

Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte: Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques

Céline Bourdin

► To cite this version:

Céline Bourdin. Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte : Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-00950043

HAL Id: tel-00950043 https://theses.hal.science/tel-00950043

Submitted on 20 Feb 2014

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.





Thèse de Doctorat

Céline BOURDIN

Mémoire présenté en vue de l'obtention **du grade de Docteur de l'Université d'Angers** Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Discipline : Neurosciences Laboratoire : Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV

Soutenue le 18 Septembre 2013

École doctorale : VENAM Thèse N° 1264

Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte : Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques

	JURY
Rapporteurs :	Mme. Evelyne BENOIT, Chargé de recherches, CNRS, Gif-sur-Yvette Mme Emmanuelle JACQUIN-JOLY, Directrice de Recherches INRA, Versailles
Examinateurs :	M. Philippe LUCAS, Directeur de Recherches INRA, Versailles M. Daniel BOUJARD, Professeur, Université de Rennes 1 Mme Valérie RAYMOND, Professeur, Université d'Angers
Directeur de Thèse :	M. Christian LEGROS, Professeur, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	M. Bruno LAPIED, Professeur, Université d'Angers

Remerciements

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV de l'Université d'Angers et a été cofinancée par la région Pays de la Loire et l'INRA Angers-Nantes.

Je remercie :

Le Professeur Bruno Lapied pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant mon master 2 et ma thèse, et pour la confiance qu'il m'a témoignée au cours de ma thèse.

Mon directeur de thèse, le Professeur Christian Legros qui m'a dirigé pendant mon stage de master 2 et ma thèse. Je lui suis très reconnaissante pour ses encouragements constants, son enthousiasme et la confiance qu'il m'a accordée pendant ces quatre années. Je le remercie aussi de la patience dont il a fait preuve au cours de la rédaction de ce manuscrit. J'aimerais lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais de relecture, souvent très courts, des documents que je lui ai adressés.

Evelyne Benoît (CR1 CNRS) et Emmanuelle Jacquin-Joly (DR2 INRA) de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. J'associe à ces remerciements le Professeur Valérie Raymond, le Professeur Daniel Boujard, et Philippe Lucas (DR2 INRA) pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Les membres de mon comité de suivi de thèse, le Professeur Alain Morel, Philippe Lucas et Daniel Cattaert (DR CNRS) pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse.

Le Docteur Alain Hamon pour m'avoir transmis tout son savoir sur la technique de la double micro-électrode en potentiel imposé sur l'ovocyte de xénope. Vos conseils m'ont par la suite permis de résoudre de nombreux problèmes.

Le Docteur Marjorie Juchaux de la plateforme IMAC pour les expériences d'immunohistochimie sur les ovocytes de xénope. Sans ton aide précieuse, ce projet n'aurait jamais pu être réalisé.

Les stagiaires que j'ai pu aider à un moment ou à un autre au cours de ma thèse: Imène, Marie, Aurélie, Vincent, Dimitri, Charlène, Yassine, Raphaël et particulièrement Selma et Ophélie pour avoir contribuer à rendre cette fin de thèse plus agréable.

5

Olivier Laurec pour ses compétences en informatique qui ont souvent sauvées mon manuscrit de thèse et les données accumulées pendant ma thèse.

Bénédicte Moignot pour m'avoir transmis ces connaissances en biologie moléculaire au cours de mon master et de ma première année de thèse. Merci Laurence Murillo et Delphine Calas-List pour leurs encouragements constants et pour leur écoute attentive. Merci à Fabienne Dupuy pour ses remarques pertinentes.

Merci à Sylvia Anton et Christophe Gadenne. Vous m'avez beaucoup aidé pendant la dernière année de ma thèse et je vous en suis très reconnaissante.

Mes collègues de bureau qui ont supporté mes monologues incessants pendant cette dernière année. Le bureau va vous paraître bien calme sans moi (enfin !!). Merci à toi Emiliane pour ton amitié sincère, pour avoir toujours répondue présente dans les moments les plus difficiles de cette fin de thèse et pour bien d'autres choses encore. Merci aussi à Antoine pour le dépaysement qu'il nous assure en nous faisant partager sa passion pour la photo et les amphibiens. Je vous souhaite bon courage à tous les deux qui entrez dans la dernière ligne droite de votre thèse. Merci à Kaouther pour sa bonne humeur constante. Ca a été un plaisir de partager le bureau avec toi cette année et je te dis bon courage pour la suite de ta thèse. Merci également à Mathilde d'avoir accepté de relire mon intro de thèse. Je te souhaite bonne chance pour la suite de sa thèse.

Sophie Quinchard pour son soutien technique et amical pendant ma thèse. Ta présence et ton écoute ont souvent été d'un grand réconfort.

Benoît Calmes et Thomas Guillemette pour le temps qu'ils ont consacré aux manips de Southern blot. Je vous en suis très reconnaissante. Je remercie également Damien Picard pour son aide précieuse pour les études phylogénétiques.

Mes parents, mon frère, ma sœur et toute ma famille qui m'ont soutenu pendant ces 4 ans. Merci à Amélie, Amandine, Sylvaine, Lydie et Lucie pour avoir supporté les longues discussions sur ma thèse pendant ces quatre années.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et qui m'ont apporté leur aide à un moment ou à un autre : Marie-Christine LePaven, Hervé LeCorronc, Olivier List, Rolande Ndong Nna, Lydie Garnier, Hélène Tricoire-Leignel, Steeve Hervé Thany, César Mattéi, Nathalie Guérineau, Luzia Bossé, Manuel Ferrer, Quentin Coquerel, Béatrice Bodereau-Dubois, Céline Lavialle-Defaix, Patrice Chiron, Josy-Anne Froger, Cyril LeCorre, Delphine Goven, Véronique Marchais, Patricia Licznar, et tous ceux qui se reconnaitront.

Table des matières

Table des matières7
Liste des abréviations9
Avant-Propos 11
Introduction Ribliographique
$CUADITDE 1 \cdot I \in CANAL SODIUM DEDENDANT DU DOTENTIEI 12$
A Pôle physiologique de genel Ne
A- Kole physiologique de canal Na _v
C. Diversité fonctionnelle des canaux Na ⁺ natifs chez les insectes 58
CHAPITRE 2 : PHARMACOLOGIE DU CANAL SODIUM D'INSECTE
A- Les modulateurs de l'activation des canaux Na ⁺
B- Les inhibiteurs des courants Na ⁺
CHAPITRE 3 : HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL
A- Identification des sous-unités auxiliaires présentes dans la chaîne nerveuse de la
blatte <i>P. americana</i> par une approche de biologie moléculaire
B- Caractérisation fonctionnelle des courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant la sous-
unité principale avec différentes sous-unités auxiliaires
C- Modulation de la sensibilité des canaux Na_v aux molécules pharmacologiques par
les sous-unites auxiliaires 80
Matériels et Méthodes
CHAPITRE 1: LE MODELE BIOLOGIQUE: LA BLATTE PERIPLANETA
AMERICANA
A- Conditions d'élevage des blattes82
B- Le système nerveux de la blatte P. americana
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE EMPLOYEE POUR LA CARACTERISATION DES
GENES ET DES TRANSCRITS CODANT LES SOUS-UNITES AUXILIAIRES DU
CANAL SODIUM D'INSECTE CHEZ LA BLATTE P. AMERICANA85
A- Prélèvements des différents tissus chez la blatte P. americana
B- Extraction des ARN totaux
C- La transcription inverse
D- Amplification des ADNc codant les sous-unités auxiliaires du canal Na _v de P .
americana
E- EXIFACION EL PUFILICATION DES PRODUITS PCR
G. Identification des clones recombinants par PCR
H- Extraction de l'ADN plasmidique
I Extraction de l'Alert phismitique I- Séquencage et analyse des séquences
J- Insertion d'un Tag-histidine (his-tag) à l'extrémité N-terminale des sous-unités
auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B109
K- Extraction d'ADN génomique (ADNg)111
L- Southern blot
CHAPITRE 3 : TECHNIQUES D'ELECTROPHYSIOLOGIE
A- Le xénope Xenopus laevis
B- Les ovocytes de xenope117

 C- Prélèvement des ovocytes de xénope D- Transcription <i>in vitro</i> des ADN clonés E- Injection des ovocytes F- Mise au point des conditions d'injection et du temps d'incubation des ovoc G- La technique de la double microélectrode en potentiel imposé H- Protocoles de stimulation I- Applications des molécules pharmacologiques J- Analyse des données K- Tests statistiques 	
CHAPITRE 4 : TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE A- Principe de la microscopie confocal à balayage laser B- Les anticorps C- Immunomarquage des ovocytes de xénope exprimant les canaux Na _v	129 129 130 131
CHAPITRE 5 ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES DES SOUS- AUXILIAIRES DU CANAL NA _V	UNITES
 Résultats et Discussion CHAPITRE 1 : LA SOUS-UNITE TEH1 DE <i>P. AMERICANA</i> : PaTEH1 A- Clonage de la sous-unité PaTEH1 et analyse de sa structure B- Mise en évidence de la rétention d'intron à l'origine du variant PaTEH1B. C- Mise en évidence d'un troisième variant dans les neurones DUM, PaTEH1 D- Expression des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B dans l'ovocyte de xénoj E- Co-localisation des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B avec la sou DmNav1-1 par microscopie confocale F- Discussion générale CHAPITRE 2 : LES SOUS-UNITES AUXILIAIRES TIPE, TEH2, TEH3 et TP <i>P. AMERICANA</i> A- La sous-unité PaTipE B- Les sous-unités PaTEH2 et PaTEH3 	135 137 137 144 C147 pe149 is-unité 171 177 EH4 CHEZ 183 183 183
C- La sous-unité PaTEH4 CHAPITRE 3 : RELATIONS PHYLOGENETIQUES DES SOU AUXILIAIRES	
Conclusions et Perspectives	251
CHAPITRE 2 PERSPECTIVES	250
T . 1 C	

Liste des abréviations

Ac : anticorps ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire ADNg : acide désoxyribonucléique génomique AL: anesthésiques locaux ANOVA : ANalysis Of VAriance ARNm : acide ribonucléique messagers ATP : adénosine tri-phosphate BET : bromure d'éthidium BKCa : canal potassium activé par le calcium BLAST: basic local alignment search tool BSC : Blatella sodium channel BTX : batrachotoxine CAM : cellular adhesion molecule (molécules d'adhésion cellulaire) Ca_v : canal calcium dépendant du potentiel CHL : chinese hamster lung (cellule pulmonaire de hamster chinois) CHO: chinese hamster ovary (cellule ovarienne de hamster chinois) CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Phosphatase alkaline d'intestin de veau) **CIP** : Calf Intestinal Phosphatase CNG : canaux activés par les nucléotides cycliques DGA : dernier ganglion abdominal DEPC : diéthylpyrocarbonate DMSO : Diméthylsulfoxide dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate DTT : dithiothréitol DUM : dorsal unpaired median DRG : dorsal root ganglion (ganglion de la racine dorsale) DDT : dichloro-diphényl-trichloréthane DMSO : Diméthyl sulfoxide DSC : Drosophila sodium channel EDTA : éthylène dinitrile tétraacétate FMRF-amide : phénylalanine-méthionine-arginine-phénylalanine-amide GABA : acide gamma-amino butirique gK : conductance potassique gNa : conductance sodique HCN : canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation HEK : Human Embyonnic Kidney (cellules embryonnaire humaine de rein) HEPES : acide 4-(2-Hydroxyéthyl)piperazine-1-éthanesulfonique Hz: hertz Ig: Immunoglobuline INa : courant sodium Kdr: knockdown resistance K_v : canal potassium dépendant du potentiel LIC : Ligation Independent Cloning LTE: épilepsie du lobe temporal MSG : Mushroom shaped accessory glands

nap : no action potential Na_v : canal sodium dépendant du potentiel **ORF** : Open Reading Frame PA : potentiel d'action pb: paire de bases PB: phosphate buffered PBS: phosphate buffered saline PCR : réaction de polymérisation en chaîne PKA : protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique PKC : protéine kinase dépendant du calcium qPCR : PCR quantitative RACE : rapid amplification cDNA ends RT-PCR : reverse-transcription polymorphism chain reaction SDS : Sodium dodécyl sulfate SEM : erreur standard de la moyenne SNC: système nerveux central SNP : système nerveux périphérique SOS : standard oocyte saline STX : saxitoxine TAE: Tris Acétate EDTA TAP: tobacco acid pyrophosphatase TEH: TipE homolog TEVC: two-electrode voltage-clamp (technique de la double microélectrode en potentiel imposé) TipE: temperature-induced paralysis locus E TM: segment transmembranaire TTX : tétrodotoxine UTR : Untranslated region Vssc1 : Voltage-sensitive sodium channel 1

VUM: ventral unpaired median

Avant-propos

Avant-propos

Le canal sodium dépendant du potentiel est un déterminant moléculaire de l'excitabilité chez l'animal (Hille, 2001). Il est aussi la cible de nombreuses molécules, dont les insecticides neurotoxiques. Le canal sodium est très étudié chez les mammifères mais il est encore mal connu chez les insectes. Ces derniers représentent le groupe animal le plus important et le plus diversifié avec 2,8 à 10 millions d'espèces (Odegaard, 2000 ; Windley et coll., 2012). Environ 10000 espèces d'insectes sont considérées comme étant des organismes nuisibles ce qui correspond à moins de 0,4% de la totalité des espèces d'insectes (Windley et coll., 2012). Les insectes ravageurs de culture occasionnent des pertes quantitatives et qualitatives très importantes. En l'absence de protection, 30 à 40% des récoltes mondiales seraient détruites par les insectes et les maladies¹. En France, en 2009, les insectes ravageurs ont causés en moyenne 14% de perte². Pour obtenir une production optimale, les plantes doivent donc être protégées contre ces insectes ravageurs, mais aussi contre les maladies, les mauvaises herbes et autres agresseurs. La lutte contre ces insectes ravageurs repose essentiellement sur l'application d'insecticides chimiques. Cependant, l'utilisation massive des insecticides a conduit à de nombreux effets délétères sur l'environnement, la santé publique et les insectes dits auxiliaires tels que les abeilles.

Les connaissances actuelles sur les canaux sodium dépendant du potentiel d'insecte montrent qu'il existe une forte homologie de séquence entre les canaux sodium d'insecte et les canaux sodium de mammifères. Cette forte homologie peut donc conduire à des problèmes de santé non négligeables. Cette thèse contribue à compléter les connaissances sur les canaux sodium d'insecte en étudiant les structures le constituant. Ici, nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation du canal sodium par ses protéines accessoires. Ces protéines accessoires sont présentes uniquement chez les insectes, et pas chez les mammifères. Elles pourraient donc constituer des cibles très intéressantes pour les insecticides. Cette étude permet donc d'apporter de nouvelles informations sur ces protéines accessoires. Dans ce but, nous avons étudié leur diversité chez la blatte *P. americana*. Puis nous nous sommes intéressés à leurs effets modulateurs sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal sodium d'insecte.

¹<u>www.iupp.fr</u> (consulté en juin 2013)

² <u>www.iupp.fr</u>

Avant-propos

Introduction Bibliographique

CHAPITRE 1 : LE CANAL SODIUM DEPENDANT DU POTENTIEL

A- Rôle physiologique du canal sodium dépendant du potentiel

Les canaux sodium dépendants du potentiel (canaux Nav : Na pour sodium et v pour potentiel (voltage en anglais)) sont impliqués dans la genèse et la propagation du potentiel d'action (PA) dans les cellules excitables, tels les neurones, les cellules musculaires squelettiques et cardiaques et les cellules neuroendocrines (Hille, 2001). Le PA est un changement transitoire du potentiel de membrane caractérisé par différentes phases : la dépolarisation, la repolarisation, l'hyperpolarisation et le retour au potentiel de repos de la membrane (Figure 1A, Forehand, 2009). Ces différentes phases résultent de l'intervention des canaux sodium (Na⁺) et potassium (K⁺) qui s'ouvrent et se ferment dans la membrane plasmique selon une chronologie bien précise. Quand la membrane est dépolarisée, les canaux Na_v commencent à s'ouvrir (Figure 1B). Le canal Na_v ouvre plus rapidement sa porte d'activation (porte m) que le canal potassium dépendant du potentiel (K_v) et permet par conséquent l'entrée massive d'ions sodium dans la cellule. Cet influx d'ions chargés positivement entraîne une dépolarisation soudaine de la membrane. Puis, la porte d'inactivation (porte h) des canaux Na_v se ferme ; la conductance sodique diminue. Dans le même temps, les canaux K_v sont activés, permettant la sortie d'ions potassium. Ces deux derniers événements (l'inactivation des canaux Nav et l'activation des canaux Kv) entraînent une repolarisation très rapide de la membrane. Le potentiel de membrane diminue alors jusqu'à un niveau plus bas que le potentiel de repos, appelé l'hyperpolarisation post-potentiel d'action. Cette hyperpolarisation est due à l'activité plus longue des canaux K_v, responsables d'une sortie d'ions K^+ . Le canal K_v va ensuite se fermer avec une cinétique plus lente, tandis que le potentiel de membrane va revenir au potentiel de repos.



Figure 1. Le potentiel d'action. A. Le potentiel d'action (ligne pleine) est formé de plusieurs phases : le potentiel de repos (A), la phase de dépolarisation (B), la repolarisation (C) et l'hyperpolarisation post-potentiel d'action (D). Les conductances des ions des canaux Na_v (gNa) et K_v (gK) sont indiquées en pointillés. B. Les canaux Na_v et K_v passent par plusieurs états au cours des différentes phases du potentiel d'action (modifié d'après Forehand, 2009).

Comme indiqué dans les **figures 1** et **2**, le canal Na_v possède une porte d'activation (porte m) et une porte d'inactivation (porte h) lui permettant, en fonction de leurs ouvertures, de prendre trois conformations distinctes: ouvert, inactivé et fermé (**Figure 2**). Lorsque le canal est au repos, la porte m est fermée et la porte h est ouverte. Suite à une dépolarisation de la membrane, la porte m s'ouvre, permettant le passage de l'état ouvert à l'état fermé du canal, ainsi que l'entrée d'ions Na⁺ dans la cellule. Ce phénomène s'appelle l'activation. Après quelques millisecondes, la porte d'inactivation se ferme et le canal passe de l'état ouvert à l'état fermé, il s'agit de la réactivation ou de la récupération de l'état inactivé.



Figure 2. Les états fonctionnels du canal Na_v. Le canal Na_v peut se présenter sous trois états fonctionnels différents : fermé, ouvert et inactivé. Lorsque le canal est fermé, la porte d'activation (porte m) est fermée et la porte d'inactivation (porte h) est ouverte. Lors d'une dépolarisation, le canal Na_v passe de l'état fermé à l'état ouvert. Ce phénomène est appelé activation. Lorsque le canal Na_v passe de l'état ouvert à l'état inactivé, il s'agit de l'inactivation. Enfin le canal revient à l'état fermé, il s'agit de la réactivation ou récupération de l'état inactivé.

B- Structure et fonctions des canaux Na_v

Les canaux Na_v sont des glycoprotéines hétéromultimériques transmembranaires constituées par l'association d'une sous-unité principale de 220-260 kDa avec une ou deux sous-unités auxiliaires d'environ 33 à 36 kDa (Catterall et coll., 2007). Le premier volet de cette partie sera consacré aux sous-unités principales (également appelées sous-unités α) : combien de gènes codent ces sous-unités chez les mammifères et chez les insectes ? Leur structure est-elle conservée ? Dans un deuxième volet, nous traiterons des sous-unités auxiliaires (appelées sous-unités β chez les mammifères). Nous détaillerons l'effet de ces sous-unités auxiliaires sur les sous-unités α .

B-1 La sous-unité principale ou sous-unité α

B-1-1 Au niveau génétique

B-1-1-1 Les gènes codant les canaux Nav chez les Vertébrés

Des études biochimiques utilisant la tétrodotoxine (TTX³) ont permis l'identification de canaux Na_v chez l'anguille électrique *Electrophorus electricus* (Agnew et coll., 1978), le rat (Hartshorne et Catterall, 1981) et le poussin (Lombet et Lazdunski, 1984). Puis en 1984, la première séquence codant un canal Na_v a été identifiée et clonée chez l'anguille électrique (Noda et coll., 1984). Suite à cette découverte, plusieurs canaux Na_v ont été identifiés et clonés chez d'autres Vertébrés tels que la souris (*Mus musculus*) et l'homme (*Homo sapiens*) (pour revue, Goldin et coll., 2002), mais aussi le poisson-zèbre, *Danio rerio* (Tsai et coll., 2001) et deux espèces de poissons-globe, *Fugu pardalis* et *Fugu rubripes* (Yotsu-Yamashita et coll., 2000).

Chez les mammifères, 9 isoformes de la sous-unité α du canal sodium ont été clonées dans différents tissus et nommées Na_v1.1 à Na_v1.9 (Goldin, 2000 ; Catterall et coll., 2005). Elles sont codées par neuf gènes : SCN1A à SCN5A et SCN8A à SCN11A (**Tableau 1**). Ces neuf isoformes permettent le flux d'ions Na⁺ à travers la membrane des cellules excitables en fonction de l'état d'excitabilité membranaire. Il est à noter qu'une dixième isoforme, appelée Na_x, est rattachée à cette famille de canaux. Elle est codée par le gène SCN6A chez la souris

³ Neurotoxine produite par plusieurs souches d'une bactérie du genre vibrio bloquant le pore du canal sodium

et le gène SCN7A chez l'humain (Goldin, 2000). Le canal Na_x serait un senseur de sodium dans l'organisme, mais jusqu'à maintenant son rôle est mal compris.

Isoformes	Gènes	Expression tissulaire
Na _v 1.1	SCN1A	SNC et SNP
Na _v 1.2	SCN2A	SNC
Na _v 1.3	SCN3A	SNC
Na _v 1.4	SCN4A	Muscles squelettiques
Na _v 1.5	SCN5A	Muscles squelettiques et cœur
Na _v 1.6	SCN8A	SNC et SNP
$Na_v 1.7$	SCN9A	SNP et cellules de Schwann, cellules chromaffines,
		muscle lisse des coronaires cardiaques
$Na_v 1.8$	SCN10A	DRG
Na _v 1.9	SCN11A	SNP
Na _x	SCN6A	Cœur, utérus, muscle squelettique, astrocytes et DRG
	SCN7A	

Tableau 1 : Sous-unités α du canal Nav chez les Vertébrés.

