



HAL
open science

**Caractérisation des sous-unités principales et auxiliaires
des canaux sodium dépendant du potentiel exprimées
dans le système nerveux central de l'insecte *periplaneta
americana***

Bénédicte Moignot

► **To cite this version:**

Bénédicte Moignot. Caractérisation des sous-unités principales et auxiliaires des canaux sodium dépendant du potentiel exprimées dans le système nerveux central de l'insecte *periplaneta americana*. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2010. Français. NNT : . tel-00491350

HAL Id: tel-00491350

<https://theses.hal.science/tel-00491350>

Submitted on 11 Jun 2010

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.

**CARACTERISATION DES SOUS-UNITES PRINCIPALES ET AUXILIAIRES
DES CANAUX SODIUM DEPENDANT DU POTENTIEL EXPRIMEES DANS
LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE L'INSECTE *PERIPLANETA
AMERICANA***

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Biologie des organismes

ECOLE DOCTORALE : VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER

Présentée et soutenue publiquement

le : 29 Janvier 2010

à : Angers

par : Bénédicte Moignot

Devant le jury ci-dessous :

| | |
|--|--------------|
| Mme Emmanuelle Jacquin-Joly , Directrice de Recherches INRA, Versailles | Rapporteuse |
| M. David Sattelle , Professeur de l'Université d'Oxford | Rapporteur |
| Mme Valérie Raymond-Delpech , Maître de conférences de l'Université Paul Sabatier, Toulouse | Examinatrice |
| M. Bruno Lapied , Professeur de l'Université d'Angers | Examinateur |
| Directeur de thèse : M. Christian Legros , Maître de conférences de l'Université d'Angers | |

RESUME

Chez les insectes, un seul et unique gène code la sous-unité principale α des canaux sodium dépendant du potentiel (Na_v). De plus, quatre à cinq gènes codent les sous-unités auxiliaires β . Bien que la blatte, *Periplaneta americana*, soit un modèle en neurophysiologie, il n'existe aucune donnée sur les structures moléculaires des canaux Na_v de cette espèce. L'objectif de cette thèse était de caractériser les canaux Na_v exprimés au niveau de la chaîne nerveuse (CN), du dernier ganglion abdominal (DGA) et des DUM neurones octopaminergiques.

Tout d'abord, nous avons mis en évidence que la diversité moléculaire de la sous-unité principale est générée par épissage alternatif au niveau de trois régions du canal. Les combinaisons d'exons majoritaires identifiées parmi les ADNc de CN et du DGA sont l'exon A seul (boucle L1), la combinaison EFHG¹¹²⁹ (boucle L2) et l'exon G1 (IIIS3-S4). En dépit de cette diversité moléculaire, nous n'avons isolé qu'un seul ADNc de 6153 pb codant une sous-unité principale dénommée PaNa_v1. La combinaison d'exons alternatifs caractérisant cette isoforme (J, A, E, F, G¹¹²⁹, H, G1) s'est alors avérée représentative des ADNc les plus exprimés dans la CN et le DGA. Par contraste, dans les neurones DUM, nous n'avons identifié qu'une seule population d'ADNc codant chaque région citée précédemment. Par ailleurs, une analyse bioinformatique à partir des génomes séquencés d'insecte a permis de montrer que les exons optionnels I et F sont les moins conservés entre les différents ordres d'insecte.

Parallèlement à la caractérisation des sous-unités principales classiques, nous avons découvert un nouveau gène codant des sous-unités α atypiques nommées PaFPC1 et PaFPC2. Ces dernières comptent 1153 résidus d'acide aminé dont huit qui les distinguent. Elles partagent seulement 59% d'identité protéique avec PaNa_v1. L'absence du motif moléculaire impliqué dans l'inactivation des canaux Na_v suggère que ces nouvelles sous-unités possèdent des propriétés électrophysiologiques originales. Une analyse phylogénétique détaillée a permis de montrer que PaFPC1 se branche à la base des sous-unités α des canaux Na_v d'insecte. Cette découverte montre alors pour la première fois l'existence d'un événement de duplication du gène des canaux Na_v chez les insectes.

Finalement, nous avons clonés deux populations d'ADNc codant des sous-unités auxiliaires nommées PaTEH1.1 et PaTEH1.2. Grâce à la récente mise à disposition du génome de plusieurs espèces d'insecte, nous avons pu conduire une étude phylogénétique clarifiant la situation des sous-unités auxiliaires de canaux Na_v au sein de ce taxon. De plus, une étude électrophysiologique préliminaire dans des ovocytes de xénope a permis de montrer que PaTEH1.1 se comporte comme une protéine chaperonne. C'est à dire qu'elle augmente significativement l'expression des sous-unités principales d'insecte.

Ainsi, nos résultats originaux offrent un nouveau regard sur les canaux Na_v et ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des acteurs moléculaires à la base de l'excitabilité membranaire chez les insectes.

Mots-clés : insecte, canaux sodium dépendant du potentiel, RT-PCR, électrophysiologie, phylogénie

ABSTRACT

In insects, only one gene encodes the α pore-forming subunit of voltage-gated sodium channel (Na_v). In addition, four to five genes encode the β auxiliary subunits. Although the American cockroach, *Periplaneta americana*, is a model in insect neurophysiology, few data describe the molecular structures at the base of the Na_v . The aim of our study was to characterize the subunits expressed in the nerve cord (NC), the terminal abdominal ganglion (TAG) and DUM neurons of this particular species.

First, we showed that the molecular diversity of the α subunit is generated by alternative splicing in NC and TAG. The main alternative exons identified in the cloned cDNA are A (loop L1), EFGHG¹¹²⁹ (loop L2) and G1 (IIIS3-S4). Despite of the molecular diversity, only one 6153-bp cDNA encoding PaNa_v1 has been identified. This isoform is characterized by the alternative exons (J, A; E; F; G¹¹²⁹, H and G1) highly expressed in the NC and TAG. On the opposite, only one type of cDNA has been identified in DUM neurons. Altogether, these results show that molecular diversity is lower at the cellular level. Moreover, a bioinformatic analysis showed the optional exons I and F are the most divergent currently known exons between insect orders.

In addition, we discovered two full-length cDNAs encoding atypical α subunits named PaFPC1 and PaFPC2. They contain 1553 amino acid residues and differ from each other by eight punctual mutations. They share 59% protein identity with PaNa_v1. The absence of the inactivation particle MFMT suggests that these novel subunits mediate original electrophysiological properties. However, a detailed phylogenetic analysis puts forward that PaFPC is a novel member of the insect Na_v channels. Hence; this discovery shows for the first time the existence of an ancestral duplication event of the Na_v gene in insects.

Finally, we cloned two cDNA populations encoding auxiliary subunits named PaTEH1.1 and PaTEH1.2. A phylogenetic analysis clarifies the relationships between the different families of insect auxiliary subunit. Moreover, a preliminary electrophysiological study showed that PaTEH1.1 increased significantly the expression of the pore-forming subunit of insect Na_v in *Xenopus* oocytes.

In conclusion, our results constitute new insights in insect ion channels field. In addition, they open new research perspectives for understanding the molecular basis of the membrane excitability in insects.

Key-words: insect, voltage-gated sodium channels, RT-PCR, electrophysiology, phylogeny

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire Récepteur et Canaux Ioniques membranaires de l'Université d'Angers et a été soutenue financièrement par la région des Pays de la Loire.

JE REMERCIE :

Professeur Bruno Lapied pour m'avoir accueillie parmi son équipe au cours de mon master recherche, puis de mon doctorat.

Directrice de Recherche Emmanuelle Jacquin-Joly, Professeur David Sattelle et Docteur Valérie Raymond-Delpech de me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs et d'examineurs.

Docteur Christian Legros qui m'a encadré et encouragé tout au long de ces années. Disponible à mon égard, je lui exprime toute ma gratitude pour m'avoir formé patiemment aux subtilités de la biologie moléculaire et pour m'avoir insufflé son dynamisme et son enthousiasme.

Docteurs Christophe Lemaire et Damien Picard pour leur collaboration aux études phylogénétiques. J'ai vraiment apprécié de découvrir cette discipline.

Docteur Hélène Tricoire-Leignel pour les discussions si enrichissantes que nous avons échangé. Au-delà de m'avoir encouragée avec constance, j'ai apprécié sa présence lors de mes premières années d'enseignement en tant que monitrice.

Sophie Quinchart pour son soutien technique, logistique et sa convivialité sincère.

Tous ceux qui m'ont encouragé et conseillé lors de la réalisation de ce travail : Docteur Alain Hamon, Docteur Steeve Thany, Docteur Patricia Licznar et Docteur Véronique Marchais.

Mes aînés Docteur Hélène Gautier, Docteur Céline Laviaille-Defaix, Docteur Laurence Murillo, Docteur Zeineb Es-Salah-Lamoureux et Docteur Antonin Ferry. Au quotidien, ils m'ont encouragé et fait part de leurs expériences et astuces de jeunes chercheurs. Je leur souhaite à chacun de belles envolées professionnelles et personnelles. Un petit clin d'œil tout particulier à Zeineb dont la générosité et l'enthousiasme m'ont particulièrement touchée et à Laurence pour son écoute attentive et ses conseils avisés.

Béatrice Dubois-Bodereau et Aly Mohammed qui terminent leur thèse. Je leur adresse mes plus sincères encouragements et leur souhaite beaucoup de réussite.

Céline Bourdin pour sa participation à l'expression des canaux Na_v dans des ovocytes de xénope et aux études électrophysiologiques lors de son master 2 et premiers mois de thèse. Ce fût un plaisir de te transmettre mes connaissances en bio mol, je te souhaite bonne chance pour la suite et j'espère que nous associerons nos résultats à de futures publications.

Safa Bouabid avec qui j'ai passé de très bons moments et des fous rires inoubliables. Persévérante et courageuse, je lui souhaite de réussir ses projets les plus chers...et j'espère que notre amitié perdura au-delà des frontières.

Marie Chevé, Marie Bidon, An Phu Ngwen pour leur participation et leur bonne humeur lors de nos expérimentations. C'est avec vous que j'ai vécu ma première expérience de tournage cinématographique ! Je vous adresse tous mes encouragements ainsi qu'aux doctorants et ATER que j'ai rencontré lors des derniers mois.

Olivier Laurec qui a configuré plusieurs de mes ordinateurs et m'a légué un des ses bureaux le temps de la rédaction.

Le Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur Centre pour le soutien financier qu'ils m'ont accordé tout au long de mon monitorat. Je les remercie aussi pour la qualité et l'originalité des formations liées à la pédagogie. A ce titre je remercie aussi le collège doctoral d'Angers et l'école doctorale VENAM pour la diversité des formations proposées.

Docteur Frédérique Deloffre-Vye qui m'a véritablement accompagné pour réussir et appréhender mon expérience professionnelle.

Mes amies d'enfance, Agathe et Virginie qui ont toujours été soucieuses de ma réussite et m'ont soutenu fidèlement. Merci à Agathe pour ses talents de secrétaire de rédaction et Virginie pour son objectivité qui m'a souvent éclairé. J'associe à ces remerciements Christophe pour ses vifs encouragements et son humour incontesté.

Mes Parents pour leur confiance, leur dévouement, leurs attentions bienveillantes et leurs encouragements. Je vous dédie ce manuscrit avec toute ma tendresse.

Mes neveux Alexis et Adrien ainsi que leurs parents Séverine et Thierry. Je vous dédie mon « exposé sur les cafards »...sans oublier mes cousins Audrey et Maxime.

Youyou pour tes encouragements sans faille et ton soutien moral.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 1 |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES | 3 |
| AVANT-PROPOS | 5 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 7 |
| CHAPITRE 1. LE CANAL SODIUM DEPENDANT DU POTENTIEL CHEZ LES ANIMAUX | 7 |
| <i>A Qu'est-ce qu'un canal sodium dépendant du potentiel ?</i> | 7 |
| <i>B Biologie moléculaire des canaux Na_v de vertébrés</i> | 10 |
| <i>C Biologie moléculaire des canaux Na_v des insectes</i> | 17 |
| <i>D Relation structure-fonction des canaux Na_v</i> | 29 |
| <i>E Pharmacologie moléculaire des canaux Na_v aux insecticides neurotoxiques</i> | 34 |
| <i>F Physiologie des courants Na⁺ d'insectes</i> | 41 |
| CHAPITRE 2. MODULATION DE LA STRUCTURE ET DE L'ACTIVITE DES CANAUX NA _v PAR DES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES ET POST-TRADUCTIONNELLES | 47 |
| <i>A Présentation générale des mécanismes générant de la diversité moléculaire</i> | 47 |
| <i>B Diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte par épissage alternatif</i> | 49 |
| <i>C Diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte par édition de l'ARN messenger</i> | 73 |
| <i>D Corrélation entre l'épissage alternatif et l'édition de l'ARNm</i> | 77 |
| <i>E Régulation de la traduction des ARN codant la sous-unité DmNa_v</i> | 78 |
| <i>F Mécanismes de modulation des courants Na⁺ du SNC par des voies de régulation intracellulaire</i> | 79 |
| CHAPITRE 3. DEFINITION DE LA PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE ET DES OBJECTIFS | 88 |
| <i>A Le contexte scientifique de nos recherches</i> | 88 |
| <i>B Notre hypothèse de recherche et les objectifs scientifiques associés</i> | 91 |
| MATERIELS ET METHODES | 94 |
| CHAPITRE 1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE <i>P. AMERICANA</i> : LE MODELE BIOLOGIQUE | 94 |
| <i>A Conditions d'élevage des blattes P. americana</i> | 94 |
| <i>B Le système nerveux central de la blatte P. americana</i> | 95 |
| CHAPITRE 2. ETUDE DE LA STRUCTURE DES CANAUX NA _v PAR UNE APPROCHE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE | 99 |
| <i>A Préparation des tissus</i> | 100 |
| <i>B Purification des ARNs</i> | 100 |
| <i>C Transcription inverse</i> | 103 |
| <i>D Amplification des ADNc ciblés par la technique de la polymérisation en chaîne</i> | 104 |
| <i>E Amplification de la sous-unité principale α exprimée dans la chaîne nerveuse</i> | 107 |
| <i>F Amplification d'une nouvelle sous-unité α apparentée aux canaux Na_v : PaFPC</i> | 115 |
| <i>G Amplification de la sous-unité auxiliaire β exprimée dans la chaîne nerveuse : PaTEH1</i> | 118 |
| <i>H Clonage des produits de PCR</i> | 124 |
| <i>I Analyse des séquences et identification des relations phylogénétiques</i> | 136 |

| | |
|---|------------|
| <i>J</i> Technique de la RT-PCR sur neurones DUM isolés | 137 |
| CHAPITRE 3. ETUDE DES COURANTS Na ⁺ PAR UNE APPROCHE ELECTROPHYSIOLOGIQUE | 148 |
| <i>A</i> Etude électrophysiologiques des courants Na ⁺ natifs des neurones DUM de <i>P. americana</i> par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière..... | 148 |
| <i>B</i> Expression de canaux Na _v recombinants dans des ovocytes de xénope et mesure électrophysiologique des courants Na ⁺ en potentiel imposé par la technique de double-microélectrodes intracellulaires..... | 157 |
| RESULTATS ET DISCUSSIONS | 160 |
| CHAPITRE 1. ETUDE DES CANAUX SODIUM DE LA BLATTE <i>P. AMERICANA</i> PAR UNE APPROCHE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE | 160 |
| <i>A</i> Clonage de l'ADNc codant la sous-unité α des canaux Na _v de la blatte <i>Periplaneta americana</i> | 161 |
| <i>B</i> Diversité moléculaire de la sous-unité α des canaux sodium exprimés dans la chaîne nerveuse..... | 172 |
| <i>C</i> Diversité moléculaire des canaux Na _v exprimés dans la chaîne nerveuse de <i>P. americana</i> | 176 |
| <i>D</i> Découverte d'un nouveau transcrit PaFPC | 186 |
| <i>E</i> Les transcrits de la sous-unité auxiliaire β des canaux sodium de la blatte <i>Periplaneta americana</i> | 201 |
| CHAPITRE 2. ETUDE DES CANAUX Na _v DE LA BLATTE <i>P. AMERICANA</i> PAR UNE APPROCHE D' ELECTROPHYSIOLOGIE | 216 |
| <i>A</i> Inhibition de l'expression de la sous-unité principale des canaux Na _v exprimée dans les neurones DUM par stratégie antisens | 216 |
| <i>B</i> Expression des sous-unités principales et auxiliaires dans l'ovocyte de xénope..... | 224 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 227 |
| CHAPITRE 1. CONCLUSIONS GENERALES | 229 |
| <i>A</i> La sous-unité PaNa _v 1 : une sous-unité très conservée parmi les sous-unités α des canaux Na _v d'insecte | 229 |
| <i>B</i> Les exons alternatifs : entre conservation et divergence | 230 |
| <i>C</i> Diversité moléculaire des canaux Na _v à différents niveaux de la chaîne nerveuse | 230 |
| <i>D</i> Découverte de la sous-unité PaFPC : mise en évidence d'une duplication du gène codant la sous-unité α de canaux Na _v chez <i>P. americana</i> | 231 |
| <i>E</i> Caractérisation des deux isoformes de sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2..... | 232 |
| CHAPITRE 2. PERSPECTIVES | 233 |
| <i>A</i> Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaFPC | 233 |
| <i>B</i> Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaTEH1.1 et PaTEH1.2..... | 233 |
| LISTE DES FIGURES | 236 |
| LISTE DES TABLEAUX | 239 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 241 |
| ANNEXES – PUBLICATIONS | 257 |

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

4-AP: 4-aminopyridine
ADAR : adenosine deaminase that acts on RNA
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : acide désoxyribonucléique génomique
AIC : akaike information criterion
AKAP : A-kinase anchore protein
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNc : acide ribonucléique complémentaire
ATP : adénosine triphosphate
BK β : sous-unité auxiliaire β du canal BKCa
BK_{Ca} : canal potassium dépendant activé par le calcium
BLAST : basic local alignment search tool
CAM: cell-adhesion molecule
CamKII : protéine kinase dépendant du complexe calcium-calmoduline
Ca_v : canaux calcique dépendant du potentiel
CIP : calf intestinal phosphatase
CIAP: calf intestinal alkaline phosphatase
CN: chaine nerveuse
DGA: dernier ganglion abdominal
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
DPM: dorsal paire median
DUM: dorsal unpaired median
DEPC: diéthylpyrocarbonate
DMDS: disulfure de diméthyle
ECS: editing site complementary sequence
EDTA: éthylène dinitrile tétraacétate
EGTA: a acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-*N,N,N',N'*-tétraacétique
FMRF-amide : Phénylalanine-Methionine-Arginine-Phénylalanine-amide
GABA : acide gamma aminobutyrique
GFP : green fluorescent protein
HEK : cellule embryonnaire humaine de rein
HEPES: acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique
INa : courant sodium dépendant du potentiel
IUB: International Union of Biochemistry

K_v: canaux potassium dépendant du potentiel
LB: luria broth
LZ: leucine zipper
M-MLV : moloney murine leukemia virus
MSG: mushroom shaped-accessory glands
MUSCLE: multiple sequence comparison by log-expectation
nAChr: récepteur nicotinique à l'acétylcholine
nap : non action potential
Na_v: canaux sodium dépendant du potentiel
OAS: oligonucléotides antisens
PA : potentiel d'action
PAUP : phylogenetic analysis using parsimony
PHYLIP: phylogeny inference package
PCR: polymerisation chain reaction
PKA: protéine kinase dépendant de l'AMPc
PKC : protéine kinase dépendant du calcium
POMA : paraneoplastic opsoclonus-myoclonus ataxia
RACE: rapid Amplification cDNA ends
RCPG : récepteur couplé à une protéine G
RLM : RNA ligase-mediated
RT-PCR : reverse transcription polymerisation chain reaction
SNC: système nerveux central
STX. Saxitoxine
SOS : standard oocytes saline
TAP : tobacco acid pyrophosphatase
TAE: Tris acetate EDTA
TEA: tétraéthylammonium
TEH: TipE homolog
TipE: temperature-induced paralysis locus E
TTX: tétrodotoxine
TM: transmembranaire
T_m: melting temperature ou temperature de fusion
Ts: temperature sensitive
uORF: upstream open reading frame
VUM: ventral unpaired median
X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

AVANT-PROPOS

Les insectes constituent indiscutablement le taxon animal le plus diversifié avec 5 à 10 millions d'espèces estimées, soit 63% du nombre total d'espèces décrites (Odegaard, 2000, Niven et coll., 2008). Bien que 0,4% des insectes soient considérés nuisibles pour les activités anthropiques, les ravages causés par ces derniers sont considérables tant pour la production agricole que la santé humaine et animale (Nicholson, 2007). Les pertes mondiales de productions agricoles liées aux insectes ravageurs de culture sont estimées à 18% (Oerke et coll., 2004). Plus de 400 arbovirus¹ ont été identifiés comme agents étiologiques et menacent, principalement en zones intertropicales, la santé publique et des cheptels (Nicholson, 2007). Ainsi, pour contrôler ces populations d'insectes nuisibles, de nombreux insecticides ciblant le système nerveux des insectes ont été commercialisés depuis le début des années 50 (Casida, 2009). Efficaces et de bon marché, ils garantissent non seulement des rendements agricoles élevés mais aussi un ensemble d'externalités positives (augmentation des revenus de l'exploitant, qualité sanitaire des denrées agricoles, diminution des prix...) (Cooper et coll., 2007). Cependant, le transfert des insecticides vers plusieurs compartiments de l'environnement a contribué à la dégradation de la qualité de l'air, du sol et de l'eau et leur présence menace les organismes non cibles (Observatoire des Résidus de Pesticides²). De ce fait, des liens entre l'exposition aux insecticides et la survenue de maladies neurodégénératives, de cancers et de troubles de la reproduction sont de plus en plus mis en évidence tant chez les applicateurs qu'au niveau de la population générale (Bjorling-Poulsen et coll., 2008, Testud et coll., 2008). Ainsi, face à cet inquiétant constat des effets adverses liés à l'application des insecticides, des mesures réglementaires visant à réduire, si possible, de 50 % leur utilisation impose la mise en œuvre de pratiques culturales plus économes en pesticides (Plan EcoPhyto 2018, 2008). Dans ce contexte socio-économique, l'étude de la neurotoxicologie des insectes s'avère plus que jamais nécessaire pour développer des insecticides plus spécifiques des insectes, efficaces à très faibles doses et peu rémanents dans l'environnement (Matsuda et coll., 2007).

Représentant plus de 300 millions d'années d'évolution, les insectes ont su coloniser une gamme variée d'habitats à la surface de la Terre (Megy et coll., 2009). Leur succès évolutif est attribué à un vaste répertoire de comportements déterminant leur mode d'alimentation, leur mobilité, leur stratégie de reproduction et leur mode de communication.

¹ de l'anglais « arthropod born virus », c'est-à-dire virus transmis par des arthropodes

² <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=547&ongletid=276>

L'évolution de cette extraordinaire diversité comportementale repose notamment sur des changements morphologiques et physiologiques importants de la chaîne nerveuse ventrale (Niven et coll., 2008). Ainsi, l'identification des acteurs cellulaires et moléculaires à la base de l'évolution des circuits neuronaux contrôlant les comportements des différentes espèces d'insectes constitue une source d'information essentielle pour concevoir des molécules insecticides spécifiques.

Le message nerveux diffusé au sein du système nerveux central et périphérique correspond à un signal de nature électrochimique transmis entre des neurones, c'est-à-dire des cellules excitables sensibles à des stimuli. L'excitabilité membranaire des neurones dépend de la composition protéique de la membrane cytoplasmique, en particulier de la présence de canaux ioniques dépendant du potentiel. Ces derniers sont activés par des variations du potentiel de la membrane et sont à l'initiative des potentiels d'action (PAs), unité de base du message nerveux de nature électrique. Les canaux sodium dépendant du potentiel (Na_v) sont responsables de la genèse et de la transmission des PAs (Hille, 2001). Leur niveau d'expression et leur structure moléculaire détermine alors le niveau d'excitabilité du neurone. Au sein d'un même insecte, de nombreux variants codant des canaux Na_v ont été identifiés (Dong, 2007). En revanche, l'importance fonctionnelle de cette incroyable diversité moléculaire reste encore peu connue, et sa compréhension constitue un véritable défi scientifique (Dong, communication personnelle). La découverte de subtiles divergences moléculaires et fonctionnelles entre les canaux Na_v d'insecte d'espèces différentes ouvre des perspectives intéressantes en termes de développement de molécules insecticides spécifiques.

Ainsi les recherches présentées dans ce manuscrit concernent les canaux Na_v exprimés dans la chaîne nerveuse de la blatte *Periplaneta americana*, modèle d'étude en neurobiologie des invertébrés. La première partie dresse l'état de l'art des canaux Na_v d'insecte tant sur le plan génétique, électrophysiologique et pharmacologique. La seconde partie porte sur la caractérisation de la diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans la chaîne nerveuse de *P. americana* par une approche de biologie moléculaire. La troisième partie s'attache à comprendre par une approche de biologie cellulaire le rôle fonctionnel des canaux Na_v identifiés. En guise de conclusion, l'ensemble des résultats sont discutés à la lumière des connaissances actuelles.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. LE CANAL SODIUM DEPENDANT DU POTENTIEL CHEZ LES ANIMAUX

A Qu'est-ce qu'un canal sodium dépendant du potentiel ?

Les animaux sont les seuls organismes pourvus d'un système nerveux capable de conduire rapidement le message nerveux (Hille, 1989). Ce dernier correspond à un signal électrochimique transmis entre les cellules excitables (neurones, cellules du muscle squelettique et cardiaque et cellules neuroendocrines). La transmission du signal électrique repose sur des variations rapides et transitoires du potentiel membranaire des cellules excitables. Ces variations sont nommées potentiel d'action (PA) et mettent en jeu, par dépolarisation de la membrane, des conductances sodiques et potassiques mises en évidence par Hodgkin et Huxley en 1952 (Figure 1) (revisitées dans la revue (Bezanilla, 2006)). Ces flux d'ions Na^+ et K^+ traversant la membrane sont contrôlés par des protéines membranaires caractérisées par un pore perméable aux ions (Figure 1).

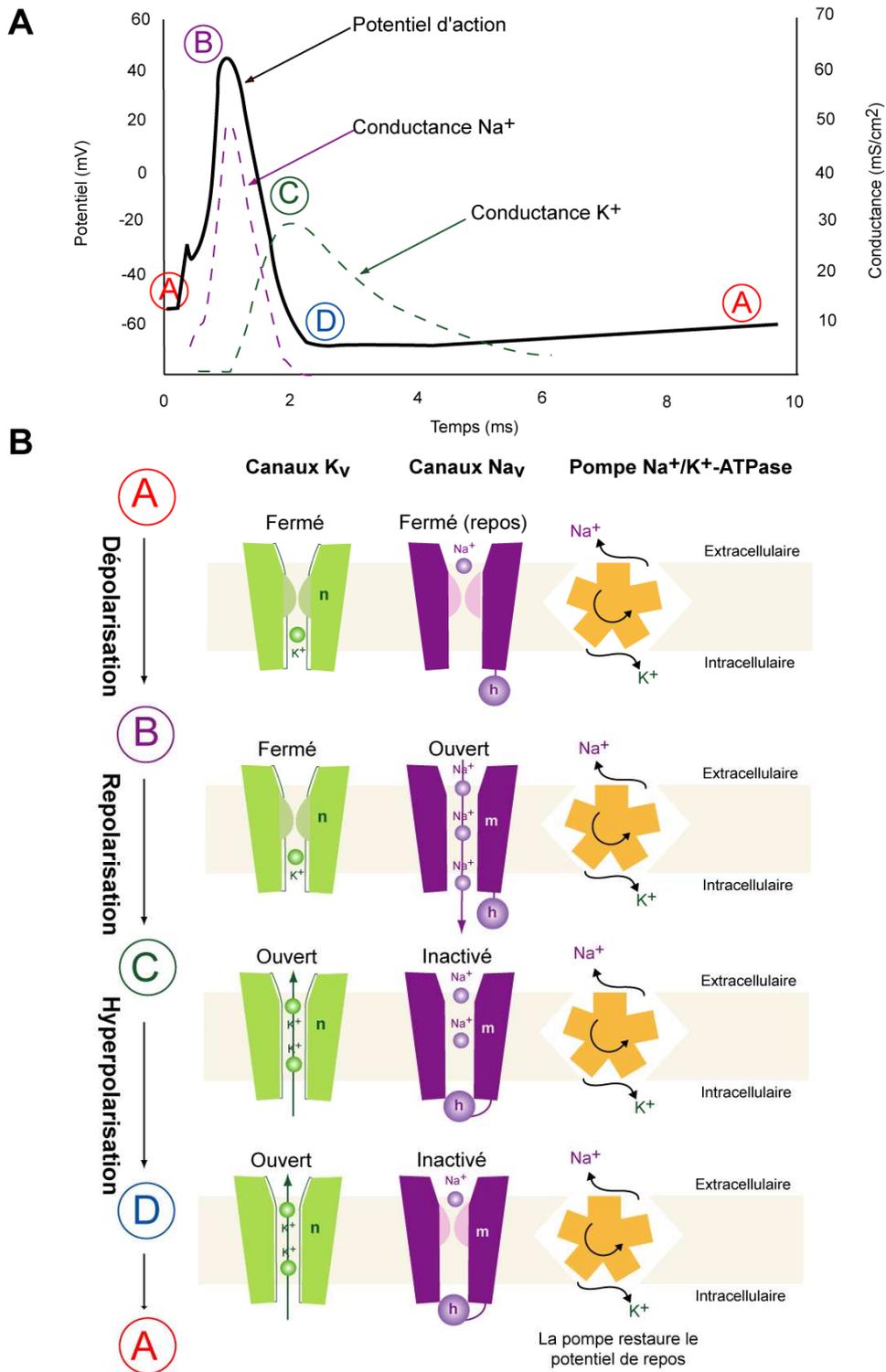


Figure 1 : Le potentiel d'action : conductances ioniques et structures moléculaires associées.

A. Evolution des conductances Na^+ et K^+ au cours du potentiel d'action (PA) mesurées à partir de l'axone de calmar (modifié d'après Bezanilla, 2006). Les lettres majuscules se référant aux transitions entre les différentes phases du PA sont reprises dans le schéma B.

B. Conformations des canaux Na_v et canaux K_v au cours des différentes phases du potentiel d'action (dépolariation, repolarisation et hyperpolariation). A l'état fermé, la porte n du canal K_v et la porte m du canal Na_v bloquent les flux ioniques. Au contraire, à l'état ouvert, elles sont ouvertes sous l'effet de la variation de potentiel et le pore de chaque canal devient perméable aux ions respectifs. Pour le canal Na_v , une seconde porte h bloque le flux d'ions Na^+ à l'état inactivé.

A l'état de repos, le potentiel de la membrane est négatif par rapport au milieu extracellulaire, de l'ordre de -60 mV pour un neurone. Lorsque le potentiel de la membrane augmente *via* une stimulation et atteint le seuil de déclenchement des PAs, les canaux sodium dépendant du potentiel (Na_v^3) sont activés et s'ouvrent (Figure 1). Les ions Na^+ entrent alors dans la cellule sous l'influence d'un gradient électrochimique. L'accumulation progressive de charges positives à l'intérieur de la cellule est responsable de la phase de dépolarisation des PAs. Puis, les canaux Na_v s'inactivent et le flux d'ions Na^+ cesse. Le potentiel dépolarisant de la cellule déclenche alors l'ouverture des canaux potassium dépendant du potentiel (K_v). Les ions K^+ sortent de la cellule sous l'influence d'un gradient électrochimique. La déperdition de charges positives est alors responsable de la phase de repolarisation. La fermeture tardive des canaux K_v est responsable de la phase d'hyperpolarisation. Cette ultime phase coïncide avec la période réfractaire au cours de laquelle la cellule n'est plus disposée à émettre de nouveaux PAs. Le rétablissement du potentiel de repos est alors assuré par des pompes Na^+/K^+ -ATPase. Au regard de la séquence des événements à l'origine des PAs, les canaux Na_v s'impose comme les acteurs moléculaires responsables de la genèse et de la transmission des PAs.

L'objectif de ce chapitre bibliographique est de discuter des connaissances acquises sur la biologie moléculaire et la physiologie des canaux Na_v d'insectes. Ainsi, une étude détaillée des gènes codant les canaux Na_v d'insecte s'attache à actualiser l'état des connaissances dans ce domaine. Puis, les propriétés biophysiques des courants Na^+ de différentes préparations neuronales d'insectes sont comparées pour en apprécier leur diversité. Enfin, la pharmacologie des canaux Na_v d'insecte aux insecticides neurotoxiques est discutée. Par ailleurs, étant donné que les canaux Na_v d'insecte partagent une forte homologie avec les canaux Na_v de vertébrés, nous présenterons des éléments majeurs caractérisant ces derniers.

³ Le symbole chimique Na fait référence aux ions sodium et l'indice v fait référence à l'activateur des canaux, à savoir le potentiel de la membrane ou « voltage » en anglais.

B Biologie moléculaire des canaux Na_v de vertébrés

B.1 Les sous-unités principales α

B.1.1 Découverte de la structure de la sous-unité α des canaux Na_v de vertébrés

La sous-unité principale α du canal Na_v est une glycoprotéine membranaire qui constitue un pore perméable aux ions. La caractérisation de la structure secondaire et des domaines fonctionnels de la sous-unité α a été réalisée à partir de plusieurs approches. L'avancée de la biochimie a permis de purifier la sous-unité α de l'organe électrique du poisson *Electrophorus electricus* à l'aide de [³H]tétrodotoxine (TTX), radioligand possédant une haute affinité pour les canaux Na_v (Agnew et coll., 1983). Puis, les outils de la biologie moléculaire ont permis d'isoler les ADNc codant le canal Na_v d'*E. electricus* grâce à des oligonucléotides et des anticorps spécifiques (Noda et coll., 1984). Ensuite, les transcrits codant la sous-unité α des canaux Na_v chez le rat ont été clonés (Noda et coll., 1986, Kayano et coll., 1988). Plus tard, des études de relations structure/fonction ont permis d'identifier les domaines fonctionnels impliqués dans l'activation, l'inactivation et la sélectivité aux ions Na⁺ (Heinemann et coll., 1992, West et coll., 1992, Kontis et coll., 1997).

B.1.2 Structure de la sous-unité principale α

La sous-unité α principale des canaux Na_v appartient à la superfamille des canaux ioniques dépendant du potentiel caractérisés par la tétramérisation d'un domaine pore (Hille, 2001). Les canaux Na_v font partie d'une sous-famille de canaux ioniques dont le pore est constitué d'une sous-unité α comportant quatre domaines transmembranaires répétés en tandem (DI à DIV). Dès la caractérisation du canal Na_v d'*E. electricus* la topologie transmembranaire des canaux Na_v a été prédite (Noda et coll., 1984). Chaque domaine transmembranaire comprend six segments, notés S1 à S6. Les domaines sont connectés entre eux par des boucles intracellulaires (L1, L2, L3) de taille variable (Figure 2). Les extrémités amino et carboxy-terminales sont intracellulaires. De plus, l'équipe de Noda

avait identifié à partir d'une analyse détaillée de la séquence protéique les résidus d'acides aminés à l'origine des propriétés fonctionnelles des canaux Na_v , dont nous allons brièvement discuter ci-dessous (Figure 2). Pour des raisons de clarté, les relations de structure-fonction sont approfondies plus en détails dans la partie D du chapitre.

Premièrement, les segments S4 comportent des résidus d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) agencés régulièrement autour des hélices α tous les trois à quatre positions (Figure 2) (Noda et coll., 1984). De ce fait, les segments S4 constituent le senseur de potentiel des canaux Na_v . Autrement dit, lors d'une dépolarisation, les segments S4 se meuvent vers le milieu extracellulaire et conduisent à l'ouverture du canal Na_v (Catterall, 2000).

Deuxièmement, les boucles reliant les segments S5 et S6 s'invaginent dans le lumen du canal pour former le pore du canal, et sont nommées pour cette raison boucles P (Figure 2). Elles contiennent des résidus d'acides aminés qui forment le filtre de sélectivité aux ions Na^+ (Catterall, 2000).

Troisièmement, la boucle intracellulaire L3 comporte quatre résidus d'acides aminés (isoleucine, phénylalanine, méthionine, thréonine) correspondant à la porte d'inactivation h (Figure 2) (Goldin, 2003).

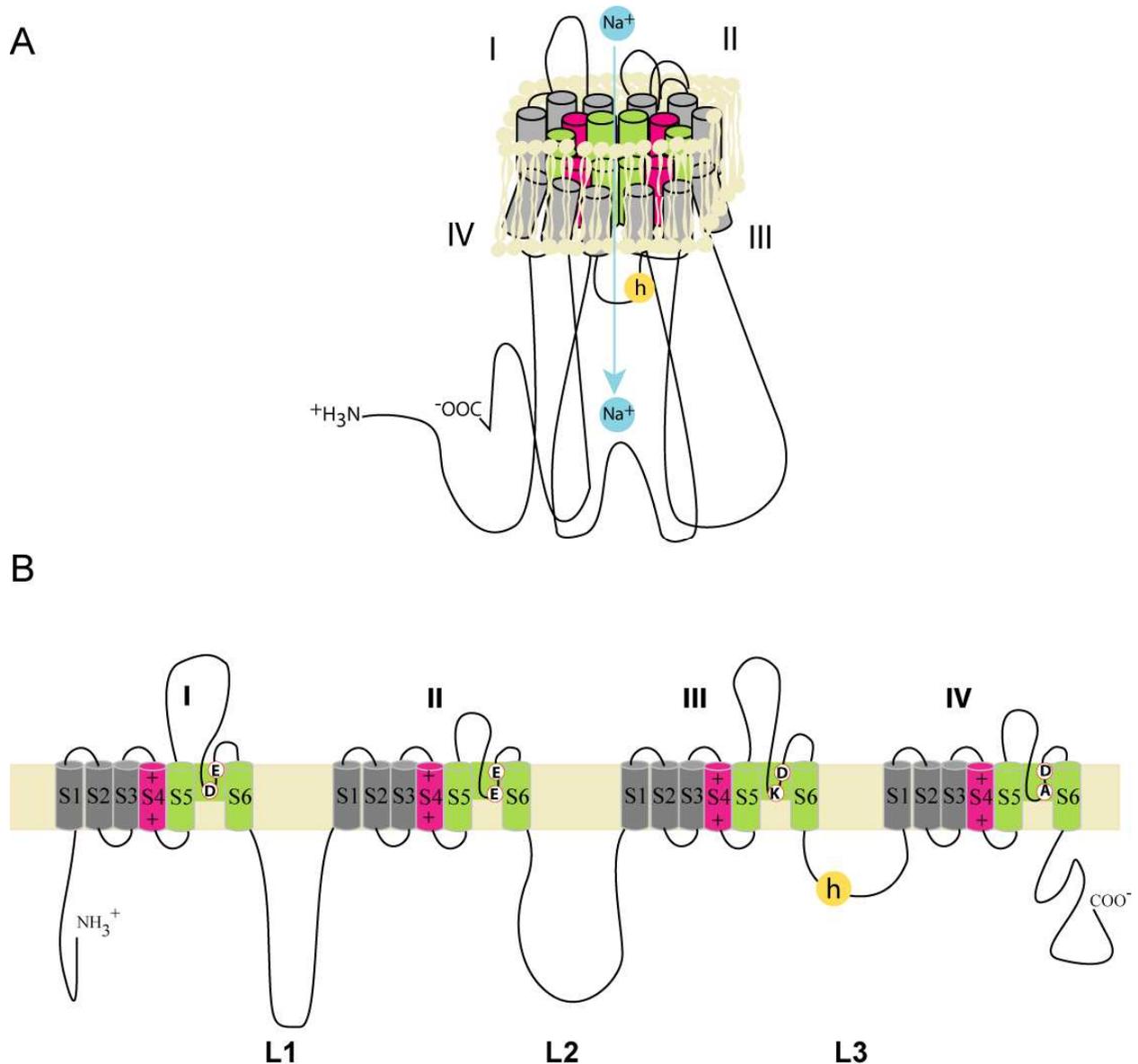


Figure 2 : Structure de la sous-unité α des canaux Na_v de vertébrés.

A. La structure de la sous-unité α des canaux Na_v comprend quatre domaines transmembranaires répétés en tandem (I à IV) formant un pore perméable aux ions Na^+ (modifié d'après (Ekberg et coll., 2006)).

B. Topologie membranaire de la sous-unité α montrant les six segments (S1 à S6) de chaque domaine. Les S4 sont chargés positivement (+) (segments roses en A). Les résidus d'acides aminés (DEKA et EEDD) localisés sur les boucles reliant les segments S5 et S6 (segments verts en A) forment le filtre de sélectivité aux ions Na^+ . Les boucles intracellulaires reliant les domaines sont nommées L1, L2 et L3. La porte h impliquée dans l'inactivation est indiquée par un cercle jaune sur la boucle L3 (modifié d'après (Yu et coll., 2005)).

B.1.3 Les sous-unités α des canaux Na_v clonées chez les vertébrés

Plusieurs canaux Na_v ont été révélés chez les vertébrés à l'issue de l'enregistrement électrophysiologique des courants Na^+ , de la purification biochimique des sous-unités α et du clonage des transcrits codant les canaux Na_v (Goldin, 2001). Chez les mammifères, tels que le rat et l'homme, neuf gènes codant des canaux Na_v ont été identifiés (Goldin, 2002a). Les gènes *SNCA1* à *SNCA9* codent respectivement les neuf sous-unités $\text{Na}_v1.1$ à $\text{Nav}1.9$. Cette nomenclature systématique des canaux Na_v de mammifères a été instaurée sur le modèle de la classification des canaux Ca_v et K_v (Goldin et coll., 2000). Elle a été étendue aux isoformes orthologues identifiées chez d'autres espèces de vertébrés et d'invertébrés (Goldin et coll., 2000). En effet, des sous-unités orthologues aux sous-unités α des canaux Na_v de mammifères ont été clonées chez le triton (*Cynops pyrrhogaster*) et plusieurs espèces de poissons (*Danio rerio*, *E. electricus*, *Fugu pardalis* et *Sternopygus macrurus*) (Goldin, 2002a).

Chez les mammifères, une dixième isoforme nommée Na_x a divergé des neuf autres isoformes. Elle ne partage que 50% d'homologie de séquence avec les autres canaux Na_v , et se différencie par quelques domaines peptidiques critiques pour la fonction du canal. En effet, le senseur de potentiel compte moins de résidus d'acide aminés chargés positivement et la particule d'inactivation est absente. A ce jour, la conductance sodique de cette protéine-canal n'a pas pu être vérifiée *via* l'expression de canaux recombinants (Gautron et coll., 1992, George et coll., 1992, Felipe et coll., 1994, Akopian et coll., 1997). D'autres fonctions ont alors été suggérées pour ces protéines, telle que l'homéostasie de la concentration extracellulaire du sodium (Hiyama et coll., 2002, Watanabe et coll., 2002).

B.1.4 En quoi les isoformes de canaux Na_v de mammifères se distinguent-elles ?

Les sous-unités α de canaux Na_v1 de mammifères peuvent être divisées en cinq groupes en fonction de leur homologie de séquence, leur profil d'expression tissulaire, leur sensibilité à la TTX et la localisation chromosomique de leurs gènes (Tableau 1) (Goldin, 2002a, Ogata et coll., 2002). Sur le chromosome 2 du rat, quatre gènes codent des sous-

unités α de canaux Na_v sensibles à la TTX et sont uniquement exprimés dans le SNC (Tableau 1). Les trois gènes localisés sur le chromosome 9 du rat code des sous-unités α résistantes à la TTX et exprimés dans le muscle cardiaque ($\text{Na}_v1.5$) et le SNP. La sous-unité $\text{Na}_v1.6$ est codée par un gène isolé sur le chromosome 15 du rat et est exprimée dans des tissus excitables et non-excitables tels que les cellules gliales.

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des sous-unités α des canaux Na_v chez le rat.

| Groupe | % identité de séquence moyenne | Sous-unité α | Gène | Localisation chromosomique | Sensibilité à la TTX | Expression tissulaire dominante |
|--------|--------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|----------------------|--|
| I | 82 | rNav1.1 | Scn1a | chromosome 2 | S | SNC |
| | | rNav1.2 | Scn2a1 | | | |
| | | rNav1.3 | Scn3a | | | |
| | | rNav1.7 | Scn9a | | | |
| II | 57 | rNav1.5 | Scn5a | chromosome 9 | R | Muscle cardiaque |
| | | rNav1.8 | Scn10a | | | SNP |
| | | rNav1.9 | Scn11a | | | |
| III | - | rNav1.4 | Scn4a | chromosome 11 | S | Muscle squelettique |
| IV | - | rNav1.6 | Scn8a | chromosome 15 | S | SNC, SNP, glie |
| V | - | rNax | Scn7a | chromosome 2 | - | Muscle cardiaque, utérus, glie, muscle lisse |

S : sensible ; R : Résistant ; SNC : Système Nerveux Central ; SNP : Système Nerveux périphérique

En dépit d'une identité de séquence protéique importante, les neuf isoformes Na_v1 de mammifères possèdent une signature électrophysiologique et pharmacologique distincte (revue (Catterall et coll., 2005a)). De plus, la coexpression de ces isoformes avec des sous-unités auxiliaires dans des cellules non excitables produit des courants Na^+ proches des courants Na^+ natifs. Mais alors quelles sont ces sous-unités auxiliaires des canaux Na_v de mammifères ?

B.2 Les sous-unités auxiliaires β

B.2.1 Diversité et structure des sous-unités auxiliaires de canaux Na_v chez les vertébrés

Les génomes de mammifères contiennent quatre gènes *SCNB1* à *SCNB4* codant respectivement les sous-unités auxiliaires $\text{Na}_v\beta1$ à $\text{Na}_v\beta4$ (Yu et coll., 2003a). Des gènes codant des sous-unités homologues à $\text{Na}_v\beta1$, $\text{Na}_v\beta2$, $\text{Na}_v\beta3$ et $\text{Na}_v\beta4$ de mammifères

ont aussi été identifiés et clonés chez le poisson zèbre *D. rerio* (zbeta1, zbeta2, zbeta4.1 et zbeta4.2) (Chopra et coll., 2007). Mais aucun gène homologue n'a été identifié, jusqu'à ce jour, dans le génome des insectes étudiés. L'hypothèse d'une évolution récente des sous-unités β des canaux Na_v a alors été posée en parfaite cohérence avec la diversification et la spécialisation du signal électrique chez les vertébrés (Ex. : propagation saltatoire des potentiels d'action) (Chopra et coll., 2007). Par ailleurs, l'étude des relations phylogénétiques distingue deux sous-groupes avec d'un côté les sous-unités $\text{Na}_v\beta1$ et $\text{Na}_v\beta3$, et d'un autre côté les sous-unités $\text{Na}_v\beta2$ et $\text{Na}_v\beta4$ (Tseng et coll., 2007). Cette dichotomie est à mettre en relation avec la distribution tissulaire. En effet, chez l'adulte, les sous-unités $\text{Na}_v\beta1$ et accessoirement $\text{Na}_v\beta3$ sont exprimés dans le SNC alors que les sous-unités $\text{Na}_v\beta2$ sont exprimées dans le muscle squelettique (Catterall et coll., 2003).

Les sous-unités $\text{Na}_v\beta$ sont toutes caractérisées par un seul domaine transmembranaire, une large extrémité N terminale extracellulaire et une petite extrémité C terminale intracellulaire (Figure 3). L'extrémité N terminale extracellulaire possède un domaine immunoglobuline de type V (IgV) caractérisé par des cystéines établissant des ponts disulfures (Figure 3) (Isom, 2001). De ce fait, les sous-unités $\text{Na}_v\beta$ de vertébrés partagent aussi un ancêtre commun avec des protéines CAM (pour « cell adhesion molecule ») possédant des domaines IgV (Chopra et coll., 2007). L'extrémité N terminale extracellulaire possède plusieurs sites de N-glycosylation importants pour la régulation des sous-unités β (Isom et coll., 1996). En accord avec la phylogénie, les sous-groupes de sous-unités $\text{Na}_v\beta$ sont différenciables d'un point de vue biochimique. En effet, les sous-unités $\text{Na}_v\beta2$ et $\text{Na}_v\beta4$ sont liées de manière covalente aux sous-unités α tandis que les sous-unités $\text{Na}_v\beta1$ et $\text{Na}_v\beta3$ ne le sont pas (Yu et coll., 2003a).

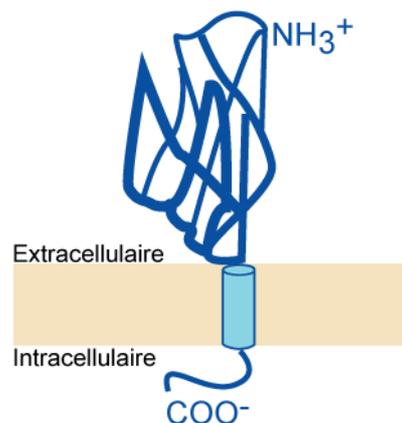


Figure 3 : Topologie membranaire des sous-unités auxiliaires β des canaux Na_v de vertébrés

L'extrémité amino-terminale des sous-unités β de vertébrés est extracellulaire et souvent illustrée d'une manière analogue à un domaine immunoglobuline (modifié d'après Catterall et coll., 2003).

B.2.2 Dualité de la fonction des sous-unités β de vertébrés

L'interaction fonctionnelle entre les sous-unités $\text{Na}_v\beta$ et les sous-unités α de type Na_v1 a été démontrée en coexprimant ces deux sous-unités recombinantes dans des cellules non-excitables. Les quatre sous-unités $\text{Na}_v\beta$ de rat augmentent la densité membranaire des sous-unités du rat $\text{rNa}_v1.2$ et accélèrent les cinétiques d'activation et/ou d'inactivation (Isom et coll., 1992, Isom et coll., 1995, Morgan et coll., 2000, Yu et coll., 2003b). Ainsi les propriétés biophysiques des canaux Na_v1 recombinants deviennent comparables à celles des canaux Na_v de neurones dissociés (Catterall, 2000). Cette interaction fonctionnelle a été confirmée entre la sous-unité zbeta1 et la sous-unité $\text{DrNa}_v1.5$ du poisson *D. rerio* (Chopra et coll., 2007). Une interaction directe à la base de la modulation de l'activation et de l'inactivation des courants Na^+ a été mise évidence entre certains résidus d'acides aminés de l'extrémité N terminale de $\text{Na}_v\beta1$ et quelques résidus d'acides aminés de la boucle P des domaines I et IV de rNav1.2 (Makita et coll., 1996).

Par ailleurs, de manière analogue aux protéines CAM, les sous-unités β de mammifères interagissent avec d'autres protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire *via* les extrémités N et C terminales, et ce indépendamment de la sous-unité α (revue (Isom, 2001)). De manière indirecte, ces interactions protéine-protéine régulent l'activité des canaux Na_v1 . D'un côté, l'interaction entre les sous-unités $\text{Na}_v\beta1$ et les protéines de la matrice extracellulaire augmente la densité des canaux $\text{Na}_v1.2$ recombinants exprimés au niveau de la membrane d'ovocyte de xénope (McCormick et coll., 1999). D'un autre côté, l'interaction entre les sous-unités β et les protéines du cytosquelette joue un rôle dans le transport et la localisation cellulaire des canaux Na_v (revue (Lai et coll., 2006, Cusdin et coll., 2008)). Ces interactions permettent notamment l'agrégation des canaux Na_v au niveau des nœuds de Ranvier et du cône d'émergence.

En conclusion, les canaux Na_v de vertébrés sont des glycoprotéines membranaires hétéromultimériques constituées de multiples combinaisons possibles parmi neuf isoformes de sous-unités α ($Na_v1.1$ et $Na_v1.9$) et quatre isoformes de sous-unités β ($Na_v\beta1$ à $Na_v\beta4$). Les sous-unités Na_v1 et les sous-unités $Na_v\beta$ sont exprimées différemment selon les types cellulaires et les stades de développement. Selon les combinaisons exprimées les propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux Na_v diffèrent. Des interactions complexes entre les sous-unités $Na_v\beta$ et des protéines des matrices intra et extracellulaires contribuent à l'adressage, la mise en place et la modulation de l'activité des canaux Na_v . Ainsi, ces interactions protéines-protéines sont responsables de la genèse et de la transmission rapide des PAs chez les vertébrés. Mais alors qu'en est-il de la structure et de la modulation des canaux Na_v d'insecte chez qui les axones sont amyéliniques ? Existents-ils plusieurs gènes codant des sous-unités α et β ? Comment la régulation des canaux Na_v module les PAs et l'excitabilité membranaire des neurones d'insectes ? C'est à ces diverses questions que les données bibliographiques présentées ci-dessous et dans le prochain chapitre répondront.

C Biologie moléculaire des canaux Na_v des insectes

Les canaux Na_v d'insectes sont aussi des glycoprotéines hétéromultimériques constituées d'une sous-unité α déterminant les propriétés biophysiques des courants Na^+ associées à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires β modulant les propriétés biophysiques et pharmacologiques. Les éléments de bibliographie présentés ci-dessous confrontent les données actuelles de la biologie moléculaire des canaux Na_v d'insecte, en s'attachant tout particulièrement à mettre en évidence leurs différences avec les canaux Na_v de vertébrés.

C.1 La sous-unité principale α

C.1.1 Découverte de la famille des gènes des canaux Na_v d'arthropodes

Pendant longtemps il a été considéré que chez les insectes, un seul gène codait des sous-unités α de canaux Na_v fonctionnels. Depuis, cette hypothèse a été confirmée par les connaissances modernes des génomes de plusieurs espèces d'insectes (Davies et coll., 2007a, Dong, 2007). Ainsi, chez les insectes, les sous-unités α de canaux Na_v partagent entre 72% et 99% d'identité de séquence avec la sous-unité α du canal Na_v de *Drosophila melanogaster*, modèle animal de référence en génétique. La caractérisation de la structure primaire de la sous-unité α de *D. melanogaster*, nommée Para puis DmNa_v , est la résultante d'études génétiques, électrophysiologiques et moléculaires conduites sur ces vingt dernières années. Grâce à la séquence de cette dernière, diverses sous-unités α de canaux Na_v d'arthropodes ont pu alors être identifiées par homologie.

Tout d'abord, pour identifier les gènes impliqués dans l'excitabilité membranaire du système nerveux des insectes, des mutants de *D. melanogaster* avaient été sélectionnés pour leurs phénotypes paralytiques mettant en jeu une altération probable des canaux Na_v . Ces paralysies induites par des mutations aléatoires du génome ont la particularité d'être réversibles en fonction de la température (« temperature sensitive (^{ts}) »). Ainsi trois allèles mutés ont été sélectionnés : *para^{ts}* pour « paralysis », *nap^{ts}* pour « no action potential » et *TipE^{ts}* pour « temperature-induced paralysis locus E » (Suzuki et coll., 1971, Wu et coll., 1978, Kulkarni et coll., 1982). Des études de comportement et de physiologie ont montré que ces allèles codent des protéines impliquées dans la conduction du message nerveux, l'excitabilité membranaire, la sensibilité à la tétrodotoxine et à la vératridine (Ganetzky et coll., 1986). Quelques années plus tard, des études d'électrophysiologie ont montré que l'allèle *tipE^{ts}* réduit la densité du courant tandis que l'allèle *para^{ts}* modifie les propriétés d'activation des courants Na^+ de neurones embryonnaires maintenus en culture (O'Dowd et coll., 1988, O'Dowd et coll., 1989). L'ensemble de ces observations ont alors abouti au fait que les loci *para* et *TipE* codent des protéines importantes dans la régulation de la fonction des canaux Na_v chez *D. melanogaster*.

Parallèlement à ces travaux, la caractérisation moléculaire de la sous-unité $DmNa_v$ a bénéficié des avancées de la biologie moléculaire des sous-unités α de Na_v de vertébrés (Noda et coll., 1984). Ainsi, la séquence du locus *para* a pu être identifiée par homologie de séquence avec l'ADNc codant la sous-unité α du canal Na_v de l'anguille électrique *E. electricus* et du rat (Salkoff et coll., 1987, Ramaswami et coll., 1989). Puis, de nombreux transcrits codant différentes isoformes de sous-unités α ont pu être successivement clonés chez *D. melanogaster* (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Olson et coll., 2008). Par ailleurs, la technique de la « marche chromosomique » le long de l'allèle *TipE^{ts}* a permis de caractériser les transcrits codant une sous-unité auxiliaire β qui a été nommée TipE (Feng et coll., 1995b).

C.1.2 Quelles sont les espèces d'arthropodes pour lesquelles les canaux Na_v sont étudiés ?

La caractérisation des canaux Na_v de *D. melanogaster* offre des informations essentielles quant aux mécanismes génétiques et physiologiques à la base de la modulation de l'excitabilité membranaire des neurones. Au-delà de ces connaissances fondamentales, il s'est avéré nécessaire d'étendre la caractérisation des canaux Na_v à d'autres espèces d'insecte présentant un intérêt médical ou socio-économique (Nicholson, 2007) (Figure 4). Ainsi, la majorité des espèces d'insectes pour lesquelles les canaux Na_v ont été étudiés sont nuisibles pour les habitations, les cultures, les denrées agricoles, la santé humaine et animale. A l'opposé des espèces nuisibles, il existe des espèces d'insectes utiles pour les écosystèmes agricoles (Ex : abeille pour la pollinisation) ou pour des activités économiques (Ex. : vers à soie pour la sériciculture et les applications biotechnologiques) (Evans et coll., 2003). La majeure partie des informations de séquence datent de moins de cinq ans et proviennent essentiellement de l'analyse du génome de plusieurs espèces d'insectes, principalement vecteurs de maladie, en raison des enjeux importants de santé publique (Megy et coll., 2009). Ainsi, la profusion de ces connaissances permet (1) d'identifier les mécanismes de résistances aux insecticides et, (2) de déterminer des domaines fonctionnels et pharmacologiques spécifiques d'une espèce c'est-à-dire intéressants pour la sélectivité de nouveaux insecticides et répulsifs.

Cependant, en dépit de ces nombreuses recherches, l'identification des transcrits de canaux Na_v d'insecte reste encore un domaine à explorer au regard de la diversité des insectes. Par exemple, aucune donnée concernant la biologie moléculaire des canaux Na_v

de criquet migrateur, ravageur de culture important en Afrique, n'a été reporté dans la littérature. La biologie moléculaire d'autres insectes tels que la blatte *Periplaneta americana*, modèle très utile en neurophysiologie des invertébrés et accessoirement nuisible urbain vecteur de germes pathogènes, est aussi peu explorée.

Par ailleurs, la structure primaire des canaux Na_v a été caractérisée chez d'autres espèces d'arthropodes nuisibles tels que les tiques et l'acarien parasite des abeilles (*Varroa destructor*) (He et coll., 1999, Wang et coll., 2003a). De plus, la caractérisation des canaux Na_v du scorpion (*Mesobuthus martensis*) et de la tarentule (*Ornithoctonus huwena*) permet d'étudier les relations structure-fonction à la base de l'activité des toxines sécrétées par ces espèces venimeuses (Zuo et coll., 2006).

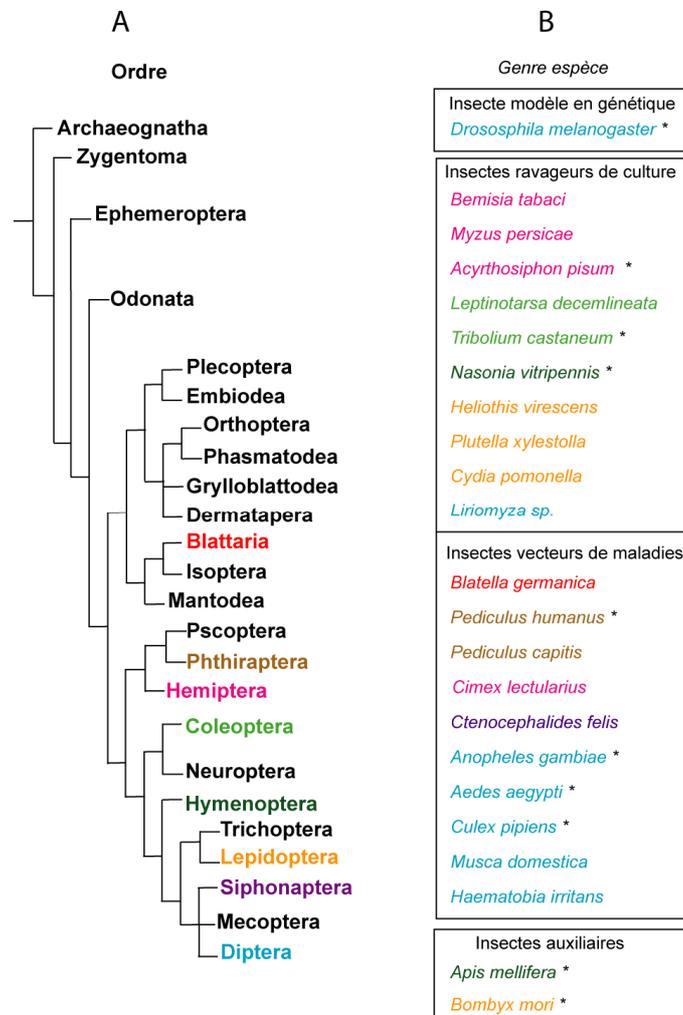


Figure 4 : Espèces d'insecte pour lesquelles les canaux Na_v ont été étudiés.

A. Arbre des relations phylogénétiques entre les différents ordres d'insectes (modifié d'après Niven et coll., 2008).

B. Les espèces sont écrites de la même couleur du genre auquel elles appartiennent (A). Les espèces d'insecte dont le génome est caractérisé sont indiquées par un astérisque. Ce recensement a été réalisé à partir de la revue Davies et coll., 2007a et d'une recherche personnelle dans les banques de données (tableau 3).

C.1.3 Organisation générale des gènes homologues à *DmNa_v*

Le gène *DmNa_v* est l'un des gènes les plus importants du génome de *D. melanogaster* avec une taille estimée à 293 kb (Song et coll., 2007, Chang et coll., 2009). Le transcrit est quant à lui compris entre 10 et 15 kb (Loughney et coll., 1989, Thackeray et coll., 1994, Chang et coll., 2009). La mise à disposition des génomes dans les banques de données a permis de caractériser l'organisation des gènes homologues à *DmNa_v* chez plusieurs espèces d'insectes (Tableau 2). La partie du gène correspondant au cadre ouvert de lecture comprend en moyenne 30 kb. La taille des introns est variable non seulement entre les différentes espèces mais aussi au sein même du gène (Ex : entre 66 et 44143 pb pour *Aedes aegypti*). Il a même été rapporté que la taille de régions introniques en position homologue varie entre deux souches différentes de la teigne des crucifères (Sonoda et coll., 2008b). Les régions non codantes apparaissent comme des régions peu conservées des gènes subissant une faible pression de sélection. A l'opposé, le nombre et la taille des exons sont beaucoup plus conservés entre les différents insectes étudiés. Ainsi, une trentaine d'exons codent le cadre ouvert de lecture chez la majorité des espèces. A ceux-ci, s'ajoutent deux exons alternatifs mutuellement exclusifs conservés chez la majorité des espèces, excepté chez *Apis mellifera*, *Heliothis virescens* et *Varroa destructor* (Tableau 2). L'exon de plus faible taille (33 pb) est un exon alternatif alors que l'exon de plus haut poids moléculaire code pour la région C terminale. La cadre ouvert de lecture mesure entre 6 et 6,5 kb selon les isoformes et les espèces (Tableau 2).

Tableau 2 : Organisation des gènes homologues au gène *DmNa_v*, chez plusieurs espèces d'insectes.

| Identification | | Gène | | | | Cadre ouvert de lecture | | Référence |
|----------------|--------------------------------|-------------|-------------------------|---------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|---|
| Ordre | Espèce | Taille (kb) | Taille des introns (pb) | # exons (COL) | Taille des exons (pb) | Séquence nucléique (bp) | Séquence protéique | |
| Coleoptera | <i>Tribolium castaneum</i> | - | 46 à 870 | 25 (+2) | 33 à 795 | 6105 | 2034 | Davies et coll., 2007a |
| Diptera | <i>Drosophila melanogaster</i> | 293 | 59 à 5754 | 29 (+2) | 33 à 1002 | 6273 à 6396 | 2091 à 2131 | Salkoff et coll., 1987; Loughney et coll., 1989; Thackeray et coll., 1994; Davies et coll., 2007a |
| Diptera | <i>Drosophila virilis</i> | - | 59 à 5938 | 29 (+2) | 33 à 993 | 6516 | 2171 | Davies et coll., 2007a; Clark et coll., 2007 |
| Diptera | <i>Anopheles gambiae</i> | - | 57 à 18920 | 33 (+2) | 21 à 1014 | <=6417 | <=2138 | Davies et coll., 2007a |
| Diptera | <i>Aedes aegypti</i> | - | 66 à 44143 | 32 (+2) | 33 à 993 | 6423 | 2140 | Davies et coll., 2007a; Chang et coll., 2009 |
| Diptera | <i>Culex quinquefasciatus</i> | - | - | 32 (+2) | 63 à 954 | 6306 | 2101 | Davies et coll., 2007a; Xu et coll., 2006 (Npu) |
| Hymenoptera | <i>Apis mellifera</i> | - | 32 à 6656 | 29 (+1) | 33 à 780 | 6060 | 2019 | Davies et coll., 2007a |
| Lepidoptera | <i>Bombyx mori</i> | - | 73 à 3285 | 33 (+2) | 33 à 561 | - | - | Davies et coll., 2007a |
| Lepidoptera | <i>Bombyx mori</i> | 31 (ORF) | 73 à 2853 | 34 (+2) | 33 à 629 | 6117 | 2038 | Shao et coll., 2009b |
| Lepidoptera | <i>Plutella xylostella</i> | 22 (ORF) | 60 à 2656 | 33 (+2) | 21 à 438 | 5669 | 1189 | Sonada et coll., 2006, Sonada et coll., 2008b |
| Lepidoptera | <i>Heliothis virescens</i> | < 32 (ORF) | 74 à 2500 | 31 (+1) | 33 à >375 | 5085 (+~63) | 1695 (+~20) | Park et coll., 1999 |

Le nombre (#) d'exons mutuellement exclusifs est indiqué entre parenthèses après le nombre total d'exons constituant le cadre ouvert de lecture. Pour *Apis mellifera* un seul de ces exons a été identifié sur la séquence du gène homologue à *DmNa_v*, tandis que pour *Heliothis virescens* un seul de ces exons a été identifié sur la séquence des transcrits clonés (nombre en gris). COL : cadre ouvert de lecture

C.1.4 Les ADNc clonés codant le cadre ouvert de lecture des sous-unités α de canaux Nav d'arthropodes

Les informations de séquence correspondant au cadre ouvert de lecture des sous-unités α des canaux Na_v d'arthropodes sont de deux natures. D'un côté, nous distinguons les ADNc codant une région partielle de la sous-unité α . Ces ADNc partiels ont été isolés car ils codent des régions impliquées dans la résistance aux insecticides (revue (Davies et coll., 2007b)). D'un autre côté, nous distinguons les ADNc codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture de la sous-unité α (Tableau 3). Ces ADNc complets permettent (1) caractériser les différents variants codant les canaux Na_v chez les insectes ; et (2) de démontrer qu'ils codent des canaux Na_v fonctionnels par des techniques d'expression dans des systèmes hétérologues.

Les séquences codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture des sous-unités α des canaux Na_v ont été obtenues selon trois méthodes (Tableau 3). La première méthode concerne le clonage de l'ADNc codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture des sous-unités

α , soit 6 kb. Généralement les propriétés fonctionnelles des protéines codées par ces ADNc sont ensuite étudiées par expression dans un système hétérologue. Notons que seuls les canaux Na_v de *D. melanogaster*, *B. germanica* et *V. destructor* ont pu être exprimés dans des ovocytes de xénope à ce jour (Feng et coll., 1995a, Warmke et coll., 1997, Tan et coll., 2002a, Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Du et coll., 2009a). La seconde méthode fait référence à une reconstitution virtuelle du cadre ouvert de lecture par assemblage des séquences d'ADNc codant des régions chevauchantes de la sous-unité α . Dans ce cas, les protéines déduites des ADNc reconstitués ne peuvent pas être exprimées dans un système hétérologue, exception faite pour le canal Na_v Vssc1 de *Musca domestica* (Smith et coll., 1997b, Lee et coll., 2000b). La troisième méthode concerne la déduction du cadre ouvert de lecture codant des sous-unités α putatives de canaux Na_v à partir de l'annotation des génomes.

Jusqu'à ce que la nomenclature des canaux Na_v soit révisée, les transcrits homologues à *DmNa_v* étaient nommés selon chaque auteur (Goldin et coll., 2000). En accord avec cette nomenclature, les transcrits codant les sous-unités α de Na_v d'arthropodes sont renommés dans ce manuscrit (Tableau 3).

Tableau 3: Recensement (Novembre 2009) des ADNc codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture (COL) des sous-unités α des canaux Na_v d'arthropodes.

| Origine de la séquence du COL et expression des Nav | Identification | | Nom de la sous-unité | Nom de la sous-unité | Taille (bp) | Protéine déduite (aa) | N° Accession GenBank (NCBI) | Références |
|---|---|---------------------------------------|----------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|---|
| | Ordre | Espèce | Original | Thèse | | | | |
| COL intégralement sous-cloné & sous-unité α exprimée | Diptera | <i>Drosophila melanogaster</i> | Para puis DmNav | DmNav | ~6000 | ~3000 | ND | Feng et coll., 1995; Olson et coll. 2008 |
| | Blattaria | <i>Blattella germanica</i> | ParaCSMA (KD1, KD2, KD3) | BgNav | ~6000 | ~3000 | ND | Tan et coll., 2002 |
| | | | BgNav | | ~6000 | ~3000 | ND | Song et coll., 2004 |
| | Mesostigmata | <i>Varroa destructor</i> | VdNav1a | VdNav1a | ~6000 | ~3000 | ND | Du et coll., 2009a |
| COL reconstitué & sous-unité α exprimée | Diptera | <i>Drosophila melanogaster</i> | Para | DmNav | ~6000 | ~3000 | ND | Warmke et coll., 1997; Lin et coll., 2009 |
| | | <i>Musca domestica</i> | Vssc1wt (=Vssc1NAIDM) | MdNav | ~6400 | ~3100 | ND | Smith et coll., 1997; Lee et coll., 2000 |
| COL reconstitué & sous-unité α non exprimée | Diptera | <i>Drosophila melanogaster</i> | Para | DmNav1 | 6396 | 2131 | M32080 | Loughney et coll., 1989; Thackeray et coll., 1994 |
| | | | VsscNAIDM ou Msc | MdNav1 | 6315 | 2104 | U38813 | Ingles et coll., 1996 |
| | | <i>Musca domestica</i> | Vssc538ge | MdNav1.2 | 6315 | 2104 | U38814 | Ingles et coll., 1996 |
| | | | | MdNav1.3 | 6327 | 2108 | X96668 | Williamson et coll., 1996 |
| | | <i>Anopheles gambiae</i> | Ag para | AgNav1 | <=6417 | <=2138 | AM422833 | Davies et coll., 2007a |
| | | <i>Aedes aegypti</i> | Aa-para | AaNav1 | 6423 | 2140 | EU399179 | Chang et coll., 2009 |
| | <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> | | CpNav1.1 | 6306 | 2101 | EU817517 | Xu et coll., 2006 | |
| | Blattaria | <i>Blattella germanica</i> | ParaCSMA | BgNav1 | 6096 | 2031 | U73583 | Dong et coll., 1997 |
| | | | ParaEctiban-R | BgNav1.2 | 6096 | 2031 | U73584 | Dong et coll., 1997 |
| | Hemiptera | <i>Cimex lectularius</i> | FL-BB | CINav1 | 6084 | 2027 | FJ031996 | Yoon et coll., 2008 |
| | | | NY-BB | CINav1.2 | 6084 | 2027 | FJ031997 | Yoon et coll., 2008 |
| | Lepidoptera | <i>Bombyx mandarina</i> | | BmaNav1 | 5553 | 1850 | EU688972 | Zhao et coll., 2008 (sd) |
| | | <i>Bombyx mori</i> | BmNav | BmNav1 | <=6258 | <=2085 | ND | Shao et coll., 2009b |
| | Phthiraptera | <i>Plutella xylostella</i> | | PxNav | 5669 | 1889 | ND | Sonoda et coll., 2008b |
| | | <i>Pediculus humanus humanus</i> | | PhhNav1 | 6259 | 2086 | AB090951 | Tomita et coll., 2003 |
| | | <i>Pediculus humanus capitis</i> | | PhcNav1 | 6156 | 2051 | AY191155 | Lee et coll., 2003 |
| | Arachnida; Acari | <i>Varroa destructor</i> | VmNa | VmNav1 | 6645 | 2214 | AY259834 | Wang et coll., 2003a |
| | Arachnida; Scorpion | <i>Mseobuthus martensis</i> | MmNav1 | MmNav1 | 5616 | 1871 | AY322171 | Zhuo et coll., 2006 |
| | Arachnida; Araneae | <i>Ornithoctonus huwena</i> | OhNav1 | OhNav1 | 5964 | 1987 | DQ839489 | Zhuo et coll., 2006 |
| | COL intégralement déduit à partir de l'annotation du génome | Coleoptera | <i>Tribolium castaneum</i> | | TcNav1,1 | 6105 | 2034 | XM_962927 |
| | | | | TcNav1.2 | 6072 | 2023 | XM_962937 | Prédit |
| Diptera | | <i>Drosophila ananassae</i> | | DaNav1 | 6411 | 2136 | XM_001966110 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila erecta</i> | | DeNav1 | 6393 | 2130 | XM_001977899 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila grimshawi</i> | | DgNav1 | 6516 | 2171 | XM_001992475 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila mojavensis</i> | | DmoNav1 | 6507 | 2198 | XM_002010801 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila virilis</i> | | DvNav1 | 6516 | 2171 | XM_002054976 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila pseudoobscura</i> | | DpNav1 | 6192 | 2063 | XM_001354641 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila willistoni</i> | | DwNav1 | 6606 | 2201 | XM_002071185 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Drosophila yakuba</i> | | DyNav1 | 5658 | 1885 | XM_002100781 | Clark et coll., 2007 |
| | | <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> | | CpNav1.2 | 6387 | 2128 | BN001089 | Davies et coll., 2007a |
| | | <i>Aedes albopictus</i> | | AalNav1 | 5988 | 1995 | AY663384 | Wu et coll., 2004 (sd) |
| Hymenoptera | | <i>Apis mellifera</i> | | AmNav1 | 6060 | 2019 | XM_392548 | Prédit |
| | | <i>Nasonia vitripennis</i> | | NvNav1 | 6252 | 2081 | BN001094 | Davies et coll., 2007a |
| Lepidoptera | | <i>Bombyx mori</i> | BmNav | BmNav1 | 6117 | 2038 | EU822499 | Shao et coll., 2009b |

☞ D'après une recherche personnelle dans les banques de données

En accord avec la nomenclature établie, les ADNc dont les séquences ont été déposées dans la banque de données GenBank de NCBI sont renommées. Pour *Musca domestica*, *Cimex lectularius*, *Tribolium castaneum* et *Culex quinquefasciatus* plusieurs transcrits ont été caractérisés. MdNav1.1, MdNav1.3 et CINav1 sont des isoformes impliquant une forte sensibilité aux pyréthrinoïdes. Au contraire, MdNav1.2 et CINav1.2 sont des isoformes impliquant une faible sensibilité aux pyréthrinoïdes. ND : séquence non déposée ; sd : soumission directe des séquences.

C.1.5 Identité de séquence protéique entre les sous-unités α des canaux Na_v d'arthropodes

Les sous-unités α des canaux Na_v d'insecte connus partagent entre 72% et 87% d'identité de séquence protéique avec la sous-unité DmNa_v1 (Tableau 4). Les sous-unités α des trois espèces d'arachnide partagent 50% d'identité de séquence protéique avec la sous-unité DmNa_v1 , indiquant que les canaux Na_v des arachnides divergent. De plus, bien que les insectes et les vertébrés soient des phylums distants d'un point de vue évolutif, les sous-unités DmNa_v1 et rNav1.2 partagent 41% d'identité de séquence protéique. Ainsi, l'ensemble de ces identités de séquences relativement élevées indiquent que les canaux Na_v sont des protéines très conservées au sein des *Billateria*.

Tableau 4 : Identités de séquence protéique partagées entre les sous-unités orthologues à DmNa_v1

| Ordre taxonomique | Blattaria | | | Diptera | | | Hemiptera | Lepidoptera |
|---|----------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Espèce | <i>Blattella germanica</i> | <i>Musca domestica</i> | <i>Anopheles gambiae</i> | <i>Aedes albopictus</i> | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Culex pipiens</i> | <i>Cimex lectularius</i> | <i>Bombyx mori</i> |
| Sous-unité α | BgNav1 | MdNav1 | AgNav1 | AalNav1 | AeNav1 | CpNav1,1 | CiNav1 | BmNav1 |
| % d'identité de séquence protéique avec DmNav1 | 77 | 87 | 80 | 78 | 81 | 80 | 73 | 75 |
| Ordre taxonomique | Coleoptera | Hymenoptera | | Phthiraptera | Acari | Scorpion | Araneae | Rodentia |
| Espèce | <i>Tribolium castaneum</i> | <i>Apis mellifera</i> | <i>Nasonia vitrepennis</i> | <i>Pediculus humanus humanus</i> | <i>Varoa destructor</i> | <i>Mesobuthus martensis</i> | <i>Ornithoctonus huwena</i> | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Sous-unité α | TcNav1,1 | AmNav1 | NvNav1 | PhhNav1 | VdNav1 | MmNav1 | OhNav1 | rNav1.2 |
| % d'identité de séquence protéique avec DmNav1 | 72 | 73 | 74 | 72 | 50 | 50 | 54 | 41 |

 D'après une analyse bioinformatique personnelle

Numéro d'accèsion rNav1.2 : M94055

C.2 Les sous-unités auxiliaires β

C.2.1 Les sous-unités auxiliaires β d'insecte : une famille multigénique spécifique

A l'instar des canaux Na_v de vertébrés, les sous-unités principales α des canaux Na_v d'insecte sont associées à des sous-unités auxiliaires β dont la structure est cependant très différente de celle des sous-unités β de vertébrés. Chez *D. melanogaster*, des fonctions similaires aux sous-unités β de vertébrés semblent être assurées par une protéine de petite taille nommée TipE, en référence à la mutation localisée sur le locus E du chromosome 3 (Kulkarni et coll., 1982, Feng et coll., 1995a).

Des interrogations dans les banques de données avec l'outil BLAST, à partir de la séquence protéique de TipE, identifient non seulement des sous-unités orthologues à TipE mais aussi quatre autres familles de sous-unités auxiliaires paralogues, et ce uniquement dans les génomes des insectes (Tseng et coll., 2007). Les transcrits de ces quatre familles ont été clonés chez *D. melanogaster*, et nommés *TEH1*, *TEH2*, *TEH3* et *TEH4* pour « TipE homolog » (Derst et coll., 2006). A ce jour un seul autre transcrit orthologue à *TipE*, à savoir *Vssc1*, a été cloné chez *Musca domestica* (Lee et coll., 2000b). Par ailleurs, les résultats de l'interrogation dans des banques de données avec l'outil BLAST indiquent que les sous-unités TEH présentent une faible homologie de séquence protéique avec les sous-unités auxiliaires des canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire chez les vertébrés ($\text{BK}\beta$ ou $\text{Slo}\beta$). Ces informations de séquences associées à une étude phylogénétique montrent que les sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insectes et les sous-unités $\text{BK}\beta$ de vertébrés partagent un ancêtre commun (Derst et coll., 2006). Les sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insectes ont donc évoluées après la divergence entre les vertébrés et les insectes, et constituent de ce fait des protéines spécifiques des insectes (Derst et coll., 2006, Tseng et coll., 2007). Ces protéines sont donc tout à fait intéressantes pour rechercher des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques spécifiques des canaux Na_v d'insecte.

C.2.2 Structure des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte

Des études biochimique ont permis de montrer que la sous-unité TipE est une glycoprotéine membranaire constituée de deux domaines transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire ainsi que des extrémités N et C terminales intracellulaires (Feng et coll., 1995a). Cette structure générale est conservée entre toutes les sous-unités auxiliaires β d'insecte (Figure 5). Cependant, quelques motifs structuraux situés au niveau de la boucle extracellulaire différencient les sous-unités. Tour d'abord, cette boucle est de taille plus importante pour les sous-unités TipE, TEH3 et TEH4. De plus, les sous-unités TEH3 et TEH4 possèdent des domaines protéiques similaires aux facteurs de croissance épidermique (EGF) (Derst et coll., 2006). Par ailleurs, la thréonine en position 9 de l'extrémité N terminale de la sous-unité TipE appartient à un site putatif de phosphorylation à la PKC (Feng et coll., 1995a). Mais la fonctionnalité de ce site potentiel n'a pas encore été démontrée. De plus, la topologie transmembranaire des sous-unités auxiliaires β des canaux Na_v d'insecte présente des similarités avec la sous-unité β des canaux potassiques dépendant du calcium (BK_{Ca}), confirmant une histoire évolutive commune (Figure 5).

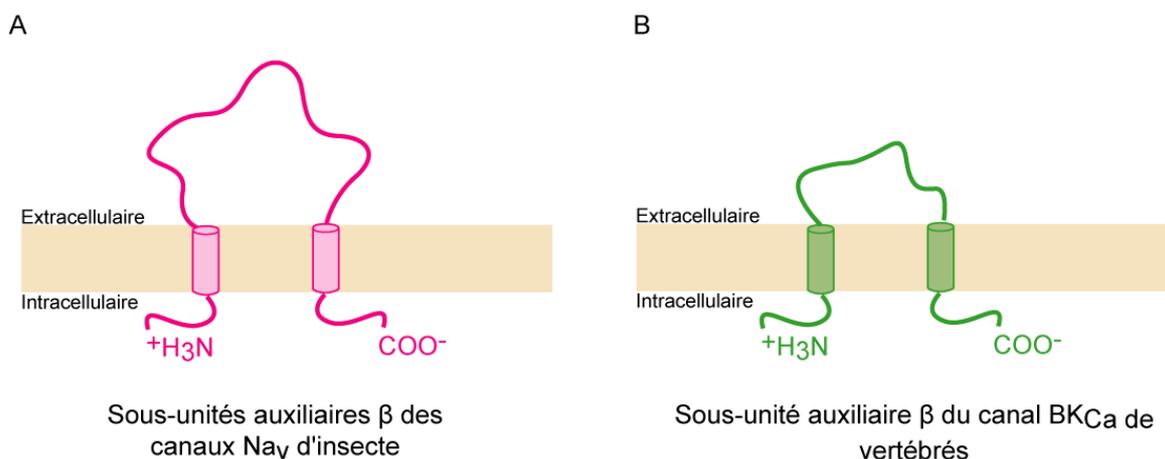


Figure 5 : Comparaison de la topologie transmembranaire des sous-unités β de canaux Na_v d'insecte avec la sous-unité β des canaux BK_{Ca} de vertébrés.

(A : modifié d'après Feng et coll., 1995a et B : modifié d'après Savalli et coll., 2007)

C.2.3 Quel est le rôle de la sous-unité TipE ?

Chez *D. melanogaster*, les mutants TipE sont caractérisés par une paralysie réversible en fonction de la température (Feng et coll., 1995a, Feng et coll., 1995b). La densité des courants Na⁺ des neurones embryonnaires des mutants TipE est fortement réduite par rapport à la densité des courants Na⁺ des neurones sauvages (O'Dowd et coll., 1988). Ces résultats indiquent que TipE module l'expression de la sous-unité DmNa_v1. En accord avec ces études, il a été montré que la coexpression de la sous-unité DmNa_v1 avec la sous-unité TipE, dans des ovocytes de xénope, augmente considérablement l'amplitude des courants Na⁺ comparativement à l'injection seule de la sous-unité DmNa_v1 (Feng et coll., 1995a, Warmke et coll., 1997). De plus, la co-injection de la sous-unité TipE avec la sous-unité DmNa_v1 accélère l'inactivation des courants Na⁺ (augmentation d'un facteur 2 de la constante d'inactivation) (Warmke et coll., 1997). La coexpression de la sous-unité MdNa_v1 avec la sous-unité Vssc1 engendre une modulation similaire des courants Na⁺ (Lee et coll., 2000b). Ceci indique que la fonction des sous-unités homologues à TipE est bien conservée entre les insectes. Au contraire, la co-injection de la sous-unité TipE avec la sous-unité VmNa_v1 dans des ovocytes de xénope diminue l'amplitude des courants Na⁺, indiquant que la sous-unité TipE module différemment l'expression des sous-unités α des canaux Na_v des arachnides (Du et coll., 2009a).

Par ailleurs, la fréquence de décharge des potentiels d'action des neurones embryonnaires des mutants TipE⁻ est fortement réduite par rapport au phénotype sauvage. En effet, la réduction de l'excitabilité membranaire des mutants TipE⁻ est associée au ralentissement de la réactivation des canaux Na_v (Hodges et coll., 2002). Par conséquent, TipE s'avère être non seulement une protéine permettant l'adressage de la protéine-canal dans la membrane mais aussi une protéine accessoire modulant les propriétés d'inactivation et de réactivation de la sous-unité DmNa_v1. Dans ce sens, la fonction de TipE est analogue aux sous-unités β de mammifères. Mais alors qu'en est-il des autres sous-unités homologues à TipE ?

La coexpression de la sous-unité DmNa_v1 avec les sous-unités TEH1, TEH2 et TEH3 dans des ovocytes de xénope augmente aussi l'amplitude des courants Na⁺ (Derst et coll., 2006). La sous-unité TEH1 augmente deux fois plus l'amplitude des courants Na⁺ par rapport à la sous-unité TipE. Au contraire, l'effet des sous-unités TEH2 et TEH3 est moins

important comparativement à sous-unité TipE. En revanche, la sous-unité TEH4 n'a pas d'influence sur l'amplitude du courant Na^+ lorsqu'elle est co-exprimée avec DmNa_v1 , mais conduit à une réduction importante du courant lors d'une co-injection de DmNa_v1 et TEH1 (Derst et coll., 2006). Par conséquent, TEH4 a un effet inhibiteur sur l'expression du canal. Non seulement, la sous-unité TEH1 influence fortement le niveau d'expression de la sous-unité DmNa_v1 mais aussi module la dépendance au potentiel de l'inactivation. En présence de la sous-unité TEH1 l'inactivation à l'état stable du courant Na^+ est décalée de 6 mV vers des potentiels hyperpolarisants par rapport à la coexpression de DmNa_v1 avec la sous-unité TipE. De plus, la sous-unité TEH1 ralentit de 26 % la constante de réactivation.

Les transcrits TEH1 sont uniquement exprimés dans la SNC alors que les transcrits des autres sous-unités sont aussi exprimés dans les tubes de Malpighi, le tissu adipeux, les glandes salivaires et les muscles (Derst et coll., 2006). Par conséquent, l'interaction entre la sous-unité TEH1 et la sous-unité DmNa_v1 doit jouer un rôle fonctionnel prépondérant au sein du SNC. Malgré ces suppositions, aucune donnée n'a montré à ce jour une interaction physique entre les sous-unités principales et les sous-unités auxiliaires de canaux Na_v d'insecte.

D Relation structure-fonction des canaux Na_v

Hodgkin et Huxley ont été les premiers à concevoir un modèle de base décrivant les mécanismes ioniques des potentiels d'actions à partir d'études électrophysiologiques des courants Na^+ de l'axone géant de calmar (Hodgkin et coll., 1952). Ainsi, ils ont modélisé par un système d'équation l'activation (paramètre m) et l'inactivation (paramètre h) des canaux Na_v en fonction du temps [$m(t)$ et $h(t)$] et du potentiel (m^∞ et h^∞). Basées sur ces fondements théoriques, des études de relation structure-fonction ont permis de corréliser les propriétés électrophysiologiques des canaux Na_v de vertébrés à des motifs moléculaires. Par extension, les motifs moléculaires associés à l'état d'activation et d'inactivation des canaux Na_v sont communément appelés portes m et h , respectivement (Figure 6). En effet, l'abondance des informations de séquences acquises lors du clonage des canaux Na_v d'*E. electricus* a permis de prédire un ensemble de résidus protéiques importants pour la fonction des canaux Na_v de vertébrés (Noda et coll., 1984). Puis, l'expression des sous-unités α recombinantes de vertébrés dans des cellules non-excitables a permis de corréliser ces identités moléculaires aux propriétés des courants Na^+ . En revanche, en raison de la

difficulté à exprimer des canaux Na_v d'insecte dans un système hétérologue, l'investigation expérimentale des relations de structure-fonction caractérisant les canaux Na_v d'insecte reste un domaine peu développé. Les données sont alors extrapolées des informations acquises pour les canaux Na_v de vertébrés.

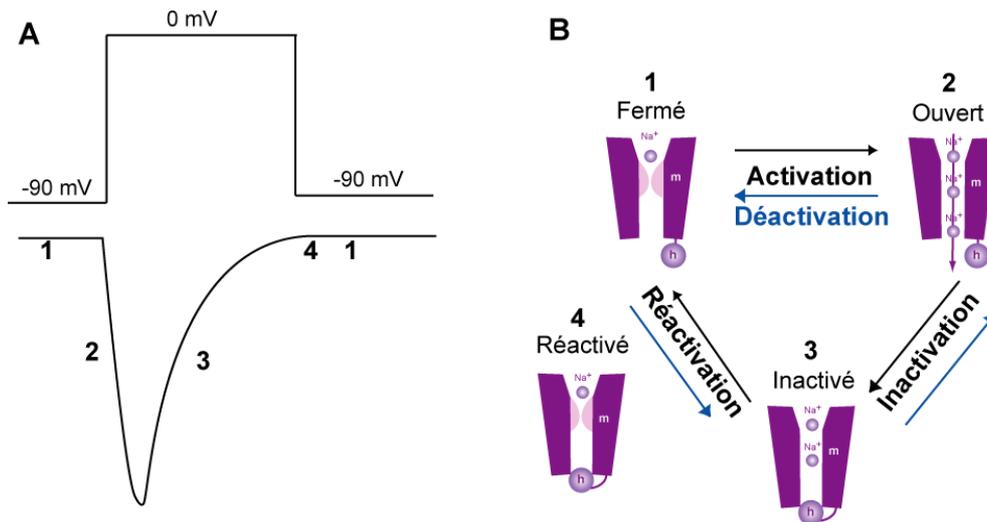


Figure 6 : Les courants Na^+ résultent de différents états de conformation des canaux Na_v .

A. Décours du courant Na^+ à la suite d'une dépolarisation (-90 à 0 mV). Les chiffres se réfèrent aux différents états conformationnels des canaux Na_v .

B. Au repos les canaux Na_v sont fermés : la porte h est ouverte et la porte m est fermée (1 : état de repos). Lors de la dépolarisation, la porte m s'ouvre laissant passer les ions Na^+ (2 : activation). Puis rapidement la porte h bloque les ions Na^+ par occlusion du pore (3 : inactivation). A la fin de la dépolarisation, la porte m se referme avant que la porte h ne s'ouvre (4 : réactivation).

D.1 Processus d'activation

L'activation des canaux Na_v résulte du déplacement de résidus d'acides aminés chargés positivement sous l'effet d'une dépolarisation de la membrane. Rapidement, il a été postulé que les segments S4 des canaux Na_v sont impliqués dans l'activation étant donné qu'ils comptent plusieurs arginine et lysine agencées régulièrement autour des hélices α (Noda et coll., 1984). La neutralisation de ces résidus chargés positivement par des mutations ponctuelles a finalement prouvé que les segments S4 constituent le senseur de potentiel des canaux Na_v de mammifères (Stuhmer et coll., 1989). De plus, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que non seulement la charge des arginines et lysines influence la dépendance au potentiel de l'activation, mais aussi leur structure (Kontis et coll.,

1997). De plus, les résidus chargés positivement des segments S4 des domaines I à III influencent davantage la dépendance au potentiel de l'activation (Kontis et coll., 1997, Bosmans et coll., 2008). Par conséquent, sous l'effet d'une dépolarisation, les segments S4 se déplacent vers le milieu extracellulaire, ce qui modifie la conformation des canaux Na_v et entraîne l'ouverture du pore du canal. Plusieurs modèles basés sur l'activation des canaux K_v conceptualisent les mouvements du senseur de potentiel dans la membrane (Tombola et coll., 2006). Pour les canaux Na_v , le modèle de la torsion hélicoïdale reste le plus défendu jusqu'à aujourd'hui (Catterall, 2000).

Les résidus d'acides aminés chargés positivement au niveau du senseur de potentiel des canaux Na_v de mammifères sont intégralement conservée au niveau des homologues de la sous-unité DmNa_v1 (Loughney et coll., 1989).

D.2 Filtre de sélectivité

Les canaux Na_v ne sont pas perméables aux ions Ca^{2+} , et le ratio de la perméabilité des ions K^+ par rapport aux ions Na^+ est de 0,03, indiquant que les canaux Na_v sont très sélectifs aux ions Na^+ (Favre et coll., 1996). Le clonage des sous-unités α de canaux Na_v de mammifères a permis d'identifier les résidus d'acides aminés clefs impliqués dans la sélectivité aux ions Na^+ . Cette signature moléculaire est localisée au niveau de larges boucles extracellulaires, nommées boucles P, reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine. Plus précisément, les résidus d'acide aminé D, E, K et A localisés en position homologue sur chaque boucle P forme un anneau interne déterminant le filtre de sélectivité aux ions Na^+ (Figure 2) (Heinemann et coll., 1992). Parmi ces résidus d'acides aminés le glutamate (DII) et la lysine (DIII) jouent un rôle essentiel puisque leur association au sein de l'anneau AEKA de canaux mutants conserve la sélectivité aux ions Na^+ (Favre et coll., 1996). Récemment, il a été proposé que la liaison hydrogène liant l'extrémité carboxyle du glutamate et l'extrémité amino de la lysine bloque l'interaction des cations monovalents, limitant ainsi leur passage dans le pore du canal (Lipkind et coll., 2008). En revanche, les ions Na^+ sont capables de rompre cette liaison. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la sélectivité des canaux Na_v peut être échangée en substituant les résidus d'acides aminés de l'anneau interne par leurs homologues EEEE des canaux Ca_v (Heinemann et coll., 1992).

Un second anneau EEDD situé en bordure externe du pore du canal participe aussi à la conductance sodique des canaux Na_v (B1.2/Figure 2) (Chiamvimonvat et coll., 1996). Enfin, ajoutons que des études de mutagenèse dirigée, réalisées sur les canaux $\text{rNa}_v1.4$, ont identifié d'autres résidus acides aminés dans les domaines III et IV, impliqués dans la sélectivité ioniques du canal Na_v (Tsushima et coll., 1997). Ainsi la mutation K1237C induit une sélectivité préférentielle pour les cations divalents ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$).

Par ailleurs, les résidus impliqués dans le filtre de sélectivité des canaux Na_v sont intimement liés à l'affinité des bloqueurs spécifiques de canaux Na_v à savoir la TTX ou la STX. Le site récepteur de ces toxines comprend les anneaux EEMD et DEKA (Soong et coll., 2006). Ainsi, la neutralisation du glutamate constituant l'anneau DEKA rend le canal rNav1.2 insensible à la TTX (Noda et coll., 1989). De plus, il a été montré par mutagenèse dirigée que les glutamates constituant l'anneau interne EEDD déterminent le site de fixation de la TTX (Terlau et coll., 1991). Enfin, la tyrosine précédant l'aspartate dans le domaine I est substituée par une cystéine au niveau des sous-unités rNav1.5 , conférant la résistance des canaux à la TTX (Satin et coll., 1992). Par conséquent, ce résidu d'acide aminé discrimine la sensibilité des canaux Na_v à la TTX.

Les canaux Na_v d'insecte recombinants ou natifs sont sensibles à la TTX (F.1.2/Tableau 5), ce qui suggère que le pore de canaux Na_v d'insecte partage une forte homologie avec celui des canaux Na_v de mammifères. En effet, l'analyse des séquences protéiques montrent que la signature moléculaire DEKA impliquée dans la sélectivité des canaux Na_v de mammifères est parfaitement conservée au niveau des sous-unités homologues à la sous-unité DmNa_v1 (Loughney et coll., 1989). Comme chez les mammifères, la lysine de l'anneau DEKA joue un rôle prépondérant pour la sélectivité des canaux Na_v d'insecte aux ions Na^+ . En effet, d'autres canaux ioniques proches des canaux Na_v d'insecte, à savoir BSC1 (*B. germanica*) et DSC1 (*D. melanogaster*) possèdent une signature moléculaire différente DEEA (Salkoff et coll., 1987, Liu et coll., 2001). L'expression de la sous-unité BSC1 dans des ovocytes de xénope a montré que ce canal est sélectif à la fois aux ions Ca^{2+} et aux ions Na^+ (Zhou et coll., 2004). Enfin, l'expression de la sous-unité VmNa_v1 de *Varroa destructor* dans des ovocytes de xénope a permis de montrer que l'anneau EETS en position homologue de l'anneau EEMD chez les mammifères et EEID chez les insectes est responsable de la résistance de VmNa_v1 à la TTX (Du et coll., 2009a). De plus, l'aspartate de la boucle IIS5-S6 de l'anneau externe EEDD des canaux Na_v de mammifères est remplacé par une glutamine au niveau des canaux Na_v d'insecte.

D.3 Mécanismes d'inactivation

Après l'activation des canaux Na_v , la conductance pour les ions Na^+ augmente rapidement, puis décroît malgré le maintien de la dépolarisation (Figure 6). L'inactivation est responsable de cette cinétique du courant Na^+ , et correspond de ce fait à la fermeture du pore des canaux Na_v (Figure 6). De plus, au cours de l'inactivation, les canaux Na_v sont maintenus indisponibles jusqu'à ce qu'ils soient réactivés après l'arrêt de la dépolarisation. Deux types d'inactivation ont été distingués en fonction de leur cinétique : l'inactivation rapide (<1ms) *versus* l'inactivation lente (>1s). L'inactivation rapide est importante pour la repolarisation des PAs, alors que l'inactivation lente est plus impliquée dans la modulation de l'excitabilité membranaire et de la fréquence de décharge des PAs. Les motifs moléculaires mis en jeu pour ces deux processus sont tout à fait distincts (Goldin, 2003, Ulbricht, 2005).

Des expériences de biochimie et de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus d'acides aminés associés à l'inactivation rapide de la sous-unité α r $\text{Na}_v1.2$ (Stuhmer et coll., 1989, West et coll., 1992). Le peptide IFMT localisé au niveau de la boucle intracellulaire L3 constitue la particule d'inactivation. Etant donné son rôle fonctionnel majeur, il est très conservé parmi la séquence protéique des canaux Na_v de vertébrés. Le principe de cette particule d'inactivation est d'obstruer le pore du canal selon le concept de « boule chaîne » (Goldin, 2003). Plus précisément, au cours d'une impulsion dépolarisante, le déplacement des segments S4 favorise l'accès du peptide IFMT à son site récepteur. Ce dernier recense des résidus d'acides aminés situés dans les boucles intracellulaires IIS4-S5 et IVS4-S5. Ainsi cette interaction protéique au sein de la sous-unité α stabilise, en fonction du potentiel de la membrane, l'occlusion du pore (Goldin, 2003).

Les mécanismes de l'inactivation lente sont plus complexes, impliquant des structures différentes de l'inactivation rapide, et encore peu compris de nos jours. L'hypothèse proposée pour expliquer l'inactivation lente est un réarrangement de la structure du pore des canaux Na_v conduisant à une réduction de la conductance aux ions Na^+ . De multiples résidus d'acides aminés localisés au niveau du segment IVS4, IIS6 et de la boucle IIS5-S6 ont été identifiés comme étant importants pour ce processus (Goldin, 2003, Ulbricht, 2005).

De manière générale, les courants Na^+ des préparations d'insectes s'inactivent rapidement. En accord avec ces observations électrophysiologiques, l'alignement multiple

des séquences protéiques des sous-unités α rNav1.2 et des sous-unités α homologues à DmNa_v1 montrent que l'homologue de la particule d'inactivation comprend les résidus MFMT chez les insectes, et que les résidus d'acides aminés constituant le site récepteur sont parfaitement conservés. Des courants Na⁺ s'inactivant lentement ont été occasionnellement mesurés dans différentes préparations neuronales (Lapied et coll., 1990, Lapied et coll., 1997). Parallèlement, il a été montré que la substitution d'une phénylalanine par une sérine au niveau de l'extrémité C terminale de la sous-unité BgNa_v1 induit un courant qui s'inactive lentement (Liu et coll., 2004).

En conclusion, l'analyse des séquences protéiques fait apparaître la conservation des motifs moléculaires déterminant les trois propriétés fonctionnelles entre les sous-unités α de canaux Na_v de mammifères et d'insecte. Cependant, aucune étude n'a démontré expérimentalement comment l'environnement protéique du pore, du senseur de potentiel et de la particule d'inactivation conditionne les propriétés des canaux Na_v d'insecte.

E Pharmacologie moléculaire des canaux Na_v aux insecticides neurotoxiques

La sous-unité α des canaux Na_v ne constitue pas seulement un pore perméable aux ions Na⁺ mais aussi une cible pour de nombreuses neurotoxines, antileptiques, anesthésiques locaux et insecticides qui altèrent leur fonction. Sept sites récepteurs aux neurotoxines caractérisent les canaux Na_v d'insecte (Gordon et coll., 2007) (Figure 7). Dans la suite de l'exposé, nous nous intéresserons aux molécules ciblant le site 7 et le site des anesthésiques locaux en raison de leur utilisation majeure pour la lutte contre les insectes nuisibles. En effet, les insecticides de la famille des pyréthrinoïdes ciblent le site 7 tandis que les insecticides de la famille des dérivés de pyrazolines partagent le même site que celui des anesthésiques locaux (Raymond-Delpech et coll., 2005). Mais alors comment ces deux familles d'insecticides peuvent altérer de manière différente la fonction des canaux Na_v ?

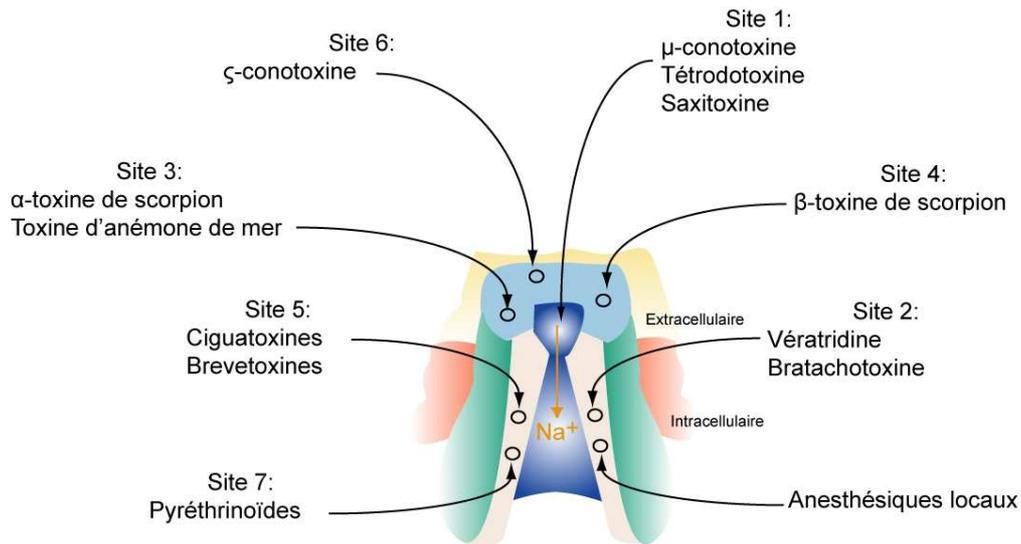


Figure 7 : Pharmacologie de la sous-unité α des canaux Na_v .

Les sites récepteurs des neurotoxines sont indiqués par un numéro. Les sites récepteurs des toxines liposolubles (alcaloïdes (site 2), polyéthers cycliques de toxine marine (site 5), les anesthésiques locaux et les pyréthriinoïdes de synthèses (site 7)) sont situés au cœur des régions hydrophobes du canal. Les sites récepteurs des toxines hydrosolubles (toxines α et β de scorpion (sites 3 et 4 respectivement), ζ -conotoxines (site 6)) sont situés au niveau des régions extracellulaires du canal. Le vestibule externe du pore au centre du canal est le site récepteur 1 de l' μ -conotoxine, de la tétrodotoxine et de la saxitoxine. (Modifié d'après Gordon et coll., 2007)

E.1 Mode d'action et site de fixation des pyréthriinoïdes

E.1.1 Découverte et utilisation

Les pyréthriinoïdes sont des molécules de synthèse analogues aux pyréthrines, ensembles de métabolites secondaires des fleurs de chrysanthèmes (*Tanacetum cinerariaefolium*) (Isman, 2006). Les pyréthrines ont naturellement une action insecticide caractérisée par un arrêt rapide de la conduction nerveuse, une hyperactivité et des convulsions chez la plupart des insectes, ceci résultant d'un dysfonctionnement des canaux Na_v (Isman, 2006). Photosensibles les pyréthrines ont connus un développement commercial mineur. Cependant, pour remédier à cette propriété physico-chimique, des analogues synthétiques photostables, à savoir les pyréthriinoïdes, ont été élaborés. Commercialisés dès les années 1970 ils représentent aujourd'hui 25% des insecticides les plus vendus dans le monde (Shafer et coll., 2005).

E.1.2 Mode d'action

Deux classes de pyréthriinoïdes sont différenciables en fonction de leur structure chimique et de leur mode d'action. Structuellement, les pyréthriinoïdes de type II se distinguent des pyréthriinoïdes de type I de part la présence d'une liaison α -cyanée (Figure 8). En dépit de partager la même cible moléculaire, les symptômes associés à une intoxication par ces deux classes de pyréthriinoïdes diffèrent (Narahashi, 2000) (Figure 8). Les pyréthriinoïdes de type I, tels que la perméthrine, prolonge la durée d'ouverture des canaux Na_v suffisamment pour atteindre le seuil de déclenchement des PAs, et provoquer de ce fait la répétition des PAs (Figure 8A). Cette hyperexcitation provoque des convulsions, des prostrations et des paralysies typiques qualifiées de « knock-out ». Les pyréthriinoïdes de type II, tels que la deltaméthrine, prolonge aussi la durée d'ouverture des canaux Na_v mais d'une manière si importante que la dépolarisation lente de la membrane aboutit à un blocage progressif de la propagation des PAs (Figure 8B). Les pyréthriinoïdes de type II sont aussi plus efficaces car leurs effets sont irréversibles.

