

Published in :

Bulletin de la Classe des Sciences de l'Académie Royale de Belgique, 317 : 1780, 2011.

<http://www.academieroyale-sciences.be/cgi?lg=fr&pag=1780&tab=317&rec=8&frm=0>

Le « dynamic-clamp »: quand les modèles théoriques interagissent directement avec des neurones vivants pour en révéler les propriétés intégratives.

Alain Destexhe,

Unité de Neurosciences, Information et Complexité (UNIC), CNRS, Gif sur Yvette, France.

<http://cns.iaf.cnrs-gif.fr>

L'objet de cet article est de donner un aperçu des possibilités de la technique de « dynamic-clamp », par laquelle des modèles théoriques sont mis en interaction directe avec des cellules vivantes. Cette technique est illustrée par l'étude des *états de haute conductance* des neurones du cortex cérébral. Elle ouvre la voie à de nouveaux paradigmes d'investigation des propriétés intégratives des neurones, où la théorie et l'expérience ne peuvent plus être dissociées.

Le *dynamic-clamp*

Le principe du *dynamic-clamp* (« imposition dynamique » en anglais) est le suivant: le potentiel de membrane des neurones varie suivant l'activation ou la désactivation de conductances membranaires. Pour interagir avec le neurone de façon « naturelle », il faut donc idéalement soit altérer les conductances existantes, ou bien ajouter ou retirer des conductances dans la membrane du neurone. Malheureusement, ajouter ou soustraire une conductance est une opération difficile, parce que ces conductances sont associées aux canaux ioniques, qui laissent passer sélectivement certains types d'ions au travers de la membrane. Une alternative est d'injecter un courant, généré par ordinateur, et qui mime en détail le courant ionique de conductances membranaires, c'est le principe du *dynamic-clamp*.

La technique d'enregistrement intracellulaire (illustrée à la Figure 1) permet d'enregistrer le potentiel $V(t)$, et d'injecter un courant $I(t)$. Pour une conductance donnée $G(t)$, le courant est donné par la loi d'Ohm:

$$I(t) = G(t) * [V(t) - E]$$

où E est, pour cette conductance, le potentiel d'équilibre de la membrane lorsqu'aucun courant ne la traverse (*potentiel d'équilibre de Nernst*).

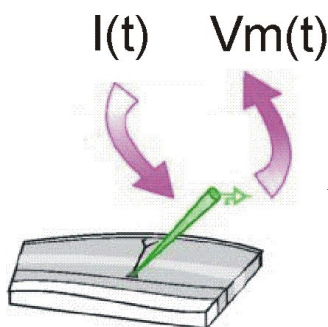


Figure 1: Enregistrement intracellulaire d'un neurone au moyen d'une micropipette (en vert). L'enregistrement permet

physiquement de lire le potentiel de membrane $V_m(t)$ tout en injectant simultanément un courant $I(t)$.

La difficulté technique réside dans le fait que si l'on veut ajouter une conductance $G(t)$ dans un neurone, il faut calculer $I(t)$ selon l'équation ci-dessus, mais l'injection de $I(t)$ va elle-même modifier le potentiel $V(t)$, ce qui modifie en retour $I(t)$. La procédure est donc de lire le V , calculer I , injecter I , relire le V résultant, recalculer I , etc. En d'autres termes, il faut réaliser une boucle de rétroaction en temps réel avec la cellule. Le $G(t)$ est en général calculé par un modèle théorique (par exemple résolution d'une équation différentielle), ce qui permet d'ajouter une ou plusieurs conductances dans un neurone. Ce principe de *dynamic-clamp* a été initialement introduit en physiologie des cellules cardiaques [1], et s'est ensuite généralisé à de nombreux domaines et il trouve la plupart de ses applications actuelles en neurobiologie [2-4] (pour une revue exhaustive voir [5]).