Les différentes isoformes du canal Na_v sont classées en plusieurs catégories en fonction de leur sensibilité à la TTX, de leur distribution tissulaire ou de leur localisation chromosomique. En effet, les variants $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$ sont sensibles à la TTX (IC 50⁴ : 4 à 25nM), alors que les variants $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ y sont moins sensibles (IC 50 : 40 à 60mM) (Catterall et coll., 2005).

Les gènes SCN1A, SCN2A, SCN3A et SCN8A sont principalement exprimés dans le système nerveux central (SNC), alors que le gène SCN11A est principalement exprimé dans le système nerveux périphérique (SNP). Le gène SCN4A est exprimé dans les muscles squelettiques et le gène SCN5A est exprimé dans le muscle cardiaque. Quant aux gènes SCN9A et SCN10A, ils sont exprimés dans les neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG pour <u>D</u>orsal <u>R</u>oot <u>G</u>anglions) (Fozzard et Hanck, 1996).

Au niveau chromosomique, les gènes SCN1A, SCN2A, SCN3A et SCN9A sont situés sur le chromosome 2, alors que les gènes SCN5A, SCN10A et SCN11A sont localisés sur le chromosome 3. Enfin, SCN4A et SCN8A sont positionnés respectivement sur les chromosomes 17 et 12.

⁴ IC 50 = concentration pour laquelle 50% du courant Na⁺ est inhibé

B-1-1-2 Les gènes codant les canaux Nav chez les insectes

L'identification du gène codant le canal Na_v chez l'insecte a débuté suite à la mise en évidence de plusieurs mutations (para^{ts}, nap^{ts} et tipE^{ts}) affectant les canaux Na_v chez *Drosophila melanogaster*. Plus particulièrement, ces mutations induisent un phénotype paralytique sensible à la température (Suzuki et coll., 1971, Wu et coll., 1978, Kulkarni et coll., 1982). L'étude des propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques et génétiques de deux mutants (para^{ts} et nap^{ts}) montrent qu'ils sont impliqués dans la conduction nerveuse, dans l'excitabilité membranaire ainsi que dans la sensibilité à la TTX, la STX et la vératridine (Ganetzky et coll., 1986). Par la suite, il a été montré que dans des neurones embryonnaires de drosophile en culture, l'allèle *para* affecte l'expression ainsi que les propriétés d'ouverture et de fermeture des canaux Na_v (O'Dowd et coll., 1989). Parallèlement à ces études, la séquence du locus *para* a été clonée (Ganetzky et coll., 1986 ; Loughney et coll., 1989). Les homologies structurales et fonctionnelles de cette protéine avec le canal Na_v de Vertébrés ont permis de confirmer que ce gène code le canal Na_v chez l'insecte (Salkoff et coll., 1987, Ramaswami et coll., 1989 ; Loughney et coll., 1989). Dans la nomenclature actuelle le gène *para* est également appelé DmNa_v (Goldin, 2002).

Depuis cette date, plusieurs orthologues du gène DmNa_v ont été identifiés (**Tableau** 2). En 1996, le gène Vssc1 (pour <u>V</u>oltage-<u>s</u>ensitive <u>s</u>odium <u>c</u>hannel) a été cloné et exprimé chez la mouche domestique *Musca domestica* (Williamson et al, 1996; Ingles et coll., 1996). Dans la nouvelle nomenclature, il a été renommé MdNa_v (Goldin, 2002). L'année suivante, un gène orthologue à DmNa_v est identifié et cloné chez la blatte allemande *Blattella germanica* et nommé *para*^{CSMA} puis BgNa_v (Dong, 1997). Plus récemment, d'autres orthologues de DmNa_v ont été clonés chez d'autres espèces telles que *Varroa destructor* avec le canal VmNa_v (Wang et coll., 2003), *Bombyx mori* avec le canal BmNa_v (Shao et coll., 2009) et la blatte *Periplaneta americana* avec le canal PaNa_v1 (Moignot et coll., 2009). Chez d'autres espèces dont le génome a été séquencé, plusieurs gènes codant le canal Na_v ont été identifiés par annotation du génome (**Tableau 2**).

Un autre gène apparenté à celui du canal sodium a également été identifié chez *D. melanogaster* (Salkoff et coll., 1987), chez *Heliothis virescence* (Park et coll., 1999) et chez *B. germanica* (Liu et coll., 2002) sur la base des homologies de séquence qu'il présentait avec les gènes orthologues à DmNa_v (30 à 35% d'homologie de séquence). Ce gène a été nommé DSC1 chez la Drosophile (pour <u>D</u>rosophila <u>S</u>odium <u>C</u>hannel) et BSC1 chez *B. germanica*. Dans la nomenclature actuelle (Goldin, 2002), les canaux de type DSC1 sont également

nommés $Na_v 2$. Il est à noter que certaines études ont également appelé le canal Na_x par ce même nom, rendant parfois difficile de déterminer la nature des canaux étudiés. Toutefois, des études moléculaires et électrophysiologiques ont montré que ce canal est sélectif aux ions $Ca2^+$ et Na^+ (Zhou et coll., 2004). Il est donc aujourd'hui admis qu'un seul gène code la sousunité principale chez les insectes.

Origine des séquences	Espèces	Nom	Taille (aa)	N° Accession protéique	Références
Cadre de	Drosophila melanogaster	DmNa _v 1	~2000	ND	Olson et coll., 2008
lecture cloné et canal	Blattella germanica	para ^{CSMA} (BgNa _v 1)	~2000	AAL88448 (KD1) AAL88449 (KD2)	Tan et coll., 2002a
l'ovocyte de	Diationa gormanica	BgNa _v 1	2000	ND	Song et coll., 2004
xénope	Varroa destructor	VdNa _v 1	2215	AAP13992	Du et coll., 2009
Cadre de	Drosophila melanogaster	para (DmNa _v 1)	~2000	ND	Warmke et coll., 1997
reconstitué et canal exprimé	Musca domestica	Vssc1 ^{NAIDM} (MdNa _v 1	~2000	ND	Smith et coll., 1997 Lee et coll., 2000
Cadre de		PaNa _v 1	2051	ACX44801	
lecture cloné,	Periplaneta americana	PaFPC1	1553	ACX44802	Moignot et coll., 2009
exprimé		PaFPC2	1553	ACX44803	
	Drosophila melanogaster	para (DmNa _v 1)	2131	AAB59195	Loughney et coll., 1989 Ramaswani et Tanouye, 1989
		(MdNa _v 1)	2105	AAB47604	Knipple et coll., 1994 Ingles et coll., 1996
	Musca domestica	Vssc1 ^{330ge} (MdNa _v 1)	2104	AAB47605	Knipple et coll., 1994 Ingles et coll., 1996
		MdNa _v	2108	CAA65448	Williamson et coll., 1996
	Anopheles gambiae	Ag ^{para} (AgNa _v)	2139	CAM12801	Davies et coll., 2007a
	Aedes aegypti	Aa-para (AaNa _v)	2140-2147	ACB37022 ACB37023 ACB37024	Chang et coll., 2009
	Culex pipiens quinquefasciatus	CpNa _v	~2000	ND	Xu et coll., 2006
		para ^{CSMA} (BgNa _v 1)	2025	AAC47483	Miyazaki et coll., 1996 Dong, 1997
	Blattella germanica	para ^{Ectiban-R} (BgNa _v 1)	2025	AAC47484	
	Bombyx mori	BmNa _v	2038	NP_001136084	Shao et coll. 2009
	Pediculus humanus capitis	(PhcaNa _v)	2051	AAP20106 à AAP20108	Lee et coll., 2003
	Pediculus humanus corporis	Pedhu (PhcoNa _v)	2086	BAC67159	Tomita et coll., 2003
O a data da	Varroa destructor	VdNa _v	2215	AAP13992	Wang et coll., 2003
Lecture	Drosophila erecta	DeNa _v	2130	XP_001977935	Clark et coll., 2007
reconstitué.	Drosophila ananassae	DaNa _v	2136	XP_001966146	Clark et coll., 2007
canaux non	Droosphila mojavensis	DmoNa _v	2168	XP_002010837	Clark et coll., 2007
exprimés	Drosophila virilis	DvNa _v	2171	XP_002055012	Clark et coll., 2007
	Drosophila willistoni	DwNa _v	2201	XP_002071221	Clark et coll., 2007
	Drosophila grimshawi	DgNa _v	2171	XP_001992511	Clark et coll., 2007
	Drosophila yakuba	DyNa _v	1885	XP_002100817	Clark et coll., 2007
	Bactrocera dorsalis	BdNa _v	2134	AEX08661	Prédiction
	culex pipiens quinquefasciatus	CpNa _v	2129	CAM31891 a CAM31894	Davies et coll., 2007
	Culex pipiens pallens	CppNa _v	2147	BAI77918	Komagata et coll., 2010
	Tribolium castaneum	TcNa _v	~2000	NP_001159381 NP_001159380	Prédiction
	Bombus impatiens	BiNav	2044	XP_003488828	Prédiction
	Bombus terrestris	BtNa _v	2044	XP_003397764	Prédiction
	Apis mellifera	AmNa _v	2044	NP_001159377	Prédiction
	Nasonia vitripennis	NvNa _v	2084	NP_001128389	Davies et coll., 2007
	Harpegnathos saltator	HsNa _v	~2000	XP_003704878 à XP_003704881	Bonasio et coll., 2010
	Megachile rotundata	MrNa _v	~2000	XP_003704878	Prédiction
	Camponotus floridanus	CfNa _v	2088	EFN61422	Bonasio et coll., 2010
-	Danaus plexiplus	DpNa _v	2112	EHJ74501	Prédiction
	Cimex lectularius	CINa _v	2027	ACI43362 ACI43363	Yoon et coll., 2008

Tableau 2 : Recensement des sous-unités	s principales identifiées chez les arth	ropodes (février 2013)
---	---	------------------------

Tableau réalisé à partir d'une recherche dans la banque de données Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) et d'une recherche bibliographique. ND : séquence non déposée dans les banques de données.

Plus récemment, un nouveau gène codant une protéine homologue au canal Na_v a été mis en évidence chez la blatte *P. americana* (Moignot et coll., 2009), montrant que chez cette espèce, deux gènes étaient susceptibles de coder le canal Na_v. Ce deuxième gène, appelé PaFPC (pour <u>Periplaneta americana f</u>our <u>P</u>-domain <u>c</u>hannel), résulterait d'une duplication de gène. Toutefois, PaFPC présente des différences notables avec le gène PaNa_v1. Dans la séquence en acides aminés déduite, le motif correspondant à la porte d'inactivation au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV n'est pas présent. De plus, une autre différence au niveau de l'anneau interne de sélectivité ionique a été observée. En effet, une isoleucine présente chez DmNa_v1, BgNa_v1 et PaNa_v1 est substituée par une leucine chez PaFPC. Ce motif participe à la détermination de la sensibilité à la TTX (Terlau et coll., 1991). Par conséquent, il est prédit que ce canal ne s'inactiverait pas et serait moins sensible à cette toxine que les autres canaux. Enfin, les boucles extracellulaires L1 et L2 sont plus courtes chez PaFPC que chez DmNa_v1, BgNa_v1 et PaNa_v1 (Moignot et coll., 2009).

B-1-2 Relation structure-fonction de la sous-unité principale du canal Nav

La sous-unité principale du canal Na_v forme l'intégralité du pore du canal. Chez l'insecte, comme chez les mammifères, elle est constituée de 4 domaines homologues, numérotés de I à IV, reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques également appelées « linker » (L1, L2 et L3) (Figure 3A). Chaque domaine est formé de 6 segments transmembranaires, S1 à S6, liés par de petites boucles intracellulaires et extracellulaires (Catterall et coll., 2007). Le pore, qui conduit les ions Na⁺, ainsi que le filtre de sélectivité du canal Na_v sont formés par les segments S5 et S6 et par les boucles P (Yu et coll., 2005). Cette boucle P est une boucle particulière située entre les segments S5 et S6 de chaque domaine qui, en réentrant dans la membrane, forme la partie extracellulaire du canal. Au sein de chaque domaine, la boucle P contient deux acides aminés spécifiques formant les filtres de sélectivité du canal. Les segments S6 forment quant à eux la partie intracellulaire du pore (Figure 3B). Les segments S4 de chaque domaine sont impliqués dans la propriété de détection du potentiel. Ils sont appelés détecteurs de potentiel ou "voltage sensor". Dans le linker 3 se trouve la porte d'inactivation qui est impliquée dans l'inactivation rapide du canal Na_v. Cette structure est commune à celle d'autres canaux ioniques (canaux calciques dépendant du potentiel (Ca_v) et canaux NALCN). Les canaux K_v présentent également une structure similaire : la protéine canal à quatre domaines est formée par l'assemblage de quatre sous-unités, chacune constituée d'un domaine à six segments transmembranaires.

B-1-2-1 Le filtre de sélectivité

D'une manière générale, les études sur les relations structures/fonctions des canaux Na_v sont basées sur l'utilisation de toxines naturelles. L'étude des interactions de la TTX et de la saxitoxine (STX) avec les canaux Na_v a permis de mettre en évidence les résidus impliqués dans la sélectivité du canal Na_v aux ions Na⁺. La substitution par mutagenèse dirigée d'un résidu d'acide glutamique, situé dans la boucle P du domaine I, en un résidu glutamine (E386Q) transforme le canal Na_v1.2 de rat (rNa_v1.2) en canal résistant à des concentrations de TTX et de STX supérieures à 10µM (Noda et coll., 1989). La mutation E386Q induit également une diminution de la conductance du canal Na⁺ (Noda et coll., 1989), montrant l'implication du résidu glutamine dans la sélectivité ionique. Parallèlement, une autre étude a établi que la substitution d'un résidu d'acide aspartique, également situé dans la boucle P du domaine I, par un résidu asparagine (D384N) diminue la perméabilité du canal aux ions Na⁺ (Pusch et coll., 1991). Ces deux études montrent donc que des résidus d'acides aminés impliqués dans la sensibilité des canaux à la TTX et à la STX jouent aussi un rôle dans la sélectivité du canal Na_v

Terlau et ses collaborateurs (1991) ont montré que des mutations modifiant les résidus d'acides aminés D384, E387, E942, E945, K1422, M1425, A1714 et D1717, se situant tous dans les boucles P des quatre domaines, induisaient une diminution importante de la sensibilité du canal à la TTX et la STX. La substitution de la lysine du domaine III (K1422) et celle de l'alanine du domaine IV (A1714) rendent le canal sodium sensible aux ions Ca²⁺ et Ba^{2+,} indiquant leur importance dans la sélectivité du canal aux ions Na⁺ (Heinemann et coll., 1992). Ces résidus sont partie intégrante de deux anneaux formés par l'association d'un résidu de chaque domaine et impliqués dans la sélectivité du canal. Le premier anneau, le plus interne, résulte de l'association fonctionnelle des résidus D384 (I), E942 (II), K1422 (III) et A1714 (IV) et est communément appelé motif DEKA (ronds noirs, **Figure 3A**). Le deuxième anneau, plus externe, est formé par les résidus E387 (I), E945 (II), D1426 (III) et D1717 (IV) (ronds blancs, **Figure 3A**) (Catterall et coll., 2003).

Chez les insectes, les quatre acides aminés constituant le filtre de sélectivité DEKA sont aussi retrouvés dans la séquence des canaux Na_v répertoriés dans le **Tableau 2**. Cependant, le deuxième anneau n'est que partiellement conservé. En effet, les résidus glutamate (E) du domaine I et II sont conservés (sauf chez les espèces du genre *Pediculus* où le glutamate du deuxième domaine est remplacé par un résidu glutamine (Q)), ainsi que l'alanine du domaine IV. Le résidu aspartate (D) du domaine III est remplacé par un résidu glutamine (Q) chez toutes les espèces d'insectes répertoriées dans le **Tableau 2** à l'exception de *B. dorsalis* et *C. lectularius* (résidu proline) et de *P. humanus* (résidu glutamate). D'après les études de mutagenèse dirigée réalisées par Terlau et son équipe (1991), les canaux Na_v d'insectes seraient donc légèrement plus sensibles à la TTX (CI50 avec D1426 = 18nM et D1426Q = 9,8 nM) et moins sensibles à la STX (CI50 avec D1426 = 1,2 nM et D1426Q = 2,7 nM).





NH

A. Le canal Na_v est constitué d'une sous-unité principale et d'une ou plusieurs sous unités auxiliaires. La sous-unité principale est constituée de 4 domaines (I à IV) formés par 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les boucles cytoplasmiques qui relient les domaines entre eux sont appelées linker L1, L2 et L3. Le linker 3 contient la porte d'inactivation (h). Entre les segments S5 et S6 de chaque domaine se trouve une boucle particulière appelée boucle P. Deux acides aminés impliqués dans la sélectivité du canal aux ions Na⁺ sont localisés au sein de ces boucles et représentés par des ronds blancs (anneau externe) et noirs (anneau interne) (modifié d'après Yu et coll., 2005). B. Organisation du canal sodium dans la membrane. Les quatre domaines formant le canal sont repliés autour du pore qui conduit les ions Na⁺. Le pore est formé par les segments S5 et S6 de chaque domaine et les boucles P reliant ces deux segments (modifié d'après Amin et coll., 2010).

h

Milieu

COO-

intracellulaire

B-1-2-2 L'activation du canal sodium

Lors de l'analyse de la structure primaire du canal Na_v cloné chez l'anguille électrique, Noda et ses collaborateurs (1984) ont émis l'hypothèse que les segments S4 de chaque domaine se comportaient comme des senseurs de potentiel et étaient donc impliqués dans l'activation du canal. Ces segments S4 sont composés par des résidus chargés positivement (arginine et lysine) tous les trois acides aminés et séparés par deux résidus non polaires (Stühmer et coll., 1989). Cette hypothèse a par la suite été confirmée par des études de mutagenèse dirigée. En effet, lorsque plus de trois résidus chargés positivement étaient remplacés par des résidus neutres ou chargés négativement dans les segments S4 des domaines I et II, les courants Na⁺ dans l'ovocyte de xénope étaient extrêmement réduits, voire nuls (Stühmer et coll., 1989). De plus, le remplacement de quelques résidus chargés positivement du segment S4 du domaine I induisait un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs, indiquant l'implication du segment S4 dans le processus d'activation (Stühmer et coll., 1989).

L'ouverture des canaux Nav est due au changement de conformation des segments S4 suite à une dépolarisation de la membrane. Ce mécanisme est très controversé et plusieurs modèles ont été décrits : le modèle de la vis hélicoïdale, le modèle de la torsion hélicoïdale et le modèle de la pagaie (Figure 4) (Elinder et coll., 2007 ; Börjesson et Elinder, 2008). Le modèle de la vis hélicoïdale a été proposé juste après le premier clonage du canal sodium (Guy et Seetharamulu, 1986; Catterall, 1986). Celui-ci suggère une interaction entre les charges positives du segment S4 et les charges négatives des autres parties du canal. Suite à une dépolarisation, le segment S4 subit une rotation de 180° et se déplace de 13,5 Å vers l'extérieur, permettant ainsi l'ouverture du canal Nav (Keynes et Elinder, 1999; Gandhi et Isacoff, 2002). Puis en 1997, un nouveau modèle appelé torsion hélicoïdale apparait (Papazian et Bezanilla, 1997). Dans celui-ci, le transfert de charge se fait principalement par la rotation de 180° du segment S4 qui se déplace peu (2 à 4 Å) par rapport au modèle de la vis hélicoïdale (Chanda et coll., 2005). Le modèle de la pagaie a été proposé en 2003 à partir des études de cristallographie réalisées sur le canal K_v (Jiang et coll., 2003). Dans ce modèle, le segment S4 et la partie extérieure du segment S3 (appelé segment S3b) forment une pagaie qui va se déplacer dans la membrane d'environ 15 à 20 Å (Jiang et coll., 2003; Ruta et coll., 2005). Ces trois modèles sont encore très controversés aujourd'hui, chacun ayant ses partisans et ses opposants. En effet, l'angle de rotation de 180° du segment S4 est admis, mais le mouvement de translation de ce segment reste encore un sujet très débattu (Börjesson et Elinder, 2008). Des études de mutagenèse dirigée et de modélisation réalisée sur le canal bactérien NaChBac (chez *Bacillus halodurans*) supportent le modèle de la vis hélicoïdale (Charalambous et Wallace, 2011). Cependant, d'autres études portant sur le canal NaChBac et sur le canal Na_vAb (chez *Arcobacter butzleri*) s'appuient sur le modèle de la pagaie (Payandey et coll., 2011; Yarov-Yarovoy et coll., 2011).



Figure 4. Modélisation du mouvement des segments S4 à la suite d'une dépolarisation. Le mouvement des segments S4 est décrit par plusieurs modèles. Dans le modèle de la vis hélicoïdale (à droite), le segment S4 subit une rotation de 60° et se déplace vers l'extérieur de 4,5 Å par étape. Trois étapes, soit une rotation de 180° et un déplacement de 13,5 Å, sont nécessaires pour transférer trois charges positives et permettre l'ouverture du canal. Dans le modèle de torsion hélicoïdale (au centre), le segment S4 subit la même rotation que dans le modèle de la vis hélicoïdale, mais avec un déplacement plus faible. Dans le modèle de la pagaie (à gauche), le segment S4 est rattaché à l'extrémité externe du segment S3 et forme ainsi une pagaie. Suite à la dépolarisation, cette pagaie se déplace à travers la bi-couche lipidique de la membrane. EXT : milieu extracellulaire ; INT : milieu intracellulaire (modifié d'après Börgesson et Elinder, 2008).

B-1-2-3 L'inactivation

B-1-2-3-1 L'inactivation rapide

L'inactivation rapide du canal sodium fait intervenir un cluster de résidus d'acides aminés situés dans la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV. Cette structure, appelée porte ou particule d'inactivation (représentée par un h sur la **Figure 3A**), a été identifiée suite à plusieurs études. Tout d'abord, le traitement de la surface intracellulaire du canal avec des enzymes protéolytiques a montré un blocage de l'inactivation du canal Na_v, indiquant que les structures intracellulaires étaient impliquées dans ce processus (Armstrong, 1973). Puis, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les différentes structures situées du côté intracellulaire du canal a permis de déterminer que le linker 3 était impliqué dans l'inactivation du canal Na_v (Vassilev et coll., 1988, 1989). Parallèlement, Stühmer et coll. (1989) ont montré que le clivage du linker 3 induisait une diminution très importante de la cinétique d'inactivation. Toutes ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de la boucle extracellulaire située entre les domaines III et IV dans le phénomène d'inactivation rapide du canal Na_v.

