



HAL
open science

Analyse électrophysiologique, pharmacologique et moléculaire de facteurs modulant les effets d'un insecticide, le fipronil, sur des récepteurs gabaergiques d'insectes

Zeineb Es-Salah

► **To cite this version:**

Zeineb Es-Salah. Analyse électrophysiologique, pharmacologique et moléculaire de facteurs modulant les effets d'un insecticide, le fipronil, sur des récepteurs gabaergiques d'insectes. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00439681v1

HAL Id: tel-00439681

<https://theses.hal.science/tel-00439681v1>

Submitted on 8 Dec 2009 (v1), last revised 25 Jan 2010 (v2)

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.

**ANALYSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE, PHARMACOLOGIQUE ET
MOLECULAIRE DE FACTEURS MODULANT LES EFFETS D'UN
INSECTICIDE, LE FIPRONIL, SUR DES RECEPTEURS
GABAERGIQUES D'INSECTES**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : **Biologie des Organismes**

ECOLE DOCTORALE VENAM

(Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer)

Présentée et soutenue publiquement

le : 10 décembre 2008

à : Angers

par : **Zeineb ES-SALAH**

Devant le jury ci-dessous :

Mme GAUTHIER Monique (Rapporteur), Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

M. BELZUNCES Luc (Rapporteur), Directeur de recherche, UMR 406 INRA, Avignon

M. SCHLICHTER Rémy (Examineur), Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

M. LAPIED Bruno (Examineur), Professeur, Université d'Angers

Directeur de thèse : M. HAMON Alain, Maître de Conférences, Université d'Angers

Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires
UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV,
UFR Sciences, Université d'Angers
2 Boulevard Lavoisier
49045 Angers cedex 01, France

ED 495

Thèse effectuée au sein du

Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires
UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV,
UFR Sciences, Université d'Angers
2 Boulevard Lavoisier
49045 Angers cedex 01, France

A ma famille, pour leur soutien sans faille et leur amour

*A celui qui a su m'encourager et être présent
dans les bons comme les mauvais moments*

Remerciements

Je remercie le Pr Bruno Lapied pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de thèse ainsi que mes travaux de DEA au sein du laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaire, et pour m'avoir accordé de son précieux temps pour participer à mon encadrement.

Je tiens à remercier le directeur de cette thèse, le Dr Alain Hamon, pour son professionnalisme, et pour m'avoir permis de bénéficier de son expérience et de sa rigueur scientifique. Votre capacité d'organisation n'a d'égale que votre amour pour la Bretagne. Je vous souhaite une bonne continuation pour ces quelques mois, avant de profiter d'une retraite bien méritée.

Mme Monique Gauthier (Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse) et M. Luc Belzunces (Directeur de recherche à l'UMR 406, INRA, Avignon) ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie pour cet honneur, et pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail.

Je témoigne ma reconnaissance à M. Rémy Schlichter (Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg), pour avoir consenti à juger ce travail. Ses remarques et commentaires seront d'un apport certain.

Je remercie la Région Pays de la Loire pour le soutien financier qu'elle m'a accordé.

Ces travaux de thèse ne seraient pas ce qu'ils sont sans la solidarité dont ont fait preuve mes amis et collègues du laboratoire RCIM.

J'adresse mes très sincères remerciements à Hélène Tricoire-Leignel, pour son encadrement rigoureux en biologie moléculaire, et pour tout ce que j'ai pu apprendre à ses côtés, autant humainement que professionnellement. Grâce à toi un projet qui me tenait à cœur a pu être réalisé. Merci encore pour tout.

J'exprime mes remerciements à Steeve Thany, pour m'avoir prêté une oreille attentive en cas de besoin, et pour avoir été jusqu'à me prêter son propre ordinateur pour que je puisse terminer cette thèse dans de bonnes conditions. Un grand merci également à Christian Legros pour ses conseils scientifiques, sa sympathie et pour le soutien qu'il m'a apporté dans les moments les plus difficiles.

Un très grand merci à tous ceux qui ont rendu cette thèse plus agréable. Merci Olivier pour ton amitié, et pour l'aide que tu m'as apportée chaque fois que j'en avais besoin. Merci Laurence pour avoir été aussi présente, notamment en cette fin de thèse. Tous tes conseils m'ont été très utiles, et tu m'as enlevé une belle épine (que dis-je, une branche !) du pied. Merci à toi Bénédicte pour ton amitié sincère et pour tout ce que tu m'as apporté humainement. Tu es une véritable amie, et je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse. Merci à toi Béatrice pour ton amitié et pour avoir su égayer ma fin de thèse par ta présence (et par ta musique ?). Bon courage pour ta fin de thèse. Merci Céline pour ta bonne humeur, et pour les bons moments partagés à Genève.

Il me serait difficile de ne pas remercier Sophie Quinchard. Tu apportes énormément au laboratoire, et les conditions de travail n'auraient pas été les mêmes sans ton aide précieuse.

Je souhaite une bonne continuation à Aly, Antonin, Patricia et Véronique, et beaucoup de résultats.

Une pensée pour Hélène Gautier qui m'a beaucoup appris. Je te souhaite bon vent pour ta nouvelle vie. Une pensée aussi pour le Pr Maria Stankiewicz, qui a eu la grande gentillesse de m'accueillir chez elle pour rencontrer les étudiants polonais, je garde un excellent souvenir de ce séjour. Et puis une pensée pour Safa. Merci pour tous les moments partagés ensemble (et à venir). Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je ne peux finir sans faire une dédicace à ma p'tite sœur, pour avoir supporté mes réveils (très) matinaux durant la rédaction de ce manuscrit, pendant ses vacances.

ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
Chapitre I. Les récepteurs ionotropes du GABA	16
A Présentation générale	16
B Les GABARs de vertébrés	18
<i>B.1 Localisation et structure</i>	<i>18</i>
<i>B.2 Pharmacologie.....</i>	<i>22</i>
C Les GABARs d'invertébrés	22
<i>C.1 Les sous-unités clonées.....</i>	<i>23</i>
<i>C.2 Accroissement de la diversité des sous-unités par des modifications post-transcriptionnelles</i>	<i>30</i>
<i>C.3 Pharmacologie des GABARs d'invertébrés</i>	<i>35</i>
<i>C.4 Composition en sous-unités des GABARs natifs d'insectes</i>	<i>40</i>
Chapitre II. Le fipronil, un insecticide antagoniste des GABARs	44
A Le fipronil, découverte et utilisations	45
B Les métabolites du fipronil.....	47
<i>B.1 Fipronil sulfone</i>	<i>48</i>
<i>B.2 Désulfinyl-fipronil</i>	<i>49</i>
C Symptômes de l'intoxication par le fipronil.....	50
D Cibles du fipronil	51
E Mécanismes d'action	53
<i>E.1 Données électrophysiologiques</i>	<i>54</i>
<i>E.2 Données obtenues par déplacement de radioligands et par modélisation</i>	<i>55</i>
F Sélectivité du fipronil pour les insectes	59
<i>F.1 Sélectivité insectes/vertébrés</i>	<i>59</i>
<i>F.2 La sélectivité dépend de la composition en sous-unités des GABARs</i>	<i>59</i>
Chapitre III. Facteurs susceptibles de moduler la sensibilité des GABARs au fipronil	61
A La composition en sous-unités	62
B Les acides aminés clés des sous-unités	63
C Les modifications post-transcriptionnelles.....	67
<i>C.1 Epissage alternatif.....</i>	<i>67</i>
<i>C.2 Edition de l'ARNm.....</i>	<i>68</i>
D La phosphorylation des GABARs.....	68
<i>D.1 Vertébrés</i>	<i>68</i>
<i>D.2 Invertébrés.....</i>	<i>74</i>
MATERIEL ET METHODES	77
Chapitre I. Expression de GABARs de drosophile dans des ovocytes de xénope.79	79
A Introduction	79
B Obtention de l'ARNm muté de la sous-unité RDL	80
<i>B.1 Mutagenèse dirigée.....</i>	<i>80</i>
<i>B.2 Midipréparation et transcription.....</i>	<i>84</i>

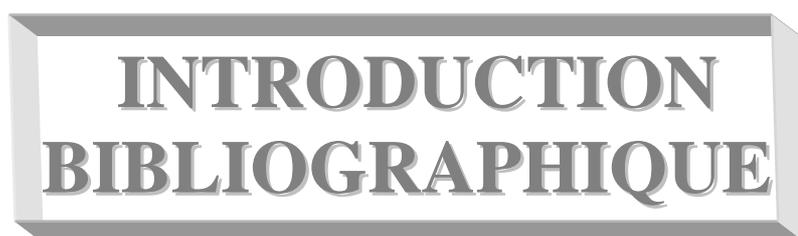
C Expression des récepteurs RDL dans les ovocytes de xénope	84
D Etude des courants GABAergiques en conditions de potentiel imposé par la technique de double-microélectrode	87
Chapitre II. Etude des GABARs natifs des neurones DUM de la blatte	
<i>Periplaneta americana</i>.....	90
A Introduction	90
A.1 Les neurones DUM	90
A.2 Les GABARs des neurones DUM efférents.....	92
B Etude électrophysiologique et pharmacologique	93
B.1 Obtention de neurones DUM isolés (figure 15)	93
B.2 Etude électrophysiologique des GABARs des neurones DUM.....	96
C Sous-unité RDL de <i>Periplaneta americana</i> : identification et recherche de sites potentiels de phosphorylation	103
C.1 Identification d'une séquence partielle du transcrit de la sous-unité RDL de <i>Periplaneta americana</i> à partir de chaînes nerveuses	104
C.2 Identification d'une séquence partielle du transcrit de la sous-unité RDL de <i>P. americana</i> à partir de neurones DUM.....	111
RESULTATS	118
Chapitre I. Rôle de l'édition de l'ARNm dans la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil	119
A Présentation	119
B Résultats obtenus.....	120
C Discussion des résultats.....	133
Chapitre II. Rôle de la phosphorylation dans la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil	135
A Présentation	135
B Résultats obtenus.....	136
B.1 Clonage de la sous-unité RDL dans les neurones DUM.....	166
C Discussion des résultats.....	168
C.1 Résultats concernant les GABARs des neurones DUM de <i>P. americana</i>	168
C.2 Résultats concernant les récepteurs RDL de drosophile exprimés dans des ovocytes de xénope	169
CONCLUSION - PERSPECTIVES	172

ABREVIATIONS

3-APMPA	3-aminopropyl(méthyl)phosphate
3-APS	3-aminopropanesulfonate
AChBP	"acetylcholine binding protein"
AChE	acétylcholine estérase
ACTA	association de coordination technique agricole
ADAR	"adenosine deaminases that act on RNA"
ATP	adénosine triphosphate
BIDN	3,3-bis-trifluorométhyl-bicyclo[2,2,1]heptane-2,2-dicarbonitrile
CACA	acide cis-4-aminocrotonique
CaMKII	kinase dépendante du complexe Ca ²⁺ /calmoduline de type II
CE ₅₀	concentration produisant la moitié de l'effet maximal d'une substance
CI ₅₀	concentration produisant 50% de l'effet inhibiteur d'une substance
cyt P450	cytochrome P450
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane
DEF	S,S,S-tributyl phosphorothioate
Df	"fast coxal depressor motoneurone"
DGA	dernier ganglion abdominal
DHEA	déhydroépiandrostérone
DL ₅₀	dose létale qui tue 50% des individus
DMSO	diméthylsulfoxyde
DRG	"dorsal root ganglion"
TD ₅₀	temps de demi-vie d'une substance dans un environnement donné
DUM	"Dorsal Unpaired Median"
EBOB	4'-ethynyl-4-n-propyl-bicycloorthobenzoate
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	acide éthylèneglycol tétraacétique
FBA	"feedback amplifieur"
GABA	acide γ-aminobutyrique
GABAR	récepteur du GABA
GluCIR	récepteur ionotrope du glutamate dépendant des ions chlorure
GlyR	récepteur de la glycine

GRD	"GABA and glycine-like receptor of <i>Drosophila</i> "
GST	glutathion S-transférase
HEPES	acide 4-(2-Hydroxyethyl)pipérazine-1-éthanesulfonique
I4AA	acide imidazole-4-acétique
IGABA	courant GABAergique
KCC	cotransporteur K ⁺ /Cl ⁻
kdr	"knock-down resistance"
KN-62	1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phénylpipérazine
KO	"knock-out"
LCCH3	"ligand-gated chloride channel homolog 3"
LGIC	"ligand-gated ion channel"
MAP kinase	"mitogen-activated protein kinase"
nAChR	récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NKCC	cotransporteur Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻
ONUAA	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
ORF	"open reading frame"
P4S	acide pipéridine-4 sulfonique
PBO	pipéronyl butoxide
PCR	"polymerase chain reaction"
PDBu	phorbol 12,13-dibutyrate
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PPSE	potential postsynaptique excitateur
PS	sulfate de pregnénone
PTX	picrotoxine
PTXine	picrotoxine
RDL	"resistance to dieldrin"
REACH	enregistrement, évaluation et autorisation des substances chimiques
S2	lignée de cellules de drosophile (Schneider)
SAICM	"strategic approach for international chemicals management"
Sf21	cellules dérivées de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SOS	solution saline standard pour ovocytes

SNC	système nerveux central
SR95531	gabazine
TACA	acide trans-4-aminocrotonique
TAMP	trans-2-aminométhyl-cyclopropane
TBPS	t-butylbicyclophosphorothionate
THIP	4,5,6,7-tétrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol
TPMPA	acide (1,2,5,6-tétrahydropyridin-4-yl)méthylphosphinique
TPP	triphényl phosphate
ZAPA	acide (Z)-3-[(aminoiminométhyl) thio] prop-2-énoïque



**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

L'accroissement démographique est à l'origine d'une intensification des productions agricoles, avec une croissance allant jusqu'à 50 % entre 1994 et 2004, notamment dans l'hémisphère sud (statistiques de l'ONU pour l'Alimentation et l'Agriculture, ONUAA)¹. En découle une utilisation d'autant plus importante des pesticides, qui permettent des pertes quatre fois moindres que dans les cultures non traitées (d'après l'Union des Industries de la Protection des Plantes)². Leur emploi abusif, notamment en agriculture depuis la seconde guerre mondiale, explique leur présence généralisée à l'échelle internationale, avec une consommation mondiale équivalente à un coût de 27 milliards de dollars en 2003 (d'après le "Programme Stratégique d'utilisation des pesticides 2006-2011" de l'ONU). S'ajoutent à cela les 500 000 tonnes de pesticides périmés à traiter, dont quelques grammes seraient suffisants pour empoisonner des milliers de personnes, sans parler des contaminations environnementales¹. Des résidus sont retrouvés dans les eaux, les brouillards, l'air par pollution diffuse, ainsi que dans les aliments et les organismes. Les conséquences sur la santé environnementale et humaine sont alarmantes. Les politiques de méthodes alternatives ainsi que les textes relatifs à l'utilisation de pesticides, tels le "code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides" (ONUAA, Rome, 2003), ainsi que la convention de Rotterdam (1998) et l'"Approche stratégique de la gestion internationale des produits chimiques" (SAICM, conférence de Dubaï, 2006), engagées par le Programme des Nations Unies pour l'environnement, ont pour objectif une amélioration des stratégies d'utilisation. Mais ces politiques sont difficilement applicables dans les pays en développement, où la croissance annuelle d'utilisation des pesticides est de l'ordre de 3 à 15 % (d'après le "Programme Stratégique d'utilisation des pesticides 2006-2011" de l'ONU). L'emploi des

¹ www.fao.org

² www.uipp.org

produits phytosanitaires est aujourd'hui très réglementé, et des cahiers des charges précis sont imposés aux industriels. L'instauration du projet REACH (enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques), entré en vigueur en 2007, a pour but un meilleur contrôle des substances chimiques, avec suppression des produits les plus dangereux (Commission Européenne)¹.

Les insecticides font partie de la famille des pesticides, et sont des substances actives ou préparations utilisées pour tuer les insectes nuisibles. Plus de 90% des insecticides de synthèse sont neurotoxiques, et ont pour cibles moléculaires majeures les canaux sodiques dépendants du potentiel, l'acétylcholinestérase (AChE), les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs) et les récepteurs ionotropes du GABA (GABARs). Ces derniers sont la cible des polychlorocycloalcanes (comme les cyclodiènes), insecticides de première génération, et des phénylpyrazoles (comme le fipronil), insecticides de deuxième génération. Au-delà des problèmes de santé environnementale et humaine évoqués plus haut, l'utilisation intensive des insecticides est à l'origine de phénomènes de résistances, notamment génétique et métabolique.

Le fipronil présente des caractéristiques en accord avec une réduction des doses d'insecticides. En effet, des traitements à l'échelle du milligramme à la centaine de gramme par hectare d'ingrédient actif suffisent, selon la formulation. Néanmoins, une utilisation des polychlorocycloalcanes contraire aux bonnes pratiques agricoles durant ce dernier demi-siècle a eu pour effet l'apparition de résistance des insectes à ces insecticides ainsi qu'au fipronil par résistance croisée, notamment par mutation des GABARs ionotropes. Une connaissance détaillée des mécanismes d'action est donc nécessaire, à la fois pour pallier aux phénomènes de résistance, et pour permettre à long terme une réduction des doses appliquées. Cette thèse se propose de déterminer si des phénomènes autres que les résistances génétique et métabolique pourraient être à l'origine d'une modification de l'efficacité du fipronil.

¹ <http://ec.europa.eu>

Le manuscrit sera présenté de la façon suivante :

- une introduction bibliographique axée sur trois points essentiels :
 - les GABARs et leurs propriétés structurales, pharmacologiques et fonctionnelles
 - le fipronil, ses propriétés, effets et mécanismes d'action
 - les facteurs susceptibles de modifier la sensibilité des GABARs aux insecticides. Parmi ces facteurs, deux ont été retenus en vue de notre travail expérimental : l'édition de l'ARNm de sous-unités de GABARs et la modulation de l'activité des GABARs par phosphorylation
- une description des techniques utilisées
- un exposé des résultats, qui ont été obtenus à la fois sur des récepteurs recombinants et des récepteurs natifs :
 - des récepteurs homomériques de drosophile exprimés dans des ovocytes de xénope (pour l'étude de l'influence de l'édition de l'ARNm)
 - des récepteurs présents sur les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* (pour l'étude des effets de la phosphorylation)
- un résumé des principales conclusions de l'étude et quelques perspectives pour des recherches futures.

Chapitre I. Les récepteurs ionotropes du GABA

A Présentation générale

La transmission nerveuse chez les vertébrés et les invertébrés s'effectue via la libération de neurotransmetteurs. Le GABA (acide gamma-aminobutyrique) est le neurotransmetteur inhibiteur le plus commun dans le système nerveux central (SNC), et est issu de la décarboxylation du glutamate par la glutamate décarboxylase. Il est ubiquitaire puisqu'il est retrouvé dans les règnes animal et végétal, ainsi que chez les bactéries. Le GABA a été identifié et isolé pour la première fois chez les mammifères en 1950 (Awapara et coll., 1950 ; Udenfriend, 1950). Cependant, il n'a été accepté comme neurotransmetteur que dans les années 1960 après un grand nombre de travaux, notamment chez l'écrevisse et l'ascaris (Basemore et coll., 1957 ; Del Castillo et coll., 1964).

Les GABARs existent sous deux formes : métabotropes et ionotropes. Les récepteurs métabotropes (aussi appelés récepteurs GABA_B chez les vertébrés) se présentent sous forme de récepteurs hétérodimériques, couplés à une protéine G. Ces protéines ne sont pas des récepteurs-canaux, et à ce titre ne peuvent faire transiter d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Cependant, ils sont en relation avec des canaux ioniques qui peuvent être de type calcique ou potassique (Bettler et Tiao, 2006). Les récepteurs ionotropes des vertébrés existent sous deux formes, qui diffèrent par leur composition en sous-unités et leur pharmacologie : les GABA_ARs et les GABA_CRs. Ces récepteurs, aussi appelés récepteurs-canaux, existent également chez les invertébrés, et sont les cibles de nombreuses molécules, dont des insecticides, contrairement aux récepteurs métabotropes. Cette thèse portera sur les GABARs ionotropes.

Les GABARs ionotropes font partie de la superfamille "Cys-loop" des canaux ioniques ouverts par un ligand (LGICs ou Ligand Gated Ion Channels), qui ont une faible probabilité d'ouverture en absence de neurotransmetteur. Les membres de cette famille possèdent une structure générale commune, à savoir un domaine N-terminal extracellulaire, suivi de quatre domaines transmembranaires (figure 1). Ils sont caractérisés par une signature "Cys-loop" (deux cystéines séparées par 13 acides aminés) dans leur partie N-terminale, impliquée dans les processus d'ouverture et de fermeture du canal (Absalom et coll., 2003 ; Grutter et coll., 2005). Ils peuvent être anioniques (comme les récepteurs du GABA ou de la glycine) ou cationiques (comme les récepteurs de type 3 de la sérotonine ou de l'acétylcholine).

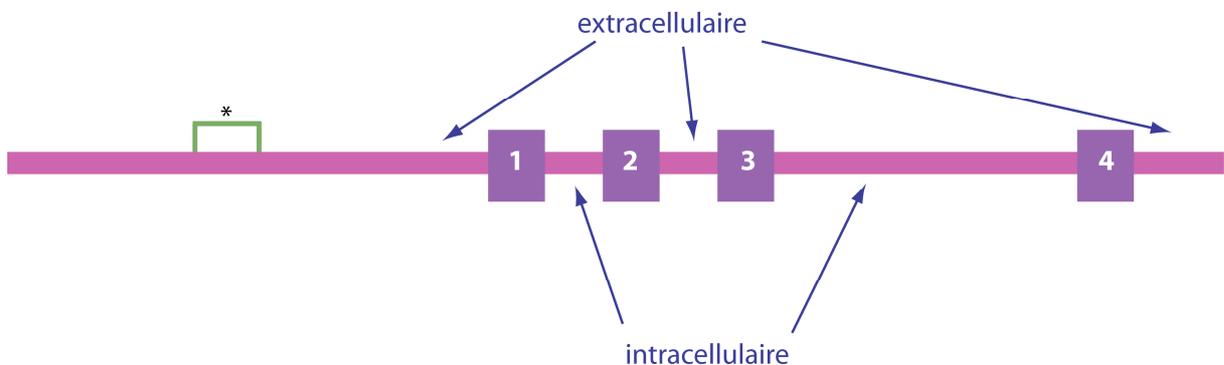


Figure 1 . Structure caractéristique des sous-unités composant les récepteurs de la superfamille "Cys-loop". Les parties extracellulaires et intracellulaires sont indiquées. La signature "Cys-loop" est surmontée par un astérisque.

Les GABARs anioniques sont essentiellement inhibiteurs, cependant un rôle excitateur leur est aussi attribué. Cela se produit dans les neurones où le potentiel d'inversion des ions chlorure est moins négatif que le potentiel de repos, du fait d'une concentration très élevée en chlorure intracellulaire. L'activation des GABARs entraîne alors un flux sortant d'ions chlorure, d'où une dépolarisation membranaire (PPSE). Cette particularité physiologique a notamment été observée aux stades précoces du développement cérébral chez tous les mammifères étudiés. Dans les neurones immatures, les GABARs sont excitateurs grâce au cotransporteur NKCC1, dont la fonction est de provoquer un influx d'ions chlorure. Au cours de la maturation neuronale, le cotransporteur KCC2 qui provoque au contraire un efflux de chlorure, devient prédominant, ce qui fait chuter la concentration intracellulaire en ions chlorure et permet aux GABARs de devenir inhibiteur (Ben-Ari, 2002).

Chez les invertébrés, les données génétiques et structurales concernant les GABARs sont encore très fragmentaires, bien que des réponses inhibitrices aient été décelées dès 1957 sur des neurones de crustacés (Basemore et coll., 1957). Des réponses excitatrices ont aussi été rapportées chez *Drosophila melanogaster* au niveau cérébral. Comme chez les mammifères, le cotransporteur de type KCC est peu exprimé lors des stades précoces de développement, ce qui conduit à des dépolarisations GABAergiques, et l'expression augmente progressivement au cours du développement (Hekmat-Scafe et coll., 2006). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, le gène EXP-1 code pour une protéine qui forme également des GABARs excitateurs au niveau musculaire, mais cette excitation résulte d'un mouvement de cations et non d'ions chlorure (Beg et Jorgensen, 2003).

B Les GABARs de vertébrés

B.1 Localisation et structure

B.1.a Localisation

Les GABARs de vertébrés sont présents dans le SNC mais absents des muscles, ce qui constitue une différence importante avec les invertébrés, où les GABARs interviennent pour inhiber la contraction musculaire. Deux types de GABARs différant par leur composition en sous-unités et leur pharmacologie ont été identifiés : les GABA_ARs et les GABA_CRs. Les GABA_ARs sont ubiquitaires dans de nombreuses zones cérébrales, avec une localisation qui peut être pré-, post- ou extrasynaptique (Kullmann et coll., 2005). Les GABA_CRs sont aussi présents dans différentes zones du SNC, dans le système digestif, les testicules et les spermatozoïdes, mais ont été principalement étudiés dans la rétine (Jansen et coll., 2000 ; Chebib, 2004 ; Li, S. et coll., 2008).

B.1.b Structure et agencement des sous-unités

Les premières sous-unités des GABA_ARs de vertébrés ont été clonées à partir de cerveau bovin, et ont été appelées α et β (Schofield et coll., 1987). Les profils hydrophatiques réalisés alors ont permis de déterminer que chaque sous-unité est formée d'un grand domaine extracellulaire N-terminal et de quatre domaines transmembranaires (M1→M4) réunis par des boucles (figure 2A). Le récepteur complet est pentamérique (Nayeem et coll., 1994) et les segments transmembranaires sont arrangés de manière à ce que les domaines M2 forment un canal par lequel vont transiter des ions chlorure (figure 2B et C).

B.1.c Sous-unités

Seize sous-unités de GABA_ARs ont été clonées ($\alpha 1 \rightarrow 6$, $\beta 1 \rightarrow 3$, $\gamma 1 \rightarrow 3$, δ , ϵ , π et θ), ainsi que trois sous-unités de GABA_CRs ($\rho 1 \rightarrow 3$). Il est aujourd'hui établi que les GABA_ARs de vertébrés sont hétéromériques, bien que des récepteurs homomériques aient été obtenus dans des systèmes d'expression hétérologues comme l'ovocyte de xénope. Les récepteurs homomériques présentent en effet une pharmacologie généralement différente de celle des GABA_ARs natifs, comme c'est le cas pour les récepteurs formés de $\beta 1$ exprimée dans des ovocytes de xénope, qui sont insensibles à la bicuculline (Sanna et coll., 1995), ou encore les récepteurs homomériques $\beta 3$, insensibles au GABA (Davies et coll., 1997). La stœchiométrie des GABA_ARs est de type : 2α , 2β , 1γ , cette dernière sous-unité pouvant être remplacée par δ , ϵ , π ou θ (Luscher et Keller, 2004). Les GABA_CRs natifs contiennent des sous-unités ρ ($1 \rightarrow 3$) et peuvent être homomériques ou hétéromériques (Enz et Cutting, 1999).

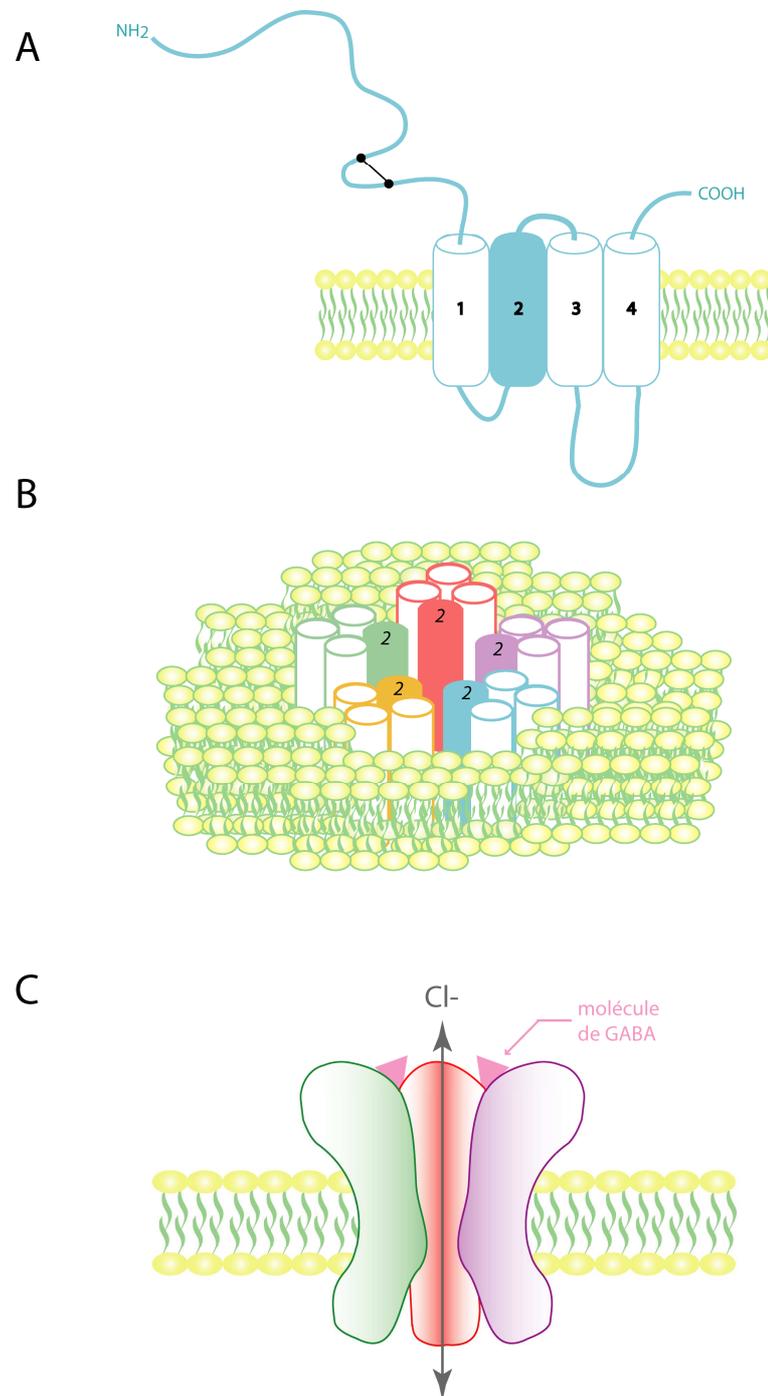


Figure 2 . Structure des GABARs ionotropes. A : Structure d'une sous-unité de GABAR, avec les quatre domaines transmembranaires et le doublet de cystéines (points noirs) caractéristiques de la superfamille "Cys-loop". **B :** Formation du canal central par les domaines transmembranaires M2. **C :** Organisation des sous-unités du GABAR autour d'un pore central par lequel transitent les ions chlorure.

Il a été montré que la localisation des récepteurs GABAergiques est dépendante de la composition en sous-unités (Nusser et coll., 1998). Par exemple, la localisation postsynaptique des GABA_ARs est déterminée par la présence des sous-unités $\gamma 2$ et $\gamma 3$, alors que les récepteurs contenant la sous-unité δ se trouvent plutôt dans les sites extra- et pérисynaptiques (Luscher et Keller, 2004).

B.1.d Domaines fonctionnels des récepteurs

Parmi les différents domaines constituant les GABA_ARs, trois demandent une attention plus particulière : le domaine N-terminal, contenant le site de liaison du GABA, le domaine transmembranaire 2 (M2), impliqué dans la constitution du canal central et site de fixation d'antagonistes, et la grande boucle M3-M4, cible de kinases. Le domaine M2 et la boucle M3-M4 seront présentés plus loin (paragraphe "Introduction bibliographique" II.E.2, p.55 et III.D.1, p.68, respectivement).

Des expériences de mutagenèse dirigée et des modélisations ont permis de mettre en évidence l'implication du domaine N-terminal dans la liaison du GABA. Le neurotransmetteur se fixe à l'interface entre les sous-unités α et β (Smith et Olsen, 1995 ; Cromer et coll., 2002). La comparaison de la séquence protéique de la sous-unité $\beta 2$ avec celle de l'AChBP, protéine contenant cinq sites de liaison de l'acétylcholine, a permis de proposer un découpage du site de fixation du GABA en cinq boucles (Ci et coll., 2008). Les résidus aromatiques ont été présentés comme étant importants dans l'interaction ligand-récepteur (Amin et Weiss, 1993). La figure 3 (p.26) résume les données actuelles concernant les sites probablement impliqués dans la liaison du ligand.

B.2 Pharmacologie

Les GABA_ARs et les GABA_CRs diffèrent par leur pharmacologie. Les molécules les plus étudiées ayant des sites de liaison sur ces récepteurs sont présentées dans le tableau 1.

	Agonistes	Antagonistes compétitifs	Antagonistes non compétitifs	Modulateurs allostériques
GABA _A	GABA, muscimol, isoguvacine, 3-APS, THIP, P4S, acide isonipécotique	SR95531, bicuculline	picrotoxine, TBPS, EBOB, BIDN, cyclodiènes, fipronil, lindane,	benzodiazépines, barbituriques, stéroïdes, alcool, ivermectine
GABA _C	GABA, TACA, CACA, TAMP	I4AA, 3-APMPA, TPMPA	picrotoxine	

Tableau 1 . Pharmacologie des GABA_ARs et GABA_CRs.

La pharmacologie des GABA_ARs est clairement dépendante de leur composition en sous-unités. Par exemple, les benzodiazépines, des modulateurs positifs des GABA_ARs, se fixent sur des récepteurs contenant la sous-unité γ (Sigel et Buhr, 1997) et la fixation des neurostéroïdes, qui sont également des modulateurs positifs des GABA_ARs, nécessite à la fois les sous-unités α et β (Hosie et coll., 2007). Quant aux différents GABA_CRs, ils ont une pharmacologie relativement semblable, bien qu'une différence notable dans la sensibilité à la picrotoxine (PTXine) ait été relevée : les récepteurs homomériques $\rho 2$ y sont plus sensibles que les récepteurs formés de $\rho 1$ (Enz et Cutting, 1999).

C Les GABARs d'invertébrés

La structure des GABARs d'invertébrés n'est pas définie, mais il est admis qu'elle est identique à celle des GABARs de vertébrés.

Les investigations électrophysiologiques prouvent l'existence ubiquitaire de GABARs chez plusieurs espèces d'invertébrés, d'embranchements différents (illustration par des exemples dans le tableau 6, pp.36-37), ce qui prouve l'importance de ces récepteurs dans l'ensemble du règne animal. Comme chez les vertébrés, il existe à la fois des récepteurs ionotropes et métabotropes. En effet, la présence de récepteurs GABA_B-like a clairement été démontrée chez la blatte *Periplaneta americana* (Hue, 1991 ; Bai et Sattelle, 1995 ; Hue et Amat, 1997 ; Le Corrionc et coll., 2002) ainsi que chez *C. elegans* (Schuske et coll., 2004 ; Dittman et Kaplan, 2008). De plus, trois sous-unités GABA_B-like, dont les transcrits sont très présents dans le système nerveux central, ont été clonées chez la drosophile (Mezler et coll., 2001). Une de ces sous-unités semble peu homologue des sous-unités GABA_B de vertébrés, avec des identités de séquence inférieures à 35%¹. Les GABARs ionotropes, sensibles aux insecticides, seront traités par la suite.

C.1 Les sous-unités clonées

L'étude de génomes permet de détecter la totalité des sous-unités pouvant entrer dans la composition des récepteurs ionotropes chez une espèce donnée. Chez *C.elegans*, plus de trente sous-unités de LGICs anioniques (GABARs et récepteurs ionotropes du glutamate dépendants des ions chlorure (GluClRs)) ont été mises en évidence (Bargmann, 1998). Cependant, seules les sous-unités UNC-49 (à l'origine de GABARs anioniques) et EXP-1 (donnant des GABARs cationiques) (Williamson et coll., 2007 ; Jones et Sattelle, 2008) ont été clonées et exprimées à ce jour. Chez *D. melanogaster*, dix protéines homologues de la superfamille GABA/Glycine entrent potentiellement dans la composition des GABARs ionotropes (Littleton et Ganetzky, 2000). Cependant, trois sous-unités seulement ont été clonées et exprimées à ce jour chez les insectes.

¹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

C.1.a RDL

La sous-unité RDL ("Resistance to dieldrin") de drosophile (606 acide aminés) est la première sous-unité de GABAR à avoir été totalement clonée chez l'insecte, suite à une recherche du gène responsable de la résistance aux cyclodiènes (ffrench-Constant et coll., 1991). Le locus unique du gène *Rdl* est localisé au niveau de l'emplacement 66F du bras gauche du chromosome III de *D. melanogaster*. La sous-unité RDL a par la suite été clonée chez de nombreuses espèces de différents ordres (tableau 2).

Ordre	
Diptères	<i>Drosophila melanogaster</i> (P25123)
	<i>Drosophila simulans</i> (AAK00512)
	<i>Anopheles gambiae</i> (EAA44137)
	<i>Aedes aegypti</i> (XP_001653205)
	<i>Musca domestica</i> (AAC23602)
	<i>Ceratitis capitata</i> (AAD51101)
	<i>Lucilia cuprina</i> (AAB81966)
Lépidoptères	<i>Heliothis virescens</i> (AAB62572)
	<i>Plutella xylostellus</i> (ABX47168)
	<i>Spodoptera exigua</i> (ABQ45398)
Coléoptères	<i>Tribolium castaneum</i> (ABU63595)
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (AAC23603)
Hyménoptères	<i>Apis mellifera</i> (AAC63381)
Blattoptères	<i>Blattella germanica</i> (AAB33736)
Siphonaptères	<i>Ctenocephalides felis</i> (CAG30670)

Tableau 2 . Présence de la sous-unité RDL chez des insectes de différents ordres. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI¹. Les numéros d'accèsion sont indiqués entre parenthèses.

La comparaison du gène *Rdl* avec d'autres séquences déposées dans des banques de données a permis de déterminer qu'il code pour une sous-unité de GABA_ARs. Cependant, la comparaison de la séquence protéique de RDL avec celles de sous-unités GABAergiques et glycinergiques montre une identité plus forte avec les récepteurs de la glycine qu'avec les récepteurs du GABA (ffrench-Constant et Rocheleau, 1992). De plus, la présence d'un doublet de cystéines en partie N-terminale, associée à un profil hydrophatique identique à celui des récepteurs de la superfamille des LGICs, à savoir quatre domaines transmembranaires, fait de RDL un membre de la superfamille "Cys-loop", et plus précisément de la famille GABA/Glycine-like. Au niveau génique, la taille du locus (plus de

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

50 kb) contraste avec celle de l'ARNm mature (8,8 kb avec une ORF de "seulement" 2 kb) (ffrench-Constant et coll., 2000).

Les résultats obtenus par hybridation *in situ* ou par immuno-cytochimie et -histochimie ont permis de démontrer la présence de l'ARNm et de la sous-unité RDL de manière ubiquitaire dans le système nerveux central, notamment dans le cerveau, de *Drosophila melanogaster* (Aronstein et ffrench-Constant, 1995 ; Harrison et coll., 1996 ; Stilwell et ffrench-Constant, 1998 ; Lee, D. et coll., 2003 ; Liu et coll., 2007), *Calliphora erythrocephala* (Brotz et coll., 1997), *Manduca sexta* (Sattelle et coll., 2003) et de *Periplaneta americana* (Sattelle et coll., 2000). L'hybridation *in situ* montre aussi une expression du transcrit de la sous-unité RDL dans le système nerveux périphérique (Stilwell et ffrench-Constant, 1998). De manière générale, la sous-unité est principalement retrouvée au niveau neuropilaire, lieu de contacts synaptiques. Il est aussi à noter que RDL ne semble pas présente au niveau musculaire (Harrison et coll., 1996).

Le fait que la perte du locus *Rdl* soit létale pour la drosophile souligne l'importance fonctionnelle de cette sous-unité, et par extension, des GABARs chez l'insecte (Stilwell et ffrench-Constant, 1998 ; ffrench-Constant et coll., 2000). La sous-unité RDL semble jouer un rôle dans la transmission synaptique rapide (Bloomquist, 2001 ; Lee, D. et coll., 2003 ; Buckingham et coll., 2005), l'apprentissage (Liu et coll., 2007), la latence du sommeil (période précédant le sommeil paradoxal) (Agosto et coll., 2008), les processus olfactifs (Sattelle et coll., 2000 ; Liu et coll., 2007), visuels (Sattelle et coll., 2000 ; Buckingham et coll., 2005), gustatifs (Bloomquist, 2001) et mécanosensoriels (Sattelle et coll., 2000).

Les sous-unités RDL s'assemblent dans des systèmes hétérologues pour former des GABARs fonctionnels perméables aux ions chlorure et sensibles au GABA mais pas à la glycine (Buckingham et coll., 1994 ; Millar et coll., 1994), confirmant leur appartenance à la famille des GABARs. Les sites de liaison du GABA sur la sous-unité RDL ne sont pas clairement définis à ce jour. Cependant, des alignements de séquences avec les sous-unités de GABA_ARs de vertébrés, et plus exactement avec les résidus mutés qui affectent la réponse au GABA, permettent de prévoir les sites potentiellement impliqués dans la fixation du ligand (figure 3).

Hsap $\alpha 1$	M-----	RKSP-GLSDC	LWAWILLLLST	LTGRSYGQP-	--SLQDELKD	NTTV----FT	
Hsap $\beta 2$	M-----W	RVR---KRGY	FGIWSFP---	LII-----	-----AAVCA	QSVNDPSNMS	
Dmel RDL	MSDSKMDKLA	RMAPLPRTP	LTIWLAINMA	LIAQETGHKR	IHTVQAATGG	GSMLGDVNI	
<i>Boucle D</i>							
Hsap $\alpha 1$	RIL---DRL	DGYDNRLRPG	LGERVTEVKT	DIFVTSFGPV	SDHDMEY	LD VFFRQS WKDE	
Hsap $\beta 2$	LVKETVDRL	KGYDIRLRPD	FGGPPVAVGM	NIDIASIDMV	SEVNMDYTL	MYFQQAWRDK	
Dmel RDL	AIL---DSFS	VSYDKRVRPN	YGGPPVEVGV	TMYVLSISSV	SEVLMDF	LD FYFRQ FWTDP	
				<i>Boucle A</i>	<i>Boucle E</i>		
Hsap $\alpha 1$	RLKF-KGP-M	TVLRNLNLMA	SKIWTPDTFF	HNGKKSVAHN	MTMPNKLL	RI TEDGTLTYTM	
Hsap $\beta 2$	RLSYNVIP--	LNLTLNDRVA	DQLWVPDITYF	LNDKKS FVHG	VTVKNRMIRL	HPDGTVLYGL	
Dmel RDL	RLAYRKRPGV	ETLSVGSEFI	KNIWVPD	TFV NEKQS YFHI	ATTSNEF	IRV HHS GSITRSI	
<i>Cys-loop</i>			<i>Boucle B</i>				
Hsap $\alpha 1$	RLTVRAE	CPM HLED	FPMDAH	ACPLKFG	SSYA YTRAEV	VYEW TREPARS	VVV AEDGSRLNQY
Hsap $\beta 2$	RITTTAA	CPM DLRRY	PLDEQ	NCTLEIES	YG YTTDDI	EFYV -RGDDNAV	TG VTK-IELPQF
Dmel RDL	RLTITAS	CPM NLOQY	FPMDRO	LCHIEI	ESFG YTMRD	IRYFW -RDGLSS	VGM SSE-VELPQF
<i>Boucle C</i>							
Hsap $\alpha 1$	DLGQTVDSG	IVQSS--TGE	YVMTTHFHL	KRKIGYFVIQ	TYLPCIMTVI	LSQVSFWLNR	
Hsap $\beta 2$	SIVDYKLITK	KVVFS--TGS	YPRLS LSFKL	KRNIGYFILQ	TYMPSILITI	LSWVSFWINY	
Dmel RDL	RVRVLGHRQR	ATEINLT	TGN YS RLACEIQF	VRSMGYyliQ	IYIPSGLIVI	ISWVSFWLNR	
Hsap $\alpha 1$	ESVP						
Hsap $\beta 2$	DASA						
Dmel RDL	NATP						

Figure 3 . Alignement des parties N-terminales des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 2$ (*Homo sapiens*) avec la sous-unité RDL de *Drosophila melanogaster*, à l'aide du site AlignP¹. Les résidus qui ont été présentés comme faisant partie du site de fixation du GABA sont en couleur, selon la référence utilisée : vert (Leite et Cascio, 2001), marron (Sigel et coll., 1992), bleu foncé (Boileau et coll., 1999), bleu clair (Ci et coll., 2008), orange (Amin et Weiss, 1993), rose (Kash et coll., 2004). Les acides aminés formant les boucles probablement impliquées dans le site du fixation du GABA sont encadrées (Ci et coll., 2008). Les résidus de la sous-unité RDL qui s'alignent avec ces acides aminés sont indiqués en rouge.

C.1.b LCCH3

La sous-unité LCCH3 ("ligand-gated chloride channel homologue 3") a été clonée chez *D. melanogaster* (Henderson et coll., 1993). Elle est longue de 496 acides aminés et possède une identité de 47% avec la sous-unité β des GABA_ARs de vertébrés. A ce titre, elle a été baptisée "sous-unité β de drosophile". Le locus est situé en position 13A du chromosome X de *D. melanogaster* (Henderson et coll., 1993). Comme dans le cas de la sous-

¹ http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/alignp_in.pl

unité RDL, la protéine LCCH3 a été identifiée chez d'autres espèces que la drosophile (tableau 3).

Ordre	
Diptères	<i>Drosophila melanogaster</i> (Q08832)
	<i>Anopheles gambiae</i> (EAA06524)
Lépidoptères	<i>Heliothis virescens</i> (AAB62565)
Coléoptères	<i>Tribolium castaneum</i> (NP_001103251)
Hyménoptères	<i>Apis mellifera</i> (ABG75736)

Tableau 3 . Présence de la sous-unité LCCH3 et de ses homologues chez des insectes de différents ordres. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI¹. Les numéros d'accèsion sont indiqués entre parenthèses

La sous-unité LCCH3 et son ARNm ont été localisés chez la drosophile, à l'aide d'anticorps et par hybridation *in situ*, respectivement. L'apparition des sous-unités LCCH3 est précoce puisqu'elle débute dès le stade 11 du développement de l'embryon, dans la majorité des neuroblastes. Les stades 14 et 15 montrent un localisation ubiquitaire de la sous-unité et de l'ARNm dans le système nerveux central, mais restreinte aux corps cellulaires, avec absence de signal dans le neuropile (Aronstein et coll., 1996).

La sous-unité LCCH3 exprimée seule ne permet pas d'obtenir des courants GABAergiques (Zhang et coll., 1995 ; Gisselmann et coll., 2004).

C.1.c GRD

La dernière sous-unité de drosophile clonée (numéro d'accèsion : Q24352), GRD ("GABA and glycine-like receptor of *Drosophila*") (616 résidus) a une identité de 30-40% avec les sous-unités de GABARs et les récepteurs glycinergiques (GlyRs) de vertébrés (Harvey et coll., 1994). Elle possède une identité de 27% avec RDL. Le locus est en position 75A du bras gauche du chromosome III de *D. melanogaster*. La sous-unité GRD a aussi été identifiée chez *Apis mellifera* (ABG75735) et *Tribolium castaneum* (ABU63597) (d'après la

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

banque de données protéiques NCBI¹ ; les numéros d'accèsion sont indiqués entre parenthèses).

La localisation de la sous-unité GRD est indéterminée. Cependant, des ARNm de GRD ont été détectés dans la tête de drosophile, dans le cadre d'une étude sur le syndrome du chromosome X fragile (D'Hulst et coll., 2006).

De même que pour LCCH3, l'expression de l'ARNm de GRD dans des ovocytes de xénope ne donne pas de récepteurs répondant au GABA ou à d'autres neurotransmetteurs dont la glycine, même à forte concentration (Harvey et coll., 1994 ; Gisselmann et coll., 2004). La co-expression de la sous-unité GRD avec des sous-unités $\alpha 1$ ou $\beta 1$ de GABARs bovins, ou encore avec la sous-unité β du récepteur glycinergique de rat, ne permet pas non plus d'obtenir des récepteurs fonctionnels (Harvey et coll., 1994).

C.1.d Autres sous-unités de GABARs d'invertébrés

L'analyse de séquences génétiques de *D. melanogaster* a révélé l'existence d'une autre sous-unité potentielle, AAF48539. Là encore, cette protéine ne donne pas de GABARs fonctionnels dans l'ovocyte de xénope (Gisselmann et coll., 2004). Un alignement avec les autres sous-unités clonées permet de déterminer des identités de séquence d'environ 30% (site AlignP²).

Deux sous-unités de GABARs ont aussi été clonées chez la lymnée des étangs (*Lymnaea stagnalis*). La sous-unité β forme des récepteurs fonctionnels lorsqu'elle est exprimée seule ou en combinaison avec une sous-unité α de GABA_AR bovin dans des ovocytes de xénope (Harvey et coll., 1991). La sous-unité ζ de la lymnée possède des identités de séquence de 30-40% avec la sous-unité β de la même espèce et la sous-unité RDL de *D. melanogaster*, mais aussi avec des sous-unités de GABA_AR, de GABA_CR et de GlyR. Cependant, l'expression de la sous-unité dans des ovocytes de xénope seule ou en

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

² http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/alignp_in.pl

combinaison ne donne pas de courants, malgré l'application de différents neurotransmetteurs, dont le GABA et la glycine (Hutton et coll., 1993).

Chez *C. elegans*, le locus *unc-49* est à l'origine de trois produits d'expression. Les sous-unités obtenues, UNC-49A, -49B et -49C, ressemblent à la sous-unité RDL de *D. melanogaster*. Néanmoins, les transcrits de UNC-49A sont très faiblement détectés chez l'individu adulte, alors que les transcrits UNC-49B et UNC-49C sont clairement présents (Bamber et coll., 1999). Chez cette espèce, les GABARs sont principalement situés au niveau des jonctions neuromusculaires (Bamber et coll., 1999 ; Schuske et coll., 2004). Des travaux utilisant des protéines de fusion fluorescentes ont permis de visualiser les motoneurones GABAergiques, et de comparer leur localisation avec celle des GABARs constitués de sous-unités de type UNC-49. Les résultats indiquent que les GABARs de *C. elegans* sont en fait localisés en amas au niveau des jonctions neuromusculaires, et font face aux différenciations présynaptiques GABAergiques (Gally et Bessereau, 2003a, 2003b). Uniquement la sous-unité UNC-49B seule ou en combinaison avec UNC-49C donne des récepteurs du GABA fonctionnels, perméables aux ions chlorure, lorsqu'elle est exprimée dans l'ovocyte de xénope (Bamber et coll., 1999). Des gènes homologues à celui de UNC-49 sont retrouvés dans les génomes de *Brugia malayi* (parasite filaire) et *Trichinella spiralis* (nématode parasite) (Williamson et coll., 2007). La sous-unité GAB-1, orthologue de LCCH3 (Dent, 2006), a été clonée chez *C. elegans* (Feng et coll., 2002). Les récepteurs homomériques formés de cette sous-unité sont insensibles au GABA. Cependant, des récepteurs hétéromériques formés de la protéine GAB-1 et de la sous-unité HG1 (clonée chez le nématode *Haemonchus contortus* et proche des sous-unités α/γ de vertébrés) sont sensibles au GABA (Feng et coll., 2002).

Une autre sous-unité, EXP-1, a aussi été clonée chez *C. elegans*. Elle est impliquée dans la défécation et est localisée au niveau des jonctions neuromusculaires (Beg et Jorgensen, 2003). La séquence protéique de la sous-unité EXP-1 est peu homologue de celles des sous-unités RDL, LCCH3 ou GRD de *D. melanogaster*, puisque les identités de séquences sont comprises entre 22 et 25,7%¹. Qui plus est, les réponses obtenues après application de GABA sur des récepteurs EXP-1 exprimés sont de type sodique (Beg et Jorgensen, 2003).

¹ http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/alignp_in.pl

Il semblerait que d'autres gènes codant pour des sous-unités de GABARs soient présents dans le génome de *C.elegans* et soient encore non identifiés. Ces gènes coderaient pour des sous-unités α - et β -like, une autre sous-unité de type UNC-49 et une sous-unité apparentée à EXP-1 (Schuske et coll., 2004).

C.2 Accroissement de la diversité des sous-unités par des modifications post-transcriptionnelles

Un même gène de sous-unité de GABARs peut donner des isoformes différentes, du fait de modifications post-transcriptionnelles telles que l'épissage alternatif ou l'édition de l'ARNm. Dans les deux cas, il s'agit d'un remaniement de l'ARN pré-messager, qui aboutit à une modification ponctuelle pour ce qui est de l'édition, et une modification plus étendue pour l'épissage. Ce dernier repose sur l'obtention d'ARNm qui diffèrent dans leur composition en exons, alors que l'édition permet de changer des acides aminés de manière ponctuelle. Les deux modifications peuvent se combiner, puisque chez les mammifères, l'édition d'un récepteur glutamatergique entraîne l'accumulation d'ARN n'ayant pas subi d'épissage (Bass, B.L., 2002). L'importance de ces phénomènes réside dans le fait qu'ils peuvent générer un nombre important de variants, puisque par exemple un seul gène de nAChR de drosophile ($\alpha 6$) peut théoriquement former plus de 30 000 isoformes du fait de ces modifications post-transcriptionnelles (Grauso et coll., 2002).

Chez les invertébrés, ces mécanismes affectent plusieurs types de canaux et récepteurs. Par exemple, chez la drosophile, quatre des dix sous-unités de nAChRs présentes dans le génome sont affectées par un épissage (Sattelle et coll., 2005). Chez le même insecte, l'ARNm de la sous-unité α de GluClR possède aussi plusieurs sites d'épissage et d'édition (Semenov et Pak, 1999). Des éditions existent également chez *Musca domestica* (nAChR Md $\alpha 6$, (Gao et coll., 2007)), *Drosophila melanogaster* et *virilis* (canal para, (Hanrahan et coll., 2000)). Enfin, chez *Blattella germanica*, les éditions de la sous-unité α du canal sodique BgNa(v) sont tissu-spécifiques, et dépendantes du stade de développement (Song, W. et coll., 2004), ce qui permet de supposer qu'elles jouent un rôle important sur le plan fonctionnel.

C.2.a Epissage alternatif

L'ARN pré-messager de la sous-unité RDL présente neuf exons, dont deux subissent un épissage alternatif : l'exon 3 (dont les variants sont 3a et 3b) et l'exon 6 (variants 6c et 6d), ce qui permet d'obtenir quatre variants d'épissage (RDLac, ad, bc et bd) (figure 4 et figure 5, p.33).

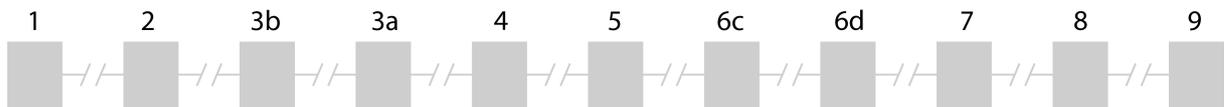


Figure 4 . Organisation génomique des exons du gène *Rdl* de *D. melanogaster*. Modifié d'après ffrench-Constant et Rocheleau, 1992, 1993.

Chez la drosophile, les séquences peptidiques codées par les exons 3a et 3b ou 6c et 6d diffèrent par deux et dix acides aminés, respectivement. La première sous-unité clonée chez la drosophile est de type "ac", et ce variant est retrouvé chez *Aedes aegypti* (Thompson, M. et coll., 1993). La sous-unité "bd" est présente chez plusieurs espèces, dont *Drosophila melanogaster* (ffrench-Constant et Rocheleau, 1993), *Drosophila simulans* (Le Goff et coll., 2005), *Musca domestica* (Eguchi et coll., 2006), *Heliothis virescens* (Wolff et Wingate, 1998), *Laodelphax striatellus* (Narusuye et coll., 2007) et *Spodoptera exigua* (Shang et coll., 2008). Une sous-unité proche de RDLbd (DRC 17-1-2) a été clonée chez *D. melanogaster* mais quelques acides aminés diffèrent (Chen, R. et coll., 1994). Après analyse à l'aide des données actuelles, les différences constatées s'avèrent être deux éditions (R122•G et M360•V).