Recréer *in vitro* les conditions *in vivo*

Cet article illustre un exemple spécifique d'application de la technique du *dynamic-clamp*, l'injection de conductances¹ pour recréer les conditions physiologiques de neurones dans le cerveau *in vivo*. Les enregistrements intracellulaires *in vivo* sont difficiles à réaliser techniquement, et instables (à cause des pulsations cardiaques, mouvements de l'animal, etc). Il est beaucoup plus facile d'enregistrer des neurones *in vitro*, mais dans ce type de préparation, les neurones sont dans un état de repos très différent de leur état *in vivo*. Les neurones *in vivo* sont caractérisés par des « états de haute-conductance » [6,7], à cause du fait qu'ils reçoivent en permanence des milliers d'entrées synaptiques, chacune responsable de l'activation d'une conductance membranaire. Pour étudier ces états de haute conductance, il faut normalement enregistrer les neurones *in vivo*, ce qui est difficile techniquement. Une alternative est de recréer *in vitro* les conditions *in vivo*, ce qui est possible grâce à la technique du *dynamic-clamp*.

Si l'expérimentateur (ou son alter-ego théoricien) dispose d'un modèle théorique de l'activité des conductances *in vivo*, alors il est possible – grâce au *dynamic-clamp* – d'injecter ces conductances dans un neurone *in vitro* et recréer les conditions *in vivo* tout en bénéficiant des avantages de la technique *in vitro* (facilité de stimulation, stabilité et qualité des enregistrements, etc). La Figure 2 illustre une expérience de *dynamic-clamp* pour recréer les conditions *in vivo* dans un neurone du cortex visuel *in vitro*. Des états de haute conductance, très similaires aux conditions *in vivo*, sont obtenus en injectant deux conductances, qui représentent l'activité des synapses excitatrices (G_e) et inhibitrices (G_i), dont l'activité est importante *in vivo*. G_e et G_i sont simulées par ordinateur en résolvant une équation différentielle stochastique, et elles sont simultanément injectées dans le neurone en calculant le courant selon la loi d'Ohm (voir ci-dessus). Cette technique permet de recréer un potentiel de membrane fluctuant et un état de conductance très similaires aux enregistrements *in vivo* [8].

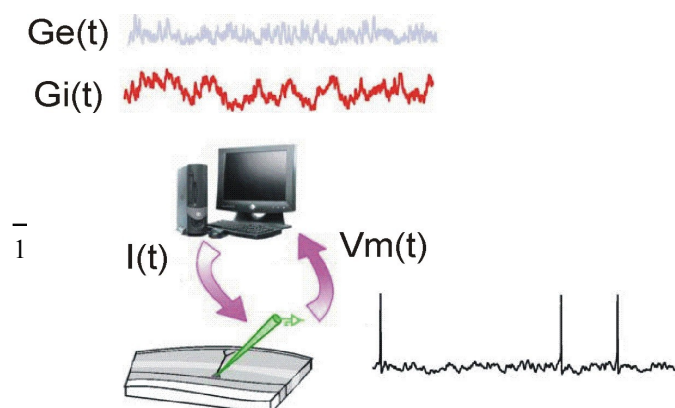


Figure 2: Injection en « *dynamic-clamp* » de conductances fluctuantes pour recréer les conditions électrophysiologiques *in vivo*. Les conductances $G_e(t)$ et $G_i(t)$ sont calculées par ordinateur (par *dynamic-clamp*).

exemple en résolvant une équation différentielle stochastique), et injectées dans la cellule sous forme de conductance. Le potentiel de membrane obtenu $V(t)$ est aussi fluctuant, et très proche des conditions *in vivo*.

Propriétés intégratives des neurones *in vivo*

Pourquoi est-il intéressant de recréer ces états de haute conductance *in vitro* ? La réponse est que les neurones ont des propriétés intégratives très différentes *in vivo*, parce que la présence de fortes conductances, et de niveaux importants de fluctuations du V_m , modifie certains paramètres essentiels de l'intégration membranaire. En plus des critères de simplicité et de stabilité, le *dynamic-clamp* offre un autre avantage très conséquent. Les conductances injectées sont entièrement générées par un modèle, ce qui permet de contrôler ses paramètres. Par exemple, on peut contrôler indépendamment le niveau de conductance et le niveau de fluctuations, ce qui n'est pas possible *in vivo*. Ceci a permis de caractériser séparément l'effet de ces deux paramètres. Il a été montré que la conductance contrôle le seuil d'excitabilité du neurone, tandis que les fluctuations contrôlent sa sensibilité (ou le « gain » du neurone).