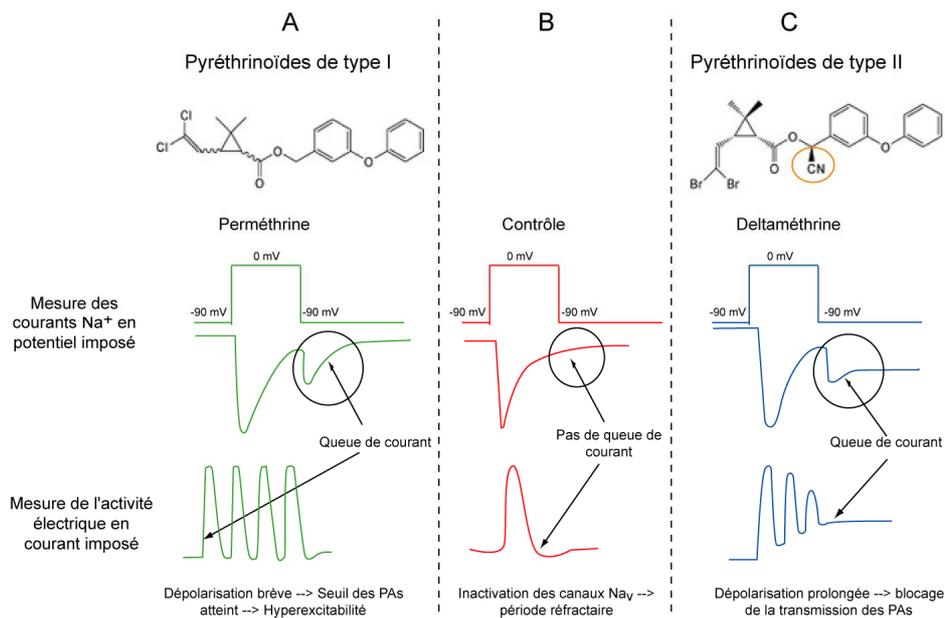


Figure 8 : Structure chimique et mode d'action des pyréthriinoïdes.

A : Pyréthriinoïdes de type I (Ex. : perméthrine). Les pyréthriinoïdes de type I induisent une queue de courant dont la durée et l'amplitude dépolarisent juste suffisamment la membrane pour atteindre le seuil de déclenchement des PAs. Ceci conduit à une hyperexcitabilité.

B. En condition contrôle lors de la repolarisation de la membrane, les canaux Na_v sont à l'état inactivé et la membrane ne génère plus de PAs pendant la période réfractaire.

C. Pyréthriinoïdes de type II (Ex. : deltaméthrine) sont caractérisés par une liaison α -cyanée (cercle orange). Les pyréthriinoïdes de type II induisent une queue de courant dont l'amplitude et la durée prolongée conduisent à une dépolarisation si importante de la membrane que la transmission des PAs est bloquée.

Plus précisément, en se fixant sur le canal préférentiellement à l'état activé, les pyréthriinoïdes empêchent la fermeture de la porte m du canal au cours de la désactivation ou de la réactivation. Cette modification de la conformation du canal et à l'origine du flux d'ions Na^+ continu. Ainsi, en présence de pyréthriinoïdes, le déroulement du courant Na^+ est caractérisé par un courant supplémentaire dit « queue de courant » mesuré au moment de la repolarisation (Figure 8). En fonction de l'amplitude et de la durée de la queue de courant, on peut discerner les types de pyréthriinoïdes.

E.1.3 Site de fixation des pyréthriinoïdes

Le site de fixation correspond aux résidus d'acides aminés interagissant avec les pyréthriinoïdes. Au-delà du site de fixation, les résidus d'acides aminés impliqués dans la conformation favorable des canaux Na_v à la fixation des pyréthriinoïdes sont aussi très importants. L'identification des mécanismes de résistance aux pyréthriinoïdes par mutation de cible a permis d'identifier les résidus d'acide aminé essentiels pour l'activité de ces molécules (Davies et coll., 2007b, Dong, 2007). Trois mutations localisées dans la boucle IIS4-S5 (M918T), les segments IIS5 (T929I) et IIS6 (L1014F) de la sous-unité DmNa_v1 réduisent l'affinité de la deltaméthrine d'un facteur 200, 100 et 20 respectivement (Vais et coll., 2000, Vais et coll., 2003). Plus précisément, ces mutations diminuent le nombre de canaux Na_v à l'état activé lors de l'application d'une dépolarisation, ce qui limite la fixation de l'insecticide. De plus, ces trois mutations ont été identifiées chez d'autres espèces d'insecte, indiquant leur rôle majeur dans le mode d'action des pyréthriinoïdes (Davies et coll., 2007b). Une étude récente a modélisé le site de fixation des pyréthriinoïdes en reconstituant la sous-unité DmNa_v à partir de la structure cristallisée du canal potassique $\text{K}_v1.2$ (O'Reilly et coll., 2006). Ce modèle met en avant le rôle de la boucle IIS4-S5 et des hélices α IIS5 et IIS6 pour la fixation des pyréthriinoïdes. D'autres résidus localisés notamment dans le segment IIS6 semblent aussi constituer le site de fixation.

E.2 Mode d'action et site de fixation des dérivés de pyrazoline

E.2.1 Découverte et utilisation

Face à la résistance de nombreuses espèces d'insectes aux pyréthrinoïdes, des insecticides dits de seconde génération, ont été développés à partir de la fin des années 1990. Il s'agit de molécules de synthèse dérivant de pyrazolines, composés organiques constituées d'un cycle aromatique comptant trois carbones, deux azotes dont un azote hydrogéné et une double liaison.

L'indoxacarbe de la famille des oxadiazines est le premier insecticide commercialisé avec anneau analogue au cycle des pyrazolines (Figure 9). Il présente l'originalité d'être bioactivé par le système enzymatique des insectes. Cette réaction correspond à la substitution du groupe esther de méthyle par un hydrogène (Wing et coll., 1998, Wing et coll., 2000). Ainsi, le métabolite actif, nommé DCJW, est pourvu d'une activité insecticide encore plus performante que la molécule mère. Le taux d'indoxacarbe métabolisé en DCJW est un facteur critique pour déterminer son efficacité et est variable selon les ordres d'insectes. Ainsi, l'indoxacarbe est converti plus rapidement en DCJW par les lépidoptères que ce soit par administration orale ou application topique, comparé aux insectes piqueurs-suceurs (Wing et coll., 2000).

Le métaflumizone est un autre dérivé de pyrazoline qui possède quant à lui une structure analogue aux semicarbazones (Figure 9) (Takagi et coll., 2007). Depuis 2004, il est co-développé par la société Fort Dodge Animal Health en tant que produit antiparasitaire à usage vétérinaire (ProMeris®), et par BASF Crop Protection en tant que produit agropharmaceutique. Toutefois son usage n'a pas encore été approuvé par la majorité des pays européens.

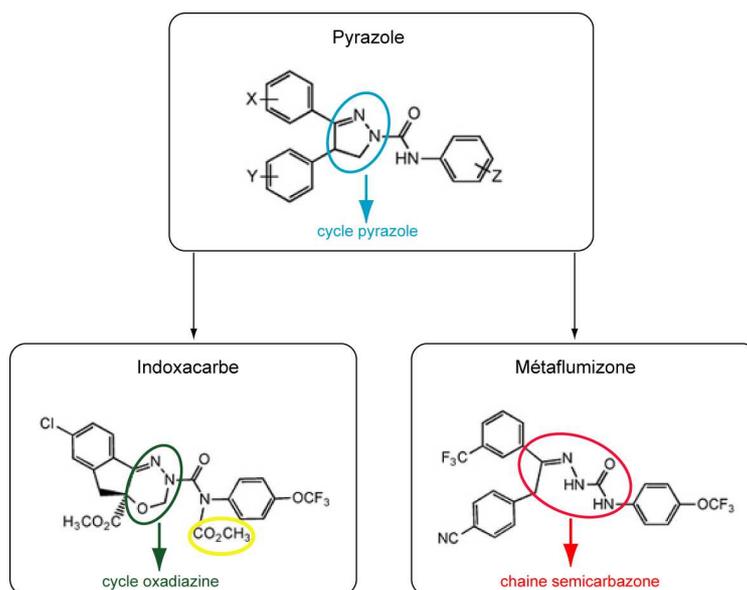


Figure 9 : Structure chimique des dérivés de pyrazolines (modifié d'après Takagi et coll. 2007).

L'indoxacarbe et le métaflumizone dérivent de molécules avec un cycle pyrazole modifié. Ainsi l'indoxacarbe comprend un cycle oxadiazine (cercle vert) alors que la métaflumizone comporte une chaîne semicarbazone (cercle rouge). La bioactivation de l'indoxacarbe en DCJW consiste en la substitution du groupe ester de méthyle (cercle jaune) par un hydrogène.

E.2.2 Mode d'action des dérivés de pyrazoline

(a) Les oxadiazines

Des études électrophysiologiques ont montré que le DCJW inhibe l'activité électrique du cinquième ganglion abdominal des larves de *M. sexta* (Wing et coll., 1998). Des études de patch-clamp en configuration cellule entière ont confirmé que la conductance sodique des neurones DUM de *P. americana* est réduite de manière dose dépendante par le DCJW, (Lapied et coll., 2001). Par conséquent, chez les insectes, la cible majeure du DCJW est le canal Na_v . Dans une autre étude de patch-clamp réalisée à partir de neurones dissociés du ganglion métathoracique de blatte *P. americana*, l'activité insecticide de l'indoxacarbe a été comparée à celle du DCJW (Zhao et coll., 2005). Les effets neurotoxiques de l'indoxacarbe sont aussi caractérisés par une réduction graduelle de l'amplitude des courants Na^+ au cours du temps. Mais, alors que les effets induits par le DCJW sont irréversibles, les effets induits par l'indoxacarbe sont annulés après rinçage des neurones. Par conséquent, le DCJW possède une plus forte affinité pour les canaux Na_v , comparativement à l'indoxacarbe.

Ces mêmes études ont montré que l'activité du DCJW dépend du potentiel de la membrane des neurones. Plus le potentiel de la membrane est maintenu à des potentiels dépolarisants prolongés, plus le DCJW bloque les canaux Na_v (Zhao et coll., 2005). Un décalage de la courbe d'inactivation lente à l'état stable vers des potentiels hyperpolarisants est observé en présence de DCJW. Ceci indique que le DCJW se lie de manière sélective à l'état d'inactivation lente puis stabilise les canaux Na_v dans cet état de conformation. Ce couplage inactivation lente/fixation du DCJW a aussi été remarqué pour des isoformes BgNav ne possédant pas les mêmes propriétés d'inactivation (Song et coll., 2006).

(b) Le métaflumizone

Les investigations caractérisant le mode d'action du métaflumizone sont pour le moment limitées étant donné sa récente découverte (Takagi et coll., 2007). Des mesures de patch-clamp en conditions de potentiel et de courant imposés sur des neurones de *M. sexta* illustrent l'effet bloqueur du métaflumizone sur les canaux Na_v . Des mesures électrophysiologiques des courants Na^+ élicités par l'expression des sous-unités Dm Na_v1 ou BgNav1.1 associées à la sous-unité TipE dans des ovocytes de xénope confirme la dépendance au potentiel de l'effet bloqueur du métaflumizone (Salgado et coll., 2007, Silver et coll., 2009).

(c) Identification des résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation des dérivés de pyrazolines aux canaux Na_v

Les dérivés de pyrazoline possèdent des propriétés pharmacologiques proches de celles des anesthésiques locaux tels que la lidocaïne (Hille, 2001). En effet, les anesthésiques locaux sont aussi des bloqueurs des canaux Na_v dont l'affinité dépend du potentiel de la membrane. De plus, ils inhibent graduellement les courants Na^+ au fur et à mesure que les stimuli se répètent. Ce mode d'action est qualifié de blocage phasique ou de blocage « use dependent » (Hille, 2001). Toutefois contrairement aux anesthésiques locaux, les dérivés de pyrazolines possèdent une cinétique d'association et de dissociation trop lente pour exercer un blocage phasique (Lapied et coll., 2001, Silver et coll., 2005, Song et coll., 2006, Silver et coll., 2007). Ainsi, la co-application d'anesthésiques locaux avec le DCJW réduit l'effet bloqueur du DCJW, ceci suggérant que ces deux familles de molécules agissent sur le même site (Lapied et coll., 2001, Silver et coll., 2005). Les résidus d'acide aminés importants pour la fixation des anesthésiques locaux sont localisés au niveau des segments S6 des domaines DI-DIV des canaux Na_v , et en particulier au niveau des résidus aromatiques du segment IVS6 (Wang et coll., 2003b).

Des expériences de mutagenèse dirigée ce sont intéressées à l'effet de la mutation des résidus F1579 et Y1586, localisés dans le segment IVS6 de la sous-unité α rNav1.4, sur la modulation de l'efficacité des oxadiazines (Silver et coll., 2007). Alors que la mutation F1579A réduit de deux fois la sensibilité des mutants au DCJW, la mutation Y1598 conduit à l'effet contraire. Par analogie avec les anesthésiques locaux, les auteurs émettent l'hypothèse que le résidu F1579 stabilise la fixation des dérivés de pyrazoline. Au contraire, ils suggèrent que l'interaction stérique entre le résidu Y1586 et le DCJW est non favorable à sa fixation. De la même manière, l'implication des résidus aromatiques en position homologue de la sous-unité BgNav1.1 (F1817 et Y1824) a été évaluée (Silver et coll., 2009). Les effets induits par ces mutations sont distincts de ceux cités précédemment pour les canaux Na_v de mammifères. La mutation F1817A augmente de 20% l'efficacité du DCJW et du métaflumizole. La mutation Y1824A favorise d'un côté l'interaction du DCJW avec les canaux Na_v , mais réduit d'un autre côté la fixation du métaflumizone. Cette étude finit par conclure que le site de fixation des dérivés de pyrazoline implique très certainement un ensemble de résidus d'acides aminés répartis sur d'autres régions des canaux Na_v d'insecte.

F Physiologie des courants Na^+ d'insectes

F.1.1 Localisation des canaux Na_v d'insecte

La localisation des canaux Na_v au sein du système nerveux central des insectes a été caractérisée à partir d'études associant des techniques d'immunocytochimie et d'électrophysiologie. Généralement, les potentiels d'action sont initiés et transmis le long de l'axone, ce qui suggère que les canaux Na_v sont localisés au niveau de l'axone. En effet, les canaux Na_v ont été mis en évidence par un anticorps spécifique au niveau de la membrane des axones de différents neurones de *P. americana* (French et coll., 1993, Amat et coll., 1998). Toutefois, des potentiels d'action spontanés ou déclenchés ont été enregistrés au niveau du corps cellulaire de différents neurones d'insecte, ce qui suggère que les canaux Na_v sont aussi localisés au niveau du soma. En effet, les propriétés électrophysiologiques et la sensibilité à la TTX des canaux Na_v associés à cette activité électrique du soma ont été caractérisés chez diverses préparations neuronales d'insecte (Tableau 5). Plus précisément, dans le cas des neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) de *P. americana*, des canaux Na_v fonctionnels ont été localisés au niveau du neurite primaire (Lapied et coll., 1989, Lapied et

coll., 1990, Amat et coll., 1998). La concentration des canaux Na_v au pôle basal des corps cellulaires en culture a aussi été mentionnée pour les neurones du lobe antennaire de l'abeille et les neurones récepteurs olfactifs du papillon de nuit (Kloppenburger et coll., 1999, Lucas et coll., 2002).

Mais alors comment expliquer la présence des canaux Na_v au niveau du corps cellulaire des neurones d'insecte ? D'un côté, il a été montré que l'amplitude croissante du courant Na^+ au cours de la culture des neurones DUM dissociés de *P. americana* est associée à une synthèse des canaux Na_v (Tribut et coll., 1991). D'un autre côté, il a été suggéré que la déafférentation des cellules de Kenyon de l'abeille stimule l'incorporation, au niveau de la membrane, des canaux Na_v provenant du cytosol (Schafer et coll., 1994). En résumé, les canaux Na_v d'insecte sont principalement localisés au niveau des sites d'initiation des potentiels d'action et au niveau de l'axone. La membrane des corps cellulaires possède aussi des canaux Na_v fonctionnels lorsque les neurones sont maintenus en culture.

F.1.2 Propriétés biophysiques des courants Na^+

Les propriétés biophysiques et pharmacologiques des courants Na^+ des neurones d'insecte ont été investiguées grâce au développement de la culture cellulaire des neurones (Tableau 5). De manière générale, les systèmes de culture de neurones d'insecte sont élaborés de façon à conserver les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones *in situ* (Beadle, 2006). Ainsi, la culture des neurones offre l'avantage de pouvoir (i) contrôler les conditions expérimentales afin d'isoler les courants ioniques et (ii) étudier les neurones de petite taille difficile d'accès *in situ* (Ex. cellules Kenyon). Mais l'inconvénient de cette approche est que l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* peut s'avérer problématique dans le sens où les neurones sont isolés de leur environnement natif et déconnectés du réseau synaptique. Ceci peut influencer l'excitabilité membranaire et/ou conduire à des remaniements cellulaires. En effet, dans certains cas, l'activité électrique spontanée est altérée lorsque les neurones sont mis en culture (Exemple : neurones du lobe antennaire de l'abeille (Kloppenburger et coll., 1999); neurones DUM du ganglion métathoracique de *Schistocerca migratoria* (Heidel et coll., 2006)). Seuls les neurones DUM dissociés du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana* conservent intactes leurs propriétés électriques spontanées *in situ* (Lapied et coll., 1990).

Tableau 5 : Quelques caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques des courants Na⁺ transitoires de différentes préparations neuronales d'insecte et de canaux Na_v recombinants exprimés dans des ovocytes de xénope.

| Type cellulaire | Espèce d'insecte | Préparation | Stade de développement | Paramètre des courants Na ⁺ | | | | | | | [TTX] bloc (μM) | Référence | |
|-------------------------------------|---|--|------------------------|--|---|--------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|---|----------------------|
| | | | | Potentiel de repos (mV) | Seuil activation (mV) | Max I-V (mV) | V _{0,5} Activation (mV) | K _a (mV) | V _{0,5} Inactivation (mV) | K _i (mV) | | | |
| Neurones sensoriels | <i>Manduca sexta</i> | Neurones olfactifs récepteurs | adulte | -62 | pas de courant Na ⁺ mesuré sur la soma en patch unitaire | | | | | | | 0,10 | Zufall et coll. 1991 |
| | <i>Manestra brassicae</i> | | larve | -53 à -33 | -50 | -10 ou 0 | - | - | - | - | 1,00 | Lucas et coll. 2002 | |
| | <i>Apis mellifera</i> | | pupe | -48 à -75 | -60 | -30 | - | - | - | - | 1,00 | Laurent et coll. 2002 | |
| | <i>Manduca sexta</i> | Neurones lobe antennaire* | pupe | - | -50 et -45 | -10 | - | - | -50 | - | - | Mercer et coll. 2002 | |
| | <i>Apis mellifera</i> | Neurones moteurs lobe antennaire* | adulte | -40 à -60 | -35 | -5 | - | - | -73 | 6 | 0,10 | Kloppenberget coll., 1999 | |
| Neurones du système nerveux central | <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Neurones embryonnaires</i> | gastrula moyenne | - | -30 | 0 | - | - | -48 | 4 | 0,01 | O'Dowd et coll. 1988 | |
| | <i>Gryllus bimaculatus</i> | Interneurones géants (derniers ganglions abdominaux) | adulte | -40 à -60 | -35 à -30 | -10 | - | - | -40 | 8 | 0,10 | Kloppenberget coll. 1998 | |
| | <i>Apis mellifera</i> | Cellules de Kenyon | pupe | - | -45 | -10 | - | - | -53 | 5 | 0,10 | Schäfer et coll., 1994 | |
| | | | | -140 à -54 | -40 | -10 | -30 | 7 | -51 | 6 | - | Wustenberg et coll. 2004 | |
| | <i>Heliothis virescens</i> | Neurones (ganglions thoraciques et abdominaux) | adulte ou larve | - | -48 | -18 | -29 | 5 | -50 | 5 | 0,10 | Lee et coll. 2000a | |
| | <i>Locusta migratoria</i> | Neurones DUM (ganglions métathoraciques)** | adulte | -33 | -35 | 0 | -18,5 | 6,5 | -42 | 7 | 0,10 | Brône et coll. 2003 | |
| | <i>Schistocerca gregaria</i> | Neurone DUM (ganglions métathoraciques) * | adulte | -50 à -60 | -40 | -5 | -18 | 7 | -44 | 7 | - | Heidel et coll. 2006 | |
| <i>Periplaneta americana</i> | Neurones DUM (derniers ganglions abdominaux)*** | adulte | - | -40 | -10 | -26 | 9 | -41 | 10 | 0,10 | Lapied et coll., 1990 | | |
| | | adulte | - | -40 | -10 | -29 | 7 | -39 | 7 | - | Wicher et coll. 2001 | | |
| Canaux Nav recombinants | <i>Drosophila melanogaster</i> | Para+TipE | adulte | - | -35 | -5 | -17 | 5,5 | -44 | 4,5 | 0,01 | Feng et coll. 1995, Warmke et coll., 1997 | |
| | <i>Musca domestica</i> | MdNav1+Vsscβ | adulte | - | - | - | -17 | - | -34,5 | - | - | Lee et coll., 2000b | |

Les astérisques indiquent que les préparations neuronales possèdent une activité électrique spontanée caractérisée *in situ* (*), *in vitro* (**) ou les deux (***). En italique figure les préparations neuronales non caractérisées.

Globalement, les propriétés biophysiques des courants Na^+ et la sensibilité à la TTX des canaux Na_v d'insecte sont similaires entre les différentes préparations neuronales (Tableau 5) (Wicher et coll., 2001).

De manière générale, la dépolarisation de la membrane des neurones conduit à une activation et une inactivation rapides des canaux Na_v . Cependant, au niveau du soma des neurones DUM de *P. americana* (Lapied et coll., 1990), des neurones embryonnaires de *D. melanogaster* (O'Dowd, 1995), des neurones du lobe antennaire et des cellules de Kenyon d'*Apis mellifera* (Schafer et coll., 1994, Kloppenburg et coll., 1999), des interneurons géants de *Gryllus bimaculatus* (Kloppenburger et coll., 1998) et des neurones DUM de *S. gregaria* deux courants Na^+ coexistent. En plus, des courants Na^+ transitoires qui s'inactivent rapidement, il existe des courants Na^+ qui s'inactivent lentement. Les deux courants Na^+ partagent les mêmes propriétés d'activation à l'état stable. Ces courants persistants sont aussi sensibles à la TTX et insensibles au cadmium, indiquant qu'ils sont générés par des canaux Na_v (Lapied et coll., 1990, Schafer et coll., 1994, Kloppenburg et coll., 1998, Kloppenburg et coll., 1999).

La mesure des courants Na^+ unitaires à la surface de la membrane des neurones DUM a révélé l'existence d'un autre courant Na^+ différent des courants Na^+ préalablement cités (Lapied et coll., 1990). Ces nouveaux canaux Na_v nommés bNa pour « background sodium channel » génèrent spontanément et de manière stochastique des courants Na^+ sensibles à la TTX. La probabilité d'ouverture de ces canaux est maximale lorsque la membrane est dépolarisée à -50 mV. Ainsi, les canaux bNa maintiennent l'activité électrique spontanée des neurones DUM en élevant le potentiel de la membrane au seuil de déclenchement des potentiels d'action (Lapied et coll., 1997, Lapied et coll., 1999).

F.1.3 Diversité des courants Na^+ d'insecte

(a) Evolution de la densité des courants Na^+

Des populations de courants Na^+ différentes ont pu être distinguées en fonction des types cellulaires et du stade de développement. Chez *S. gregaria*, la densité de courant Na^+ varie entre plusieurs populations de neurones DUM sans que les propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable soit significativement différentes (Heidel et coll., 2006). Chez

Manduca sexta, la densité de courant Na^+ des neurones du lobe antennaire augmente au fur et à mesure du développement de la puppe sans modification des propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable (Mercer et coll., 2002). Il a aussi été remarqué que la densité des courants Na^+ des neurones embryonnaires de *D. melanogaster* est réduite comparée à d'autres préparations (O'Dowd et coll., 1988). Ainsi, l'ensemble de ces études indiquent que le niveau d'expression des canaux Na_v , facteur déterminant la densité des courants Na^+ , est le paramètre le plus variable en fonction du type cellulaire et du stade de développement. Il est donc tout à fait envisageable que les niveaux d'expression des sous-unités α et β varient en fonction du type cellulaire et du stade de développement.

(b) Expression de deux courants Na^+ transitoires différents au sein des neurones DUM de *P. americana*

Grâce à des outils pharmacologiques originaux, deux courants Na^+ distincts nommés INa1 et INa2 ont été dissociés pour la première fois au sein des neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana* (Lavialle-Defaix et coll., 2006). Les courants INa1 sont inhibés par le L-glutamate à une concentration de 10 μM alors que les courants INa2 sont insensibles au L-glutamate (Figure 10). Plus précisément, le L-glutamate active *via* un récepteur métabotrope de type III une voie de phosphorylation impliquant l'AMPc, une kinase cytosolique dépendant de l'AMPc (PKAc) et une PKAa ancrée à une protéine d'ancrage AKAP (Figure 10). Cette voie de régulation intracellulaire conduit alors à l'inhibition des courants INa1. Parallèlement, il a été montré que la dépendance au potentiel de l'inactivation à l'état stable des courants INa2 est décalée vers des potentiels hyperpolarisants par rapport à INa1. De plus, la constante de réactivation des courants INa2 est plus faible que celle d'INa1. Autrement dit l'ensemble de ces propriétés biophysiques indiquent que les canaux Na_v générant les courants INa2 s'inactivent et se réactivent plus rapidement que les canaux Na_v générant les courants INa1. Ainsi, en présence de L-glutamate la fréquence des PAs des neurones DUM augmente indiquant que INa1 régule les fréquences basses des PAs (Figure 10). Par conséquent, la modulation de l'excitabilité membranaire des neurones DUM met en jeu deux courants Na^+ distincts dont l'activité est régulée à des voies de phosphorylation spécifiques.

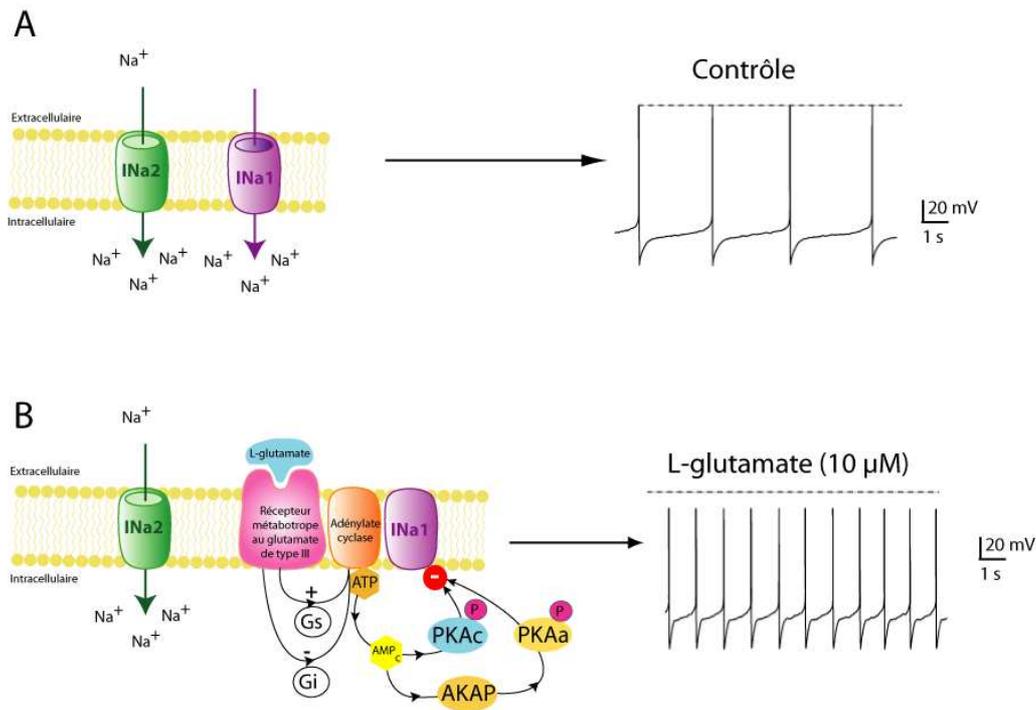


Figure 10 : Courants INa1 et INa2 modulant l’excitabilité membranaire des neurones DUM (modifié d’après Lavalie-Defaix et coll., 2006).

Dans les conditions contrôle les courants INa1 et INa2 coexistent.

Le L-glutamate se fixe sur un récepteur métabotrope de type III. L’activation de la protéine Gs stimulatrice d’un côté et la levée de l’inhibition de la protéine Gi inhibitrice d’un autre côté conduit à une augmentation de l’AMPc. Ce messager secondaire active la PKAc cytosolique et l’AKAP qui libère une PKAa ancrée. Cette voie de régulation régule alors négativement les canaux sodium générant les courants INa1. La fréquence des potentiels d’action augmente alors de 70% par rapport aux conditions contrôle.

Cette analyse de la littérature met en avant trois points :

- la coexistence de courants Na⁺ qui s’activent rapidement et de courants Na⁺ persistants au sein de plusieurs préparations neuronales d’insecte,
- la variabilité de la densité des courants Na⁺ en fonction du stade de développement et des types neuronaux,
- la coexistence de deux courants Na⁺ transitoires modulant l’excitabilité membranaire des neurones DUM de *P. americana*.

Mais alors comment expliquer l’origine de cette diversité des courants Na⁺ chez les insectes ? Existent-ils des isoformes particulières de canaux Na_v exprimés en fonction du stade de développement ? Si oui, quelle est l’origine de cette diversité moléculaire ? Comment des processus de phosphorylation peuvent moduler l’activité des canaux Na_v ?

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA STRUCTURE ET DE L'ACTIVITE DES CANAUX Na_v PAR DES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES ET POST-TRADUCTIONNELLES

A Présentation générale des mécanismes générant de la diversité moléculaire

Le maintien de l'excitabilité neuronale ainsi que la genèse et la transmission des potentiels d'action repose sur des processus de régulation précis de l'activité des canaux ioniques et des récepteurs membranaires. Le terme anglosaxon « fine-tuning » rend bien compte de ce concept de la plasticité des protéines neuronales en fonction des besoins physiologiques. En effet, la flexibilité des propriétés intrinsèques des neurones est importante pour permettre au réseau neuronal de s'adapter afin de contrôler les fonctions complexes des organismes supérieurs (mémoire, coordination, adaptation...). Pour ce faire, la modulation de l'activité des protéines neuronales est opérée à différents niveaux de leur cycle de vie. De ce fait, il existe des processus de régulation post-transcriptionnels et des processus de régulation post-traductionnels (Figure 11). Les premiers génèrent des canaux Na_v aux structures moléculaires différentes tandis que les seconds ne font que moduler brièvement leur activité.

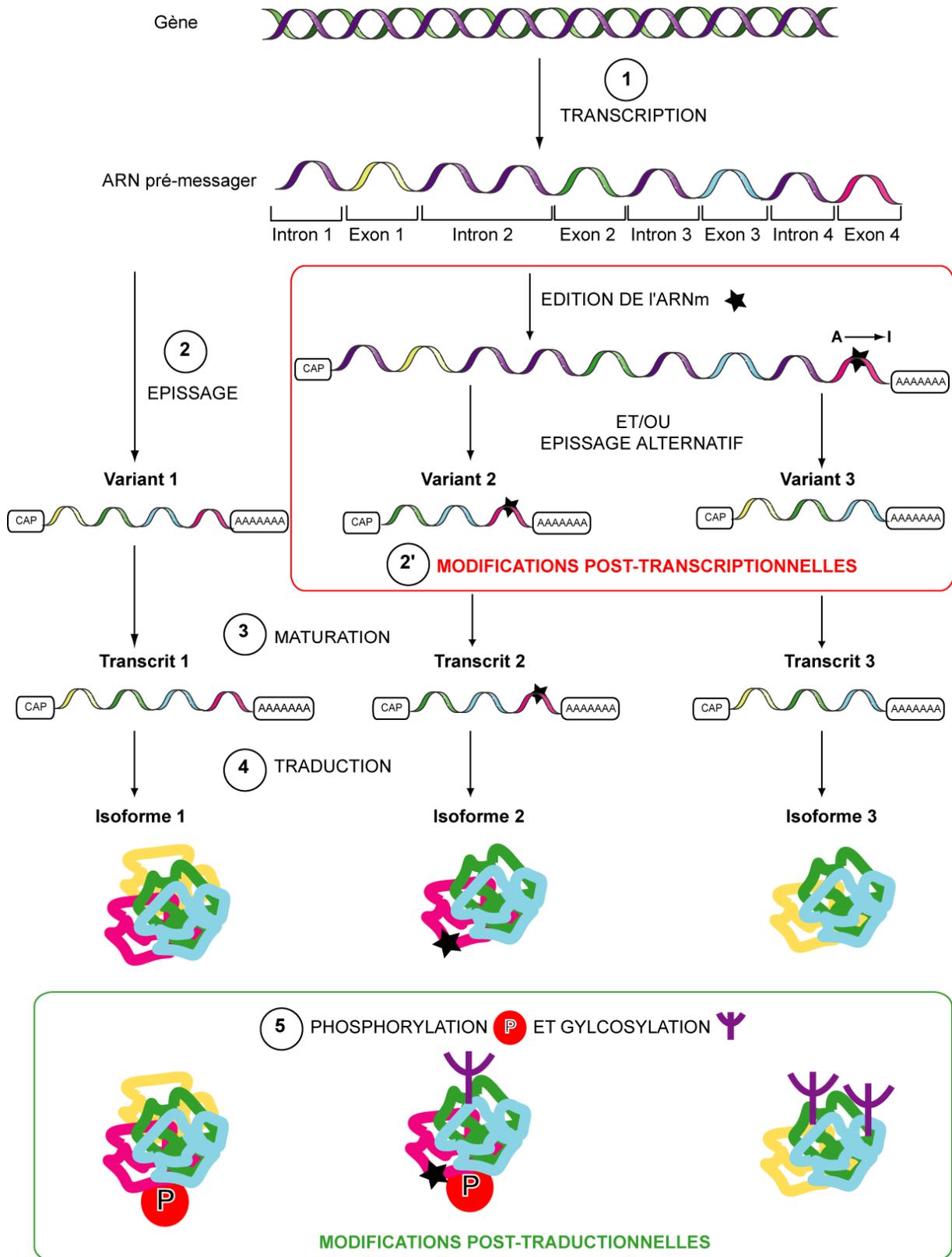


Figure 11 : Principes généraux des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles à la base de la diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte.

B Diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte par épissage alternatif

Chez les vertébrés, plusieurs duplications d'un gène ancestral ont permis de générer une famille multigénique de neuf gènes codant des canaux Na_v fonctionnels (Goldin, 2002a) (Introduction/Chapitre 1/B.1.4). La situation est tout autre chez les arthropodes puisqu'un seul gène code la sous-unité α des canaux Na_v (Introduction/Chapitre 1/C.1). Toutefois, il n'en reste pas moins qu'une riche diversité de canaux Na_v a été caractérisée tant à partir d'enregistrements électrophysiologiques de courants Na^+ de neurones d'insecte qu'à partir du clonage de transcrits différents exprimés dans le SNC. La caractérisation de l'organisation des gènes homologues à *DmNa_v1* a permis de montrer l'existence de plusieurs sites d'épissage alternatif et d'édition de l'ARNm responsables la diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte. Les objectifs de cette étude bibliographique sont de discuter :

- (1) les différents sites d'épissage alternatif et d'édition de l'ARNm caractérisant les gènes homologues à *DmNa_v1* ;
- (2) la conservation ou la divergence de ces modifications post-transcriptionnelles au cours de l'évolution des canaux Na_v d'arthropodes ;
- (3) les processus régulant l'épissage alternatif et l'édition de l'ARN messenger ;
- (4) les implications fonctionnelles et pharmacologiques induites par ces modifications post-transcriptionnelles.

Les connaissances relatives à la modulation de l'expression des gènes codant les sous-unités auxiliaires β sont moins approfondies à ce jour. Toutefois, quelques sites putatifs d'épissage alternatif mis en évidence seront mentionnés.

B.1 Présentation générale de l'épissage alternatif

B.1.1 L'épissage alternatif est un mécanisme ubiquitaire

L'épissage alternatif est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes très répandu chez les organismes eucaryotes supérieurs. En effet, il a été prédit qu'approximativement 50% des gènes exprimés dans les cellules animales sont régulés par ce procédé (Letunic et coll., 2002). L'épissage alternatif concerne particulièrement certaines classes fonctionnelles de gènes telles que le système immunitaire, le système nerveux et la transduction du signal (Lareau et coll., 2004). Le principe de l'épissage alternatif repose sur la sélection de différentes combinaisons d'exons au sein d'un même ARN pré-messager qui conduit de ce fait à la synthèse de multiples variants distincts (Figure 11). Les transcrits codent alors des séquences protéiques distinctes déterminant des propriétés singulières (Figure 11). Ainsi, l'épissage alternatif permet d'adapter le protéome lors de la différenciation tissulaire et le développement des organismes (Chabot, 1996, Lopez, 1998). Pour ce faire, il est lui-même régulé de manière complexe. De plus, au-delà, de diversifier le protéome, l'épissage alternatif s'avère aussi un mécanisme de régulation de divers processus biologiques (Ex : interactions protéines-protéines, apoptose, traduction) (revue (Lareau et coll., 2004)).

D'un point de vue évolutif, l'épissage alternatif confère un avantage adaptatif certain (Copley, 2004). En effet, il permet « d'essayer » de nouvelles structures de protéines par inclusion ou exclusion d'exons tout en conservant l'expression d'isoformes fonctionnelles. Cette évolution de la diversité des protéines est aussi avantageuse dans le sens où elle est spécifique à chaque gène, démultipliant ainsi les variants possibles. De plus, la régulation de la diversité des protéines *via* l'épissage alternatif est plus « rapide » que la régulation d'une famille de gènes homologues dont la transcription de quelques uns doit être réprimée au bénéfice des autres (Copley, 2004).

B.1.2 Comment fonctionne l'épissage alternatif ?

Après transcription des gènes, les introns contenus au niveau des ARN pré-messagers sont excisés et les exons ligés pour former des ARN matures. Les motifs moléculaires déterminants les sites d'épissage sont localisés au niveau des introns. Des exons dits alternatifs peuvent aussi être excisés selon les transcrits tandis que certains introns peuvent être conservés. Différents modes d'épissage alternatifs ont ainsi été décrits (Figure 12). Les formes d'épissage alternatif majeures concernent les exons optionnels qui peuvent être absents ou présents et les exons mutuellement exclusifs (Figure 12).

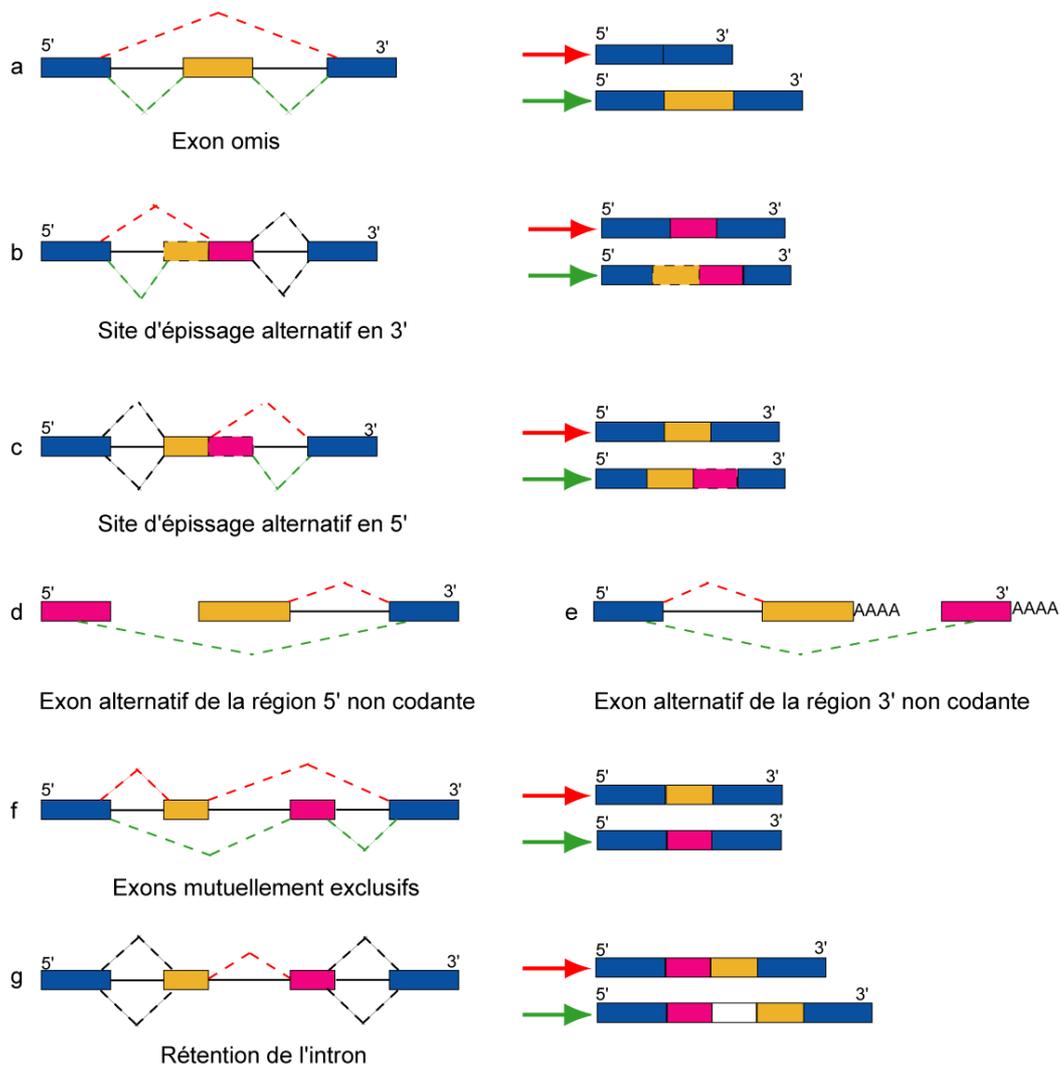


Figure 12 : Formes majeures de l'épissage alternatif de l'ARNm.

Les formes a, b, c, d et e concernent des exons optionnels (modifié d'après (Wang et coll., 2008))

La reconnaissance du site d'épissage est réalisée par l'assemblage du spliceosome, un complexe composé des 5 ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs) et de 50 à 100 polypeptides, au niveau de sites consensus de l'intron (revue (Smith et coll., 2000)) (Figure 13). Chez *D. melanogaster* la séquence consensus du site d'épissage en 5', à savoir MAG/GURAGU⁴ a été vérifiée par des modélisations informatiques (Mount et coll., 1992). Le site d'épissage en 3' correspond à l'oligonucléotide YAG⁵. Une fois le spliceosome assemblé sur les sites d'épissage, les réactions d'excision de l'intron et de ligation des exons sont catalysées.

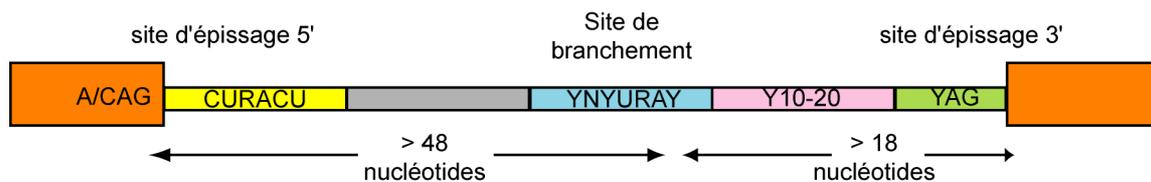


Figure 13 : Sites consensus de l'assemblage du spliceosome décrits au niveau de l'intron des métazoaires (modifié d'après (Smith et coll., 2000)).

L'épissage alternatif est un procédé très régulé mettant en jeu un réseau de facteurs *trans*-régulateurs et *cis*-régulateurs (Lopez, 1998, Smith et coll., 2000, Wang et coll., 2008). Parmi les facteurs *cis*-régulateurs il y a des motifs exoniques et introniques qui activent ou répriment l'assemblage du spliceosome à sa cible. Certains facteurs *trans*-régulateurs sont spécifiques du stade de développement ou des tissus. Il a même été montré que l'épissage alternatif peut être régulé par des hormones de stress (Xie et coll., 1998).

B.1.3 Les gènes du système nerveux sont de bons candidats à l'épissage alternatif

L'épissage alternatif régule tout particulièrement l'expression des gènes exprimés dans le système nerveux (Grabowski et coll., 2001). En effet, ce processus s'avère tout à fait adapter pour ajuster relativement rapidement et précisément les propriétés d'excitabilité des différents types neuronaux en raison des avantages cités précédemment (B.1.1). Ainsi, l'épissage alternatif contrôle notamment la différenciation des cellules neuronales, la

⁴ avec / : site d'épissage ; les nucléotides dégénérés M : A ou C et R : A ou G

⁵ Y : T ou C

croissance des axones et la synaptogenèse (Li et coll., 2007). De plus, l'épissage alternatif permet à chaque neurone mature de moduler son excitabilité membranaire en fonction des stimuli perçus (Grabowski et coll., 2001). Ainsi, de nombreux gènes exprimés au sein du SNC des insectes sont épissés de manière alternative. Parmi ces gènes citons chez *D. melanogaster* les gènes codant des canaux potassium K_v (*shaker* (Sutcliffe et coll., 1988)), des canaux sodium Na_v (*para* (Loughney et coll., 1989)), des canaux calcique Ca_v (*cac* (Smith et coll., 1998)), des canaux potassiques dépendant du calcium (*pslo* (Derst et coll., 2003)), des récepteurs au GABA (*rdl* (French-Constant et coll., 1993)) et des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (*nAChR* (Sattelle et coll., 2005)). De plus, différents facteurs de régulations de l'épissage alternatif ont été caractérisés dans le système nerveux (Li et coll., 2007).

B.2 L'épissage alternatif des gènes codant des canaux Na_v d'arthropodes : de la conservation à la divergence des exons optionnels

B.2.1 L'épissage alternatif de la sous-unité α des canaux Na_v d'insectes : un processus fortement conservé

(a) Les exons alternatifs du gène *DmNa_v*

L'épissage alternatif concernant les canaux Na_v d'insecte a été caractérisé pour la première fois lors du clonage des produits de PCR codant les boucles intracellulaires L1 et L2 et le domaine II de la sous-unité $DmNa_v$ (Loughney et coll., 1989). Quatre exons optionnels (a, b, e, f) et deux exons mutuellement exclusifs (c/d) caractérisent cette région de la sous-unité $DmNa_v$. Après cette étude, sept autres exons optionnels (i, j, h, exon7, exon 8, exon 22 et exon 23) et deux autres exons mutuellement exclusifs (k/l) ont été identifiés au niveau du gène *DmNa_v* (Thackeray et coll., 1994, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Les exons a, b, i, j, e, f, h et l'exon 22 sont localisés au niveau des boucles cytoplasmiques alors que les exons k/l, c/d, l'exon 7, l'exon 8 et l'exon 23 codent des segments transmembranaires (Figure 14).

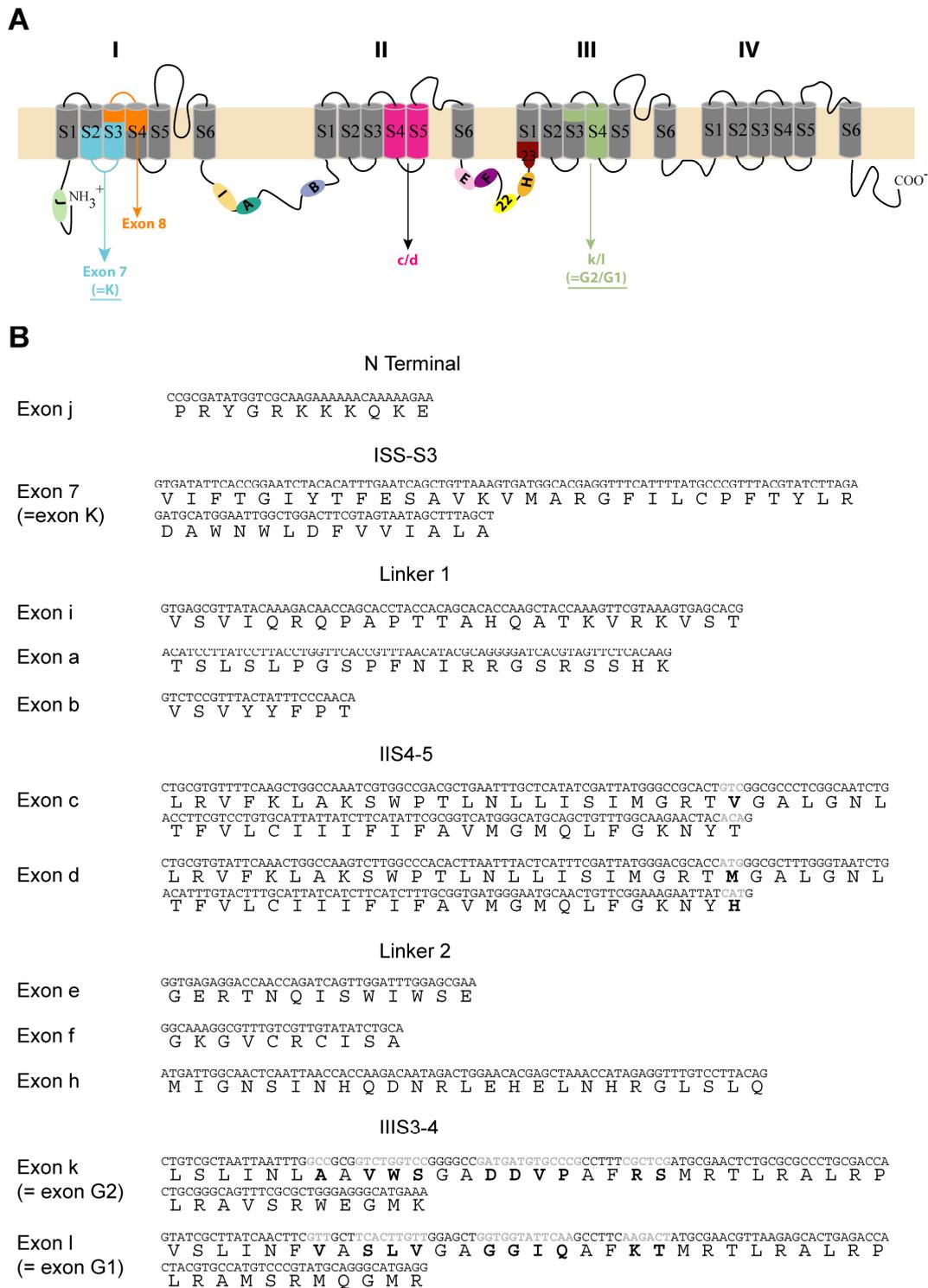


Figure 14 : Exons alternatifs caractérisant les isoformes des sous-unités $DmNa_v$.

A. Localisation des exons alternatifs au niveau de la sous-unité $DmNa_v$.

B. Séquences nucléiques et protéiques déduites des exons alternatifs des transcrits $DmNa_v$. Les bases nucléiques et les résidus d'acides aminés qui diffèrent entre les exons mutuellement exclusifs (c/d, k/l) sont indiqués en caractère gras gris et noirs respectivement. Les exons optionnels 8, 22 et 23 ont été caractérisés uniquement chez les embryons. Les séquences de ces trois exons n'ont pas été déposées (Lin et coll., 2009). Les exons homologues aux transcrits de $BgNa_v$ (K, G1 et G2) sont indiqués.

Chez *D. melanogaster*, les exons mutuellement exclusifs partagent une forte identité de séquence protéique (96,3 % entre c et d, 61 % entre l et k) (Figure 14). De plus, 65 % des variants analysés expriment l'exon d et 97% expriment l'exon l chez des drosophiles adultes, indiquant que l'expression d'un des deux exons mutuellement exclusifs est favorisée vis-à-vis de son homologue (Olson et coll., 2008). Ainsi l'ensemble de ces résultats mettent en évidence que l'expression des exons mutuellement exclusifs contribue peu à la diversité moléculaire des sous-unités DmNa_v.

A l'opposé, la diversité moléculaire des sous-unités DmNa_v est beaucoup plus importante au niveau des boucles cytoplasmiques L1 et L2. Ainsi, chez *D. melanogaster* 20 types de variants se distinguent sur la base de l'épissage alternatif de sept exons optionnels localisés au niveau des boucles L1 et L2 (Olson et coll., 2008).

(b) Les exons alternatifs sont conservés pour les gènes homologues à DmNa_v

Des exons homologues aux exons alternatifs du gène DmNa_v ont été identifiés chez la majorité des espèces d'arthropodes étudiées. L'identité de séquence protéique est sans surprise importante entre les exons alternatifs du gène DmNa_v et ces homologues du groupe des diptères (48% à 100%) (analyse bioinformatique personnelle). A l'opposé, la divergence la plus notable est celle qui sépare DmNa_v des gènes du groupe des arachnides. La divergence est telle que seuls les homologues des exons K et G1 ont été identifiés chez *Mesobuthus martensis* (Zuo et coll., 2006).

Jusqu'à ce jour aucune nomenclature n'a harmonisé le nom des exons alternatifs des génomes d'insecte. Lors de leur caractérisation initiale chez *D. melanogaster* et *D. virilis*, ils ont été nommés par une lettre minuscule (Loughney et coll., 1989, Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995). Puis, au cours de la caractérisation de la sous-unité BgNa_v de *B. germanica* les lettres désignant les exons alternatifs homologues au gène DmNa_v ont été conservées (Song et coll., 2004). Toutefois, pour se distinguer des exons alternatifs de *D. melanogaster*, des lettres majuscules ont été choisies. De plus, les exons mutuellement exclusifs k/l ont été renommés G2/G1 respectivement (Figure 14). Mais, au cours de l'annotation des génomes d'*A. gambiae*, *A. aegypti*, *C. pipiens*, *A. mellifera*, *B. mori* et *T. castaneum* les exons alternatifs ont été identifiés par un nombre (Davies et coll., 2007a). Le système de numérotation des exons alternatifs présente l'inconvénient de ne pas être homogène entre les génomes des insectes (Ex. : exon a de *D. melanogaster* = exon 13 chez

A. gambiae = exon 12 chez *C. pipiens*...). Au cours de ce manuscrit, nous conserverons donc le système de lettre minuscule pour désigner les exons alternatifs de *D. melanogaster* comme indiqué sur la Figure 14. Pour toutes les autres espèces nous conserverons les lettres majuscules. Pour les exons optionnels nouvellement décrits chez les embryons de *D. melanogaster*, nous conserverons toutefois leur numérotation excepté l'exon 7 qui sera nommé K (Lin et coll., 2009) (Figure 14).

(c) Quelques sites d'épissage alternatifs ont été confirmés pour les gènes homologues à *DmNa_v*

La caractérisation des exons alternatifs des gènes homologues à *DmNa_v* n'est pas toujours associée à une observation de la délétion des exons optionnels ou de la substitution des exons mutuellement exclusifs (Tableau 6). En effet, pour observer l'épissage alternatif il est nécessaire de comparer la séquence d'au moins une douzaine de variants (Shao et coll., 2009b). Ce constat souligne les contraintes techniques liées à la caractérisation de l'épissage alternatif des canaux *Na_v*. De plus, il est préférable de compléter leur identification par la description des sites d'épissage au niveau de l'ADN génomique. Ainsi, la caractérisation de plusieurs variants *AgNa_v*, *AeNa_v* (Davies et coll., 2007a), *BgNa_v* (Song et coll., 2004), *BmNa_v* (Shao et coll., 2009b), *CINa_v* (Yoon et coll., 2008), *HvNa_v* (Park et coll., 1999), *MdNa_v* (Lee et coll., 2002) et *PxNa_v* (Sonoda et coll., 2008b) a permis de prouver l'épissage alternatif de la plupart des exons. Chez les autres espèces d'insectes, les sites d'épissage ont été déduits par homologie de séquence protéique avec les canaux *DmNa_v* (Tableau 6). Pour d'autres espèces, les sites d'épissage ont été prédits lors de l'annotation du génome, mais les transcrits n'ont pas encore été caractérisés (Ex. : *T. castaneum*, *N. vitripennis*). Mais alors les sites d'épissage alternatif sont-ils conservés entre toutes les espèces d'insecte ?

Tableau 6 : Conservation des exons alternatifs homologues à $DmNa_v$ chez diverses espèces d'arthropodes.

| | Exons alternatifs et localisation | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|----|----|----|--------|----|-----|-----|----|----|---------|----|-------|
| | N terminal | L1 | | | IIS4-5 | | | LII | | | IIIS3-4 | | |
| | J | I | A | B | C/D | | | E | F | H | G1/G2 | | |
| | | | | | C | D | C/D | | | | G1 | G2 | G1/G2 |
| % d'espèces pour lesquelles les exons alternatifs ont été identifiés par homologie avec $DmNav$ | 81 | 71 | 89 | 89 | 61 | 68 | - | 25 | 50 | 64 | 100 | 48 | - |
| % d'espèces pour lesquelles les variants distincts ont été analysés | 36 | 15 | 32 | 28 | - | - | 58 | 57 | 43 | 60 | - | 4 | 40 |

☞ Analyse bioinformatique personnelle

La première ligne indique le pourcentage d'espèces pour lesquelles des exons alternatifs ont été identifiés par homologie de séquence protéique avec $DmNa_v$. La seconde ligne indique la proportion en pourcentage d'espèce pour lesquelles l'épissage alternatif a été observé après analyse de différents variants. Les espèces d'insecte considérées sont : *A. aegypti*, *A. gambiae*, *A. mellifera*, *B. germanica*, *B. mori*, *B. mandarina*, *C. pipiens*, *D. melanogaster*, *D. vorilis*, *D. ananassae*, *D. erecta*, *D. grimshawi*, *D. mojavensis*, *D. pseudoobscura*, *D. willistoni*, *D. yakuba*, *C. lectularius*, *H. virescens*, *L. decemlineata*, *M. domestica*, *N. vitripennis*, *P. humanus humanus*, *P. humanus capitis*, *T. castaneum*, *O. huwena*, *B. martensis* et *V. destructor*.

(d) L'organisation génomique des exons mutuellement exclusifs G1 et G2 a une origine très ancienne chez les canaux ioniques dépendant du potentiel

Chez *D. melanogaster*, les exons k et l mutuellement exclusifs évitent l'expression de segments transmembranaires identiques. De ce fait, ils partagent une identité de séquence protéique importante (61%). De plus, ils sont aussi très conservés chez les autres arthropodes (équivalent exons G1 et G2) (Figure 14). L'ensemble de ces caractéristiques indiquent que les exons k et l résultent d'une duplication ancienne d'un gène ancestral (Letunic et coll., 2002). Par ailleurs, l'homologue de l'exon G1 est de manière générale beaucoup plus exprimé que l'homologue de l'exon G2 (Tableau 6). En effet, l'épissage alternatif des exons mutuellement exclusif résulte d'une compétition entre les sites de fixation des spliceosomes favorisant ainsi l'expression d'un des deux exons dupliqués (Letunic et coll., 2002). Toutefois, il est intéressant de noter que quelques variants $DmNa_v1$ et $VmNa_v1$ sont dépourvus de ces deux exons (Wang et coll., 2003b, Lin et coll., 2009). L'exclusion simultanée de ces deux exons ne décale pas le cadre de lecture mais conduit à l'expression de sous-unités α ne comportant pas la région IIIS3-S4. Certains transcrits de $BgNa_v$ contiennent un troisième exon, G3, mutuellement exclusif avec les exons G1 et G2 (Tan et coll., 2002a). L'exon G3 contient quant à lui un codon stop, et de ce fait son expression induit des isoformes non fonctionnelles. Mais, à ce jour, aucun homologue de l'exon G3 n'a été identifié chez d'autres espèces d'arthropodes.

L'arrangement des exons mutuellement exclusifs k et l est non seulement très conservé chez les insectes mais présente aussi des homologues avec les exons 18A et 18N codant la région III S3-S4 des sous-unités α $Na_v1.6$ murine, humaine et de poisson (Plummer et coll., 1997). De plus, l'exon 18N contient un codon stop qui conduit à l'expression d'une protéine incomplète de la même manière que l'exon G3 de *BgNa_v*. Ces informations indiquent que l'événement de duplication à l'origine de ces exons mutuellement exclusifs est antérieur à la divergence des insectes et des vertébrés. Cependant, les exons 18A et 18 N de *rNa_v1.6* ne partagent que 30% d'identité de séquence protéique contrairement aux exons k et l de *DmNa_v* (61%). Des divergences similaires entre exons dupliqués ont été discutées pour d'autres canaux ioniques (Na_v , Ca_v , Slo) et récepteurs membranaires (GluCl, RDL, nAchR) (Copley, 2004). L'hypothèse suggérée par cet auteur est qu'après l'événement de la duplication du gène ancestral, les exons mutuellement exclusifs ont divergé de manière indépendante entre les espèces. En conclusion, les sites d'épissage impliquant les exons mutuellement exclusifs G1, G2 et G3 chez les arthropodes et les exons mutuellement exclusifs 18A et 18N chez les vertébrés partagent une origine commune très ancienne.

Le gène *rNav1.2* est caractérisé par des exons mutuellement exclusifs 5A/5N codant la région IS3-S4 (Sarao et coll., 1991). L'exclusion de l'homologue de 5A, à savoir l'exon 8, a été observée pour quelques transcrits exprimés chez des embryons de *D. melanogaster* (Lin et coll., 2009). De plus, il a été montré que les exons 18A/18N résultent de la duplication des exons 5A/5N codés par le gène ancestral à l'origine des canaux ioniques dépendent du potentiel (Plummer et coll., 1997). Ainsi les exons mutuellement exclusifs caractérisant les canaux Na_v des animaux résultent de phénomène de duplication ancien et de divergence maintenue par la sélection (Figure 15).

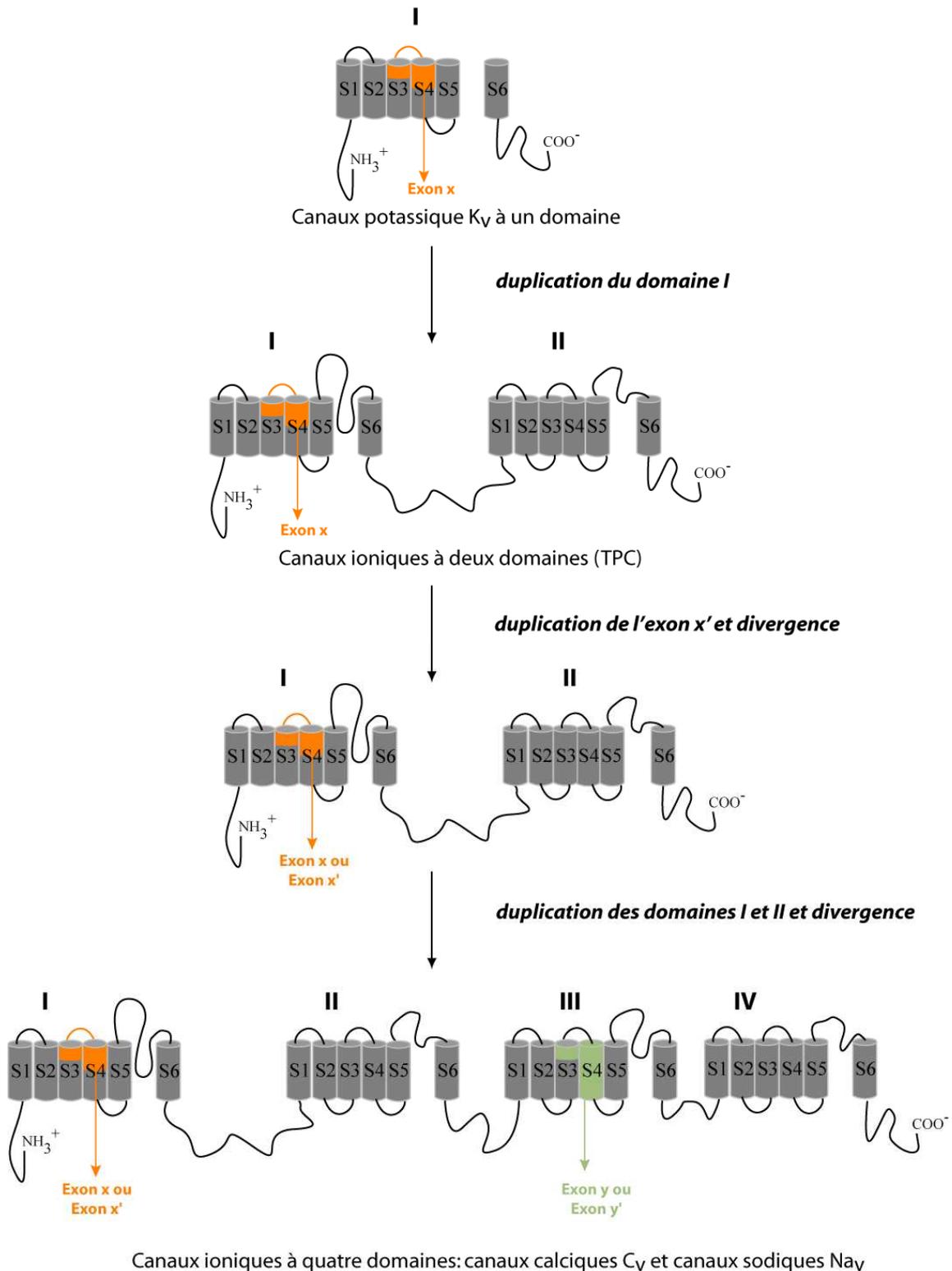


Figure 15: Événements de duplication à l'origine des exons mutuellement exclusifs des canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires (Ca_v et Na_v).

Les exons mutuellement exclusifs des gènes ancestraux sont nommés x/x' et y/y'. Ils correspondent respectivement aux exons mutuellement exclusifs c/d et k/l actuels du gène *DmNa_v*; et 5A/5N et 18A/18N des gènes des canaux Na_v de mammifères (modifié d'après Plummer et coll., 1997).

(e) **Diversité de l'organisation génomique des exons optionnels codant des régions des boucles intracellulaires L1 et L2**

Comme mentionné précédemment, les exons optionnels localisés au niveau des régions codant les boucles L1 et L2 présentent le maximum de divergence de séquence protéique entre les sous-unités α de canaux Na_v arthropodes.

Au niveau des transcrits *HvNa_v*, d'*Heliothis virescens* les séquences homologues aux exons A et I sont localisées dans un intron non épissé (Park et coll., 1999) (Figure 16). Par ailleurs, au regard des transcrits *BmNa_v*, analysés il semble que les exons A et I ne soient pas soumis à l'épissage alternatif (Shao et coll., 2009b). En revanche, un exon optionnel peut s'insérer entre les exons A et I (Shao et coll., 2009b) (Figure 16). Cet exon optionnel supplémentaire n'a été observé qu'au niveau du gène *BmNa_v*. De plus, il est intéressant d'observer qu'il existe au niveau du gène d'*AgNa_v*, un exon optionnel, différent de *BmNa_v*, qui s'insère aussi entre les exons A et I (Davies et coll., 2007a) (Figure 16). Enfin, un autre cas de figure a été mentionné chez la blatte allemande (Song et coll., 2004). L'exon A est tout à fait atypique puisque son exclusion lors de l'épissage conduit à un décalage du cadre de lecture et à la traduction d'un codon stop prématuré. Par conséquent les variants *BgNa_v*, n'exprimant pas l'exon A sont rares (1,5% des clones analysés) (Song et coll., 2004).

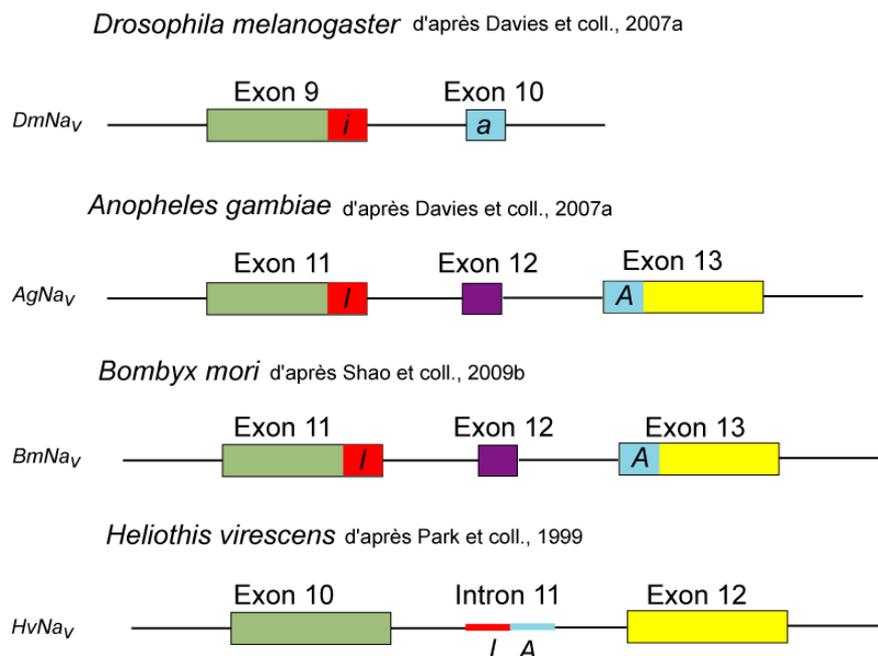


Figure 16 : Organisation génomique des exons homologues aux exons optionnels a et i du gène *DmNa_v* chez une espèce de diptère (*Anopheles gambiae*) et deux espèces de lépidoptères (*Bombyx mori* et *Heliothis virescens*).

☞ Analyse bioinformatique personnelle

En ce qui concerne l'arrangement génomique des exons optionnels E et F codant la boucle cytoplasmique L2 quelques singularités sont aussi notables chez les lépidoptères et dans une moindre mesure chez la punaise de lit *Cimex lectularius*. Au niveau de *BmNa_v*, *PxNa_v* et *HvNa_v* un nouvel exon en position homologue des exons e et f de *DmNa_v* a été caractérisé (Park et coll., 1999, Sonoda et coll., 2008b, Shao et coll., 2009b). Chez *BmNa_v* une région interne à ce nouvel exon s'avère même être un exon optionnel. Pour le gène *CINa_v* il existe aussi un exon optionnel peu conservé en position homologue aux exons e et f de *DmNa_v*.

Ainsi la variabilité au niveau de l'arrangement génomique des homologues des exons optionnels A, I, E et F montrent que les sites d'épissages localisés au niveau des boucles L1 et L2 ont été remaniés au cours de l'évolution. En effet, ces sites d'épissage alternatif sont moins contraints à la pression de sélection par rapport aux sites d'épissage des exons mutuellement exclusifs codant des régions transmembranaires. Ainsi, des organisations génomiques particulières d'un ordre taxonomique ont vraisemblablement été sélectionnées.

(f) Existe-t-il des exons alternatifs spécifiques d'une espèce ?

En plus du remaniement de certains sites d'épissages alternatifs, il existe des exons optionnels pour lesquels aucun homologue n'a été identifié chez une autre espèce. C'est au niveau des boucles intracellulaires que ces exons optionnels sont principalement localisés. En effet, des exons alternatifs spécifiques ont été décrits au niveau :

- de la boucle L1 chez *Pediculus humanus capitis* (Lee et coll., 2003), *Anopheles gambiae* (Davies et coll., 2007a), *Bombyx mori* (Shao et coll., 2009b), *Cimex lectularius* (Yoon et coll., 2008), *Aedes aegypti* (Chang et coll., 2009) ;
- de la boucle L2 chez *Plutella xylostella* (Sonoda et coll., 2008b) et *Aedes aegypti* (Chang et coll., 2009) ;
- de l'extrémité carboxyle terminale chez *Varroa destructor* (Wang et coll., 2003b).

Quelques exons optionnels codant des segments transmembranaires ont aussi été caractérisés au niveau des gènes *AgNa_v* (IS6) et *VmNa_v* (IIS2-S4). L'exclusion de ces exons optionnels codant des segments transmembranaires conduit à l'expression de sous-unités α incomplètes et probablement non fonctionnelles.

En conclusion, la forte identité de séquence protéique partagée entre les exons alternatifs et la conservation des sites d'épissage soulignent le rôle fonctionnel important de ces exons chez la majorité des insectes. Les exons mutuellement exclusifs codant des segments transmembranaires sont très conservés au sein du phylum des insectes, voir pour certains au sein même des *Billateria*. A l'opposé, la diversité entre les exons alternatifs codant des régions des boucles intracellulaires L1 et L2 est plus importante. Les identités de séquence protéique sont plus faibles et des arrangements génomiques de certains sites d'épissage alternatifs sont même notables entre les différents ordres. Quelques exons alternatifs s'avèrent aussi être spécifiques à une seule espèce d'insecte. Cette diversité spécifique des espèces d'insecte s'avère tout à fait intéressante dans la mesure où elle est à mettre en relation avec des propriétés pharmacologiques et de régulation des canaux Na_v propres à chaque insecte. Mais l'expression des différents exons alternatifs au cours du développement des insectes et la distribution tissulaire des variants conditionne cette éventuelle diversité spécifique des espèces d'insecte.

B.3 Régulation de l'épissage alternatif

B.3.1 Régulation en fonction du stade de développement

(a) Quels sont les tissus d'insecte considérés ?

Dés 1987, l'équipe de Salkoff a proposé que les variants $DmNa_v$ exprimés au cours du développement sont différents (Salkoff et coll., 1987). Depuis des études plus complètes ont été réalisées pour caractériser l'épissage alternatif des gènes homologues à $DmNa_v$ au cours du développement d'insectes holométaboles tels que *D. melanogaster*, *D. virilis*, *M. domestica* et *B. mori* et d'insectes hémimétaboles comme *B. germanica* (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Lee et coll., 2002, Song et coll., 2004, Lin et coll., 2009, Shao et coll., 2009b). Il est important de noter qu'en fonction des stades de développement considérés les ARN totaux sont prélevés à partir de l'insecte entier ou de segments isolés (tête, thorax et abdomen) (Tableau 7). Afin d'avoir une vue d'ensemble de la régulation de l'épissage alternatif au cours du développement des insectes, je vais discuter ci-dessous des points communs qui ressortent de ces études.

Tableau 7 : Tissus prélevés pour extraire les ARN totaux lors des études s'intéressant aux profils d'expression des variants codant des canaux Na_v au cours du développement des insectes.

| Type de métamorphose | Espèce | Œuf | Larve | Pupe | Nymphe | Adulte | | | Références |
|----------------------|--------------------------------|--------|-------|------|--------|--------|-------------------|--------|---|
| | | Entier | | | | Tête | Thorax et abdomen | Entier | |
| Holométabole | <i>Drosophila melanogaster</i> | | X | | | X | | | Loughney et coll., 1989 |
| | <i>Drosophila melanogaster</i> | | X | | | | | X | Tackeray et coll., 1994 |
| | <i>Drosophila melanogaster</i> | | X | | | | | X | Olson et coll., 2008 |
| | <i>Drosophila melanogaster</i> | | X | | | | | X | Lin et coll., 2009 |
| | <i>Drosophila virilis</i> | | X | | | | | X | Tackeray et coll., 1995 |
| | <i>Musca domestica</i> | | X | | | | | X | Lee et coll., 2002 |
| Hémimétabole | <i>Bombyx mori</i> | X | | | | X | | | Shao et coll., 2009 |
| | <i>Blattella germanica</i> | | X | | X | | | X | Tan et coll., 2002 et Song et coll., 2004 |

(b) Modulation de l'expression de sous-unités α incomplètes

Chez *B. mori* la proportion de transcrits codant des sous-unités BmNa_v incomplètes est maximale lors des derniers stades larvaires (24% des transcrits analysés contre 0,5% à 5% des transcrits pour les autres stades) (Shao et coll., 2009b). Ces protéines sont incomplètes car aucun des exons mutuellement exclusifs C/D ou G1/G2 ne sont exprimés. L'hypothèse proposée par les auteurs est que l'expression de variants incomplets pendant cette période du développement régule négativement le nombre de canaux Na_v fonctionnels avant la métamorphose (Shao et coll., 2009b). Dans la lignée de ces observations, il a été montré que les transcrits codant des protéines non fonctionnelles sont au contraire très rares à l'état adulte de *B. germanica* (Ex : 5 % des transcrits analysés) (Song et coll., 2004). Par conséquent, il semblerait que le profil d'expression des variants incomplets soit associé à une régulation de l'expression des sous-unités Na_v.

(c) Modulation de l'expression des exons alternatifs de la boucle L1

Les exons optionnels A, I et B codant une fraction de la boucle intracellulaire L1 sont relativement bien exprimés tout au long du développement. Chez les drosophiles (Tableau 7), ces trois exons sont exprimés dans des proportions équivalentes entre les stades larvaires et adultes (A : ~50%, I : ~80% B : ~70% des transcrits analysés) (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Chez *B. mori*, les exons A, I et B sont exprimés par tous les variants analysés, et ce quelque soit le stade de développement (Shao et coll., 2009b). Comparativement, chez *B. germanica* à l'état adulte l'exon B est toutefois peu exprimé (28 % des clones analysés) (Song et coll., 2004). Le maintien de l'expression de ces trois exons au cours du développement sous-entend un rôle fonctionnel important.

(d) Modulation de l'expression des exons alternatifs de la boucle L2

Chez *D. melanogaster*, *D. virilis* et *M. domestica* l'expression de l'exon F est supérieure pendant le stade larvaire comparé au stade adulte (90% *versus* 10% des transcrits analysés respectivement) (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Lee et coll., 2002). Au contraire, chez la blatte allemande adulte, 98,5% des transcrits analysés codent l'exon F (Song et coll., 2004). Cependant, cette étude ne précise pas l'évolution de l'expression de cet exon au cours du stade larvaire. Globalement, ces résultats indiquent que le niveau d'expression de l'exon F est variable entre les différents ordres d'insecte au cours du développement. Conjointement, la proportion de transcrits analysés codant l'exon E est plus élevée à l'état adulte qu'à l'état larvaire chez les trois espèces de diptères citées précédemment (20% contre 5%) (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Lee et coll., 2002).

(e) Modulation de l'expression des exons mutuellement exclusifs

Il est intéressant de noter que l'exon D est majoritairement exprimés chez *D. melanogaster*, *D. virilis* et *M. domestica* quelque soit le stade de développement (de 65 à 100% des clones analysés) (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Lee et coll., 2002, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). A l'opposé, tous les transcrits analysés codent l'exon C chez la blatte allemande à l'état adulte (Song et coll., 2004). En ce qui concerne les autres exons mutuellement exclusifs, l'exon G1 est presque exclusivement exprimé chez *B. mori*, *B. germanica* et *D. melanogaster* tout au long du développement des individus (> 90% des transcrits analysés) (Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009, Shao et coll., 2009b). Au contraire, chez *M. domestica* c'est l'exon G2 qui est principalement exprimé quelque soit le stade de développement (Lee et coll., 2002). Cette analyse met en évidence que la distribution des exons mutuellement exclusifs évoluent peu entre les stades de développement des insectes. Toutefois il semblerait que la sélection des sites d'épissage divergent entre ces mêmes espèces d'insecte.

(f) Fréquence d'expression des isoformes au cours du développement

Jusqu'à ce niveau, nous avons discuté de l'expression des exons alternatifs au cours du développement en les considérant indépendamment. Mais qu'en est-il de l'évolution des combinaisons d'exons ou variants au cours du développement ? Chez *D. melanogaster*, la diversité des variants exprimés au cours des stades larvaires et adultes est

importante (27 et 29 variants identifiés respectivement) (Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009) (Tableau 8). Mais rappelons que dans ces études les ARN sont purifiés à partir de l'insecte entier, augmentant potentiellement la diversité des transcrits analysés (Tableau 8). Toutefois les variants majoritaires représentent 20% des clones analysés aussi bien au stade larvaire qu'au stade adulte. Seuls l'expression des exons alternatifs j et f varient entre ces deux variants majoritaires (Tableau 8). La fréquence d'expression des autres variants est par ailleurs beaucoup plus faible (< 5% des clones analysés). Chez *B. germanica* à l'état adulte, 55% des transcrits analysés sont identiques, soulignant davantage l'expression dominante d'un seul variant, et ce au niveau de l'insecte entier. Par conséquent, malgré une diversité moléculaire abondante l'expression d'un variant est favorisée chez ces deux espèces. Existents-ils donc des facteurs déterminant l'expression d'un variant plutôt qu'un autre ?

Tableau 8 : Comparaison des combinaisons d'exons dans les variants majoritaires des sous-unités α de canaux Na_v , exprimés chez *Drosophila melanogaster* et *Blattella germanica* au cours du développement.

| | <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Blattella germanica</i> | Références |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|
| | Embryon | | |
| Variant majoritaire | j- k+ i+ a+ b+ d e- f+ h- l | - | Lin et coll., 2009 |
| % variant majoritaire | 20% (10/50) | | |
| Nombre de variants total | 27 | - | |
| Nb de variants > 5% | 5 | - | |
| | Adulte | | |
| Variant majoritaire | j+ k+ i+ a+ b+ d e- f- h- l | J+ K+ l- A+ B- C E- F+ G1 | Olson et coll., 2008 et Song et coll., 2004 |
| % variant majoritaire | 20% (13/64) | 55% (38/69) | |
| Nombre de variants total | 29 | 20 | |
| Nb de variants > 5% | 7 | 1 | |

a/b : Nombre de clones/nombre de clones total, - pas de données

En 1994, l'équipe de Thackeray a modélisé la fréquence d'apparition des variants selon une loi d'indépendance. Il a été proposé que les exons alternatifs ne sont pas épissés de manière indépendante. En d'autre terme l'expression d'un exon alternatif est régulée par l'expression d'un autre exon alternatif. Mais ce modèle n'a jamais été validé expérimentalement. D'autant plus que récemment Lin et coll. ont montré qu'il n'y a pas de corrélation significative entre l'expression des exons alternatifs les uns avec les autres (Lin et coll., 2009).

B.3.2 Distribution tissulaire des variants

La distribution tissulaire des exons alternatifs a été beaucoup moins étudiée. En effet, la difficulté réside au niveau de la préparation des tissus à isoler chez les insectes de petites tailles. Toutefois, il a été montré par RT-PCR sur différents tissus de *B. germanica* que les variants exprimant l'homologue de l'exon k, soit G1 chez *BgNa_v1*, sont abondamment exprimés dans la chaîne nerveuse et les muscles (Tan et coll., 2002a). Chez les vertébrés, davantage d'études se sont intéressées à la distribution tissulaire des variants de canaux Na_v (ex : cerveau, muscle, cœur, colon, prostate, aorte...) (Schaller et coll., 1992, Raymond et coll., 2004, Blechschmidt et coll., 2008).

En conclusion, au regard de cette analyse, nous pouvons souligner que la diversité moléculaire des sous-unités α identifiées est très inférieure à la diversité théorique. En effet, chez *D. melanogaster* 2304 isoformes de sous-unités α peuvent être théoriquement exprimées à l'état adulte. Or nous venons de mentionner que 29 variants ont été analysés au stade adulte (Tableau 8) (Olson et coll., 2008). Par conséquent, l'hypothèse d'une régulation de l'épissage alternatif restreignant l'expression d'une multitude de variants *DmNa_v* est tout à fait louable. Mais alors quelles sont les données de la littérature actuelle discutant de cette suggestion ?

B.4 Facteurs de régulation de l'épissage alternatif du gène *DmNa_v*

En général, l'épissage alternatif est régulé par des protéines qui s'associent à l'ARN pré-messager pour favoriser ou défavoriser la reconnaissance des exons alternatifs par les particules d'épissage ou spliceosome (Smith et coll., 2000). Pour identifier les protéines régulatrices de l'épissage alternatif de gènes exprimés dans le SNC de *D. melanogaster*, 250 ARN interférence double brin ciblant des protéines possédant des motifs de fixation aux ARN pré-messager ont été sélectionnés (Park et coll., 2004). Seuls les ARN interférence *pasila* (*ps*) régulent l'épissage alternatif des exons mutuellement exclusifs k et l codant la région IIIS3-4. Les cellules traitées avec *ps* expriment beaucoup plus l'exon k par rapport aux cellules témoins qui expriment l'exon l. *ps* semble aussi réguler les sites

d'épissage alternatif des exons optionnels a et i. De plus, la surexpression de l'exon k a été confirmée dans des neurones embryonnaires mutants *ps-* (Lin et coll., 2009). Etant donné le nombre élevé de site d'épissage, il est fort probable que le panel de protéines régulant l'épissage alternatif du gène *DmNa_v* soit beaucoup plus important.

Jusqu'à maintenant, nous avons dressé l'état des connaissances caractérisant la diversité moléculaire des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte. A l'issue de ce constat, la question émergente est de comprendre quelle est la fonctionnalité de cette diversité moléculaire ? Comment cette multitude de transcrits régulent précisément les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux Na_v ? A l'instar des mutations ponctuelles réduisant la sensibilité des canaux Na_v aux insecticides, quelles conséquences impliquent l'expression de nombreuses isoformes de canaux Na_v sur l'activité de ces molécules neurotoxiques ?

B.5 Conséquences de l'épissage alternatif de la sous-unité α sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques

Peu d'études ont pu établir jusqu'à ce jour une corrélation entre la structure moléculaire des différentes isoformes de sous-unités α d'insecte clonées et les propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ tant par des approches *in vivo* qu'*in vitro*. En effet le clonage des ADNc codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte représente une difficulté technique majeure qui limite cette approche structure-fonction (Dong, 2003). Toutefois, les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des sous-unités *DmNa_v* et *BgNa_v* clonées ont pu être comparées à l'issue de leur expression dans des ovocytes de xénope (Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009).

B.5.1 Modulation des propriétés électrophysiologiques

(a) Peut-on associer une isoforme à un profil de courant Na⁺ particulier ?

Parmi les 29 isoformes DmNa_v clonées chez *D. melanogaster* à l'état adulte, 24 induisent un courant Na⁺ mesurable après coexpression avec la sous-unité auxiliaire TipE dans des ovocytes de xénope (Olson et coll., 2008). La comparaison des propriétés électrophysiologiques des 24 courants Na⁺ révèle des propriétés d'activation et d'inactivation variées. Le potentiel d'activation à 50% ($V_{0,5}$) est compris entre -20 et -30 mV pour les trois quarts des isoformes exprimées. Le potentiel d'inactivation à 50% ($V_{0,5}$) est compris entre -33 et -66 mV, et est plus variable entre les isoformes. Au regard de ces mesures électrophysiologiques, les auteurs ont suggéré l'absence de corrélation significative entre les combinaisons d'exons et les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation. Toutefois le courant Na⁺ du variant caractérisé par la combinaison d'exon j+ i- a+ b- c e- f- h- l est tout à fait atypique. Il s'active à des potentiels hyperpolarisants ($V_{0,5}$ = -60 mV) et ne s'inactive pas. Les auteurs ont alors proposé que ce variant est un bon candidat pour générer les courants Na⁺ persistants identifiés dans plusieurs préparations neuronales d'insecte (Introduction/Chapitre1/F).

Les propriétés d'activation et d'inactivation de neuf isoformes exprimées chez *Blattella germanica* adulte ont été déterminées dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude d'Olson et coll. citée ci-dessus (Song et coll., 2004). Les potentiels d'activation et d'inactivation $V_{0,5}$ de ces neuf isoformes sont compris entre [-25 mV, -44 mV] et [-39 mV, -54 mV] respectivement. Cependant, cette étude ne mentionne pas s'il existe une corrélation significative entre ces paramètres électrophysiologiques et la structure des isoformes. Par conséquent ces deux études soulignent la difficulté à corréler clairement la structure des variants épissés à une modulation précise de l'excitabilité membranaire. Toutefois, plusieurs études soutiennent au contraire la thèse de la modulation des propriétés électrophysiologiques des canaux Na_v d'insecte en fonction des exons alternatifs exprimés.

(b) Quel est l'impact de chaque exon alternatif sur les propriétés d'activation et d'inactivation des courants Na⁺ ?

Chez *B. germanica*, la substitution de l'exon G1 par l'exon G2 conduit à l'expression d'isoformes BgNa_v1 aux propriétés électrophysiologiques distinctes (Tan et coll., 2002a). Les isoformes exprimant l'exon G2 (sous-unités KD2) génère des courants Na⁺ dont l'amplitude est neuf fois supérieure aux isoformes exprimant l'exon G1 (sous-unités KD1). De plus, les sous-unités KD2 s'activent à des potentiels plus dépolarisants et s'inactivent à des potentiels plus hyperpolarisants. Bien qu'il soit ambitieux d'extrapoler ces données à des neurones, nous pouvons concevoir que l'expression des sous-unités KD2 dans la membrane des neurones est associée à une diminution de l'excitabilité membranaire. Au contraire, il a été montré que l'expression de l'exon B induit une réduction de l'amplitude du courant Na⁺ des isoformes BgNa_v1 exprimées dans des ovocytes de xénope (Song et coll., 2004).

L'équipe de Lin a étudié l'impact de chaque exon alternatif sur les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation à l'état stable de 27 sous-unités DmNa_v isolées de *D. melanogaster* à l'état embryonnaire (Lin et coll., 2009). L'expression des exons optionnels j, e et f est associée à une modulation des propriétés d'activation. Tandis que l'expression de l'exon f décale la courbe d'activation à l'état stable vers des potentiels hyperpolarisants, l'expression des exons j et e décalent cette dernière vers de potentiels dépolarisants. Par extrapolation, nous pouvons supposer, avec toutefois une certaine réserve, que l'expression de variants codant les exons j- e- f+ augmente l'excitabilité membranaire des neurones. Soulignons que 68% des transcrits identifiés codent cette combinaison d'exons (Tableau 8). Les exons h et j décalent respectivement l'inactivation à l'état stable vers des potentiels dépolarisants et hyperpolarisants. Dans ce dernier cas, l'expression de l'exon j serait associée à une augmentation de la durée des potentiels d'action. Pour les auteurs, l'exon k codant les segments IIIS3-S4 est responsable d'un courant Na⁺ persistant. Or cette démonstration s'oppose à l'équipe d'Olson et coll. 2008 pour qui le variant qui induit un courant Na⁺ persistant n'exprime pas l'exon mutuellement exclusif k.

Chez *D. melanogaster*, il a été mis en évidence *in vivo* une corrélation entre les variants de DmNa_v et les profils d'expression des courants Na⁺ de neurones embryonnaires par RT-PCR sur cellule unique (O'Dowd et coll., 1995). Plus précisément, la détection des transcrits codant l'exon optionnel a est associée à des courants Na⁺ d'amplitude maximales. Cette approche apporte des éléments de réflexion supplémentaires. En effet, elle rappelle

que la fréquence d'expression des isoformes au niveau de la membrane des neurones joue un rôle fondamental quant aux profils des courants Na^+ . Au contraire, l'expression abondante d'isoformes identiques dans des ovocytes de xénope ne reflète pas cette réalité physiologique, et ne permet donc pas d'apprécier la participation de chaque isoforme à la densité de courant Na^+ (Lin et coll., 2009).

En conclusion, cette discussion au sujet de la régulation des propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ via l'épissage alternatif des gènes codant de canaux Na_v d'insecte soulèvent plusieurs contradictions. Il est possible d'associer les propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ à plusieurs exons alternatifs indépendamment des uns des autres. Au contraire, il est plus difficile de corrélérer la structure complète de la sous-unité α à des propriétés cinétiques spécifiques. De plus, l'extrapolation des mesures électrophysiologiques réalisées à partir de canaux Na_v recombinants exprimés dans des ovocytes de xénope est délicate et incertaine. Ainsi, la confrontation de ces résultats avec des mesures électrophysiologiques par patch-clamp de neurones isolés complexifient les interprétations. En effet, ces dernières études mesurent des courants Na^+ macroscopiques, reflet de l'activité simultanée de plusieurs canaux Na_v . En l'absence d'outils pharmacologiques adaptés il est très périlleux d'isoler les courants Na^+ générés par des isoformes distinctes. Une seule étude a pu démasquer deux courants Na^+ distincts via des outils pharmacologiques modulant des voies de régulation intracellulaire au sein des neurones DUM de *P. americana* (Lavialle-Defaix et coll., 2006). Ce résultat sous-entend donc que des résidus d'acides aminés de la sous-unité α interagissent avec des constituants intracellulaires tels que des protéines kinases, sous-unités auxiliaires ou autres protéines régulatrices. Mais alors quels sont ces résidus d'acides aminés ? Sont-ils codés par des exons alternatifs à l'origine de la diversité moléculaire de la sous-unité α des canaux Na_v d'insecte ? A-t-on démontré expérimentalement leur fonctionnalité ? Ces questions sont examinées ultérieurement dans la partie D de ce chapitre traitant des modifications post-transcriptionnelles.

B.5.2 Modulation des propriétés pharmacologiques : sensibilité des canaux Na_v aux insecticides neurotoxiques

Non seulement l'expression des exons alternatifs affectent les propriétés biophysiques des isoformes de canaux Na_v d'insecte mais aussi modulent leur sensibilité aux insecticides neurotoxiques.

Premièrement, les exons alternatifs G1 et G2 codant les segments IIS3-IIS4 chez *B. germanica* sont impliqués dans la différence de sensibilité à la deltaméthrine des isoformes BgNa_v1.1 (G1) et BgNa_v2.1 (G2) (Tan et coll., 2002a). BgNa_v1.1 est 100 fois plus sensible à la deltaméthrine que BgNa_v1.2. Par ailleurs, la substitution de l'exon G1 par l'exon G2 au sein de la sous-unité BgNav1.1 diminue sa sensibilité d'un facteur 10 par rapport au phénotype sauvage. Plus précisément, il a été démontré par mutagenèse dirigée que l'alanine en position 10 de la séquence protéique de l'exon G2 contribue à la faible sensibilité de la sous-unité BgNa_v2.1 à la deltaméthrine. (Du et coll., 2006). Toutefois, le mécanisme exact par lequel l'alanine en position 10 de l'exon G2 module la sensibilité des isoformes à la deltaméthrine n'est pas bien connu.

Deuxièmement, la glycine en position 1111 de la sous-unité BgNa_v, résidu d'acide aminé épissé alternativement au niveau de la boucle L2, est impliqué dans la sensibilité des canaux Na_v de *B. germanica* aux pyréthriinoïdes de type II (Du et coll., 2009b). La délétion de cette glycine réduit la sensibilité des mutants d'un facteur 8 aux pyréthriinoïdes de type II sans modifier la sensibilité aux pyréthriinoïdes de type I. Les auteurs proposent alors que la glycine en position 1111 contribue, en association avec deux glutamates adjacents, au site de fixation du groupement α-cyané des pyréthriinoïdes de type II.

Troisièmement, il a été noté que chez *Musca domestica*, *Plutella xylostella*, *Cimex lectularius* et *Bemisia tabaci*, plusieurs mutations impliquées dans la résistance aux pyréthriinoïdes sont localisées au niveau des exons mutuellement exclusif C et D (Lee et coll., 2002, Morin et coll., 2002, Sonoda et coll., 2006, Yoon et coll., 2008). Mais alors peut-on associer l'expression d'un des deux exons à un niveau de résistance ? Chez *Musca domestica* la toxicologie des pyréthriinoïdes ne peut être associée qu'à l'exon D étant donné que chez cette espèce les isoformes exprimant l'exon C sont tronquées par codon stop prématuré (Lee et coll., 2002). Chez *Plutella xylostella*, la résistance à la perméthrine est

associée à la mutation d'une thréonine par une isoleucine en position 929. Cette mutation a été identifiée uniquement au niveau de l'exon D des individus résistants (Sonoda et coll., 2006). L'analyse du génome a confirmé l'existence de deux allèles codant l'exon D et exprimant un phénotype sensible ou résistant. L'analyse du transcriptome de souches avec un niveau de résistance élevée aux pyréthriinoïdes a montré que 74% des individus expriment l'exon D muté alors que l'expression des exons C et D est équivalente pour des souches susceptibles et résistantes élevées en laboratoire (Sonoda et coll., 2008a). Cette observation suggère que le niveau d'expression des exons C et D est indépendant du niveau de résistance des insectes mais variables en fonction des conditions environnementales des insectes.

B.6 L'épissage alternatif des sous-unités auxiliaires β : un processus peu décrit dans la littérature

Les données décrivant les sites d'épissage alternatif des sous-unités auxiliaires β de canaux Na_v d'insecte sont peu abondantes. Trois variants *TipE* exprimés dans la tête de *D. melanogaster* ont été identifiés (Feng et coll., 1995a). Deux des variants sont caractérisés par un cadre ouvert de lecture atypique (intron non excisé ou multiples exons épissés). Toutefois, la régulation des propriétés biophysiques des courants Na^+ par ces isoformes n'a pas été étudiée. Par ailleurs, la recherche des sous-unités homologues à TEH1 dans les banques de donnée à l'aide de l'outil BLAST montre que deux variants codant des sous-unités CqTEH1 coexistent chez *C. pipiens* (analyse bioinformatique personnelle). La séquence protéique codant l'extrémité C terminale de ces deux variants diffère. Mais aucune étude n'a démontré à ce jour le rôle des isoformes épissées de sous-unités auxiliaires de canaux Na_v d'insecte.

C Diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte par édition de l'ARN messenger

C.1 Présentation générale de l'édition de l'ARN messenger

La régulation de l'expression des gènes par édition de l'ARN messenger est plus délicate à caractériser que l'épissage alternatif. En effet, l'édition de l'ARNm correspond à l'insertion, la délétion ou la substitution ponctuelle de nucléotides au niveau de l'ARN messenger primaire. La modification de la séquence nucléique des exons peut alors conduire à la traduction d'une séquence protéique distincte. De plus, la modification des régions 5' et 3' non codantes peut moduler la stabilité des ARNm et leur transport.

L'édition a été décrite pour la première fois au niveau des ARN mitochondriaux de trypanosomes (Benne et coll., 1986). Chez ces protozoaires l'insertion de multiples uridines au niveau de l'ARNm est indispensable à la synthèse de protéines fonctionnelles. Par la suite, il a été montré que l'édition par substitution est la forme la plus répandue chez les eucaryotes supérieurs (Keegan et coll., 2004). Le mécanisme de substitution des nucléotides lors de l'édition de l'ARNm repose sur des désaminations convertissant la cytosine (C) en uracile (U) [édition C→U] et l'adénosine (A) en inosine (I) [édition A→I]. Ces réactions de désaminations mettent en jeu des désaminases particulières dont quelques unes ont été caractérisées (Keegan et coll., 2004).

L'édition de l'ARNm concerne essentiellement les gènes exprimés dans le SNC (Keegan et coll., 2004). Par exemple, chez *D. melanogaster* il a été montré que seuls les gènes exprimés dans le SNC sont édités parmi un large panel de gènes étudiés (Hoopengardner et coll., 2003). Toutefois, l'édition A→I du gène *cacophony* codant des canaux calciques Ca_v a aussi été découvert dans les muscles de *D. melanogaster* (Keegan et coll., 2005). Par ailleurs, l'identification de l'édition A→I au niveau d'espèces anciennes telles que la seiche et la drosophile et d'espèces plus récentes de mammifères indique qu'il s'agit d'un processus ancien important dans la modulation des fonctions neuronales (Keegan et coll., 2004). En effet, l'édition peut générer un potentiel de diversité moléculaire des transcrits conséquent. Par exemple, les transcrits du gène *cacophony* présente 10 sites d'édition de l'ARNm, ce qui induit théoriquement 1000 isoformes distinctes (Smith et coll., 1996a, Peixoto et coll., 1997). De plus, il semble que l'édition de l'ARNm permet non

seulement d'augmenter la diversité des protéines neuronales mais aussi de contrôler le fonctionnement du système nerveux (Palladino et coll., 2000b). Ainsi, l'édition permet véritablement de contrôler finement l'expression des gènes impliqués dans la conduction rapide du message nerveux comparé à l'expression d'allèles multiples. C'est pourquoi il a été proposé que l'édition de l'ARNm est un processus ayant participé à l'émergence de phénotypes comportementaux adaptés à l'environnement au cours de l'évolution (Palladino et coll., 2000b).

C.2 Mécanismes de l'édition A→I chez les insectes

C.2.1 Quels sont les acteurs principaux de l'édition A→I ?

Les enzymes qui catalysent la désamination de l'adénosine en inosine appartiennent à la famille des adénosines désaminases de l'ARN (ADAR) (Bass et coll., 1997, Keegan et coll., 2004). Elles reconnaissent une structure secondaire particulière de l'ARNm primaire formée de l'appariement de la séquence de l'exon qui contient l'adénosine à éditer avec une séquence complémentaire d'un intron (ECS) (Higuchi et coll., 1993, Hanrahan et coll., 2000, Reenan, 2005). Après l'édition A→I, l'appariement des ARNt est modifié étant donné qu'ils interprètent l'inosine comme une guanosine (Basilio et coll., 1962). Ceci peut alors conduire à la substitution d'un résidu d'acide aminé.

Il existe deux types d'ADAR. Le premier type cible les ARN double brin et convertit de manière non spécifique de multiples adénosines en inosine. Cette activité non spécifique de telles ADAR a été proposée comme un moyen de défense contre les virus ou une régulation de l'expression des gènes *via* une stratégie antisens (Bass et coll., 1988, Kumar et coll., 1997). Au contraire, le second type d'ADAR convertit spécifiquement quelques adénosines en inosine. La majorité des gènes régulés par ce type d'ADAR sont exprimés dans le SNC. Par exemple, chez *D. melanogaster* les cibles connues des ADAR sont les transcrits codant des canaux ioniques dépendant du potentiel (ex : gènes *para*, *DCSl*, *cac*, *slo*, *sh*), des récepteurs ligands (ex : gènes *rdl*, *nAChra6*, *GluCI*) et des enzymes impliquées dans la transmission présynaptique (Jepson et coll., 2007).

C.2.2 Autorégulation de l'activité des ADAR par édition A→I au cours du développement de *D. melanogaster*

Le génome de *D. melanogaster* contient un seul locus codant l'enzyme ADAR (Palladino et coll., 2000a) alors que trois loci ont été identifiés dans le génome des mammifères (Keegan et coll., 2004). Toutefois, la diversité des isoformes dADAR est générée par épissage alternatif et édition de l'ARNm en fonction du stade de développement (Palladino et coll., 2000a). Le gène dADAR est principalement exprimé dans le SNC et son niveau d'expression augmente à l'âge adulte (Palladino et coll., 2000a). Par conséquent, la proportion des variants édités codant des canaux Ca_v et des canaux Na_v augmentent aussi à l'âge adulte (Hanrahan et coll., 2000, Keegan et coll., 2005). Mais, l'activité désaminase des enzymes ADAR s'autorégule négativement par l'édition de l'ARNm (Palladino et coll., 2000b, Keegan et coll., 2005). En effet l'activité des isoformes dADAR éditées est plus faible comparée à celle des isoformes dADAR non édités (Keegan et coll., 2005). Une sur-régulation des transcrits dADAR non édités est létale. Par ailleurs, l'absence d'expression du gène ADAR conduit à des phénotypes neurologiques défailants chez les adultes de drosophiles mutantes *ADAR-* (Palladino et coll., 2000b). Par conséquent, l'enzyme ADAR joue un rôle fonctionnel déterminant dans la modulation du comportement. Son activité est modulée par édition au cours du développement.

C.2.3 Conservation et évolution des sites d'édition A→I chez les insectes

Chez les insectes, il a été montré que certains sites d'édition A→I sont conservés alors que d'autres divergent entre les gènes orthologues à *DmNa_v*, *DSCI*, *synaptotagimine I* et *nAChR-α6* (Hanrahan et coll., 2000, Hoopengardner et coll., 2003, Reenan, 2005, Jin et coll., 2007). Mais alors comment expliquer l'évolution des sites d'édition entre les insectes ? Une analyse de l'expression des transcrits *synaptotagimine I* chez plusieurs espèces d'insecte représentant 300 millions d'années de l'évolution a permis d'identifier des déterminants moléculaires responsables de l'émergence de sites d'édition spécifiques chez certaines espèces d'insectes (Reenan, 2005). La perte ou l'apparition de structure secondaire stable de l'ARN primaire déterminant le substrat des ADARs explique cette variabilité entre les différentes espèces d'insecte. En effet, quelques mutations au niveau

des séquences introniques proches de la séquence ECS suffisent à déstabiliser cette structure secondaire de l'ARNm et empêcher l'activité des ADARs.

C.3 Edition de l'ARNm codant des sous-unités α de canaux Na_v des insectes

C.3.1 Caractérisation des sites d'édition

Dix sites d'édition A→I ont été identifiés chez *D. melanogaster* (Hanrahan et coll., 2000, Palladino et coll., 2000b, Reenan et coll., 2000) (Figure 17). Les substitutions K1455R et S1587N sont conservées chez *D. virilis* (Hanrahan et coll., 2000) (Figure 17). Il est intéressant de noter que les éditions A→I conduisant aux substitutions Q1296R et N1587S génèrent une séquence protéique consensus du site de phosphorylation de la PKC (Hanrahan et coll., 2000, Reenan, 2005). D'autres sites d'édition A→I ont été identifiés parmi les divers transcrits *DmNa_v*, clonés (Olson et coll., 2008). Mais des analyses de l'ADNg sont nécessaires pour confirmer que ces variations ponctuelles de nucléotides entre les différents transcrits résultent de l'édition de l'ARNm. Des variants codant la sous-unité α du canal Na_v de *B. germanica* se différencient aussi par des nucléotides divergents en position homologue (Liu et coll., 2004, Song et coll., 2004) (Figure 17). Ces variations nucléiques résultent à la fois d'édition A→I et d'édition C→U.

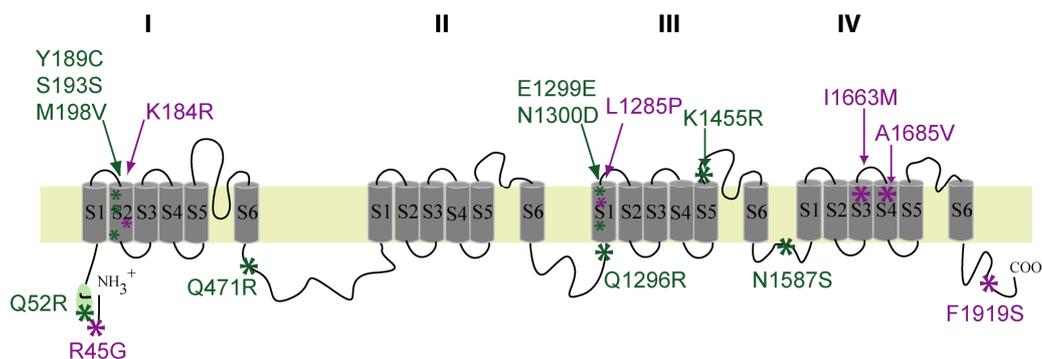


Figure 17 : Position des résidus d'acide aminé substitués par édition de l'ARN au sein des sous-unités *DmNa_v* (vert) et *BgNa_v* (violet).