Chez *D. melanogaster*, les variants de la sous-unité RDL résultant de l'épissage alternatif (RDLac, RDLad, RDLbc et RDLbd) ont tous été détectés par clonage (ffrench-Constant et Rocheleau, 1993), alors que chez certaines espèces d'insectes, seuls un à trois variants ont été identifiés à ce jour (tableau 4).

	Isoformes épissées de type...	N° Accession
<i>Drosophila simulans</i>	bc	EDX09812 ; XP_002084227
	bd	Q9BLY8 ; AAK00512
<i>Anopheles gambiae</i>	ac	EAA44136
	bc	EAA44137
	bd	EDO63781
<i>Heliothis virescens</i>	ad	AAB62572
	bd	AAB62563
	d	AAB62564
<i>Apis mellifera</i>	d	AAC63381
	bd	ABG75734
<i>Blattella germanica</i>	c	AAB33734 ; AAB33736
<i>Aedes aegypti</i>	ac	AAA68961
<i>Tribolium castaneum</i>	ac	ABU63594 ; NP_001107808
	bd	ABU63595 ; ABU63596 ; NP_001107809 ; NP_001107764 ; AAB81523
<i>Spodoptera exigua</i>	bd	ABQ45398
<i>Laodelphax striatellus</i>	bd	BAF31884

Tableau 4 . Variants d'épissage de la sous-unité RDL chez différentes espèces d'insectes. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI¹.

Chez la drosophile, les conductances des récepteurs homomériques RDLac (21,4 pS) et RDLbd (20 pS) sont quasiment identiques (Zhang et coll., 1995). Chez *C. elegans*, le locus *unc-49* permet de générer trois sous-unités distinctes par épissage alternatif. Néanmoins la fonctionnalité des trois sous-unités n'est pas la même puisque, comme précisé plus haut (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" I.C.1.d, p.28), seule la sous-unité UNC-49B donne des récepteurs homomériques fonctionnels (Bamber et coll., 1999).

A titre indicatif, chez les vertébrés, l'épissage alternatif a été observé pour plusieurs sous-unités de GABA_ARs. C'est le cas pour $\gamma 2$, dont les isoformes sont $\gamma 2S$ et $\gamma 2L$, et diffèrent par huit acides aminés (Whiting et coll., 1990), ou encore $\beta 2$, qui donne $\beta 2S$ et $\beta 2L$, avec une insertion de 38 résidus (McKinley et coll., 1995).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

C.2.b Edition de l'ARNm

Plusieurs types d'édition de l'ARNm ont été décrits (C→U, U→C, A→I(G)). Cependant, seule l'édition de type A→I sera évoquée ici car elle est la seule à avoir été observée dans le cas des GABARs. Elle résulte de l'action d'une enzyme, l'ADAR (pour "adenosine deaminases that act on RNA"), qui cible l'ARN partiellement ou complètement bicaténaire, et qui catalyse la déamination d'une adénosine pour donner une inosine. Cette dernière sera considérée comme une guanosine par la machinerie traductionnelle (Bass, B.L., 2002). Ce type d'édition peut donner lieu à la création, la délétion ou la modification d'un codon, la création d'un site d'épissage ou la modification de la structure de l'ARN. Contrairement à ce qui est observé chez les vertébrés, une délétion de l'ADAR n'est pas létale chez les insectes. Cependant, chez la drosophile, cette délétion est à l'origine de changements comportementaux, tels que des défauts dans le contrôle moteur, la reproduction et le vol (Palladino et coll., 2000). Chez *C. elegans*, les effets de la délétion sont moindres, et consistent en des défauts du chimiotactisme (Bass, B.L., 2002).

En ce qui concerne la sous-unité RDL, plusieurs sites d'édition de type A→I ont été décrits chez *D. melanogaster* : R122→G, I283→V, N294→D et M360→V (Hoopengardner et coll., 2003 ; Buckingham et coll., 2005) (figure 5).

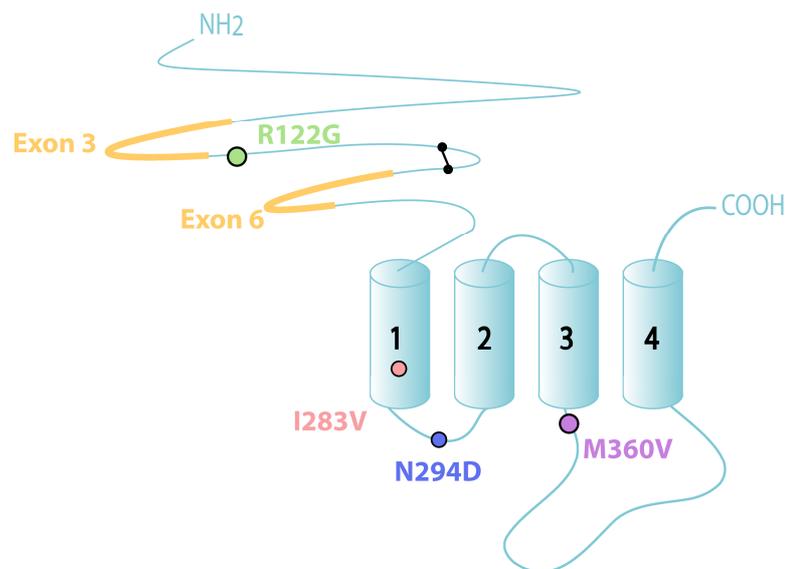


Figure 5 . Représentation schématique de la sous-unité RDL, montrant la localisation des sites d'édition ainsi que la position des séquences codées par les exons épissés. Le doublet de cystéines est représenté par deux points noirs.

L'analyse des séquences de la sous-unité RDL dans les banques de données montre que ces sites d'édition sont retrouvés chez plusieurs espèces (tableau 5).

	R122•G/K	I283•V	N294•D	M360•V	N° Accession
<i>Drosophila simulans</i>	R122•G	✓			AAK00512 ; Q9BLY8 ; (Le Goff et coll., 2005)
<i>Heliothis virescens</i>	R122•K (AGA•AAA)				AAB62563 ; AAB62572
<i>Apis mellifera</i>	R122•K (AGA•AAG)				AAC63381 ; XP_001120292
<i>Aedes aegypti</i>			✓		AAA68961
<i>Tribolium castaneum</i>	R122•G (AGA•GGA)				AAB81523
<i>Lucilia cuprina</i>		✓			AAB81966
<i>Musca domestica</i>	R122•G (AGA•GGA)		✓		AAC23602 ; Q75NA5
<i>Ceratitis capitata</i>	R122•G (AGA•GGA)		✓		AAD51101
<i>Spodoptera exigua</i>	R122•K (AGA•AAA)				ABQ45398

Tableau 5 . Sites d'édition présents dans la sous-unité RDL, selon l'espèce. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI¹.

Le rôle de l'édition dans la pharmacologie des GABARs et leur sensibilité aux insecticides n'ayant jamais été analysé, cette étude constitue l'un des objectifs de cette thèse.

A titre comparatif, une étude récente montre que chez les vertébrés, la sous-unité $\alpha 3$ des GABA_ARs peut être éditée (Ohlson et coll., 2007). Cette édition prend de l'ampleur avec l'âge chez les souris. Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle des modifications pharmacologiques pourraient découler de cette édition.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

C.3 Pharmacologie des GABARs d'invertébrés

Les tableaux 6 et 7 présentent des exemples représentatifs de la pharmacologie des GABARs natifs ou exprimés d'invertébrés.

	<i>D. melanogaster</i>	<i>M. sexta</i>			<i>A. mellifera</i>	<i>L. migratoria</i>	<i>C. elegans</i>	<i>L. polyphemus</i>
Préparation	neurones embryonnaires en culture	neurones de lobe antennaire	neurones de lobe antennaire	microsacs formés de membrane de larves (tête et ganglions)	cellules de lobe antennaire de pupe	neurones de ganglion thoracique	cellules musculaires de la paroi du corps ("body wall muscles")	neurones de ganglions abdominaux et circum-oesophagiens
Agonistes (autres que GABA)			muscimol		muscimol, CACA	muscimol	muscimol	muscimol
Antagonistes compétitifs	bicuculline	bicuculline	bicuculline	bicuculline	bicuculline	bicuculline		bicuculline
Autres antagonistes	PTX	PTX, PTXine		PTXine	PTX, fipronil	PTX		PTX, PTXine, picrotine, TBPS
Références	(Lee, D. et coll., 2003)	(Waldrop et coll., 1987)	(Christensen et coll., 1998)	(Sattelle et coll., 2003)	(Barbara et coll., 2005)	(Neumann et coll., 1987)	(Richmond et Jorgensen, 1999)	(Walker et coll., 1981)

Tableau 6. Pharmacologie de GABARs natifs. "bicuculline" signifie insensible à la bicuculline.

<i>P. americana</i>										
Préparation	extraits de système nerveux	Fibres musculaires (muscle coxal)	neurones <i>in situ</i>	neurones DUM en culture	neurones embryonnaires cérébraux en culture	neurones cérébraux en culture	neurones de ganglions thoraciques et abdominaux	neurones du dernier ganglion abdominal	neurones ganglion thoracique	neurones du troisième ganglion thoracique
Agonistes (autres que GABA)	GABA ~ muscimol THIP, 3-APS, isoguvacine	muscimol > GABA > THIP	isoguvacine > > muscimol ≥ GABA > 3-APS	CACA	muscimol	muscimol, CACA, TACA	muscimol			
Antagonistes compétitifs	Bicuculline	bicuculline	bicuculline (potentiel de repos) bicuculline (potentiels hyperpolarisés)		bicuculline	Bicuculline SR95531			bicuculline	
Autres antagonistes		PTXine, kétoendrine, endrine, époxyde d'heptachlore	PTX	PTX, BIDN	PTX, TBPS, lindane	PTX, TBPS, lindane		EBOB, lindane	fipronil, dieldrine	PTX
Références	(Lummis et Sattelle, 1985)	(Schnee et coll., 1997)	(Sattelle et coll., 1988)	(Alix et coll., 2002)	(Shimahara et coll., 1987)	(Aydar et Beadle, 1999)	(Walker et coll., 1981)	(Ihara et coll., 2005)	(Zhao et coll., 2003)	(Malécot et Sattelle, 1990)

Pharmacologie de GABARs natifs (suite). "bicuculline" signifie insensible à la bicuculline.

<i>D. melanogaster</i>	
Sous-unité exprimée	RDLbd
	RDLac
Agonistes (autres que GABA)	<p>muscimol \geq GABA \geq TACA \geq ZAPA \geq isoguvacine \geq acide isonipécotique \geq CACA \geq β- alanine $>$ 3-APS</p> <p>GABA $>$ TACA $>$ muscimol $>$ CACA</p> <p>GABA = TACA $>$ CACA</p> <p>muscimol</p>
Antagonistes compétitifs	<p>SR95531</p> <p>bicuculline</p> <p>bicuculline</p>
Autres antagonistes	<p>PTXine $>$ EBOB $>$ fipronil \geq TBPS</p> <p>PTXine, EBOB, fipronil</p> <p>PTXine, TBPS, EBOB, fipronil</p> <p>PTXine, TBPS, EBOB, fipronil</p> <p>PTXine, EBOB, TBPS, EBOB, BIDN, dieldrine</p> <p>PTXine, TBPS, EBOB, BIDN, dieldrine</p> <p>PTXine, EBOB, fipronil</p> <p>PTXine, EBOB, fipronil</p>
Références	<p>(Hosie et Sattelle, 1996a)</p> <p>(Buckingham et coll., 1994)</p> <p>(Millar et coll., 1994)</p> <p>(ffrench-Constant et coll., 1993a)</p> <p>(Buckingham et coll., 1996)</p> <p>(Shirai et coll., 1995)</p> <p>(Grolleau et Sattelle, 2000)</p> <p>(Le Goff et coll., 2005)</p>

Tableau 7 . Pharmacologie de GABARs exprimés. "bicuculline" signifie insensible à la bicuculline.

	<i>D. melanogaster</i>	<i>M. domestica</i>	<i>D. variabilis</i>	<i>H. virescens</i>	<i>L. striatellus</i>	<i>L. stagnalis</i>
Sous-unité exprimée	DRC 17-1-2 (RDLbd)	MdRDL(bd)	RDLdv	HVRDL	RDLbd	β
Agonistes (autres que GABA)	muscimol			muscimol > GABA	muscimol ≥ GABA > isoguvacine > CACA	muscimol, 4'-chlorodiazépam, diazépam
Antagonistes compétitifs	bicuculline			bicuculline	SR95531	bicuculline
Autres antagonistes	PTX > TBPS	PTXine, fipronil, lindane	PTXine, fipronil	PTXine, fipronil, dieldrine	EBOB, dieldrine, fipronil	PTX, endrine, époxyde d'heptachlore
Références	(Chen, R. et coll., 1994)	(Eguchi et coll., 2006)	(Zheng et coll., 2003)	(Wolff et Wingate, 1998)	(Narusuye et coll., 2007)	(Harvey et coll., 1991 ; Zaman et coll., 1992)

Pharmacologie de GABARs exprimés (suite). "bicuculline" signifie insensible à la bicuculline.

Les tableaux 6 et 7 permettent de constater que les récepteurs homomériques RDL possèdent une pharmacologie présentant des similitudes à la fois avec les GABA_ARs (sensibilité aux benzodiazépines, par exemple) et les GABA_CRs (sensibilité au CACA, notamment). La classification utilisée pour les GABA_ARs de vertébrés n'est donc pas applicable aux insectes. De plus, ces tableaux montrent des analogies importantes dans la pharmacologie des récepteurs natifs et des récepteurs homomériques RDL. Néanmoins, quelques différences laissent supposer que les GABA_ARs natifs ne comportent pas uniquement la sous-unité RDL.

C.4 Composition en sous-unités des GABA_ARs natifs d'insectes

Le fait que les sous-unités GRD et LCCH3 ne donnent pas de récepteurs fonctionnels quand elles sont exprimées seules suggère l'implication d'autres sous-unités pour une fonction correcte des récepteurs contenant ces protéines. De plus, les GABA_ARs natifs et exprimés (RDL) présentent quelques différences dans leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, ce qui autorise à penser que les récepteurs contenant la sous-unité RDL sont également hétéromériques. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent cependant pas de déterminer la constitution exacte des GABA_ARs natifs, car le nombre de sous-unités clonées est encore faible.

C.4.a Les GABA_ARs natifs : avec ou sans RDL ?

L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-RDL suggère que la sous-unité n'est pas présente au niveau musculaire (Harrison et coll., 1996). Or des courants chlorure induits par le GABA ont été observés dans le muscle squelettique de *P. americana* (Rauh et coll., 1997 ; Schnee et coll., 1997), ce qui conduit à penser que les récepteurs GABA_Aergiques anioniques présents dans les muscles sont formés d'autres sous-unités que RDL. En ce qui concerne les récepteurs neuronaux, aussi bien les GABA_ARs natifs de neurones de *D. melanogaster* (Zhang et coll., 1994) que les récepteurs RDLac exprimés dans des cellules

S2 (Grolleau et Sattelle, 2000) présentent deux temps d'ouverture, un long et un court. Toutefois, le temps long s'avère être plus court pour les récepteurs RDLac. En outre, le temps moyen d'ouverture est de 118 ms pour des GABARs natifs (Zhang et coll., 1994), alors qu'il est de seulement 62 ms pour les récepteurs RDLac (Zhang et coll., 1995). Ces données biophysiques suggèrent donc que la sous-unité RDLac n'entre pas seule dans la composition des récepteurs neuronaux natifs.

La pharmacologie des GABARs natifs et des récepteurs RDL exprimés est très proche (tableaux 6 et 7, pp.36-39). Cependant, le 4'-chlorodiazépam, à l'origine d'une potentialisation du courant GABAergique chez l'insecte (Aydar et coll., 1995), est peu voire non efficace sur les récepteurs RDL (Millar et coll., 1994 ; Buckingham et coll., 1996 ; Hosie et Sattelle, 1996b). Une autre benzodiazépine, le flunitrazépam, potentialise le courant GABA dans des neurones cérébraux (Shimahara et coll., 1987) et le motoneurone Df de blatte (Sattelle et coll., 1988), et à plus forte concentration, le réduit, dans les neurones Df de *P. americana* (Sattelle et coll., 1988). La potentialisation de la réponse au GABA et au muscimol par le flunitrazépam a aussi été observée dans des neurones en culture de ganglions thoraciques de *Locusta migratoria* (Neumann et coll., 1987). Cependant, cette même molécule n'a pas d'effet sur les récepteurs RDL exprimés dans des ovocytes de xénope (Hosie et Sattelle, 1996b ; Wolff et Wingate, 1998) ou dans des cellules S2 de drosophile (Millar et coll., 1994). Même si la possibilité de récepteurs homomériques RDL natifs est envisageable, ces résultats renforcent l'idée que de nombreux GABARs natifs sont hétéromériques.

C.4.b Des GABARs natifs constitués des sous-unités RDL et LCCH3 ?

Comme signalé précédemment, parmi les sous-unités de *Drosophila melanogaster* clonées, seule RDL permet d'obtenir des récepteurs homomériques fonctionnels. Cependant, l'existence de récepteurs natifs formés de la sous-unité RDL en combinaison avec GRD et/ou LCCH3 est envisageable, puisque les trois sous-unités peuvent être retrouvées dans un même organisme comme chez *Drosophila melanogaster* (ffrench-Constant et coll., 1991 ; Henderson et coll., 1993 ; Harvey et coll., 1994), *Tribolium castaneum* (Jones et Sattelle, 2007) et *Apis mellifera* (Jones et coll., 2006).

Des récepteurs anioniques ont été produits par co-expression RDL/LCCH3 (Zhang et coll., 1995). Cependant, ces récepteurs présentent des différences importantes avec les GABARs natifs. Par exemple, les ouvertures du canal sont observées sous forme de bouffées, incompatibles avec le temps d'ouverture de 118 ms observé pour les GABARs natifs (Zhang et coll., 1994). De plus, deux états de sous-conductances, qui n'existent pas pour les récepteurs natifs, ont été relevés (Zhang et coll., 1995). La pharmacologie des récepteurs RDL/LCCH3 est également inhabituelle de par leur sensibilité à la bicuculline et leur insensibilité à la picrotoxine. Enfin, des études d'immunocytochimie comparant les localisations de RDL et LCCH3 montrent d'importantes différences : LCCH3 apparaît plus tôt au cours du développement embryonnaire (stade 11) et semble exclusivement associée aux corps cellulaires (Aronstein et coll., 1996), alors que RDL apparaît plus tard (stades 14-16) et est située principalement dans les neuropiles (Aronstein et French-Constant, 1995). Par conséquent, il semble peu probable que des GABARs natifs soient constitués des sous-unités RDL et LCCH3.

C.4.c Des GABARs natifs cationiques ?

Des ARNm de LCCH3, GRD et AAF48539 ont été injectées dans l'ovocyte de xénope, sous diverses combinaisons. Seuls les ovocytes avec les sous-unités LCCH3 et GRD ont permis d'obtenir des récepteurs fonctionnels. Cependant, contrairement aux récepteurs natifs, les GABARs obtenus ne conduisent pas les ions chlorure, mais sont cationiques, et laissent transiter les ions sodium et potassium (Gisselmann et coll., 2004). Des récepteurs cationiques perméables aux ions sodium ont aussi été obtenus par expression de la sous-unité EXP-1 de *C. elegans* (Beg et Jorgensen, 2003). *In vivo*, des réponses GABAergiques excitatrices faisant intervenir des cations ont été décrites chez divers invertébrés comme l'aplysie (Yarowsky et Carpenter, 1978) ou le crabe *Cancer borealis* (Swensen et coll., 2000), mais les sous-unités impliquées n'ont jamais été caractérisées sur le plan moléculaire. Chez les insectes, aucun GABAR cationique n'a été mis en évidence à ce jour dans le système nerveux central lors d'études électrophysiologiques et il reste à démontrer que des récepteurs hétéromériques LCCH3/GRD existent bien *in vivo*.

En résumé, il est peu probable que les sous-unités RDL, LCCH3 et GRD se combinent pour former des récepteurs hétéromériques natifs. La composition réelle des récepteurs contenant RDL reste donc indéterminée. Les seuls récepteurs hétéromériques natifs incluant la sous-unité RDL dont l'existence soit démontrée actuellement ont été découverts chez la drosophile. De façon surprenante, ils contiennent à la fois la sous-unité RDL et une sous-unité du GluClR, des protéines qui sont toutes les deux spécifiques des invertébrés (Ludmerer et coll., 2002). C'est le premier exemple connu de récepteurs ionotropes composés de sous-unités se liant à des neurotransmetteurs différents.

Chapitre II. Le fipronil, un insecticide antagoniste des GABARs

Les GABARs sont inhibés par de nombreux composés qui peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur mécanisme d'action. La bicuculline et la gabazine sont des antagonistes de type compétitif, c'est à dire des molécules qui se lient aux mêmes sites que le GABA et empêchent l'action de ce neurotransmetteur. Les avermectines (dont l'ivermectine) sont des molécules très complexes qui peuvent inhiber les réponses GABAergiques ou, au contraire, les potentialiser en fonction des doses utilisées (Raymond et Sattelle, 2002). Enfin, les antagonistes non compétitifs comme la picrotoxine, le TBPS ou l'EBOB empêchent l'action du GABA en bloquant le canal chlorure.

Exception faite des avermectines, les insecticides qui ciblent les GABARs ont un mécanisme d'action qui se rapproche de celui des antagonistes non compétitifs. Le groupe commercial le plus ancien (insecticides de première génération) est celui des polychlorocycloalcanes (cyclodiènes et lindane). Très utilisés dans les années 1940-50, la plupart (comme la dieldrine, l'aldrine, l'heptachlore, l'endrine et le chlordane) sont aujourd'hui interdits par la convention de Stockholm (2001), du fait de "leurs propriétés toxiques, leur rémanence, leur accumulation dans les organismes vivants, leur propagation et leur accumulation dans les écosystèmes terrestres et aquatiques", mais aussi en raison de leur faible sélectivité insectes/mammifères. Depuis sont apparus des composés dits de seconde génération, qui ont le même mode d'action, comme le fipronil (figure 6, p.48). Ce chapitre sera consacré à cet insecticide, très largement utilisé aujourd'hui.

A Le fipronil, découverte et utilisations

Le fipronil fait partie de la famille des phénylpyrazoles, des composés commercialisés pour leur activité herbicide. Néanmoins, le fipronil est aussi un nématicide mais il est surtout connu pour son activité insecticide. Il existe sous plusieurs formulations et est utilisé pour la protection des cultures (traitements de sol, traitement foliaire,...), la protection des animaux domestiques et la protection des locaux (conteneurs, greniers, crevasses murales,...). Son intérêt en tant qu'insecticide est qu'il est efficace à des doses faibles à très faibles (de l'ordre du milligramme à la centaine de gramme par hectare d'ingrédient actif, selon la formulation), comparé à d'autres substances actives (tableau 8).

Utilisation	Marque commerciale	Classe d'insecticides	Substance active (concentration dans la formulation)	Doses d'emploi de la formulation (g/m ²)	Quantité de substance active correspondante (g/ha)
Traitement de locaux	Goliath [®] gel (BASF Agro SAS)	phénylpyrazoles	fipronil (0,05%)	0,06	0,3
	Stomoxine [®] mural (Schering-Plough)	pyréthrinoides	perméthrine (25%)	0,25	625
	Ficam [®] W (Bayer Environmental Science SAS)	carbamates	bendiocarbe (80%)	1	8 000
Traitement du sol (fourmis)	Blitz [®] (BASF Agro SAS)	phénylpyrazoles	fipronil (0,003%)	10	3
	Insecte sol granule MFR (Florendi jardin)	organophosphorés	diazinon (5%)	20	10 000

Tableau 8 . Exemples de doses de substances actives utilisées pour des insecticides de différentes classes. Les produits cités sont autorisés en France, et les doses correspondent aux recommandations du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche¹, sauf pour Goliath[®] gel².

¹ <http://e-phy.agriculture.gouv.fr>

² http://www.goliathgel.com/fr/produit/micro_dosage/index.php

Qui plus est, un projet pour une nouvelle formulation qui consiste en des appâts pour larves de taupin (mené par l'université Grenoble I) est en cours (colloque "pesticides et environnement", décembre 2007¹). Cette formulation permet d'utiliser là encore de faibles doses, et offre une alternative au pelliculage de semences ou au microgranules de fipronil (produits aujourd'hui retirés du marché français²).

Bien que le fipronil se dégrade lentement dans les sols, sa rémanence est moindre que celle des polychlorocycloalcanes. En effet, le temps de demi-vie (TD₅₀) du fipronil dans les sols est compris entre 96 et 135 jours (d'après le "comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles de l'abeille", rapport de décembre 2005). A titre de comparaison, les TD₅₀ du chlordane, de la dieldrine ou de l'endrine (cyclodiènes) sont compris entre 4 et 14 ans³. De plus, le fipronil est relativement immobile dans le sol et l'eau et a un faible potentiel d'atteinte des nappes phréatiques par lessivage (Tingle et coll., 2002). En outre, son spectre d'efficacité est large, puisqu'il est utilisé contre les coléoptères (taupins), les diptères (mouches grises, mouches de semis), les thysanoptères (thrips), les orthoptères (criquets), les blattoptères, les isoptères (termites) et les hyménoptères (fourmis) (ACTA, 2005). Enfin son action se fait par contact et par ingestion (Buczowski, G. et Schal, 2001b). Il a aussi été montré que des blattes soumises à une formulation en gel concentré contenant du fipronil (Maxforce[®] FC, Bayer) excrètent des liquides toxiques pour leurs congénères (Buczowski, G. et Schal, 2001a).

Toutes ces caractéristiques expliquent l'engouement commercial pour le fipronil. La première synthèse de ce produit par Buntain et ses collaborateurs date de 1987, et une demande de brevet a été déposée sous le nom "Derivatives of N-phenylpyrazoles" par Rhône-Poulenc Agriculture la même année. Le brevet a plusieurs fois changé de propriétaire (2003 : Bayer Agriculture, 2004 : Bayer CropScience SA, 2005 : BASF Agro). En 2006, la protection définitive du brevet a été accordée à BASF, Lyon (Office européen des brevets⁴), qui a récemment annoncé son intention d'investir plus de 150 millions d'euros pour augmenter la production de quatre produits phytosanitaires, dont le fipronil⁵.

¹ <http://www.ecologie.gouv.fr>

² <http://e-phy.agriculture.gouv.fr>

³ <http://www.fao.org/docrep/005/X2570F/X2570F09.htm>

⁴ <http://ep.espacenet.com>

⁵ <http://www.forbes.com>

Le fipronil est d'autant plus efficace qu'il cible non seulement les GABARs, mais aussi les GluClRs, limitant l'impact des résistances croisées. En outre, il est plus sélectif pour les GABARs d'insectes comparé aux insecticides de première génération (paragraphe "Introduction", II.D, p.51 et II.F p.59).

B Les métabolites du fipronil

Dans l'environnement, le fipronil peut être dégradé dans les eaux, les sols et les plantes. Il est essentiellement photodégradé en désulfinyl-fipronil, mais il peut aussi être oxydé en sulfone, réduit en sulfide dans les sols (par des facteurs biotiques ou abiotiques) ou encore être hydrolysé en amide (faiblement) (Connelly, 2001 ; Gunasekara et Troung, 2007, California environmental protection agency¹). D'autres métabolites résultent de la transformation du fipronil (comme l'acide sulfonique), mais à moindre mesure.

Les principaux produits de dégradation du fipronil sont le fipronil sulfone (produit de métabolisation) et le désulfinyl-fipronil (produit par photodégradation) (figure 6). Ces deux composés exercent un effet insecticide, parfois plus important que le fipronil lui-même, notamment sur les vertébrés (tableaux 9 et 10).

¹ <http://www.calepa.ca.gov>

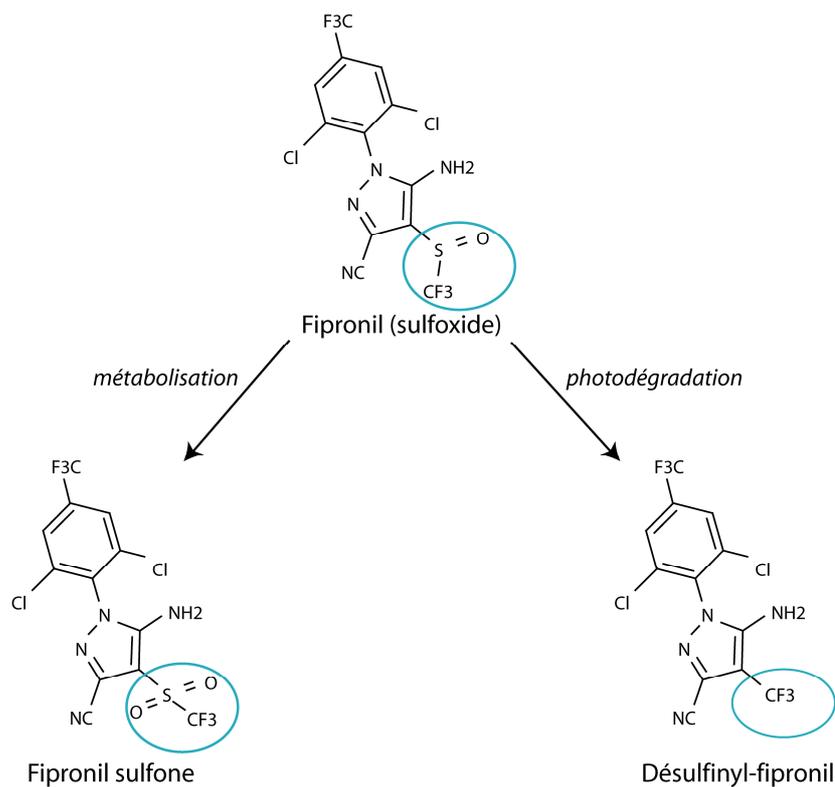


Figure 6 . Structure du fipronil et de ses métabolites majeurs.

B.1 Fipronil sulfone

Le dérivé sulfone du fipronil est le métabolite majeur chez les vertébrés (Hainzl et Casida, 1996 ; Roberts et Hutson, 1998) et chez les insectes (Scharf et coll., 2000 ; Durham et coll., 2002). Chez ces derniers, la métabolisation peut se faire 1) par les monooxygénases à cytochromes P450 (cyt P450) puisque le pipéronyl butoxide (PBO, inhibiteur de cyt P450) augmente l'effet du fipronil chez la mouche domestique (Cole et coll., 1993 ; Hainzl et Casida, 1996 ; Hainzl et coll., 1998), ou 2) par les glutathion S-transférases D1 chez *Drosophila simulans* (Le Goff, 2001). Le fipronil est rapidement métabolisé en fipronil sulfone dans l'organisme. Ce dernier est plus persistant, et a plus d'affinité *in vitro* pour les GABARs de souris que le fipronil, comme le montre le tableau 9 (Hainzl et coll., 1998). De même, les concentrations nécessaires pour obtenir 50% d'inhibition des courants chlorure générés par l'activation des GABARs de rat et des GluClRs de blatte sont moindres

pour le fipronil sulfone que pour le dérivé sulfoxyde, notamment dans le cas de récepteurs activés de façon répétitive (phénomène de "use-dependence") (Zhao et coll., 2005).

	fipronil		fipronil sulfone	
	vertébrés	insectes	vertébrés	insectes
CI₅₀ (nM)	1103	7	175	9
Rapport des CI₅₀ (vertébrés/insectes)	158		19	

Tableau 9 . Comparaison des concentrations d'insecticide entraînant 50% de déplacement du radioligand [³H]EBOB, mesurées pour des membranes neuronales de vertébrés ou d'insectes (Hainzl et coll., 1998). "CI₅₀" = concentration produisant 50% de l'effet inhibiteur d'une substance.

B.2 Désulfinyl-fipronil

Le fipronil est aussi dégradé par photolyse en désulfinyl-fipronil, qui est plus rémanent que l'insecticide. Les concentrations nécessaires pour tuer 50% des individus (DL₅₀) sont plus faibles pour le désulfinyl-fipronil que pour le fipronil chez la mouche et la souris (tableau 10). D'après les rapports des CI₅₀ (concentration produisant 50% de l'effet inhibiteur d'une substance) pour le déplacement du radioligand [³H]EBOB, le photodérivé et le métabolite sulfone sont moins sélectifs pour les insectes, et sont plus neurotoxiques pour les vertébrés que le fipronil lui-même (Hainzl et Casida, 1996). De plus, le dérivé désulfinyl a plus d'affinité pour les GABARs que le fipronil sulfone (tableaux 9 et 10 ; Hainzl et coll., 1998 ; Hainzl et Casida, 1996).

	fipronil		désulfinyl-fipronil	
	souris	mouche	souris	mouche
DL₅₀ (mg/kg)	41	0,13	23	0,058
Rapport des DL₅₀ (vertébrés/insectes)	315		397	
	vertébrés	insectes	vertébrés	insectes
CI₅₀ (nM)	1103	7	129	4,1
Rapport des CI₅₀ (vertébrés/insectes)	158		31	

Tableau 10 . Comparaison des DL₅₀ du fipronil et du désulfinyl-fipronil ainsi que de leur CI₅₀ (mesuré par déplacement du radioligand [³H]EBOB) (Hainzl et Casida, 1996 ; Hainzl et coll., 1998).

C Symptômes de l'intoxication par le fipronil

Chez l'humain, 345 cas de contamination et intoxication par le fipronil ont été recensés par le centre antipoison de Paris¹, pour la période 1994-2003. Les symptômes des intoxications sont des troubles digestifs (irritations du pharynx, vomissements, douleurs abdominales) ainsi que des somnolences, des troubles neurologiques mineurs (céphalées, vertiges) et érythèmes cutanés. Douze cas d'intoxication d'animaux domestiques (chats, chiens, lapin) ont aussi été constatés ; les symptômes observés sont des tremblements. Chez la souris, le fipronil entraîne un clonus facial (contractions rapides et involontaires), des convulsions tonico-cloniques, des saccades musculaires au niveau de la tête, ainsi qu'une extension tonique des membres antérieurs et postérieurs (Cole et coll., 1993 ; Kamijima et Casida, 2000).

Pour ce qui est de l'effet du fipronil sur les insectes à doses létales, il consiste en une hyperactivité, une hyperexcitabilité, des convulsions, puis la mort de l'insecte (Bloomquist, 2003). A doses plus faibles, des abeilles ayant ingéré une solution sucrée contenant du fipronil présentent une réduction de l'apprentissage olfactif (Decourtye et coll., 2005). Une autre étude indique qu'une diminution de la mobilité d'*Apis mellifera* est observée par application locale de l'insecticide, ainsi qu'une diminution de l'extension du proboscis, associée à une réduction là encore de la performance de la mémorisation (El Hassani et coll., 2005). Une étude plus récente met aussi en avant l'implication du fipronil dans la réduction de la mobilité des abeilles, associée à une ingestion d'eau accrue. Là encore, une diminution de l'apprentissage olfactif a été observée (Aliouane et coll., 2008). La comparaison entre des traitements locaux par application sur le tégument et oraux par ingestion indique une toxicité plus grande pour les traitements locaux. Les auteurs suggèrent une photolyse qui donnerait le composé désulfinyl-fipronil, expliquant l'effet plus important (El Hassani et coll., 2005).

¹ <http://www.centres-antipoison.net>

D Cibles du fipronil

Le fipronil agit à la fois sur les GABARs et sur les GluClRs. Ces derniers n'existent que chez les invertébrés, augmentant ainsi la sélectivité par rapport aux vertébrés.

D.1.a Les GABARs, cibles du fipronil

Les GABARs natifs et recombinants sont des cibles du fipronil. En effet, les premières études faites par Rhône-Poulenc sur le fipronil ont permis de démontrer que l'application de l'insecticide sur le ganglion cérébral d'asticot de mouche entraîne une augmentation de l'activité électrique ganglionnaire, qui est plus importante lorsque du GABA est appliqué (Gant et coll., 1998). De plus, l'expression de RDL dans l'ovocyte de xénope a permis de montrer dès 1994 que cette sous-unité de récepteur GABAergique est une cible du fipronil (Buckingham et coll., 1994). Les mécanismes d'action seront traités plus loin (p.53).

D.1.b Les GluClRs, cibles du fipronil

Il est certain que des GluClRs existent dans le SNC des insectes (Raymond et coll., 2000 ; Ihara et coll., 2005 ; Zhao et coll., 2005 ; Janssen et coll., 2007). Dans une préparation contenant à la fois des GABARs et des GluClRs (neurones du lobe antennaire d'*Apis mellifera*), l'application prolongée de GABA pour désensibiliser les GABARs, suivie d'application de glutamate, ne modifie pas l'amplitude des courants GluCl, suggérant que ces récepteurs ne sont pas formés de sous-unités fixant le GABA (Barbara et coll., 2005).

Les GluClRs sont clairement reconnus comme cibles du fipronil chez *Periplaneta americana* (Raymond et coll., 2000 ; Ikeda et coll., 2003 ; Zhao et coll., 2004 ; Raymond-Delpech et coll., 2005), *Locusta migratoria* (Janssen et coll., 2007), *Musca domestica* (Eguchi et coll., 2006) et *Caenorhabditis elegans* (Horoszok et coll., 2001). Les GluClRs ont aussi d'autres points communs avec les GABARs, bien que des différences

existent. En effet, ils sont généralement sensibles à la PTX et à la PTXine (Bloomquist, 2001 ; Zhao et coll., 2004 ; Barbara et coll., 2005 ; Eguchi et coll., 2006). Cependant, les CI_{50} pour le blocage des GABARs et des GluClRs de neurones de blattes sont de 28 et de 730 nM, respectivement. De même, la comparaison de CI_{50} montre que les récepteurs homomériques RDL sont 180 fois plus sensibles au fipronil que les récepteurs homomériques GluCl α (Eguchi et coll., 2006). Une insensibilité à la PTXine, même à de fortes concentrations, a aussi été observée dans le cas de GluClRs formés par la sous-unité GLC-3 de *C. elegans* (Horoszok et coll., 2001). De plus, les courants GluCl sont de deux types : désensibilisants et non-désensibilisants. Une étude sur des neurones de blatte a montré que la PTXine et le fipronil affectent surtout ces derniers (Zhao et coll., 2004), alors que dans le cas des GABARs, les antagonistes préfèrent l'état désensibilisé (Newland et Cull-Candy, 1992 ; Zhang et coll., 1994). Néanmoins, des études réalisées sur des GluClRs recombinants de *Musca domestica* ont au contraire révélé que le fipronil et la PTXine inhibent préférentiellement les courants désensibilisants (Eguchi et coll., 2006).

Comme les GABARs, les GluClRs sont bloqués par le lindane, mais contrairement aux GABARs, ils le sont de façon réversible et de fortes concentrations de l'insecticide sont nécessaires pour obtenir le même effet que sur les GABARs (Ihara et coll., 2005 ; Eguchi et coll., 2006). De même, ils peuvent être bloqués par le BIDN (Horoszok et coll., 2001). Enfin, ils sont sensibles à l'ivermectine et son dérivé, l'ivermectine (Cully et coll., 1994 ; Bloomquist, 2001 ; Horoszok et coll., 2001) mais semblent insensibles à la dieldrine (Ikeda et coll., 2003).

D.1.c Les récepteurs mixtes RDL/sous-unité de GluClR, cibles du fipronil ?

Il a été montré que la sous-unité RDL est co-exprimée avec une sous-unité GluCl α dans des fractions membranaires extraites de têtes de drosophile (Ludmerer et coll., 2002). Cette association est rendue possible par le fait que ces sous-unités sont proches sur le plan évolutif. En effet d'après un arbre phylogénétique construit pour les membres de la famille "Cys-loop" de *D. melanogaster*, *A. mellifera* et *T. castaneum*, les GABARs sont plus proche des GluClRs que des autres récepteurs (Jones et Sattelle, 2007). Etant donné que les

deux protéines sont des cibles du fipronil, il semble opportun de voir si cela est aussi valable pour les récepteurs mixtes.

La localisation de RDL et des GluClRs ne correspond pas toujours, puisque des GluClRs se trouvent dans le SNC mais aussi dans les muscles squelettiques, où ils sont extrajonctionnels (Bloomquist, 2001), alors que la sous-unité RDL ne semble pas présente au niveau musculaire (Harrison et coll., 1996), et se trouve plutôt dans les zones de contacts synaptiques au sein des ganglions nerveux (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" I.C.1.a, p.24). De plus, la co-expression des sous-unités RDL et GluCl α de *Musca domestica* dans les ovocytes de xénope n'a pas abouti à la formation de récepteurs hétéromériques RDL/GluCl α . Cependant, les récepteurs RDL obtenus en présence de sous-unités GluCl α donnent des courants GABAergiques plus amples que les récepteurs RDL exprimés seuls, sans qu'il y ait modification de la CE₅₀ (concentration pour obtenir 50% d'effet) du GABA ou de la CI₅₀ de la PTX, indiquant que les récepteurs sont constitués uniquement de la sous-unité RDL. Les auteurs suggèrent que les récepteurs homomériques RDL interagissent avec la sous-unité GluCl α de telle sorte que l'expression membranaire des récepteurs RDL soit favorisée (Eguchi et coll., 2006).

Ainsi, bien qu'il existe des récepteurs RDL/GluCl α *in vivo* (Ludmerer et coll., 2002), il n'a pas été possible d'obtenir des récepteurs mixtes fonctionnels par expression dans les ovocytes de xénope, et donc de déterminer s'ils sont sensibles ou non au fipronil.

E Mécanismes d'action

Des antagonistes tels que la PTX, le TBPS, le BIDN, la dieldrine et le fipronil ont des effets physiologiques très proches du fait de la proximité ou du chevauchement de leurs sites de liaison sur les GABARs. C'est pourquoi il semble judicieux d'aborder les interactions moléculaires du fipronil avec les GABARs en les comparant avec celles d'autres antagonistes.

E.1 Données électrophysiologiques

Le fipronil agit sur les récepteurs RDL de manière à la fois compétitive et non-compétitive, indépendamment du potentiel de membrane (Hosie et coll., 1995a). A titre comparatif, l'action de la PTX sur le courant GABAergique de vertébrés dépend de la préparation. Par exemple, un effet à la fois compétitif et non-compétitif a été constaté pour des neurones sensitifs de grenouille (Inoue et Akaike, 1988) ainsi que pour des GABA_CRs recombinants de perche (Qian et coll., 2005), alors que pour des GABA_ARs recombinants humains, l'effet est non-compétitif, puisque la CE₅₀ du GABA n'est pas modifiée (Hollands et coll., 2007).

Comme le fipronil, la PTX, le TBPS et la dieldrine agissent sur les GABARs de vertébrés en réduisant l'hyperpolarisation membranaire induite par le GABA ou le muscimol (agoniste des GABA_ARs). En conditions de potentiel imposé, tous ces antagonistes réduisent l'amplitude des courants GABAergiques et accélèrent leur désensibilisation (Nagata et Narahashi, 1994 ; Dillon et coll., 1995 ; Narahashi, 1995). Pour la dieldrine, l'effet est plus complexe puisqu'il se fait en deux temps : l'application de l'insecticide entraîne une augmentation du courant suivie d'une diminution (Nagata et Narahashi, 1994), et son effet, ainsi que celui de la PTX, sont "use-dependent", c'est à dire qu'ils augmentent avec le nombre d'applications de GABA, que ce soit pour les GABA_ARs ou les GABA_CRs (Yoon et coll., 1993 ; Nagata et Narahashi, 1994 ; Goutman et Calvo, 2004). De plus, le fipronil agit à la fois sur les récepteurs au repos (fermés) et les récepteurs activés par le GABA (Ikeda et coll., 2001).

Les mécanismes d'action des antagonistes sont pratiquement les mêmes pour les GABARs d'insectes que pour ceux des mammifères. En effet, là encore une augmentation de la désensibilisation est observée, à la fois pour les GABARs neuronaux de la blatte et pour les récepteurs RDL recombinants dans des ovocytes de xénopes (Ihara et coll., 2005 ; Le Goff et coll., 2005 ; Eguchi et coll., 2006). De plus, les effets du fipronil (et de son dérivé sulfone), de la PTX, du lindane et de l'EBOB sont "use-dependent", que ce soit pour les récepteurs natifs ou pour les récepteurs recombinants RDL (Zhao et coll., 2003 ; Ihara et coll., 2005 ; Le Goff et coll., 2005 ; Zhao et coll., 2005 ; Eguchi et coll., 2006). Enfin, le lindane, l'EBOB, le

fipronil et son métabolite sulfone agissent à la fois sur les récepteurs au repos et les récepteurs activés (Zhao et coll., 2003 ; Ihara et coll., 2005 ; Zhao et coll., 2005).

Cependant, les mécanismes d'action des antagonistes sur les GABARs de mammifères et d'insectes présentent quelques différences. Par exemple, dans les deux cas l'affinité du fipronil pour le GABAR est la même que le récepteur soit activé ou au repos (Ikeda et coll., 2001 ; Zhao et coll., 2003), cependant la constante de temps du blocage est dix-sept fois moindre pour le récepteur activé chez l'insecte (Zhao et coll., 2003). De plus, l'effet de 1 μ M de fipronil est nul (Ratra et coll., 2002) ou complètement réversible (Ikeda et coll., 2001) sur des GABARs de vertébrés, alors que l'effet du fipronil à la même concentration est irréversible sur les GABARs d'invertébrés natifs ou sur les récepteurs RDL exprimés (Grolleau et Sattelle, 2000 ; Zhao et coll., 2003 ; Barbara et coll., 2005 ; Le Goff et coll., 2005). Ajouté à cela, les récepteurs RDL possèdent deux temps d'ouverture, un long et un court. Le fipronil réduit l'activité du canal en diminuant de 4,8 fois le temps court (Grolleau et Sattelle, 2000), alors que dans le cas des vertébrés, le fipronil agit plutôt en diminuant la fréquence d'ouverture du canal (Ikeda et coll., 2004).

E.2 Données obtenues par déplacement de radioligands et par modélisation

Le mode d'action des antagonistes dépend de la localisation de leur site de liaison, en l'occurrence dans les bords du pore du canal, essentiellement formé des domaines transmembranaires M2. Des expériences de déplacement de radioligands et des modélisations ont permis de mettre en lumière des variabilités dans les sites de liaison des antagonistes entre les vertébrés et les invertébrés. Il semblerait que les sites de fixation chez les vertébrés soient très proches et se chevauchent (Kalueff, 2007), alors que chez les invertébrés les sites sont différents, bien que des interactions puissent avoir lieu.

Une récente modélisation du GABAR de vertébrés montre qu'il existe cinq sites de liaison des antagonistes sur les bords du canal (Law et Lightstone, 2008). Chacun des sites potentiels peut interagir avec plusieurs des ligands testés. Par exemple, la PTX, le lindane et le BIDN se lient à tous les sites proposés, avec une préférence pour la base des

domaines transmembranaires. Dans les sous-unités α , β ou γ , chacun des domaines transmembranaires participe à la constitution de ces sites, qui se trouvent principalement au niveau de la sous-unité β ou aux interfaces α/β et β/γ . Le fipronil ne peut accéder à tous les sites parce qu'il est la plus grosse des molécules parmi celles testées, et se fixe dans une partie plus haute dans le canal. Ainsi, hormis le fipronil, plus volumineux, les autres antagonistes se lient à tous les sites. Les antagonistes agiraient par inhibition allostérique, en augmentant l'énergie nécessaire pour passer de l'état fermé/désensibilisé à l'état ouvert (Law et Lightstone, 2008). Cela confirme les observations selon lesquelles les antagonistes maintiennent les récepteurs à l'état désensibilisé (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" II.E.1, p.54).

En ce qui concerne les invertébrés, le manque d'information sur les sous-unités existantes rend la modélisation difficile. Néanmoins, les déplacements des radioligands (notamment [^3H]EBOB et [^3H]BIDN) permettent de pallier quelque peu à cela. La figure 7 (A et B) résume les données obtenues, et propose un modèle partiel pour les sites de liaison des antagonistes.

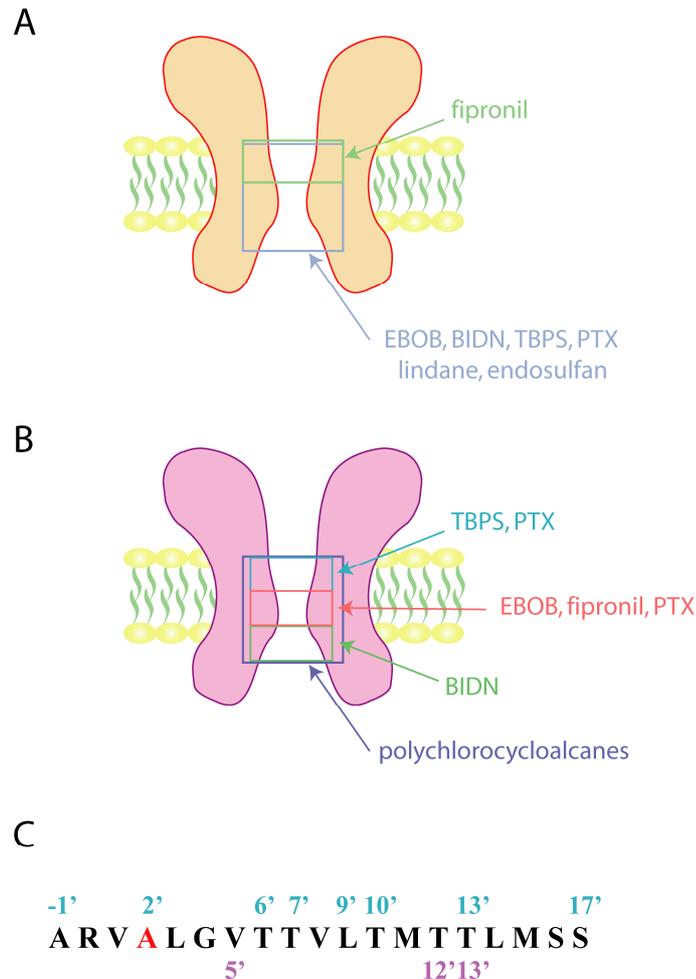


Figure 7 . Proposition de modèle des sites de liaison des antagonistes des GABA_AR de vertébrés (modifié d'après Law et Lightstone, 2008) (A) et d'invertébrés (B) (Cole et coll., 1995 ; Sattelle et coll., 1995 ; Gant et coll., 1998). C : séquence protéique du domaine transmembranaire M2 de la sous-unité RDL. Les acides aminés exposés à la lumière du canal (bleu) et ceux dont les mutations modifient la désensibilisation du récepteur (violet) chez les vertébrés sont signalés. Seuls sont présentés les résidus qui s'alignent avec RDL. L'alanine dont la mutation entraîne une résistance aux cyclodiènes et au fipronil (cf. chapitre III.B, p.63) est en rouge.

Comme le domaine M2 participe de façon importante à la liaison des antagonistes, des alignements ont été effectués à partir des données de la littérature¹. La figure 7C présente le domaine M2 de la séquence protéique de la sous-unité RDL, et un alignement avec les résidus exposés à la lumière du canal ou interagissant avec les antagonistes (Xu et Akabas, 1993 ; Gurley et coll., 1995 ; Xu et Akabas, 1996 ; Perret et coll., 1999 ; Chen, L. et coll., 2006a). Les résidus ayant un rôle dans la désensibilisation (Birnie et coll., 1997a ; Birnie et coll., 1997b ; Dalziel et coll., 1999) chez les vertébrés sont également indiqués. Les acides

¹ http://bioinfo.hku.hk/services/analyseseq/cgi-bin/alignp_in.pl

aminés impliqués dans la liaison des antagonistes et dans la désensibilisation sont très proches, voire communs, ce qui peut expliquer l'accélération de la désensibilisation en présence de ces molécules.

La figure 8 présente une modélisation des antagonistes entourés des acides aminés impliqués dans leur site de liaison, à savoir l'alanine en 2', la thréonine en 6' et la leucine en 9' (cf. figure 7C).

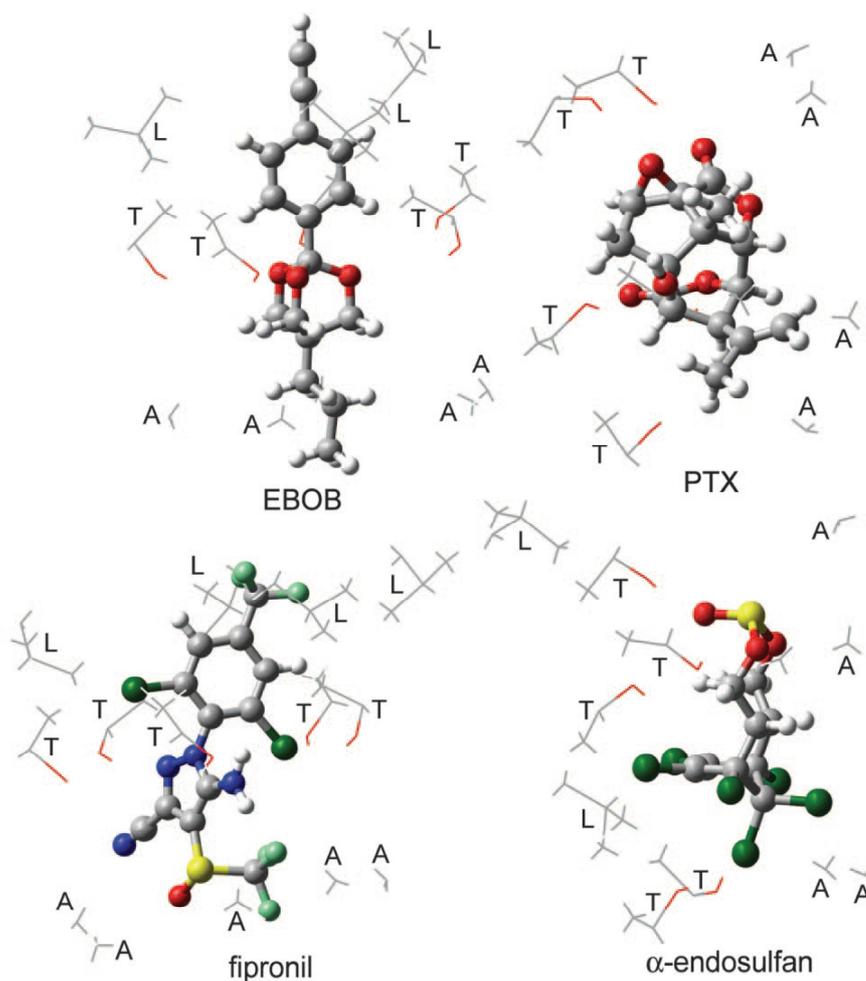


Figure 8 . Implication des acides aminés en position 2'(A), 6'(T) et 9'(L) des domaines M2, dans la liaison d'antagonistes des GABA_AR. La modélisation a été réalisée pour des récepteurs homomériques β3 des GABA_AR humains (Chen, L. et coll., 2006b).