Par la suite, les résidus impliqués dans l'inactivation rapide ont été identifiés au moyen d'études de mutagenèse dirigée. Chez les mammifères, cette porte d'activation est formée par quatre résidus d'acides aminés successifs très conservés chez de nombreuses espèces, isoleucine (I), phénylalanine (F), méthionine (M), thréonine (T) qui forment le motif IFMT (Patton et coll., 1992 ; West et coll., 1992 ; Kellenberger et coll., 1997). L'alignement des séquences des canaux sodium d'insectes répertoriés dans le **Tableau 2** montre la conservation de cette structure, à ceci près qu'elle est formée par les résidus MFMT. Cependant, deux variants de l'espèce *Tribolium castaneum* (Numéros d'accession Genbank EFA11577 et NP_001159381) présentent un motif légèrement différent (LMMT). Ces canaux n'ayant été ni exprimés ni étudiés, nous ne savons pas s'ils présentent des propriétés d'inactivation différentes.

Le mécanisme d'inactivation rapide fonctionne sur un modèle "boulet-chaîne" dans lequel la porte d'inactivation ferme le pore en se fixant à un récepteur formé par plusieurs régions du canal (Figure 5). Chez les mammifères, ce récepteur est formé par les boucles cytoplasmiques situées entre les segments S4 et S5 des domaines III et IV (Smith et Goldin, 1997; McPhee et coll., 1998) et l'extrémité cytoplasmique du segment S6 du domaine IV (Ragsdale et coll., 1994; McPhee et coll., 1995). Plus précisément, il a été montré que la phénylalanine de la particule d'inactivation interagissait avec une alanine (en position 1329 chez le rat) située dans la boucle reliant les segments S4 et S5 du domaine III (Smith et Goldin, 1997) et avec une asparagine (en position 1662 chez le rat) située dans la boucle reliant les segments S4 et S5 du domaine IV (McPhee et coll., 1998). De plus, la mutation dans le segment S6 du domaine IV d'un cluster de trois résidus d'acides aminés (VIL1774-6AAA) perturbe fortement l'inactivation rapide (McPhee et coll., 1994). Enfin, McPhee et coll. (1995) ont montré que les résidus F1764 et V1774 situés dans le segment S6 du domaine IV jouaient un rôle important dans l'inactivation rapide du canal. Chez les insectes, l'alignement des séquences des canaux Nav répertoriés dans le Tableau 2 montre que les résidus constituant le récepteur de la particule d'inactivation sont également très conservés.



Figure 5. Modélisation du mécanisme d'inactivation du canal Na_v. La boucle cytoplasmique contient la porte d'inactivation formée par les résidus d'acides aminés IFMT (chez les mammifères). Celle-ci se replie pour obstruer le pore en se fixant sur un récepteur formé par des résidus situés dans les boucles intracellulaires liant les segments S4 et S5 des domaines III et IV et l'extrémité cytoplasmique du segment S6 du domaine IV (modifié d'après Catterall et coll., 2000). Par extrapolation, l'inactivation rapide pour le canal Na_v d'insectes fait intervenir les résidus d'acides aminés MFMT.

Plusieurs études réalisées sur les canaux Na_v de mammifères suggèrent également une implication de l'extrémité C-terminale du canal Na_v dans son processus d'inactivation rapide. En effet, l'inactivation du canal Na_v 1.5 chez l'humain plus lente que celle des canaux Na_v 1.4 et Na_v 1.2 serait imputable à la région C-terminale du canal (Deschênes et coll., 2001 ; Mantegazza et coll., 2001). De plus, des études ont montré que des mutations au niveau du Cterminal du canal Na_v 1.5 impliquées dans le syndrome du QT long, perturbaient l'inactivation rapide (Wei et coll., 1999 ; Deschênes et coll., 2000). Le processus d'inactivation serait modulé par la présence d'hélices α dans la région C-terminale du canal (Cormier et coll., 2002).

Enfin, de nombreuses études indiquent que les segments S4 de chaque domaine, qui sont impliqués dans l'activation du canal sodium, jouent également un rôle dans l'inactivation du canal (Chen et coll., 1996 ; Kühn et Greeff, 1999). En effet, des mutations au niveau de ces segments montrent un décalage des courbes d'inactivation, mais aussi une diminution de la pente de la courbe (Chen et coll., 1996).

B-1-2-3-2 L'inactivation lente

L'inactivation lente du canal Na_v (Figure 6) est un phénomène moins bien connu et fort probablement plus complexe que l'inactivation rapide. Il fait intervenir de nombreuses régions du canal principalement situées dans la région du pore. Plusieurs études de mutagenèse dirigée ont mis en évidence que l'inactivation lente implique un changement de conformation de la région externe du pore. Ainsi, la substitution par une méthionine d'un résidu thréonine (T698 chez le rat et T704 chez l'humain) situé dans le segment S5 du domaine II altère les propriétés d'inactivation lente du canal (Cummins et Sigworth, 1996; Hayward et coll., 1997; Bendahhou et coll., 1999). Plusieurs résidus, tels que l'isoleucine 1495 dans le segment S5 du domaine IV ou la valine du segment S6 du domaine I, renforcent l'inactivation lente lorsqu'ils sont remplacés respectivement par une phénylalanine ou une méthionine (Bendahhou et coll., 1999; Takahashi et Cannon, 1999). Des mutations dans les segments S6 des domaines II modifient également l'inactivation lente. La substitution de la thréonine T698 par une méthionine M (T698M) induit un déplacement de la courbe d'inactivation lente vers des potentiels dépolarisants. La substitution de la valine 787 par une lysine (V787K) stabilise l'inactivation lente alors que sa substitution par une cystéine (V787C) la déstabilise (Cummins et Sigworth, 1996 ; O'Reilly et coll., 2001).



Figure 6. Représentation schématique de l'inactivation rapide et de l'inactivation lente d'un courant Na⁺. L'intersection des deux tangentes (en rouge) permet de visualiser les deux types d'inactivation.

Des résidus situés dans les boucles P des domaines I et II ont également un effet sur l'inactivation lente (Balser et coll., 1996 ; Vilin et coll., 2001). La substitution d'un résidu tryptophane par une cystéine (W402C) réduit l'inactivation lente (Balser et coll., 1996). Vilin et coll. (2001) ont montré l'importance de la boucle P du domaine II dans le contrôle de l'inactivation lente à l'état stable des canaux hNa_v1.4 et hNa_v1.5 chez l'humain. Ces deux isoformes ont des probabilités d'inactivation lente différentes qui s'expliquent par des résidus

spécifiques, V754 pour Na_v1.4 et I891 pour Na_v1.5 (Vilin et coll., 2001). Enfin, deux études suggèrent que les segments S4 des domaines II et IV jouent un rôle dans l'inactivation lente (Fleig et coll., 1994 ; Mitrovic et coll., 2000).

B-1-2-3-3 L'inactivation ultra lente

Un troisième processus, appelé inactivation ultra lente, a été observé pour le canal $Na_v 1.4$ lors de la substitution d'une lysine par une sérine (K1237S) ou un résidu glutamate (K1237E) dans la boucle P du domaine III, ainsi que lors de la substitution d'une alanine par un résidu aspartate (A1529D) dans la boucle P du domaine IV (Todt et coll., 1999 ; Hilber et coll., 2001). Ces deux résidus (K1237 et A1529) sont également impliqués dans la sélectivité du canal aux ions sodium car ils appartiennent au motif DEKA. Une étude réalisée par Hilber et coll. (2002) a montré que l'inactivation ultra lente est inhibée par la fixation de la porte d'inactivation sur son récepteur.

Il existe donc différents états d'inactivation du canal Na_v impliquant chacun des régions différentes du canal. Ceux-ci peuvent être modulés par des facteurs extérieurs ou alors par les sous-unités auxiliaires chez les mammifères. Toutefois, si ces différents mécanismes sont très étudiés pour les canaux Na_v des mammifères, il n'existe que peu d'études sur l'activation et sur les différents états d'inactivation des canaux Na_v d'insectes (Song et coll., 2004 ; Lin et coll., 2009 ; Du et coll., 2010).

B-1-3 Le canal sodium dans l'évolution

B-1-3-1 Phylogénie du canal sodium

L'histoire de l'apparition des canaux Na_v a été décryptée au travers de nombreuses études phylogénétiques (Anderson et Greenberg, 2001 ; Hu et Catterall, 2004 ; Zakon, 2012). Ces dernières s'appuient sur les liens de parenté définis selon plusieurs paramètres tels que les homologies structurales et les identités de séquences.

Selon les études portant sur l'apparition des canaux Na_v , ceux-ci seraient le résultat de l'évolution des canaux K_v . Ces derniers sont apparus il y a trois milliards d'années chez les bactéries et sont toujours présents dans tous les organismes vivants (Anderson et Greenberg, 2001). Il apparaît donc que les canaux K_v sont les fondateurs de la famille des canaux perméables aux ions regroupant : les canaux sensibles au potentiel (parmi lesquels se trouvent les canaux calciques (Ca_v), les canaux Na_v et les canaux K_v), les canaux potassiques sensibles au calcium (BKCa), les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG), et les protéines HCN (canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation) (Yu et Catterall, 2004). Le canal K_v est constitué d'une protéine possédant une structure à six segments transmembranaires (6TM) qui s'associe en tétramère pour former le canal, alors que les canaux Na_v et Ca_v sont des canaux à quatre domaines, suggérant que le canal K_v pourrait être l'ancêtre des canaux Na_v et Ca_v .

Strong et coll. (1993) ont suggéré que le gène codant le domaine à 6TM du canal K_v se serait dupliqué très tôt dans l'évolution des eucaryotes, conduisant à une sous-unité à deux domaines. Le canal complet (quatre domaines) serait ainsi formé par la dimérisation de cette protéine. Cette hypothèse est confirmée par l'existence d'un canal perméable aux ions Ca²⁺ à deux domaines dans les endosomes et les lysosomes (Galione et coll., 2009), ainsi que par les similarités observées entre les domaines I et III, mais aussi II et IV du canal Na_v (Strong et coll., 1993). Le gène codant ce canal a ensuite probablement été dupliqué pour coder une protéine à quatre domaines (Zakon, 2012). Les canaux Na_v et Ca_v à quatre domaines seraient donc le résultat de deux évènements de duplication successifs du gène codant le domaine à 6TM du canal K_v (Anderson et Greenberg, 2001). Cette hypothèse est supportée par les rôles fonctionnels des canaux K_v, Ca_v et Na_v. En effet, la présence des canaux K_v et Ca_v est requise pour des mécanismes de signalisation primordiaux (Charalambous et Wallace, 2011). Les canaux Na_v sont quant à eux importants pour permettre la propagation rapide des PA dans les

axones, chez des organismes possédant un système nerveux développé (Charalambous et Wallace, 2011)

Cependant, il a été montré que les bactéries expriment des canaux K_v à 1 domaine (Derst et Karschin, 1998), des canaux Ca_v à quatre domaines (cch1-mid1, Teng et coll, 2008), mais pas de canaux Nav à quatre domaines (Ren et coll., 2001 ; Koishi et coll., 2004). Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle les canaux Ca_v sont issus de l'évolution du gène codant le canal K_v. Les canaux Na_v, quant à eux, résulteraient de l'évolution du gène codant un canal ayant une structure proche des canaux Ca^{2+} de type T (Goldin, 2002). Cette hypothèse est appuyée par le fait que les quatre domaines du canal Na_v présentent plus de similarités avec les quatre domaines du canal Ca_v qu'entre ses domaines respectifs (Hille, 2001). De plus, cette hypothèse est étayée par l'analyse des acides aminés engagés dans le filtre de sélectivité du canal Na_v (Zakon, 2012). L'étude des séquences protéigues des canaux Na_v et Ca_v chez plusieurs espèces (champignons, choanoflagellés et métazoaires) montre que les choanoflagellés possèdent un canal présentant des caractéristiques des canaux Nav2 (DSC1 chez la drosophile). Chez les métazoaires inférieurs, le filtre de sélectivité de ces canaux est formé par les acides aminés DEEA. Ce motif se situe à l'intersection des motifs observés dans les canaux Ca_v (EEEE) et Na_v1 (DEKA), suggérant que chez ces espèces, ces canaux sont à la fois sélectifs aux ions Ca²⁺ et aux ions Na⁺ (Zakon, 2012). Puis, chez les méduses, le résidu glutamate (E) du domaine II est remplacé par un résidu lysine (K). Le filtre de sélectivité ainsi formé (DKEA) augmente la spécificité du canal aux ions Na⁺, mais reste toutefois moindre que pour le motif DEKA (Lipkind et Fozzard, 2008). Enfin, le filtre de sélectivité DEKA apparait chez les Bilatériens et leur confère une sélectivité aux ions Na⁺ plus prononcée (Liebeskind et coll., 2011).

Cependant, la découverte relativement récente d'un canal Na_v se présentant sous la forme d'un homotétramère de domaines à 6TM chez des organismes procaryotes primitifs pourrait remettre en cause cette hypothèse (Ren et coll., 2001 ; Koishi et coll., 2004). En effet, ce canal présente d'importantes similarités avec les canaux Na_v et Ca_v de Vertébrés. Le fait que seuls des organismes multicellulaires, tels que la méduse, le calamar et la drosophile expriment des canaux sodium à quatre domaines (Loughney et coll., 1989 ; Sato et Matsumoto, 1992 ; Anderson et coll., 1993 ; Nagahora et coll., 2000) suggère que ces canaux à quatre domaines pourraient résulter de deux évènements successifs de duplication et de fusion du gène codant un canal Na_v bactérien à un seul domaine (Yu et Catterall, 2004 ; Yu et coll., 2005). Les récentes études de cristallographie réalisées sur les canaux Na_v de

procaryotes appuient cette hypothèse (Payandey et coll., 2011 ; Charalambous et Wallace, 2011 ; Zhang et coll., 2012).

B-1-3-2 Evolution du canal sodium chez les Vertébrés et les Invertébrés

Chez les Vertébrés, les différentes isoformes du canal Nav sont réparties en cinq branches sur l'arbre phylogénétique. Cette répartition est relativement bien corrélée avec la localisation chromosomique des gènes codant ces différentes isoformes (Plummer et Meisler, 1999 ; Goldin, 2002). De plus, il a été observé que chaque segment de chromosome portant les différents gènes codant le canal sodium porte également un complexe de gène HOX (gènes impliqués dans le développement). Ceci suggère que l'expansion des gènes codant le canal sodium est associée à une première duplication du génome qui a eu lieu avant la divergence pré-Vertébrés et Invertébrés (Plummer et Meisler, 1999). Cette duplication a généré quatre complexes de gènes HOX, qui sont également identifiables pour les gènes codant les canaux Nav. En effet, ces sous-unités sont réparties en quatre groupes comprenant i) les sous-unités Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.7 et Nax, ii) les sous-unités Nav1.4 et Nav1.6, iii) les sous-unités Nav1.5 et Nav1.8 et iv) la sous-unité Nav1.9 (Plummer et Meisler, 1999 ; Goldin, 2002). Puis, les gènes à l'origine des trois premiers groupes se sont dupliqués et ont conduit à l'apparition de nouveaux gènes.

Chez l'humain, les gènes codant les sous-unités Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.7 et Na_x forment un cluster de gènes sur le chromosome 2. Ces canaux représentent la plus importante branche de l'arbre, ce qui suggère qu'ils possèdent un ancêtre commun (Goldin, 2002). Le gène codant la sous-unité Na_x diverge légèrement sur cette branche de l'arbre par rapport aux autres gènes. Ceci pourrait expliquer le fait que le canal codé par ce gène ne soit pas fonctionnel dans un système hétérologue. En effet, cette protéine a un rôle physiologique différent, autre qu'un canal sodium dépendant du potentiel (Watanabe et coll., 2000). Le gène codant la sous-unité Na_v1.6 est situé sur une branche proche de celle où se trouvent les cinq isoformes cités ci-dessus, suggérant un ancêtre commun à ces deux groupes de sous-unités. La sous-unité Na_v1.4 se trouve également sur une branche séparée, ce qui concorde avec sa localisation chromosomique (Goldin, 2002). Les gènes codant les trois sous-unités résistantes à la TTX, Na_v1.5, Na_v1.8 et Na_v1.9, sont répartis sur deux branches distinctes, bien qu'ils soient situés sur le même chromosome. Cette observation suggère que le gène codant Na_v1.9

et les gènes codant $Na_v 1.5$ et $Na_v 1.8$ ont un ancêtre différent (Plummer et Meisler, 1999 ; Goldin, 2002).

Contrairement aux Vertébrés, l'évolution du canal Na_v est peu étudiée chez les Invertébrés. L'arbre phylogénétique du canal Na_v chez les Invertébrés est formé par deux branches (Spafford et coll., 1999 ; Goldin, 2002). L'une d'elles contient, entre autres, les canaux Na_v d'insectes DmNa_v1 (Loughney et coll., 1989), MdNa_v1 (Ingles et coll., 1996) et BgNa_v1 (Dong, 1997) et autres orthologues de DmNa_v1, ainsi que deux gènes codant des canaux Na_v chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. Ces canaux de type Na_v1 induisent un courant entrant (**Figure 7**). L'autre branche comprend, entre autres, les canaux DmNa_v2 (DSC1) et BgNa_v2 (BSC1), ainsi que deux gènes codant des canaux Na_v chez la sangsue suggère deux évènements de duplication lors de l'évolution de cette espèce (Goldin, 2002). L'expression du canal BSC1 ayant montré des propriétés similaires à celle d'un canal Ca_v, celui-ci ne serait donc pas un vrai canal sodium (Zhou et coll., 2004 ; **Figure 7**). Cette découverte suggère que, bien que l'arbre phylogénétique des canaux Na_v sélectifs aux ions Na⁺ (Goldin, 2002).

Cependant, Moignot et coll. (2009) ont récemment identifié et cloné un nouveau membre de la famille des canaux Na_v. Ce canal, nommé PaFPC, présente 59% d'homologie avec le canal PaNa_v1. Sa topologie est la même (4 domaines chacun constitués de 6 segments transmembranaires) mais il présente plusieurs différences importantes concernant sa constitution en acides aminés. Au cours de sa thèse, B. Moignot a montré que la sous-unité PaFPC présente un senseur de potentiel, mais que la charge nette de celui-ci est plus faible que celle des sous-unités principales des autres canaux Na_v (Moignot, 2010). De plus, il a été observé que la sous-unité PaFPC ne possède pas le motif MFMT formant la porte d'inactivation du canal Na_{v.} ni les résidus d'acides aminés impliqués dans le récepteur de la particule d'inactivation (Moignot et coll., 2009; Moignot, 2010). En effet, à la place de ce motif très conservé entre les espèces d'insectes se trouvent les résidus d'acides aminés ATDS (Moignot et coll., 2009). Toutefois, la sous-unité PaFPC possède les résidus impliqués dans les anneaux de sélectivité (DEKA et EEQD), indiquant que le canal induit par cette protéine possèderait une sélectivité aux ions Na⁺, comme les canaux de type Na_v1 (Moignot, 2010). Ces observations suggèrent que la protéine PaFPC pourrait induire un courant Na⁺ avec des propriétés d'activation et d'inactivation inhabituelles. Malheureusement, les tentatives





Figure 7. Structure des canaux de type Nav1, BSC1/DSC1 et PaFPC, et courants qui leurs sont associés. Les canaux de type Nav1 exprimés dans l'ovocyte de xénope induisent un courant entrant suite à une dépolarisation de -100 mV à -10 mV, pendant 20 ms. En ce qui concerne le canal PaFPC, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée jusqu'à maintenant. Le canal BSC1 exprimé dans l'ovocyte de xénope (10 ng d'ARN, 4 jours d'incubation) induit un courant sortant suite à une dépolarisation de -100 mV à -10 mV, pendant 2 s (Zhou et coll., 2004).

D'après l'étude phylogénétique réalisée par Moignot et coll. (2009), le canal PaFPC serait membre d'une nouvelle famille de canaux à quatre domaines transmembranaires contenant une boucle P. Celui-ci se branche à la base des canaux Na_v d'insectes, montrant pour la première fois une forte proximité phylogénétique entre deux gènes codant une sousunité α du canal Na_v, chez la même espèce d'insecte (Moignot, 2010). Cette étude suggère que les gènes PaNa_v1 et PaFPC résultent d'un évènement de duplication (Moignot et coll., 2009).
Introduction bibliographique. Chapitre 1

B-2 Les sous-unités auxiliaires du canal Na⁺

B-2-1 Les sous-unités auxiliaires ou sous-unités β du canal Na^+ chez les Vertébrés

B-2-1-1 Biologie moléculaire et structure des sous-unités β

Chez les Vertébrés, quatre sous-unités auxiliaires ont été identifiées et nommées $\beta 1$ à $\beta 4$ (Isom et coll., 1992 ; Isom et coll. 1995a ; Morgan et coll., 2000 ; Yu et coll., 2003). Elles sont codées par quatre gènes appelés SCN1B à SCN4B (**Tableau 3**). Ces gènes ont été clonés chez plusieurs espèces de mammifères telles que le rat, la souris et l'homme (pour revue, Tseng et coll., 2009). Des gènes orthologues à ceux-ci ont aussi été identifiés et clonés chez le poisson-zèbre *Danio rerio* et nommés zbeta1, zbeta2, zbeta3 et zbeta4 (Chopra et coll., 2007).

Les sous-unités β s'associent à la sous-unité α du canal sodium pour former des complexes hétéromultimériques consistant en une sous-unité liée de façon non-covalente (β 1 ou β 3) et une sous-unité liée de façon covalente par un pont disulfure (β 2 ou β 4) (Catterall et coll., 2005). Les sous-unités β 1 et β 3 présentent une forte identité de séquence protéique (57%) alors qu'entre les sous-unités β 2 et β 4, l'homologie est beaucoup plus faible (35%). Contrairement à la sous-unité α , les sous-unités β sont des protéines de petites tailles (215 à 228 acides aminés) et de faible poids moléculaire (33-38 kDa).

Nom	Gène	Poids moléculaire (en kDa)	Taille (en aa)	Expression tissulaire	Références
β1	SNC1B	33	218	SNC, SNP, cellules gliales, muscle squelettique, muscle cardiaque, DRG	Isom et coll., 1992
β2	SNC2B	36	215	SNC, SNP, muscle cardiaque, DRG	Isom et coll., 1995a
β3	SNC3B	-	215	SNC, SNP, glandes surrénales, DRG, muscle cardiaque	Morgan et coll., 2000 Fahmi et coll., 2001
β4	SNC4B	38	228	SNC, SNP, muscle cardiaque, DRG	Yu et coll., 2003 Catterall et coll., 2005

 Tableau 3 : Les sous-unités auxiliaires chez les mammifères

Les sous-unités β présentent toutes la même structure (Isom et coll., 2001 ; Yu et coll., 2003) : une extrémité amino terminale (N-terminale) extracellulaire renfermant un domaine immunoglobuline-like (Ig-like) de type V, un domaine ou segment transmembranaire et une extrémité carboxy terminale (C-terminale) cytoplasmique (**Figure 8**).