Le diagramme représente la topologie des sous-unités Na_v dans la membrane. Les positions des résidus d'acides aminés ont été déduites à partir des séquences protéiques déduites des variants *DmNa_v* (GenBank : M32078) et *BgNa_v* (GenBank : U73583). La première lettre correspond au résidu non édité et la seconde au résidu édité.

C.3.2 Rôle fonctionnel de l'édition

L'édition des gènes des canaux Na_v d'insecte est régulée en fonction du développement et des tissus (Hanrahan et coll., 2000, Liu et coll., 2004). Mais aucune étude n'a démontré jusqu'à ce jour les conséquences fonctionnelles de l'édition de l'ARNm sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des sous-unités $DmNa_v$. Toutefois, la modulation des propriétés cinétiques des courants Na^+ à la suite de l'édition de l'ARNm a été étudiée pour des isoformes $BgNa_v$ exprimées dans des ovocytes de xénope (Liu et coll., 2004, Song et coll., 2004). L'édition U→C change la phénylalanine (F [TTT]) par une sérine (S [TCT]) en position 1919 (région C terminale) de la sous-unité $BgNav4$ (Liu et coll., 2004). Cette édition a pour conséquence le ralentissement de l'inactivation du courant Na^+ de manière comparable aux courants Na^+ persistants.

D Corrélation entre l'épissage alternatif et l'édition de l'ARNm

Plusieurs publications font état d'une co-régulation de l'épissage alternatif et de l'édition au niveau des gènes *dADAR*, *DSCI*, *RDL* et *GluR-B* (Hoopengardner et coll., 2003, Laurencikienė et coll., 2006, Schoft et coll., 2007, Jones et coll., 2009). Dans ces études, il a été montré que les transcrits édités se distinguent des transcrits non édités de part la présence d'un exon. Plus précisément, il a été montré chez *D. melanogaster* que l'édition est un phénomène plus fréquent quand les exons alternatifs sont situés en aval de l'exon édité (Agrawal et coll., 2005). Par ailleurs, étant donné que l'édition requière des séquences introniques il est admis que l'édition précède l'épissage (Rueter et coll., 1999, Reenan et coll., 2000, Seeburg, 2000, Agrawal et coll., 2005, Laurencikienė et coll., 2006). Ainsi, l'édition peut affecter l'épissage selon trois mécanismes. Premièrement, l'édition peut altérer les signaux *cis*-régulateurs qui modulent l'épissage. En effet, il a été montré que l'édition A→I convertit le dinucléotide AA en un dinucléotide AG à l'extrémité 3' d'un intron du gène *ADAR2* exprimé chez le rat (Laurencikienė et coll., 2006). Ce dernier mime le dinucléotide AG communément rencontré à la jonction 3' des sites d'épissage, et conduit de ce fait en l'inclusion d'un exon optionnel. Deuxièmement, l'édition peut déstabiliser la structure secondaire de l'ARN primaire, permettant l'accès à des protéines du spliceosome (Agrawal et coll., 2005). Troisièmement, après l'édition de l'adénosine, des hélicases ARN double brin

permettent de dérouler la structure secondaire de l'ARN double brin afin de permettre l'assemblage du spliceosome (Reenan et coll., 2000, Seeburg, 2000)

Par conséquent, l'édition de l'ARNm joue un rôle crucial pour générer des protéines diverses. Non seulement l'édition conduit à la substitution de résidus d'acide aminé distincts mais influence aussi l'efficacité de l'épissage alternatif et peut contribuer à l'excision de certains exons.

E Régulation de la traduction des ARN codant la sous-unité $DmNa_v$

L'activité synaptique des motoneurones de *D. melanogaster* contrôle la transcription du gène $DmNa_v$ via le répresseur traductionnel Pumilio (Mee et coll., 2004). La quantification par RT-PCR en temps réel montre que l'excitation synaptique élevée des motoneurones est corrélée à une diminution de la quantité des transcrits $DmNa_v$. A l'inverse, la quantité des transcrits *pumilio* est augmentée quand l'excitation synaptique est accrue. Des mesures électrophysiologiques des courants Na^+ montrent que la suppression de Pumilio chez les individus mutants induit une augmentation de l'excitabilité membranaire (Mee et coll., 2004). En conclusion, l'accroissement de l'activité synaptique des motoneurones induit la transcription du gène *pumilio*. Les produits de ce dernier ciblent le cadre ouvert de lecture des transcrits $DmNa_v$, ce qui a pour effet de réprimer leur traduction (Muraro et coll., 2008). L'expression des canaux Na_v dans la membrane est alors réduite et l'excitabilité des motoneurones diminue. Des cofacteurs protéiques sont aussi associés à l'activité répressive de Pumilio. Certains de ces cofacteurs sont mêmes spécifiques d'un type cellulaire (Muraro et coll., 2008). Par conséquent, la traduction des transcrits $DmNa_v$ peut être modulée en fonction des tissus. A l'issue de ces résultats, il serait intéressant de savoir si l'activité répressive de Pumilio varie aussi en fonction des variants $DmNa_v$ exprimés.

F Mécanismes de modulation des courants Na⁺ du SNC par des voies de régulation intracellulaire

La phosphorylation est un mécanisme de modification post-traductionnelle rapide et réversible régulant la fonction, l'expression et la localisation cellulaire des canaux ioniques dépendant du potentiel (Dai et coll., 2009). Cette réaction chimique correspond à une estérification de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine, par addition d'un ou plusieurs groupement(s) phosphate. La phosphorylation des canaux Na_v est catalysée principalement par la protéine kinase dépendant de l'AMPc (PKA) et la protéine kinase dépendant du calcium (PKC) (Scheuer et coll., 2006). La présence des phosphates au niveau des chaînes latérales des résidus induit alors des modifications stériques et de charges affectant principalement l'activation et l'inactivation des canaux Na_v.

Etant donné que la phosphorylation des canaux Na_v est le plus souvent transitoire, les groupements phosphates ajoutés sont ensuite clivés par des phosphatases. Les sérines-thréonines phosphatases interagissant avec les Na_v sont la phosphatase 2A (PP2A) et la phosphatase 2B dépendant du calcium (PP2B ou calcineurine) (Murphy et coll., 1993, Chen et coll., 1995).

La manipulation des différents états de phosphorylation des canaux Na_v s'avère une opération délicate qui limite l'accès à la compréhension exhaustive de mécanismes de régulation intracellulaire. Ainsi, au cours de ce chapitre, nous nous appuierons sur des exemples clés de la régulation des canaux Na_v chez les vertébrés, modèle plus largement étudiés, afin d'appréhender les processus de phosphorylation et de déphosphorylation des canaux Na_v d'insecte.

F.1 Régulation des courants Na⁺ de mammifères par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation

F.1.1 Phosphorylation des canaux Na_v par la PKA

(a) Quel est l'effet de la phosphorylation des canaux Na_v par la PKA ?

Dans un premier temps, il a été montré par des expériences d'autoradiographie et d'immunoprécipitation que les canaux Na_v des neurones du cerveau de rat sont phosphorylés par la PKA dans les conditions basales de la cellule (Rossie et coll., 1987). La première expérience ayant montré la modulation des courants Na⁺ par la PKA provient de l'application de la sous-unité catalytique de la PKA directement sur la membrane excisée de neurones cérébraux de rat ou sur la membrane excisée des cellules de mammifères exprimant des canaux rNa_v1.2 recombinants (Li et coll., 1992). Dans ces conditions, la phosphorylation des canaux Na_v par la PKA conduit à une réduction de 40 à 50% de l'amplitude du courant Na⁺ sans modifier les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation (Li et coll., 1992, Smith et coll., 1996b). Plus précisément, la diminution de l'amplitude du courant Na⁺ correspond à une diminution de la conductance et/ou de la probabilité d'ouverture des canaux Na_v (Li et coll., 1992). De plus, la rapidité de la réduction du courant Na⁺ (2 à 5 minutes) et la réversibilité de la régulation indique qu'il ne s'agit ni d'une modification structurale stable de la sous-unité α, ni d'une modification de sa localisation intracellulaire.

In vivo, il a été montré que l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 couplé à une protéine G (RCPG) active la PKA et conduit aussi à une diminution de l'amplitude des courants Na⁺ natifs de 30 à 50% au niveau des neurones isolés striataux (Surmeier et coll., 1993, Schiffmann et coll., 1995), pyramidaux (Gorelova et coll., 2000) et hippocampiques (Cantrell et coll., 1997). De plus, la réduction de l'amplitude des courants Na⁺ par la stimulation des récepteurs dopaminergiques D1 est accompagnée d'une augmentation du seuil de déclenchement des potentiels d'action et d'une diminution de la fréquence des PAs (Cantrell et coll., 2001). Ainsi, la phosphorylation des canaux Na_v par

l'activation de la PKA *via* la stimulation de récepteurs dopaminergiques contribue à l'ajustement de l'excitabilité membranaire des neurones et à la régulation de leur activité sécrétrice.

La régulation des canaux rNa_v1.2 par la PKA requière la protéine d'ancrage AKAP 15 qui permet à la PKA de cibler spécifiquement et rapidement les canaux Na_v des neurones de cerveau de rat (Tibbs et coll., 1998, Cantrell et coll., 1999). L'AKAP 15 est une petite protéine de 81 résidus d'acides aminés constituée d'une région N terminale servant d'ancrage au phospholipide, d'une hélice α ciblant la PKA et d'une région C terminale interagissant avec d'autres protéines (Tasken et coll., 2004). Plus précisément, l'AKAP 15 reconnaît un motif de type leucine zipper localisé au niveau de la région 5' de la boucle intracellulaire L1 à proximité des sites phosphorylés par la PKA (Cantrell et coll., 1999, Carr et coll., 2003, Few et coll., 2007).

(b) Quels sont les résidus mis en jeu lors de la phosphorylation de la sous-unité rNa_v1.2 par la PKA ?

Dans un premier temps, l'analyse de la structure primaire de la sous-unité rNav1.2 a permis d'identifier l'existence de cinq séquences K/RRX(X)S/T⁶ localisées au niveau de la boucle intracellulaire L1 correspondant aux séquences consensus du site d'action de la PKA (Kemp et coll., 1990). Dans un second temps, des expériences de biochimie ont permis de confirmer que les sérines en position 573, 610, 623 et 687 des sites consensus préalablement prédits sont véritablement phosphorylés par la PKA (Murphy et coll., 1993). Puis, il a été montré par mutagenèse dirigée que ces quatre sérines sont importantes pour obtenir une réduction de l'amplitude des courants Na⁺ lorsque la PKA est activée (Smith et coll., 1996b). Plus précisément, la conservation de la sérine en position 573 chez des mutants dépourvus des autres sérines suffit pour réduire de 30% l'amplitude du courant Na⁺ lorsque la PKA est activée (Cantrell et coll., 1997, Smith et coll., 1997a).

Il est intéressant de noter que la phosphorylation des canaux Na_v de mammifères *via* l'activation de la PKA est variable en fonction des isoformes. Les canaux rNa_v1.4 exprimés dans des ovocytes et les canaux rNav1.6 exprimés dans des cellules de mammifères sont insensibles à l'activité de la PKA (Smith et coll., 1996b, Chen et coll., 2008). En effet, les sérines en position 573, 610, 623 et 687 de la séquence protéique de

⁶ X : n'importe quel résidu d'acide aminé

rNa_v1.2 sont peu conservées au niveau de la séquence protéique des sous-unités rNa_v1.6 et rNa_v1.4 (Smith et coll., 1996b, Chen et coll., 2008).

F.1.2 Phosphorylation des canaux Na_v par la PKC

(a) Régulation des courants Na⁺ du SNC des mammifères par la PKC

Des expériences de phosphorylation *in vitro* à partir de canaux Na_v de cerveau de rat purifiés et intégrés à des vésicules phospholipidiques reconstituées ont permis de démontrer par autoradiographie qu'au moins trois phosphopeptides de la sous-unité α sont ciblés par la PKC (Murphy et coll., 1992). En effet, des expériences de biochimie et de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier plusieurs sérines de la sous-unité rNa_v1.2 ciblées par la PKC : les sérines en position 554, 573, 576 et 610 au niveau de la boucle L1 et la sérine en position 1506 au niveau de la boucle L3 (Smith et coll., 1996b, Cantrell et coll., 2002). L'application de PKC directement sur la membrane excisée de cellules de mammifères exprimant les canaux rNa_v1.2 recombinants diminue de 80% l'amplitude des courants Na⁺ et ralentit le décours de l'inactivation (Numann et coll., 1991). Toutefois la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation n'est pas modifiée. La diminution de l'amplitude des courants Na⁺ *via* l'activation de la PKC concerne aussi les sous-unités rNav1.7 et rNav1.8 exprimées dans des ovocytes de xénope (Vijayaragavan et coll., 2004).

La diminution de l'amplitude des courants Na⁺ ainsi que le ralentissement de l'inactivation *via* l'activation de la PKC a été observé *in vivo* à partir de neurones de cerveau de rat (Numann et coll., 1991), de neurones hippocampiques (Cantrell et coll., 1996, Cantrell et coll., 1999, Cantrell et coll., 2002) et de neurones striataux (Hourez et coll., 2005). Plus précisément, au niveau de neurones hippocampiques, la stimulation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine active la PKC qui conduit aussi à la réduction de l'amplitude des courants Na⁺ (Cantrell et coll., 1996).

F.1.3 Régulation convergente des courants Na⁺ du SNC des mammifères par l'activation de la PKA et de la PKC

Les PKA et PKC sont constitutivement activées dans les neurones (Murphy et coll., 1992, Murphy et coll., 1993). Des interactions moléculaires et des voies de régulation convergentes entre ces deux kinases participent ainsi à l'intégrité de la fonction neuronale.

Il a été montré par des études électrophysiologiques de la sous-unité rNav1.2 recombinante exprimée dans des cellules de mammifères une synergie entre la PKA et la PKC (Li et coll., 1993). Si la sérine en position 1506 est mutée alors la réduction de l'amplitude du courant Na⁺ n'est plus observée lorsque la PKA est activée (Li et coll., 1993). Ceci indique que la phosphorylation de la sérine en position 1506 par la PKC est nécessaire pour que l'amplitude du courant Na⁺ soit réduite lorsque la PKA est activée. De la même manière, il en a été déduit que la PKC doit phosphoryler la sérine en position 576 pour permettre la réduction de l'amplitude du courant Na⁺ lorsque la sérine S687 est phosphorylée par la PKA (Cantrell et coll., 2002). Dans ce cas, l'interaction moléculaire proposée repose sur une modification de la conformation de la boucle intracellulaire L1 par la PKC pour favoriser l'accessibilité de la PKA à son substrat (Cantrell et coll., 2001).

La réduction de l'amplitude des courants Na⁺ *via* l'activation de la PKA des neurones hippocampiques est aussi potentialisée lorsque (1) la PKC est stimulée par des activateurs et (2) que la membrane est dépolarisée à des potentiels proches du seuil de déclenchement des PAs (Cantrell et coll., 1999). La phosphorylation des canaux Na_v par la PKC est surtout nécessaire à des potentiels hyperpolarisants pour réduire l'amplitude des courants Na⁺ (Li et coll., 1993, Cantrell et coll., 1999). A des potentiels plus dépolarisants (de -100 mV à -75 mV), la réduction des courants Na⁺ est majoritairement induite par la PKA tandis que l'effet de la PKC est négligeable (Li et coll., 1993, Cantrell et coll., 1999). Il a été proposé que ce couplage PKA/PKC mette en jeu des phosphatases. En effet, la phosphorylation des canaux Na_v par la PKC inhiberait la déphosphorylation des canaux Na_v par la calcineurine et la PP2A et par conséquent favoriserait la réduction de l'amplitude des courants Na⁺ par la PKA (Kondratyuk et coll., 1997). A des potentiels dépolarisants, il a toutefois été montré qu'il n'existe pas de liens entre la réduction du courant Na⁺ par la PKA et la phosphorylation des canaux Na_v par la PKC (Cantrell et coll., 1999). En effet, la réduction de l'amplitude de courant Na⁺ *via* l'activation de la PKA et de la PKC est attribuée à

une diminution du nombre de canaux Na_v disponibles à l'état fermé. Cette réduction du nombre de canaux Na_v disponibles est comparable à l'inactivation lente des canaux Na_v lors d'une dépolarisation prolongée (Carr et coll., 2003).

En conclusion chez les mammifères, la stimulation des récepteurs RCPG par la dopamine et l'acétylcholine active des voies de signalisation mobilisant la PKA et la PKC. Les activités enzymatiques de la PKA et la PKC interagissent : changement de conformation du canal, modulation de l'activité des phosphatases...

La régulation des canaux Na_v de mammifères par la PKA et de la PKC varie aussi en fonction du potentiel de la membrane. De ce fait, la modulation des canaux Na_v neuronaux par des processus de phosphorylation résulte de l'intégration de plusieurs voies de signalisation interagissant les unes avec les autres et ce dans le but d'ajuster rapidement la réponse neuronale.

F.1.4 Modulation des courants Na^+ par la CamKII

Une seule étude s'est intéressée à la régulation des courants Na^+ de mammifères *via* la protéine kinase dépendant du complexe calcium-calmoduline (CaMKII) (Carlier et coll., 2000). L'application d'inhibiteurs de la CaMKII (KN-62 et peptides) réduit fortement l'amplitude des courants Na^+ des neurones de cerveau de rat mais n'a aucun effet sur des courants Na^+ de canaux recombinants exprimés dans des cellules CHO. Ceci suggère que les canaux Na_v sont indirectement régulés par la CamKII à l'état basal des neurones ou que la CaMKII est absente des cellules CHO (Carlier et coll., 2000).

F.2 Régulation des courants Na⁺ d'insecte par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation

Peu d'études relatent de la phosphorylation et de la déphosphorylation des canaux Na_v d'insectes. Néanmoins il a été montré que les canaux Na_v neuronaux immunoprécipités de criquet, de blatte, de mouche et de papillon de nuit sont phosphorylés par la PKA (Gordon et coll., 1990). De plus, les données de la biologie moléculaire indiquent l'existence d'au moins trois sites putatifs de phosphorylation par la PKA et d'un site putatif de phosphorylation par la PKC au niveau de la sous-unité α des canaux Na_v d'insecte (Tableau 9). Par contre aucune étude n'a confirmé jusqu'à ce jour la fonction de ces sites *via* des canaux Na_v d'insecte recombinants. Mais quelques études d'électrophysiologie ont montré que les courants Na⁺ de différents neurones d'insectes sont sensibles à des messagers secondaires et aux sérine-thréonine kinases.

F.2.1 Identification des sites putatifs de phosphorylation pour la PKA et la PKC

Les sous-unités α clonées présentent des sites putatifs de phosphorylation pour la PKA et la PKC. Quatre sites putatifs de phosphorylation pour la PKA ont été rapportés pour la sous-unité DmNa_v1 (Loughney et coll., 1989). Il s'agit des sérines en position 553 (exon a de la boucle L1), en position 1177 (L2), en position 1543 et 1550 (boucle L3). Des alignements de séquence protéique des canaux Na_v d'insecte montre la conservation de quatre sites putatifs de phosphorylation (Tableau 9). La sérine en position 1543 de la sous-unité DmNa_v1 est substituée par une asparagine chez toutes les autres sous-unités d'insectes, suggérant que ce site putatif de phosphorylation est unique à *D. melanogaster*. Par ailleurs, en fonction des méthodes et des logiciels employés la prédiction des sites de phosphorylation peut varier. Par exemple, le site SRHSSY de AgNa_v1 n'est pas prédit comme étant un site de phosphorylation alors que son homologue de MdNa_v1 l'est (Ingles et coll., 1996, Davies et coll., 2007a). C'est la raison pour laquelle la prédiction des sites de phosphorylation reste insuffisante pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la phosphorylation des canaux Na_v d'insecte par la PKA et la PKC.

Tableau 9 : Sites putatifs de phosphorylation pour la PKA et la PKC identifiés chez plusieurs espèces d'insecte.

| | L1 | | | L2 | L3 | | Référence |
|----------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------------|
| | PKA | PKA/PKC | PKA | PKA | PKA | PKA | |
| | <i>Exon I</i> | <i>Exon A</i> | | | | | |
| | S553 (DmNav1) | S570 (DmNav1) | S641 (DmNav1) | S1177 (DmNav1) | S1543 (DmNav1) | S1550 (DmNav1) | Loudney et coll., 1989 |
| <i>D. melanogaster</i> | KVRKVS T* | RRGSRSS | SRHSS Y | KRD ASK* | KKYY SAM* | KRMG SK* | |
| <i>Musca domestica</i> | KVRKVS T* | RRGSRSS * | SRHSS Y* | KRD VSK | KKYY NAM | KRMG SK | Ingles et coll., 1996 |
| <i>Anopheles gambiae</i> | KARKV SA* | RRGSRGS * | SRHSS Y | KRD ASK* | KKYY NAM | KRMG SK* | Davies et coll., 2007 |
| <i>Aedes aegypti</i> | KARKV SA | RRGSRGS | SRHSS Y | KRD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | |
| <i>Culex pipiens</i> | KARKV SA | RRGSRGS | SRHSS Y | KRD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | |
| <i>Apis mellifera</i> | KVRKVS A | RRSRGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | |
| <i>Bombyx mori</i> | RPRKVS M | RRGSRGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | Shao et coll. 2009 |
| <i>Plutella xylostella</i> | RQRKVS M | RRGSRGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | Sonada et coll., 2008 |
| <i>Heliothis virescens</i> | L. REYEM | RRGSRGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | Park et coll., 1999 |
| <i>Pediculus humanus</i> | KFRKVS A | RRSRGS | SRHSS Y | KGD MSK | KKYY NAM | KRMG SK | Lee et coll., 2003 |
| <i>Cimex lectularius</i> | – | RRGSRGS | SRHSS Y | – | KKYY NAM | KRMG SK | Yoon et coll., 2008 |
| <i>Varoa destructor</i> | KVR . . . | RRGSRSS * | SRHSS Y | GDEVD | KKYY NAM | KRMG SK | Wang et coll., 2003 |
| <i>Blattella germanica</i> | AIRKVS A | RRGSQGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | Dong et coll., 1997 |
| <i>Tribolium castaneum</i> | KIRKVS A | RRGSRGS | SRHSS Y | KRD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | |
| <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | KMRKVS A | RRGSRGS | SRHSS Y | KRD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | Lee et coll., 1999 |
| <i>Nasonia vitripennis</i> | KVRKVS T | RRGSRGS | SRHSS Y | KD ASK | KKYY NAM | KRMG SK | |

☞ Analyse bioinformatique personnelle

Les séquences de ces sites putatifs ont été déduites à partir des sérines prédites dans la littérature (*) et des séquences consensus des sites de phosphorylation (PKA : KR-R-X(X)-ST (Kemp et coll., 1990) et PKC : R-RF-R-R-RK-G-ST (site www.kinexus.ca)). Ces séquences ont ensuite été identifiées pour chaque espèce d'insecte à partir d'un alignement protéique selon CLUSTAL W des sous-unités α d'insecte. Les sérines prédites pour être phosphorylées sont en rouge, les résidus conservés sont en caractères gras et les résidus similaires sont en bleus. Les tirets indiquent l'absence de résidus d'acide aminé homologues.

F.2.2 Régulation des courants Na^+ d'insecte par des voies de signalisation impliquant la PKA, la PKC et la CaMKII

(a) Régulation des courants Na^+ de neurones DUM de *P. americana* par des voies de signalisation impliquant la PKA et la PKC

Au cours du chapitre précédent, nous avons mentionné l'existence de deux courants INa1 et INa2 dans les neurones DUM de *P. americana* dissociables par l'activation de la voie de l'AMPc *via* le L-glutamate. (Introduction/Chapitre 1/ F.1.3).

Parallèlement à cette voie de phosphorylation, il a été montré que la neurohormone D (NHD) réduit l'amplitude des courants Na^+ des neurones DUM de *P. americana* de manière dose-dépendante (Wicher, 2001). La réduction des courants Na^+ s'explique par une accélération de l'inactivation et une diminution de la constante de temps de réactivation des courants Na^+ sans modification de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation. En d'autre terme, la porte m se ferme plus rapidement au

cours de la dépolarisation conduisant ainsi à la réduction du courant Na^+ mais elle se rouvre ensuite plus lentement au cours de la réactivation. Par ailleurs, l'application d'activateurs de la PKA ou de la sous-unité catalytique de la PKA mime les effets de la NHD. Ceci indique que le NHD active une voie de régulation mettant en jeu l'AMPc et la PKA phosphorylant directement ou indirectement les canaux Na_v (Wicher, 2001). Il est aussi intéressant de noter que l'activation de la PKC potentialise les effets modulateurs de la NHD (Wicher, 2001). Par conséquent, il est probable que les voies de régulation de la PKA et de la PKC soient convergentes dans les neurones DUM, comme cela a été démontré chez les vertébrés (F1.3).

(b) Régulation potentielle des propriétés fonctionnelles des sous-unités DmNa_v par la CamKII

Des études de génétique conduites à partir de *D. melanogaster* ont montré un lien entre l'activité de la CamKII, l'expression de la sous-unité DmNa_v1 et l'excitabilité neuronale (Park et coll., 2002). En effet, la mutation du gène codant la CamKII augmente la létalité des individus au stade embryonnaire par défaut d'éclosion, et ce surtout lorsque ces derniers expriment des mutations au niveau du gène *DmNa_v1* (Park et coll., 2002). De plus, il a été montré que le niveau d'expression de la CamKII est réduit chez des populations de *B. germanica* résistantes au DDT, insecticide ciblant les canaux Na_v (Inagaki et coll., 1998). Ces résultats suggèrent donc un lien entre la pharmacologie des canaux Na_v et l'activité de la CamKII.

CHAPITRE 3. DEFINITION DE LA PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE ET DES OBJECTIFS

A Le contexte scientifique de nos recherches

Cette thèse s'intègre parmi les études s'intéressant à établir une corrélation entre la structure moléculaire des canaux Na_v et les propriétés de l'excitabilité membranaire des neurones. Plus précisément, la problématique de recherche a été bâtie en confrontant les courants Na^+ natifs des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* aux connaissances relatives à la diversité moléculaire et fonctionnelle des canaux Na_v d'insecte. Ainsi, le contexte de la problématique de notre recherche se positionne au carrefour de trois axes majeurs : l'étude des courants Na^+ natifs de neurones d'insecte, la caractérisation des processus à l'origine de la diversité moléculaire des canaux Na_v et l'étude électrophysiologique des canaux Na_v recombinants (Figure 18). Afin de comprendre les objectifs de recherche fixés, la problématique est repositionnée dans son contexte scientifique au cours des paragraphes suivants.

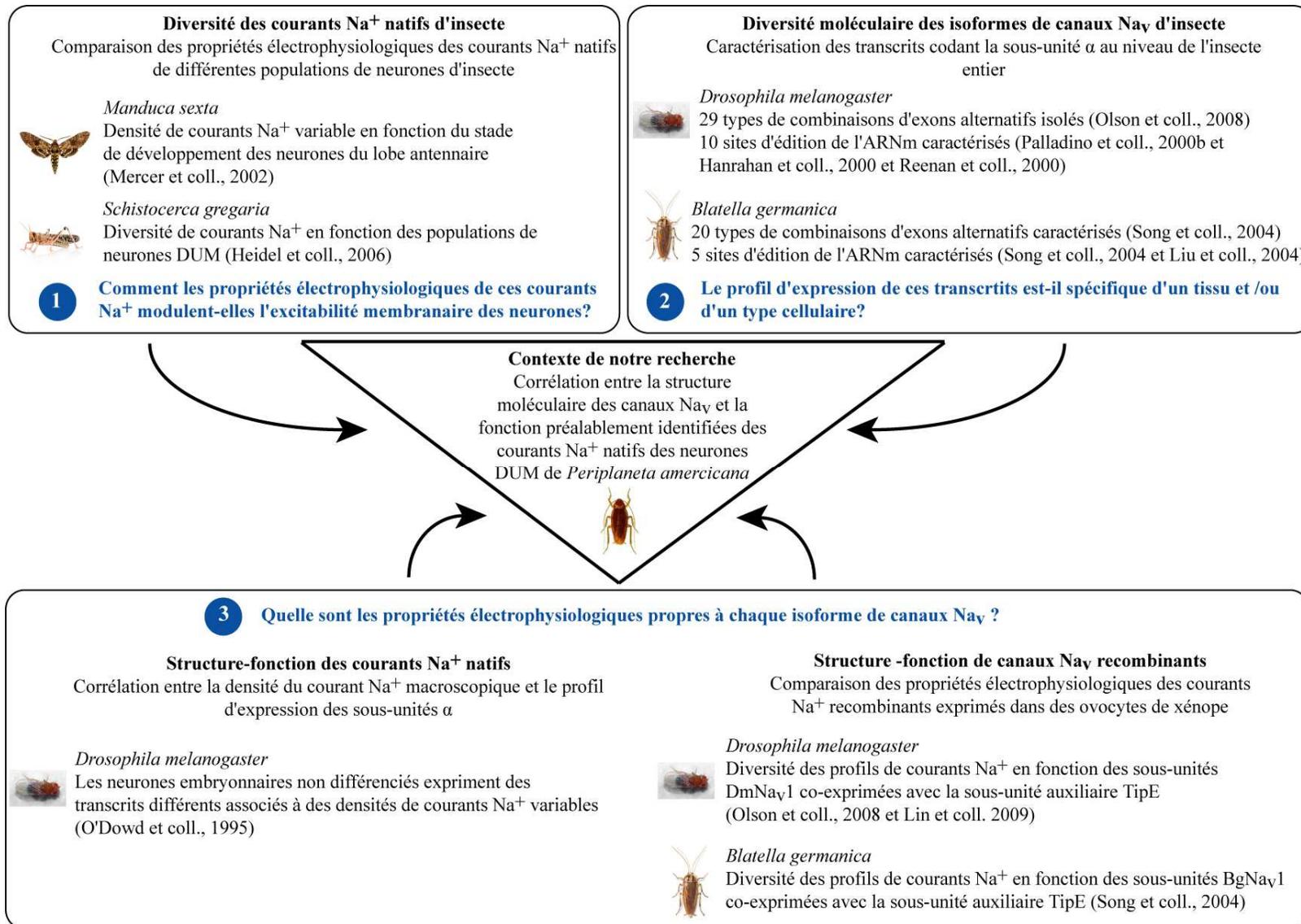


Figure 18 : Intégration de notre démarche de recherche dans le contexte scientifique actuel.

Premièrement, des études électrophysiologiques ont mis en évidence l'existence d'une diversité de courants Na^+ entre des populations distinctes de neurones isolés chez *Manduca sexta* et *Schistocerca gregaria* (Mercer et coll., 2002, Heidel et coll., 2006). Dans ces deux cas, la variabilité de la densité des courants Na^+ est associée à la modulation de l'amplitude des potentiels d'action émis par les neurones, et ce en fonction du stade de développement ou du type neuronal (Mercer et coll., 2002, Heidel et coll., 2006). Mais comment expliquer la corrélation entre les propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ et la fréquence de décharge des potentiels d'action ?

Deuxièmement, en parallèle à ces travaux s'intéressant à la caractérisation des courants Na^+ natifs, des études ont mis en exergue les processus de modifications post-transcriptionnelles à l'origine de la diversité moléculaire des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte (Introduction/chapitre 2/Parties B, C et D). Chez *D. melanogaster* et *B. germanica*, l'épissage alternatif des gènes codant les sous-unités α induit l'expression de multiples transcrits codant des combinaisons d'exons alternatifs différentes (Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008). De plus, plusieurs sites d'édition de l'ARN messager ont été identifiés pour ces mêmes espèces (Palladino et coll., 2000b, Song et coll., 2004). Dans ces études, les transcrits amplifiés par RT-PCR ont pour origine les ARN totaux purifiés soit d'un ensemble de tissus pour *B. germanica*, soit de l'organisme complet pour *D. melanogaster*. Mais alors comment cette diversité moléculaire peut-elle être répartie en fonction des tissus, voir même des types cellulaires ? Quelle est sa signification physiologique ?

Une seule étude, relativement ancienne, s'est attachée à corréler la structure moléculaire des canaux Na_v avec la densité des courants Na^+ natifs de neurones embryonnaires de *D. melanogaster* (O'Dowd et coll., 1995). Par RT-PCR sur neurone isolé, elle montre en effet une corrélation entre la densité de courants Na^+ natifs et l'expression des exons alternatifs a et i localisés au niveau de la boucle intracellulaire L1. Cependant, la population de neurone étudiée est hétérogène, limitant la corrélation entre la diversité moléculaire des canaux Na_v et leur rôle au sein d'un type neuronal particulier.

Par ailleurs, l'expression de canaux Na_v recombinants dans des systèmes hétérologues a permis de caractériser les propriétés électrophysiologiques de chaque isoforme de sous-unité α de *D. melanogaster* et *B. germanica* co-exprimée avec la sous-unité auxiliaire TipE (Warmke et coll., 1997, Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Toutefois à partir de ces études il est difficile d'extrapoler les propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ de canaux Na_v recombinants à leur fonction *in vivo*.

Outre l'intérêt fondamental qu'offrent la physiologie des neurones d'insecte et la biologie moléculaire des canaux Na_v , ces recherches apportent des arguments de réflexion intéressants dans un contexte appliqué. En effet, les canaux Na_v sont la cible d'insecticides majeurs que sont le DDT, les pyréthrinoïdes et les dérivés de pyrazoline (Dong, 2003) (Introduction/Chapitre 1/E). Le paradoxe des insecticides est la diminution régulière de leur efficacité au fur et à mesure des applications, sous l'effet de contraintes évolutives au sens darwinien. Mais alors dans quelle mesure la diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte peut-elle moduler l'activité des insecticides ? Et réciproquement, peut-on concevoir une modulation des modifications post-transcriptionnelles des canaux Na_v sous une pression de sélection opérée par les insecticides ? Est-ce que toutes les isoformes sont sensibles aux insecticides de façon égale ?

B Notre hypothèse de recherche et les objectifs scientifiques associés

Ainsi, les recherches présentées dans ce manuscrit ont été initiées au regard des expériences de patch-clamp réalisées à partir des neurones DUM de la blatte *P. americana* (Figure 19). En effet, deux courants Na^+ distincts nommés INa1 et INa2 ont été isolés, grâce à des outils pharmacologiques, au sein d'une population unique de neurones octopaminergiques DUM de la blatte *P. americana* (Laviaille-Defaix et coll., 2006). Dans ce cas, les deux courants INa1 et INa2 participent conjointement à la régulation de la fréquence de décharge des potentiels d'action (Figure 19). A l'issue de cette découverte et en accord avec la bibliographie existante, nous avons émis l'hypothèse que des canaux Na_v aux structures moléculaires distinctes sont coexprimés au sein des neurones DUM. Plus précisément, nous avons envisagés que les courants INa1 et INa2 sont dus à la coexpression de sous-unités α et/ou de sous-unités β différentes (Figure 19). A partir de cette hypothèse de recherche, deux objectifs scientifiques ont été formulés dont le contenu est étayé ci-dessous.

1. Caractériser la diversité moléculaire des canaux sodium exprimés dans le système nerveux central par une approche de biologie moléculaire.

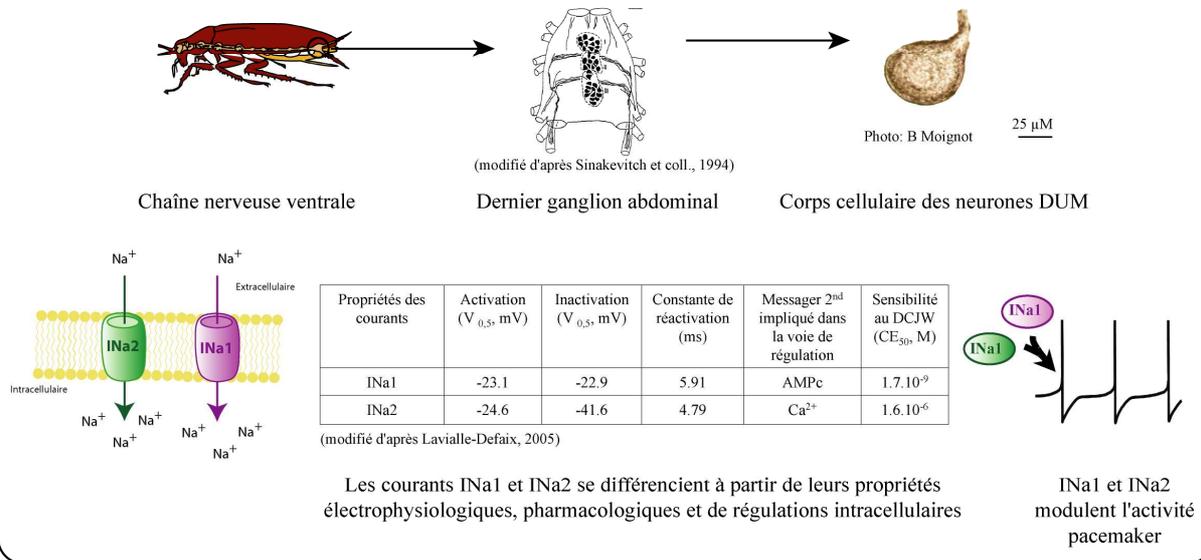
Bien que la blatte *P. americana* soit un modèle de référence en neurobiologie des invertébrés, il existe peu de données caractérisant les transcrits exprimés dans le système nerveux central de cet insecte. Toutefois, l'alignement protéique des canaux Na_v de quelques espèces d'insecte telle que *Drosophila melanogaster* et *Blattella germanica* a permis d'identifier des régions très homologues, amorçant ainsi la mise au point de l'amplification des transcrits codant des canaux Na_v chez *P. americana*. De cette façon, nous avons isolé dans un premier temps des ADNc codant partiellement les sous-unités α et β des canaux Na_v par RT-PCR sur des ARN totaux purifiés de la chaîne nerveuse. Les informations de séquence acquises, nous ont permis d'isoler par la suite la totalité des transcrits exprimés dans la chaîne nerveuse. Dans un second temps, nous avons affiné l'identification des structures moléculaires des canaux Na_v en isolant les transcrits exprimés dans le dernier ganglion abdominal où se concentrent les corps cellulaires des neurones DUM. Dans un troisième temps, nous avons mis au point la technique de la RT-PCR sur cellule unique pour caractériser la diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans ce modèle cellulaire.

2. Corréler la structure moléculaire des transcrits identifiés aux profils des courants Na⁺ par une approche d'électrophysiologie.

La caractérisation moléculaire des canaux Na_v exprimés dans le SNC de *P. americana* a été complétée par des études fonctionnelles des sous-unités α et β clonées. Dans un premier temps, nous avons tenté d'exprimer des sous-unités α et β recombinantes dans des ovocytes de xénope pour caractériser le profil électrophysiologique des courants Na⁺. Puis, pour corréler la structure moléculaire des canaux Na_v au courant Na⁺ natifs des neurones DUM, nous avons souhaité inhiber l'expression des isoformes de la sous-unité α par stratégie dite « d'oligonucléotides antisens ». La mise au point de la technique sur DUM neurone isolé nous offre aussi la possibilité de corréler les phénotypes des courants Na⁺ à l'expression des transcrits. Ainsi, la combinaison de ces approches fonctionnelles devrait permettre d'appréhender encore plus le rôle des isoformes de canaux Na_v dans leur milieu natif.

Contexte du modèle biologique étudié

Deux courants Na^+ , INa1 et INa2, modulent conjointement l'activité pacemaker des neurones octopaminergiques DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplanata americana* (Lavialle-Defaix et coll., 2006)

**Hypothèse de recherche**

Différentes sous-unités α et/ou β de canaux Na_v sont co-exprimés dans les neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana*.

Objectifs scientifiques**Etape 1: Caractérisation de la diversité moléculaire des canaux sodium exprimés dans le système nerveux central par une approche de biologie moléculaire**

Caractérisation des transcrits codant les sous-unités α et β des canaux Na_v exprimés à trois niveaux distincts du système nerveux central:

1. la chaîne nerveuse
2. le dernier ganglion abdominal
3. les neurones DUM

Etape 2: Corrélation entre la structure moléculaire des canaux sodium et les profils des courants Na^+ par une approche d'électrophysiologie

Caractérisation de la fonction des sous-unités α et β de canaux Na_v clonées par deux approches d'électrophysiologie complémentaires:

Approche *in vitro* par la technique de double microélectrode: Expression des sous-unités α et β clonées dans des ovocytes de xénope

Approche *in vivo* par la technique du patch-clamp: RT-PCR sur neurone DUM isolé et inhibition de l'expression des isoformes de la sous-unité α des canaux Na_v exprimées dans les neurones DUM par stratégie dite des "oligonucléotides antisens"

Figure 19: Diagramme synoptique illustrant les courants Na^+ du modèle cellulaire étudié, l'hypothèse de recherche déclinée et les objectifs scientifiques de recherche.

MATERIELS ET METHODES

Pour caractériser les sous-unités α et β des canaux Na_v , exprimés dans la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana* nous avons mis en œuvre plusieurs méthodes de biologie moléculaire. Ainsi, le modèle biologique est décrit dans le premier chapitre. Puis, le second chapitre détaille les méthodes employées en biologie moléculaire depuis l'extraction des acides nucléiques jusqu'à l'analyse des séquences des ADNc clonés. La technique de la RT-PCR sur DUM neurone isolé est tout particulièrement agrémentée de commentaires quant aux précautions nécessaires pour sa mise en œuvre. La méthodologie utilisée pour établir des relations phylogénétiques entre les séquences des ADNc isolés est aussi expliquée dans le chapitre 2. Dans le chapitre 3, deux techniques de mesures électrophysiologiques des courants Na^+ sont détaillées. La première correspond à la technique du patch-clamp employée pour mesurer les courants Na^+ natifs de neurones DUM. La seconde technique se réfère à l'expression dans un système hétérologue de sous-unités recombinantes de canaux Na_v .

CHAPITRE 1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE *P. AMERICANA* : LE MODELE BIOLOGIQUE

A Conditions d'élevage des blattes *P. americana*

Les blattes *P. americana* employées pour toutes les expériences présentées dans ce manuscrit sont issues d'un élevage n'ayant jamais été en contact avec des insecticides (Figure 20). Les blattes sont élevées à 29°C avec une photopériode constante de 12 heures jour et 12 heures nuit. Leur nourriture et l'eau sont fournies tous les 3 jours. Seuls les blattes mâles adultes sont utilisées pour préserver l'élevage et rester ainsi en accord avec les études menées antérieurement, *in vivo* sur des neurones, au laboratoire.



Figure 20: Colonie de blattes *Periplaneta americana* employées pour les expériences.

Les larves sont aptères et les adultes ailés.

B Le système nerveux central de la blatte *P. americana*

B.1 Niveau tissulaire : la chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire

Le système nerveux central (SNC) de la blatte *P. americana*, et plus largement celui des insectes, est constitué d'une chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire (Niven et coll., 2008). Les ganglions sont divisés en quatre types selon leur localisation anatomique, soit les ganglions cérébroïdes ou « cerveau », les ganglions sous-œsophagiens, thoraciques et abdominaux (A1 à A6 ou dernier ganglion abdominal, DGA) (Figure 21). Les ganglions sont reliés entre eux par deux connectifs, entourés d'une gaine conjonctive qui joue le rôle de soutien et de barrière hémato-encéphalique entre le milieu extérieur et l'environnement des cellules nerveuses.

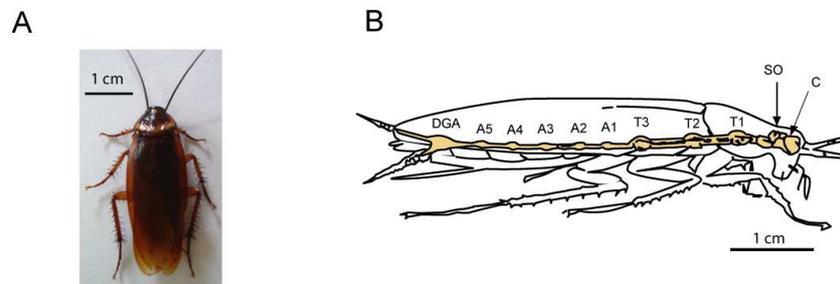


Figure 21 : Représentation schématique du système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana*.

A. Blatte mâle adulte isolé (photo Zeineb Es-Salah-Lamoureux).

B. Schéma de la chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire. C : ganglions cérébroïdes ; SO : ganglions sous-œsophagiens ; T1 à T3 : ganglions thoraciques ; A1 à A5 : ganglions abdominaux ; DGA : dernier ganglion abdominal.

B.2 Niveau subtissulaire : le dernier ganglion abdominal

Le dernier ganglion abdominal contrôle plusieurs fonctions physiologiques dont le système circulatoire, l'excrétion et la reproduction *via* un réseau de différentes cellules neurosécrétrices (Nassel, 1996). Ainsi, au sein des ganglions abdominaux coexistent les corps cellulaires des neurones DUM (Dorsal Unpaired Median), les neurones VUM (Ventral Unpaired Median), les neurones DPM (Dorsal Paired Median), les neurones intergéants et les neurones locaux (Figure 22) (Amat et coll., 1996, Nassel, 1996). Les corps cellulaires sont situés dans la zone corticale du ganglion et sont entourés de cellules gliales constituant la neuroglie (Figure 22). Les prolongements axonaux et les arborisations neuritiques des corps cellulaires du ganglion mais aussi des autres ganglions de la chaîne nerveuse sont concentrés dans le neuropile (Figure 22). C'est à ce niveau que sont localisées les synapses. Chez *P. americana*, le dernier ganglion abdominal correspond à la fusion de cinq ganglions abdominaux primitifs (A7 à A11), et de ce fait est caractérisé par une taille relativement importante comparativement aux autres ganglions abdominaux (Figure 21) (Sinakevitch et coll., 1995).

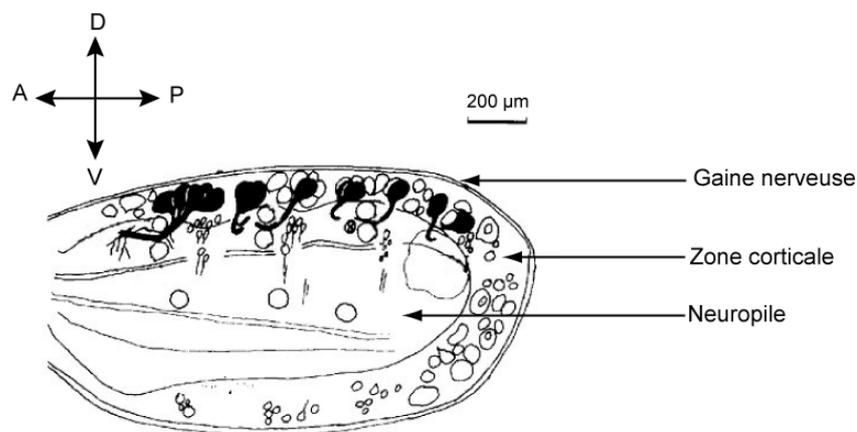


Figure 22 : Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana*.

De la périphérie vers le centre, trois structures caractérisent le DGA : la gaine nerveuse, la zone corticale et le neuropile. Différents types neuronaux sont représentés par des formes ovoïdes. Les neurones DUM efférents (en noir) sont identifiés à l'aide d'anticorps poly clonaux anti-octopamine (modifié d'après Sinakevitch et coll., 1996).

B.3 Niveau cellulaire : les neurones DUM

L'appellation des neurones DUM ("Dorsal Unpaired Median") est associée à leur localisation spatiale, à savoir le long de la ligne médiane du côté dorsal des ganglions (Hoyle, 1974). Cette disposition particulière a une origine embryonnaire caractérisée par le bourgeonnement de neuroblastes médians produisant une descendance de cellules sans homologues, c'est-à-dire impaires. Ainsi trois types de neurones DUM, issus des mêmes cellules souches, coexistent au sein des ganglions (Braünig et coll., 2001) :

- › les neurones DUM efférents, à large soma (diamètre de 30 à 60 μm), présentent une arborisation neuritique dite "en T", sécrètent de l'octopamine, et génèrent spontanément des potentiels d'action de grande amplitude,
- › les neurones intersegmentaires sont GABAergiques et possèdent un soma de plus petit diamètre (10 à 20 μm). Ils sont caractérisés par leurs prolongements neuritiques "en H" qui relient les ganglions,
- › les interneurones locaux sont aussi GABAergiques (10 à 20 μm de diamètre) et disposent de prolongements neuritiques restreints au ganglion.

Au laboratoire, les neurones DUM efférents du DGA ont été caractérisés sur le plan biochimique, physiologique, électrophysiologique et pharmacologique (revue (Grolleau et coll., 2000)). Le DGA de la blatte *P. americana* contient 36 neurones DUM octopaminergiques répartis en trois îlots distincts (Figure 23) (Sinakevitch et coll., 1994, Sinakevitch et coll., 1996). Des marquages intracellulaires au chlorure de cobalt ont montré que les neurones DUM octopaminergiques du DGA de *P. americana* innervent l'appareil circulatoire, les muscles viscéraux et les glandes reproductrices mâle et femelle (Sinakevitch et coll., 1994, Sinakevitch et coll., 1995, Sinakevitch et coll., 1996). La sécrétion de l'octopamine est alors contrôlée par l'activité électrique des neurones DUM. En effet, ces derniers ont la particularité de générer spontanément des PAs de grande amplitude à fréquence régulière sans aucune afférence excitatrice (Lapied et coll., 1989). Cette activité, dite de type « pacemaker » est une propriété intrinsèque du corps cellulaire (Lapied et coll., 1989). Elle est générée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel, et modulée par des canaux ioniques responsables de courants dits de repos essentiels pour maintenir le potentiel de membrane au seuil de déclenchement des PAs

(Figure 23) (Grolleau et coll., 2000, Wicher et coll., 2001, Defaix et coll., 2005, Lavalie-Defaix et coll., 2006).

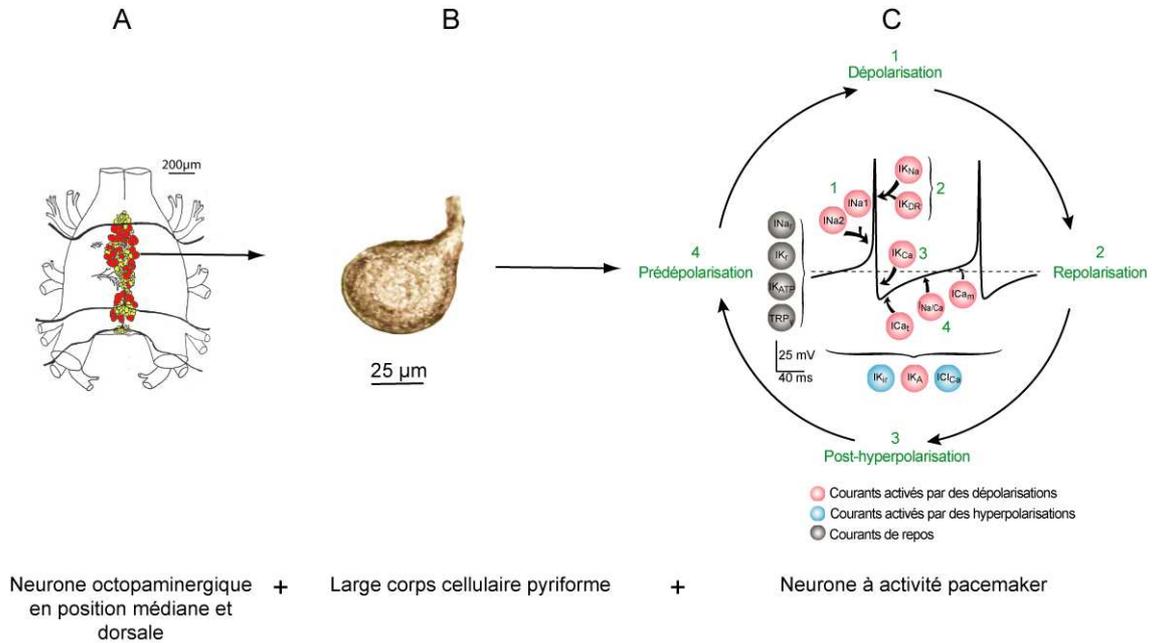


Figure 23 : Critères anatomiques, biochimiques et électrophysiologiques caractérisant les neurones DUM efférents du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana*.

A : Localisation des neurones DUM efférents (rouge), des neurones intersegmentaires et des interneurons locaux (jaune) le long de la ligne médiane du DGA de *Periplaneta americana* (modifié d'après Sinakevitch et coll., 1996). B. Corps cellulaire des neurones DUM efférents. C. Canaux ioniques impliqués dans l'activité électrique spontanée des neurones DUM (modifié d'après Grolleau et Lapied, 2000 ; Defaix et Lapied, 2005 et Lavalie-Defaix et coll., 2006).

CHAPITRE 2. ETUDE DE LA STRUCTURE DES CANAUX Na_v PAR UNE APPROCHE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

La figure ci-dessus présente l'approche générale de biologie moléculaire utilisée.

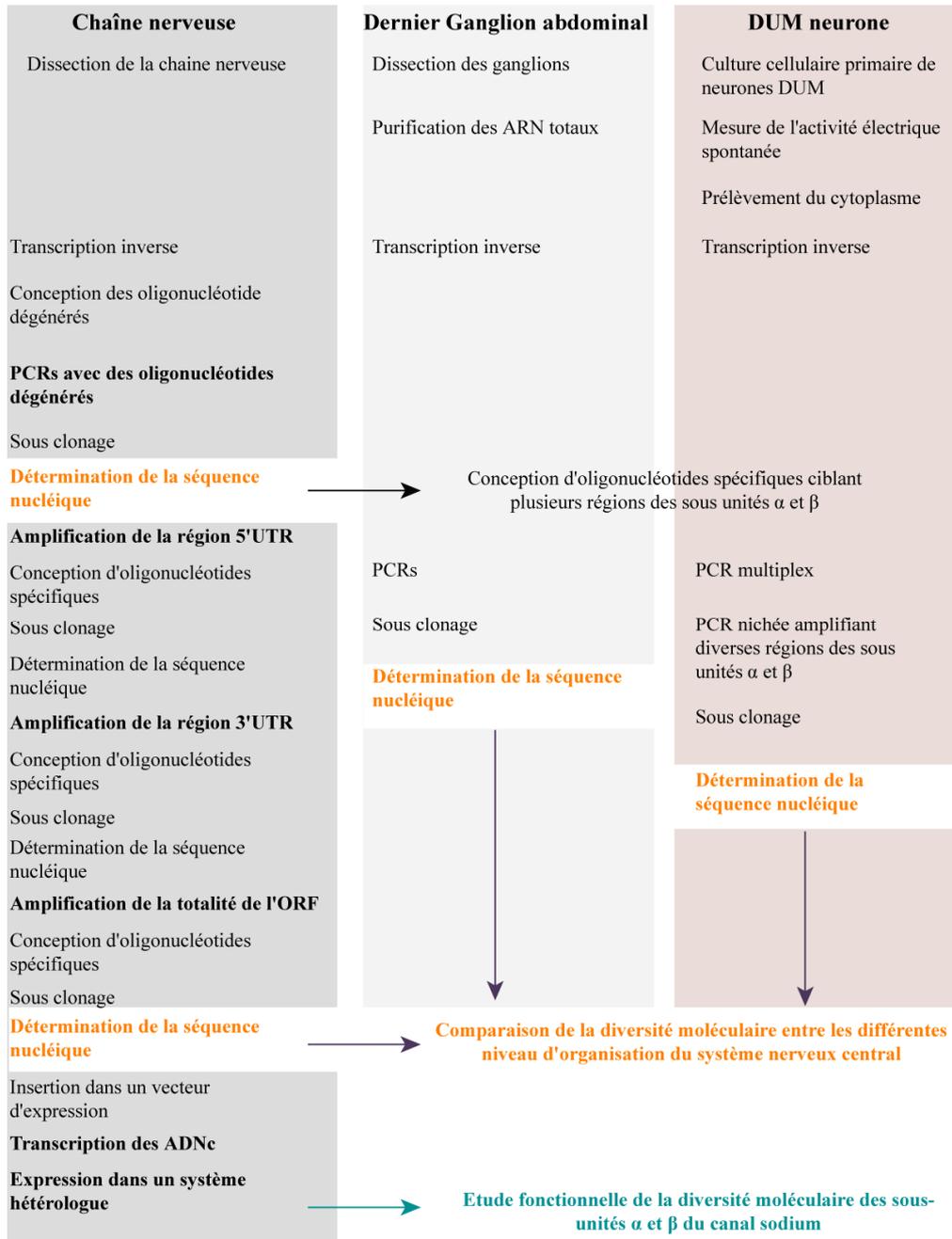


Figure 24: Méthodes de biologie moléculaire employées pour étudier la diversité moléculaire des sous-unités α et β des canaux sodium exprimés dans le système nerveux central de la blatte *P. americana*.

A Préparation des tissus

Cinq tissus distincts sont isolés pour extraire les ARN totaux. Ces tissus comprennent une partie de la chaîne nerveuse ventrale, la tête, les muscles du coxa des pattes, les intestins ainsi que les gonades mâles. Plus précisément, les chaînes nerveuses prélevées comprennent trois ganglions thoraciques et six ganglions abdominaux. Les gonades mâles comprennent les glandes accessoires MSG. Les tissus sont prélevés sur sept individus après anesthésie des blattes à 4°C. Les ARNs sont des acides nucléiques sensibles à l'hydrolyse par des ribonucléases ubiquitaires. Ainsi pour préserver leur qualité, les tissus sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide après avoir été disséqués sous loupe binoculaire (Figure 25, Etape 1). De plus la congélation permet de les réduire en fine poudre par broyage pour extraire les ARN totaux (Figure 25, Etape 2). Les tissus ainsi réduits en poudre sont conservés à - 80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux.

B Purification des ARNs

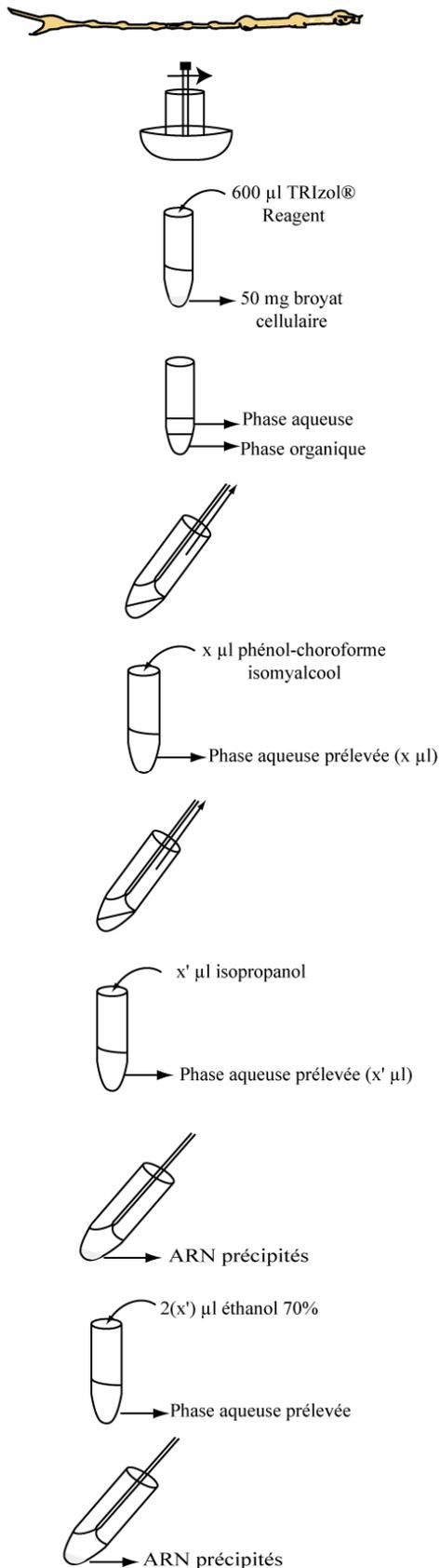
B.1 Purification des ARN totaux de différents tissus

La purification d'ARN totaux intacts et de bonne qualité représente une étape importante qui détermine le succès de la transcription inverse ultérieurement. Différentes méthodes de purification des ARN totaux existent et doivent être adaptées selon les tissus. Au laboratoire, la purification des ARN totaux basée sur la technique classique du TRIzol® LS Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) s'est avérée la mieux adaptée pour les cinq tissus de *P. americana*.

La méthode du TRIzol® LS Reagent correspond au développement de la méthode mise au point par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et coll., 1987). Ce réactif correspond à un mélange d'isothiocyanate de guanidine et de phénol. Il permet pendant la phase d'homogénéisation des tissus de dénaturer les protéines tout en préservant la qualité des ARN. 60 µl de TRIzol® sont ajoutés par mg de tissus broyés (Figure 25, Etape 3). Le broyat cellulaire est homogénéisé par des aspirations-refoulement successifs à l'aide d'une

aiguille stérile Neolus IM 40 mm 8/10 (Terumo®, Tokyo, Japon) montée sur une seringue de 1 ml (Terumo®, Leuven, Belgique). Puis après avoir ajouté 200 µL de chloroforme (Sigma-Aldrich®, S^T Louis, Etats-Unis), par ml de TRIzol®, le mélange est incubé 10 minutes à 44°C pour dénaturer les complexes nucléoprotéiques. Après une centrifugation de 15 min à 43 g, la phase aqueuse et la phase organique sont séparées. Cette séparation permet d'isoler les protéines dans la phase phénolique et à l'interface tandis que les ARNs restent exclusivement dans la phase aqueuse. La phase aqueuse est alors délicatement prélevée (Figure 25, Etape 8). Un volume identique de phénol-chloroforme-isoamylalcool pH 4,7 (Sigma-Aldrich®) est ajouté à la phase aqueuse, puis le tout est centrifugé 10 min à 43 g (Figure 25, Etape 9). La nouvelle phase aqueuse est prélevée et un volume identique d'isopropanol (HPLC, Sigma-Aldrich®) est ajouté pour la précipitation des ARNs (Figure 25, Etapes 11 et 12). Une incubation de 10 minutes à 30°C puis une centrifugation de 10 minutes à 43 g permet la précipitation des ARNs sous forme de culot. Ce dernier est rincé à l'éthanol 70% (HPLC, Carlo Erba, Italie), séché à l'air libre puis resuspendu dans 15 µl d'eau pure (Gibco™, Invirogen) (Figure 25, Etapes 13 à 17). Par expérience, ce volume d'eau est suffisant pour obtenir la concentration d'ARN souhaitée.

La qualité et la quantité des ARNs purifiés sont mesurées par spectrophotométrie UV (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) en faisant varier la longueur d'onde de 220 à 350 nm. Le spectrophotomètre est étalonné à partir du solvant dans lequel sont resuspendus les acides nucléiques. La concentration des ARN est obtenue en multipliant la densité optique mesurée à 280 nm par le facteur de corrélation correspondant aux acides nucléiques simples brins (40ng/µL par unité d'absorbance). Le rapport des densités optiques 260/280 (<1,8) indique une faible contamination protéique, et le rapport 280/230 (<2) reflète une faible contamination par des résidus organiques tels que le phénol.



1. Dissection de 7 chaînes nerveuses soit 50 mg de tissus
2. Broyage des tissus dans de l'azote liquide
3. Ajout 3 ml de TRIzol® Reagent
4. Homogénéisation
5. Ajout 600 µl de chloroforme
6. Incubation 10 min à 44°C
7. Centrifugation 15 min à 43 g

Séparation d'une phase aqueuse et d'une phase organique

8. Prélèvement de la phase aqueuse (x µl) contenant les ARN totaux
9. Ajout d'un volume équivalent à la phase aqueuse (x µl) de phénol-chloroforme isomylalcool pH 4,7
10. Centrifugation 10 min à 43 g
11. Prélèvement de la phase aqueuse (x' µl) contenant les ARN totaux
12. Ajout d'un volume équivalent à la phase aqueuse (x' µl) d'isopropanol
- 13 Incubation 10 min 30°C
14. Centrifugation 10 min à 43 g
15. Prélèvement du surnageant
16. Ajout d'éthanol 70% avec un volume équivalent à 2 fois le volume de la phase aqueuse prélevée lors de l'étape n°11
17. Prélèvement du surnageant
18. Séchage du culot
19. Resuspension du culot dans 15 µl d'eau pure

Figure 25: Protocole de la purification des ARN totaux à partir de la méthode Trizol® Reagent (Invitrogen™).

B.2 Purification des ARN totaux du dernier ganglion abdominal

La purification des ARN totaux du dernier ganglion abdominal (DGA) a été réalisée à partir du kit NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Ce kit est adapté à la purification d'ARN à partir d'échantillons réduits (< 5 mg de tissu). Le principe est de séparer les ARN des autres constituants cellulaires par fixation des ARN sur une membrane en silice. Brièvement, quatorze DGA sont disséqués dans les mêmes conditions mises en œuvre lors du prélèvement des tissus (partie B). Les ganglions sont directement disposés dans 100 µl de tampon de lyse contenant de l'isothiocyanate de guanidine ainsi que des sels chaotropiques pour inhiber les ribonucléases. Après agitation du mélange, 5 µl d'un ARN carrier sont ajoutés au lysat pour concentrer les ARN. Ensuite, 100 µl d'éthanol 70% sont ajoutés au mélange pour ajuster les conditions de fixation de l'ARN à la membrane en silice. Le lysat est déposé sur la membrane. Puis après centrifugation, cette dernière est désalée à l'aide d'un tampon fourni par le kit. Cette étape permet l'activité de la désoxyribonucléase déposée directement sur la membrane. Après, trois rinçages de la membrane avec des tampons fournis par le kit, les ARNs sont élués dans de l'eau. La qualité et la quantité des ARN obtenus sont mesurées par spectrophotométrie UV (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) (partie C.1).

C Transcription inverse

Les ADNc sont obtenus par transcription inverse des ARNs totaux en suivant les instructions du kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen™). SuperScript™ III est une version améliorée de l'ARN transcriptase inverse M-MLV mélangée à un inhibiteur de ribonucléases (RnaseOut™). Afin de préserver la qualité des ARN nous effectuons la transcription inverse dans des tubes Eppendorf® Biopur (Hamburg, Allemagne) stériles et exempts de ribonucléases. Des oligonucléotides (oligo (dT)₂₀) s'hybridant à la queue poly-A des ARNs sont utilisés comme amorce pour la transcription inverse. Un premier assemblage contenant 5 µg d'ARN totaux, 2,5 µM d'oligo (dT)₂₀ et 1 µl de tampon « Annealing Buffer » est chauffé 5 minutes à 65°C, puis aussitôt refroidi à 4°C pour permettre l'hybridation des amorces à la matrice. Le second assemblage comprend 2 µl du mélange SuperScript™ III/RnaseOut™ et 10 µl de tampon approprié (10 mM de MgCl₂ et 1 mM de chaque dNTP). La transcription inverse est réalisée pendant 50 minutes à 50°C. Une

incubation de 5 minutes à 85°C permet de dénaturer les enzymes. Afin d'éliminer les complexes nucléiques ARN/ADNc, un volume de ribonucléase H contenant 0,3 U (Promega, Charbonnières-les-bains, France) est ajouté. Cette enzyme est activée pendant 20 minutes à 37°C puis inhibée pendant 5 minutes à 85°C. Les aliquots d'ADNc sont conservés à -20°C. Ils constituent la matrice amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR).

D Amplification des ADNc ciblés par la technique de la polymérisation en chaîne

D.1 Principe général de la polymérisation en chaîne

La polymérisation en chaîne ou PCR est une technique de routine rapide et sensible permettant d'amplifier *in vitro* et de manière ciblée des faibles quantités d'ADN (Mullis, 1990) (Figure 26). Une seule copie d'ADN simple brin peut être théoriquement amplifiée par cette technique. Elle nécessite deux oligonucléotides ou amorces s'hybridant de manière complémentaire en position 3' de l'ADN simple brin. La conception des amorces nécessite alors de connaître la séquence nucléique de l'ADN d'intérêt sur lequel s'hybrident les amorces. L'hybridation des amorces à l'ADN dépend de leur température de fusion ainsi que des conditions de stringence du milieu réactionnel. Une fois que les oligonucléotides se sont fixés à l'ADN simple brin, l'amplification de l'ADN peut être opérée par des ADN polymérases thermostables possédant une activité polymérasique 5'→3'. Elles synthétisent des brins d'ADN complémentaires par appariement de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs). L'amplification est réalisée au cours de n cycles caractérisés par trois températures qui permettent successivement la dénaturation des ADN double brin, l'hybridation des amorces à l'ADN et la synthèse de l'ADN par d'ADN polymérase thermostables. Au final, les produits de PCR ou amplicons contiennent x^n fragments d'ADN qui sont tous de même poids moléculaire. Ce dernier correspond au nombre de paire de bases séparant les 2 amorces (Figure 26).

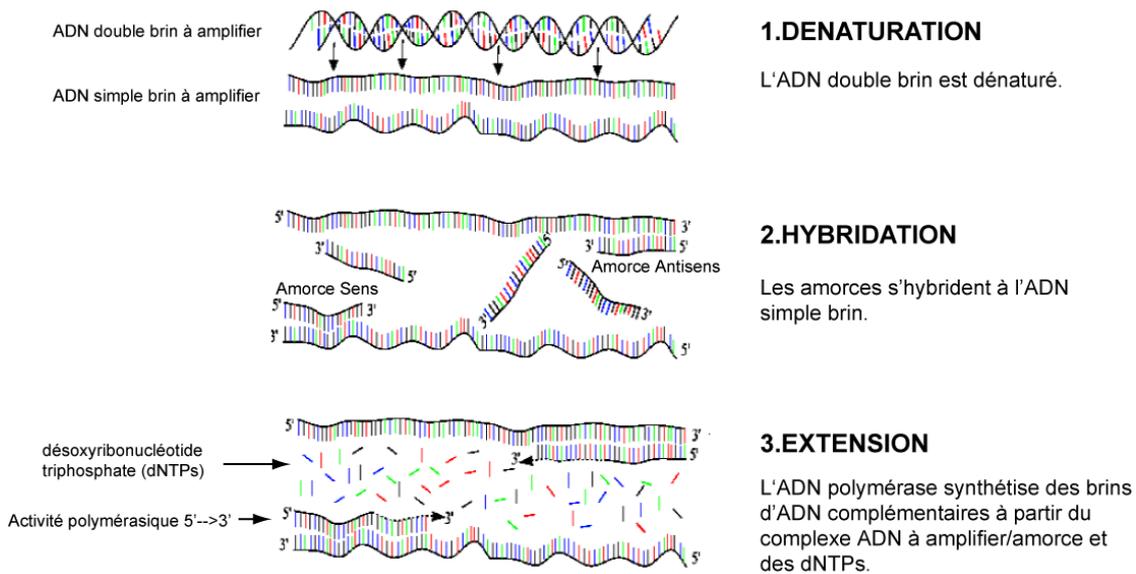
Polymérisation en Chaîne: n cycles de 3 étapes

Figure 26 : Principe de la polymérisation en chaîne (PCR) (modifié d'après Andy Vierstraete, 1999⁷).

D.2 Critères de choix des ADN polymérases thermostables

Afin d'optimiser le rendement et la qualité des amplicons, les protocoles de PCRs ont été ajustés en fonction de la taille des inserts, des températures de fusion des oligonucléotides et de la méthode de sous clonage. Pour cela le choix des ADN polymérases thermostables est déterminant. Il repose sur plusieurs critères (Tableau 10). Pour les PCRs emboîtées, nous avons privilégié des ADN polymérases thermostables de haute fidélité, c'est-à-dire génératrice de peu d'erreurs d'appariement des dNTPs au cours de la polymérisation de l'ADN. Dans ce cas les enzymes ont une activité correctrice exonucléasique 3'→5' dite « proofreading ». La spécificité et le rendement de certaines enzymes sont aussi optimisés par une activité dite « Hot Start ». La particularité de ces enzymes est d'être complexée à un anticorps qui inhibe toute amplification non spécifique des ADNc à température ambiante. L'étape de dénaturation initiale doit être dans ce cas suffisamment longue pour dénaturer l'anticorps et de ce fait activer l'enzyme. Pour l'amplification d'ADNc de taille importante nous avons sélectionné des ADN polymérases

⁷ <http://users.ugent.be/~avierstr/>

thermostables performantes capables d'amplifier de longs amplicons. Enfin, nous avons choisi des ADN polymérase douées d'une activité terminale transférase ajoutant des désoxyadénosines aux extrémités 3' des amplicons pour permettre leur sous clonage dans des vecteurs-T linéarisés qui possèdent une désoxythymidine complémentaire aux extrémités 5'.

Tableau 10 : Critères de choix des ADN polymérase thermostables.

| Nom commercial de l'ADN polymérase | EuroTaq | GoTaq® | Taq Platinum® | KOD HIFI | Accuprime™ | |
|------------------------------------|-----------------------------|--|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Fabricant | EuroClone®, Sizanio, Italie | Promega, Charbonnières-les-bains, France | Invitrogen, Carlsbad, USA | Novagen®, Darmstadt, Allemagne | Invitrogen, Carlsbad, USA | |
| Origine | <i>Thermus aquaticus</i> | <i>Thermus aquaticus</i> | <i>Thermus aquaticus</i> | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> | <i>Thermococcus aquaticus</i> | <i>Pyrococcus species</i> |
| Activité exonucléasique 3'→5' | Non | Non | Non | Oui | Non | Oui |
| Hot Start | Non | Non | Oui | Oui | Oui | Non |
| Activité terminale transférase | Oui | Oui | Oui | Non | Oui | Non |
| Capacité d'amplification ADNc | 6 kb | 3 kb | Non précisé | 12 kb | 20 kb | Non précisé |

D.3 Conditions standards d'amplification des ADNc ciblés

La majorité des PCRs présentées dans ce manuscrit ont été réalisées à partir d'un milieu réactionnel préparé selon un protocole standard. Le volume final du milieu réactionnel est de 20 µl et comprend 0,5 µl ou 1 µl d'ADNc en fonction du rendement de la RT. Le milieu réactionnel contient le tampon approprié de l'ADN polymérase thermostable choisie, 1,5 mM de MgCl₂ ou 1 mM de MgSO₄ selon les propriétés des ADN polymérase thermostables, 0,2 mM de chaque dNTPs et 1 U d'enzyme. Le volume final est ajusté avec de l'eau pure (Gibco™, Invitrogen™). Les amorces dégénérées sont ajoutées à une concentration finale de 10 µM alors que les amorces spécifiques sont ajoutées à une concentration finale de 0,3 µM.

Les thermocycleurs des fabricants Flexigen Techne (Cambridge, Royaume Uni) et Eppendorf (Le Pecq, France) ont été utilisés indifféremment alors que le thermocycleur à gradient du fabricant Bio-Rad (Marne-la-Coquette, France) a été employé pour mettre au point les conditions d'amplification. En effet, l'avantage des PCRs à gradient est de pouvoir amplifier simultanément des ADN avec 8 températures d'hybridation différentes.

E Amplification de la sous-unité principale α exprimée dans la chaîne nerveuse

Etant donné qu'aucune information relatives aux transcrits du canal sodium de la blatte *P. americana* n'est connue, la stratégie d'amplification des ADNc codant la sous-unité α a consisté à amplifier de manière séquentielle des régions chevauchantes à partir d'oligonucléotides dégénérés. A partir des informations de séquences ainsi obtenues nous avons conçu des oligonucléotides spécifiques permettant d'amplifier les régions 5' et 3' non codantes par la technique de RACE-PCR. Ces dernières informations de séquence nous ont permis de concevoir des oligonucléotides spécifiques permettant d'amplifier la totalité du cadre de lecture codant la sous-unité α (Figure 27).

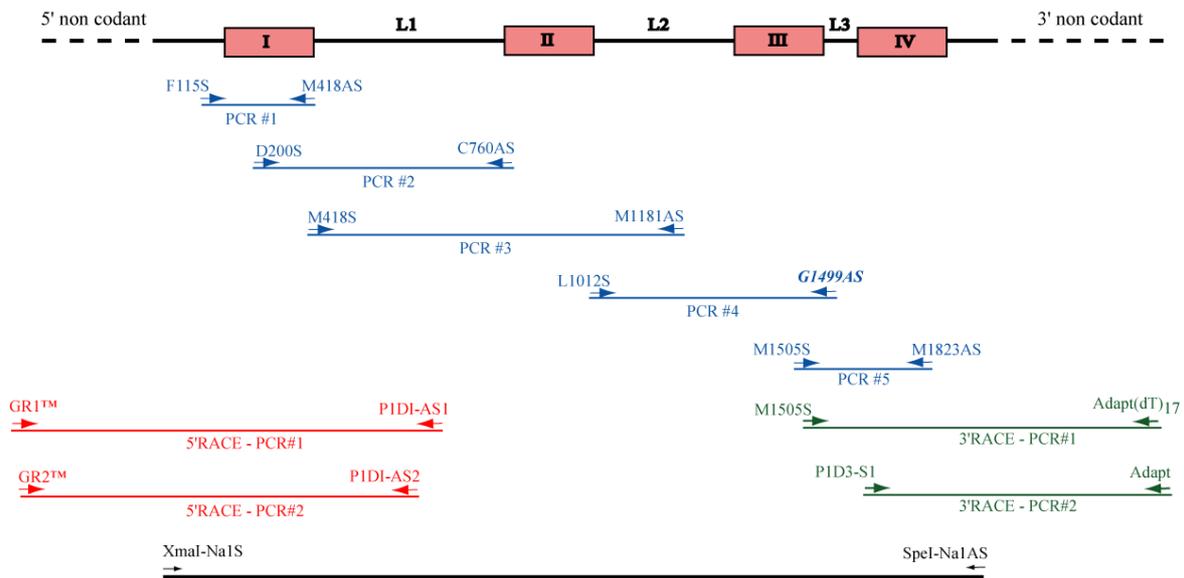


Figure 27: Stratégie d'amplification du cadre ouvert de lecture de la sous-unité α du Na_v de *P. americana* par RT-PCR.

En accord avec la topologie du canal sodium DmNa_v1 de drosophile, les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires de la sous-unité α de *P. americana* sont représentés par des rectangles et des traits horizontaux, respectivement. Les régions 5' et 3' non codantes sont représentées par des traits en pointillés. En bleu sont indiquées les PCR réalisées à partir d'oligonucléotides dégénérés. En rouge et vert figurent respectivement les amplifications des régions 5' et 3' non codantes par la technique de RACE-PCR. L'amplification du cadre de lecture codant la sous-unité α est mentionnée en noir. La taille des produits de PCR obtenus est indiquée en paire de base (pb).

E.1 Amplification de régions conservées à partir d'oligonucléotides dégénérés

E.1.1 Conception des oligonucléotides dégénérés pour amplifier la sous-unité principale α

Neuf oligonucléotides dégénérés sont conçus de manière à cibler des régions conservées de la sous-unité α des Na_v d'insectes (Tableau 11). Pour ce faire, les régions conservées ont été sélectionnées à partir de l'alignement multiple des séquences protéiques codant les canaux Na_v d'insecte et de mammifère. Puis, au sein de ces régions conservées, nous avons sélectionné un peptide (7 à 10 résidus) contenant le maximum de résidus d'acides aminés au code génétique peu dégénéré (M, W, F, Y, S, C, H, Q, N, K, D, E) afin de minimiser la dégénérescence. A partir de ces peptides, la séquence nucléique des oligonucléotides dégénérés est déterminée. A partir de ces oligonucléotides dégénérés nous avons pu amplifier cinq amplicons dont les séquences se chevauchent et couvrent la quasi-totalité du cadre ouvert de lecture de sous-unité α de *P. americana*.

Tableau 11 : Paires des oligonucléotides dégénérées conçues pour amplifier des régions conservées des canaux Na_v d'insectes.

| PCR | Nom des amorces | Séquence nucléique dégénérées | Région ciblée | Taille attendue d'après BgNav (pb) |
|---------|-----------------|---|-----------------------------|------------------------------------|
| PCR # 1 | F115S | 5'-YWSNGCNACNGAYGCNATGTGGATHYTNG-3' | N terminal – IS6 | 900 |
| | M418AS | 5'-CNGCYTTYTTYTGNARYTCRTCRTANSWC-3' | | |
| PCR # 2 | D200S | 5'-GAYGCNTGGAAYTGGYTNGAYTTYGTNG-3' | IS3 – boucle L1 | 1600-1700 |
| | C760AS | 5'-CCANARCCARCARTCCCANACRC-3' | | |
| PCR # 3 | M418S | 5'-GWSNTAYGAYGARYTNCARAARAARGCNG-3' | IS6 – boucle L2 | 2300 |
| | M1181AS | 5'-GCRTCYTTYTTYCYTCNCRTCC-3' | | |
| PCR # 4 | L1012S | 5'-YTNWSNGCNCCNACNGCNGAYAAYGARAC-3' | Boucle L2 – III boucle P | 1400 |
| | G1499AS | 5'-CATGATCTGAATCCATCCC-3' | | |
| PCR # 5 | M1505S | 5'-GTAYYTNTAYTTYGTNTTYTTYATHATHTTYGG-3' | IIIS6–IVS6* | 950 |
| | M1823AS | 5'-YTCNARDATNACNGCDATRTAC-3' | | |

Les bases dégénérées sont selon le code IUB suivant : H (A, C, T) ; N (A,C,G,T) ; R (A,G) ; S (G,C) ; Y (C,T) et W (A,T). La première lettre et le nombre mentionnés pour les noms des amorces font référence aux résidus d'acides aminés dans la séquence protéique de BgNav (AAC47483). L'oligonucléotide G1499AS est spécifique au canal sodium de *P.americana*. Ce dernier a pu être conçu à partir des informations de séquences obtenues à l'issue de la PCR #4. S : sens, AS : anti-sens, Th : température d'hybridation utilisée pour la PCR.

E.1.2 Conditions d'amplification des ADNc ciblés

Les cinq PCR amplifiant des régions chevauchantes de la sous-unité α du canal sodium ont été réalisées à partir de 0,5 μ l d'ADNc dans un volume final de 20 μ l en suivant le protocole standard. L'ADN polymérase thermostable employée est EuroTaq. Le programme de température est conçu selon la base suivante : 94°C 2 min, 35* [94°C 30s, 50°C-60°C 30s, 72°C 1min/kb], 72°C 5 min. Les oligonucléotides dégénérés correspondent à un pool de séquences nucléiques différentes. Leur température de fusion n'est donc pas une valeur unique. De ce fait, la température d'hybridation programmée est d'une manière générale comprise entre 50 et 60°C. Elle est optimisée à l'issue d'une PCR à gradient. La durée d'élongation est ajustée en fonction de la taille attendue des amplicons (Tableau 11) à raison d'une minute par kb.

E.2 Amplification des régions 5' et 3' non codantes

A partir des informations de séquences obtenues à l'issue de la PCR1 et de la PCR6, des oligonucléotides spécifiques antisens et sens ciblant la sous-unité α du canal sodium de *P. americana* ont été conçus pour amplifier les régions 5' et 3' non codantes respectivement. Etant donné que nous ne connaissons pas la séquence nucléique des extrémités des régions 5' et 3' non codantes, des séquences adaptatrices connues sont liguées aux acides nucléiques en 5' et en 3' pour permettre leur amplification. Pour ce faire, deux variantes de la technique de RACE-PCR ont été appliquées pour amplifier ces régions. Pour la région 5' non codante il s'agit de la technique RLM-RACE-PCR et pour la région 3' non codante il s'agit de la technique RACE-PCR classique. Ces régions ont été amplifiées à partir d'ADNc obtenus après transcription inverse des ARN messagers purifiés de la chaîne nerveuse. Le succès de l'amplification des régions 5' et 3' non codantes dépend beaucoup de la qualité des ARN. Il est donc conseillé de réaliser la technique de RACE-PCR dans la continuité de la purification des ARN.

E.2.1 Amplification de la région 5'UTR par la méthode de la RLM-RACE PCR

(a) Présentation générale de la méthode RLM-RACE PCR

La technique de la RLM-RACE-PCR développée dans le kit GeneRacer™ (Invitrogen™) que nous avons utilisé est une variante de la RACE-PCR (Figure 28). L'intérêt de cette méthode est de favoriser le clonage d'ARNm pourvus d'une coiffe en 5' grâce à la ligation d'une séquence d'ARN adaptatrice avant la transcription inverse. Brièvement, le principe consiste à liguier avec une T4 ARN ligase une séquence d'ARN adaptatrice uniquement aux ARNm intacts. Pour cela les ARNs messagers dégradés sont déphosphorylés par la phosphatase CIP (Figure 28, étape 1) et la coiffe des ARNm est hydrolysée par la pyrophosphatase TAP (Figure 28, étape 2). La transcription inverse est réalisée de la même façon que celle décrite dans la partie D de ce chapitre. Les ADNc ainsi produits contiennent alors la séquence de l'adaptateur en 5' (Figure 28, étape 5a). Des oligonucléotides spécifiques de cette séquence adaptatrice et du transcrit d'intérêt sont alors utilisés pour amplifier la région 5' non codante à l'issue de PCRs emboîtées.

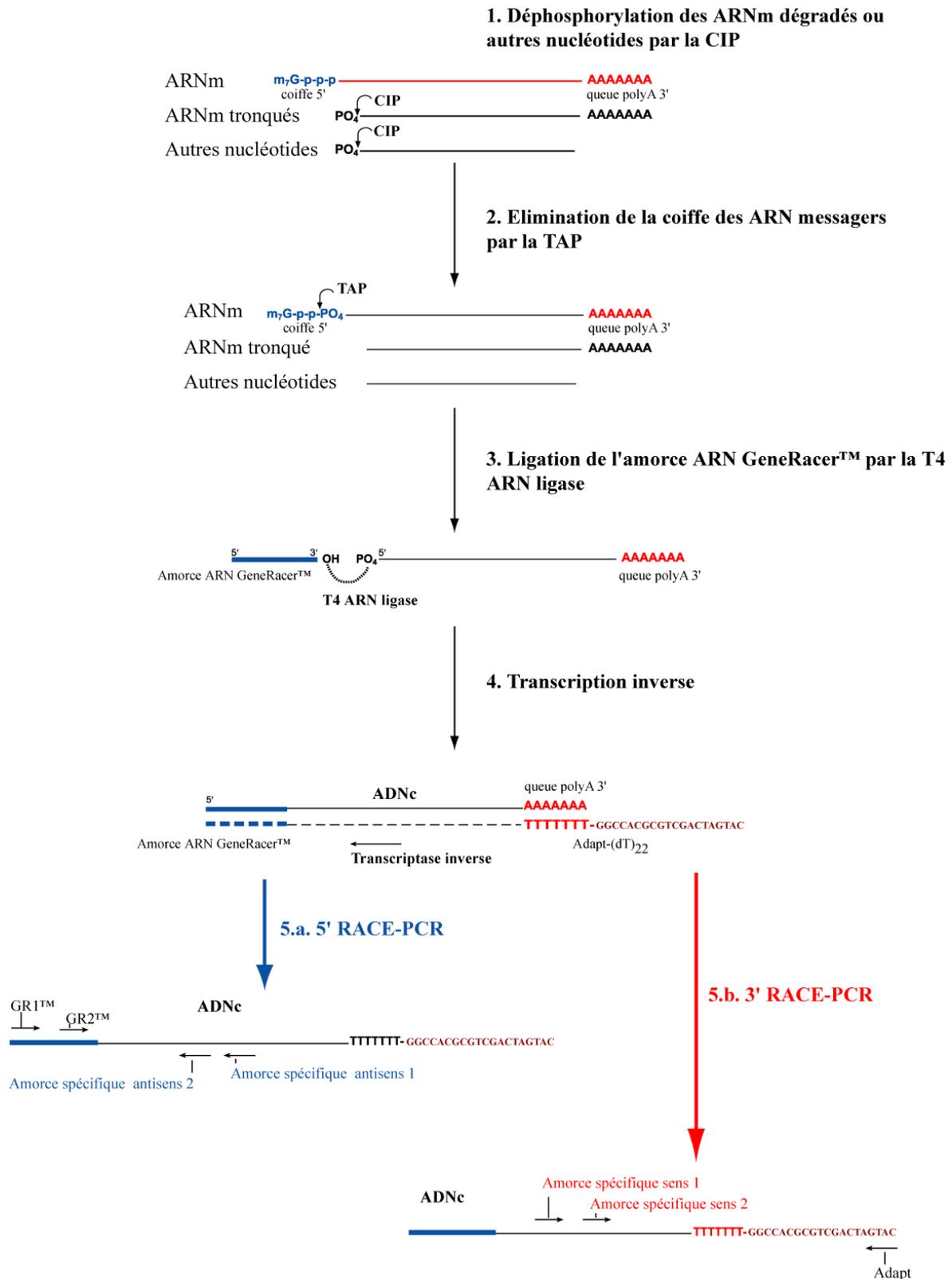


Figure 28: Principe des deux variantes de RACE-PCR utilisées pour amplifier les régions 5' non codante et 3' non codante des sous-unités α et β du Na_v de *P. americana*.

Pour l'amplification de la région 5' non codante, la RLM-RACE PCR consiste à la ligation d'une amorce ARN GeneRacer™ aux ARNm avant la transcription inverse. Pour l'amplification de la région 3' non codante, la RACE-PCR consiste à utiliser un oligonucléotide Adapt (dT)₂₂ comme amorce au cours de la transcription inverse.

(b) Conditions d'amplification de la région 5' non codante de la sous-unité α

Après avoir purifié les ARN totaux et préparé les ADNc selon les instructions du kit GeneRacer™ (Invitrogen™) nous avons réalisé deux PCRs pour amplifier la région 5' non codante de la sous-unité α . La première PCR est réalisée dans un volume final de 50 μ l à partir de 1 μ l d'ADNc en utilisant l'ADN polymérase thermostable KOD HIFI (Tableau 12) selon le protocole standard. L'amorce GR1™ est ajoutée à une concentration finale de 0.9 μ M tandis que l'amorce spécifique P1D1-AS1 est maintenue à une concentration finale de 0,3 μ M. Le programme de PCR est le suivant : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 64°C 30s, 72°C 2 min], 72°C 8 min. La seconde PCR est réalisée avec 1 μ l de la première PCR et l'ADN polymérase thermostable EuroTaq (Tableau 12) dans un volume final de 100 μ l selon les instructions standards. Le programme de température est le suivant : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 65°C 30s, 72°C 90 s], 72°C 8 min.

Tableau 12: Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1 et GR2) et le domaine I de la sous-unité principale α du canal sodium de la blatte *P. americana*.

| Région | Transcrit d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | Tm (°C) |
|---------------|-----------------------|-----------------|---|---------|
| 5' non codant | Adaptateur GeneRacer™ | GR1™ | 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' | 74 |
| | | GR2™ | 5'-GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' | 78 |
| | Sous-unité α | P1DI-AS1 | 5'-GCAAACACGGAGAGTGAGAACATG-3' | 72 |
| | | P1DI-AS2 | 5'-CTTAACGGCCGACTCAAATGTG-3' | 66 |

Tm correspond à la température de fusion des amorces déterminée selon la formule 4GC+2AT.

E.2.2 Amplification de la région 3' non codante par la méthode de RACE-PCR

(a) Présentation générale de la méthode RACE-PCR pour amplifier les régions 3' non codante

La région 3' non codante de la sous-unité α a été amplifiée par une technique classique de RACE-PCR. A partir des ADNc obtenus par transcription inverse comme décrit précédemment (Matériels et Méthodes/chapitre 2/ Parties B et C) deux PCR emboîtées ont été effectuées (Figure 28 Etape 5b). Les oligonucléotides utilisés pour amplifier les régions 3' non codantes sont référencés dans le Tableau 13. Au cours de la première PCR, le polyT de l'oligonucléotide Adapt (dT)₂₀ cible la queue poly A des ADNc double brin. Puis au cours de

la seconde PCR, l'oligonucléotide Adapt s'hybride de manière complémentaire à la séquence adaptatrice de l'oligonucléotide Adapt (dT)₂₀.

(b) Conditions d'amplification de la région 3' non codante de la sous-unité α

La première PCR a consisté à préamplifier la région 3' non codante en utilisant l'oligonucléotide dégénéré M1505S et l'oligonucléotide Adapt(dT)₂₀. La PCR a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase Platinum® (Tableau 13) à partir de 1 μ l de matrice dans un volume finale de 20 μ l préparé selon les conditions standards. L'oligonucléotide M1505S est utilisé à une concentration finale de 20 μ M tandis que l'oligonucléotide Adapt (dT)₂₀ est ajusté à une concentration finale de 0,3 μ M. Le programme de température est le suivant: 94°C 5 min, 35*[94°C 30s, 50 °C 30s, 72°C 2 min], 7 2°C 4 min. La seconde PCR a été réalisée à partir de 1 μ l de la première PCR dans les conditions décrites ci-dessus excepté que chaque amorce PIDI-2S et Adpat est ajustée à une concentration finale de 0,3 μ M. Pour le programme d'amplification seule la température d'hybridation diffère par rapport à la PCR initiale avec une température d'hybridation de 55°C .

Tableau 13 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue poly A et le domaine III de la sous-unité principale α du canal sodium de la blatte *P. americana*.

| Région | Transcrit d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | Tm (°C) |
|---------------|------------------------------|--------------------------|--|---------|
| 3' non codant | Adaptateur de la queue polyA | Adapt (dT) ₂₀ | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₂₀ -3' | 50 |
| | | Adapt | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' | 66 |
| | Sous-unité α | M1505S | 5'-GTAYYTNTAYTTYGTNTTTYATHATHHTTYGG-3' | 50 |
| | | P1D3-AS1 | 5'-CGCAAGCCTGATAATGAGCTGG-3' | 65 |

L'oligonucléotide Adapt (dT)₂₀ a été conçu de manière à être à la fois complémentaire de la queue polyA de l'ADNc double brin en première PCR et de l'oligonucléotide Adapt en seconde PCR. Tm correspond à la température de fusion des amorces déterminée selon la formule 4GC+2AT.

E.3 Amplification de l'ADNc codant la totalité la sous-unité α

Les informations de séquences obtenues à partir de l'amplification de la région 5' non codante de la sous-unité α nous ont permis de concevoir un oligonucléotide spécifique ciblant l'ADNc codant le début du signal peptide. Cet oligonucléotide *Xma*I-Na1S [5'-AAA**CCCGG**GCCAACCATGTCCGACGATTCGTCTCCATATC-3'] comprend aussi, en amont du codon d'initiation de la traduction, (i) le site de restriction de *Xma*I figuré en italique et (ii) la séquence consensus de Kozak soulignée dans la séquence de l'oligonucléotide. Pour l'extrémité 3', nous avons conçu un oligonucléotide à partir de la séquence nucléique du canal sodium de la blatte *B. germanica*. En effet, l'oligonucléotide spécifique conçu à partir de la séquence de la région 3' non codante ne nous permettait pas d'amplifier le cadre de lecture complet de la sous-unité α de *P. americana*. Cette stratégie a été rendu possible par le fait que le C terminal est relativement bien conservé entre les Na_v d'insectes. Cet oligonucléotide *Spe*I-Na1AS [5'-TTTT**ACTAG**TCAGACGTCCGGTGGATCGCGAAGTC-3'] comprend le site de restriction *Spe*I indiqué en italique dans la séquence. Les sites de restriction insérés dans ces deux oligonucléotides permettent le sous clonage des produits de PCR dans le vecteur d'expression pGEM Hejuel.

Pour amplifier l'ADNc codant la sous-unité α du canal Na_v (6 kb) nous avons choisi d'employer l'ADN polymérase thermostable Accuprime™ (Tableau 10). Le mélange réactionnel contient 0,5 μ l d'ADNc dans un volume final réactionnel standard. Le programme d'amplification est : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 62° C 30s, 68°C 6 min], 68°C 20 min.

F Amplification d'une nouvelle sous-unité α apparentée aux canaux Na_v : PaFPC

L'amplification de régions chevauchantes de la sous-unité α du canal Na_v de *P. americana* à partir d'oligonucléotides dégénérés nous a permis de mettre en évidence un nouveau gène codant une sous-unité α putative de canaux Na_v . Nous avons nommé cette nouvelle sous-unité α PaFPC. L'amplification du cadre de lecture codant cette sous-unité PaFPC a été effectuée par une approche similaire à l'amplification du cadre de lecture codant la sous-unité PaNa_v1 (Figure 29).

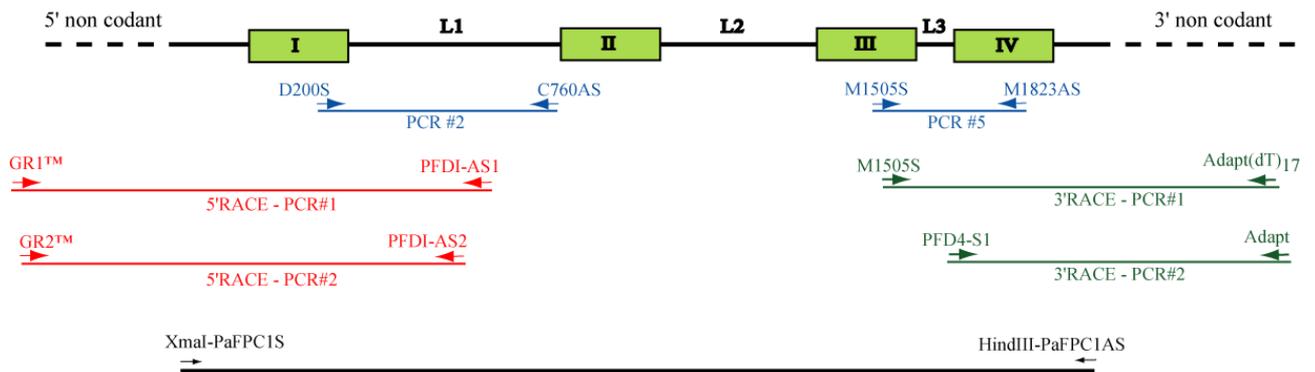


Figure 29 : Stratégie d'amplification du cadre de lecture de la sous-unité PaFPC de *P. americana* par RT-PCR.

Les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires de la sous-unité PaFPC sont représentés par des rectangles et des traits horizontaux, respectivement. Les régions 5' et 3' non codantes sont représentées par des traits en pointillés. En bleu sont indiquées les PCR réalisées à partir d'oligonucléotides dégénérés. En rouge et vert figurent respectivement les amplifications des régions 5' et 3' non codantes par la technique de RACE-PCR. L'amplification du cadre de lecture codant la sous-unité PaFPC est mentionnée en noir. La taille des produits de PCR obtenus est indiquée en paire de base (pb).

F.1 Amplification des régions 5' et 3' non codantes

L'amplification des régions 5' et 3' non codantes de PaFPC ont été effectuées par les techniques de RACE-PCR décrites précédemment (Matériels et Méthodes/Chapitre 2/ E.2.1.a). Les oligonucléotides spécifiques ont été conçus à partir des informations de séquences obtenues à l'issue du clonage des produits des PCR#1 et des PCR#6 (Tableau 14).

F.1.1 Conditions d'amplification de la région 5' non codante de PaFPC

La région 5' non codante de PaFPC a été amplifiée en employant la même technique de RLM-RACE-PCR développée dans le kit GeneRacer™ (Invitrogen™). Les oligonucléotides spécifiques conçus pour amplifier la région 5' non codante de PaFPC sont référencés dans le Tableau 14. Les conditions d'amplification sont identiques à celles mises au point pour amplifier la région 5'UTR de la sous-unité PaNa_v1 (E 2.1.b).

Tableau 14 : Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1™ et GR2™) et le domaine I de la sous-unité α de PaFPC.

| Région | Région d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | T _m (°C) |
|---------------|-----------------------|-----------------|---|---------------------|
| 5' non codant | Adaptateur GeneRacer™ | GR1™ | 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' | 74 |
| | | GR2™ | 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' | 78 |
| | Sous-unité PaFPC | PFD1-AS1 | 5'-CCGCACAAGGGATACTCTATCCAG-3' | 74 |
| | | PFD1-AS2 | 5'-CAGTCATCAGGAATGTACCAATGCG-3' | 74 |

T_m correspond à la température de fusion des amorces déterminée selon la formule 4GC+2AT.

F.1.2 Conditions d'amplification de la région 3' non codante de PaFPC

La région 3' non codante de PaFPC a été amplifiée à partir de la technique classique de RACE-PCR au cours de laquelle nous avons eu recours à des oligonucléotides spécifiques (Tableau 15). Les conditions réactionnelles et les oligonucléotides de la première PCR sont identiques à ceux de la première PCR amplifiant la région 3' non codante de PaNa_v1 (§ F.2.2.b). La seconde PCR a été réalisée à partir de 1 µl de la première PCR selon le protocole standard de l'ADN polymérase thermostable Taq Platinum®. Le programme de température est le suivant: 94°C 5 min, 30*[94°C 30 s, 55 °C 30s, 72°C 2 min], 72°C 4 min. Les amorces PID2-2S et Adpat sont ajustées à une concentration finale de 0,3 µM chacune.

Tableau 15 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue poly A et le domaine IV de la sous-unité α PaFPC.

| Région | Région d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | Tm (°C) |
|---------------|------------------------------|--------------------------|--|---------|
| 3' non codant | Adaptateur de la queue polyA | Adapt (dT) ₂₂ | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₂₂ -3' | |
| | | Adapt | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' | 66 |
| | Sous-unité PaFPC | M1505S | 5'-GTAYYTNTAYTTYGTNTTTYTTYATHATHHTTYGG-3' | |
| | | PFD4-AS1 | 5'-GCGTCAACCGGAAGTTCGGATACAC-3' | 56 |

L'oligonucléotide Adapt (dT)₂₀ a été conçu de manière à être à la fois complémentaire de la queue polyA de l'ADNc double brin en première PCR et de l'oligonucléotide Adapt en seconde PCR. Tm correspond à la température de fusion des amorces déterminée selon la formule 4GC+2AT.

F.2 Amplification de la totalité du cadre de lecture codant PaFPC

A partir des informations de séquences obtenues à la suite du clonage des ADNc codant les régions 5' et 3' non codantes de PaFPC, nous avons conçus des amorces spécifiques ciblant le codon d'initiation de la traduction et le codon stop respectivement. Les oligonucléotides conçus XmaI-PaFPC1S et Hind III-PaFPC1AS contiennent respectivement les sites de restriction *XmaI* et *Hind III* permettant le clonage directionnel des produits de PCR dans le vecteur d'expression pGEM Hejuel. Il s'agit de l'oligonucléotide XmaI-PaFPC1S [5'-AAAC**CCCGGG**CCAACCATGGCTGACAATTCACCGCTAATAAG-3'] contenant la séquence soulignée de Kozak et de l'oligonucléotide HindIII-PaFPC1AS [5'-TTT**AAGCTT**GGAAACCTGTTTGGACTGAAAGCTC-3'].

Pour amplifier l'ADNc codant la sous-unité α PaFPC (4,6 kb) nous avons choisi d'employer l'ADN polymérase thermostable Accuprime™ (Tableau 10). Le mélange réactionnel contient 1 μ l d'ADNc dans un volume final de 40 μ l dont la composition est standard. Le programme d'amplification est : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 62°C 30s, 68°C 4 min 40], 68°C 15 min.

G Amplification de la sous-unité auxiliaire β exprimée dans la chaîne nerveuse : PaTEH1

Pour l'amplification du transcrit codant la sous unité auxiliaire PaTEH1 exprimée dans la chaîne nerveuse, nous avons appliqué une méthode comparable à l'amplification du transcrit codant la sous unité principale α (Figure 30). Dans un premier temps, nous avons amplifié une région conservée des sous unités homologues à TEH1 avec des oligonucléotides dégénérés. Les informations de séquences obtenues à l'issue du sous clonage de ces produits de PCR, nous ont permis de concevoir des oligonucléotides spécifiques nous permettant d'amplifier les régions 5' et 3' non codantes selon des méthodes de RACE-PCR. Enfin, nous avons pu cloner le transcrit complet codant la sous-unité PaTEH1.

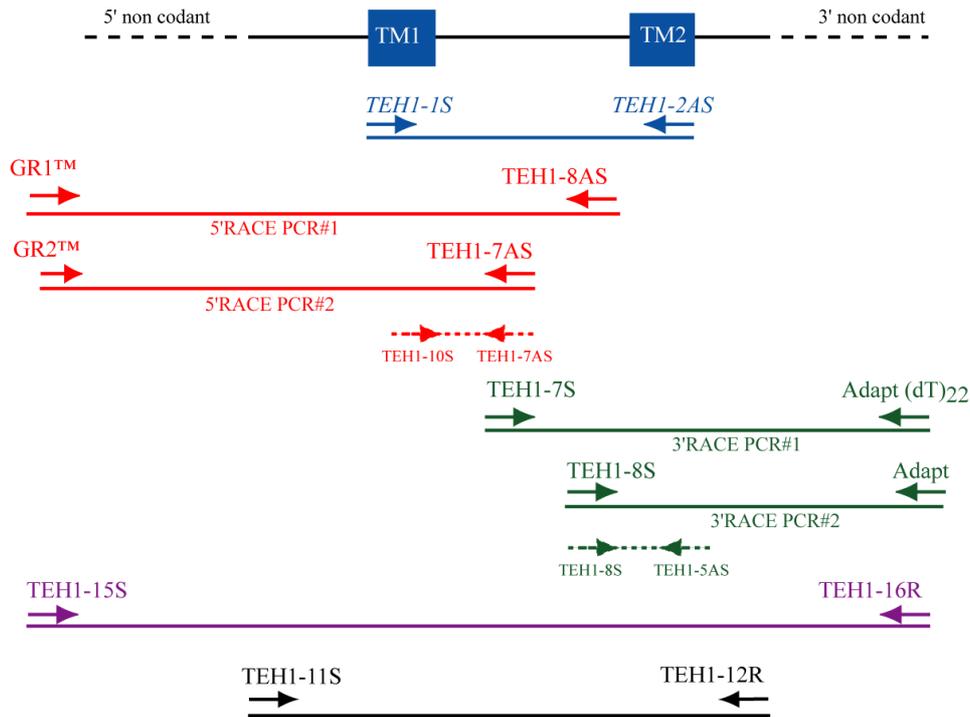


Figure 30: Stratégie d'amplification de la sous-unité auxiliaire PaTEH1.

Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont représentés par des rectangles, les boucles par des traits pleins et les régions 5' et 3' non codantes par des traits en pointillés. L'amplification réalisée à partir des oligonucléotides dégénérés est indiquée en bleu. En rouge et vert sont mentionnées respectivement les amplifications des régions 5' et 3' non codantes. Les PCRs internes réalisées pour contrôler la spécificité des amplicons codant les régions 5' et 3' non codantes sont mentionnés en traits pointillés. La PCR amplifiant le transcrit complet de la sous-unité PaTEH1 est figurée en violet. L'amplification de la totalité du cadre de lecture de la sous-unité PaTEH1 est figurée en noir.