F Sélectivité du fipronil pour les insectes

F.1 Sélectivité insectes/vertébrés

Le fipronil présente une grande sélectivité insectes/mammifères, comme le montre la valeur de la DL_{50} qui est 130 à 315 fois plus faible chez la mouche domestique que chez la souris (Cole et coll., 1993 ; Hainzl et Casida, 1996). Des études de déplacement du radioligand [3H]EBOB montrent que le fipronil se fixe beaucoup plus facilement aux membranes neuronales d'insectes qu'à celles des mammifères. Le ratio de sélectivité (CI_{50} humain/ CI_{50} insecte) est de 160 à 190 pour le fipronil, alors qu'il n'est que de 78 pour le lindane et de 2,2 pour l' α -endosulfan, confirmant que le fipronil est plus sélectif pour les insectes que les insecticides de première génération (Hainzl et Casida, 1996 ; Hainzl et coll., 1998). Cela est corroboré par le fait que des $GABA_C$ Rs, constitués de sous-unités $\rho 1$ humaines exprimées dans des ovocytes de xénope, sont 72 et 87 fois moins sensibles au fipronil qu'à la PTXine ou au lindane, respectivement (Ratra et coll., 2002). De plus, la comparaison blatte-rat, par patch-clamp en configuration cellule-entière, montre que le fipronil a une plus grande affinité pour les GABARs de blatte, et que ces derniers sont 46 fois plus sensibles à l'insecticide que les GABARs de rat (Zhao et coll., 2003 ; Ikeda et coll., 2004). La sélectivité du fipronil vis-à-vis des insectes par rapport aux vertébrés pourrait être expliquée par la taille d'un des sous-sites de fixation des GABARs plus large chez la mouche que chez le rat (Ozoe et Akamatsu, 2001 ; Ju et coll., 2007). Les antagonistes étant de grosses molécules (de l'ordre de 6-8 Å (Chen, L. et coll., 2000)), l'accès serait donc facilité chez les invertébrés.

F.2 La sélectivité dépend de la composition en sous-unités des GABARs

Par des expériences de déplacement du radioligand [3H]EBOB, il a été montré que le fipronil interagit faiblement avec le site EBOB des récepteurs homomériques $\rho 1$, un

peu plus avec celui des GABA_ARs natifs, et très fortement avec celui des récepteurs homomériques $\beta 3$ humains, avec un ratio de la CI_{50} entre les GABA_ARs natifs et les récepteurs $\beta 3$ de plus de 1000 (Ratra et coll., 2002). Cela n'est pas spécifique au fipronil, puisque les récepteurs $\beta 3$ sont aussi plus sensibles aux cyclodiènes et au lindane que les GABA_ARs natifs (Ratra et Casida, 2001 ; Ratra et coll., 2001). Les affinités relatives de nombreux antagonistes pour le site EBOB des GABA_ARs d'insectes sont très proches de celles observées dans le cas des récepteurs homomériques $\beta 3$ (Ratra et coll., 2001). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le site de fixation des antagonistes se trouve essentiellement sur les sous-unités β ou aux interfaces α/β ou β/γ (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" II.E.2, p.55 ; (Law et Lightstone, 2008)). Une autre explication serait l'importance de l'alanine en position 2' du domaine M2 de la sous-unité $\beta 3$, substituée par une valine et une sérine dans les sous-unités α et γ , respectivement. Or, l'alanine permet une meilleure stabilisation des antagonistes dans les récepteurs homomériques $\beta 3$ comparé aux récepteurs $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (Alam et coll., 2007), et cette alanine est conservée dans les sous-unités RDL.

Chapitre III. Facteurs susceptibles de moduler la sensibilité des GABARs au fipronil

La sensibilité des insectes aux molécules insecticides est influencée par de multiples facteurs, comme la vitesse de pénétration des molécules toxiques à travers la cuticule, la métabolisation de ces molécules dans l'organisme, la sensibilité des récepteurs ou enzymes ciblés par les insecticides ou encore le comportement des insectes. La modification d'un ou de plusieurs de ces facteurs peut faire apparaître des populations d'insectes résistantes à un ou plusieurs insecticides.

Ainsi, la surexpression d'un seul gène de cyt P450 (*Cyp6g1*), parmi les 90 existants chez la drosophile, entraîne une résistance au DDT retrouvée dans le monde entier. La surexpression de ce co-facteur enzymatique entraîne l'apparition de résistances-croisées à plusieurs insecticides, dont les néonicotinoïdes, les organophosphorés et des régulateurs de croissance. La surexpression de gènes d'estérases entraîne aussi l'apparition de résistance (ffrench-Constant et coll., 2004). Des cas de résistance métabolique ont également été décrits pour les insecticides ciblant les GABARs. Ainsi, un papillon nocturne du groupe des noctuelles, *Helicoverpa armigera*, présente une résistance aux cyclodiènes qui n'est pas due à des mutations affectant les GABARs puisque le gène *Rdl*, en particulier, est de type sensible (ffrench-Constant et coll., 2000). La même observation a été rapportée pour le puceron des laitues, *Nasonovia ribisnigri*, dont certains individus présentent une résistance à la dieldrine et à l'endosulfan (Rufingier et coll., 1999). Dans ce dernier cas, l'addition de DEF (inhibiteur de GST) mène à une réduction de la tolérance à ces deux cyclodiènes, indiquant une détoxification plus importante par la GST dans les lignées résistantes. Ce fait n'est pas isolé, puisque la même observation a été effectuée pour une population de *Drosophila simulans* résistantes, où une surexpression de la GST est constatée (Le Goff, 2001). De même, dans une population de pyrale du riz (*Chilo suppressalis*) résistante au fipronil, l'effet de l'insecticide est synergisé par le PBO (inhibiteur de cyt P450), le TPP (inhibiteur des estérases) et le DEF

(Li, X. et coll., 2007). De plus, la comparaison de populations de *Musca domestica* sensibles et résistantes au fipronil indique que le PBO synergise davantage l'effet du fipronil dans ces dernières, suggérant une détoxification plus forte par les monooxygénases à cyt P450 dans les lignées résistantes. En outre, la même étude démontre que des modifications cuticulaires entraînent une diminution de la pénétration du fipronil dans les lignées résistantes (Wen et Scott, 1999).

La sensibilité des insectes aux molécules insecticides est également dépendante des caractéristiques des cibles auxquelles se lient ces molécules. Les paragraphes suivants décrivent les propriétés structurales et fonctionnelles des GABARs qui influencent les effets du fipronil, des cyclodiènes et d'autres molécules antagonistes.

A La composition en sous-unités

La composition en sous-unités des GABARs d'insectes est inconnue à ce jour. Néanmoins, certaines données actuelles permettent d'affirmer que ce facteur influe sur leur pharmacologie et leur sensibilité aux insecticides, comme nous l'avons vu dans le cas des vertébrés, où la sensibilité au fipronil est plus élevée pour les récepteurs homomériques $\beta 3$ que pour les récepteurs natifs (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" II.F.2, p.59)

Les divers GABARs de neurones d'insectes présentent des différences de sensibilité à certaines molécules, ce qui suggère l'existence de GABARs dont la composition en sous-unités diffère. Par exemple, le dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* contient des interneurons géants dont les réponses au GABA présentent deux composantes qui ont une sensibilité différente à la PTX (Hue, 1991). Les mêmes résultats ont été obtenus sur les corps cellulaires de neurones Df et DUM chez le même insecte (Le Corrionc et Hue, 1999). Une étude plus approfondie des deux populations de GABARs de neurones DUM montre une légère différence de sensibilité au fipronil et à la PTX, mais cette différence est beaucoup plus nette pour la dieldrine (Le Corrionc et coll., 2002).

Une réponse en deux temps à la dieldrine (augmentation du courant GABAergique, suivie d'une diminution du courant) a été observée sur des neurones de blatte

américaine (Zhao et coll., 2003). Ces deux types d'effets peuvent à priori être dus à l'existence de deux sites sur un même GABAR ou à l'existence de deux GABARs différents. Compte tenu du fait que, chez les vertébrés, la potentialisation du courant par la dieldrine est conditionnée par la présence d'une sous-unité γ (Nagata et coll., 1994), les auteurs proposent que des GABARs ayant une composition différente en sous-unités soient à l'origine du double effet de la dieldrine.

Les sous-unités RDL et LCCH3 de drosophile co-exprimées dans des cellules Sf21 forment des récepteurs fonctionnels. Contrairement aux récepteurs RDL et à la majorité des GABARs natifs, les récepteurs RDL/LCCH3 sont peu sensibles à la picrotoxine (500 fois moins que les récepteurs RDL). Ils sont par contre sensibles à la bicuculline, contrairement à la plupart des GABARs natifs d'insectes (tableau 6, pp.36-37 ; (Zhang et coll., 1995)). La co-expression des sous-unités GRD et LCCH3 a permis l'obtention de GABARs de type cationique, avec une pharmacologie distincte de celle des autres GABARs d'insectes. En effet, bien que les récepteurs soient bloqués par la PTX, ils ne sont pas sensibles au lindane et la dieldrine (Gisselmann et coll., 2004).

Tous ces exemples montrent bien que la nature des sous-unités des GABARs d'insectes influence fortement leur sensibilité aux insecticides et aux autres antagonistes de ces récepteurs.

B Les acides aminés clés des sous-unités

Dès la fin des années 1940, diverses populations d'insectes ont présenté une résistance aux cyclodiènes (Denholm et coll., 2002), mais cette résistance n'a été expliquée qu'au début des années 1990, car la cible de cette famille d'insecticides n'a été découverte qu'au milieu des années 1980. La résistance aux cyclodiènes a touché la plupart des pays où ces insecticides ont été utilisés et elle a même été considérée comme l'un des changements génétiques les plus étendus apportés par l'homme (Jowett et coll., 1997). La recherche de l'origine de cette résistance a conduit au clonage du gène *Rdl* chez la drosophile (French-Constant et coll., 1991). La comparaison des séquences de lignées de drosophiles sensibles et résistantes a montré que la mutation d'un seul acide aminé de cette sous-unité, situé dans le

domaine M2 (alanine en 2'), est à l'origine de la résistance à ces insecticides. Les mutations peuvent être de type A301•S ou A301•G (ffrench-Constant et coll., 1993b) (nommée A302•S/G par erreur). La capacité de la protéine codée par le gène *Rdl* à former des récepteurs homomériques par expression dans des ovocytes de xénope a permis une analyse fonctionnelle des conséquences de ces mutations (ffrench-Constant et coll., 1993a). La confirmation du rôle de la mutation A301•S a également été apportée par insertion du cosmide 6, contenant le gène *Rdl* muté, dans des embryons de drosophiles. Les individus obtenus présentent une récupération partielle du phénotype résistant, ce qui est expliqué par la semi-dominance de la résistance aux cyclodiènes (Stilwell et coll., 1995). Le remplacement de l'alanine par une sérine modifie la polarité du résidu 301 via l'addition d'un groupe hydroxyle. Certains auteurs proposent que ce changement serait à l'origine d'une gêne stérique ou électrostatique pour la liaison des insecticides à leur site de fixation (Thompson, M. et coll., 1993). La mutation A301•S est aujourd'hui présente chez de nombreuses espèces, dont *Drosophila melanogaster* et *simulans*, *Musca domestica*, *Aedes aegypti*, *Bemisia tabaci* (aleurode du tabac) et *argentifolii* (aleurode du poinsettia), *Myzus persicae*, *Tribolium castaneum*, *Hypothenemus hampei* et *Blattella germanica*. La mutation A301•G est retrouvée chez *Drosophila simulans* et *Myzus persicae* (ffrench-Constant et coll., 2000), ainsi que *Anopheles arabiensis* (Du et coll., 2005). La substitution en A301 est à l'origine de résistance croisée à plusieurs composés (tableau 11).

Molécules dont l'effet est réduit du fait de la mutation A301•S/G	Références
PTX	(ffrench-Constant et coll., 1993b; Lee, H. J. et coll., 1993; Zhang et coll., 1994; Hosie et coll., 1995; Buckingham et coll., 1996; Wolff et Wingate, 1998; ffrench-Constant et coll., 2000; Bloomquist, 2001; Lee, D. et coll., 2003; Buckingham et coll., 2005; Le Goff et coll., 2005)
fipronil	(Cole et coll., 1995 ; Hosie et coll., 1995a ; Bloomquist, 2001 ; Buckingham et coll., 2005 ; Le Goff et coll., 2005)
cyclodiènes	(ffrench-Constant et coll., 1993a ; Thompson, M. et coll., 1993 ; Cole et coll., 1995 ; Miyazaki et coll., 1995 ; Buckingham et coll., 1996 ; ffrench-Constant et coll., 2000)
lindane	(Cole et coll., 1995 ; Hosie et coll., 1997 ; Buckingham et coll., 2005)
EBOB	(Hosie et coll., 1997)
TBPS	(Hosie et coll., 1997 ; Buckingham et coll., 2005)
BIDN	(Hosie et coll., 1995b ; Buckingham et coll., 2005)

Tableau 11 . Résistances croisées due à la mutation en A301.

La réduction dans la sensibilité n'est pas équivalente pour tous les composés : elle est plus importante pour EBOB et la dieldrine, moins pour le fipronil, et est encore moins prononcée pour l'endosulfan ou le lindane (Cole et coll., 1995). Cette réduction serait due à deux modifications (Zhang et coll., 1994) :

1) la mutation de l'alanine 301 entraîne une déstabilisation de l'état désensibilisé (état le plus favorable à la liaison de l'insecticide), ce qui se manifeste par un fort ralentissement de la phase de désensibilisation des courants induits par le GABA,

2) l'alanine 301 étant très probablement l'un des résidus bordant le canal (cf. figure 7C, p.57), sa substitution peut influencer sur l'interaction de l'antagoniste avec son site de liaison.

La mutation A301S/G rend compte de tous les cas de résistance aux cyclodiènes rapportés dans les populations naturelles chez diverses espèces d'insectes, ce qui illustre le rôle clé de l'alanine 301 de la sous-unité RDL dans le fonctionnement des GABARs. Néanmoins, la souche Eyguières de *Drosophila simulans*, sélectionnée en laboratoire par le fipronil sur plusieurs générations, montre la présence d'une double mutation, A301G et T350M (domaine transmembranaire M3) dans la sous-unité RDL de tous les individus résistants. L'expression de mutants simples ou doubles dans des ovocytes de xénope a permis de montrer que cette seconde mutation est à l'origine d'une augmentation de la résistance au fipronil (Le Goff et coll., 2005).

La résistance induite par la mutation du gène *Rdl* se maintient longtemps dans les populations naturelles, même en absence de sélection par des insecticides. Ainsi, cette résistance persisterait à une fréquence de 1 à 10 % dans les populations de drosophiles en champ, malgré l'arrêt de l'utilisation des cyclodiènes (French-Constant et coll., 2000). Le même phénomène s'observe en laboratoire puisque chez la blatte germanique, des individus prélevés en champ et élevés huit années sans sélection possèdent la mutation A301S, et la fréquence de résistance est de 0,38 à 0,97 selon la lignée étudiée (Hansen et coll., 2005). De même, dans des élevages de puces du chat (*Ctenocephalides felis*) non soumis à une sélection par des insecticides, sept souches résistantes ont été trouvées sur les huit examinées (Bass, C. et coll., 2004). Les auteurs expliquent cela par l'hypothèse d'un coût génétique de la résistance faible, celui-ci étant la diminution de la capacité d'un organisme à survivre et se reproduire dans un nouvel environnement, malgré la présence d'une mutation permettant un

avantage sélectif dans l'environnement de départ. Une autre explication serait l'impact de la rémanence des cyclodiènes avec lesquels les puces auraient pu être en contact avant l'élevage en laboratoire. Cela peut aussi être dû au type d'hérédité. Par exemple, chez le coléoptère *Hypothenemus hampei*, la transmission est de type haplodiploïde : les mâles sont fonctionnellement haploïdes, alors que les femelles sont diploïdes. Par conséquent, si un mâle hémizygote résistant se reproduit avec des femelles hétérozygotes, toutes les femelles obtenues auront au moins un allèle résistant. De plus, sous pression de sélection insecticide, la majorité des femelles seront homozygotes résistantes. Si ces femelles se reproduisent avec un mâle résistant, alors les lignées obtenues seront résistantes homozygotes. Ainsi, du fait de la semi-dominance de la résistance Rdl et de l'haplodiploïdie, la propagation de cette résistance est rapide (Brun et coll., 1995).

Chez *C. elegans*, l'alanine en position 279 de la sous-unité β du GluClR, qui est l'équivalent de l'alanine 301 de RDL, peut être mutée pour donner une thréonine. Cette mutation réduit de dix-mille fois la sensibilité des ces récepteurs à la PTX ainsi que leur désensibilisation (Etter et coll., 1999), comme dans le cas des récepteurs RDL, suite à la mutation A301>S (Zhang et coll., 1994). De même, il est intéressant de noter que, chez la mouche domestique sauvage, la sous-unité GluCl α possède une sérine en position 278 (équivalent de l'alanine en position 301 de RDL). Lorsque cette sérine est changée en alanine, la sensibilité à la PTX, au fipronil et au lindane est augmentée (Hirata et coll., 2008). Par conséquent, les GluClRs doivent être considérés avec attention dans les études de résistance au fipronil, puisqu'une mutation de type S278>A pourrait établir un phénotype "super-sensible".

C Les modifications post-transcriptionnelles

C.1 Épissage alternatif

L'expression de variants résultant de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de RDL dans des ovocytes de xénope permet d'étudier l'impact de cette modification post-transcriptionnelle sur la pharmacologie des récepteurs RDL. Bien que la sensibilité à la PTXine et l'insensibilité à la bicuculline soient les mêmes quelle que soit l'isoforme testée, la sensibilité au GABA et à des agonistes comme le muscimol, l'isoguvacine et l'acide isonipécotique diffère selon le variant étudié. L'ordre de sensibilité pour ces agonistes est le suivant : RDLac > RDLad > DRC 17-1-2(≈RDLbd) (Hosie et Sattelle, 1996a ; Hosie et coll., 2001). Une comparaison entre RDLac et DRC 17-1-2 montre également une sensibilité au pentobarbitone plus élevée pour DRC 17-1-2 (Belelli et coll., 1996).

Les sous-unités UNC-49B et -49C de *C. elegans* sont issues d'un épissage alternatif à partir d'un même ARN pré-messager (Bamber et coll., 1999). La comparaison de la pharmacologie des récepteurs homomériques UNC-49B et hétéromériques UNC-49B/C montre une réduction de la sensibilité au GABA pour ces derniers (Bamber et coll., 2005), ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à deux neurostéroïdes (DHEA et sulfate de pregnénolone) (Twede et coll., 2007). Bien que les antagonistes des GABARs préfèrent l'état désensibilisé (Newland et Cull-Candy, 1992), la présence de la sous-unité UNC-49C de *C. elegans*, qui entraîne une accélération de la désensibilisation, confère une réduction de la sensibilité à la PTX des récepteurs hétéromériques UNC-49B/C (Bamber et coll., 2005). La diminution de la sensibilité au GABA pourrait expliquer de manière indirecte la baisse de sensibilité à la PTX, puisque l'ouverture des canaux par le GABA favorise la liaison de cette molécule selon le phénomène de "use-dependence".

Ces données montrent que l'épissage alternatif permet d'augmenter la diversité pharmacologique des GABARs d'invertébrés, à partir d'un seul ARN pré-messager.

C.2 Edition de l'ARNm

Bien que quatre sites d'édition de la sous-unité RDL soient définis, aucune étude n'a été menée sur leur impact dans la pharmacologie des GABARs. Cependant, l'édition peut être à l'origine de résistances aux insecticides, comme cela a été montré pour la résistance *kdr* aux pyrethrinoïdes, liée au gène *para*, codant pour la principale sous-unité des canaux sodium chez de nombreuses espèces. La mutation *kdr* la plus commune est celle donnant lieu à la substitution L/F/H dans le segment 6 du domaine II du canal. Elle réduit la liaison des pyrethrinoïdes, en diminuant leur affinité pour les canaux ouverts et en favorisant le passage du canal à l'état fermé inactivé (Dong, 2007). Cette mutation serait en fait une édition de l'ARN de type U→C chez *Culex quinquefasciatus*, *Blattella germanica* et *Musca domestica* (Xu et coll., 2006a, 2006b).

D La phosphorylation des GABARs

Les GABARs de vertébrés sont sujets à des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation au niveau de la large boucle intracellulaire qui relie les segments transmembranaires M3 et M4. Ces récepteurs peuvent également être affectés indirectement par la phosphorylation/déphosphorylation de protéines associées. Les données concernant les invertébrés sont beaucoup plus limitées.

D.1 Vertébrés

Les sérine-thréonine kinases catalysent la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine, en utilisant des nucléotides tel l'ATP comme donneur de phosphates. La famille de ces enzymes comprend de nombreux membres, dont les CaMK, les caséine kinases, les PKA, les PKC ou les MAP kinases.

D.1.a PKC

Les PKC existent sous différents isotypes, séparés en trois sous-familles. Les PKC classiques (α , β et γ) sont dépendantes du calcium et du diacylglycérol (DAG). Les PKC nouvelles (δ , ϵ , η et θ) sont indépendantes du calcium et dépendantes du DAG. Les PKC atypiques (ζ et λ/ι) sont indépendantes à la fois du calcium et du DAG, mais, comme les deux autres isotypes, elles sont activées par d'autres messagers lipidiques, telle la phosphatidylsérine (Nishizuka, 1995 ; Song, M. et Messing, 2005). La régulation par la PKC des GABARs de vertébrés peut aboutir à trois types d'effets : 1) une modification de l'amplitude du courant GABAergique (IGABA), et parfois de la désensibilisation des récepteurs, 2) une modulation du trafic membranaire des récepteurs et/ou 3) une modification de la pharmacologie des récepteurs.

Bien qu'une augmentation de l'amplitude de IGABA ait été montrée dans une étude sur des GABA_ARs recombinants (Lin et coll., 1996), la majorité des études montrent une réduction de la fonction des GABARs natifs ou recombinants par la PKC (tableau 12).

Effet de l'activation de la PKC	Type de GABAR	Références
↘ IGABA	<i>GABA_ARs recombinants</i>	(Sigel et coll., 1991 ; Leidenheimer et coll., 1993 ; Krishek et coll., 1994 ; Chapell et coll., 1998 ; Connolly et coll., 1999 ; Filippova et coll., 2000 ; Brandon et coll., 2002b)
	<i>GABA_ARs natifs</i>	(Krishek et coll., 1994 ; Brandon et coll., 2000)
Accentuation de la ↘ de IGABA due à l'ATP	<i>GABA_CRs recombinants</i>	(Filippova et coll., 1999)
↘ IGABA et réduction de la désensibilisation	<i>GABA_ARs recombinants</i>	(Leidenheimer et Chapell, 1997 ; Moon et coll., 2000)
↘ flux ³⁶ Cl ⁻ induit par le muscimol	<i>GABA_ARs natifs</i>	(Kumar et coll., 2005)

Tableau 12 . Etudes montrant la diminution de la fonction des GABARs par la PKC. "↘ IGABA" signifie "réduction du courant GABAergique".

La phosphorylation des GABARs par la PKC se fait essentiellement sur des sérines, au niveau des boucles intracellulaires (figure 9).

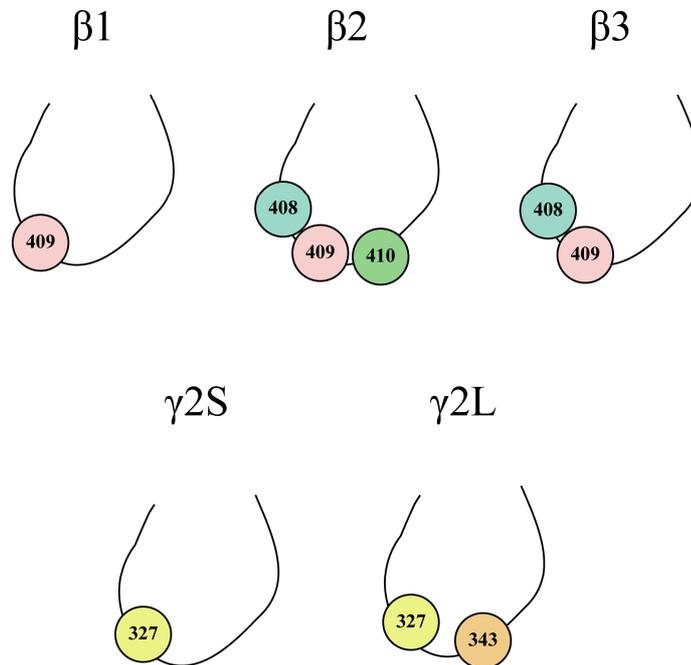


Figure 9 . Position relatives des sérines phosphorylées par la PKC dans les boucles M3-M4, selon la sous-unité (Moss et coll., 1992a ; Krishek et coll., 1994 ; McDonald et Moss, 1997 ; Chapell et coll., 1998 ; Brandon et coll., 1999 ; Brandon et coll., 2002a).

La diminution du courant GABAergique par la PKC peut résulter d'une phosphorylation directe du récepteur. Par autoradiographie, il a été montré que lorsque les sérines en position 409 de la sous-unité $\beta 1$ et les sérines en 408 et 409 de $\beta 3$ des GABA_ARs sont mutées, les sous-unités ne sont plus phosphorylées par la PKC (Brandon et coll., 1999). La même technique a permis de démontrer que l'activation de la PKC par le PDBu (phorbol ester) entraîne une augmentation de la phosphorylation des sous-unités $\beta 3$ de neurones corticaux de rat en culture (Brandon et coll., 2000). Des études électrophysiologiques de GABARs recombinants indiquent que lorsque la sérine en position 409 de la sous-unité $\beta 1$ est mutée, l'activation de la PKC ne permet plus la réduction du courant GABAergique observée dans les conditions contrôles (Krishek et coll., 1994). A l'inverse, dans le cas des GABA_CRs recombinants, des travaux ont établi que la diminution du courant dû au GABA par activation de la PKC est la même lorsque les sérines faisant partie des sites potentiels de phosphorylation sont mutées (Kusama et coll., 1998), ce qui indique une phosphorylation indirecte par la PKC. De plus, par autoradiographie, il a été établi que les sous-unités $\rho 1$ de GABA_CRs sont phosphorylées. Des mutations des sites de phosphorylation n'empêchent

cependant pas la réduction du courant GABAergique induite par le PMA (phorbol ester activateur de la PKC) (Filippova et coll., 2000). Par conséquent, la PKC peut agir par voie indirecte, qui peut être une internalisation des GABARs faisant intervenir d'autres cibles de la PKC que les récepteurs eux-mêmes.

Les GABARs de vertébrés sont sujets à un trafic membranaire, constaté aussi bien pour les récepteurs natifs que pour les récepteurs recombinants. L'expression des récepteurs dans les ovocyte de xénope a permis de montrer que l'activation de la PKC est à l'origine d'une endocytose (Chapell et coll., 1998 ; Filippova et coll., 2000 ; Kusama et coll., 2000), et que cette endocytose semble spécifique. En effet, dans des ovocytes de xénope exprimant à la fois des nAChRs et des GABA_CRs, les courants cholinergiques ne sont pas réduits suite à l'activation de PKC, contrairement aux IGABA (Filippova et coll., 2000). L'expression de GABARs dans des lignées cellulaires a également permis d'observer une internalisation spécifique suite à l'activation de la kinase (Filippova et coll., 1999). Les auteurs de cette étude proposent l'hypothèse d'une modification dans les interactions entre les GABARs et le cytosquelette suite à la phosphorylation, qui serait à l'origine de l'internalisation. Cependant, les récepteurs semblent aussi internalisés de manière constitutive, afin d'être stockés dans les compartiments intracellulaires. L'endocytose serait donc indépendante de la PKC. Dans ce cas, et l'enzyme agirait en diminuant le recyclage des récepteurs depuis le compartiment périnucléaire jusqu'à la surface membranaire (Connolly et coll., 1999). L'utilisation d'anticorps dirigés contre la sous-unité β montre à l'inverse qu'il n'y a pas d'endocytose pour les GABARs natifs (Brandon et coll., 2000). Du fait des différences entre les résultats obtenus par divers auteurs, l'implication de la PKC dans l'internalisation reste un sujet de controverse.

Le trafic membranaire n'est pas spécifique à la PKC, puisqu'un blocage des tyrosines kinases dans l'ovocyte de xénope entraîne une réduction du nombre de GABARs membranaires (Balduzzi et coll., 2001). *A contrario*, la PKA ne semble pas agir sur l'internalisation (McDonald et coll., 1998).

Le troisième effet de la PKC sur les GABARs consiste en une modification de leur pharmacologie (tableau 13). Des souris "knock-out" (modification génétique afin d'altérer un gène) pour la PKC ϵ montrent une hypersensibilité à l'éthanol, au pentobarbital et au diazépam (Hodge et coll., 1999), ce qui suggère une implication des GABARs. A l'inverse, des études sur des GABARs recombinants indiquent que l'activation de la PKC est à l'origine

d'une augmentation de l'effet potentialisateur du diazépam et du pentobarbital sur le courant dû au GABA (Leidenheimer et coll., 1993). La contradiction apparente entre ces deux études pourrait être expliquée par le fait que seule la PKC ϵ est étudiée pour la première, alors que dans la seconde étude, plusieurs sous-types de PKC sont activés. Les résultats de Leidenheimer et coll. (1993) sont appuyés par des études de marquage, montrant que des tranches de cerveau traitées avec du dibutyrate de phorbol (PDBu) fixent davantage de [3 H]flunitrazépam et de [3 H]TBPS, de manière zone-spécifique (Oh et coll., 1999).

		Modulateur positif concerné	L'effet global de la molécule est potentialisé	L'effet global de la molécule est réduit	Références
GABA _A Rs recombinants		diazépam	✓		(Leidenheimer et coll., 1993)
		pentobarbital	✓		
		THDOC (neurostéroïde)	✓		(Leidenheimer et Chapell, 1997)
GABA _A Rs natifs	neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe et cellules granulaires du gyrus denté	neurostéroïdes de type 5 β 3 α	✓		(Harney et coll., 2003)
	interneurones de la lamina II (moëlle épinière)	neurostéroïdes de type 5 α 3 α		✓	(Vergnano et coll., 2007)
	microsacs formés de membrane de cortex frontal de rat	allopregnanolone et pregnanolone (neurostéroïdes)		✓	(Hodge et coll., 2002)

Tableau 13 . Modulation de la pharmacologie des GABA_ARs par la PKC.

D.1.b CaMKII

La calcium-calmoduline kinase II (CaMKII), ubiquitaire, forme une holoenzyme constituée de huit à douze sous-unités (Schulman, 1993). Chaque sous-unité possède un domaine catalytique en partie N-terminale, un domaine central régulateur, où se fixe le complexe calcium-calmoduline, et un domaine contrôlant l'autoinhibition. En effet, la

CaMKII est constitutivement inhibée par interaction entre le domaine catalytique et le domaine d'autoinhibition. La levée de cette inhibition est permise par la liaison du complexe calcium-calmoduline qui empêche cette interaction (Schulman, 1993 ; Braun et Schulman, 1995). La CaMKII phosphoryle les sous-unités $\alpha 1$ et γ des GABARs (Churn et coll., 2002) et régule différemment des GABARs natifs selon qu'ils possèdent la sous-unité $\beta 2$ ou $\beta 3$ (Houston et coll., 2008). Elle permet le maintien de la fonction du récepteur (Churn et DeLorenzo, 1998), et peut aussi potentialiser la réponse au GABA des neurones corticaux d'embryons de souris, puisque son inhibition par le KN-62 réduit le courant (Aguayo et coll., 1998). Cette potentialisation a également été observée après injection intracellulaire de CaMKII pré-activée dans des neurones granulaires du cervelet de rat (Houston et Smart, 2006). De plus, l'augmentation de l'activité de la CaMKII entraîne une augmentation de la fixation du flunitrazépam (Churn et coll., 2002). Ainsi, comme la PKC, cette kinase peut influencer sur la pharmacologie des GABARs.

D.1.c PKA

La PKA peut également phosphoryler les GABARs de vertébrés, notamment sur la sérine 409 de $\beta 1$ et les sérines 408/409 de $\beta 3$. L'effet de la PKA sur la fonction des GABARs diffère selon les études. En effet, selon le modèle cellulaire utilisé et selon la sous-unité ou le résidu phosphorylé, la PKA a pour effet une augmentation ou une inhibition de la fonction des GABARs (Brandon et coll., 2002a). Par exemple, la phosphorylation par la PKA de la sous-unité $\beta 1$ a pour effet une diminution de IGABA (Moss et coll., 1992b), alors que la phosphorylation de la sous-unité $\beta 3$ entraîne une augmentation de IGABA et que la sous-unité $\beta 2$ n'est pas un substrat de la PKA, malgré la présence d'un site potentiel de phosphorylation (McDonald et coll., 1998). La PKA peut moduler la pharmacologie des GABARs au même titre que la PKC ou la CaMKII. Les GABARs de neurones DRG de rat sont sensibles au nefiracetam (psychostimulant), qui augmente le courant induit par de faibles concentrations de GABA et réduit le courant obtenu pour de fortes concentrations de l'agoniste. La présence d'un inhibiteur de PKA entraîne un blocage de l'effet du nefiracetam (Huang et coll., 1996). Dans le même modèle cellulaire, le chlorure de mercure potentialise le courant GABAergique. L'inhibition de la PKA augmente cette potentialisation et l'activation de la PKA la bloque,

confirmant un rôle de cette kinase dans la modulation de la pharmacologie des GABARs de vertébrés (Huang et Narahashi, 1997).

D.2 Invertébrés

Peu d'études sur la phosphorylation des GABARs d'invertébrés ont été rapportées dans la littérature. Il a néanmoins été démontré que dans une lignée cellulaire de drosophile (S2) exprimant des récepteurs homomériques RDL, la réduction progressive de IGABA ("run-down") peut être empêchée par l'inclusion d'EGTA dans la pipette de patch-clamp, indiquant le maintien de la fonction du récepteur par un processus calcium-dépendant (Millar et coll., 1994). De plus, dans le cas de neurones non identifiés du dernier ganglion de la blatte *Periplaneta americana*, l'inclusion d'ATP dans la pipette a aussi pour effet une stabilisation de IGABA, alors que la présence d'un peptide inhibiteur de la PKA réduit l'effet stabilisant de l'ATP, suggérant l'implication de la PKA dans le maintien de la réponse GABAergique (Watson, 2001 ; Watson et Salgado, 2001). Enfin, l'inhibition de la CaMKII des neurones DUM de blatte américaine mène à une réduction de IGABA, qui suggère une régulation positive des GABARs de ces neurones par la CaMKII (Alix et coll., 2002). D'autres kinases sont probablement impliquées dans la régulation des GABARs : l'entrée de calcium permet une augmentation de IGABA dans les cellules de Kenyon d'*Apis mellifera*, mais les kinases citées précédemment (PKC, PKA et CaMKII) ne semblent pas impliquées (Grunewald et Wersing, 2008).

Aucune étude portant sur les effets de la phosphorylation sur la pharmacologie des GABARs d'insectes n'a été rapportée à ce jour. Par contre, de telles études ont été menées pour d'autres récepteurs et canaux d'insectes. Ainsi, il a été montré que dans les neurones DUM de *Periplaneta americana*, l'imidaclopride, un insecticide agissant sur les nAChRs, voit son effet réduit lorsque la PKA est activée (Courjaret et Lapied, 2001). De la même manière, dans le même modèle cellulaire, une voie dépendante de la CaMKII facilite l'effet du DCJW, métabolite de l'indoxacarbe, insecticide qui agit sur les canaux sodiques (Lavialle-Defaix, 2005).

Objectifs de l'étude

Parmi les facteurs susceptibles de moduler la sensibilité des GABARs d'insectes à des insecticides tels que le fipronil, nous en avons sélectionné deux qui n'ont jamais été examinés jusqu'à présent : l'édition de l'ARNm de la sous-unité RDL et la phosphorylation des GABARs.

► Des éditions de l'ARNm peuvent être à l'origine de résistance aux insecticides, comme cela a déjà été montré pour les pyrethriinoïdes (Xu et coll., 2006a, 2006b). La sous-unité RDL est potentiellement éditée sur quatre sites, et le rôle de ces éditions n'a jamais été déterminé. Parmi les quatre éditions potentielles de la sous-unité RDL, notre choix s'est porté sur l'édition R122G, qui se trouve en partie N-terminale, dans une zone charnière entre les boucles D et A, impliquées dans la fixation du GABA (figure 3, p. 26). Par ailleurs, deux mutations ponctuelles de RDL (A301G et T350M) ont été retrouvées dans une souche résistante sélectionnée par le fipronil. Cette double mutation est parfois associée à l'édition R122G (Le Goff et coll., 2005). La première série d'objectifs visait à déterminer :

- 1) si l'édition R122G est à l'origine de modifications fonctionnelles du GABAR,
- 2) si l'édition R122G entraîne une résistance au fipronil,
- 3) si l'association mutations ponctuelles-édition peut accentuer la résistance au fipronil.

Afin de répondre à ces questions, différents variants de la sous-unité RDL ont été exprimés dans des ovocytes de xénope et les courants induits par l'activation des récepteurs RDL ont été étudiés par la technique de double-microélectrode en conditions de potentiel imposé. Les isoformes utilisées étaient soit sauvages, soit mutées en positions A301G et T350M, et possédaient ou non une mutation mimant la substitution R122G, obtenue par mutagenèse dirigée.

► La phosphorylation est un mécanisme qui peut moduler le fonctionnement et la pharmacologie de canaux ioniques ou de récepteurs ionotropes. Les effets de la PKC sur les GABARs de mammifères sont bien connus. Par contre, ses effets sur les GABARs d'invertébrés n'ont jamais été étudiés. Par conséquent, une seconde série d'objectifs consistait en :

- 1) la détermination du rôle de la PKC dans la régulation des GABARs d'insectes,
- 2) la détermination des conséquences de la phosphorylation sur la sensibilité au fipronil.

Parmi les deux sous-types de GABARs présents sur le soma des neurones DUM de *P. americana*, l'un est régulé positivement par une voie impliquant la CaMKII. Ces cellules ont donc servi de modèle d'étude pour étudier la régulation par la PKC. Les courants induits par l'activation des GABARs ont été enregistrés par la technique du patch-clamp en conditions de potentiel imposé.

La sous-unité RDL est de loin la mieux connue des sous-unités des GABARs d'insectes clonées jusqu'alors, mais la détermination de sa séquence n'a jamais été effectuée chez la blatte américaine. Par conséquent, la troisième série d'objectifs était :

- 1) de cloner la sous-unité RDL de *P. americana*, en vue de rechercher des sites potentiels de phosphorylation pouvant expliquer les phénomènes de phosphorylation observés *in vivo*,
- 2) de détecter sa présence dans les neurones DUM.

MATERIEL ET METHODES

Trois approches expérimentales différentes ont été utilisées pour atteindre les objectifs fixés :

➤ Expression de récepteurs homomériques constitués de sous-unités RDLbd de *Drosophila melanogaster* dans des ovocytes de xénope, et étude électrophysiologique et pharmacologique de ces récepteurs en conditions de potentiel imposé, par la technique de double-microélectrode intracellulaire,

➤ Etude électrophysiologique et pharmacologique des GABARs natifs des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*, en conditions de potentiel imposé, par la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière,

➤ Clonage de la sous-unité RDL dans le système nerveux de la blatte *P. americana*, et identification de cette sous-unité dans le neurone DUM, par PCR.

Chapitre I. Expression de GABARs de drosophile dans des ovocytes de xénope

A Introduction

Les xénopes du Cap (*Xenopus laevis*) sont des amphibiens anoures de la famille des pipidés, vivant principalement en Afrique du Sud, et dont le mode de vie est purement aquatique. Au-delà de leur rôle en tant qu'animal de compagnie, ils sont parmi les amphibiens les plus étudiés et utilisés en laboratoire. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'intérêt de ces animaux est la possibilité d'en prélever des ovocytes, excellent système d'expression de protéines hétérologues.

Les ovocytes, issus de fragments ovariens de xénope, se présentent en amas, avec des cellules de tailles différentes selon le stade de développement (stades I à VI). L'expression de protéines se fait généralement dans des ovocytes en fin de développement, à savoir en stade V ou VI, bien que des expressions en stade IV soient préférées pour des courants rapides (tels les courants sodiques). En effet, cela limite la valeur de la capacité membranaire et donc la durée des courants capacitifs pouvant interférer avec les courants ioniques dus aux canaux exprimés. Les ovocytes de stade V-VI sont aisément reconnaissables à leur taille importante (1-1,2 mm de diamètre), mais aussi à leur hémisphère animal très pigmenté et leur hémisphère végétatif dépigmenté.

L'intérêt des ovocytes de xénope comme système d'expression de protéines hétérologues réside dans leur grande taille, la possibilité de les obtenir en grande quantité, leur pauvreté en canaux endogènes une fois la couche de cellules folliculaires dégagée, et leur très forte capacité d'expression protéique. Leur incubation *in vitro* est relativement aisée puisqu'une solution saline additionnée de pyruvate (comme source d'énergie) et d'antibiotiques est suffisante pour les maintenir en bon état pendant près d'une semaine.

De l'ARNm d'hémoglobine de lapin injecté dans des ovocytes de xénope a permis la synthèse hétérologue de cette protéine dès le début des années 1970 (Gurdon et coll., 1971). Néanmoins, l'expression de récepteurs et canaux membranaires n'a été réalisée qu'au début des années 80. La première expression de GABARs a été obtenue en 1982 par injection d'ARN extrait de lobes optiques de poussin (Miledi et coll., 1982). L'ovocyte est tout à fait approprié à l'expression de GABARs exogènes parce qu'il ne possède pas de GABAR endogènes à sa surface (Kusano et coll., 1982).

B Obtention de l'ARNm muté de la sous-unité RDL

Exprimer des protéines recombinantes dans un système hétérologue présente le grand avantage de pouvoir contrôler la séquence de la protéine étudiée. Dans le cas de cette thèse, l'objectif était de mimer l'édition R122G de la sous-unité RDL, par mutagenèse dirigée.

B.1 Mutagenèse dirigée

Le travail a porté sur l'ADNc de la sous-unité RDLbd de *Drosophila melanogaster*, inséré dans le plasmide pNB40 (Brown et Kafatos, 1988). Ce plasmide, créé à partir de plusieurs autres constructions dans l'objectif d'exprimer des antigènes protéiques de drosophiles, permet une transcription et une traduction rapides *in vitro*. Il contient un site NotI unique, autorisant la linéarisation du plasmide et possède deux sites promoteurs : Sp6 et T7, un de chaque côté de l'insert. Le promoteur Sp6 permet la transcription à partir d'ADNc alors que la transcription à partir du promoteur T7 aboutit à la production d'ARN anti-sens. Le promoteur Sp6 est suivi d'un fragment de la séquence en 5' non traduite de l'ARNm du gène mineur de la β -globine de xénope, afin de faciliter la transcription de l'insert (figure 10).

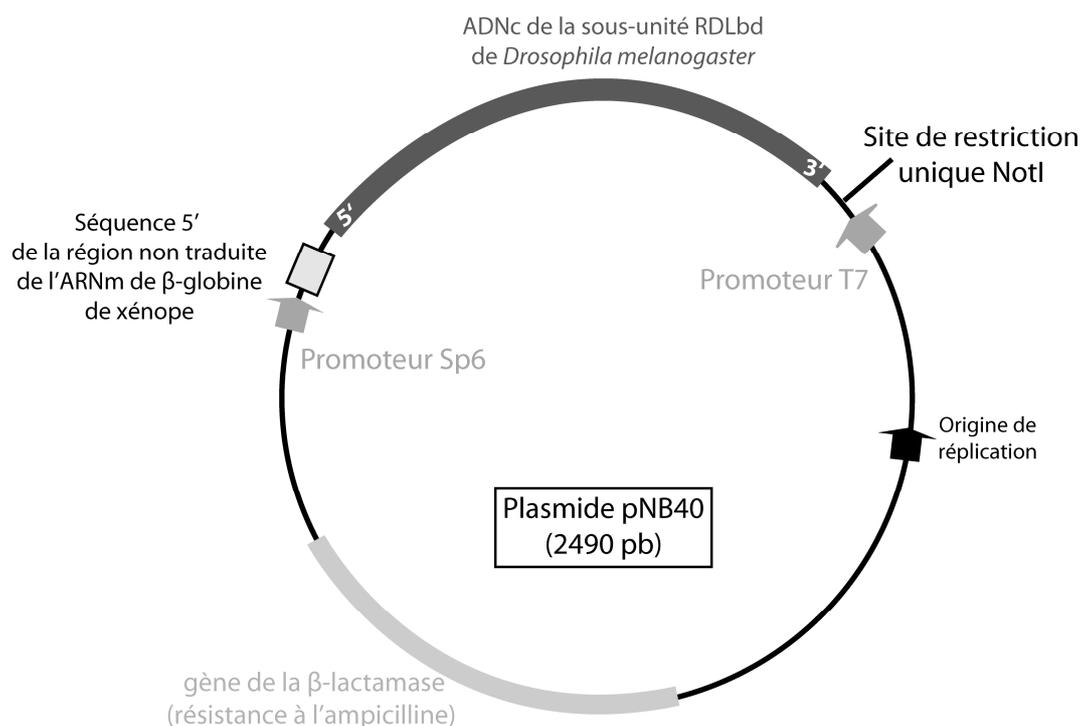


Figure 10 . Représentation schématique du plasmide pNB40. Modifié d'après Brown et Kafatos, 1988.

Le plasmide contenant la sous-unité RDLbd sauvage de *D. melanogaster* a été initialement offert par le Pr. French-Constant (Université de Bath, UK), et a été modifié par le Dr. Le Goff (Université de Nice Sophia-Antipolis), afin d'y insérer les mutations A301>G et T350>M (Le Goff et coll., 2005). Les plasmides contenant les ADNc de RDLbd sauvage et RDLbd double-mutant ont été utilisés pour cette thèse, afin de créer une mutation mimant l'édition R122>G. Les amorces employées pour la création des mutations sont présentées dans le tableau 14.

	Amorces sens	Amorces anti-sens
A301>G	5'-GCGTGTGGGGCTCGGTGTGACAAC-3'	5'-GTTGTACACCGAGCCCCACACGC-3'
T350>M	5'-GGAATACGCCATGGTCGGCTACA-3'	5'-GTAGCCGACCATGGCGTATTC-3'
R122>G	5'-TAGCGTATGGAAAACGACCTG- 3'	5'-CAGGTCGTTTCCATACGCTA- 3'

Tableau 14 . Amorces utilisées pour l'obtention des substitutions A301>G, T350>M (Dr. G. Le Goff) et R122>G (cette thèse).

L'introduction de la mutation a été effectuée par PCR à l'aide du kit "QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis kit" (Stratagene Europe, Amsterdam, Pays-Bas). Le principe consiste en l'amplification du plasmide par PCR, et est basé sur la méthylation naturelle des plasmides provenant de bactéries *Escherichia coli* (figure 11). Cette méthylation est due au gène *dam* codant pour une méthylase. Les amorces qui contiennent le nucléotide modifié s'hybrident à chacun des brins du plasmide, après qu'ils aient été séparés par dénaturation. L'enzyme polymérase utilisée dans ce kit est la PfuUltra™. Il s'agit d'une enzyme de haute fidélité qui a l'avantage de n'introduire un pourcentage d'erreur que de 0,9 % pour une séquence de 1kb, soit 18 fois moins environ qu'une Taq polymérase classique (d'après le fournisseur). Le programme de PCR, réalisée dans un thermocycleur Flexigene (Techne, Cambridge, UK), est le suivant : 95°C, 3 min ; 12 cycles (95°C, 30 sec ; 62°C, 1 min ; 68°C, 5 min) ; 72°C, 8 min. Suite à cela, 10 unités de l'enzyme de restriction DpnI sont ajoutées au produit d'amplification, pour une digestion d'une heure (37°C). Cette incubation permet la dégradation de l'ADN parental méthylé. S'ensuit alors une amplification bactérienne dans des lignées supercompétentes XL1-Blue, fournies avec le kit. L'insertion plasmidique se fait par choc thermique : après addition de l'ADN, les bactéries sont incubées dans de la glace pendant 30 minutes, puis subissent un choc de 45 secondes à 42°C, et sont de nouveau placées sur la glace (2 minutes). Du milieu SOC (0.5% extrait de levure, 2% tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) est ensuite ajouté, et les bactéries, après avoir été incubées une heure à 37°C sous agitation, sont étalées sur un milieu gélosé enrichi [agar 15 g/l, milieu LB (Luria Broth (20 g/l), extrait de levure (10 g/l)], contenant de l'ampicilline (0,1 mg/ml). Des colonies bactériennes sont ensuite ensemencées dans du milieu LB/ampicilline et incubées à 37°C sous agitation pendant plus de 16 heures.

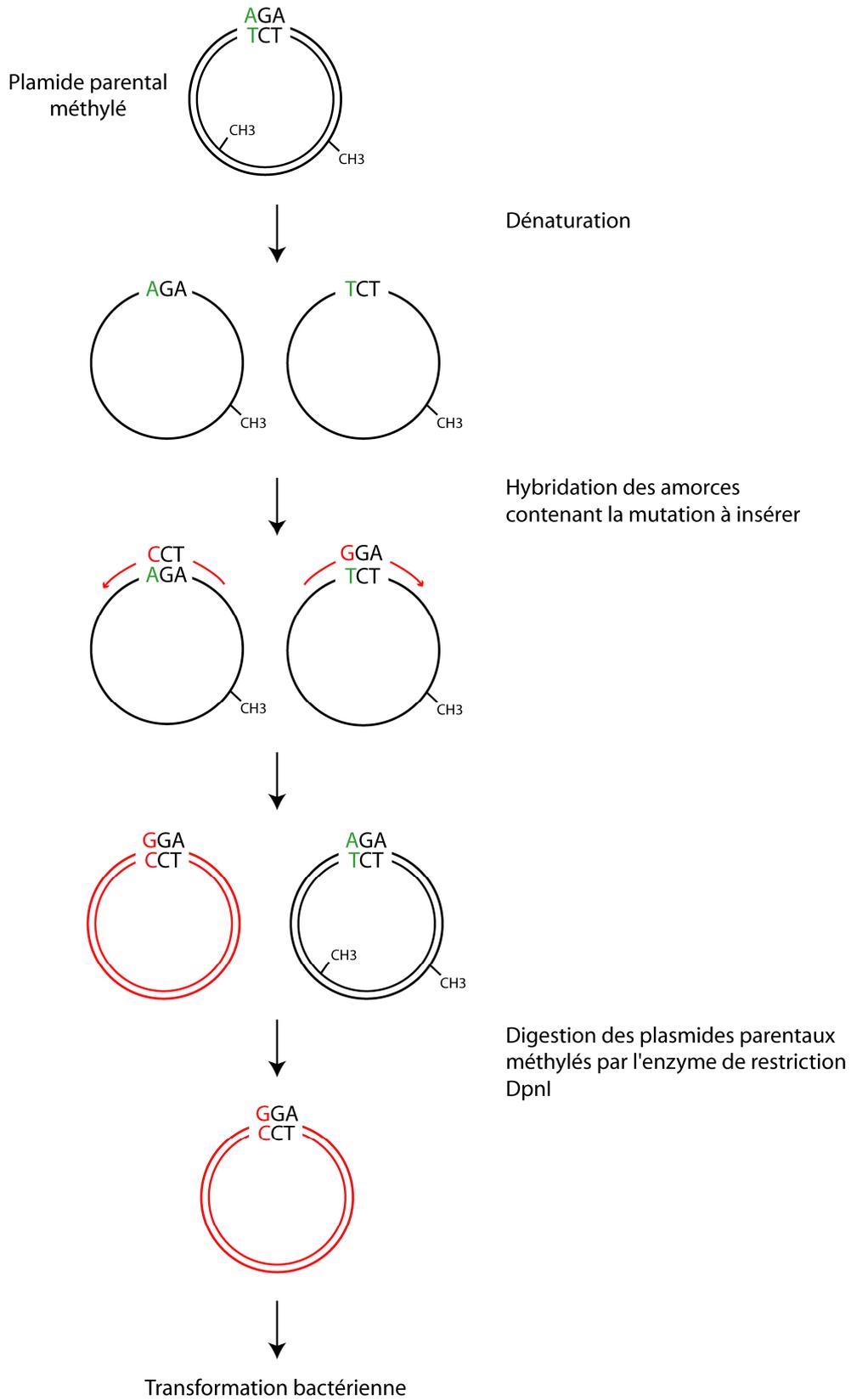


Figure 11 . Principe de la mutagenèse dirigée.

B.2 Midipréparation et transcription

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries et purifié par midipréparation à l'aide du kit "QIAfilter Plasmid Midi Kit" (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), suivant les instructions du fabricant. Les ADN obtenus sont linéarisés par l'enzyme de restriction NotI, pendant une heure à 37°C, et la réaction est arrêtée par ajout d'EDTA 0,5M (1/20^e volume), Na acétate 3M (1/10^e volume) et éthanol (2 volumes).

La transcription à partir des plasmides pNB40, contenant les ADNc des sous-unités RDL sauvages (WT), WT + R122G, double-mutants (A301G/T350M) et double-mutants + R122G, a été effectuée à l'aide du kit "Sp6 mMessage mMachine[®]" (Ambion Europe, Huntingdon, UK). Après linéarisation des plasmides par NotI, la réaction de transcription a lieu à 37°C, en suivant les consignes du fabricant. Suite à l'incubation, de la TurboDNase[®] est ajoutée, afin de dégrader l'ADN résiduel. Pour finir, afin d'ôter les restes de contaminants (protéines, oligonucléotides et sels), l'ARN est purifié à l'aide du kit "MEGAClear[™]" (Ambion Europe, Huntingdon, UK). La dilution finale est choisie de telle sorte que l'amplitude maximale des courants induits par le GABA, suite à l'expression de l'ARNm, soit comprise entre 100 et 1000 nA environ.

C Expression des récepteurs RDL dans les ovocytes de xénope

Les xénopes sont élevés dans une animalerie, à température comprise entre 20 et 22°C, et avec une photopériode de 12h/12h. Les individus sont nourris deux fois par semaine avec des granulés pour truites. Les excréments et autres déchets sont évacués et filtrés grâce à un système de pompage branché sur le secteur.

En vue d'un prélèvement d'ovocytes par laparotomie, les animaux (figure 12A) sont anesthésiés par immersion dans de l'eau contenant du méthanesulfonate de tricaine (MS-222) à 0,15% pendant 40 minutes. La solution est tamponnée par du bicarbonate (1,5 g/l) afin d'éviter les risques d'acidose. L'abdomen est incisé sur une longueur de 0,5-1cm et des

fragments ovariens sont prélevés à l'aide de pinces préalablement flambées. La plaie est recousue à l'aide de fil chirurgical auto-résorbable, monté sur une aiguille courbe (Ethicon Vicryl, Ethicon, Issy les Moulineaux). Il n'est pas nécessaire de badigeonner la plaie d'antibiotique car la peau de cet animal sécrète des peptides ayant des activités antimicrobiennes à large spectre (Soravia et coll., 1988). L'animal est finalement placé sous un filet d'eau pour éliminer l'anesthésique et faciliter le réveil.

Les fragments ovariens, formés d'ovocytes à différents stades de développement réunis par du tissu conjonctif, sont placés dans 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). Les ovocytes sont entourés d'enveloppes folliculaires comprenant, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épithélium ovarien, la thèque (tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins) et une couche de cellules folliculaires (figure 12B et C). Ces enveloppes doivent être enlevées en vue des enregistrements électrophysiologiques pour trois raisons : 1) elles constituent une barrière mécanique qui gêne l'empalement des microélectrodes, 2) elles ralentissent le retour à un potentiel de membrane stable après la dépolarisation induite par l'empalement (Kusano et coll., 1982), et 3) elles ralentissent l'accès des substances pharmacologiques à la membrane ovocytaire. La "défolliculation" est réalisée par incubation des fragments ovariens à température ambiante dans de la collagénase IA (Sigma-Aldrich Chimie, L'Isle d'Abeau Chesnes), diluée dans du SOS sans calcium. L'absence de calcium permet d'éviter l'action de protéases présentes sous formes d'impuretés dans la solution de collagénase et qui pourraient léser la membrane ovocytaire. Le tube contenant les ovocytes est agité lentement et manuellement pendant 10 à 15 minutes afin de faciliter l'action de la collagénase. A l'issue de ce traitement, les enveloppes folliculaires sont très fragilisées, ce qui permet ensuite de libérer manuellement les ovocytes, à l'aide de pinces fines soigneusement affûtées. Des ovocytes "prêts à l'emploi" (entourés uniquement de la membrane vitelline) sont alors obtenus (figure 12D et E).

