu de la Gabazine (un bloquant des synapses inhibitrices GABA) appliquée dans le milieu externe (Mext) ou milieu de perfusion. Observez l'effet après 5 minutes (file 0072) et 10 minutes (file 0073) d'application.

- Quel est l'effet de la Gabazine sur l'activité spontanée?
- Quel type de récepteur GABA est impliqué ?
- Quels ions sont impliqués et dans quel sens va le courant ?



2. ENREGISTREMENT INTRACELLULAIRE (patch-clamp WCR en ICLAMP)

A. STIMULATION DES AFFERENCES EXCITATRICES (PPSEs)



-Dans IClamp ouvrir le dossier PPSE (POTENTIEL POST-SYNAPTIQUE EXCITATEUR)

Les potentiels post-synaptique excitateurs (PPSE) ont été enregistrés dans les neurones de la substantia nigra (SNr) en absence des entrées inhibitrices (application de Gabazine dans le Milieu extérieur).

Tout d'abord, au début de l'enregistrement on applique un court stimulus intracellulaire hyperpolarisant de 30pA d'amplitude et de 180ms de durée, juste pour vérifier le bon état du seal (résistance d'accès), 3 sec après celui-ci un stimulus extracellulaire pour analyser la réponse synaptique.

a. Ouvrez le file 0017

-Décrire la cinétique des phases du potentiel synaptique excitateur (file 0017) : la phase précoce courte (réponse initiale) et la phase tardive longue du PPSE.

-Quel type des récepteurs sont impliqués dans chaque phase (pour rappel chaque récepteur a sa propre cinétique d'activation et d'inactivation).

-Mesurer : l'amplitude et la durée du Potentiel synaptique

-Déterminer : le seuil de potentiel d'action en mV

-Prédire les types des courants ioniques impliqués en chaque phase.

b. Ouvrez le file 0020

Sur la même cellule un bloqueur des courants glutamatergiques (l'APV) a été appliqué. Observez la réponse à l'APV tout d'abord dans le file 0020 (5min) puis dans le file 0021 (10min). Quel est l'effet net de l'APV ? Quel type des courants Glutamatergiques bloque t-il ? Voir figure ci-dessus.

c. Ouvrez le file 0022

Un stimulus de 10Hz (8 stimuli) a été appliqué (toujours en présence d'APV)

-Comment est la réponse synaptique par rapport au stimulus (1 :1, 1 :2), comment devient la réponse dans le temps ?

d. Dans le fichier « stimulation subliminaire » file 0037, 5 stimulus subliminaires ont été appliqué, que pouvez vous en déduire, quel type de propriété synaptique est observé.

B. STIMULATION DES AFFERENCES INHIBITRICES (PPSI_s)

-Dans le **dossier PPSI** (POTENTIEL POST-SYNAPTIQUE INHIBITEUR) **file 0027**

Pour observer les potentiels synaptiques inhibiteurs, la réponse à différents stimulus hyperpolarisants et dépolarisants ont été enregistrés en ICLAMP en présence d'un bloqueur des synapses glutamatergiques ionotropiques: Le CNQX.

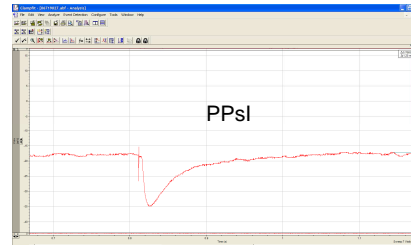
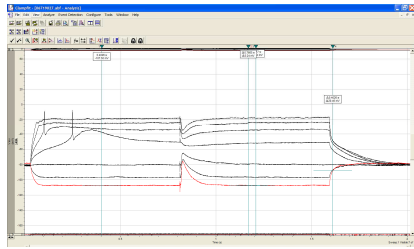
-Pour vérifier qu'il s'agit d'un courant synaptique GABA on utilise 2 stratégies :

1. La première consiste en vérifier que le potentiel d'inversion (inversion de courant) du courant synaptique enregistré est proche du *potentiel d'inversion théorique du chlore* ($E_{inv} = -65mV$).

a. Mesurez à quel niveau approximatif de potentiel la réponse synaptique s'inverse.

b. Que signifie un potentiel dépolarisant GABA (tracés inférieurs) et quid d'un potentiel hyperpolarisant GABA (tracés supérieurs) du file 0027. Dans quels sens serait le flux d'ions chlorure ?

2. La deuxième consiste en utiliser un bloquant des récepteurs GABA_A tel la Gabazine. Observez l'effet de la Gabazine dans le **file 0041**. Vérifiez et représentez ces stratégies.



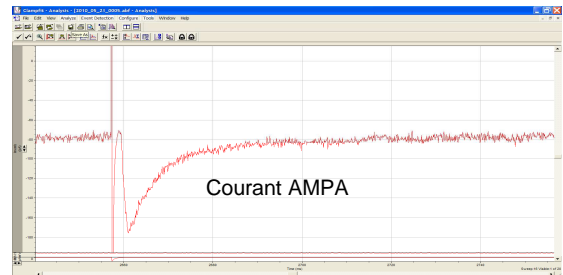
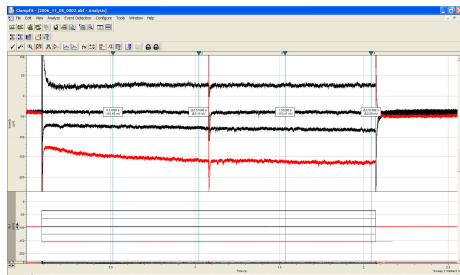
3. ENREGISTREMENT INTRACELLULAIRE (patch-clamp WCR en VCLAMP)

ANALYSES DES COURANTS SYNAPTIQUES EXCITATRICES AMPA

Dans le **dossier VCLAMP « courant AMPA »** vous trouverez des enregistrements en courant des cellules de la SNr. Ce sont des courants glutamatergiques conduites par des récepteurs AMPA (après blocage des courants NMDA par APV).

Représentez le courant en situation contrôle (002) (Imemb en pA). Et après l'application de CNQX (un bloquant des courants AMPA) (files 0011 et 0012). Attention Ne pas confondre artefact de stimulation et courant ionique.

- Indiquez quel est le sens de courant (entrant ou sortant)
- Quels types d'ions sont impliqués ?
- Quel est le potentiel d'inversion ?



Conclusions :

- Comment peut-on enregistrer les signaux synaptiques ?
- Comment reconnaître un signal synaptique excitateur d'un signal inhibiteur ?
- Quels types des courants ioniques sont induits par l'activation des récepteurs AMPA, NMDA et par l'activation des récepteurs GABA_A ?