G.1 Amplification d'une région conservée à partir d'oligonucléotides dégénérés

G.1.1 Conception des oligonucléotides dégénérés pour amplifier la sous-unité auxiliaire PaTEH1

Après plusieurs tentatives infructueuses du clonage de la sous-unité PaTEH1, nous avons décidé d'améliorer la méthode de conception des oligonucléotides dégénérés mise au point précédemment (E.1.1) dans le but de diminuer leur dégénérescence. A partir d'un alignement multiple de séquences protéiques codant des sous-unités auxiliaires homologues à TEH1, nous avons sélectionné un peptide (7 à 10 résidus) contenant le

maximum de résidus d'acides aminés au code génétique peu dégénéré (M, W, F, Y, S, C, H, Q, N, K, D, E). Ensuite, nous avons diminué la dégénérescence des oligonucléotides en déterminant les acides nucléiques à partir de l'alignement multiple des séquences nucléiques codant les résidus d'acide aminés sélectionnés (Figure 31).

| Espèces | Alignements protéiques | Alignements nucléiques | Oligonucléotides dégénérés | Régions ciblées |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Anopheles gambiae</i> | VPLYVDP | gtgccgctgtacgtcgatccg | TEH1.1S GTGCCGCTSTACGTS GAYCCS | Domaine transmembranire TM1 |
| <i>Apis mellifera</i> | VPLYVDP | gtgccactttacgtcgatccg | | |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | VPLYVDP | gtaccgctctatgtggaaccg | | |
| <i>Nasonia vitripennis</i> | VPLYVDP | gtgccgctctacgtcgaccg | | |
| <i>Tribolium castaneum</i> | VPLYVDP | gtgccgctgtacgtcgacccc | | |
| <i>Anopheles gambiae</i> | MHCDCRC | atgcactgtgattgtagggtg | TEH1.2AS ATGCACTGYGACTGCMGSTG | Domaine transmembranire TM2 |
| <i>Apis mellifera</i> | MHCDCRC | atgcactgtgactgcagggtg | | |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | MHCDCRC | atgcactgcgactgccgctg | | |
| <i>Nasonia vitripennis</i> | MHCDCRC | atgcactgcgactgcagggtg | | |
| <i>Tribolium castaneum</i> | MHCDCRC | atgcattgcgactgccggtg | | |

Figure 31 : Alignements protéiques et nucléiques de séquences codant les domaines transmembranaires TM1 et TM2 des sous-unités auxiliaires orthologues à DmTEH1 chez cinq espèces d'insectes.

Seules les régions sélectionnées pour concevoir des oligonucléotides dégénérés sont exposées. Les nucléobases conservées entre les 5 espèces sont mentionnées en noir. Les bases nucléiques divergentes sont indiquées en vert et rouge. Seules les bases nucléiques en rouge ont été dégénérées pour concevoir les oligonucléotides TEH1.1S et TEH1.2AS. Les bases dégénérées sont d'après le code IUB suivant : S (G, C) ; Y (T, C) et M (A, C). *Anopheles gambiae* (XM_310354), *Apis mellifera* (XM_001120804), *Drosophila melanogaster* (DQ139957), *Nasonia vitripennis* (XM_001606785), *Tribolium castaneum* (XM_964728).

G.1.2 Conditions de PCR pour amplifier la sous-unité PaTEH1 à partir d'oligonucléotides dégénérés

Les conditions de PCR ayant permis d'amplifier des ADNc codant la sous-unité PaTEH1 ont été réalisées à partir du protocole standard en employant l'ADN polymérase thermostable EuroTaq. Le programme de température est le suivant: 94°C 2 min, 35* [94°C 20s, 60°C 30s, 72°C 30s], 72°C 5 min.

G.2 Amplification des régions 5' et 3' non codantes

De la même façon que pour la sous-unité α , nous avons conçus des oligonucléotides spécifiques ciblant la sous-unité PaTEH1 à partir des informations de séquence obtenues lors du sous clonage des produits de PCR décrits ci-dessus (G.1). Les oligonucléotides ont été conçus de manière à ce que les produits des PCR1 et PCR2 diffèrent d'une centaine de paire de base pour être comparables après électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 30). Des oligonucléotides supplémentaires ont été conçus de manière à pouvoir réaliser des PCRs internes à partir des produits de PCRs emboîtées pour s'assurer de la spécificité des amplicons (Figure 30). Les régions 5' et 3' non codantes de la sous-unité PaTEH1 ont été amplifiées à partir d'ARN purifiés de la chaîne nerveuse par les mêmes méthodes de RACE-PCR décrites précédemment (E.2.1.a).

G.2.1 Amplification de la région 5'UTR par RLM-RACE-PCR

La région 5'UTR de la sous-unité PaTEH1 a été amplifiée en utilisant le kit GeneRacer™ (Invitrogen™) selon les instructions du fabricant (Figure 28) et les oligonucléotides spécifiques ciblant le domaine transmembranaire TM1 (Tableau 16). La première PCR est réalisée dans un milieu réactionnel de 50 μ l à partir de 1 μ l d'ADNc en utilisant l'ADN polymérase EuroTaq dans les conditions standards. L'amorce GR1™ est utilisée à une concentration finale de 0,9 μ M alors que l'amorce TEH1-8AS est ajoutée à une concentration finale de 0,3 μ M. Le programme de PCR est le suivant : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 62°C 30s, 72°C 90s], 72°C 5 min. La seconde PCR emboîtée a été effectuée avec comme matrice 1 μ l de la PCR 1 en appliquant le même protocole excepté que les amorces GR2™ et TEH1-7AS sont utilisées à une concentration finale de 0,3 μ M chacune. Une PCR interne avec comme matrice la PCR2 permet de contrôler la spécificité des amplicons de la PCR2 avant leur sous clonage.

Tableau 16: Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1™ et GR2™) et le domaine transmembranaire TM1 de la sous-unité auxiliaire PaTEH1 du canal sodium de la blatte *P. americana*.

| Région | Région d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | Tm (°C) |
|---------------|-----------------------|-----------------|---|---------|
| 5' non codant | Adaptateur GeneRacer™ | GR1™ | 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' | 74 |
| | | GR2™ | 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' | 78 |
| | Sous-unité PaTEH1 | TEH1 -7AS | 5'-CGATGGGGATGTTGATGTTGAC-3' | 66 |
| | | TEH1-8AS | 5'-CGTACATGGTGGTGAAGTTGTC-3' | 66 |
| | | TEH1-10S | 5'-GCCAGTGAAATGTGTGACCACTC-3' | 66 |

Tm correspond à la température de fusion des oligonucléotides déterminée selon la formule $T_m = 4GC + 2AT$. L'oligonucléotide TEH1-7AS a été utilisé en PCR1, l'oligonucléotide TEH1-8AS a été utilisé en PCR2 et les oligonucléotides TEH1-10S et TEH1-7AS ont permis de réaliser une PCR interne de contrôle avec comme matrice la PCR2.

G.2.2 Amplification de la région 3' UTR par RACE-PCR

La région 3' UTR de la sous-unité PaTEH1 a été amplifiée par une technique classique de RACE-PCR (Figure 30). Les oligonucléotides utilisés pour amplifier les régions 3' UTR sont référencés dans le Tableau 17. La première PCR a été réalisée à partir d'un milieu réactionnel standard d'amplification des régions 3' non codante avec l'ADN polymérase thermostable EuroTaq. Le programme de la PCR a été conçu de manière à favoriser l'hybridation de l'oligonucléotide Adapt (dT)₂₂ à faible température dans un premier temps tout en favorisant l'hybridation spécifique de l'amorce TEH1-7S à plus haute température dans un second temps. Pour cela 3 cycles de PCR avec des températures d'hybridation croissantes ont été programmés successivement de la façon suivante : 94°C 4 min, 5*[94°C 20s, 50°C 30s, 72°C 90s], 5*[94°C 20s, 55°C 30s, 72°C 90s], 20*[94°C 20s, 50°C 30s, 72°C 60s], 72°C 5 min. La seconde PCR a été effectuée avec comme matrice 1 µl de produit de la PCR1 et un protocole standard d'utilisation de l'ADN polymérase EuroTaq. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 60°C 30s, 72°C 90s], 72°C 5 min. Une PCR interne avec comme matrice la PCR2 permet de contrôler la spécificité des amplicons de la PCR2 avant leur sous clonage.

Tableau 17 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue polyA des ADNc double brin et le domaine transmembranaire TM1 de la sous-unité auxiliaire PaTEH1 du canal sodium de la blatte *P. americana*.

| Région NC | Région d'intérêt | Nom des amorces | Séquence nucléique des oligonucléotides | T _m (°C) |
|---------------|------------------------------|--------------------------|--|---------------------|
| 3' non codant | Adaptateur de la queue polyA | Adapt (dT) ₂₂ | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₂₂ -3' | |
| | | Adapt | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' | 66 |
| | Sous-unité PaTEH1 | TEH1-7S | 5'-GTCAACATCAACATCCCCATCG-3' | 66 |
| | | TEH1-8S | 5'-GACAACCTTCACCACCATGTACG-3' | 66 |
| | | TEH1-5AS | 5'-CGAAGTAATGGATGATGATGGCG-3' | 66 |

T_m correspond à la température de fusion des oligonucléotides déterminée selon la formule $T_m = 4GC + 2AT$. L'oligonucléotide TEH1-7S a été utilisé en PCR1, l'oligonucléotide TEH1-8S a été utilisé en PCR2 et les oligonucléotides TEH1-8S et TEH1-5AS ont permis de réaliser une PCR interne de contrôle avec comme matrice la PCR2.

G.3 Amplification des ADNc codant la totalité de la sous-unité β

Les informations de séquence obtenues à partir de l'amplification des régions 5' et 3' non codantes de la sous-unité PaTEH1 nous ont permis de concevoir deux paires d'oligonucléotides spécifiques (Figure 30). La première paire d'oligonucléotide permet d'amplifier le transcrite complet de la sous-unité PaTEH1. Il s'agit des oligonucléotides TEH1-15S [5'-AAAAGTTGTCAGCTGTTCCGGCG-3'] et TEH1-16R [5'(T)₂₃CAAATATAGGCCATGTATTTCTACC-3'] ciblant les régions 5' et 3' non codantes respectivement. La seconde paire d'oligonucléotides permet d'amplifier le cadre de lecture des transcrits codant de la sous-unité TEH1. Ainsi l'oligonucléotide TEH1-11S [5'-CAGAT**CCCGGG**ATGAGGAGCAGCAGCTCGGAG-3'] cible l'extrémité 5' du peptide signal et l'oligonucléotide TEH1-12AS [CTGATT**CTAG**ACCGAATCATGTTCTATCTTCT] cible l'extrémité 3' du codon stop. Les oligonucléotides TEH1-11S et TEH1-12AS comprennent respectivement les sites de restriction *Xma*I et *Xba*I figurés en caractère gras dans les séquences nucléiques. Les sites de restriction insérés permettent ainsi le sous clonage des produits de PCR dans le vecteur d'expression pGEM Hejuel. Les transcrits codant la sous-unité PaTEH1 ont été amplifiés en utilisant l'ADN polymérase thermostable Accuprime™ à partir d'un mélange réactionnel standard de 20 μ l final. Le programme d'amplification a été adapté de la façon suivante pour les 2 PCR: 94°C 4 min, 35*[94°C 20s, 62°C 30s, 68°C 2 min], 68°C 5 min.

H Clonage des produits de PCR

Jusqu'à ce niveau du chapitre matériels et méthodes, seules les méthodes et conditions d'amplification de divers inserts codant les sous-unités α et β ont été décrites. Après leur amplification, tous les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose pour les séparer en fonction de leur taille et déterminer leur poids moléculaire. Si les produits de PCR présentent la taille attendue alors ils sont purifiés. Les produits de PCR correspondent à un mélange de plusieurs amplicons de poids moléculaire voisin. L'origine de ces amplicons peut être de différentes natures. Il peut s'agir d'une famille multigénique, de transcrits distincts ou de produits non spécifiques. Le sous clonage s'avère alors nécessaire pour isoler et déterminer la séquence nucléique de chacun des ADNc amplifiés.

H.1 Analyse des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Pour déterminer le poids moléculaire des amplicons nous réalisons une séparation des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose (Electrophoresis grade, Invitrogen™) dilué dans tampon (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA, pH 8.3). L'électrophorèse est une technique de séparation de l'ADN double brin en fonction de son poids moléculaire. La distance de migration est proportionnelle au logarithme décimal du poids moléculaire des fragments d'ADN. L'ADN migre sur un support constitué d'un gel en agarose constituant une maille plus ou moins serrée selon sa concentration. La concentration d'agarose est déterminée selon la taille des fragments à séparer. La migration est réalisée dans un champ électrique dont la tension est réglée de 50 à 100 mV. L'ADN étant chargé négativement, il migre vers l'anode. Le bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g/ml}$) ajouté lors de la préparation du gel s'intercale entre les bases de l'ADN et permet de visualiser l'ADN en devenant fluorescent sous ultra violet. Lorsque les amplicons possèdent le poids moléculaire attendu, les bandes de gel correspondantes sont prélevées puis purifiées à l'aide des kits NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) ou QIAEX II® (Qiagen, Courtaboeuf, France).

H.2 Méthodes de clonage

H.2.1 Présentation générale des méthodes de clonage utilisées

Le clonage est une technique qui permet l'insertion d'une molécule d'ADN « étrangère » dans un vecteur. Le clonage comprend deux étapes principales : (1) l'insertion des produits de PCR dans un vecteur et (2) la multiplication des vecteurs recombinants par un hôte. Dans le cas de nos expériences nous avons utilisé deux types de plasmide comme vecteur et eu recours à la transfection bactérienne de deux souches d'*Escherichia coli* (Figure 32). Les plasmides et les souches de bactéries *E.coli* utilisés ont été choisis en fonction de la taille des inserts et de l'objectif du clonage (Tableau 18). Pour caractériser la séquence nucléique des inserts, nous avons utilisé des plasmides linéarisés dits « vecteur-T » qui permettent de cloner directement des produits de PCR amplifiés avec des ADN polymérases thermostables douées d'une activité terminale transférase (Figure 32A). Pour préparer des ARNc à partir des transcrits clonés nous avons utilisé le plasmide d'expression pGEM Hejuel (Figure 32B). Deux souches de bactéries chimiocompétentes *E. coli* ont permis de multiplier les plasmides recombinants. La souche DH5 α TM-T1^R (InvitrogenTM) a été la plus employée en routine alors que la souche MAX Efficiency[®] Stbl2TM (InvitrogenTM) a été préférée pour cloner des transcrits instables tels que ceux codant la sous unité α du canal Na_v.

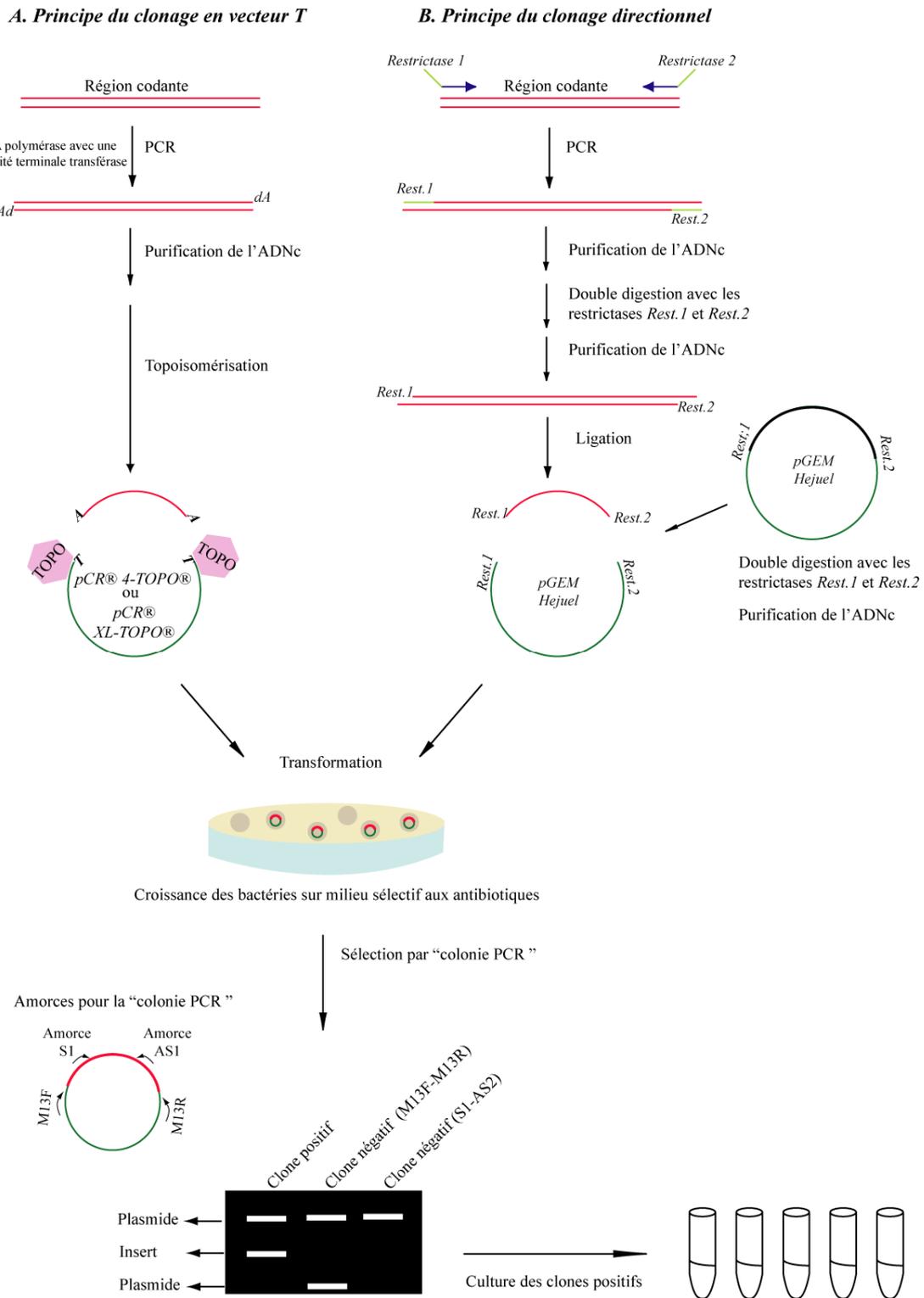


Figure 32: Principes des méthodes de clonage.

A. Le principe du clonage en vecteur T a été appliqué avec les plasmides pCR® 4-TOPO®, pCR® XL-TOPO®. Dans ce cas l'insertion des produits de PCR dans le plasmide est réalisée par topoisomérisation.

B. Le principe du clonage directionnel a été appliqué avec le plasmide d'expression pGEM Hejuel. Dans ce cas les produits de PCR doublement digérés par des restrictases sont insérés dans le plasmide au niveau de sites compatibles et ligés ensemble par la T4 ADN ligase. En fonction des vecteurs employés les milieux de culture sont sélectifs à différents antibiotiques (ampicilline pour les vecteurs pCR® 4-TOPO® et pGEM Hejuel ; kanamycine pour le vecteur pCR® XL-TOPO®). La « colonie PCR » permet de cribler les clones positifs.

Tableau 18: Vecteurs et bactéries *Escherichia Coli* employés pour sous cloner les fragments de PCR amplifiés en fonction de leur poids moléculaire et du besoin de l'expérience.

| | | Sous unité α PaNAv1 et PaFPC | | | | Sous unité β | | | | |
|--------------------------------|----------|---|--------------|-------------|--|---|-------|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Nature du fragment | | PCR1 à PCR6 | 5' UTR | 3'UTR | Cadre ouvert de lecture | PCR1 | 5'UTR | 3'UTR | Transcrit | Cadre ouvert de lecture |
| Taille insert (pb) | | 321 à 1758 | 1250 et 1300 | 1270 et 950 | 6153 et 4662 | 531 | 985 | 630 | 1700 et 1800 | 840 |
| Etude de la séquence nucléique | Vecteur | pCR [®] 4-TOPO [®] | | | pCR [®] -XL-TOPO [®] | pCR [®] 4-TOPO [®] | | | pCR [®] 4-TOPO [®] | pCR [®] 4-TOPO [®] |
| | Bactérie | DH5 α TM -T1 ^R | | | MAX Efficiency [®] Stb2 TM | DH5 α TM -T1 ^R | | | | |
| Expression | Vecteur | X | | | pGEM Hejuel | X | | | | pGEM Hejuel |
| | Bactérie | | | | MAX Efficiency [®] Stb2 TM | | | | | DH5 α TM -T1R |

H.2.2 Préparation de l'ADN recombinant

(a) Préparation de l'ADN recombinant par réaction de topoisomérisation

1) Caractéristiques des plasmides utilisés : pCR[®] 4-TOPO[®] et pCR[®]-XL-TOPO[®]

Les plasmides pCR[®] 4-TOPO[®] et pCR[®]-XL-TOPO[®] (InvitrogenTM) sont des plasmides linéarisés qui comportent des désoxythimidines protusives aux extrémités 5' (Figure 32A). Ils sont associés par liaison covalente à une topoisomérase. Cette dernière permet l'association des inserts dans le plasmide au cours d'une réaction de topoisomérisation. Le plasmide pCR[®]-XL-TOPO[®] plus adapté au clonage des inserts de haut poids moléculaire a été choisi pour amplifier le transcrit codant la sous unité α du canal Na_v. Les plasmides pCR[®] 4-TOPO[®] et pCR[®]-XL-TOPO[®] possèdent plusieurs marqueurs de sélection (Figures 33 et 34). Ils possèdent les gènes *LacZ α* et *ccdB* en amont du site de polyclonage. L'insertion d'un insert dans ces plasmides empêche l'expression de ces deux gènes et permet de sélectionner les plasmides transformants. En effet, l'expression de la β galactosidase permet hydrolyse de l'X-gal, un analogue du galactose, en un dérivé de coloration bleue, discriminant les bactéries non transformantes. L'expression de la toxine *ccdB* est mortel pour les bactéries non transformantes. Le plasmide pCR[®] 4-TOPO[®] est caractérisé par les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine et le plasmide pCR[®]-XL-TOPO[®] est caractérisé par les gènes de résistance à la kanamycine et la zéocine.

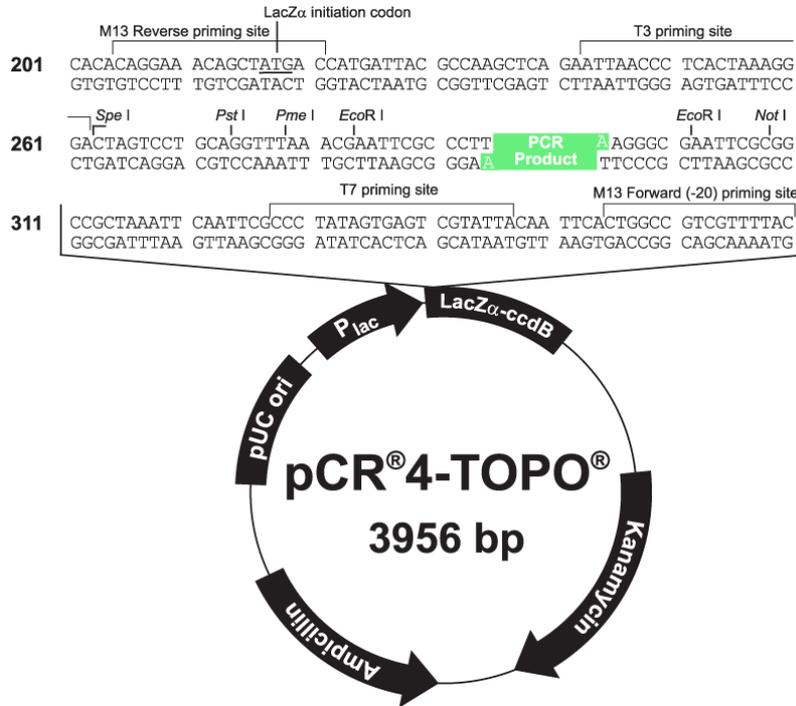


Figure 33: Carte de restriction du site de clonage du vecteur pCR® 4-TOPO® du kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen™).

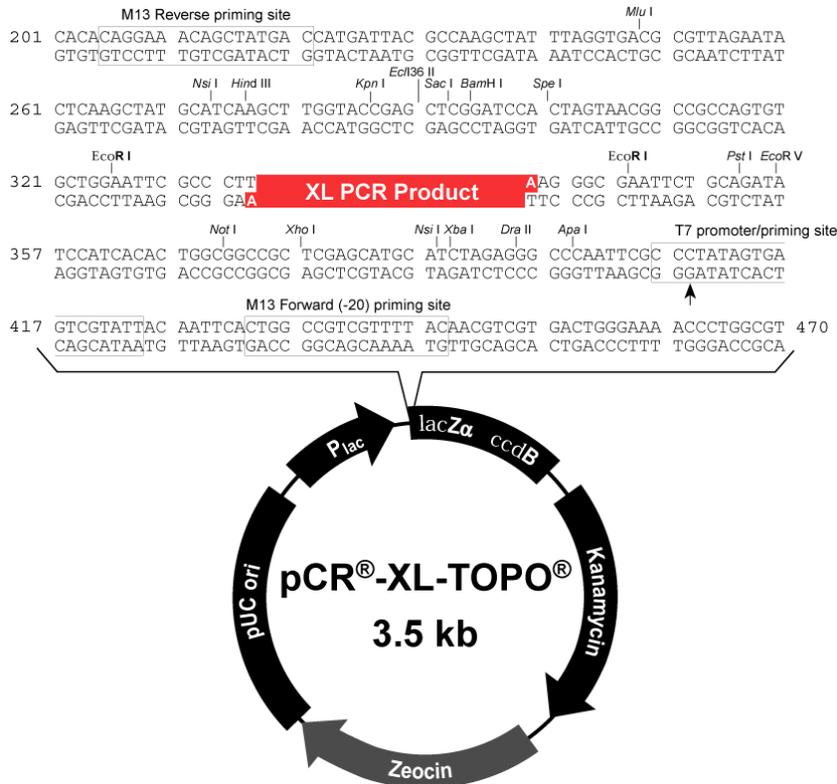


Figure 34: Carte de restriction du site de clonage du vecteur pCR®-XL-TOPO® du kit TOPO XL PCR Cloning (modifié d'après Invitrogen™).

2) Conditions d'utilisation du plasmide pCR[®] 4-TOPO[®]

Selon les instructions du fabricant, le milieu réactionnel de la réaction de topoisomérisation contient 50 ng d'ADNc purifié, 10 ng de plasmide pCR[®] 4-TOPO[®] et le tampon spécifique (120 mM NaCl, 6 mM MgCl₂). La réaction est opérée pendant une incubation de 10 minutes à température ambiante (20-23°C) puis arrêter à 4°C. Les produits sont ensuite transfectés aux bactéries *E.coli*.

3) Conditions d'utilisation du plasmide pCR[®]-XL-TOPO[®]

Le clonage d'insert de haut poids moléculaires nécessitent de prendre quelques mesures spécifiques. En effet, étant donné que les fragments d'ADN de haut poids moléculaires sont plus sensibles aux UV, les produits de PCR doivent être purifiés directement après la PCR pour préserver leur intégrité. Puis selon les instructions du fabricant, 4µl de produit de PCR purifié sont mis à incuber pendant 5 minutes à température ambiante avec 10 ng de vecteur pCR[®]-XL-TOPO[®]. Puis 1 µl de tampon (30 mM NaCl, 6 mM MgCl₂) est ajouté au milieu réactionnel précédent pour favoriser la transformation.

(b) Préparation de l'ADN recombinant pour le clonage directionnel

Les produits de PCR correspondant aux transcrits codant le cadre de lecture des sous-unités α et β ont été clonés dans le plasmide d'expression pGEM Hejuel par la technique du clonage directionnel. Cette technique consiste à liguer l'insert au plasmide au niveau de sites de restriction compatibles (Figure 32B).

Le plasmide pGEM Hejuel dérive de la série des plasmides pGEM de Promega (don Pr. Olaf Pongs, Institut de Transduction du Signal neuronal, Hambourg, Allemagne) (Figure 35). Il s'agit d'un vecteur d'expression qui permet de synthétiser des ARNc à partir des transcrits clonés. Les ARNc sont ensuite injectés dans des ovocytes de Xénope dans lesquels ils sont traduits en protéines. Pour ce faire le plasmide pGEM Hejuel comporte le promoteur T7 pour la transcription des ADNc clonés ainsi que les séquences 5' et 3' non codante de la β globuline de *Xenopus laevis* en 5' et 3' du site de polyclonage respectivement. Ces séquences transcrites permettent de stabiliser les ARN messagers injectés dans les ovocytes. Le marqueur de sélection est le gène de résistance à l'ampicilline.

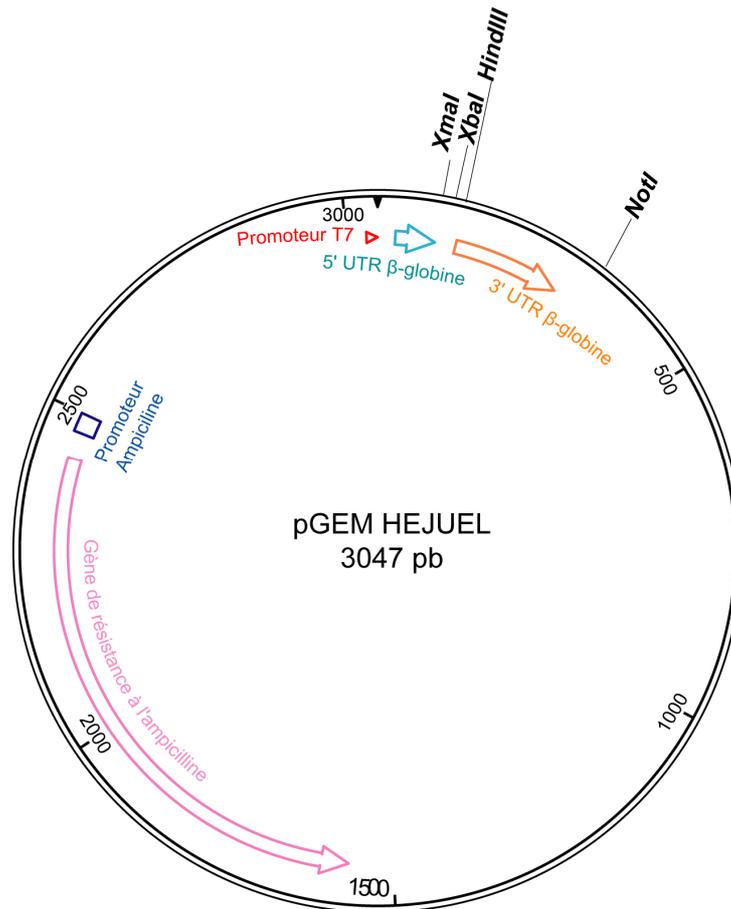


Figure 35 : Carte de restriction du plasmide pGEM Hejuel (gracieusement donné par Pr. Olaf Pongs, Institut de Transduction du Signal neuronal, Hambourg, Allemagne).

1) Préparation du plasmide pGEM Hejuel

Les produits de PCR correspondant aux transcrits codant le cadre de lecture des sous-unités α et β sont insérés dans le plasmide pGEM Hejuel au niveau des sites de restriction compatibles à savoir *XbaI* et *XmaI*. Le plasmide est donc digéré par *XmaI* et *XbaI* dans un tampon commun (Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 50 mM, DTT 1mM, pH 7,5) à 37°C. Les enzymes de restriction sont ensuite inactivées à 65°C pendant 10 minutes. Le plasmide doublement digéré présente alors des extrémités cohésives. Afin d'éviter que le plasmide ne se recircularise lors de la ligation de l'insert au plasmide les extrémités 5' de ce dernier sont déphosphorylées par la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIAP) directement dans le tampon des enzymes de restriction. Après ces étapes de digestion et de déphosphorylation, le plasmide est purifié à partir du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).

2) Clonage directionnel du transcrit codant le cadre de lecture de les sous-unités α PaNa_v1 et PaFPC

Les produits de PCR amplifiés avec les amorces Xma1-Na1S, Spe1-Na1AS, Xma1-PaFPC1S et HindIII-PaFPC1AS contiennent les sites de restriction *XmaI*, *SpeI* et *HindIII*. Ces enzymes de restriction génèrent des extrémités cohésives compatibles avec celles du plasmide pGEM Hejuel préparé ci-dessus. Ainsi, 1 μ g de chaque produit de PCR correspondant PaNa_v1 sont doublement digérés avec *XmaI* et *SpeI* alors que les produits de PCR correspondant à PaFPC sont doublement digérés avec *XmaI* et *HindIII* selon les conditions standard d'utilisation de ces restrictases. Les produits de digestion sont ensuite purifiés à partir du kit NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel). Puis ils sont ligués au plasmide pGEM Hejuel par la T4 ADN ligase. Lors de la ligation le rapport insert : plasmide est de 3 :1 molaire. La masse d'insert a été déterminée à partir de la formule :

$$\text{Masse insert (ng)} = 3 \times [\text{taille insert (pb)} \times \text{masse de plasmide (ng)} / \text{taille plasmide (pb)}]$$

Ainsi 50 ng de plasmide sont ligués à 330 ng de l'ADNc codant la sous-unité PaNa_v1 et 240 ng de l'ADNc codant la sous-unité PaFPC dans un volume final de 10 μ l contenant le tampon de la ligase (6 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 0,1 mg/ml bovine serum albumin, 7 mM β -mercaptoethanol, 0,1 mM ATP, 2 mM dithiothreitol, 1 mM spermidine) et 4 Weiss U de T4 DNA ligase. La ligation est réalisée pendant 14 heures à 14°C.

3) Clonage directionnel du transcrit codant le cadre de lecture de la sous-unité β

Les transcrits de la sous-unité β sont aussi sous clonés dans le plasmide pGEM Hejuel linéarisé par *XbaI* et *XmaI*. Les produits de PCR amplifiés avec TEH1.11S et TEH1.12R sont digérés par *XbaI* et *XmaI* puis purifiés. Lors de la ligation le rapport insert : plasmide est aussi de 3 :1 molaire. La ligation a été réalisée en deux temps selon le protocole standard de la T4 ADN ligase cité ci-dessus. Une première ligation contenant 50 ng de plasmide et 45 ng d'insert dans un volume final de 10 μ l a été réalisée pendant 19 heures à 16°C. Puis, ce produit de ligation a été dilué avec de l'eau dans un volume final de 100 μ l pour une seconde ligation de 14 heures à 16°C. Les produits de la seconde ligation sont précipités à l'éthanol et resuspendu dans 10 μ l d'eau.

H.2.3 Condition de la transfection bactérienne dans *E.coli* et conditions de culture des bactéries transformantes

(a) Transfection des bactéries *E.coli* DH5 α TM-T1^R

Les bactéries *E.coli* DH5 α TM-T1^R (InvitrogenTM) sont chimiocompétentes. Les bactéries *E. coli* DH5 α TM-T1^R en suspension dans un volume final de 50 μ l sont transfectées avec 2 μ l de produit de topoïsomérisation ou de ligation par choc thermique (42°C pendant 30s). Les bactéries transformées sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation dans un milieu de culture microbiologique (SOC, InvitrogenTM) nutritif pour permettre l'expression des gènes marqueur de sélection. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB [2% de Lennox Both Brase (InvitrogenTM), 1,5% d'agar (InvitrogenTM) et 1% d'extrait de levure (BactoTM Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Lept de Claix, France)] sélectif enrichi de 100 μ g/ml d'ampicilline. 30 μ l d'une solution d'X-gal dilué dans du diméthylformamide à une concentration de 40 mg/ml sont ajoutés au milieu de culture dans le cas d'une sélection bleu/blanc des bactéries transformantes. Les bactéries sont mises en culture pendant 12 à 14 heures à 37°C. La pression de sélection imposée par les antibiotiques permet d'éliminer les bactéries non transformées par le plasmide recombinant.

(b) Transfection des bactéries *E.coli* MAX Efficiency® Stbl2TM

Les bactéries *E. coli* MAX Efficiency® Stbl2TM (InvitrogenTM) sont aussi chimiocompétentes et présentent l'intérêt de supporter l'expression d'insert instable tel que le transcrite codant le cadre de lecture de la sous unité α . En effet, la sous-unité α du canal Na_v comporte la répétition en tandem de quatre domaines transmembranaires qui peut s'avérer toxique pour certaines souches de bactéries *E. coli*. Les bactéries *E. coli* MAX Efficiency® Stbl2TM en suspension dans un volume final de 50 μ l sont transfectées avec 2 μ l de la réaction de topoïsomérisation ou de la ligation au cours d'un choc thermique de 25 s à 42°C. Les cellules transformées sont mises en culture à 30°C pendant 48 heures sur un milieu LB (composition I.2.3.a) enrichi en kanamycine (50 μ g/ml) ou en ampicilline (100 μ g/ml) selon les plasmides. A cette température le risque de recombinaison plasmidique par les bactéries *E. coli* est réduit et leur croissance ralentie.

H.2.4 Criblage des colonies par « colonies PCR »

Quelque soit les méthodes de sous clonage réalisées, les colonies sont repiquées depuis le milieu agar dans une préculture liquide contenant 150 μ L de LB enrichi avec l'antibiotique approprié (voir ci-dessus I2.3). A l'issue de 2 heures de préculture, les colonies sont analysées par « colonie PCR » pour cribler les clones positifs ayant l'insert. Les amorces universelles M13F et M13R ou des amorces spécifiques de l'insert sont utilisées pour la « colonie PCR » (Figure 32). 40 μ l de chaque colonie est prélevé de la préculture. Après centrifugation de 2 minutes à 48 g, le surnageant est jeté puis les culots sont resuspendus dans 10 μ l d'eau. La PCR est réalisée dans un volume final de 10 μ l selon des conditions standards. Le programme de la « colonie PCR » est adapté selon la taille de l'insert à amplifier et la température de fusion des amorces utilisées. Puis, le poids moléculaire de l'insert des colonies est contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les clones bactériens positifs sont mis en culture dans 5 ml de milieu LB sélectif à l'antibiotique approprié.

H.2.5 Extraction d'ADN plasmidique par minipréparation

Les cultures sont centrifugées afin d'isoler le culot bactérien à une accélération de 43 g. L'ADN plasmidique de chaque clone est extrait et purifié par la technique du lysat clair alcalin à l'aide du kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel). Brièvement, les bactéries subissent une lyse cellulaire par l'ajout d'un tampon contenant 200 mM de NaOH et du SDS 1%. L'ADN est précipité à partir d'un tampon contenant de l'acétate de potassium. Après une centrifugation de 10 min à une accélération de 43 g, l'ADN génomique forme un culot tandis que l'ADN plasmidique reste en suspension dans le surnageant. Ce dernier est déposé sur une colonne comportant une membrane de silice. Après une centrifugation de 1 min à 12200 rpm, l'ADN est fixé sur la membrane en silice en présence de sels chaotropiques. La membrane est rincée successivement avec deux tampons du kit qui contiennent de l'éthanol pour éliminer les sels chaotropiques et autres contaminants protéiques. L'ADN est élué avec 50 μ l de tampon (Tris-HCl 5 mM pH 8,5 (Invitrogen)). La qualité et la concentration d'ADN plasmidique purifiée est mesurée par spectrophotométrie à une longueur de 260 nm (ND-1000, Nanodrop). Une unité d'absorption à 260 nm correspond à une concentration de 50

ng/μl d'ADN bicaténaire. Le zéro optique est réglé avec le solvant dans lequel l'ADN plasmidique a été élué.

H.2.6 Extraction d'ADN plasmidique par midipréparation

Pour les transcrits sous clonés dans le vecteur pGEM, des midipréparations ont été réalisées à partir du kit NucleoBond Xtra (Macherey-Nagel) afin d'extraire une quantité plus importante de plasmide. Le volume de culture bactérienne utilisé est de 100 ml. Le principe repose aussi sur la technique du lysat clair alcalin. Brièvement, au culot bactérien est ajouté un tampon contenant 200 mM de NaOH et du SDS 1% pour lyser les cellules, puis un autre tampon du kit contenant de l'acétate de potassium pour précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 10 min à une accélération de 18 g, le lysat contenant l'ADN plasmidique est déposé sur un filtre préalablement imbibé par un tampon du kit. Le lysat ainsi filtré se dépose par gravité sur une membrane de résine riche en silice sur laquelle est greffée une matrice anionique. Cette membrane joue ainsi le rôle d'échangeur anionique. Dans un premier temps, l'ADN chargé négativement se fixe à la membrane chargée positivement dans des conditions de pH acide. Puis la membrane est rincée avec des tampons du kit enrichi en éthanol pour éliminer des contaminants protéiques ou ARN. L'ADN plasmidique est enfin séparé de la membrane par un tampon d'éluat du kit au pH basique. L'ADN plasmidique contenu dans l'éluat est ensuite précipité à l'isopropanol (Sigma-Alfrich®, 99+%) afin d'éliminer les sels chaotropiques restants. Le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans de l'eau et peut servir de matrice à diverses réactions telles que l'analyse de la séquence et la transcription *in vivo*. La quantité et la qualité de l'ADN plasmidique est mesurée par spectrophotométrie comme décrit précédemment I.2.5.

H.2.7 Digestion enzymatique des ADN plasmidiques

^(a) **Digestion enzymatique des clones contenus dans les vecteurs pCR[®] 4-TOPO[®] et pCR[®] -XL-TOPO[®]**

La présence de l'insert dans le plasmide et la qualité de l'extraction de l'ADN plasmidique sont contrôlées par une digestion du plasmide par la restrictase *EcoRI* (Invitrogen™) qui présente deux sites de part et d'autre du site clonage de pCR[®] 4-TOPO[®] et

pCR[®]-XL-TOPO[®] (et). 250 ng d'ADN plasmidique sont digérés dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl de tampon fourni avec l'enzyme et 0,2 U d' *EcoRI*. La digestion est effectuée pendant 1 heure à 37°C. Puis, les inserts et le plasmide sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose. La séquence nucléique des inserts montrant le poids moléculaire attendu est analysée.

(b) Digestion enzymatique des clones contenus dans le vecteur d'expression pGEM Hejuel

Au moins deux digestions sont réalisées pour les inserts clonés dans le plasmide pGEM Hejuel. Dans un premier temps, nous nous assurons de la taille du plasmide recombinant en le linéarisant. Cette taille doit correspondre à la somme des poids moléculaires du plasmide pGEM Hejuel et de l'insert, soit 9 kb pour les transcrits codant la sous-unité α et 4,7 kb pour les transcrits codant la sous-unité β . Puis, nous contrôlons de manière plus précise la taille de l'insert en effectuant une double digestion du plasmide recombinant avec *XmaI* et *XbaI* pour la sous-unité PaTEH1 et avec *SpeI* et *XbaI* pour la sous-unité α . Ces doubles digestions permettent de distinguer l'insert du plasmide après leur séparation par électrophorèse. Toutes les digestions sont réalisées à partir de 250 ng d'ADN plasmidique, quantité suffisante pour analyser aussi la qualité de l'ADN plasmidique. La séquence nucléique des inserts montrant le poids moléculaire attendu est analysée.

H.2.8 Analyse de la séquence nucléique

La séquence nucléique des inserts est déterminée par la société Millegen (Labège, France). La société utilise des séquenceurs ADN tels que 3130/3130XL Genetic Analyzer et 3730/3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) qui utilisent la technologie d'électrophorèse capillaire pour séparer les fragments d'ADN. Les électrophorégrammes obtenus pour chaque séquence sont analysés avec le logiciel BioEdit. Pour comparer les séquences nucléiques et protéiques des clones un alignement multiple est réalisé à partir de la méthode Clustal W (Thompson et coll., 1994). Une interrogation de type BLAST protéique auprès de la base de données GenBank de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) à l'aide des séquences protéiques, déduites des séquences nucléiques des transcrits, permet de déterminer les identités protéiques les plus homologues.

I Analyse des séquences et identification des relations phylogénétiques

Les électrophorogrammes des séquences nucléiques sont analysées à partir du logiciel Lasergene® v8.0 (DNASar, Madison, USA).

La recherche des gènes homologues est réalisée à partir d'interrogations de type BLASTP dans la banque de donnée générale GenBank⁸ et des banques de données spécifiques du génome des insectes (toutes les espèces : GenBank Arthropod Genome⁹, Pucerons : Aphibase¹⁰ ; Abeilles : Beebase¹¹, Vers à soie : Silkbase¹² et insectes vectoriels : Vectorbase¹³ (Megy et coll., 2009)).

L'alignement multiple des séquences homologues aux gènes *PaNa_v1* et *PaFPC* a été réalisé selon la méthode ClustalW (Thompson et coll., 1994). L'alignement multiple des séquences homologues à la sous-unité PaTEH1 a été réalisé selon la méthode MUSCLE qui permet d'aligner plus rapidement et avec plus d'exactitude des séquences nucléiques et protéiques (Edgar, 2004). L'alignement est ensuite amélioré selon trois principes :

- détermination des domaines transmembranaires à partir de l'outil PHOBIUS¹⁴ pour identifier les régions conservées (Kall et coll., 2004),
- suppression des régions non conservées, telles que les extrémités amino et carboxy-terminales, les boucles L1 et L2 des sous-unités orthologues à PaNa_v1 et PaFPC et l'extrémité carboxy-terminale de la boucle extracellulaire des sous-unités orthologues à PaTEH1,
- alignement manuellement des résidus homologues non pris en compte préalablement.

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

⁹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=insects

¹⁰ <http://www.aphibase.com/aphibase/>

¹¹ <http://genomes.arc.georgetown.edu/beebase/blast/blast.html>

¹² <http://www.silkdb.org/silkdb/>

¹³ <http://www.vectorbase.org/index.php>

¹⁴ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/phobius/>)

Ensuite, nous avons recherché les paramètres du modèle de substitutions nucléotidiques le plus parcimonieux à partir de la méthode statistique AIC implémentée au logiciel MODELTEST v.3.7 (Posada et coll., 1998). L'arbre phylogénétique a alors été élaboré en prenant en compte les paramètres du modèle sélectionné et selon une recherche de maximum de vraisemblance à partir du logiciel PAUP*4.0 beta 10 (Swafford, 2002) ou PHYLIP v3.0.. La robustesse des nœuds a été évaluée selon une analyse de bootstrap basée sur 1000 répliques. L'arbre est visualisé avec le logiciel TreeView (Page, 2002).

J Technique de la RT-PCR sur neurones DUM isolés

Après avoir identifié les transcrits codant les canaux Na_v dans la chaîne nerveuse et le dernier ganglion abdominal, nous avons souhaité identifier les transcrits codant les canaux Na_v dans les neurones DUM. Pour ce faire, nous avons adapté la technique de la RT-PCR sur cellule unique aux neurones DUM.

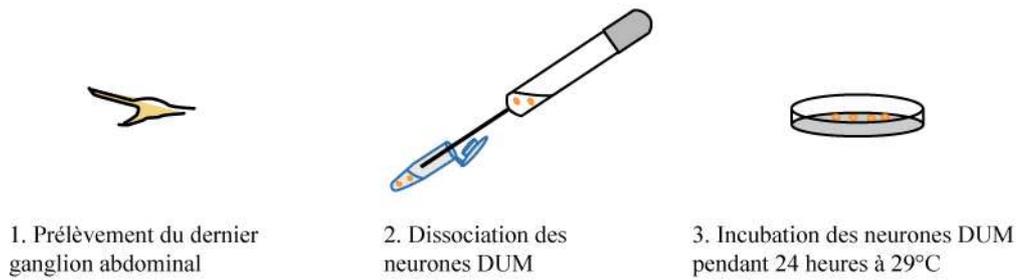
J.1 Principe général de la RT-PCR sur cellule unique isolée

Isoler l'ARN total contenu dans une seule cellule et détecter des transcrits d'intérêt à partir de l'ARN total de cette même cellule a toujours représenté un véritable challenge technique. Dès la fin des années 80, la technique de la RT-PCR sur cellule unique a été mise au point pour réaliser des profils d'expression de cellules isolées (Rappolee et coll., 1989). Mais c'est véritablement le développement de l'association des techniques d'électrophysiologie (patch-clamp) et de biologie moléculaire (RT-PCR sur cellule unique) qui a permis de réaliser des corrélations phénotype-génotype à l'échelle de neurone individuel (Lambolez et coll., 1992). La méthode comprend trois étapes principales: (1) caractériser les propriétés électrophysiologiques des cellules par la technique du patch-clamp, (2) prélever le cytoplasme de la cellule dans la pipette de patch-clamp pour le transférer dans un tube et (3) procéder à l'amplification des transcrits d'intérêt par RT-PCR (Monyer et coll., 1995) (Figure 36). La technique de prélèvement du cytoplasme *via* une pipette de patch-clamp permet d'appliquer cette méthode sur des préparations diverses telles que des cellules dissociées, des cultures primaires de cellules ou des tranches de tissus. Cette stratégie

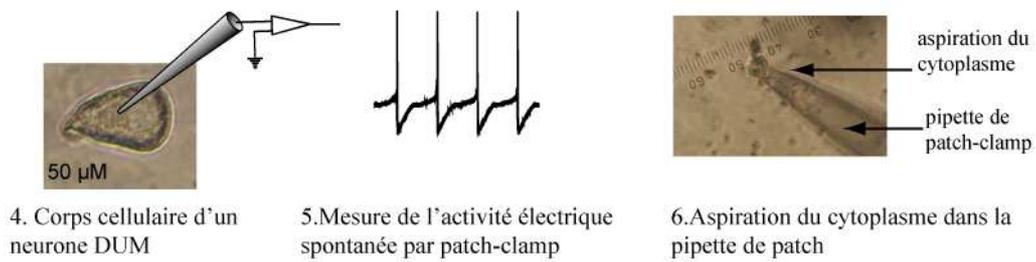
combinant le patch-clamp et la RT-PCR sur cellule unique s'avère alors tout particulièrement idéale pour détecter des transcrits codant des canaux ioniques et des récepteurs membranaires. Ainsi nombreuses études font état de cette technique pour détecter l'expression de ces protéines dans des neurones de vertébrés (Sucher et coll., 2000). Par contre, cette stratégie a été moins adaptée aux neurones d'invertébrés tels que *Hirudo medicinalis* (sangsue) (Blackshaw et coll., 2003), *D. melanogaster* (O'Dowd et coll., 1995), *P. americana* (Wicher et coll., 2006) et *Locusta migratoria* (Janssen et coll., 2007), *Apis mellifera* (Dupuis et coll., 2009).

L'intérêt de combiner le patch-clamp et la RT-PCR sur cellule unique est d'établir un profil d'expression de plusieurs gènes au sein d'une même cellule plutôt que de détecter un seul transcrit. La PCR multiplex emboîtée s'avère alors être une approche intéressante pour réaliser ces profils d'expression. Elle consiste à amplifier au cours d'une première PCR plusieurs gènes ciblés par un mélange d'amorces. La seconde PCR réalisée avec des amorces internes permet non seulement d'affiner la spécificité des amplicons mais surtout d'amplifier chaque transcrit séparément (Figure 36). Dans le cadre de nos recherches nous avons détecté la coexpression de plusieurs gènes au sein des neurones DUM. De plus nous avons affiné l'identification des transcrits amplifiés en sous-clonant les produits de PCR. En effet le challenge que nous nous étions fixés était de caractériser les variants codant la sous-unité α des canaux Na_v au sein des neurones DUM de *P. americana*.

Culture primaire de neurones DUM isolés



Patch-clamp



Biologie moléculaire: RT-PCR multiplex emboîtée

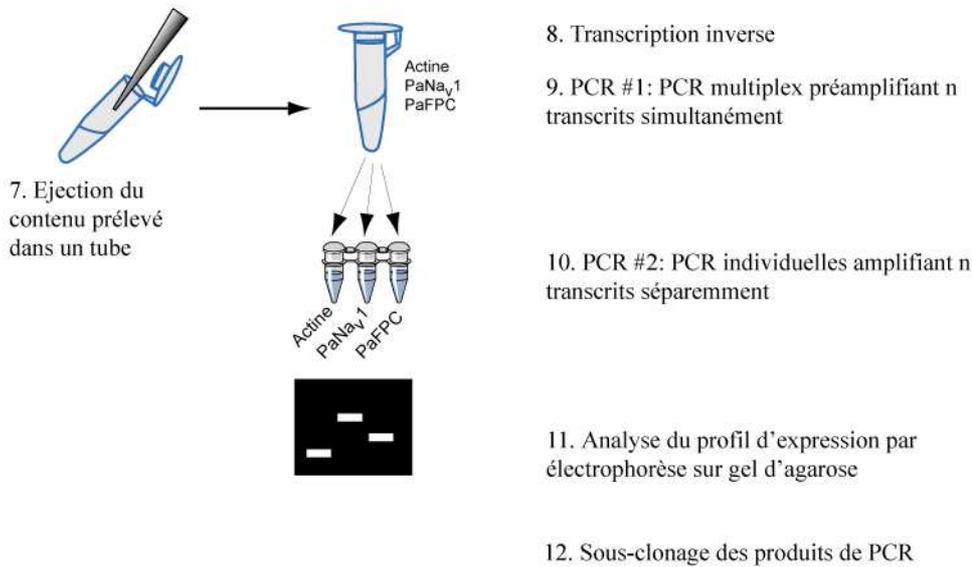


Figure 36: Etapes principales de la RT-PCR multiplex sur neurones DUM isolés.

J.2 Mise au point de la technique de la RT-PCR sur DUM neurone

J.2.1 Prélèvement des cytoplasmes

Les neurones DUM sont prélevés au niveau du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse de *P. americana* puis isolés par la technique de dissociation cellulaire (Lapied et coll., 1989) (Matériels et Méthodes/Chapitre 3/A1). Après une incubation de 24 heures dans une étuve à 29°C, les neurones DUM sont sélectionnés visuellement selon des critères morphologiques à savoir une forme pyriforme et une taille voisine de 50 µM (Figure 23). Le cytoplasme est prélevé avec une pipette de patch contenant 8 µl de solution intrapipette et possédant une résistance comprise entre 0.7 et 0.9 MOhm. Après l'établissement de la configuration dite « cellule entière », l'activité électrique spontanée des neurones DUM est contrôlée par des mesures en courant imposé (B.4 Partie 2). La mesure de cette activité spontanée est importante puisqu'elle témoigne de l'expression des canaux Na_v. Puis, le cytoplasme est aspiré dans la pipette de patch en appliquant une pression négative. Il est important de contrôler visuellement l'aspiration du cytoplasme dans la pipette pour ajuster la pression négative. Quand une faible portion de la cellule reste en dehors de la pipette alors cette dernière est retirée délicatement du bain tout en maintenant la pression négative à l'interface liquide-air. Puis le cytoplasme est aussitôt éjecté dans un tube Eppendorf® Biopur refroidi contenant 1 µl de tampon (Tris 200 mM pH 8,5) et 1 µl de l'inhibiteur de ribonucléase RNasin® Plus (Promega).

J.2.2 RT-PCR multiplex emboîtée

(a) Conception des amorces spécifiques pour amplifier les transcrits exprimés dans les neurones DUM

Pour caractériser les variants codant la sous-unité α du canal sodium exprimés dans les neurones DUM nous avons choisi d'amplifier de manière séquentielle des régions intéressantes comportant des exons alternatifs. Pour amplifier chaque région d'intérêt, trois à quatre oligonucléotides spécifiques ont été conçus de manière à générer des amplicons d'une taille comprise entre 200 et 800 pb. Cette contrainte est imposée par la limite de

détection de la technique de la RT-PCR sur cellule unique capable d'amplifier des transcrits de taille modeste (Tableau 19 et Figure 37). Le transcrit codant l'actine (numéro d'accèsion GenBank AY33345), protéine composante du cytosquelette et fortement exprimée, a été amplifié pour évaluer la quantité d'ADNc et détecter des contaminations d'ADNg (K. 3.2) (Tableau 19 et Figure 37).

Tableau 19 : Oligonucléotides spécifiques conçus pour amplifier les transcrits à partir de la RT-PCR sur neurone DUM isolé. La température de fusion T_m est déterminée à partir de la formule $4AT+2GC$.

| Transcrit d'intérêt | Nom de l'oligonucléotide | Séquence | T_m (°C) |
|--|--------------------------|---------------------------------|------------|
| Sous unité PaNav1 (boucle 1) | L1-1S | 5'-CATTGTCGCCATGTCATACGACG-3' | 66 |
| | L1-2S | 5'-TATTCTTGGAACCTTGAGCCACAGC-3' | 70 |
| | L1-3AS | 5'-GAAGAATAGTTGGAGCCAACGG-3' | 66 |
| Sous unité PaNav1 (boucle 2) | L2-1S | 5'-CTTTGGTTCCTCGAATCTGTTCG-3' | 66 |
| | L2-2AS | 5'-CTTGTTCTCGATGAGCTGGAAG-3' | 66 |
| | L2-3AS | 5'-TTTTCAGGACAGCAATCCGCAG-3' | 66 |
| Sous unité PaNav1 (Domaine III) | DIII-1S | 5'-CCTCGGCTTCAAGAAGTACTTCA-3' | 70 |
| | DIII-2AS | 5'-CGTTCATGATCTGAATCCATCCC-3' | 70 |
| | DIII-3AS | 5'-CACGTGTAGTTCTCAGCAATGC-3' | 66 |
| Sous-unité PaNav1 (DIV) | IVS3-S | 5'-GATTTTCGTAGTTGTCATCCTCTC-3' | 66 |
| | IVS6-AS | 5'-GACGAGATATGACAGAAGGAAGGC-3' | 72 |
| | IVploop-AS | 5'-CCAATAGTCGCAGATCCACAG-3' | 64 |
| Sous-unité PaFPC (Domaine I) | PaF-IS3-S | 5'-GGTTACATAACGCTCGTGTTG-3' | 66 |
| | PaF-lpl-1AS | 5'-AAGGCCCAACCGAATGTATCG-3' | 66 |
| | PaF-lpl-2AS | 5'-GTCATCAGGAATGTACCAATGCG-3' | 68 |
| Actine | Act-1S | 5'-CTGACCCTTAAATACCCCATG-3' | 60 |
| | Act-2AS | 5'-CACAAATTTCTCGTTCGGCGTG-3' | 60 |
| | Act-3S | 5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3' | 62 |
| | Act-4AS | 5'-GTAAAGCTGTAACCACGCTCAG-3' | 66 |

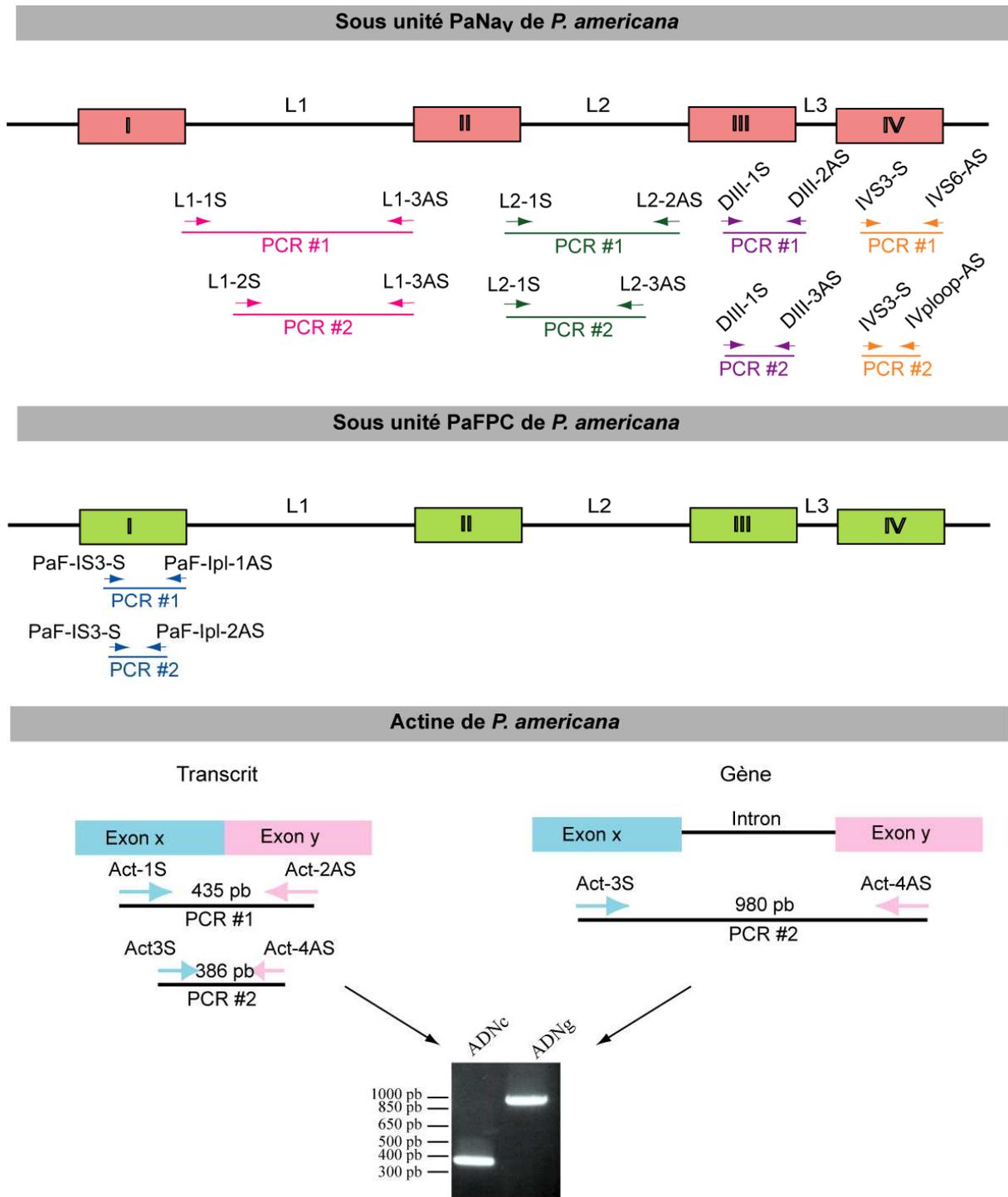


Figure 37 : Schéma montrant la disposition des amorces spécifiques utilisées pour amplifier plusieurs transcrits exprimés dans les neurones DUM.

(b) Transcription inverse des ARN totaux de neurone DUM isolé

La transcription inverse est réalisée sans purification préalable des ARN totaux afin de limiter au maximum toute perte de matériel. Par ailleurs, pour éviter des contaminations à l'ADNg, un traitement à la désoxyribonucléase I est réalisé préalablement à la transcription inverse. La désoxyribonucléase I est activée 15 minutes à 37°C puis inactivée à 70°C pendant 5 minutes.

Dans le tube contenant le cytoplasme traité à la désoxyribonucléase I, nous ajoutons directement 7,5 µl d'un premier assemblage contenant 1 µl d'une solution contenant 5 mM de chaque dNTP, 25 ng/µl d'hexanucléotides aléatoires et 6,5 µl de Tris 10 mM pH 8,5. Les hexanucléotides aléatoires servent d'amorce à la transcription inverse et présentent l'intérêt de pouvoir rétro-transcrire des transcrits tronqués. L'hybridation des hexanucléotides aléatoires à l'ARN est réalisée en chauffant cet assemblage pendant 5 minutes à 65°C au bain marie, suivie immédiatement d'une incubation de 1 minute dans la glace. Ensuite 10 mM final de DTT, 5 mM final de MgCl₂ et 1 µL de transcriptase inverse associée à un inhibiteur d'ARNase (SuperScript III™ Reverse Transcriptase Rnase/ RNase Out, kit Super III First strand, Invitrogen™) sont ajoutés au premier assemblage. Cette transcriptase inverse a été choisie car elle permet de rétro-transcrire entre 0,1 pg et 5 µg d'ARN totaux. La concentration finale de DTT et de MgCl₂ a été ajustée de manière à optimiser l'activité de la transcriptase inverse tout en préservant l'activité des ADN polymérase thermostables. Après une incubation de 10 minutes à 25°C, la transcription inverse est réalisée pendant 50 minutes à 50°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par chauffage (5 minutes, 85°C). Afin d'éliminer les fragments d'ARN des fragments hybrides ARN-ADN on ajoute 0,3 U de ribonucléase H (Promega, France) dont l'activité est maintenue pendant 20 minutes à 37°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

(c) RT-PCR multiplex emboîtée

La PCR multiplexe emboîtée se réalise en deux étapes successives d'amplification par PCR. La première PCR consiste en une préamplification de n transcrits dans 1 seul tube avec n couples d'amorces spécifiques. La seconde PCR permet d'amplifier séparément ces n transcrits dans n tubes différents avec 1 seul couple d'amorce par tube (Figure 36). Avant de réaliser les PCR multiplex emboîtées à partir de l'ADNc de neurone DUM isolé, il est préférable d'optimiser ses conditions de PCR tout à fait particulières à partir de dilution successive des ADNc de la chaîne nerveuse.

1) Première PCR : PCR multiplexe

La première PCR est réalisée dans un volume final de 100 µL avec comme matrice la totalité de l'ADNc de neurone DUM isolé, soit 10 µl. Les transcrits sont amplifiés simultanément par l'ADN polymérase thermostable KOD HiFi dans un milieu réactionnel standard (E.3) excepté que chaque amorce est ajustée à une concentration finale de 0,6 µM. Le programme de température est le suivant: [95°C 3 min, 35 fois * (95°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 90s), 72°C 2min]. Les produits de cette première PCR sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) afin d'éliminer les sels, l'enzyme et les oligonucléotides. Ces produits de PCR purifiés constituent la matrice des PCR suivantes.

2) Seconde PCR : PCR emboîtée

La seconde PCR permet d'amplifier séparément chaque transcrit à partir d'amorces internes spécifiques. Cette PCR est réalisée dans un volume final de 20 µl à partir de l'ADN polymérase thermostable EuroTaq. Le milieu réactionnel de la PCR est standard. Le programme de cette seconde PCR est le suivant: [94°C 2min; 35 * (94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C: 1min/kb), 72°C: 5min].

Les produits de la seconde PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour caractériser la séquence nucléique des transcrits codant le canal Na_v, les produits de PCR sont purifiés puis clonés dans le vecteur pCR®-4-TOPO® et multipliés dans bactéries chimiocompétentes DH5α™-T1^R de la même façon que décrite précédemment (I).

J.3 Les contraintes de la technique de la RT-PCR sur DUM neurone isolé

La technique de patch-clamp combinée à la technique de la RT-PCR sur cellule unique nécessite de suivre quelques mesures expérimentales permettant de s'affranchir de l'amplification de produits de PCR faux négatifs et/ou faux-positifs. Les produits de PCR faux-négatifs peuvent être dus à la dégradation de l'ARN ou aux conditions inappropriées de transcription inverse ou de PCR. Pour préserver l'intégrité de l'ARN quelques règles simples doivent être prises en considération lors du prélèvement du cytoplasme. Par ailleurs, l'analyse des transcrits par RT-PCR sur cellule unique doit aussi être validée par différents contrôles expérimentaux excluant l'amplification de faux-positifs provenant soit des contaminations de l'ADN génomique soit d'ADNc d'autres préparations.

J.3.1 La préservation du matériel biologique des contaminations par les ribonucléases

L'ARN est une macromolécule particulièrement sensible aux dégradations par les ribonucléases. Le prélèvement du cytoplasme doit être réalisé dans un environnement exempt de ribonucléases. Pour ce faire, il est important de porter des gants en latex tout au long de l'expérience, d'autoclaver le matériel (pipette de patch, embouts de pipette, flacons contenant les solutions), de nettoyer les paillasses et les instruments tels que les pipettes avec une solution de NaOH 0,1 M. De plus, la solution intrapipette employée doit être réservée au prélèvement des neurones DUM. Sa préparation doit être réalisée dans un environnement exempt de nucléases (voir ci-dessus) et les constituants qui la composent sont dilués avec de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Avant tout usage, la solution intrapipette est filtrée à 0,2 µm.

Afin de préserver l'intégrité des ARN, le contrôle électrophysiologique des neurones DUM doit être opéré pendant une courte durée pour pouvoir aspirer le cytoplasme quelques minutes après l'établissement de la configuration entière. Le contrôle visuel du prélèvement permet de s'assurer que seuls les constituants cellulaires pénètrent bien à l'intérieur de la pipette de patch-clamp. Une fois que le cytoplasme est éjecté dans le tube qui contient déjà un inhibiteur de ribonucléases, les ARN sont aussitôt soumis à une transcription inverse ou conservés à -80°C pendant au maximum 1 mois.

J.3.2 Les contaminations par l'ADN génomique

Au cours du prélèvement du cytoplasme il peut arriver que le noyau des neurones DUM soit aussi aspiré dans la pipette de patch-clamp. L'amplification des deux allèles d'un même gène est alors tout à fait envisageable étant donné la sensibilité de la PCR. Pour s'affranchir de l'amplification de tels de faux-positifs plusieurs méthodes ont été proposées (Johansen et coll., 1995, Cauli et coll., 1997, Sucher et coll., 2000).

Dans le cadre de notre étude, un traitement du cytoplasme prélevé à la désoxyribonucléase I avant la transcription inverse s'est avéré une solution appropriée. Toutefois, il est nécessaire de bien veiller à l'inactiver par un chauffage à 70°C afin d'éviter

que l'ADNc ne soit dégradé ultérieurement. Un traitement supplémentaire à la protéinase K est aussi préconisée avant l'étape d'inactivation à la chaleur (Sucher et coll., 1995).

Les contaminations de l'ADN génomique peuvent être aussi mises en évidence par le choix précautionneux des amorces. L'idéal est de concevoir des amorces sens et antisens situées sur deux exons différents (Cauli et coll., 1997). L'amplification de l'ADN génomique génère des produits de PCR de plus grande taille que ceux résultant de l'amplification de l'ADNc. La différence de taille entre les deux produits de PCR équivaut à la taille de la région intronique séparant les deux exons ciblés par chacune des amorces. Lorsque des profils d'expression sont établis un seul couple d'amorce respectant ces mesures suffit pour exclure des faux-positifs induits par l'amplification de l'ADN génomique. Dans le cas où la structure de l'ADN génomique n'est pas connue il peut s'avérer judicieux de tester les couples d'amorces en mettant au point des PCR contrôles avec comme matrice de l'ADN génomique (Cauli et coll., 1997).

Les contaminations de l'ADN génomique peuvent aussi être contrôlées en réalisant une transcription inverse au cours de laquelle la transcriptase inverse est omise. Si après analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons sont observés alors cela indique qu'il s'agit très probablement d'ADN génomique. Ce contrôle est lui même validé en ayant réalisé parallèlement et dans les mêmes conditions une RT-PCR sans matrice (O'Dowd et coll., 1995).

Enfin il est possible de contrôler l'amplification de l'ADNg en comparant différents types cellulaires dont on connaît le profil d'expression de certains transcrits. Ainsi il a pu être montré que les allèles des gènes codant les récepteurs au glutamate GluR2 et GluR5 ne sont pas amplifiés au cours de la technique de la RT-PCR sur des cellules cérébrales n'exprimant pas ces gènes (Johansen et coll., 1995).

J.3.3 Les contaminations non spécifiques

La dernière source de contamination, et probablement la plus pernicieuse, est l'amplification de faux-positifs provenant d'ADNc autre que celui des neurones DUM isolés. Ce risque est d'autant plus important que la quantité d'ARN rétro-transcrit est faible et que de ce fait le nombre de cycle d'amplification pour détecter les transcrits d'intérêt est important. Ainsi, la conception de contrôles appropriés et la maîtrise de ces contaminations

potentielles constitue une étape déterminante pour valider la technique RT-PCR sur neurone DUM.

L'origine des ADNc d'autres préparations peut être diverse et difficile à identifier. Ces ADNc peuvent avoir été libérés dans le milieu ambiant *via* des aérosols et avoir contaminé au cours du temps les pipettes, les réactifs... Pour contourner ce problème, il est préconisé dans la mesure du possible de réaliser la purification des ARN et les PCR ainsi que l'analyse des produits de PCR dans des pièces séparées (Sucher et coll., 2000). De plus, il est préférable que les embouts des micropipettes soient munis de filtres contre les aérosols.

Enfin, des expériences de RT-PCR menées avec comme matrice la solution intrapipette, le milieu de culture des neurones DUM et de l'eau doivent être effectuées en parallèle de la RT-PCR sur DUM neurone isolé. Les contrôles réalisés avec comme matrice la solution intrapipette et l'eau permettent d'identifier les contaminations d'ADNc autre que celui de neurones DUM. Par ailleurs, sept ganglions sont dissociés mécaniquement pour isoler les neurones DUM. Il est donc fort probable que des ARN de diverses cellules du ganglion enrichissent le milieu de culture suite à leur destruction mécanique. Le milieu de culture est prélevé par capillarité en y trempant la pipette de patch pendant 5 minutes. La RT-PCR effectuée avec le milieu de culture permet alors de détecter l'ADNc de cellules du ganglion. Ce n'est que lorsque ces trois contrôles sont négatifs et que les produits de la RT-PCR sur DUM neurone isolé sont positifs que l'analyse peut être validée (O'Dowd et coll., 1995).

CHAPITRE 3. ETUDE DES COURANTS Na^+ PAR UNE APPROCHE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

A Etude électrophysiologiques des courants Na^+ natifs des neurones DUM de *P. americana* par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière

A.1 Culture primaire des neurones DUM

L'isolement et la mise en culture des corps cellulaires des neurones DUM sont effectués d'après le protocole mis au point par Lapied et coll., 1989. Les dissections et dissociations ganglionnaires sont faites à température ambiante, dans des conditions stériles pour éviter toute contamination bactérienne et fongique (hotte à flux laminaire horizontal, instruments flambés à l'alcool, solutions filtrées avec des filtres 0,22 μm (Millipore, Billerica, US) et enrichissement des solutions par des antibiotiques).

Après avoir sectionné la tête, les pattes et les ailes, la blatte est épinglée sur un support face ventrale orientée vers le haut. L'accès au DGA est possible en dégageant la cuticule ventrale, et en déplaçant la glande conglobée (ou phallique) du système reproducteur. L'extrémité de la chaîne nerveuse est immédiatement humidifiée par le liquide physiologique LPC1 (Tableau 20), afin d'éviter tout dessèchement et de faciliter la dissection. Les troncs trachéaux ventraux de part et d'autre de la chaîne nerveuse sont délicatement écartés à l'aide de pinces fines. Le DGA est prélevé en sectionnant les nerfs cercaux de part et d'autre et le connectif le reliant au cinquième ganglion. Aussitôt, le DGA est déposé dans une boîte de culture contenant du LPC1. Un nettoyage plus minutieux du ganglion est effectué à l'aide d'aiguilles montées pour éliminer les ramifications nerveuses et les trachées résiduelles. A chaque dissociation, six ganglions sont prélevés de cette façon.

Les tissus ganglionnaires subissent ensuite un traitement enzymatique qui fragilise la structure du ganglion. Pour ce faire ils sont incubés dans du LPC1 enrichi avec de la collagénase IA (300 UI/mL, Worthington Biochemicals, Lakewood, USA) (LPC2, Tableau 20) pendant 35 minutes à 29°C. Puis, la collagénase est éliminée en rinçant successivement les ganglions dans deux bains de LPC1 pendant cinq minutes.

Les ganglions sont ensuite transférés dans un tube de 1,5 ml contenant du LPC3 (Tableau 20). La dissociation mécanique s'effectue par aspirations-refoulements successifs des ganglions à l'aide de pipettes Pasteur dont les diamètres sont progressivement réduits à la flamme. Le premier diamètre permet de désorganiser la structure du ganglion. Le deuxième diamètre permet d'isoler les îlots des neurones, et le troisième diamètre permet d'individualiser les corps cellulaires des neurones DUM. Les cellules ainsi isolées sont déposées délicatement dans des boîtes de Pétri (35 mm, Falcon, Becton Dickinson Labware, US) préalablement traitées à la poly-D-lysine (100µg/ml, Sigma, France). Cette matrice permet l'adhérence des neurones sur le fond de la boîte. Les neurones DUM sont incubés à 29°C pendant entre 24 et 72 heures selon les expériences.

Tableau 20 : Composition des liquides physiologiques utilisés lors de la dissection du dernier ganglion abdominal et de la dissociation des neurones DUM.

| | LPC1 | LPC2 | LPC3 |
|------------------------------------|------|------|------|
| NaCl (mM) | 200 | | |
| KCl (mM) | 3,1 | | |
| MgCl₂ (mM) | 5 | | |
| CaCl₂ (mM) | 4 | | |
| HEPES (mM) | 10 | | |
| Saccharose (mM) | 50 | | |
| pénicilline (UI/ml) | 100 | - | 50 |
| streptomycine (µg/ml) | 100 | - | 50 |
| collagénase IA (UI/ml) | - | 300 | - |
| sérum de veau fœtal | - | - | 5 % |
| pH (ajusté avec du NaOH 1N) | 7,4 | | |

A.2 Mesures électrophysiologiques des courants Na⁺ par patch-clamp

A.2.1 Présentation de la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière

Pour enregistrer les courants Na⁺ des neurones DUM, nous avons eu recours à la technique du patch-clamp. Cette technique mise au point par Neher et Sakmann à la fin des années 70 fût améliorée par Hamill et collaborateurs en 1981. Le principe consiste à étudier les courants ioniques d'un ou plusieurs canaux ioniques, en isolant électriquement une portion de membrane. Pour ce faire, une pipette de patch est approchée délicatement à proximité de la membrane du neurone. Lorsque l'extrémité de la pipette atteint la membrane de la cellule, une pression négative est exercée pour créer une zone de forte résistance électrique entre la pointe de la pipette et la membrane de la cellule. Cette résistance, appelée résistance de scellement ou « seal », peut atteindre plusieurs gigaohms (10⁹Ω). Ainsi, la région de la membrane située sous la pointe de la pipette est isolée électriquement du reste de la cellule, c'est la configuration dite « cellule attachée » (Figure 38). Une aspiration supplémentaire à travers la pipette de patch-clamp est appliquée jusqu'à provoquer la rupture de la membrane afin d'obtenir la configuration dite « cellule entière » (Figure 38). A ce moment, une continuité physique et électrique est établie entre la pipette et le cytoplasme de la cellule. De plus, la composition du milieu intracellulaire est contrôlée *via* la composition de la solution contenue dans la pipette de patch.

A partir de la configuration « cellule entière », des variations du potentiel de la membrane ou des courants ioniques macroscopiques résultant de l'activité électrique de l'ensemble des canaux ioniques présents à la surface de la membrane peuvent être enregistrés respectivement dans des conditions de courant imposé ou de potentiel imposé, de telles sorte que :

$$I = N \times P_{o(t,V)} \times i \quad (1)$$

Où I est le courant macroscopique ; N, le nombre de canaux ; P_o, la probabilité d'ouverture d'un canal ionique à un instant t et à un potentiel V et i, le courant élémentaire qui traverse un seul canal ionique.

L'inconvénient majeur de cette configuration est la dilution des composants du milieu intracellulaire indispensable au bon fonctionnement des canaux ioniques (processus de « wash-out ») qui entraîne une réduction progressive de l'amplitude du courant au cours du temps (phénomène de « run-down »). Ainsi, pour contrer ce phénomène la solution du milieu intrapipette est enrichie en éléments énergétiques (e.g. ATP, GTP).

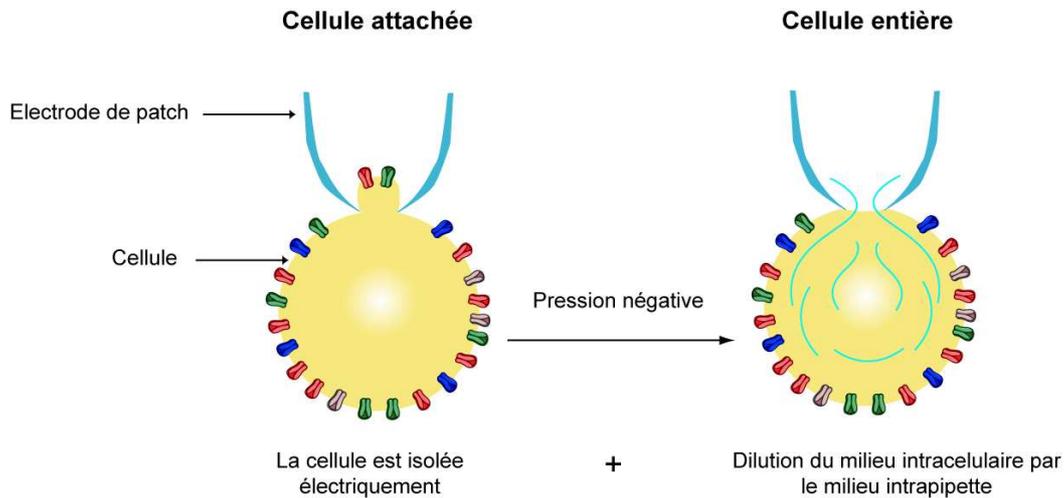


Figure 38 : Configurations d'enregistrement de la technique du patch-clamp.

Un ensemble de canaux ioniques et de récepteurs membranaires sont schématisés à la surface de la membrane.

A.2.2 Dispositif expérimental

Les boîtes de Pétri contenant les corps cellulaires des neurones DUM isolés sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, Rungis, France) déposé sur une table antivibratoire au centre d'une cage de Faraday. La pipette de patch est maintenue sur un porte-pipette fixé à la tête de l'amplificateur opérationnel (AOP). Cet ensemble pipette et tête de l'amplificateur est déplacé manuellement au dessus de la cellule. Un micromanipulateur piézo-électrique tridimensionnel (Burleigh TS-5000-150, Burleigh Instruments, New York, USA) permet d'ajuster finement la disposition de la pipette par rapport à la cellule.

Les pipettes utilisées sont étirées à partir d'un capillaire en verre borosilicaté (GC 150T-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) à l'aide d'une étireuse horizontale P-97 (Sutter instrument, Novato, US). La résistance de la pipette est ajustée entre 1,1 à 1,4 M Ω (pour l'enregistrement des potentiels d'action) et 0,8 et 1 M Ω (pour l'enregistrement des

courants Na^+). Lorsque la pipette est plongée dans la solution extracellulaire, un potentiel dit de jonction se crée en raison des différences de compositions ioniques entre les solutions. Ce potentiel est toujours annulé avant la formation du scellement.

La pipette est connectée *via* la tête de l'amplificateur à une des bornes de l'AOP (Axopatch 200A, Axon Instrument, Foster City, CA). Ce dernier est relié à :

- 1) un oscilloscope numérique (Nicolet 310, Nicolet instruments, Madison, USA) pour visualiser les signaux physiologiques,
- 2) un stimulateur programmable (SMP-310, Biologic, Claix, France) pour appliquer des stimulations électrique à la préparation
- 3) un ordinateur PC pour enregistrer les signaux *via* une interface (Digidata 1322 interface, Axon instruments, Foster City, US).

Les courants ioniques et les potentiels d'action sont enregistrés et mesurés à l'aide du logiciel pClamp10 (10.0.0., Axon Instruments, Foster City, USA). L'analyse des courants ioniques enregistrés est effectuée par l'intermédiaire du logiciel Clampfit (version 8.0.2, Axon instrument) et les données numériques sont analysées par le logiciel Prism (version 4.0, GraphPad, USA).

A.2.3 Composition et application des solutions

La composition des solutions extracellulaires et intrapipettes est déterminée de manière à pouvoir enregistrer soit l'activité électrique spontanée, soit les courants Na^+ (Tableau 21) (Lapied et coll., 1989, Lapied et coll., 1990, Laviaille-Defaix et coll., 2006). Pour isoler les courants Na^+ , les solutions comprennent notamment des ions non perméants aux canaux calciques (cadmium et césium) et des agents pharmacologiques inhibiteurs des canaux potassiques (Ex : 4-AP).

Tableau 21 : Composition des solutions extracellulaires et intrapipette utilisées lors des expériences de patch-clamp dans les conditions de courant imposé et de potentiel imposé.

* pH ajusté avec NaOH 1M, ** pH ajusté avec KOH 1M, *** pH ajusté avec CsOH 1M

| | Composition solution extracellulaire (mM) | | Composition solution intrapipette (mM) | |
|------------------|---|------|--|--------|
| Courant imposé | NaCl | 200 | K-aspartate | 160 |
| | KCl | 3,1 | K-fluorure | 10 |
| | MgCl ₂ | 4 | NaCl | 10 |
| | CaCl ₂ | 5 | MgCl ₂ | 1 |
| | HEPES | 10 | CaCl ₂ | 0,5 |
| | pH | 7,4* | EGTA | 10 |
| | | | HEPES | 10 |
| | | | ATP-Mg | 1 |
| | | pH | 7,4** | |
| Potentiel imposé | NaCl | 80 | CsCl | 90 |
| | TEA-Cl | 100 | CsF | 70 |
| | KCl | 3,1 | NaCl | 15 |
| | CaCl ₂ | 2 | MgCl ₂ | 1 |
| | MgCl ₂ | 7 | EGTA | 5 |
| | CdCl ₂ | 1 | HEPES | 10 |
| | 4-AP | 5 | ATP-Mg | 3 |
| | HEPES | 10 | pH | 7,4*** |
| | pH | 7,4* | | |

Les solutions extracellulaires sont appliquées par perfusions gravimétriques multicanaux.

A.2.4 Protocoles de stimulation et analyse des données

Lors de l'établissement de la configuration entière, le potentiel imposé à la cellule est ajusté de telle sorte que les canaux Na⁺ des neurones DUM soient tous fermés et activables, soit un potentiel de maintien de -90 mV (Lapied et coll., 1989, Lapied et coll., 1990, Laviaille-Defaix et coll., 2006).

(a) Courbe courant-potentiel

Pour déterminer l'évolution de l'amplitude du courant Na⁺ en fonction du potentiel de la membrane, nous établissons une courbe courant-potentiel, encore dénommée I/V. Pour ce faire, à partir du potentiel de maintien, les canaux Na_v sont stimulés en appliquant des chocs dépolarisants d'une durée de 30 ms jusqu'à +10 mV avec des incréments de 10 mV. Les valeurs de courants sont normalisées par rapport à l'amplitude maximale du courant

obtenue (I_{max}). La courbe I/V des courants Na^+ des neurones DUM est alors ajustée selon l'équation de Stühmer (Lapied et coll., 1990) :

$$I_{Na} = G * (1 - (1 / (1 + \exp((V - V_{0,5}) / K)))) * (V - V_{rev})$$

Où G est la conductance, V le potentiel testé, $V_{0,5}$ le potentiel pour lequel la moitié des canaux sont ouverts, K la constante d'activation et V_{rev} le potentiel d'inversion.

(b) Mesure de l'activation à l'état stable

L'activation à l'état stable est déterminée selon un protocole analogue à celui employé pour déterminer la courbe I/V . Dans un premier temps, nous avons déterminé la conductance (G) des canaux Na_v pour chaque potentiel testé à partir de la formule :

$$G = I / (V - V_r)$$

Où I est l'intensité du courant relevé pour un potentiel donné V , et V_r est le potentiel d'inversion, c'est-à-dire le potentiel pour lequel la courbe I/V coupe l'axe des abscisses.

Puis les conductances sont normalisées (G/G_{max}) et la courbe d'activation est analysée à partir de l'équation de Boltzmann :

$$m_{\infty} = 1 / (1 + \exp[(V_{0,5} - V) / K])$$

où V est le potentiel testé, $V_{0,5}$ le potentiel pour lequel 50% des canaux sont activés et K le facteur de pente.

(c) Mesure de l'inactivation à l'état stable

L'inactivation à l'état stable est déterminée à partir d'un protocole à double choc. Le principe consiste à appliquer un premier choc d'une durée de 500 ms entre -100 mV et +40 mV par décrétement de 10 mV. Après ce premier choc, le potentiel de la membrane est rétabli à -90 mV pendant 1 ms, puis un second choc jusqu'à 0 mV est appliqué pendant une durée de 30 ms. Plus le potentiel du premier choc est dépolarisant, plus le nombre de canaux Na_v à l'état inactivé augmente, et plus le courant Na^+ mesuré lors du second choc diminue.

A partir des familles de courants enregistrées lors du second choc, les courants sont normalisés par rapport à I_{max} . La courbe de l'inactivation à l'état stable est analysée à partir de l'équation de Boltzmann :

$$I/I_{max} = 1/(1+\exp((V-V_{0,5})/k))$$

où I est le courant sodium, I_{max} le courant au pic obtenu à $-100mV$, $V_{0,5}$ est le potentiel pour lequel la moitié des canaux sodium sont inactivés et K correspond au facteur de pente.

A.3 Conception des oligonucléotides antisens

Afin d'évaluer la fonctionnalité des variants identifiés dans la chaîne nerveuse de *P. americana*, nous avons souhaité inhiber l'expression des isoformes de canaux Na_v , exprimés dans les neurones DUM par une stratégie dite des oligonucléotides antisens (AS). Le principe de cette méthode consiste à transfecter des cellules avec de courtes séquences d'acides désoxyribonucléiques complémentaires d'un ARN cible. La liaison, par hybridation spécifique de l'AS avec l'ARNm, interrompt la traduction de la protéine codée et/ou conduit à la dégradation des ARNm par la ribonucléase H (Myers et coll., 2000). Cette méthode a notamment été employée pour étudier l'implication des sous-unités $Na_v1.6a$, $Na_v1.3$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.2$ dans la modulation des fonctions physiologiques de neurones de vertébrés (Brinkmeier et coll., 1997, Keller et coll., 2000, Lindia et coll., 2005, Pineda et coll., 2006). La technique des AS s'est aussi avérée efficace pour caractériser les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des récepteurs nicotiques nAChR de neurones de *Manduca sexta* et des canaux calciques dépendant du potassium (pSlo) des neurones DUM de *P. americana* (Fickbohm et coll., 2003, Gautier et coll., 2008).

Les AS ont été conçus pour s'hybrider au niveau du codon d'initiation et de la boucle intracellulaire L1 des transcrits *PaNa_v* (Tableau 22). Les AS comportent 15 pb, taille avérée idéale pour permettre leur pénétration dans la cellule tout en conservant leur affinité et spécificité pour le gène ciblé (Myers et coll., 2000). Des séquences nucléotidiques ne ciblant pas les transcrits *PaNa_v* ont été utilisés comme témoin négatif pour confirmer qu'aucun effet n'est dû à la nature physique des oligonucléotides. Plus précisément, il s'agit de séquences complémentaires des AS ciblant le gène *pslo* ré-écrite dans le sens contraire, autrement nommées « reverse anti-sens » [RAS1 (5'-TACAGCTTGACACTC-3'), RAS2 (5'-

CTCTACTGTAGCCAC-3'), RAS3 (5'-AGTGGTCCGCTTCTA-3')] (Gautier et coll., 2008) (Europrim, Invitrogen™, Cergy Pontoise, France).

Tableau 22 : Séquences nucléiques des oligonucléotides complémentaires à l'ARNm du gène *PaNa_v*, conçus pour la technique dite des oligonucléotides antisens.

| Région ciblée | Nom du mélange | Nom | Séquence nucléique |
|---------------|----------------|-------|------------------------|
| N terminale | N-AS | NAS1 | 5'-CGAATCGTCCGGACAT-3' |
| | | NAS2 | 5'-CTCTGATATGGACGA-3' |
| Boucle L1 | L1-AS | L1AS1 | 5'-CTCTGATATGGACGA-3' |
| | | L1AS2 | 5'-TTCACACTTCCGCC-3' |
| | | L1AS3 | 5'-AATGCTCATCTTCTC-3' |

Les neurones DUM sont incubés avec un mélange de deux ou trois séquences ciblant respectivement l'extrémité amino-terminale et la boucle extracellulaire L1 (10 µM/AS) directement dans le milieu de culture pendant une durée de 48 heures (Tableau 22).

A.4 Approche microscopique : étude de la transfection des antisens dans le neurone DUM

La pénétration des AS dans les neurones DUM est un phénomène qui n'a pas encore été décrit. Nous avons alors souhaité contrôler la transfection des AS dans les neurones DUM par microscopie confocale. Pour ce faire, nous avons utilisé un oligonucléotide AS modifié avec un fluorochrome ALEXA 555 en position 3' (5'-CTCACAGTTCGACAT-3'), soit l'AS-alexa, dont l'activité biologique a été démontrée précédemment par Gautier et coll. 2008. Les neurones DUM sont isolés selon le protocole de dissociation décrit précédemment (A1). Le milieu physiologique LPC3 employé lors de la dissociation mécanique (Tableau 20) est enrichi avec l'AS-alexa à une concentration de 10µM finale. Etant donné que les AS-alexa sont photosensibles, la dissociation mécanique est réalisée dans la semi-obscurité. Les neurones DUM isolés sont mis en culture dans des chambres adaptées montées sur lame (Lab-Tek™, Nalg Nunc International, USA). Après 24 ou 48 heures d'incubation à l'obscurité à 29°C, le milieu de culture contenant les AS-alexa est délicatement prélevé, puis les neurones sont rincés deux fois pendant 5 minutes avec le milieu physiologique LPC1 (Tableau 20). Les corps cellulaires sont ensuite fixés pendant 10 minutes avec une solution de 2% de paraformaldéhyde contenant 5% de saccharose préparé dans un tampon phosphate salin PBS (NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 3mM pH 7.4). Puis trois bains de 5 minutes avec le tampon PBS sont réalisés pour

rincer les cellules fixées. Les cloisons formant les chambres sont détachées des lames. Quelques gouttes d'une solution de tampon PBS enrichie avec 10% de glycérol sont déposées sur les lames avant la mise en place d'une lamelle de verre pour une meilleure adhésion. Un microscope confocale (FluoView, Olympus) muni d'une caméra permet de localiser les AS-alexa par émission de fluorescence avec un laser He-Ne (543 nM). Les microphotographies sont analysées avec le logiciel ImageJ.

B Expression de canaux Na_v recombinants dans des ovocytes de xénope et mesure électrophysiologique des courants Na^+ en potentiel imposé par la technique de double-microélectrodes intracellulaires

Afin de caractériser les propriétés fonctionnelles des sous-unités des canaux Na_v de *P. americana*, nous avons eu recours à un système d'expression de protéines hétérologues classique, à savoir l'ovocyte de xénope. L'intérêt des ovocytes de xénope comme système d'expression des protéines réside dans leur taille importante (1-1.2 mm de diamètre), la possibilité de les obtenir en grande quantité, leur pauvreté en canaux endogènes, et leur très forte capacité d'expression protéique. En effet, le principe consiste à injecter dans l'ovocyte de xénope des acides nucléiques recombinants. La traduction et la maturation des protéines sont alors contrôlées par la machinerie cellulaire de l'ovocyte. Les protéines membranaires, telles que les canaux ioniques et récepteurs, sont insérées dans la membrane de l'ovocyte. L'activité électrique de l'ensemble des protéines exprimées à la surface membranaire peut alors être mesurée par la technique de double-microélectrodes intracellulaires.

Plusieurs sous-unités de canaux Na_v recombinantes d'insecte ont été employées : DmNav1/pcDNA3 13-5 (don de Dr. Jeffrey Warmke, Merck Research Laboratories, Rahway, Etats-Unis) et DmTEH1/pGEMHE (don de Dr. Christian Derst, Institut de Neuroanatomie Intégrative, Berlin, Allemagne).

B.1 Préparation des ARN complémentaires (ARNc)

Les ADNc clonés dans le vecteur d'expression pGEM Hejuel ont été linéarisés avec la restrictase NotI (Invitrogen) (Matériels et Méthodes/Chapitre 2/H.2.2b/Figure 35). Des ARNc ont été synthétisés *in vitro* à l'aide du kit T7 mMessage mMachin[®] (Ambion[®] Europe, Huntingdon, Royaume Uni). Brièvement, la séquence du promoteur T7 localisé en 5' de l'ADNc est reconnue par l'ARN polymérase du kit. La transcription est réalisée, selon les instructions du kit, pendant une heure à 37°C pour les ADNc codant les sous-unités auxiliaires. Cette durée est multipliée par deux pour les ADNc codant les sous-unités principales en raison de leur haut poids moléculaire. Une structure analogue à la structure CAP est incorporée en 5'. Les ARNc sont purifiés à l'aide du kit MegaClear (Ambion[®] Europe), et quantifiés par spectrophotométrie comme décrit précédemment (Matériels et Méthodes/Chapitre2/B.1). La concentration finale des ARNc est ajustée à 0,2 µg/ml. Ces derniers sont conservés à -80°C.

B.2 Prélèvement et défolliculation des ovocytes

Les xénopes, *Xenopus laevis*, sont anesthésiés par immersion dans un bain de méthanesulfonate de tricaine (MS-222) à 0,15% pendant 40 minutes. Après incision de l'abdomen, les fragments ovariens sont délicatement prélevés à l'aide de pince. La plaie est soigneusement recousue à l'aide de fil chirurgical auto-résorbable, monté sur une aiguille courbe (Ethicon Vicryl, Ethicon, Issy les Moulineaux). Les fragments ovariens sont rincés avec une solution de SOS (Standard Oocyte Saline) normale (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES ; pH 7,5). Puis, les ovocytes subissent un traitement enzymatique avec de la collagénase IA [2 mg/ml] (Sigma) diluée dans une solution de SOS dépourvue de calcium, pendant 10 à 15 minutes. A l'issue de ce traitement, les enveloppes folliculaires sont suffisamment fragilisées pour libérer manuellement, sous loupe binoculaire, les ovocytes ainsi défolliculés.

B.3 Injection des ARNc dans l'ovocyte de xénope

Les ARNc codant les sous-unités α et β de canaux Na_v , sont injectés simultanément dans le cytoplasme des ovocytes, à l'aide d'un nanoinjecteur automatique (Nanoject II, Drummond Scientific, Etats Unis). Le rapport des concentrations entre les sous-unités principales et les sous-unités auxiliaires est de 1 :1. Au total, entre 9 et 27 nl d'ARNc sont injectés, soit 3 à 25 ng d'ARNc par ovocyte. Les ovocytes sont incubés au minimum 72 heures à température ambiante pour permettre la traduction ainsi que l'assemblage et l'insertion membranaire des protéines synthétisées. Le milieu d'incubation est constitué de SOS autoclavé et supplémenté de pénicilline (100 U/ml), de streptomycine (100 mg/ml), de gentamycine (50 mg/ml) et du pyruvate de sodium (2,5 mM). A l'issue de cette incubation, l'intensité des courants Na^+ mesure entre 0,4 et 2 μA . Ce milieu est changé tous les deux jours.

B.4 Mesure des courants Na^+ par la technique de double micro-électrodes intracellulaires

Les ovocytes sont maintenus part des minutes au centre d'une cuve. Ils sont délicatement empalés avec deux microélectrodes en verre borosilicaté, préalablement étirées (Narishige, Japon). La première électrode (Harvard Apparatus, 0,5 M Ω à 2 M Ω) permet la mesure du potentiel de membrane de l'ovocyte (V_m), et la seconde (Clark Electromedical Instrument, Phymep, France, 2 à 5 M Ω) sert à injecter un courant dans la cellule afin de maintenir le potentiel imposé par l'expérimentateur. Les électrodes sont remplies de KCl 3 M et reliées à une tête d'amplificateur (Axon headstage, Axon instruments, Foster City, USA). Un convertisseur courant-potentiel Digidata 1320A permet d'appliquer des protocoles de stimulation et d'enregistrer les courants Na^+ via la logiciel pClamp, comme décrit précédemment pour la mesure des courants Na^+ de neurones DUM (Matériels et Méthodes/Chapitre 3/A.2.4).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 1. ETUDE DES CANAUX SODIUM DE LA BLATTE *P. AMERICANA* PAR UNE APPROCHE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Rappelons que l'objectif de recherche est de caractériser les sous-unités α et β des canaux Na_v exprimés dans le SNC de la blatte *P. americana* au niveau tissulaire (chaîne nerveuse¹⁵ (CN)), subtissulaire (dernier ganglion abdominal (DGA)) et cellulaire (neurones DUM). L'approche par biologie moléculaire nous a permis :

- d'isoler les ADNc codant la totalité du cadre ouvert de lecture de la sous-unité principale et d'une sous-unité auxiliaire,
- d'apprécier la diversité moléculaire des transcrits codant des sous-unités α et β dans la CN, le DGA et les neurones DUM,
- de caractériser un nouveau gène codant une sous-unité α apparentée aux Na_v d'insecte,
- d'étudier les relations phylogénétiques entre les sous-unités principales et auxiliaires des canaux Na_v d'insecte.

¹⁵ Par « chaîne nerveuse » (CN) nous entendons les 3 ganglions thoraciques et 6 ganglions abdominaux.

A Clonage de l'ADNc codant la sous-unité α des canaux Na_v de la blatte *Periplaneta americana*

A.1.1 Stratégie de clonage de l'ADNc codant la sous-unité α du canal Na_v par une approche séquentielle

(a) Caractérisation de fragments d'ADNc chevauchants

Le cadre ouvert de lecture codant les sous-unités principales des canaux Na_v d'insecte est de taille importante (~6 kb) (Introduction/Chapitre 1/C.1/Tableaux 2 et 3). Pour cloner les ADNc codant le cadre ouvert de lecture de ce gène chez *P. americana*, nous avons eu recours à une stratégie consistant à isoler, de manière séquentielle, des régions chevauchantes. Ainsi, neuf réactions de PCR avec des paires d'oligonucléotides dégénérés ciblant des régions conservées parmi les gènes orthologues à *DmNa_v1* ont été opérées (Figure 39). Les régions 5' et 3' non codantes ont été obtenues par la technique de RACE-PCR.

En fonction des couples d'oligonucléotides dégénérés employés, les tailles des produits de PCR obtenus sont variables et en accord avec ce que l'on peut attendre pour des canaux Na_v (Figure 39). Une recherche de type BLASTP dans la banque de données GenBank, à partir des séquences protéiques déduites des ADNc de chaque produit de PCR cloné, a permis de montrer que les transcrits isolés partagent la plus forte identité de séquence protéique avec les régions homologues des sous-unités de canaux Na_v d'insectes (Tableau 23). Les plus fortes identités de séquence protéique sont partagées entre les isoformes de *P. americana* et de *B. germanica*, espèces appartenant au même ordre des *Blattaria* (Tableau 23). Pour cette raison, nous avons par la suite utilisé la séquence de BgNa_v1 (U73583) comme référence.

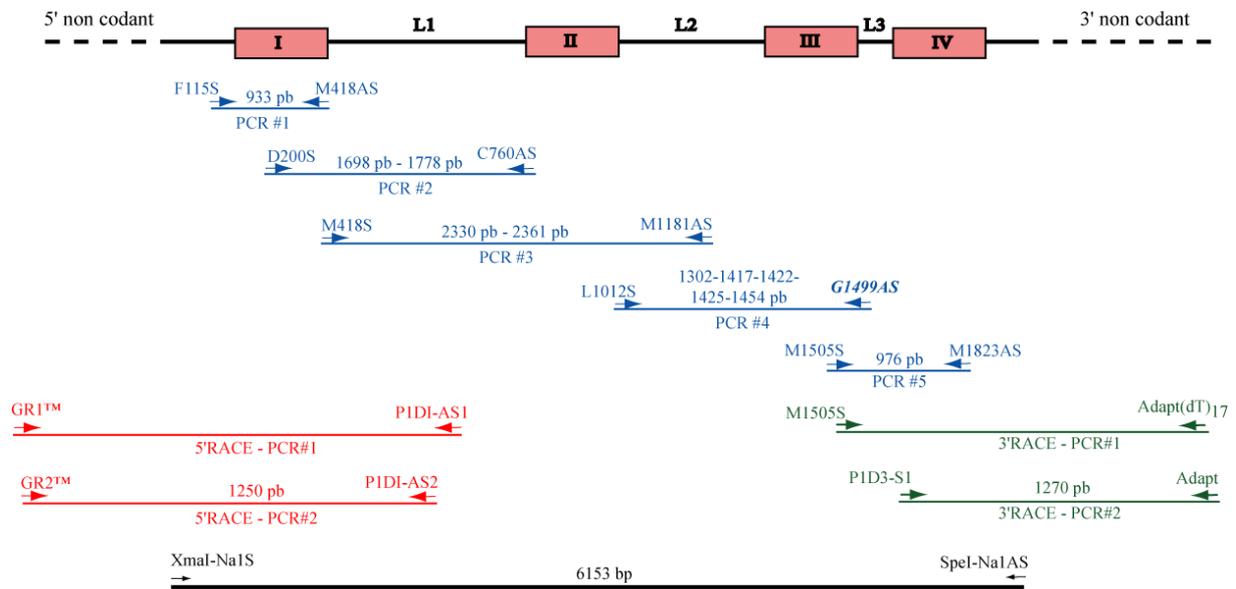


Figure 39 : Stratégie de clonage des ADNc codant la sous-unité α du canal Na_v de *P. americana* par RT-PCR.

Les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires de la sous-unité α sont représentés par des rectangles et des traits horizontaux, respectivement. Les régions 5' et 3' non codantes sont représentées par des traits en pointillés. En bleu sont indiquées les PCR réalisées avec des paires d'oligonucléotides dégénérés. L'oligonucléotide G1499AS indiqué en caractères gras est quant à lui un oligonucléotide spécifique. En rouge et vert figurent respectivement les amplifications des régions 5' et 3' non codantes par la technique de RACE-PCR. En noir est mentionné le transcrit *PaNa_v1* codant le cadre ouvert de lecture. La taille des produits de PCR obtenus est indiquée en paire de base (pb).

Les identités de séquence protéique les plus élevées concernent les régions correspondant à des domaines transmembranaires (PCR#1 [72 à 89%] et PCR#5 [74 à 83%]) (Tableau 23). Au contraire, les identités de séquence protéique les plus faibles sont associées aux boucles intracellulaires L1 et L2 (PCR#2, PCR#3 et PCR#4). Ces résultats confirment que la divergence entre les sous-unités α de canaux Na_v d'insecte est plus élevée au niveau des boucles L1 et L2 comparativement aux domaines transmembranaires.

Tableau 23: Identités de séquence protéique partagée entre les clones obtenus avec les PCR#1 à PCR#5 et les régions homologues des sous-unités α des canaux Na_v de plusieurs espèces d'insecte.

| | 5'RACE-PCR (PCR#2) | PCR#1 | PCR#2 | PCR#3 | PCR#4 | PCR#5 | 3'RACE-PCR (PCR#2) |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------------|----------------|------------------------------|------------|------------------------|
| Région ciblée | N terminal-IS2 | Fin N terminal – IS6 | IS3 – linker 1 | IS6 – linker 2 | Linker 2 – III boucle P | IIIS6-IVS6 | IV Boucle P-C terminal |
| Taille des ADNc isolés (pb) | 553 et 586 | 933 | 1698 et 1778 | 2330 et 2361 | 1302, 1417, 1422, 1425, 1454 | 976 | 594 |
| Identité protéique (%) | [67 à 92] | [72 à 89] | [58 à 76] | [58 à 80] | [58 à 83] | [74 à 83] | [53 à 73] |

Les espèces d'insecte considérées sont *A. aegypti*, *A. gambiae*, *A. mellifera*, *B. germanica*, *B. mori*, *C. pipiens*, *Drosophila melanogaster*, *C. lectularius*, *H. virescens*, *L. decemlineata*, *M. domestica*, *N. vitripennis*, *P. humanus* et *T. castaneum*. Les identités de séquences protéiques sont mentionnées par un intervalle [minimum à maximum]. Les identités de séquences protéiques sont toutes maximales entre les régions homologues de *P. americana* et *B. germanica*.