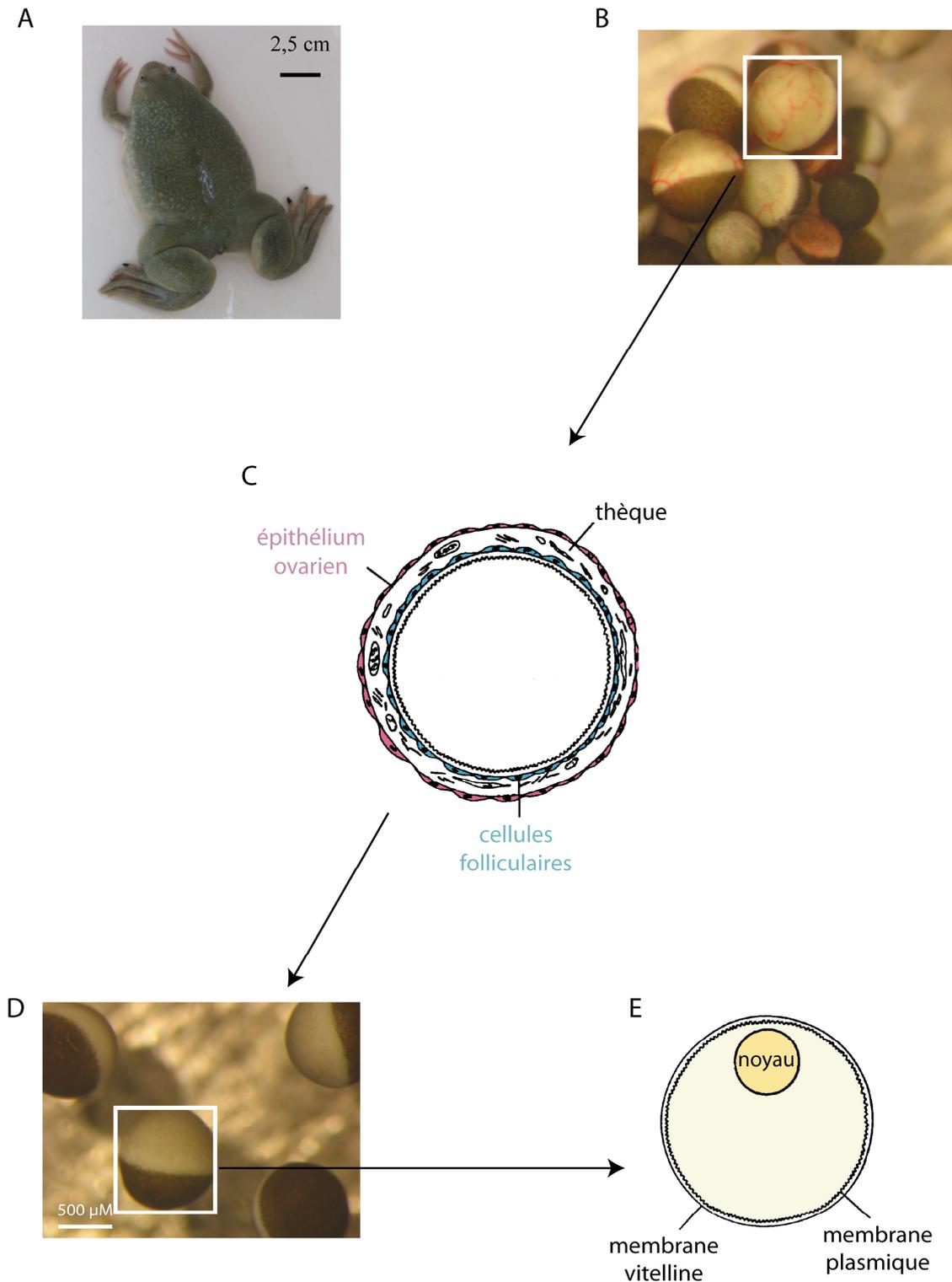


Figure 12 . Obtention d'ovocytes de xénope "défolliculés". **A :** *Xenopus laevis* femelle. **B :** Ovocytes de xénope après prélèvement. Les ovocytes sont reliés par du tissu connectif et sont entourés d'enveloppes contenant des vaisseaux sanguins. **C :** Schéma montrant les couches tissulaires qui entourent les ovocytes après prélèvement (Snutch, 1988). **D et E :** Photo et schéma (Snutch, 1988) d'ovocytes de xénope après traitement à la collagénase et dégagement manuel des enveloppes folliculaires.

De l'ARN est injecté dans le cytoplasme des ovocytes, à l'aide d'un nanoinjecteur (Nanoject II, Drummond Scientific, Etats-Unis), fixé sur un micromanipulateur. En moyenne, près de 20 nl d'ARN à 20 ng/ μ l sont injectés de façon à obtenir des courants GABAergiques compris entre 100 et 1000 nA. Les ovocytes sont incubés 24 heures au minimum 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, contenant de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 mg/ml), de la gentamycine (50 mg/ml) et du pyruvate de sodium (2,5 mM). Ce milieu est changé tous les deux jours.

D Etude des courants GABAergiques en conditions de potentiel imposé par la technique de double-microélectrode

La technique de TEVC ("two-electrode voltage-clamp") est basée sur le principe suivant : une des électrodes permet la mesure du potentiel de membrane de l'ovocyte (V_m), et l'autre sert à injecter un courant dans la cellule (I_m), afin de maintenir le potentiel imposé par l'expérimentateur (figure 13). Cette technique permet l'enregistrement de courants d'amplitude pouvant aller de l'échelle du nanoampère à celle de la dizaine de microampères (au-delà, le potentiel imposé est difficile à maintenir). Chaque microélectrode est étirée à partir d'un capillaire en verre borosilicaté (Clark Electromedical Instruments, Phymep, Paris, France) puis remplies de KCl concentré (3 M). Elle est ensuite fixée à un porte-électrode lui-même relié à une tête d'amplificateur (Axon headstage, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis) que l'on peut déplacer dans les trois dimensions grâce à un micromanipulateur. Les têtes sont elles-mêmes connectées à un amplificateur GeneClamp 500 (Axon instruments, Foster City, Etats-Unis). La résistance des électrodes, mesurée dans du SOS, doit être comprise entre 1 et 10 M Ω .

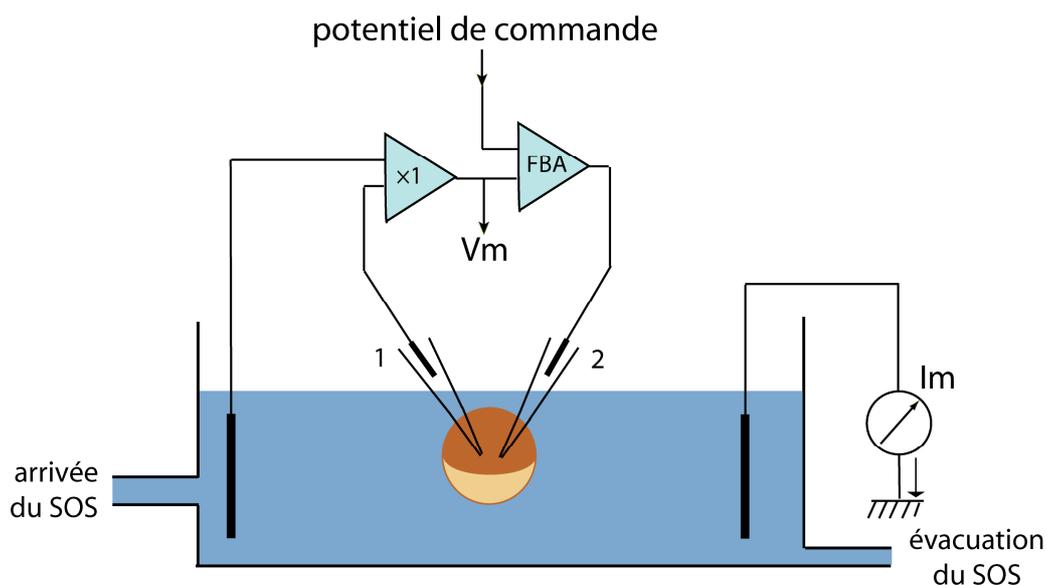


Figure 13 . Schéma simplifié du principe de la technique de double-microélectrode. Suite à l'injection de l'ARN, les ovocytes sont maintenus à température ambiante pendant au moins 24 heures puis utilisés pour l'étude des courants GABAergiques. V_m = potentiel de membrane ; FBA = amplificateur à circuit de contre-réaction ("feedback amplifier") ; I_m = courant injecté via l'électrode 2 pour maintenir le potentiel imposé constant. Ce courant est mesuré lors de son écoulement vers la terre.

Les ovocytes incubés sont utilisés entre un jour et une semaine après l'injection. Ils sont placés entre cinq minutes dans une chambre d'altuglas d'un volume d'environ 100 μ l. Le SOS, dans lequel les ovocytes sont immergés, est délivré à débit constant par une pompe péristaltique (Minipuls 3, Gilson, Villiers Le Bel, France) et évacué par un système d'aspiration à vide. Suite à la légère lésion membranaire provoquée par l'empalement des électrodes, un temps d'attente d'environ 20 minutes est respecté pour permettre une repolarisation et une stabilisation du potentiel de membrane. Le potentiel d'équilibre des ions chlorure dans les ovocytes baignant dans du SOS étant compris entre -15mV et -25mV , le potentiel de membrane est fixé à -60mV pour tous les enregistrements, ce qui permet d'obtenir des courants entrants (correspondant à des flux sortants de chlorure) lors d'applications de GABA. Le neurotransmetteur est appliqué à un débit d'environ 4 ml/min et le courant mesuré est enregistré sur papier à l'aide d'une table traçante (Gould BS-272, RIL instruments, Aldershot, UK).

Dans le cadre de l'étude des effets de l'édition sur la sensibilité des GABARs au fipronil, deux protocoles ont été suivis :

• Le premier a servi à réaliser les courbes dose-réponse du GABA pour chaque variant. Dans ce cas, les applications de l'agoniste sont séparées de dix minutes. Ce temps est suffisant pour permettre une complète récupération de la désensibilisation. Les courants sont mesurés au pic (amplitude maximale) puis un rinçage immédiat au SOS est effectué. Le GABA est appliqué à des concentrations allant de 3 μ M à 3 mM. Les courbes dose-réponse du GABA obtenues permettent de déterminer la CE_{30} (concentration pour obtenir 30% d'effet), qui sert de concentration de travail pour l'étude des effets du fipronil.

• Le second protocole a permis de construire les courbes d'inhibition du fipronil (CIL Cluzeau, France). Pour la construction de ces courbes, le fipronil est appliqué à des concentrations allant de 1.10^{-10} à 1.10^{-6} M, et le protocole d'application est présenté figure 14.

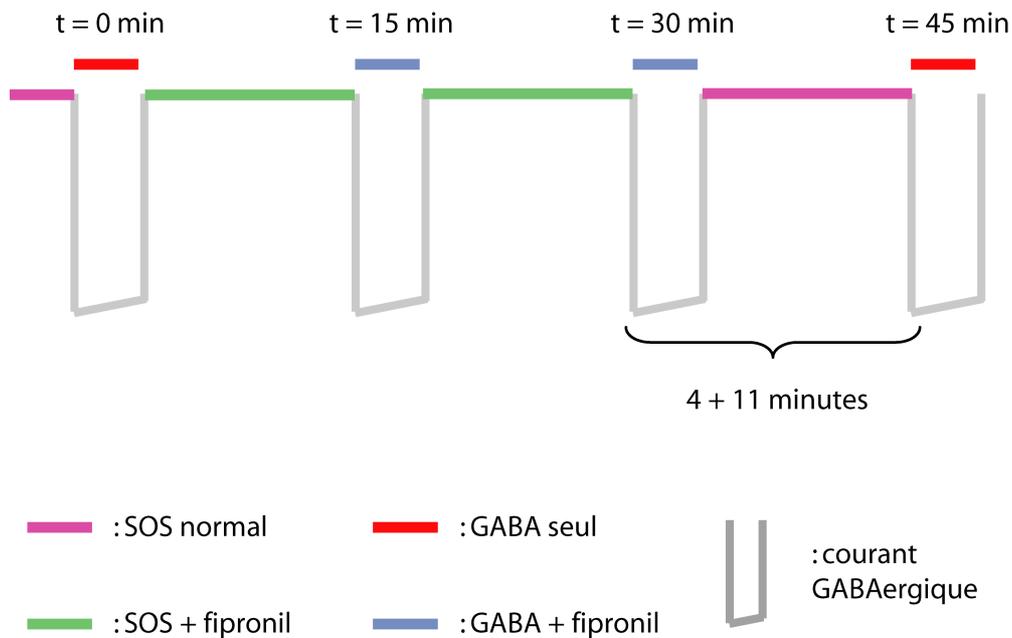


Figure 14 . Protocole utilisé pour la construction des courbes dose-réponse du fipronil.

Dans le cadre de l'étude de la phosphorylation des récepteurs RDL exprimés dans des ovocytes de xénope, les produits pharmacologiques utilisés sont : le fipronil, le PDBu (phorbol ester, activateur de la PKC) et la chélérythrine (inhibiteur de la PKC).

Chapitre II. Etude des GABARs natifs des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*

A Introduction

L'étude des effets du fipronil sur les GABARs natifs nécessite d'utiliser un modèle biologique dont les caractéristiques sont connues. Les neurones DUM ("Dorsal Unpaired Median") de la blatte *P. americana* possèdent à leur surface des GABARs dont les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques ont déjà été étudiées au sein du laboratoire (Hue, 1991 ; Dubreil et coll., 1993 ; Dubreil, 1996 ; Le Corrionc et Hue, 1999 ; Grolleau et Sattelle, 2000 ; Alix, 2001 ; Alix et coll., 2002 ; Le Corrionc et coll., 2002). De plus, il est établi que diverses kinases participent à la régulation intracellulaire des récepteurs et canaux ioniques membranaires de ces neurones. C'est le cas pour la régulation de l'activité des GABARs par la CaMKII (Alix et coll., 2002), des nAChRs résistants à l' α -bungarotoxine par des PKCs (Courjaret et coll., 2003) et d'un canal sodique dépendant du potentiel par la PKA (Lavialle-Defaix et coll., 2006). De ce fait, les neurones DUM constituent un très bon modèle d'étude des modulations de l'efficacité du fipronil par les phénomènes de phosphorylation, et notamment par les PKCs.

A.1 Les neurones DUM

Les neurones DUM tirent leur nom de leur localisation spatiale dans les ganglions nerveux, à savoir le long de la ligne médiane, au niveau dorsal (Hoyle, 1974). Ils

ont été décrits chez diverses espèces d'insectes d'ordre différents. Chez la blatte, ils sont absents des ganglions sous-œsophagiens et cérébroïdes, sont présents dans tous les ganglions de la chaîne nerveuse, et sont plus nombreux dans le dernier ganglion abdominal, qui est issu d'une fusion des ganglions 7 à 11 (Braunig et Pflugger, 2001). Il existe trois types de neurones DUM, issus des mêmes cellules souches, les neuroblastes médians :

‣ 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 interneurons locaux sont aussi GABAergiques (10 à 20 μm de diamètre) et disposent de prolongements neuritiques restreints au ganglion.

Les neurones intersegmentaires propagent l'information nerveuse entre les ganglions et les interneurons locaux intègrent le signal au sein d'un même ganglion. Les neurones DUM efférents sont des cellules sécrétrices d'octopamine, une substance biogène comportant un groupement amine qui est reconnue comme ayant un rôle de neurotransmetteur, de neurohormone et de neuromodulateur chez l'insecte. Les neurones octopaminergiques sont des modulateurs des muscles squelettiques et viscéraux. Des marquages par du bleu de toluidine et du cobalt montrent que, chez la blatte, ces neurones contrôlent l'activité des muscles de l'appareil reproducteur (Sinakevitch et coll., 1995 ; Stevenson et Sporhase-Eichmann, 1995), de muscles viscéraux (comme le cœur) et squelettiques (dont les muscles alaires) (Sinakevitch et coll., 1996).

Les neurones DUM efférents sont les plus étudiés du fait de leur activité spontanée et ils sont aujourd'hui bien caractérisés sur le plan électrophysiologique et pharmacologique. La présence de plusieurs types de GABARs ionotropes dans ces neurones en font une préparation de choix pour étudier l'influence de la phosphorylation sur la sensibilité des GABARs aux insecticides.

A.2 Les GABARs des neurones DUM efférents

D'après les études réalisées au laboratoire, les neurones DUM présentent trois types de GABARs ionotropes qui diffèrent à la fois par leur localisation et leur pharmacologie : deux sont extrasynaptiques (corps cellulaire) et seront nommés GABAR1 et GABAR2 pour une meilleure compréhension, et le troisième est synaptique, avec une localisation neuritique (Dubreil et coll., 1994). Nos travaux ont été menés sur les corps cellulaires des neurones DUM isolés et ont donc porté uniquement sur les GABAR1 et GABAR2. Les GABARs extrasynaptiques présentent en effet un intérêt particulier dans le cadre de cette thèse, puisque le fonctionnement de l'un d'eux (GABAR2) est modulé positivement par la CaMKII (Alix et coll., 2002).

Les deux récepteurs extrasynaptiques présentent une pharmacologie relativement semblable (tableau 15) mais les GABAR2 sont sélectivement activés par l'acide cis-4-aminocrotonique (CACA).

		GABAR synaptique	GABAR1 extrasynaptique	GABAR2 extrasynaptique
Agonistes	muscimol		✓	
	isoguvacine		✓	
	CACA	✓	non	✓
	TACA	–		✓
	ZAPA	–		✓
	THIP	–		✓
	β-alanine	–		✓
Antagonistes	PTX		✓	
	fipronil		✓	
	dieldrine	–		✓
	BIDN	–		✓
	EBOB	✓		–
	bicuculline	–		non
	SR95531	–		non

Tableau 15 . Pharmacologie de trois sous-types de GABARs présents à la surface des neurones DUM de la blatte *P. americana* (Dubreil et coll., 1993 ; Dubreil et coll., 1994 ; Dubreil, 1996 ; Le Corrionc et Hue, 1999 ; Alix, 2001). "✓" signifie "sensible à" ; "non" signifie "insensible à" ; "–" signifie "non déterminé".

B Etude électrophysiologique et pharmacologique

B.1 Obtention de neurones DUM isolés (figure 15)

Les blattes américaines sont des insectes cosmopolites de l'ordre des blattoptères (autrefois dictyoptères). Les individus étudiés lors de cette thèse proviennent d'un élevage de quarante années, et n'ont pas été soumis à des pressions insecticides. Les blattes sont élevées à 29°C, avec une alternance de 12h d'éclairage et 12h d'obscurité. Leur nourriture et l'eau sont fournies régulièrement.

Six blattes mâles adultes sont disséquées pour chaque expérimentation, et les neurones DUM sont isolés (Lapied et coll., 1989). Les dissections et dissociations ganglionnaires sont réalisées à température ambiante, sous une hotte à flux laminaire horizontal désinfectée à l'alcool 70°C, en utilisant des instruments flambés à l'alcool, des antibiotiques et des filtres 0,22 µm (Millipore, Billerica, Etats-Unis). La tête, les pattes et les ailes sont sectionnées, et la blatte est présentée face ventrale orientée vers le haut. L'accès au dernier ganglion abdominal est permis par un dégagement de la cuticule ventrale, et par le déplacement de la glande conglobée (ou phallique) du système reproducteur (Feliubadalo, 1996). L'extrémité de la chaîne nerveuse est immédiatement recouverte par du liquide physiologique de composition 1 (LPC1, cf. tableau 16, p.95), 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 dernier ganglion abdominal (DGA) est retiré par section des nerfs cercaux et connectifs, et est placé dans une boîte contenant du LPC1. Une fois les six DGA récupérés, ils sont nettoyés des restes trachéens, des nerfs périphériques et des connectifs. Les neurones DUM se trouvant exclusivement le long de la ligne dorsale, les côtés de chaque ganglion sont délicatement sectionnés à l'aide d'aiguilles montées. Les tissus ganglionnaires ainsi rendus accessibles sont ensuite soumis à un traitement par la collagénase IA (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ). La composition de la solution contenant l'enzyme est présentée dans le tableau 16 (LPC2).

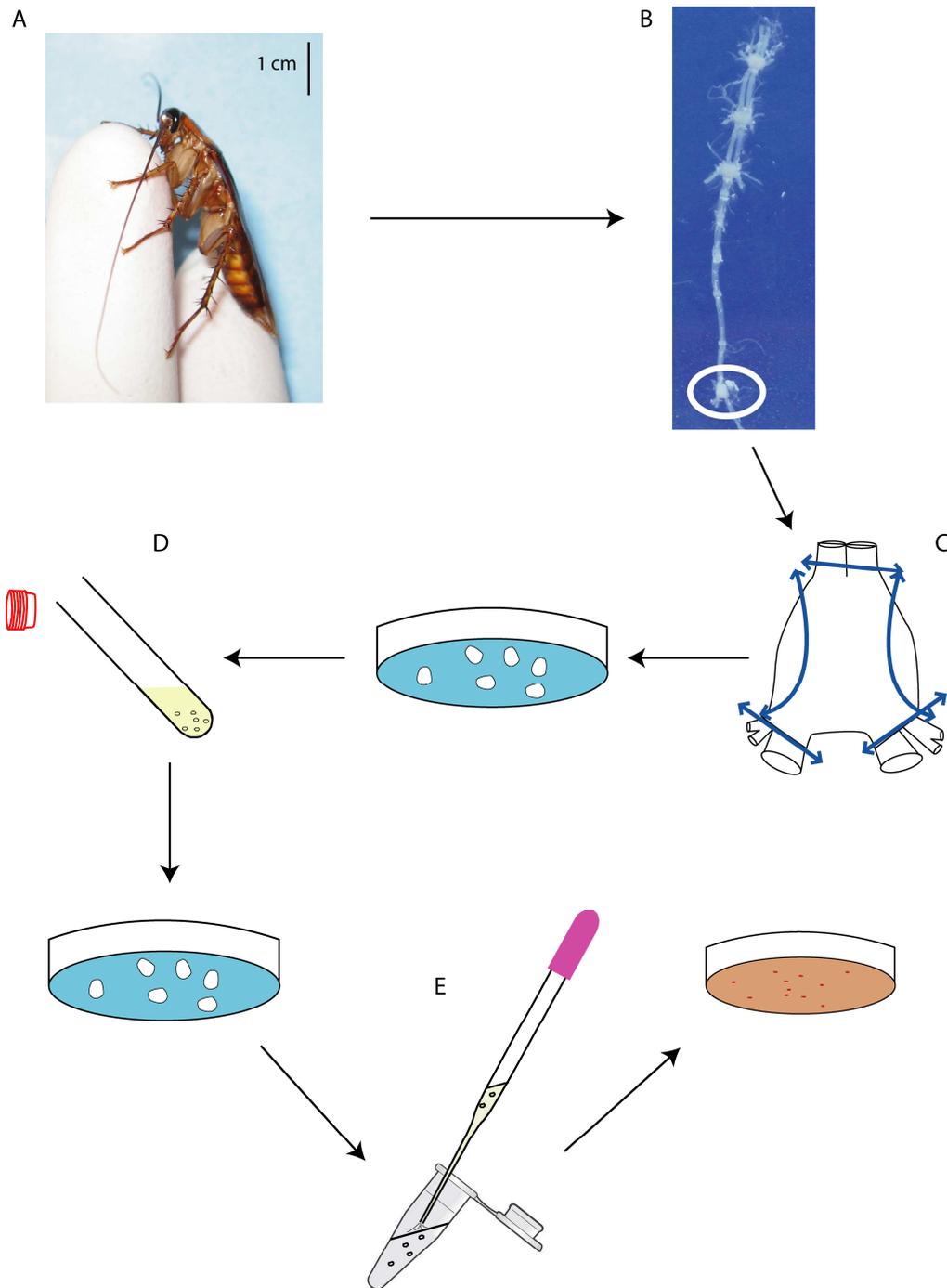


Figure 15 . Schéma du protocole permettant l'obtention des neurones DUM du DGA de *P. americana*. **A** : blatte américaine mâle. **B** : chaîne nerveuse de la blatte, dont on distingue les trois ganglions thoraciques, ainsi que le DGA (entouré en blanc). **C** : section des parties du DGA non nécessaires, afin de ne garder que la ligne médiane. **D** : traitement enzymatique par la collagénase IA. **E** : dissociation mécanique par aspirations-refoulements.

Après une incubation de 35 minutes à 29°C, la collagénase est éliminée par rinçage des ganglions par deux fois dans du LPC1, cinq à dix minutes. Les ganglions sont ensuite placés dans un tube de 1,5 ml contenant du LPC3 (tableau 16), et sont soumis à une dissociation mécanique brève, par passages à travers des pipettes Pasteur dont les diamètres sont réduits à la flamme. Le liquide contenant désormais les neurones dissociés est déposé délicatement dans des boîtes de culture stériles (35 mm, Falcon, Becton Dickinson Labware, Etats-Unis), dont le fond est recouvert de poly-D-lysine (100µg/ml, Sigma, France), afin d'assurer l'adhérence des cellules. Les neurones sont incubés à 29°C pendant 24 heures.

	LPC1	LPC2	LPC3
NaCl	200		
KCl	3,1		
MgCl₂	5		
CaCl₂	4		
HEPES	10		
saccharose	50		
pénicilline (UI/ml) / streptomycine (µg/ml)	100 100	-	50 50
collagénase IA	-	150 UI/ml	-
sérum de veau fœtal	-	-	5 %
pH (ajusté avec du NaOH 1M)	7,4		

Tableau 16 . Composition des solutions utilisées lors de la dissection-dissociation aboutissant à l'obtention de neurones DUM isolés. Sauf pour la collagénase, les concentrations sont en mM.

B.2 Etude électrophysiologique des GABARs des neurones DUM

B.2.a Présentation de la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière et en conditions de potentiel imposé

Les courants induits par l'activation des GABARs des neurones DUM sont étudiés à l'aide de la technique du patch-clamp, mise au point à la fin des années 1970 et améliorée dans les années 1980 (Neher et Sakmann, 1976 ; Hamill et coll., 1981). Cette technique permet d'étudier des courants ioniques à l'échelle de la cellule entière ou d'un canal unique, en isolant électriquement une portion de membrane. Une légère pression négative permet de créer un scellement hermétique entre la pipette de patch-clamp et la cellule, avec une résistance électrique de plusieurs giga-ohms. Dans cette configuration (cellule-attachée), seul(s) le(s) canal (canaux) se trouvant sous la membrane peu(ven)t être étudié(s), en imposant un potentiel de travail ("voltage-clamp").

Afin de travailler sur l'ensemble des canaux ioniques et/ou récepteurs d'une cellule, comme dans le cadre de cette thèse, la configuration cellule-entière est employée. Dans ce cas, une pression négative supplémentaire est appliquée, de manière à rompre le fragment de membrane se trouvant sous la pipette. L'intérieur de la pipette est alors en continuité avec le cytoplasme cellulaire. Dans ces conditions, il est possible d'étudier l'évolution du potentiel de membrane en mode courant-imposé ("current-clamp") ou d'étudier l'évolution du courant selon le potentiel imposé ("voltage-clamp"), tout en contrôlant les milieux intracellulaire et extracellulaire (figure 16).

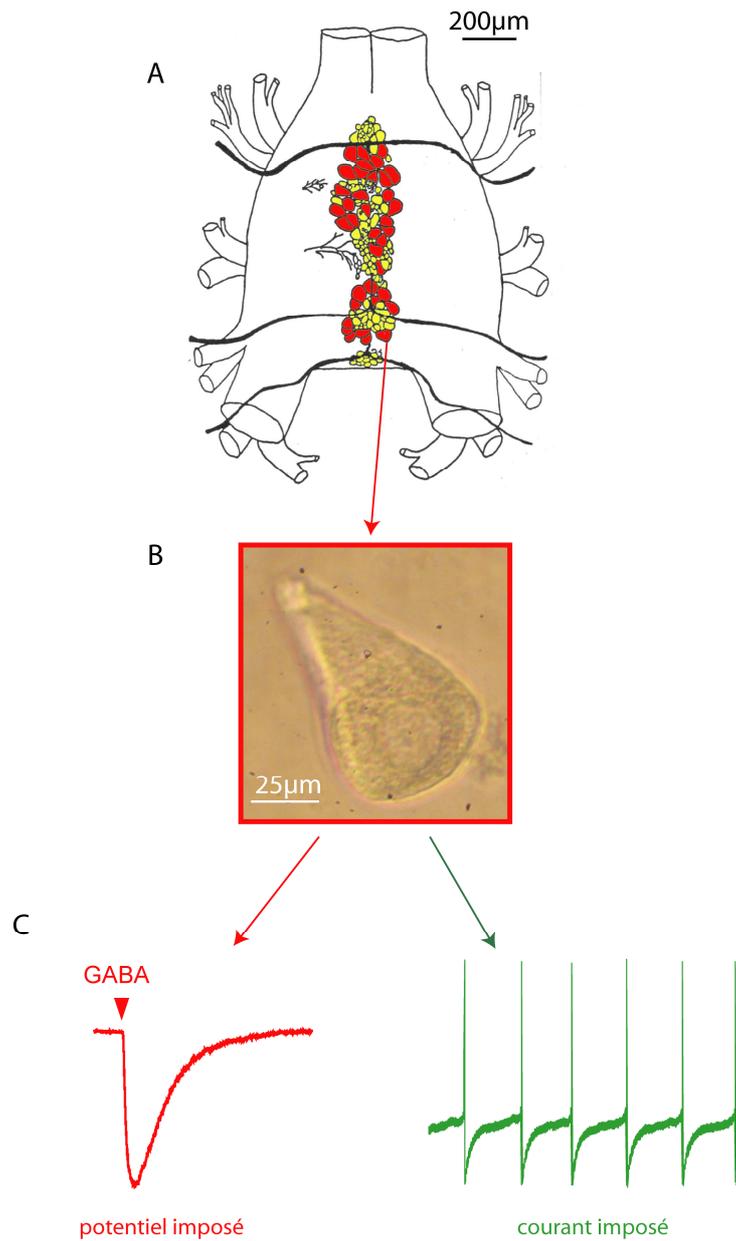


Figure 16 . La membrane des neurones DUM du DGA peut être soumise à un courant imposé ou à un potentiel imposé. A : DGA de *P. americana*, contenant des neurones DUM. A l'inverse des neurones intersegmentaires et des interneurons locaux (en jaune), les neurones efférents (en rouge) sont de grande taille. Modifié d'après Sinakevitch et collaborateurs, 1996. **B :** neurone DUM isolé, avec une forme piriforme caractéristique. **C :** mesure du courant en mode potentiel imposé (exemple représentatif d'un courant GABAergique) ou du potentiel en mode courant imposé (exemple représentatif de potentiels d'action).

L'étude des GABARs a été réalisée en conditions de potentiel imposé. Le courant traversant la membrane plasmique est dû à deux composantes : le courant capacitif et le courant ionique (I_i), qui sont reliées par la relation :

$$I = C_m \cdot dE/dt + I_i$$

(avec I = courant global, C_m =capacité membranaire, E = potentiel de membrane, t =temps et I_i = courant ionique)

Par conséquent, lorsque le potentiel est imposé, alors dE/dt est nul, et le courant global correspond au courant ionique (Aidley, 1998). Ce dernier, appelé aussi courant macroscopique puisqu'il fait intervenir tous les canaux/récepteurs ouverts à un temps et à un potentiel donnés, dépend de plusieurs facteurs, de telle sorte que :

$$I = N \cdot P_{o(t,v)} \cdot i$$

(avec I = courant macroscopique, N = nombre de canaux, P_o = probabilité d'ouverture à un instant t et un potentiel V donnés et i = courant élémentaire (unitaire))

L'inconvénient principal de la configuration cellule entière du patch-clamp est que les composants intracellulaires tels que les seconds messagers sont dilués par la solution intrapipette, ce qui peut provoquer une réduction progressive du courant au cours du temps (phénomène de "run-down"). Le "run-down" des courants GABAergiques peut être réduit par l'inclusion dans la solution intrapipette de composés comme la phosphocréatine ou l'ATP (Gyenes et coll., 1988 ; Watson et Salgado, 2001).

B.2.b Dispositif expérimental (figure 18)

Après 24 heures d'incubation, les neurones DUM efférents en culture sont placés sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, France) positionné dans une cage de Faraday et posé sur une table anti-vibratoire. Les cellules étudiées, à savoir les neurones DUM octopaminergiques, sont distingués des autres cellules par deux critères :

1) morphologique : ces neurones sont piriformes, et de grande taille (diamètre compris entre 30 et 60 μm (Sinakevitch et coll., 1996)),

2) électrophysiologique : les neurones DUM présentent une activité électrique spontanée (Grolleau et Lapied, 2000), qu'il est aisé de confirmer en conditions de courant imposé.

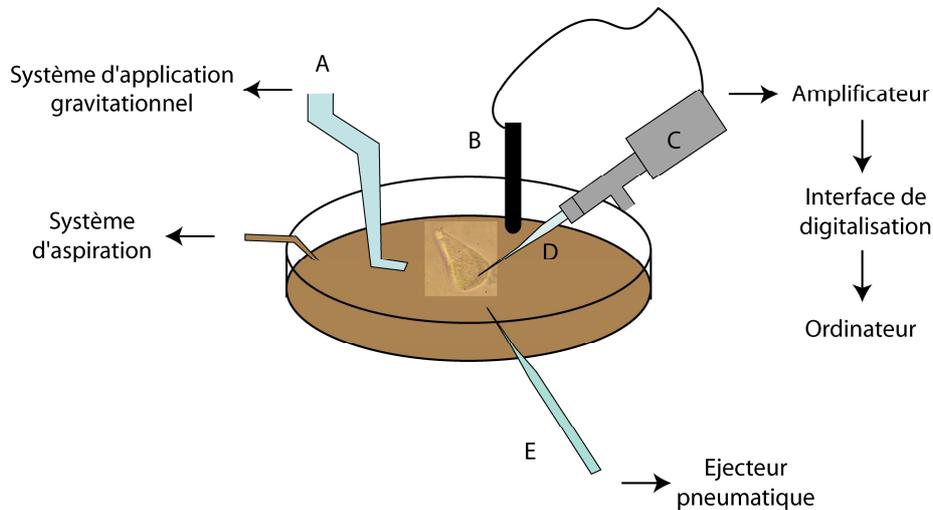


Figure 17 . Représentation schématique d'une boîte contenant un neurone DUM, et de la disposition du matériel. A : système de perfusion des solutions physiologiques extracellulaires et des produits pharmacologiques. B : électrode de référence. C : tête d'amplificateur. D : pipette de patch-clamp. E : pipette d'éjection du GABA.

Chaque pipette de patch-clamp est étirée à partir d'un capillaire en verre borosilicaté (GC 150T-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) à l'aide d'une étireuse P-97 (Sutter instrument, Novato, Etats-Unis) et fixée via un porte-électrode à la partie mobile de l'amplificateur opérationnel (tête d'amplificateur). Sa résistance est comprise entre 1 et 1,2 M Ω , une fois remplie avec du liquide intrapipette (cf. composition tableau 17, p.101). L'ensemble est porté par un micromanipulateur piézo-électrique (Burleigh TS-5000-150, Burleigh instruments, New-York, Etats-Unis), afin de permettre de très faibles déplacements de l'électrode de patch-clamp. Celle-ci est reliée à un amplificateur (Axopatch 200B, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis), lui-même relié à :

1) un oscilloscope (Nicolet 310, Nicolet instruments, Madison, Etats-Unis), qui permet de visualiser l'évolution du courant ou du potentiel,

2) un stimulateur (SMP-310, Biologic, Claix, France), à l'aide duquel des stimulations électriques sont appliquées à la préparation,

3) un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface (Digidata 1322 interface, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis).

Le principe de la technique de patch-clamp (figure 17) repose sur les propriétés d'un amplificateur opérationnel (AOP) fonctionnant en convertisseur courant-tension. Dans des conditions de potentiel imposé, le convertisseur, qui se trouve dans la tête d'amplificateur, force le potentiel de pipette (V_{pip}) à "suivre" le potentiel imposé par l'expérimentateur (V_{cmd}). Les potentiels V_{pip} et V_{cmd} sont constamment comparés par l'amplificateur différentiel (AD), selon la formule : $V_2 = V_{cmd} - V_1$. Dans le cas où les deux potentiels ne sont pas équivalents (c'est-à-dire si V_2 est différent de 0), l'amplificateur calcule le courant nécessaire afin de maintenir V_{cmd} , selon la loi d'Ohm ($V_2 = RCR \cdot i$). Les différences entre ces potentiels sont instantanément compensées par injection de courant (i) via la résistance de contre-réaction (RCR). Ce courant est proportionnel à la tension d'entrée.

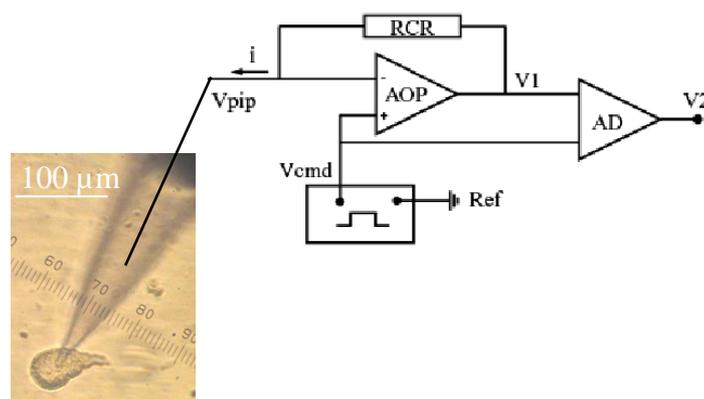


Figure 18 . Schéma du principe de la technique du patch-clamp, en conditions de potentiel imposé, appliquée aux neurones DUM. "AOP" = amplificateur opérationnel ; "AD" = amplificateur différentiel ; "RCR" = résistance de contre-réaction ; "Ref" = potentiel de référence ; "Vcmd" = potentiel de commande ; "Vpip" = potentiel de la pipette ; "V1" = potentiel de sortie de l'AOP ; "V2" = potentiel de sortie de l'AD ; "i" = courant.

Les signaux électrophysiologiques sont filtrés à 5 kHz par un filtre passe-bas, enregistrés à une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz, et mesurés à l'aide du logiciel pClamp8 (8.0.2., Axon Instruments, Foster City, Etats-Unis).

B.2.c Enregistrement des courants GABAergiques

Il a été fait mention de l'existence d'un cotransport potassium/chlorure dans les neurones DUM (Dubreil et coll., 1995). Afin d'inactiver ce système, les enregistrements se font dans des conditions de concentrations quasi-symétriques en chlorure ($[Cl^-]_{\text{extracellulaire}} = 188,1 \text{ mM}$; $[Cl^-]_{\text{intracellulaire}} = 173 \text{ mM}$). D'après l'équation de Nernst, le potentiel d'inversion des ions chlorure est alors de $-2,1 \text{ mV}$. Diverses compositions de solutions intrapipette ont été testées afin de pallier au phénomène de "run-down" signalé plus haut. Le protocole permettant de travailler sans réduction significative de IGABA implique l'utilisation de pyruvate de sodium dans la solution intrapipette (Ihara et coll., 2005). Les compositions des solutions intrapipette et extracellulaire sont présentées dans le tableau 17.

	Solution extracellulaire	Solution intrapipette
NaCl	167	-
gluconate de sodium	33	-
KCl	3,1	170
MgCl₂	4	1
CaCl₂	5	0,5
pyruvate de sodium	-	15
EGTA	-	10
phosphate de créatine	-	10
HEPES	10	20
pH (ajusté avec)	7,4 (NaOH 1M)	7,4 (KOH 1M)

Tableau 17 . Composition des solutions utilisées lors des expériences de patch-clamp. Les concentrations sont en mM.

Hormis pour la construction des courbes courant-potentiel, où le potentiel imposé est changé manuellement, le potentiel est imposé à -50 mV . Un système de perfusion gravimétrique multicanal permet d'irriguer les neurones de manière continue et à débit constant avec du liquide extracellulaire (cf. composition tableau 17), et d'appliquer certains

produits pharmacologiques (tableau 18). Le renouvellement de ce milieu est effectué par un système d'aspiration, qui permet aussi de maintenir un niveau de liquide constant dans la boîte de culture.

	Effet du produit pharmacologique	Application
fipronil	insecticide ciblant les GABARs	via la solution extracellulaire
PMA	phorbol esters, activateurs des PKCs classiques et nouvelles	
PDBu		
Gö6983	inhibiteurs de PKCs	
chélérythrine		
KN-62	inhibiteur de la CaMKII	via la solution intracellulaire

Tableau 18 . Outils pharmacologiques utilisés lors de l'étude des GABARs des neurones DUM de *P. americana*.

Le neurotransmetteur GABA (100 μ M) est appliqué grâce à une pipette d'éjection reliée à un système d'éjection pneumatique (Miniframe model PPS-2, Medical system, Greenvale, New-York, Etats-Unis), lui-même relié à une arrivée d'azote. Ce système présente l'avantage d'appliquer le GABA par pressions brèves, limitant ainsi la désensibilisation des récepteurs. Les pipettes d'éjection sont étirées à partir de capillaires en verre borosilicaté (GC 150T-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB), et leur résistance est approximativement de 2 M Ω . Le volume de solution de GABA appliqué est déterminé par réglage de la pression d'éjection (15 psig, ce qui équivaut à 1,05 kg.cm⁻²) et du temps d'éjection (100 ms).

Les constructions de courbes ainsi que les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, Etats-Unis).

C Sous-unité RDL de *Periplaneta americana* : identification et recherche de sites potentiels de phosphorylation

L'étude électrophysiologique des GABARs des neurones DUM de *P. americana* montre que leur fonctionnement est régulé par phosphorylation (Alix et coll., 2002). Il est possible que l'action des kinases s'exerce sur des protéines accessoires ayant pour fonction de réguler les récepteurs, mais une phosphorylation directe des sous-unités des récepteurs est également envisageable. En effet, les sous-unités RDL de différentes espèces d'insectes (*D. melanogaster*, *M. domestica*, *C. capitata*, *A. mellifera*, *B. germanica*) présentent des sites potentiels de phosphorylation, notamment dans la boucle intracellulaire M3-M4¹. La présence de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de *P. americana* a été recherchée, en vue de la détection de sites potentiels de phosphorylation.

La démarche expérimentale pour atteindre ces objectifs est la suivante :

- clonage de la sous-unité RDL à partir de chaînes nerveuses de *P. americana* (ganglions thoraciques et abdominaux), dans le but de concevoir des amorces spécifiques en vue de cibler la sous-unité RDL des neurones DUM de la blatte américaine,
- obtention des séquences spécifiques de l'ARNm de la sous-unité RDL d'une seule population cellulaire, les neurones DUM du dernier ganglion abdominal de *P. americana*,
- recherche de sites potentiels de phosphorylation dans ces séquences.

¹ <http://pred.ngri.re.kr/PredPhospho.htm>
<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/PPSP/>
<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>

C.1 Identification d'une séquence partielle du transcrit de la sous-unité RDL de *Periplaneta americana* à partir de chaînes nerveuses

Le premier objectif est d'amplifier la séquence du transcrit de la sous-unité RDL à l'aide d'amorces dégénérées, à partir d'ADNc issus d'ARN totaux de chaînes nerveuses de la blatte américaine.

C.1.a Extraction des ARN totaux et transcription inverse

1) Extraction des ARN totaux à partir de tissus nerveux de blatte

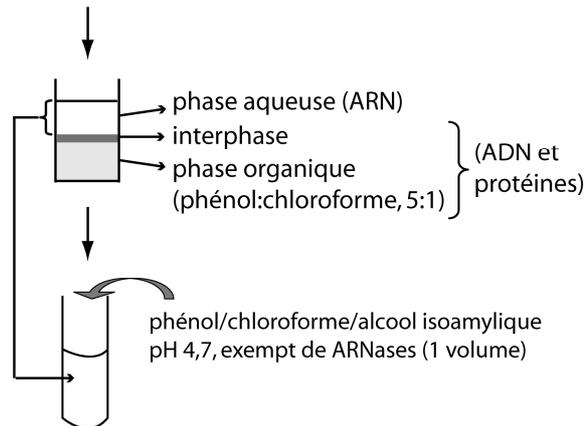
La tête, les pattes et les ailes ainsi que la cuticule dorsale, les viscères et les glandes génitales sont d'abord retirés. En présence de solution LPC1 (cf. composition tableau 16, p.95) pour humidifier la préparation, les chaînes nerveuses (c'est-à-dire les trois ganglions thoraciques ainsi que les six ganglions abdominaux) sont prélevés après section des connectifs et ramifications nerveuses, puis sont placés dans de l'azote liquide, en vue d'être broyées. Quatorze chaînes nerveuses, correspondant à 123 mg, sont ainsi conservées dans de l'azote liquide dans l'attente de l'extraction des ARN totaux. Cette étape, réalisée à l'aide de Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) (figure 19), a permis d'obtenir 2,75 µg d'ARN totaux, soit 22 ng/mg de chaîne nerveuse. La pureté de ces acides nucléiques est évaluée par spectrophotométrie UV (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) en faisant varier la longueur d'onde de 220 à 350 nm. Le rapport des densités optiques (DO) mesurées à 260 et 280 nm (1,88) indique une faible contamination protéique, tandis que le rapport DO_{260nm}/DO_{230nm} (proche de 2) reflète une faible contamination par des résidus organiques (phénol et autres composés aromatiques).

1 - **Homogénéisation des échantillons** dans du Trizol® (5ml/100mg de tissu)



2 - **Séparation des phases**

- incubation à 30°C, 5 min
(afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques)
- ajout de chloroforme (0,2ml/ml de Trizol® utilisé)
- incubation à 30°C, 2 min
puis centrifugation à 12000g (10000-11000rpm) à 4°C, 15 min



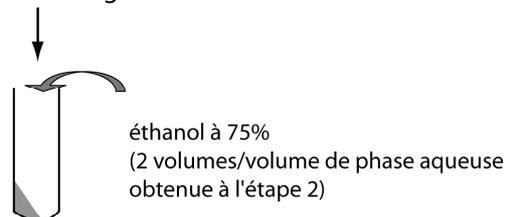
- centrifugation à 12000rpm 4°C, 5 min
et récupération de la phase aqueuse



3 - **Précipitation de l'ARN**



- incubation à 30°C, 10 min
puis centrifugation à 12000rpm à 4°C, 10 min
et élimination du surnageant



- centrifugation à 7500rpm à 4°C, 5 min
- ajout de 100µl d'eau exempte d'ARNases
et incubation à 55°C, 10 min

Figure 19 . Protocole d'extraction des ARN totaux à partir de chaînes nerveuses de *Periplaneta americana*, à l'aide du Trizol® .

2) *Transcription inverse*

Afin de ne cibler que les ARNm, les oligonucléotides utilisés au cours de la transcription inverse sont des oligo(dT)₂₀, qui s'hybrident spécifiquement à la queue poly-A, caractéristique des ARNm. La réaction se déroule pendant une heure à 50°C en présence d'une transcriptase inverse, la "Superscript™ III" (200 UI/μl) (Europrim, Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), du tampon de réaction "First-Strand" fourni avec l'enzyme, et comprenant du MgCl₂ (10 mM) et des dNTPs (4 mM), et d'un inhibiteur de RNases ("RNase Out®" (40 UI/μl) ; Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). La réaction est inactivée en portant la température à 85°C pendant 5 minutes et l'élimination des ARN appariés à l'ADNc est réalisée par la RNase H® (2 UI/μl) (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) pendant 20 minutes à 37°C. La pureté et la concentration des ADNc sont évaluées de la même manière qu'en C.1.a.1.

C.1.b PCR ("polymerase chain reaction")

Les ADNc obtenus sont soumis à deux PCR successives, impliquant des amorces dégénérées (tableau 19). Ces dernières sont conçues au niveau des zones les plus conservées parmi les séquences protéiques des transcrits de RDL de différentes espèces (*D. melanogaster* (n° accession NP523991), *H. virescens* (n° accession CAB41615), *A. mellifera* (n° accession XP001120292), *L. striatellus* (n° accession BAF31884), *P. xylostella* (n° accession ABN13426) et *B. germanica* (n° accession S76561)). Dans un premier temps, la zone conservée comprise entre les domaines N-terminal et transmembranaire 3 (fragment "A") a été ciblée, afin d'identifier la sous-unité RDL chez *P. americana*. Dans un second temps, la boucle transmembranaire M3-M4 (fragment "B"), peu conservée et où se situent les sites potentiels de phosphorylation, a été amplifiée (figure 20).

		Séquence (5'→3')	Acides aminés correspondants
RDL	AS1	GGNGAYGTNAAYATHTCNGC	GDVNISA
	AS2=BS1	GAGTAAGRCCNAAAYTAYGGWGG	RVRPNYGG
	AR1	GGCNAARMGRATHCARATG	MAKRIQM
	BS2	GGNGTNGARACNYTNWSNGT	GVETLSV
	BR1	CTVATGTACTGGATCATHTABCT	LMYWIIYL
	BR2	TACTCYCGYATCGTKTTYCC	YSRIVFP

Tableau 19 . Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc de RDL dans la chaîne nerveuse de *P. americana*. Pour les séquences des amorces dégénérées, "R" = G ou A, "K" = G ou T, "S" = G ou C, "W" = A ou T, "M" = A ou C, "Y" = T ou C, "H" = A ou T ou C, "B" = G ou T ou C, "V" = G ou A ou C et "N" = G ou A ou T ou C.

Les zones d'intérêt sont amplifiées par deux PCR successives. Le principe consiste en la réalisation d'une première PCR (PCR1), dont le produit est utilisé comme matrice pour une seconde PCR (PCR2), appelée PCR nichée ou emboîtée. Les amorces utilisées pour la PCR2 sont internes à celles utilisées lors de la PCR1, afin d'accroître la spécificité de la réaction (figure 20). Les compositions des milieux réactionnels des PCR sont présentées dans le tableau 20.

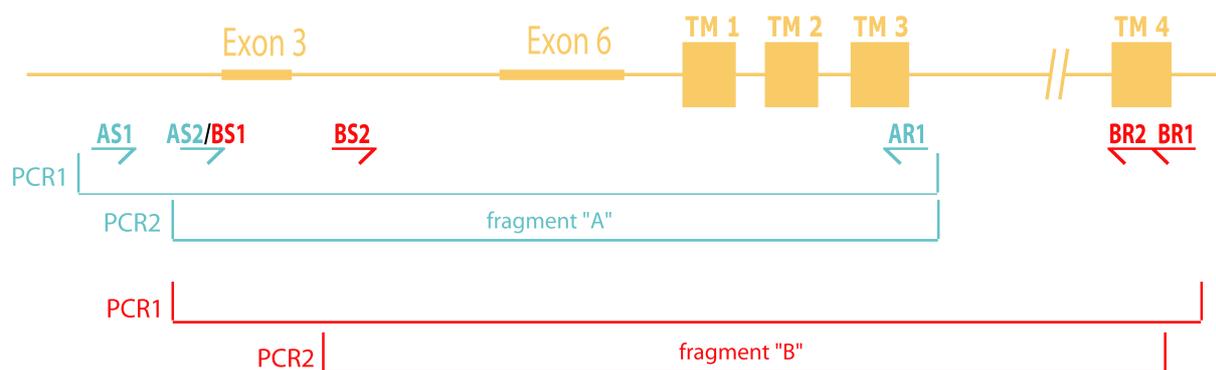


Figure 20 . Emplacements relatifs des amorces utilisées pour l'amplification des zones plus conservées (fragment "A") et moins conservées (fragment "B") de l'ADNc de la sous-unité RDL dans la chaîne nerveuse.

		Concentration finale	Volume (µl)
Amplification de la zone conservée (partie N-terminale à domaine M3) (fragment "A")			
Matrice	PCR1 (ADNc)	-	2
	PCR2 (produit de la PCR1, dilué au 1/10 ^e)	-	2
Amorces	PCR1 (AS1/AR1)	5 µM / amorce	1 / couple d'amorces
	PCR2 (AS2/AR1)		
Tampon de l'enzyme EuroTaq [®] [(NH ₄) ₂ SO ₄ (160 mM), Tris/HCl (670 mM) pH 8,8, 0,1% Tween-20]		-	2
MgCl ₂ (37,5 mM)		1,5 mM	0,8
dNTPs (10 mM)		0,2 mM	0,4
EuroTaq [®] (5 UI/µl)		0,075 UI/µl	0,3
H ₂ O qsp 20 µl		-	12,5
Amplification de la zone comprenant la boucle M3-M4 (fragment "B")			
Matrice	PCR1 (ADNc)	-	1
	PCR2 (produit de la PCR1, dilué au 1/10 ^e)	-	1
Amorces	PCR1 (BS1/BR1)	5 µM / amorce	1 / couple d'amorces
	PCR2 (BS2/BR2)		
Tampon de l'enzyme Platinum [®] KCl [(500 mM), Tris/HCl (200 mM) pH 8,4]		-	2
MgCl ₂ (50 mM)		1,5 mM	0,6
dNTPs (10 mM)		0,2 mM	0,4
Platinum [®] (5 UI/µl)		0,075 UI/µl	0,3
H ₂ O qsp 20 µl		-	12,5

Tableau 20 . Constitution des milieux réactionnels des PCR pour l'amplification de l'ADNc de la sous-unité RDL de la chaîne nerveuse de *P. americana*.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur Flexigene (Techne, Cambridge, UK). L'enzyme utilisée pour la polymérisation est soit l'EuroTaq[®] (5 U/µl) (ATGC, Marne-La-Vallée, France), dont le tampon de réaction est constitué des éléments suivants : (NH₄)₂SO₄ (160 mM), Tris/HCl (670 mM) pH 8,8 et 0,1% Tween-20, soit la Taq

Platinum[®] (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), dont la composition du tampon de réaction est : KCl (500 mM), Tris/HCl (200 mM) pH 8,4.

Les programmes de PCR utilisés sont les suivants :

1 – Amplification de la zone comprise entre le domaine N-terminal et le domaine transmembranaire M3 (fragment "A"), à l'aide de l'enzyme EuroTaq[®] :

PCR1 : 94°C, 2min ; 40 cycles (94°C, 30sec ; 50°C, 30sec ; 72°C, 30sec) ; 72°C, 5min.

PCR2 : 94°C, 2min ; 40 cycles (94°C, 30sec ; 55°C, 30sec ; 72°C, 30sec) ; 72°C, 5min.

2 – Amplification de la zone comprise entre les domaines transmembranaires M3 et M4 (fragment "B"), à l'aide de l'enzyme Platinum[®] :

PCR1 et *PCR2* : 94°C, 2min ; 35 cycles (94°C, 30sec ; 50°C, 30sec ; 72°C, 1min et 30sec) ; 72°C, 5min.

Une électrophorèse sur gel d'agarose (1 à 1,5%) permet de déterminer les amplicons de bonne taille. Les produits de PCR corrects sont ensuite purifiés à l'aide du kit "NucleoSpin[®] Extract II" (Macherey-Nagel Düren, Allemagne), selon les instructions du fournisseur. Les rendements obtenus suite à cette purification sont de 25 ng/μl pour l'amplification du fragment "A" et de 115 ng/μl pour l'amplification du fragment "B".