Mais probablement l'effet le plus important, illustré à la Figure 3, est que les conditions de genèse des potentiels d'action (PA) sont très différentes en fonction de l'état de conductance du neurone. La technique de *dynamic-clamp* permet de contrôler les paramètres des conductances injectées et de générer deux états, de « basse » et « haute » conductance. Pour distinguer les variations de conductance qui ont mené aux PA, on calcule la « corrélation inverse », c'est à dire les variations de conductance, en moyenne, qui précèdent les PA (moyenne sur des centaines ou milliers de PA). Cette méthode révèle que dans le premier état (Fig. 3, gauche), les PA sont provoqués principalement par les conductances excitatrices, parce que la conductance totale de la membrane augmente juste avant le PA, et cette augmentation est nécessairement due à l'excitation. Dans le second état (Fig. 3, droite), de haute conductance, les PA sont provoqués principalement par les conductances inhibitrices, parce que dans ce cas, la conductance totale de la membrane diminue juste avant le PA, et cette diminution est nécessairement due à l'inhibition. Dans les états de haute conductance, la plupart des PA sont donc provoqués par une *dis-inhibition*.

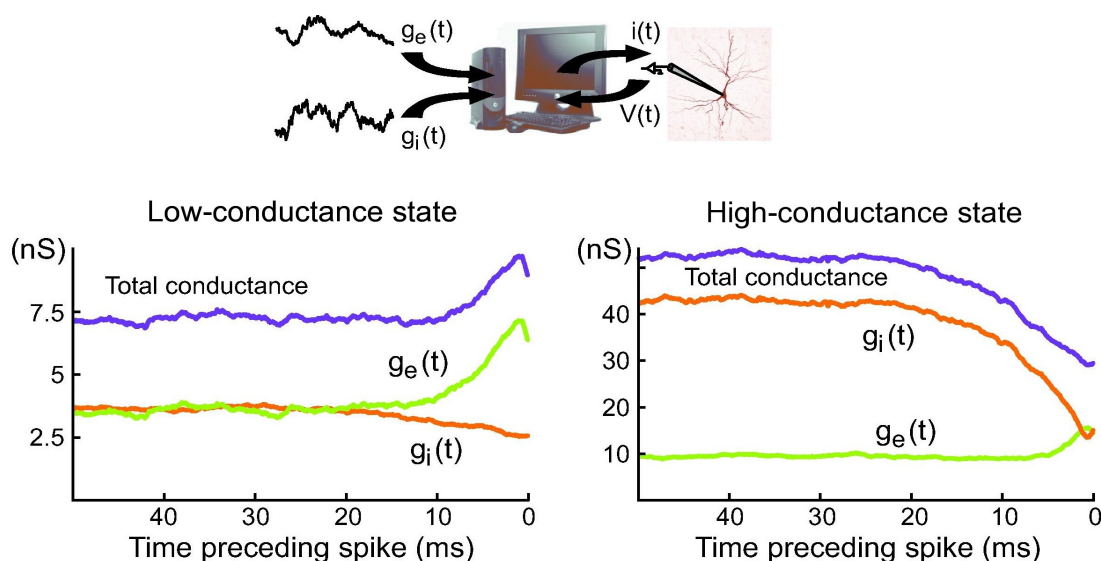
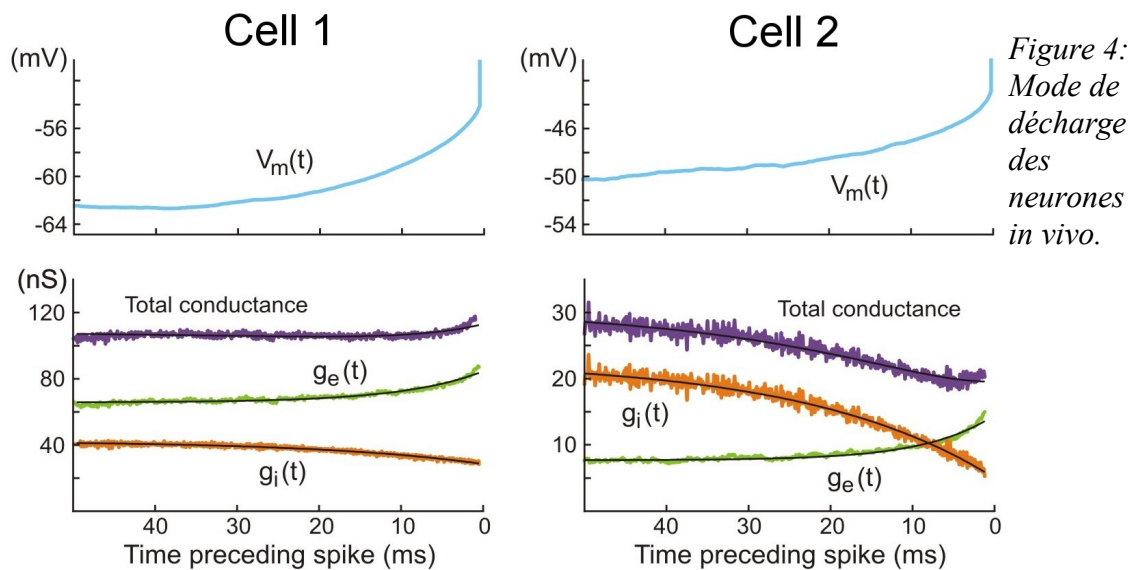