Figure 8. Représentation schématique de la structure des sous-unités β **.** Les sous-unités β sont constituées d'une extrémité N-terminale extracellulaire, d'un segment transmembranaire et d'une extrémité C-terminale intracellulaire. L'extrémité N-terminale renferme un domaine Ig-like similaire à celui présent dans les molécules d'adhésion cellulaire (modifié d'après Chahine et O'Leary, 2011).

B-2-1-2 Fonction des sous-unités β

Les sous-unités β jouent trois rôles distincts. Premièrement, elles ont un effet régulateur sur les courants Na⁺ en modulant leur densité ainsi que les propriétés d'ouverture et de fermeture des canaux Na_v. Elles partagent ces fonctions régulatrices avec les sous-unités auxiliaires des canaux K_v et Ca_v (Isom et coll., 1994 ; Adelman, 1995). Deuxièmement, les sous-unités β des canaux Na_v agissent comme molécules d'adhésion cellulaire (Yu et coll, 2005). Cette fonction n'a été observée que pour les sous-unités β du canal Na_v. Troisièmement, il a été montré récemment que la sous-unité β 1 est capable de moduler l'activité des canaux K_v (Nguyen et coll., 2012 ; Marionneau et coll., 2012).

B-2-1-2-1 Les sous-unités β modulent les courants Na⁺

B-2-1-2-1-1 Modulation de la densité du courant Na⁺

Les sous-unités α de Vertébrés sont capables de générer un courant Na⁺, en absence des sous-unités β . Cependant, ces courants sont différents des courants natifs enregistrés dans les neurones. Ils présentent en effet des cinétiques d'activation et d'inactivation plus lentes, suggérant la présence d'autres protéines régulant ces courants (Isom et coll., 1992 ; Isom et coll., 1995a).

Depuis leur découverte, les sous-unités β ont été co-exprimées avec les sous-unités α dans plusieurs systèmes d'expression tels que l'ovocyte de xénope ou les cellules HEK (Human Embryonic Kidney), CHL (Chinese Hamster Lung) ou CHO (Chinese Hamster Ovary), dans le but de déterminer leurs effets sur les courants Na⁺. Le premier effet observé est la régulation de la densité du courant Na⁺. En effet, la co-expression des sous-unités β 1 à β 4 avec les sous-unités α dans l'ovocyte de xénope induit généralement une augmentation de la densité du courant Na⁺ variant de 1,7 à 5,7 fois par rapport à celle mesurée lorsque la sousunité α est exprimée seule (**Tableau 4**). Cette augmentation varie en fonction du type de sousunité α et de sous-unité β exprimées, mais aussi en fonction du type cellulaire dans lequel les sous-unités α et β sont exprimées. Par exemple, la sous-unité β 1 augmente l'amplitude du courant Na⁺ lorsqu'elle est co-exprimée avec la sous-unité Na_v1.8, mais pas en présence de la sous-unité Na_v1.7 (Vijayaragavan et coll., 2001). De même, la sous-unité β3 induit une augmentation de la densité du courant Na⁺ lorsqu'elle est co-exprimée avec la sous-unité Nav1.8 dans l'ovocyte de xénope (Shah et coll., 2000), alors qu'une diminution de la densité du courant est observée dans les cellules HEK-293 avec la même sous-unité α (Zhao et coll., 2011). Dans des cellules CHO, la co-expression de la sous-unité Nav1.3 avec les sous-unités β 1, β 2 ou β 3 n'entraîne aucune modification de la densité du courant Na⁺ (Meadows et coll., 2002).

La co-expression de plusieurs sous-unités β avec une sous-unité α conduit également à une augmentation de la densité du courant Na⁺. L'expression des sous-unités β 1 et β 2 avec la sous-unité Nav1.2 dans des cellules CHL ou dans l'ovocyte de xénope montre une augmentation de la densité du courant Na⁺ par rapport à Na_v1.2 seule, mais celle-ci est identique à celle observée en présence de Na_v1.2 et β1 (Smith et Goldin, 1998 ; Kazarinova-Noyes et coll., 2001). Les effets des sous-unités \beta1 et \beta2 sur la densité du courant ne sont donc pas cumulés. En revanche, l'expression des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ avec la sous-unité Nav1.8 dans l'ovocyte de xénope entraîne une augmentation du courant par rapport à Nav1.8 seule, mais une diminution par rapport Na_v1.8/ β 1, Na_v1.8/ β 1/ β 2 ou Na_v1.8/ β 1/ β 3. Dans cette étude, les sous-unités β 2 et β 3 diminuent l'effet de la sous-unité β 1 (Vijayaragavan et coll., 2004). Chaque sous-unité β module donc la densité de courant Na⁺ de façon différente. De plus, elles agissent différemment en fonction de la sous-unité α à laquelle elles sont associées. Enfin, le système d'expression hétérologue utilisé pour exprimer les différentes combinaisons $\alpha + \beta$ a un impact sur la densité de courant Na⁺ qui peut être dû à des différences de matériel génétique propre à chaque système, des modifications post-traductionnelles, ou des voies de transduction endogènes différentes (West et coll., 1992 ; Qu et coll., 2001).

Sous- unité β	ous- Système nité β d'expression Sous-unité α		Effets	Références
-		Na _v 1.1	Accélération de la cinétique d'inactivation rapide	Smith et Goldin, 1998
		Na _v 1.2	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 2,5) Shift hyperpolarisant de l'inactivation à l'état stable de -19mV Accélération de la cinétique d'inactivation 	Isom et coll., 1992 Patton et coll., 1994
		Na _v 1.3	Accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation	
		embryonnaire	• Shift hyperpolarisant de l'inactivation de 11,3 mV	Detter at call 1004
			 Accélération de la cinétique d'inactivation (x 5) et d'activation Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 5) 	Fatton et con., 1994
β1	Ovocytes de xénope		 Shift hyperpolarisant de l'inactivation de -4 mV Accélération de la récupération de l'état inactivé (x 5,4) Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 1.7) 	Bennett et coll., 1993
		Na _v 1.4	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ Shift hyperpolarisant de l'inactivation de -10,2 mV Accélération de la cinétique d'inactivation 	Wallner et coll., 1993
			 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (240%) Shift hyperpolarisant de l'inactivation à l'état stable de -6mV 	Nuss et coll., 1995
		Na _v 1.5	 Augmentation du courant Na⁺ (x 6) Pas d'effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation, ni sur les dépendances vis-à-vis du potentiels, ni sur la récupération de l'état inactivé 	Qu et coll., 1995
			 Ralentissement de la cinétique d'inactivation d'un courant Na⁺ tardif (I_{NaL}) Augmentation de l'amplitude du courant Na⁺ 	Maltsev et coll., 2009
		Na _v 1.7	 Accélération de la cinétique d'inactivation (x 11) du courant Na⁺ Shift hyperpolarisant de l'activation de - 5,3mV et de l'inactivation à l'état stable de - 1,6mV 	Vijayaragavan et coll., 2001
		Na _v 1.8	 Accélération de la cinétique d'inactivation (x 1,7) du courant Na⁺ Shift hyperpolarisant de l'activation de -8 mV et de l'inactivation à l'état stable de -7,8mV. Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 3,3 à 5,7) 	Vijayaragavan et coll., 2001 Vijayaragavan et coll., 2004
	Callulas	Na _v 1.2	• Shift dépolarisant de l'activation (5,9 mV) et de l'inactivation (3,7 mV)	Qu et coll., 2001
	HEK-293	Na _v 1.8	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 2,3) Shift hyperpolarisant de l'activation (-4 mV) et de l'inactivation (-4,6 mV) 	Zhao et coll., 2011
	Cellules CHL	Na _v 1.2	 Augmentation du courant Na⁺ Shift de l'inactivation à l'état stable vers des potentiels hyperpolarisants Shift de l'activation vers des potentiels hyperpolarisants 	Isom et coll., 1995b

Tableau 4 : Effets des sous-unités auxiliaires de mammifères sur les courants Na⁺

β1	Cellules CHO	Na _v 1.3	 Shift hyperpolarisant de l'inactivation (~ -10 mV) Pas d'effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation 	Meadows et coll., 2002
	Ovocytes de xénope	Na _v 1.1	Accélération de la cinétique d'inactivation rapide	Smith et Goldin, 1998
		Na _v 1.2	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 1,8) Shift hyperpolarisant de l'inactivation (-2mV) Accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation 	Isom et coll., 1995a
β2		Na _v 1.8	• Shift dépolarisant de l'inactivation (3,9 mV)	Vijayaragavan et coll., 2004
	Cellules HEK-293	Na _v 1.2	• Shift dépolarisant de l'activation (3,6 mV) et de l'inactivation (8,5 mV)	Qu et coll., 2001
	Cellules CHO	Nav1.3	• Pas d'effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation	Meadows et coll., 2002
	Ovocytes de xénope	Nav1.2	 Pas d'effet sur les cinétiques d'inactivation Shift hyperpolarisant de l'inactivation (-4,2 mV) 	Morgan et coll., 2003
		Na _v 1.8	Shift dépolarisant de l'inactivation (5 mV)	Vijayaragavan et coll., 2004
		Na _v 1.8	 Shift hyperpolarisant de l'activation (5 mV) Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 3) 	Shah et coll., 2000
β3	Cellules HEK-293	Na _v 1.3	 Shift dépolarisant de l'activation (7 mV) et de l'inactivation (7 mV) Ralentissement de la cinétique d'inactivation Accélération de la récupération de l'état inactivé 	Cummins et coll., 2001
			Ralentissement de la cinétique d'inactivationShift dépolarisant de l'activation	Cusdin et coll., 2010
		Na _v 1.8	• Diminution de l'amplitude du courant Na ⁺ de 31%	Zhao et coll., 2011
	Cellules CHO	Nav1.3	 Shift hyperpolarisant de l'inactivation (~ -10 mV) Pas d'effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation 	Meadows et coll., 2002
	Cellules HEK-293	Nav1.1	Shift hyperpolarisant de l'activation (-5 mV)	Aman et coll., 2009
β4		Na _v 1.2	Shift hyperpolarisant de l'activation (-7 mV)	
		Na _v 1.4	 Shift hyperpolarisant de l'activation (-6,1mV) Peu d'effet sur l'inactivation 	Yu et coll., 2003
		Na _v 1.5	 Peu d'effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation Peu d'effet sur la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation 	
		Na _v 1.6	Shift hyperpolarisant de l'activation (-8 mV)	Zhao at cell 2011
		Na _v 1.8	• Shift hyperpolarisant de l'activation (-17 mV) et de l'inactivation à l'état stable (-9 mV)	Znao et coll., 2011

Cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) : cellules humaines provenant de l'épithélium rénal embryonnaire. Cellules CHL (Chinese Hamster Lung) : cellules pulmonaires de hamster. Cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) : cellules provenant d'un épithélium ovarien de hamster

B-2-1-2-1-2 Modulation des propriétés biophysiques du courant Na⁺

Les sous-unités β ont également un effet modulateur sur les propriétés biophysiques des courants Na⁺. Elles affectent à la fois les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant, les dépendances vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation, mais aussi la récupération de l'état inactivé (**Tableau 4**). Globalement, la co-expression des sous-unités β avec une sous-unité α conduit à une accélération des cinétiques d'activation et/ou d'inactivation très marquée dans l'ovocyte de xénope. Par exemple, dans ce système d'expression, la sous-unité β 1 accélère les cinétiques d'inactivation des courants mesurés pour toutes les sous-unités α à l'exception de la sous-unité Na_v1.5 (Isom et coll., 1992 ; Patton et coll., 1994 ; Qu et coll., 1995 ; Smith et Goldin, 1998). Le domaine Ig-like de la sous-unité serait impliqué dans cette régulation. Ainsi, sa suppression annule l'effet de la sous-unité β 1 sur l'inactivation (McCormick et coll., 1998). En revanche, dans d'autres systèmes d'expression (cellules CHO, CHL ou HEK), l'effet de ces sous-unités sur les cinétiques d'activation et d'inactivation est beaucoup moins important, voire inexistant (Meadows et coll., 2002). Dans les cellules HEK, la sous-unité β 3 induit un ralentissement de la cinétique d'inactivation du canal Na_v1.3 (Cusdin et coll., 2010).

Si les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ ont majoritairement peu d'effet sur l'activation, elles modulent la dépendance au potentiel de l'inactivation. En fonction de la sous-unité α avec laquelle elles sont exprimées et du type de système d'expression utilisé, cette dépendance au potentiel est déplacée vers des potentiels dépolarisants (Vijayaragavan et coll., 2004 ; Qu et coll., 2001) ou hyperpolarisants (Isom et coll., 1992 ; Isom et coll., 1995a). La sous-unité $\beta 3$ a quant à elle un effet à la fois sur l'activation et l'inactivation (**Tableau 4**). La sous-unité $\beta 4$, exprimée dans des cellules HEK induit un déplacement de l'inactivation vers des potentiels hyperpolarisants, quelle que soit la sous-unité α qui lui est associée (Aman et coll., 2009 ; Yu et coll., 2003 ; Zhao et coll., 2011).

Peu d'études montrent l'effet des sous-unités β sur la récupération de l'état inactivé. Cependant, il apparaît que cette dernière est accélérée en présence de la sous-unité β 1 associée à la sous-unité Na_v1.4 dans l'ovocyte de xénope (Bennett et coll., 1993) ainsi qu'en présence de la sous-unité β 3 associée à la sous-unité Na_v1.3 dans les cellules HEK (Cummins et coll., 2001). En revanche, dans des cellules CHO, les sous-unités β 1, β 2 et β 3 ralentissent la récupération de l'état inactivé du canal Na_v1.3 (Meadows et coll., 2002). La co-expression de plusieurs sous-unités β avec une sous-unité α conduit également à des modifications des propriétés biophysiques. L'expression des sous-unités β 1 et β 2 avec la sous-unité Na_v1.2 dans l'ovocyte de xénope conduit à l'obtention de courants Na⁺ possédant une cinétique d'activation similaire à celle observée en présence de β 1 seule (Smith and Goldin, 1998). Combiné aux effets des sous-unités β observés sur la densité du courant Na⁺, ces résultats soulignent le fait que les effets de la sous-unité β 1 semblent prendre le dessus sur ceux de la sous-unité β 2. Ce constat est également fait avec la sous-unité β 3. Lorsque celle-ci est co-exprimée avec la sous-unité Na_v1.8 dans l'ovocyte de xénope, elle ne modifie pas la dépendance au potentiel de l'activation. Quand la sous-unité β 1 est rajoutée à ce complexe (Na_v1.8/ β 3), un shift dépolarisant de l'activation est observé comme en présence du complexe Na_v1.8/ β 1. Cet effet est cependant réduit en ce qui concerne l'inactivation (Vijayaragavan et coll., 2004).

B-2-1-2-2 Les sous-unités β comme molécules d'adhésion cellulaire (CAM)

Toutes les sous-unités β identifiées à ce jour contiennent un domaine Ig-like extracellulaire de type V (Isom, 2001 ; Yu et coll., 2003). Cette particularité a été mise en évidence pour la première fois chez la sous-unité β2 qui possède un domaine extracellulaire similaire à deux segments de la CAM contactine (Isom et coll., 1995a). Cette sous-unité β_2 , via son domaine Ig-like, est capable, comme la contactine, de se fixer à des molécules de la matrice extracellulaire, la ténascine-C et la ténascine-R (Srinivasan et coll., 2008). Cette interaction permet la fixation de la sous-unité α à ces molécules via la sous-unité $\beta 2$ (Srinivasan et coll., 2008). L'analyse des domaines N-terminaux des sous-unités β1 et β3 a révélé par la suite une homologie avec une autre CAM : la myéline (McCormick et coll., 1998 ; Morgan et coll., 2000). Ces deux sous-unités β s'associent via leur domaine Ig-like à une neurofascine qui joue un rôle dans l'assemblage des nœuds de Ranvier (Ratcliffe et coll., 2001). Une étude réalisée par Kazarinova-Noyes et coll. (2001) montre que l'association des sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 2$ avec la contactine et une sous-unité α (Na_v1.2) conduit à une augmentation de l'amplitude du courant comparé à la sous-unité α seule ou co-exprimée avec β 1 et/ou β 2. De plus, une augmentation de la fixation de la STX suggère une augmentation de la densité de canaux dans la membrane cellulaire (Kazarinova-Noyes et coll., 2001). Enfin, il a été montré que les sous-unités β participent au recrutement de l'ankyrine au niveau des nœuds de Ranvier, contribuant ainsi à l'adressage membranaire de la sous-unité α et aux interactions du canal avec les molécules d'adhésion de la cellule, la matrice extracellulaire et le cytosquelette intracellulaire (Malhotra et coll., 2000 ; Yu et coll., 2005).

B-2-1-2-3 La sous-unité β 1 module les canaux K_v

Très récemment, deux études ont montré que la sous-unité β 1 était capable d'interagir avec les canaux K_v1 et de moduler leurs propriétés. En effet, il a été montré que dans des cellules de mammifères, la sous-unité β 1 s'assemble avec le canal K_v1.2 ou le canal K_v7.2 (Nguyen et coll., 2012), mais aussi avec le canal K_v4.2 (Marionneau et coll., 2012). Dans l'ovocyte de xénope, β 1 accélère l'activation du canal K_v1.2, déplace la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels hyperpolarisants et accélère la composante rapide de la déactivation (Nguyen et coll., 2012). Dans les cellules de mammifères, β 1 ralentit l'activation du canal K_v7.2 (Nguyen et coll., 2012).

B-2-1-3 L'épissage alternatif des sous-unités β

B-2-1-3-1 Qu'est-ce que l'épissage alternatif?

L'épissage des ARN pré-messagers est une étape cruciale dans la régulation de l'expression des gènes chez les organismes eucaryotes. Il permet l'excision des introns et la liaison des exons pour former les ARN messagers (Keren et coll., 2010). L'épissage alternatif est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel par lequel plusieurs transcrits d'ARNm sont générés à partir d'un ARN pré-messager. Ces transcrits varient de par les régions codantes qu'ils contiennent et donnent lieu à des protéines distinctes (Kim et coll., 2008). L'épissage alternatif de régions non codantes peut être à l'origine de la localisation et de la stabilité des ARN, ainsi que de l'efficacité de leur traduction en protéine (Kim et coll., 2008). Il existe plusieurs formes d'épissage alternatif pouvant être classées en quatre groupes (**Figure 9**) : le saut d'exon (a), les sites donneurs et accepteurs alternatifs (b et c), la rétention d'intron (d) (Kim et coll., 2008 ; Keren et coll., 2010). L'exclusion d'exons mutuellement exclusifs (e), les promoteurs alternatifs (f) et les polyA alternatifs, sont également des formes d'épissage alternatif, mais elles sont beaucoup moins fréquentes (Kim et coll., 2008 ; Keren et coll., 2010).



Figure 9. Les différents types d'épissage alternatif. Les évènements d'épissage alternatif sont classés en quatre groupes : (a) le saut d'exon où l'exon est épissé en même temps que les introns qui l'entourent, (b) et (c) les sites donneurs et accepteurs alternatifs qui conduisent à la reconnaissance par le spliceosome d'au moins deux sites d'épissage à la fin d'un exon, (d) la rétention d'intron où un intron est conservé dans l'ARN mature. Les évènements e, f et g, sont des épissages peu fréquents. Les introns sont représentés par des traits pleins et les pointillés indiquent les options d'épissage (modifié d'après Keren et coll., 2010).

B-2-1-3-2 Exemples de rétention d'intron au niveau du gène SCN1B

Chez la sous-unité ß1, deux variants ont été identifiés, chacun issu d'une rétention d'intron (Kazen-Gillespie et coll., 2000 ; Qin et coll., 2003). Le premier variant est le résultat de la rétention de l'intron 3 du gène SCN1B. Identifié et cloné chez le rat, ce variant, nommé β1A (Kazen-Gillespie et coll., 2000), est une protéine de 253 acides aminés (soit 38 de plus que β 1) et possède une nouvelle extrémité 3' générée par la rétention d'intron, différente de celle de β 1. Toutefois, la topologie de la protéine est conservée et le variant β 1A contient un segment transmembranaire suivi d'une extrémité intracellulaire un peu plus longue (3 acides aminés) que celle de ß1. Cependant, une étude récente a démontré que chez l'homme, la sousunité ß1A ne possède pas de domaine transmembranaire et est en fait une protéine soluble (Patino et coll., 2011). Le variant β 1A est très fortement exprimé dans le cerveau pendant le développement embryonnaire, puis son expression diminue après la naissance. A l'inverse, la sous-unité β1 n'est pas exprimée pendant le développement embryonnaire du cerveau et son expression augmente au fur et à mesure que celle de ß1A diminue (Kazen-Gillespie et coll., 2000). L'expression de la protéine β1A a aussi été observée dans plusieurs tissus de rat adulte (muscles cardiaques et squelettiques, glandes surrénales). Co-exprimée dans des cellules CHO avec la sous-unité Na_v1.2, le variant β 1A induit une augmentation du courant Na⁺ de 2,5 fois et un léger shift dépolarisant de l'activation inférieur à 3mV. Contrairement à la sous-unité β 1, la sous-unité β 1A n'a pas d'effet sur l'inactivation à l'état stable ni sur les cinétiques du courant (Kazen-Gillespie et coll., 2000). En revanche, elle joue un rôle dans la croissance des neurites en permettant l'adhésion avec les sous-unités β1 neuronales (Patino et coll., 2011).

Le second variant identifié de la sous-unité β 1 est également le résultat d'une rétention partielle de l'intron 3 du gène SCN1B, mais chez l'homme (Qin et coll., 2003). Il a été nommé β 1B et est constitué de 268 acides aminés, soit 53 de plus que la sous-unité β 1 et 15 de plus que la sous-unité β 1A. Cette nouvelle protéine possède une extrémité N-terminale identique à celles des sous-unités β 1 et β 1A, mais présente une extrémité C-terminale différente de β 1 et β 1A, suggérant que la séquence de ce nouveau domaine est spécifique à cette espèce. Tout comme la sous-unité β 1, la sous-unité β 1B est fortement exprimée dans le cerveau et les muscles squelettiques (Isom et coll., 1992 ; Qin et coll., 2003). Elle est également exprimée dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les reins et le pancréas (Qin et coll., 2003). L'expression de la sous-unité β 1B avec la sous-unité Na_v1.2, induit une augmentation de la densité du courant Na^+ (2 fois), mais pas de modification des cinétiques du courant ni des propriétés d'ouverture et de fermeture du canal (Qin et coll., 2003).