(b) Caractérisation de la région 5' des canaux Na_v de *P. americana*

Les informations de séquence obtenues à l'issue de la PCR#2 ? nous ont permis de concevoir deux oligonucléotides antisens P1DI-AS1 et P1DI-AS2 ciblant la boucle intracellulaire L1. Ces oligonucléotides ont été utilisés pour réaliser une PCR emboîtée amplifiant la région 5' du canal Na_v de *P. americana* par la technique de la RLM RACE-PCR. L'alignement des séquences nucléiques obtenues après clonage des produits de la PCR#2 (clones N1, N2 et N3) nous a permis de caractériser la région 5' des canaux Na_v de *Periplaneta americana*. Les séquences contiennent une partie non codante et le début du cadre ouvert de lecture des canaux Na_v . Le peptide signal a été identifié par homologie de séquence protéique avec celui des canaux Na_v d'insecte (Figure 40). Les ADNc N1 et N2 codent chacun une région de 184 résidus d'acides aminés partageant 73% d'homologie avec la région 5' homologue de BgNa_v1 (Tableau 23). L'ADNc N3 code un exon supplémentaire partageant une forte homologie de séquence protéique avec l'exon alternatif J de BgNa_v1 (73%). Les clones N1, N2 et N3 codent une région 5' non codante identique comportant 434 pb (Figure 40). Par ailleurs, le clone N1 se distingue car il contient 191 pb supplémentaires par rapport aux clones N2 et N3. Les séquences nucléiques différenciant le clone N1 des clones N2 et N3 divergent de 51%.



Figure 40: Structure des ADNc isolés codant la région 5' terminale des canaux Na_v de *Periplaneta americana*.

Les régions 5' non codantes sont représentées par des traits pleins et les régions codantes par un cadre. Les séquences 5' non codantes divergentes entre les clones N1, N2 et N3 sont différenciées en rouge et vert, respectivement. L'exon J caractérisant le transcrite N3 est indiqué par un cadre bleu.

Par comparaison, les ADNc isolés correspondant à la région 5' non codante des gènes *DmNa_v1*, *BgNa_v1*, *CINa_v1* et *VmNa_v1* contiennent 271 pb, 555 pb, 186 pb et 205 pb respectivement (Loughney et coll., 1989, Dong, 1997, Wang et coll., 2003a, Yoon et coll., 2008). Cependant, étant donné la taille importante des transcrits codant des canaux Na_v d'insecte (~12kb estimé par la technique de Northern Blot), il a été supposé que la taille de la région 5' non codante est en réalité bien supérieure à la taille des transcrits isolés par les techniques classiques de RACE-PCR (Dong, 1997). Ceci indique que malgré toutes les précautions prises pour préserver l'intégrité des ARN totaux, ces derniers sont fragilisés par les conditions expérimentales.

Par ailleurs, c'est la première fois que deux types d'ADNc distincts codant des régions 5' non codantes des canaux Na_v d'insecte sont mentionnés dans la littérature. Mais alors comment expliquer l'origine de cette diversité au niveau de la région 5' non codante des canaux Na_v de *P. americana*? Plusieurs hypothèses sont envisageables. La première hypothèse formulée est que la région 5' non codante des canaux Na_v de *P. americana* est polymorphe. En effet, les ARN totaux sont purifiés à partir de sept individus. De plus, il a été montré que la région du promoteur du gène humain *hNa_v1.5* est sujette à un polymorphisme (Yang et coll., 2004). Cette région polymorphe est par ailleurs impliquée dans la régulation de l'expression du gène *hNa_v1.5* et est associée aux arythmies cardiaques. La seconde hypothèse est qu'il existe des exons alternatifs au niveau de la région 5' non codante des canaux Na_v de *P. americana*. Pour valider cette hypothèse il faudrait comparer les séquences des clones N1, N2 et N3 à la séquence de clones supplémentaires. De plus, cette hypothèse corrobore une étude dans laquelle il a été montré que la région 5' non codante du gène murin *mNa_v1.5* contient trois exons alternatifs (1A, 1B et 1C) exprimés en fonction des stades de développement (Shang et coll., 2005). Il a aussi été montré que les exons 1A et 1C sont associés à des éléments stimulateurs de la traduction. Par conséquent,

il est tout à fait concevable que la traduction des transcrits codant des sous-unités α de canaux Na_v soit régulée d'une manière analogue chez *P. americana* via la région 5' non codante.

(c) **Caractérisation de la région 3' des canaux Na_v de *P. americana***

A partir des informations de séquence obtenues à l'issue de la PCR#5 nous avons conçu un oligonucléotide spécifique sens P1D3-S1 ciblant la région du pore du domaine 4 (Figure 41). La région 3' du canal Na_v de *P. americana* a été isolée après une PCR emboîtée selon la technique de la RACE-PCR. Les ADNc isolés, nommés C1 et C2, incluent 594 pb de la région 3' codante et 676 pb de la région non codante (Figure 41). Au regard de la littérature, la taille de la région 3' non codante des transcrits C1 et C2 est sous-estimée. En effet, la région 3' non codante isolée des gènes *DmNa_v1*, *BgNa_v1* et *VmNa_v1* compte 7 kb, 1,5 kb et 1,2 kb respectivement (Figure 41) (Dong, 1997, Wang et coll., 2003a, Song et coll., 2007). Par ailleurs, l'extrémité de la région 3' non codante est pourvue de la queue de poly-adénylation (poly(A)) qui compte jusqu'à 19 adénosines pour le clone C2. Cependant, les séquences ne possèdent pas le signal consensus de polyadénylation AATAAA.

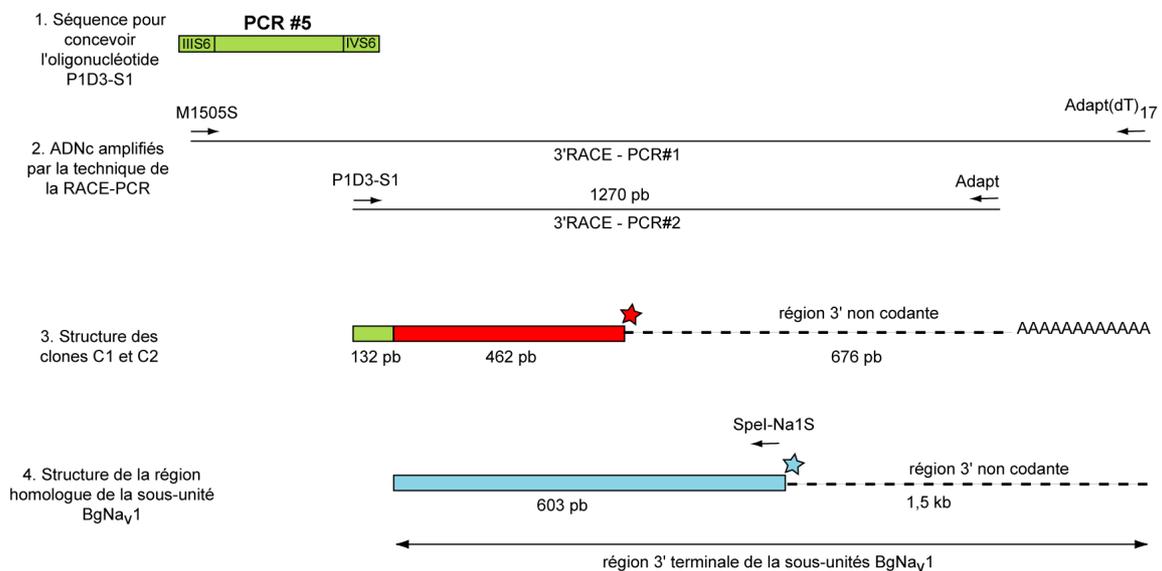


Figure 41 : Comparaison de la structure des clones C1 et C2 avec la région homologue de la sous-unité BgNa_v1 de *Blattella germanica*.

Les régions codantes sont représentées par des rectangles et les régions non codantes par des traits pointillés. Les codons stop sont indiqués par une étoile. La séquence des produits de la PCR#5 a permis de concevoir l'oligonucléotide spécifique P1D3-S1. La séquence des clones C1 et C2 code le segment IVS6, l'extrémité carboxy-terminale ainsi qu'une région non codante. L'oligonucléotide ciblant la queue poly-A est identifié sur les clones C1 et C2. L'extrémité 3' terminale de la sous-unité BgNa_v1 de taille plus importante que l'extrémité 3' des clones C1 et C2. Elle a permis de concevoir l'oligonucléotide SpeI-Na1S.

L'identité de séquence protéique partagée entre les séquences protéiques déduites de la région codante des clones C1 et C2 et la région homologue de la sous-unité BgNa_v1 est de 73% (Tableau 23). Mais l'alignement des séquences protéiques déduites souligne la taille réduite de l'extrémité 3' terminale de la région codante de C1 et C2 (Figure 41). En effet, celle-ci code 47 résidus d'acides aminés en moins par rapport à la région homologue de BgNa_v1, séquence de référence (Figure 41). Ce résultat suggère l'existence d'une extrémité carboxy-terminale courte chez *P. americana*. Comparativement, au niveau de l'extrémité carboxy-terminale du gène VmNa_v de *Varroa destructor*, un exon optionnel de 210 pb code un codon stop prématuré écourtant de 45 résidus d'acides aminés la sous-unité VmNa_v1 (Wang et coll., 2003a). A partir de la séquence nucléique de la région codante des clones C1 et C2, nous avons conçu un oligonucléotide spécifique antisens pour amplifier la totalité des ADNc codant le cadre ouvert de lecture des canaux Na_v de *P. americana*. En dépit de plusieurs conditions de PCR, nous n'avons pas pu amplifier l'ADNc souhaité avec cet oligonucléotide ciblant l'extrémité carboxy-terminale courte. Il est donc probable que les clones C1 et C2 soient non représentatifs des canaux Na_v de *P. americana* et correspondent à un polymorphisme individuel que les conditions de RACE-PCR ont favorisées au détriment des autres séquences. Pour contourner cette difficulté nous avons alors conçu l'oligonucléotide SpeI-Na1AS à partir de la séquence nucléique codant l'extrémité 3' terminale de la sous-unité α de *B. germanica*, espèce dont les isoformes de canaux Na_v partagent le maximum d'identité de séquence protéique avec les canaux Na_v de *P. americana*.

Dans la littérature, l'amplification de la région 3' non codante des canaux Na_v par la méthode classique de RACE-PCR est connue pour être relativement délicate. En effet, elle s'est avérée incomplète ou sans succès pour les gènes *DmNa_v1*, *HvNa_v1* et *PxNa_v1* (Loughney et coll., 1989, Park et coll., 1999, Sonoda et coll., 2008b).

A.1.2 Amplification des ADNc codant la totalité du cadre ouvert de lecture de la sous-unité α des canaux Na_v de *P. americana*

Pour exprimer les canaux Na_v de *P. americana* dans un système hétérologue, nous avons tenté d'amplifier et de cloner les ADNc codant la totalité du cadre ouvert de lecture de la sous-unité α exprimée dans la chaîne nerveuse. Pour ce faire, les informations de séquences relatives aux régions 5' et 3' nous ont permis de concevoir des

oligonucléotides spécifiques ciblant les extrémités du cadre ouvert de lecture (Matériels et Méthodes/Chapitre 2/E.3).

L'amplification des ADNc de la chaîne nerveuse à partir des amorces spécifiques XmaI-Na1S et SpeI-Na1AS nous a permis d'obtenir des produits de PCR d'un poids moléculaire proche de 6 kb (Figure 42). Soixante douze clones ont été analysés par « colonies PCR » avec des amorces ciblant une région du domaine IV (amorces DIV-1S et DIV-3AS), et seulement trois se sont avérés positifs. L'analyse par carte de restriction des ADN plasmidiques purifiés à l'aide des endonucléases *Hind III*, *EcoRV*, *SpeI* et *EcoRI* a montré qu'un seul clone contenait la totalité du produit de PCR. Puis, l'analyse de la séquence nucléique a confirmé que la séquence des deux autres clones avait été remaniée (excision de 1340 pb en 3' ou insertion d'une région du vecteur au sein de l'insert).

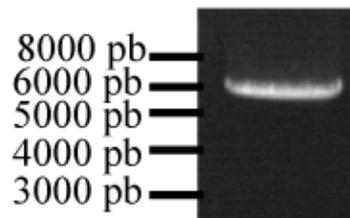


Figure 42: RT-PCR amplifiant à partir des oligonucléotides XmaI-Na1S et SpeI-Na1AS les ADNc exprimés dans la chaîne nerveuse de *P. americana*.

Les produits de PCR (10 μ l) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% TAE 0,5X. Une échelle de marqueurs de poids moléculaire est indiquée à gauche (1kb+, Invitrogen™).

Le clonage de l'ADNc codant le cadre ouvert de lecture des canaux Na_v d'insecte est reconnu critique dans la littérature. En effet, de part leur structure riche en séquences répétées, les canaux Na_v d'insecte s'avère toxiques pour les bactéries *E.coli* (Dong, 2003, Lee et coll., 2009). Pour se prémunir de cette toxicité, l'ADN plasmidique étranger à la bactérie est réarrangé ou excisé par des enzymes impliquées dans la recombinaison de l'ADN, ce qui altère l'intégrité des ADN recombinants. En dépit d'avoir employé des souches *E. coli* n'exprimant pas d'enzyme de recombinaison (MAX Efficiency®Stbl2™), les inserts se sont avérés instables. De plus, la température de culture des bactéries transformées était ajustée à 30°C afin de limiter toutes autres réactions enzymatiques pouvant dégrader les ADN recombinants. Nous avons alors tenté de remédier à cette toxicité en clonant des produits de PCR dans des vecteurs à faible copie, limitant ainsi l'accumulation de produit du gène étranger. Mais les résultats furent sans succès.

L'analyse de la séquence nucléique du transcrit complet a permis de mettre en évidence que le cadre ouvert de lecture contient 6153 pb et code une protéine de 2051

résidus d'acide aminés. Cette taille de transcrit est toute à fait conforme à celle des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte (Introduction/Chapitre 1/ C.1.4/ tableau 3). Ainsi, en accord avec la nomenclature des canaux Na_v d'insecte cette sous-unité α du canal Na_v de *P. americana* a été nommée PaNav_v1 (numéro d'accès dans GenBank : GQ132119).

A.1.3 Analyse de la structure primaire de PaNav_v1

L'alignement multiple des séquences protéiques de PaNav_v1 et des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte met en évidence que PaNav_v1 partage la plus forte identité avec BgNav_v1 de *Blattella germanica* (92%) (Tableau 24). Ce résultat est en accord avec les résultats décrits précédemment et confirme que les sous-unités α des canaux Na_v des espèces de l'ordre *Blattaria* ont peu divergés au cours de l'évolution de ce taxon. Au contraire, l'identité de séquence la plus faible est partagée avec les sous-unités α des arachnides (de 54% à 57%) et du rat (42%) (Tableau 24).

Tableau 24 : Identité de séquences protéiques entre PaNav_v1 et les autres sous-unités α de canaux Na_v d'insectes et du rat rNav_v1.2.

| Ordre taxonomique | Blattaria | Diptera | | | | | | Hemiptera | |
|--|----------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Espèce | <i>Blattella germanica</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Musca domestica</i> | <i>Anopheles gambiae</i> | <i>Aedes albopictus</i> | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Culex pipiens</i> | <i>Cimex lectularius</i> | |
| Sous-unité α | BgNav1 | DmNav1 | MdNav1 | AgNav1 | AalNav1 | AeNav1 | CpNav1.1 | CiNav1 | |
| % d'identité de séquence protéique avec PaNav1 | 92 | 75 | 75 | 78 | 74 | 78 | 77 | 78 | |
| Ordre taxonomique | Lepidoptera | Coleoptera | Hymenoptera | Phthiraptera | | Acari | Scorpion | Araneae | Rodentia |
| Espèce | <i>Bombyx mori</i> | <i>Tribolium castaneum</i> | <i>Apis mellifera</i> | <i>Nasonia vitrepenis</i> | <i>Pediculus humanus humanus</i> | <i>Varroa destructor</i> | <i>Mesobuthus martensis</i> | <i>Ornithoctonus huwena</i> | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Sous-unité α | BmNav1 | TcNav1.1 | AmNav1 | NvNav1 | PhhNav1 | VdNav1 | MmNav1 | OhNav1 | rNav1.2 |
| % d'identité de séquence protéique avec PaNav1 | 77 | 77 | 79 | 79 | 77 | 54 | 54 | 57 | 42 |

L'analyse du profil d'hydrophobie de PaNav_v1 prédit une topologie d'organisation membranaire classique pour les canaux Na_v qui se caractérise par la répétition en tandem de quatre domaines transmembranaires connectés par des boucles hydrophiles intracellulaires (Figure 43). De plus, chaque domaine est composé de 6 segments hydrophobes (hélices α S1 à S6) et d'une boucle P plus hydrophile entre les segments S5 et S6. L'indice d'hydrophobie relatif au segment S5 du domaine III est très faible comparativement à l'indice d'hydrophobie des autres segments S5. Or d'après l'échelle de Kyte et Doolittle, le segment S5 du domaine III de PaNav_v1 ne comporte pas plus de résidus d'acides aminés avec un indice d'hydrophobie négatif comparativement aux autres segments S5. Le calcul de l'index d'hydrophobie à partir de plusieurs tailles de fenêtre ne modifie pas significativement la prédiction du profil d'hydrophobie de PaNav_v1. De plus, le profil d'hydrophobie de la sous-

unité $DmNa_v1$ est équivalent à celui de $PaNa_v1$ à partir de l'échelle de Kyte et Doolittle. Par conséquent, il est fort probable que cette ambiguïté du segment IIIS5 soit inhérente à la méthode employée. Par ailleurs, les régions N et C terminales hydrophiles sont toutes les deux orientées vers l'intérieur de la membrane.

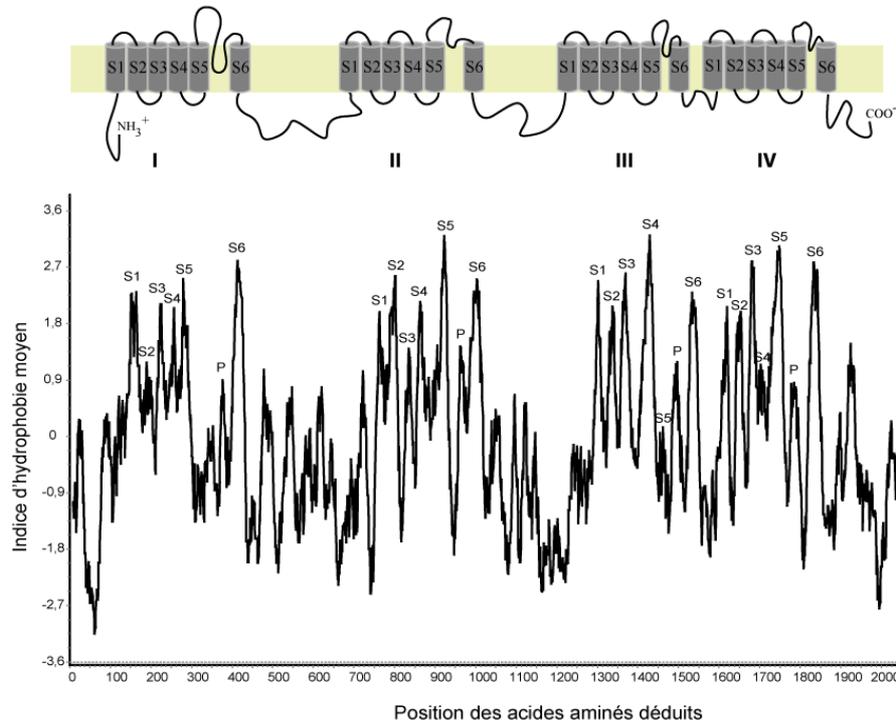


Figure 43 : Profil d'hydrophobie de $PaNa_v1$ réalisé à partir de la méthode Kyte et Doolittle (Kyte et coll., 1982).

Les résidus d'acides aminés sont représentés sur l'axe des abscisses, les indices d'hydrophobie sont mentionnés sur l'axe des ordonnées en raison d'une moyenne de 15 résidus d'acides aminés. Les segments transmembranaires sont caractérisés par des indices d'hydrophobie les plus élevés et sont mentionnés de S1 à S6. La boucle P du pore est caractérisée par un indice d'hydrophobie plus faible.

L'analyse de la séquence de $PaNa_v1$ montre que ce dernier présente toutes les caractéristiques des canaux Na_v : senseur de potentiel, filtre de sélectivité aux ions Na^+ et porte d'inactivation (Figure 44). Quatre, cinq, six et huit résidus chargés positivement (lysine (K) ou arginine (R)) sont alternés tous les 3 ou 4 résidus au niveau des segments IS4, IIS4, IIIS4 et IVS4 respectivement. Les boucles P formant le pore de $PaNa_v1$ comportent l'anneau interne DEKA (I : D387, II : E972 ; III : K1498, IV : K1791) et l'anneau externe EEQD (I : E390, II : E975 ; III : Q1502, IV : D1794) impliqués dans la sélectivité des canaux Na_v d'insectes aux ions Na^+ . Le linker 3 possède le tripeptide MFM qui permet aux canaux Na_v d'insectes de s'inactiver. Les résidus d'acide aminé constituant les sites récepteur du motif MFM lors de l'inactivation sont A1411, F1428, L1737, F1739, F1837 et V1847 (Goldin, 2003).

| | | |
|--------|---|------|
| PaNav1 | MSDSSSISEEERSLFRPFTRESLAAIEARIAEEYAKRKELEKKRAEGEGDS-GRKRKKKEVRYDDEDEDEGEPQDPATLE | 79 |
| DmNav1 | MTEDSDSISEEERSLFRPFTRESLVQIEQRIAAEHEKQKELERKRAEGEVPRYGRKKQKEIRYDDEDEDEGEPQDPPTLE | 80 |
| PaNav1 | QGAPIPVRMQGLFPPELASTPLEDIDPFYQNRFTFVVVSKGKDIRFSATEAMWILDPFNPIRRVAIYLLVHPLFSLFII | 159 |
| DmNav1 | QGVPIPVRLQGSFPPELASTPLEDIDPYNSVLTFFVVVSKGKDIRFSASKAMWMLDPFNPIRRVAIYLLVHPLFSLFII | 160 |
| PaNav1 | TTILTNCIFMIMPPTPTTIESTEVIIFTGIYTFESAVKVMARGFILQPFYLRDAWNWLDFFVVIALAYVTMGIDLGNLAALR | 239 |
| DmNav1 | TTILVNCILMIMPPTPTTVESTEVIIFTGIYTFESAVKVMARGFILCPFTYLRDAWNWLDFFVVIALAYVTMGIDLGNLAALR | 240 |
| PaNav1 | TFRVLRALKTVAIIVPGIKTIVGAVIESVKNLRLVILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCVKNFPSDGSWGNLTDENWF | 319 |
| DmNav1 | TFRVLRALKTVAIIVPGIKTIVGAVIESVKNLRLVILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCIKKFPLDGSWGNLTDENWD | 320 |
| PaNav1 | SFCSNKS HWYIPDDTIEYPLCGNSSGAGTCCPGYTCLQGFNDPNYGYTSFDTFGWAFLSAFRLMTQDYWENLYQLVLR | 399 |
| DmNav1 | YHNRSSN WYSEDEGISFPLCGNISGAGQCDDDYVCLQGFNPNYGYTSFDSFGWAFLSAFRLMTQDFWEDLYQLVLR | 400 |
| PaNav1 | AGPWHMLFFIVIIIFLGSFYLVSLILAVAMSYDELQKAE EEE EAA EEE EALREAE EEA RAKEAK---RARQADKEAAHAAG | 476 |
| DmNav1 | AGPWHMLFFIVIIIFLGSFYLVSLILAVAMSYDELQKAE EEE EAA EEE EALREAE EEA AKA KLEERANAQAQAADAAA | 480 |
| PaNav1 | LAQAA--AEVVKSPSGSSCLSYELFV-GQKGNADNNK EKMSIRSEEGDS-----ISEHRRIVGANGTAGVRKVSASLSL | 548 |
| DmNav1 | AEEAALHP EMAKSPT-YSCISYELFVGGKGNDDNNK EKMSIRSEVESESVSIQRQPAPTTAHQATKVRKVSITSLSL | 559 |
| PaNav1 | PGSDFNLRGRSRGSHQFP IRNGRGRFVGGDRKPLVLS TYLDAQEHLPHYADDSNAVTPMSEENGAIVPVYYANLGS | 628 |
| DmNav1 | PGSDFNIRGRSRSSH KYTIRNGRGRF-GIPGSDR KPLVLS TYQDAQHLPHYADDSNAVTPMSEENGAIVPVYYGNLGS | 638 |
| PaNav1 | HSSYTSHASRISYTSHGDL LGA---G GKPRTKESQLRTRSGRNNPSQLPNSTPYMSD-----DHKYMDASVSDDDGAVK | 699 |
| DmNav1 | HSSYTSHQSRISYTSHGDL LGGMAVMGVSTMTKESKLRNRNTRNQS VGATNGGTTCLDTNHKLDHRDYEIGLECTDEAGK | 718 |
| PaNav1 | AKHSDNPFIEQM QTTIVDMNDVMVLNDIEEQAAGRQSRASEQ-----DEDEGPTVKEKVLAI CLRGIDIFCVW | 770 |
| DmNav1 | IKHHDNPFIEPVTQTIVDMKDMVLNDIEEQAAGRHSRASDRGVS VYYPTE-----DDEDGPTFKDKALEVILKGDVFCVW | 798 |
| PaNav1 | DCCWLWLFQ EYVALLVDFPVELFITL CIVVNMLFMALDHYDMNKDMEKALKSGNYFF TATFAIEATLKL IAMS PKYYF | 850 |
| DmNav1 | DCCVWVLFQ EEWVSLIVDFPVELFITL CIVVNTMFAMADHDMNKEMERVLKSGNYFF TATFAIEATM KLMAMS PKYYF | 878 |
| PaNav1 | QEGWNI FDFIIVALSLLELGLGEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNL LISIMGR TVGALGNLTFVLCIIIFIFAVMG | 930 |
| DmNav1 | QEGWNI FDFIIVALSLLELGLGEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNL LISIMGR TMGALGNLTFVLCIIIFIFAVMG | 958 |
| PaNav1 | MQLFGKNYFDNVERFPDGDTPRWNFADFMHSMFIVFRVLCGEWIE SMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIIGNLVVNLFLAL | 1010 |
| DmNav1 | MQLFGKNYHDHDKDRFPDGDLP RWNFTDFMHSFMFIVFRVLCGEWIE SMWDCMYVGDVSCIPFFLATVVIIGNLVVNLFLAL | 1038 |
| PaNav1 | LLSNFGSSNLSAPTADNETNKIAEAFDRFSRLFNWIKRSALSVAKMLRAKLTNQISDQTPGEGPSS---SWKE----- | 1080 |
| DmNav1 | LLSNFGSSNLSAPTADNDTNKIAEAFNRIGRFKSWVKRNIADCFKLRNKL TNQISDQPSGERTNQISWIWSEKGVRCR | 1118 |
| PaNav1 | -DAHDRD TDLDLTADEI IADGMVYRDKKSPKQDTQLEVAIGDGMFTIHGDLKKNLKEDKLLMNNTK VIGNSFQGNHKDN | 1159 |
| DmNav1 | ISA EHGDNEL ELGHDEI LADGLI---KKG I KEQTQLEVAIGDGMFTIHGDMKN-----NK | 1171 |
| PaNav1 | RIENDYLHNRQEDTLSTRSYGSHKNRPFKDESHKGS AETMDGEGKKDASKEDLEQEGNAEEDGE GEGEGHLEEDMALDGG | 1239 |
| DmNav1 | PKKSKYLNNATDDDTASINSYGSHKNRPFKDESHKGS AETMEGEEKRDASKEDLGLDEELDEEGECEEGPLDGDII IHAH | 1251 |
| PaNav1 | TEDVMMSEYPADCCPEKCYRRFPFLAGDEDSPFWQGWGNLRLKTFQ LIENKYFETAVITMILLSSLALALEDVHLSYRPT | 1319 |
| DmNav1 | DEDI-LDEYPADCCPDSYKFPILAGDDSPFWQGWGNLRLKTFRLIEDKYFETAVITMILMSSLALALEDVHLPQRPI | 1330 |
| PaNav1 | LQDILYYMDRIFTVIFFLIEMLIKWLALGFKKYFTNACWCLDFVIVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRLRPLRAM | 1399 |
| DmNav1 | LQDILYYMDRIFTVIFFLIEMLIKWLALGFKVYLTNACWCLDFVIVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRLRPLRAM | 1410 |
| PaNav1 | SRMQGMRVVVNALVQAIPSI FNVLLVCLIFWLI FAIMGVQLFAGKYHKCVDGNSTTLSHEIIPDRNACIAENYTWENSPM | 1479 |
| DmNav1 | SRMQGMRVVVNALVQAIPSI FNVLLVCLIFWLI FAIMGVQLFAGKYFKCEDMNGTKLSHEIIPNRNACESENYTWVNSAM | 1490 |



Figure 44: Aligment des séquences protéiques des sous-unités PaNa_v1 et DmNa_v1.

L'alignement à été réalisé selon la méthode MUSCLE. Les espaces introduits pour optimiser l'alignement sont indiqués par des traits d'union. Les segments transmembranaires sont encadrés de différentes couleurs en fonction des domaines (DI : rouge ; DII : bleu, DIII : marron et DIV : violet). Les exons alternatifs sont encadrés en vert et nommés selon la nomenclature par une lettre. Les résidus d'acides aminés chargés positivement dans les segments S4 sont en jaune. Les résidus d'acides aminés formant les anneaux du filtre de sélectivité aux ions Na⁺ (DEKA et EEQD) sont colorés en bleu clair. Les résidus MFMT formant la boucle d'inactivation sont en orange et les résidus d'acides aminés déterminant le site récepteur sont mentionnés par un astérisque (*).

Le transcrit isolé PaNa_v1 est caractérisé par une combinaison de neuf exons (J, K, A, D, E, F, H, G¹¹²⁹, G1) partageant de 73 à 100% d'identité de séquence protéique avec les exons alternatifs décrits chez *D. melanogaster* et *B. germanica* (Tableau 24). Cette combinaison d'exons correspond au variant BgNa_v6 de la blatte adulte *B. germanica* (Song et coll., 2004). Par contre, cette combinaison d'exon n'a pas été observée parmi les variants de canaux Na_v isolés de *Musca domestica* (Lee et coll., 2002) et de *D. melanogaster* (Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). La glycine (G) en position 1129 au niveau de la séquence protéique de PaNa_v1 est l'homologue de la glycine épissée alternativement en position 1111 chez BgNa_v (Du et coll., 2009b). Ainsi, ces résultats suggèrent la conservation des sites d'épissage alternatif les gènes PaNa_v1 et BgNa_v1. Cette hypothèse renforce le degré de parenté élevé entre les canaux Na_v de *B. germanica* et *P. americana* au sein de l'ordre taxonomique des *Blattaria* (Résultats/Chapitre 2/Figure 54).

En conclusion, l'analyse détaillée de la structure primaire de PaNa_v1 et l'étude des liens de parenté par phylogénie nous permettent d'affirmer sans ambiguïté que PaNa_v1 est un canal Na_v classique. Dans la littérature, les seuls travaux similaires reportant le clonage d'un ADNc codant d'un seul tenant le cadre ouvert de lecture de la sous-unité α des canaux Na_v d'arthropodes ne concerne que *D. melanogaster*, *B. germanica* et *V. destructor* (Tan et coll., 2002b, Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Du et coll., 2009a, Lin et coll., 2009).

B Diversité moléculaire de la sous-unité α des canaux sodium exprimés dans la chaîne nerveuse

B.1 Caractérisation des exons alternatifs des sous-unités α

Le transcrit *PaNa_v1* contient neuf exons homologues aux exons alternatifs du variant *BgNa_v6* (Song et coll., 2004). De plus, la comparaison des séquences d'ADNc amplifiés au cours des PCR #2, #3 et #4 a permis d'identifier des exons alternatifs supplémentaires (Tableau 25). Il s'agit des exons optionnels I, B, E localisés au niveau des boucles intracellulaires L1 et L2 et de l'exon mutuellement exclusif G2 codant les segments IIIS3-S4. Les identités de séquence protéique partagées entre chacun des exons alternatifs identifiés et les exons homologues des gènes des autres sous-unités α de canaux Na_v d'insecte sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 25 : Identités de séquence protéique entre les exons alternatifs identifiés à partir du transcrit *PaNav_v1* et les exons alternatifs homologues de sous-unités α de canaux Na_v d'arthropode.

| Ordre taxonomique | Espèce | Localisation Exons alternatifs | Pourcentage d'identité de séquence protéique avec PaNav1 | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|--------|-----------|-----|---------|----|-----------|------|------|---------|------|------|
| | | | N terminal | IS2-S3 | Boucle L1 | | IIS4-S5 | | Boucle L2 | | | IIS3-S4 | | |
| | | | J | K | I | A | B | C | D | E | F | H | G1 | G2 |
| Diptera | <i>Domestica melanogaster</i> | DmNav1 | 57 | 83 | 4 | 81 | 87,5 | 98 | 96 | 31 | 0 | 43 | 100 | 89 |
| | <i>Musca domestica</i> | MdNav1 | 43 | 83 | 3 | 86 | 87,5 | 87 | 96 | 31 | 0 | 43 | 95 | 80 |
| | <i>Anopheles gambiae</i> | AgNav1 | 77 | 81 | 7,4 | 100 | 87,5 | 98 | 96 | - | 0 | 39 | 97,5 | 97,5 |
| | <i>Culex (pipiens)</i> | CpNav1 | 69 | 81 | 7,4 | 100 | 87,5 | 96 | 96 | 31 | 0 | 43 | 97,5 | 95 |
| | <i>Aedes aegypti</i> | AaNav1 | 69 | 81 | 7,4 | 100 | 87,5 | 98 | 96 | 31 | 0 | 43 | 97,5 | 95 |
| | <i>Aedes albopictus</i> | AalNav1 | 54 | 81 | 7,4 | 100 | 87,5 | - | 96 | 31 | - | 43 | 97,5 | - |
| Hymenoptera | <i>Apis mellifera</i> | AmNav1 | 61,5 | 88 | 0 | 95 | 75 | 98 | - | - | 61,5 | 42 | 97,5 | 97,5 |
| | <i>Nasonia vitripennis</i> | NvNav1 | - | 88 | 0 | 95 | 100 | 98 | - | - | 46 | 29 | 97,5 | 93 |
| Lepidoptera | <i>Bombyx mori</i> | BmNav1 | 54 | 84 | 18 | 100 | 87,5 | 94 | 96 | - | - | 25 | 95 | 85 |
| | <i>Heliothis virescens</i> | HvNav1 | 69 | 85 | - | 100 | 87,5 | 94 | - | - | - | 25 | 95 | - |
| Blattaria | <i>Blattella germanica</i> | BgNav1 | 61,5 | 99 | 66 | 86 | 100 | 98 | - | 90 | 92 | 80 | 100 | 100 |
| Hemiptera | <i>Cimex lectularius</i> | CiNav1 | 69 | 84 | 6 | 100 | 62,5 | 96 | - | 54,5 | - | 38 | 93 | - |
| Phthiraptera | <i>Pediculus humanus humanus</i> | PhhNav1 | 46 | 81 | 3,5 | 86 | 62,5 | 98 | 98 | - | 53 | 50 | 97,5 | - |
| Coleoptera | <i>Tribolium castaneum</i> | TcNav1 | - | 87,5 | 3,5 | 100 | 50 | - | 96 | 45 | 11 | 25 | 95 | - |
| Arachnida; Acari | <i>Varroa destructor</i> | VdNav1 | - | 65 | 0 | 86 | 87,5 | 93 | - | - | - | - | 80 | - |
| Arachnida; Scorpion | <i>Mesobuthus martensii</i> | MmNav1 | - | 71 | 18 | 9 | - | 91 | - | - | - | - | 73 | - |
| Arachnida; Araneae | <i>Ornithoctonus huwena</i> | OhNav1 | - | 69 | 8,5 | 76 | - | - | 92,5 | - | - | - | 83 | - |

Le tiret indique qu'aucune séquence homologue n'a été identifiée dans le génome ou les transcrits dont les séquences sont déposées dans les banques de données. L'identité de séquence nulle indique que les séquences des exons alternatifs sont totalement différentes.

Par souci de clarté, les identités de séquence indiquées dans le tableau 25 sont moyennées par ordre d'insecte et reporté sur un diagramme (Figure 45).

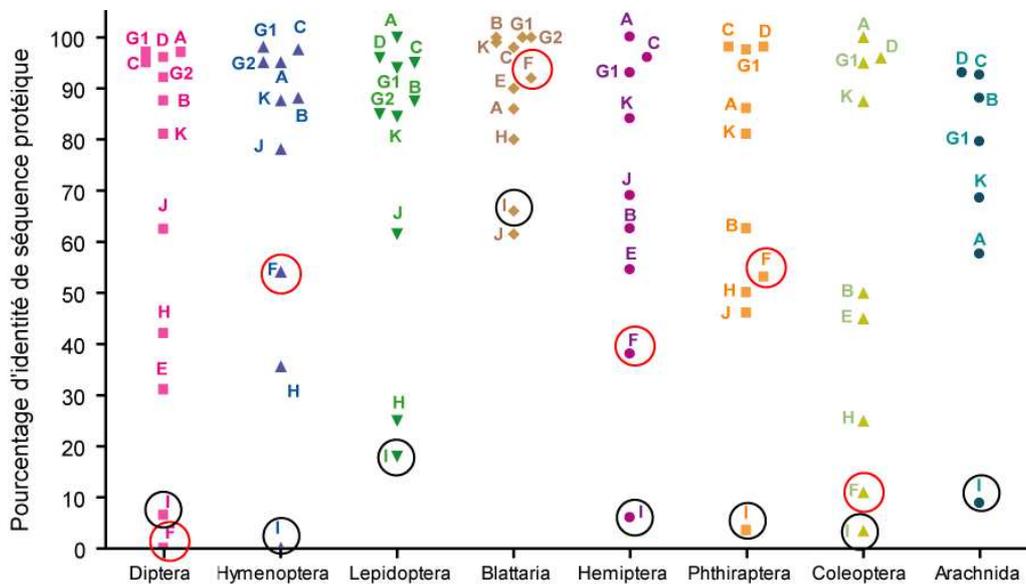


Figure 45 : Identité de séquence protéique entre les exons alternatifs de PaNa_v1 et les exons homologues des autres sous-unités α de canaux Na_v d'insecte.

Les exons optionnels I et F les moins conservés entre les espèces de l'ordre des *Blattaria* et les espèces des autres ordres sont entourés en noir et rouge respectivement.

Globalement les exons alternatifs sont bien conservés au sein de l'ordre des *Blattaria* (identité de séquence protéique comprise entre 61.5% et 100%) (Tableau 25). Les identités de séquence protéique sont aussi très élevées entre les exons optionnels K, B, A et les exons mutuellement exclusifs G1/G2 et C/D de PaNa_v1 et des autres sous-unités α de canaux Na_v d'insecte (Tableau 25 et Figure 45). Par conséquent, ce résultat suggère que ces exons jouent un rôle fonctionnel majeur. Étonnement l'identité de séquence protéique entre l'exon A de PaNa_v1 et BgNa_v1 est l'une des plus faibles (86%), suggérant une divergence à ce niveau entre ces espèces de genre différent. Les exons optionnels J, I, E, F et H sont les moins conservés entre les espèces de l'ordre des *Blattaria* et les espèces des autres ordres. Les exons optionnels I et F de la sous-unité PaNa_v1 partagent une très faible identité de séquence protéique avec les exons homologues des autres sous-unités, indiquant que ces deux exons optionnels ne sont pas conservés entre les différents ordres d'insecte (Figure 45). En effet, les séquences protéiques des exons I et F de PaNa_v1 sont totalement différentes de celles des exons homologues des espèces de diptères, d'hyménoptères, d'hémiptères, de phthiraptères, de coléoptères et d'arachnides. Ainsi, l'ensemble de ces observations confirme que la diversité moléculaire entre les sous-unités α des arthropodes est plus importante au niveau des boucles intracellulaires L1 et L2. Par

ailleurs, à l'instar des transcrits isolés de *B. germanica*, nous n'avons pas observé d'épissage alternatif au niveau des segments IIS4-S3 des transcrits *PaNa_v1* (Song et coll., 2004).

En conclusion, le gène *PaNa_v1* contient des exons alternatifs décrits dans la littérature (Tableau 25). Aucun exon optionnel nouveau n'a été identifié parmi tous les transcrits *PaNa_v1* analysés. Les exons alternatifs caractérisés sont presque tous identiques aux exons alternatifs de *BgNa_v1*, indiquant la conservation des sites d'épissage alternatif entre ces deux espèces. De plus, l'épissage alternatif de la glycine en position 1111 du gène *BgNa_v* est conservé au niveau du gène *PaNa_v* (Du et coll., 2009b). Plus précisément, il s'agit de la glycine G en position 1129 de l'isoforme *PaNa_v1*. Seul l'exon mutuellement exclusif G3 décrit chez *B. germanica* n'a pas été identifié à partir des transcrits isolés de *P. americana* (Tan et coll., 2002a). En accord avec les données bibliographiques, les exons alternatifs les plus conservés codent des segments transmembranaires (exons K, C, G1 et G2) et l'exon optionnel A dont le site putatif de phosphorylation à la PKA est parfaitement conservé (Introduction/Chapitre 2/C.2/Tableau 9). L'ensemble de ces résultats confirment la fonctionnalité importante de ces exons alternatifs pour la sous-unité *PaNa_v1*. Les exons optionnels I, E et F les plus divergents entre les différents ordres d'insectes sont cependant très conservés entre les gènes *PaNa_v1* et *BgNa_v1*. Cette analyse met en exergue que la distance entre les exons alternatifs des sous-unités α des canaux *Na_v* des espèces du genre *Blattaria* est faible. Ainsi au regard de ces résultats concernant la structure primaire des canaux *Na_v*, nous pouvons prédire une très forte similarité entre la pharmacologie des sous-unités *PaNa_v1* et *BgNa_v1*. Mais alors quel est le profil d'expression de chacun de ces exons dans la chaîne nerveuse de *P. americana*? Existents-ils des exons alternatifs plus représentés? Le variant *PaNa_v1* isolé est-il représentatif des variants exprimés dans la chaîne nerveuse?

C Diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans la chaîne nerveuse de *P. americana*

C.1.1 Analyse de la fréquence d'expression de chaque exon alternatif

Nous avons souhaité déterminer la distribution des variants à trois niveaux de la chaîne nerveuse. Le premier niveau est tissulaire et correspond à la chaîne nerveuse (CN). Le second niveau est subtissulaire et se rapporte au dernier ganglion abdominal (DGA). Le troisième niveau est cellulaire et comprend les neurones DUM. Pour ce faire, trois régions contenant des exons alternatifs, à savoir les boucles intracellulaires L1 et L2 ainsi que les segments transmembranaires IIS3-S4, ont été amplifiées par RT-PCR. En ce qui concerne les neurones DUM, la technique de RT-PCR sur cellule unique a été mise en œuvre. Les oligonucléotides employés ont été conçus à l'issue de l'analyse des séquences d'ADNc des produits des PCR#2, #3 et #4 (Matériels et Méthodes/Chapitre 2/E Figure 27/J2.2.2 Tableau 19 et Figure 37). La séquence nucléique de 10 à 15 clones a été analysée pour chaque produit de PCR, soit un total d'environ 120 clones toute matrice confondue. A l'issue de l'analyse des séquences nucléiques des ADNc, la fréquence d'expression de chaque exon alternatif a été déterminée puis comparée entre chaque matrice (CN, DGA et DUM) (Figure 46).

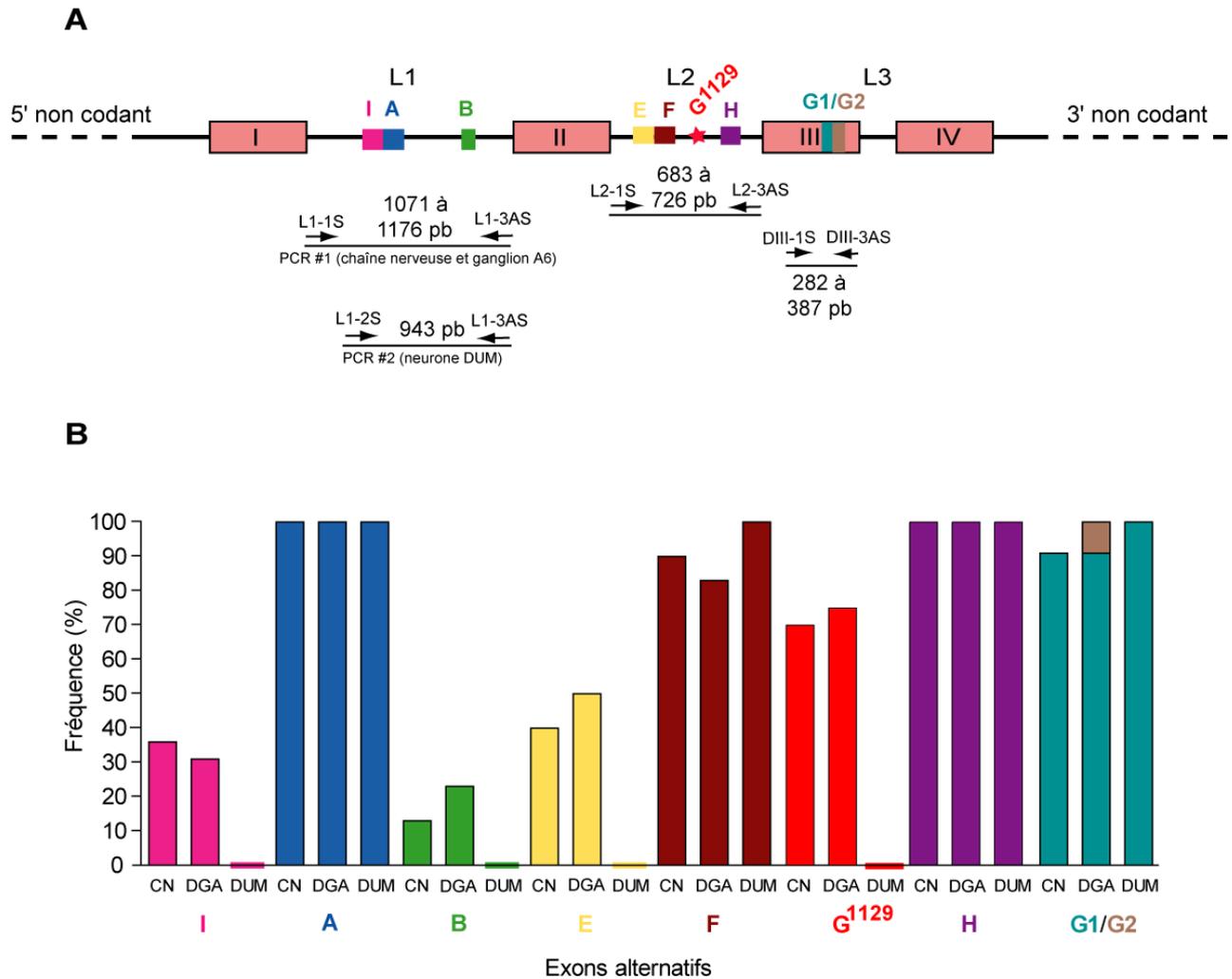


Figure 46 : Expression des exons alternatifs du gène *PaNa_v*, dans la chaîne nerveuse (CN), le dernier ganglion abdominal (DGA) et les neurones DUM.

A. Diagramme représentant les quatre domaines transmembranaires du canal *PaNa_v* (cadre) et la localisation des exons alternatifs identifiés (I, A, B, E, F, H, G¹¹²⁹, G1/G2). Les régions amplifiées sont délimitées par les oligonucléotides spécifiques représentés par des flèches. La taille des produits de PCR est mentionnée en paire de base (pb).

B. Histogramme de la fréquence d'expression des exons alternatifs pour chaque matrice (CN, DGA et neurones DUM).

Les résultats montrent que tous les ADNc isolés contiennent les exons optionnels A et H, et ce que ce soit au niveau de la CN, du DGA et du neurone DUM (Figure 46). Ceci suggère que les transcrits exprimés dans la chaîne nerveuse de *P. americana* à l'état adulte contiennent tous les exons A et H. Comparativement, les exons A et H sont exprimés dans des proportions analogues chez *B. germanica* à l'état adulte (98,5% et 100% des transcrits analysés respectivement) (Song et coll., 2004). Par contraste, la fréquence d'expression des exons A et H est plus réduite chez *D. melanogaster*. A l'état embryonnaire, 60% et 20% des ADNc analysés codent respectivement les exons A et H (Lin et coll., 2009). A l'état adulte, la

fréquence d'expression de l'exon a est maintenue à 70% alors que les transcrits codant l'exon h ne représentent que 5% des ADNc caractérisés (Olson et coll., 2008). D'après la fréquence d'expression élevée de l'exon A, nous pouvons supposer que le site putatif de phosphorylation à la PKA joue très certainement un rôle fonctionnel important (Introduction/ chapitre 2/ F.2.1/ Tableau 9). Il serait vraiment intéressant de confirmer cette hypothèse par des expériences de mutagenèse dirigée.

L'exon mutuellement exclusif G1 caractérise 90% des ADNc amplifiés par RT-PCR à partir de la CN et du DGA (Figure 46). Dans le DGA, un ADNc identifié contient l'exon G2 alors que dans la chaîne nerveuse un ADNc identifié ne contient aucun des deux exons mutuellement exclusifs. Dans les neurones DUM, seul l'exon G1 a été remarqué parmi les clones analysés. À l'issue de ces résultats, nous pouvons en déduire que les transcrits contenant l'exon G1 sont majoritaires dans le SNC de *P. americana* à l'état adulte. Cette observation est en adéquation avec les autres sous-unités α d'insecte qui comportent majoritairement l'exon G1 (Introduction/Chapitre 2/ B.2.1.c/Tableau 6).

Les ADNc analysés contenant les exons optionnels I, B et E sont minoritaires (Figure 46). Leur fréquence d'expression est comprise entre 11% et 50% des ADNc identifiés dans la CN et le DGA. Au contraire, aucun des ADNc identifiés dans les neurones DUM n'expriment un de ces trois exons alternatifs. En plus de cette observation, nous n'avons pas identifié les autres exons optionnels F et G¹¹²⁹ parmi les ADNc de neurones DUM, bien qu'ils soient exprimés dans la CN et le DGA. Au regard de ces résultats, nous pouvons en déduire que la diversité moléculaire des sous-unités α de canaux Na_v est la plus faible au niveau des neurones DUM comparativement à la CN et le DGA.

Ainsi, à partir de l'ensemble des résultats détaillés ci-dessus, nous constatons que le degré de diversité des canaux Na_v décroît au niveau cellulaire. Par déduction, et dans l'hypothèse où les transcrits *PaNa_v* sont identiques dans tous les neurones DUM, la combinaison d'exons alternatifs caractérisant ce variant unique serait I- A+ B- E- F- G¹¹²⁹- H+ G1+.

C.1.2 Analyse de la fréquence d'expression des combinaisons d'exons

Dans le but de caractériser les combinaisons d'exons alternatifs exprimées dans la chaîne nerveuse de *P. americana*, nous avons déterminé la fréquence d'expression de chaque combinaison isolée à l'issue de l'amplification des régions codant les boucles intracellulaires L1 et L2 (Figure 47).

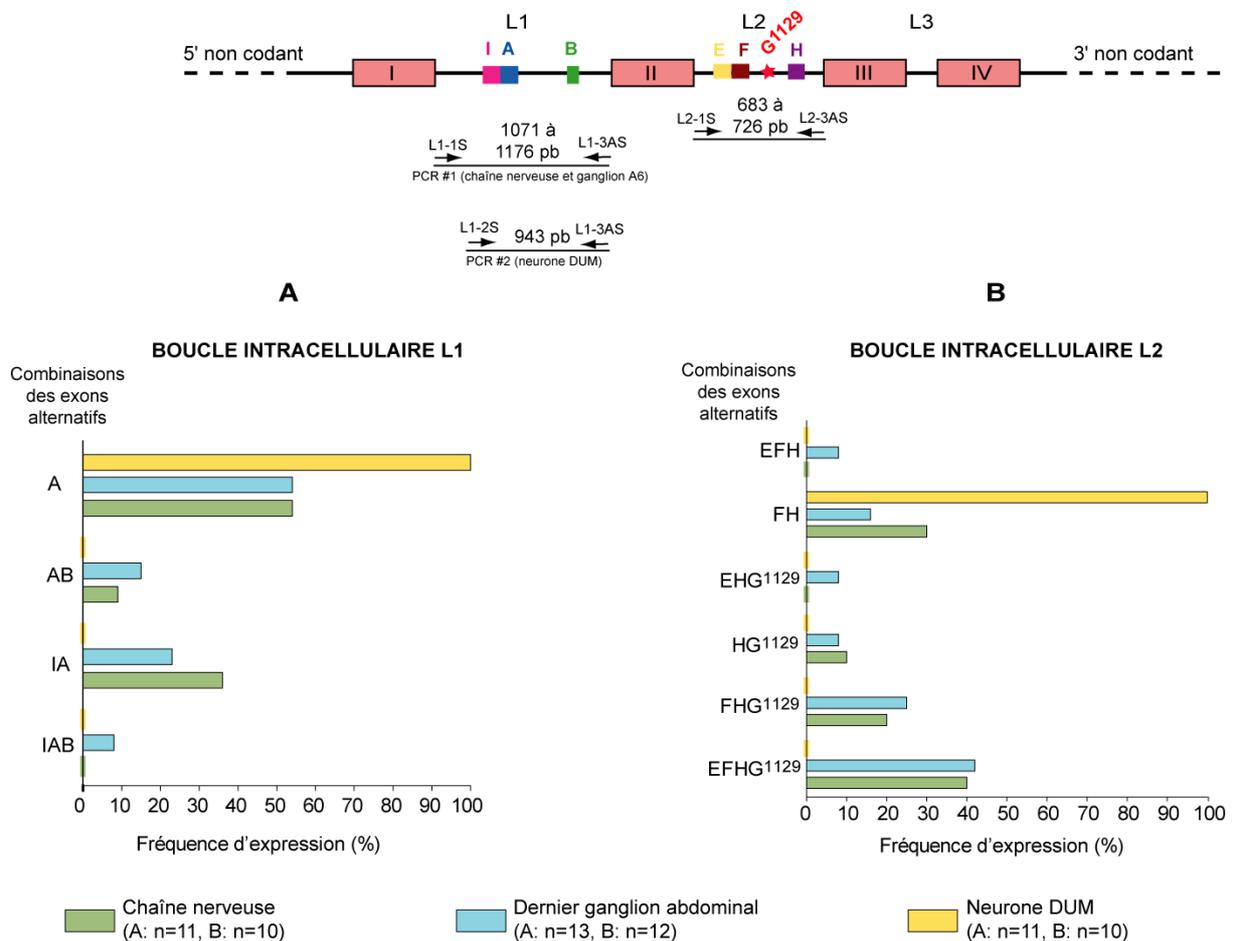


Figure 47 : Fréquence d'expression des combinaisons d'exons alternatifs caractérisant les variants *PaNa_v*, isolés de la chaîne nerveuse (CN), le dernier ganglion abdominal (DGA) et les neurones DUM.

A. Fréquence d'expression des combinaisons d'exons alternatifs caractérisant les transcrits codant la boucle intracellulaires L1. B. Fréquence d'expression des combinaisons d'exons alternatifs caractérisant les transcrits codant la boucle intracellulaires L2 (n=nombre de clones analysés).

Quatre combinaisons d'exons alternatifs ont été identifiées dans la région codant la boucle intracellulaire L1. Les ADNc possédant uniquement l'exon optionnel A sont majoritaires dans la chaîne nerveuse et le dernier ganglion abdominal (54% des transcrits analysés dans les deux cas). Les autres ADNc les plus représentés sont caractérisés par la combinaison d'exons AI (36% et 23% des transcrits identifiés respectivement dans la CN et le DGA). Au contraire, dans les neurones DUM tous les ADNc analysés contiennent uniquement l'exon A.

Six combinaisons d'exons alternatifs ont été répertoriées dans la région codant la boucle intracellulaire L2. Les fréquences d'expression sont variables. La fréquence d'expression des ADNc ayant les exons E, F, H et G¹¹²⁹ est maximale dans la CN et le DGA (40% et 42% des transcrits analysés respectivement). Dans la CN les ADNc qui sont secondairement les plus représentés possèdent les exons F et H (30% des clones analysés) alors que dans le DGA il s'agit des transcrits comportant les exons F, H et G¹¹²⁹ (25% des clones analysés). Trois autres combinaisons d'exons ont été identifiées (EFH, EHG¹¹²⁹ et HG¹¹²⁹). Leur fréquence d'expression est inférieure à 20%. À la lumière des résultats présentés précédemment (C.1.2), les ADNc identifiés dans les neurones DUM possèdent tous les exons F et H.

C.1.3 Discussion générale des résultats

Pour caractériser la diversité moléculaire des sous-unités α exprimées dans le SNC de *P. americana*, nous avons cloné plusieurs ADNc codant des combinaisons d'exons variables. Ces ADNc codent différentes régions de la sous-unité α que sont les boucles intracellulaires L1, L2 et les segments transmembranaires IIS3-S4. Des approches analogues ont été employées pour caractériser la diversité moléculaire des sous-unités α des canaux Na_v de *D. melanogaster*, *D. virilis*, *M. domestica*, *B. mori*, *A. gambiae*, *V. desctructor*, *H. virescens*, *A. aegypti*, *P. xylestolla*, *C. lectularius*, *P. humanus capitis* (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Park et coll., 1999, Lee et coll., 2002, Tomita et coll., 2003, Wang et coll., 2003a, Davies et coll., 2007a, Sonoda et coll., 2008b, Yoon et coll., 2008, Chang et coll., 2009, Shao et coll., 2009b). Toutefois, au cours de ces études les ARNs ont été purifiés à partir de l'insecte entier ou d'un segment (tête ou abdomen). Au contraire, dans nos recherches nous nous sommes focalisés sur l'identification des transcrits uniquement exprimés dans le SNC (à l'exclusion de la tête), cible principale des toxines et insecticides neurotoxiques. Pour ce faire, nous avons analysé

la séquence nucléique d'une douzaine de clones pour chaque produit de PCR amplifié à partir de trois matrices distinctes (chaîne nerveuse, dernier ganglion abdominal et neurones DUM). Cet ordre de grandeur est reconnu suffisant pour identifier des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte épissées alternativement (Shao et coll., 2009b). Par ailleurs, étant donné que nous avons comparé des fréquences d'expression des exons alternatifs identifiés dans la CN, le DGA et les neurones DUM, il est apparu important de sélectionner des effectifs équivalents pour éviter des biais de représentativité. Cette méthode est valable à condition que les constructions plasmidiques ne soient pas toxiques pour les bactéries *E. coli* employées, ce qui est probablement le cas en raison de la taille réduite des inserts (<1,1 kb). Ainsi, les résultats obtenus vont être discutés ci-dessous à la lumière de deux questions.

(a) Peut-on identifier des transcrits spécifiquement exprimés dans le SNC de *P. americana* ?

L'analyse des séquences nucléiques des clones met en exergue l'expression de plusieurs transcrits codant des combinaisons d'exons alternatifs distinctes au sein de la chaîne nerveuse et du dernier ganglion abdominal. Trois à quatre combinaisons d'exons contenues dans la région codant la boucle L1 ont été identifiées respectivement dans la CN et le DGA (Figure 47). Quatre à six combinaisons d'exons localisées dans la région codant la boucle L2 ont été identifiées respectivement dans CN et le DGA (Figure 47). Or le nombre théorique de combinaisons d'exons contenues au niveau des régions codant les boucles L1 et L2 s'élève respectivement à huit et seize, soit deux à trois fois plus que le nombre de combinaisons d'exons identifiées. Par conséquent, nos résultats indiquent que la diversité moléculaire des transcrits *PaNa_v* exprimés dans le SNC de *P. americana* est réduite par rapport à la diversité théorique. Cette constatation a aussi été mise en évidence chez d'autres espèces d'insecte. Chez *B. germanica*, quatre combinaisons d'exons localisées dans la région codant la boucle L1 et trois combinaisons d'exons contenues dans la région codant la boucle L2 ont été identifiées parmi vingt variants *BgNa_v* (Song et coll., 2004). Chez *D. melanogaster* et *D. virilis*, dix-huit combinaisons d'exons contenues dans une région comprise entre les exons a et f ont été identifiées, soit la moitié du nombre de combinaisons théoriques (Thackeray et coll., 1995).

Afin de déterminer s'il existe des transcrits $PaNa_v$ spécifiquement exprimés dans la CN, nous avons comparé la diversité moléculaire caractérisée chez deux espèces de blattes étudiées à l'état adulte (Figure 48). Nous remarquons qu'il existe peu de différence entre les variants principalement exprimés au niveau de l'organisme entier de *B. germanica* et de la CN de *P. americana*. Cette observation suggère que l'épissage alternatif est dominant dans le SNC des insectes. Chez les mammifères, il est reconnu que l'épissage alternatif régule majoritairement l'expression des gènes exprimés dans le système nerveux (Grabowski et coll., 2001, Lareau et coll., 2004). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer les isoformes de canaux Na_v exprimées dans d'autres tissus excitables d'insectes tels que les muscles. En effet, chez *D. melanogaster*, des courants Na^+ ont été mesurés dans les muscles ventraux latéraux de l'abdomen (Yamaoka et coll., 1988).

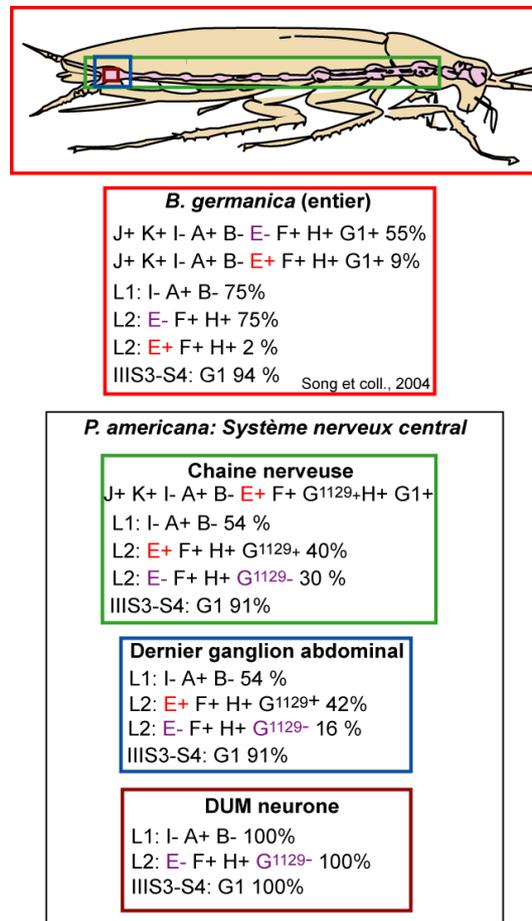


Figure 48 : Comparaison de la distribution des variants de la sous-unité α des canaux Na_v exprimés majoritairement chez *B. germanica* (organisme entier) et *P. americana* (système nerveux central).

La présence d'un exon alternatif est indiqué par le signe + et l'absence d'un exon alternatif est indiqué par le signe -. Les exons optionnels dont l'expression varie entre les transcrits identifiés sont mentionnés par une couleur. La fréquence d'expression de l'exon G^{1111} parmi les variants $BgNa_v$ (homologue de l'exon G^{1129} de $PaNa_v1$) n'est pas indiquée dans la publication Song et coll. 2004.

Par ailleurs, la fréquence d'expression des différents variants identifiés est hétérogène. En effet, les variants exprimant uniquement l'exon A sont majoritaires dans la CN et le DGA. De plus, les transcrits codant les combinaisons d'exons FH et EFHG¹¹²⁹ représentent 70% et 58% des ADNc isolés respectivement de la CN et du DGA (Figure 47). Par conséquent, en dépit de la diversité moléculaire observée, la fréquence d'expression d'un seul variant est privilégiée par rapport aux autres variants. A la lumière de ce constat, nous pouvons en déduire que le transcrit *PaNa_v1* codant les exons optionnels A, E, F, H, G¹¹²⁹ est représentatif des variants majoritairement exprimés dans la CN et le DGA. De manière analogue, la dominance d'un variant *Na_v* par rapport aux autres a été reportée pour d'autres espèces d'insecte et au niveau de différents organes de mammifères. Un seul transcrit est abondamment exprimé dans tout le corps de *B. germanica* et *D. melanogaster* bien qu'une vingtaine de variants codant les sous-unités α des canaux *Na_v* aient été caractérisée (Introduction/Chapitre 2/ B.3.1.f/Tableau 8) (Song et coll. 2004, Olson et coll., 2008 Lin et coll. 2009). Des mesures du niveau d'expression des transcrits par RT-PCR en temps réel, ont permis de montrer que le variant *mNa_v5* est 2,5 fois plus exprimé que le variant *mNa_v5d* dans le cœur de souris au stade adulte (Haufe et coll., 2005). Des expériences analogues ont montré que l'expression du variant 12v1 du gène humain *hNav1.3* est supérieure aux deux autres variants 12v2 et 12v3 dans 7 organes adultes différents (Thimmapaya et coll., 2005).

D'un point de vue qualitatif, les transcrits analysés dans la CN et le DGA de *P americana* se distinguent essentiellement de part l'expression des exons optionnels E et G¹¹²⁹ localisés au niveau de la boucle L2 (Figure 48). Chez *D. melanogaster*, l'expression de l'exon e influence les propriétés d'activation à l'état stable des isoformes DmNa_v exprimées dans des ovocytes de xénope (Lin et coll., 2009). Plus précisément, l'exon e conduit à un décalage de la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels dépolarisants. Chez *B. germanica*, il a été montré que la délétion de l'exon optionnel G en position 1111 de la sous-unité BgNa_v (homologue du résidu d'acide aminé G¹¹²⁹ de la sous-unité PaNa_v1) diminue la sensibilité aux pyréthriinoïdes de type II (Du et coll., 2009b). Le rôle modulateur des exons optionnels codant la boucle intracellulaire L2 a aussi été investigué chez les mammifères. Il a été montré que la délétion de l'exon 11 favorise la modulation des propriétés d'activation des isoformes humaines hNa_v1.7, exprimées dans des cellules HEK, en présence d'analogue de l'AMPC (Chatelier et coll., 2008). Les auteurs proposent que la présence de l'exon 11 limite l'accès aux sites de phosphorylation par la PKA en modifiant la structure de la boucle intracellulaire L2. Par ailleurs, il a été montré que la délétion de l'exon optionnel 17 est associée à une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux hNa_v1.5d exprimés dans des cellules HEK (Camacho et coll., 2006).

Dans les neurones DUM, tous les transcrits identifiés codent les mêmes exons optionnels (A, F et H) et l'exon mutuellement exclusif G1 (Figure 46). Ainsi sur la base de ces résultats, nous pouvons en déduire que la diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans les neurones DUM n'est pas associée aux exons épissés dans la boucle L1, L2 et les segments transmembranaires III-S3-S4. De plus, il est intéressant de noter que les exons A, F, H et G1 sont aussi majoritairement exprimés dans la CN et le DGA (Figure 46). Seule la délétion de l'exon E et de la glycine G en position 1129 est moins fréquente dans la CN et la DGA (Figure 46). Ainsi la signature moléculaire des exons optionnels contenus dans la région codant la boucle L2 est tout à fait singulière dans les neurones DUM au regard des ADNc exprimés dans la CN et le DGA (Figure 48). Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer si l'exon optionnel J est aussi épissé dans les neurones DUM. A l'encontre de nos résultats, quatre combinaisons d'exons contenues dans la région codant la boucle L1 ont été caractérisées par RT-PCR sur neurones embryonnaires de *D. melanogaster* (O'Dowd et coll., 1995). Toutefois il s'agit de populations neuronales hétérogènes, limitant la corrélation précise entre les transcrits des canaux Na_v et un type cellulaire donné. A l'instar des insectes, l'identification des variants épissés alternativement codant des canaux Na_v dans un type cellulaire a été peu investigué chez les mammifères. Seule la coexpression des variants du gène *rNav1.6* (18A, 18N et $\Delta 18$) a été caractérisée dans des neurones d'hippocampiques embryonnaires par RT-PCR sur cellule unique (Mechaly et coll., 2005). Parallèlement, d'autres études ont corrélé l'expression d'un ou plusieurs gènes Na_v à un profil de courants Na^+ mesuré par patch-clamp dans des cellules de mammifères ou de la sangsue (Blackshaw et coll., 2003, Rugiero et coll., 2003, Strega et coll., 2003, Mechaly et coll., 2005, Vignali et coll., 2006). Par conséquent, nos résultats montrent pour la première fois l'expression de plusieurs transcrits codant des canaux Na_v exprimés uniquement dans le SNC des insectes.

(b) Les fréquences d'expression observées par l'approche de clonage sont-elles représentatives de la diversité moléculaire réelle ?

Premièrement, la PCR peut apporter un biais à l'étude de la représentativité des différents variants exprimés dans un tissu. En effet, l'amplification exponentielle des ADNc et les phénomènes de compétition entre les séquences amplifiées peuvent altérer les fréquences relatives des différents transcrits. En d'autres termes, les conditions de PCR peuvent favoriser l'amplification d'un transcrit peu exprimé naturellement au détriment des autres. Pour résoudre cette question méthodologique, Thackeray et coll. 1994, ont comparé la fréquence d'expression des variants à partir de la technique de la RT-PCR et de la

détection des ARN par des oligonucléotides radiomarqués. Ils montrent que la fréquence relative d'expression des variants observée à l'issue de la PCR est proche de la fréquence des transcrits des ARNm non amplifiés (Thackeray et coll., 1994). Par ailleurs, la PCR en temps réel est la technique qui offre actuellement la meilleure représentativité de l'expression des gènes. De plus, il est tout à fait possible d'associer cette technique à la RT-PCR sur cellule unique pour quantifier le nombre de copie de chaque transcrit (revue (Liss et coll., 2004)).

Deuxièmement, le clonage représente une autre source de biais possible pour étudier la diversité moléculaire des canaux Na_v (Thackeray et coll., 1994, Shao et coll., 2009b). Pour s'assurer que les fréquences des exons ne résultaient pas d'un tel biais, nous avons amplifié la région de la boucle intracellulaire L1 à partir de deux préparations distinctes d'ARN. Il s'est avéré que les fréquences des exons A, I et B étaient similaires. De plus, les fréquences relatives des exons sont relativement cohérentes entre les différentes matrices considérées (CN, DGA, neurone DUM), soulignant l'homogénéité des résultats.

Troisièmement, la méthode que nous avons utilisée consistant à réaliser une RT-PCR, un clonage et une analyse de la séquence nucléique à partir d'ADN plasmidique purifié est une méthode longue et laborieuse qui constitue une limite pour étudier la diversité moléculaire des canaux Na_v à grande échelle. Ainsi, pour augmenter l'échantillonnage et la robustesse des fréquences relatives, d'autres méthodes sont envisageables. La première méthode consiste à différencier les variants en fonction des sites de restriction caractérisant la séquence nucléique des exons alternatifs (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995). Certes cette méthode recourt au clonage des ADNc mais elle offre l'avantage de ne pas analyser la séquence nucléique de chaque clone. La seconde méthode plus récente consiste à analyser la séquence nucléique de multiples transcrits *via* la technique d'analyse à haut débit Solexa (Shao et coll., 2009a). Le principe de cette technologie est d'analyser la séquence nucléique de plusieurs ADNc sans avoir recours au clonage. Les échantillons d'ADNc sont divisés en fragment de 100 à 200 pb et immobilisés sur une matrice solide. Sur cette dernière, chaque population de transcrit est amplifiée et isolée sur une surface de quelques centimètres carrés. La séquence nucléique de chaque population de transcrits est alors déterminée. La troisième méthode envisageable pour quantifier l'expression relative des variants épissés sans recours au clonage est la technique dite « polony » (pour polymerase colony) (Zhu et coll., 2003). Cette technologie comprend trois étapes : (i) la création d'un gel acrylamide contenant les ADNc à étudiés, (ii) l'amplification directement sur le gel de chaque « colonie d'ADNc » et (iii) l'hybridation d'oligonucléotides spécifiques sur chaque exon alternatif. Il est alors possible de comparer les combinaisons d'exons

caractérisant chaque « polony », et de déduire la fréquence d'expression de nombreux variants. Cette technologie a permis de caractériser l'expression de 60 000 transcrits du gène *tau* impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Conrad et coll., 2007). Cette méthode s'avérait vraiment intéressante pour caractériser les transcrits de canaux Na_v dont la taille importante limite leur amplification et leur clonage.

D Découverte d'un nouveau transcrit PaFPC

Lors de la caractérisation de la sous-unité α des canaux Na_v exprimés dans la CN de *P. americana*, nous avons découvert un nouveau transcrit apparenté aux canaux Na_v d'insecte. Les résultats concernant la caractérisation de cette nouvelle protéine ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Publication n°1).

D.1 Clonage de l'ADNc codant la sous-unité PaFPC

L'amplification des ADNc de chaîne nerveuse par RT-PCR à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées ciblant des régions conservées des canaux Na_v , nous a permis non seulement de caractériser la sous-unité Pa Na_v1 , comme décrit dans la partie A de ce chapitre, mais aussi d'isoler de nouveaux transcrits. Premièrement, lors de l'analyse électrophorétique des ADNc amplifiés avec les oligonucléotides F115S et M418AS, deux populations d'ADNc se différenciant de 780 pb ont été séparées (Figure 49). Ces deux populations d'ADNc ont été clonées séparément, puis leur séquence nucléique analysée. Des interrogations de types BLASTP à partir des séquences protéiques déduites des deux populations d'ADNc ont prédit les homologies les plus élevées avec les canaux Na_v d'insecte. Toutefois, les séquences protéiques déduites des ADNc de 1700 et 920 pb partagent respectivement 77% et 55% d'identité protéique avec la région homologue de la sous-unité Dm Na_v1 . Deuxièmement, de manière analogue à la première RT-PCR citée ci-dessus, deux populations d'ADNc comportant 976 pb chacune mais ne partageant que 65% de séquence nucléique ont été amplifiées avec une seconde paire d'oligonucléotides dégénérés ciblant la région IIIIS6 à IVS6 des canaux Na_v (Figure 49). Les séquences

protéiques déduites de ces deux populations partagent 89% et 54% d'identité protéique avec la région homologue de la sous-unité DmNa_v1. Mais alors quelle est l'origine de ces différentes populations d'ADNc ?

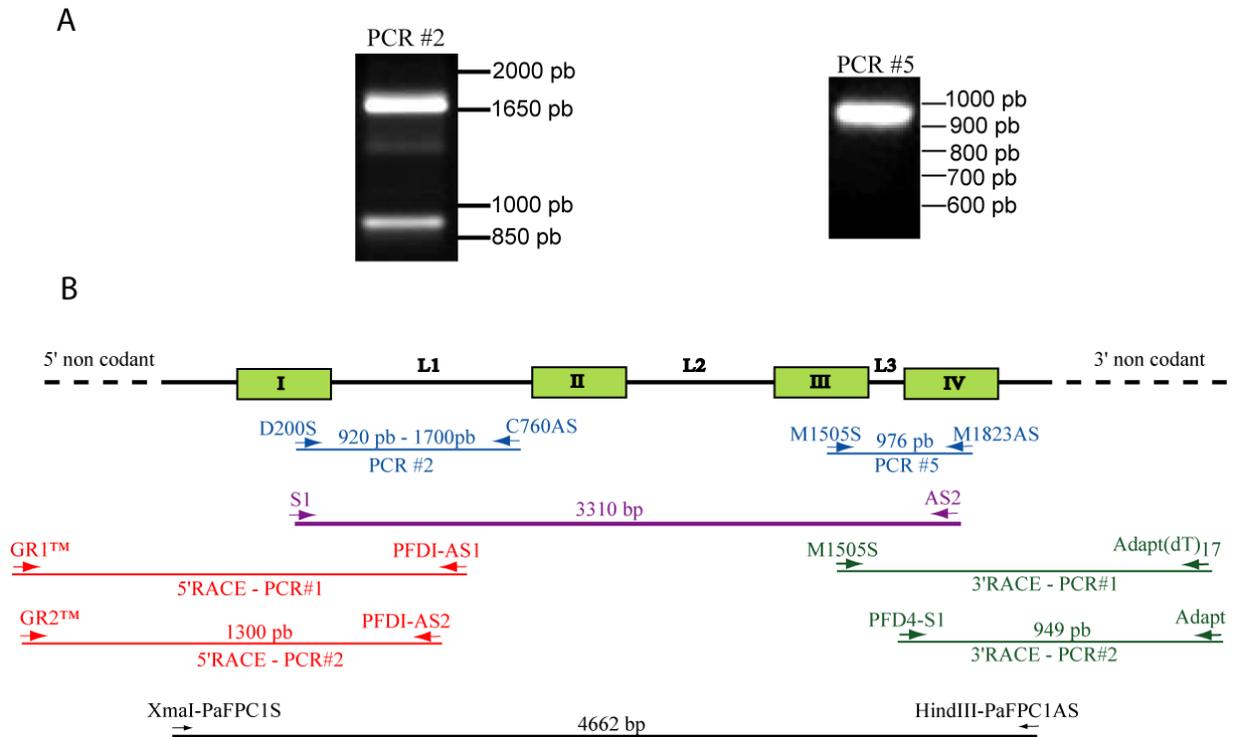


Figure 49: Clonage des ADNc codant la sous-unité PaFPC de *P. americana*.

A. Analyse des produits de la RT-PCR#2 et RT-PCR#5 (10 µl) sur gel d'agarose 1%. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué sur la droite (1 Kb⁺, Invitrogen™)

B. Les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires homologue à la sous-unité DmNa_v1 sont représentés par des rectangles et des traits horizontaux respectivement. Les régions 5' et 3' non codantes sont représentées par des traits en pointillés. En bleu sont indiquées les PCR réalisées à partir d'oligonucléotides dégénérés. En rouge et vert figurent respectivement les amplifications des régions 5' et 3' non codantes par la technique de la RT-PCR. En violet et noir sont mentionnées les transcrits codant partiellement ou intégralement le cadre ouvert de lecture.

Au regard des identités de séquences protéiques, nous avons pu déduire que les protéines partageant la plus forte homologie avec la sous-unité DmNa_v1 correspondent aux canaux Na_v d'insecte classiques. La caractérisation de la unité-unité α des canaux Na_v de *P. americana* est détaillée dans la partie Résultats/Chapitre 1/Partie A.

Mais alors les populations d'ADNc atypiques appartiennent-elles à des transcrits différents ou un seul et même transcrit ? Pour répondre à cette question nous avons alors conçu des oligonucléotides spécifiques S1 et AS1 afin de déterminer si les ADNc clonés appartenaient à un seul et même transcrit (Figure 49). Ainsi, nous avons pu isoler par RT-PCR un amplicon de 3,3 kb. L'analyse directe de la séquence du produit de PCR a alors

confirmé que les deux populations d'ADNc préalablement isolées appartenaient à un gène atypique peu homologue au gène *DmNa_v*. A la suite de cette découverte, nous avons alors amplifié les extrémités 5' et 3' de ce nouveau gène par RACE-PCR (Figure 49).

Le début du cadre ouvert de lecture a été amplifiée par la technique de la 5'-RACE PCR. L'ADNc isolé comprend une région non codante de 341 pb et une région codante de 965 pb. Les quatre bases précédant immédiatement le codon d'initiation (CAAA, position -4 à -1) correspondent parfaitement la séquence consensus (C/AAA/C) du site d'initiation de la traduction chez *D. melanogaster* (Cavener, 1987). La fin du cadre ouvert de lecture a été amplifiée par la technique de la 3'-RACE PCR comprend une région codante de 742 pb et une région non codante de 205 pb. L'extrémité 3' non codante contient une queue poly(A). Le motif AATAA est proche de la séquence consensus du site polyadénylation (AATAAA) définit chez *D. melanogaster*.

Les informations de séquences acquises nous ont permis de concevoir les oligonucléotides XmaI-S2 et HindIII-R1 ciblant les extrémités du cadre ouvert de lecture de ce nouveau gène (Figure 49). A l'aide de cette paire d'amorces nucléotidiques, nous avons pu amplifier des ADNc de 4,5 kb. Le clonage de ces produits de PCR s'est avéré aussi délicat que le clonage des ADNc codant la sous-unité PaNa_v1. En effet, au regard de la faible densité et de la croissance lente des colonies bactériennes, nous avons supposé que les produits protéiques du plasmide recombinant sont toxiques pour les bactéries. Deux clones contenant l'intégralité du cadre ouvert de lecture ont pu être isolés. L'analyse par carte de restriction des ADN plasmidiques purifiés a permis de montrer que les deux clones contenaient la totalité du cadre ouvert de lecture. Ces derniers comprennent 4662 pb et codent deux protéines de 1153 résidus d'acides aminés se différenciant par 8 acides aminés. L'interrogation dans des banques de données à l'aide de l'outil BLAST, à partir de ces deux séquences protéiques, a permis de mettre en évidence la conservation de quatre domaines transmembranaires répétés en tandem, classant ainsi les nouvelles protéines parmi les sous-unités α formant un pore. Nous avons alors nommé le nouveau gène *PaFPC* en référence à « *Periplaneta americana* four P-domain channel » (numéro d'accession dans GenBank : GQ132120 (variant PaFPC1) et GQ132121 (variant PaFPC2)). Nous avons ensuite réalisé une interrogation au sein des génomes d'insecte¹⁶ avec l'outil tBLASTn à partir de la séquence de PaFPC1. Les résultats ont montré que les identités de séquence protéique les plus élevées comprises entre 50% et 60% sont partagées avec les sous-unités

¹⁶ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=insects

α de canaux Na_v d'insecte. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats suggère que le gène *PaFPC* est spécifique d'autres espèces d'insecte, tel que *P. americana*.

D.2 Analyse de la structure

L'analyse du profil d'hydrophobie de la sous-unité PaFPC1 montre une topologie transmembranaire analogue aux canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires (DI à DIV) reliés par des boucles intracellulaires (Figure 50). Chaque domaine est composé de six segments (S1 à S6) et d'une boucle P hydrophile entre les segments S5 et S6. Les extrémités amino et carboxy-terminales sont hydrophiles et localisées dans le milieu intracellulaire. A partir de ces informations, nous avons déduit l'organisation topologique de la sous-unité PaFPC1 (Figure 50).

A

| | | |
|--------|--|------|
| PaFFC | MADISPLIREERQLFRPPTRAMLTAPSAQPAKENGKTBENKDNSRDKG-----RGANKDRDGSAPDQALE | 67 |
| PaNav1 | MSDDSSSISEERSLFRPPTRESLAAIEARIAEYAKQKE-LEKKRAEGEGDSGRKRKKEVRYDDEDEGQPDATLE | 79 |
| BgNav | MSDDSSSISEERSLFRPPTRESLAAIEARIAEYAKQKE-LEKKRAEG-----EVRDDEDEDEGQPDATLE | 68 |
| PaFFC | QGSRIIPARMNIPFAELASTPLEDFDPFYKMKTFVVVKAGDIFRFSGEKSLWMLDPFPIRRVAISTVQPIFSYFI | 147 |
| PaNav1 | QGAPIVVRMQLFPPELASTPLEDIDPFYQNRQTFVVVSKGKDIRFRSATPAMWILDPPNPIRRVAIYILVHPLFSLFII | 159 |
| BgNav | QGAPIVVRMQLFPPELASTPLEDIDPFYQNRQTFVVVSKGKDIRFRSATPAMWILDPPNPIRRVAIYILVHPLFSLFII | 148 |
| PaFFC | ITILTHCIPMMPATQTTTYILELVFLSIYTIIEVVVKVARGFILHFPAYLRDPWNWLDFTVTLGYLTHVYDLGLYALR | 227 |
| PaNav1 | TTILTNCIFMIMPPTTPIESTEVIFGTIYTFESAVKVMARGFILQPFYLRDAWNWLDFTVYIALAYVTMGIDLGNLAALR | 239 |
| BgNav | TTILTNCIFMIMPPTTPIESTEVIFGTIYTFESAVKVMARGFILQPFYLRDAWNWLDFTVYIALAYVTMGIDLGNLAALR | 228 |
| PaFFC | AFRVLRSWRIVTVIPGWRTIVDALSLSTSLKDLVLLLLFSLFVFAVGLQIYMGVLTQKCVKHFPADGSGWGNFTDERWF | 307 |
| PaNav1 | TFRVLRLKTVAIVPGKTIIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCVKNFPSDGSWGNLTDENWF | 319 |
| BgNav | TFRVLRLKTVAIVPGKTIIVGAVIESVKNLRDVIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCVKNFINSWGEENLNDENWH | 308 |
| PaFFC | NYTNSSSHWHYIPDDWIEYPLCGNSSGAGMCPGTYCLOGVGCNPNYGYTSFDTFGWAFLSVFRVLTLDYWEPLYQLALRS | 387 |
| PaNav1 | SFCSNKSHWHYIPDDTIEYPLCGNSSGAGTCCPGTYCLOGVGCNPNYGYTSFDTFGWAFLSAFRLMTQDYWENLYQLVLS | 399 |
| BgNav | AFCSNNTNWFYFAGAPEVPLCGNSSGAGTCCPDYTCLOGVGCNPNYGYTSFDTFGWAFLSAFRLMTQDYWENLYQLVLS | 388 |
| PaFFC | AGPWHLEFFILVYFYGFCEFNFLAVVMSYTHVVKADDEEAERELKKEKKAASVANNT----- | 449 |
| PaNav1 | AGPWHMLFFIVIIFLGSFYLVNLIILAVVMSYDELQKKAEEEEEAALREAEAAARAKEAKARQADKAAHAAGLAQ | 479 |
| BgNav | AGPWHMLFFIVIIFLGSFYLVNLIILAVVMSYDELQKKAEEEEEAALREAEAAARAKEAKARQADKLAQAQELAAAQ | 468 |
| PaFFC | -----ANGQE----- | 454 |
| PaNav1 | AAA--EIVVKSPPSSSCLSYELFVQK-GNADNNKPKMSIRSEEGDSISEHRRIVGANGTAGVRKVSAAASLSPGSPFNLR | 556 |
| BgNav | ELAGANAKSPSGSSRSYELFVQKDGNDNKRRENMSIRSEEGDSISEHGRVVGANGTA-VRKVSAAASLSPGSPFNHR | 547 |
| PaFFC | ----- | 454 |
| PaNav1 | RGSQGSHTPIRNGRGRFVGGPPGDRKPLVLSTYLDAQEHLPYADDSNAVTPMSEENGAIVVPVYYALGSRHSSYTS | 636 |
| BgNav | RGSQGSHTPIRNGRGRFVGGPPGDRKPLVLSTYLDAQEHLPYADDSNAVTPMSEENGAIVVPVYYALGSRHSSYTS | 627 |
| PaFFC | -----QTTI | 458 |
| PaNav1 | SRISYTSHGDLGAGKPKTKESQLRTRSGRNNPSQIPNSTPYMSDDHKYMDASVSDSDGAVKAKHSDNPFIEQM | 716 |
| BgNav | SRISYTSHGDLGAGKNSQTKINQLRARSVRNNPSQIPNSTPYM-----ASADSDGAVKAKHSDNPFIEQM | 700 |
| PaFFC | EMNGDEAVVIDNNQAARQQS-----DPTPAPSVTQRIT-----DFLCVWDCCVWPQKLGQAGAVL | 517 |
| PaNav1 | VDMNDVMVLNDIEQAAGQSRASEQG-----DEDEGPTVKEKVLAIQVRGIDIFCVWDCCWLVKQFQEVALLV | 788 |
| BgNav | VDMNDVMVLNDIEQAAGQSRASEHGVSIIYFPTDEDEGPTVKEKVLAIQVRGIDIFCVWDCCWLVKQFQEVALLV | 780 |
| PaFFC | SPFFELFTAMITIVNITFMALDHHDMNIEFELIRITGNYIFTSIIVIEAVLKIATSPKGYFKSWNVDFITIVVFA | 597 |
| PaNav1 | DPFVELFITLICIIVNITFMALDHHDMNIDMKNKMEKALKSGNYFFATATFAIEATLKLIIAMSPKYYFQEGWNI | 868 |
| BgNav | DPFVELFITLICIIVNITFMALDHHDMNIDKALKSGNYFFATATFAIEATLKLIIAMSPKYYFQEGWNI | 860 |
| PaFFC | LGLEGVQGLSVFRSFRLLRVFRLAKFWPTLNNFMSVMTKSYGAFVNVYVYVFLIFIFAHGMQLFGMNYIDNVER | 677 |
| PaNav1 | LGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFRLAKSWPTLNLISIMGRITVVALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYDNVER | 944 |
| BgNav | LGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFRLAKSWPTLNLISIMGRITVVALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYDNVER | 940 |
| PaFFC | DTPRWNFTDFHSFMIVFRALCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFVAVFFVGNLVNLNLHALLLNNG-SFCNSPT | 756 |
| PaNav1 | DTPRWNFADFMSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFLATVVIIGNLVNLNLFALLLSNFSSNLSAPTAD | 1028 |
| BgNav | DTPRWNFTDFMSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFLATVVIIGNLVNLNLFALLLSNFSSNLSAPTAD | 1020 |
| PaFFC | DQKDEDALAIVRIFKRFKP-NLNAVKS----- | 784 |
| PaNav1 | TNKIAEAFDRFSRFNWIKRKRSALVAKMLRAKLTNQISDQTPGEGPSSSWKEDAHDRDLDLDADEIADGVYRDKKS | 1108 |
| BgNav | TNKIAEAFDRFSRFNWIKRKRSALVAKMLRAKLTNQISDQTP-----DAHDRDLDLDADEIADGVYRDKKS | 1090 |
| PaFFC | -----P | 785 |
| PaNav1 | PKDQQTQLEVAIGDMEFTIHGDLKKNLKDKLMMNNTKVIKNSFGQNHKDNRIEN-DYLNHRQDEBTLSTRSYGSHK | 1187 |
| BgNav | PKDQQTQLEVAIGDMEFTIHGDLKKNLKDKLMMNNTKVIKNSLN--HKDNRIESDYLNHRQDEBTLSTRSYGSHK | 1168 |
| PaFFC | MKPDSED-----IVESQEIQGNNIAD-----AEDVLAGE*PPDCCCAFYKCFPSRP-A | 833 |
| PaNav1 | PKDQSHKGSAAETMDGEGKDKASKEDLEQEGNAEEDGEGEEGHLEEDMALDGGTEDVMMSEYPADCCPKCYRFP | 1267 |
| BgNav | PKDQSHKGSAAETMDGEGKDKASKEDLQEGEGEEDGEGE-GPLEEDMVLDAETEDVMMSEYPADCCPKCYRFP | 1247 |
| PaFFC | RDSSVQIMWSNIRRVCFLLAKNKYFKFVTAVLETSVLLALELIVLPQRPVLVNIITLYVDYVLTAFVFIEMIMLFAV | 913 |
| PaNav1 | EDSPFQGWGNLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSLALALEDVHLSRPILODILYMDRIFTVIFFIEMLIKWLAL | 1347 |
| BgNav | EDSPFQGWGNLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSLALALEDVHLSRPILODILYMDRIFTVIFFIEMLIKWLAL | 1327 |
| PaFFC | FKKYFTSKWYWLDFFIVVAYLNFVLMCAG---ISALQTLRLLRVFRFRPSKYNMGVVITSLVAVPHIFNVILVGL | 990 |
| PaNav1 | FKKYFTNAWCWLDFFIVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTRTLRALRPLRAMSRMQGMRVVVVALVQAIPSI | 1427 |
| BgNav | FKKYFTNAWCWLDFFIVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTRTLRALRPLRAMSRMQGMRVVVVALVQAIPSI | 1407 |

| | | | |
|--------|--|-------------|-------------|
| | IIIS5 | | |
| PaFPC | FFWLVFAIMGVQLFAGKPKYKCVDENSTVLSHEITMDRNDCHENYTWENSPMNFHDVGNAYLSLLQVATPKGWQIMNDA | 1070 | |
| PaNav1 | IFWLVFAIMGVQLFAGKYHKCVDSNSTLSHEIIPDRNACIAENYTWENSPMNFHDVGNAYLSLLQVATPKGWQIMNDA | 1507 | |
| BgNav | IFWLVFAIMGVQLFAGKYHKCVDSNSTLSHEIIPDRNACIAENYTWENSPMNFHDVGNAYLSLLQVATPKGWQIMNDA | 1487 | |
| | IIIS6 | | |
| PaFPC | IDSREVHKQPIRETNIYMYLYVFFIIFGSFFILKLFVCIIDIPROQRKAEGLSATDSRTOLIYRRAVMTMSAKPV | 1149 | |
| PaNav1 | IDSREDFKQPIRETNIYMYLYVFFIIFGSFFTLNLFIVIIDNFNEQKKKAGGSLEMPFTEQKKYINAMKKMGSKKPL | 1587 | |
| BgNav | IDSRELHKQPIRETNIYMYLYVFFIIFGSFFTLNLFIVIIDNFNEQKKKAGGSLEMPFTEQKKYINAMKKMGSKKPL | 1567 | |
| | IVS1 | IVS2 | |
| PaFPC | KRIPKPTCHPQSLMYDTSVNRKPFYTMILLIILNVAVMAIDHYGQSMFSDVLDYLNIFITIFVFCVTKVSGLRHHYF | 1229 | |
| PaNav1 | KAIIPRPKWRPAIVFEICTDKKFDMIIMLFIGFNMLTMDLHYQSSQFSDVLDYLNIMIFIVIFSSSECLMKIFALRYHYF | 1667 | |
| BgNav | KAIIPRPKWRPAIVFEICTDKKFDMIIMLFIGFNMLTMDLHYQSSQFSDVLDYLNIMIFIVIFSSSECLMKIFALRYHYF | 1647 | |
| | IVS3 | IVS4 | IVS5 |
| PaFPC | KDPWNIIDFYVVLATAGMLSDVIEKYFISPTLLRIRLRVGRRLRYFSARGVRLLLLALRKLRLTLFNSFLLFVI | 1309 | |
| PaNav1 | KEPNLFDVVFVILSILGLVLSDIIEKYFVSPVTLRVRVAVKGRVRLRVKAGKIRTLFALAMSLPALFNICLLFLV | 1747 | |
| BgNav | KEPNLFDVVFVILSILGLVLSDIIEKYFVSPVTLRVRVAVKGRVRLRVKAGKIRTLFALAMSLPALFNICLLFLV | 1727 | |
| | IVS5 | IVS6 | |
| PaFPC | MFVAVFGMEFFMHRDAGAADDVYNFKTFGQSTILLFQLATSAGWDGVYFAIANEEDCRAPDELGYPGNGCSRAIGIA | 1389 | |
| PaNav1 | MFIFAIFGMSFFMHVRDKGGLDDVYNFKTFGQSMILLFQMSTAGWDGVLDGIMNEBCRKPDELGYPGNGCSATIGIA | 1827 | |
| BgNav | MFIFAIFGMSFFMHVRDKGGLDDVYNFKTFGQSMILLFQMSTAGWDGVLDGIMNEEDCNKPNDELGYPGCGSATIGIA | 1807 | |
| | IVS6 | | |
| PaFPC | MLVSYLITICLVINMYAAVILVYVLDVYEDSKEGLTDDDDYDMFEVWQFDPDATQYIRYDQSELLEALQPPLOVQKP | 1469 | |
| PaNav1 | FLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDDYMYEIQQFDPDGTQYIRYDQSEFLDLEPPLQIHKP | 1907 | |
| BgNav | FLLSYLVISFLVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDDYMYEIQQFDPDGTQYIRYDQSEFLDLEPPLQIHKP | 1887 | |
| | | | |
| PaFPC | NKYKIISMNIPICKDDHIFYKDVLDALVKDVPSTRGSPVEAG----DVQAPNVDEAEYKPVSSTLQRQREYCVRLIQNA | 1545 | |
| PaNav1 | NKYKIVSMDIPICKGDLMFCDILDALTKDFPARKGNATIESEGLGEVQ-ARPEVGYEFPVSSTLWRQREYCARLIQNA | 1986 | |
| BgNav | NKYKIVSMDIPICKGDLMFCDILDALTKDFPARKGNPIEESAEELGEVQGRPDEVGYEFPVSSTLWRQREYCARLIQNA | 1967 | |
| | | | |
| PaFPC | WRKHKQQN----- | 1553 | |
| PaNav1 | WRKHKQQRQGCGEDSDAGDDALHDRHQTAVLVESDGFVTKNGHRVVIHSRSPSVTSRSTDV | 2050 | |
| BgNav | WRKHKQQRQGCGEDSDAGDDPELQDRHQTAVLVESDGFVTKNGHRVVIHSRSPSVTSRSTDV | 2031 | |

B

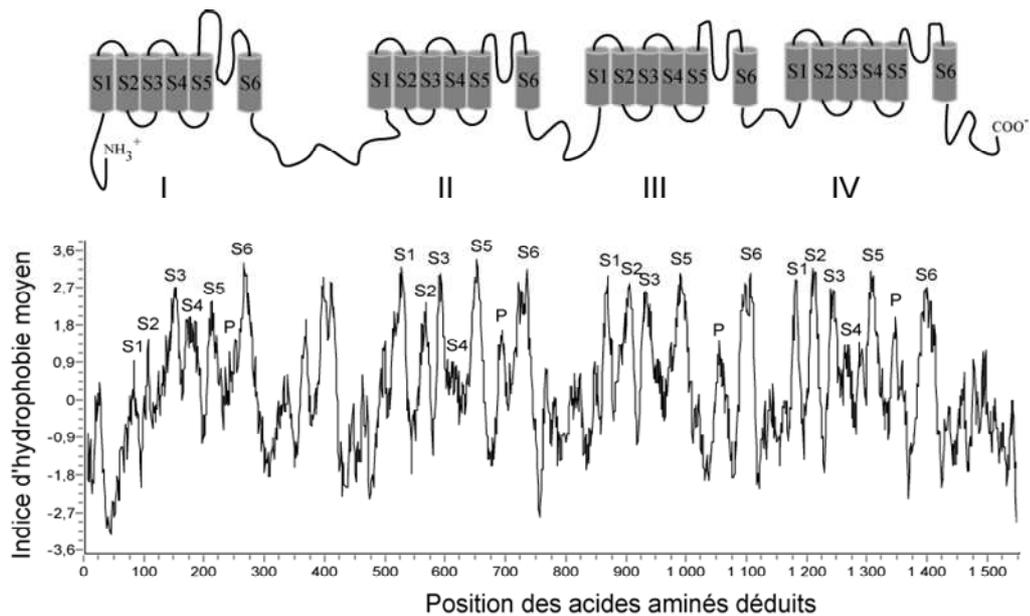


Figure 50 : Structure primaire de la sous-unité PaFPC1.

A. Alignement multiple des sous-unités PaFPC1, PaNav1, BgNav1 selon la méthode de *Clustal W*. Les résidus d'acides aminés identiques, similaires et différents sont insérés dans une zone de couleur gris clair, gris foncé et blanc respectivement. Les segments transmembranaires sont indiqués par une ligne noire. Les substitutions différenciant les sous-unités PaFPC1 et PaFPC2 sont indiquées par un astérisque (*) et concernent les substitutions suivantes : M122T, A294T, I545V, P751S, F815S, D1069G, K1468E et E1520G.

B. Organisation topologique de la sous-unité PaFPC1 déduite à partir du profil d'hydrophobicité. L'analyse d'hydrophobie a été réalisée en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle (Kyte et coll., 1982). Les résidus d'acides aminés déduits de la nouvelle protéine sont reportés sur l'axe des abscisses, et les indices d'hydrophobie mentionnés sur l'axe des ordonnées ont été calculés sur une fenêtre moyenne de 15 résidus d'acides aminés. Les hélices α S1 à S6 de chaque domaine (DI à DIV) sont identifiées par des indices d'hydrophobie élevée alors que les boucles P sont caractérisées par des indices d'hydrophobie plus faibles.

Pour l'analyse structure-fonction de PaFPC1, nous avons réalisé un alignement multiple des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte (Pa Na_v1 , Bg Na_v1 et Dm Na_v1) et du rat r $\text{Na}_v1.2$. Nous avons ainsi identifié les motifs moléculaires caractérisant les canaux Na_v , à savoir le senseur de potentiel, les boucles constituant le pore du canal et la porte d'inactivation (Figure 51).

Premièrement, les segments S4 de la sous-unité PaFPC contiennent des résidus d'acides aminés chargés positivement, et disposés régulièrement le long de l'hélice α (Figure 51A). En revanche, la charge nette des segments IS4 à IVS4 de la sous-unité PaFPC1 est inférieure à la charge nette du senseur de potentiel des autres sous-unités α de canaux Na_v . En effet, deux lysines sont substituées par deux glutamates dans les segments IIIS4 et IVS4. De plus, cinq substitutions conservant les charges positives (une arginine substituée par une lysine et *vice-versa*) sont localisées en position 236 (IS4), 619 (IIS4), 1271 (IVS4), 964 (IIIS4) et 1283 (IVS4) de la sous-unité PaFPC1. Or il a été montré que la charge et la structure des arginines et lysine localisées au sein du senseur de potentiel modulent les propriétés d'activation des canaux Na_v (Stuhmer et coll., 1989, Kontis et coll., 1997). Ainsi, à l'instar des canaux ioniques dépendant du potentiel, la sous-unité PaFPC comprend un senseur de potentiel.

Deuxièmement, les boucles P de la nouvelle sous-unité partagent de fortes homologies de séquence (entre 71 et 92% d'identité protéique) avec les boucles P des sous-unités Bg Na_v1 et Dm Na_v1 . L'anneau interne DEKA qui détermine la sélectivité aux ions Na^+ est conservé au sein du pore de la sous-unité PaFPC1 (Loughney et coll., 1989, Heinemann et coll., 1992, Chiamvimonvat et coll., 1996). De plus, les résidus d'acides aminés EEQD constituant l'anneau externe du filtre de sélectivité aux ions Na^+ des canaux Na_v d'insecte sont aussi conservés au niveau de la sous-unité PaFPC1. En revanche, les résidus EEID des canaux Na_v d'insecte déterminant la sensibilité à la tétrodotoxine diffèrent de quelque peu au niveau de la sous-unité PaFPC1 (Du et coll., 2009a). En effet, l'isoleucine est substituée par un résidu d'acide aminé similaire, à savoir une leucine au niveau de la sous-unité PaFPC1. La conservation des motifs moléculaires associés à la sélectivité des canaux ioniques aux ions Na^+ indique que PaFPC est apparenté aux canaux Na_v .

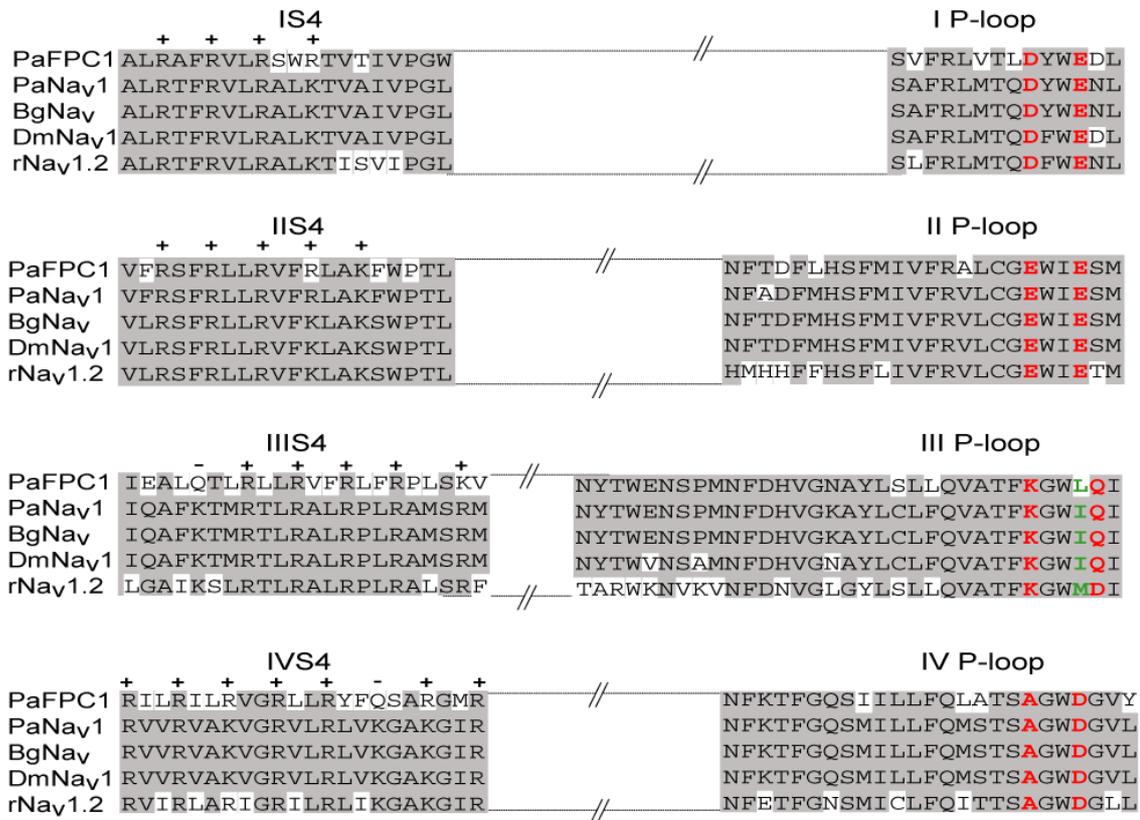
Troisièmement, la boucle intracellulaire L3 de PaFPC1 partage peu d'identité de séquence protéique (34%) avec les boucles L3 des sous-unités Pa Na_v1 , Bg Na_v1 et Dm Na_v1 . De plus, elle ne possède pas le motif IFMT impliqué dans l'inactivation rapide des canaux Na_v d'insecte (Figure 51B). Les résidus d'acides aminés déterminant le site récepteur de la porte d'inactivation ne sont pas conservés au niveau de la sous-unité PaFPC1 (Goldin,

2003). L'ensemble de ces résultats indiquent que les propriétés d'inactivation de la sous-unité PaFPC1 sont probablement atypiques.

Enfin, les tailles des boucles intracellulaires L1 (99 résidus d'acides aminés) et L2 (109 résidus d'acides aminés) de la sous-unité PaFPC1 sont respectivement deux à trois fois plus petites que les boucles des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte.