Figure 3: Détermination de deux modes de décharge par dynamic-clamp. Les conductances moyennes liées aux potentiels d'action (PA) sont calculées. Schéma: injection de conductances stochastiques dans un neurone par la technique de dynamic-clamp. En bas: conductance totale (bleu), conductance excitatrice (vert) et conductance inhibitrice (orange) pendant les 50 ms précédant les PA. Gauche: état de basse conductance: les conductances injectées sont d'amplitude faible, et le PA est généré par une augmentation de conductance excitatrice, qui entraîne une augmentation de conductance totale. Droite: état de haute conductance: les conductances injectées sont fortes (plus proche de la situation *in vivo*). Le PA est précédé d'une diminution de conductance, qui est causée par une diminution d'inhibition.

Quel mode de décharge *in vivo* ?(10/11)

Les expériences décrites ci-dessus indiquent l'existence de deux modes de décharge, mais il reste à démontrer quel est le mode présent *in vivo*. Dans ce but, une procédure mathématique a été développée pour estimer les corrélations inverses des conductances *in vivo* [9]. Cette procédure consiste à calculer la corrélation inverse du potentiel de membrane, et d'en extraire (par une méthode probabiliste) la corrélation inverse des conductances. Les résultats de cette analyse, réalisée sur des enregistrements intracellulaire chez le chat *in vivo* [10], est illustrée à la Figure 4. La majorité des cellules analysées (10/11) exhibent un mode de décharge par disinhibition, typique des états de haute conductance, tant pour l'animal éveillé que pendant le sommeil à ondes lentes et le sommeil paradoxal [10].



Corrélation inverse obtenue dans un neurone chez le chat éveillé. Le potentiel de membrane moyen (haut) et les conductances moyennes (bas) sont indiquées (bleu = conductance totale, vert = conductance excitatrice, orange = conductance inhibitrice). Cell 1: exemple de cellule dans un mode de basse conductance; Cell 2: exemple de cellule dans un mode de haute conductance. Ce dernier cas constitue la grande majorité (10/11) des cellules enregistrées en intracellulaire chez l'animal éveillé. Modifié d'après [10]

Conclusions

Cet article a illustré trois points importants. Premièrement, la technique du *dynamic-clamp* [1-5] permet de recréer *in vitro* les conditions *in vivo* par injection de conductances fluctuantes, ce qui permet un contrôle fin des paramètres de ces conductances et d'en identifier leur rôle. Cette technique nécessite de mettre en interaction directe des modèles théoriques (qui génèrent les conductances) et l'expérimentation biologique (enregistrement intracellulaire).

Deuxièmement, ce travail démontre l'importance des conductances et de leurs paramètres, qui déterminent le mode de décharge des neurones. Non seulement les fluctuations jouent un rôle primordial, mais selon l'état de conductance, ce sont les fluctuations de l'excitation ou celles de l'inhibition qui contrôlent la décharge des neurones. L'implication physiologique du mode de décharge par l'inhibition est importante, d'une part parce qu'elle donne un rôle plus important que prévu aux neurones inhibiteurs *in vivo*, et d'autre part parce que ce type de dynamique provient nécessairement de l'activité récurrente. Ceci veut dire que la majorité des décharges des neurones ne sont pas provoquées par une activité externe mais une activité *interne* au cortex cérébral. Les conséquences de ces contraintes sur le traitement d'information par les réseaux neuronaux corticaux sont potentiellement importantes [11].