En 1994, une autre rétention d'intron a été observée au niveau du gène SCN1B chez le rat, conduisant à la production de deux isoformes de la sous-unité β 1 nommées $\beta_{1.1}$ et $_{\beta1.2}$ (Oh et Waxman, 1994). L'isoforme $\beta_{1.2}$ présente 86 pb de plus que l'isoforme $\beta_{1.1}$, au niveau de la région 3' non-codante, 6 pb après le codon STOP. Des études complémentaires réalisées sur l'ADN génomique ont permis de mettre en évidence la rétention de l'intron 5 dans l'isoforme $\beta_{1.2}$ (Dib-Hajj et Waxman, 1995). Cette rétention d'intron pourrait participer à la régulation des transcrits dans les cellules. En effet, des ARNm possédant la même séquence codante, mais des régions 3' non-codantes différentes, peuvent avoir des demi-vies distinctes (Sureau et Perbal, 1994). Les isoformes $\beta_{1.1}$ et $\beta_{1.2}$ pourraient donc avoir des demi-vies différentes (Dib-Hajj et Waxman, 1995).

B-2-1-4 Pathologies associées aux sous-unités auxiliaires

Chez les mammifères, des mutations présentes dans les sous-unités β sont reliées à des maladies cardiaques et neurologiques (Tableau 5). Des mutations dans la sous-unité β 1 sont impliquées dans des convulsions fébriles (Wallace et coll., 1998 ; Audenaert et coll., 2003 ; Scheffer et coll., 2007). C'est le cas de la substitution de la cystéine (C) 121 en tryptophane (W) dans le domaine (Ig) extracellulaire de β 1, qui induit la rupture d'un pont disulfure (Wallace et coll., 1998). La co-expression dans l'ovocyte de xénope de la sous-unité C121W β 1 (à faible concentration) avec la sous-unité Na_v1.2 de rat (rNa_v1.2) a montré une diminution de la modulation des courants sodiques par rapport à la sous-unité β 1. Ceci serait probablement dû à une diminution de l'affinité la sous-unité C121Wβ1 pour la sous-unité α (Meadows et coll., 2002). De plus, une étude électrophysiologique réalisée sur des cellules CHO a montré que la sous-unité C121WB1 favorise l'ouverture des canaux hNav1.3 à des valeurs de potentiel plus négatives, induisant une augmentation de l'amplitude des courants et donc de l'excitabilité cellulaire (Meadows et coll., 2002). La substitution d'une arginine par une cystéine dans le domaine Ig extracellulaire (R125C) de la sous-unité ß1 conduit également à une forme d'épilepsie sévère chez le nourrisson, appelée le syndrome de Dravet. In vitro, cette substitution ne modifie pas la synthèse de cette protéine, mais elle n'est plus transportée à la surface des cellules. Dans des cellules CHL exprimant le canal Nav1.2, la sous-unité R125Cβ1 induit une diminution de la densité de courant sodium comparée à β1 (Patino et coll., 2009). D'autres mutations conduisant à différentes formes d'épilepsie ont été identifiées sur le gène SCN1B et sont répertoriées dans le **Tableau 5**. Une mutation présente au niveau de la sous-unité β 1A, dans une région qui lui est propre, est également impliquée dans l'épilepsie idiopathique (Patino et coll., 2011).

La sous-unité $\beta 2$ présenterait un intérêt pour la neuroprotection. En effet, O'Malley et coll. (2009) ont montré que la perte de fonctionnalité de la sous-unité $\beta 2$ induit un effet neuroprotecteur chez des souris transgéniques utilisées dans l'étude de la sclérose en plaque.

Le gène SCN3B fait partie des gènes qui sont régulés dans l'hippocampe des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (LTE) sans sclérose de l'hippocampe (van Gassen et coll., 2007). En effet, le niveau d'expression de la sous-unité β 3 dans l'hippocampe des patients atteints de LTE sans sclérose de l'hippocampe est très nettement diminué par rapport aux sujets sains.

Enfin, une diminution de l'expression de la sous-unité β 4 a été observée dans le striatum de souris transgéniques utilisées pour étudier la maladie de Huntington (Oyama et coll., 2006).

Sous- unité β	Maladies	Relations avec la maladie	Modèle animal	Références
β1	 Convulsions fébriles Syndrome de Dravet Epilepsie du lobe temporal Blessure nerveuse traumatique 	 Substitution C121W dans le domaine Ig extracellulaire Transversion d'un A en C au niveau du site d'épissage de l'exon 3 Substitutions C121W mais aussi R85C/H Substitution R125C dans le domaine Ig extracellulaire 	Humain Souris	Wallace et coll., 1998 Meadows et coll., 2002 Audenaert et coll., 2003 Chen et coll., 2004 Scheffer et coll., 2007 Patino et coll., 2009
β1Α	• Epilepsie idiopathique	 Substitution G257R dans une région propre à β1A 	Humain	Patino et coll., 2011
β2	 Sclérose en plaque Douleur neuropathique post-traumatique Douleur inflammatoire Blessure nerveuse traumatique 	Régulation négative de l'expression de la sous-unité β2	Humain Souris	O'Malley et coll., 2009
β3	 Epilepsie du lobe temporal sans sclérose de l'hippocampe Blessure nerveuse traumatique 	Régulation négative de l'expression de la sous-unité β3	Humain	Van Gassen et coll., 2009
β4	Maladie de Huntington	Diminution de l'expression de la sous-unité dans le striatum	Souris Homme	Oyama et coll., 2006

Tableau 5 : Pathologies associées aux sous-unités auxiliaires de mammifères

B-2-2 Les sous-unités auxiliaires chez les insectes

Contrairement aux sous-unités β de Vertébrés pour lesquelles de nombreuses études ont été réalisées, peu d'informations sont disponibles sur les sous-unités auxiliaires d'insectes.

B-2-2-1 Biologie moléculaire et structure des sous-unités auxiliaires d'insectes

Des études réalisées chez des souches mutantes de drosophile ont montré qu'une mutation au niveau du gène *tipE* (pour temperature-induced paralysis locus <u>E</u>) avait un impact sur la fixation de la STX au canal Na⁺ (Jackson et coll., 1986). De plus, cette mutation induisait une diminution de la densité de courant Na⁺ dans des neurones embryonnaires de drosophile (O'Dowd et Aldrich, 1988). En 1995, Feng et coll. réalisent le clonage du gène *tipE* chez *D. melanogaster*, du fait de l'importance que semble avoir ce gène sur l'expression du canal (Feng et coll., 1995a, 1995b). Le gène *tipE* code une protéine (DmTipE) de 50,2 kDa, chargée négativement et contenant 452 résidus d'acides aminés. D'après le profil d'hydrophobie, la séquence de DmTipE présente deux domaines transmembranaires putatifs (**Figure 10**) : le premier domaine est constitué de 39 acides aminés (positions 14 à 52) et le second domaine de 27 acides aminés (positions 274 à 300).



Figure 10. Structure des sous-unités auxiliaires du canal Na_v chez l'insecte (A) et du canal BKCa chez les mammifères (B). A. La sous-unité auxiliaire du canal sodium possède deux domaines transmembranaires liés par une large boucle extracellulaire, et des extrémités N-terminale et C-terminale cytoplasmiques. B. La structure de la sous-unité β du canal BKCa présente également deux domaines transmembranaires, mais ceux-ci sont reliés par une boucle cytoplasmique plus courte. L'extrémité C-terminale de ce canal est plus courte que celle des sous-unités auxiliaires du canal sodium. Les points rouges (•) représentent les ½ cystines impliquées dans la formation des ponts disulfures chez la sous-unité β du BKCa et qui sont conservés chez les sous-unités auxiliaires du canal Na_v (modifié d'après Feng et coll., 1995 ; Derst et coll., 2006 ; Savalli et coll., 2007).

Par la suite, une étude bioinformatique réalisée par Derst et coll. (2006) a permis de découvrir quatre protéines homologues à DmTipE chez la drosophile. Ces quatre nouvelles sous-unités ont été appelées DmTEH1 à DmTEH4 pour TipE Homologs (Tableau 6). Les sous-unités DmTEH1 et DmTEH2 sont de petite taille (279 et 309 acides aminés) et présentent 34% d'identité de séquence protéique. Les sous-unités DmTEH3 et DMTEH4 sont de plus grande taille (448 et 524 acides aminés) et ont 39 % d'identité de séquence protéique. Tout comme la sous-unité DmTipE, ces quatre nouvelles protéines sont constituées de deux segments transmembranaires reliés entre eux par une large boucle extracellulaire. Chez les sous-unités DmTEH3 et DmTEH4, cette boucle renferme deux domaines extracellulaires de type EGF-like (Epithelial Growth Factor –like) riches en 1/2 cystines et similaires à ceux de la fibrilline-2 humaine, suggérant une fonction particulière des sous-unités DmTEH3 et DmTEH4. En effet, ces domaines pourraient interagir avec des composants de la matrice extracellulaire ou avoir d'autres rôles structuraux (Derst et coll., 2006). Aucun homologue des sous-unités β de mammifères n'est présent dans le génome de la drosophile (Littleton et Ganetzky, 2000). En revanche, Derst et coll., (2006) ont montré une homologie structurale entre les sous-unités auxiliaires du canal Nav d'insectes et les sous-unités auxiliaires du canal potassique activé par le calcium (BKCa). En effet, les deux types de sous-unités auxiliaires possèdent deux segments transmembranaires reliés par une boucle extracellulaire (Figure 10). Cette similitude structurale s'étend également dans la boucle extracellulaire où l'on observe la conservation de ¹/₂ cystines qui sont connues pour être impliquées dans la formation de ponts disulfures chez la sous-unité β du canal BKCa (Derst et coll., 2006). Il peut cependant être noté qu'un nombre plus important de ¹/₂ cystines est présent dans la boucle extracellulaire des sous-unités auxiliaires du canal Nav d'insectes. En effet, il y a 8 ¹/₂ cystines dans les boucles extracellulaires des sous-unités TipE, TEH1 et TEH2, 24 dans les boucles extracellulaires des sous-unités TEH3 et 20 dans les boucles extracellulaires des sous-unités TEH4. Ce nombre très important de ¹/₂ cystines montre la présence de nombreux ponts disulfure putatifs au sein de la boucle extracellulaire des sous-unités auxiliaires du canal Nav d'insectes. En comparaison, la boucle extracellulaire des sous-unités β du BKCa de mammifères ne contient que 4 ¹/₂ cystines, mais celle-ci est beaucoup moins large que chez les sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insectes.

Un gène orthologue au gène *tipE* a par la suite été identifié et cloné chez *Musca domestica* (Lee et coll., 2000). Ce gène, nommé *Vsscβ*, puis *MdTipE*, code une protéine de 438 acides aminés, d'une masse moléculaire de 48,8 kDa. La sous-unité MdTipE partage 72% d'homologie de séquence protéique avec DmTipE (Lee et coll., 2000). A ce jour, MdTipE est la seule sous-unité homologue à DmTipE qui a été clonée et exprimée chez une autre espèce d'insectes que *D. melanogaster*.

Depuis le début des années 2000, plusieurs gènes orthologues aux gènes DmTipE et DmTEH1-4 ont été identifiés chez d'autres espèces d'insectes à partir de l'annotation des génomes (**Tableau 6**). Cependant, certains gènes codant les sous- unités auxiliaires ne sont pas présents chez toutes les espèces d'insectes répertoriées dans ce tableau. En effet, le gène *teh4* est absent du génome des quatre espèces des moustiques *A. gambiae*, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* et *A. darlingi* et du génome du ver à soie *B. mori* (Li et coll., 2011), suggérant la perte de ce gène chez ces cinq espèces. L'absence de ces gènes peut aussi s'expliquer par le fait que le génome de certaines espèces, telles que *A. darlingi*, *Acromyrmex echiniator* ou *Megachile rotundata*, ne soit pas encore totalement séquencé.

Tableau 6:1	Les sous-unités	auxiliaires	chez les	s insectes
-------------	-----------------	-------------	----------	------------

	Espèces		TipE	TEH1	TEH2	TEH3	TEH4	Références
1ces es	Drosophila	N. Acc	NP_523920 (A) NP_728952 (B)	NP_649959 (A) NP_001262442 (B)	NP_647867 (A) NP_001163345 (B)	NP_652335	NP_647866	Feng et coll., 1995
quen	melanogaster	Taille (aa)	452	279	309 et 313	448	524	Derst et coll., 2006
Séc		N. Acc	AAD31018	-	-	-	-	
	Musca domestica	Taille (aa)	438	-	-	-	-	Lee et coll., 2000
	Tribolium	N. Acc	XP_970009	XP_969821	XP_969868	XP_969938	XP_969803	Prédiction
	castaneum	Taille (aa)	336	264	227	450	467	
	Anopheles gambiae*	Taille (aa)	XP_563317 506	281	290	XP_312093 451	-	Holt et coll., 2002
	Culex pipens	N. Acc	XP_001845939	XP_001847986 (1) XP 001847987 (2)	XP_001845941	XP_001845940	-	Atkinson et coll.,
	quinquefasciatus*	Taille (aa)	467	261 et 285	278	451	-	unpublished
	Aedes aegynti*	N. Acc	XP_001654725	-	XP_001654727	XP_001654726	-	Nene et coll 2007
ome		Taille (aa)	435	-	290	451	-	
gén	Anopheles darlingi	N. Acc	EFR27668	EFR24422	-	EFR27669	-	Prédiction
'np	Padiaulus		205 YP 002430493	200 YP 002430492	- XP 002430495	YP 002430494	- XP 002430496	Kirknoss of coll
ion	humanus corporis*	Taille (aa)	393	299	280	445	472	unpublished
otat		N. Acc	XP_003393417	XP_003393512	XP_003393419	XP_003393420	XP_003393416	
ů u	Bombus terrestris	Taille (aa)	356	298	252	447	463	Prediction
e l's	Bombus impatiens	N. Acc	XP_003492196	XP_003487659	XP_003492198	XP_003492197	XP_003492199	Prédiction
p se		Taille (aa)	356	298	252	447	458	Trealetion
léduite	Nasonia vitripennis	N. Acc	XP_003425769	XP_003425767 (1) XP_003425768 (2)	XP_001606871	-	XP_001606880	Prédiction
ses c		Taille (aa)	351	306 et 303	297	-	466	
ouenb	Apis florea	N. ACC	XP_003698004	XP_003689906	XP_003698005	XP_003698002 (1) XP_003698003 (2)	XP_003698044	Prédiction
Sé		Taille (aa)	356	334	252	446 et 452	461	
	Apis mellifera*	N. ACC	-	XP_001120804	-	XP_003251631	XP_003251630	Prédiction
	Acyrthosiphon	N Acc	- XP 003247890	290 XP 001944615	-	XP 003247891	XP 003247894	
	pisum*	Taille (aa)	442	245	-	477	<u>514</u>	Prédiction
	Dosophila	N. Acc	XP_002035302	-	-	-	XP_002035298	
	sechellia*	Taille (aa)	452	-	-	-	519	Clark et coll., 2007
	Drosophila erecta*	N. Acc	XP_001971855	XP_001980735	XP_1971852	XP_001971853	XP_001971851	Clark et coll 2007
	Brosophila creata	Taille (aa)	452	279	309	448	524	
	Drosophila	N. Acc	XP_001353042	XP_001358570	XP_00135304	XP_001353039	XP_001353038	Clark et coll., 2007
	pseudoobscura [*]	N Acc	455 XP 002026943	279 XP 002013770	304 XP 002026940	448 XP 002026941	524	
	persimilis*	Taille (aa)	455	232	151	331	-	Clark et coll., 2007
	Drosophila	N. Acc	XP_001957734	XP_001953603	XP_001957731	XP_001957732	XP_001957730	
	ananassae*	Taille (aa)	455	279	311	448	524	Clark et coll., 2007
	Drosophila	N. Acc	XP_001983500	XP_001995859	XP_001983497	XP_001983498	XP_001983496	Clark et coll 2007
	grimshawi*	Taille (aa)	464	267	301	449	530	
	Drosophila willistopi*	N. ACC	XP_002068191	XP_002074186	XP_002068189	XP_002068190	XP_002068188	Clark et coll., 2007
Je	Drosophila	N Acc	404 XP 002012170	XP 002001233	XP 002012173	449 XP 002012172	XP 002012174	
L D	mojavensis*	Taille (aa)	456	279	298	448	525	Clark et coll., 2007
n gé	Dracaphilo virilia*	N. Acc	XP_002046321	XP_002054016	XP_002046317	XP_002046318	XP_002046316	Clark at call 2007
u dt	Drosopnila virilis"	Taille (aa)	485	279	298	448	518	Clark et coll., 2007
atio	Drosophila	N. Acc	XP_002083593	-	-	-	XP_002083589	Clark et coll., 2007
not	simulans*	I aille (aa)	434	-	-	-	524	
l'an	Drosophila affinis*	Taille (aa)	-	-	-	AUNO/220 356	-	Clark et coll., 2007
de	Drosophila	N. Acc	-	-	-	-	XP 002093655	
ites	yakuba*	Taille (aa)	-	-	-	-	524	Clark et coll., 2007
édu	Harpegnathos	N. Acc	EFN80530	EFN89297	EFN80532	EFN80531	EFN80533	Reposie et cell 2010
p se	saltator*	Taille (aa)	457	139	242	446	416	Boriasio et coli., 2010
ance	Danaus plexippus	N. Acc	EHJ73913	-	-	EHJ65606	-	Prédiction
huę		I aille (aa)	320	-	-	434	-	-
Sé	Solenopsis invicta*	Taille (aa)	331	EFZ22830 440	243	-	-	Wurn et coll., 2011
1	Camponatus	N. Acc	EFN71413	EFN71411	EFN71415	EFN71414	EFN71416	
	floridanus*	Taille (aa)	370	117	240	444	462	Bonasio et coll., 2010
1	4 or om (r =====	N. Acc	EGI58930	EGIE9022	EGIE9020		ECIE	
	echiniator		EGI58931	LG130833	LG130929	-	LG130320	Prédiction
		Taille (aa)	384	292	240	-	461	
1	Megachile	IN. ACC	-	-	-	XP_003706362	XP_003706361	Prédiction
	loculuard	N°Acc	-	-	-	440 ADD 20080	401	Alves-Silva et coll
	Glossina morsitans	Taille (aa)	-	-	-	449	-	2010

*Espèces dont le génome est séquencé. Recensement au 21 février 2013 à partir de la banque de données GenBank de NCBI. N. Acc : Numéro d'accession protéique

B-2-2-2 Localisation chromosomique et distribution tissulaire

Chez *D. melanogaster*, les gènes codant les sous-unités auxiliaires sont localisés sur deux chromosomes différents. Tout d'abord, les gènes codant DmTipE, DmTEH2, DmTEH3 et DmTEH4 se trouvent sur le chromosome 3L (Derst et coll., 2006). Une étude a récemment montré qu'ils forment un "cluster" génomique très conservé chez les insectes (Li et coll., 2011). En effet, les gènes *Teh2*, *Teh3* et *TipE* se retrouvent dans un même bloc, voisin du gène *Teh4*. Chez la majorité des espèces étudiées, ce "cluster" de gènes est localisé au sein de l'un des introns d'un gène nommé CG18675 chez *D. melanogaster* (Li et coll., 2011). Le gène codant DmTEH1 est sur le chromosome 3R (Derst et coll., 2006).

Des analyses par RT-PCR de différents tissus ont permis de localiser l'expression des gènes codant les sous-unités auxiliaires chez *D. melanogaster* (Derst et coll., 2006). Les cinq sous-unités sont exprimées dans le système nerveux central de l'insecte. Dans les tubules de Malpighi, l'intestin, les glandes salivaires et la paroi musculaire, quatre des cinq sous-unités sont exprimées : DmTipE et DmTEH2-4. Enfin, seules les sous-unités DmTipE, DmTEH2 et DmTEH3 sont exprimées dans le tissu adipeux. Contrairement aux autres sous-unités qui ont une distribution assez ubiquitaire, DmTEH1 se distingue par une expression limitée au système nerveux central (Derst et coll., 2006).

B-2-2-3 Rôle des sous-unités auxiliaires chez les insectes

B-2-2-3-1 Modulation de l'excitabilité neuronale

Lors d'une étude réalisée sur des neurones de drosophile en culture, il a été montré que l'absence de la protéine TipE conduit à une altération de l'activité électrique spontanée des neurones (Hodges et coll., 2002). En effet, les expérimentations effectuées sur les neurones d'une souche mutante *tipE* de drosophile montrent une importante diminution de la fréquence et de la spontanéité de l'activité électrique (Hodges et coll., 2002). Par ailleurs, la densité des courants Na⁺ est également diminuée, induisant une réduction de l'amplitude des PA enregistrés à partir de ces neurones (Hodges et coll., 2002). Cependant, la fréquence et la spontanéité de l'activité électrique des neurones des souches mutantes peuvent être restaurées lorsqu'un transgène contenant la sous-unité TipE sauvage est exprimé dans ces neurones (Hodges et coll., 2002). Ces résultats indiquent que la sous-unité TipE joue un rôle important dans la modulation de l'activité électrique.

B-2-2-3-2 Modulation de la densité du courant Na⁺

Jusqu'à aujourd'hui, les canaux Na_v d'insectes ont été exprimés dans un seul système d'expression hétérologue : l'ovocyte de xénope. Contrairement aux sous-unités α de Vertébrés, il est très difficile d'exprimer les sous-unités homologues à DmNa_v dans un système d'expression hétérologue en l'absence d'une sous-unité auxiliaire. En effet, l'injection de 40 ng d'ARN de la sous-unité DmNa_v seule dans l'ovocyte de xénope produit un courant Na⁺ d'une amplitude de l'ordre de 0,25 µA au bout de 3 à 5 jours à 20°C (Feng et coll., 1995b). En modifiant la quantité d'ARN injecté (> 50ng), le temps et la température d'incubation des ovocytes (7 jours à 18°C), Warmke et coll. (1997) sont parvenus à l'obtention de courants Na⁺ d'une amplitude supérieure à 1µA avec *para* seul.