A l'issue de l'identification des déterminants moléculaires impliqués dans la fonction des canaux Na_v , il est intéressant de remarquer que la structure de PaFPC est comparable aux sous-unités Na_x de vertébrés en dépit d'une faible homologie de séquence protéique (34%). En effet, les deux sous-unités ont un cadre de lecture réduit, partage une identité de séquence protéique proche de 50% avec les canaux Na_v classiques et ne possède pas le tripeptide impliqué dans l'inactivation rapide (Gautron et coll., 1992, George et coll., 1992, Felipe et coll., 1994, Akopian et coll., 1997). En dépit de ces singularités, la sous-unité Na_x est considérée jusqu'à ce jour comme un membre de la sous-famille des canaux Na_v de mammifère (Goldin, 2002b). En revanche, contrairement à la sous-unité PaFPC, la lysine de l'anneau DEKA est substituée par une asparagine au niveau de la sous-unité Na_x (George et coll., 1992). Or la lysine joue un rôle essentiel pour la sélectivité des canaux Na_v aux ions Na^+ (Favre et coll., 1996).

A



B

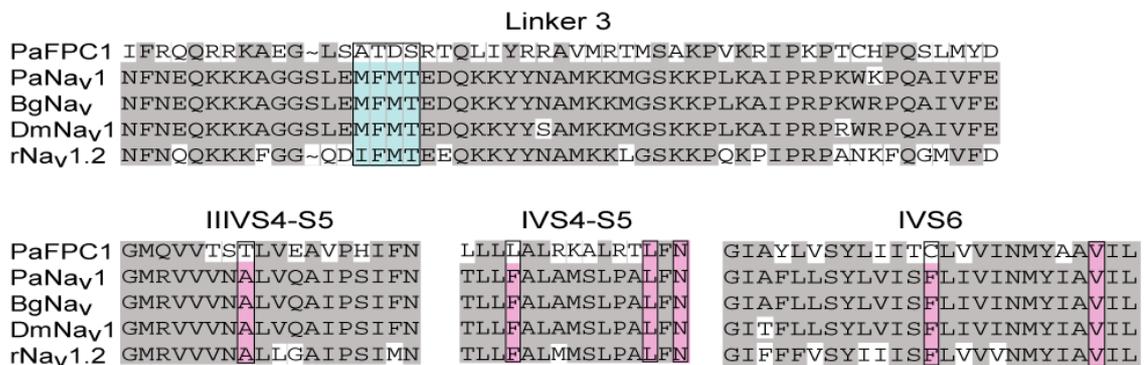


Figure 51 : Alignement des séquences protéiques des sous unités PaFPC1, PaNav₁, BgNav₁, DmNav₁ et rNav_{1.2}.

Les résidus d'acides aminés identiques sont indiqués par une zone grise et les résidus divergents sont indiqués en blanc.

A. Alignement des segments S4 (senseur de potentiel) et des boucles P (filtre de sélectivité et récepteur à la TTX). Les résidus d'acides aminés positivement sont mentionnés par le symbole + et les glutamates par le symbole -. Les résidus d'acides aminés constituant les anneaux DEKA, EEQD (filtre de sélectivité aux ions Na⁺) et EEMD (site récepteur de la TTX) sont écrits en caractères rouge.

B. Déterminants moléculaires impliqués dans l'inactivation rapide des canaux Na_v : les résidus d'acides aminés constituant la porte d'inactivation MFMT chez les insectes et IFMT chez les mammifères sont encadrés en bleu clair. Les résidus d'acides aminés constituant le site récepteur de la porte d'inactivation sont répartis au niveau des boucles IIIVS4-S5 et IVS4-S5 et le segment IVS6 (cadre rose).

D.3 Expression des transcrits codant la sous-unité PaFPC

D.3.1 Expression tissulaire

La distribution tissulaire des transcrits *PaFPC* a été réalisée par RT-PCR de chaîne nerveuse¹⁷, des muscles des pattes, des intestins et des gonades mâles MSG. Afin de discriminer les transcrits *PaFPC* des transcrits *PaNav*, à partir de leur poids moléculaire, nous avons conçus des oligonucléotides ciblant la boucle intracellulaire L1. Deux amplicons d'approximativement 750 et 900 pb correspondant à la boucle L1 de *PaNav*_{v1} ont été identifiés dans tous les tissus, excepté les gonades MSG (Figure 52). L'analyse de la séquence nucléique des produits de RT-PCR de chaîne nerveuse a montré qu'il s'agissait de différents variants. La caractérisation détaillée des transcrits *PaNav*, est étayée dans la partie B de ce chapitre. En revanche, un seul amplicon correspondant aux transcrits *PaFPC* a été isolé. Les transcrits *PaFPC* sont abondamment exprimés dans la chaîne nerveuse, les muscles et les intestins. En dépit d'une dissection minutieuse des différents tissus, on ne peut pas exclure des contaminations par des ARN de tissus nerveux provenant des efférences ou afférences. Pour contrôler ces éventuelles contaminations, nous avons amplifié le gène codant le précurseur du neuropeptide FMRFamide, marqueur des neurones.

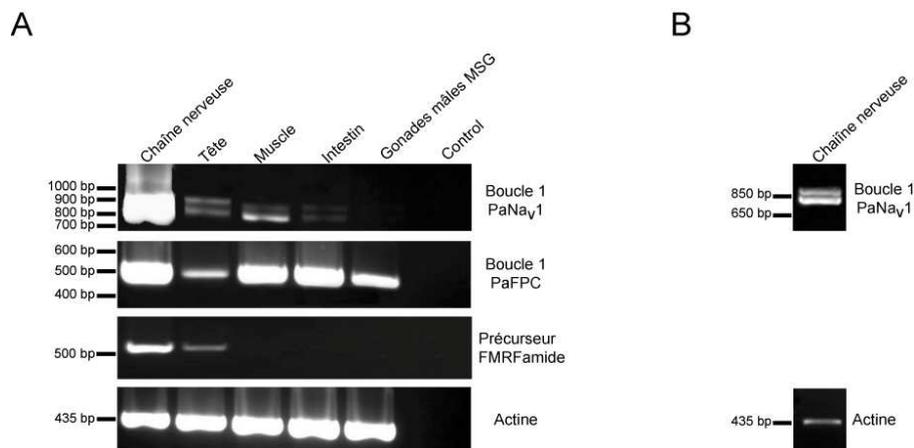


Figure 52 : Distribution tissulaire des transcrits *PaFPC* et *PaNav*_{v1}.

A. Chaque produit de PCR a été séparé sur un gel comportant 1,5% d'agarose. Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5 µg) et de matrice d'ADNc (1 µl) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine. Le gène du précurseur de FMRFamide permet d'identifier spécifiquement les tissus nerveux.

B. Afin de visualiser les différents variants de *PaNav*, 5 µl de produit de PCR ont été séparé au lieu de 15 µl au niveau d'A. Comparativement, un volume similaire de produit de PCR correspondant à l'actine a été séparé.

¹⁷ Nous entendons par chaîne nerveuse : les 3 ganglions thoraciques et les 6 ganglions abdominaux

D.3.2 Expression cellulaire

En adaptant la technique de la RT-PCR sur cellule unique aux neurones DUM isolés nous avons pu amplifier des ADNc codant l'actine et les sous-unités PaNav_v et PaFPC. Plus précisément, pour réaliser des profils d'expression nous avons eu recours à des PCR multiplexes emboîtées (Matériels et méthodes/Chapitre 2/J.2.2). Les produits de PCR ont été sous-clonés pour vérifier leur spécificité. L'analyse des séquences a confirmé que les ADNc amplifiés codent l'actine, le domaine I de la sous-unité PaFPC et le domaine IV de la sous-unité PaNav_v (Figure 53). Par conséquent, dans les neurones octopaminergiques DUM, les gènes codant les sous-unités PaFPC et PaNav_v sont cotranscrits. D'une manière analogue, les transcrits du récepteur à la pèrisulfakinine, hormone de la satiété, et du récepteur à l'adipokinétique, hormone de la faim, ont aussi été détectés par RT-PCR sur neurones DUM isolés de *P. americana* (Wicher et coll., 2006, Wicher et coll., 2007). Ainsi, l'expression du gène PaNav_v corrobore tout à fait la phase de dépolarisation des potentiels d'action enregistrés avant le prélèvement du cytoplasme des neurones.

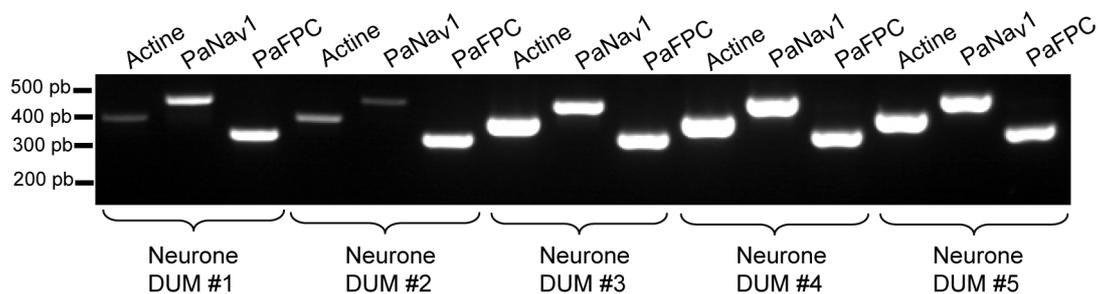


Figure 53 : Profil d'expression des ADNc codant les sous-unités PaNav_v et PaFPC dans les neurones DUM.

Un volume de 10 µl produit de PCR a été séparé sur un gel comportant 1,5% d'agarose. La taille des ADNc codant l'actine (386 pb) indique qu'il n'y a pas de contaminations d'ADNg. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué sur la gauche (1kb⁺, Invitrogen).

D.4 Relations phylogénétiques entre PaFPC et les gènes codant des canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires

D.4.1 Arbre phylogénétique

Nous avons souhaité déterminer les relations phylogénétiques entre le nouveau gène *PaFPC* et les gènes codant des sous-unités α de canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires chez les arthropodes. Le modèle de substitution nucléotidique sélectionné selon la méthode statistique AIC implémenté au logiciel MODELTEST est le modèle (GTR+I+C) avec les paramètres suivants: $f(A)=0.2446$, $f(C)=0.2529$, $f(G)=0.2364$; taux de mutation $R(A-C)=2.1266$, $R(A-G)=3.9675$, $R(A-T)=1.5464$, $R(C-G)=1.5043$, $R(C-T)=5.7631$; proportion de sites invariables (I)=0.0484 et paramètre de la distribution Gamma (G)=0.6973. L'arbre de maximum de vraisemblance généré à partir de ce modèle d'évolution est présenté dans la figure 54. Chacun des six clades monophylétiques, identifiés A à F sur la figure 54, est associé à une sous-famille de canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires. Ainsi, nous distinguons les canaux Na_v , les canaux orthologues à la sous-unité $\alpha 1U$ de *D. melanogaster*, les canaux orthologues à la sous-unité DSC1 de *D. melanogaster* et les trois types de canaux calciques Ca_v (Ca1D, Ca1A et $\alpha 1T$).

Le clade A correspond aux canaux Na_v et reflète l'arbre de vie des différents ordres d'insectes (Niven et coll., 2008). De ce fait, les canaux Na_v des espèces de l'ordre des *Blattaria* (Bg Na_v1 et Pa Na_v1) se branche à la base des canaux Na_v des espèces des autres ordres d'insectes étudiés. La nouvelle sous-unité PaFPC1 se branche quant à elle à la base des canaux Na_v d'insecte. Au regard de la littérature, c'est la première fois que deux gènes codant des sous-unités α de canaux Na_v si proches phylogénétiquement sont décrits au sein d'une même espèce d'insecte. Jusqu'à ce jour les gènes codant les canaux SC1 (clade B) étaient considérés comme les plus proches phylogénétiquement des gènes codant des sous-unités orthologues à Dm Na_v (Dong, 2007). En effet, l'identité de séquence protéique partagée entre Dm Na_v1 et DSC1 est de 51% (Ramaswami et coll., 1989). En revanche, l'identité de séquence protéique entre BSC1 et Bg Na_v1 de *Blattella germanica* est de 34% (Liu et coll., 2001). De plus, il a été montré que la sous-unité BSC1, exprimée dans des ovocytes de xénope, est perméable à la fois aux ions Na^+ et aux ions Ca^{2+} (Liu et coll.,

2001). Par ailleurs, le clade C contient les gènes orthologues à la sous-unité $\alpha 1U$ de *D. melanogaster*. Des études de génétique ont montré que ce canal apparenté à la fois aux canaux Na_v et aux canaux calciques Ca_v intervient dans la régulation du comportement moteur diurne (Nash et coll., 2002). Les clades monophylétiques D, E et F correspondent aux gènes codant des canaux Ca_v orthologues aux sous-unités Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3 de vertébrés (Catterall et coll., 2005b). Ils se branchent à la base des canaux ioniques dont la structure moléculaire et la fonction est intermédiaire à celle des canaux Na_v et Ca_v . En effet, d'un point de vue évolutif, les canaux Na_v et SC1 sont considérés comme les descendants des premiers canaux Ca_v (Strong et coll., 1993, Zhou et coll., 2004). Ainsi, l'arbre phylogénétique proposé est en accord avec les liens de parenté entre les gènes codant des canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires.

D.4.2 PaFPC : résultat d'une duplication ancienne des canaux Na_v d'insectes

A ce jour, les gènes codant les sous-unités α des canaux Na_v chez les insectes constitue une seule famille. En revanche, quatre gènes codant des sous-unités α de canaux Na_v chez un autre protostomien, à savoir la sangsue *Hirudo medicinalis* (annélide), ont été caractérisés (Blackshaw et coll., 2003). Nos résultats suggèrent alors qu'un événement de duplication a pu conduire aux gènes *PaNa_v1* et *PaFPC* au sein de *P. americana*. L'absence de gènes orthologues à *PaFPC* parmi le génome des espèces d'insectes étudiées ainsi que son embranchement à la base des canaux Na_v de *Blattaria* indique que *PaFPC* a été conservé au sein de cet ordre. Pour étayer cette suggestion, nous avons tenté d'amplifier par RT-PCR les ADNc codant des sous-unités orthologues à *PaFPC* chez d'autres insectes de l'ordre des *Blattaria* telles que la blatte allemande (*Blattella germanica*) et la blatte souffleuse de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) avec les mêmes oligonucléotides dégénérés ciblant *PaNa_v1* et *PaFPC* (Matériel et méthodes/Chapitre 2/E.1.1 Tableau 11). En dépit de plusieurs conditions d'amplification, les ADNc se sont avérés coder pour des sous-unités α de canaux Na_v classiques. Comparativement, chez le tunicier *Ciona intestinalis*, deux des quatre gènes codant des sous-unités α de canaux Na_v , à savoir *CiNa_v3* et *CiNa_v4*, n'ont pas été identifiés chez un autre tunicier tel que *Halocynthia roretzi* (Okamura et coll., 2005).

Contrairement aux annélides et tuniciers, l'origine de la diversité des gènes codant des sous-unités de canaux Na_v est relativement bien documentée pour les poissons et les mammifères (Plummer et coll., 1999, Lopreato et coll., 2001, Goldin, 2002a, Novak et

coll., 2006). Huit et neuf gènes codent respectivement des sous-unités α de canaux Na_v chez ces deux groupes de deutérostomiens (Goldin, 2002a, Okamura et coll., 2005, Novak et coll., 2006). Tout d'abord, chez les mammifères, les gènes codant les canaux Na_v sont physiquement liés à des groupes de gènes HOX (pour « homeobox ») répartis sur quatre segments chromosomiques paralogues. Cette organisation génomique suggère que l'émergence de multiples gènes codant les canaux Na_v résulte de la duplication du génome après la divergence séparant les pré-vertébrés des urochordés (Plummer et coll., 1999). De plus, des duplications en tandem des gènes codant les canaux Na_v auraient par la suite conduit au neufs gènes (Na_v1 à Na_v9) décrits chez les mammifères (Plummer et coll., 1999). Toutefois, ce modèle évolutif des canaux Na_v de mammifères est discuté pour d'autres lignées de vertébrés tels que les poissons. Dans un premier temps, l'hypothèse d'une duplication en tandem des gènes Na_v a été validée pour le poisson *Sternopygus macrurus* (Lopreato et coll., 2001). Mais, une étude phylogénétique conduite à partir des gènes *SNCA* de plusieurs espèces de poissons a au contraire stipulé que l'expansion de la diversité des canaux Na_v chez les téléostéens résulte uniquement d'une importante duplication du génome (Novak et coll., 2006). Par conséquent, l'origine de la diversité des gènes codant des canaux Na_v est ancienne dans l'histoire évolutive des vertébrés mais différente entre le groupe des téléostéens et des tétrapodes.

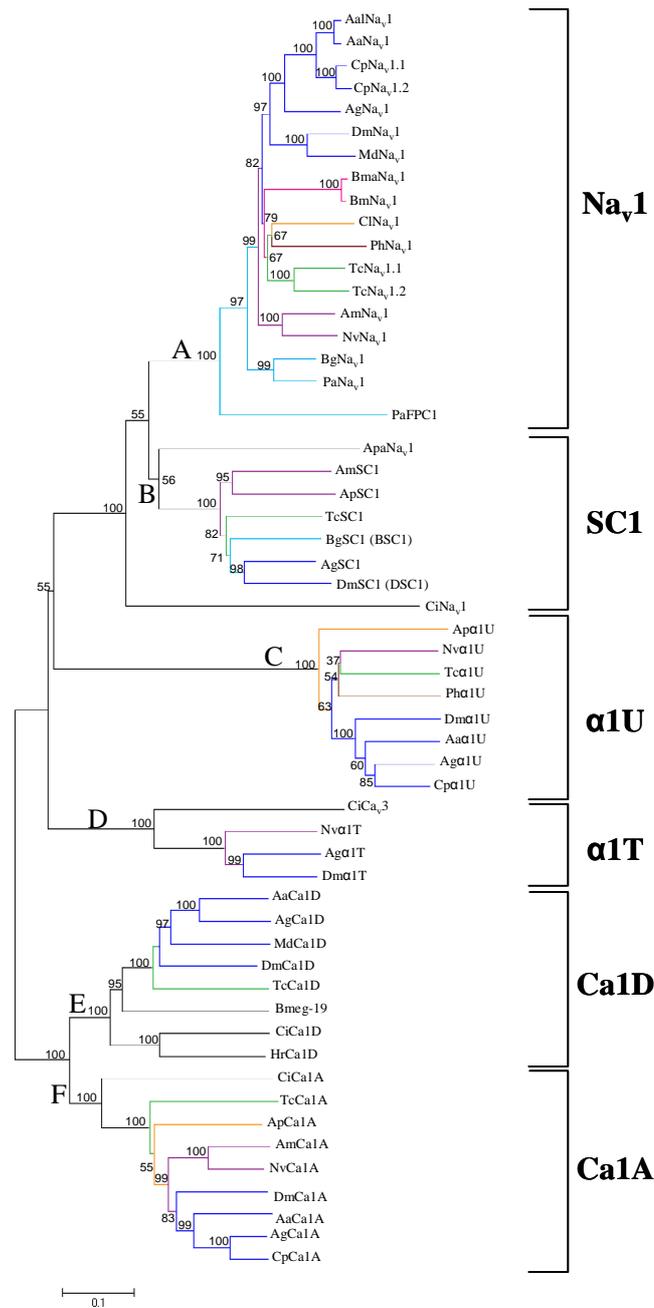


Figure 54 : Arbre de maximum de vraisemblance des sous-unités α de canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires chez les arthropodes.

Le modèle de substitution nucléotidique (GTR+I+G) a été sélectionné à partir d'un alignement multiple des canaux Na_v , des canaux calciques Ca_v , des canaux orthologues aux sous-unités $\alpha 1\text{U}$ et DSC1 de *D. melanogaster*. Six clades monophylétiques identifiés par les lettres A, B, C, D, E et F correspondent respectivement aux canaux Na_v , aux canaux orthologues à DSC1 (suffixe SC1), aux canaux orthologues à Dm $\alpha 1\text{U}$ (suffixe $\alpha 1\text{U}$), aux canaux calciques orthologues aux canaux Ca_{v3} de vertébrés (suffixe $\alpha 1\text{T}$), aux canaux calciques orthologues aux canaux Ca_{v1} de vertébrés (suffixe Ca1D) et aux canaux calciques orthologues aux canaux Ca_{v2} de vertébrés (suffixe Ca1A). Les embranchements correspondant à différents ordres sont indiqués par une couleur : bleu foncé : *Diptera* ; bleu clair : *Blattaria* ; marron : *Phthiraptera* ; orange : *Hemiptera* ; rose : *Lepidoptera* ; vert : *Coleoptera* ; violet : *Hymenoptera*. Les valeurs de bootstrap supérieur à 50% sont indiquées ainsi que la barre d'échelle représentant le nombre de substitutions par site. Pour des raisons de clarté, les abréviations relatives aux espèces ainsi que les numéros d'accès des séquences sont reportés dans le tableau en annexe de la publication n°1.

E Les transcrits de la sous-unité auxiliaire β des canaux sodium de la blatte *Periplaneta americana*

Les canaux Na_v d'insecte comportent une sous-unité principale α ainsi qu'une ou plusieurs sous-unités β . Afin de compléter notre étude sur la structure des canaux Na_v de *P. americana*, nous avons souhaité connaître les variants codant la sous-unité auxiliaire orthologue à la sous-unité DmTEH1 (Introduction/Chapitre 1/C.2.). Nous avons choisi de caractériser en priorité cette sous-unité en raison de son expression dans le SNC et de sa fonction régulatrice importante des sous-unités DmNa_v exprimées dans des ovocytes de xénope.

E.1 Clonage des ADNc codant les sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2

E.1.1 Caractérisation des séquences nucléiques et protéiques déduites des transcrits isolés

L'alignement des séquences protéiques disponibles des sous-unités homologues à DmTEH1 a permis de mettre en évidence des régions conservées que nous avons ciblées avec les amorces nucléotidiques dégénérées TEH1-1S et TEH1-2AS. L'ADNc codant la sous-unité orthologue à DmTEH1 chez *P. americana* a été isolé par RT-PCR à partir d'ARN totaux de chaîne nerveuse selon la stratégie décrite sur la figure 55. Ainsi, les ADNc amplifiés avec les oligonucléotides dégénérés TEH1-1S et TEH1-2AS contiennent 561 pb et les séquences protéiques déduites partagent 51% d'identité de séquence protéique avec la région homologue de DmTEH1. A partir des séquences nucléiques caractérisées nous avons conçu des oligonucléotides spécifiques pour amplifier les extrémités 5' et 3' des transcrits par la technique de RACE-PCR (Tableau 16 et Tableau 17).

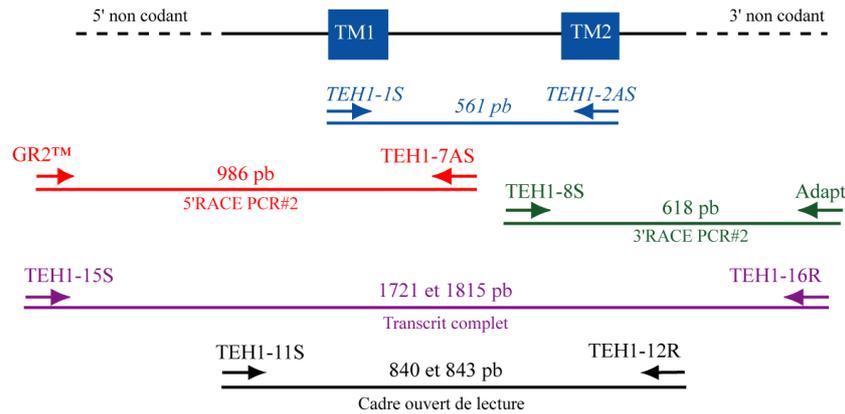


Figure 55 : Clonage par RT-PCR de l'ADNc codant la sous-unité auxiliaire orthologue à DmTEH1 chez *Periplaneta americana*.

Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont représentés par des rectangles, les boucles par des traits pleins et les régions 5' et 3' non codantes par des traits en pointillés. L'amplification réalisée à partir des oligonucléotides dégénérés est indiquée en bleu. La taille des produits de PCR est indiquée en paire de base (pb).

Les ADNc amplifiés par la technique de la 5' RACE-PCR contiennent une région 5' non codante comportant 554 pb et une région de 432 pb codant l'extrémité 5' de la protéine (Figure 55). Le peptide signal a été identifié par homologie avec les sous-unités auxiliaires d'insecte orthologues à DmTEH1. La région 5' non codante comprend un cadre ouvert de lecture de type « uORF » (pour « upstream open reading frame »). La séquence consensus du site d'initiation de la traduction, à savoir C/AAAC/A définit chez *D. melanogaster*, n'a pas été identifiée parmi les transcrits analysés (Cavener, 1987). Par ailleurs, les ADNc amplifiés par la technique de la 3' RACE-PCR contiennent une région 3' non codante comportant 421 pb et une région de 197 pb codant l'extrémité 3' de la protéine (Figure 55). La séquence préférentielle AATAAA du site de polyadénylation n'a pas été observée parmi les transcrits analysés. Toutefois, les ADNc contenant la région 3' non codante comporte une queue poly(A) de 34 pb.

Les expériences de 5' et 3'-RACE ont permis de concevoir des oligonucléotides spécifiques pour amplifier la totalité du transcrit et du cadre ouvert de lecture (Figure 55). Deux populations d'ADNc ne se différenciant que d'un segment de 94 pb ont été clonés et leur séquence analysée (Figure 56). Les séquences protéiques déduites des séquences nucléiques partagent 47% d'identité protéique avec la sous-unité DmTEH1. De plus, une interrogation de type BLASTP à partir des séquences protéiques prédit la plus forte homologie avec des sous-unités orthologues à DmTEH1. Par conséquent, les transcrits isolés codent des sous-unités orthologues à DmTEH1 chez *P. americana*. Ainsi, en accord avec la nomenclature établie (Tableau 27), nous avons nommé ces deux populations d'ADNc *PaTEH1.1* (1721 pb avec un cadre ouvert de lecture de 843 pb codant une protéine

de 280 résidus d'acides aminés) et *PaTEH1.2* (1815 pb dont un cadre ouvert de lecture de 840 pb codant une protéine de 279 résidus d'acides aminés). L'extrémité 3' des transcrits *PaTEH1.1* comprend une séquence supplémentaire de 94 pb (cadre rouge Figure 56). Cette séquence, nommée séquence A, contient un codon stop et son insertion augmente de 60 pb la région 3' non codante des transcrits *PaTEH1.2*. De plus, l'extrémité carboxy-terminale codée par la séquence A de la sous-unité *PaTEH1.2* est différente de celle de la sous-unité *PaTEH1.1* (Figure 56). *PaTEH1.1* contient à la fin du cadre ouvert de lecture une séquence nommée séquence B (cadre bleu Figure 56) au lieu de la séquence A dans *PaTEH1.2*. Donc, les extrémités carboxy-terminales de ces deux protéines, diffèrent du fait de la présence de la séquence A dans leur ADNc. Lorsque la séquence A est présente, la séquence B ne fait plus alors partie du cadre ouvert de lecture.

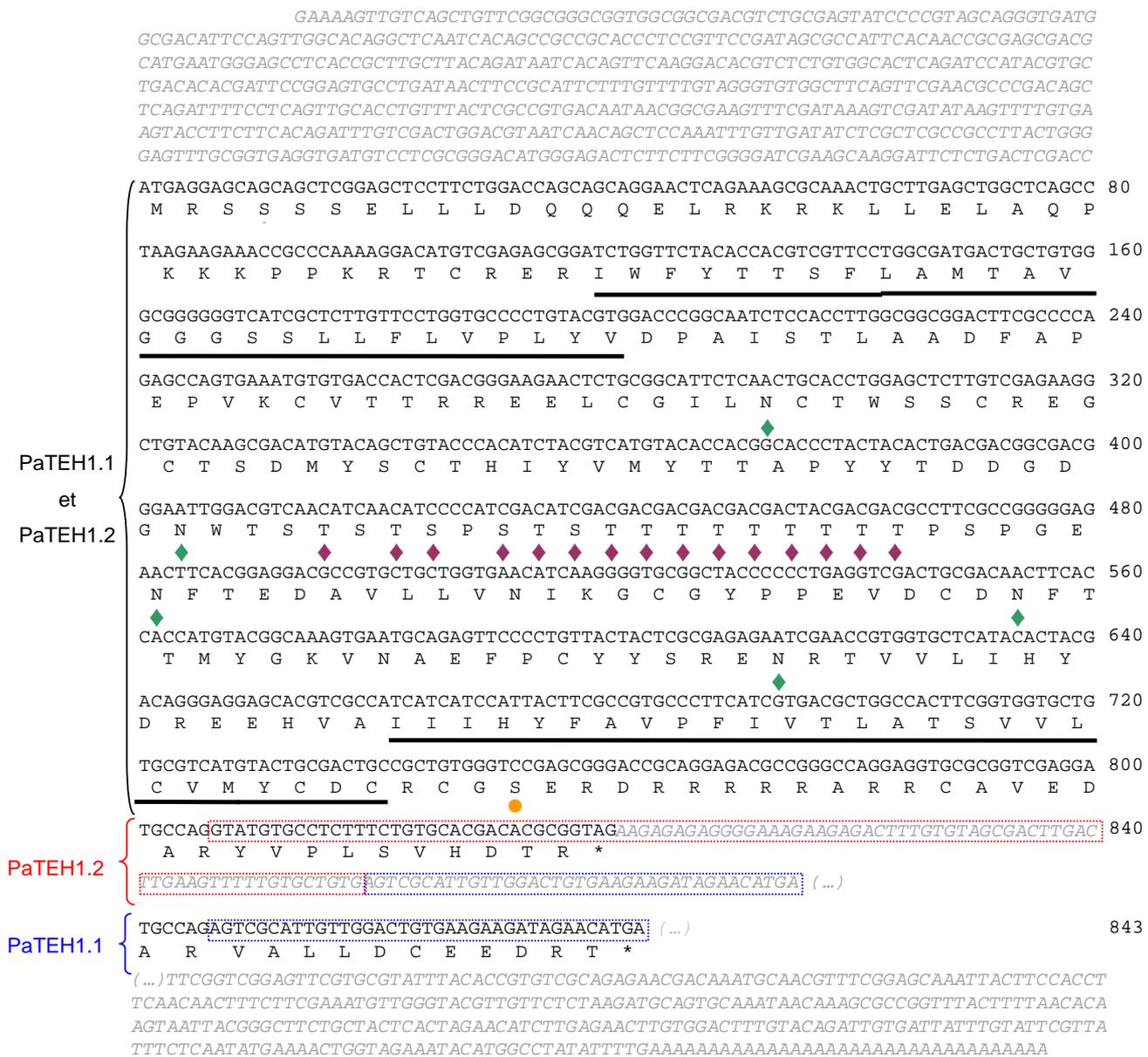


Figure 56 : Séquences nucléiques et protéiques déduites des ADNc PaTEH1.1 et PaTEH1.2. Les séquences non codantes sont écrites en italique et grisées.

Les séquences de PaTEH1.1 et PaTEH1.2 sont identiques exceptées à partir de la position 806. Ainsi, d'un côté l'extrémité COOH de PaTEH1.2 est codée par une fraction de la séquence A encadrée en rouge. D'un autre côté, l'extrémité COOH de PaTEH1.1 est codée par la séquence B encadrée en bleu. Les domaines transmembranaires sont indiqués par un trait épais et ont été déterminés à partir de l'outil Phobius. Les sites putatifs de N-glycosylation et d'O-glycosylation sont respectivement indiqués par un losange vert et marron. La sérine de la séquence consensus du site de phosphorylation de la PKC est indiquée par un cercle orange. Les chiffres sur la droite indiquent le nombre de paires de base du cadre ouvert de lecture.

E.1.2 Comment expliquer l'existence des deux transcrits PaTEH1.1 et PaTEH1.2 ?

La découverte de PaTEH1.1 et PaTEH1.2 suggère deux possibilités quant à leur origine : ils résultent de l'épissage alternatif d'un même gène ou de l'expression de deux gènes distincts (Figure 57). Pour élucider cette question, nous avons donc envisagé de déterminer la structure du ou des gènes codant les transcrits identifiés. Pour ce faire, nous avons tenté d'amplifier l'ADNg de *P. americana* à l'aide d'oligonucléotides ciblant la boucle extracellulaire et la séquence B des gènes recherchés. L'analyse électrophorétique des produits de PCR montre que leur taille est supérieure de 100 pb avec l'ADNg par rapport à celle des ADNc amplifiés avec les mêmes oligonucléotides. Cette différence suggérait alors la présence d'un intron. Or il s'est avéré après analyse de la séquence des amplicons qu'il s'agissait d'ADNg non spécifiques. En effet, les extrémités 5' et 3' des séquences des clones isolés contiennent le même oligonucléotide, indiquant que ce dernier s'est hybridé à chacune des deux extrémités lors de la PCR. Un résultat analogue a été obtenu avec une autre paire d'oligonucléotide. Il est donc probable que la zone amplifiée contient un intron de taille importante, non compatible avec les conditions de PCR.

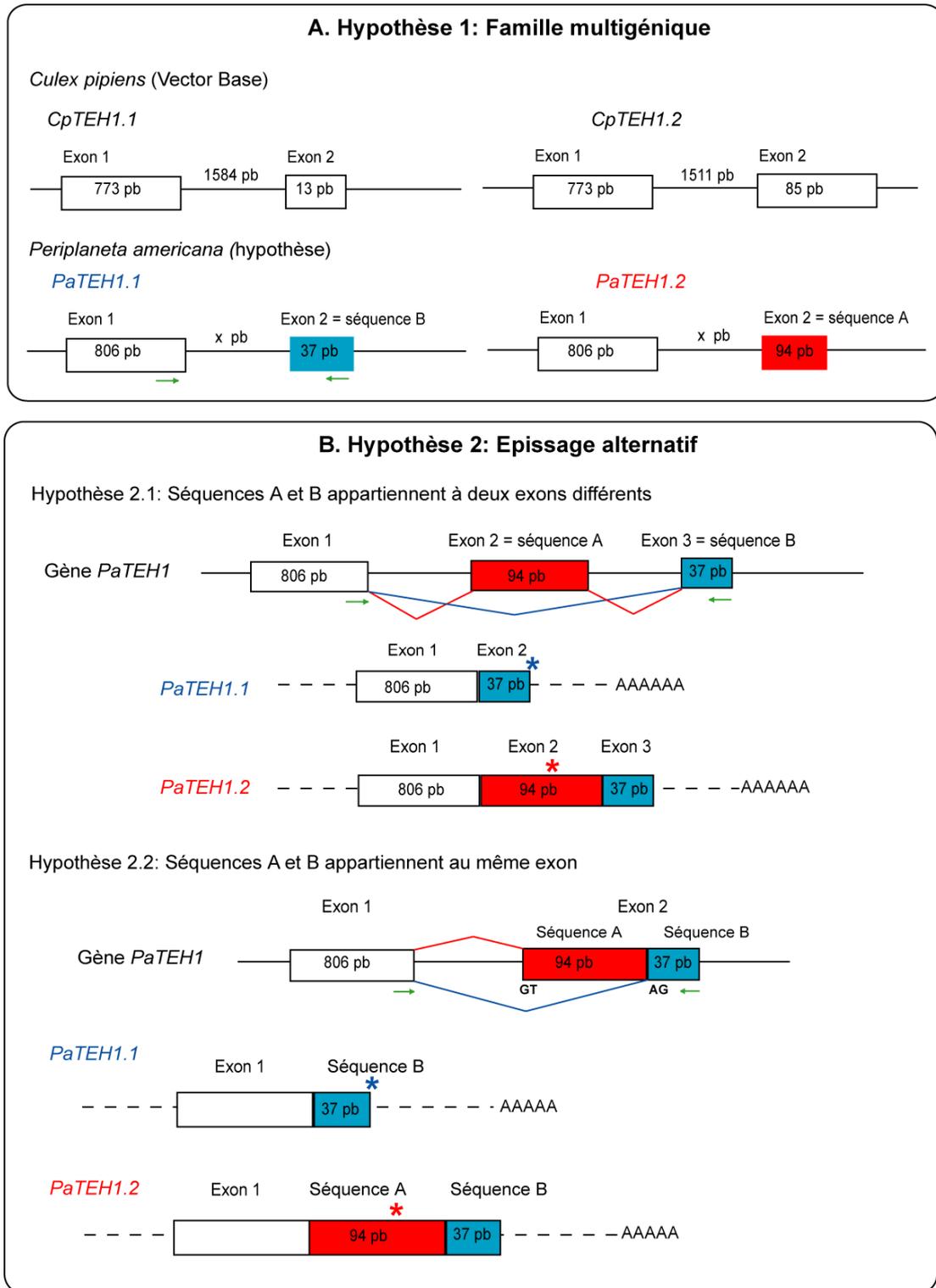


Figure 57: Hypothèses proposées pour expliquer l'origine des transcrits *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2*.

A. L'hypothèse d'une famille multigénique est basée selon les gènes dupliqués *CpTEH1.1* et *CpTEH1.2* identifiés dans le génome de *Culex pipiens*.

B. Deux formes d'épissage alternatif au niveau du gène *PaTEH1* sont envisageables en fonction de la structure du gène *PaTEH1*.

Les exons sont représentés par des cadres, les introns par des traits pleins, les séquences non codantes des transcrits par des traits pointillés, les codons stops par des astérisques et les oligonucléotides employés pour amplifier l'ADN génomique par des flèches vertes.

A l'instar des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2, l'alignement des sous-unités CpTEH1.1 et CqTEH1.2 de *C. pipiens* montre une divergence juste au niveau des extrémités carboxy-terminales. L'analyse de l'annotation du génome de *C. pipiens* indique que ces deux isoformes sont codées par deux gènes dupliqués sur le même chromosome (<http://cpipiens.vectorbase.org/Genome/ContigView>) (Figure 57). Pour confirmer que PaTEH1.1 et PaTEH1.2 sont deux gènes distincts, il serait nécessaire de faire une analyse par southern-blot pour identifier le polymorphisme de restriction caractérisant chacun des gènes.

Deux formes d'épissage sont envisageables pour expliquer l'origine de PaTEH1.1 et PaTEH1.2, selon que les séquences A et B appartiennent à deux exons distincts ou à un seul exon commun (Figure 57). Ainsi, la présence d'un site d'épissage alternatif en amont de la séquence A pourrait conduire à l'exclusion ou l'insertion de celle-ci. Le principe d'un épissage alternatif consistant en l'excision partielle d'un exon, soit la séquence A, corrobore avec la présence des dinucléotides GT et AG caractéristiques des séquences donneur/accepteur des sites d'épissage de part et d'autre de cette séquence (Figure 57). Ainsi pour confirmer la nature du site d'épissage, nous concevrons des oligonucléotides ciblant les séquences A et B pour amplifier l'ADNg.

E.2 Conservation des motifs des sous-unités auxiliaires β des canaux Na_v d'insecte.

L'analyse du profil d'hydrophobie de la séquence protéique PaTEH1.1 révèle deux domaines transmembranaires avec des indices d'hydrophobie élevés connectés par une boucle hydrophile (Figure 58). Cette prédiction est en accord avec la structure secondaire des sous-unités auxiliaires de canaux Na_v de *D. melanogaster* (Feng et coll., 1995a, Derst et coll., 2006). Les résidus d'acides aminés constituant les domaines transmembranaires ont ensuite été déterminés plus précisément à partir de l'outil Phobius¹⁸. Ils s'avèrent être légèrement différents par rapport à la prédiction des domaines transmembranaires de DmTEH1 proposés par Derst et coll. 2006.

¹⁸ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/phobius/>

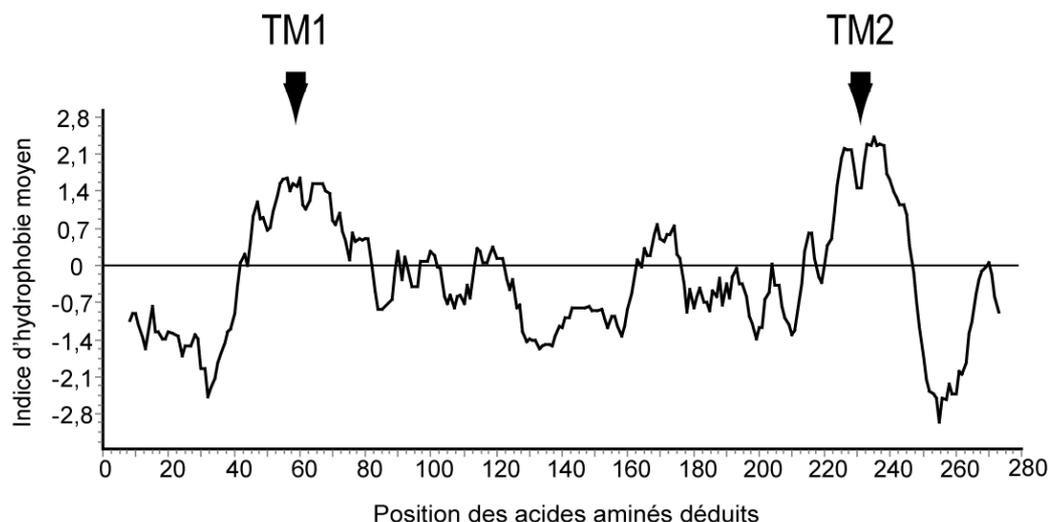


Figure 58 : Profil d'hydrophobie de la sous-unité PaTEH1.1 réalisé à partir de la méthode Kyte et Doolittle, 1982.

Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont caractérisés par les indices d'hydrophobie les plus élevés et sont indiqués par des flèches. Les résidus d'acides aminés sont représentés sur l'axe des abscisses, les indices d'hydrophobie sont mentionnés sur l'axe des ordonnées en raison d'une moyenne de 15 résidus d'acides aminés.

L'alignement multiple de la sous-unité PaTEH1.1 avec les sous-unités DmTEH1, ApTEH1, CpTEH1, AgTEH1, NvTEH1, AmTEH1, TcTEH1 et PhTEH1 met en exergue les régions conservées et les motifs moléculaires caractéristiques des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte (Figure 59). De plus, il permet de déduire que PaTEH1.1 partage le maximum d'identité de séquence protéique avec la sous-unité TcTEH1 (55%) ; et le minimum d'identité de séquence protéique avec la sous-unité ApTEH1 (31%) (Tableau 26). Comparativement à la sous-unité principale Pa Na_v1 partageant entre 74 et 92% d'identité de séquence protéique avec les sous-unités orthologues connues, la sous-unité auxiliaire PaTEH1.1 est moins conservée entre les insectes.

Tableau 26 : Identités de séquence protéique partagées entre PaTEH1 et les sous-unités auxiliaires orthologues d'insecte.

| Ordre taxonomique | Diptera | | | | Hymenoptera | | | Phthiraptera | Coleoptera |
|--|--------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Espèce | <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Anopheles gambiae</i> | <i>Culex pipiens</i> | <i>Culex pipiens</i> | <i>Acyrtosiphon pisum</i> | <i>Apis mellifera</i> | <i>Nasonia vitrepeennis</i> | <i>Pediculus humanus humanus</i> | <i>Tribolium castaneum</i> |
| Sous-unité α | DmTEH1 | AgTEH1 | CpTEH1.1 | CpTEH1.2 | ApTEH1 | AmTEH1 | NvTEH1 | PhTEH1 | TcTEH1 |
| Identité de séquence protéique avec PaTEH1.1 (%) | 47 | 50 | 51 | 49 | 31 | 47 | 45 | 53 | 55 |

Premièrement, l'extrémité amino-terminale est de taille réduite (47 résidus d'acide aminé) et comprend de nombreux résidus d'acides aminés chargés positivement. Les lysines et les arginines représentent jusqu'à 28% de la masse moléculaire de l'extrémité amino-terminale de PaTEH1.1. L'extrémité amino-terminale des sous-unités orthologues est aussi riche en lysine et arginine (~ 20% de la masse moléculaire) (Figure 59). Ces

séquences protéiques semblent fonctionner comme des signaux d'exportation du reticulum endoplasmique (Derst et coll., 2006).

Deuxièmement, la boucle extracellulaire de PaTEH1.1 (151 résidus d'acides aminés) représente plus de 50% de la taille de la protéine. Elle est caractérisée par huit cystéines conservées au niveau des autres sous-unités orthologues (Figure 59). Quatre de ces cystéines sont connues pour former des ponts disulfures au niveau de la sous-unité auxiliaire β du canal potassique dépendant du calcium (Slo β) (Figure 59) (Derst et coll., 2006). Par conséquent, la structure tertiaire de la sous-unité PaTEH1.1 est certainement déterminée par quatre ponts disulfures. La boucle extracellulaire de PaTEH1.1 comporte aussi des 5 séquences consensus des sites putatifs de N-glycosylation et 15 séquences consensus des sites d'O-glycosylation (Figure 59) (serveur EnsembleGly¹⁹). Les sites de N-glycosylation intégrant les asparagines localisées en position 98 et 205 de la sous-unité PaTEH1.1 sont conservés chez les autres sous-unités, indiquant un rôle fonctionnel majeur (Figure 59). L'asparagine en position 98 est aussi conservée au niveau de la sous-unité DmTE (Feng et coll., 1995a). Au contraire, les sites d'O-glycosylation sont uniques à PaTEH1.1.

Troisièmement, l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité PaTEH1.1 est réduite (36 résidus d'acides aminés) et peu conservée (10 à 42% d'identité de séquence protéique avec les sous-unités orthologues). La sérine en position 251 de la sous-unité PaTEH1.1 est prédite comme étant la cible de la PKC (logiciels : NetPhosK 2.0²⁰, PhosphoMotif Finder²¹, PredPhospho²² et KinasePhos²³) (Figure 59). Comparativement, un site putatif à la PKC a été proposé au niveau de l'extrémité amino-terminale de la sous-unité DmTE (Feng et coll., 1995a).

L'ensemble de ces critères nous ont permis de proposer une topologie de la sous-unité PaTEH1.1 (Figure 60).

¹⁹ <http://turing.cs.iastate.edu/EnsembleGly/>

²⁰ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

²¹ <http://www.hprd.org/PhosphoMotif>

²² http://www.nih.go.kr/predphospho/proteo/html/inc_PredPhospho.htm

²³ <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>

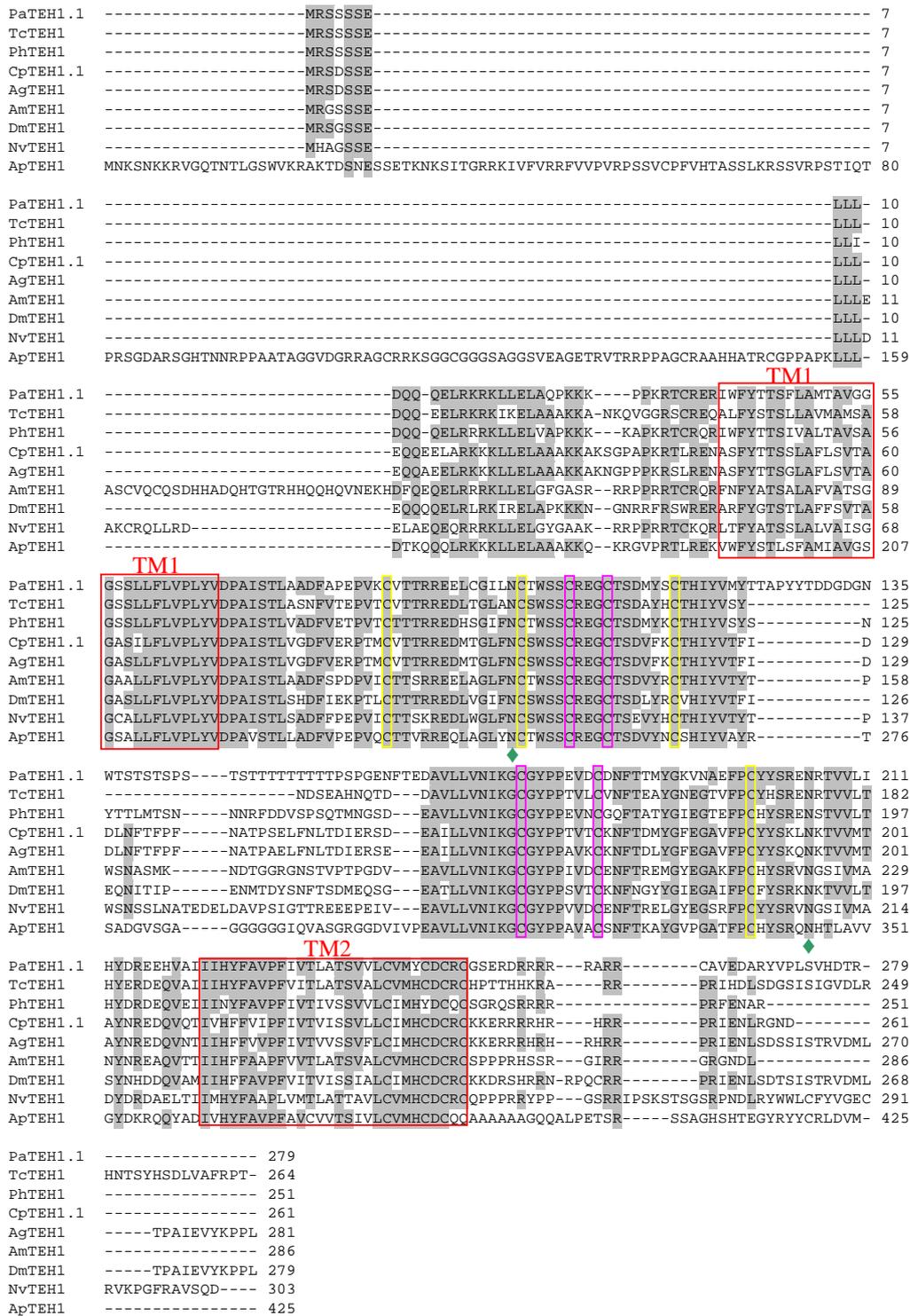


Figure 59 : Alignement multiple des séquences protéiques de la sous-unité PaTEH1.1 et des sous-unités DmTEH1, ApTEH1, CpTEH1.1, AgTEH1, NvTEH1, AmTEH1, TcTEH1 et PhTEH1 selon la méthode MUSCLE²⁴.

Les résidus d'acide aminés identiques sont grisés. Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont encadrés en rouge. Les cystéines conservées entre les neuf sous-unités orthologues sont encadrées en rose. Les cystéines connues pour former des ponts disulfures sont encadrées en jaune (Derst et coll., 2006). Les sites N-glycosylation conservés sont indiqués par un losange vert.

²⁴ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/>

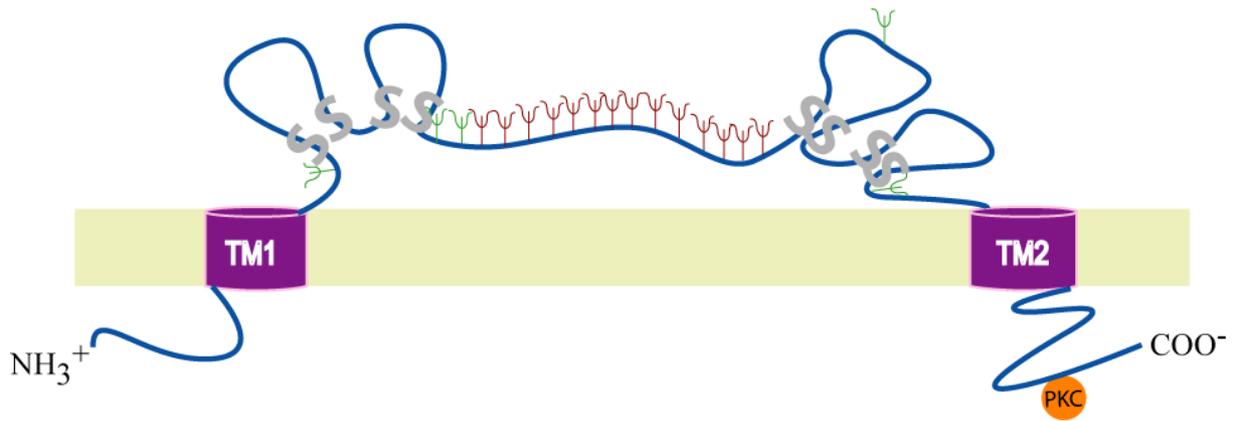


Figure 60 : Topologie proposée des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 et localisation des ponts disulfures établis entre les cystéines, les séquences consensus des sites de glycosylation (boucle extracellulaire) et de phosphorylation (extrémité carboxy-terminale).

Les sites de N-glycosylation sont indiqués en vert et les sites d'O-glycosylation sont mentionnés en marron. PKC : protéine kinase dépendant de l'AMPc et S : soufre.

E.3 Distribution tissulaire des transcrits PaTEH1.1 et PaTEH1.2

Par la suite, nous avons souhaité connaître la distribution d'expression tissulaire des transcrits *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2* par RT-PCR sur une partie de la chaîne nerveuse²⁵ (ganglions thoraciques et abdominaux), tête, muscle, intestin et gonades mâles. Les oligonucléotides TEH1-11S et TEH1-12AS employés ciblent le peptide signal et la séquence « exon b » des transcrits *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2* (Figure 61A). Ces derniers permettent ainsi de différencier les deux populations de transcrits en fonction de leur taille. L'analyse des produits de RT-PCR sur chaque tissu par électrophorèse sur gel d'agarose montre la coexpression de *PaTEH1.1* (~ 950 pb) et *PaTEH1.2* (~ 850 pb) uniquement dans les ganglions thoraciques et abdominaux de la chaîne nerveuse (Figure 61A). De plus, nous avons détecté les transcrits des sous-unités *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2* dans le DGA, confirmée par l'analyse de la séquence de plusieurs ADNc clonés (Figure 61B). Ce résultat corrobore la distribution tissulaire de *DmTEH1* détectée uniquement dans le système nerveux central des larves de *D. melanogaster* (Derst et coll., 2006).

²⁵ Par chaîne nerveuse nous entendons les 3 ganglions thoraciques et 6 ganglions abdominaux.

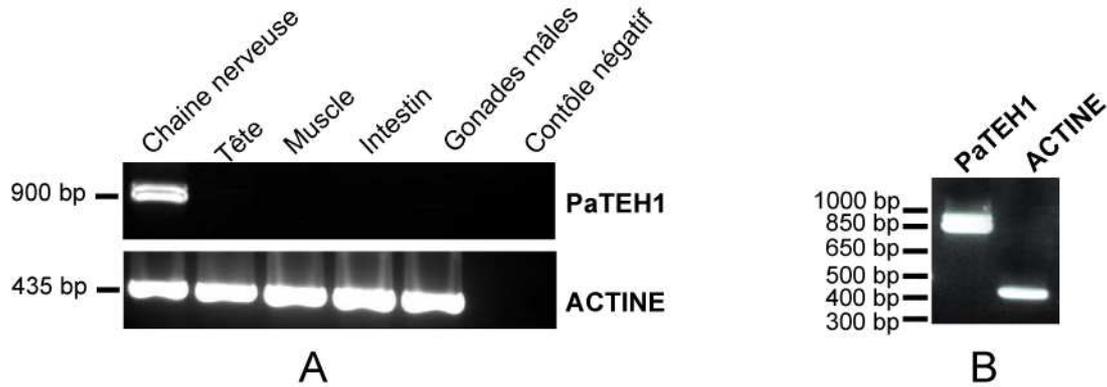


Figure 61 : Distribution tissulaire (A) et ganglionnaire (B) des transcrits *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2*.

Chaque produit de PCR a été séparé sur un gel comportant 1,5% d'agarose. Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5 µg) et de matrice d'ADNc (1 µl) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine. Le tissu nommé chaîne nerveuse correspond aux ganglions thoraciques et abdominaux.

Comparativement, chez les mammifères, les sous-unités auxiliaires de canaux Na_v sont significativement plus exprimées dans les tissus neuronaux comparativement aux autres tissus (Qu et coll., 2001). Nous pouvons alors supposer que l'expression des sous-unités auxiliaires est contrôlée par des facteurs spécifiques du système nerveux.

E.4 Relations phylogénétiques entre les sous-unités auxiliaires des autres canaux ioniques

E.4.1 Recherche bioinformatique des sous unités orthologues à *PaTEH1.1*

Pour construire l'arbre phylogénétique nous avons dans un premier temps identifié des sous-unités homologues à *PaTEH1.1* à partir d'une interrogation de type BLASTP dans plusieurs banques de données générales ou spécialisées du génome des insectes. Un alignement multiple des 45 séquences protéiques, selon la méthode Clustal W, nous a permis de regrouper les gènes identifiés en cinq familles de gènes orthologues aux gènes codant les sous-unités DmTE, DmTEH1, DmTEH2, DmTEH3 et DmTEH4 (Tableau 27). Par souci de clarté et étant donné qu'aucune nomenclature officielle n'a été reportée à ce jour, pour les sous-unités β de canaux Na_v d'insecte, nous avons harmonisé les noms des gènes selon la règle suivante : initiales du genre et de l'espèce précédant la famille de gène.

Ainsi, notre recherche a mis en exergue l'absence de sous-unités orthologues à DmTEH4 chez *A. aegypti*, *A. gambiae*, *C. pipiens* et *B. mori*, insecte dont le génome est entièrement séquencé. Cette absence de gènes orthologues à DmTEH4 chez *A. gambiae* et *B. mori* avait aussi été mentionnée par Derst et coll. en 2006. En revanche, nous avons identifié des sous-unités orthologues à DmTEH4 chez *A. mellifera*, *N. vitripennis*, *P. humanus* et *T. castaneum* dont les génomes n'étaient pas entièrement disponibles en 2006 (Derst et coll., 2006). Par ailleurs, nous n'avons pas identifié les sous-unités ApTEH2, NvTEH1 et AeTEH1 bien que les génomes soient entièrement connus. Des événements de délétions peuvent expliquer l'absence de ces gènes. Au regard de la taxonomie des insectes, une délétion tardive lors de la séparation des genres *Aedes* et *Culex* pourrait expliquer l'absence de AeTEH1. Un autre événement de délétion chez les insectes du super ordre *Nematocera* pourrait expliquer l'absence des sous-unités orthologues à DmTEH4 chez les genres *Aedes*, *Anopheles* et *Culex*. Ces observations ne sont qu'indicatives. L'analyse de séquences orthologues chez d'autres espèces d'insecte permettrait de dater plus précisément les événements de délétion.

Tableau 27: Recensement (Novembre 2009) des sous-unités auxiliaires β de canaux Na^v chez les insectes.

| Espèce | | TipE | TEH1 | TEH2 | TEH3 | TEH4 |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------|
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Nom | DmTE | DmTEH1 | DmTEH2 | DmTEH3 | DmTEH4 |
| | Taille COL (aa) | 452 | 279 | 309 | 448 | 516 |
| | N'accession | NM_079196 (A) = NM_168067 | NM_141702 = DQ139957 | NM_139610 | NM_144078 | NM_139609 |
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | Nom | ApTE | ApTEH1 | | ApTEH3 | ApTEH4 |
| | Taille COL (aa) | 200 (non complet) | 425 | | 478 | 535 |
| | N'accession | ACYPI002009 | XM_001944580 | | ACYPI36355 | ACYPI36358 |
| <i>Aedes aegypti</i> | Nom | AeTE | | AeTEH2 | AeTEH3 | |
| | Taille COL (aa) | 435 | | 290 | 451 | |
| | N'accession | XM_001654675 | | XM_001654677 | XM_001654676 | |
| <i>Anopheles gambiae</i> | Nom | AgTE | AgTEH1 | AgTEH2 | AgTEH3 | |
| | Taille COL (aa) | 460 | 280 | 254 | 451 | |
| | N'accession | XM_563317 | XM_310354 | XM_312094 | XM_312093 | |
| <i>Apis mellifera</i> | Nom | AmTE | AmTEH1 | AmTEH2 | AmTEH3 | AmTEH4 |
| | Taille COL (aa) | 356 | 287* | 248 | 446 | 461 |
| | N'accession | GB12769-RA | XM_001120804 | GB10333-RA | GB19011-RA | GB17990-RA |
| <i>Culex pipiens</i> | Nom | CpTE | CpTEH1.1 & CpTEH1.2 | CpTEH2 | CpTEH3 | |
| | Taille COL (aa) | 467 | 261 & 285 | 837 | 451 | |
| | N'accession | XM_001845887 | XM_001847934 & XM_001847935 | XM_001845889 | XM_001845888 | |
| <i>Nasonia vitripennis</i> | Nom | | NvTEH1 | NvTEH2 | NvTEH3 | NvTEH4 |
| | Taille COL (aa) | | 303 | 297 | 454 | 466 |
| | N'accession | | XM_001606785 | XM_001606821 | XM_001606812 | XM_001606830 |
| <i>Musca domestica</i> | Nom | MdTE | | | | |
| | Taille COL (aa) | 438 | | | | |
| | N'accession | AF131734 | | | | |
| <i>Pediculus humanus</i> | Nom | PhTE | PhTEH1 | PhTEH2 | PhTEH3 | PhTEH4 |
| | Taille COL (aa) | 393 | 299 | 280 | 445 | 472 |
| | N'accession | XM_002430448 | XM_002430447 | XM_002430450 | Xm_002430449 | XM_002430451 |
| <i>Tribolium castaneum</i> | Nom | TcTE | TcTEH1 | TcTEH2 | TcTEH3 | TcTEH4 |
| | Taille COL (aa) | 405 | 264 | 320 | 450 | 467 |
| | N'accession | XM_964916 | XM_964728 | XM_964775 | XM_964845 | XM_964710 |
| <i>Bombyx mori</i> | Nom | BmTE | BmTEH1 | BmTEH2 | BmTEH3 | |
| | Taille COL (aa) | 321 | 227 | 257 | 435 | |
| | N'accession | BGIBMGA010081-TA | BGIBMGA012615-TA | BGIBMGA010080-TA | BGIBMGA010079-TA | |

Ces séquences ont été identifiées à l'issue d'une interrogation de type BLASTP dans la banque de données GenBank (accession en noir), AphidBase (accession en vert), Beebase (accession en bleu), et Silkbase (accession en rose). Les espèces d'insecte dont le génome est connu sont écrites en rouge, contrairement à *Musca domestica* écrites en vert.

E.4.2 Relations phylogénétiques entre PaTEH1.1, PaTEH1.2 et les sous-unités paralogues

Le modèle de substitutions nucléotidiques sélectionné à partir de l'alignement multiple des sous-unités homologues à PaTEH1.1 et PaTEH1.2 est (GTR+I+G) caractérisé par les paramètres $f(A)=0.2041$, $f(C)=0.3225$, $f(G)=0.2702$, $f(T)=0.2032$; taux de la matrice $R(A-C)=1.7064$, $R(A-G)=3.8108$; $R(A-T)=2.5441$; $R(C-G)=1.7639$; $R(C-T)=4.8403$; $R(G-T)=1.0000$; proportion de sites invariables (I)=0.0416 et gamma distribution (G)=0.6973). L'arbre phylogénétique défini à partir de ce modèle montre de façon robuste que les sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 sont proches phylogénétiquement de la famille des gènes orthologues à DmTEH1 (Figure 62). Les familles de gènes orthologues aux gènes *DmTEH3* et *DmTEH4* constitue un seul clade avec une valeur de bootstrap de 83%. De manière analogue, les familles de gènes orthologues aux gènes *DmTEH1* et *DmTE* sont regroupées dans un même clade dont la valeur de bootstrap est de 94%. Cette analyse suggère que deux événements de duplication anciens sont à l'origine de ces quatre familles de gènes. Cependant, la trifurcation non résolue entre ces clades (valeur de bootstrap de 64%) ne nous permet pas de préciser lequel de ces trois clades est à l'origine des autres. En effet, la divergence entre les séquences de ces clades et de la sous-unité de vertébrés h β KCa a contraint l'alignement et par conséquent l'information phylogénétique résultante n'est pas suffisamment robuste au niveau de ce noeud.



Figure 62 : Arbre phylogénétique des gènes codant des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d’insecte.

L’arbre phylogénétique a été défini selon les paramètres du modèle de substitutions nucléotidiques GTR et a été déterminé selon la méthode de maximum de vraisemblance implémentée au logiciel PHYLIP v3.0. IL est raciné avec la sous-unité BKCa Les valeurs de bootstrap ont été déterminées à partir de 1000 répliquions. L’échelle indique la distance entre les séquences et correspond au nombre de substitutions nucléotidiques par site.

CHAPITRE 2. ETUDE DES CANAUX Na_v DE LA BLATTE *P. AMERICANA* PAR UNE APPROCHE D' ELECTROPHYSIOLOGIE

Après avoir caractérisé plusieurs sous-unités α et β des canaux Na_v exprimés dans le SNC de la blatte *P. americana*, nous avons souhaité déterminer leur importance fonctionnelle. Pour ce faire, deux stratégies ont été mises en place. La première a consisté à inhiber l'expression des sous-unités principales exprimées dans les neurones DUM par la stratégie dite des oligonucléotides antisens. La seconde stratégie a consisté à exprimer dans des ovocytes de xénope les sous-unités PaTEH1, PaFPC, PaTEH1.1 et PaTEH1.2, puis de mesurer les courants Na^+ par la technique de double-microélectrode intracellulaire.

A Inhibition de l'expression de la sous-unité principale des canaux Na_v exprimée dans les neurones DUM par stratégie antisens

A.1.1 Suivi du transfert des antisens dans le neurone DUM

Nous avons souhaité suivre la transfection des neurones DUM par les oligonucléotides AS-Alexa à partir d'immunofluorescence confocale. La fluorescence des AS-Alexa est détectée au niveau de la membrane cytoplasmique et du noyau des neurones DUM après une incubation de 24 et 48 heures des cellules avec les oligonucléotides (Figure 63). L'absence de fluorescence au niveau des débris cellulaires (Figure 63 A, B et C) indique que les AS-Alexa pénètrent au sein des neurones DUM *via* un mécanisme de transport cellulaire. Ce résultat corrobore les données de la littérature. En effet, en l'absence de système de transfection particulier, l'entrée des oligonucléotides AS dans les cellules en culture est réalisée par pinocytose ou par endocytose (Hughes et coll., 2001).

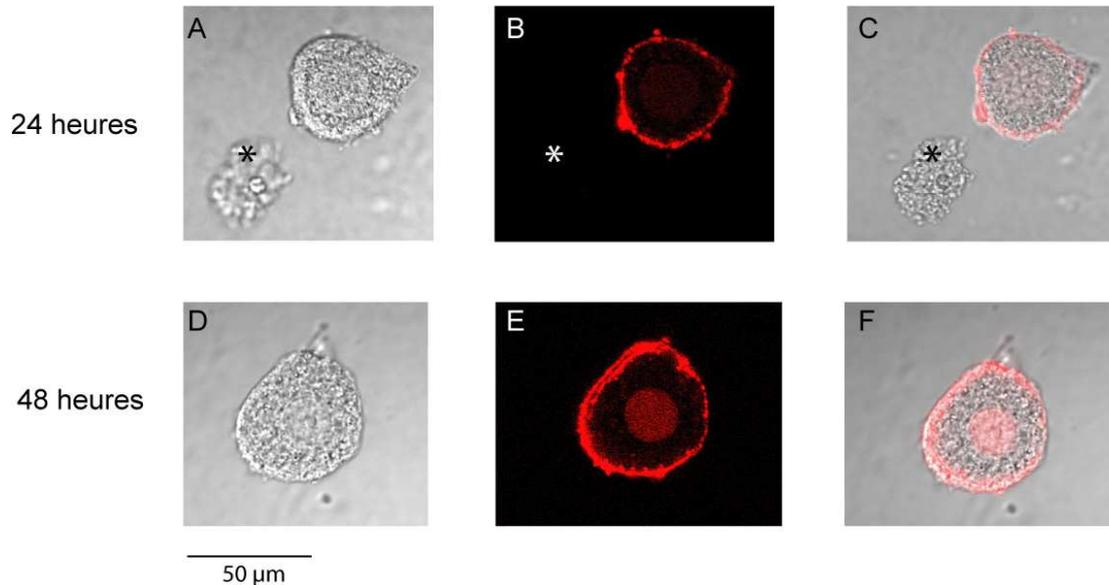


Figure 63 : Détection des AS-alexa ciblant le gène *pSlo* par immunofluorescence confocale dans des neurones DUM de *P. americana* après 24 et 48 heures d'incubation.

A et D : observation en lumière transmise ; B et E : observation en lumière rouge ; C et F : superposition des images obtenues en lumière rouge et lumière transmise. Le débris cellulaire est indiqué par un astérisque (*).

La fluorescence des AS-alexa au niveau du noyau s'intensifie entre 24 et 48 heures d'incubation. Des approches analogues ont permis de localiser, par microscopie confocale, des AS couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) au niveau du noyau de cellules pulmonaires et cellules des glandes surrénales après 4 et 48 heures d'incubation, respectivement (Pichon et coll., 2000, Acosta et coll., 2002). Ainsi, la migration des AS dans le noyau correspond à la localisation de leur cible primaire, à savoir l'ARNm. Par contraste, la fluorescence intensive des AS-alexa au niveau de la membrane des neurones DUM est un résultat moins attendu. Mais alors comment expliquer la localisation des AS-alexa au niveau de la membrane des neurones ? L'hypothèse envisageable est liée à la nature biochimique de la membrane des neurones particulièrement riche en phospholipides. Des interactions électrostatiques peuvent alors s'établir entre les charges positives de la tête hydrophile des phospholipides constituant la bicouche lipidique et les charges négatives des groupements phosphates des oligonucléotides AS. Des interactions sont aussi possibles entre les acides nucléiques et les résidus d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) ou les résidus d'acides aminés possédant un groupement aromatique (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) (Ellis et coll., 2007).

A.1.2 Modulation de l'activité électrique spontanée des neurones DUM après prétraitement avec des oligonucléotides AS

Les canaux Na_v sont responsables de la phase de dépolarisation des PAs et leurs propriétés électrophysiologiques participent à la modulation de leur fréquence. Dans un premier temps, nous avons alors tenté d'inhiber l'activité électrique spontanée des neurones DUM en prétraitant ces derniers avec le mélange L1-AS. Les conditions contrôle correspondent aux neurones DUM non prétraités et aux neurones DUM prétraités avec les oligonucléotides RAS. Après 48 heures d'incubation des neurones DUM dans un milieu de culture enrichi avec des oligonucléotides, l'activité électrique spontanée des neurones DUM est maintenue quelque soit les conditions de prétraitement (Figure 64).

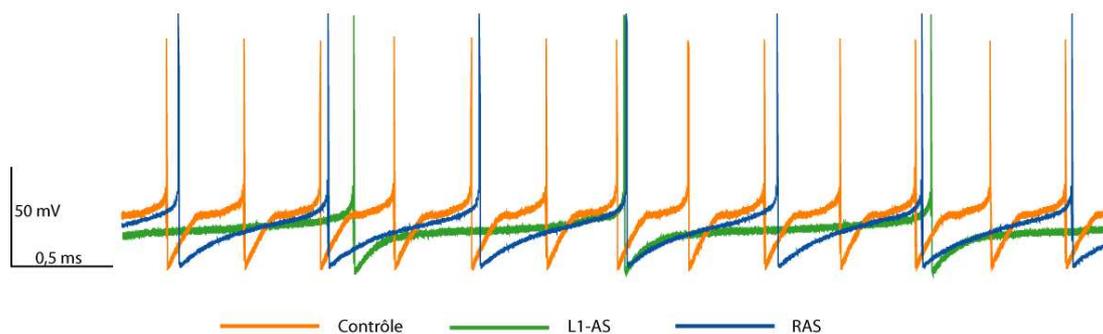


Figure 64 : Potentiels d'action spontanés 48 heures après la mise en culture de neurones DUM avec des oligonucléotides ciblant la boucle intracellulaire L1 du gène $PaNa_v$ (L1-AS), des oligonucléotides non spécifiques (RAS).

L'amplitude des PAs, l'amplitude du potentiel supérieur à 0 mV (overshoot), l'amplitude du potentiel inférieur à 0 mV (undershoot) ainsi que la durée des PAs à 50% de la repolarisation (ADP_{50}) ne sont pas significativement différentes entre les trois conditions (Tableau 28). La fréquence des PAs des neurones prétraités avec le mélange L1-AS est réduite significativement de 70% par rapport à la fréquence des neurones non prétraités, indiquant la possibilité d'une modulation des propriétés électrophysiologiques des courants Na^+ . En effet, la fréquence des potentiels d'action est aussi modulée en présence de L-glutamate *via* l'inhibition des courants $INa1$ (Lavialle-Defaix et coll., 2006).

Toutefois, la fréquence des PAs des neurones DUM prétraités avec les oligonucléotides RAS est aussi réduite par rapport aux neurones DUM non traités (diminution de 36%). Ce résultat suggère que l'augmentation de la durée des PAs peut être

en partie associée à la nature physique des oligonucléotides. En effet, il a été montré précédemment par microscopie confocale que l'émission de fluorescence des oligonucléotides AS-alexa est intense au niveau de la membrane des neurones DUM, indiquant une concentration locale d'AS. Ainsi, la modification de la charge électrique de la membrane *via* la présence d'acides nucléiques à proximité des canaux ioniques dépendant du potentiel peut affecter leurs propriétés électrophysiologiques (Fickbohm et coll., 2003). De plus, il a été montré par des expériences structurales de résonance magnétique nucléaire que des complexes peuvent se former entre des phosphates et des arginines au sein de modèle peptique analogue aux segments S4 des canaux ioniques dépendant du potentiel (Pradhan et coll., 2005). Ces interactions phosphates/arginine peuvent moduler les propriétés d'activation des canaux ioniques (Pradhan et coll., 2005). Enfin, les oligonucléotides peuvent être dégradés dans le milieu de culture ou dans la cellule par des désoxyribonucléases, ce qui conduit à la synthèse de métabolites non spécifiques (Henry et coll., 2002).

Tableau 28 : Comparaison des caractéristiques des potentiels d'action spontanés 48 heures après la mise en culture de neurones DUM avec des oligonucléotides.

| Paramètre / Modalité | Amplitude des PA (mV) | Overshoot (mV) | Undershoot (mV) | ADP ₅₀ (ms) | Fréquence des PA (Hz) |
|----------------------|-----------------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Contrôle (n=7) | 132,5 ± 2,5 | 57,3 ± 1,5 | -74,7 ± 1,7 | 2,47 ± 0,3 | 2,60 ± 0,5 |
| L1-AS (n=6) | 141,2 ± 3,1 | 62,5 ± 3,2 | -78,6 ± 2,6 | 2,38 ± 0,1 | 0,86 ± 0,3* |
| RAS (n=5) | 138,7 ± 3,3 | 62,7 ± 3 | -76,4 ± 1,1 | 2,2 ± 0,04 | 1,58 ± 0,4 |

L'activité électrique spontanée des neurones DUM prétraités avec des oligonucléotides L1-AS est comparée à l'activité électrique spontanée des neurones DUM prétraités avec les oligonucléotides RAS et des neurones non prétraités (contrôle). Les valeurs indiquées correspondent à des moyennes ± SEM. L'astérisque indique que la valeur est significativement différente (p -value < 0.05, test Mann Whitney).

A.1.3 Modulation des courants Na⁺ des neurones DUM après prétraitement avec les oligonucléotides N-AS et L1-AS

Nous avons mesuré les courants Na⁺ macroscopiques des neurones DUM 48 heures après leur mise en culture avec les oligonucléotides N-AS et L1-AS. Les courbes I/V des courants Na⁺ des neurones prétraités avec les oligonucléotides N-AS et L1-AS et la courbe I/V des courants Na⁺ des neurones en condition contrôle sont ajustées à partir de l'équation de Stühmer, et ne sont pas significativement différentes (Figure 65A). De plus, les propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation à l'état stable des neurones prétraités et de neurones témoins sont similaires entre les neurones prétraités et les neurones non prétraités (Figure 65B et C). L'ensemble de ces résultats montrent que

l'utilisation des oligonucléotides N-AS et L1-AS ne permettent pas d'inhiber l'expression des courants Na^+ des neurones DUM, ni ne modulent leurs propriétés électrophysiologiques. Ainsi, en dépit de l'observation de la pénétration des AS au niveau des neurones DUM par microscopie confocale (A.1.1), les oligonucléotides N-AS et L1-AS ne semblent pas affecter pas l'expression des canaux Na_v des neurones DUM. De la même manière, l'observation du transport des AS dirigés contre le gène humain *hNav1.4* (4444a), par immunohistochimie, au sein de myotubes, n'est pas associée à une inhibition de l'expression du gène (Keller et coll., 2000). En revanche, les oligonucléotides 4444a inhibent l'expression des canaux *hNav1.4* recombinants exprimés dans des ovocytes de xénope. Les auteurs ont donc conclu que l'internalisation des AS par une cellule et l'accès à la cible est une condition nécessaire mais pas suffisante pour garantir l'activité biologique des AS *in vivo*. En effet, plusieurs facteurs liés à la nature chimique des oligonucléotides, aux conditions de culture cellulaire et au type cellulaire peuvent affecter la biodisponibilité et l'activité biologique des AS (Akhtar et coll., 1992, Agrawal, 1996, Myers et coll., 2000, Hughes et coll., 2001). Toutefois, cette même technique a permis d'inhiber avec succès l'expression du gène *Pslo* au niveau des neurones DUM (Gautier et coll., 2008). Par conséquent, l'absence d'activité biologique des oligonucléotides N-AS et L1-AS est certainement liée dans notre étude à la cible, c'est-à-dire aux canaux Na_v .

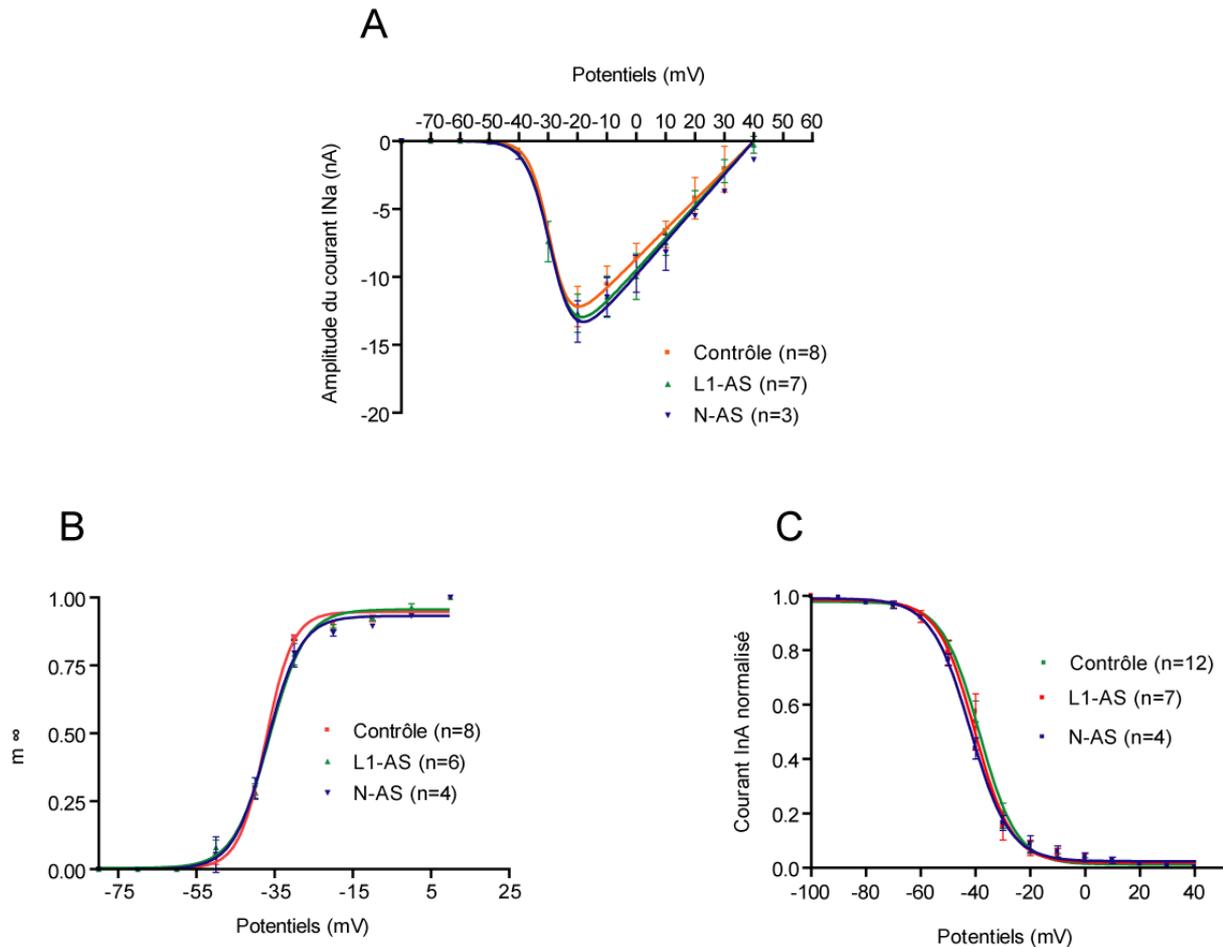


Figure 65 : Courants Na^+ des neurones DUM prétraités pendant 48 heures avec des oligonucléotides antisens ciblant la boucle intracellulaire L1 (L1-AS) et le codon d'initiation de la traduction (N-AS).

A. Courbe courant – potentiel. Les courants Na^+ sont induits en dépolarisant la membrane des neurones par incréments de 10 mV à partir du potentiel de maintien de -90 mV (voir encart du protocole). Les points correspondant à la moyenne \pm SEM (barres). Le nombre de cellules pour lesquelles le courant Na^+ a été enregistré pour chaque condition est indiqué entre parenthèses.

B. Courbe d'activation à l'état stable. Les moyennes de la conductance normalisée (G/G_{max}) \pm SEM sont ajustées selon l'équation de Boltzmann ($V_{0,5} = -37$ mV et $K=3.5$ mV pour les neurones contrôles et $K = -4.5$ mV pour les neurones prétraités avec L1-AS ou N-AS). Le nombre de cellules pour lesquelles le courant Na^+ a été enregistré pour chaque condition est indiqué entre parenthèses.

C. Courbe d'inactivation à l'état stable. Les courants Na^+ sont obtenus selon le protocole de double choc (voir encart). Les moyennes des courants normalisés (I/I_{max}) \pm SEM sont tracées en fonction du premier potentiel appliqué et ajustées selon l'équation de Boltzmann ($V_{0,5} = -38.5$ mV, $V_{0,5} = -40$ mV et $V_{0,5} = -42$ mV pour les neurones contrôle, les neurones prétraités avec les oligonucléotides L1-AS et N-AS respectivement ; $K=-7$ mV pour les trois conditions).

A.1.4 Les canaux Na_v des neurones DUM sont-ils de bons candidats à la stratégie des oligonucléotides antisens ?

Plusieurs facteurs liés à la nature des canaux Na_v peuvent expliquer la difficulté à inhiber leur expression par la stratégie des oligonucléotides antisens. Trois facteurs sont discutés ci-dessous.

(a) La conception des oligonucléotides

L'inhibition de l'expression des canaux Na_v1.4, Na_v1.5 et Na_v1.6 par la stratégie des oligonucléotides AS a déjà été appliquée avec succès pour différents types cellulaires de vertébrés (Brinkmeier et coll., 1997, Keller et coll., 2000, Sha et coll., 2003, Pineda et coll., 2006). Dans ces études, les oligonucléotides AS conçus ciblent des régions non homologues aux régions ciblées par les oligonucléotides L1-AS employés dans notre étude. En effet, les oligonucléotides AS ciblant le segment IIIS4 des canaux hNa_v1.5, rNa_v1.5 et hNa_v1.4 se sont avérés très efficaces, conduisant à une réduction de l'amplitude du courant Na⁺ de 90% après trois jours d'incubation (Brinkmeier et coll., 1997, Keller et coll., 2000, Sha et coll., 2003). Cependant, l'inhibition de l'expression de l'isoforme Na_v1.6 de *Danio rerio* a été réalisée à partir d'oligonucléotides ciblant des régions en amont et en aval du codon d'initiation, alors que des oligonucléotides AS en position homologue se sont avérés inefficaces vis-à-vis de l'expression du gène *rNav1.5* (Brinkmeier et coll., 1997, Pineda et coll., 2006). Par conséquent, l'efficacité des oligonucléotides AS dépend véritablement de la structure secondaire des ARNm, et varie en fonction des isoformes. Une modélisation bioinformatique a montré que la formation de boucle au niveau des régions codant les segments IIIS4 favorisent l'affinité des oligonucléotides AS pour les transcrits *hNav1.5* et *hNav1.4* (Keller et coll., 2000).

(b) Fréquence de renouvellement des canaux Na_v dans la membrane

La fréquence de renouvellement des canaux Na_v dans la membrane du corps cellulaire des neurones DUM n'est pas connue. Par ailleurs, des expériences de biochimie avec un radioligand spécifique des canaux Na_v (saxitoxine) ont montré que la fréquence de renouvellement des canaux Na_v est de 3,1 jours au niveau du plasmalemme des cellules de Schwann de lapin en culture (Ritchie, 1988). Il est donc probable que la durée d'incubation des neurones DUM avec les AS nécessaire pour inhiber l'expression de la sous-unité principale des canaux Na_v soit supérieure à 48 heures. Dans le paragraphe suivant nous allons discuter dans quelle mesure l'augmentation de la durée de culture des neurones DUM est envisageable.

(c) Niveau d'expression des canaux Na_v dans les neurones DUM

Des expériences d'électrophysiologie ont montré que l'amplitude des courants Na^+ des neurones DUM augmente de 42 % entre 24 et 72 heures après leur mise en culture, indiquant un processus important de néosynthèse des canaux Na_v (Tribut et coll., 1991). De plus, la quantité d'ARNm codant les sous-unités $DmNa_v$ augmente de 90% au cours des trente premières heures de la culture des neurones embryonnaires de *D. melanogaster* (Hodges et coll., 2002). Par conséquent, cela peut expliquer pourquoi les AS n'ont pas été efficaces pour s'opposer à cette surexpression des gènes. Pour contrer cette régulation de l'expression des gènes codant les canaux Na_v , nous avons tenté de prolonger la durée d'incubation des neurones DUM en présence des AS jusqu'à 72 heures. Cependant, la culture des neurones DUM à court terme s'est avérée peu adaptée pour des durées aussi longues. En effet, les membranes sont fragilisées et peu enclin à des mesures électrophysiologiques par la technique du patch-clamp. Un protocole de culture à long terme des neurones DUM, jusqu'à 30 jours, a été développé au laboratoire (Lapied et coll., 1993). Au cours de cette culture les neurones DUM conservent une activité électrique spontanée similaire aux neurones DUM nouvellement dissociés. Cependant la régénération du neurite primaire dès les trois premiers jours de culture limite des mesures de courants Na^+ en potentiel imposé. En effet, plusieurs auteurs ont mentionné la difficulté de maintenir un potentiel imposé pour la mesure de courants Na^+ lorsque la surface membranaire des neurones d'insecte est étendue (Kloppenburg et coll., 1999, Lucas et coll., 2002, Wustenberg et coll., 2004).

B Expression des sous-unités principales et auxiliaires dans l'ovocyte de xénope

B.1.1 Expression de la sous-unité PaFPC

Au regard de la structure moléculaire des sous-unités PaFPC1 et PaFPC2, nous avons souhaité savoir si elles génèrent des conductances sodiques dépendant du potentiel. Pour se faire nous avons injecté des ARNc codant ces sous-unités dans des ovocytes de xénope seuls ou en association avec des ARNc codant la sous-unité auxiliaire TipE. Quelque soit les combinaisons d'ARNc injecté, aucun courant Na^+ n'a été enregistré. De manière similaire, l'expression fonctionnelle de la sous-unité DSC1 de *D. melanogaster*, isolée par homologie avec les canaux Na_v de l'anguille électrique, s'est aussi avérée sans succès (Salkoff et coll., 1987). Par ailleurs, la mise au point d'un protocole d'enregistrement électrophysiologique particulier a permis de montrer que la sous-unité orthologue BSC1 de *B. germanica* constitue un canal sélectif aux ions Ca^{2+} et Na^+ lorsqu'elle est exprimée dans des ovocytes de xénope (Zhou et coll., 2004). Ainsi, il est probable que l'expression fonctionnelle de PaFPC requiert des protéines chaperonnes particulières et/ou des conditions d'enregistrements différentes de celles des canaux Na_v d'insecte classiques.

B.1.2 Modulation de l'amplitude des courants Na^+ par les sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2

Nous avons souhaité déterminer la fonctionnalité des sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2 en les exprimant à la surface de la membrane d'ovocytes de xénope. Plus précisément, la sous-unité DmNa_v1 a été co-injectée avec les sous-unités DmTE ou PaTEH1.1 ou PaTEH1.2. L'amplitude des courants Na^+ des canaux Na_v recombinants est très variable est fonction des sous-unités auxiliaires, indiquant une modulation du niveau d'expression de la sous-unité DmNa_v1 dans la membrane des ovocytes (Figure 66). Ainsi, l'amplitude au pic des courants Na^+ est augmentée significativement de 61%, 78% et 86% lorsque la sous-unité DmNa_v1 est co-exprimée avec

la sous-unité PaTEH1.1, comparativement à l'amplitude du courant Na^+ mesuré en présence des sous-unités DmTEH1, PaTEH1.2 et DmTE respectivement (Figure 66). Par conséquent, ces résultats montrent que la sous-unité PaTEH1.1 augmente l'expression fonctionnelle de la sous-unité principale DmNa_v1, et ce de manière plus importante que la sous-unité orthologue DmTEH1. Derst et coll. avaient aussi montré que la sous-unité DmTEH1 augmente l'amplitude des courants DmNa_v par rapport à la sous-unité DmTE (Derst et coll., 2006). Cependant, la quantité d'ARNc injecté pour chaque sous-unité n'étant pas mentionnée, nous ne pouvons pas comparer le niveau d'expression de la sous-unité DmNa_v1 entre nos résultats et ceux de l'équipe de Derst.

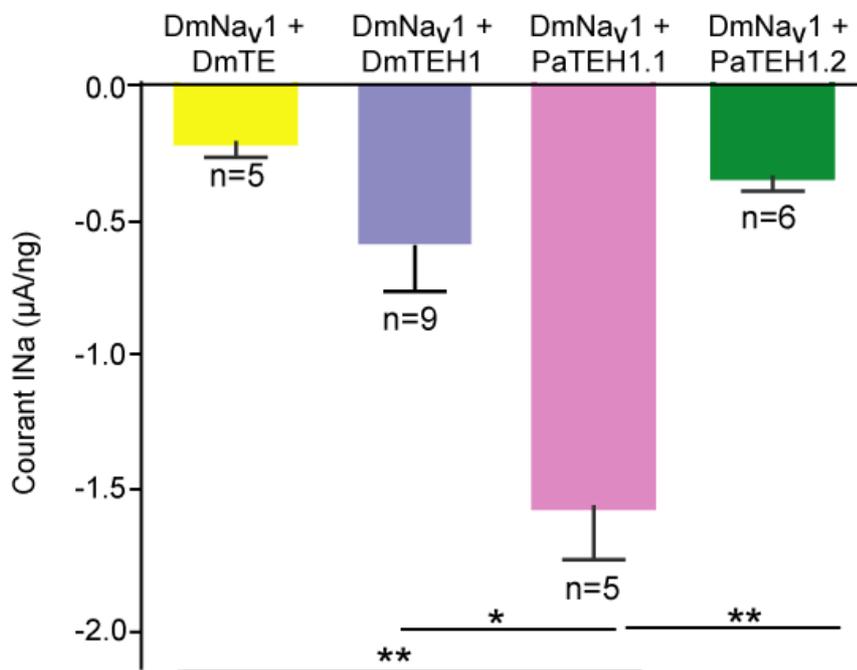


Figure 66 : Amplitude du courant INa induit par l'expression de la sous-unité DmNa_v1, dans des ovocytes de xénope, en présence des sous-unités auxiliaires DmTE, DmTEH1, PaTEH1.1 et PaTEH1.2.

L'amplitude maximale du courant Na^+ mesurée lors des dépolarisations d'incrément de 10 mV à partir du potentiel imposé de -70 mV est divisée par la quantité d'ARNc injecté par ovocyte. Les rapports de concentration des sous-unités DmNa_v1 et des sous-unités auxiliaires sont 1 :1. 7 ng d'ARNc codant la sous-unité DmTE sont co-injectés avec 7 ng d'ARNc codant la sous-unité DmNa_v1 par ovocyte. En raison du niveau d'expression important de la sous-unité DmNa_v1 en présence de la sous-unité PaTEH1.1, seulement 1.8 ng d'ARNc codant la sous-unité PaTEH1.1 sont co-injectés avec 1.8 ng d'ARNc codant la sous-unité DmNa_v1. L'injection des ARNc codant la sous-unité DmNa_v1 avec les ARNc codant la sous-unité PaTEH1.2 a été réalisée de la même manière que pour PaTEH1.1. Les courants Na^+ sont mesurés 3 jours après l'injection des ARNc dans les ovocytes de xénope. n : nombre d'ovocytes, **: P-value < 0.01 (test statistique Mann-Whitney). Les mesures de courants ont été réalisées par Céline Bourdin (Doctorante 1^{ère} année en 2009).

Il a été aussi montré que les isoformes épissées de sous-unités auxiliaires scn1ba_tv1 et scn1ba_tv2 du poisson *D. rerio* modulent différemment d'un facteur 2 le niveau d'expression de la sous-unité snca8 exprimée dans des oocytes de xénope (Fein et coll., 2007). De manière analogue aux sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2, ces deux sous-unités sont identiques excepté au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. Contrairement à la sous-unité scn1ba_tv2, la sous-unité scn1ba_tv1 possède une tyrosine en position homologue de la sous-unité $\beta 1$ mammifère, critique dans la modulation des courants Na^+ via une interaction avec une protéine du cytosquelette telle que l'ankyrine.

Nous avons aussi co-injecté des ARNc de la sous-unité PaNa_v1 avec la sous-unité auxiliaire PaTEH1.1 ou PaTEH1.2. Dans les deux cas, aucun courant Na^+ n'a pu être mesuré. Comparativement, il est mentionné dans la littérature que toutes les sous-unités α de canaux Na_v d'insecte ne sont pas fonctionnelles lorsqu'elles sont exprimées dans des ovocytes de xénope. En effet, 50% des sous-unités α des canaux Na_v de *D. melanogaster* et *B. germanica* se sont avérées non fonctionnelles dans l'ovocyte de xénope (Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008). L'hypothèse avancée est que l'ADNc codant la sous-unité PaNa_v1 contient des erreurs liées à l'amplification. En effet, l'équipe de Lin a estimé que chaque ADNc codant le cadre ouvert de lecture de la sous-unité DmNa_v contient 10 mutations liées à des erreurs d'appariement en dépit de l'utilisation d'ADN polymérase de haute fidélité (Elongase® (Invitrogen™)).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les canaux Na_v sont les acteurs moléculaires de l'excitabilité membranaire des neurones (Hille, 2001). Responsables de la genèse et de la transmission des potentiels d'actions, ils s'avèrent être des cibles privilégiées de nombreuses neurotoxines naturelles d'origine animale et végétale ainsi que de neurotoxines de synthèse à effets insecticides (Catterall et coll., 2007, Dong, 2007). Les études neurotoxicologiques portant sur les canaux Na_v d'insecte, à l'échelle moléculaire et cellulaire, fournissent alors des informations importantes quant aux modes d'action de ces agents pharmacologiques (Peterson et coll., 2008). Dans ce cadre, il apparaît alors nécessaire de caractériser et de comparer les structures moléculaires des canaux Na_v des insectes. L'analyse des génomes séquencés et disponibles a permis de confirmer que chez les insectes, contrairement aux vertébrés, un seul et unique gène, homologue au gène *para* ou *DmNa_v* de *D. melanogaster*, code la sous-unité α fonctionnelle des canaux Na_v exprimés dans les cellules excitables (Goldin, 2002a, Davies et coll., 2007a, Dong, 2007). Cependant, chez les insectes, cet unique gène conduit à de nombreuses isoformes différentes en raison de modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif et édition de l'ARNm). Ainsi, vingt-neuf variants épissés et dix sites d'édition de l'ARNm ont été identifiés chez *D. melanogaster* (Hanrahan et coll., 2000, Palladino et coll., 2000b, Reenan et coll., 2000, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Par ailleurs, un canal Na_v natif correspond à l'assemblage de ces sous-unités α et d'une ou plusieurs sous-unités auxiliaires pour lesquelles 5 familles de gènes ont été identifiées au niveau de la plupart des génomes d'insectes (Tseng et coll., 2007).

Chez les mammifères, l'expression de neufs gènes différents codant les canaux Na_v1 dépend des tissus et des stades de développement (Ogata et coll., 2002). De plus, les canaux Na_v1 se distinguent de part leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques (Catterall et coll., 2005a). Par contraste, chez les insectes, la situation est moins bien connue. Alors que l'expression des variants du gène *DmNa_v* est différente entre les stades larvaires et adultes, la distribution tissulaire des variants n'a pas été investiguée à ce jour (Thackeray et coll., 1994, Thackeray et coll., 1995, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). L'expression des isoformes *DmNa_v* dans des ovocytes de xénope génère une gamme de courants Na^+ aux propriétés d'activation et d'inactivation variables (Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Cependant, en dépit de la caractérisation de leurs propriétés électrophysiologiques, le rôle physiologique de la diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte n'a pas encore été élucidé. Une seule étude, relativement ancienne, a corrélé des

profils de courants Na^+ de neurones embryonnaires de *D. melanogaster* avec l'expression des variants épissés du gène DmNa_v (O'Dowd et coll., 1995). Egalement chez les mammifères, l'implication des différents variants d'un même gène Na_v1 dans la modulation de l'excitabilité des cellules est peu résolue. En effet, les propriétés d'activation et d'inactivation des isoformes épissées des gènes $h\text{Na}_v1.3$, $h\text{Na}_v1.5$ et $r\text{Na}_v1.6$ exprimées dans des cellules non excitables sont similaires et ne permettent pas de prédire leur rôle *in vivo* (Dietrich et coll., 1998, Zimmer et coll., 2002a, Thimmapaya et coll., 2005). A l'instar des insectes, chez les mammifères seules deux études ont montré une corrélation entre l'expression des variants des gènes $h\text{Na}_v1.5$ et $r\text{Na}_v1.6$ et les profils de courants Na^+ de myocytes ventriculaires et des cellules ciliées de l'oreille interne, respectivement (Haufe et coll., 2005, Mechaly et coll., 2005). Par conséquent, la corrélation entre les courants Na^+ natifs et la structure moléculaire des canaux Na_v exprimés, à l'échelle cellulaire, constitue un intérêt scientifique majeur.

Au laboratoire, deux courants Na^+ transitoires, dépendant du potentiel et sensibles à la tétrodontoxine ont été identifiés au sein des neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana* (Lapied et coll., 1990, Laviaille-Defaix et coll., 2006). Leurs propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques et de régulation intracellulaire sont différentes. De ce fait, chacun de ces courants modulent différemment l'activité électrique spontanée des neurones DUM. Ainsi, le fil conducteur de notre recherche a été la corrélation entre les profils de courants Na^+ exprimés dans les neurones DUM et la structure moléculaire des canaux Na_v . L'hypothèse la plus probable était que plusieurs isoformes de sous-unités α et/ou β sont exprimées dans les neurones DUM. Nos recherches se sont appuyées sur l'association de la biologie moléculaire (purification d'acides nucléiques, RT-PCR, clonage et analyse bioinformatique) et de biologie cellulaire (culture de neurone d'insecte et patch-clamp). Les résultats obtenus permettent de dresser un état des lieux de la diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans la CN de la blatte *P. americana*, à l'état adulte. L'apport de la phylogénie a permis d'identifier les liens de parenté entre les gènes découverts chez *P. americana* et les gènes paralogues d'autres espèces d'arthropodes. Nous avons tenté d'inhiber l'expression des canaux Na_v des neurones DUM par une stratégie dites des oligonucléotides antisens. Ainsi, dans une première partie, les résultats seront récapitulés afin d'en extraire les principales données. Dans une seconde partie, quelques perspectives émanant des résultats exposés seront proposées.

CHAPITRE 1. CONCLUSIONS GENERALES

Les sous-unités α et β des canaux Na_v exprimées dans la CN de *P. americana* ont été caractérisées par une approche de biologie moléculaire. Ainsi, quatre nouvelles protéines ont été identifiées. Ci-dessous sont résumées les principales caractéristiques de ces diverses sous-unités.

A La sous-unité PaNa_v1 : une sous-unité très conservée parmi les sous-unités α des canaux Na_v d'insecte

En raison de la taille importante des ADNc codant la sous-unité α des canaux Na_v d'insecte, nous avons amplifié dans un premier temps plusieurs régions conservées qui se chevauchent. Malgré la diversité des ADNc épissés au sein de la chaîne nerveuse, un seul ADNc codant l'intégralité de la sous-unité α du canal Na_v de *P. americana* a été isolé. La difficulté du clonage des ADNc codant des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte a aussi été mentionnée pour d'autres espèces d'arthropodes (Dong, 2003, Wang et coll., 2003a, Lee et coll., 2009). En accord avec la nomenclature établie, nous avons nommé cette nouvelle sous-unité PaNa_v1. Elle s'avère être la quatrième sous-unité orthologue de canaux Na_v d'arthropode dont l'ADNc a été intégralement cloné après DmNa_v, BgNa_v (*B. germanica*) et VmNa_v (*V. destructor*) (Song et coll., 2004, Olson et coll., 2008, Lin et coll., 2009). Ainsi, la séquence de PaNa_v1 contient les motifs moléculaires caractéristiques des canaux Na_v : alternance régulière de résidus d'acides aminés chargés positivement au niveau des segments S4, anneaux DEKA et EEQD déterminant la sélectivité aux ions Na^+ et la sensibilité à la TTX au niveau des boucles S5-S6 et tripeptide MFM occluant le pore lors de la phase d'inactivation. De plus, PaNa_v1 nous a permis d'actualiser la phylogénie des sous-unités α des canaux Na_v d'insecte. Nous avons alors montré qu'au-delà de la conservation des sous-unités α de canaux Na_v , l'histoire évolutive des gènes orthologues à PaNa_v1 correspond à l'histoire évolutive des insectes.

B Les exons alternatifs : entre conservation et divergence

La comparaison des séquences de plusieurs ADNc codant les boucles intracellulaires L1, L2 et les segments IIS3-S4 a permis de confirmer l'épissage alternatif des exons optionnels J, I, A, B, E, F, H, G¹¹²⁹ et des exons mutuellement exclusifs G1 et G2 au niveau de la CN de *P. americana*. Par conséquent, les facteurs *cis* et *trans* régulateurs contrôlant l'épissage alternatif de ces exons sont conservés entre des gènes d'espèces d'insecte séparés de plus de 300 millions d'années (Ex : blatte *versus* drosophile). Une analyse bioinformatique détaillée a permis de mettre en exergue que les exons codant des segments transmembranaires (K, C, G1 et G2) ainsi que les exons optionnels codant une région de la boucle L1 (A et B) sont très conservés entre les gènes orthologues (identité de séquence supérieure à 81%). Ce résultat indique que l'ensemble de ces exons jouent un rôle fonctionnel important, et sont de ce fait conservés entre les insectes étudiés. Au contraire l'identité de séquence des exons optionnels J, I, E, F et H, localisés au niveau des boucles cytoplasmiques L1 et L2, est comprise entre 11% et 69%. Alors que les exons I et F de la sous-unité PaNa_v1 sont très différents des exons homologues des autres sous-unités α de canaux Na_v d'insecte, ils sont très conservés chez *B. germanica* (66 et 92 % d'identité de séquence protéique respectivement). Cette observation suggère qu'en dépit d'une forte homologie entre les canaux Na_v d'insecte, des motifs moléculaires peuvent différencier les insectes de différents ordres.

C Diversité moléculaire des canaux Na_v à différents niveaux de la chaîne nerveuse

Nous avons souhaité « cartographier » la diversité moléculaire des canaux Na_v à l'échelle tissulaire (CN), subtissulaire (DGA) et cellulaire (neurones DUM). Cette approche est innovante puisqu'à ce jour aucune étude systématique ne s'est intéressée à caractériser la diversité moléculaire des Na_v au sein d'un même tissu d'insecte. Pour ce faire, l'adaptation de la technique de la RT-PCR sur neurones DUM s'est révélée intéressante pour notre étude. Ainsi, nous avons montré que plus de 85% des ADNc isolés contiennent les exons alternatifs A, F, H et G1. Dans la CN et le DGA, les exons les moins représentés sont dans l'ordre croissant G2<B<I<E. Aucun de ces quatre exons n'a été identifié parmi les ADNc isolés de neurones DUM. De plus, la combinaison d'exons J, K, A, E, F, G¹¹²⁹, H, G1

caractérisant l'ADNc codant la sous-unité PaNa_v1 s'est avérée représentative des ADNc les plus exprimés dans la CN. Bien que différentes combinaisons d'exons caractérisent les ADNc de la CN et du DGA, une seule combinaison d'exon caractérise les boucles L1 et L2 des canaux Na_v de neurones DUM. Cette observation suggère alors que la diversité moléculaire des canaux Na_v est réduite à l'échelle du neurone DUM. Comme mentionné précédemment, des études complémentaires s'intéressant à d'autres régions épissées seraient nécessaires pour s'assurer qu'un seul variant de la sous-unité-unité α soit réellement exprimé au sein des neurones DUM.

D Découverte de la sous-unité PaFPC : mise en évidence d'une duplication du gène codant la sous-unité α de canaux Na_v chez *P. americana*

Au cours de notre investigation de la diversité moléculaire des canaux Na_v exprimés dans la CN, nous avons découvert un nouveau gène codant une sous-unité α atypique. Deux ADNc codant l'intégrité du cadre ouvert de lecture de ce gène original ont été isolés. En raison de la répétition en tandem de quatre domaines transmembranaires, nous avons nommé ces sous-unités PaFPC1 et PaFPC2. Des interrogations de type BLASTP dans les banques de données des génomes d'insecte ont prédit des homologies uniquement avec les canaux Na_v classiques. Plus précisément, PaFPC1 partagent 59% d'identité de séquence protéique avec PaNa_v1. Bien que le filtre de sélectivité aux ions Na⁺ soit conservé au sein de PaFPC1, des singularités moléculaires le distinguent nettement des canaux Na_v classiques. Premièrement, la charge nette des segments S4 est plus faible comparativement à celle des sous-unités α de canaux Na_v d'insecte et de vertébrés, indiquant des propriétés d'activation particulières. Deuxièmement, le tripeptide impliqué dans l'inactivation des canaux Na_v est absent, suggérant l'absence d'un tel processus ou la participation d'autres motifs moléculaires. L'analyse des relations phylogénétique de PaFPC1 avec des sous-unités paralogues d'insecte a permis de montrer que PaFPC1 se branche à la base des canaux Na_v d'insecte, indiquant qu'un événement de duplication est à l'origine de PaNa_v1 et PaFPC. Toutefois, ce dernier n'aurait pas été conservé chez les insectes plus évolués que la blatte. De ce fait, nos travaux montrent pour la première fois l'existence de deux gènes proches phylogénétiquement de la famille des canaux Na_v d'insecte.