C.1.c Clonage

Les produits de PCR purifiés sont sous-clonés dans les vecteur pCR4-TOPO[®] et PCR2.1-TOPO[®], respectivement, selon les instructions fournies dans le kit "TOPO TA Cloning kit for Sequencing[®]" (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). Le principe est basé sur une topoisomérase, fixée de façon covalente au vecteur, qui permet la ligation du produit purifié et du plasmide.

Suite à la topoisomérisation, les plasmides recombinés sont amplifiés par transformation de bactéries chimiocompétentes de type DH5α (*Escherichia coli* ; Invitrogen,

Carlsbad, Etats-Unis). Ces dernières sont étalées dans des boîtes de Petri contenant du milieu gélosé [agar 15 g/l, LB (Luria Broth (20 g/L), extraits de levure (10 g/l) et ampicilline (0,1 mg/ml)], auquel sont ajoutés du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside, 20 mg/ml), un substrat de la β -galactosidase et de l'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, 100 mM), un analogue du lactose, qui permet la transcription du gène codant pour la β -galactosidase. La présence des inserts dans les vecteurs est vérifiée de deux manières.

1) Coloration translucide due à l'absence d'expression de la β -galactosidase :

Le site d'insertion du produit de PCR dans le vecteur se situe au milieu du gène codant pour la β -galactosidase, ce qui empêche son expression et donc la dégradation du produit X-gal en un produit bleu. Après incubation une nuit à 37°C, seules les colonies translucides (c'est-à-dire celles n'ayant pas dégradé le X-gal, et contenant donc très probablement l'insert) sont remises en culture, à 37°C pendant trois heures.

2) Taille du produit de PCR après amplification à l'aide d'amorces universelles situées sur le vecteur :

Les amorces universelles M13F et M13R, situées de part et d'autre du site d'insertion du fragment à cloner, sont utilisées au cours d'une PCR de criblage des colonies translucides (94°C, 2min ; 25 cycles (94°C, 30sec ; 55°C, 30sec ; 72°C, 1min) ; 72°C, 5min). Seules les colonies possédant un insert de taille attendue, soit la taille du produit de PCR à laquelle s'ajoutent 190 pb provenant de la séquence du vecteur, sont remises en culture à 37°C, sous agitation (200rpm), en vue d'une extraction plasmidique.

Après amplification des bactéries possédant l'insert, une minipréparation est réalisée à l'aide du kit "NucleoSpin[®] Plasmid" (Macherey-Nagel Düren, Allemagne), en suivant les consignes du fabricant. Les échantillons obtenus sont séquencés par la société Millegen (Lille, France), après ultime vérification de la présence de l'insert par digestion par l'enzyme de restriction EcoRI.

C.1.d Analyse des séquences

Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel BioEdit® (Hall, 1999). La séquence de l'insert est "isolée" de celle du vecteur, et les séquences des différents clones sont alignées par la méthode "ClustalW" (Thompson, J. D. et coll., 1994). Cette étape permet d'une part de mettre en évidence les variations de séquences entre les différents clones et d'autre part de déterminer une séquence consensus. Celle-ci est ensuite comparée avec celle des banques de données à l'aide du programme BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool")¹, afin de déterminer le type de protéine codée par la séquence, et de construire un arbre phylogénétique, en appliquant le principe de parcimonie maximale (logiciel Phylip version 3.66 (Felsenstein, 2001)). Les zones conservées des séquences consensus obtenues permettent de concevoir des amorces spécifiques, qui seront utilisées pour l'amplification de la sous-unité RDL à l'échelle de la cellule, dans les neurones DUM de la blatte américaine. De plus, des sites potentiels de phosphorylation sont recherchés dans les fragments de séquences codant pour la boucle M3-M4, à l'aide du programme PPSP ("Prediction of PK-Specific Phosphorylation Site") (Xue et coll., 2006).

C.2 Identification d'une séquence partielle du transcrit de la sous-unité RDL de *P. americana* à partir de neurones DUM

La technique d'amplification de l'ARN d'une protéine d'une cellule unique est utilisée chez l'insecte depuis 1995 (O'Dowd et coll., 1995) et son utilisation chez *P. americana* est récente (Wicher et coll., 2006). Cette technique a permis, dans le cas de cette thèse, de confirmer la présence de la sous-unité RDL dans les neurones DUM, en ciblant la zone conservée en amont de la boucle M3-M4.

¹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

C.2.a Prélèvement du cytoplasme

Le prélèvement du cytoplasme s'effectue à partir de neurones DUM isolés et mis en culture comme décrit précédemment (B.1 p.93). Après incubation, les cellules sont étudiées par patch-clamp, dans le but de vérifier l'activité spontanée caractéristique de ces cellules, et de confirmer la présence de GABARs par applications de GABA et obtention de courants. Le microscope et le plan de travail sont stérilisés à l'aide d'alcool à 70° et de NaOH (0,1M), la manipulation étant réalisée avec des gants stériles afin d'éviter toute contamination par les RNases. La solution intrapipette, préparée dans des conditions RNase-free (c'est-à-dire en l'absence de RNases), présente la composition suivante (en mM) : Kaspertate (160), Kfluoride (10), NaCl (10), MgCl₂ (1), CaCl₂ (0,5), HEPES (10), EGTA (10) et ATP-Mg (1). Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH (1M). Suite à l'enregistrement des courants GABAergiques, une forte pression négative est appliquée, afin que le cytoplasme soit aspiré dans la pipette. Le contenu est alors immédiatement placé dans un tube BioPur[®], exempt de RNases (Eppendorf France, Le Pecq), contenant 1 µl de tampon Tris 200 mM (pH 8,5) (figure 21), puis est soumis, soit directement, soit après congélation à -80°C, à une transcription inverse.

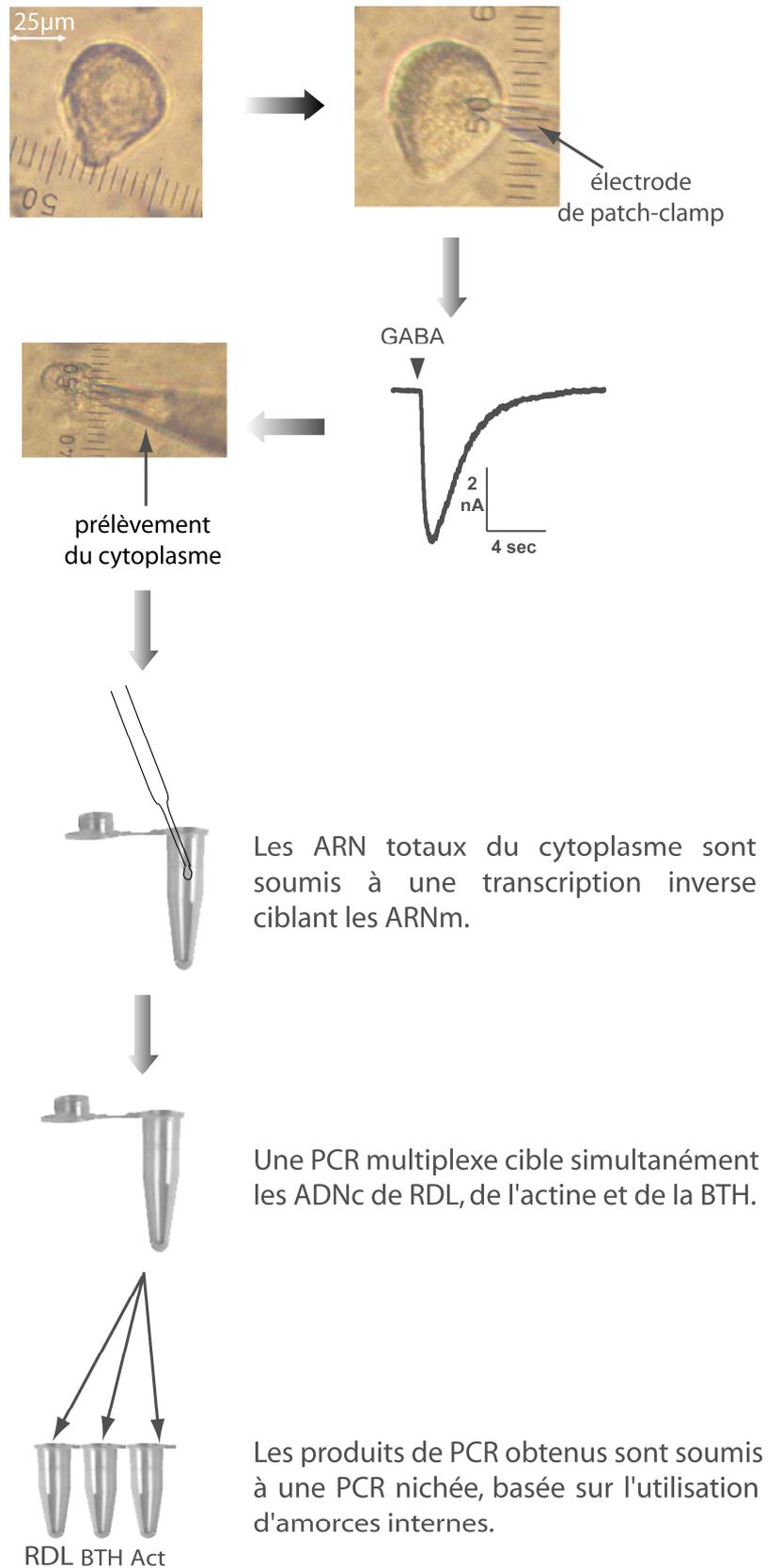


Figure 21 . Protocole d'identification de la sous-unité RDL dans un neurone DUM : technique de PCR sur cellule isolée.

C.2.b Transcription inverse

La solution contenant le cytoplasme est soumise à un traitement à la DNase I à 37°C pendant 15 minutes, puis à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer l'enzyme. S'ensuit une transcription inverse, dont le protocole est sensiblement identique à celui décrit en C.1.a.2 (p.106), excepté pour le tampon de réaction de la transcriptase inverse. Ainsi, la réaction a lieu à 50°C pendant 50 minutes en présence de "Superscript™ III" (200 UI/μl) (Europrim, Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), d'un tampon de réaction comprenant du MgCl₂ (10 mM) et des dNTPs (4 mM), et d'un inhibiteur de RNases ("RNase Out®" (40 UI/μl) ; Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis).

C.2.c PCR multiplexe et PCR emboîtée

Les ADNc sont soumis à une PCR multiplexe suivie d'une PCR emboîtée. La PCR multiplexe a pour principe l'utilisation de plusieurs couples d'amorces au cours d'une même réaction. Dans le cas présent, les amorces spécifiques conçues à l'aide des séquences de l'ADNc de RDL des chaînes nerveuses sont utilisées (figure 22 et tableau 21). Elles ciblent les ADNc : 1) de la sous-unité RDL, 2) d'un gène ubiquitaire, l'actine, qui permet entre autres de confirmer l'absence de contamination par de l'ADN génomique, et 3) de la BTH (β-tyramine hydroxylase), qui est spécifique des cellules octopaminergiques, et qui a été clonée au laboratoire par Q. Coquerel (master M1 2005-2006). Les produits de la PCR multiplexe sont utilisés comme matrice pour les PCR emboîtées (ou nichées), dont les amorces ne ciblent qu'un type d'ADNc.

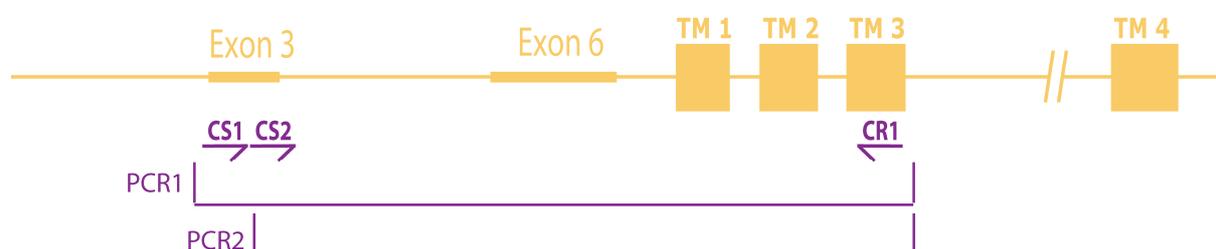


Figure 22 . Emplacements relatifs des amorces utilisées pour l'amplification de la zone conservée comprise entre le domaine N-terminal et le segment transmembranaire M3 de l'ADNc de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de la blatte américaine.

			Séquence (5'→3')
RDL	CS1		GGTGCCGGACACGTTCTTCG
	CS2		GAGCATAACGGTTGACTATTACC
	CR1		GGTCTTCGCTTCTCTGCTCG
Actine	PCR1	Act S1	CTGACCCTTAAATACCCCATTTG
		Act R1	CACAATTTCTCGTTCGGCGTG
	PCR2	Act S2	CACGGTATCGTGACCAACTG
		Act R1	GTAAAGCTGTAACCACGCTCAG
BTH	PCR1	BTH S1	CAAGCATCACGTGGTGCAATAC
		BTH R1	CATCTCTGATGTGTCGTGTGAAC
	PCR2	BTH S1	CAAGCATCACGTGGTGCAATAC
		BTH R2	TGAGTATGCCTTCCGTTGGC

Tableau 21 . Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des ADNc de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de *P. americana*. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc de RDL sont CS1/CR1 pour la PCR multiplexe et CS2/CR1 pour la PCR emboîtée. "S" = sens et "R" = anti-sens.

Les compositions des milieux réactionnels des PCR sont présentées dans le tableau 22.

	Concentration finale	Volume (μ l)
PCR multiplexe		
Matrice	-	9,46 à 11 (selon la cellule)
Amorces RDL (CS1/CR1), actine (S1/R1) et BTH (S1/R1)	5 μ M / amorce	3 / couple d'amorces
Tampon de l'enzyme KOD HiFi [®] [Tris-HCl (1.2M), KCl (100 mM), (NH ₄) ₂ SO ₄ (60 mM), 1% Triton X-100, 0.01% BSA, pH 8.0]	-	10
MgSO ₄ (25 mM)	0,8 mM	3,2
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	2
KOD HiFi [®] (1 UI/ μ l)	0,02 UI/ μ l	2
H ₂ O qsp 100 μ l	-	44,8
PCR emboîtée		
Matrice = produit de la PCR multiplexe dilué au 1/10 ^e	-	3
Amorces RDL (CS2/CR1) ou actine (S2/R2) ou BTH (S1/R2)	5 μ M / amorce	1 / amorce
Tampon de l'enzyme EuroTaq [®] [(NH ₄) ₂ SO ₄ (160 mM), Tris/HCl (670 mM) pH 8,8, 0,1% Tween-20]	-	2
MgCl ₂ (37,5 mM)	1,5 mM	0,8
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,4
EuroTaq [®] (5 UI/ μ l)	1,5 UI/ μ l	0,3
H ₂ O qsp 20 μ l	-	12,5

Tableau 22 . Constitution des milieux réactionnels des PCR pour l'amplification de l'ADNc de la sous-unité RDL des neurones DUM.

La PCR multiplexe est réalisée à l'aide de l'ADN polymérase de haute fidélité KOD HiFi[®] (1 U/ μ l) (Novagen, EMD Biosciences, Darmstadt, Allemagne). Le programme de PCR est comme suit :

PCR multiplexe : 94°C, 2 minutes ; 40 cycles (94°C, 30 secondes ; 60°C, 30 secondes ; 72°C, 30 secondes) ; 72°C, 5 minutes.

Le programme pour la PCR emboîtée, réalisée à l'aide de l'enzyme EuroTaq® (ATGC, Marne-La-Vallée, France), est le suivant :

PCR emboîtée : 94°C, 2 minutes ; 40 cycles (94°C, 30 secondes ; 60°C (actine ou BTH) ou 64°C (RDL), 30 secondes ; 72°C, 30 secondes) ; 72°C, 5 minutes.

Les amplicons de taille attendue, déterminés par électrophorèse sur gel d'agarose, sont découpés et purifiés à l'aide du kit "NucleoSpin® Extract II" (Macherey-Nagel Düren, Allemagne). Les rendements obtenus après purification sont de l'ordre de 30 ng/µl (selon la cellule).

C.2.d Clonage et analyse des séquences

Les inserts obtenus sont ensuite ligués au vecteur pCR2.1-TOPO®, inclus dans le kit "TOPO TA Cloning®" (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), en suivant les consignes du fabricant. Les plasmides sont soumis à une amplification bactérienne (cellules chimiocompétentes DH5α), et sont extraits suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans le paragraphe C.1.c (p.109). Après séquençage par la société Millegen (Lille, France), les séquences obtenues sont analysées suivant la démarche indiquée dans le paragraphe C.1.d (p.111).



RESULTATS

Chapitre I. Rôle de l'édition de l'ARNm dans la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil

A Présentation

Quatre acides aminés de la sous-unité RDL peuvent être édités, conduisant aux substitutions suivantes : R122>G, I283>V, N294>D et M360>V (Hoopengardner et coll., 2003). La substitution R122>G se trouve dans la partie N-terminale, au niveau de l'exon 4. Du fait de sa localisation entre deux boucles (D et A) potentiellement impliquées dans la liaison du GABA, il est possible que cette édition puisse avoir un impact sur la sensibilité des récepteurs RDL aux agonistes. En effet, l'arginine est un acide aminé de taille importante (174,2 g/mol), et est le résidu le plus basique, de par son groupement guanidium. La glycine, résidu neutre, est à l'inverse l'acide aminé le plus petit (75,07 g/mol) et le plus simple. L'hypothèse d'une modification de la liaison du GABA semble donc envisageable.

En outre, dans une lignée de *Drosophila simulans* sélectionnée par du fipronil pendant 42 générations (Eyguières 42), la sous-unité RDL montre trois changements par rapport à la sous-unité de type sauvage : une double-mutation A301>G/T350>M (toujours observée) et l'édition R122>G (retrouvée chez la plupart des clones séquencés) (Le Goff, 2001). Cependant cette édition a aussi été détectée dans une lignée de *Drosophila simulans* (Gotheron) sensible au fipronil, ce qui semble indiquer qu'elle ne joue pas de rôle dans la résistance à cet insecticide, du moins lorsqu'elle apparaît de façon isolée. Par contre, il n'est pas à exclure que son association avec la double mutation A301>G/T350>M puisse renforcer la résistance au fipronil. C'est pourquoi l'étude des effets de cette association a été entreprise.

B Résultats obtenus

Les résultats ont été présentés sous forme de poster lors d'un colloque (résumé 1, cf. Annexe), et ont été publiés (publication 1).

Publication 1

RNA editing regulates insect GABA receptor function and insecticide sensitivity

Zeineb Es-Salah, Bruno Lapied, Gaëlle Le Goff, Alain Hamon

Neuroreport **19**(9): 939-43.



(SOS) of the following composition: in mM, 100 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ and 5 HEPES, pH 7.5. Stages V and VI oocytes were defolliculated manually using fine forceps, after treatment with 2 mg/ml collagenase IA (Sigma, France) in Ca²⁺-free SOS solution.

Defolliculated oocytes were injected with approximately 20 nl of 20 ng/μl capped RNA and maintained at 18–20°C in sterile SOS solution supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml), gentamycin (50 μg/ml) and sodium pyruvate (2.5 mM). This medium was replaced at 48-h intervals.

One to 5 days after injection, oocytes were placed in a 100-μl Plexiglas recording chamber continuously superfused with SOS and tested for RDL receptor expression using 3 M KCl-filled borosilicate electrodes and a two-electrode voltage-clamp amplifier (GeneClamp 500; Axon Instruments, Foster City, California, USA). Current signals were recorded at a holding potential of –60 mV and displayed on a Gould BS-272 chart recorder (RIL instruments, Aldershot, UK).

GABA (Sigma, France) was bath-applied at a flow rate close to 4 ml/min. Applications were separated by a 10–15-min interval to ensure complete recovery from desensitization. Fipronil (CIL Cluzeau, France) was first dissolved in dimethylsulphoxide then diluted in SOS to the final required concentrations.

Data are presented as mean ± SEM of three to eight independent experiments. Dose–response curves were fitted with a four-parameter logistic equation and inhibition curves were fitted using a sigmoidal dose–response equation (Prism 2.0; GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was performed using unpaired *t*-tests.

Results

Sensitivity of wild-type and A301G/T350M RDL receptors to GABA is decreased by R122G editing

Studies were performed on four RDL_{bd} variants: WT, R122G, A301G/T350M (a double-mutated variant found in *D. simulans* flies highly resistant to fipronil) and A301G/T350M/R122G (Fig. 1). Injection of each mRNA variant in oocytes led to functional homomeric receptors. The effect of

the R122G replacement on GABA sensitivity was assessed by measuring the dose dependence of GABA-induced chloride currents for each receptor variant. Two–two comparisons (WT vs. R122G and A301G/T350M vs. A301G/T350M/R122G) show that the R122G replacement induced a significant shift of the curve to the right in a parallel manner (Fig. 2). The EC₅₀ values calculated for the nonedited and edited forms of the WT RDL receptor were, respectively, 56.9 and 83.3 nM. Similarly, the EC₅₀ values for the A301G/T350M receptor isoform was shifted from 53.5 to 70.7 nM when R122 was changed to glycine. Hill coefficients, ranging from 1.63 to 2.03, did not differ significantly between edited and non-edited receptor variants (Table 1).

Sensitivity of wild-type and A301G/T350M RDL receptors to fipronil is decreased by R122G editing

To compare the sensitivity of the four RDL isoforms to fipronil, the insecticide was added to the superfusing SOS after a control application of GABA (*t*=0) and continuously applied afterwards. At 15 and 30 min, an EC₃₀ concentration of GABA was co-applied with fipronil for 4 min. Chloride GABA-induced currents were measured at their maximum amplitude and at the end of neurotransmitter applications. This allowed us to study three phases of the current (i.e. peak current, desensitization and late current). In the presence of fipronil, repeated applications of GABA produced a gradual depression of both peak and late components of the currents, as reported previously [7]. No significant effect of the R122G change on desensitization could be observed in either WT or A301G/T350M RDL isoforms (data not shown). In contrast, both peak and late components of the current were less reduced by fipronil after R122G modification (Fig. 3a and c). Quantitative data analysis (Fig. 3b, d and Table 2) confirmed that the R122G change induced a significant shift to the right in fipronil potency for both WT and A301G/T350M receptor isoforms (except at *t*=15 min for peak current). At 30 min for instance, the IC₅₀ calculated for WT-peak and A301G/T350M-peak currents was increased by about 4.5-fold and 2-fold, respectively. Whatever the measured parameter (peak or late current), the R122G-induced shift was significantly more important for the WT receptor than for the A301G/

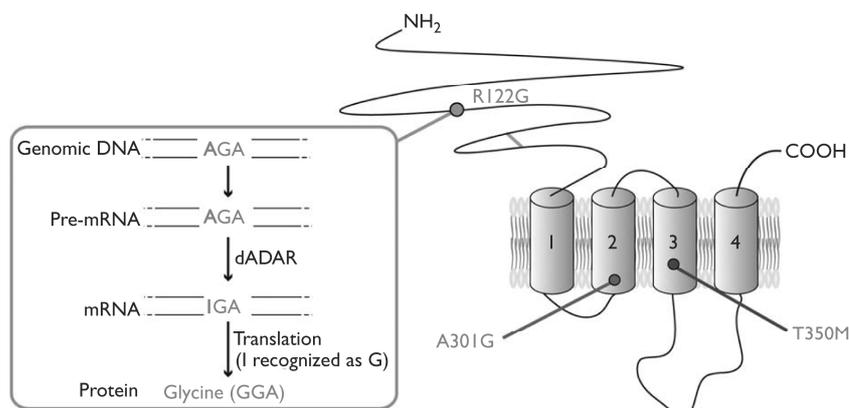


Fig. 1 Membrane topology of the resistance to dieldrin (RDL) subunit, with position of the R122 edited site and the two residues (A301 and T350) that have been found to be altered in resistant *Drosophila* flies. The box represents the mechanism by that A-to-I editing occurs: the editing enzyme adenosine deaminase converts adenosine to inosine by hydrolytic deamination and inosine is read as guanosine by the translation machinery. The R122 site represents one of the four editing sites that exist in the RDL subunit.

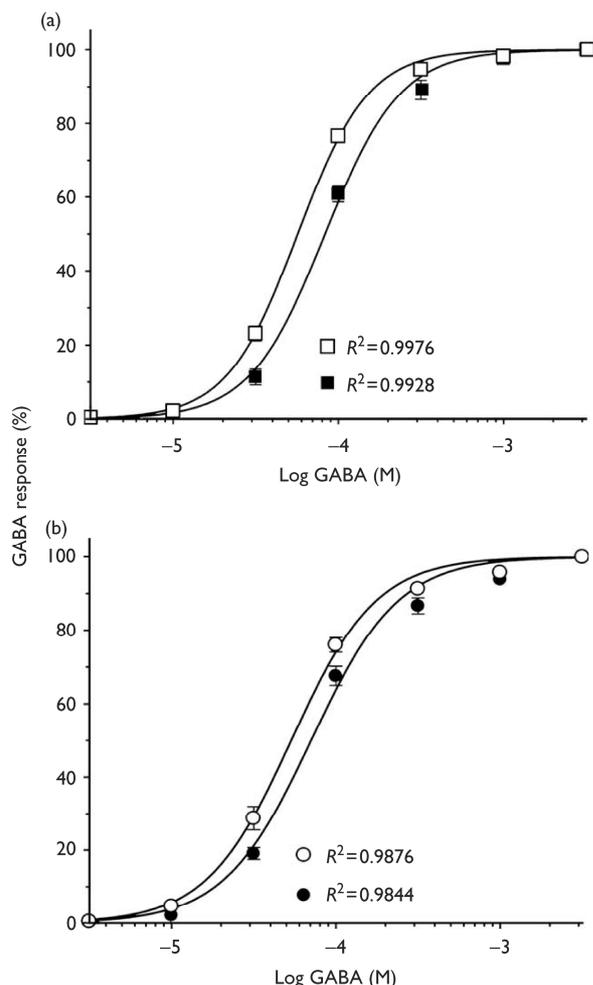


Fig. 2 Gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration–response curves obtained with oocytes expressing wild-type (a) or A301G/T350M (b) RDL receptors, without (open symbol) and with the R-to-G change at the I22 residue (closed symbol). Note the shift to the right correlated with this modification. Data were normalized to the response to 3 mM GABA for each oocyte and presented as mean \pm SEM ($n=4-8$ independent experiments). Curves were fitted as described in Methods.

Table I GABA EC₅₀s and Hill coefficients for wild-type and mutant RDL receptors expressed in *Xenopus* oocytes

	EC ₅₀ (μM)	Hill coefficient
WT	56.90 \pm 1.31 (4)	2.03 \pm 0.07
R122G	83.30 \pm 2.88 (5)***	1.91 \pm 0.11
A301G/T350M	53.50 \pm 1.72 (8)	1.68 \pm 0.08
A301G/T350M/R122G	70.69 \pm 3.49 (8)***	1.63 \pm 0.11

Effects of the R122G replacement on the sensitivity of RDL_{bd} isoforms to GABA. EC₅₀ values and Hill coefficients are presented as mean \pm SEM for (n) experiments.

GABA, γ -aminobutyric acid; RDL, resistance to dieldrin.

***Significantly different from receptors without the R122G change ($P < 0.005$).

T350M variant. This confirmed that the A301G and T350M mutations did not enhance the resistance to fipronil caused by R122 editing.

Discussion

The genome of *D. melanogaster* is composed of 13 600 genes but diversity of the proteome can be considerably expanded by several mechanisms, including alternative splicing and pre-mRNA editing. An RNA-specific adenosine deaminase has been cloned in this organism [18] and over 500 mRNAs have been identified as potential targets for this enzyme [19]. In *Drosophila*, like in other organisms, A-to-I editing occurs mainly in gene transcripts encoding voltage-gated ion channels and neurotransmitter receptors, which suggests a role for this process in nervous system function [15]. Despite the report of RNA editing among Cys-loop receptors, the functional consequences of this mechanism have never been investigated for GABA receptors. The present study allows us to demonstrate, for the first time, that A-to-I editing of the R122 site of the *Drosophila* RDL subunit, expressed in *Xenopus* oocytes, decreases the sensitivity to both GABA and fipronil. The alteration of GABA potency might be related to the position of R122 near the putative agonist-binding site. Alignment of RDL sequence with that of the human $\alpha 1$ GABAR subunit shows that residue 122 is located between two loops (D and E), known to be essential for the binding of agonist in vertebrate GABA_A receptors [20]. Serine 83, a residue that lies within the same region of the rat $\alpha 6$ GABAR subunit, also influences response to agonists [21]. As suggested for serine 83, modification of residue 122 in the RDL subunit might alter sensitivity to GABA by modifying the positioning of loops D and E or their movement during signal transduction.

The second effect of the R122G replacement (i.e. alteration in fipronil sensitivity) seems to be linked to the decrease in agonist potency. Earlier findings have established that fipronil acts preferentially on agonist-bound receptors [22,23]. As the R122G replacement reduces agonist potency, it is likely that it decreases the proportion of agonist-bound receptors at a given concentration of GABA, which, as a result, affects fipronil binding. Moreover, in *Drosophila* S2 cells expressing stably the WT RDL subunit, it has been shown that, under normal conditions, two exponentials are required to describe the channel open time distribution, which is consistent with two kinds of openings, long-time and short-time openings [24]. It was also demonstrated that fipronil lowers channel activity by shortening the longer open time constant. On the basis of these results, it is tempting to suggest that the R122G replacement shortens GABAR channel opening, which thereby modifies fipronil effect.

Finally, as illustrated in Fig. 3, the R122G change slightly increased the resistance factor associated with A301G/T350M combined point mutations. However, no synergistic effect could be observed, suggesting that the edited and mutated sites have independent effects on fipronil resistance.

Conclusion

Our study provides evidence that RNA editing has important functional consequences on GABA receptors. We also show that insecticide resistance of GABA receptors can be enhanced by posttranscriptional modifications, which has never been reported previously for these important targets of neurotoxic insecticides.

Acknowledgements

The authors thank R.H. ffrench-Constant for the kind gift of pNB40/RDL_{bd} plasmid. Z. Es-Salah was supported by a doctoral fellowship of the Région Pays de la Loire.

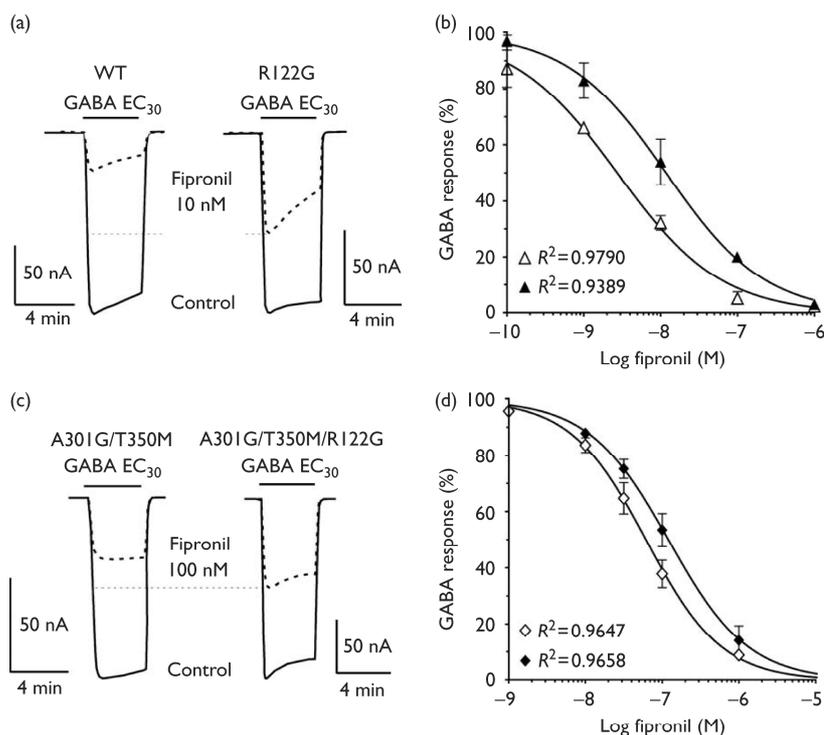


Fig. 3 Effect of the RI22G replacement on γ -aminobutyric acid receptor (GABA) sensitivity to fipronil. (a) and (c) Current traces showing the effect of EC₃₀ concentrations of GABA in control (solid lines) and after a 30-min fipronil application (10 nM in (a) and 100 nM in (c), dashed lines). (b) and (d) Dose-response inhibition curves for the effects of a 30-min fipronil application on GABA-induced peak current, in oocytes expressing RDL receptors without (open symbol) and with R-to-G change at the I22 residue (closed symbol). Data are presented as mean \pm SEM ($n=3-6$ for each point). Curves were fitted as described in Methods.

Table 2 Blocking action of fipronil on GABA-induced responses for wild-type and mutant RDL receptors expressed in *Xenopus* oocytes

IC ₅₀ (nM)	15 min	30 min
Peak current		
WT	73.38 \pm 13.05 (2)	2.8 \pm 0.25 (5)
RI22G	125.91 \pm 32.22 (5)	12.18 \pm 1.03 (4)***
A301G/T350M	316.97 \pm 39.35 (5)	60.10 \pm 2.44 (4)
A301G/T350M/RI22G	405.74 \pm 20.16 (3)	117.25 \pm 1.85 (3)***
Late current		
WT	3.97 \pm 0.51 (6)	0.8 \pm 0.03 (6)
RI22G	16.07 \pm 2.07 (3)***	4.66 \pm 0.85 (4)***
A301G/T350M	75.11 \pm 4.81 (5)	61.43 \pm 5.31 (5)
A301G/T350M/RI22G	155.96 \pm 39.86 (3)*	111.24 \pm 25.81 (3)*

Effects of the RI22G replacement on fipronil potency (IC₅₀, nM) for peak and late GABA-induced currents, after bath-application of the insecticide for 15 or 30 min. Values are presented as mean \pm SEM for (n) experiments.

*Significantly different from receptors without the RI22G change ($P < 0.05$).

***Significantly different from receptors without the RI22G change ($P < 0.005$).

GABA, γ -aminobutyric acid; WT, wild type.

References

- french-Constant RH, Mortlock DP, Shaffer CD, MacIntyre RJ, Roush RT. Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:7209-7213.
- Harvey RJ, Schmitt B, Hermans-Borgmeyer I, Gundelfinger ED, Betz H, Darlison MG. Sequence of a *Drosophila* ligand-gated ion-channel

- polypeptide with an unusual amino-terminal extracellular domain. *J Neurochem* 1994; **62**:2480-2483.
- Henderson JE, Soderlund DM, Knipple DC. Characterization of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor beta subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193**:474-482.
- french-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 1993; **363**:449-451.
- Zhang HG, french-Constant RH, Jackson MB. A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *J Physiol* 1994; **479**:65-75.
- Hosie AM, Baylis HA, Buckingham SD, Sattelle DB. Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and -resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* 1995; **115**:909-912.
- Le Goff G, Hamon A, Bergé JB, Amichot M. Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J Neurochem* 2005; **92**:1295-1305.
- french-Constant RH, Rocheleau TA. *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem* 1993; **60**:2323-2326.
- Amin J, Weiss DS. GABA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 1993; **366**:565-569.
- Westh-Hansen SE, Rasmussen PB, Hastrup S, Nabekura J, Noguchi K, Akaike N, et al. Decreased agonist sensitivity of human GABA(A) receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the alpha1 subunit. *Eur J Pharmacol* 1997; **329**:253-257.
- Hosie AM, Sattelle DB. Agonist pharmacology of two *Drosophila* GABA receptor splice variants. *Br J Pharmacol* 1996; **119**:1577-1585.
- Hosie AM, Buckingham SD, Presnail JK, Sattelle DB. Alternative splicing of a *Drosophila* GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neuroscience* 2001; **102**:709-714.

13. Jin Y, Tian N, Cao J, Liang J, Yang Z, Lv J. RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evol Biol* 2007; **7**:98.
14. Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 2007; **7**:17–30.
15. Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R. Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* 2003; **301**:832–836.
16. Buckingham SD, Biggin PC, Sattelle BM, Brown LA, Sattelle DB. Insect GABA receptors: splicing, editing and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol* 2005; **68**:942–951.
17. Brown NH, Kafatos FC. Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol* 1988; **203**:425–437.
18. Palladino MJ, Keegan LP, O'Connell MA, Reenan RA. dADAR, a *Drosophila* double-stranded RNA-specific adenosine deaminase is highly developmentally regulated and is itself a target for RNA editing. *RNA* 2000; **6**:1004–1018.
19. Xia S, Yang J, Su Y, Qian J, Ma E, Haddad GG. Identification of new targets of *Drosophila* pre-mRNA adenosine deaminase. *Physiol Genomics* 2005; **20**:195–202.
20. Ci S, Ren T, Su Z. Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABA(A) receptor using molecular modeling. *Protein J* 2008; **27**:71–78.
21. Drafts BC, Fisher JL. Structural determinants of the pharmacological properties of the GABAA receptor alpha6 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **309**:1108–1115.
22. Ikeda T, Zhao X, Nagata K, Kono Y, Shono T, Yeh JZ, et al. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **296**:914–921.
23. Zhao X, Salgado VL, Yeh JZ, Narahashi T. Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**:914–924.
24. Grolleau F, Sattelle DB. Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Br J Pharmacol* 2000; **130**:1833–1842.

Les résultats concernant les effets de l'édition R122G n'ont pas été présentés en totalité. Certaines illustrations non incluses dans la publication, mais aussi quelques résultats complémentaires sont présentés dans les figures 23 à 29.

Illustrations complémentaires

Les tracés de la figure 23 montrent que la substitution R122G entraîne une réduction de la sensibilité au GABA, que cette substitution apparaisse dans des sous-unités RDL de type sauvage ou dans des sous-unités présentant la double-mutation A301G/T350M.

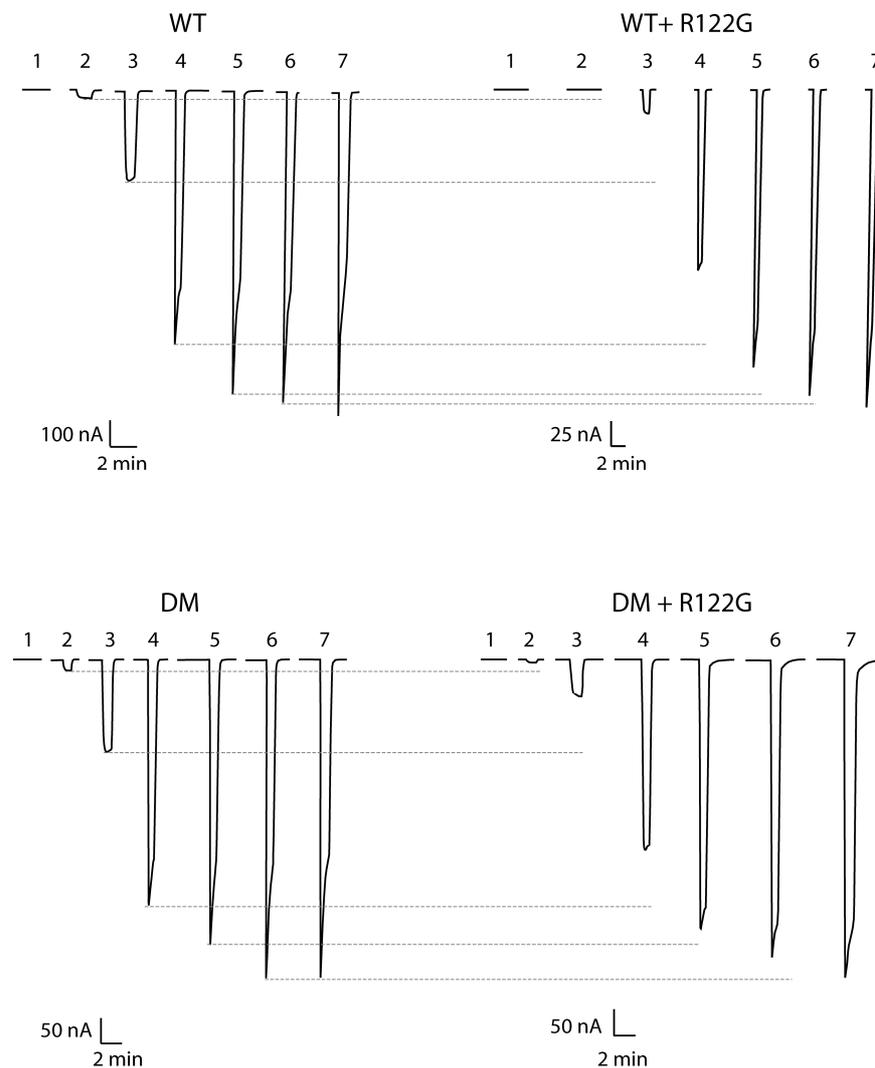


Figure 23 . Exemples représentatifs de courants GABAergiques utilisés pour la construction des courbes dose-réponse du GABA. Le GABA est appliqué jusqu'à ce que l'amplitude maximale du courant soit atteinte puis est rincé. Les chiffres 1 à 7 représentent les concentrations en GABA utilisées. **1** : $3 \cdot 10^{-6} \text{M}$; **2** : $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$; **3** : $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$; **4** : $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$; **5** : $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$; **6** : $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$; **7** : $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Les courbes dose-réponse du GABA obtenues sont présentées dans la publication 1, figure 2. "DM" : double mutant A301G/T350M

Il est à noter (tracés de gauche) que les récepteurs formés de sous-unités doublement mutées présentent pratiquement la même sensibilité au GABA que les récepteurs sauvages, comme cela avait été observé précédemment (Le Goff et coll., 2005), indiquant que les mutations A301>G et T350>M n'ont pas d'impact sur la sensibilité au GABA lorsqu'elles sont combinées. La diminution de sensibilité au GABA observée pour les récepteurs A301>G/T350>M/R122>G est donc imputable uniquement à la substitution R122>G.

La publication 1 présente une partie des données obtenues sur les effets du fipronil sur les différents types de récepteurs RDL exprimés. Afin de compléter ces résultats, la figure 24 montre des tracés représentatifs de l'effet du fipronil sur le courant GABA, et les figures 25 à 28 présentent les courbes d'inhibition pour 15 minutes d'application du fipronil, et après rinçage de l'insecticide avec du liquide physiologique pendant 15 minutes, en fonction du type de sous-unité RDL exprimée.

Il est à noter (figure 24) que les effets de l'insecticide sont plus marqués après la deuxième application de GABA (comparer les effets après 15 et 30 minutes d'application), en accord avec une facilitation des effets du fipronil par la répétition des applications de GABA (phénomène de "use-dependence"). La comparaison des courants montre aussi que l'effet du fipronil est irréversible pour les récepteurs formés de la sous-unité RDL sauvage, avec ou sans la modification R122>G. A l'inverse, cet effet est réversible dans le cas des récepteurs présentant la double-mutation A301>G/T350>M. En effet, le courant récupère partiellement après rinçage, ce qui traduit une diminution de la liaison du fipronil aux récepteurs. De plus, suite au rinçage, le courant tend à augmenter pendant l'application de GABA, comme cela a déjà été observé précédemment (Le Goff et coll., 2005), ce qui suggère que le GABA facilite la libération du fipronil de son site de liaison.

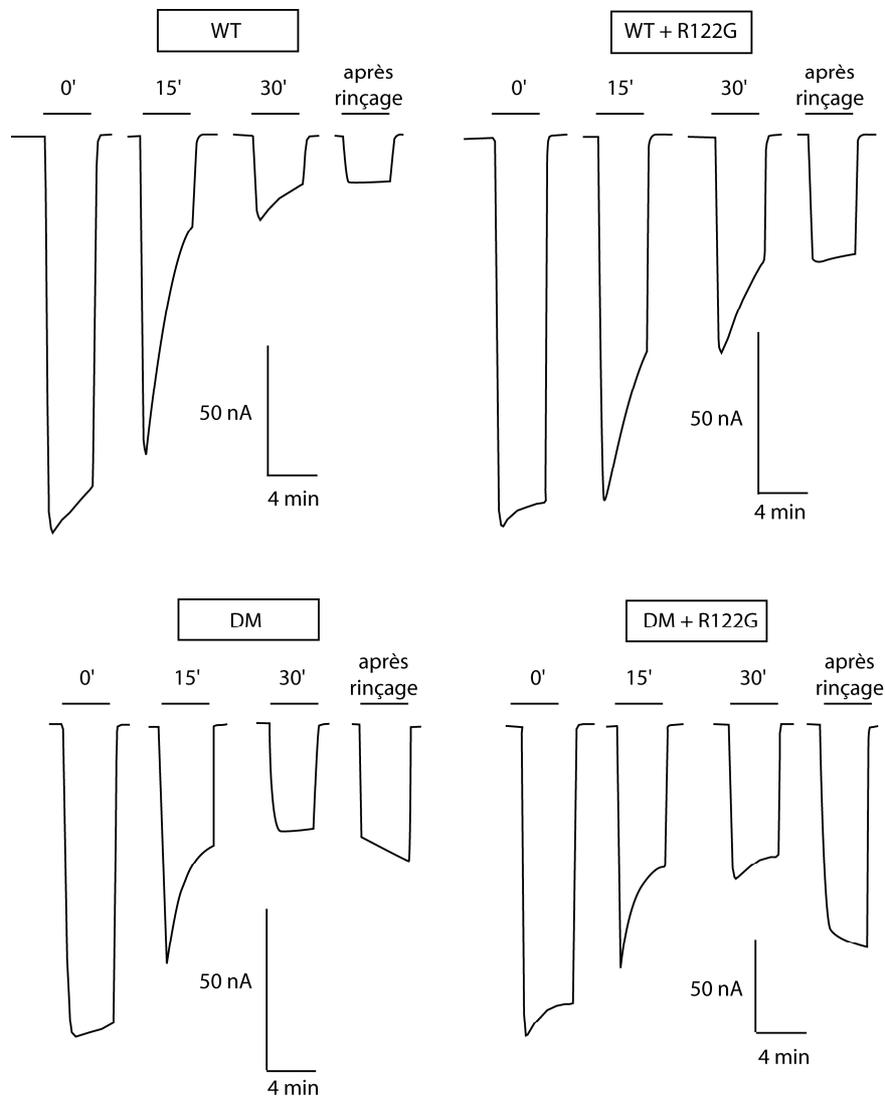


Figure 24 . Courants GABAergiques illustrant les effets du fipronil à 15 et 30 minutes d'application, et après rinçage pendant 15 minutes par du liquide physiologique, selon la nature de la sous-unité exprimée (WT ou WT+R122G ou DM ou DM+R122G). La barre horizontale représente l'application du GABA (CE₃₀). Les concentrations de fipronil utilisées sont de 10nM pour les tracés du haut et de 100nM pour ceux du bas. "DM" : double mutant A301•G/T350•M.

Le tableau 2 de la publication 1 présente les valeurs de CI_{50} obtenues pour des applications de fipronil d'une durée de 15 et 30 minutes et la figure 3, les courbes d'inhibition pour 30 minutes d'application de fipronil. Les figures 25 à 28 présentent les courbes dose-réponse du fipronil pour des applications de 15 minutes et celles obtenues après un rinçage par du SOS pendant 15 minutes. Pour rappel, les courants GABAergiques ont été mesurés en deux points : 1) à l'amplitude maximale obtenue peu après l'application de l'agoniste ("courant au pic"), et 2) après quatre minutes d'application du GABA ("courant tardif").

La comparaison des CI_{50} des figures 25A et 25B et des figures 27A et 27B montre que les GABARs sont moins sensibles au fipronil pour le courant au pic que pour le courant tardif, après 15 minutes d'application. Ces données confirment que la fixation du GABA facilite l'effet de l'insecticide. De plus, quelle que soit la composition des GABARs, un décalage des courbes d'inhibition vers la droite est observé en présence de la modification R122G. Ce décalage est très faible pour les courants au pic à 15 min et est plus important après quatre minutes d'application du GABA, probablement parce que le récepteur est plus désensibilisé. Cela est en accord avec les observations selon lesquelles la désensibilisation facilite l'effet des antagonistes sur les GABARs (cf. paragraphe "Introduction bibliographique" E.1, p.54). Comme indiqué dans la publication 1, l'effet de l'édition R122G sur les CI_{50} pourrait être expliqué par le fait que cette édition diminue la "puissance" du GABA. Par conséquent, le pourcentage de récepteurs ayant lié le ligand est réduit pour une concentration donnée de GABA, ce qui se répercute négativement sur la liaison du fipronil.

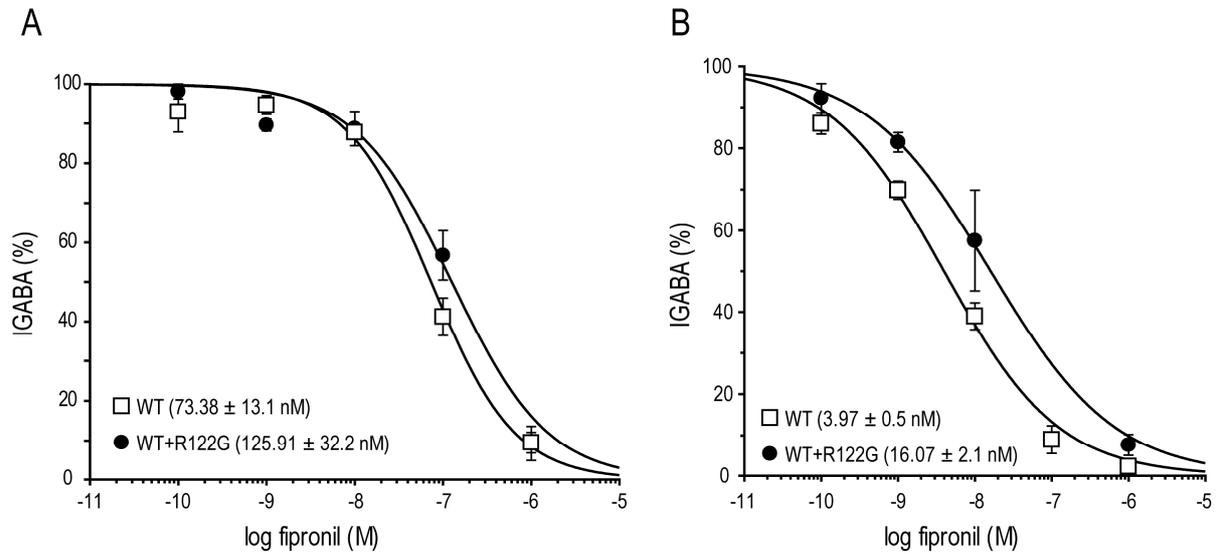


Figure 25 . Courbes d'inhibition du fipronil (appliqué pendant 15 minutes) pour le courant GABAergique mesuré au pic (A) et le courant tardif (B), dans le cas de récepteurs RDL constitués de sous-unités sauvages (WT) ou WT présentant la substitution R122G. Les CI_{50} sont indiquées entre parenthèses. La concentration de GABA utilisée correspond à la CE_{30} (valeur obtenue d'après les courbes dose-réponse du GABA).

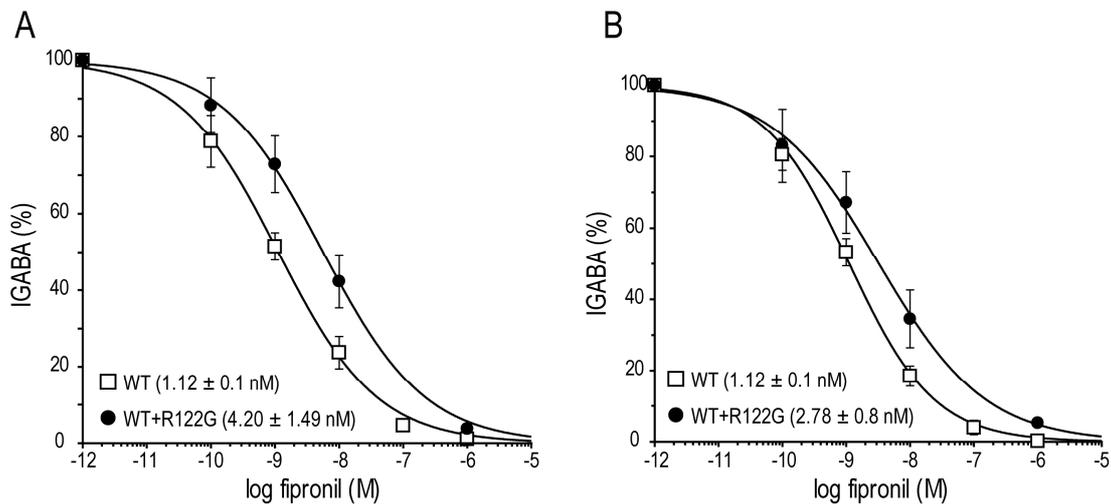


Figure 26 . Courbes d'inhibition du fipronil après rinçage pendant 15 minutes avec du SOS (récepteurs RDL sauvages ou WT+R122G). A : Courant mesuré au pic. B : courant tardif. Les CI_{50} sont indiquées entre parenthèses. La concentration de GABA utilisée correspond à la CE_{30} .

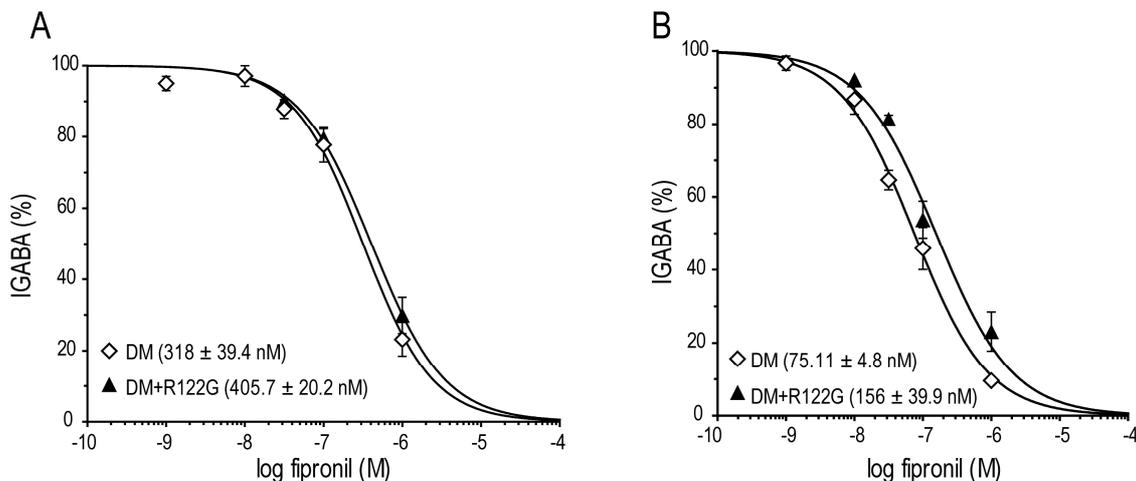


Figure 27. Courbes d'inhibition du fipronil (appliqué pendant 15 minutes) dans le cas des récepteurs RDL double-mutants (A301G/T350M) ou A301G/T350M/R122G. **A** : Courant mesuré au pic. **B** : courant tardif (après 4 minutes d'application de GABA). Les CI₅₀ sont indiquées entre parenthèses. La concentration de GABA utilisée correspond à de la CE₃₀.