Comme observé chez les mammifères, les sous-unités auxiliaires d'insectes augmentent la densité du courant Na⁺ à travers les sous-unités principales exprimées dans l'ovocvte de xénope (Tableau 7 ; Feng et coll., 1995b ; Derst et coll., 2006). En effet, dans l'ovocyte de xénope, la co-expression de la sous-unité DmTipE avec DmNav induit une augmentation importante de l'amplitude du courant Na⁺ (Feng et coll., 1995b). Dix ans plus tard, Derst et coll. (2006) ont également montré que les sous-unités DmTEH1, DmTEH2 et DmTEH3, co-exprimées avec DmNa_v, augmentaient la densité du courant Na⁺, mais avec la même ampleur. L'effet le plus important est observé avec la sous-unité DmTEH1 (augmentation d'un facteur 30), puis avec la sous-unité DmTipE (augmentation d'un facteur 10). Les sous-unités DmTEH2 et DmTEH3 augmentent la densité de courant Na⁺ de façon moins importante (5 et 8 fois). Au contraire, la sous-unité DmTEH4 n'a quant à elle aucun effet sur l'amplitude du courant Na⁺ lorsqu'elle est exprimée avec DmNa_v. En revanche, lorsqu'elle est co-exprimée avec DmTEH1 et DmNa_v, elle induit une diminution de la densité de courant Na⁺ par rapport à celle observée avec DmTEH1 et DmNa_v. La sous-unité DmTEH4 aurait un effet inhibiteur sur le courant Na⁺ (Derst et coll., 2006). Ces observations montrent une bonne corrélation avec l'étude réalisée par O'Dowd et Aldrich en 1988, sur des neurones embryonnaires de drosophile en culture. En effet, ils avaient observé une diminution de la densité de courant Na⁺ chez des mutants *tipE*⁻ (O'Dowd et Aldrich, 1988).

Tableau 7 : Effets des sous-unités auxiliaires d'arthropodes sur les courants Na^+ enregistrés dans un système d'expression hétérologue

Sous- unité auxiliaire	Sous-unité principale	Système d'expression	Effets	Références
	<i>para</i> (DmNa _v)		 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 30) 	Feng et coll., 1995b
	DmNa _v	*	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ Accélération de la cinétique d'inactivation (x 2) 	Warmke et coll., 1997
DmTipE	DmNa _v		 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 10) Accélération de la récupération de l'état inactivé par rapport à DmNa_v seul 	Derst et coll., 2006
	Vssc1 (MdNa _v)		 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 2,8) par rapport à MdNa_v seul 	Lee et coll., 2000
	VdNa _v 1a		 Diminution de la densité de courant Na⁺ d'environ 4 fois 	Du et coll., 2009
Vsscβ (MdTipE)	MdNa _v	Ovocytes de	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 5) par rapport à MdNa_v seul Accélération de la cinétique d'inactivation de (x 2,2) Shift dépolarisant de l'inactivation de 3,2 mV par rapport à MdNa_v seul 	Lee et coll., 2000
DmTEH1	DmNav	xénope	 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 30) Shift hyperpolarisant de l'inactivation de -6 mV par rapport à DmNa_v+DmTipE Ralentissement de la cinétique d'inactivation (de 1,3 fois) par rapport à DmNa_v+DmTipE Ralentissement de la récupération de l'état inactivé (2,4 fois plus lente) par rapport à DmNa_v+DmTipE 	Derst et coll., 2006
DmTEH2			 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 5) Shift dépolarisant de l'inactivation de 3,4 mV par rapport à DmNa_v+DmTipE 	
DmTEH3			 Augmentation de la densité de courant Na⁺ (x 8) Shift dépolarisant de l'inactivation de 3,6 mV par rapport à DmNa_v+DmTipE 	
DmTEH4			 Diminution de l'effet de DmTEH1 sur la densité de courant Na⁺ 	

La sous-unité DmTipE a également été co-exprimée avec les sous-unités principales d'autres espèces d'insectes telles que *B. germanica* pour favoriser l'expression des canaux Na_v dans les ovocytes de xénope (Song et coll., 2004, 2006). En effet, DmTipE induit aussi une augmentation du courant Na⁺ chez les autres espèces. Par exemple, chez *M. domestica*, la co-expression de MdNa_v avec DmTipE conduit à une augmentation de 2,8 fois de la densité du courant Na⁺ par rapport à MdNa_v seul (**Tableau 7**). Cependant, cet effet est plus important lorsque MdNa_v est co-exprimé avec MdTipE (Lee et coll., 2000). Ceci indique une conservation des propriétés des homologues de TipE chez les insectes. Une étude récente a montré que la co-expression de DmTipE avec la sous-unité principale délétée de l'exon b (VdNa_v1a) d'un arachnide, l'acarien parasite *Varroa destructor*, induisait une diminution de la densité de courant Na⁺ d'un facteur 4 (Du et coll., 2009).

Pour tester la spécificité des sous-unités auxiliaires de mammifères et d'insectes, Warmke et coll. (1997) ont co-injecté d'une part *para* avec β 1 et d'autre part rNa_v1.2 avec DmTipE, dans l'ovocyte de xénope. Les courants mesurés avec la combinaison rNa_v1.2/DmTipE présentent les mêmes caractéristiques que ceux enregistrés avec rNa_v1.2 seul, indiquant que DmTipE n'a pas d'influence sur les canaux rNa_v1.2 à l'opposé de β 1. De même, aucun courant n'a été mesuré en présence de *para* avec β 1, montrant que la sous-unité β 1 ne module pas les courants Na⁺ d'insectes (Warmke et coll., 1997).

B-2-2-3-3 Modulation des propriétés biophysiques du courant Na⁺

Les sous-unités auxiliaires de type TipE modulent également les propriétés biophysiques du courant Na⁺. Comme observé chez les mammifères, lorsque DmNa_v est co-exprimé avec DmTipE, les courants enregistrés ont des cinétiques plus rapides : ils s'activent et s'inactivent plus rapidement que les canaux DmNa_v seuls (Warmke et coll., 1997). Ils présentent des cinétiques d'activation et d'inactivation similaires à celles des courants Na⁺ enregistrés dans les neurones embryonnaires de drosophile (O'Dowd et Aldrich, 1988). Warmke et coll. (1997) ont montré que les courants mesurés suite à une co-injection de DmNa_v et DmTipE dans l'ovocyte de xénope s'inactivaient deux fois plus vite que les courants obtenus avec DmNa_v seul. Le même résultat a été observé sur des courants Na⁺ enregistrés en présence des sous-unités MdNa_v et MdTipE (Lee et coll., 2000). La sous-unité DmTEH1 agit également sur la cinétique d'inactivation du courant Na⁺. Par rapport à TipE, la présence de DmTEH1 induit un léger ralentissement de la cinétique d'inactivation (Derst et coll., 2006), par ailleurs également observé pour les canaux de mammifères.

La sous-unité DmTipE ne modifie pas les dépendances vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation, alors que les sous-unités DmTEH1 à DmTEH3 et MdTipE ont un effet sur la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation (Warmke et coll., 1997 ; Derst et coll., 2006). La sous-unité DmTEH1 induit un shift hyperpolarisant de l'inactivation alors que les sous-unités DmTEH2, DmTEH3 et MdTipE induisent un shift dépolarisant par rapport à la sous-unité principale, DmNa_v ou MdNa_v, exprimée seule (**Tableau 7**, Lee et coll., 2000 ; Derst et coll., 2006). Enfin, la sous-unité DmTipE accélère la récupération de l'état inactivé du courant Na⁺ par rapport à DmNa_v seule, alors que la sous-unité DmTEH1 la ralentit par rapport à DmNa_v/DmTipE (**Tableau 7**, Derst et coll., 2006).

C- Diversité fonctionnelle des canaux Nav natifs chez les insectes

Beaucoup d'études portant sur les canaux Nav d'insectes ont été réalisées dans des systèmes d'expression hétérologues tels que l'ovocyte de xénope. Chez les insectes, les études réalisées par Song et coll. (2004, 2006) et Olson et coll. (2008) montrent une grande diversité des canaux Nav, tant au niveau moléculaire qu'au niveau fonctionnel. En effet, chez *D. melanogaster*, 27 variants ont été identifiés, clonés et exprimés dans l'ovocyte de xénope (Olson et coll., 2008). Chez *B. germanica*, ce sont 20 variants qui ont été identifiés, clonés et exprimés dans l'ovocyte de xénope (Song et coll., 2004 ; Song et coll., 2006). Ces variants résultent de modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif, édition de l'ARN) conduisant à des variants fonctionnels ou non, avec des propriétés d'activation et d'inactivation différentes (Song et coll., 2004 ; Song et coll., 2004 ; Song et coll., 2008).

Cependant, plusieurs études ont également mis en évidence une diversité fonctionnelle des canaux Na⁺ natifs dans les neurones d'insectes. Zhao et son équipe (2005) ont montré dans des neurones identifiés des ganglions thoraciques de la blatte *P. americana* deux types de courants Na⁺ distingués en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Le premier de ces courants Na⁺, appelé courant Na⁺ de type I, est caractérisé par des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides. Il est bloqué par la TTX à une concentration de 400 nM, mais pas par le chlorure de cadmium (CdCl₂) à une concentration de 50 μ M. Le second type de courant Na⁺ coexiste avec un courant présentant des cinétiques d'activation lentes. Il est bloqué par la présence de CdCl₂ à 50 μ M ou par la suppression du Ca²⁺ extracellulaire et seule la composante rapide de ce courant disparaît en présence de TTX (400 nM) ou en absence d'ions Na⁺ dans le milieu extracellulaire. La composante lente est éliminée en présence de CdCl₂ (50 μ M) ou en absence de Ca²⁺ extracellulaire. Ces données indiquent que la composante rapide de ce courant correspond à un courant Na⁺, appelé courant Na⁺ de type II (Zhao et coll., 2005).

Les courants de type I et de type II présentent des propriétés d'inactivation rapide et lente différentes. En effet, les courants de type I s'inactivent à des potentiels plus négatifs que les courants de type II, à la fois pour l'inactivation rapide et pour l'inactivation lente. De plus, ils possèdent tous deux une sensibilité différente au DCJW⁵. Les courants de type I sont réduits d'environ 80% en présence d'1 μ M d'indoxacarbe ou de DCJW à -100mV. Cependant, cette inhibition est irréversible avec le DCJW alors qu'elle ne l'est pas avec l'indoxacarbe (Zhao et

⁵ Métabolite actif de l'indoxacarbe, insecticide de la classe des oxadiazines (voir Chapitre 2, paragraphe B-1-1)

coll., 2005). Les courants de type II sont quant à eux insensibles au DCJW et à l'indoxacarbe (1 μ M) à -100 mV, mais sont bloqués par les mêmes concentrations d'indoxacarbe et de DCJW à des potentiels allant de -60 à -40 mV (Zhao et coll., 2005).

Les travaux de thèse de Céline Lavialle-Defaix (2005) réalisés au laboratoire ont montré la coexistence de deux populations de canaux Na⁺ dans la membrane des neurones DUM (pour <u>D</u>orsal <u>U</u>npaired <u>M</u>edian, voir Matériels et Méthodes, chapitre 1) du système nerveux de *P. americana*. Ces deux courants, I_{Na1} et I_{Na2}, présentent des propriétés biophysiques différentes, au niveau de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation, de la constante de temps de la déactivation et de la récupération de l'état inactivé (Lavialle-Defaix et coll., 2006). En effet, les courants I_{Na2} s'inactivent à des potentiels plus négatifs que les courants I_{Na1}, Contrairement à ce qui a été démontré dans l'étude de Zhao et coll. (2005), les courants I_{Na2}, qui s'inactivent à des potentiels plus négatifs que les canaux I_{Na1}. De plus, ces deux types de courants sont régulés par des voies de signalisation différentes. Il a été montré que I_{Na1} est régulé par phosphorylation, par la protéine kinase A (PKA), alors que la régulation de I_{Na2} est dépendante du taux de Ca²⁺ intracellulaire (Lavialle-Defaix, 2006). Il est probable que cette diversité fonctionnelle repose sur des combinaisons de sous-unités principales et de sous-unités auxiliaires différentes.

Introduction bibliographique. Chapitre 1

CHAPITRE 2 : PHARMACOLOGIE DU CANAL SODIUM D'INSECTE

Les canaux Na_v sont les cibles pharmacologiques de nombreuses molécules naturelles et synthétiques qui altèrent leurs fonctions en se fixant sur des sites récepteurs distincts (Catterall et coll., 2007). Huit sites récepteurs ont été identifiés (**Figure 11**) et caractérisés pour des neurotoxines d'origine végétale ou animale, des anesthésiques locaux et des insecticides (Catterall et coll., 2007, Gordon et coll., 2007). Ce chapitre s'intéresse aux molécules naturelles ou synthétiques qui altèrent les fonctions d'activation, d'inactivation ou de conduction du canal Na_v . Une attention toute particulière est portée sur le mode d'action des insecticides qui ciblent le canal Na_v (DDT, pyréthrinoïdes, DCJW et métaflumizone).



Figure 11. Représentation schématique de la sous-unité α du canal Na_v et des sites récepteurs de neurotoxines. Les sites récepteurs des neurotoxines sont représentés par des cercles blancs. Les sites récepteurs des modulateurs liposolubles du canal Na_v (site 2), des toxines marines (site 5), des pyréthrinoides synthétiques (site 7) et des anesthésiques locaux sont localisés dans la partie hydrophobique du canal Na_v. Les sites récepteurs des toxines polypeptidiques hydrosolubles telles que les toxines de scorpions (site 3 et 4), et les sites récepteurs des δ -conotoxines (site 6) sont localisés du coté extracellulaire du canal Na_v. Les boucles P situées dans le pore du canal, au centre de la protéine forment le site récepteur 1 (modifié d'après Gordon et coll., 2007). Les antidépressifs se fixent sur le site des anesthésiques locaux (fluoxetine).

A- Les modulateurs de l'activation du canal Nav

A-1 Le DDT

A-1-1 Généralités

Le dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT, **Figure 12**) est un composé organochloré qui a été synthétisé pour la première fois en 1874. Ses propriétés insecticides ont été découvertes en 1939 par le chimiste suisse Paul Müller. Au début, le DDT apparait comme étant l'insecticide idéal de par sa grande toxicité envers les insectes nuisibles et son apparente innocuité pour l'homme (Davies et coll., 2007). De plus, il peut être produit en quantité illimitée, car il est peu coûteux et son effet toxique est de longue durée (jusqu'à 6 mois en pulvérisation sur les murs). L'utilisation du DDT a par la suite conduit au développement et à la commercialisation de nombreux insecticides organochlorés (exemple du méthoxychlore, **Figure 12**). Le DDT a permis un contrôle spectaculaire de la malaria dans les années 1950 lors d'une grande campagne d'éradication de cette maladie dans toute l'Europe. Grâce à cette campagne orchestrée et financée par divers organismes (l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les Nations Unies, la Fondation Rockefeller et le Service de Santé Public américain), l'Europe est considérée comme libérée de la malaria endémique en 1975. Une diminution du taux de mortalité dû à la malaria est également observée en Afrique, en Inde et dans d'autres pays d'Extrême Orient (Davies et coll., 2007).



Figure 12. Structure chimique du DDT et du Méthoxychlore

Depuis 1970, l'utilisation du DDT, ainsi que de nombreux organochlorés, a été restreinte à cause des inconvénients non négligeables qu'ils induisent. En effet, ils représentent des risques importants au niveau environnemental du fait de leur persistance dans la nature (jusqu'à 12 ans) et de leur implication dans la mort d'insectes bénéfiques tels que les abeilles (Davies et coll., 2007). Cependant, ils sont toujours utilisés en quantité limitée pour lutter contre le paludisme sous la recommandation de l'OMS qui considère que le DDT ne présente pas de risque pour la santé quand il est utilisé correctement.

A-1-2 Mode d'action du DDT

Le DDT agit principalement sur le système nerveux périphérique et exerce son action neurotoxique en agissant sur les canaux Na_v . Il prévient la déactivation des canaux sodium en empêchant la fermeture de la porte d'activation du canal (Narahashi, 1986). Il en résulte une fuite persistante d'ions Na^+ à travers la membrane qui empêche la repolarisation de la membrane du neurone (Coats, 1990 ; Zlotkin, 1999). Les nerfs sont alors en état d'hyperexcitabilité suite aux PA répétés dans le neurone. Les muscles de l'insecte se contractent alors et il en résulte des tremblements d'un bout à l'autre du corps et des appendices de l'insecte. Après une exposition de plusieurs heures à plusieurs jours, une paralysie excitatrice est observée, puis l'insecte meurt (Davies et coll., 2007).

A-2 Les pyréthrinoïdes

A-2-1 Généralités

Les pyréthrinoïdes sont des analogues synthétiques dérivés du pyrèthre, substance naturellement trouvée dans les fleurs de chrysanthèmes (*Tanacetum cinerariifolium*) (Raymond-Delpech et coll., 2005; Davies et coll., 2007). Les premiers analogues synthétiques commercialisés ont été les pyréthrines de type I et de type II. Cependant, leur utilisation en agriculture a très vite été limitée, car ces composés étaient très peu stables dans l'air et dans l'eau, et leur coût de production était très important (Davies et coll., 2007).

C'est à la suite de nombreuses modifications de la structure de ces pyréthrines (de 1924 à 1970) que sont apparus les premiers pyréthrinoïdes synthétiques tels que l'alléthrine (**Figure 13**). De 1968 à 1974, des composés photostables, persistant peu dans les sols et présentant une forte

Introduction bibliographique. Chapitre 2

activité insecticide avec une faible toxicité envers les mammifères tels que la cyperméthrine et la deltaméthrine, ont été synthétisés (**Figure 13**). Puis à partir de 1975 et jusqu'en 1983, des composés plus spécifiques des mites et des tiques ont été développés (fluvalinate et fluméthrine, **Figure 13**) (Davies et coll., 2007).

Il existe deux types de pyréthrinoïdes classés en fonction de leur structure et des symptômes qu'ils produisent. Les pyréthrinoïdes de type I qui ne possèdent pas de groupement α -cyané et ceux de type II qui contiennent ce groupement (Coats, 1990; Raymond-Delpech et coll., 2005; Davies et coll., 2007, **Figure 13**).



Figure 13. Structure chimique de différents pyréthrinoïdes de type I et de type II. Contrairement aux pyréthrinoïdes de type I, les pyréthrinoïdes de type II présentent un groupement α -cyané (C=N) (modifié d'après Raymond-Delpech et coll., 2005 et Davies et coll., 2007).

A-2-2 Mode d'action des pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes agissent à la fois sur le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Chez les mammifères, les pyréthrinoïdes de type I induisent un comportement agressif, des tremblements, une hyperexcitabilité, une ataxie et des convulsions qui entraînent une paralysie fatale (Coats, 1990 ; Raymond-Delpech et coll., 2005). Les pyréthrinoïdes de type II induisent une salivation, une hypersensibilité, une choréoathétose⁶, des mouvements involontaires et des convulsions (Coats, 1990 ; Raymond-Delpech et coll., 2005). Dans le cas des pyréthrinoïdes de type II, on parle d'un effet "knock-down" chez les insectes.

Une des cibles des deux types de pyréthrinoïdes est le canal Na_v. Ceux-ci agissent en ralentissant les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Na⁺ (Shafer et coll., 2005). D'une façon générale, les pyréthrinoïdes de type I (exemple de la perméthrine) se fixent sur les canaux Na_v lorsqu'ils sont à l'état activé (Figure 14A). Ils déplacent la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels hyperpolarisants et causent un ralentissement de la cinétique d'activation du courant Na⁺ (Casida et Durkin, 2013). L'ouverture des canaux Na_v à un potentiel inapproprié et pendant une durée plus longue provoque une répétition des PA (Figure 14B). Les pyréthrinoïdes de type II (exemple de la deltaméthrine) se fixent préférentiellement lorsque les canaux Nav sont à l'état activé. Ils maintiennent leur ouverture pendant une longue période durant laquelle la membrane reste dépolarisée, empêchant ainsi la génération des PA. Ils agissent donc en bloquant la conduction des canaux Nav (Figure 14B) (Casida et Durkin, 2013). Les effets des pyréthrinoïdes sont aussi visibles sur le courant de queue (entouré en bleu dans la Figure 14B). Le courant de queue est une augmentation du courant au moment de la repolarisation. Les pyréthrinoïdes de type I induisent un courant de queue de taille et de durée importantes alors que les pyréthrinoïdes de type II génèrent un courant de queue continu (Figure 14B).

Les pyréthrinoïdes possèdent une plus forte activité sur les insectes que sur les mammifères. Premièrement, ils sont plus efficaces à des températures faibles proches de celles du corps des insectes (15-20°C) qu'à celles du corps des mammifères (36-39°C) (Narahashi, 2000). Deuxièmement, les canaux Na_v d'insectes sont plus sensibles aux pyréthrinoïdes que ceux des mammifères (Narahashi, 2000 ; Casida et Durkin, 2013). En effet, la perméthrine est au

⁶ État caractérisé par des mouvements intermédiaires entre les mouvements choréiques habituels et les mouvements athétosiques, plus lents, moins amples, gagnant l'extrémité des membres, donnant souvent une impression générale de reptation.

Introduction bibliographique. Chapitre 2

moins 100 fois plus efficace sur les canaux Na_v d'insectes que sur ceux de mammifères (Warmke et coll., 1997). Troisièmement, la détoxification est plus efficace chez les mammifères (Casida et Durkin, 2013).



Figure 14. Mode d'action des pyréthrinoïdes sur le canal Na_v. A. Etats du canal Na_v dans des conditions contrôles (à gauche) ou en présence de pyréthrinoïdes (à droite). L'ouverture des canaux Na_v suite à une dépolarisation permet l'entrée d'ions Na⁺ dans la cellule. Le canal s'inactive rapidement et retourne à l'état de repos (fermé) avant de pouvoir s'ouvrir de nouveau. Ceci permet de limiter l'entrée d'ions Na⁺ et la durée de la dépolarisation. En présence de pyréthrinoïdes, le canal ne s'inactive plus après son ouverture (encadré rouge), entraînant un flux constant d'ions Na⁺. B Effet des pyréthrinoïdes de type I (milieu) et de type II (à droite) sur le courant Na⁺ et sur les potentiels d'action par rapport aux conditions contrôles (à gauche). Dans des conditions contrôles, le courant s'inactive rapidement suite à une dépolarisation (trait plein) et cette dernière engendre un unique PA. En présence de pyréthrinoïdes, les canaux restent ouverts après la dépolarisation ce qui produits un "courant de queue" (entouré en bleu). Les canaux Na_v modifiés par les pyréthrinoïdes de type I dépolarisent la membrane au-dessus du seuil de génération des PA conduisant à une répétition des PA. Les pyréthrinoïdes de type II causent une dépolarisation prolongée, diminuent le gradient électrochimique du Na⁺ et l'amplitude des PA (modifié d'après Shafer et coll., 2005 et Smith et coll., 1998).