E Caractérisation des deux isoformes de sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2

Pour compléter notre étude sur les canaux Na_v de *P. americana*, nous avons cloné deux populations d'ADNc codant le cadre ouvert de lecture d'une sous-unité auxiliaire. Partageant le maximum d'identité protéique, soit 55%, avec la sous-unité TcTEH1 de *T. castaneum*, nous avons nommé les deux nouvelles sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2. Seuls 11 résidus d'acides aminés codant l'extrémité carboxy-terminale distinguent ses deux sous-unités. PaTEH1.1 et PaTEH1.2. L'analyse de l'organisation topologique de la sous-unité PaTEH1.1 a révélé la présence de deux domaines transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire de 167 résidus d'acides aminés. Cette boucle extracellulaire comprend 19 sites putatifs de glycosylation ainsi que huit cystéines déterminant des ponts disulfures. L'analyse des relations phylogénétiques a permis de confirmer que PaTEH1.1 et PaTEH1.2 sont plus proches phylogénétiquement des sous-unités orthologues à DmTEH1 que les quatre autres familles de sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte. Ces deux sous-unités ont été co-exprimées avec la sous-unité Dm Na_v1 dans des oocytes de xénope. En présence de la sous-unité PaTEH1.1 l'amplitude du courant Na^+ est deux fois plus amplifiée par rapport à l'association de la sous-unité Dm Na_v1 avec la sous-unité DmTEH1 ou DmTE. Au contraire, l'amplitude du courant Na^+ mesuré lors de la coexpression des sous-unités Dm Na_v1 et PaTEH1.2 n'est pas significativement différente des autres combinaisons protéiques. Par conséquent, PaTEH1.1 s'avère une protéine chaperonne très efficace permettant d'augmenter l'expression de la sous-unité Dm Na_v1 dans l'ovocyte de xénope.

CHAPITRE 2. PERSPECTIVES

A Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaFPC

L'expression de la sous-unité PaFPC dans des ovocytes de xénope avec ou sans sous-unités auxiliaires ne nous a pas permis de mesurer de courant ionique dépendant du potentiel. Par ailleurs, afin d'apprécier la fonction de PaFPC, il serait intéressant de détecter son expression par immunohistochimie. Les anticorps pourraient cibler la boucle intracellulaire L3 divergente de la sous-unité PaNa_v1. En effet, il s'est avéré que les anticorps SP19 ciblant les canaux Na_v d'insecte sont efficaces pour détecter les canaux Na_v de *P. americana* (Amat et coll., 1998).

B Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaTEH1.1 et PaTEH1.2

B.1.1 Distribution spatio-temporelle des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 au sein du système nerveux de *P. americana*

Tout d'abord, il serait intéressant de comparer le niveau d'expression des transcrits *PaTEH1.1* et *PaTEH1.2* au niveau de la CN chez des individus aux stades larvaires et adulte. Cette information permettrait de savoir si l'expression de ces sous-unités est sous le contrôle de facteur de régulation dépend du développement de la même manière que la sous-unité TipE (Feng et coll., 1995a). La technique envisageable est la RT-PCR quantitative en temps réel. De plus, il serait intéressant de comparer l'expression de ces deux sous-unités auxiliaires à l'expression de la sous-unité principale α . En effet aucune information ne relate des rapports stœchiométriques entre les sous-unités α et β exprimées *in vivo*.

Afin de déterminer la localisation des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 dans la chaîne nerveuse, des expériences telles que l'hybridation *in situ* et/ou l'immunohistochimie

seraient envisageables. Dans ce cas, les sondes et les anticorps pourraient cibler l'extrémité carboxy-terminale qui est différentes entre les deux isoformes.

B.1.2 Relations structure-fonction des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2

Différentes hypothèses peuvent expliquer la variation de l'amplitude des courants Na^+ des sous-unités DmNa_v1 exprimées dans des ovocytes de xénope en fonction des sous-unités auxiliaires PaTEH1.1 et PaTEH1.2. Premièrement, en fonction des sous-unités auxiliaires le nombre de sous-unités DmNa_v1 adressées dans la membrane de l'ovocyte peut varier. Pour vérifier cette hypothèse, le nombre de sous-unités DmNa_v1 exprimée dans la membrane d'ovocyte peut être évaluée indirectement en mesurant l'affinité de la [^3H]tétrodotoxine, radioligand spécifique des canaux Na_v (Kazen-Gillespie et coll., 2000). Deuxièmement, il est probable que la variation de l'expression fonctionnelle de la sous-unité DmNa_v1 soit le résultat d'un transport cellulaire différent au sein de l'ovocyte de xénope. Pour tester cette hypothèse, la localisation cellulaire des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 peut être observée par fluorescence confocale en présence d'un marqueur d'expression tel que la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) (Zimmer et coll., 2002b, Camacho et coll., 2006). De plus, la co-localisation des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 avec les sous-unités α au sein de la membrane de l'ovocyte pourraient être observée par immunohistochimie. Troisièmement, il est probable qu'en fonction de la sous-unité auxiliaire, la durée d'ouverture des canaux Na_v varie. Pour tester cette hypothèse, la probabilité d'ouverture des canaux DmNa_v1 coexprimés avec différentes sous-unités auxiliaires pourrait être mesurée par la technique de patch unitaire (Camacho et coll., 2006). En effet, plus la probabilité d'ouverture des canaux Na_v exprimés à la surface de la membrane de l'ovocyte augmente, plus l'amplitude des courants Na^+ macroscopiques augmente.

La détermination des propriétés de dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation à l'état stable sont nécessaires pour caractériser l'effet modulateur des sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2 sur les courants Na^+ . De plus, il serait intéressant de déterminer les propriétés cinétiques des courants Na^+ (constante d'inactivation, constante de réactivation). En fonction des propriétés électrophysiologiques modulées par les sous-unités PaTEH1.1 et PaTEH1.2, la pharmacologie des canaux Na_v recombinants aux agents neurotoxiques pourraient être évalués. De plus, à ce jour, il est d'usage de co-exprimer les sous-unités DmNa_v et BgNa_v avec la sous-unité DmTipE . Or les premières mesures

électrophysiologiques montrent que la sous-unité PaTEH1.1 module différemment les courants Na⁺. Il serait donc intéressant de comparer les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des courants Na⁺ des sous unités DmNa_v et BgNa_v en présence de la sous-unité TipE et PaTEH1.1.

La sous-unité PaTEH1.1 est caractérisée par plusieurs sites putatifs de glycosylation non conservés au niveau des sous-unités orthologues. Or chez les mammifères il est bien établi que la glycosylation des sous-unités β1 module les propriétés d'activation de plusieurs sous-unités α de canaux Na_v de mammifères (Johnson et coll., 2004). Il serait donc tout à fait intéressant de comparer les propriétés des courants Na⁺ en coexprimant les sous-unités DmNa_v1 et PaTEH1.1 dans des cellules disposant de la machinerie cellulaire pour associer des acides sialiques aux glycoprotéines et dans des cellules mutantes dépourvues de ce système. De plus, la fonctionnalité des sites putatifs de glycosylation pour être vérifiée par mutagenèse dirigée.

En guise de conclusion finale, nous pouvons mentionner que les résultats obtenus tout au long de cette thèse ont permis d'acquérir une connaissance plus précise de la biologie moléculaire des canaux Na_v exprimés spécifiquement dans le SNC de *P. americana*. De plus, la découverte de nouveaux gènes ouvrent de nouvelles voies de recherche intéressantes pour la neurophysiologie des insectes.

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Le potentiel d'action : conductances ioniques et structures moléculaires associées..... | 8 |
| Figure 2 : Structure de la sous-unité α des canaux Na_v de vertébrés..... | 12 |
| Figure 3 : Topologie membranaire des sous-unités auxiliaires β des canaux Na_v de vertébrés | 15 |
| Figure 4 : Espèces d'insecte pour lesquelles les canaux Na_v ont été étudiés..... | 20 |
| Figure 5 : Comparaison de la topologie transmembranaire des sous-unités β de canaux Na_v d'insecte avec la sous-unité β des canaux BK_{Ca} de vertébrés. | 27 |
| Figure 6 : Les courants Na^+ résultent de différents états de conformation des canaux Na_v | 30 |
| Figure 7 : Pharmacologie de la sous-unité α des canaux Na_v | 35 |
| Figure 8 : Structure chimique et mode d'action des pyréthrinoides..... | 36 |
| Figure 9 : Structure chimique des dérivés de pyrazolines (modifié d'après Takagi et coll. 2007)..... | 39 |
| Figure 10 : Courants INa1 et INa2 modulant l'excitabilité membranaire des neurones DUM (modifié d'après Laviolle-Defaix et coll., 2006)..... | 46 |
| Figure 11 : Principes généraux des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles à la base de la diversité moléculaire des canaux Na_v d'insecte. | 48 |
| Figure 12 : Formes majeures de l'épissage alternatif de l'ARNm. | 51 |
| Figure 13 : Sites consensus de l'assemblage du spliceosome décrits au niveau de l'intron des métazoaires (modifié d'après (Smith et coll., 2000)). | 52 |
| Figure 14 : Exons alternatifs caractérisant les isoformes des sous-unités DmNa_v | 54 |
| Figure 15: Evénements de duplication à l'origine des exons mutuellement exclusifs des canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires (Ca_v et Na_v). | 59 |
| Figure 16 : Organisation génomique des exons homologues aux exons optionnels a et i du gène DmNa_v , chez une espèce de diptère (<i>Anopheles gambiae</i>) et deux espèces de lépidoptères (<i>Bombyx mori</i> et <i>Heliothis virescens</i>)..... | 60 |
| Figure 17 : Position des résidus d'acide aminé substitués par édition de l'ARN au sein des sous-unités DmNa_v (vert) et BgNa_v (violet)..... | 76 |
| Figure 18 : Intégration de notre démarche de recherche dans le contexte scientifique actuel..... | 89 |
| Figure 19: Diagramme synoptique illustrant les courants Na^+ du modèle cellulaire étudié, l'hypothèse de recherche déclinée et les objectifs scientifiques de recherche. | 93 |

MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|----|
| Figure 20: Colonie de blattes <i>Periplaneta americana</i> employées pour les expériences. | 95 |
| Figure 21 : Représentation schématique du système nerveux central de la blatte <i>Periplaneta americana</i> | 95 |
| Figure 22 : Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominal de la blatte <i>P. americana</i> | 96 |
| Figure 23 : Critères anatomiques, biochimiques et électrophysiologiques caractérisant les neurones DUM efférents du dernier ganglion abdominal de la blatte <i>P. americana</i> | 98 |

| | |
|---|-----|
| Figure 24: Méthodes de biologie moléculaire employées pour étudier la diversité moléculaire des sous-unités α et β des canaux sodium exprimés dans le système nerveux central de la blatte <i>P. americana</i> | 99 |
| Figure 25: Protocole de la purification des ARN totaux à partir de la méthode Trizol® Reagent (Invitrogen™). | 102 |
| Figure 26 : Principe de la polymérisation en chaîne (PCR) (modifié d'après Andy Vierstraete, 1999). | 105 |
| Figure 27: Stratégie d'amplification du cadre ouvert de lecture de la sous-unité α du Na_v de <i>P.americana</i> par RT-PCR. | 107 |
| Figure 28: Principe des deux variantes de RACE-PCR utilisées pour amplifier les régions 5' non codante et 3' non codante des sous-unités α et β du Na_v de <i>P. americana</i> | 111 |
| Figure 29 : Stratégie d'amplification du cadre de lecture de la sous-unité PaFPC de <i>P.americana</i> par RT-PCR. | 115 |
| Figure 30: Stratégie d'amplification de la sous-unité auxiliaire PaTEH1. | 119 |
| Figure 31 : Alignements protéiques et nucléiques de séquences codant les domaines transmembranaires TM1 et TM2 des sous-unités auxiliaires orthologues à DmTEH1 chez cinq espèces d'insectes. | 120 |
| Figure 32: Principes des méthodes de clonage..... | 126 |
| Figure 33: Carte de restriction du site de clonage du vecteur pCR® 4-TOPO® du kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen™)..... | 128 |
| Figure 34: Carte de restriction du site de clonage du vecteur pCR®-XL-TOPO® du kit TOPO XL PCR Cloning (modifié d'après Invitrogen™)..... | 128 |
| Figure 35 : Carte de restriction du plasmide pGEM Hejuel (gracieusement donné par Pr. Olaf Pongs, Institut de Transduction du Signal neuronal, Hambourg, Allemagne). | 130 |
| Figure 36: Etapes principales de la RT-PCR multiplex sur neurones DUM isolés. | 139 |
| Figure 37 : Schéma montrant la disposition des amorces spécifiques utilisées pour amplifier plusieurs transcrits exprimés dans les neurones DUM. | 142 |
| Figure 38 : Configurations d'enregistrement de la technique du patch-clamp. | 151 |

RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|-----|
| Figure 39 : Stratégie de clonage des ADNc codant la sous-unité α du canal Na_v de <i>P. americana</i> par RT-PCR. | 162 |
| Figure 40: Structure des ADNc isolés codant la région 5' terminale des canaux Na_v de <i>Periplaneta americana</i> | 164 |
| Figure 41 : Comparaison de la structure des clones C1 et C2 avec la région homologue de la sous-unité Bg Na_v1 de <i>Blattella germanica</i> | 165 |
| Figure 42: RT-PCR amplifiant à partir des oligonucléotides XmaI-Na1S et SpeI-Na1AS les ADNc exprimés dans la chaîne nerveuse de <i>P. americana</i> | 167 |
| Figure 43 : Profil d'hydrophobie de Pa Na_v1 réalisé à partir de la méthode Kyte et Doolittle (Kyte et coll., 1982). | 169 |
| Figure 44: Alignement des séquences protéiques des sous-unités Pa Na_v1 et Dm Na_v1 | 171 |
| Figure 45 : Identité de séquence protéique entre les exons alternatifs de Pa Na_v1 et les exons homologues des autres sous-unités α de canaux Na_v d'insecte. | 174 |

| | |
|---|-----|
| Figure 46 : Expression des exons alternatifs du gène <i>PaNav</i> dans la chaîne nerveuse (CN), le dernier ganglion abdominal (DGA) et les neurones DUM. | 177 |
| Figure 47 : Fréquence d'expression des combinaisons d'exons alternatifs caractérisant les variants <i>PaNav</i> isolés de la chaîne nerveuse (CN), le dernier ganglion abdominal (DGA) et les neurones DUM. | 179 |
| Figure 48 : Comparaison de la distribution des variants de la sous-unité α des canaux Na_v exprimés majoritairement chez <i>B. germanica</i> (organisme entier) et <i>P. americana</i> (système nerveux central). | 182 |
| Figure 49: Clonage des ADNc codant la sous-unité PaFPC de <i>P. americana</i> | 187 |
| Figure 50 : Structure primaire de la sous-unité PaFPC1. | 191 |
| Figure 51 : Alignement des séquences protéiques des sous unités PaFPC1, PaNav1, BgNav1, DmNav1 et rNav1.2. | 194 |
| Figure 52 : Distribution tissulaire des transcrits <i>PaFPC</i> et <i>PaNav1</i> | 195 |
| Figure 53 : Profil d'expression des ADNc codant les sous-unités <i>PaNav</i> et <i>PaFPC</i> dans les neurones DUM. ... | 196 |
| Figure 54 : Arbre de maximum de vraisemblance des sous-unités α de canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires chez les arthropodes. | 200 |
| Figure 55 : Clonage par RT-PCR de l'ADNc codant la sous-unité auxiliaire orthologue à DmTEH1 chez <i>Periplaneta americana</i> | 202 |
| Figure 56 : Séquences nucléiques et protéiques déduites des ADNc <i>PaTEH1.1</i> et <i>PaTEH1.2</i> . Les séquences non codantes sont écrites en italique et grisées. | 204 |
| Figure 57: Hypothèses proposées pour expliquer l'origine des transcrits <i>PaTEH1.1</i> et <i>PaTEH1.2</i> | 206 |
| Figure 58 : Profil d'hydrophobie de la sous-unité <i>PaTEH1.1</i> réalisé à partir de la méthode Kyte et Doolittle, 1982. | 208 |
| Figure 59 : Alignement multiple des séquences protéiques de la sous-unité <i>PaTEH1.1</i> et des sous-unités DmTEH1, ApTEH1, CpTEH1.1, AgTEH1, NvTEH1, AmTEH1, TcTEH1 et PhTEH1 selon la méthode MUSCLE. | 210 |
| Figure 60 : Topologie proposée des sous-unités <i>PaTEH1.1</i> et <i>PaTEH1.2</i> et localisation des ponts disulfures établis entre les cystéines, les séquences consensus des sites de glycosylation (boucle extracellulaire) et de phosphorylation (extrémité carboxy-terminale). | 211 |
| Figure 61 : Distribution tissulaire (A) et ganglionnaire (B) des transcrits <i>PaTEH1.1</i> et <i>PaTEH1.2</i> | 212 |
| Figure 62 : Arbre phylogénétique des gènes codant des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte. | 215 |
| Figure 63 : Détection des AS-alexa ciblant le gène <i>pSlo</i> par immunofluorescence confocale dans des neurones DUM de <i>P. americana</i> après 24 et 48 heures d'incubation. | 217 |
| Figure 64 : Potentiels d'action spontanés 48 heures après la mise en culture de neurones DUM avec des oligonucléotides ciblant la boucle intracellulaire L1 du gène <i>PaNav</i> (L1-AS), des oligonucléotides non spécifiques (RAS). | 218 |
| Figure 65 : Courants Na^+ des neurones DUM prétraités pendant 48 heures avec des oligonucléotides antisens ciblant la boucle intracellulaire L1 (L1-AS) et le codon d'initiation de la traduction (N-AS). | 221 |
| Figure 66 : Amplitude du courant INa induit par l'expression de la sous-unité Dm Na_v1 , dans des ovocytes de xénope, en présence des sous-unités auxiliaires DmTE, DmTEH1, <i>PaTEH1.1</i> et <i>PaTEH1.2</i> | 225 |

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Quelques caractéristiques des sous-unités α des canaux Na_v chez le rat. | 14 |
| Tableau 2 : Organisation des gènes homologues au gène <i>DmNa_v</i> chez plusieurs espèces d'insectes. | 22 |
| Tableau 3: Recensement (Novembre 2009) des ADNc codant l'intégralité du cadre ouvert de lecture (COL) des sous-unités α des canaux Na_v d'arthropodes. | 24 |
| Tableau 4 : Identités de séquence protéique partagées entre les sous-unités orthologues à <i>DmNa_v1</i> | 25 |
| Tableau 5 : Quelques caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques des courants Na^+ transitoires de différentes préparations neuronales d'insecte et de canaux Na_v recombinants exprimés dans des ovocytes de xénope. | 43 |
| Tableau 6 : Conservation des exons alternatifs homologues à <i>DmNa_v</i> chez diverses espèces d'arthropodes..... | 57 |
| Tableau 7 : Tissus prélevés pour extraire les ARN totaux lors des études s'intéressant aux profils d'expression des variants codant des canaux Na_v au cours du développement des insectes. | 63 |
| Tableau 8 : Comparaison des combinaisons d'exons dans les variants majoritaires des sous-unités α de canaux Na_v exprimés chez <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Blattella germanica</i> au cours du développement. | 65 |
| Tableau 9 : Sites putatifs de phosphorylation pour la PKA et la PKC identifiés chez plusieurs espèces d'insecte. | 86 |

MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|-----|
| Tableau 10 : Critères de choix des ADN polymérase thermostables..... | 106 |
| Tableau 11 : Paires des oligonucléotides dégénérées conçues pour amplifier des régions conservées des canaux Na_v d'insectes. | 108 |
| Tableau 12: Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1 et GR2) et le domaine I de la sous-unité principale α du canal sodium de la blatte <i>P. americana</i> | 112 |
| Tableau 13 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue poly A et le domaine III de la sous-unité principale α du canal sodium de la blatte <i>P. americana</i> | 113 |
| Tableau 14 : Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1™ et GR2™) et le domaine I de la sous-unité α de PaFPC. | 116 |
| Tableau 15 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue poly A et le domaine IV de la sous-unité α PaFPC. | 117 |
| Tableau 16: Oligonucléotides spécifiques ciblant l'adaptateur du kit GeneRacer™ (GR1™ et GR2™) et le domaine transmembranaire TM1 de la sous-unité auxiliaire PaTEH1 du canal sodium de la blatte <i>P. americana</i> | 122 |
| Tableau 17 : Oligonucléotides spécifiques ciblant la queue polyA des ADNc double brin et le domaine transmembranaire TM1 de la sous-unité auxiliaire PaTEH1 du canal sodium de la blatte <i>P. americana</i> . . | 123 |
| Tableau 18: Vecteurs et bactéries <i>Escherichia Coli</i> employés pour sous cloner les fragments de PCR amplifiés en fonction de leur poids moléculaire et du besoin de l'expérience. | 127 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 19 : Oligonucléotides spécifiques conçus pour amplifier les transcrits à partir de la RT-PCR sur neurone DUM isolé. La température de fusion T_m est déterminée à partir de la formule $4AT+2GC$ | 141 |
| Tableau 20 : Composition des liquides physiologiques utilisés lors de la dissection du dernier ganglion abdominal et de la dissociation des neurones DUM..... | 149 |
| Tableau 21 : Composition des solutions extracellulaires et intrapipette utilisées lors des expériences de patch-clamp dans les conditions de courant imposé et de potentiel imposé..... | 153 |
| Tableau 22 : Séquences nucléiques des oligonucléotides complémentaires à l'ARNm du gène <i>PaNav</i> , conçus pour la technique dite des oligonucléotides antisens. | 156 |

RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|-----|
| Tableau 23: Identités de séquence protéique partagée entre les clones obtenus avec les PCR#1 à PCR#5 et les régions homologues des sous-unités α des canaux Na_v de plusieurs espèces d'insecte. | 163 |
| Tableau 24 : Identité de séquences protéiques entre <i>PaNav</i> 1 et les autres sous-unités α de canaux Na_v d'insectes et du rat r Na_v 1.2. | 168 |
| Tableau 25 : Identités de séquence protéique entre les exons alternatifs identifiés à partir du transcrit <i>PaNav</i> 1 et les exons alternatifs homologues de sous-unités α de canaux Na_v d'arthropode..... | 173 |
| Tableau 26 : Identités de séquence protéique partagées entre PaTEH1 et les sous-unités auxiliaires orthologues d'insecte. | 208 |
| Tableau 27: Recensement (Novembre 2009) des sous-unités auxiliaires β de canaux Na_v chez les insectes. | 213 |
| Tableau 28 : Comparaison des caractéristiques des potentiels d'action spontanés 48 heures après la mise en culture de neurones DUM avec des oligonucléotides..... | 219 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acosta R., Montanez C., Gomez P. and Cisneros B.**, 2002. Delivery of antisense oligonucleotides to PC12 cells. *Neurosci Res*, 43 (1): 81-86.
- Agnew W. S., Miller J. A., Ellisman M. H., Rosenberg R. L., Tomiko S. A. and Levinson S. R.**, 1983. The voltage-regulated sodium channel from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 48 Pt 1 165-179.
- Agrawal R. and Stormo G. D.**, 2005. Editing efficiency of a *Drosophila* gene correlates with a distant splice site selection. *Rna*, 11 (5): 563-566.
- Agrawal S.**, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotechnol*, 14 (10): 376-387.
- Akhtar S. and Juliano R. L.**, 1992. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends Cell Biol*, 2 (5): 139-144.
- Akopian A. N., Souslova V., Sivilotti L. and Wood J. N.**, 1997. Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS Lett*, 400 (2): 183-187.
- Amat C. and Hue B.**, 1996. Morphological and electrophysiological aspects of dorsal median paired neurons generating plateau action potentials in the terminal abdominal ganglion of the insect central nervous system. *J Comp Physiol A*, 178 105-115.
- Amat C., Lapiéd B., French A. S. and Hue B.**, 1998. Na⁺-Dependent neuritic spikes initiate Ca²⁺-dependent somatic plateau action potentials in insect dorsal paired median neurons. *J Neurophysiol*, 80 (5): 2718-2726.
- Basilio C., Wahba A. J., Lengyel P., Speyer J. F. and Ochoa S.**, 1962. Synthetic polynucleotides and the amino acid code. V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48 613-616.
- Bass B. L., Nishikura K., Keller W., Seeburg P. H., Emeson R. B., O'Connell M. A., Samuel C. E. and Herbert A.**, 1997. A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA. *Rna*, 3 (9): 947-949.
- Bass B. L. and Weintraub H.**, 1988. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell*, 55 (6): 1089-1098.
- Beadle D. J.**, 2006. Insect neuronal cultures: an experimental vehicle for studies of physiology, pharmacology and cell interactions. *Invert Neurosci*, 6 (3): 95-103.
- Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J. P., Sloof P., Van Boom J. H. and Tromp M. C.**, 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46 (6): 819-826.
- Bezanilla F.**, 2006. The action potential: from voltage-gated conductances to molecular structures. *Biol Res*, 39 (3): 425-435.
- Bjorling-Poulsen M., Andersen H. R. and Grandjean P.**, 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health*, 7 50.
- Blackshaw S. E., Henderson L. P., Malek J., Porter D. M., Gross R. H., Angstadt J. D., Levasseur S. M. and Maue R. A.**, 2003. Single-cell analysis reveals cell-specific patterns of expression of a family of putative voltage-gated sodium channel genes in the leech. *J Neurobiol*, 55 (3): 355-371.
- Blechsmidt S., Haufe V., Benndorf K. and Zimmer T.**, 2008. Voltage-gated Na⁺ channel transcript patterns in the mammalian heart are species-dependent. *Prog Biophys Mol Biol*, 98 (2-3): 309-318.
- Bosmans F., Martin-Eauclaire M. F. and Swartz K. J.**, 2008. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 456 (7219): 202-208.
- Braünig P. and Pflüger H. S.**, 2001. The unpaired median neurons of insect. *Adv Insect Physiol*, 28 185-266.
- Brinkmeier H., Schu B., Seliger H., Kurz L. L., Buchholz C. and Rudel R.**, 1997. Antisense oligonucleotides discriminating between two muscular Na⁺ channel isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 234 (1): 235-241.

- Brone B., Tytgat J., Wang D. C. and Van Kerkhove E.**, 2003. Characterization of Na(+) currents in isolated dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria* and effect of the alpha-like scorpion toxin BmK M1. *J Insect Physiol*, 49 (2): 171-182.
- Camacho J. A., Hensellek S., Rougier J. S., Blechschmidt S., Abriel H., Benndorf K. and Zimmer T.**, 2006. Modulation of Nav1.5 channel function by an alternatively spliced sequence in the DII/DIII linker region. *J Biol Chem*, 281 (14): 9498-9506.
- Cantrell A. R. and Catterall W. A.**, 2001. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 2 (6): 397-407.
- Cantrell A. R., Ma J. Y., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1996. Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron*, 16 (5): 1019-1026.
- Cantrell A. R., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1999. Voltage-dependent neuromodulation of Na⁺ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 19 (13): 5301-5310.
- Cantrell A. R., Smith R. D., Goldin A. L., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1997. Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci*, 17 (19): 7330-7338.
- Cantrell A. R., Tibbs V. C., Yu F. H., Murphy B. J., Sharp E. M., Qu Y., Catterall W. A. and Scheuer T.**, 2002. Molecular mechanism of convergent regulation of brain Na(+) channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15. *Mol Cell Neurosci*, 21 (1): 63-80.
- Carlier E., Dargent B., De Waard M. and Couraud F.**, 2000. Na(+) channel regulation by calmodulin kinase II in rat cerebellar granule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 274 (2): 394-399.
- Carr D. B., Day M., Cantrell A. R., Held J., Scheuer T., Catterall W. A. and Surmeier D. J.**, 2003. Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity. *Neuron*, 39 (5): 793-806.
- Casida J. E.**, 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem Res Toxicol*, 22 (4): 609-619.
- Catterall W. A.**, 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26 (1): 13-25.
- Catterall W. A., Cestele S., Yarov-Yarovoy V., Yu F. H., Konoki K. and Scheuer T.**, 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49 (2): 124-141.
- Catterall W. A., Goldin A. L. and Waxman S. G.**, 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev*, 55 (4): 575-578.
- Catterall W. A., Goldin A. L. and Waxman S. G.**, 2005a. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57 (4): 397-409.
- Catterall W. A., Perez-Reyes E., Snutch T. P. and Striessnig J.**, 2005b. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57 (4): 411-425.
- Cauli B., Audinat E., Lambolez B., Angulo M. C., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S. and Rossier J.**, 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci*, 17 (10): 3894-3906.
- Cavener D. R.**, 1987. Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res*, 15 (4): 1353-1361.
- Chabot B.**, 1996. Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet*, 12 (11): 472-478.
- Chang C., Shen W. K., Wang T. T., Lin Y. H., Hsu E. L. and Dai S. M.**, 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 39 (4): 272-278.

- Chatelier A., Dahllund L., Eriksson A., Krupp J. and Chahine M.,** 2008. Biophysical properties of human Na v1.7 splice variants and their regulation by protein kinase A. *J Neurophysiol*, 99 (5): 2241-2250.
- Chen T. C., Law B., Kondratyuk T. and Rossie S.,** 1995. Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J Biol Chem*, 270 (13): 7750-7756.
- Chen Y., Yu F. H., Sharp E. M., Beacham D., Scheuer T. and Catterall W. A.,** 2008. Functional properties and differential neuromodulation of Na(v)1.6 channels. *Mol Cell Neurosci*, 38 (4): 607-615.
- Chiamvimonvat N., Perez-Garcia M. T., Tomaselli G. F. and Marban E.,** 1996. Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels. *J Physiol*, 491 (Pt 1) 51-59.
- Chomczynski P. and Sacchi N.,** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1): 156-159.
- Chopra S. S., Watanabe H., Zhong T. P. and Roden D. M.,** 2007. Molecular cloning and analysis of zebrafish voltage-gated sodium channel beta subunit genes: implications for the evolution of electrical signaling in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 7 113.
- Conrad C., Zhu J., Conrad C., Schoenfeld D., Fang Z., Ingelsson M., Stamm S., Church G. and Hyman B. T.,** 2007. Single molecule profiling of tau gene expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 103 (3): 1228-1236.
- Cooper J. and Dobson H.,** 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment *Crop Protection*, 26 1337-1348.
- Copley R. R.,** 2004. Evolutionary convergence of alternative splicing in ion channels. *Trends Genet*, 20 (4): 171-176.
- Cusdin F. S., Clare J. J. and Jackson A. P.,** 2008. Trafficking and cellular distribution of voltage-gated sodium channels. *Traffic*, 9 (1): 17-26.
- Dai S., Hall D. D. and Hell J. W.,** 2009. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev*, 89 (2): 411-452.
- Davies T. G., Field L. M., Usherwood P. N. and Williamson M. S.,** 2007a. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol*, 16 (3): 361-375.
- Davies T. G., Field L. M., Usherwood P. N. and Williamson M. S.,** 2007b. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59 (3): 151-162.
- Defaix A. and Lapied B.,** 2005. Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invert Neurosci*, 5 (3-4): 135-146.
- Derst C., Messutat S., Walther C., Eckert M., Heinemann S. H. and Wicher D.,** 2003. The large conductance Ca²⁺-activated potassium channel (pSlo) of the cockroach *Periplaneta americana*: structure, localization in neurons and electrophysiology. *Eur J Neurosci*, 17 (6): 1197-1212.
- Derst C., Walther C., Veh R. W., Wicher D. and Heinemann S. H.,** 2006. Four novel sequences in *Drosophila melanogaster* homologous to the auxiliary Para sodium channel subunit TipE. *Biochem Biophys Res Commun*, 339 (3): 939-948.
- Dietrich P. S., McGivern J. G., Delgado S. G., Koch B. D., Eglén R. M., Hunter J. C. and Sangameswaran L.,** 1998. Functional analysis of a voltage-gated sodium channel and its splice variant from rat dorsal root ganglia. *J Neurochem*, 70 (6): 2262-2272.
- Dong K.,** 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*, 27 (2): 93-100.
- 44
- Dong K.,** 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*, 7 (1): 17-30.
- Du Y., Liu Z., Nomura Y., Khambay B. and Dong K.,** 2006. An alanine in segment 3 of domain III (IIIS3) of the cockroach sodium channel contributes to the low pyrethroid sensitivity of an alternative splice variant. *Insect Biochem Mol Biol*, 36 (2): 161-168.

- Du Y., Nomura Y., Liu Z., Huang Z. Y. and Dong K.**, 2009a. Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels. *J Biol Chem*,
- Du Y., Nomura Y., Luo N., Liu Z., Lee J. E., Khambay B. and Dong K.**, 2009b. Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol*, 234 (2): 266-272.
- Dupuis J. P., Bazelot M., Barbara G. S., Paute S., Gauthier M. and Raymond Delpech V.**, 2009. Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *J Neurophysiol*,
- Edgar R. C.**, 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5 113.
- Ekberg J. and Adams D. J.**, 2006. Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: key roles in inflammatory and neuropathic pain. *Int J Biochem Cell Biol*, 38 (12): 2005-2010.
- Ellis J. J., Broom M. and Jones S.**, 2007. Protein-RNA interactions: structural analysis and functional classes. *Proteins*, 66 (4): 903-911.
- Evans J. D. and Gundersen-Rindal D.**, 2003. Beenomes to Bombyx: future directions in applied insect genomics. *Genome Biol*, 4 (3): 107.
- Favre I., Moczydlowski E. and Schild L.**, 1996. On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. *Biophys J*, 71 (6): 3110-3125.
- Fein A. J., Meadows L. S., Chen C., Slat E. A. and Isom L. L.**, 2007. Cloning and expression of a zebrafish SCN1B ortholog and identification of a species-specific splice variant. *BMC Genomics*, 8 226.
- Felipe A., Knittle T. J., Doyle K. L. and Tamkun M. M.**, 1994. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J Biol Chem*, 269 (48): 30125-30131.
- Feng G., Deak P., Chopra M. and Hall L. M.**, 1995a. Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances *Drosophila* para sodium channel function. *Cell*, 82 (6): 1001-1011.
- Feng G., Deak P., Kasbekar D. P., Gil D. W. and Hall L. M.**, 1995b. Cytogenetic and molecular localization of tipE: a gene affecting sodium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139 (4): 1679-1688.
- Few W. P., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 2007. Dopamine modulation of neuronal Na⁽⁺⁾ channels requires binding of A kinase-anchoring protein 15 and PKA by a modified leucine zipper motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (12): 5187-5192.
- French-Constant R. H. and Rocheleau T. A.**, 1993. *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem*, 60 (6): 2323-2326.
- Fickbohm D. and Trimmer B. A.**, 2003. Antisense inhibition of neuronal nicotinic receptors in the tobacco-feeding insect, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 53 (4): 172-185.
- French A. S., Sanders E. J., Duszyk E., Prasad S., Torkkeli P. H., Haskins J. and Murphy R. A.**, 1993. Immunocytochemical localization of sodium channels in an insect central nervous system using a site-directed antibody. *J Neurobiol*, 24 (7): 939-948.
- Ganetzky B., Loughney K. and Wu C. F.**, 1986. Analysis of mutations affecting sodium channels in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci*, 479 325-337.
- Gautier H., Auger J., Legros C. and Lapied B.**, 2008. Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide. *J Pharmacol Exp Ther*, 324 (1): 149-159.
- Gautron S., Dos Santos G., Pinto-Henrique D., Koulakoff A., Gros F. and Berwald-Netter Y.**, 1992. The glial voltage-gated sodium channel: cell- and tissue-specific mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (15): 7272-7276.
- George A. L., Jr., Knittle T. J. and Tamkun M. M.**, 1992. Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (11): 4893-4897.

- Goldin A. L.**, 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 63 871-894.
- Goldin A. L.**, 2002a. Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol*, 205 (Pt 5): 575-584.
622
- Goldin A. L.**, 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol*, 13 (3): 284-290.
- Goldin A. L., Barchi R. L., Caldwell J. H., Hofmann F., Howe J. R., Hunter J. C., Kallen R. G., Mandel G., Meisler M. H., Netter Y. B., Noda M., Tamkun M. M., Waxman S. G., Wood J. N. and Catterall W. A.**, 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28 (2): 365-368.
- Gordon D., Karbat I., Ilan N., Cohen L., Kahn R., Gilles N., Dong K., Stuhmer W., Tytgat J. and Gurevitz M.**, 2007. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon*, 49 (4): 452-472.
- Gordon D., Moskowitz H. and Zlotkin E.**, 1990. Sodium channel polypeptides in central nervous systems of various insects identified with site directed antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1026 (1): 80-86.
- Gorelova N. A. and Yang C. R.**, 2000. Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 84 (1): 75-87.
- Grabowski P. J. and Black D. L.**, 2001. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 65 (3): 289-308.
- Grolleau F. and Lapied B.**, 2000. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: Towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *Journal of Experimental Biology*, 203 (11): 1633-1648.
- Hanrahan C. J., Palladino M. J., Ganetzky B. and Reenan R. A.**, 2000. RNA editing of the *Drosophila* para Na(+) channel transcript. Evolutionary conservation and developmental regulation. *Genetics*, 155 (3): 1149-1160.
- Haufe V., Camacho J. A., Dumaine R., Gunther B., Bollensdorff C., von Banchet G. S., Benndorf K. and Zimmer T.**, 2005. Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J Physiol*, 564 (Pt 3): 683-696.
- He H., Chen A. C., Davey R. B., Ivie G. W. and George J. E.**, 1999. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun*, 261 (3): 558-561.
- Heidel E. and Pfluger H. J.**, 2006. Ion currents and spiking properties of identified subtypes of locust octopaminergic dorsal unpaired median neurons. *Eur J Neurosci*, 23 (5): 1189-1206.
- Heinemann S. H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K. and Numa S.**, 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356 (6368): 441-443.
- Henry S. P., Monteith D. K., Matson J. E., Mathison B. H., Loveday K. S., Winegar R. A., Matson J. E., Lee P. S., Riccio E. S., Bakke J. P. and Levin A. A.**, 2002. Assessment of the genotoxic potential of ISIS 2302: a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Mutagenesis*, 17 (3): 201-209.
- Higuchi M., Single F. N., Kohler M., Sommer B., Sprengel R. and Seeburg P. H.**, 1993. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*, 75 (7): 1361-1370.
- Hille B.**, 1989. The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q J Exp Physiol*, 74 (6): 785-804.
- Hille B.**, 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, Third Edition. 814.
- Hiyama T. Y., Watanabe E., Ono K., Inenaga K., Tamkun M. M., Yoshida S. and Noda M.**, 2002. Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci*, 5 (6): 511-512.

- Hodges D. D., Lee D., Preston C. F., Boswell K., Hall L. M. and O'Dowd D. K.**, 2002. tipE regulates Na⁺-dependent repetitive firing in Drosophila neurons. *Mol Cell Neurosci*, 19 (3): 402-416.
- Hodgkin A. L. and Huxley A. F.**, 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*, 116 (4): 449-472.
- Hoopengardner B., Bhalla T., Staber C. and Reenan R.**, 2003. Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science*, 301 (5634): 832-836.
- Hourez R., Azdad K., Vanwalleghem G., Roussel C., Gall D. and Schiffmann S. N.**, 2005. Activation of protein kinase C and inositol 1,4,5-triphosphate receptors antagonistically modulate voltage-gated sodium channels in striatal neurons. *Brain Res*, 1059 (2): 189-196.
- Hoyle G.**, 1974. A function for neurons (DUM) neurosecretory on skeletal muscle of insects. *J. Exp. Zool.*, 189 401-406.
- Hughes M. D., Hussain M., Nawaz Q., Sayyed P. and Akhtar S.**, 2001. The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov Today*, 6 (6): 303-315.
- Inagaki S., Kaku K., Dunlap D. Y. and Matsumura F.**, 1998. Sequences of cDNAs encoding calmodulin, and partial structures of calmodulin kinase, and a calcium channel of kdr-resistant and -susceptible German cockroaches, *Blattella germanica*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 120 (2): 225-233.
- Ingles P. J., Adams P. M., Knipple D. C. and Soderlund D. M.**, 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem Mol Biol*, 26 (4): 319-326.
- Isman M. B.**, 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*, 51 45-66.
- Isom L. L.**, 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, 7 (1): 42-54.
- Isom L. L. and Catterall W. A.**, 1996. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature*, 383 (6598): 307-308.
- Isom L. L., De Jongh K. S., Patton D. E., Reber B. F., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A. L. and Catterall W. A.**, 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, 256 (5058): 839-842.
- Isom L. L., Ragsdale D. S., De Jongh K. S., Westenbroek R. E., Reber B. F., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, 83 (3): 433-442.
- Janssen D., Derst C., Buckinx R., Van den Eynden J., Rigo J. M. and Van Kerkhove E.**, 2007. Dorsal unpaired median neurons of locusta migratoria express ivermectin- and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels. *J Neurophysiol*, 97 (4): 2642-2650.
- Jepson J. E. and Reenan R. A.**, 2007. Genetic approaches to studying adenosine-to-inosine RNA editing. *Methods Enzymol*, 424 265-287.
- Jin Y., Tian N., Cao J., Liang J., Yang Z. and Lv J.**, 2007. RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evol Biol*, 7 98.
- Johansen F. F., Lambolez B., Audinat E., Bochet P. and Rossier J.**, 1995. Single cell RT-PCR proceeds without the risk of genomic DNA amplification. *Neurochem Int*, 26 (3): 239-243.
- Johnson D., Montpetit M. L., Stocker P. J. and Bennett E. S.**, 2004. The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J Biol Chem*, 279 (43): 44303-44310.
- Jones A. K., Buckingham S. D., Papadaki M., Yokota M., Sattelle B. M., Matsuda K. and Sattelle D. B.**, 2009. Splice-variant- and stage-specific RNA editing of the Drosophila GABA receptor modulates agonist potency. *J Neurosci*, 29 (13): 4287-4292.
- Kall L., Krogh A. and Sonnhammer E. L.**, 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338 (5): 1027-1036.
- Kayano T., Noda M., Flockerzi V., Takahashi H. and Numa S.**, 1988. Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett*, 228 (1): 187-194.

- Kazen-Gillespie K. A., Ragsdale D. S., D'Andrea M. R., Mattei L. N., Rogers K. E. and Isom L. L.**, 2000. Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J Biol Chem*, 275 (2): 1079-1088.
- Keegan L. P., Brindle J., Gallo A., Leroy A., Reenan R. A. and O'Connell M. A.**, 2005. Tuning of RNA editing by ADAR is required in *Drosophila*. *Embo J*, 24 (12): 2183-2193.
- Keegan L. P., Leroy A., Sproul D. and O'Connell M. A.**, 2004. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biol*, 5 (2): 209.
- Keller H., Schu B., Rudel R. and Brinkmeier H.**, 2000. Cellular uptake and efficacy of antisense oligonucleotides against RNAs of two Na(+) channel isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 295 (1): 367-372.
- Kemp B. E. and Pearson R. B.**, 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci*, 15 (9): 342-346.
- Kloppenborg P., Kirchoff B. S. and Mercer A. R.**, 1999. Voltage-activated currents from adult honeybee (*Apis mellifera*) antennal motor neurons recorded in vitro and in situ. *J Neurophysiol*, 81 (1): 39-48.
- Kloppenborg P. and M H. O.**, 1998. Voltage-activated currents in identified giant interneurons isolated from adult crickets *gryllus bimaculatus*. *J Exp Biol*, 201 (Pt 17) 2529-2541.
- Kondratyuk T. and Rossie S.**, 1997. Depolarization of rat brain synaptosomes increases phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels. *J Biol Chem*, 272 (27): 16978-16983.
- Kontis K. J., Rounaghi A. and Goldin A. L.**, 1997. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J Gen Physiol*, 110 (4): 391-401.
- Kulkarni S. J. and Padhye A.**, 1982. Temperature-sensitive paralytic mutations on the second and third chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 40 191-199.
- Kumar M. and Carmichael G. G.**, 1997. Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8): 3542-3547.
- Kyte J. and Doolittle R. F.**, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157 (1): 105-132.
- Lai H. C. and Jan L. Y.**, 2006. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 7 (7): 548-562.
- Lambolez B., Audinat E., Bochet P., Crepel F. and Rossier J.**, 1992. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*, 9 (2): 247-258.
- Lapied B., Grolleau F. and Sattelle D. B.**, 2001. Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol*, 132 (2): 587-595.
- Lapied B., Malecot C. O. and Pelhate M.**, 1989. Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.*, 144 535-549.
- Lapied B., Malecot C. O. and Pelhate M.**, 1990. Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J. Exp. Biol.*, 151 387-403.
- Lapied B., Stankiewicz M., Grolleau F. and Pelhate M.**, 1997. Background sodium channels are necessary for maintenance of beating pacemaker activity in insect neurosecretory cells. 27P.
- Lapied B., Stankiewicz M., Grolleau F., Rochat H., Zlotkin E. and Pelhate M.**, 1999. Biophysical properties of scorpion alpha-toxin-sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci*, 11 (4): 1449-1460.
- Lapied B., Tribut F., Sinakevitch I., Hue B. and Beadle D. J.**, 1993. Neurite regeneration of long-term cultured adult insect neurosecretory cells identified as DUM neurons. *Tissue Cell*, 25 (6): 893-906.
- Lareau L. F., Green R. E., Bhatnagar R. S. and Brenner S. E.**, 2004. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol*, 14 (3): 273-282.

- Laurencikiene J., Kallman A. M., Fong N., Bentley D. L. and Ohman M.**, 2006. RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO Rep*, 7 (3): 303-307.
- Laurent S., Masson C. and Jakob I.**, 2002. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons: ionic currents, membrane excitability and odourant response in developing workerbee and drone. *Eur J Neurosci*, 15 (7): 1139-1152.
- Lavialle-Defaix C., Gautier H., Defaix A., Lapied B. and Grolleau F.**, 2006. Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol*, 96 (5): 2437-2450.
- Lee D. and Adams M. E.**, 2000a. Sodium channels in central neurons of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*: basic properties and modification by scorpion toxins. *J Insect Physiol*, 46 (4): 499-508.
- Lee S. H., Dunn J. B., Clark J. M. and Soderlund D. M.**, 1999. Molecular analysis of kdr-like resistance in a permethrin-resistant strain of colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63 63-75.
- Lee S. H., Gao J. R., Yoon K. S., Mumcuoglu K. Y., Taplin D., Edman J. D., Takano-Lee M. and J. M. C.**, 2003. Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pest Biochem Physiol*, 75 79-91.
- Lee S. H., Ingles P. J., Knipple D. C. and Soderlund D. M.**, 2002. Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *Vssc1* sodium channel gene. *Invert Neurosci*, 4 (3): 125-133.
- Lee S. H., Smith T. J., Ingles P. J. and Soderlund D. M.**, 2000b. Cloning and functional characterization of a putative sodium channel auxiliary subunit gene from the house fly (*Musca domestica*). *Insect Biochem Mol Biol*, 30 (6): 479-487.
- Lee S. H. and Soderlund D. M.**, 2009. Cloning and maintenance of the housefly sodium channel gene using low copy number vector and two sequential host strains. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12 51-53.
- Letunic I., Copley R. R. and Bork P.**, 2002. Common exon duplication in animals and its role in alternative splicing. *Hum Mol Genet*, 11 (13): 1561-1567.
- Li M., West J. W., Lai Y., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1992. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron*, 8 (6): 1151-1159.
- Li M., West J. W., Numann R., Murphy B. J., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1993. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science*, 261 (5127): 1439-1442.
- Li Q., Lee J. A. and Black D. L.**, 2007. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci*, 8 (11): 819-831.
- Lin W. H., Wright D. E., Muraro N. I. and Baines R. A.**, 2009. Alternative splicing in the voltage-gated sodium channel *DmNav* regulates activation, inactivation and persistent current. *J Neurophysiol*,
- Lindia J. A., Kohler M. G., Martin W. J. and Abbadie C.**, 2005. Relationship between sodium channel *Nav1.3* expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain*, 117 (1-2): 145-153.
- Lipkind G. M. and Fozzard H. A.**, 2008. Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. *J Gen Physiol*, 131 (6): 523-529.
- Liss B. and Roeper J.**, 2004. Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons. *Trends Neurosci*, 27 (8): 475-481.
- Liu Z., Chung I. and Dong K.**, 2001. Alternative splicing of the *BSC1* gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*, 31 (6-7): 703-713.
- Liu Z., Song W. and Dong K.**, 2004. Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from U-to-C RNA editing of an insect sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (32): 11862-11867.
- Lopez A. J.**, 1998. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet*, 32 279-305.

- Lopreato G. F., Lu Y., Southwell A., Atkinson N. S., Hillis D. M., Wilcox T. P. and Zakon H. H.**, 2001. Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (13): 7588-7592.
- Loughney K., Kreber R. and Ganetzky B.**, 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, 58 (6): 1143-1154.
- Lucas P. and Shimahara T.**, 2002. Voltage- and calcium-activated currents in cultured olfactory receptor neurons of male *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chem Senses*, 27 (7): 599-610.
- Makita N., Bennett P. B. and George A. L., Jr.**, 1996. Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J Neurosci*, 16 (22): 7117-7127.
- Matsuda K., Ozoe Y. and Sattelle D. B.**, 2007. Molecular pharmacology of insect ion channels and implications for insect toxicology. *Invert Neurosci*, 7 (1): 1-2.
- McCormick K. A., Srinivasan J., White K., Scheuer T. and Catterall W. A.**, 1999. The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem*, 274 (46): 32638-32646.
- Mechaly I., Scamps F., Chabbert C., Sans A. and Valmier J.**, 2005. Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha subunits expressed in neuronal and non-neuronal excitable cells. *Neuroscience*, 130 (2): 389-396.
- Mee C. J., Pym E. C., Moffat K. G. and Baines R. A.**, 2004. Regulation of neuronal excitability through pumilio-dependent control of a sodium channel gene. *J Neurosci*, 24 (40): 8695-8703.
- Megy K., Hammond M., Lawson D., Bruggner R. V., Birney E. and Collins F. H.**, 2009. Genomic resources for invertebrate vectors of human pathogens, and the role of VectorBase. *Infect Genet Evol*, 9 (3): 308-313.
- Mercer A. R. and Hildebrand J. G.**, 2002. Developmental changes in the density of ionic currents in antennal-lobe neurons of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Neurophysiol*, 87 (6): 2664-2675.
- Monyer H. and Lambolez B.**, 1995. Molecular biology and physiology at the single-cell level. *Curr Opin Neurobiol*, 5 (3): 382-387.
- Morgan K., Stevens E. B., Shah B., Cox P. J., Dixon A. K., Lee K., Pinnock R. D., Hughes J., Richardson P. J., Mizuguchi K. and Jackson A. P.**, 2000. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (5): 2308-2313.
- Morin S., Williamson M. S., Goodson S. J., Brown J. K., Tabashnik B. E. and Dennehy T. J.**, 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol*, 32 (12): 1781-1791.
- Mount S. M., Burks C., Hertz G., Stormo G. D., White O. and Fields C.**, 1992. Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res*, 20 (16): 4255-4262.
- Mullis K. B.**, 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262 (4): 56-61, 64-55.
- Muraro N. I., Weston A. J., Gerber A. P., Luschnig S., Moffat K. G. and Baines R. A.**, 2008. Pumilio binds para mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons. *J Neurosci*, 28 (9): 2099-2109.
- Murphy B. J. and Catterall W. A.**, 1992. Phosphorylation of purified rat brain Na⁺ channel reconstituted into phospholipid vesicles by protein kinase C. *J Biol Chem*, 267 (23): 16129-16134.
- Murphy B. J., Rossie S., De Jongh K. S. and Catterall W. A.**, 1993. Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem*, 268 (36): 27355-27362.
- Myers K. J. and Dean N. M.**, 2000. Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *Trends Pharmacol Sci*, 21 (1): 19-23.

- Narahashi T.**, 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther*, 294 (1): 1-26.
- Nash H. A., Scott R. L., Lear B. C. and Allada R.**, 2002. An unusual cation channel mediates photic control of locomotion in *Drosophila*. *Curr Biol*, 12 (24): 2152-2158.
- Nassel D. R.**, 1996. Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Prog Neurobiol*, 48 (4-5): 325-420.
- Nicholson G. M.**, 2007. Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49 (4): 413-422.
- Niven J. E., Graham C. M. and Burrows M.**, 2008. Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annu Rev Entomol*, 53 253-271.
- Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takeshima H., Kurasaki M., Takahashi H. and Numa S.**, 1986. Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature*, 320 (6058): 188-192.
- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N. and et al.**, 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312 (5990): 121-127.
- Noda M., Suzuki H., Numa S. and Stuhmer W.**, 1989. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett*, 259 (1): 213-216.
- Novak A. E., Jost M. C., Lu Y., Taylor A. D., Zakon H. H. and Ribera A. B.**, 2006. Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. *J Mol Evol*, 63 (2): 208-221.
- Numann R., Catterall W. A. and Scheuer T.**, 1991. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science*, 254 (5028): 115-118.
- O'Dowd D. K.**, 1995. Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. *J Neurobiol*, 27 (1): 113-126.
- O'Dowd D. K. and Aldrich R. W.**, 1988. Voltage-clamp analysis of sodium channels in wild-type and mutant *Drosophila* neurons. *J Neurosci*, 8 (10): 3633-3643.
- O'Dowd D. K., Gee J. R. and Smith M. A.**, 1995. Sodium current density correlates with expression of specific alternatively spliced sodium channel mRNAs in single neurons. *J Neurosci*, 15 (5 Pt 2): 4005-4012.
- O'Dowd D. K., Germeraad S. E. and Aldrich R. W.**, 1989. Alterations in the expression and gating of *Drosophila* sodium channels by mutations in the para gene. *Neuron*, 2 (4): 1301-1311.
- O'Reilly A. O., Khambay B. P., Williamson M. S., Field L. M., Wallace B. A. and Davies T. G.**, 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem J*, 396 (2): 255-263.
- Odegaard F.**, 2000. How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71 583-597.
- Oerke E. C. and Dehne H. W.**, 2004. Safeguarding production - losses in the major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23 275-285.
- Ogata N. and Ohishi Y.**, 2002. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na channels. *Jpn.J.Pharmacol.*, 88 365-377.
- Okamura Y., Nishino A., Murata Y., Nakajo K., Iwasaki H., Ohtsuka Y., Tanaka-Kunishima M., Takahashi N., Hara Y., Yoshida T., Nishida M., Okado H., Watari H., Meinertzhagen I. A., Satoh N., Takahashi K., Satou Y., Okada Y. and Mori Y.**, 2005. Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol Genomics*, 22 (3): 269-282.
- Olson R. O., Liu Z., Nomura Y., Song W. and Dong K.**, 2008. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38 (5): 604-610.
- Page R. D.**, 2002. Visualizing phylogenetic trees using TreeView. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 6 Unit 6 2.

- Palladino M. J., Keegan L. P., O'Connell M. A. and Reenan R. A.**, 2000a. dADAR, a *Drosophila* double-stranded RNA-specific adenosine deaminase is highly developmentally regulated and is itself a target for RNA editing. *Rna*, 6 (7): 1004-1018.
- Palladino M. J., Keegan L. P., O'Connell M. A. and Reenan R. A.**, 2000b. A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell*, 102 (4): 437-449.
- Park D., Coleman M. J., Hodge J. J., Budnik V. and Griffith L. C.**, 2002. Regulation of neuronal excitability in *Drosophila* by constitutively active CaMKII. *J Neurobiol*, 52 (1): 24-42.
- Park J. W., Parisky K., Celotto A. M., Reenan R. A. and Graveley B. R.**, 2004. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (45): 15974-15979.
- Park Y., Taylor M. F. and Feyereisen R.**, 1999. Voltage-gated sodium channel genes *hscp* and *hDSC1* of *Heliothis virescens* F. genomic organization. *Insect Mol Biol*, 8 (2): 161-170.
- Peixoto A. A., Smith L. A. and Hall J. C.**, 1997. Genomic organization and evolution of alternative exons in a *Drosophila* calcium channel gene. *Genetics*, 145 (4): 1003-1013.
- Peterson R. T., Nass R., Boyd W. A., Freedman J. H., Dong K. and Narahashi T.**, 2008. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*, 29 (3): 546-555.
- Pichon C., Roufai M. B., Monsigny M. and Midoux P.**, 2000. Histidylated oligolysines increase the transmembrane passage and the biological activity of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 28 (2): 504-512.
- Pineda R. H., Svoboda K. R., Wright M. A., Taylor A. D., Novak A. E., Gamse J. T., Eisen J. S. and Ribera A. B.**, 2006. Knockdown of Nav1.6a Na⁺ channels affects zebrafish motoneuron development. *Development*, 133 (19): 3827-3836.
- Plummer N. W., McBurney M. W. and Meisler M. H.**, 1997. Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *J Biol Chem*, 272 (38): 24008-24015.
- Plummer N. W. and Meisler M. H.**, 1999. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics*, 57 (2): 323-331.
- Posada D. and Crandall K. A.**, 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.
- Pradhan P., Ghose R. and Green M. E.**, 2005. Voltage gating and anions, especially phosphate: a model system. *Biochim Biophys Acta*, 1717 (2): 97-103.
- Qu Y., Curtis R., Lawson D., Gilbride K., Ge P., DiStefano P. S., Silos-Santiago I., Catterall W. A. and Scheuer T.**, 2001. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci*, 18 (5): 570-580.
- Ramaswami M. and Tanouye M. A.**, 1989. Two sodium-channel genes in *Drosophila*: implications for channel diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (6): 2079-2082.
- Rappolee D. A., Wang A., Mark D. and Werb Z.**, 1989. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem*, 39 (1): 1-11.
- Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B. M., Rauh J. J. and Sattelle D. B.**, 2005. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci*, 5 (3-4): 119-133.
- Raymond C. K., Castle J., Garrett-Engle P., Armour C. D., Kan Z., Tsinoremas N. and Johnson J. M.**, 2004. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *J Biol Chem*, 279 (44): 46234-46241.
- Reenan R. A.**, 2005. Molecular determinants and guided evolution of species-specific RNA editing. *Nature*, 434 (7031): 409-413.
- Reenan R. A., Hanrahan C. J. and Ganetzky B.**, 2000. The *mle*(*napts*) RNA helicase mutation in *Drosophila* results in a splicing catastrophe of the para Na⁺ channel transcript in a region of RNA editing. *Neuron*, 25 (1): 139-149.
- Ritchie J. M.**, 1988. Sodium-channel turnover in rabbit cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 233 (1273): 423-430.

- Rossie S. and Catterall W. A.**, 1987. Cyclic-AMP-dependent phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels in primary cultures of rat brain neurons. *J Biol Chem*, 262 (26): 12735-12744.
- Rueter S. M., Dawson T. R. and Emeson R. B.**, 1999. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*, 399 (6731): 75-80.
- Rugiero F., Mistry M., Sage D., Black J. A., Waxman S. G., Crest M., Clerc N., Delmas P. and Gola M.**, 2003. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and Nav1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *J Neurosci*, 23 (7): 2715-2725.
- Salgado V. L. and Hayashi J. H.**, 2007. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. *Vet Parasitol*, 150 (3): 182-189.
- Salkoff L., Butler A., Wei A., Scavarda N., Giffen K., Ifune C., Goodman R. and Mandel G.**, 1987. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science*, 237 (4816): 744-749.
- Sarao R., Gupta S. K., Auld V. J. and Dunn R. J.**, 1991. Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 19 (20): 5673-5679.
- Satin J., Kyle J. W., Chen M., Bell P., Cribbs L. L., Fozzard H. A. and Rogart R. B.**, 1992. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, 256 (5060): 1202-1205.
- Sattelle D. B., Jones A. K., Sattelle B. M., Matsuda K., Reenan R. and Biggin P. C.**, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 27 (4): 366-376.
- Savalli N., Kondratiev A., de Quintana S. B., Toro L. and Olcese R.**, 2007. Modes of operation of the BKCa channel beta2 subunit. *J Gen Physiol*, 130 (1): 117-131.
- Schafer S., Rosenboom H. and Menzel R.**, 1994. Ionic currents of Kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. *J Neurosci*, 14 (8): 4600-4612.
- Schaller K. L., Krzemien D. M., McKenna N. M. and Caldwell J. H.**, 1992. Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *J Neurosci*, 12 (4): 1370-1381.
- Scheuer T. and Catterall W. A.**, 2006. Control of neuronal excitability by phosphorylation and dephosphorylation of sodium channels. *Biochem Soc Trans*, 34 (Pt 6): 1299-1302.
- Schiffmann S. N., Lledo P. M. and Vincent J. D.**, 1995. Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J Physiol*, 483 (Pt 1) 95-107.
- Schoft V. K., Schopoff S. and Jantsch M. F.**, 2007. Regulation of glutamate receptor B pre-mRNA splicing by RNA editing. *Nucleic Acids Res*, 35 (11): 3723-3732.
- Seeburg P. H.**, 2000. RNA helicase participates in the editing game. *Neuron*, 25 (2): 261-263.
- Sha Q., Robinson S. W., McCulle S. L., Shorofsky S. R., Welling P. A., Goldman L. and Balke C. W.**, 2003. An antisense oligonucleotide against H1 inhibits the classical sodium current but not I_{Ca}(TTX) in rat ventricular cells. *J Physiol*, 547 (Pt 2): 435-440.
- Shafer T. J., Meyer D. A. and Crofton K. M.**, 2005. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environmental Health Perspectives*, 113 (2): 123-136.
- Shang L. L. and Dudley S. C., Jr.**, 2005. Tandem promoters and developmentally regulated 5'- and 3'-mRNA untranslated regions of the mouse Scn5a cardiac sodium channel. *J Biol Chem*, 280 (2): 933-940.
- Shao D., Okuse K. and Djamgoz M. B.**, 2009a. Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression. *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (7): 1471-1481.
- Shao Y. M., Dong K., Tang Z. H. and Zhang C. X.**, 2009b. Molecular characterization of a sodium channel gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 39 (2): 145-151.
- Silver K. and Soderlund D. M.**, 2005. State-dependent block of rat Nav1.4 sodium channels expressed in *xenopus* oocytes by pyrazoline-type insecticides. *Neurotoxicology*, 26 (3): 397-406.

- Silver K. S., Nomura Y., Salgado V. L. and Dong K.**, 2009. Role of the sixth transmembrane segment of domain IV of the cockroach sodium channel in the action of sodium channel blocker insecticides. *Neurotoxicology*, 30 (4): 613-621.
- Silver K. S. and Soderlund D. M.**, 2007. Point mutations at the local anesthetic receptor site modulate the state-dependent block of rat Na v1.4 sodium channels by pyrazoline-type insecticides. *Neurotoxicology*, 28 (3): 655-663.
- Sinakevitch I. G., Geffard M., Pelhate M. and Lapied B.**, 1994. Octopamine-like immunoreactivity in the dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the accessory gland of the male cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res*, 276 15-21.
- Sinakevitch I. G., Geffard M., Pelhate M. and Lapied B.**, 1996. Anatomy and targets of Dorsal Unpaired Median neurones in the Terminal Abdominal Ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol*, 367 (1): 147-163.
- Sinakevitch I. I., Geffard M., Pelhate M. and Lapied B.**, 1995. Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol*, 198 (Pt 7): 1539-1544.
- Smith C. W. J. and Valcarel J.**, 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*, 25 (8): 381-388.
- Smith L. A., Peixoto A. A., Kramer E. M., Villella A. and Hall J. C.**, 1998. Courtship and visual defects of cacophony mutants reveal functional complexity of a calcium-channel alpha1 subunit in *Drosophila*. *Genetics*, 149 (3): 1407-1426.
- Smith L. A., Wang X., Peixoto A. A., Neumann E. K., Hall L. M. and Hall J. C.**, 1996a. A *Drosophila* calcium channel alpha1 subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. *J Neurosci*, 16 (24): 7868-7879.
- Smith R. D. and Goldin A. L.**, 1996b. Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci*, 16 (6): 1965-1974.
- Smith R. D. and Goldin A. L.**, 1997a. Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci*, 17 (16): 6086-6093.
- Smith T. J., Lee S. H., Ingles P. J., Knipple D. C. and Soderlund D. M.**, 1997b. The L1014F point mutation in the house fly *Vssc1* sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol*, 27 (10): 807-812.
- Song J. and Tanouye M.**, 2007. Role for para sodium channel gene 3' UTR in the modification of *Drosophila* seizure susceptibility. *Dev Neurobiol*, 67 (14): 1944-1956.
- Song W., Liu Z. and Dong K.**, 2006. Molecular basis of differential sensitivity of insect sodium channels to DCJW, a bioactive metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb. *Neurotoxicology*, 27 (2): 237-244.
- Song W., Liu Z., Tan J., Nomura Y. and Dong K.**, 2004. RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *J Biol Chem*, 279 (31): 32554-32561.
- Sonoda S., Igaki C., Ashfaq M. and Tsumuki H.**, 2006. Pyrethroid-resistant diamondback moth expresses alternatively spliced sodium channel transcripts with and without T929I mutation. *Insect Biochem Mol Biol*, 36 (12): 904-910.
- Sonoda S., Igaki C. and Tsumuki H.**, 2008a. Alternatively spliced sodium channel transcripts expressed in field strains of the diamondback moth. *Insect Biochem Mol Biol*, 38 (9): 883-890.
- Sonoda S., Tsukahara Y., Ashfaq M. and Tsumuki H.**, 2008b. Genomic organization of the para-sodium channel alpha-subunit genes from the pyrethroid-resistant and -susceptible strains of the diamondback moth. *Arch Insect Biochem Physiol*, 69 (1): 1-12.
- Soong T. W. and Venkatesh B.**, 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. *Trends Genet*, 22 (11): 621-626.
- Strege P. R., Ou Y., Sha L., Rich A., Gibbons S. J., Szurszewski J. H., Sarr M. G. and Farrugia G.**, 2003. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285 (6): G1111-1121.
- Strong M., Chandy K. G. and Gutman G. A.**, 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol*, 10 (1): 221-242.

- Stuhmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X. D., Noda M., Yahagi N., Kubo H. and Numa S.,** 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339 (6226): 597-603.
- Sucher N. J. and Deitcher D. L.,** 1995. PCR and patch-clamp analysis of single neurons. *Neuron*, 14 (6): 1095-1100.
- Sucher N. J., Deitcher D. L., Baro D. J., Warrick R. M. and Guenther E.,** 2000. Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single-cell RT-PCR. *Cell Tissue Res*, 302 (3): 295-307.
- Surmeier D. J. and Kitai S. T.,** 1993. D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res*, 99 309-324.
- Sutcliffe J. G. and Milner R. J.,** 1988. Alternative mRNA splicing: the Shaker gene. *Trends Genet*, 4 (11): 297-299.
- Suzuki D. T., Grigliatti T. and Williamson R.,** 1971. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. VII. A mutation (para-ts) causing reversible adult paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (5): 890-893.
733
- Takagi K., Hamaguchi H., Nishimatsu T. and Konno T.,** 2007. Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. *Vet Parasitol*, 150 (3): 177-181.
- Tan J., Liu Z., Nomura Y., Goldin A. L. and Dong K.,** 2002a. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *J Neurosci*, 22 (13): 5300-5309.
- Tan J., Liu Z., Tsai T. D., Valles S. M., Goldin A. L. and Dong K.,** 2002b. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. *Insect Biochem Mol Biol*, 32 (4): 445-454.
- Tasken K. and Aandahl E. M.,** 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84 (1): 137-167.
- Terlau H., Heinemann S. H., Stuhmer W., Pusch M., Conti F., Imoto K. and Numa S.,** 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett*, 293 (1-2): 93-96.
- Testud F., Grillet J. P. and Nisse C.,** 2008. Effets des produits phytosanitaires chez les agriculteurs, quels risques à long terme? *Le concours médical*, 130 (672-676):
- Thackeray J. R. and Ganetzky B.,** 1994. Developmentally regulated alternative splicing generates a complex array of *Drosophila* para sodium channel isoforms. *J Neurosci*, 14 (5 Pt 1): 2569-2578.
- Thackeray J. R. and Ganetzky B.,** 1995. Conserved alternative splicing patterns and splicing signals in the *Drosophila* sodium channel gene para. *Genetics*, 141 (1): 203-214.
- Thimmapaya R., Neelands T., Niforatos W., Davis-Taber R. A., Choi W., Putman C. B., Kroeger P. E., Packer J., Gopalakrishnan M., Faltynek C. R., Surowy C. S. and Scott V. E.,** 2005. Distribution and functional characterization of human Nav1.3 splice variants. *Eur J Neurosci*, 22 (1): 1-9.
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J.,** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22 (22): 4673-4680.
- Tibbs V. C., Gray P. C., Catterall W. A. and Murphy B. J.,** 1998. AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain sodium channels. *J Biol Chem*, 273 (40): 25783-25788.
- Tombola F., Pathak M. M. and Isacoff E. Y.,** 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22 23-52.
- Tomita T., Yaguchi N., Mihara M., Takahashi M., Agui N. and Kasai S.,** 2003. Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol*, 40 (4): 468-474.
- Tribut F., Lapied B., Duval A. and M. P.,** 1991. A neosynthesis of sodium channels is involved in the evolution of the sodium current in isolated adult DUM neurons. *Pflugers Arch.*, 419 665-667.

- Tseng T. T., McMahon A. M., Johnson V. T., Mangubat E. Z., Zahm R. J., Pacold M. E. and Jakobsson E.**, 2007. Sodium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 12 (3-4): 249-262.
- Tsushima R. G., Li R. A. and Backx P. H.**, 1997. Altered ionic selectivity of the sodium channel revealed by cysteine mutations within the pore. *J Gen Physiol*, 109 (4): 463-475.
- Ulbricht W.**, 2005. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev*, 85 (4): 1271-1301.
- Vais H., Atkinson S., Pluteanu F., Goodson S. J., Devonshire A. L., Williamson M. S. and Usherwood P. N.**, 2003. Mutations of the para sodium channel of *Drosophila melanogaster* identify putative binding sites for pyrethroids. *Mol Pharmacol*, 64 (4): 914-922.
- Vais H., Williamson M. S., Goodson S. J., Devonshire A. L., Warmke J. W., Usherwood P. N. and Cohen C. J.**, 2000. Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J Gen Physiol*, 115 (3): 305-318.
- Vignali S., Leiss V., Karl R., Hofmann F. and Welling A.**, 2006. Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J Physiol*, 572 (Pt 3): 691-706.
- Vijayaragavan K., Boutjdir M. and Chahine M.**, 2004. Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol*, 91 (4): 1556-1569.
- Wang R., Huang Z. Y. and Dong K.**, 2003a. Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*). *Insect Biochem Mol Biol*, 33 (7): 733-739.
- Wang S. Y. and Wang G. K.**, 2003b. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal*, 15 (2): 151-159.
- Wang Z. and Burge C. B.**, 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna*, 14 (5): 802-813.
- Warmke J. W., Reenan R. A., Wang P., Qian S., Arena J. P., Wang J., Wunderler D., Liu K., Kaczorowski G. J., Van der Ploeg L. H., Ganetzky B. and Cohen C. J.**, 1997. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J Gen Physiol*, 110 (2): 119-133.
- Watanabe E., Hiyama T. Y., Kodama R. and Noda M.**, 2002. NaX sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci Lett*, 330 (1): 109-113.
- West J. W., Patton D. E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A. L. and Catterall W. A.**, 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (22): 10910-10914.
- Wicher D.**, 2001. Peptidergic modulation of an insect Na(+) current: role of protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol*, 85 (1): 374-383.
- Wicher D., Agricola H. J., Sohler S., Gundel M., Heinemann S. H., Wollweber L., Stengl M. and Derst C.**, 2006. Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. *J Neurophysiol*, 95 (4): 2314-2325.
- Wicher D., Derst C., Gautier H., Lapied B., Heinemann S. H. and Agricola H. J.**, 2007. The satiety signaling neuropeptide perisulfakinin inhibits the activity of central neurons promoting general activity. *Front Cell Neurosci*, 1 3.
- Wicher D., Walther C. and Wicher C.**, 2001. Non-synaptic ion channels in insects - basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol*, 64 (5): 431-525.
- Williamson M. S., Martinez-Torres D., Hick C. A. and Devonshire A. L.**, 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet*, 252 (1-2): 51-60.
- Wing K. D., Sacher M., Kagaya Y., Tsurubuchi Y., Mulderig L., Connair M. and Schnee M.**, 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Protection*, 19 537-545.

- Wing K. D., Schnee M.E., Sacher M and M. C.**, 1998. A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37 (1): 91 - 103.
- Wu C. F., Ganetzky B., Jan L. Y., Jan Y. N. and Benzer S.**, 1978. A *Drosophila* mutant with a temperature-sensitive block in nerve conduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (8): 4047-4051.
- Wustenberg D. G., Boytcheva M., Grunewald B., Byrne J. H., Menzel R. and Baxter D. A.**, 2004. Current- and voltage-clamp recordings and computer simulations of Kenyon cells in the honeybee. *J Neurophysiol*, 92 (4): 2589-2603.
- Xie J. and McCobb D. P.**, 1998. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science*, 280 (5362): 443-446.
- Yamaoka K. and Ikeda K.**, 1988. Electrogenic responses elicited by transmembrane depolarizing current in aerated body wall muscles of *Drosophila melanogaster* larvae. *J Comp Physiol A*, 163 (6): 705-714.
- Yang P., Kupersmidt S. and Roden D. M.**, 2004. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res*, 61 (1): 56-65.
- Yoon K. S., Kwon D. H., Strycharz J. P., Hollingsworth C. S., Lee S. H. and Clark J. M.**, 2008. Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol*, 45 (6): 1092-1101.
- Yu F. H. and Catterall W. A.**, 2003a. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*, 4 (3): 207.
- Yu F. H., Westenbroek R. E., Silos-Santiago I., McCormick K. A., Lawson D., Ge P., Ferriera H., Lilly J., DiStefano P. S., Catterall W. A., Scheuer T. and Curtis R.**, 2003b. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci*, 23 (20): 7577-7585.
- Yu F. H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G. A. and Catterall W. A.**, 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57 (4): 387-395.
- Zhao X., Ikeda T., Salgado V. L., Yeh J. Z. and Narahashi T.**, 2005. Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neurotoxicology*, 26 (3): 455-465.
- Zhou W., Chung I., Liu Z., Goldin A. L. and Dong K.**, 2004. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron*, 42 (1): 101-112.
- Zhu J., Shendure J., Mitra R. D. and Church G. M.**, 2003. Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing. *Science*, 301 (5634): 836-838.
- Zimmer T. and Benndorf K.**, 2002a. The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. *J Gen Physiol*, 120 (6): 887-895.
- Zimmer T., Biskup C., Bollensdorff C. and Benndorf K.**, 2002b. The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol*, 186 (1): 13-21.
- Zufall F., Stengl M., Franke C., Hildebrand J. G. and Hatt H.**, 1991. Ionic currents of cultured olfactory receptor neurons from antennae of male *Manduca sexta*. *J Neurosci*, 11 (4): 956-965.
- Zuo X. P., He H. Q., He M., Liu Z. R., Xu Q., Ye J. G. and Ji Y. H.**, 2006. Comparative pharmacology and cloning of two novel arachnid sodium channels: Exploring the adaptive insensitivity of scorpion to its toxins. *FEBS Lett*, 580 (18): 4508-4514.

ANNEXES - PUBLICATIONS

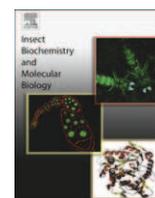
PUBLICATION N°1

**Article publié dans le journal
Insect Biochemistry and Molecular Biology**



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: Evidence for an early duplication of the *para-like* gene

Bénédicte Moignot^a, Christophe Lemaire^b, Sophie Quincharde^a, Bruno Lapied^a, Christian Legros^{a,*}^aLaboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France^bUMR Pathologie v g tale, biodiversité, écologie, interactions, bioagresseurs-plantes (Pave), INRA, IFR 149 QUASAV, 42 rue Georges Morel, BP 57, 49071 Beauco z  cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2009

Received in revised form

23 September 2009

Accepted 24 September 2009

Keywords:

Ion channels

Insect

Molecular cloning

Phylogeny

Sodium channels

ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels (Na_v channels) belong to a superfamily of ion channels which play an essential role in membrane excitability. Only one gene encoding Na_v channels has been characterized so far in insects. Here, we have cloned one full-length cDNA encoding a conventional insect Na_v channel (PaNa_v1) and two full-length cDNAs encoding putative insect Na_v channels (PaFPC1 and PaFPC2) in *Periplaneta americana*, a model insect for neurophysiological studies. The ORFs of PaFPC1 and PaFPC2 contained 4662 bp and encoded 1553 amino acid residues, and the ORF of PaNa_v1 contained 6153 bp and encoded 2051 amino acid residues. PaFPC1 and PaFPC2 are two isoforms, which differ by eight single amino acid substitutions. PaFPC1 shares 37.5–55% protein identities with known insect Na_v channels, while PaNa_v1 shares 70–97.5% protein identities with these latter. Both PaFPC1 and PaFPC2 possess the molecular hallmarks of Na_v channels except the motif involved in fast inactivation. Contrary to PaNa_v1 transcripts which are expressed mainly in the central nervous system, those ones of PaFPC are also expressed in non-neuronal tissues (muscles, gut and mushroom-shaped accessory glands). A detailed phylogenetic analysis confirmed that PaNa_v1 and PaFPC are evolutionarily closely related to insect Na_v channel genes.

  2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Voltage-dependant sodium channels belong to a superfamily of voltage-gated ion channels (VGICs) consisting in heteromultimeric glycoproteins formed by the association of a pore-forming subunit (α -subunit) and one or several regulatory subunit(s) (Yu et al., 2005). Na_v channels are members of the four-P domain channel (FPC) family, in which the α -subunit genes encode a polypeptide with four homologous P domains repeated in tandem (DI–DIV). Each P domain contains six transmembrane segments (S1–S6) and a membrane-inserted hairpin-like P loops between helices S5 and S6 containing the ionic selectivity filter (Maelicke, 1988; Zhorov and Tikhonov, 2004). S4 segments are positively charged and act as the sensor for the voltage sensitivity of the channels due to their positive charges (Noda et al., 1984). Additionally to Na_v channels, three other FPC subfamilies are distinguished including voltage-gated

Abbreviations: BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 41 73 50 67; fax: +33 2 41 73 52 15.

E-mail address: christian.legros@univ-angers.fr (C. Legros).

0965-1748/\$ – see front matter   2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ibmb.2009.09.006

calcium channels (Ca_v), *Drosophila* sodium channel (DSC1) homologs and Na⁺ leak channel (NALCN) homologs. DSC1 has been firstly described in *Drosophila melanogaster* and its homologous channels have been found exclusively in insect orders (Liu et al., 2001; Park et al., 1999; Salkoff et al., 1987). The DSC1-orthologous gene *BSCI* of *Blattella germanica* has been characterized as a voltage-gated channel permeable to both Na⁺ and Ca²⁺ (Zhou et al., 2004). The fourth subfamily comprises genes encoding proteins homologous to NALCN channels (Snutch and Monteil, 2007). Despite NALCN is highly homologous to Na_v and Ca_v channels, it is voltage-insensitive and was proposed to be a sodium leak channel (Lu et al., 2007). Homologs of this protein were also described in *Caenorhabditis elegans* (*nca1* and *nca21*) and in *D. melanogaster* (*Dm1 1U/CG1517*) genome (Nash et al., 2002; Yeh et al., 2008).

It is widely accepted that Na_v channel genes diverged from a primordial Ca_v channel gene (Strong et al., 1993). Due to the selectivity to both Na⁺ and Ca²⁺ ions, the subfamilies of the DCSI are proposed to be the descendants of the primordial Ca_v channel genes (Zhou et al., 2004). On a functional point of view, Ca_v channels have contributed to the ability of eukaryotes to use intracellular free calcium as a signalling process. The successive evolution of Na_v channels have made fast transmission of the nervous message

possible in animals (Hille, 2001, 1989). As a consequence, Na_v channels are the most recent channels of the VGICs family (Goldin, 2002).

In mammals, nine genes (*Na_v1* to *Na_v9*) and a tenth one *Na_x* encode different Na_v channels isoforms (Catterall et al., 2005). A multigenic family has also been characterized in some invertebrate species such as *Hirudo medicinalis* (leech) and *Holocynthia roretzi* (ascidia) with four and two characterized genes, respectively (Blackshaw et al., 2003; Nagahora et al., 2000; Okamura et al., 1994). In insect sequenced genomes, only one confirmed Na_v channel gene related to the *para* gene of *D. melanogaster* encoding DmNa_v1 has been identified (Shao et al., 2009). The heterologous expression of DmNa_v1 and its orthologs (MdNa_v1 of *Musca domestica*, BgNa_v1 of *B. germanica*) in *Xenopus* oocyte mediate typical voltage-dependant Na⁺ currents (Smith et al., 1997; Tan et al., 2002; Warmke et al., 1997). Nevertheless, the expression of this unique gene leads to a large number of isoforms, relying on post-transcriptional events such as alternative splicing and RNA editing in *D. melanogaster* and *B. germanica* (Hanrahan et al., 2000; Olson et al., 2008; Song et al., 2004).

Periplaneta americana is widely used as a model to study insect neurophysiology. Because different electrophysiological and pharmacological experiments have demonstrated the existence of Na⁺ current diversity with specialized functions in, for example, axons and neurosecretory cells identified as dorsal unpaired median neurons (Lapied et al., 1990; Lavielle-Defaix et al., 2006), our main aim was to analyse the diversity of Na_v channels in the central nervous system (CNS) at molecular level. Although we searched for different para-like channel isoforms expressed in the CNS of *P. americana*, we cloned two full-length cDNAs named *PaNa_v1* and *PaFPC*, which encode a conventional and a putative Na_v channel, respectively. By RT-PCR, we detected *PaNa_v1* and *PaFPC* expression in different tissues. A detailed phylogenetic analysis confirmed that *PaNa_v1* and *PaFPC* genes are evolutionarily closely related to insect Na_v channel genes.

2. Material and methods

2.1. Tissue preparation

Various tissues were isolated from American cockroaches obtained from our laboratory stock colonies maintained under standard conditions (29 °C, photoperiod of 12-h light/12-h dark). Mushroom-shaped accessory glands (MSG), gut, muscles extracted from the coxa of the legs, head and the ventral nerve cord were dissected from adult male cockroaches previously anaesthetised by chilling to 4 °C. Nerve cord preparation included thoracic and abdominal ganglia, together with the connectives.

2.2. RNA extraction, RT-PCR, RACE and cloning full-length cDNA sequences

Total RNA was isolated from various tissues using the TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, USA). Five micrograms of total RNA was primed with an Oligo(dT)₂₀ and reverse-transcribed into first-strand cDNA with the SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen). Degenerate primers designing from conserved amino acid residues of Na_v channels of *D. melanogaster* (DmNa_v1: GenBank M32078) and *B. germanica* (BgNa_v1: GenBank U73583) were used to amplify domains DI and DIV (Table 1). The PCR experiments were carried out with EuroTaq polymerase (Eurobio, France). PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using NucleoSpin Extract II[®] (Macherey–Nagel, Germany). Each PCR fragment was subcloned into pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) and several clones were sequenced on both strands by the company Millegen Biotechnology. After isolating homologous cDNA sequences

encoding DI and DIV of Na_v channels the 5' and 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) were subsequently performed. The 5' end regions of both *PaNa_v1* and *PaFPC* cDNAs were isolated by employing the RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends method (GeneRacer[™] kit, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The reverse gene-specific primers (GSPs) used for *PaNa_v1* were (P1DI – R1: 5'-GCAAACACGGAGAGTGAGAA-CATG-3') and (P1DI – R2: 5'-CTTAACGGCCGACTCAAATGTG-3'), and for *PaFPC*, were (PFDI – R1: 5'-CCGCACAAGGGATACTCTATCCAG-3') and (PFDI-R2: 5'-CAGTCATCAGGAATGTACCAATGCG-3'). The 3' end region of *PaFPC* was obtained according to standard the procedure. PCRs were carried out with the degenerate primer S2 and the antisense GSPs (PFDIV-S1: 5'-GCGTCAACCGGAAGTTCGGATACA-3') and an Oligo(dT)₁₇ adapter primer (Adapt: 5'-GGCCACGGCTCGACTAG-TACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). All RACE-PCRs products were gel-purified and subcloned for sequence analysis as described above.

Two specific primers were designed to isolate the full-length of *PaNa_v1* (6 kb): a forward primer (XmaI-S1: 5'-AAACCCGGGCCAAC CATGTCCGACGATTCGTCGTCATATC-3') and a reverse primer (SpeI-R1: 5'-TTTTACTAGTTCAGACGTCGGTGGATCGCGAAGTC-3'). XmaI – S1 sequence was based on the 5' of *PaNa_v1* and SpeI – R1 primer was designed using 3' sequences of *BgNa_v1*. To isolate the full-length of *PaFPC* (4.8 kb) the sense and anti-sense primers were (XmaI-S2: 5'-AAACCCGGGCCAACCATGGCTGACAATTCACCGCTAATAAG-3') and (HindIII-R1: 5'-TTTAAGCTTGGAAACCTGTTGGACTGAAAGCTC-3') respectively. Restriction enzyme recognition sequences underlined were added to the forward and reverse primers, to facilitate cloning into the vector pBlueScript SK II (Stratagene, USA). The entire coding regions of both genes were amplified using the Accuprime[™] Taq DNA Polymerase mix (Invitrogen). For transformation and plasmid propagation, *Escherichia coli* MAX Efficiency Stbl2-competent cells (Invitrogen) were used and cultivated at 30 °C as host cells.

2.3. Phylogeny analysis

The phylogram was constructed from Na_v channels, Ca_v channels, Dmα1U-orthologous and DSCI-orthologous channels in order to understand the evolutionary relationships between *PaNa_v1* and *PaFPC1* and the four-P domain α-subunits ion channels. Briefly full-length ORFs were identified using BLAST research in GenBank and VectorBase databases (Table S1). Then the alignment of amino acids sequences was carried out with *ClustalW* method (Thompson et al., 1994) implemented in BioEdit. For clear alignment, the amino acid sequences of the terminal regions and the central part of the cytoplasmic linkers I and II were excluded due to their divergence. Gaps were treated as missing characters. Best nucleotide substitution model was found using MODELTEST v.3.7 (Posada and Crandall, 1998). Akaike Information Criterion (AIC) was used for model selection. Phylogenetic tree based on the sequences analysis were constructed by using parameters of the selected model. Maximum likelihood heuristic search was conducted using PAUP[®]4.0 beta10 (Swafford 2002). Confidence on node was assessed by bootstrapping 1000 times.

3. Results

3.1. Molecular cloning of two full-length cDNAs: *PaNa_v1* and *PaFPC*

To clone the cDNA encoding Na_v channels of *P. americana*, we proceeded by conventional RT-PCR strategy (Fig. 1). With degenerate primers corresponding to highly conserved regions of *para*-related genes, we performed two RT-PCRs using nerve cord tissue. The first RT-PCR was aimed to amplify cDNA fragments encoding a region containing domain I and linker 1. Two cDNA fragments of 1700 bp and 920 bp were cloned and their deduced amino acid

Table 1
Sequences of the oligonucleotides used in PCR and their corresponding region.

| Primer names | Nucleotide sequence ^a | Domain |
|---|--|----------------------------|
| A. Degenerated primers used to amplify <i>PaNav1</i> and <i>PaFPC</i> cDNAs | | |
| S1 | 5'-YWSNGCNACNGAYGCNATGTGGATHYTNG-3' | IS3 –Linker 1 (PCR #1) |
| R1 | 5'-CNGCYTTYTYTGNARYTCRTCRTANSWC-3' | IS3 –Linker 1 (PCR #1) |
| S2 | 5'-GTAYYNTAYTYTGNTTYTYATHATHHTYGG-3' | IIIS6 – IVS6 (PCR #2) |
| R2 | 5'-YTCNARDATNACNGCDATRTAC-3' | IIIS6 – IVS6 (PCR #2) |
| B. Specific primers used in RACE | | |
| P1DI-R1 | 5'-GCAAACACGGAGAGTGAGAACATG-3' | 5'UTR+partial ORF PaNav1 |
| P1DI-R2 | 5'-CTTAACGGCCGACTCAAATGTG-3' | 5'UTR+partial ORF PaNav1 |
| PFDI-R1 | 5'-CCGCACAAGGATACTCTATCCAG-3' | 5'UTR+partial ORF PaFPC |
| PFDI-R2 | 5'-CAGTCATCAGGAATGTACCAATGCG-3' | 5'UTR+partial ORF PaFPC |
| S2 | 5'-GTAYYNTAYTYTGNTTYTYATHATHHTYGG-3' | 3'-UTR + partial ORF PaFPC |
| PFDIV-S1 | 5'-GCGTCAACCGAAGTTCGGATACAC-3' | 3'-UTR + partial ORF PaFPC |
| Adapt | 5'-GGCCACGCGTACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3' | 3'-UTR + partial ORF PaFPC |
| C. Primers used to amplify the full-length ORF | | |
| XmaI-S1 | 5'-AAACCCGGGCCAACCATGTCCGACGATTCCGTCC TCATATC-3' | Full-length ORF PaNav1 |
| SpeI-R1 | 5'-TTTACTAGTTCAGACGTCGGTGGATCGCGAAGTC-3' | Full-length ORF PaNav1 |
| XmaI-S2 | 5'-AAACCCGGGCCAACCATGGCTGACAATTCACCGTAATAAG-3' | Full-length ORF PaFPC |
| HindIII-R1 | 5'-TTTAAGCTTGAAACCTGTTGGACTGAAAGCTC-3' | Full-length ORF PaFPC |
| D. Primers used to amplify the linker 1 | | |
| P1L1-S1 | 5'-CGTAGTGAAGAAGGGACTCG-3' | Linker 1 of PaNav1 |
| P1L1-R1 | 5'-TATTCTTGGAACTTGAGCCACAGC-3' | Linker 1 of PaNav1 |
| PFL1-S1 | 5'-CGATACATTCGGTTGGGCCTT-3' | Linker 1 of PaFPC |
| PFL1-R1 | 5'-GATTACCGGATGAAGAGCTC-3' | Linker 1 of PaFPC |

^a Designation of oligonucleotide mixtures: R = A + G; Y = C + T; S = G + C; H = A + C + T; N = A + G + C + T; W = A + T. S = sens; R = reverse; P1 = PaNav1, PF = PaFPC.

sequences were, respectively, 77% and 55% identical to that of the corresponding regions of DmNav1. The second RT-PCR yielded 970-bp amplicons covering a region from IIIS6 to IVS6. Two distinct cDNA sequences were distinguished and their deduced amino acid sequences shared 89% or 54% with the corresponding regions of DmNav1. Altogether, these data suggested that at least two genes expressed in the CNS of *P. americana* encoded distinct sodium channel proteins. Thus, two 5'RACE and two 3'RACE were performed separately with specific primers matching the sequences of cDNAs obtained previously. The data sequences obtained with 5'RACE and 3'RACE permitted to design specific primers pairs (Table 1) to amplify separately the complete ORF of the two genes by RT-PCR. The first cDNA amplified contained an ORF of 6153 bp encoding a 2051 amino acids protein, and was named PaNav1 (GenBank™ accession number GQ132119) due to its high sequence

identities with DmNav1 (81%) and with BgNav1 (91%). Interestingly, the alternative exons J, K, A, E, F and G1 which were already described in different insect species such as *B. germanica* are conserved in PaNav1 (Davies et al., 2007; Song et al., 2004). The second RT-PCR led to the isolation of two full-length cDNA inserts with ORFs of 4662 bp. The two predicted proteins consisted of 1553 amino acids, which differed from each other by eight point mutations (Fig. 2A). Blast searches of the GenBank non-redundant protein sequences database using both deduced amino acid sequences allowed us to classify them as novel members of FPC channels. From these findings, the new gene was called PaFPC in reference to *P. americana* four-P domain channels [GenBank™ accession nos: GQ132120 (PaFPC1 variant) and GQ132121 (PaFPC2 variant)]. Further analyses were performed using PaFPC1 sequence. In addition, after searching the arthropoda Genome Databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/>

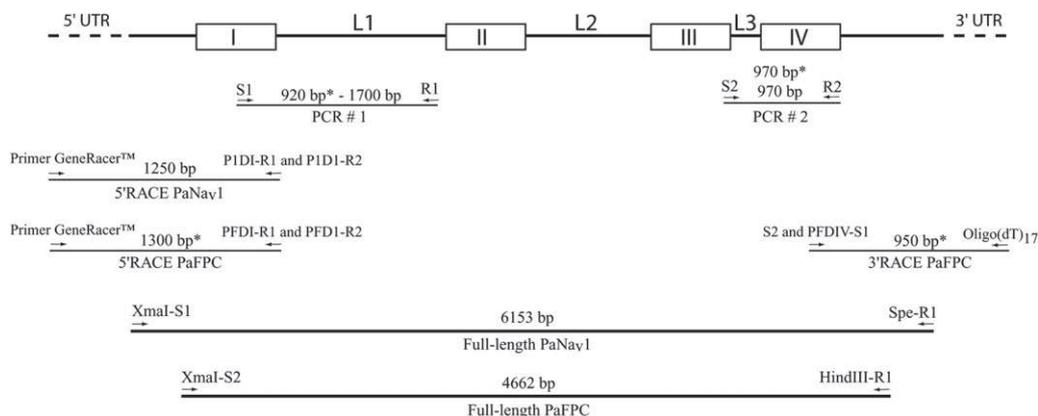


Fig. 1. cDNAs covering both *PaNav1* and *PaFPC* genes. A diagram of the domain organization of both Na_v α-subunit channels is presented at the top, showing four domains (I–IV), linkers (L1, L2, L3) between domains, 5' and 3' untranslated regions. cDNAs were isolated by RT-PCR. Primers and sizes of the PCR products are indicated. Sizes indicated with an asterisk (*) refer to *PaFPC* gene.

A

| | | |
|--------|--|------|
| PaFPC1 | MADNSPLIREERQRLFRPYTRAMLTAPSAQPAKENGKTEENKNSRDKG-----RGANKDRDGSAPDQALE | 67 |
| PaNav1 | MSDDSSSISEERSLFRPFTRESLAAIEARIAEYAKRKE-LEKKRAEGEGDSGRKRRKKEVRYDDEDEDEGPQPDATLE | 79 |
| BgNav1 | MSDDSSSISEERSLFRPFTRESLAAIEARIAEYAKRKE-LEKKRAEG-----EVRYDDEDEDEGPQPDATLE | 68 |
| | ▲ Exon J ▲ | |
| PaFPC1 | QGSRIIPARMNIFPAELASTPLEDFDPFYKPKKTFVVVTKAGDIFRFSGEKSLWMLDPFTPIRRAVISTVQPIFSYFTM | 147 |
| PaNav1 | QGAPIPVRMQGLFPEPELASTPLEDIDPFYQNRFTVVVSKGKIDFRFSATQAMWILDPFNPIRRVAIYILVHPLFSFLII | 159 |
| BgNav1 | QGAPIPVRMQGLFPEPELASTPLEDIDPFYQNRFTVVVSKGKIDFRFSATQAMWILDPFNPIRRVAIYILVHPLFSFLII | 148 |
| | IS1 IS2 IS3 IS4 | |
| PaFPC1 | ITILICIFMIMPATQTTYILELVFLSIYTIIEVVVKVARGFILHPPAYLRDPWNWLDLFLVTLIGYITLVVDLGLYALR | 227 |
| PaNav1 | TTILTNCIFMIMPPTPTIESTEVIFFGIYTFESAVKVMARGFILQPFYLRDAWNWLDVVIYALAVTMGIDLGNLAALR | 239 |
| BgNav1 | TTILTNCIFMIMPPTPTIESTEVIFFGIYTFESAVKVMARGFILQPFYLRDAWNWLDVVIYALAVTMGIDLGNLAALR | 228 |
| | IS4 Exon K IS5 | |
| PaFPC1 | AFRVLRSWRVTIVPGWRTIVDALSLSTSLKDLVLLLFSLFVFAVGLQIYMGVLTQKCVKHFPAIDGSGWGNFTDERWF | 307 |
| PaNav1 | TFRVLRAKLTVAIVPGLKTIVGAVIESVKNLRDVILITMFSLSVFLMGLQIYMGVLTQKCVKHFPAIDGSGWGNFTDENWF | 319 |
| BgNav1 | TFRVLRAKLTVAIVPGLKTIVGAVIESVKNLRDVILITMFSLSVFLMGLQIYMGVLTQKCVKHFPAIDGSGWGNFTDENWF | 308 |
| | IS6 | |
| PaFPC1 | AGPWHMLFFIIVVYFGTFCFNFILAVVMSYTHVVKRADEEAAERELKKEKAASVANNT----- | 449 |
| PaNav1 | AGPWHMLFFIIVIFLGSFYLVSLILAVVMSYDELQKKAEEEEAAEAAALREAEAAARAKEAKRARQADKEAAHAAGLAQ | 479 |
| BgNav1 | AGPWHMLFFIIVIFLGSFYLVNLLAVVMSYDELQKKAEEEEAAEAAALREAEAAARAKEAKLRQADKLAQAELAAQ | 468 |
| | ANGQE | |
| PaFPC1 | -----ANGQE----- | 454 |
| PaNav1 | AAA--EIVKSPSGSSCLSYELFVQK-GNADNNKEMKISRSEEGDSISEHFRIVGANGTAGARKVSAASLSLPGSPFNLR | 556 |
| BgNav1 | ELAGANAKSPSGSSRSYELFVQKGDGNNDKRENMKISRSEEGDSISEHFRVGRVANGTAARKVSAASLSLPGSPFNHR | 547 |
| | ▲ Exon A ▲ | |
| PaFPC1 | ----- | 454 |
| PaNav1 | RGSRGSHQFPINRGRGRFVPPGGDRKPLVLSYLDQAEHLPYADDSNAVTPMSEENGAIIVVPVYYANLGRSHSSYTSHA | 636 |
| BgNav1 | RGSRGSHHFTIRNGRGRFVPPGGDRKPLVLSYLDQAEHLPYADDSNAVTPMSEENGAIIVVPVYYASLGRSHSSYTSHA | 627 |
| | -----QTTI | |
| PaFPC1 | SRIYSYTHGDLGAGGKPRTKESQLRTRSRGNNSQVLPNSTPYMSDDHKYMDASVSDDGAVKAKHSDNPFIEQMQQTTI | 716 |
| PaNav1 | SRIYSYTHGDLGAGNKSQTKINQLRARSVRNNSQVLPNSTPYM-----ASADSDGAVKAKHSDNPFIEQMQQTTI | 700 |
| BgNav1 | SRIYSYTHGDLGAGNKSQTKINQLRARSVRNNSQVLPNSTPYM-----ASADSDGAVKAKHSDNPFIEQMQQTTI | 700 |
| | IIS1 | |
| PaFPC1 | EMNGDEAVVIDNNQAARQOS-----DPTAPASVTRQLT-----DFLCVWDCCVWQKLQGAIGAVL | 517 |
| PaNav1 | VDMNDVMVLNDIIEQAAGQSRASEQG-----DEDEEGPTVKEKVLATCRGIDIFCVWDCCWLWLFQYVALLVF | 788 |
| BgNav1 | VDMNDVMVLNDIIEQAAGQSRASEHGVSYYFPTDEDEEGPTVKEKVLATCRGIDIFCVWDCCWLWLFQYVALLVF | 780 |
| | IIS1 Exon B IIS2 IIS3 | |
| PaFPC1 | SPFFELFIAIIVNITFMALDHDHMDNIEFERILSTGNYIFTSIYIWEAVLKIITLSPKYEYKDSWNVDFDIIVVFALE | 597 |
| PaNav1 | DPFVELFITLICIVNMLFALDHDHMDNMDKALKSGNYFFATFATEATLKLIIAMSPKYYFQEGWNIFDFIIVALSLLE | 868 |
| BgNav1 | DPFVELFITLICIVNMLFALDHDHMDNMDKALKSGNYFFATFATEATLKLIIAMSPKYYFQEGWNIFDFIIVALSLLE | 860 |
| | IIS3 IIS4 IIS5 | |
| PaFPC1 | LGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFLAKFWPTLNNFMSVMTKSYGAFVNMVYVFLIFIFALIGMQLFGMNYIDNVERFPDG | 677 |
| PaNav1 | LGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVTGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVERFPDG | 948 |
| BgNav1 | LGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFLAKSWPTLNLISIMGRVTGALGNLTFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYIDNVERFPDG | 940 |
| | IIS6 | |
| PaFPC1 | DIPRWNFDTDFHSFMIVFRALCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFVAVFFVGNLVLNLLHALLLNNG-SFCTSPTSDEE | 756 |
| PaNav1 | DTPRWNAFDMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFLATVIGNLVNLFLALLSNFGSSNLSAPTADNE | 1028 |
| BgNav1 | DIPRWNFDTDFMHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCLVGDWSCIPIFFLATVIGNLVNLFLALLSNFGSSNLSAPTADNE | 1020 |
| | DSEKDEALAIIVRIFKRFKP-NLNAVKLS----- | |
| PaFPC1 | DSEKDEALAIIVRIFKRFKP-NLNAVKLS----- | 784 |
| PaNav1 | TNKIAEAFDRFSRLFNWIKRSALSVAKMLRAKLTNQISDQTPGEGPSSSWKEDAHDRDLDLDTADEIILADGMVYRDKKS | 1108 |
| BgNav1 | TNKIAEAFDRFSRLFNWIKRSALSVAKMLRAKLTNQISDQTP-----DAHERDLDLDTADEIILADGMVYRDKKS | 1090 |
| | ▲ Exon E ▲ Exon F ▲ | |
| PaFPC1 | -----P | 785 |
| PaNav1 | PKDQTLQLEVAIGDGMEFTIHGDLKKNLKKDKLMMNNTKVIKNSFQGNHKNRIEN-DYLNHRQDEDTLSTRSYSGSHKNRP | 1187 |
| BgNav1 | PKDQTLQLEVAIGDGMEFTIHGDLKKNLKKDKLMMNNTKVIKNSLN--HKDNRIESGDYLNHRQDEDTLSTGSYSGSHKNRP | 1168 |
| | ▲ G ¹¹¹¹ * | |
| PaFPC1 | MKPDSSED-----IVESQEIQGNNIAD-----AEDVLAGEPDCCCNAFYKCFPSRP-A | 833 |
| PaNav1 | FKDSSHKGSAAETMDGEGKDKASKEDLQEGNAEEDGEGEGHLEEDMALDGGTEDVMMSEYPADCCPKCYRPFPLAGD | 1267 |
| BgNav1 | YKDDSHKGSAAETMDGEGKDKASKEDLQEGEGEEDGEGE-GPLEEDMVLDAGTEDVMMSEYPADCCPKCYRPFPLAGD | 1247 |
| | IIS1 IIS2 | |
| PaFPC1 | RDSSVQRMWSNRRVCFLLAKNKYFKFVTAIVLVITVLLALEDIYLPQRPVLVNITLYVDYVLTAFVVIEMIMLFAVG | 913 |
| PaNav1 | EDSPFWQGWGNLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSALALEDVHLSYRPILODILYMDRIFTVIFFIEMLIKWLALG | 1347 |
| BgNav1 | EDSPFWQGWGNLRLKTFQLIENKYFETAVITMILLSSALALEDVHLSYRPILODILYMDRIFTVIFFIEMLIKWLALG | 1327 |
| | IIS3 IIS4 IIS5 | |
| PaFPC1 | FKKYFTSKWYWLDFIVVAYLNFVLMCAG---IDALQTLRLLRVFRLFRPISKVNGMCOVVTSTLVEAVPHIFNVVLVGI | 990 |
| PaNav1 | FKKYFTNAWCWLDIVVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRLALRPLRAMSRMQGMRVVVVALVQAIPSIFNVLLVCL | 1427 |
| BgNav1 | FKKYFTNAWCWLDIVVMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRLALRPLRAMSRMQGMRVVVVALVQAIPSIFNVLLVCL | 1407 |
| | ▲ Exon G1 ▲ | |

| | IIIS5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-----------------|---|------|------|------|-------|------|-------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|------|---|------|------|------|---|------|
| PaFPC1 | FFWL | VFAIMGVQLFAGK | F | YK | CV | DEN | STVLS | HEIT | M | D | R | N | C | I | H | E | N | T | W | E | N | S | P | M | N | F | D | H | V | G | N | A | Y | L | S | L | L | Q | V | A | T | F | K | G | W | I | Q | I | M | N | D | A | * | 1070 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaNav1 | IFWLI | FAIMGVQLFAGKYHK | C | V | D | N | S | T | L | S | H | E | I | I | P | D | R | N | A | C | I | A | E | N | T | W | E | N | S | P | M | N | F | D | H | V | G | K | A | Y | L | C | L | F | Q | V | A | T | F | K | G | W | I | Q | I | M | N | D | A | 1507 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BgNav1 | IFWLI | FAIMGVQLFAGKYHK | C | V | D | N | S | T | L | S | H | E | I | I | P | D | R | N | A | C | I | A | E | N | T | W | E | N | S | P | M | N | F | D | H | V | G | K | A | Y | L | C | L | F | Q | V | A | T | F | K | G | W | I | Q | I | M | N | D | A | 1487 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IIIS6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaFPC1 | IDSR | E | L | H | K | Q | P | I | R | E | T | N | I | M | Y | L | F | V | F | F | I | I | F | G | S | F | F | I | L | K | F | V | C | L | I | I | D | I | F | R | O | R | R | K | A | E | G | - | L | S | A | T | D | R | T | Q | L | I | Y | R | R | A | V | M | T | S | A | K | P | V | 1149 | | | | | | |
| PaNav1 | IDSR | E | L | F | K | Q | P | I | R | E | T | N | I | M | Y | L | F | V | F | F | I | I | F | G | S | F | F | T | L | N | L | F | I | G | V | I | I | D | N | F | N | E | Q | K | K | A | G | G | S | L | E | M | F | M | T | E | D | Q | K | K | Y | N | A | M | K | K | G | S | K | K | P | L | 1587 | | | | |
| BgNav1 | IDSR | E | L | H | K | Q | P | I | R | E | T | N | I | M | Y | L | F | V | F | F | I | I | F | G | S | F | F | T | L | N | L | F | I | G | V | I | I | D | N | F | N | E | Q | K | K | A | G | G | S | L | E | M | F | M | T | E | D | Q | K | K | Y | N | A | M | K | K | G | S | K | K | P | L | 1567 | | | | |
| | IVS1 | | | | | IVS2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaFPC1 | KRIP | K | P | T | C | H | P | O | S | L | M | Y | D | I | S | V | N | R | K | F | E | Y | T | M | L | I | I | L | N | V | A | V | M | A | D | H | Y | Q | S | M | F | S | E | V | L | D | Y | L | N | I | F | I | F | F | V | E | C | V | I | K | V | S | G | L | R | H | Y | F | 1229 | | | | | | | | |
| PaNav1 | KAI | P | R | K | W | R | P | Q | A | I | V | F | E | I | C | T | N | K | K | F | D | M | I | I | M | L | F | I | G | F | N | M | L | T | M | T | L | D | H | Y | Q | S | Q | F | S | D | V | L | D | Y | L | N | M | I | F | I | V | F | S | S | E | C | L | M | K | I | F | A | L | R | Y | H | Y | F | 1667 | | |
| BgNav1 | KAI | P | R | K | W | R | P | Q | A | I | V | F | E | I | C | T | N | K | K | F | D | M | I | I | M | L | F | I | G | F | N | M | L | T | M | T | L | D | H | Y | Q | S | Q | F | S | D | V | L | D | Y | L | N | M | I | F | I | V | F | S | S | E | C | L | M | K | I | F | A | L | R | Y | H | Y | F | 1647 | | |
| | IVS3 | | | IVS4 | | | IVS5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaFPC1 | K | E | P | W | N | L | F | D | F | V | V | I | L | S | I | L | G | L | V | L | S | D | I | E | K | Y | F | S | P | T | L | L | R | V | R | V | R | V | A | K | G | R | V | L | R | L | V | K | A | G | K | I | R | T | L | L | F | A | L | A | M | S | L | P | A | L | F | N | I | C | L | L | L | F | L | V | 1309 |
| PaNav1 | K | E | P | W | N | L | F | D | F | V | V | I | L | S | I | L | G | L | V | L | S | D | I | E | K | Y | F | S | P | T | L | L | R | V | R | V | R | V | A | K | G | R | V | L | R | L | V | K | A | G | K | I | R | T | L | L | F | A | L | A | M | S | L | P | A | L | F | N | I | C | L | L | L | F | L | V | 1747 |
| BgNav1 | K | E | P | W | N | L | F | D | F | V | V | I | L | S | I | L | G | L | V | L | S | D | I | E | K | Y | F | S | P | T | L | L | R | V | R | V | R | V | A | K | G | R | V | L | R | L | V | K | A | G | K | I | R | T | L | L | F | A | L | A | M | S | L | P | A | L | F | N | I | C | L | L | L | F | L | V | 1727 |
| | IVS5 | | | | IVS6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaFPC1 | M | F | I | F | A | I | F | G | M | S | F | F | M | H | V | R | D | K | G | L | D | D | V | N | F | K | T | F | G | S | I | L | L | F | Q | L | A | T | S | A | G | W | D | G | V | F | A | T | A | N | E | E | D | C | R | A | P | D | E | L | G | P | G | N | C | S | R | A | L | G | I | A | 1389 | | | | |
| PaNav1 | M | F | I | F | A | I | F | G | M | S | F | F | M | H | V | R | D | K | G | L | D | D | V | N | F | K | T | F | G | S | M | I | L | L | F | Q | M | S | T | S | A | G | W | D | G | V | L | D | G | I | M | N | E | D | C | R | K | P | D | E | L | G | P | G | N | C | S | A | T | I | G | I | A | 1827 | | | |
| BgNav1 | M | F | I | F | A | I | F | G | M | S | F | F | M | H | V | R | D | K | G | L | D | D | V | N | F | K | T | F | G | S | M | I | L | L | F | Q | M | S | T | S | A | G | W | D | G | V | L | D | G | I | M | N | E | D | C | N | K | P | N | S | E | I | G | P | G | C | G | S | A | T | I | G | I | A | 1807 | | |
| | IVS6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaFPC1 | Y | L | S | Y | L | I | S | L | I | V | N | M | Y | A | A | V | I | L | Y | V | L | E | Y | E | D | S | R | E | G | L | T | D | D | D | Y | D | M | F | E | V | W | Q | F | D | P | E | A | T | Q | Y | I | R | Y | D | Q | L | S | E | L | L | A | L | O | P | L | O | V | K | P | * | 1469 | | | | | | |
| PaNav1 | F | L | S | Y | L | V | I | S | L | I | V | N | M | Y | I | A | V | I | L | E | N | S | Q | A | T | E | D | V | Q | E | G | L | T | D | D | D | Y | D | M | Y | E | I | W | Q | F | D | P | D | G | T | Q | Y | I | R | Y | D | Q | L | S | E | F | L | D | V | L | E | P | L | Q | I | H | K | P | 1907 | | | |
| BgNav1 | F | L | S | Y | L | V | I | S | L | I | V | N | M | Y | I | A | V | I | L | E | N | S | Q | A | T | E | D | V | Q | E | G | L | T | D | D | D | Y | D | M | Y | E | I | W | Q | F | D | P | D | G | T | Q | Y | I | R | Y | D | Q | L | S | E | F | L | D | V | L | E | P | L | Q | I | H | K | P | 1887 | | | |
| PaFPC1 | N | K | Y | K | I | S | M | N | I | P | I | C | K | D | D | H | I | F | Y | K | D | V | L | E | A | L | V | K | D | V | F | S | R | R | G | S | P | V | E | A | G | --- | D | V | Q | A | P | N | V | D | E | A | E | Y | K | P | V | S | S | T | L | Q | R | Q | R | E | E | Y | C | V | R | L | I | Q | N | A | 1545 |
| PaNav1 | N | K | Y | K | I | V | S | M | D | I | P | I | C | K | D | L | M | F | C | V | D | I | L | D | A | L | T | K | D | F | A | R | K | G | N | P | I | E | S | G | E | L | G | V | Q | - | A | R | P | D | E | V | G | Y | E | P | V | S | S | T | L | W | R | Q | R | E | E | Y | C | A | R | L | I | Q | N | A | 1986 |
| BgNav1 | N | K | Y | K | I | V | S | M | D | I | P | I | C | K | D | L | M | F | C | V | D | I | L | D | A | L | T | K | D | F | A | R | K | G | N | P | I | E | S | A | E | L | G | V | Q | P | G | R | P | D | E | V | G | Y | E | P | V | S | S | T | L | W | R | Q | R | E | E | Y | C | A | R | L | I | Q | N | A | 1967 |
| PaFPC1 | W | R | K | H | K | Q | Q | N | ----- | 1553 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PaNav1 | W | R | K | H | K | Q | Q | R | G | G | P | G | E | D | S | D | A | G | D | A | L | H | D | R | H | Q | T | A | V | L | V | E | S | D | G | F | V | T | K | N | G | H | R | V | I | H | S | R | S | P | S | V | T | S | R | S | T | D | V | 2050 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BgNav1 | W | R | K | H | K | Q | Q | R | G | A | G | P | E | D | S | D | A | G | D | P | L | Q | D | R | H | Q | T | A | V | L | V | E | S | D | G | F | V | T | K | N | G | H | R | V | I | H | S | R | S | P | S | V | T | S | R | S | T | D | V | 2031 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

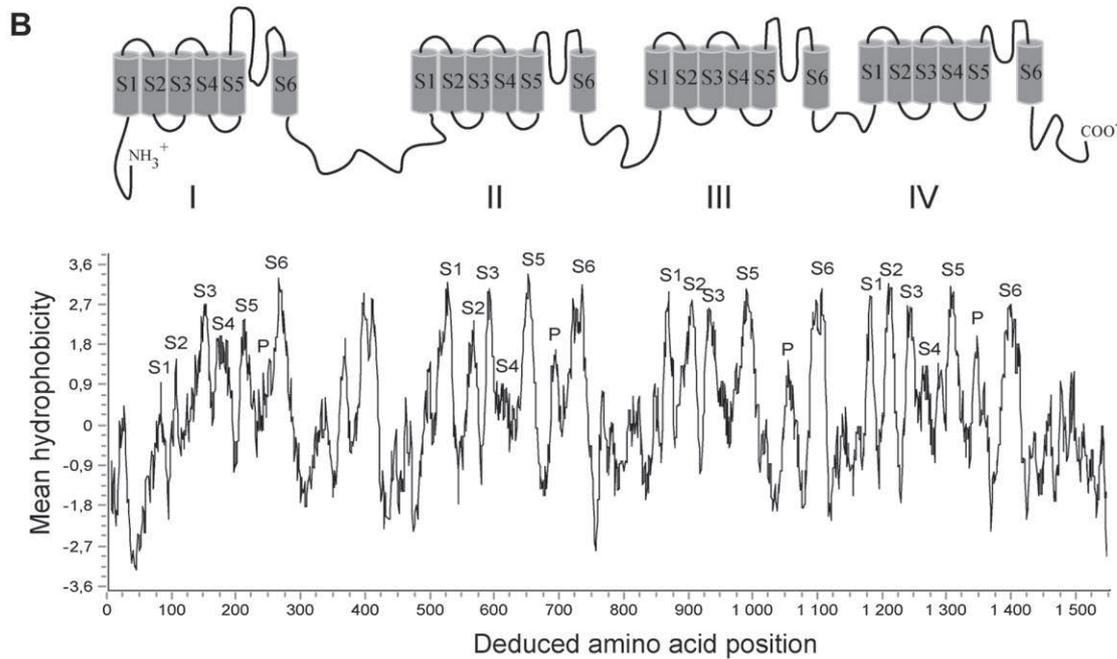


Fig. 2. (continued).