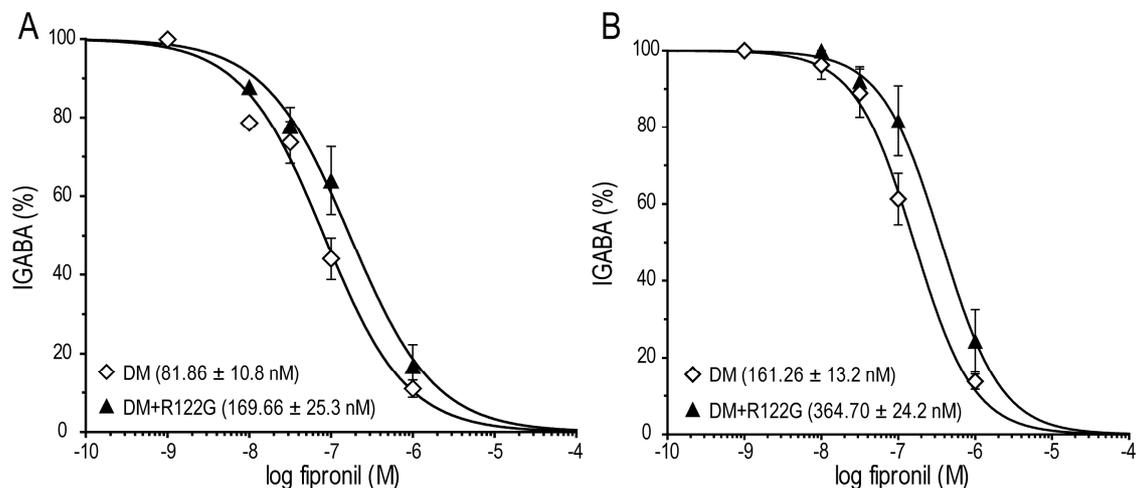
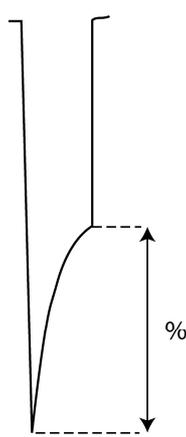


Figure 28. Courbes d'inhibition du fipronil après rinçage pendant 15 minutes avec du SOS (récepteurs double-mutants A301G/T350M ou A301G/T350M/R122G). **A** : Courant mesuré au pic. **B** : courant tardif. Les CI₅₀ sont indiquées entre parenthèses. La concentration de GABA utilisée correspond à de la CE₃₀.

Résultats complémentaires

Conformément aux résultats obtenus dans la littérature pour les antagonistes des GABARs, le fipronil accélère clairement la désensibilisation, quelle que soit la sous-unité testée. Le tableau 23 compare la désensibilisation des récepteurs RDL avant et après application de fipronil pendant quinze minutes.

Ratio désensibilisation t=15 / t=0min fipronil



WT 0 min : 20,31 ± 2 % (n=45)	3,03	p<0.001
WT 15 min : 61,5 ± 3,6 % (n=5)		
WT+R122G 0 min : 23,36 ± 2,9 (n=34)	2,19	p<0.01
WT+R122G 15 min : 51,2 ± 6,6 (n=3)		
DM 0 min : 26,9 ± 2,6 % (n=33)	2,01	p<0.01
DM 15 min : 54 ± 1,3 % (n=4)		
DM+R122G 0 min : 30,44 ± 3,7 (n=13)	1,17	p>0.05
DM +R122G 15 min : 35,7 ± 6,5 (n=3)		

Tableau 23 . Comparaison de la désensibilisation des récepteurs dans les conditions contrôles et après 15 minutes d'application de fipronil (CI₅₀). Le principe du calcul des pourcentages de désensibilisation est indiqué sur le tracé de gauche.

La désensibilisation est accélérée suite à l'application de fipronil (15 minutes de traitement), et semble moins accentuée dans les conditions contrôles en présence de l'édition R122G. Cependant, ces résultats sont difficilement interprétables car, dans les conditions contrôles, la désensibilisation augmente avec l'amplitude des courants, c'est-à-dire avec le niveau d'expression des récepteurs dans les ovocytes. Il apparaît en effet que les pourcentages de désensibilisation sont très hétérogènes selon l'amplitude du courant GABAergique (figure 29). Par conséquent, l'influence de l'édition R122G sur la désensibilisation n'a pu être prise en considération pour la publication 1.

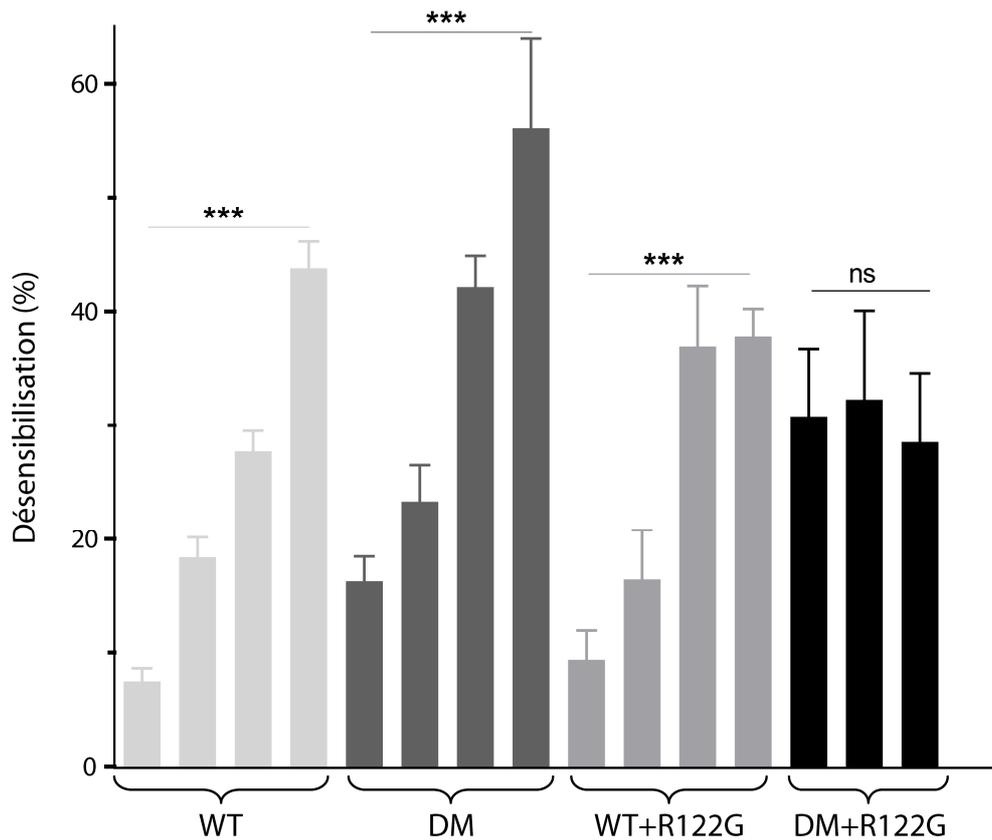


Figure 29 . Comparaison des degrés de désensibilisation des récepteurs en conditions contrôles. Le principe du calcul du pourcentage de désensibilisation est le même que pour le tableau 23. Pour chaque isoforme de récepteur RDL, 4 barres représentent les amplitudes de IGABA comprises entre (de gauche à droite) 0-200, 200-500, 500-1000 et 1000-1500 nA, respectivement (pas d'amplitude supérieure à 1000 nA pour DM + R122G). Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du test One-way ANOVA.

C Discussion des résultats

Le fait que la substitution R122G, obtenue par mutagenèse dirigée de RDL, entraîne une réduction de la sensibilité non seulement au GABA, mais aussi au fipronil, montre que l'édition n'est pas sans conséquences fonctionnelles dans les GABARs d'invertébrés.

Cette modulation de la pharmacologie des GABARs par un mécanisme d'édition n'avait jamais été mise en évidence jusqu'alors, pas même pour les GABARs de vertébrés. Les sites d'édition de ces récepteurs, localisés sur la sous-unité $\alpha 3$, n'ont en effet été

découverts que très récemment (Ohlson et coll., 2007). Une publication récente montre que l'édition de la sous-unité $\alpha 3$ augmente au cours du développement embryonnaire et postnatal chez la souris, mais aussi qu'elle est tissu-spécifique (Rula et coll., 2008). Les données électrophysiologiques obtenues à partir de récepteurs $\alpha 3\beta 3\gamma 2L$ recombinants indiquent que l'édition de la sous-unité $\alpha 3$ entraîne une diminution significative de l'amplitude des courants générés par ces récepteurs. De plus, l'activation du courant est plus lente et la désactivation plus rapide que pour les récepteurs sans sous-unité éditée. Les auteurs imputent cela à la position du site d'édition (boucle M2-M3), qui a un rôle dans le contrôle de l'ouverture du canal (Rula et coll., 2008).

La recherche des conséquences fonctionnelles de l'édition de l'ARNm des GABARs de vertébrés et d'invertébrés constitue un champ d'investigation très large, et permet une nouvelle approche dans la compréhension du fonctionnement de ces récepteurs. Dans le cas des récepteurs RDL, les éditions qui n'ont pas été abordées au cours de cette étude peuvent aussi avoir une influence fonctionnelle, de par leur localisation structurale. L'édition I283V se trouve dans le domaine M1, et il a été vu plus haut (p.55) que tous les domaines transmembranaires participent potentiellement à la fixation des antagonistes (Law et Lightstone, 2008). N294D se trouve dans la boucle intracellulaire M1-M2. Un alignement de la sous-unité $\beta 3$ avec RDL montre une aspartate là où se trouve l'asparagine pour RDL. Or, il a été montré que ce résidu fait partie d'un groupe de cinq acides aminés impliqués dans la sélectivité aux anions dans la sous-unité $\beta 3$ (Jensen et coll., 2002). Pour finir, l'édition M360V est localisée dans la boucle M3-M4, qui joue un rôle dans la régulation des récepteurs de vertébrés, leur pharmacologie, ainsi que leurs interactions avec le cytosquelette (Olsen et Tobin, 1990 ; Moss et Smart, 2001).

Chapitre II. Rôle de la phosphorylation dans la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil

A Présentation

La phosphorylation joue un rôle essentiel dans la modulation de l'activité des récepteurs membranaires. Plusieurs enzymes appartenant à la famille des sérine-thréonine kinases, comme la PKC, la CaMKII et la PKA, ont ainsi été reconnues comme ayant une influence sur le fonctionnement et la pharmacologie des GABARs de vertébrés. Dans le cas des GABARs d'insectes, par contre, les connaissances restent très limitées. Il a cependant été établi que la CaMKII exerce une régulation positive sur les récepteurs GABAergiques des neurones DUM de la blatte *P. americana* (Alix et coll., 2002). Ces neurones sont également dotés de deux types de PKC (conventionnelles et nouvelles) qui régulent un sous-type de nAChR (Courjaret et coll., 2003), mais dont l'effet sur les GABARs et leur pharmacologie n'a pas encore été déterminé.

Les neurones DUM possédant des récepteurs GABAergiques sensibles au fipronil (Le Corrionc et coll., 2002), ce modèle cellulaire a été utilisé pour tester :

- 1) la régulation des GABARs d'insectes par la PKC,
- 2) les effets de la phosphorylation sur l'efficacité du fipronil,
- 3) la présence de la sous-unité RDL en vue de rechercher des sites potentiels de phosphorylation par la PKC.

De plus, nous avons également entrepris d'étudier les effets de la PKC sur des récepteurs RDL de drosophile exprimés dans des ovocytes de xénope.

B Résultats obtenus

Les résultats concernant la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil par des phénomènes d'édition et de phosphorylation ont été présentés sous forme de poster lors d'un congrès de la Fédération Européenne des NeuroSciences, et le résumé a été publié dans un volume de FENS abstracts (résumé 2, cf. Annexe). Les données concernant les mécanismes de régulation intracellulaire ont été présentés sous forme de poster lors du colloque de Neurobiologie des Invertébrés (Toulouse, titre : "Récepteurs GABAergiques ionotropes de neurones d'insecte : régulation intracellulaire et identification moléculaire d'une sous-unité", auteurs : ES-SALAH Z., DASSI C., HAMON A., TRICOIRE-LEIGNEL H.). Un article scientifique présentant les résultats concernant la modulation de la sensibilité des GABARs au fipronil par phosphorylation est actuellement en cours de préparation (publication 2).

Publication 2

**Regulation of two GABA receptor subtypes by PKC and CaMKII
phosphorylation alters sensitivity of insect neurosecretory cells
to the insecticide fipronil**

Zeineb Es-Salah, Hélène Tricoire-Leignel, Laurence Murillo, Valérie Itier, Bruno Lapied,
Alain Hamon

En préparation, pour une soumission à *Journal of Neurochemistry*

(Par souci pratique, les figures ne sont pas présentées à la fin de l'article, comme dans le cas
d'une soumission, mais sont intégrées dans le texte.)

Title page

**Regulation of two GABA receptor subtypes by PKC and CaMKII
phosphorylation alters sensitivity of insect neurosecretory cells
to the insecticide fipronil**

Zeineb Es-Salah¹, Hélène Tricoire-Leignel¹, Laurence Murillo¹, Valérie Itier², Bruno Lapied¹,
Alain Hamon¹

¹ Laboratoire RCIM, UPRES EA 2647/USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex, France

² IMRB - Inserm U841, Equipe n°10 "Système neuromusculaire et inflammation", Faculté de Médecine, 8 rue du général Sarrail, 94011 Créteil, France

Abbreviations: CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; GluClR, glutamate-gated chloride channels; PMA, Phorbol-12-myristate-13-acetate; PDBu, Phorbol 12,13-dibutyrate; Gö6983, 3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione; KN-62, 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine; DUM, Dorsal Unpaired Median; DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C

Abstract

Serine/threonine kinases play important role in the modulation of vertebrate GABA receptors (GABARs). However, their implication in regulating insect GABARs is unknown. We investigated the effects of PKCs on *Periplaneta americana* Dorsal Unpaired Median neurons, known to express ionotropic GABARs (GABAR1 and GABAR2). The GABA-induced currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique. PKC modulation was assessed using activators (PMA, PDBu) and the inhibitor (Gö6983). GABAR2 activity was totally blocked by 0.3 μ M PMA, whereas effects on GABAR1 required higher concentrations. Blockade of CaMKII with KN-62, in parallel with activation or inhibition of PKC, showed that GABAR2 was independently inhibited by the two kinases and that PKC was negatively regulated by CaMKII. PCR cloning revealed the presence of the RDL GABAR subunit in *Periplaneta americana* nerve cord, with potential PKC and CaMKII phosphorylation sites.

Because phosphorylation is a novel mechanism that affects insecticide sensitivity, the effects of PKC activation and/or inhibition on fipronil sensitivity were examined. The dose-response curve illustrating inhibition of GABA-induced currents by fipronil displayed a biphasic aspect. Fipronil sensitivity was decreased upon selective blockade of GABAR2 by PKC, indicating a higher sensitivity to fipronil for GABAR2 than GABAR1. Our results show that cells sensitivity to fipronil are altered by phosphorylation.

Keywords: GABA, PKC, CaMKII, fipronil, RDL, DUM neurons

Running title: GABAR phosphorylation and sensitivity to fipronil

Introduction

In insects, as in vertebrates, ionotropic GABA receptors (GABARs) mediate fast inhibitory transmission in the central nervous system. They are targeted by several important classes of insecticides, including cyclodienes (e.g. dieldrin) and phenylpyrazoles (e.g. fipronil). These compounds cause neuronal hyperexcitation and convulsions by reducing the flow of chloride ions through the receptor channel complex (Bloomquist, 1996). Unfortunately, their wide use, especially in agriculture, has led to the development of resistance mechanisms in many pest species. In most field populations studied to date, cyclodiene/fipronil resistance is associated with a point substitution (A301S/G) in a GABAR subunit, called RDL (for resistance to dieldrin), that is widespread in the central nervous system of many insect species (French-Constant et coll., 2000). Similar resistance-associated substitutions have been identified in other key targets of neurotoxic insecticides, such as sodium channels, nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and acetylcholinesterases (Raymond-Delpech et coll., 2005 ; Dong, 2007). In addition, evidence that posttranscriptional modifications, such as RNA editing of insect GABA receptors, also affect insecticide sensitivity have been brought recently (Es-Salah et coll., 2008).

Besides these mechanisms, several recent studies have established that insecticide sensitivity is also strongly dependent on physiological intracellular processes like phosphorylation or dephosphorylation. For example, in cockroach neurosecretory cells (DUM neurons), modification of the phosphorylation state of an α -bungarotoxin-resistant nAChR affects the action of the neonicotinoid insecticide imidacloprid (Courjaret et Lapied, 2001). Moreover, in the same cells, the effect of the indoxacarb metabolite DCJW on sodium channels is greatly facilitated by activation of CaMKII (Lavialle-Defaix, 2005). However, no study has examined whether the effects of GABAR-directed insecticides are modified by phosphorylation/dephosphorylation processes. This is probably due to the paucity of knowledge about the functional regulation of insect GABARs by phosphorylation.

Until now, it has been shown on *Periplaneta americana* unidentified neurons that a PKA-dependent mechanism participates in the maintenance of GABAR function (Watson et Salgado, 2001). Moreover, in the terminal abdominal ganglion of the American cockroach, DUM neurons are known to express two distinct GABARs subtypes. GABAR2 is positively modulated by calcium-calmodulin kinase II (CaMKII), whereas GABAR1 is insensitive to CaMKII (Alix et coll., 2002). The most recent study on intracellular regulation of GABAR

function in insect neurons came from experiments performed on mushroom body Kenyon cells of the honey bee, and suggests the implication of calcium in the regulation of GABAR functional properties, but without PKA, PKC or CaMKII involvement (Grunewald et Wersing, 2008). Although PKC isozymes are known to regulate an alpha-bungarotoxin resistant nAChR in insect neurosecretory cells (Courjaret et coll., 2003), there is no evidence indicating that PKC might modulate insect GABAR activity.

Based on findings reporting that i) ionotropic GABARs are major targets for the widely used phenylpyrazole insecticides (e.g., fipronil) and ii) phosphorylation strongly alters the action of several classes of insecticides, we have investigated the effects of PKCs on GABA-induced chloride currents in cockroach DUM neurons and the influence of PKC on fipronil sensitivity. Finally, to determine whether the effects of kinases might involve a direct phosphorylation of GABAR subunits, we have assessed the presence of the RDL subunit by PCR, in the nerve cord of the cockroach and determined its partial sequence to identify potential phosphorylation sites.

Methods

Cell isolation. Isolation of adult DUM neuron cell bodies was performed under sterile conditions using enzymatic digestion and mechanical dissociation of the terminal abdominal ganglia of adult male *Periplaneta americana* cockroaches, as previously described (Lapied et coll., 1989). Isolated cells were kept for 24 hours at 29°C before experiments were carried out.

Electrophysiology. GABA-induced chloride currents were recorded using the patch-clamp technique, under voltage-clamp mode. Whole-cell currents were evoked by applying GABA through a glass micropipette connected to a pneumatic pressure ejection system (15 psig, 300ms in duration, Miniframe Medical Systems Corporation, Greenvale, NY, USA). The pipette (resistance 2 M Ω , when filled with agonist) was positioned within 50 μ m from the studied isolated cell body. GABA-induced currents were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), filtered at 5 kHz. Data were stored on-line on the hard disk of a PC computer (sampling frequency: 10kHz) connected to a 16-bit A/D converter (Digidata 1322A, Axon Instruments). The pClamp package (pClamp8.0.2., Axon Instruments) was used for data acquisition and analysis. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard

Apparatus, Edenbridge, UK) using a P-97 puller (Sutter instruments, Novato, CA, USA). Pipettes had resistances ranging from 1 to 1.2 MΩ when filled with internal solution (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal pipette solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (> 2 GΩ). DUM neuron cell bodies were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -50 mV (except when otherwise stated). Patch-clamp experiments were conducted at room temperature (20°C).

Solutions and chemicals. The cells were continuously superfused by a gravity perfusion system with a chloride-isotonic solution containing (in mM): 167 NaCl, 33 D-gluconic acid, 3.1 KCl, 4 MgCl₂, 5 CaCl₂ and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The internal pipette solution contained (in mM): 170 KCl, 1 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 15 pyruvic acid sodium salt, 10 EGTA, 20 HEPES and 10 phosphocreatine-di-Tris; pH was adjusted to 7.4 with KOH. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France). Pyruvic acid (sodium salt, Research organics Inc, Cleveland, USA) was used to prevent rundown of GABA currents. Fipronil (CIL Cluzeau, France) was first dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO), and then diluted in bath solution to the final required concentration. Stock solutions containing the PKC activators/inhibitor PMA, PDBu and Gö6983 were freshly dissolved every day in the bath solution. The CaMKII inhibitor KN-62, first dissolved in DMSO, was then diluted in pipette solution just before use.

Statistical analysis. Data, when quantified, were expressed as mean ± S.E.M, where n is the number of experiments. Differences between means were tested for statistical significance by Student's *t* test. Curve fitting analysis was carried out using the software Prism 2 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). The equation used to fit fipronil inhibition curve is given below.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) \left[\frac{\text{Fraction}_1}{1 + 10^{X - \text{LogEC50}_1}} + \frac{1 - \text{Fraction}_1}{1 + 10^{X - \text{LogEC50}_2}} \right]$$

Statistical probability is expressed as ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

Cloning of partial cDNA sequence encoding the GABA receptor RDL subunit. 2.5 μg of total RNA were isolated from ventral nerve cords of 14 adult cockroaches using Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and were reverse-transcribed using the Superscript III[™] First Strand Synthesis Supermix in the presence of 50 μM oligodT₂₀[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA),

according to the manufacturer's instructions. Four degenerated primers were designed in accordance with the amino-acid sequence homologies between the RDL sequences from six insect species: *D. melanogaster* (accession n° NP523991), *H. virescens* (accession n° CAB41615), *A. mellifera* (accession n° XP001120292), *L. striatella* (accession n° BAF31884), *P. xylostella* (accession n° ABN13426) and *B. germanica* (accession n° S76561). These primers, which amino-acid motifs are RVRPNYGG (5'-GAGTAAGRCCNAAAYTAYGGWGG-3': DS1 primer), GVETLSV (5'-GGNGTNGARACNYTNWSN-3': DS2 primer), LMYWIIYL (5'-AGVTADATGATCCAGTACATBAG-3': DR1 primer) and YSRIVFP (5'-GGRAAMACGATRCGRGAGTA-3': DR2 primer) were successively used in embedded PCRs (DS1-DR1 / DS2-DR2) in order to amplify the partial C-terminal domain of the RDL coding sequence. Both PCRs were performed in the presence of Taq Platinum[®] polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) during 35 cycles 30s at 94°C; 30s at 60°C; 30s at 72°C, preceded by 2 min at 94°C and followed by 5 min at 72°C. The PCR products leading to DNA fragments of 1150 bp were purified using Nucleospin[®] Extract II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. These DNA fragments were cloned into the pCR2.1TOPO[®] plasmid (Invitrogen, Carlsbad, USA) for sequencing.

Sequence analysis. A multiple alignment of clone sequences revealed two types of transcripts, one of which displayed a 57 bp insertion, leading to two consensus sequences of 994 and 1051 bp (*Pame2-long* vs *Pame1-short*) created with Bioedit, version 7.0. (Hall, 1999). Identities of both sequences isolated in *P. americana* ventral nerve cord were checked using BLASTn program and their amino-acid translation were used in a multiple alignment with the protein sequences of the RDL subunit from four insect species using ClustalW, version 1.83 (Thompson, J. D. et coll., 1994). This alignment was visualized using Bioedit, version 7.0 (Hall, 1999).

A phylogenetic analysis was performed under the maximum parsimony method with PHYLIP Package, version 3.66 (Felsenstein, 2001). An equally-weighted maximum parsimony search was run with 1000 random addition replicates (bootstrap). The *D. melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ subunit was used as an outgroup. The best tree was visualized by Tree View, version 1.6.6 (Page, 1996).

Because phosphorylation modulates the GABA receptors function in *P. americana* DUM neurons, we performed predictive analysis of putative phosphorylation sites on both isolated

RDL subtypes sequences in *P. americana* ventral nerve cord, using PPSP ("prediction of protein kinase-specific phosphorylation site") (Xue et coll., 2006).

Results

Pressure application of GABA (100 μ M) onto the voltage-clamped DUM neuron cell body induced a transient inward current (IGABA) that reversed at 1.6mV, a potential close to the calculated Nernstian equilibrium potential for chloride ions (-2.1mV; Fig. 1a). Between -70mV and 0mV, the relationship between peak current amplitude and membrane potential displayed a biphasic aspect, which best fitted using two linear regressions (Fig. 1b), the first one between -70 and -30mV (slope conductance: 115 ± 12.6 nS, n=11) and the second one between -30 and 0mV (slope conductance: 57.4 ± 7.5 nS, n=11). The biphasic shape of the I-V curve reflects the presence of two distinct GABARs subtypes (named GABAR1 and GABAR2) that differ from each other on the basis of their pharmacological profile, intracellular signalling pathway through CaM-Kinase II activation and sensitivity to calcium.

Effect of PKC activation on the inward chloride current mediated by GABARs. To study the effects of PKC activation, the cells were incubated for 4h with the phorbol ester PMA, at a concentration of 300nM. Following PMA incubation, the voltage dependence of IGABA was strikingly modified, with data being best fitted by only one linear regression. At -30mV, no significant difference with control I/V curve was observed ($p > 0.05$), but at -70mV, there was a significant decrease of IGABA amplitude in presence of PMA, compared to control (control: n=10; PMA: n=5; $p < 0.05$) (Fig. 1c and d). Moreover, the slope conductance calculated from the linear regression (49.8 ± 3.7 nS, n=5) was close to that determined between -30mV and 0mV in control experiments, indicating that PMA did not notably affect inward current activated by GABAR1 but fully reduced the current mediated by GABAR2. However, at higher concentrations (1 μ M in Fig. 1d), PMA also reduced IGABA amplitude at potentials more positive than -30mV, thus showing that GABAR1, like GABAR2, was inhibited by PMA.

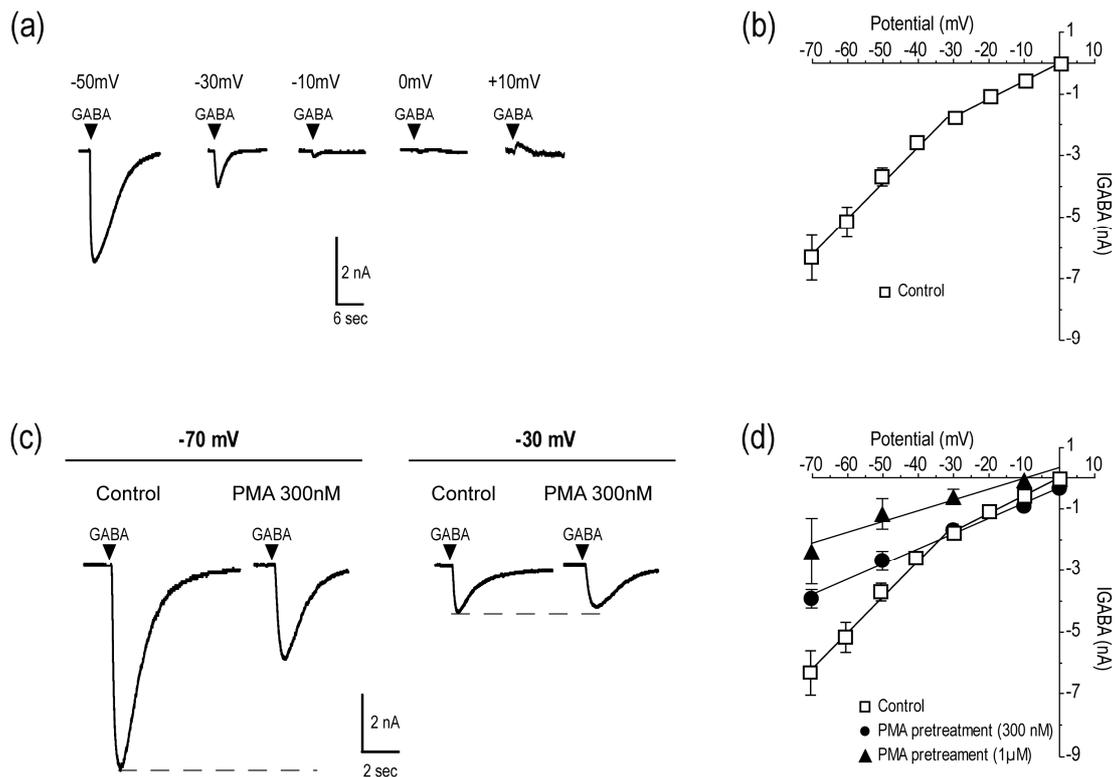


Figure 1. DUM neuron GABARs are differentially regulated by PMA. **(a)** Representative whole cell current traces obtained at different holding potentials from a DUM neuron cell body, in response to local application of 100µM GABA via a micropipette connected to a pneumatic pressure ejection system. In chloride isotonic conditions, the currents reversed at a potential close to 0mV. **(b)** Plot of the current-voltage relationship of GABA-induced current. Two linear regressions were necessary to best fit the data points (n=11), which reflects the presence of two GABAR subtypes in DUM neuron cell bodies. **(c)** Effect of PMA on GABA-induced currents. Cells were incubated in presence of 300nM PMA for 4 hours prior to recordings. Note that PMA pre-treatment resulted in a strong reduction in current amplitude at -70mV holding potential, whereas currents were almost unaffected at -30mV. **(d)** Current-voltage relationship of GABA responses following application of 300nM PMA (●) or 1µM PMA (▲) for 4h (n=5 for each concentration). Note that 300nM PMA affected only the first component of the biphasic I/V curve (at potentials more negative than -30mV) whereas the two components were affected by 1µM PMA. Values are means ±SEM.

To assess the time course of current inhibition, DUM neuron somata, voltage-clamped at a steady state holding potential of -50mV, were exposed to GABA pulses every 2 min during continuous superfusion of PDBu (an activator of PKCs). In the presence of 2µM PDBu, GABA-induced currents were reduced by 90.7±3.8% (n=3, p<0.0001) after a 20-min application (Fig. 2a). The almost total inhibition obtained in less than 30 min, confirmed that both GABAR1 and GABAR2 were sensitive to PKC.

To check whether the reduction of the GABA response amplitude could be caused by receptor internalization, as observed in some neuronal preparations (Song, M. et Messing, 2005), membrane capacitance was measured every 2min, in the presence or absence of 2µM PDBu.

Figure 2b shows that PDBu did not induce any significant changes of membrane capacitance during the time course of experiments ($p>0.05$). This suggests that the total number of GABARs in the neuronal membrane was not reduced by endocytosis.

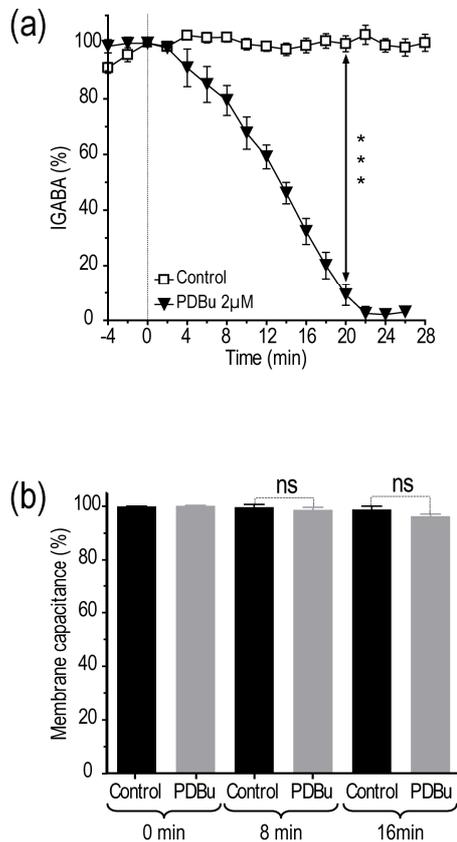


Figure 2. Inhibition of GABA-induced currents by PDBu is not caused by endocytosis. **(a)** Time-course of PDBu-mediated inhibition of GABA-induced currents (▼, n=3), compared to control currents (□, n=21). Bath-application (dashed line) of 2µM PDBu was started at time 0. Holding potential: -50mV. **(b)** Evolution of membrane capacitance with time, in the presence (grey bars) or absence (black bars) of 2µM PDBu. Membrane capacitance is expressed as percentage of initial value.

In order to inhibit a possible basal activity of PKCs and to assess the effects of this inhibition on GABA responses, Gö6983 was continuously superfused at a concentration of 100nM and its effect on IGABA amplitude was checked every 2min, at a holding potential of -50mV. Surprisingly, IGABA was progressively decreased by Gö6983 as with PKC activators (Fig. 3a). After stabilization, the decrease was estimated to be $31\pm 5.1\%$ (n=3, $p<0.0001$). Similar experiments with another PKC inhibitor, chelerythrin, also led to decrease of GABA response amplitude (data not shown). Statistical analysis revealed no significant difference ($p>0.05$) between the decreases induced by Gö6983 ($31\pm 5.1\%$, n=3) and 300nM PMA ($33.6\pm 7.8\%$, n=5) (Fig. 3b). This indicates that Gö6983, like 300nM PMA, selectively blocked GABAR2 activity. It should be noted that the decrease of IGABA amplitude produced by these two compounds was also very close to that previously observed when CaMKII was inhibited via

blockade of Ca^{2+} entry (Alix et coll., 2002). From these results, it is tempting to suggest a cross-talk between PKC and CaMKII in GABAR2 regulation.

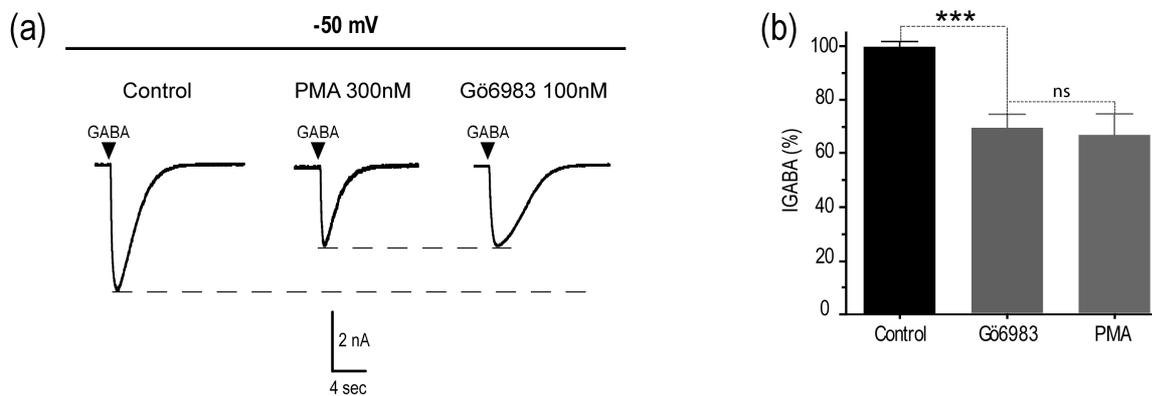


Figure 3. Effects of PKC effectors on IGABA amplitude. **(a)** Sample current traces illustrating the equivalent inhibitory effects of 300nM PMA and 100nM Gö6983 (100nM) on the amplitude of GABA-induced currents. Potential was held at -50mV. **(b)** Histogram summarizing the effect of Gö6983 (n=3) and PMA (n=5). Values are means \pm SEM.

Interaction between PKC and CaMKII. Following activation of PKC by incubation of the cells with 300nM PMA, CaMKII was blocked by subsequent intracellular application of 10 μ M KN-62 through the patch electrode. The linear I/V curve obtained under these conditions yielded a slope factor (45.5 ± 13.6 nS, n=5) that was close to that determined after PMA incubation alone (Fig. 4a). Current amplitudes measured in the presence of PMA combined to KN-62 (-3.61 ± 1.5 nA, n=3, at -70mV and -1.36 ± 0.6 nA, n=3, at -30mV) did not differ ($p > 0.05$) from those measured in the presence of PMA applied alone (-3.90 ± 0.3 nA, n=5 at -70mV; -1.61 ± 0.2 nA, n=5, at -30mV) (Fig.4b). The lack of additional effect on GABAR2 confirms that this receptor was already fully blocked by PKC and that KN-62, in combination with 300nM PMA, had no effect on GABAR1.

In an additional set of experiments, instead of stimulating PKC, we inhibited its basal activity by incubating the cells with 100nM Gö6983, before recording GABA responses at a membrane potential of -50mV, with 10 μ M KN-62 in the patch pipette. While KN-62 without PKC inhibition decreased IGABA amplitude by $49.9 \pm 5.5\%$ (n=3), it produced a $57.7 \pm 11.2\%$ increase when PKC activity was previously inhibited. The fact that inhibition of CaMKII can produce opposite effects on IGABA, depending on whether PKC is active or not, implies that the two kinases do not act separately, and that CaMKII acts on GABAR2 via PKC inhibition.

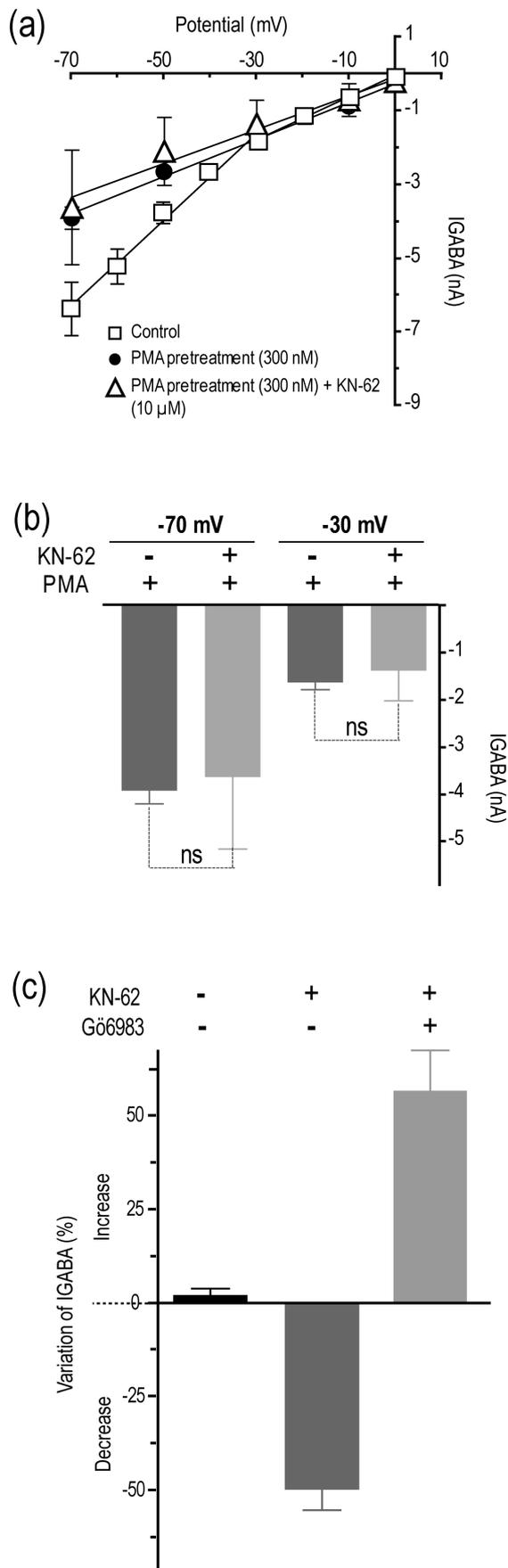


Figure 4. Regulation of GABAR2 by both PKC and CaMKII. (a) I/V curve showing the effect of PKC activation by 4h PMA pre-treatment (300nM, ●, n=5), compared to PKC activation by PMA followed by CaMKII inhibition by KN-62 (10μM, ▲, n=3). Note that no additive effect was observed when KN-62 was used, and that one linear regression best fitted the PMA/KN-62 curve. (b) Histogram showing the effects of PMA (300nM) followed or not by KN-62 (10μM) on GABA-induced inward current, at two holding potentials (-30mV and -70mV). (c) Histogram illustrating the effects of KN-62 (10μM) on IGABA, preceded or not by Gö6983 treatment (100nM), at a holding potential of -50mV. Values are means ±SEM.

Effect of intracellular regulation on fipronil sensitivity. A dose-response inhibition curve for the effects of fipronil on the peak amplitude of GABA-induced currents was established following superfusion with fipronil for 10 min. The minimal concentration that elicited an unambiguous current decrease was close to 10^{-10} M and total current block required about 10^{-5} M insecticide. Data were best fitted with a two-site competition curve (Fig. 5a), providing evidence that the two GABAR subtypes displayed a different fipronil sensitivity. To determine which subtype was most sensitive to fipronil, we selectively blocked GABAR2 via inhibition of PKC by Gö6983. As illustrated in Figure 5b, the decrease in IGABA amplitude that was induced by 10^{-8} M fipronil was significantly less important ($p < 0.05$) in the presence of Gö6983 ($24.4 \pm 6.1\%$, $n=4$) than in control ($41 \pm 2.6\%$, $n=4$). A significant decrease in fipronil sensitivity under Gö6983 ($p < 0.01$) was also observed when the insecticide was tested at 10^{-6} M. Indeed, the fipronil-induced IGABA decrease in presence of Gö6983 was of $62.8 \pm 3.8\%$, $n=4$ whereas it was of $87.4 \pm 4\%$, $n=4$ in control experiments (Fig.5b). Selective inhibition of GABAR2 activity by low concentrations of phorbol esters led to similar results (not illustrated). Taken together, these data clearly show that GABAR1 is less sensitive to fipronil than GABAR2.

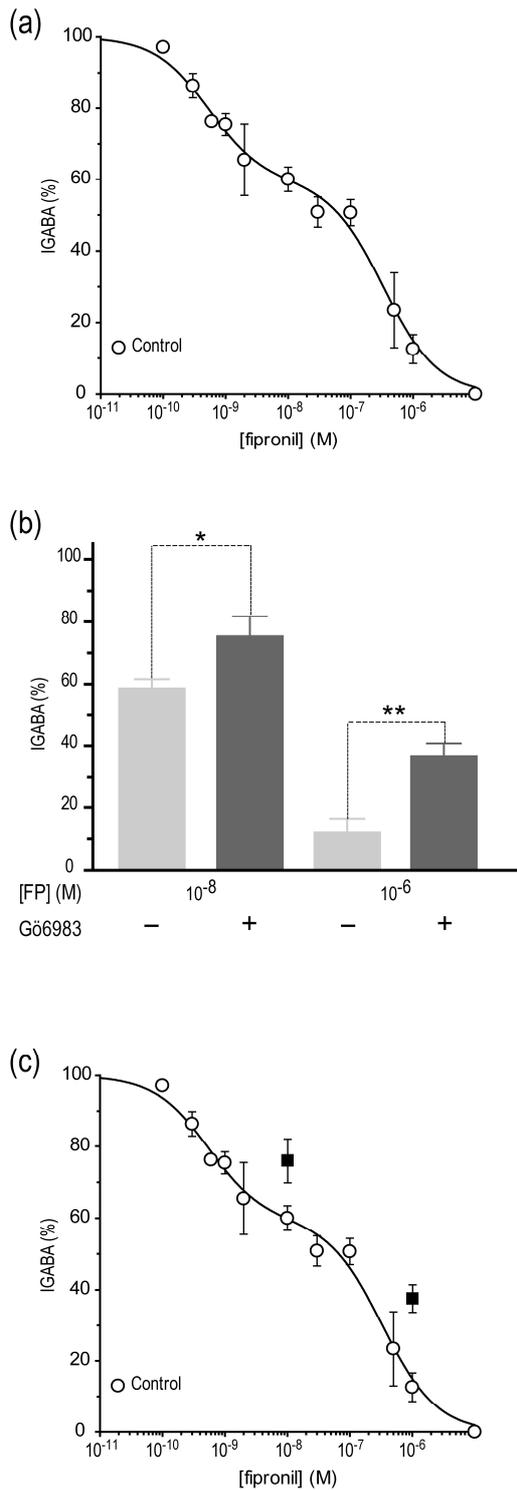


Figure 5. Fipronil sensitivity depending on the GABAR subtype. **(a)** Fipronil inhibition curve constructed at a holding potential of -50mV. Fipronil at different concentrations was bath applied for 10min and GABA-induced current was normalized with IGABA before fipronil application for each cell. Note the biphasic aspect of the curve, suggesting different sensitivities of the two GABARs to fipronil. **(b-d)** Histograms comparing effect of different concentrations of fipronil on one or two GABARs. Pretreatments with PKC activator (PDBu 1 μ M, until IGABA stabilization) or inhibitor (Gö6983 100nM, 30min) as well as calcium channel inhibitor (CdCl₂ 1mM, 20min) allows to block GABAR2. Fipronil is applied thereafter to see its effect on GABAR1 alone. **(e)** Fipronil inhibition curves superimposed to compare total fipronil effect with effect on GABAR1 alone, after Gö6983 (100nM) pretreatment. Note the shift to the right when GABAR2 was blocked. Potential was held at -50mV. Values are \pm SEM.

Identification of a partial cDNA sequence encoding the GABA receptor RDL subunit in *P. americana* nerve cord. Using degenerated primers in nested PCR, we identified two types of transcripts, named *Pame-short* and *Pame-long* corresponding to partial sequences of the *P. americana* GABA receptor RDL subunit, as confirmed by BLAST program, multiple alignment and phylogenetic analyses (Fig. 6 and 7). Indeed, the partial cDNA consensus sequences in *P. americana* are localized in the clade including the RDL subunits of eight insect species and not in the two others clades concerning LCCH3 and GRD subunits of GABA receptors. These *Pame1-short* and *Pame2-long* RDL subunit variants share 58% identity with the orthologous *D. melanogaster* whereas they are 82% identical to the RDL subunit partial sequence of the *B. germanica* RDL subunit and 77% and 75% to the orthologous *A. mellifera* and *L. striatellus* sequences, respectively. The 994-bp and 1051-bp cDNA consensus sequences leading to 331 and 350 amino-acids fragments stand for the region between the 6th exon in the N-terminal extracellular domain and the 4th transmembrane domain. The alternatively spliced variant detected in *P. americana* displays the exon 6d, as identified in many others insects species (ffrench-Constant et Rocheleau, 1993 ; Le Goff et coll., 2005 ; Eguchi et coll., 2006 ; Narusuye et coll., 2007). The absence of the A301S/G (ffrench-Constant et coll., 1993b) or the T350M (Le Goff et coll., 2005) mutations in the second and the third transmembrane domains, respectively, indicates that the two types of transcripts encode wild-type (fipronil-sensitive) RDL subunits. Predictive analysis of putative phosphorylation sites in the intracellular M3-M4 loop reveal that the serines in position 287 and 306 of the *Pame1-short* and *the Pame2-long* sequences, respectively (Fig. 6) might be phosphorylated by both PKC and CaMKII. In the longer version (*Pame2-long*), the 19-residues insertion contains another potential phosphorylation site for PKC and CaMKII (serine in position 276).

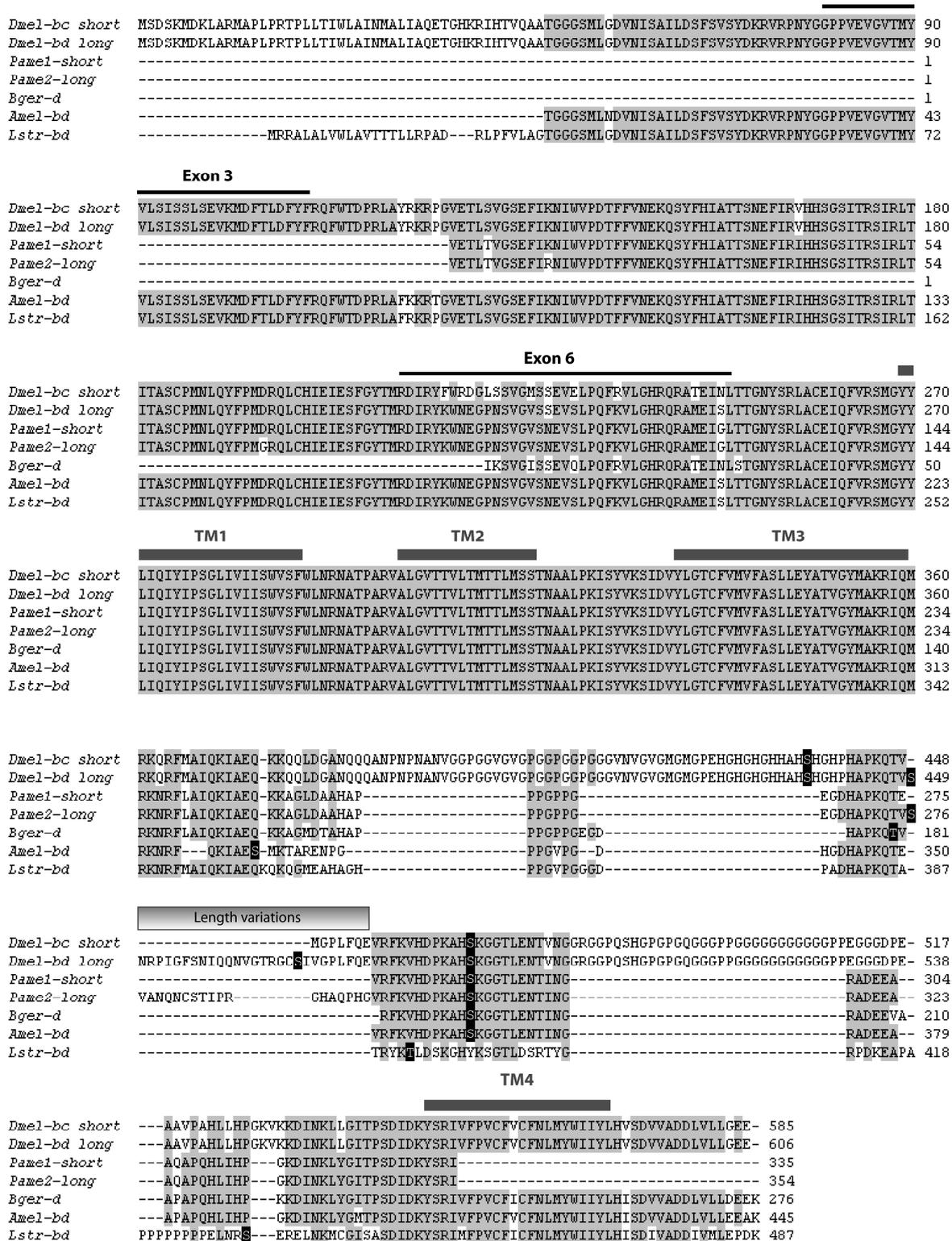


Figure 6. Protein sequence alignment of GABA receptors RDL subunits from *P. americana* (*Pame1-short*, *Pame2-long*), *D. melanogaster* (*Dmel-bc*: NP_729462; *Dmel-bd*: NP_523991), *B. germanica* (*Bger-d*: AAB33734), *A. mellifera* (*Amel-bd*: ABG75734) and *L. striatellus* (*Lstr-bd*: BAF31884). Conserved amino-acids appear in black font on grey back. Black and grey bars indicate the positions of the alternatively spliced exons 3 and 6 and of the transmembrane domains (TM1 – TM4), respectively. Note that the length of the box

indicated-region, which is localized in the intracellular loop between the 3rd and the 4th transmembrane domains, differ between short and long cDNA variants in *P. americana* as in *D. melanogaster*. Amino acids implicated in putative phosphorylation sites are in white font on black back.

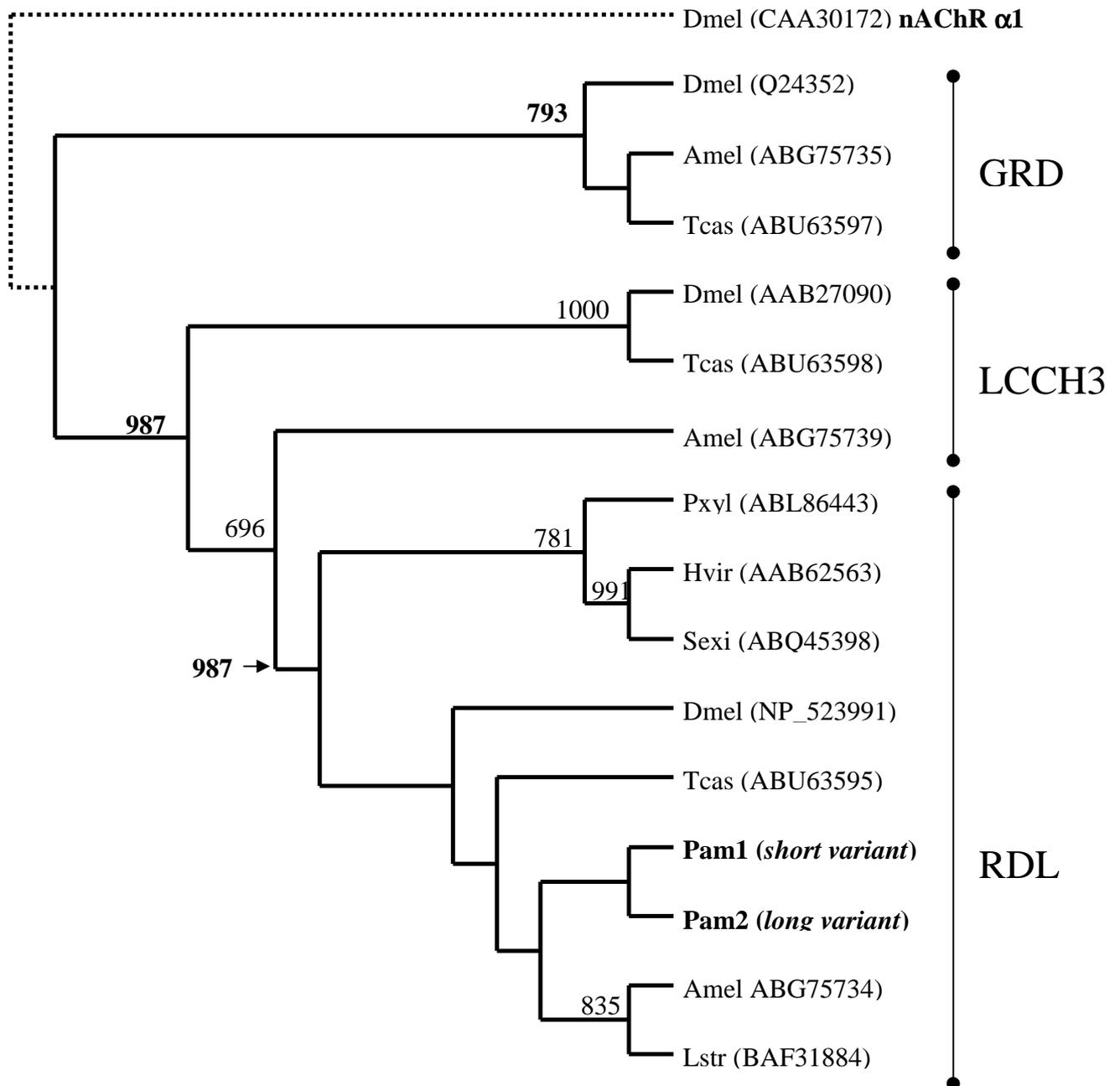


Figure 7. Phylogenetic analysis of the GABAR subunits RDL, GRD and LCCH3 amino-acids sequences of seven insect species, using maximum parsimony in 1000 replicates. The accession numbers used are : RDL (*Dmel*: NP_523991, *Amel*: ABG75734, *Lstr*: BAF31884, *Sexi*: ABQ45398, *Tcas*: ABU63595, *Hvir*: AAB62563, *Pxyl*: ABL86443), GRD (*Dmel*: Q24352, *Amel*: ABG75735, *Tcas*: ABU63597) and LCCH3 (*Dmel*: AAB270090, *Amel*: ABG75739, *Tcas*: ABU63598). *D. melanogaster* α1 subunit of nicotinic acetylcholine receptor (*Dmel* α1 nAChR) was used as an

outgroup. Bootstrap values greater than 50% are shown. Note that the shorter (*Pame1-short*) and the longer (*Pame2-long*) transcripts identified in *P. americana* cluster only with the RDL sequences of all insects.