A-2-3 Site de fixation des pyréthrinoïdes

Les résidus impliqués dans le site de fixation des pyréthrinoïdes au canal Na_v d'insectes ont pu être déterminés grâce à plusieurs études. Tout d'abord, des études mettant en jeu les mutations responsables de la diminution de la sensibilité du canal sodium aux pyréthrinoïdes, ont permis de mettre en évidence 25 substitutions d'acides aminés impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Cependant, après des expériences de mutagenèse dirigée et l'expression des mutants dans l'ovocyte de xénope, seules 12 de ces substitutions se sont révélées être impliquées dans la diminution de la sensibilité du canal aux pyréthrinoïdes (Soderlund, 2008 et 2011). Ces substitutions sont essentiellement localisées dans la boucle entre le segment S4 et S5 du domaine II (résidus M918 et L925), le segment S5 domaine II (résidus T929 et L932) et les segments S6 des domaines I (résidu V410), II (résidus L993 et L1014) et III (résidu F1519) (Vais et coll., 2000 ; Tan et coll., 2005 ; Soderlund, 2008).

D'autre part, les modèles structuraux réalisés par Lipkind et Fozzard (2000) et Zhao et coll. (2004) indiquent que les boucles entre les segments S4 et S5, les segments S5 et S6 de chaque domaine sont situés à proximité les uns des autres près de l'extrémité intracellulaire du pore du canal, suggérant que c'est à cet endroit que se trouve le site de fixation des pyréthrinoïdes.

A-2-4 Les résistances aux pyréthrinoïdes

A-2-4-1 Les différentes formes de résistances

Les résistances aux insecticides résultent de trois mécanismes distincts intervenant à trois niveaux : 1) comportemental, 2) physiologique et 3) biochimique. Les résistances dites comportementales sont associées à la mobilité (générée par une irritabilité et une répulsion au contact de l'insecticide) ou à l'immobilité de l'insecte (Haubruge et Amichot, 1998). Les résistances dites physiologiques sont induites par des modifications de la cinétique de pénétration, la séquestration ou l'excrétion de l'insecticide. Enfin, la résistance biochimique est liée à deux types de modifications : une activité accrue des systèmes de dégradation (les cytochromes P450, les glutathion S-transférases et les estérases) ou une modification de la cible de l'insecticide empêchant l'action de ce dernier. Dans cette partie, seules les résistances dues à une modification de la cible, c'est-à-dire le canal Na_v, sont développées.

A-2-4-2 Les résistances kdr et super-kdr

La résistance la plus fréquemment observée chez les insectes vis-à-vis des pyréthrinoides est la résistance kdr (pour <u>knockdown resistance</u>). Celle-ci a été mise en évidence pour la première fois en 1951 chez la mouche domestique par Busvine. Des études réalisées ultérieurement ont permis de découvrir que cette résistance est principalement due à une mutation d'un acide aminé situé dans le segment transmembranaire S6 du domaine II du canal (Davies et coll., 2007). En effet, le résidu leucine 1014 était substitué par une histidine (L1014H) chez *Heliothis virescens*, une phénylalanine (L1014F) chez *M. domestica, C. pipiens, A. gambiae, D.melanogaster, B. germanica, Plutella xylostella, Mysus persicae* (Schuler et coll., 1998; Miyazaki et coll., 1996; Dong, 1997; Williamson et coll., 1996; Martinez-Torres, 1998, 1999; Soderlund, 2008) ou une sérine (L1014S) chez *C. quinquefasciatus* et *A. gambiae* (Martinez-Torres, 1999; Ranson et coll., 2000) (**Figure 15**). D'autres résidus ont également été rattachés à la résistance kdr dans les domaines I et III (pour revue, voir Vais et coll., 2001) (**Figure 15**).

Une autre résistance associée à la résistance kdr a été identifiée chez plusieurs espèces d'insectes telles que *M. domestica* et *D. melanogaster* : la résistance super-kdr. Celle-ci implique principalement la substitution par une thréonine de la méthionine 918 présente dans la boucle reliant les segments S5 et S6 du domaine II (Williamson et coll., 1996). Chez le pou *Pediculus capitis*, et le papillon *Plutella xylostella*, la résistance super-kdr est due à la substitution d'une thréonine (T929) par une isoleucine (Vais et coll., 2001) (**Figure 15**).

Le rôle de ces deux mutations (kdr et super-kdr) dans la diminution de la sensibilité du canal sodium aux pyréthrinoïdes a été mis en évidence grâce à l'expression de ces canaux mutés dans l'ovocyte de xénope. Les mutations kdr diminuent la sensibilité des canaux sodiques *para* (DmNa_v), Vssc1 (MdNa_v) et BgNa_v aux pyréthrinoïdes de cinq à dix fois (Smith et coll., 1997 ; Zhao et coll., 2000 ; Vais et coll., 2000 ; Tan et coll., 2002 ; Liu et coll., 2002).

Chez plusieurs espèces, la présence de plusieurs mutations peut conférer une très forte résistance vis-à-vis des insecticides. Chez *Musca domestica* et *Haematobia irritans*, la combinaison des mutations kdr et super-kdr induit une très forte résistance aux pyréthrinoides (Dong, 2007). Chez la blatte allemande, *B. germanica*, la présence des mutations E434K, C764R et L993F confère au canal Na_v une sensibilité vis-à-vis de la deltaméthrine divisée par 500 (Tan et coll., 2002).



Figure 15. Localisation des mutations impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Les mutations impliquées dans la résistance kdr sont représentées par des étoiles bleues et celles impliquées dans la résistance super-kdr sont indiquées par des étoiles rouges. Les résidus d'acides aminés concernés sont indiqués pour chaque mutation ainsi que les espèces d'insectes pour lesquels ces mutations ont été observées. * L1014H chez *Heliothis virescens*, L1014F chez *M. domestica, C. pipiens, A. gambiae, D.melanogaster, B. germanica, Plutella xylostella, Mysus persicae* ou L1014S chez *C. quinquefasciatus* et *A. gambiae* (modifié d'après Vais et coll., 2001 et Dong, 2007).

Introduction bibliographique. Chapitre 2

B- Les inhibiteurs du courant Na⁺

Dans cette partie, deux types d'inhibiteurs du courant Na^+ sont développés : les insecticides de la famille des dérivés de pyrazolines (indoxacarbe et métaflumizone) et les anesthésiques locaux (AL) avec l'exemple de la lidocaïne. En effet, cet AL présente un site de fixation similaire à celui de ces insecticides et il a été montré récemment qu'il avait un effet sur les canaux Na_v d'insectes.

B-1 Les dérivés de pyrazolines

B-1-1 Les oxadiazines : exemple de l''indoxacarbe et de son métabolite actif : le DCJW

B-1-1-1 Généralités

L'indoxacarbe (**Figure 16**), découvert en 1992 par DuPont de Nemours (France), est le premier représentant de la famille des oxadiazines. Il a été commercialisé par la société DuPont pour la protection des cultures sous forme de granulés contenant 30% d'indoxacarbe (Steward[®]) à disperser dans l'eau. Cette molécule est autorisée en France depuis 1998. Elle est particulièrement active vis-à-vis des lépidoptères de la vigne, de la tomate, des pommiers et des poiriers. La commercialisation de l'indoxacarbe a été un succès dans le développement d'une nouvelle génération d'insecticides ciblant le canal Na_v. En effet, l'identification de nouveaux insecticides ciblant le canal Na_v.

L'indoxacarbe est identifié sous différents codes : DPX-MP062 et DPX-JW062. En effet, il s'agit d'une molécule chirale présentant deux énantiomères S (Sinister) et R (Rectus). Le DPX-JW062 est un mélange racémique (50:50) de ces deux énantiomères. Le DPX-MP062, la forme commercialisée par la firme DuPont de Nemours., est un mélange de 25 % d'énantiomères R et de 75% d'énantiomères S. Wing et coll. (1998) ont observé une stéréo-sélectivité entre les deux énantiomères : l'énantiomère S a une activité insecticide plus forte que l'énantiomère R.



Figure 16. L'indoxacarbe et son métabolite actif le DCJW L'indoxacarbe est un pro-insecticide qui est clivé par des enzymes de types estérases ou amidases en un métabolite décarbométhoxylé, le DCJW.

Le principal avantage de l'indoxacarbe provient du fait qu'il soit un pro-insecticide. Il requiert une activation métabolique par les insectes avant d'agir sur les canaux Na⁺. Des enzymes de types estérases ou amidases clivent l'indoxacarbe, libèrent une molécule décarbométhoxylée et active, appelée DCJW (**Figure 16**, Wing et coll., 1998). Chez les larves des Lépidoptères, l'enzyme responsable de cette activation a été trouvée à de fortes concentrations dans les cellules de l'intestin moyen et dans les tissus adipeux. Les mammifères vont quant à eux convertir l'indoxacarbe en métabolites non toxiques, ce qui fait de lui une molécule peu nocive pour eux (Dong, 2007).

B-1-1-2 Mode d'action du DCJW

L'indoxacarbe induit chez l'insecte des symptômes neurotoxiques (tremblements des pattes thoraciques et des mandibules) suivis par de légères convulsions, puis finalement une paralysie flasque (Wing et coll., 1998). Les mêmes phénomènes sont observés en présence de DCJW, mais quatre fois plus rapidement (Wing et coll., 1998). Cette différence est probablement due au temps nécessaire à la métabolisation de l'indoxacarbe en DCJW. Des enregistrements réalisés au niveau du nerf moteur de *Manduca sexta* ont montré une diminution de l'amplitude du PA après l'application de DCJW à une concentration de 1 µM (Wing et coll., 1998). De même, une diminution de l'amplitude du PA a été observée au niveau de corps cellulaires de neurones DUM traités avec du DCJW à une concentration de 100 nM (Lapied et coll., 2001). Ces études ont été complétées par des expériences de patch-clamp montrant les effets inhibiteurs dose dépendant du DCJW sur le courant Na⁺ dans les neurones DUM isolés (Lapied et coll., 2001). En effet, l'application du DCJW (100 nM) pendant six minutes induit une diminution de
Introduction bibliographique. Chapitre 2

l'amplitude du courant Na⁺ de 60% (Lapied et coll., 2001). L'application de plusieurs concentrations de DCJW sur les neurones DUM a permis d'estimer une valeur d'IC50⁷ pour le DCJW de 28 nM (Lapied et coll., 2001). Les effets du DCJW sur les propriétés d'inactivation du canal Na⁺ sont assez controversés. En effet, aucun effet du DCJW n'a été observé sur la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation lente, ni de l'inactivation rapide dans les neurones DUM de *P. americana* (Lapied et coll., 2001). En revanche, l'application du DCJW sur des neurones non identifiés dans les ganglions thoraciques de *P. americana* induit un shift hyperpolarisant de l'inactivé (Zhao et coll., 2005). Une étude réalisée sur des canaux Na⁺ lorsque ceux-ci sont à l'état inactivé (Zhao et coll., 2005). Une étude réalisée sur des canaux Na_v de *B. germanica* exprimés dans l'ovocyte de xénope montre également un shift hyperpolarisant de l'inactivation du DCJW. Les auteurs de cette étude suggèrent également que le DCJW se fixerait préférentiellement sur les canaux Na⁺ à l'état inactivé (Song et coll., 2006).

B-1-1-3 Site de fixation du DCJW

Le RH-3421(dihydropyrazole) inhibe la fixation de la batrachotoxine (BTX) de façon allostérique, tout comme les AL, suggérant que les sites pharmacologiques de ces deux types de molécules ont des points communs (Salgado et coll., 1992). Plusieurs études mettant en compétition un AL (la dubicaïne) et le RH-3421 montrent en effet que ces deux molécules pourraient avoir le même site de fixation (Salgado, 1992 ; Paynes et coll., 1998). Par la suite, il a été montré que l'addition de TTX provoque une augmentation de l'inhibition induite par le DCJW, alors que l'ajout de la lidocaïne diminuait la capacité d'inhibition du DCJW (Lapied et coll., 2001). Ces résultats indiquent que les sites de fixation de la lidocaïne et du DCJW seraient communs (Lapied et coll., 2001). Le DCJW se fixerait donc sur un site chevauchant celui des AL (Figure 11). Des études de mutagenèse dirigée réalisées sur le canal rNav1.4 montrent que la substitution de la phénylalanine 1579 par une alanine (F1579A) induit une diminution importante de la sensibilité du canal rNav1.4 au DCJW. En revanche, la substitution de la tyrosine 1586 en alanine (Y1586A) augmente l'effet du DCJW sur le courant Na⁺ (Silver and Soderlund, 2010; von Stein et Soderlund, 2012a). Ces deux acides aminés jouent également un rôle dans l'effet de la lidocaïne sur le courant Na⁺, confirmant que les sites de fixation des deux molécules sont chevauchants.

 $^{^7}$ L'IC50 est la concentration pour laquelle le DCJW induit une diminution du courant Na $^+$ de 50%

Pour étudier le rôle de ces résidus chez l'insecte, la phénylalanine 1817 et la tyrosine 1824 du canal BgNa_v1.1 de *B. germanica* ont été substituées par des résidus alanine (F1817A etY1824A). L'expression de ces canaux mutés dans l'ovocyte de xénope montre que la substitution F1817A n'a pas d'effet sur l'inhibition du courant Na⁺ par le DCJW. Ainsi, contrairement à ce qui a été observé chez les mammifères, le résidu F1817 chez l'insecte ne joue pas de rôle primordial dans le mode d'action du DCJW (Silver et coll, 2009). Cependant, la substitution Y1824A induit une augmentation de la sensibilité du canal Na_v au DCJW comme cela est observé chez les mammifères (Silver et coll, 2009). En conclusion, le site de fixation du DCJW chez l'insecte semble être formé par des résidus d'acides aminés différents de ceux impliqués dans le site de fixation du DCJW chez les mammifères (Silver et coll., 2010).

B-1-1-4 Résistance à l'indoxacarbe

Depuis sa commercialisation, quelques cas de résistance à l'indoxacarbe ont été relevés chez *Musca domestica* (Shono et coll., 2004), *Choristoneura rosaceana* et *Plutella xylostella*. Chez *Musca domestica*, Shono et coll. (2004) ont sélectionné au bout de trois générations d'individus, une souche résistante appelée NYINDR (New York Indoxacarb Resistance). Les auteurs ont montré que cette résistance est due au fait que l'indoxacarbe n'est plus métabolisé en DCJW, mais en composés moins toxiques grâce à des monooxygénases P450. Cette souche est donc résistante à l'indoxacarbe, mais reste sensible au DCJW (Shono et coll., 2004).

B-1-2 Le métaflumizone

B-1-2-1 Généralités

Le métaflumizone (**Figure 17**) a été découvert au début des années 1990 par Nihon Noyhaku. C'est un insecticide appartenant à la classe des semi-carbazones qui a été développé dans un premier temps pour des usages vétérinaires. Il a été développé en 2004 par BASF Crop Protection et est commercialisé aux Etats-Unis depuis cette date sous le nom de ProMeris® et ProMerisDuo® par Fort Dodge Animal Health (USA) (Salgado et coll., 2007). Il est efficace contre les Lépidoptères, les Coléoptères, les Hyménoptères, les Isoptères et les Diptères. Après synthèse, le métaflumizone consiste en deux isomères : l'isomère E représenté à 90% et l'isomère Z à 10%. Il a été montré que l'isomère E a une activité insecticide dix fois plus forte que

Introduction bibliographique. Chapitre 2

l'isomère Z contre les larves des Lépidoptères (Takagi et coll., 2007). L'hydrolyse rapide du métaflumizone et de ses composés relatifs, ainsi que sa dégradation à la lumière, en font une molécule qui a un faible impact sur l'environnement (Salgado et coll., 2007).



Figure 17. Structure du métaflumizone

B-1-2-2 Mode d'action du métaflumizone

Le métaflumizone agit comme un neurotoxique puissant. Il entraîne une paralysie suivie de la mort des larves d'insectes en 24 heures (Salgado et coll., 2007). Des enregistrements réalisés sur des mécanorécepteurs de Spodoptera frugiperda générant des PA constants montrent que l'activité de ces récepteurs est bloquée par la métaflumizone (Salgado et coll., 2007). De plus, il apparait que, chez Manduca sexta, le métaflumizone bloque les PA après 20 minutes d'incubation, indiquant que cette molécule affecte la génération des PA induite par les canaux Na_v (Salgado et coll., 2007). En effet, les courants Na⁺ enregistrés après co-injection des ARN de DmNa_v et de TipE dans l'ovocyte de xénope sont totalement bloqués en présence de métaflumizone (Salgado et coll., 2007). Dans cette publication, les auteurs ont aussi montré que le blocage des canaux Na⁺ par le métaflumizone est dépendant de l'état fonctionnel du canal Na⁺. En effet, comme le DCJW, le métaflumizone agit préférentiellement sur les canaux inactivés comme les AL, mais ils se fixent plus lentement au canal que ces derniers (Salgado et coll., 1992 ; Salgado et coll., 2007). Chez les mammifères comme chez les insectes, le métaflumizone ne modifie pas la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide (Silver et coll., 2009 ; Von Stein et Soderlund, 2012a). En revanche, chez les mammifères, le métaflumizone induit un léger shift hyperpolarisant de l'inactivation lente (-3,5 mV, à une concentration de 10 µM; von Stein et Soderlund, 2012a). A l'inverse, chez les insectes, le métaflumizone induit un léger shift dépolarisant de l'inactivation lente (+3,5 mV, à une concentration de 10 µM; Silver et coll., 2009).

B-1-2-3 Site de fixation du métaflumizone

Comme indiqué dans le paragraphe B-1-1-3 de ce chapitre, plusieurs résidus situés dans le segment S6 du domaine IV du canal Na⁺ sont impliqués dans la fixation des AL. Les substitutions des acides aminés F1579A et Y1586A modifient la sensibilité du canal au métaflumizone. La mutation F1579A induit une diminution de la sensibilité du canal rNa_v1.4, indiquant que ce résidu appartient également au site de fixation du métaflumizone (von Stein et Soderlund, 2012a). La mutation Y1586A augmente la sensibilité du canal au métaflumizone, correspondant à ce qui a été précédemment observé avec des molécules de la même classe d'insecticides (von Stein et Soderlund, 2012a). Cependant, une étude réalisée sur le canal rNa_v1.3 indique que ce résidu (Y1586 pour rNa_v1.4 et Y1717 pour rNa_v1.3) ne ferait pas partie du récepteur aux AL (Li et coll., 1999). Une étude récente a également montré que la substitution du résidu V787 (segment S6 domaine II du canal rNa_v1.4) par une alanine (V787A) ou une lysine (V787K) diminuait la sensibilité du canal au métaflumizone. En revanche, ces mutations n'ont aucun effet sur la sensibilité du canal au DCJW, indiquant que ce résidu pourrait être impliqué spécifiquement dans la fixation de métaflumizone au canal Na_v (von Stein and Soderlund, 2012b).

L'impact de ces deux résidus a également été étudié chez l'insecte. Les acides aminés F1817 et Y1824 du canal BgNa_v1-1 ont été substitués par des résidus alanine comme pour les mammifères. La substitution F1817A accroit l'inhibition induite par le métaflumizone, alors que la substitution Y1824A n'a pas d'effet significatif sur la sensibilité du canal au DCJW (Silver et coll., 2009 ; Silver et coll., 2010). Ces résultats montrent que comme cela a été observé avec le DCJW, le site de fixation du métaflumizone semble être différent chez les mammifères et chez les insectes.

75

B-2 Les anesthésiques locaux : exemple de la lidocaïne

B-2-1 Généralités

La lidocaïne (**Figure 18**) ou 2-(diéthylamino)-N-(2,6-diméthylphényl) acétamide est un AL et un anti-arythmique de type amino-amide, développé par Nils Löfgren et Bengt Lundqvist en 1943 et commercialisé depuis 1948 sous le nom de Xylocaïne® (Gordh et coll., 2010). Elle est aussi utilisée pour traiter les douleurs neuropathiques.



Figure 18. Structure chimique de la lidocaïne

Les AL sont formés d'un groupement aromatique lipophile et d'un groupe amine hydrophile. Ces deux groupements sont liés par une chaîne dont la structure détermine la nature de l'anesthésique (ester, amide, cétone ou éther).

B-2-2 Mode d'action de la lidocaïne

Les AL comme la lidocaïne interrompent l'initiation et la propagation des PA en bloquant les canaux Na_v et ainsi soulagent ou préviennent la douleur (Hille, 1977). L'affinité des AL pour le canal Na_v varie en fonction de l'état dans lequel se trouve le canal. De manière générale, l'affinité est forte lorsque le canal est ouvert ou inactivé, et elle est faible lorsque le canal est au repos (Song et coll., 2011). Par conséquent, l'inhibition induite par les AL dépend à la fois du potentiel et de la fréquence de dépolarisation de la membrane : un blocage dit usage-dépendant (Hille, 1977). Le blocage des canaux Na_v par les AL est plus rapide et plus efficace lorsque ceuxci sont activés de façon répétée. L'affinité et le caractère usage-dépendant des AL pour le canal Na_v varient d'une molécule à l'autre. Il est donc distingué une « inhibition tonique » et une inhibition « usage-dépendant ». Par exemple, la lidocaïne est une molécule qui s'associe et se dissocie rapidement du canal Na_v. Par contre, la bupivacaïne s'associe rapidement, mais se dissocie beaucoup plus lentement du canal Na_v (Lagan et McLure, 2004).