Fig. 2. Primary structure analysis of a novel member of the four-P domain channel subfamily. **A.** *ClustalW* alignment of PaFPC1, PaNav1 and BgNav1. Identical amino acid residues are highlighted in light grey, similar ones in dark grey and different ones in white. Transmembrane segments are indicated with bold lines above the sequences. Alternative exons are delimited by triangle symbols. The numbering of the amino acid C¹¹¹¹ is according to BgNav1 protein sequence (GenBank accession number U73583). The substitutions of amino acids between PaFPC1 and PAFPC2 are indicated by an asterisk (*) and are the following ones: M122T, A294T, I545V, P751S, F815S, D1069G, K1468E and E1520G. **B.** Hydropathy profile and deduced topological organization of PaFPC1. Hydropathy analysis was performed using the algorithm of Kyte and Doolittle (1982). The amino acid residues of the novel protein are plotted along the x-axis, and the calculated hydropathy indexes based on a running average of 15 amino acids are plotted along the y-axis. Putative membrane spanning segments of each domain detected as hydrophobic regions are labelled as S1, S2, S3, S4, S5, P (pore), and S6. Accession numbers of the sequences are: PaFPC1 (GQ132120) and PaNav1 (GQ132119).

genom_table.cgi?organism=insects) using PaFPC1 protein by the tBlastn algorithm, only *para*-like genes encoding insect Na_v were found. The highest homology sequence suggested by the program was 50–60% average with the sequenced arthropod genomes (*Acyrtosiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Culex quinquefasciatus*, *Drosophila ananassae*, *Drosophila erecta*, *Drosophila grimshawi*, *D. melanogaster*, *Drosophila mojavensis*, *Drosophila persimilis*, *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila simulans*, *Drosophila virilis*, *Drosophila willistoni*, *Drosophila yakuba*, *Ixodes scapularis*, *Nasonia vitripennis*, *Pediculus humanus corporis*, *Rhodnius prolixus*, and *Tribolium castaneum*). Thus, our findings suggest that PaFPC is probably specific to other insect species, such as *P. americana*.

3.2. Structural analysis of PaFPC

The hydropathy analysis of PaFPC1 generated a profile similar to that of other FPC channels with a prediction of four large transmembrane domains (domains I–IV) connected by hydrophilic cytoplasmic loops (Fig. 2B). Each domain was composed of six

hydrophobic regions (S1–S6) and a P loop between S5 and S6. The hydrophobic indices of the segments S1, S2, S3, S5 and S6 were higher than those ones of S4 and P-loops region. Both N- and C-terminal regions were hydrophilic and located at the cytoplasmic side of the membrane. On the basis of these considerations, the transmembrane topology of PaFPC1 protein is illustrated in Fig. 2B.

For structure–function relationship analysis of PaFPC1, we performed a multiple alignment of insect Na_v channels (PaNa_v1, BgNa_v1 and DmNa_v1) and the mammalian rNa_v1.2 subunit. We examined the hallmarks of Na_v channels: the voltage sensor, the P region and the fast inactivation gate (Fig. 3 and Table 2). Slightly different patterns of conserved positively charged amino acids were observed in the S4 segments of PaFPC1 channel comparing to other Na_v channels (Fig. 3). Five charge-conserving substitutions (lysine substituted by arginine and vice-versa) were localised at positions 236 (IS4), 619 (IIS4), 1271 (IVS4), 964 (IIIS4) and 1283 (IVS4) in PaFPC1 amino acid sequences. Two charge-neutralising substitutions were also observed at positions 948 (IIIS4) and 1280 (IVS4) in PaFPC1 sequences. The P-loops of PaFPC1 proteins share a high percentage amino acid identity (64–92%) with those ones of PaNa_v1, BgNa_v1, DmNa_v1 and rNa_v1.2

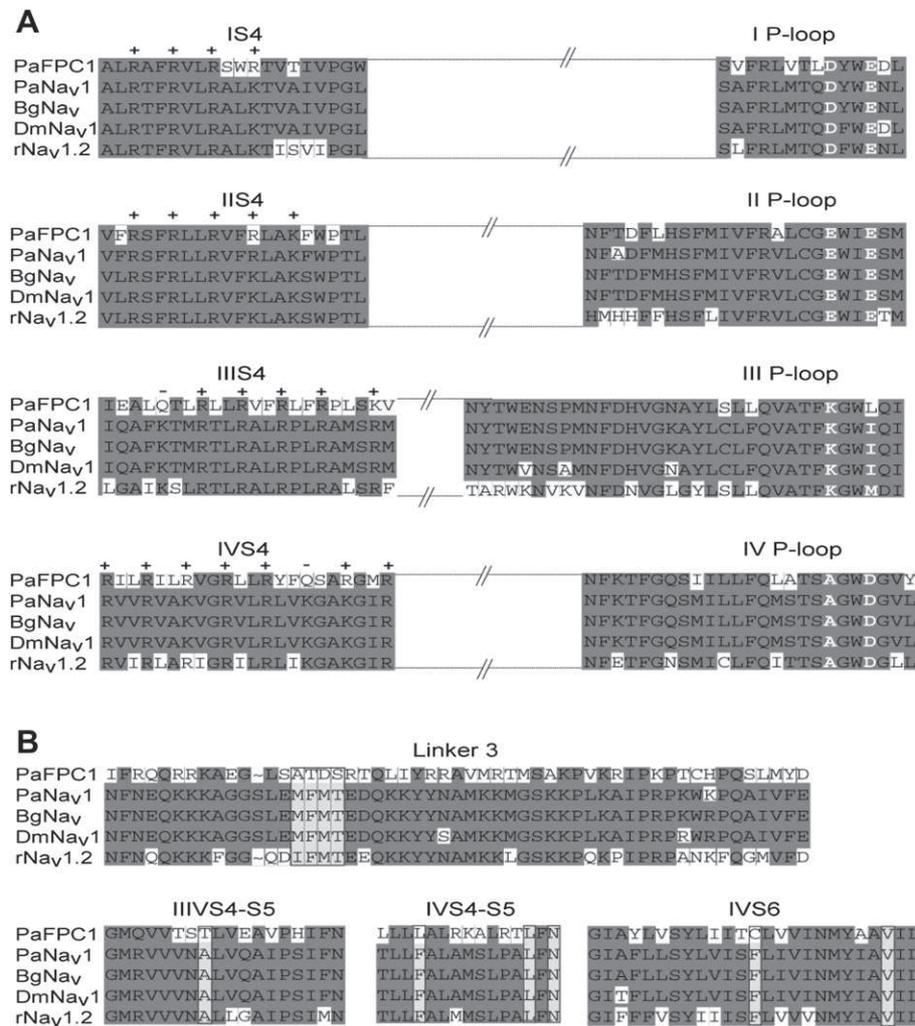


Fig. 3. ClustalW alignment of PaFPC1, PaNa_v1, BgNa_v1, DmNa_v1 and rNa_v1.2. Identical amino acid residues are highlighted in dark grey while divergent ones are highlighted in white. A. For clarity reasons, only alignment of the S4 segments (voltage sensor) and P-loops (selectivity filter) are shown. Charged amino acids presented in the S4 segments of PaFPC1 are associated with the symbol (+). Charge-neutralising substitutions are pointed out with the symbol (-). Amino acid residues forming the inner ring (DEKA) and outer ring (EED for insect Na_v and EEMD for vertebrate Na_v) are written in bold and white. B. Molecular determinants involved in fast inactivation of Na_v channels are depicted. They consist in the amino acids sequence of the linker 3, the intracellular loops IIIS4–S5 and the segments IVS6. They are framed and highlighted in clear grey. Accession numbers of the sequences are: PaFPC1 (GQ132120), PaNa_v1 (GQ132119), BgNa_v1 (U73583), DmNa_v1 (M32078) and rNa_v1.2 (X03639).

Table 2
Amino acid sequence homology between PaFPC1 and other Na_v channels isoforms.

| Na_v isoform ^a | Overall | IS4 | I P-loop | II S4 | II P-loop | IIIS4 | IIIS4–S5 | III P-loop | L3 | IVS4 | IVS4–S5 | IV P-loop | IVS6 |
|------------------------------------|---------|-----|----------|-------|-----------|-------|----------|------------|----|------|---------|-----------|------|
| % Amino acid identity with PaFPC1 | | | | | | | | | | | | | |
| Pa Na_v 1 | 59 | 70 | 71 | 85 | 87 | 41 | 61 | 88 | 34 | 45 | 72 | 84 | 72 |
| Bg Na_v | 59 | 70 | 71 | 85 | 92 | 41 | 61 | 88 | 34 | 45 | 72 | 84 | 72 |
| Dm Na_v 1 | 56 | 70 | 71 | 85 | 92 | 41 | 61 | 85 | 34 | 45 | 68 | 84 | 68 |
| r Na_v 1.2 | 42 | 55 | 64 | 85 | 67 | 45 | 50 | 64 | 33 | 45 | 68 | 68 | 68 |

L: linker.

^a Bg Na_v (U73583), Dm Na_v 1 (M32078) and r Na_v 1.2 (X03639).

proteins (Table 2). The inner ring or DEKA motif which determines the Na^+ selectivity is conserved in PaFPC channels (Heinemann et al., 1992). The negatively charged amino acids EEDD determining insect Na_v conductance are totally conserved in PaFPC channels (Chiamvimonvat et al., 1996). However, the outer ring EEMD of vertebrate Na_v which has been demonstrated to determine TTX sensitivity is slightly different in PaFPC channels (Terlau et al., 1991). The methionine M is substituted by an isoleucine I in Na_v insects while it is substituted by a leucine L in PaFPC channels. The linker 3 of PaFPC1 channel shared a remarkable low sequence identity (34%) with that one of Pa Na_v 1, Bg Na_v 1 and Dm Na_v 1 and it did not contain the MFMT motif involved in the fast inactivation mechanism of insect Na_v channels (Loughney et al., 1989). Amino acids residues determining the docking receptor of the inactivation gate were poorly conserved in PaFPC1 (Fig. 3B). Altogether, these distinctive features may endow PaFPC1 with absence of fast inactivation mechanism. The length of linker 1 (99 amino acids) and linker 2 (109 amino acids) of PaFPC1 channel were three- and two-fold smaller than that ones of Pa Na_v 1, Bg Na_v 1 and Dm Na_v 1, respectively.

3.3. Expression pattern of PaFPC and Pa Na_v 1 in diverse tissues

RT-PCR using nerve cord, head, muscles, gut and MSG tissues were performed to examine the expression pattern of PaFPC and Pa Na_v 1 transcripts. We designed specific primers encompassing the linker 1 of both channels in order to discriminate them on the basis of their size (Fig. 4 and Table 1). Two PCR fragments of approx.

750 bp and 900 bp corresponding to the linker 1 of Pa Na_v 1 transcripts were detected in all tissues except in MSG (Fig. 4). Sequence analysis of the RT-PCR products of the ventral nerve cord revealed three spliced variants which contain the following combinations of exons characterized in *para-like* genes: A, A + I and A + B (Song et al., 2004). A single PCR fragment corresponding to the PaFPC transcripts was detected in all tissues. PaFPC transcripts are abundantly expressed in nerve cord, muscles and gut tissues.

3.4. Evolutionary relationships between PaFPC1 and all other four-P domain α -subunits

Akaike information criterion used in Modeltest selected the GTR + I + G model with the following parameters: $f(A) = 0.2446$, $f(C) = 0.2529$, $f(G) = 0.2364$; rate matrix $R(A-C) = 2.1266$, $R(A-G) = 3.9675$, $R(A-T) = 1.5464$, $R(C-G) = 1.5043$, $R(C-T) = 5.7631$; proportion of invariable sites (I) = 0.0484 and Gamma distribution shape parameter (G) = 0.6973. Maximum likelihood tree inferred from the model is presented in Fig. 5. The topology of the tree reflects the Na_v 1, DSC1-like (SC1), Ca_v (Ca1D, Ca1A and α 1T) and Dm α 1U-like channels (α 1U) subfamilies that are dispatched on six monophyletic clades (A, B, C, D, E and F) with high bootstrap values (Fig. 5). Subgroups of insect Na_v genes can be distinguished in accordance with the different insect orders (*diptera*, *lepidoptera*, *phthiraptera*, *coleoptera*, *hymenoptera* and *blattaria*). As a consequence, Pa Na_v 1 is closely related to Bg Na_v 1. PaFPC1 channel clusters at the base of the cockroach Na_v channels. Hence, both genes

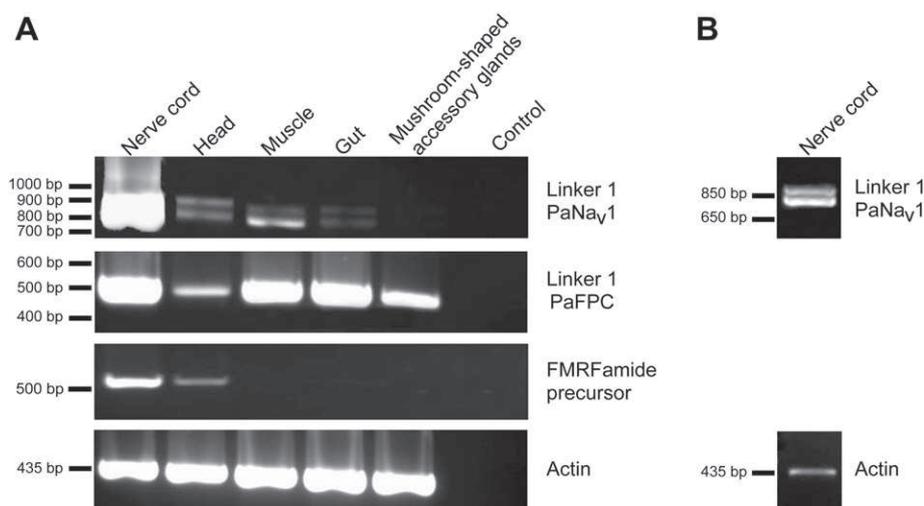
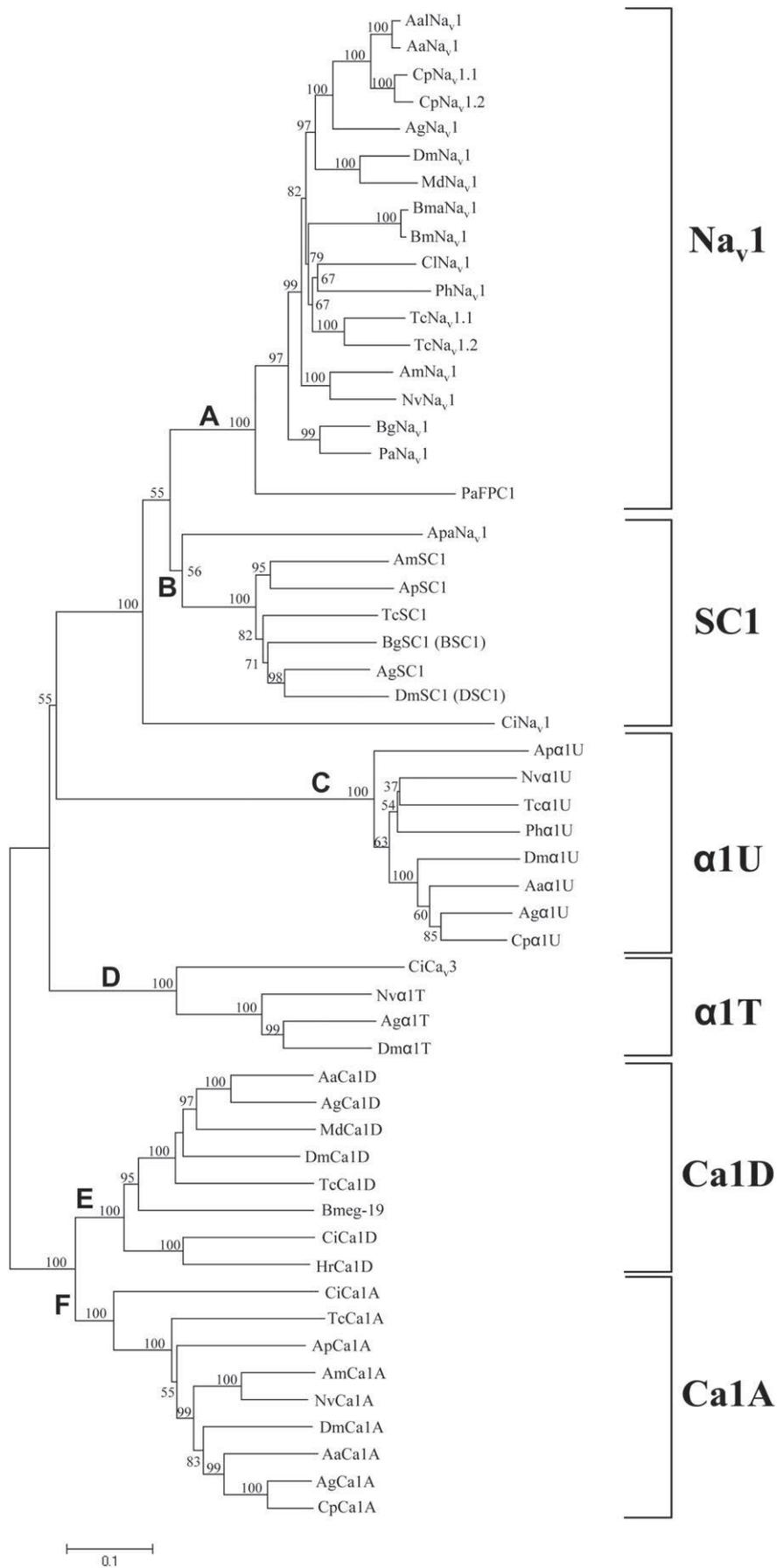


Fig. 4. Tissue specific RT-PCR of PaFPC and Pa Na_v 1. Each PCR products were separated on a 1.5% agarose gel. A. RT-PCR analysis of PaFPC and Pa Na_v 1 transcripts in nerve cord, head, muscle, gut and mushroom-shaped accessory glands (MSG) tissues. Equal amounts of total RNA (5 μg) and cDNA template (1 μl) were used in RT-PCR, as showed by similar intensities of actin (GenBank accession number AY116670). P1L1-S1 and P1L1-R1 were designed on Pa Na_v 1 cDNA sequence to amplify the linker 1 (from 750 bp to 900 bp according the variants exhibiting different combinations of the alternative exons A, I and B). The primers PFL1-S1 and PFL1-R1 were designed on PaFPC cDNA sequence to amplify the linker 1 (510 bp). Amplification of the FMRFamide precursor cDNA (GenBank accession number AY33345) (523 bp) specifically expressed in nervous tissues was used as control for PCR. B. In order to detect the spliced variants expressed in the nerve cord; only 5 μl of PCR products were used, instead of 15 μl in A. As a quantitative control, a similar volume of the PCR product obtained for actin was used.



identifies in *P. americana* can be classified into the para-like sodium channel family without any ambiguity. The monophyletic clade B appeared to be closely related to the clade A. This is confident with the fact that *DSCI* was initially described as a second Na_v channel gene in arthropods (Ramaswami and Tanouye, 1989). The sodium channel CiNa_v1 of *Ciona intestinalis* was found at the base of the clades of Na_v1 and SC1 channels subgroups. This observation strengthens the phylogenetic relations between insect Na_v channels. The monophyletic clade C contains the *Dm α 1U*-orthologous gene subfamily. The last monophyletic clades D, E and F correspond to genes encoding Ca_v channels orthologous to vertebrate Ca_v1 , Ca_v2 and Ca_v3 , respectively.

4. Discussion

Our results report the primary structure of one conventional Na_v channel named *PaNav1* and one putative Na_v channel named *PaFPC* in *P. americana*. Based on their sequence homology with insect Na_v channels, *PaNav1* appears to be a classical para-like Na_v channels whereas *PaFPC* can be considered as novel members of the four-P domain channel family.

Both primary structure and phylogenetic analysis show that *PaNav1* gene is orthologous to *para* gene. The full-length cDNA of the variant *PaNav1* is characterized by the presence of six spliced exons (optional exons: J, K, A, E, F and the mutually exclusive exon G1), which have also been reported in the variant *BgNav6* in *B. germanica* (Song et al., 2004). Moreover, the sequence analysis of PCR products corresponding to homologous regions of *PaNav1* have revealed splicing events equivalent to those ones described in other para-like channels as *DmNav*, *BgNav*, *AgNav* and *BmNav* channels (Davies et al., 2007; Olson et al., 2008; Shao et al., 2009; Song et al., 2004). Interestingly, two amino residues involved in the molecular basis of type II pyrethroids specific action are noticeable in *PaNav1* sequence (G^{1129} and E^{1137}). In fact, the homolog amino residues (G^{1111} in *BgNav1* and K1119E in a mutant of *BgNav1*) increase *BgNav1* channels sensitivity to type II pyrethroids (Du et al., 2009). Additionally our findings show, as it has been reported in *B. germanica*, that extensive alternative splicing of *PaNav1* gene can generate several isoforms within a given tissue (Tan et al., 2002). However, in addition to alternative splicing of *PaNav1* gene, our results show that the molecular diversity of Na_v channels members is also due to the expression of *PaFPC*, a second putative Na_v channel gene.

Several arguments based on the primary structure drive us to infer that *PaFPC1* proteins belong to Na_v channel subfamily. Firstly, the presence of DEKA and EEQD rings strongly suggest that these channels should be selective to Na^+ (Chiamvimonvat et al., 1996; Heinemann et al., 1992; Loughney et al., 1989). Secondly, *PaFPC1* proteins display four positively charged S4 segments conferring voltage dependence properties (Noda et al., 1984). However, the absence of two positive charges in IIS4 and IVS4 and the presence of five charge-conserving substitutions in all four domains may endow *PaFPC1* channel with particular gating properties. While the linker 3 of insect Na_v channels is highly conserved, that on of *PaFPC1* is surprisingly distant (range 28.6–34.3% identical amino acids). In addition, the key residues involved in the fast

inactivation are absent in *PaFPC1* (MFMT motif and docking site) (Goldin, 2003). Hence, these singular structural features suggest that the inactivation process of *PaFPC1* might be very atypical. Moreover, it is interesting to note that molecular similarities between *PaFPC1* and the atypical mammalian Na_x channels are noticeable despite poor sequence identities (34%). Indeed both channels have (1) an unusual reduced size of the ORF, (2) a relative low amino acid identity (around 50%) with other Na_v channels and (3) the absence of the fast inactivation particle IFM (Akopian et al., 1997; Felipe et al., 1994; Gautron et al., 1992; George et al., 1992). In the absence of evidences demonstrating that Na_x gene does not encode a classical Na_v channel, Na_x channels are still considered as members of the subfamily of mammalian Na_v channels (Goldin, 2002).

Based on the phylogenetic analysis, *PaFPC* might represent a putative member of cockroach Na_v channels gene. Indeed, the branch leading to *PaFPC1* evolved earlier than the branch leading to *PaNav1* and *BgNav1*. It is the first time that two genes encoding pore-forming α -subunit of Na_v channels with such striking homology sequence are detected within given insect specie. Comparatively, *BSCI* gene was firstly predicted as a second insect Na_v gene on the basis of its sequence identities with *BgNav1* gene (35%) until the electrophysiological characterization demonstrated that *BSCI* behaved as a Ca^{2+} -selective cation channel (Liu et al., 2001; Zhou et al., 2004). Furthermore, it would be interesting to determine whether the differences between *PaFPC1* and *PaFPC2* are caused by RNA editing, alternative splicing and polymorphism between cockroaches.

To date, Na_v channels genes of arthropods constitute a single gene family. In other invertebrate genomes (*Chordata*, *Cnidaria* and *Annelida*), two or four Na_v genes were identified. Vertebrates genomes contain a higher number of Na_v genes (six to ten genes) (Goldin, 2002). This increase of Na_v genes in these different phyla is correlated to successive duplications of an ancestor Na_v channel gene. This theory has been well documented within vertebrates in which four Na_v genes were already present in the ancestors of teleosts and tetrapods (Lopreato et al., 2001). The striking sequence identity between *PaFPC* and *PaNav1* suggests that they share a common evolutionary origin. Consequently, it is tempting to suggest that a duplication event occurred in the genome of *P. americana* which led to *PaFPC* and *PaNav1* genes. The absence of orthologous *PaFPC* genes in other genome insects and its branching at the basal of *blattaria* para-like channels supports that *PaFPC* has only been conserved in this order. Some other phylum-specific channel genes have been identified in other invertebrate species. In *C. intestinalis*, two nonconventional Na_v channel genes (*CiNav3* and *CiNav4*) sharing high phylogenetic relationship constitute an ascidian-specific branch with any counterpart in other sequenced genomes (Okamura et al., 2005). In *C. elegans*, a class of numerous nonconserved potassium channels was identified. This extensive inventory of nematode-specific potassium channels has been assumed to be an adaptive mechanism to counterpart the 'simple' nervous system (Salkoff et al., 2001).

In conclusion, we have characterized two novel FPC proteins, named *PaNav1* and *PaFPC*, from cockroach CNS. Structural analysis of these proteins indicated that they belong to Na_v channels

Fig. 5. Maximum likelihood tree of invertebrates' four-P domain channel α -subunits. The best nucleotide substitution model (GTR + I + G) was selected by Akaike Information Criteria based on alignment of Na_v channels, Ca_v channels, *Dm α 1U*-orthologous and *DSCI*-orthologous channels. Six monophyletic clades are designated by a letter (A: Na_v channels, B: *DSCI*-orthologous channels or SC1, C: *Dm α 1U*-orthologous channels, D: Ca_v channels orthologous to vertebrate Ca_v3 or α 1T, E: Ca_v channels orthologous to vertebrate Ca_v1 or $\text{Ca}1D$, F: Ca_v channels orthologous to vertebrate Ca_v2 or $\text{Ca}1A$). Each FPC channel subfamily is indicated by a suffix in accordance with the established nomenclatures. The suffixes Na_v1 and Na_v2 , SC1, $\text{Ca}1D$, $\text{Ca}1A$, α 1T and α 1U refer to Na_v channels, *DSCI*-orthologous channels, Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 , *Dm α 1U*-orthologous channels, respectively. For convenient reasons, the accession numbers of the sequences included in the tree and the abbreviation corresponding to species names are listed in the Table S1 of Supplementary materials. Bootstrap values above 50% are indicated and the scale bar represents substitutions per site.

subfamily. Based on their sequences, structural and phylogenetic criteria, we propose that PaNa_v1 corresponds to classical para-like Na_v channels, while PaFPC is a novel Na_v channel described for the first time in insects.

Acknowledgements

We thank Pr. Ke Dong and Pr. Maria Stankiewicz for critically reading the manuscript. We also thank Dr Frank Bosmans, Dr Alain Hamon, Dr Laurence Murillo and Dr Hélène Tricoire-Leignel for continuous discussion and supports during the work. B. Moignot was supported by a doctoral fellowship of the Région Pays de la Loire.

Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ibmb.2009.09.006.

References

- Akopian, A.N., Souslova, V., Sivilotti, L., Wood, J.N., 1997. Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS Lett.* 400, 183–187.
- Blackshaw, S.E., Henderson, L.P., Malek, J., Porter, D.M., Gross, R.H., Angstadt, J.D., Levasseur, S.M., Maue, R.A., 2003. Single-cell analysis reveals cell-specific patterns of expression of a family of putative voltage-gated sodium channel genes in the leech. *J. Neurobiol.* 55, 355–371.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 397–409.
- Chiamvimonvat, N., Perez-Garcia, M.T., Tomaselli, G.F., Marban, E., 1996. Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels. *J. Physiol.* 491 (Pt 1), 51–59.
- Davies, T.G., Field, L.M., Usherwood, P.N., Williamson, M.S., 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol. Biol.* 16, 361–375.
- Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., Lee, J.E., Khambay, B., Dong, K., 2009. Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 266–272.
- Felipe, A., Knittle, T.J., Doyle, K.L., Tamkun, M.M., 1994. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J. Biol. Chem.* 269, 30125–30131.
- Gautron, S., Dos Santos, G., Pinto-Henrique, D., Koulakoff, A., Gros, F., Berwald-Netter, Y., 1992. The glial voltage-gated sodium channel: cell- and tissue-specific mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7272–7276.
- George Jr., A.L., Knittle, T.J., Tamkun, M.M., 1992. Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4893–4897.
- Goldin, A.L., 2002. Evolution of voltage-gated Na⁽⁺⁾ channels. *J. Exp. Biol.* 205, 575–584.
- Goldin, A.L., 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 284–290.
- Hanrahan, C.J., Palladino, M.J., Ganetzky, B., Reenan, R.A., 2000. RNA editing of the *Drosophila* para Na⁽⁺⁾ channel transcript. Evolutionary conservation and developmental regulation. *Genetics* 155, 1149–1160.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., Numa, S., 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441–443.
- Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Hille, B., 1989. The Sharpey–Schaffer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Quart. J. Exp. Physiol.* 74, 785–804.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Lapied, B., Molecot, C.O., Pelhate, M., 1990. Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J. Exp. Biol.* 151, 387–403.
- Lavialle-Defaix, C., Gautier, H., Defaix, A., Lapied, B., Grolleau, F., 2006. Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 96, 2437–2450.
- Liu, Z., Chung, I., Dong, K., 2001. Alternative splicing of the BSC1 gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 703–713.
- Lopreato, G.F., Lu, Y., Southwell, A., Atkinson, N.S., Hillis, D.M., Wilcox, T.P., Zakon, H.H., 2001. Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7588–7592.
- Loughney, K., Kreber, R., Ganetzky, B., 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58, 1143–1154.
- Lu, B., Su, Y., Das, S., Liu, J., Xia, J., Ren, D., 2007. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell* 129, 371–383.
- Maelicke, A., 1988. Structural similarities between ion channel proteins. *Trends Biochem. Sci.* 13, 199–202.
- Nagahora, H., Okada, T., Yahagi, N., Chong, J.A., Mandel, G., Okamura, Y., 2000. Diversity of voltage-gated sodium channels in the ascidian larval nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 558–564.
- Nash, H.A., Scott, R.L., Lear, B.C., Allada, R., 2002. An unusual cation channel mediates photic control of locomotion in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 12, 2152–2158.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., et al., 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.
- Okamura, Y., Nishino, A., Murata, Y., Nakajo, K., Iwasaki, H., Ohtsuka, Y., Tanaka-Kunishima, M., Takahashi, N., Hara, Y., Yoshida, T., Nishida, M., Okado, H., Watari, H., Meinertzhagen, I.A., Satoh, N., Takahashi, K., Satou, Y., Okada, Y., Mori, Y., 2005. Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol. Genomics* 22, 269–282.
- Okamura, Y., Ono, F., Okagaki, R., Chong, J.A., Mandel, G., 1994. Neural expression of a sodium channel gene requires cell-specific interactions. *Neuron* 13, 937–948.
- Olson, R.O., Liu, Z., Nomura, Y., Song, W., Dong, K., 2008. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 604–610.
- Park, Y., Taylor, M.F., Feyereisen, R., 1999. Voltage-gated sodium channel genes hscp and hDSC1 of *Heliothis virescens* F. genomic organization. *Insect Mol. Biol.* 8, 161–170.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Ramaswami, M., Tanouye, M.A., 1989. Two sodium-channel genes in *Drosophila*: implications for channel diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2079–2082.
- Salkoff, L., Butler, A., Fawcett, G., Kunkel, M., McArdle, C., Paz-y-Mino, G., Nonet, M., Walton, N., Wang, Z.W., Yuan, A., Wei, A., 2001. Evolution tunes the excitability of individual neurons. *Neuroscience* 103, 853–859.
- Salkoff, L., Butler, A., Wei, A., Scavarda, N., Giffen, K., Ifune, C., Goodman, R., Mandel, G., 1987. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science* 237, 744–749.
- Shao, Y.M., Dong, K., Tang, Z.H., Zhang, C.X., 2009. Molecular characterization of a sodium channel gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 145–151.
- Smith, T.J., Lee, S.H., Ingles, P.J., Knipple, D.C., Soderlund, D.M., 1997. The L1014F point mutation in the house fly Vssc1 sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 807–812.
- Snutch, T.P., Monteil, A., 2007. The sodium “leak” has finally been plugged. *Neuron* 54, 505–507.
- Song, W., Liu, Z., Tan, J., Nomura, Y., Dong, K., 2004. RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *J. Biol. Chem.* 279, 32554–32561.
- Strong, M., Chandy, K.G., Gutman, G.A., 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol. Biol. Evol.* 10, 221–242.
- Tan, J., Liu, Z., Nomura, Y., Goldin, A.L., Dong, K., 2002. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *J. Neurosci.* 22, 5300–5309.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., Numa, S., 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* 293, 93–96.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Warmke, J.W., Reenan, R.A., Wang, P., Qian, S., Arena, J.P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G.J., Van der Ploeg, L.H., Ganetzky, B., Cohen, C.J., 1997. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 110, 119–133.
- Yeh, E., Ng, S., Zhang, M., Bouhours, M., Wang, Y., Wang, M., Hung, W., Aoyagi, K., Melnik-Martinez, K., Li, M., Liu, F., Schaffer, W.R., Zhen, M., 2008. A putative cation channel, NCA-1, and a novel protein, UNC-80, transmit neuronal activity in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 6, e55.
- Yu, F.H., Yarov-Yarovsky, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57, 387–395.
- Zhorov, B.S., Tikhonov, D.B., 2004. Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. *J. Neurochem.* 88, 782–799.
- Zhou, W., Chung, I., Liu, Z., Goldin, A.L., Dong, K., 2004. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron* 42, 101–112.

Tableau des transcrits codant des sous-unités de canaux ioniques à quatre domaines transmembranaires

| Specie Names | Prefix | Nav | DSCI orthologous channels | α 1U orthologous channel | Cav1 (Ca1D) | Cav2(Ca1A) | Cav3(α 1T) |
|---------------------------------------|--------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | Ap | | XM001943495 | XM001942720 | | XM001943894 | |
| <i>Aedes aegypti</i> | Ae | AY663385 | | XM001652186 | XM001661498 | XM001648645 | |
| <i>Aedes albopictus</i> | Aa | AY663384 | | | | | |
| <i>Aiptasia pallida</i> | Apa | AF041851 | | | | | |
| <i>Anopheles gambiae</i> | Ag | AM422833 | XM308670.4 | XM318373.4 | EF595743 | XM312358.4 | XM312434 |
| <i>Apis mellifera</i> | Am | XM392548 | XM395121.3 | | | XM392298 | |
| <i>Aplysia californica</i> | Ac | ACU66915 | | | | | |
| <i>Bdellooura candida</i> | Bc | U93074 | | | | | |
| <i>Blattella germanica</i> | Bg | BGU73584 | AF312365 | | | | |
| <i>Bombys mandarina</i> | Bma | EU688971 | | | | | |
| <i>Bombyx mori</i> | Bm | EU822499 | | | | | |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | Bf | XM002244393 | | | | | |
| <i>Brugia malayi</i> | Bmal | | | XM001900420 | XM001899329 | | XM001892541 |
| <i>Caenorhabditis briggsae</i> | Cb | | | | XM001670407 | XM001675815 | XM001677121 |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | Ce | | | DQ917241 (nca-21) DQ917240 (nca1) | NM171379.2 | NM171639.3 | NM171733.2 AY322480 |
| <i>Cimex lectularius</i> | Cl | FJ031996 | | | | | |
| <i>Ciona intestinalis</i> | Ci | XM002122068 XM002123637 XM002125288 XM002123120 | | | XM002123828 | XM002123935 | XM002122389 |
| <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> | Cq | BN001089.2 EU817516 | | XM001843250 | | XM001846856 | |
| <i>Cyanea capillata</i> | Cc | L15445 | | | | U93075 | |
| <i>Drosophila ananassae</i> | Da | XM001966110 | XM001960375 | XM001965523 | XM001961385 | XM001967332 | XM001963354 |
| <i>Drosophila erecta</i> | De | XM001977899 | XM001976656 | XM001978144 | XM001968986 | XM001977016 | XM001978377 |
| <i>Drosophila grimshawi</i> | Dg | XM001992475 | XM001987505 | XM001991896 | XM001988735 | XM001991841 | XM001992565 |
| <i>Drosophila mojavensis</i> | Dmo | XM002010801 | | XM002009553 | | | XM002011101 |
| <i>Drosophila persimilis</i> | Dp | | | | XM002023245 | | |
| <i>Drosophila pseudoobscura</i> | Dps | XM001354641 | XM002138166 | XM001354785 | XM001356157 | | XM002136340 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Dm | M32078 | DQ466888 | AY160083 | NM165146 | DMU55776 | NM132068.2 |
| <i>Drosophila sechellia</i> | Ds | | XM002043113 | XM002042749 | XM002038102 | XM002044472 | XM002036784 |
| <i>Drosophila simulans</i> | Dsim | | | | XM002079570 | | |
| <i>Drosophila virilis</i> | Dv | XM002054976 | XM002059439 | XM002054901 | XM002057497 | XM002055496 | XM002056812 |
| <i>Drosophila willistoni</i> | Dw | XM002071185 | XM002061383 | XM002064380 | XM002066374 | XM002071699 | XM_002075361 |
| <i>Drosophila yakuba</i> | Dy | XM002100781 | XM002092876 | XM002100525 | XM002089940 | XM002101313 | XM002099834 |
| <i>Halocynthia roretzi</i> | Hr | D17311 AB042806 | | | AB013604.2 | | |
| <i>Hydra magnipapillata</i> | Hm | | XM002161660 | XM002161427 | | XM002159844 | |
| <i>Loligo bleekeri</i> | Lb | D14525 | | | | D86600.2 | |
| <i>Loligo vulgaris</i> | Lv | L19979 | | | | | |
| <i>Lymnaea stagnalis</i> | Ls | | | | AF484080 | AF484083 | AF484084 |
| <i>Musca domestica</i> | Md | AY834743 | | | Z31723 | | |
| <i>Mesobuthus martensii</i> | Mm | AY322171.2 | | | | | |
| <i>Mya arenaria</i> | Ma | AY847740 | | | | | |
| <i>Nasonia vitripennis</i> | Nv | NM001134918 | | XM001600480 | | XM001604842 | XM001604352 |
| <i>Nematostella vectensis</i> | Nve | XM001638810 | | XM001637187 | XM001639004 | | |
| <i>Ornithoctonus huwena</i> | Oh | DQ839489 | | | | | |
| <i>Pediculus humanus</i> | Ph | AY191155 | | 118.m003372 (Vector base) | | | |
| <i>Polyorchis penicillatus</i> | Pp | AF047380 | | | | | |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | Sm | | | | AF361884 | AF361883 | |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | Spu | XM788291.2 | | | XM001181450 | | |
| <i>Stylophora pistillata</i> | Spi | | | | U64465 | | |
| <i>Tribolium castaneum</i> | Tc | XM962937 XM962927.2 | XM970570.2 | XM001812068 | XM001807478 | XM967815 | |
| <i>Trichoplax adhaerens</i> | Ta | | | | XM002108894 | | XM002109508 |
| <i>Varroa destructor</i> | Vd | AY259834 | | | | | |

PUBLICATION N°2

**Article publié dans
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**

(Sous presse à la date du dépôt du manuscrit de thèse)

How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite, DCJW, in insect pacemaker neurons ?

Authors : Céline Laviaille-Defaix, Bénédicte Moignot, Christian Legros and Bruno Lapied

Address : Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France. (CLD, BM, CL & BL)

Running title: Intracellular regulation modifies the DCJW efficiency.

Corresponding author: Professor B. Lapied : Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France.

Fax number : +33 241 73 52 15, Telephone number : +33 241 73 54 38,

e-mail : bruno.lapied@univ-angers.fr

Number of text pages: 34

Number of figures: 6

Number of references: 42

Number of words in the *Abstract*: 240

Number of words in the *Introduction*: 632

Number of words in the *Discussion*: 1449

Abbreviations : 4-AP, 4-aminopyridine; BAPTA, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; CaM, calmodulin; CaM-kinase II, calcium-calmodulin-dependent protein kinase II; DUM, dorsal unpaired median; DCJW, decarbomethoxylated compound; DMSO, dimethylsulfoxide; EGTA, ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-acetic acid; KN-62, 1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosil]-4-phenylpiperazine; PP2B, protein phosphatase 2B; TAG, terminal abdominal ganglion; W7, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride.

Recommended section : Neuropharmacology

Abstract

Decarbomethoxylated JW062 (DCJW), the active component of oxadiazine insecticide DPX-JW062 (Indoxacarb), was tested on two inward voltage-dependent sodium currents (named INa1 and INa2) expressed in short-term cultured dorsal unpaired median neurons of the cockroach *Periplaneta americana*. Under whole-cell voltage-clamp conditions, application of DCJW resulted in a biphasic dose-dependent inhibition of the global sodium current amplitude illustrating the different sodium channels sensitivity to DCJW. INa2 was less sensitive to DCJW ($IC_{50}=1.6 \mu\text{M}$) compared to INa1 ($IC_{50}=1.7 \text{ nM}$). Although previous study demonstrated that INa1 was regulated by cAMP/PKA cascade, we showed that INa2 was mainly regulated in an opposite way by the activation of a calcium-calmodulin-dependent protein phosphatase 2B (PP2B) and a calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaM-Kinase II). Furthermore, we demonstrated that activation of CaM-Kinase II by intracellular calcium *via* the calcium-calmodulin complex affected the sensitivity of Na2 channels to DCJW. Increasing intracellular calcium concentration and/or using BAPTA (calcium chelator), W7 (calmodulin inhibitor), cyclosporine A (PP2B inhibitor) and KN-62 (CaM-Kinase II inhibitor), we revealed that activation of CaM-Kinase II was involved in the modulation of the voltage dependence of steady-state inactivation and that CaM-Kinase II pathway activated by elevation of intracellular calcium concentration might render Na2 channels about 3000-fold more sensitive to DCJW. These results indicated that manipulating specific intracellular signalling pathways involved in the regulation of sodium channels could have fundamental consequences for the sensitivity of insect towards insecticides. This opens exciting research area that could improve the efficiency of insecticides.

Introduction

Because voltage-dependent sodium channels are critical elements of electrical activity in excitable cells, they are important targets of diverse neuroactive compounds including pyrethroids and pyrazoline-type insecticides (Dong, 2007; Soderlund, 2008; Silver et al. 2009). Synthetic pyrethroid insecticides, which derive from natural compounds (the pyrethrins), have been used for more than 40 years and account for 25% of the world-wide insecticide market, owing to their potency and rapid insect intoxication, their low toxicity for mammals and limited soil persistence. However, due to intensive use of insecticides in pest control, many insect populations have developed resistance to these compounds. Among the mechanisms of resistance to pyrethroids, the knockdown resistance (*kdr*) and super-*kdr* are the most well-documented mechanisms which result from one or several point mutations in the insect voltage-dependent sodium channel protein (Davies et al. 2007; Dong, 2007; Soderlund, 2008).

In this context, new insect-control compounds that are active against resistant pest strains have been developed. This latest generation of insecticides includes the pyrazoline-type insecticide indoxacarb (Silver and Soderlund, 2005a; Silver et al. 2009). Indoxacarb, developed by E.I. DuPont Company in the 1990s, was the first commercial insecticide known to act on the voltage-dependent sodium channels (McCann et al., 2001; Siver et al. 2009). In insects, this compound acts as a pro-insecticide and is rapidly bioactivated by a hydrolase to produce the N-decarbomethoxyllated metabolite, DCJW, which is the more potent insecticide known i) to block sodium dependent action potentials in lepidopteran (*Manduca sexta*) larval motor nerve preparation (Wing et al., 1998; Wing et al., 2000) and ii) to induce a dose-dependent inhibition of voltage-dependent sodium current in cockroach *Periplaneta americana* neurons (Lapied et al., 2001; Zhao et al. 2005). By contrast, while the mammalian sodium channels isoforms display differential sensitivity to pyrazoline-type insecticide (Zhao et al., 2003; Silver and Soderlund,

2005b; Silver and Soderlund, 2006), the inability to perform this metabolic bioactivation to DCJW is one of the principal cause of the very favourable selective insect toxicity of indoxacarb (McCann et al., 2001; Silver and Soderlund, 2005a).

However, some studies already report the emergence of insect insensitivity strains to indoxacarb. The development of indoxacarb tolerance can be induced by other known resistance mechanisms such as a reduction of cuticular penetration or a modification of P450 monooxygenase-mediated detoxification (Sugiyama et al., 2001; Shono et al., 2004). More recently, Sayyed and Wright (2006) identified an esterase-associated mechanism of indoxacarb resistance in a field population of diamondback moth (*Plutella xylostella*). Furthermore, organophosphate-resistant obliquebanded leafroller (*Choristoneura rosaceana*) collected from apple orchards that had never been treated with indoxacarb exhibited a very low sensitivity (>700-fold) to indoxacarb application (Ahmad et al., 2002). In addition, very recently, it has been revealed that i) the posttranscriptional modifications (RNA editing or alternative splicing) and ii) the intracellular regulation of plasma membrane receptor and ion channels targeted by insecticides, have been described as new process to affect the sensitivity of insecticides (Courjaret and Lapied, 2001; Es-Salah et al., 2008; Lapied et al., 2009). Consequently, we have investigated, in the present study, the influence of sodium channel intracellular regulation in the efficiency of DCJW using whole-cell patch-clamp technique adapted on short-term cultured insect pacemaker neurons (Grolleau and Lapied, 2000; Wicher et al., 2001). In previous studies, we have demonstrated the co-existence of two inward voltage-dependent sodium currents, named INa1 and INa2 in the same insect pacemaker neuron (Lavialle-Defaix et al., 2006). We have reported here, that these two currents differ in their sensitivity to DCJW, INa2 being 1000-fold less sensitive than INa1. Furthermore, we have demonstrated that activation of intracellular calcium-dependent phosphorylation process involving CaM-Kinase II, stimulates the transition from low

DCJW sensitivity to very high DCJW sensitivity of Na² channel. This fundamental intracellular regulation which strongly alters DCJW sensitivity may open an exciting research field to propose new strategies of insecticide use.

Methods

Cells isolation

Experiments were performed on DUM neuron cell bodies isolated from the midline part of the terminal abdominal ganglia (TAG) of the nerve chord of adult male cockroach (*Periplaneta americana*). Insects were obtained from our laboratory stock colony bred at 29°C (photoperiod of 12-h light / 12-h dark). Animal care and handling procedures were in accordance with French institutional and national health guidelines. Animals were immobilized ventral side up on a dissection dish. The ventral cuticle and accessory glands were removed to allow access to the ventral nerve cord. The abdominal nerve cord and its TAG, carefully dissected under a binocular microscope, were placed in normal cockroach saline containing (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl₂, 4 MgCl₂, 50 sucrose, 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of adult DUM neuron cell bodies was performed under sterile conditions using enzymatic digestion (collagenase type I, Worthington, Lakewood, NJ) and mechanical dissociation of the median part of the TAG as described previously (Lapied et al., 1989). Then, the isolated cell bodies were incubated at 29°C for 24 h before electrophysiological experiments were carried out.

Whole-cell recordings and data analysis

The whole-cell patch-clamp recording configuration was used to record voltage-dependent sodium currents (voltage-clamp mode) at room temperature (20-22°C). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10 ; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) using a PP83 puller (Narishige, Tokyo, Japan). Pipettes had a resistance ranging from 0.8 to 1 M Ω when filled with internal solutions (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected

before the formation of a gigaOhm seal ($>5G\Omega$). Voltage-dependent sodium currents were recorded with an Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) amplifier, filtered at 5 kHz using a 4-pole lowpass Bessel filter. Data were stored on-line on the hard disk of a PC computer (Elonex, pentium 733 MHz, sampling frequency 33 kHz) connected to a 16-bit analog-to-digital converter (Digidata 1322A, Axon Instruments). The pClamp package (version 8.0.2, Axon Instruments) was used for data acquisition and analysis. DUM neuron cell bodies were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -90 mV and 30-ms test pulses were applied at a frequency of 0.2 Hz. Although leak and capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents were performed with an on-line P/6 protocol provided by pClamp.

Data analysis

Data analysis, including fitting procedures, was performed using the software Prism 4 (Graph Pad software, San Diego, CA). Data are presented as mean \pm s.e.m. (standard error mean). Information about which pairs of means were significantly different, and which were not, were given by using a Student's t-test for multiple comparison procedure. In this case, statistical analysis was expressed as non significant (ns): $p>0.05$ and significantly different*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$. The equation used to fit the sigmoid curve was:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + (\text{IC}_{50}/X)^P) \quad (\text{Eq. 1})$$

where Y was the percentage inhibition of the peak inward sodium current; Min and Max, the minimal and maximal values; X, the DCJW or TTX concentration; IC_{50} , the concentration that produces 50% of inhibition of the peak inward sodium current and P the slope factor.

The biphasic DCJW curve was fitted by two sites competition equation:

$$\begin{aligned}
 \text{Part1} &= (\text{Max}-\text{Min}) \text{Fraction 1} / (1+ X / \text{IC}_{501}) \\
 \text{Part2} &= (\text{Max}-\text{Min}) (1-\text{Fraction 1}) / (1+ X / \text{IC}_{502}) \\
 Y &= \text{Min} + \text{Part1} + \text{Part2}
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 2}$$

X correspond to the DCJW concentration, IC_{501} and IC_{502} are the concentrations that produce 50% of the INa1 and INa2 inhibition respectively. Min and Max are the minimal and maximal values. Fraction 1 is the fraction of all sites that have affinity 1. Y was the percentage inhibition of the peak inward sodium current.

The voltage dependence of steady-state inactivation was determined using a two-step protocol in which a conditioning pulse was applied from a holding potential of -90 mV to a range of potentials between -100 and + 40 mV in 10 mV increments for 500 ms, followed by 1ms at -90 mV before the test pulse to 0 mV for 30 ms. The peak current amplitude during the test pulses were normalized to the peak current amplitude during the first test pulse, plotted against the potential of the conditioning pulse, and fit with the following Boltzmann equation :

$$I/I_{\text{max}} = 1/\{1+\exp[(V-V_{0.5})/k]\} \tag{Eq. 3}$$

where I was the peak current, I_{max} was the maximum peak current from a holding potential of -90 mV, $V_{0.5}$ was the potential at which half current was inactivated, V is the potential of the conditioning pulse and k corresponded to the slope factor.

Solutions and chemicals

The superfusing solution and the internal pipette solution used to record inward sodium currents were designed to eliminate any interference from calcium and potassium currents as already described elsewhere (Lapied et al., 1990; Laviaille-Defaix et al., 2006). The extracellular solution contained (in mM): 80 NaCl, 100 TEA-Cl, 3.1 KCl, 2 CaCl₂ (except when otherwise stated), 7 MgCl₂, 1 CdCl₂, 5 4-AP and 10 HEPES buffer, pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Patch-clamp

electrodes were filled with internal solution containing (in mM): 90 CsCl, 70 CsF, 15 NaCl 1 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES buffer and 3 ATP-Mg, pH was adjusted to 7.4 with CsOH. With this internal solution, the use of 5 mM EGTA allowed the intracellular-free calcium to be buffered at very low level (< 100 nM, measured by calcium-selective electrode, model 93-20, Orion Research, Boston, MA, USA) To test the effects of high and low intracellular calcium concentrations on the peak inward sodium current, EGTA was replaced by 1 μM of calcium or 10 mM BAPTA, respectively. All compounds were purchased from Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France). DCJW (generous gift of K.D. Wing from Dupont Crop Protection, Newark, USA) stock solution (10 mM) and KN-62 were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Final dilution contained at most 0.1% DMSO. This concentration of solvent was found to be without effect on electrophysiological properties of DUM neurons. All compounds are applied intracellularly except DCJW and caffeine that are prepared in the external solution and applied outside the membrane, by a gravity perfusion system (10 ml/h).

Results

Effects of DCJW on INa1 and INa2 in DUM neuron cell body.

As illustrated in Fig. 1A, the global sodium current expressed in DUM neuron cell body was completely blocked by bath application of tetrodotoxin (TTX) in a dose-dependent manner with a maximum of inhibition at 10 μ M ($IC_{50} = 1.96$ nM, Fig 1A). All experiments were carried out with 3 mM ATP added in the patch pipette solution to block the participation of the maintained LVA current permeable to calcium and sodium identified on DUM neurons (Defaix and Lapied, 2005). Interestingly, an increase of internal ATP concentration from 2 mM (taken from Lapied et al. 2001) to 3 mM (present study) allowed to reveal two distinct components depending on DCJW concentration (figure 1B). Whereas the semi-logarithmic curve of the global INa reduction induced by bath application of DCJW described a monophasic curve fitted by the Hill equation ($IC_{50} = 29$ nM, Eq. 1 from Lapied et al. 2001) in the presence of 2 mM ATP, the dose-response curve obtained with 3 mM added in the patch pipette solution was best described by a biphasic curve according to the equation “two site competition” (Fig 1B, $IC_{501} = 1.5$ nM and $IC_{502} = 2.5$ μ M, Eq. 2). These first results seemed to indicate that the two sodium channels, expressed in DUM neuron cell bodies (Lavialle-Defaix et al., 2006), were also differentiated on the basis of their sensitivity to intracellular ATP concentration which thereby unmask different DCJW sensitivity. To substantiate this hypothesis, additional experiments were designed to study the effects of DCJW on INa1 and INa2 in isolation. Figure 1C shows comparative semi-logarithmic curves of INa1 and INa2 inhibition induced by bath application of DCJW. The inhibitory effect of DCJW on INa2 was obtained after bath application of 10 μ M L-glutamate known to produce full inhibition of INa1 (Lavialle-Defaix et al., 2006). The effect of DCJW on INa1 was obtained by subtraction of L-glutamate-resistant INa from the corresponding global sodium current (Fig 1B, close squares). In both cases, the data were best fitted through the mean

data points according to the Hill equation (Eq. 1). The IC_{50} values estimated for DCJW were 1.7 nM and 1.6 μ M for INa1 and INa2, respectively (Fig 1C). From the comparative superimposed semi-logarithmic curves illustrated in Fig. 1D and E, we demonstrated that DCJW inhibited two distinct DUM neuron sodium channels mediating INa1 and INa2, reflecting the plateau between the two parts of the curve (Fig. 1B, E). These results clearly show that INa2 was about 1000-fold less sensitive to DCJW than INa1. After 1 μ M DCJW treatment, known to produce full inhibition of INa1 (Fig 1C), bath application of L-glutamate did not produce any additional effect (Fig 1F). These results indicated that i) INa1 was completely inhibited and ii) higher concentration of DCJW was needed to block the residual L-glutamate-resistant inward sodium current, corresponding to INa2 (Fig. 1E).

Calcium-dependent intracellular pathway modulates INa2 in DUM neurons.

Because previous electrophysiological studies reported that i) INa1 was regulated by cAMP/PKA cascade (Lavialle-Defaix et al., 2006) and ii) global INa was also affected by intracellular calcium concentration (Grolleau et al., 2001), we then investigated the participation of the calcium-dependent intracellular messenger pathways in the regulation of INa2. All experiments were carried out with saline containing 10 μ M L-glutamate to inhibit selectively INa1, as previously reported (Lavialle-Defaix et al., 2006). To test whether calcium and calcium-calmodulin complex (CaM) modulated INa2, we first examined the effect of intracellular perfusion of the calcium chelator BAPTA on INa2 amplitude. As illustrated in Fig 2A, 10 mM BAPTA added in the pipette solution produced a slight reduction of INa2 amplitude (residual INa2 amplitude was 87.4 ± 1.7 %; n=6). Similar effect was observed when the CaM inhibitor W7 (0.5 mM) was added in the pipette solution (residual INa2 amplitude was 88.7 ± 2.3 %; n=7).

By contrast, if relatively high calcium concentration was introduced into the DUM neuron cell body by adding 1 μM calcium into the patch pipette, INa2 amplitude was strongly reduced (residual INa2 amplitude was $64.6 \pm 4.9\%$, $n=9$). These results suggested that INa2 was sensitive to change in intracellular calcium concentration. Because it is known in DUM neurons that calcium acting through the calcium-receptor protein CaM is an important signal that regulates diverse enzymatic activities such as calcium/CaM-dependent protein phosphatase (i.e., calcineurin) and calcium/CaM-dependent protein kinase type II, CaMKinase II (Courjaret and Lapied, 2001), the participation of PP2B and CaM-Kinase II in the regulation of INa2 was further examined using cyclosporin A, a PP2B inhibitor and KN-62, which binds to CaMKinase II and blocks its activation by calmodulin. Intracellular application of cyclosporin A (100 nM) decreased INa2 amplitude (residual current was $79.8 \pm 4.2\%$, $n=10$, Fig 2B). By contrast, KN-62 (10 μM) produced an increase of INa2 amplitude ($111.1 \pm 3.9\%$, $n=6$, Fig 2B). These results indicated that PP2B and CaM-Kinase II regulated INa2 amplitude in an opposite way in DUM neurons. In other words, PP2B and CaM-Kinase II could up- and down-regulate INa2 amplitude, respectively. We next tested the effect of caffeine, known to stimulate the release of calcium from intracellular stores (Courjaret et al., 2003; Gautier et al., 2008), on INa2 while maintaining PP2B and/or CaMKinase II inactivated by applying intracellularly 100 nM cyclosporin A and/or 10 μM KN-62, respectively. In these conditions, bath application of caffeine (10 mM) produced stronger effect on INa2 amplitude in the presence of cyclosporin A added in the pipette solution (residual current was $64.0 \pm 2.2\%$, $n=5$, compared to $79.8 \pm 4.2\%$ recorded in the absence of caffeine, $n=10$, Fig 2B). From these results, it is reasonable to hypothesize that the caffeine-induced stronger decreased of INa2 was caused by the activation of CaMKinase II *via* the release of calcium from internal store. This was substantiated by the absence of any stronger inhibitory

effect of caffeine on INa2 amplitude when 10 μ M KN-62 was added in the pipette solution. (% of residual current was 96.7 ± 3.3 %, n=3, Fig 2B). All together, these results indicated that INa2 was modulated by intracellular calcium-dependent pathway that involved both CaM-Kinase II and PP2B.

Do calcium-dependent intracellular regulation of INa2 affect the effect of DCJW ?

Our previous work performed on insect DUM neurons demonstrated that insecticide efficiency was altered by calcium-dependent phosphorylation/dephosphorylation process (Courjaret and Lapied, 2001; Lapied et al., 2009). Then, to study if the DCJW-induced INa2 inhibition could be affected by changing the internal calcium concentration, we first examined the effect of decreasing the internal calcium concentration. High calcium buffering previously provided reliable argument for the intracellular calcium sensitivity of ion channels and/or membrane receptors in numerous preparations. It was demonstrated that all the calcium near the inner face of the membrane was not adequately buffered on a millisecond time scale by the calcium chelator, EGTA. By contrast, it was known that BAPTA was a faster and more efficient chelator (Marty and Neher, 1985). Internal application of BAPTA (10 mM) through the patch pipette significantly decreased the inhibitory effect of bath application of DCJW tested at 10 μ M on INa2 (21.6 ± 3.1 %, n=5; Fig 3A) compared to control condition (53.1 ± 7.3 %, n=6; Fig 3A). Similar effects were obtained with intracellular application of 0.5 mM W7 (22.5 ± 4.9 %, n=4; Fig. 3A). Moreover, the effect of different concentrations of DCJW was tested on INa2 amplitude when intracellular calcium concentration was decreased (using 10 mM BAPTA in the pipette solution) or increased by using high intracellular calcium concentration (1 μ M) added in the pipette solution (Fig 3B). While BAPTA reduced the effect of DCJW on INa2 ($IC_{50}=6.69$ μ M,

Fig 3B), it was interesting to note that an elevation of intracellular calcium concentration (1 μ M) increased the DCJW-induced INa2 reduction and shifted the sigmoid curve toward lower DCJW concentration ($IC_{50}=0.48$ nM) compared to control ($IC_{50} = 1.6$ μ M) (Fig 3B). These results indicated that intracellular calcium rise strongly increases Na2 channel sensitivity to DCJW. We also examined the effect of bath application of DCJW on INa2 amplitude by modification of extracellular calcium concentration. Figure 3C illustrates that an elevation of extracellular calcium concentration (from 2 mM to 9 mM) does not significantly affect the effect of DCJW (48.0 ± 5.5 % (n=5), compared to control condition (53.1 ± 7.3 % (n=6), $p>0.05$).

Because we demonstrated in this study that PP2B and CaM-Kinase II modulated Na2 current (Fig 2), we also examined the possible regulatory role of these phosphatase and kinase on DCJW-induced INa2 inhibition. Figures 4A and B, shows typical examples of normalized Na2 current amplitude recorded as a function of time in the presence of cyclosporine A and KN-62. When cyclosporin A (100 nM) was applied intracellularly through the patch pipette, the inhibitory effect of bath application of DCJW on INa2 amplitude (43.1 ± 8.1 %, n=6) was not significantly different compared to the control (53.1 ± 7.3 %, n=6, $p>0.05$, Fig 4A, C). By contrast, as indicated in Figure 4B,C, the inhibitory effect of DCJW was strongly reduced by KN-62 (8.8 ± 3.2 %, n=7, $p<0.05$). These results suggested that direct and/or indirect phosphorylation of Na2 channel by CaM-Kinase II was essential for maintaining the inhibitory effect of DCJW. This was also confirmed when bath application of DCJW (1 μ M) was tested in the presence of KN-62 and/or high internal calcium concentration (1 μ M), both added in the pipette solution, on INa2 amplitude. In this condition, the inhibitory effect of DCJW on INa2 amplitude (16.2 ± 0.7 %; n=5) was also strongly reduced compared to the effects observed without KN-62 (Fig 3B and 4D).

Involvement of CaM-Kinase II improves Na₂ sensitivity to DCJW.

Previous studies showed that the blocking action of the pyrazoline-type insecticides on sodium channels was voltage-dependent in crayfish giant axons and neurons isolated from thoracic ganglion of American cockroach, with a selective binding to the slow-inactivated state of the channel (Salgado, 1992; Zhao et al., 2005; Silver et al. 2009). In DUM neuron, however, such a mechanism has never been clearly demonstrated. According to these previous results, we hypothesized that the CaM-Kinase II-induced modification of the inhibitory effect of DCJW observed on Na₂ channels could result from change of sodium channel state regulated by CaM-Kinase II. Our results described above indicated that inhibition of CaM-Kinase II i) increased I_{Na2} amplitude (Fig. 2B) and ii) strongly reduced the inhibitory effect of DCJW on Na₂ (Fig. 4A,C). By contrast, activation of CaM-Kinase II by intracellular calcium rise decreased I_{Na2} amplitude but increased the DCJW inhibitory effect (Fig 2A, 3B and 4B, C). From these results it was tempting to suggest that CaM-Kinase II might affect specific biophysical parameter of Na₂ channel, which thereby increased sensitivity to DCJW. To substantiate this hypothesis, additional experiments were designed to study the influence of steady-state holding potential change on the inhibitory effect of DCJW. As illustrated in Fig 5A, when 50 % of Na₂ channels were inactivated by changing the steady-state holding potential from -90 mV to -40 mV (Lavialle-Defaix et al., 2006), the inhibitory effect of bath application of DCJW on I_{Na2} amplitude was more pronounced (82.3 ± 3.4 %; n=7) compared to control condition (53.1 ± 7.3 % (n=6); holding potential of -90 mV). From these last results the emerging question concerned the possible physiological implication of CaM-Kinase II on the voltage dependence of the steady-state inactivation parameter of Na₂. As shown in Fig. 5B, intracellular application of KN-62 significantly shifted the voltage-dependence of steady-state inactivation toward more positive

potentials. In this case, $V_{0.5}$ corresponding to the potential at which half the Na₂ channels were inactivated was -41.3 ± 0.1 mV ($n = 11$) compared to -31.5 ± 0.2 mV ($n = 6$) calculated in the presence of KN-62 ($p < 0.05$). These results indicated that CaM-Kinase II activation facilitated inactivated state of Na₂ channels, which thereby potentiated the inhibitory effect of DCJW.

Discussion

Calcium-dependent intracellular signalling pathways regulate DUM neuron INa2

Previous studies have reported that DUM neuron cell bodies expressed two types of voltage-dependent sodium currents. The global INa has been mainly dissociated by means of L-glutamate sensitivity (i.e., a neurotransmitter acting selectively through metabotropic glutamate receptor III activation (Laviaille-Defaix et al., 2006)) and intracellular regulation process. According to these results, the two currents have been designated INa1 and INa2 for L-glutamate-sensitive and -insensitive sodium currents, respectively (Laviaille-Defaix 2006). Although INa1 is regulated *via* a transduction mechanism involving cAMP/PKA cascade, experiments reported in this study, provide evidence that the intracellular regulation of Na2 current is mediated by intracellular calcium through activation of calcium-CaM complex, which thereby activates both PP2B and CaM-Kinase II (Fig 6). It is well known that the activity of neuronal vertebrate and insect sodium channels can be modified by protein kinase A and/or protein kinase C phosphorylation (Cantrell and Catterall, 2001; Wicher et al. 2001; Chahine et al., 2005). However, with the exception of data indicating that CaM-Kinase II is implicated in various signalling pathways involved in i) the neuronal excitability in *Drosophila melanogaster* neurons (Park et al., 2002) and ii) the regulation of vertebrates channels including potassium channels (Sansom et al. 2000; Colinas et al., 2006), calcium channels (Lee et al., 2006; Jiang et al., 2008) and cardiac or neuronal sodium channels (Carrier et al., 2000; Wagner et al., 2006), there is no data reporting the existence of a dual regulation involving PP2B and CaM-Kinase II on insect sodium channels. As summarized in the hypothetical scheme (Fig. 6), elevation in intracellular calcium level from the intracellular stores, for instance, results in activation of CaM-Kinase II by intracellular calcium through the complex calcium/CaM. Such phosphorylation is opposed by a dephosphorylation process that involves calcium/CaM-dependent PP2B also active on Na2 channels. Combining the results of

this study with those previously published (Lavialle-Defaix et al., 2006), we show that cAMP signalling pathway, PKA, calcium and finally PP2B and CaM-Kinase II are intimately interconnected in the phosphorylation/dephosphorylation process. These signalling pathways are involved in the intracellular regulation of DUM neuron INa1 and INa2; CaM-Kinase II being responsible for the modification of DCJW sensitivity.

CaM-Kinase II activation increases the sensitivity of Na2 channel to DCJW

Another interesting result presented in this study is the physiological implication of the intracellular signalling pathway on the sensitivity of the two voltage-dependent sodium channels expressed within the same neuron. We have demonstrated that INa1 and INa2 display different sensitivity to DCJW (i. e., INa1 being very sensitive to DCJW compared to INa2). Similar observations have previously been reported in non-identified heterogeneous population of cockroach thoracic neurons in which two distinct sodium currents (named type I and type II) are also differently sensitive to indoxacarb and DCJW (Zhao et al., 2005). In our study, we bring new elements for explaining how sodium channels differ on the basis on their sensitivity to DCJW. Changes in intracellular ATP concentration, known to be a key factor involved in the phosphorylation process, help to better discriminate between Na1 and Na2 channels DCJW sensitivity. As we previously reported (Lapied et al. 2001), the DCJW-induced inhibition of the global inward sodium current was best described by a monophasic dose-response curve. It is interesting to mention that these results were obtained with an internal pipette solution, which contained 2 mM ATP (see Fig. 1B). In the present study, addition of 3 mM ATP in the pipette solution produces a biphasic DCJW-induced dose-dependent inhibition of the global sodium current. The only difference that could explain the modification of the dose-response curves appearance is closely related to changes in intracellular ATP concentration (Fig. 1B). The

biphasic aspect of the dose-dependent inhibition of the sodium current by DCJW reflects that Na1 and Na2 channels differ from each other on the basis on their regulation by intracellular signalling pathway, which thereby affects the sensitivity to DCJW. In other words, as ATP is a cofactor of many protein and enzyme activities involved in regulatory processes, it can thereby modify the sodium current regulation. Increasing intracellular concentration of ATP from 2 mM to 3 mM will have physiological consequences on intracellular cAMP accumulation. Based on these observations, elevation of ATP level led to a reduction of INa1 through PKA stimulation after the increase of cAMP concentration (Lavialle-Defaix et al. 2006). This pathway activation unmasks the effect of DCJW on INa2, which appears to be 1000-fold less sensitive than INa1 (see Fig. 1B, second component of the biphasic dose-response curve and Fig. 1C).

Interestingly, our study further shows that calcium-dependent intracellular pathways could facilitate the transition from less sensitive Na2 channel to a highly sensitive channel. This is confirmed by findings indicating that the inhibitory effect of DCJW observed on INa2 amplitude is half-reduced in the presence of calcium chelator and CaM inhibitor, whereas addition of high calcium concentration in the patch pipette solution potentiates its inhibitory effect. Moreover, the DCJW-induced inhibition of INa2 amplitude is strongly reduced when CaM-Kinase II was inhibited. These results lead us to suggest that CaM-Kinase II activated by intracellular calcium through the complex calcium/CaM is involved in phosphorylation process, which will modify channel biophysical property by inducing conformational change. This renders the Na2 channels more sensitive to DCJW resulting in a shift of the semi-logarithmic curve towards lower concentrations. In addition, it has been reported in the literature that DCJW is a voltage-dependent inhibitor of insect sodium currents. It appears that the inactivated states of sodium channels are most likely to be sensitive to DCJW (Silver and Soderlund 2005a; Zhao et al., 2005; Silver et al. 2009). Furthermore, complementary studies indicate that i) two German cockroach

sodium channel isoforms (BgNav1.1 and BgNav1.4), exhibiting different voltage dependences of fast and slow inactivation, display different DCJW sensitivity and ii) the amino acid E1689K substitution in segment 4 of domain IV of sodium channel is responsible for the difference in the voltage-dependence of fast and slow inactivation and DCJW sensitivity between these two isoforms (Song et al. 2006). Based on these findings, an emerging question will be to know if INa1 and INa2 elicited by DUM neuron sodium channels, differently sensitive to DCJW, result in the combination of different isoforms of alpha and/or beta sodium channel subunits. However, to date, such correlation between native sodium currents and different sodium channel isoforms generated by RNA-editing and/or alternative splicing (Dong 2007) remains always difficult to establish. This is reinforced by recent studies reporting that two distinct sodium channel genes (rather than a unique gene) encoding sodium channels, have been characterized in the *Periplaneta americana* central nervous system (Moignot et al. 2009).

In addition, it is interesting to note that application of KN-62, an inhibitor of CaM-Kinase II, reduces the inhibitory effect of DCJW on Na₂ channels. Furthermore, this inhibitor produces a shift of the steady-state voltage dependence of the inactivation curve towards more positive potentials. The most likely explanation to these data is that Na₂ channels appear to be continuously activated by CaM-Kinase II in the basal state. However, following elevation of calcium level, the potentiation of CaM-Kinase II activation will render Na₂ channels more sensitive to DCJW. In other words and like it is observed when the depolarizing conditioning pulse is made more positive, activation of CaM-Kinase II *via* intracellular calcium rise stabilizes a more negative voltage dependence of steady-state inactivation of Na₂, in a potential range where sodium channels are more inactivated. In fact, CaM-Kinase II activation causes a permanent hyperpolarizing shift of the voltage dependence of inactivation compared to that of

recorded in the presence of CaM-Kinase II inhibitor, resulting in a potentiation of the inhibitory effect of DCJW observed on Na₂ channels.

In conclusion, this is the first attempt to describe that intracellular regulation mechanisms involving the activation of CaM-Kinase II *via* an elevation of intracellular calcium concentration, can potentiate the effect of DCJW on Na₂ channel, a DUM neuron membrane target reported to be relatively insensitive to low concentrations of DCJW. In addition, it is interesting to mention that CaM-Kinase II activation seems to be a key factor involved in the anthelmintic and insecticide efficiency. It has been reported that the response to levamisole on nAChRs expressed in the nematode *Ascaris suum* muscle depends on the phosphorylation state of the receptor by CaM-Kinase II and tyrosine kinase (Trailovic et al., 2002). Furthermore, Inagaki et al. (1998) have shown a reduction of CaM-Kinase II expression in *kdr*-resistant German cockroach *Blattella germanica* compared to *kdr*-susceptible cockroach. From these results, it appeared that manipulating intracellular signalling pathways involved in the regulation of sodium channels can have fundamental consequences for the sensitivity of insect towards given insecticides. This opens exciting research area that could improve the efficiency of insecticides.

References

- Ahmad M, Hollingworth RM and Wise JC (2002) Broad-spectrum insecticide resistance in obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) from Michigan. *Pest Manag Sci* **58**: 834-838.
- Cantrell AR and Catterall WA (2001) Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* **2**: 397-407.
- Carrier E, Dargent B, De Waard M and Couraud F (2000) Na⁽⁺⁾ channel regulation by calmodulin kinase II in rat cerebellar granule cells. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 394-399.
- Chahine M, Ziane R, Vijayaragavan K, and Okamura Y (2005) Regulation of Na^v channels in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 496-502.
- Colinas O, Gallego M, Setien R, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT and Casis O (2006) Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1978-1987.

Courjaret R and Lapied B (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* **60**: 80-91.

Davies TG, Field LM, Usherwood PN and Williamson MS (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* **59**: 151-62.

Defaix A and Lapied B (2005) Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invert Neurosci* **5**: 135-146.

Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* **7**: 17-30.

Es-Salah Z, Lapied B, Le Goff G and Hamon A (2008) RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. *Neuroreport* **19**: 939-943.

Gautier H, Auger J, Legros Ch and Lapied B (2008) Calcium-Activated Potassium Channels in Insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 149-159.

Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M and Gamelin E (2001) A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* **85**: 2293-2297.

Grolleau F and Lapied B (2000) Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: Towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *Journal of Experimental Biology* **203**: 1633-1648.

Inagaki S, Kaku K, Dunlap DY, and Matsumura F. (1998) Sequences of cDNAs encoding calmodulin, and partial structures of calmodulin kinase, and a calcium channel of kdr-resistant and -susceptible German cockroaches, *Blattella germanica*. *Comp Biochem Physiol C* **120**: 225-233.

Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H, Westenbroek RE, Scheuer T and Catterall WA (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:341-346.

Lapied B, Grolleau F and Sattelle DB (2001) Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol* **132**:587-595.

Lapied B, Malecot CO and Pelhate M (1989) Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **144**:535-549.

Lapied B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P and Corbel V (2009) Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol* **27**: 190-198.

Lavialle-Defaix C, Gautier H, Defaix A, Lapied B and Grolleau F (2006) Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol* **96**:2437-2450.

Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T and Welling A (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* **281**:25560-25567.

Marty A and Neher E (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. London* **367**:117-141.

McCann SF, Annis GD, Shapiro R, Piotrowski DW, Lahm GP, Long JK, Lee KC, Hughes MM, Myers BJ, Griswold SM, Reeves BM, March RW, Sharpe PL, Lowder P, Barnette WE and Wing KD (2001) The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. *Pest Manag Sci* **57**:153-164.

Moignot B, Lemaire C, Quinchard S, Lapied B and Legros C (2009) The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: Evidence for an early duplication of the para-like gene. *Insect Biochem Mol Biol*, in press

Park D, Coleman MJ, Hodge JJ, Budnik V and Griffith LC (2002) Regulation of neuronal excitability in *Drosophila* by constitutively active CaMKII. *J Neurobiol* **52**:24-42.

Salgado VL (1992) Slow voltage-dependent block of sodium channels in crayfish nerve by dihydropyrazole insecticides. *Mol Pharmacol* **41**: 120-126.

Sansom SC, Ma R, Carmines PK and Hall DA (2000) Regulation of Ca(2+)-activated K(+) channels by multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: F283-288.

Sayyed AH and Wright DJ (2006) Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag Sci* **62**: 1045-51.

Shono T, Zhang L and Scott JG (2004) Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **80**: 106-112.

Silver KS and Soderlund DM (2005a) Action of pyrazoline-type insecticides at neuronal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **81**: 136-143.

Silver KS and Soderlund DM (2005b) State-Dependent Block of Rat Na(v)1.4 Sodium Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes by Pyrazoline-Type Insecticides. *Neurotoxicology* **26**: 397-406.

Silver KS and Soderlund DM (2006) Differential sensitivity of rat voltage-sensitive sodium channel isoforms to pyrazoline-type insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* **214**: 209-217.

Silver KS, Song W, Nomura Y, Salgado V and Dong K (2009) Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. *Pest Biochem Physiol*, in press

Soderlund DM (2008) Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci* **64**: 610-616.

Song W, Liu Z and Dong K (2006) Molecular basis of differential sensitivity of insect sodium channels to DCJW, a bioactive metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb. *NeuroToxicology* **27**: 237-244.

Sugiyama S, Tsurubuchi Y, Karazawa A, Nagata K, Kono Y and Shono T (2001) Insecticidal Activity and Cuticular Penetration of Indoxacarb and Its N-Decarbomethoxylated Metabolite in Organophosphorus Insecticide-Resistant and -Susceptible Strains of the Housefly, *Musca domestica* (L.). *J Pesticide Sci* **26**: 117-120.

Trailovic SM, Robertson AP, Clark CL and Martin RJ (2002) Levamisole receptor phosphorylation: effects of kinase antagonists on membrane potential responses in *Ascaris suum* suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole. *J Exp Biol* **205**: 3979-3988.

Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM and Maier LS (2006) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* **116**: 3127-3138.

Wicher D, Walther C and Wicher C (2001) Non-synaptic ion channels in insects--basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* **64**: 431-525.

Wing KD, Sacher M, Kagaya Y, Tsurubuchi Y, Mulderig L, Connair M and Schnee M (2000) Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Protection* **19**: 537-545.

Wing KD, Schnee M.E., Sacher M and M. C (1998) A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **37**: 91 - 103.

Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ and Narahashi T (2005) Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neurotoxicology* **26**: 455-465.

Zhao X, Ikeda T, Yeh JZ and Narahashi T (2003) Voltage-dependent block of sodium channels in mammalian neurons by the oxadiazine insecticide indoxacarb and its metabolite DCJW. *Neurotoxicology* **24**: 83-96.

Footnotes

B. Moignot was supported by a doctoral fellowship from the Région Pays de la Loire. The authors wish to thanks Dr K.D. Wing for the gift of DCJW.

Legends for figures

Fig. 1 Effects of DCJW on INa1 and INa2 of isolated DUM neurons.

A, semi-logarithmic dose-response curve for the block of the global inward sodium current by tetrodotoxin (TTX). B, superimposed semi-logarithmic dose-response curves for the DCJW-induced inhibition of the global inward sodium current in the presence of 2 mM (open circles, Lapied et al., 2001) and 3 mM ATP (filled squares) added in the pipette solution. C, semi-logarithmic dose-response curves for DCJW on INa1 and INa2. The effect of DCJW on INa1 (i.e., L-glutamate-sensitive sodium current, open squares), obtained by subtraction of the record after 10 μ M L-glutamate treatment from the control and INa2 (L-glutamate-resistant sodium current, filled triangles). D, superimposed semi-logarithmic dose-response curves for the blockade of INa1 by DCJW compared to the DCJW-induced inhibition of the global INa as shown in graph 1B. E, comparative semi-logarithmic curves for the blockade of the global INa recorded with 3 mM ATP added in pipette solution and INa2 recorded in the presence of 10 μ M L-glutamate to block INa1. The smooth lines represent the best fit to the mean data according to the Hill equation (Eq. 1). The dose-response curves shown in B and E (filled squares) was calculated according to the equation two site competition (Eq. 2). F, typical example of sodium current traces obtained when the cells were exposed to DCJW (1 μ M) followed by L-glutamate (10 μ M). In all experiments, sodium current was evoked by a 30 ms-depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV. Data are mean \pm SEM.

Fig. 2 Calcium-dependent intracellular signalling pathways involved in the regulation of INa2.

A, comparative histogram illustrating the percentage of residual INa2 amplitude recorded at t=15 min in the presence of BAPTA (10 mM, n=6), W7 (0.5 mM, n=7) and 1 μ M of intracellular

calcium added in the pipette solution (n=9). B, histogram illustrating the percentage of residual INa2 amplitude recorded in the presence of 100 nM cyclosporin A (n=10), 10 μ M KN-62 (n=6) 10 mM caffeine applied alone or in combination, as indicated in the graph by + and – symbols below each corresponding bars. INa2 was recorded in the presence of L-glutamate (10 μ M) to block INa1. The cells were held at a holding potential of -90 mV and depolarized to 0 mV. Data are means \pm SEM. * and **, values significantly different $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Fig. 3 Calcium-dependent intracellular pathways affect the DCJW-induced INa2 inhibition.

A, histogram summarizing the effect of 10 μ M DCJW on INa2 recorded in control (number 1, n=6) and after intracellular application of 10 mM BAPTA (number 2, n=5) and 0.5 mM W7 (number 3, n=4). *Inset* shows typical example of superimposed INa2 traces elicited with a 30-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV, recorded under each experimental conditions. Currents were capacity and leak corrected. B, comparative semi-logarithmic dose-response curves of INa2 inhibition induced by DCJW recorded in control (filled triangles) and in the presence of BAPTA (10 mM, open triangles) and 1 μ M of intracellular calcium added in the internal solution (open circles). The smooth lines represent the best fit through the mean data points according to the Hill equation (Eq. 1). C, comparative histogram illustrating that external application of 9 mM calcium chloride did not change the inhibitory effect of DCJW (10 μ M) observed on INa2, compared to control (i. e., 2 mM calcium chloride). In all experiments, INa2 was recorded in the presence of L-glutamate (10 μ M) and was evoked by a 30-ms depolarizing pulse from a holding potential of -90 mV. * and **, values significantly different $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, ns, not significant ($p > 0.05$). Data are means \pm SEM.

Fig. 4 Effect of cyclosporin A and KN-62 on DCJW-induced INa2 inhibition.

A, B, time course of the normalized amplitude of the peak INa2 recorded under DCJW (10 μ M) treatment in the presence of 100 nM cyclosporin A (A) and 10 μ M KN-62 (B). *Inset*, representative example of INa2 traces obtained under different experimental conditions, as indicated in the graph. C, comparative histogram summarizing the effect of DCJW (10 μ M) on INa2 amplitude recorded in control (black bar; n=6) and after intracellular application of cyclosporin A (100 nM, n=6) and KN-62 (10 μ M, n=7). D, histogram illustrating the effect of 1 μ M DCJW on INa2 amplitude with 1 μ M calcium concentration added in the pipette solution, in the presence or absence of KN-62 (10 μ M, n=5). ***, value significantly different ($p < 0.001$), ns, not significant ($p > 0.05$). In all experiments, INa2 was elicited by a 30-ms depolarizing step to 0 mV from a holding potential of -90 mV. Cells were pretreated with L-glutamate (10 μ M). Data are means \pm SEM.

Fig. 5 Effect of DJCW and voltage-dependent inactivation parameter of INa2.

A, effect of DCJW (10 μ M) on INa2 amplitude. Inward currents were evoked by a 30-ms depolarizing test pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV (1) and after a 10-sec depolarizing conditioning pulse of -40 mV (2), according to the protocol illustrated above each current traces. The graph represents the maximum effect of DCJW (10 μ M) on INa2 amplitude recorded at a holding potential of -90 mV (filled circles, n=6) and after a depolarizing conditioning pulse to -40 mV (open circles, n=7). **, value significantly different ($p < 0.01$). B, voltage dependence of inactivation parameters of INa2 studied according to the standard 2-pulses voltage-clamp protocol indicated in *Inset*, in control (Ctr, filled circles, n=11) and in the presence of KN-62 (10 μ M, open circles, n=6) added in the pipette solution. Smooth curves of inactivation

were fitted through data points using Boltzmann equation (Eq. 3). The cells were pretreated with L-glutamate (10 μ M). Data are mean \pm SEM.

Fig. 6 Hypothetic pattern of intracellular regulation of INa2 in DUM neurons. This scheme summarizes the essential components of PP2B and CaM-Kinase II that may regulate INa2. Na2, L-glutamate-insensitive sodium channel; PP2B, calcium-calmodulin-dependent protein phosphatase 2B; CaM-Kinase II, calcium-calmodulin-dependent protein kinase II; Cyclosp A, cyclosporin A; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; BAPTA, calcium chelator; W7, calmodulin inhibitor; KN-62, CaM-Kinase II inhibitor; ER, endoplasmic reticulum.

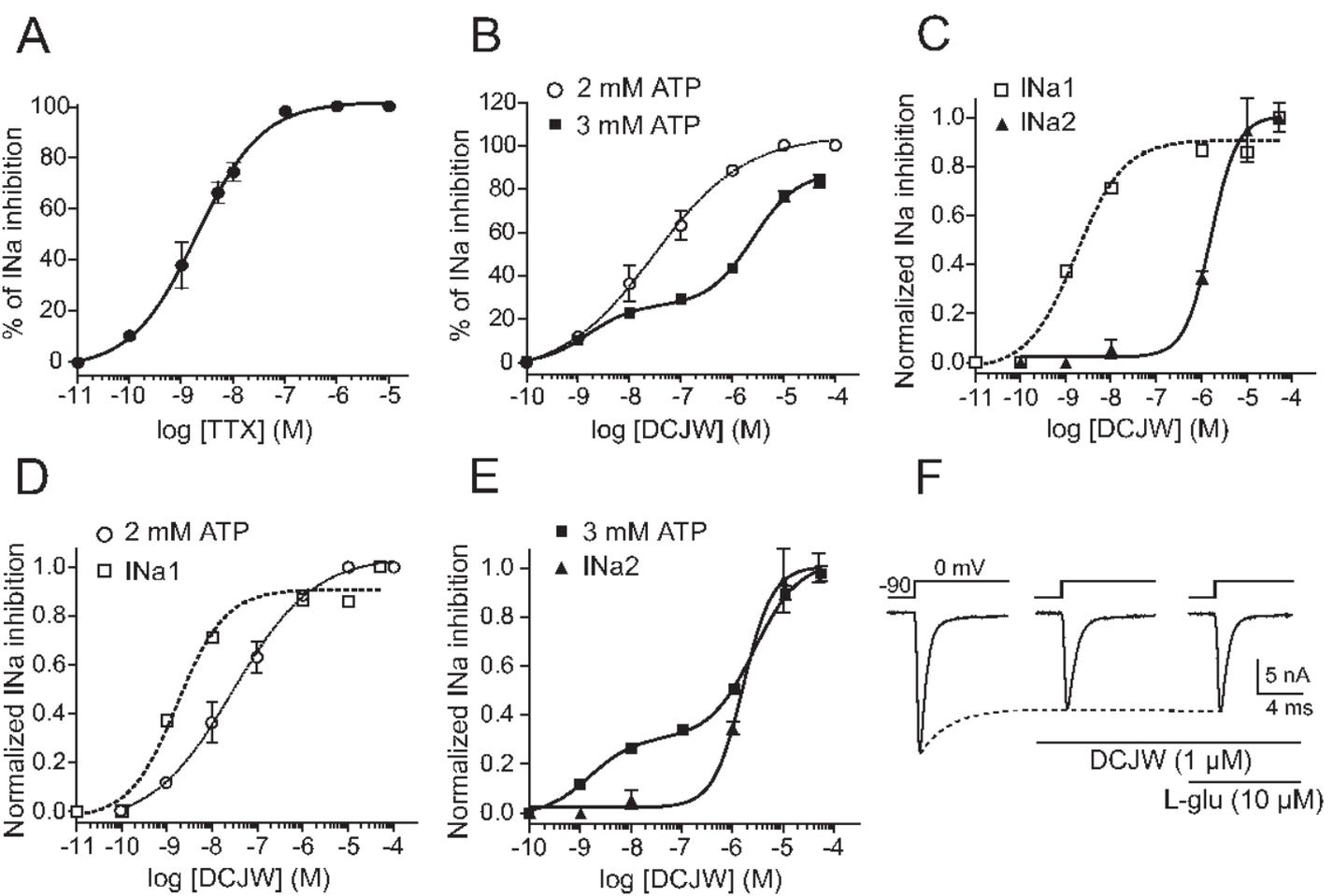
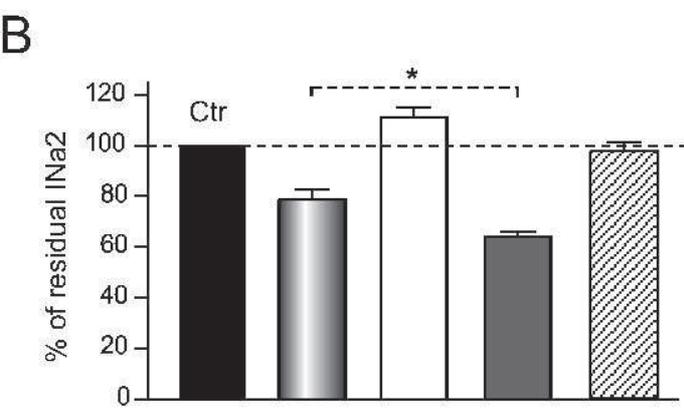
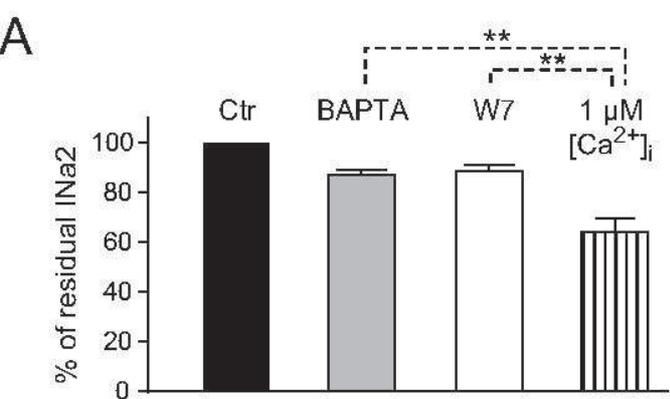


Fig. 1



| | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|
| Cyclosp A | - | + | - | + | + |
| KN-62 | - | - | + | - | + |
| Caffeine | - | - | - | + | + |

Fig. 2

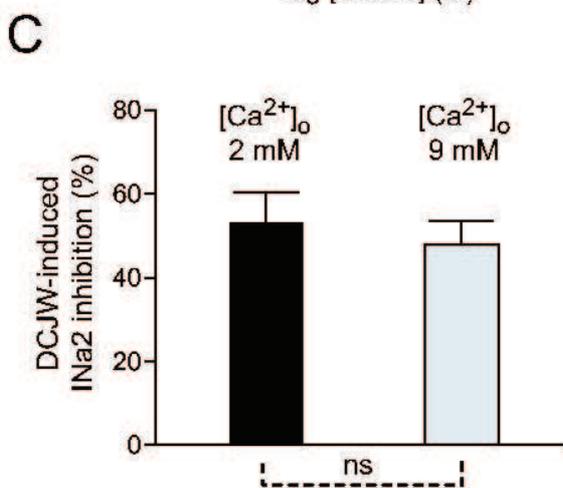
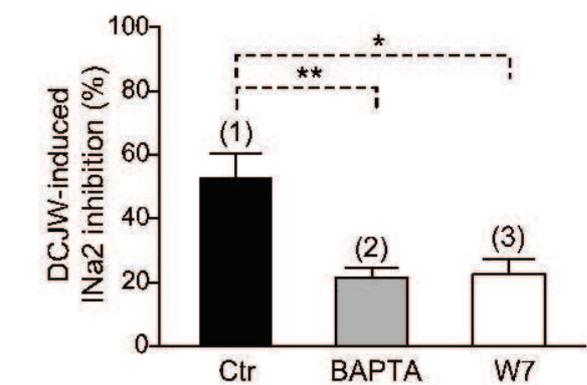
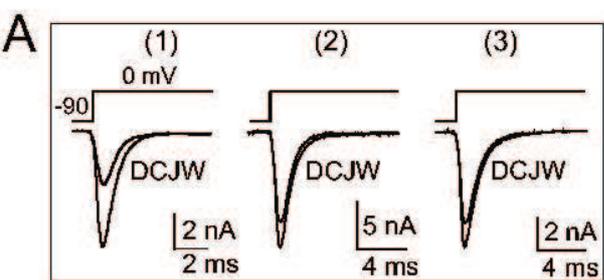


Fig. 3

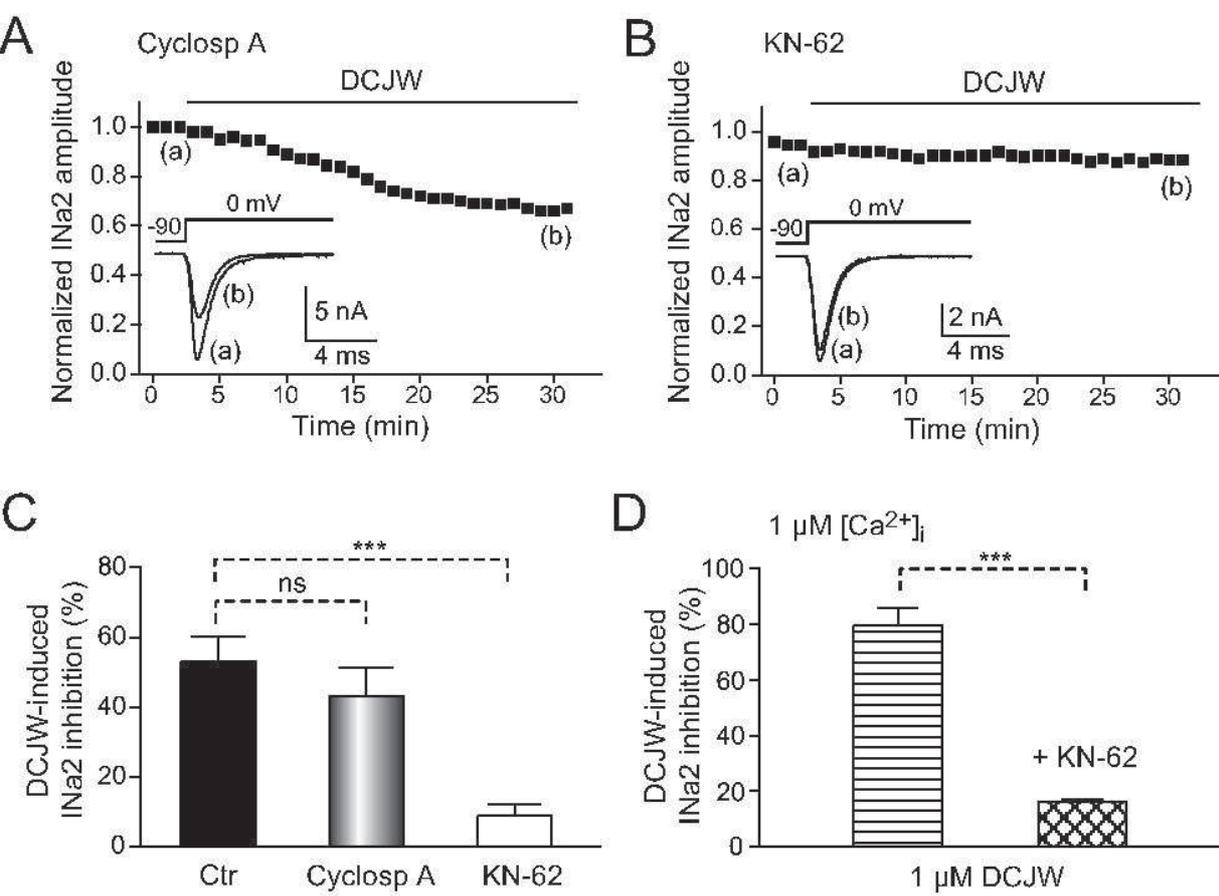


Fig. 4

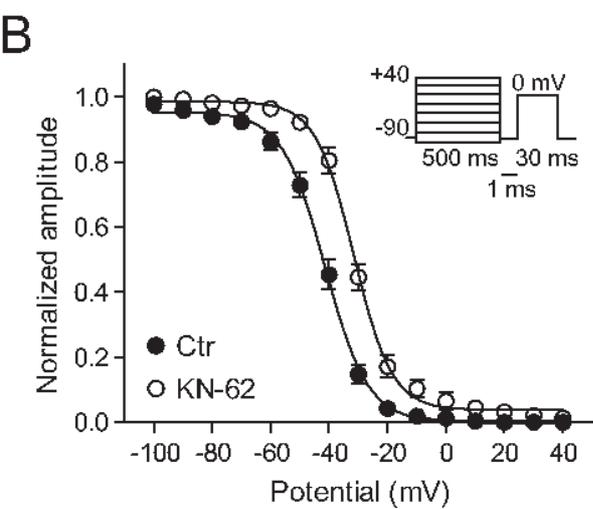
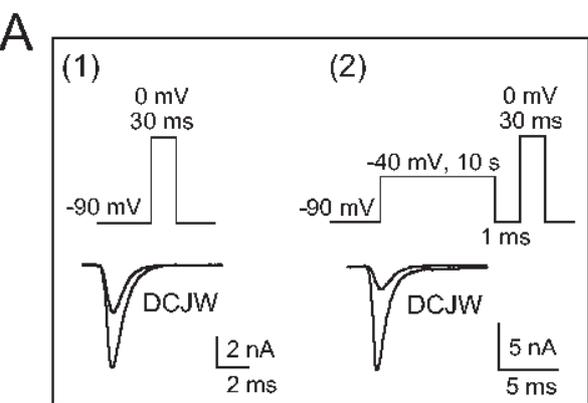


Fig. 5

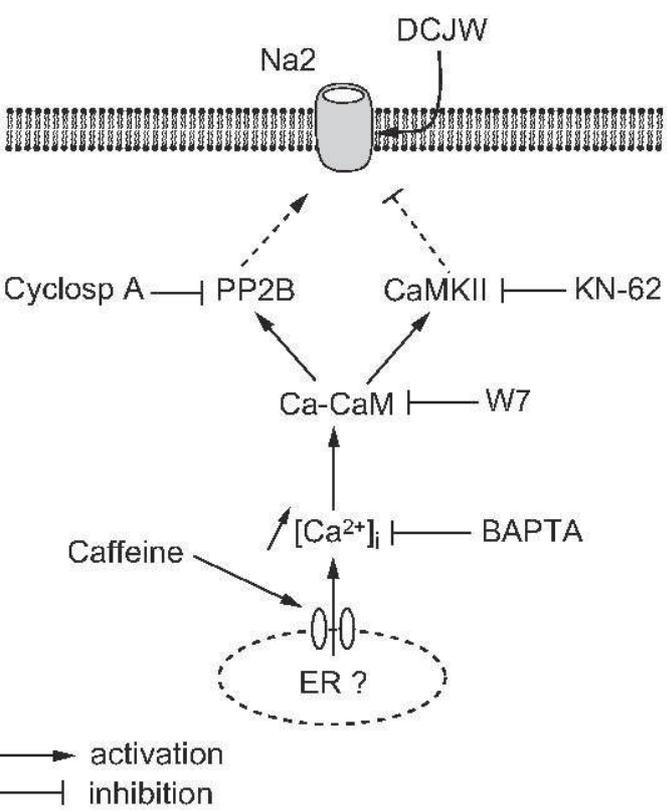


Fig. 6