Discussion

The present study reveals that two ionotropic GABARs expressed by insect neurosecretory cells (DUM neurons) are regulated by PKC phosphorylation, and that one of these receptors is controlled by a complex phosphorylation process that requires cooperation between PKC and CaMKII. Additionally, we show that the two GABARs are differentially sensitive to the insecticide fipronil and that phosphorylation strongly influences inhibition of GABA-induced currents by fipronil. Lastly, the RDL subunit identified in the cockroach nerve cord displays putative phosphorylation sites that may contribute to the complex effects of PKC and CaMKII observed in electrophysiological experiments.

PKC regulation of GABAR function in DUM neurons. Our experiments establish, for the first time, that PKC activation can lead to a nearly total block of GABA-induced currents in cockroach DUM neurons, thus evidencing that the two GABAR subtypes expressed in these cells are down-regulated by PKC. However, GABAR1 and GABAR2 do not display the same PKC sensitivity, as demonstrated by the selective block of GABAR2 at low PMA concentrations. Based on membrane capacitance measurements, the reduction of the GABA-induced currents is not related to a significant reduction in the membrane area of DUM neurons, but mainly reflects changes in the functional properties of the GABARs following PKC activation.

In vertebrates as in insects, three subgroups of PKCs have been characterized, namely conventional or classical PKCs (calcium- and DAG-dependent), novel PKCs (calcium-independent and DAG-dependent) and atypical PKCs (calcium- and DAG-independent). Because phorbol esters do not bind atypical PKCs (Newton, 2003), our data likely reflect activation of conventional PKCs (cPKCs) and/or novel PKCs (nPKCs). Our experiments show that the selective reduction of GABAR2-mediated current by 300nM PMA occurs at potentials where there is a calcium influx through resting TRP γ channels (Heine et Wicher, 1998 ; Wicher et coll., 2006). Then, it is likely that a cPKC is implicated in the down-regulation of GABAR2-mediated current. By contrast, GABAR1 down-regulation, which occurs in the absence of resting calcium influx and requires higher PMA concentrations, seems to involve a nPKC isoform. These assumptions are corroborated by a previous study

showing that, in cockroach DUM neurons, PMA preferentially activates cPKCs compared to nPKC isoforms (Courjaret et coll., 2003).

It is also tempting to postulate that the PKC inhibitor Gö6983 only blocked cPKCs at the concentration used, which explains why its inhibitory effect on IGABA was not statistically different from that induced by selective blockers of GABAR2 activity, like PMA (300nM) or KN-62 (Alix et coll., 2002). The fact that PKC inhibition by Gö6983 had the same effect as CaMKII inhibition by KN-62 also led us to suspect the existence of an interaction between these two kinases.

Interaction between PKC and CaMKII in regulating GABAR2 activity. At potentials more positive than -30mV, there is no interaction between the two kinases since, in the absence of Ca²⁺ influx, CaMKII is not activated (Alix et coll., 2002). At potentials more negative than -30mV, calcium entry through TRP γ channels allows activation of CaMKII, which results in up-regulation of GABAR2 activity (Alix et coll., 2002). The question which then arises is whether the stimulating effect of CaMKII on GABAR2 activity is direct or mediated by inhibition of the basal activity of PKC. Our observation that GABAR2 was no more activated by CaMKII when PKC was activated by PMA (Fig. 4) clearly indicates that CaMKII acts on GABAR2 via PKC inhibition.

Given that PKC inhibits GABAR2 activity, it is surprising that blockade of this enzyme by Gö6983 led to a decrease in IGABA amplitude (Fig. 3). Therefore, it is necessary to postulate that following blockade of PKC, GABAR2 is inhibited through another pathway. This pathway involves CaMKII, as demonstrated by the potentiation of IGABA when PKC block was followed by CaMKII inactivation. Therefore, it appears that CaMKII can influence GABAR2 activity via two regulation pathways, one of which has a potentiating effect (via inhibition of PKC), while the other is inhibitory (Fig. 8). If the inhibitory pathway was continuously operative, inhibition of PKC by Gö6983 should lead to a potentiation of IGABA through release of GABAR2 from PKC down-regulation. As IGABA amplitude is, on the contrary, decreased by Gö6983, one must conclude that the CaMKII inhibitory pathway appears only when the CaMKII-PKC potentiating pathway is not operative.

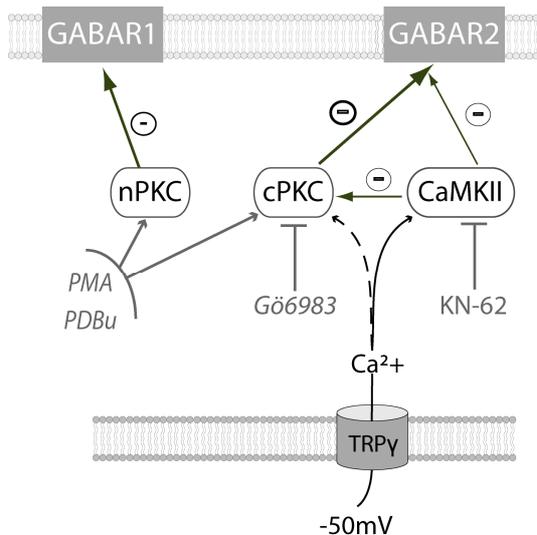


Figure 8. Hypothetical pattern of regulation of the two GABARs subtypes expressed in DUM neuron cell bodies. CaMKII influences GABAR2 activity via two regulation pathways, one of which has a potentiating effect (via inhibition of PKC), while the other is inhibitory. CaMKII is activated by calcium ions entering the cell via TRP γ channels at negative membrane potentials. GABAR1 is inhibited by a calcium independent PKC (nPKC).

Identification of RDL in *Periplaneta americana* nerve cord. The multiple alignment of several partial cDNA sequences reveals that two types of transcripts (*Pame1-short*, *Pame2-long*), are expressed in the nerve cord of *P.americana*. These transcripts differ in the length of their M3-M4 loop by 19 amino acids. A similar length variation is also present in *D. melanogaster*, (Fig.6), and in *A. mellifera* (Jones et coll., 2006). As in *D. melanogaster* it occurs in one exon, which corresponds to two exons in the shorter transcript, it is conceivable that the two types of RDL subunit transcripts in *P. americana* might originate from different splicing mechanisms. Indeed, the two exons arising from one exon would lead to a truncated sequence in a crucial region for the GABA receptor modulation, i.e. with numerous phosphorylation sites. This was observed in *A. mellifera*, where the shorter form creates a putative PKC phosphorylation site (Jones, 2006). PKC and CaMKII potential phosphorylation sites were predicted in *Pame1-short* and *Pame2-long* transcripts, which are highly relevant, considering our electrophysiological data. Noteworthy is the fact that a PKC/CaMKII phosphorylation pattern is inserted in the longer transcript, as it is the case for the longer form of the *D. melanogaster* RDL subunit (Fig. 6). This leads to the assumption that splicing might be a way to regulate phosphorylation. In agreement with this assumption, the mammalian $\gamma 2$ GABA_AR subunit displays alternative splicing, resulting in two splice variants, $\gamma 2S$ (short) and $\gamma 2L$ (long) which differ by the presence of a short insert (8 amino-acids) containing an additional PKC phosphorylation site (Machu et coll., 1993 ; Krishek et coll., 1994). In addition, mammalian $\beta 2$ subunits are also alternatively spliced, with the added sequence containing a CaMKII phosphorylation site motif (McKinley et coll., 1995).

Because the putative phosphorylation sites in the *P. americana* RDL subunit concern both PKC and CaMKII, it is conceivable that PKC binding at one of these sites in basal conditions might prevent CaMKII phosphorylation at the same site, which would explain why the direct negative control exerted by CaMKII on GABAR2 function appears only when PKC is inhibited. A very similar mechanism has already been reported in vertebrates, where two residues (Ser408/409) of GABA_AR β 3 subunit are phosphorylated by both PKA and PKC (Brandon et coll., 2002a). To determine whether RDL is involved in the complex cross-talk between PKC and CaMKII in the regulation of GABAR2 activity in cockroach DUM neurons, it will be of interest to study how these two kinases interfere with the activity of *Periplaneta americana* RDL receptors in expression systems.

Effect of intracellular regulation on fipronil sensitivity. The two GABAR subtypes expressed in DUM neuron cell bodies are not equally sensitive to fipronil, as suggested by the biphasic shape of the inhibition curve illustrating the effects of this insecticide on IGABA. The inhibitory effects of fipronil being reduced after selective block of GABAR2-mediated current by PKC activators/inhibitors, it appears that GABAR1 is less sensitive to fipronil than GABAR2. This way of regulating receptors sensitivity to insecticides has been reported for α -bungarotoxin-resistant nAChRs, which differ in their sensitivity to the neonicotinoid imidacloprid, depending on their phosphorylation state by a PKA-dependent pathway (Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany et coll., 2007). Our result confirm the importance of phosphorylation mechanisms as regulators of insecticide sensitivity in insect cells.

A differential sensitivity of DUM neuron GABAR subtypes to another insecticide, dieldrin, has previously been reported (Le Corrionc et coll., 2002). Although their fipronil sensitivity is different, the two somatic GABARs do not seem to differ in their sensitivity to dieldrin (Alix, 2001). To our knowledge, DUM neurons are the only cells in which several GABAR subtypes with distinct insecticide sensitivities have been described. Because RDL subunit is a major target of fipronil, it might be present in GABAR1 and/or GABAR2. In conclusion, we have shown that PKC activation profoundly inhibits GABA-induced responses in cockroach DUM neurons. By preferentially reducing the activity of the GABAR subtype that displays the highest sensitivity to fipronil, PKC also renders these neurons less responsive to fipronil. It would be of interest to know whether in natural environments cockroaches and other pests are able to adapt to insecticides by using phosphorylation processes like those described in our study.

Acknowledgments

Z. Es-Salah was supported by a doctoral fellowship of the Région des Pays de la Loire. We thank Sophie Quinchart for her helpful assistance.

Alix P. (2001). Contribution à l'étude des récepteurs ionotropes neuronaux du GABA chez l'insecte : cas particulier des "Dorsal Unpaired Median" neurones du système nerveux de la blatte *Periplaneta americana* L. PhD thesis. University of Angers.

Alix P., Grolleau F. and Hue B. (2002) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase regulates GABA-activated Cl⁻ current in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol* **87**, 2972-2982.

Bloomquist J. R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* **41**, 163-190.

Brandon N. J., Jovanovic J. N. and Moss S. J. (2002) Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* **94**, 113-122.

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.

Courjaret R., Grolleau F. and Lapied B. (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci* **17**, 2023-2034.

Dong K. (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* **7**, 17-30.

Eguchi Y., Ihara M., Ochi E., Shibata Y., Matsuda K., Fushiki S., Sugama H., Hamasaki Y., Niwa H., Wada M., Ozoe F. and Ozoe Y. (2006) Functional characterization of Musca glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Mol Biol* **15**, 773-783.

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.

Felsenstein J. (2001) *PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.6)*. Department of genetics. University of Washington, Seattle.

French-Constant R. H. and Rocheleau T. A. (1993) Drosophila gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem* **60**, 2323-2326.

French-Constant R. H., Steichen J. C., Rocheleau T. A., Aronstein K. and Roush R. T. (1993) A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in Drosophila populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1957-1961.

French-Constant R. H., Anthony N., Aronstein K., Rocheleau T. and Stilwell G. (2000) Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu Rev Entomol* **45**, 449-466.

Grunewald B. and Wersing A. (2008) An ionotropic GABA receptor in cultured mushroom body Kenyon cells of the honeybee and its modulation by intracellular calcium. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **194**, 329-340.

Hall T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.

Heine M. and Wicher D. (1998) Ca²⁺ resting current and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in insect neurosecretory neurons. *Neuroreport* **9**, 3309-3314.

Jones A. K., Raymond-Delpech V., Thany S. H., Gauthier M. and Sattelle D. B. (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* **16**, 1422-1430.

Krishek B. J., Xie X., Blackstone C., Haganir R. L., Moss S. J. and Smart T. G. (1994) Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* **12**, 1081-1095.

Lapied B., Le Corrionc H. and Hue B. (1989) Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology* **144**, 535-549.

Lavialle-Defaix C. (2005). Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodium dépendants du potentiel des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. PhD thesis. University of Angers.

- Le Corrionc H., Alix P. and Hue B. (2002) Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxinin. *J Insect Physiol* **48**, 419-431.
- Le Goff G., Hamon A., Berge J. B. and Amichot M. (2005) Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J Neurochem* **92**, 1295-1305.
- Machu T. K., Firestone J. A. and Browning M. D. (1993) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C phosphorylate a synthetic peptide corresponding to a sequence that is specific for the gamma 2L subunit of the GABAA receptor. *J Neurochem* **61**, 375-377.
- McKinley D. D., Lennon D. J. and Carter D. B. (1995) Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human beta 2 subunit of the GABAA receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **28**, 175-179.
- Narusuye K., Nakao T., Abe R., Nagatomi Y., Hirase K. and Ozoe Y. (2007) Molecular cloning of a GABA receptor subunit from *Laodelphax striatella* (Fallen) and patch clamp analysis of the homo-oligomeric receptors expressed in a *Drosophila* cell line. *Insect Mol Biol* **16**, 723-733.
- Newton A. C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **370**, 361-371.
- Page R. D. (1996) Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357-358.
- 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**, 119-133.
- Song M. and Messing R. O. (2005) Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci* **62**, 119-127.
- Thany S. H., Lenaers G., Raymond-Delpech V., Sattelle D. B. and Lapied B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 14-22.

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**, 4673-4680.

Watson G. B. and Salgado V. L. (2001) Maintenance of GABA receptor function of small-diameter cockroach neurons by adenine nucleotides. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 207-212.

Wicher D., Agricola H. J., Schonherr R., Heinemann S. H. and Derst C. (2006) TRPgamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *J Biol Chem* **281**, 3227-3236.

Xue Y., Li A., Wang L., Feng H. and Yao X. (2006) PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory. *BMC Bioinformatics* **7**, 163.

Résultats supplémentaires

Parce qu'il a été montré que l'activation de la PKC dans les ovocytes de xénope, exprimant des GABARs de mammifères, est à l'origine d'une endocytose des récepteurs, la même hypothèse pouvait être émise pour ce qui est des GABARs d'invertébrés. Afin de vérifier cette hypothèse, la capacité membranaire a été mesurée toutes les dix minutes. Le PDBu et le GABA sont appliqués par le bain. La chébérythrine est utilisée en prétraitement pendant trois heures, puis est co-appliquée avec le PDBu (figure 30).

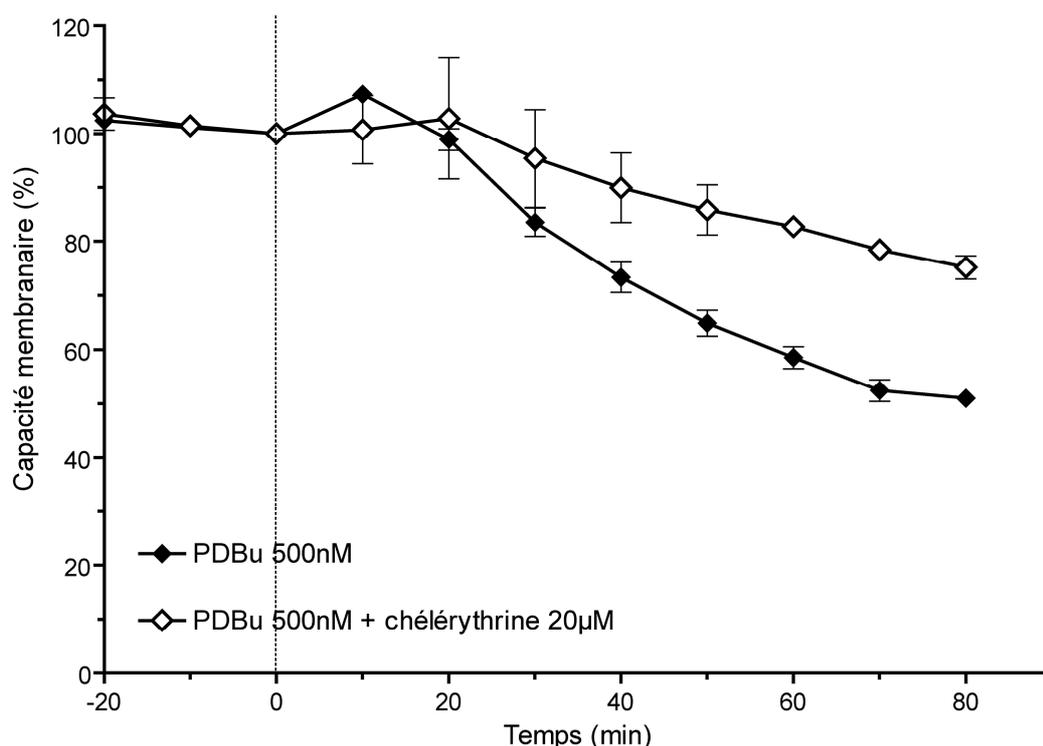


Figure 30 . Evolution en fonction du temps de la capacité membranaire d'ovocytes de xénope exprimant des récepteurs RDL, après une application de PDBu précédée ou non d'un prétraitement à la chébérythrine. La barre verticale indique le début de l'application du PDBu par le bain.

En présence de PDBu, la capacité membranaire décroît régulièrement, mis à part une légère augmentation de la capacité au cours des 10 premières minutes d'application du PDBu. La décroissance est significative après une heure d'application de l'activateur (paired t-test, $p < 0.0001$, $41,45 \pm 2\%$, $n=7$). Elle est significativement moins importante à $t=60$ minutes lorsque l'application du PDBu est précédée par un traitement à la chébérythrine (unpaired t-test, $p < 0.001$, PDBu : $41,45 \pm 2\%$; chébérythrine+PDBu : $17,25 \pm 1,3\%$). Le fait que la décroissance de la capacité membranaire (qui traduit une réduction progressive de la

surface membranaire) soit moins importante en présence de chébérythrine indique que ce phénomène est spécifiquement dépendant de la PKC.

Afin de déterminer si la réduction de la capacité membranaire est liée à une internalisation spécifique des GABARs, des expériences contrôles (avec le même protocole d'application du PDBu) ont été effectuées sur des ovocytes n'ayant pas reçu d'injections d'ARNm de la sous-unité RDL. Les résultats sont présentés dans la figure 31.

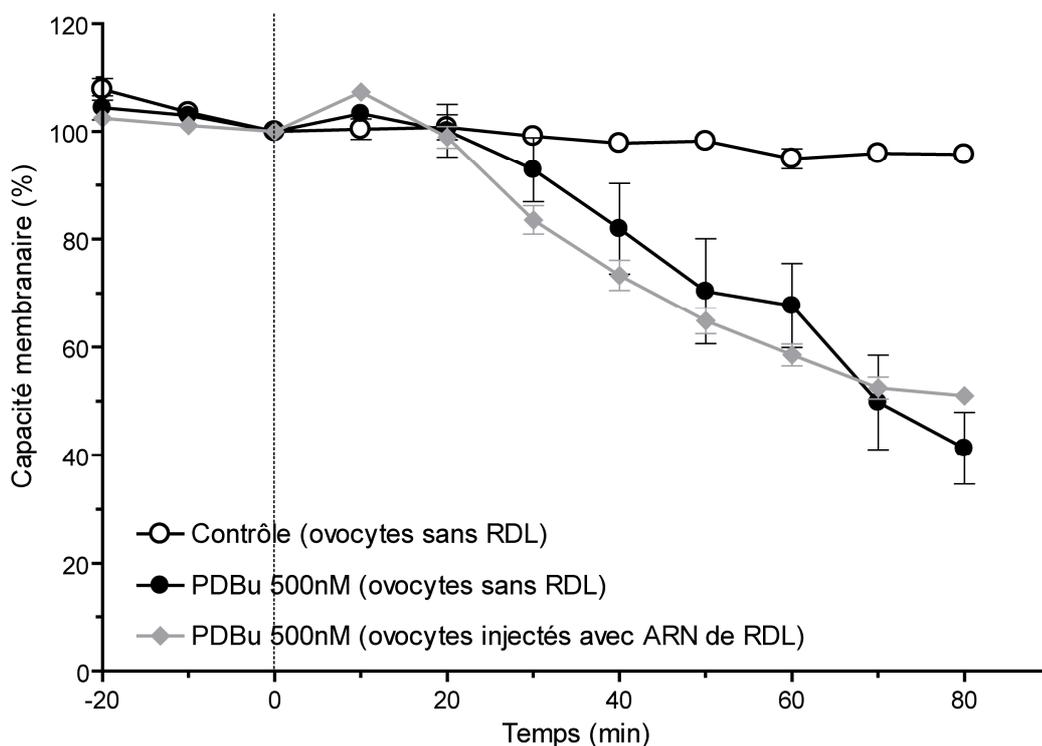


Figure 31 . Evolution en fonction du temps de la capacité membranaire d'ovocytes contrôles (points noirs) ou exprimant la sous-unité RDL (points gris), après activation de la PKC par le PDBu. Points blancs : capacité membranaire d'ovocytes contrôles, en l'absence de PDBu.

La comparaison d'ovocytes exposés ou non à du PDBu montre une réduction significativement plus importante 60 minutes après activation de la kinase (unpaired t-test, $p < 0.01$, contrôle : $5,11 \pm 1,9\%$, $n=4$; PDBu : $32,29 \pm 7,8 \%$, $n=3$). De plus, la comparaison d'ovocytes exposés au PDBu et exprimant ou non la sous-unité RDL montre une diminution de la capacité membranaire qui ne diffère pas significativement entre les deux lots ($p > 0.5$, sans RDL : $32,29 \pm 7,8\%$, $n=3$; avec RDL : $41,45 \pm 2\%$, $n=7$). Ces résultats démontrent de manière évidente que la réduction de surface membranaire induite par la PKC n'est pas liée à la présence de GABARs dans la membrane ovocytaire.

Les courants GABAeriques ont été mesurés en présence de PDBu ou de PDBu et chébérythrine (figure 32). Le protocole d'application des produits pharmacologiques est le même que celui utilisé pour la mesure de la capacité membranaire. Les résultats montrent une décroissance des courants GABAeriques dépendante de la PKC. L'activation de la kinase par le PDBu entraîne une réduction significative (unpaired t-test, $p < 0,01$) de IGABA après 40 minutes ($61,8 \pm 2,2\%$, $n=7$), moins importante après prétraitement par la chébérythrine ($37,9 \pm 5,7\%$, $n=3$).

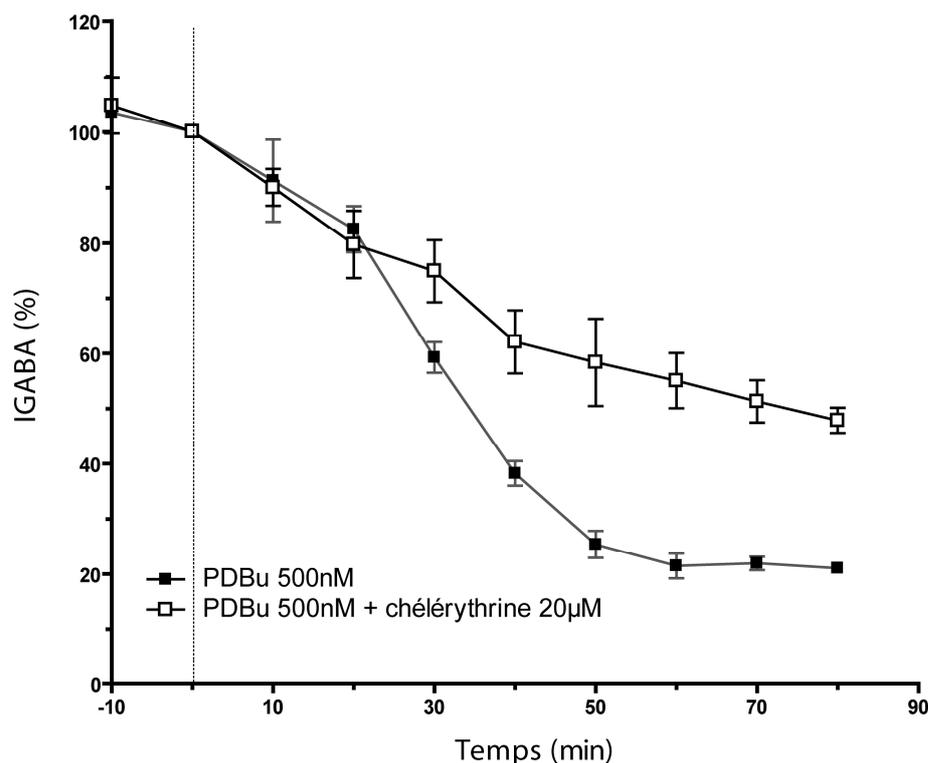


Figure 32 . Evolution du courant GABAerique après activation de la PKC par le PDBu, précédée ou non par une inhibition de la kinase par la chébérythrine.

Une comparaison de la cinétique de décroissance de IGABA et de la capacité membranaire (figure 33) montre que la réduction de IGABA commence dès l'application du PDBu, alors que la réduction de la capacité membranaire débute à $t=20$ minutes environ. Or la diminution du courant après 20 minutes d'application est déjà significative ($p < 0,01$, paired t-test). Cela suggère qu'une partie de la diminution de IGABA causée par la PKC est indépendante de l'internalisation membranaire. Cette réduction est ensuite accentuée par l'endocytose aspécifique, elle aussi causée par la PKC.

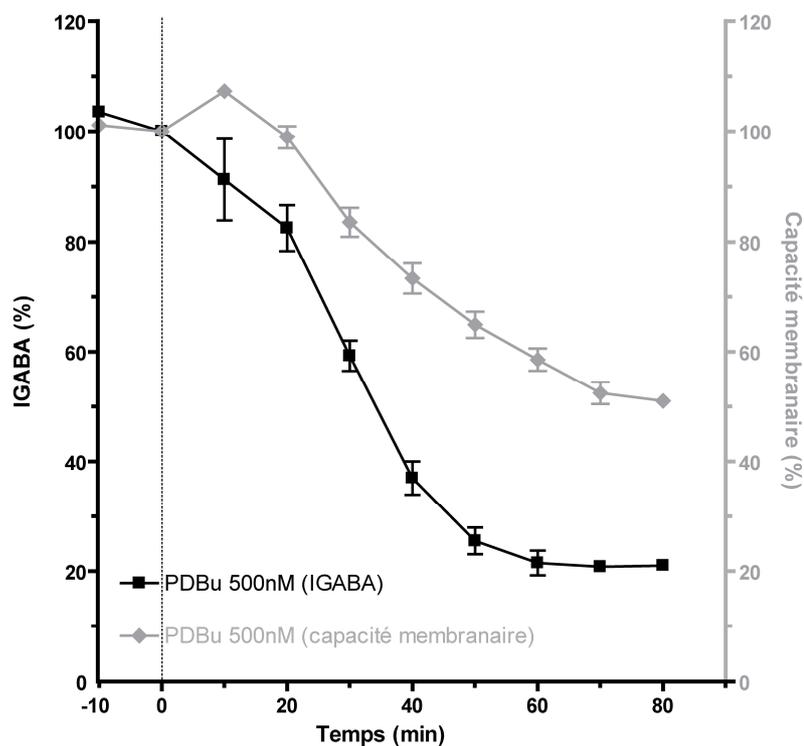


Figure 33 . Comparaison de l'évolution de IGABA et de la capacité membranaire en fonction du temps, dans le cas d'ovocytes exprimant la sous-unité RDL.

B.1 Clonage de la sous-unité RDL dans les neurones DUM

Les résultats présentés dans la publication 2 démontrent la présence de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de *P. americana*. Afin de compléter cette information, la figure 34 présente une partie de la séquence de cette protéine (depuis l'exon 3 jusqu'au domaine transmembranaire M3).

```

Dmel VLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAYRKRPGVETLSVGSEFIKNIWVPDTFFVNE
Lstr VLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAFKRKRPGVETLSVGSEFIKNIWVPDTFFVNE
Amel VLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAFKRTGVETLSVGSEFIKNIWVPDTFFVNE
Tcas VLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAFKRKRPGVETLSVGSEFIKNIWVPDTFFVNE
Pame VLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAFKRKRPGVETLSVGSEFIKNIWVPDTFFVNE

Dmel KQSYFHIATTSNEFIRVHHSITSIRSLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTM
Lstr KQSYFHIATTSNEFIRIHHSITSIRSLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTM
Amel KQSYFHIATTSNEFIRIHHSITSIRSLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTM
Tcas KQSYFHIATTSNEFIRIHHSITSIRSLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTM
Pame KQSYFHIATTSNEFIRIHHSITSIRSLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTM

Dmel RDIRYKWNNEGPNSVGVSSEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRSMGYY
Lstr RDIRYKWNNEGPNSVGVSNEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRSMGYY
Amel RDIRYKWNNEGPNSVGVSNEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRSMGYY
Tcas RDIRYKWNNEGPNSVGVSNEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRSMGYY
Pame RDIRYKWNNEGPNSVGVSNEVSLPQFKVLGHRQRAMEIGLTTGNYSRLACEIQFVRSMGYY

Dmel LIQIYIPSGLIVIIISWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSSTNAALPKISYVKSI
Lstr LIQIYIPSGLIVIIISWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSSTNAALPKISYVKSI
Amel LIQIYIPSGLIVIIISWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSSTNAALPKISYVKSI
Tcas LIQIYIPSGLIVIIISWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSSTNAALPKISYVKSI
Pame LIQIYIPSGLIVIIISWVGFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLMSSSTNAALPKISYVKSI

Dmel DVYLGTCFVMVFA
Lstr DVYLGTCFVMVFA
Amel DVYLGTCFVMVFA
Tcas DVYLGTCFVMVFA
Pame DVYLGTCFVMVFA

```

Figure 34 . Comparaison de séquences protéiques des sous-unités RDL de différentes espèces d'insectes avec celle obtenue dans les neurones DUM de *Periplaneta americana* ("Pame"). "Dmel" = *Drosophila melanogaster* (AAF50311) ; "Lstr" = *Laodelphax striatellus* (BAF31884) ; "Amel" = *Apis mellifera* (XP_001120292) ; "Tcas" = *Tribolium castaneum* (ABU63595). Les numéros d'accèsion (banque NCBI¹) sont indiqués entre parenthèses. Les acides aminés qui ne sont pas identiques pour toutes les séquences sont surmontés d'un astérisque. Les acides aminés codés par les exons 3 et 6 sont encadrés. Des traits gras indiquent les positions des domaines transmembranaires 1, 2 et 3.

La sous-unité RDL identifiée dans les neurones DUM est de type "bd". La comparaison de cette séquence avec celle des sous-unités RDLbd d'autres espèces montre une forte identité protéique dans cette région (98 à 99,2%).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>

C Discussion des résultats

C.1 Résultats concernant les GABARs des neurones DUM de *P. americana*

La publication 2 montre que, comme chez les vertébrés, les GABARs d'insectes sont régulés par la PKC, et que cette régulation aboutit à une inhibition de l'activité des récepteurs. Elle révèle également que les deux sous-types de GABARs présents dans les neurones DUM de la blatte *P. americana* ne sont pas régulés de la même manière, puisqu'une PKC nouvelle semble réguler négativement les GABAR1, alors que la régulation des GABAR2 dépend à la fois de la CaMKII et de la PKC. De plus, ces deux kinases n'agissent pas de façon indépendante sur les GABAR2 puisque la PKC est régulée négativement par la CaMKII. Les effets de la CaMKII sont eux-mêmes complexes, puisque cette enzyme influence l'activité des GABAR2 par deux voies différentes : une voie potentialisatrice passant par la PKC et une voie inhibitrice qui n'apparaît que lorsque la voie précédente est bloquée. La mise en jeu d'une kinase lorsqu'une autre a été bloquée est un phénomène qui a déjà été décrit chez les mammifères, notamment dans le cas des GABA_ARs, dont certaines sous-unités présentent des sérines pouvant être phosphorylées par plusieurs kinases. Par exemple les sérines conservées 409 (β 1 et β 3) et 410 (β 2) sont susceptibles d'être phosphorylées à la fois par la PKA, la PKC, la PKG et la CaMKII, et les sérines 327 et 343 des sous-unités γ 2 sont ciblées à la fois par la PKC et la CaMKII (Brandon et coll., 2002a). Dans des neurones de cortex cérébral de rat, les sérines 408 et 409 de β 3 sont phosphorylées de façon basale par la PKC, alors que la phosphorylation de ces résidus par la PKA ne se produit que si la PKC est inhibée (Brandon et coll., 2000). Il existe donc une "priorité" dans la phosphorylation, qui semble s'exercer dans ce cas au profit de la PKC. Cette même priorité de la PKC est constatée dans les neurones DUM, puisque pour observer l'effet inhibiteur de la CaMKII, il est nécessaire de bloquer la PKC.

En outre, notre travail montre que les deux GABARs des neurones DUM ne présentent pas la même sensibilité à l'insecticide fipronil. Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par une composition différente en sous-unités. La PKC rend les neurones DUM nettement moins sensibles au fipronil, par un mécanisme faisant intervenir une inhibition de l'activité du récepteur le plus sensible, à savoir le GABAR2.

Enfin, la sous-unité RDL a été clonée pour la première fois chez la blatte américaine, à partir de la chaîne nerveuse. Tous les transcrits détectés correspondent à l'isoforme d'épissage RDLbd, ne possèdent pas de sites édités, et sont de type sauvage puisqu'ils ne contiennent pas les mutations en A301 et en T350. Ces caractéristiques permettent aux récepteurs contenant cette sous-unité d'être dépourvus de résistance au fipronil. De plus, des transcrits de RDL ont aussi été identifiés dans les neurones DUM, suggérant une implication de cette sous-unité dans la composition d'un ou de plusieurs sous-types de GABAR de ces neurones. Les sites potentiels de phosphorylation par la PKC et la CaMKII, qui ont été identifiés dans la boucle M3-M4 de cette sous-unité, pourraient contribuer aux effets complexes de la PKC et de la CaMKII observés dans les neurones DUM. Enfin, il est à noter que dans certains cas l'insertion d'une séquence de dix-neuf résidus possède un site potentiel de phosphorylation par la PKC et la CaMKII. Un parallèle peut être fait avec la sous-unité $\gamma 2$ des GABARs de vertébrés, qui subit l'épissage alternatif d'un exon codant pour huit acides aminés. L'isoforme longue obtenue ($\gamma 2L$) possède un site supplémentaire de phosphorylation par la PKC et la CaMKII (Machu et coll., 1993). Ainsi, il serait intéressant de déterminer l'organisation génomique du gène *Rdl* de *P. americana*, afin d'apporter une explication à cette insertion.

C.2 Résultats concernant les récepteurs RDL de drosophile exprimés dans des ovocytes de xénope

Une étude des effets de la PKC sur des récepteurs RDL de drosophile exprimés dans des ovocytes de xénope pouvait sembler séduisante dans la mesure où les sous-unités de ces récepteurs recombinants peuvent être modifiées par mutagenèse dirigée. Cela peut permettre de déterminer quels résidus précis sont impliqués dans les effets de la PKC et de

vérifier si ces résidus modulent la sensibilité au fipronil. Malheureusement, il est apparu qu'en présence d'activateurs de la PKC, les ovocytes de xénope sont sujets à une endocytose membranaire aspécifique, qui entraîne une réduction des courants GABAergiques, gênant considérablement l'analyse des effets directs de la PKC sur les récepteurs exprimés.

De tels effets aspécifiques de la PKC ont également été signalés par d'autres auteurs, suite à l'expression de divers récepteurs et canaux dans des ovocytes. Ainsi, lorsque des ovocytes exprimant des canaux sodiques épithéliaux sont traités par du PMA, la capacité membranaire augmente transitoirement, puis diminue. Comme le PMA exerce des effets semblables sur des ovocytes non injectés, il apparaît qu'il s'agit d'effets non spécifiques (Awayda, 2000). Une autre étude portant sur des récepteurs GABA_A de souris montre que l'augmentation de conductance induite par le GABA est brièvement potentialisée puis inhibée en présence de PMA. Bien que l'inhibition soit clairement réduite après mutation de tous les sites connus de phosphorylation par la PKC, la potentialisation est toujours observée, indiquant un effet GABAR-aspécifique de la PKC (Krishek et coll., 1994). Une étude récente montre que ce type d'effets n'est pas limité aux ovocytes, puisque dans des cellules HEK293, l'activation de la PKC par le PMA est à l'origine d'une internalisation et d'une séquestration non seulement des protéines membranaires, mais aussi des lipides membranaires (Idkowiak-Baldys et coll., 2006).

Une interprétation possible des variations de la capacité membranaire des ovocytes en présence de PMA a été apportée par des études au microscope électronique de l'évolution du cortex ovocytaire après stimulation de la PKC. Suite à cette stimulation, les granules corticaux (vésicules de sécrétion localisées sous la membrane plasmique), subissent une exocytose (Bement et Capco, 1989). Cela peut expliquer l'augmentation de la capacité membranaire. Après libération de leur contenu, ces granules se referment et forment de larges endosomes (de taille identique ou supérieure à celle des granules corticaux) (Bement et coll., 2000), ce qui pourrait expliquer la diminution de la capacité membranaire. Ces variations induites par la PKC sont dues au fait que la kinase est directement impliquée dans la maturation des ovocytes (Laurent et coll., 1988).

Les études consacrées à la régulation par la PKC de GABARs exprimés dans des ovocytes de xénope n'ont pas toujours été accompagnées de contrôles permettant de vérifier la spécificité des effets de la PKC sur les récepteurs étudiés (Chapell et coll., 1998 ; Kusama et coll., 2000). Des effets spécifiques ont toutefois été montrés par différents auteurs.

Ainsi, dans l'étude de Krishek et coll. (1994), la mutation de toutes les sérines susceptibles d'être phosphorylées par la PKC empêche cette kinase de réduire les réponses au GABA. De plus, l'internalisation des GABARs induite par la PKC semble spécifique de ces récepteurs. En effet, l'utilisation de récepteurs GABAergiques fusionnés à la GFP ("green fluorescent protein") montre une internalisation des GABARs membranaires, associée à une diminution du courant. Or, dans des ovocytes exprimant des nAChRs, l'amplitude des courants induits par la carbamylcholine n'est pas réduite après application de PMA (Filippova et coll., 2000), indiquant que les nAChRs ne sont pas internalisés. Aucune explication satisfaisante ne peut actuellement rendre compte des contradictions apparentes entre ces résultats et ceux, comme les nôtres, qui mettent en évidence une internalisation non spécifique en présence de phorbol esters. Ces contradictions, ainsi que l'absence d'internalisation des GABARs natifs par la PKC ((Brandon et coll., 2000) et figure 2b de la publication 2) nous ont conduit à délaisser les études de phosphorylation de GABARs recombinants et à focaliser nos efforts sur la phosphorylation des GABARs natifs.

Pour pouvoir reprendre les études sur la régulation des récepteurs homomériques RDL par la PKC, il sera nécessaire d'utiliser d'autres systèmes d'expression, comme les cellules S2 de drosophile (Millar et coll., 1994 ; Buckingham et coll., 1996 ; Grolleau et Sattelle, 2000).

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de montrer l'importance de facteurs pouvant moduler les effets des insecticides, autres que les mutations ponctuelles des récepteurs cibles ou les résistances métaboliques.

Les résultats obtenus mettent en évidence :

- l'implication de l'édition R122>G de l'ARNm de la sous-unité RDL comme modulateur de la sensibilité au GABA, au même titre que l'épissage alternatif,
- l'implication de cette édition dans la réduction de la sensibilité des récepteurs RDL au fipronil,
- une régulation complexe par phosphorylation des deux GABARs présents sur le soma des neurones DUM de la blatte *P. americana*. Dans le cas des GABAR2, cette régulation implique les sérine-thréonine kinases PKC et CaMKII. Le récepteur GABAR1 est inhibé par une PKC, mais cette inhibition semble indépendante du calcium,
- une différence de sensibilité au fipronil entre les récepteurs GABAR1 et GABAR2,
- la présence du transcrite de la sous-unité RDL dans le système nerveux de *Periplaneta americana*, ainsi qu'à l'échelle cellulaire, dans les neurones DUM de cet insecte. Cette sous-unité pourrait donc participer à la composition des GABAR1 et/ou GABAR2. La présence dans cette sous-unité de sites potentiels de phosphorylation par la PKC et la CaMKII est d'un grand intérêt, si l'on se réfère aux études électrophysiologiques,
- l'insertion d'une séquence protéique de dix-neuf acides aminés, dans la boucle M3-M4 de l'un des deux isoformes de la sous-unité RDL, possédant un site potentiel de phosphorylation pour la PKC et la CaMKII.

Le fait que l'édition puisse modifier la sensibilité des GABARs aux insecticides est un élément nouveau. Les éditions de type U→C sont à l'origine de résistance aux pyrethrinoïdes des canaux sodium des insectes (Xu et coll., 2006a, 2006b). L'édition R122>G est de type A→I, et par conséquent, tous les types d'édition de l'ARN peuvent potentiellement être impliqués dans la modulation de la sensibilité aux insecticides.

Concernant la régulation des GABARs d'invertébrés, elle implique à la fois la PKC (ces travaux), la CaMKII ((Alix et coll., 2002) et ces travaux), la PKA (Watson, 2001 ; Watson et Salgado, 2001) mais aussi une autre kinase encore indéterminée (Grunewald et Wersing, 2008). Les travaux réalisés au cours de cette thèse permettent de confirmer la complexité de ces régulations chez les insectes, au même titre que chez les mammifères, où il est fait mention de compétition entre plusieurs kinases pour phosphoryler un même site (Brandon et coll., 2002a).

L'implication des phénomènes de phosphorylation dans la modulation d'effets d'insecticides a déjà été rapportée pour l'imidaclopride qui cible un sous-type de nAChRs de blatte (Courjaret et Lapied, 2001), et pour l'indoxacarbe qui agit sur les canaux sodiques (Lavialle-Defaix, 2005). En ce qui concerne les travaux présentés dans ce manuscrit, ils ne peuvent permettre de conclure que la sensibilité des neurones DUM au fipronil est diminuée par activation d'une PKC. La réduction des effets du fipronil est plutôt liée au fait que sous l'influence de la PKC, le récepteur le plus sensible à l'insecticide (GABAR2) devient non fonctionnel. La composition en sous-unités des GABARs d'insectes étant encore très imprécise, il est difficile pour le moment de comprendre l'origine de sensibilité différente des GABAR1 et des GABAR2 aux insecticides

Perspectives

Les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse pourront être complétés de plusieurs manières. Par mutagenèse dirigée, il sera possible de déterminer les effets des autres éditions de l'ARNm de la sous-unité RDL I283V, N294D et M360V, à la fois sur la sensibilité des récepteurs aux agonistes et sur leurs réponses aux insecticides. En combinant ces éditions entre elles ou avec les mutations A301S/G et/ou T350M, d'éventuels effets synergiques pourront également être détectés. De même, ces éditions (et notamment l'édition R122G) peuvent être associées à différentes isoformes épissées de RDL, puisque l'épissage alternatif peut moduler la sensibilité des récepteurs RDL aux agonistes (Hosie et Sattelle, 1996a ; Hosie et coll., 2001). Cela permettrait d'évaluer quel type d'isoforme de la sous-unité RDL est le moins sensible aux agonistes, et donc probablement le moins sensible aux antagonistes (Es-Salah et coll., 2008).

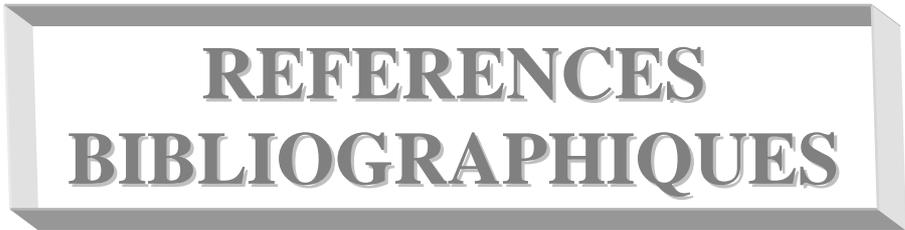
Les données concernant la phosphorylation des GABARs peuvent être complétées par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'isotypes de PKC. Ainsi, il serait

possible de vérifier la nature des PKC (classiques, nouvelles ou atypiques) impliquées dans la régulation du fonctionnement des GABARs des neurones DUM. De plus, cela permettrait de bloquer les GABAR1 de manière spécifique et de confirmer que les GABAR2 sont plus sensibles à l'insecticide. A plus long terme, le clonage des sous-unités constituant ces récepteurs sera d'un apport certain pour une meilleure connaissance des phénomènes de régulation des GABARs des neurones DUM. Il sera en effet possible, par mutagenèse dirigée et expression hétérologue des sous-unités, seules ou en combinaison, de déterminer si la phosphorylation par la PKC et la CaMKII sont directes ou font intervenir des protéines accessoires. De plus, si la phosphorylation est directe, les sous-unités impliquées seraient caractérisées. Dans ce cas, l'outil d'expression ne devra pas être l'ovocyte de xénope, du fait des effets aspécifiques de la PKC sur ces cellules (cf. chapitre "Résultats"), mais peut être par exemple les cellules S2 (lignée Schneider) de drosophile (Millar et coll., 1994 ; Buckingham et coll., 1996 ; Grolleau et Sattelle, 2000) ou les cellules Sf21 de *Spodoptera frugiperda* (Lee, H. J. et coll., 1993), qui ont déjà été utilisées pour l'expression fonctionnelle de la sous-unité RDL.

Les travaux menés au cours de cette thèse laissent supposer que la régulation intracellulaire peut être un mécanisme d'adaptation des insectes, comme cela avait été suggéré précédemment (Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany et coll., 2007). Des applications à long terme peuvent être envisagées. Les baculovirus sont des virus à ADN qui peuvent infecter de nombreuses espèces d'insectes, comme les moustiques. Un projet mené au laboratoire a pour objectif l'insertion dans le génome viral d'un gène codant pour des kinases (ou phosphatases). Tenant compte des résultats de cette thèse, une telle approche serait envisageable pour suractiver des récepteurs plus sensibles à un insecticide donné, au détriment de récepteurs moins sensibles.

La détermination de la présence de la sous-unité RDL dans les neurones DUM (cf. chapitre "Résultats") laisse supposer son implication dans la constitution des GABAR1 et/ou GABAR2. Pour tester cette hypothèse, il est envisageable d'empêcher l'expression du gène *Rdl* ("gene silencing"), soit par modification génique soit par dégradation des transcrits (en utilisant les techniques de l'ARN interférent ou ARN anti-sens, par exemple). Ces techniques se sont déjà révélées efficaces pour le blocage d'expression de sous-unités de GABA_ARs de vertébrés (Burt, 2003) ou de GABA_BRs de drosophiles (Dzitoyeva et coll., 2003). De plus, l'insertion des dix-neuf résidus dans la boucle M3-M4 de la sous-unité RDL

de la blatte américaine possède un site potentiel de phosphorylation par la PKC et par la CaMKII. La caractérisation de l'organisation génomique pourrait expliquer cette insertion, observée aussi chez *D. melanogaster*.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Toutes les adresses de sites internet citées dans ce manuscrit ont été consultées durant la période comprise entre juillet et octobre 2008.

- Absalom, N. L., Lewis, T. M., Kaplan, W., Pierce, K. D. et Schofield, P. R.** (2003). Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* **278**(50): 50151-7.
- ACTA** (2005). Index phytosanitaire Association de coordination technique agricole.
- Agosto, J., Choi, J. C., Parisky, K. M., Stilwell, G., Rosbash, M. et Griffith, L. C.** (2008). Modulation of GABAA receptor desensitization uncouples sleep onset and maintenance in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **11**(3): 354-9.
- Aguayo, L. G., Espinoza, F., Kunos, G. et Satin, L. S.** (1998). Effects of intracellular calcium on GABAA receptors in mouse cortical neurons. *Pflugers Arch* **435**(3): 382-7.
- Aidley, D. J.** (1998). The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press.
- Alam, M. S., Huang, J., Ozoe, F., Matsumura, F. et Ozoe, Y.** (2007). Synthesis, 3D-QSAR, and docking studies of 1-phenyl-1H-1,2,3-triazoles as selective antagonists for beta3 over alpha1beta2gamma2 GABA receptors. *Bioorg Med Chem* **15**(15): 5090-104.
- Aliouane, Y., Kacimi El Hassani, A., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M. et Gauthier, M.** (2008). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem*: 1.
- Alix, P.** (2001) "Contribution à l'étude des récepteurs ionotropes neuronaux du GABA chez l'insecte : cas particulier des "Dorsal Unpaired Median" neurones du système nerveux de la blatte *Periplaneta americana* L. PhD thesis."University of Angers
- Alix, P., Grolleau, F. et Hue, B.** (2002). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase regulates GABA-activated Cl⁻ current in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol* **87**(6): 2972-82.
- Amin, J. et Weiss, D. S.** (1993). GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**(6455): 565-9.
- Aronstein, K., Auld, V. et Ffrench-Constant, R.** (1996). Distribution of two GABA receptor-like subunits in the *Drosophila* CNS. *Invert Neurosci* **2**(2): 115-20.
- Aronstein, K. et ffrench-Constant, R.** (1995). Immunocytochemistry of a novel GABA receptor subunit Rdl in *Drosophila melanogaster*. *Invert Neurosci* **1**(1): 25-31.
- Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R. et Seale, B.** (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* **187**(1): 35-9.
- Awayda, M. S.** (2000). Specific and nonspecific effects of protein kinase C on the epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol* **115**(5): 559-70.

- Aydar, E. et Beadle, D. J.** (1999). The pharmacological profile of GABA receptors on cultured insect neurones. *J Insect Physiol* **45**(3): 213-219.
- Aydar, E., Taylor, A. R., Beadle, D. J. et Bermudez, I.** (1995). A novel electropharmacological profile of insect GABA receptors. *Journal of Physiology* **483**: 190-191.
- Bai, D. et Sattelle, D.** (1995). A GABAB receptor on an identified insect motor neurone. *J Exp Biol* **198**(Pt 4): 889-94.
- Balduzzi, R., Cupello, A., Diaspro, A., Ramoino, P. et Robello, M.** (2001). Confocal microscopic study of GABA(A) receptors in *Xenopus* oocytes after rat brain mRNA injection: modulation by tyrosine kinase activity. *Biochim Biophys Acta* **1539**(1-2): 93-100.
- Bamber, B. A., Beg, A. A., Twyman, R. E. et Jorgensen, E. M.** (1999). The *Caenorhabditis elegans* unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci* **19**(13): 5348-59.
- Bamber, B. A., Richmond, J. E., Otto, J. F. et Jorgensen, E. M.** (2005). The composition of the GABA receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* **144**(4): 502-9.
- Barbara, G. S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M. et Grunewald, B.** (2005). Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **191**(9): 823-36.
- Bargmann, C. I.** (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**(5396): 2028-33.
- Basemore, A. W., Elliot, K. A. et Florey, E.** (1957). Isolation of factor I. *J Neurochem* **1**(4): 334-9.
- Bass, B. L.** (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* **71**: 817-46.
- Bass, C., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L. M. et Williamson, M. S.** (2004). Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Manag Sci* **60**(12): 1157-62.
- Beg, A. A. et Jorgensen, E. M.** (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat Neurosci* **6**(11): 1145-52.
- Belelli, D., Callachan, H., Hill-Venning, C., Peters, J. A. et Lambert, J. J.** (1996). Interaction of positive allosteric modulators with human and *Drosophila* recombinant GABA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Br J Pharmacol* **118**(3): 563-76.

- Bement, W. M., Benink, H., Mandato, C. A. et Swelstad, B. B.** (2000). Evidence for direct membrane retrieval following cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes and eggs. *J Exp Zool* **286**(7): 767-75.
- Bement, W. M. et Capco, D. G.** (1989). Activators of protein kinase C trigger cortical granule exocytosis, cortical contraction, and cleavage furrow formation in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* **108**(3): 885-92.
- Ben-Ari, Y.** (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**(9): 728-39.
- Bettler, B. et Tiao, J. Y.** (2006). Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther* **110**(3): 533-43.
- Birnir, B., Tierney, M. L., Dalziel, J. E., Cox, G. B. et Gage, P. W.** (1997a). A structural determinant of desensitization and allosteric regulation by pentobarbitone of the GABAA receptor. *J Membr Biol* **155**(2): 157-66.
- Birnir, B., Tierney, M. L., Lim, M., Cox, G. B. et Gage, P. W.** (1997b). Nature of the 5' residue in the M2 domain affects function of the human alpha 1 beta 1 GABAA receptor. *Synapse* **26**(3): 324-7.
- Bloomquist, J. R.** (1996). Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* **41**: 163-90.
- Bloomquist, J. R.** (2001). GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Ishaaya, I. Springer-Verlag Berlin: 17-41.
- Bloomquist, J. R.** (2003). Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol* **54**(4): 145-56.
- Boileau, A. J., Evers, A. R., Davis, A. F. et Czajkowski, C.** (1999). Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **19**(12): 4847-54.
- Brandon, N. J., Delmas, P., Kittler, J. T., McDonald, B. J., Sieghart, W., Brown, D. A., Smart, T. G. et Moss, S. J.** (2000). GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**(49): 38856-62.
- Brandon, N. J., Jovanovic, J. N. et Moss, S. J.** (2002a). Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* **94**(1-2): 113-22.
- Brandon, N. J., Jovanovic, J. N., Smart, T. G. et Moss, S. J.** (2002b). Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* **22**(15): 6353-61.

- Brandon, N. J., Uren, J. M., Kittler, J. T., Wang, H., Olsen, R., Parker, P. J. et Moss, S. J.** (1999). Subunit-specific association of protein kinase C and the receptor for activated C kinase with GABA type A receptors. *J Neurosci* **19**(21): 9228-34.
- Braun, A. P. et Schulman, H.** (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* **57**: 417-45.
- Braunig, P. et Pfluger, H.-J.** (2001). The unpaired median neurons of insect. *Adv Insect Physiol* **28**: 185-266.
- Brotz, T. M., Bochenek, B., Aronstein, K., Ffrench-Constant, R. H. et Borst, A.** (1997). gamma-Aminobutyric acid receptor distribution in the mushroom bodies of a fly (*Calliphora erythrocephala*): a functional subdivision of Kenyon cells? *J Comp Neurol* **383**(1): 42-8.
- Brown, N. H. et Kafatos, F. C.** (1988). Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol* **203**(2): 425-37.
- Brun, L. O., Stuart, J., Gaudichon, V., Aronstein, K. et French-Constant, R. H.** (1995). Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9861-5.
- Buckingham, S. D., Biggin, P. C., Sattelle, B. M., Brown, L. A. et Sattelle, D. B.** (2005). Insect GABA receptors: splicing, editing and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol* **68**: 942-951.
- Buckingham, S. D., Hosie, A. M., Roush, R. L. et Sattelle, D. B.** (1994). Actions of agonists and convulsant antagonists on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (Rdl) homo-oligomer expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* **181**(1-2): 137-40.
- Buckingham, S. D., Matsuda, K., Hosie, A. M., Baylis, H. A., Squire, M. D., Lansdell, S. J., Millar, N. S. et Sattelle, B.** (1996). Wild-type and insecticide-resistant homo-oligomeric GABA receptors of *Drosophila melanogaster* stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1393-401.
- Buczowski, G. et Schal, C.** (2001a). Emetophagy: Fipronil-induced regurgitation of bait and its dissemination from German cockroach adults to nymphs. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **71**: 147-155.
- Buczowski, G. et Schal, C.** (2001b). Method of insecticide delivery affects horizontal transfer of fipronil in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* **94**(3): 680-5.
- Burt, D. R.** (2003). Reducing GABA receptors. *Life Sci* **73**(14): 1741-58.
- Chapell, R., Bueno, O. F., Alvarez-Hernandez, X., Robinson, L. C. et Leidenheimer, N. J.** (1998). Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **273**(49): 32595-601.