Finalement, cet article illustre le fait que la combinaison de méthodes théoriques et expérimentales permet d'ouvrir de nouveaux champs d'investigation. Cette combinaison, illustrée ici par la technique de *dynamic-clamp*, a permis la découverte et l'identification de deux modes fondamentalement différents de la décharge des neurones, ce qui aurait été impossible par des études expérimentales ou théoriques isolées. Cette combinaison offre de nombreuses autres possibilités [5,11] et constitue un bel exemple de synergie entre théoriciens et expérimentateurs en biologie.

Remerciements

Recherche subventionnée par le CNRS, l'ANR et la Communauté Européenne (projet FACETS). Je remercie mes partenaires expérimentateurs, Thierry Bal (UNIC), Jean-Marc Fellous (University of Arizona, USA), Zuzanna Piwkowska (UNIC), Igor Timofeev et Mircea Steriade (Université Laval, Canada), avec qui les expériences et analyses illustrées ici ont été réalisées.

Références

[1] Scott S. *Stimulation Simulations of Young Yet Cultured Beating Hearts*. PhD Thesis, Buffalo, NY: State, University of New York, 1979.

[2] Robinson HP and Kawai N. Injection of digitally synthesized synaptic conductance transients to measure the integrative properties of neurons. *J. Neurosci. Methods* 49: 157-165, 1993.

[3] Sharp AA, O'Neil MB, Abbott LF and Marder E. Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons. *J. Neurophysiol.* 69: 992-995, 1993.

[4] Prinz AA. Dynamic-clamp. *Scholarpedia* (in press, 2011).
http://www.scholarpedia.org/article/Dynamic_clamp

[5] Destexhe A & Bal T. (Editors) *The Dynamic-clamp: From Principles to Applications*, Springer, New York, 2009.

[6] Destexhe A, Rudolph M & Paré D. The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nature Reviews Neurosci.* 4: 739-751, 2003.

[7] Destexhe, A. High-conductance state. *Scholarpedia* 2(11): 1341 (2007)
http://www.scholarpedia.org/article/High-Conductance_State

[8] Destexhe A, Rudolph M, Fellous JM & Sejnowski TJ. Fluctuating conductances recreate in-vivo-like activity in neocortical neurons. *Neuroscience* 107: 13-24, 2001.

[9] Pospischil M, Piwkowska Z, Rudolph M, Bal T & Destexhe A. Calculating event-triggered average synaptic conductances from the membrane potential. *J. Neurophysiol.* 97: 2544-2552, 2007.

[10] Rudolph M, Pospischil M, Timofeev I & Destexhe A. Inhibition determines membrane potential dynamics and controls action potential generation in awake and sleeping cat cortex. *J. Neurosci.* 27: 5280-5290, 2007.

[11] Destexhe A & Rudolph-Lilith M. *Neuronal Noise*. Springer, New York, 2011 (in press).

Summary

In cerebral cortex *in vivo*, neurons permanently receive thousands of synaptic inputs, establishing a “high-conductance state”, in which the integrative properties of neurons are profoundly modified. It is thus necessary to understand such states in order to have access to the mechanisms of information processing in cerebral cortex. This paper reviews a recent technique, the “dynamic-clamp”, in which theoretical models directly interact with living cells. This technique allows studying high-conductance states in neurons by recreating synaptic inputs completely controlled by the theoretical models. It opens the path to understand neuronal information processing through novel paradigms where theory and experiments cannot be dissociated.

Résumé

Les neurones du cortex cérébral *in vivo* sont en permanence soumis à des milliers d'entrées synaptiques, qui établissent un “état de haute conductance”. Cet état modifie profondément les propriétés intégratives des neurones, et il est donc indispensable de bien comprendre ces états pour pouvoir accéder aux mécanismes de traitement d'information du cortex cérébral. Cet article examine une technique récente, le “dynamic-clamp”, par laquelle des modèles théoriques interagissent directement avec des cellules vivantes. Cette technique permet l'étude d'états de haute conductance des neurones en recréant les entrées synaptiques de manière contrôlée par les modèles théoriques. Elle ouvre la voie à la compréhension du traitement d'information neuronale au travers de paradigmes où la théorie et l'expérience ne peuvent être dissociées.