- Chebib, M.** (2004). GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**(11): 800-4.
- Chen, L., Durkin, K. A. et Casida, J. E.** (2006a). Spontaneous mobility of GABAA receptor M2 extracellular half relative to noncompetitive antagonist action. *J Biol Chem* **281**(50): 38871-8.
- Chen, L., Durkin, K. A. et Casida, J. E.** (2006b). Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5185-90.
- Chen, L., Wang, H., Vicini, S. et Olsen, R. W.** (2000). The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11557-62.
- Chen, R., Belelli, D., Lambert, J. J., Peters, J. A., Reyes, A. et Lan, N. C.** (1994). Cloning and functional expression of a Drosophila gamma-aminobutyric acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 6069-73.
- Christensen, T. A., Waldrop, B. R. et Hildebrand, J. G.** (1998). Multitasking in the olfactory system: context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single olfactory projection neurons. *J Neurosci* **18**(15): 5999-6008.
- Churn, S. B. et DeLorenzo, R. J.** (1998). Modulation of GABAergic receptor binding by activation of calcium and calmodulin-dependent kinase II membrane phosphorylation. *Brain Res* **809**(1): 68-76.
- Churn, S. B., Rana, A., Lee, K., Parsons, J. T., De Blas, A. et Delorenzo, R. J.** (2002). Calcium/calmodulin-dependent kinase II phosphorylation of the GABAA receptor alpha1 subunit modulates benzodiazepine binding. *J Neurochem* **82**(5): 1065-76.
- Ci, S., Ren, T. et Su, Z.** (2008). Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABA A receptor using molecular modeling. *Protein J* **27**(2): 71-8.
- Cole, L. M., Nicholson, R. L. et Casida, J. E.** (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic Biochem Physiol* **46**(1): 47-54.
- Cole, L. M., Roush, R. T. et Casida, J. E.** (1995). Drosophila GABA-gated chloride channel: modified [3H]EBOB binding site associated with Ala-->Ser or Gly mutants of Rdl subunit. *Life Sci* **56**(10): 757-65.
- Connolly, C. N., Kittler, J. T., Thomas, P., Uren, J. M., Brandon, N. J., Smart, T. G. et Moss, S. J.** (1999). Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J Biol Chem* **274**(51): 36565-72.

- Courjaret, R., Grolleau, F. et Lapied, B.** (2003). Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci* **17**(10): 2023-34.
- Courjaret, R. et 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**(1): 80-91.
- Cromer, B. A., Morton, C. J. et Parker, M. W.** (2002). Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci* **27**(6): 280-7.
- Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Paress, P. S., Van der Ploeg, L. H., Schaeffer, J. M. et Arena, J. P.** (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **371**(6499): 707-11.
- D'Hulst, C., De Geest, N., Reeve, S. P., Van Dam, D., De Deyn, P. P., Hassan, B. A. et Kooy, R. F.** (2006). Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res* **1121**(1): 238-45.
- Dalziel, J. E., Birnir, B., Everitt, A. B., Tierney, M. L., Cox, G. B. et Gage, P. W.** (1999). A threonine residue in the M2 region of the beta1 subunit is needed for expression of functional alpha1beta1 GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **370**(3): 345-8.
- Davies, P. A., Kirkness, E. F. et Hales, T. G.** (1997). Modulation by general anaesthetics of rat GABAA receptors comprised of alpha 1 beta 3 and beta 3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol* **120**(5): 899-909.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S. et Pham-Delegue, M. H.** (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* **48**(2): 242-50.
- Del Castillo, J., De Mello, W. C. et Morales, T.** (1964). Inhibitory action of gamma-aminobutyric acid (GABA) on *Ascaris* muscle. *Experientia* **20**(3): 141-3.
- Denholm, I., Devine, G. J. et Williamson, M. S.** (2002). Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science* **297**(5590): 2222-3.
- Dent, J. A.** (2006). Evidence for a diverse Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily in early bilateria. *J Mol Evol* **62**(5): 523-35.
- Dillon, G. H., Im, W. B., Carter, D. B. et McKinley, D. D.** (1995). Enhancement by GABA of the association rate of picrotoxin and tert-butylbicyclophosphorothionate to the rat cloned alpha 1 beta 2 gamma 2 GABAA receptor subtype. *Br J Pharmacol* **115**(3): 539-45.
- Dittman, J. S. et Kaplan, J. M.** (2008). Behavioral impact of neurotransmitter-activated G-protein-coupled receptors: muscarinic and GABAB receptors regulate *Caenorhabditis elegans* locomotion. *J Neurosci* **28**(28): 7104-12.

- Dong, K.** (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* **7**(1): 17-30.
- Du, W., Awolola, T. S., Howell, P., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Benedict, M. Q., Coetzee, M. et Zheng, L.** (2005). Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Mol Biol* **14**(2): 179-83.
- Dubreil, V.** (1996) "Contribution à l'étude électrophysiologique des systèmes GABAergiques régulateurs de l'activité des neurones "DUM" du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*". Angers
- Dubreil, V., Hue, B. et Pelhate, M.** (1995). Outward chloride/potassium co-transport in insect neurosecretory cells (DUM neurones). *Comp Biochem Physiol A Physiol* **111**(2): 263-70.
- Dubreil, V., Lapied, B. et Hue, B.** (1993). GABA receptor subtypes in Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons of the insect central nervous system. *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Loeb, A. B. B. e. M. J. CRC Press: 335-338.
- Dubreil, V., Sinakevitch, I. G., Hue, B. et Geffard, M.** (1994). Neuritic GABAergic synapses in insect neurosecretory cells. *Neurosci Res* **19**(2): 235-40.
- Durham, E. W., Siegfried, B. D. et Scharf, M. E.** (2002). In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Pest Manag Sci* **58**(8): 799-804.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N. et Manev, H.** (2003). Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5485-90.
- Eguchi, Y., Ihara, M., Ochi, E., Shibata, Y., Matsuda, K., Fushiki, S., Sugama, H., Hamasaki, Y., Niwa, H., Wada, M., et coll.** (2006). Functional characterization of *Musca* glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Mol Biol* **15**(6): 773-83.
- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M. et Armengaud, C.** (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* **82**(1): 30-9.
- Enz, R. et Cutting, G. R.** (1999). GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci* **11**(1): 41-50.
- Es-Salah, Z., Lapied, B., Le Goff, G. et Hamon, A.** (2008). RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. *Neuroreport* **19**(9): 939-43.
- Etter, A., Cully, D. F., Liu, K. K., Reiss, B., Vassilatis, D. K., Schaeffer, J. M. et Arena, J. P.** (1999). PicROTOXIN blockade of invertebrate glutamate-gated chloride channels:

- subunit dependence and evidence for binding within the pore. *J Neurochem* **72**(1): 318-26.
- Feliubadalo, V., Belles** (1996). Morphology and protein pattern of the accessory glands of male *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *European Journal of Entomology* **93**: 211-221.
- Felsenstein, J.** (2001). PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.6). Department of genetics. University of Washington.
- Feng, X. P., Hayashi, J., Beech, R. N. et Prichard, R. K.** (2002). Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin. *J Neurochem* **83**(4): 870-8.
- ffrench-Constant, R. H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T. et Stilwell, G.** (2000). Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu Rev Entomol* **45**: 449-66.
- ffrench-Constant, R. H., Daborn, P. J. et Le Goff, G.** (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**(3): 163-70.
- ffrench-Constant, R. H., Mortlock, D. P., Shaffer, C. D., MacIntyre, R. J. et Roush, R. T.** (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7209-13.
- ffrench-Constant, R. H. et Rocheleau, T.** (1992). *Drosophila* cyclodiene resistance gene shows conserved genomic organization with vertebrate gamma-aminobutyric acidA receptors. *J Neurochem* **59**(4): 1562-5.
- ffrench-Constant, R. H. et Rocheleau, T. A.** (1993). *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene *Rdl* shows extensive alternative splicing. *J Neurochem* **60**(6): 2323-6.
- ffrench-Constant, R. H., Rocheleau, T. A., Steichen, J. C. et Chalmers, A. E.** (1993a). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* **363**(6428): 449-51.
- ffrench-Constant, R. H., Steichen, J. C., Rocheleau, T. A., Aronstein, K. et Roush, R. T.** (1993b). A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1957-61.
- Filippova, N., Dudley, R. et Weiss, D. S.** (1999). Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human rho1 GABAC receptors. *J Physiol* **518** (Pt 2): 385-99.
- Filippova, N., Sedelnikova, A., Zong, Y., Fortinberry, H. et Weiss, D. S.** (2000). Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **57**(5): 847-56.

-
- Gally, C. et Bessereau, J. L.** (2003a). [C. elegans: of neurons and genes]. *Med Sci (Paris)* **19**(6-7): 725-34.
- Gally, C. et Bessereau, J. L.** (2003b). GABA is dispensable for the formation of junctional GABA receptor clusters in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **23**(7): 2591-9.
- Gant, D. B., Chalmers, A. E., A., W. M., B., H. H. et F., B. D.** (1998). Fipronil: action at the GABA receptor. Pesticides and the Future: Minimizing Chronic Exposure of Humans and the Environment IOS Press: 147-156.
- Gao, J. R., Deacutis, J. M. et Scott, J. G.** (2007). The nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 6 from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect Mol Biol* **16**(3): 325-34.
- Gisselmann, G., Plonka, J., Pusch, H. et Hatt, H.** (2004). *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Br J Pharmacol* **142**(3): 409-13.
- Goutman, J. D. et Calvo, D. J.** (2004). Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA rho 1 receptor. *Br J Pharmacol* **141**(4): 717-27.
- Grauso, M., Reenan, R. A., Culetto, E. et Sattelle, D. B.** (2002). Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, D α 5, D α 6 and D α 7, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics* **160**(4): 1519-33.
- Grolleau, F. et 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. *J Exp Biol* **203**(Pt 11): 1633-48.
- Grolleau, F. et Sattelle, D. B.** (2000). Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Br J Pharmacol* **130**(8): 1833-42.
- Grunewald, B. et Wersing, A.** (2008). An ionotropic GABA receptor in cultured mushroom body Kenyon cells of the honeybee and its modulation by intracellular calcium. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **194**(4): 329-40.
- Grutter, T., de Carvalho, L. P., Dufresne, V., Taly, A., Edelstein, S. J. et Changeux, J. P.** (2005). Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18207-12.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. et Marbaix, G.** (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**(5316): 177-82.
- Gurley, D., Amin, J., Ross, P. C., Weiss, D. S. et White, G.** (1995). Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABA A channel that abolish block by picrotoxin. *Receptors Channels* **3**(1): 13-20.

- Gyenes, M., Farrant, M. et Farb, D. H.** (1988). "Run-down" of gamma-aminobutyric acidA receptor function during whole-cell recording: a possible role for phosphorylation. *Mol Pharmacol* **34**(6): 719-23.
- Hainzl, D. et Casida, J. E.** (1996). Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 12764-7.
- Hainzl, D., Cole, L. M. et Casida, J. E.** (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem Res Toxicol* **11**(12): 1529-35.
- Hall, T.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. et Sigworth, F. J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hanrahan, C. J., Palladino, M. J., Ganetzky, B. et Reenan, R. A.** (2000). RNA editing of the *Drosophila* para Na(+) channel transcript. Evolutionary conservation and developmental regulation. *Genetics* **155**(3): 1149-60.
- Hansen, K. K., Kristensen, M. et Jensen, K. M.** (2005). Correlation of a resistance-associated Rdl mutation in the German cockroach, *Blattella germanica* (L), with persistent dieldrin resistance in two Danish field populations. *Pest Manag Sci* **61**(8): 749-53.
- Harney, S. C., Frenguelli, B. G. et Lambert, J. J.** (2003). Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology* **45**(6): 873-83.
- Harrison, J. B., Chen, H. H., Sattelle, E., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Rauh, J. J., Bai, D. et Sattelle, D. B.** (1996). Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* **284**(2): 269-78.
- Harvey, R. J., Schmitt, B., Hermans-Borgmeyer, I., Gundelfinger, E. D., Betz, H. et Darlison, M. G.** (1994). Sequence of a *Drosophila* ligand-gated ion-channel polypeptide with an unusual amino-terminal extracellular domain. *J Neurochem* **62**(6): 2480-3.
- Harvey, R. J., Vreugdenhil, E., Zaman, S. H., Bhandal, N. S., Usherwood, P. N., Barnard, E. A. et Darlison, M. G.** (1991). Sequence of a functional invertebrate GABAA receptor subunit which can form a chimeric receptor with a vertebrate alpha subunit. *Embo J* **10**(11): 3239-45.
- Heine, M. et Wicher, D.** (1998). Ca²⁺ resting current and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in insect neurosecretory neurons. *Neuroreport* **9**(14): 3309-14.

- Hekmat-Safe, D. S., Lundy, M. Y., Ranga, R. et Tanouye, M. A.** (2006). Mutations in the K⁺/Cl⁻ cotransporter gene kazachoc (kcc) increase seizure susceptibility in *Drosophila*. *J Neurosci* **26**(35): 8943-54.
- Henderson, J. E., Soderlund, D. M. et Knipple, D. C.** (1993). Characterization of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor beta subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **193**(2): 474-82.
- Hirata, K., Ishida, C., Eguchi, Y., Sakai, K., Ozoe, F., Ozoe, Y. et Matsuda, K.** (2008). Role of a serine residue (S278) in the pore-facing region of the housefly L-glutamate-gated chloride channel in determining sensitivity to noncompetitive antagonists. *Insect Mol Biol* **17**(4): 341-50.
- Hodge, C. W., Mehmert, K. K., Kelley, S. P., McMahon, T., Haywood, A., Olive, M. F., Wang, D., Sanchez-Perez, A. M. et Messing, R. O.** (1999). Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat Neurosci* **2**(11): 997-1002.
- Hodge, C. W., Raber, J., McMahon, T., Walter, H., Sanchez-Perez, A. M., Olive, M. F., Mehmert, K., Morrow, A. L. et Messing, R. O.** (2002). Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J Clin Invest* **110**(7): 1003-10.
- Hollands, E. C., Sewagudde D. N., Virginio, C. S., Powell, A. J., Clare, J. J., Dale, T. J. et Trezise, D. J.** (2007). Population patch clamp analysis of human recombinant GABAA $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ channels using IonWorks Quattro. Proceedings of the physiological society, Proc Life Sciences, PC191.
- Hoopengardner, B., Bhalla, T., Staber, C. et Reenan, R.** (2003). Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* **301**(5634): 832-6.
- Horoszok, L., Raymond, V., Sattelle, D. B. et Wolstenholme, A. J.** (2001). GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol* **132**(6): 1247-54.
- Hosie, A. M., Aronstein, K., Sattelle, D. B. et ffrench-Constant, R. H.** (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci* **20**(12): 578-83.
- Hosie, A. M., Baylis, H. A., Buckingham, S. D. et Sattelle, D. B.** (1995a). Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and- resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* **115**(6): 909-12.
- Hosie, A. M., Buckingham, S. D., Presnail, J. K. et Sattelle, D. B.** (2001). Alternative splicing of a *Drosophila* GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neuroscience* **102**(3): 709-14.
- Hosie, A. M. et Sattelle, D. B.** (1996a). Agonist pharmacology of two *Drosophila* GABA receptor splice variants. *Br J Pharmacol* **119**(8): 1577-85.

- Hosie, A. M. et Sattelle, D. B.** (1996b). Allosteric modulation of an expressed homo-oligomeric GABA-gated chloride channel of *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* **117**(6): 1229-37.
- Hosie, A. M., Shirai, Y., Buckingham, S. D., Rauh, J. J., Roush, R. T., Baylis, H. A. et Sattelle, D. B.** (1995b). Blocking actions of BIDN, a bicyclic dinitrile convulsant compound, on wild-type and dieldrin-resistant GABA receptor homo-oligomers of *Drosophila melanogaster* expressed in *Xenopus oocytes*. *Brain Res* **693**(1-2): 257-60.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E. et Smart, T. G.** (2007). Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**(1): 7-19.
- Houston, C. M., Hosie, A. M. et Smart, T. G.** (2008). Distinct regulation of beta2 and beta3 subunit-containing cerebellar synaptic GABAA receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* **28**(30): 7574-84.
- Houston, C. M. et Smart, T. G.** (2006). CaMK-II modulation of GABA(A) receptors expressed in HEK293, NG108-15 and rat cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* **24**(9): 2504-14.
- Hoyle, G.** (1974). A function for neurons (DUM) neurosecretory on skeletal muscle of insects. *J Exp Zool* **189**(3): 401-6.
- Huang, C. S., Ma, J. Y., Marszalec, W. et Narahashi, T.** (1996). Effects of the nootropic drug nefiracetam on the GABAA receptor-channel complex in dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* **35**(9-10): 1251-61.
- Huang, C. S. et Narahashi, T.** (1997). The role of phosphorylation in the activity and mercury modulation of GABA-induced currents in rat neurons. *Neuropharmacology* **36**(11-12): 1631-40.
- Hue, B.** (1991). Functional assay for GABA receptor subtypes of a cockroach giant interneuron. *Arch Insect Biochem Physiol* **18**(3): 147-57.
- Hue, B. et Amat, C.** (1997). Activation of picrotoxin-resistant GABA receptors by GABA and related compounds induces modulation of cockroach dorsal paired median (DPM) neuron firing. *J Insect Physiol* **43**(12): 1125-1131.
- Hutton, M. L., Harvey, R. J., Earley, F. G., Barnard, E. A. et Darlison, M. G.** (1993). A novel invertebrate GABAA receptor-like polypeptide. Sequence and pattern of gene expression. *FEBS Lett* **326**(1-3): 112-6.
- Idkowiak-Baldys, J., Becker, K. P., Kitatani, K. et Hannun, Y. A.** (2006). Dynamic sequestration of the recycling compartment by cPKC. *J Biol Chem*.
- Ihara, M., Ishida, C., Okuda, H., Ozoe, Y. et Matsuda, K.** (2005). Differential blocking actions of 4'-ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate (EBOB) and gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-HCH) on gamma-aminobutyric acid- and glutamate-induced responses of American cockroach neurons. *Invert Neurosci* **5**(3-4): 157-64.

- Ikeda, T., Nagata, K., Kono, Y., Yeh, J. Z. et Narahashi, T.** (2004). Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents. *Pest Manag Sci* **60**(5): 487-92.
- Ikeda, T., Zhao, X., Kono, Y., Yeh, J. Z. et Narahashi, T.** (2003). Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. *Neurotoxicology* **24**(6): 807-15.
- Ikeda, T., Zhao, X., Nagata, K., Kono, Y., Shono, T., Yeh, J. Z. et Narahashi, T.** (2001). Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **296**(3): 914-21.
- Inoue, M. et Akaike, N.** (1988). Blockade of gamma-aminobutyric acid-gated chloride current in frog sensory neurons by picrotoxin. *Neurosci Res* **5**(5): 380-94.
- Jansen, A., Hoepfner, M., Herzig, K. H., Riecken, E. O. et Scherubl, H.** (2000). GABA(C) receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. *Pflugers Arch* **441**(2-3): 294-300.
- Janssen, D., Derst, C., Buckinx, R., Van den Eynden, J., Rigo, J. M. et Van Kerkhove, E.** (2007). Dorsal unpaired median neurons of locusta migratoria express ivermectin- and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels. *J Neurophysiol* **97**(4): 2642-50.
- Jensen, M. L., Timmermann, D. B., Johansen, T. H., Schousboe, A., Varming, T. et Ahring, P. K.** (2002). The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor. *J Biol Chem* **277**(44): 41438-47.
- Jones, A. K., Raymond-Delpech, V., Thany, S. H., Gauthier, M. et Sattelle, D. B.** (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* **16**(11): 1422-30.
- Jones, A. K. et Sattelle, D. B.** (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* **8**(1): 327.
- Jones, A. K. et Sattelle, D. B.** (2008). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci* **8**(1): 41-7.
- Jowett, T., Huan, J. Y. et Murray, S.** (1997). Drug resistance in insects. Molecular Genetics of Drug Resistance CRC Press: 180.
- Ju, X. L., Hao, Y. L., Pei, J. F. et Ozoe, Y.** (2007). Investigation of structural requirements for inhibitory activity at the rat and housefly picrotoxinin binding sites in ionotropic GABA receptors using DISCOtech and CoMFA. *Chemosphere* **69**(6): 864-71.
- Kalueff, A. V.** (2007). Mapping convulsants' binding to the GABA-A receptor chloride ionophore: a proposed model for channel binding sites. *Neurochem Int* **50**(1): 61-8.
- Kamijima, M. et Casida, J. E.** (2000). Regional modification of [(3)H]Ethynylbicycloorthobenzoate binding in mouse brain GABA(A) receptor by endosulfan, fipronil, and avermectin B(1a). *Toxicol Appl Pharmacol* **163**(2): 188-94.

- Kash, T. L., Trudell, J. R. et Harrison, N. L.** (2004). Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt3): 540-6.
- Krishek, B. J., Xie, X., Blackstone, C., Huganir, R. L., Moss, S. J. et Smart, T. G.** (1994). Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* **12**(5): 1081-95.
- Kullmann, D. M., Ruiz, A., Rusakov, D. M., Scott, R., Semyanov, A. et Walker, M. C.** (2005). Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol* **87**(1): 33-46.
- Kumar, S., Khisti, R. T. et Morrow, A. L.** (2005). Regulation of native GABAA receptors by PKC and protein phosphatase activity. *Psychopharmacology (Berl)* **183**(2): 241-7.
- Kusama, T., Hatama, K., Saito, K., Kizawa, Y. et Murakami, H.** (2000). Activation of protein kinase C induces internalization of the GABA(C) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Physiol* **50**(4): 429-35.
- Kusama, T., Hatama, K., Sakurai, M., Kizawa, Y., Uhl, G. R. et Murakami, H.** (1998). Consensus phosphorylation sites of human GABA(c)/GABA ρ receptors are not critical for inhibition by protein kinase C activation. *Neurosci Lett* **255**(1): 17-20.
- Kusano, K., Miledi, R. et Stinnakre, J.** (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol* **328**: 143-70.
- Lapied, B., Le Corrionc, H. et Hue, B.** (1989). Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology* **144**(1): 535-549.
- Laurent, A., Basset, M., Doree, M. et Le Peuch, C. J.** (1988). Involvement of a calcium-phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* **226**(2): 324-30.
- Lavialle-Defaix, C.** (2005) "Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodium dépendants du potentiel des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. PhD thesis."University of Angers
- Lavialle-Defaix, C., Gautier, H., Defaix, A., Lapied, B. et 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): 2437-50.
- Law, R. J. et Lightstone, F. C.** (2008). Gaba receptor insecticide non-competitive antagonists may bind at allosteric modulator sites. *Int J Neurosci* **118**(5): 705-34.
- Le Corrionc, H., Alix, P. et Hue, B.** (2002). Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxinin. *J Insect Physiol* **48**(4): 419-431.

- Le Corrond, H. et Hue, B.** (1999). A native picrotoxin-resistant GABA-gated chloride channel receptor subtype in cockroach neurons. *Pest Sci* **55**: 1007-1011.
- Le Goff, G.** (2001) "Etude des mécanismes de résistance développés par une souche de *Drosophila simulans* contre un insecticide, le fipronil ".Nice Sophia-Antipolis
- Le Goff, G., Hamon, A., Berge, J. B. et Amichot, M.** (2005). Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J Neurochem* **92**(6): 1295-305.
- Lee, D., Su, H. et O'Dowd, D. K.** (2003). GABA receptors containing Rdl subunits mediate fast inhibitory synaptic transmission in *Drosophila* neurons. *J Neurosci* **23**(11): 4625-34.
- Lee, H. J., Rocheleau, T., Zhang, H. G., Jackson, M. B. et French-Constant, R. H.** (1993). Expression of a *Drosophila* GABA receptor in a baculovirus insect cell system. Functional expression of insecticide susceptible and resistant GABA receptors from the cyclodiene resistance gene Rdl. *FEBS Lett* **335**(3): 315-8.
- Leidenheimer, N. J. et Chapell, R.** (1997). Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA(A) receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **52**(2): 173-81.
- Leidenheimer, N. J., Whiting, P. J. et Harris, R. A.** (1993). Activation of calcium-phospholipid-dependent protein kinase enhances benzodiazepine and barbiturate potentiation of the GABAA receptor. *J Neurochem* **60**(5): 1972-5.
- Leite, J. F. et Cascio, M.** (2001). Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. *Mol Cell Neurosci* **17**(5): 777-92.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, H., Yan, Y. et Li, Y.** (2008). Identification and expression of GABAC receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(8): 761-7.
- Li, X., Huang, Q., Yuan, J. et Tang, Z.** (2007). Fipronil resistance mechanisms in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **89**(3): 169-174.
- Lin, Y. F., Angelotti, T. P., Dudek, E. M., Browning, M. D. et Macdonald, R. L.** (1996). Enhancement of recombinant alpha 1 beta 1 gamma 2L gamma-aminobutyric acidA receptor whole-cell currents by protein kinase C is mediated through phosphorylation of both beta 1 and gamma 2L subunits. *Mol Pharmacol* **50**(1): 185-95.
- Littleton, J. T. et Ganetzky, B.** (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* **26**(1): 35-43.
- Liu, X., Krause, W. C. et Davis, R. L.** (2007). GABAA receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron* **56**(6): 1090-102.

- Ludmerer, S. W., Warren, V. A., Williams, B. S., Zheng, Y., Hunt, D. C., Ayer, M. B., Wallace, M. A., Chaudhary, A. G., Egan, M. A., Meinke, P. T., et coll.** (2002). Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated Rdl and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits. *Biochemistry* **41**(20): 6548-60.
- Lummis, S. C. et Sattelle, D. B.** (1985). Insect central nervous system gamma-aminobutyric acid. *Neurosci Lett* **60**(1): 13-8.
- Luscher, B. et Keller, C. A.** (2004). Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* **102**(3): 195-221.
- Machu, T. K., Firestone, J. A. et Browning, M. D.** (1993). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C phosphorylate a synthetic peptide corresponding to a sequence that is specific for the gamma 2L subunit of the GABAA receptor. *J Neurochem* **61**(1): 375-7.
- Malécot, C. O. et Sattelle, D. B.** (1990). Single-channel recordings from insect neuronal GABA-activated chloride channels. *J Exp Biol* **151**: 495-501.
- McDonald, B. J., Amato, A., Connolly, C. N., Benke, D., Moss, S. J. et Smart, T. G.** (1998). Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* **1**(1): 23-8.
- McDonald, B. J. et Moss, S. J.** (1997). Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology* **36**(10): 1377-85.
- McKinley, D. D., Lennon, D. J. et Carter, D. B.** (1995). Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human beta 2 subunit of the GABAA receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **28**(1): 175-9.
- Mezler, M., Muller, T. et Raming, K.** (2001). Cloning and functional expression of GABA(B) receptors from *Drosophila*. *Eur J Neurosci* **13**(3): 477-86.
- Miledi, R., Parker, I. et Sumikawa, K.** (1982). Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **216**(1205): 509-15.
- Millar, N. S., Buckingham, S. D. et Sattelle, D. B.** (1994). Stable expression of a functional homo-oligomeric *Drosophila* GABA receptor in a *Drosophila* cell line. *Proc Biol Sci* **258**(1353): 307-14.
- Miyazaki, M., Matsumura, F. et Beeman, R. W.** (1995). DNA sequence and site of mutation of the GABA receptor of cyclodiene-resistant red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **111**(3): 399-406.

- Moon, C., Fraser, S. P. et Djamgoz, M. B.** (2000). Protein kinase and phosphatase modulation of quail brain GABA(A) and non-NMDA receptors co-expressed in *Xenopus oocytes*. *Cell Signal* **12**(2): 105-12.
- Moss, S. J., Doherty, C. A. et Huganir, R. L.** (1992a). Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *J Biol Chem* **267**(20): 14470-6.
- Moss, S. J. et Smart, T. G.** (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 240-50.
- Moss, S. J., Smart, T. G., Blackstone, C. D. et Huganir, R. L.** (1992b). Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science* **257**(5070): 661-5.
- Nagata, K., Hamilton, B. J., Carter, D. B. et Narahashi, T.** (1994). Selective effects of dieldrin on the GABAA receptor-channel subunits expressed in human embryonic kidney cells. *Brain Res* **645**(1-2): 19-26.
- Nagata, K. et Narahashi, T.** (1994). Dual action of the cyclodiene insecticide dieldrin on the gamma-aminobutyric acid receptor-chloride channel complex of rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **269**(1): 164-71.
- Narahashi, T.** (1995). Dieldrin and lindane modulation of GABA receptor-channel complex. *Molecular action of insecticides on ion channels (Livre)*.
- Narusuye, K., Nakao, T., Abe, R., Nagatomi, Y., Hirase, K. et Ozoe, Y.** (2007). Molecular cloning of a GABA receptor subunit from *Laodelphax striatella* (Fallen) and patch clamp analysis of the homo-oligomeric receptors expressed in a *Drosophila* cell line. *Insect Mol Biol* **16**(6): 723-33.
- Nayeem, N., Green, T. P., Martin, I. L. et Barnard, E. A.** (1994). Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* **62**(2): 815-8.
- Neher, E. et Sakmann, B.** (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**(5554): 799-802.
- Neumann, R., Lees, G., Beadle, D. J. et Benson, J. A.** (1987). Responses to GABA and other neurotransmitters in insect central neuronal somata in vitro. Sites of action for neurotoxic pesticides. Society, A. C.: 25-43.
- Newland, C. F. et Cull-Candy, S. G.** (1992). On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *J Physiol* **447**: 191-213.
- Newton, A. C.** (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* **370**(Pt 2): 361-71.

- Nishizuka, Y.** (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB* **9**: 484–496.
- Nusser, Z., Sieghart, W. et Somogyi, P.** (1998). Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **18**(5): 1693-703.
- O'Dowd, D. K., Gee, J. R. et 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): 4005-12.
- Oh, S., Jang, C. G., Ma, T. et Ho, I. K.** (1999). Activation of protein kinase C by phorbol dibutyrate modulates GABA_A receptor binding in rat brain slices. *Brain Res* **850**(1-2): 158-65.
- Ohlson, J., Pedersen, J. S., Haussler, D. et Ohman, M.** (2007). Editing modifies the GABA(A) receptor subunit alpha3. *Rna* **13**(5): 698-703.
- Olsen, R. W. et Tobin, A. J.** (1990). Molecular biology of GABA_A receptors. *Faseb J* **4**(5): 1469-80.
- Ozoe, Y. et Akamatsu, M.** (2001). Non-competitive GABA antagonists: probing the mechanisms of their selectivity for insect versus mammalian receptors. *Pest Manag Sci* **57**(10): 923-31.
- Page, R. D.** (1996). Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Palladino, M. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A. et Reenan, R. A.** (2000). A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell* **102**(4): 437-49.
- Perret, P., Sarda, X., Wolff, M., Wu, T. T., Bushey, D. et Goeldner, M.** (1999). Interaction of non-competitive blockers within the gamma-aminobutyric acid type A chloride channel using chemically reactive probes as chemical sensors for cysteine mutants. *J Biol Chem* **274**(36): 25350-4.
- Qian, H., Pan, Y., Zhu, Y. et Khalili, P.** (2005). Picrotoxin accelerates relaxation of GABAC receptors. *Mol Pharmacol* **67**(2): 470-9.
- Ratra, G. S. et Casida, J. E.** (2001). GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett* **122**(3): 215-22.
- Ratra, G. S., Erkkila, B. E., Weiss, D. S. et Casida, J. E.** (2002). Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. *Toxicol Lett* **129**(1-2): 47-53.
- Ratra, G. S., Kamita, S. G. et Casida, J. E.** (2001). Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**(3): 233-40.

- Rauh, J. J., Benner, E., Schnee, M. E., Cordova, D., Holyoke, C. W., Howard, M. H., Bai, D., Buckingham, S. D., Hutton, M. L., Hamon, A., et coll.** (1997). Effects of [3H]-BIDN, a novel bicyclic dinitrile radioligand for GABA-gated chloride channels of insects and vertebrates. *Br J Pharmacol* **121**(7): 1496-505.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B. M., Rauh, J. J. et Sattelle, D. B.** (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci* **5**(3-4): 119-33.
- Raymond, V. et Sattelle, D. B.** (2002). Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat Rev Drug Discov* **1**(6): 427-36.
- Raymond, V., Sattelle, D. B. et Lapied, B.** (2000). Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport* **11**(12): 2695-701.
- Richmond, J. E. et Jorgensen, E. M.** (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **2**(9): 791-7.
- Roberts, T. R. et Hutson, D. H.** (1998). Phenylpyrazoles. Metabolic Pathways of Agrochemicals: Herbicides and Plant Growth Regulators Royal Society of Chemistry.
- Rufingier, C., Pasteur, N., Lagnel, J., Martin, C. et Navajas, M.** (1999). Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. *Insect Biochem Mol Biol* **29**(4): 385-91.
- Rula, E. Y., Lagrange, A. H., Jacobs, M. M., Hu, N., Macdonald, R. L. et Emeson, R. B.** (2008). Developmental modulation of GABA(A) receptor function by RNA editing. *J Neurosci* **28**(24): 6196-201.
- Sanna, E., Mascia, M. P., Klein, R. L., Whiting, P. J., Biggio, G. et Harris, R. A.** (1995). Actions of the general anesthetic propofol on recombinant human GABAA receptors: influence of receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther* **274**(1): 353-60.
- Sattelle, D. B., Bai, D., Chen, H. H., Skeer, J. M., Buckingham, S. D. et Rauh, J. J.** (2003). Bicuculline-insensitive GABA-gated Cl⁻ channels in the larval nervous system of the moth *Manduca sexta*. *Invert Neurosci* **5**(1): 37-43.
- Sattelle, D. B., Harrison, J. B., Chen, H. H., Bai, D. et Takeda, M.** (2000). Immunocytochemical localization of putative gamma-aminobutyric acid receptor subunits in the head ganglia of *Periplaneta americana* using an anti-RDL C-terminal antibody. *Neurosci Lett* **289**(3): 197-200.
- Sattelle, D. B., Holyoke, C. W., Schnee, M. E., Cordova, D., Benner, E. A., Watson, M. K., Bai, D., Buckingham, S. D., Hutton, M. L., Hamon, A., et coll.** (1995). A bicyclic dinitrile radioligand for studying GABA-gated Cl⁻ channels. *Journal of Physiology* **483**: 193.

- Sattelle, D. B., Jones, A. K., Sattelle, B. M., Matsuda, K., Reenan, R. et Biggin, P. C.** (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **27**(4): 366-76.
- Sattelle, D. B., Pinnock, R. D., Wafford, K. A. et David, J. A.** (1988). GABA receptors on the cell-body membrane of an identified insect motor neuron. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **232**(1269): 443-56.
- Scharf, M. E., Siegfried, B. D., Meinke, L. J. et Chandler, L. D.** (2000). Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate- and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. *Pest Manag Sci* **56**: 757-766.
- Schnee, M., Rauh, J., Buckingham, S. D. et Sattelle, D. B.** (1997). Pharmacology of skeletal muscle GABA-gated chloride channels in the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* **200**(Pt 23): 2947-55.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., et coll.** (1987). Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**(6127): 221-7.
- Schulman, H.** (1993). The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**(2): 247-53.
- Schuske, K., Beg, A. A. et Jorgensen, E. M.** (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci* **27**(7): 407-14.
- Semenov, E. P. et Pak, W. L.** (1999). Diversification of *Drosophila* chloride channel gene by multiple posttranscriptional mRNA modifications. *J Neurochem* **72**(1): 66-72.
- Shang, Q. L., Liang, P. et Gao, X. W.** (2008). Cloning, developmental and tissue-specific expression of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor alpha2 subunit gene in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Pest Biochem Physiol* **Article In Press**.
- Shimahara, T., Pichon, Y., Lees, G., Beadle, C. A. et Beadle, D. J.** (1987). Gamma-aminobutyric acid receptors on cultured cockroach brain neurones. *J Exp Biol* **131**: 231-244.
- Shirai, Y., Hosie, A. M., Buckingham, S. D., Holyoke, C. W., Jr., Baylis, H. A. et Sattelle, D. B.** (1995). Actions of picrotoxin analogues on an expressed, homo-oligomeric GABA receptor of *Drosophila melanogaster*. *Neurosci Lett* **189**(1): 1-4.
- Sigel, E., Baur, R., Kellenberger, S. et Malherbe, P.** (1992). Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA_A receptor channels. *Embo J* **11**(6): 2017-23.
- Sigel, E., Baur, R. et Malherbe, P.** (1991). Activation of protein kinase C results in down-modulation of different recombinant GABA_A-channels. *FEBS Lett* **291**(1): 150-2.

- Sigel, E. et Buhr, A.** (1997). The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**(11): 425-9.
- Sinakevitch, I., Geffard, M., Pelhate, M. et 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): 1539-44.
- Sinakevitch, I., Geffard, M., Pelhate, M. et 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): 147-63.
- Smith, G. B. et Olsen, R. W.** (1995). Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **16**(5): 162-8.
- Snutch, T. P.** (1988). The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci.* **11**(6): 250-6.
- Song, M. et Messing, R. O.** (2005). Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci* **62**(2): 119-27.
- Song, W., Liu, Z., Tan, J., Nomura, Y. et Dong, K.** (2004). RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *J Biol Chem* **279**(31): 32554-61.
- Soravia, E., Martini, G. et Zasloff, M.** (1988). Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett* **228**(2): 337-40.
- Stevenson, P. A. et Sporhase-Eichmann, U.** (1995). Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **110**(3): 203-15.
- Stilwell, G. E. et ffrench-Constant, R. H.** (1998). Transcriptional analysis of the *Drosophila* GABA receptor gene resistance to dieldrin. *J Neurobiol* **36**(4): 468-84.
- Stilwell, G. E., Rocheleau, T. et ffrench-Constant, R. H.** (1995). GABA receptor minigene rescues insecticide resistance phenotypes in *Drosophila*. *J Mol Biol* **253**(2): 223-7.
- Swensen, A. M., Golowasch, J., Christie, A. E., Coleman, M. J., Nusbaum, M. P. et Marder, E.** (2000). GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol* **203**(Pt 14): 2075-92.
- Thany, S. H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D. B. et Lapied, B.** (2007). Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**(1): 14-22.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. et 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): 4673-80.

- Thompson, M., Shotkoski, F. et French-Constant, R.** (1993). Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Lett* **325**(3): 187-90.
- Tingle, C. C., J.A., R., C.F., D., S., L. et W., K.** (2002). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Albert, L. A. Springer. **176**.
- Twede, V., Tartaglia, A. L., Covey, D. F. et Bamber, B. A.** (2007). The neurosteroids dehydroepiandrosterone sulfate and pregnenolone sulfate inhibit the UNC-49 GABA receptor through a common set of residues. *Mol Pharmacol* **72**(5): 1322-9.
- Udenfriend, S.** (1950). Identification of gamma-aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method. *J Biol Chem* **187**(1): 65-9.
- Vergnano, A. M., Schlichter, R. et Poisbeau, P.** (2007). PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *Eur J Neurosci* **26**(5): 1173-82.
- Waldrop, B., Christensen, T. A. et Hildebrand, J. G.** (1987). GABA-mediated synaptic inhibition of projection neurons in the antennal lobes of the sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Comp Physiol [A]* **161**(1): 23-32.
- Walker, R. J., James, V. A., Roberts, C. J. et Kerkut, G. A.** (1981). Studies on amino acid receptors of *Hirudo*, *Helix*, *Limulus* and *Periplaneta*. *Advances in Physiological Sciences: neurotransmitters in invertebrates*. Rozsa. **22**.
- Watson, G. B.** (2001). Actions of Insecticidal Spinosyns on g-Aminobutyric Acid Responses from Small-Diameter Cockroach Neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **71**(1): 20-28.
- Watson, G. B. et Salgado, V. L.** (2001). Maintenance of GABA receptor function of small-diameter cockroach neurons by adenine nucleotides. *Insect Biochem Mol Biol* **31**(2): 207-12.
- Wen, Z. et Scott, J. G.** (1999). Genetic and biochemical mechanisms limiting fipronil toxicity in the LPR strain of house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Science* **55**(10): 988-992.
- Whiting, P., McKernan, R. M. et Iversen, L. L.** (1990). Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(24): 9966-70.
- Wicher, D., Agricola, H. J., Schonherr, R., Heinemann, S. H. et Derst, C.** (2006). TRPgamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *J Biol Chem* **281**(6): 3227-36.

- Williamson, S. M., Walsh, T. K. et Wolstenholme, A. J.** (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci* **7**(4): 219-26.
- Wolff, M. A. et Wingate, V. P.** (1998). Characterization and comparative pharmacological studies of a functional gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor cloned from the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Noctuidae:Lepidoptera). *Invert Neurosci* **3**(4): 305-15.
- Xu, M. et Akabas, M. H.** (1993). Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. *J Biol Chem* **268**(29): 21505-8.
- Xu, M. et Akabas, M. H.** (1996). Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J Gen Physiol* **107**(2): 195-205.
- Xu, Q., Wang, H., Zhang, L. et Liu, N.** (2006a). Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Biochem Biophys Res Commun* **345**(2): 774-80.
- Xu, Q., Wang, H., Zhang, L. et Liu, N.** (2006b). Sodium channel gene expression associated with pyrethroid resistant house flies and German cockroaches. *Gene* **379**: 62-7.
- Xue, Y., Li, A., Wang, L., Feng, H. et Yao, X.** (2006). PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory. *BMC Bioinformatics* **7**: 163.
- Yarowsky, P. J. et Carpenter, D. O.** (1978). Receptors for gamma-aminobutyric acid (GABA) on *Aplysia* neurons. *Brain Res* **144**(1): 75-94.
- Yoon, K. W., Covey, D. F. et Rothman, S. M.** (1993). Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* **464**: 423-39.
- Zaman, S. H., Harvey, R. J., Barnard, E. A. et Darlison, M. G.** (1992). Unusual effects of benzodiazepines and cyclodiene insecticides on an expressed invertebrate GABAA receptor. *FEBS Lett* **307**(3): 351-4.
- Zhang, H. G., ffrench-Constant, R. H. et Jackson, M. B.** (1994). A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *J Physiol* **479** (Pt 1): 65-75.
- Zhang, H. G., Lee, H. J., Rocheleau, T., ffrench-Constant, R. H. et Jackson, M. B.** (1995). Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol* **48**(5): 835-40.
- Zhao, X., Salgado, V. L., Yeh, J. Z. et Narahashi, T.** (2003). Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(3): 914-24.

- Zhao, X., Yeh, J. Z., Salgado, V. L. et Narahashi, T.** (2004). Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **310**(1): 192-201.
- Zhao, X., Yeh, J. Z., Salgado, V. L. et Narahashi, T.** (2005). Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(1): 363-73.
- Zheng, Y., Priest, B., Cully, D. F. et Ludmerer, S. W.** (2003). RdlDv, a novel GABA-gated chloride channel gene from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**(6): 595-9.



ANNEXE

Résumé 1 : Colloque Physiologie de l'insecte, Rennes, 2007**L'édition de l'ARNm des récepteurs du GABA, nouveau suspect dans le dossier "résistance des insectes au fipronil"**

ES-SALAH Zeineb, HAMON Alain, LAPIED Bruno

La lutte contre les insectes nuisibles en zones urbaines concerne majoritairement les dictyoptères et plus précisément les blattoptères. Des campagnes régulières de désinsectisation sont menées afin de limiter la prolifération de ces insectes. Parmi les insecticides neurotoxiques, le fipronil, par sa formulation en gel concentré, est l'un des plus utilisés. La cible principale du fipronil est le récepteur ionotrope du GABA (GABAR). Des marquages immunocytochimiques associés à des études électrophysiologiques ont montré l'existence de GABAR synaptiques et extra-synaptiques. Par exemple, les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*, identifiés comme étant des cellules neurosécrétrices octopaminergiques, possèdent des GABAR synaptiques et extra-synaptiques, localisés au niveau de leur corps cellulaire. Cependant, à l'heure actuelle, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des GABAR d'insectes sont mal connues. Néanmoins, un ADNc codant pour une sous-unité (RDL) de GABAR a été cloné chez la drosophile puis chez d'autres insectes dont les dictyoptères. Cette sous-unité sert de modèle pour étudier le rôle des déterminants moléculaires du GABAR impliqués dans l'efficacité du fipronil. Une résistance au fipronil apparaît lorsqu'une alanine est changée en sérine ou en glycine dans le domaine M2 de la sous-unité RDL (modifications A301S et A301G). Deux modifications supplémentaires de cette sous-unité (T350M et R122G) ont été mises en évidence en laboratoire par sélection de drosophiles résistantes au fipronil. La substitution R122G est due à une édition de l'ARN messenger et affecte la partie N-terminale du récepteur, où se fixe le GABA chez les vertébrés. Chez l'insecte, l'implication de l'édition de l'ARNm dans la résistance aux insecticides n'a été rapportée que pour les canaux sodiques dépendants du potentiel. Cependant, bien que des éditions de l'ARNm des GABAR d'insectes soient connues, il n'a jamais été établi de liens entre cette modification post-transcriptionnelle et la résistance aux insecticides.

Afin de déterminer si l'édition R122G intervient dans la résistance au fipronil, des ADNc sauvages ou doublement mutés (A301G/T350M) codant pour la sous-unité RDL de drosophile ont été modifiés par mutagenèse dirigée pour mimer cette édition. Les ARNc obtenus à partir de ces ADNc par transcription *in vitro* ont été exprimés dans des ovocytes de xénope, en vue de tests pharmacologiques par la technique de double-microélectrode en potentiel imposé. Les résultats obtenus montrent que l'édition R122G conduit à une diminution de la sensibilité des récepteurs RDL :

- 1) au GABA : les CE_{50} sont significativement différentes lorsque la mutation correspondant à la substitution R122G est incluse,
- 2) au fipronil :
 - IC_{50} (A301G/T350M) – (A301G/T350M) + R122G : 72,3 nM et 119,2 nM respectivement, après 30 min d'application de l'insecticide. Les IC_{50} sont significativement différents.

Nos résultats démontrent pour la première fois que l'édition de l'ARNm est impliquée dans le développement de la résistance des GABAR d'insectes au fipronil.

Résumé 2 : Congrès de la FENS, Genève 2008. Références de publication du résumé : FENS Abstr., vol.4, 011.6, 2008

Modulation of insect ionotropic GABA receptor function and fipronil sensitivity by RNA editing and PKC phosphorylation

ES-SALAH Z.¹, TRICOIRE-LEIGNEL H.¹, LE GOFF G.², LAPIED B.¹, HAMON A.¹

¹Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647 / USC INRA, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers Cedex 01, France

²INRA, UMR 1112, Réponses des Organismes aux Stress Environnementaux, 400 Route des Chappes, B.P. 167 06903 Sophia-Antipolis Cedex, France

The functional properties of insect GABA-gated chloride channels can be modulated by several mechanisms including point mutations and alternative splicing. Here, we showed that two other important mechanisms, PKC phosphorylation and RNA editing, also affect the responses of these receptor channels to both GABA and the insecticide fipronil.

In whole cell patch-clamp studies performed on Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons isolated from the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*, we reported that PKC activated by a phorbol ester, PDBu, induced a 94 % reduction of the GABA-induced inward current amplitude. Comparison of I/V curves with or without PKC activator showed that the two distinct GABA receptors (GABARs) of DUM neurons (1) are differentially regulated by at least two PKC isozymes. In addition, GABA-induced current amplitudes were less reduced by fipronil when PKCs were activated by PDBu prior to insecticide application.

Recently, it was reported that the molecular diversity of the GABAR RDL subunit of *Drosophila melanogaster* can be enhanced by pre-mRNA A-to-I editing at several sites, including the R122 residue (2). We mimicked RNA editing at the latter site by replacing R122 with a glycine and assessed the functional consequences of this modification by expressing RDL homomeric receptors in *Xenopus* oocytes. These experiments showed that editing at the R122 position induced a reduction of GABA and fipronil potencies. These effects were observed on both fipronil-sensitive and -resistant receptors (obtained by two mutations A301G/ T350M).

Moreover, we have cloned for the first time a partial sequence of the RDL subunit in DUM neurons of *Periplaneta americana*. To find out whether the R122G editing exists in this cellular subtype of this species, we are currently cloning the N-terminal region of the RDL subunit including this mutation.

(1) Alix et al., 2002, J.Neurophysiol. 87: 2972-2982.

(2) Hoopengardner et al., 2003, Science 301: 832-836.



TABLES

Table des Figures

Figure 1 . Structure caractéristique des sous-unités composant les récepteurs de la superfamille "Cys-loop" ..	17
Figure 2 . Structure des GABARs ionotropes..	20
Figure 3 . Alignement des parties N-terminales des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 2$ (<i>Homo sapiens</i>) avec la sous-unité RDL de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	26
Figure 4 . Organisation génomique des exons du gène <i>Rdl</i> de <i>D. melanogaster</i> ..	31
Figure 5 . Représentation schématique de la sous-unité RDL, montrant la localisation des sites d'édition ainsi que la position des séquences codées par les exons épissés ..	33
Figure 6 . Structure du fipronil et de ses métabolites majeurs.	48
Figure 7 . Proposition de modèle des sites de liaison des antagonistes des GABARs de vertébrés et d'invertébrés ..	57
Figure 8 . Implication des acides aminés en position 2'(A), 6'(T) et 9'(L) des domaines M2, dans la liaison d'antagonistes des GABARs ..	58
Figure 9 . Position relatives des sérines phosphorylées par la PKC dans les boucles M3-M4, selon la sous-unité.	70
Figure 10 . Représentation schématique du plasmide pNB40.) ..	81
Figure 11 . Principe de la mutagenèse dirigée ..	83
Figure 12 . Obtention d'ovocytes de xénope "défolliculés" ..	86
Figure 13 . Schéma simplifié du principe de la technique de double-microélectrode ..	88
Figure 14 . Protocole utilisé pour la construction des courbes dose-réponse du fipronil ..	89

Figure 15 . Schéma du protocole permettant l'obtention des neurones DUM du DGA de <i>P. americana</i>	94
Figure 16 . La membrane des neurones DUM du DGA peut être soumise à un courant imposé ou à un potentiel imposé.....	97
Figure 17 . Schéma du principe de la technique du patch-clamp, en conditions de potentiel imposé, appliquée aux neurones DUM.....	100
Figure 18 . Représentation schématique d'une boîte contenant un neurone DUM, et de la disposition du matériel.	99
Figure 19 . Protocole d'extraction des ARN totaux à partir de chaînes nerveuses de <i>Periplaneta americana</i> , à l'aide du Trizol®.	105
Figure 20 . Emplacements relatifs des amorces utilisées pour l'amplification des zones plus conservées (fragment "A") et moins conservées (fragment "B") de l'ADNc de la sous-unité RDL dans la chaîne nerveuse.	107
Figure 21 . Protocole d'identification de la sous-unité RDL dans un neurone DUM : technique de PCR sur cellule isolée.....	113
Figure 22 . Emplacements relatifs des amorces utilisées pour l'amplification de la zone conservée comprise entre le domaine N-terminal et le segment transmembranaire M3 de l'ADNc de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de la blatte américaine.....	115
Figure 23 . Exemples représentatifs de courants GABAergiques utilisés pour la construction des courbes dose-réponse du GABA.....	126
Figure 24 . Courants GABAergiques illustrant les effets du fipronil à 15 et 30 minutes d'application, et après rinçage pendant 15 minutes par du liquide physiologique, selon la nature de la sous-unité exprimée (WT ou WT+R122G ou DM ou DM+R122G).....	128
Figure 25 . Courbes d'inhibition du fipronil (appliqué pendant 15 minutes) pour le courant GABAergique mesuré au pic (A) et le courant tardif (B), dans le cas de récepteurs RDL constitués de sous-unités sauvages (WT) ou WT présentant la substitution R122G... ..	130

Figure 26 . Courbes d'inhibition du fipronil après rinçage pendant 15 minutes avec du SOS (récepteurs RDL sauvages ou WT+R122G).....	130
Figure 27 . Courbes d'inhibition du fipronil (appliqué pendant 15 minutes) dans le cas des récepteurs RDL double-mutants (A301G/T350M) ou A301G/T350M/R122G.....	131
Figure 28 . Courbes d'inhibition du fipronil après rinçage pendant 15 minutes avec du SOS (récepteurs double-mutants A301G/T350M ou A301G/T350M/R122G).....	131
Figure 29 . Comparaison des degrés de désensibilisation des récepteurs en conditions contrôles..	133
Figure 30 . Evolution en fonction du temps de la capacité membranaire d'ovocytes de xénope exprimant des récepteurs RDL, après une application de PDBu précédée ou non d'un prétraitement à la chélerythrine.....	163
Figure 31 . Evolution en fonction du temps de la capacité membranaire d'ovocytes contrôles (points noirs) ou exprimant la sous-unité RDL (points gris), après activation de la PKC par le PDBu.	164
Figure 32 . Comparaison de l'évolution de IGABA et de la capacité membranaire en fonction du temps, dans le cas d'ovocytes exprimant la sous-unité RDL.....	166
Figure 33 . Comparaison de séquences protéiques des sous-unités RDL de différentes espèces d'insectes avec celle obtenue dans les neurones DUM de <i>Periplaneta americana</i> ("Pame")..	167

Table des Tableaux

Tableau 1 . Pharmacologie des GABA _A Rs et GABA _C Rs.	22
Tableau 2 . Présence de la sous-unité RDL chez des insectes de différents ordres.....	24
Tableau 3 . Présence de la sous-unité LCCH3 et de ses homologues chez des insectes de différents ordres.....	27
Tableau 4 . Variants d'épissage de la sous-unité RDL chez différentes espèces d'insectes. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI.....	32
Tableau 5 . Sites d'édition présents dans la sous-unité RDL, selon l'espèce. D'après les séquences protéiques déposées dans la banque de données NCBI.....	34
Tableau 6. Pharmacologie de GABARs natifs. " bicuculline " signifie insensible à la bicuculline.	36
Tableau 7 . Pharmacologie de GABARs exprimés. " bicuculline " signifie insensible à la bicuculline.	38
Tableau 8 . Exemples de doses de substances actives utilisées pour des insecticides de différentes classes.....	45
Tableau 9 . Comparaison des concentrations d'insecticide entraînant 50% de déplacement du radioligand [³ H]EBOB, mesurées pour des membranes neuronales de vertébrés ou d'insectes.	49
Tableau 10 . Comparaison des DL ₅₀ du fipronil et du désulfinyl-fipronil ainsi que de leur CI ₅₀ (mesuré par déplacement du radioligand [³ H]EBOB).	49
Tableau 11 . Résistances croisées due à la mutation en A301.	64
Tableau 12 . Etudes montrant la diminution de la fonction des GABARs par la PKC.....	69
Tableau 13 . Modulation de la pharmacologie des GABA _A Rs par la PKC.....	72

Tableau 14 . Amorces utilisées pour l'obtention des substitutions A301>G, T350>M (Dr. G. Le Goff) et R122>G (cette thèse).	81
Tableau 15 . Pharmacologie de trois sous-types de GABARs présents à la surface des neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i>	92
Tableau 16 . Composition des solutions utilisées lors de la dissection-dissociation aboutissant à l'obtention de neurones DUM isolés.....	95
Tableau 17 . Composition des solutions utilisées lors des expériences de patch-clamp. Les concentrations sont en mM.....	101
Tableau 18 . Outils pharmacologiques utilisés lors de l'étude des GABARs des neurones DUM de <i>P. americana</i>	102
Tableau 19 . Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc de RDL dans la chaîne nerveuse de <i>P. americana</i>	107
Tableau 20 . Constitution des milieux réactionnels des PCR pour l'amplification de l'ADNc de la sous-unité RDL de la chaîne nerveuse de <i>P. americana</i>	108
Tableau 21 . Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des ADNc de la sous-unité RDL dans les neurones DUM de <i>P. americana</i>	115
Tableau 22 . Constitution des milieux réactionnels des PCR pour l'amplification de l'ADNc de la sous-unité RDL des neurones DUM.	116
Tableau 23 . Comparaison de la désensibilisation des récepteurs dans les conditions contrôles et après 15 minutes d'application de fipronil (CI ₅₀).....	132