B-2-3 Site de fixation des AL

Postma et Catterall (1984) ont montré que les AL inhibent la fixation de la batrachotoxine (BTX) sur le site 2, mais de façon allostérique (Figure 11). A partir des résultats qu'ils ont obtenus, ils ont supposé que le site de fixation des AL était un site distinct de celui de la BTX (Postma et Catterall, 1984). Ce site serait accessible par le côté cytoplasmique du canal (Hille, 1977). Chez les canaux Cav et Kv, les résidus impliqués dans la fixation de bloqueur de canal sont situés dans le segment S6 du domaine IV du canal Ca_v et le segment S6 du canal K_v (Striessnig et coll., 1991; Catterall et Streissnig, 1993; Choi et coll., 1993). Des études de mutagenèse dirigée ont donc été réalisées sur des acides aminés situés dans le segment S6 du domaine IV du canal Na⁺ (Ragsdale et coll., 1994). Ces études ont montré que les résidus I1761, F1764, V1767 et N1769 (segment 6 du domaine IV du canal rNav1.2) étaient importants pour la fixation des AL au canal Na⁺ (au repos ou à l'état inactivé), mais aussi des anti-arythmiques et des anticonvulsifs (Ragsdale et coll., 1994 ; Ragsdale et coll., 1996). De plus, les résidus I1760, F1764, Y1771 jouent un rôle dans le blocage usage-dépendant, indiquant que ces trois résidus font partie du site de fixation des AL (Ragsdale et coll., 1994). Pour le canal rNav1.4, les résidus impliqués dans le site de fixation des AL sont les résidus d'acides aminés F1579 et Y1585 (von Stein et Soderlund, 2012).

Plus récemment, il a été montré que les canaux d'insectes sont également sensibles aux AL et en particulier à la lidocaïne (Silver et coll., 2010 ; Song et coll., 2011). Plusieurs études ont été menées pour observer si le site de fixation de la lidocaïne sur le canal Na_v d'insectes était le même que chez les mammifères. Chez la blatte *B. germanica*, les résidus F1817 et Y1824 (homologues à F1764 etY1771) dans le segment S6 du domaine IV du canal BgNa_v1-1 contribuent également à l'action de la lidocaïne sur le canal Na_v (Silver et coll. 2010). Cependant, la substitution de ces deux résidus par des résidus alanines n'a que peu d'effet sur le bloc tonique de BgNa_v1-1 (Song et coll., 2011), alors que c'est le contraire pour le canal Na_v de mammifères (Ragsdale et coll., 1994 ; Ragsdale et coll., 1996 ; Silver et coll., 2010). Ces observations suggèrent que les résidus F1817 et Y1824 contribuent en partie au site de fixation de la lidocaïne, mais que d'autres résidus sont indispensables à l'effet de cet AL.

Introduction bibliographique. Chapitre 2

CHAPITRE 3 : HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les canaux Na_v sont des cibles moléculaires de choix pour les insecticides neurotoxiques tels que les pyréthrinoïdes. Cependant l'utilisation massive de ces composés a conduit à l'apparition de générations d'insectes résistants. Dans le but de remplacer les pyréthrinoïdes, une nouvelle génération d'insecticides a été mise sur le marché (indoxacarbe et métaflumizone). Chez les insectes, le canal Na_v est formé par deux sous-unités : une principale codée par un gène et une sous-unité auxiliaire codée par cinq gènes. Les sous-unités auxiliaires ont une fonction régulatrice (Feng et coll., 1995a; Warmke et coll., 1997; Derst et coll., 2006). Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a été menée sur l'impact des sous-unités auxiliaires sur la sensibilité des canaux Na_v vis-à-vis des insecticides. A l'heure actuelle, toutes les études pharmacologiques réalisées à ce jour dans un système d'expression hétérologue (ovocyte de xénope) ont été accomplies en présence d'une seule sous-unité auxiliaire : la sous-unité TipE. Cependant, l'étude de Derst et coll. (2006) montre que les sous-unités auxiliaires modulent de façon différente les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺, notamment l'inactivation et la récupération de l'état inactivé.

Etant donné que les insecticides de nouvelles générations ont un effet sur l'inactivation des canaux Na_v (Lapied et coll., 2001 ; Zhao et coll., 2005) nous avons supposé que de par leurs propriétés régulatrices, les sous-unités auxiliaires du canal Na_v pouvaient moduler la sensibilité du canal Na_v vis-à-vis de ces molécules pharmacologiques. Pour répondre à cette hypothèse, trois approches complémentaires ont été utilisées : une approche de biologie moléculaire, une approche électrophysiologique et une approche pharmacologique. Mon travail de thèse se découpe donc en trois objectifs :

A-Identification des sous-unités auxiliaires présentes dans la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana* par une approche de biologie moléculaire.

Jusqu'à aujourd'hui, les 5 cinq sous-unités auxiliaires du canal Na_v ont uniquement été clonées chez *D. melanogaster* (Feng et coll., 1995a ; Derst et coll., 2006) et une de ces sousunités a été clonée chez *M. domestica* (Lee et coll., 2000). Au cours de sa thèse Bénédicte Moignot a cloné deux variants de la sous-unité TEH1 qui différaient au niveau de leur extrémité C-terminale. Introduction bibliographique. Chapitre 3

Le premier objectif de ma thèse est d'identifier et de cloner les quatre autres gènes codant les sous-unités auxiliaires TipE, TEH2, TEH3 et TEH4. Cette approche permettra aussi de mettre en évidence, le cas échéant, la présence de plusieurs variants comme cela a été observé pour la sous-unité TEH1. La blatte *P. americana* fait partie des nombreux insectes pour lesquels le génome n'a pas encore été séquencé. La stratégie utilisée pour cloner les sous-unités auxiliaires du canal Na_v a été la même pour toutes les sous-unités. Pour déterminer les séquences des sousunités auxiliaires, nous avons dû concevoir des oligonucléotides dégénérés qui ciblent les régions conservées de la sous-unité auxiliaire. Pour toutes les sous-unités clonées, une étude de leur distribution dans différents tissus neuronaux et non-neuronaux a été réalisée.

B- Caractérisation fonctionnelle des courants Na⁺ obtenus en co-exprimant la sous-unité principale avec différentes sous-unités auxiliaires.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de mettre en évidence les effets modulateurs des sous-unités auxiliaires sur les courants Na^+ . Pour cela, plusieurs combinaisons de sous-unités principales et de sous-unités auxiliaires ont été injectées dans l'ovocyte de xénope en parallèle avec la co-expression de la sous-unité $DmNa_v1-1$ et les sous-unités auxiliaires DmTipE et DmTEH1. Les études électrophysiologiques ont été réalisées en utilisant la technique de la double micro-électrode en potentiel imposé (TEVC).

C- Modulation de la sensibilité des canaux Na_v aux molécules pharmacologiques par les sous-unités auxiliaires.

Le troisième objectif de ma thèse est d'étudier l'effet modulateur des sous-unités auxiliaires sur la sensibilité des canaux Na_v aux agents pharmacologiques. Deux molécules différentes ont été utilisées : un pro-insecticide, le DCJW et un anesthésique local, la lidocaïne.

Matériels et Méthodes

CHAPITRE 1: LE MODELE BIOLOGIQUE: LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA

Les blattes appartiennent à un groupe d'insectes très ancien, existant depuis plus de 250 millions d'années (Cornwell, 1968 ; Gaunt et Miles, 2002). Plus de 3500 espèces de blattes sont actuellement répertoriées dans le monde (Sookrung et Chaicumpa, 2010). Seules quelques espèces colonisent les habitations : *Periplaneta americana, Blattella germanica, Blatta orientalis, Supella longipalpa et P. fulliginosa* (Sookrung et Chaicumpa, 2010).



Figure 19. La blatte *Periplaneta americana*. A. Colonies de blattes *P. americana*. B. Blatte mâle. Les individus mâles se différencient des femelles par la présence de deux stylets entre les cerques (voir encart). C. Blatte femelle. Ici, la femelle porte une oothèque renfermant quelques dizaines d'œufs Les photos ont été réalisées à partir de l'élevage du laboratoire.

La blatte *P. americana* (**Figure 19**) est un insecte de la famille des Blattidés (Super ordre des Dictyoptères). C'est un modèle très utilisé en neurophysiologie de par la taille relativement importante des neurones (Stankiewicz et coll., 2012). De plus, l'anatomie et l'histologie de son système nerveux ont été bien caractérisées. *P. americana* est un excellent modèle pour les études pharmacologiques mais surtout pour les études électrophysiologiques car ses neurones sont facilement accessibles.

A- Conditions d'élevage des blattes

Les blattes sont élevées au laboratoire dans une pièce thermostatée à 29°C avec une photopériode 12 heures jour/ 12 heures nuit, dans un environnement dépourvu d'insecticide. Elles sont nourries avec des croquettes pour chiens (Canicroq Soup, Gamm vert, Les Ponts-de Cé, France) trois fois par semaine et de l'eau *ad libitum*. Pour toutes les expériences présentées dans ce manuscrit, seuls des individus mâles ont été utilisés, d'une part pour préserver l'élevage et d'autre part dans le but de garder une continuité avec les études menées précédemment au sein du laboratoire.

B- Le système nerveux de la blatte P. americana

B-1 La chaîne nerveuse ventrale

Le système nerveux central de la blatte *P. americana* est constitué du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale (**Figure 20**). Le cerveau est formé par la fusion des trois ganglions de la tête. Il est divisé en trois régions (le protocérébron, le deutocérébron et le tritocérébron).

La chaîne nerveuse est constituée des ganglions sous-œsophagiens, thoraciques (prothoracique, mésothoracique et métathoracique) et abdominaux. Les ganglions thoraciques sont proéminents et localisés dans chaque segment thoracique. Les ganglions abdominaux sont au nombre de six et sont plus petits que les ganglions thoraciques à l'exception du 6^{eme} ou dernier ganglion abdominal (DGA) qui provient de la fusion du système nerveux de plusieurs segments terminaux. Les ganglions sont reliés entre eux par deux connectifs et sont entourés d'une gaine conjonctive.



Figure 20. Représentation du système nerveux central de la blatte *P. americana*. Le système nerveux de la blatte *P. americana* est formé du cerveau, des ganglions thoraciques (Th1 à Th3) et des ganglions abdominaux (A1 à A5 et DGA : <u>Dernier Ganglion Abdominal</u>).

B-2 Les neurones Dorsal Unpaired Median (DUM)

Les neurones DUM ont été décrits pour la première fois chez le criquet (Plotnikova, 1969). Ils sont localisés à la surface dorsale des ganglions thoraciques et abdominaux de la chaîne nerveuse des insectes, au niveau de leur ligne médiane. Ces neurones sont appelés "unpaired" (impair) car ils présentent la particularité de ne pas avoir d'homologue (Braüning et Pflüger, 2001). Leur nombre est plus important dans le DGA car celui-ci résulte de la fusion de cinq ganglions primitifs présents dans les segments abdominaux 7 à 11 (**Figure 21**) (Sinakevitch et coll., 1995).



Figure 21. Les neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) du dernier ganglion abdominal (DGA) de la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana*. A. Représentation du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse. Les neurones DUM octopaminergiques sont identifiés en noir sur le plan médian (modifiée d'après Sinakevitch et coll., 1995). B. Neurone DUM pris en microscopie optique maintenu en culture pendant 24h (haut) et en présence d'un anticorps polyclonal dirigé contre l'octopamine (bas) (modifié d'après d'après Grolleau et Lapied, 2000).

Les corps cellulaires des neurones DUM présentent une taille relativement importante, de 45 à 60 µm de diamètre (Grolleau et Lapied, 2000). Ces neurones ont une activité électrique spontanée, dite « pacemaker » c'est-à-dire qu'ils sont capables de générer spontanément et à fréquence régulière des potentiels d'action de grande amplitude (Lapied et coll., 1990). Ce sont également des cellules sécrétrices qui synthétisent et libèrent principalement de l'octopamine, connue pour être à la fois un neurotransmetteur, une neurohormone et un neuromodulateur (Burrows, 1996; Roeder, 1999; Braünig et Pflüger, 2001). Les neurones DUM synthétisent également d'autres molécules neuroactives telles que la sérotonine (Orchard et coll., 1989), la taurine (Stevenson, 1999), les peptides de type FMRF-amide (Stevenson et coll., 1994), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Thompson et Siegler, 1989; Sinakevitch et coll., 1996), la choline et le glutamate (Bicker et coll., 1988). La présence de ces molécules neuroactives indique que le rôle physiologique des neurones DUM est complexe. En outre, il a été montré que les neurones DUM innervent l'appareil circulatoire, les muscles viscéraux et les glandes accessoires reproductrices des individus mâles et femelles (Pass et coll., 1988; Sinakevitch et coll., 1994, 1995, 1996). Ces neurones constituent donc un modèle cellulaire très intéressant pour étudier de nombreux récepteurs et canaux ioniques.

CHAPITRE 2: METHODOLOGIE EMPLOYEE POUR LA CARACTERISATION DES GENES ET DES TRANSCRITS CODANT LES SOUS-UNITES AUXILIAIRES DU CANAL NA_V D'INSECTE CHEZ LA BLATTE *P. AMERICANA*

Pour étudier les transcrits codant les sous-unités auxiliaires de la blatte *P. americana*, nous avons dans un premier temps isolé les tissus pour en extraire les ARN totaux qui seront rétrotranscrits (**Figure 22**). Le clonage des sous-unités auxiliaires a ensuite été réalisé en suivant trois étapes : 1) amplification d'une région partielle avec des oligonucléotides (ou amorces) dégénérées, 2) amplification des régions 5' et 3'UTR et 3) amplification du cadre ouvert de lecture. Les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture de chaque protéine ont ensuite été clonées dans un vecteur d'expression pour étudier l'impact fonctionnel des sousunités auxiliaires (**Figure 22**).

Prélèvement des tissus (A)
Extraction des ARN totaux (B)
Transcription inverse (C)
Amplification des ADNc codant les sous-unités auxiliaires (D)
 Conception des amorces dégénérées
PCR avec les amorces dégénérées
Clonage dans un vecteur de clonage
 Séquençage et obtention de la séquence en acides nucléiques
Amplification des régions 5' et 3'
Conception des amorces spécifiques
PCR avec les amorces spécifiques
Clonage dans un vecteur de clonage
 Séquençage et obtention de la séquence en acides nucléiques
 Amplification du cadre de lecture encadré des régions non-codantes Conception des amorces spécifiques
PCR avec les amorces spécifiques
Clonage dans un vecteur de clonage
 Séquençages et vérification des séquence en acides nucléiques
Amplification des ORFs (D)
Amplification du cadre de lecture
Clonage dans un vecteur d'expression

Figure 22. Schéma récapitulatif de la stratégie utilisée pour cloner les sousunités auxiliaires du canal Na_v de *P. americana*

A- Prélèvements des différents tissus chez la blatte P. americana

Les tissus d'origine nerveuse (la chaîne nerveuse complète - les six ganglions abdominaux et les trois ganglions thoraciques avec les connectifs - et la tête) et non nerveuse (les muscles des pattes, l'intestin et la glande reproductrice accessoire) ont été prélevés uniquement chez des individus mâles afin d'en extraire les ARN totaux (**Figure 23**). L'insecte est sacrifié par décapitation et la dissection se fait sous une loupe binoculaire. Le prélèvement de la chaîne nerveuse requiert un nettoyage de cette dernière pour éliminer les tissus non nerveux qui reste accrochés à la chaîne au cours de son prélèvement. Les muscles des pattes sont prélevés à partir du coxa (partie supérieure de la patte). Pour cela, la cuticule les recouvrant est délicatement retirée puis le muscle est coupé en deux longitudinalement pour retirer le nerf qui l'innerve. Afin de préserver l'intégrité des tissus, ceux-ci sont aussitôt placés dans un tube contenant de l'azote liquide. En effet, cette étape est nécessaire pour préserver les ARN intacts et ne pas perdre des transcrits rares.



Figure 23. Technique d'extraction des ARN totaux avec le réactif RNA NOW[®]. Cette figure reprend les étapes nécessaires pour extraire les ARN totaux des différents tissus de la blatte *P. americana*.

B- Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux (Figure 23) ont été réalisées selon la méthode modifiée de Chomczynski et Sacchi (1987). Le réactif principal utilisé est commercialisé sous le nom de solution RNA NOWTM (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Le cocktail d'agents chaotropiques (incluant de l'isothiocyanate de guanidinium) présent dans le RNA NOWTM permet d'altérer les structures secondaires et tertiaires des protéines et des polysaccharides. Le solvant contenant du phénol améliore la lyse cellulaire et l'homogénéisation des tissus, et inactive les RNases. Chaque tissu, sous forme congelée, a été réduit en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (Argos Pellet Mixer, Elgin, Illinois, USA) dans l'azote liquide et mélangé au réactif RNA NOWTM. Pour 100 mg de tissu, 1 ml du réactif a été ajouté avec 200 µl de chloroforme (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Le mélange a été vortexé et incubé 2 min à 30°C avant d'être centrifugé à 12000g pendant 15 min à 4°C pour séparer les phases organique et aqueuse. La phase organique en position inférieure (rose) contient le phénol-chloroforme, l'interphase renferme l'ADN et les protéines. La phase aqueuse supérieure (incolore) où se trouvent les ARN, représente environ 60% du volume de RNA NOWTM utilisé. Cette phase aqueuse a donc été prélevée, transférée dans un nouveau tube et additionnée d'isopropanol (500 µl d'isopropanol (Sigma-Aldrich) par ml de RNA NOWTM) afin de précipiter les ARN. Ce mélange a été incubé 10 min à 30°C puis centrifugé à 12000g pendant 10 min à 4°C. Le précipité d'ARN est visible sous la forme d'un culot au fond du tube d'une couleur blanche nacrée. Après retrait du surnageant, le culot d'ARN a été lavé avec de l'éthanol à 75% (1 ml) puis centrifugé (5 min à 7500g à 4°C). Le culot d'ARN a été séché à température ambiante avant d'être resuspendu dans 20 µl d'eau UltraPureTM dépourvue de RNase et de DNAse (InvitrogenTM, Carlsbad, Californie, USA).

La quantité et la qualité des ARN ont ensuite été évaluées par lecture de l'absorbance dans les UV par spectrophotométrie (ND1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) de 220 à 350 nm. Le rapport des densités optiques 260/280 supérieur à 1,8 est un indicateur d'absence de contamination par des protéines. Le rapport 280/230 reflète la présence de sels et/ou de solvant organique (tels que l'isothiocyanate de guanidinium) et doit être supérieur à 2. Si ces rapports d'absorbance ou les concentrations sont trop faibles, les ARN doivent alors être précipités à l'éthanol (1 μ l de glycogène, 0,1 volume d'acétate de sodium, 2 volumes d'éthanol à 96% à -80°C pendant 20 min). Après une centrifugation de 20 min à 12000g à 4°C, le culot est ensuite traité comme décrit à la fin du paragraphe précédent. Remarque : Pour l'extraction des ARNs totaux à partir des broyats de têtes, 2 extractions successives avec du Tris-phénol sont nécessaires pour extraire les pigments contenus dans les yeux de l'insecte. Ces derniers colorent les ARNs et empêchent une lecture correcte de la concentration et des rapports 260/280 et 260/230. De plus, leur présence inhibe la réaction de transcription inverse (Christian Legros, communication personnelle).

C- La transcription inverse

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été obtenus par transcription inverse des ARN totaux en suivant les instructions du kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis Supermix (InvitrogenTM). Pour chaque tissu, les réactions de transcription inverse ont été effectuées à partir de 5µg d'ARN totaux et à l'aide d'oligo (dT)₂₀ dans un tube Eppendorf® Biopur (Hambourg, Allemagne). Pour éliminer les complexes nucléiques ARN/ADNc, 0,5 unité de ribonucléase H (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) a été ajoutée et les ADNc ont été incubés 2 min à 37°C. Les ADNc ont ensuite été conservés à -20°C.

D- Amplification des ADNc codant les sous-unités auxiliaires du canal Na_v de *P. americana*

D-1 Conditions générales d'amplification par la technique de polymérisation en chaîne (ou PCR)

L'amplification des sous-unités auxiliaires du canal Nav a été réalisée grâce à la technique de polymérisation en chaîne ou PCR. Cette technique permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie à partir de très faible quantité d'ADN. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : 1) La dénaturation, qui va permettre une dissociation complète des deux brins d'ADN, 2) l'hybridation de deux amorces (ou oligonucléotides) sur l'ADN matrice qui vont délimiter la séquence à amplifier et 3) l'élongation au cours de laquelle les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libres des amorces hybridées.

L'amplification des différentes sous-unités auxiliaires a été réalisée en utilisant trois ADN polymérase thermostables : l'EuroTaq (EuroClone®, Sinazio, Italie), la KOD (Novagen, Darmstadt, Germany) et l'Advantage® (ClonTech Laboratories, Inc., Canada).

Matériels et Méthodes. Chapitre 2

L'Advantage est en fait un mélange de deux polymérases : l'ADN polymérase Taq TITANIUMTM et une polymérase ayant une activité exonucléasique 3'-5'. Les ADN polymérases possèdent une activité polymérasique 5'- 3' qui permet la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir des oligonucléotides.

La KOD et l'Advantage possèdent une activité exonucléasique 3'-5' qui permet de corriger les erreurs d'incorporation dans le nouveau brin. Elles sont dites de haute fidélité. Ces deux polymérases présentent également la particularité d'être complexées à un anticorps qui réduit l'amplification de produits PCR non spécifiques et la formation de dimères d'oligonucléotides. Pour que l'enzyme soit active, il faut que cet anticorps soit inactivé par une température de 94-95°C (technique « hot start »). L'EuroTaq et une des polymérases constituant l'Advantage possèdent une activité terminale transférase qui ajoute des désoxyadénosines aux extrémités 3' des amplicons. Ceci facilite par la suite l'insertion des produits PCR dans un vecteur de clonage.

Les PCR ont été réalisées suivant les protocoles standards proposés par chaque fabricant dans un volume réactionnel de 20 ou 25 μ l, contenant 0,5 μ l ou 1 μ l d'ADNc comme matrice. Le milieu réactionnel est constitué du tampon spécifique de l'ADN polymérase utilisée, de dNTP à 0,2 mM chaque, de 1,5 de MgCl₂ ou de 1mM de MgSO₄ en fonction de l'ADN polymérase et d'1 à 2 unités d'enzyme. Les amorces sont ajoutées à une concentration finale de 0,4 μ M si elles sont spécifiques et de 1,5 μ M si elles sont dégénérées. Le volume final est ajusté avec de l'eau ultrapure.

Pour amplifier les ADNc codant les sous-unités auxiliaires du canal Na_v, plusieurs étapes ont été nécessaires (**Figure 24**). Des oligonucléotides (ou amorces) dégénérés ont permis d'amplifier une région conservée pour obtenir des informations de séquences servant ensuite à concevoir des amorces spécifiques. Ces dernières ont permis d'amplifier les extrémités 5'et 3' de la séquence par RACE-PCR. Enfin, des amorces spécifiques s'hybridant aux régions non codantes ont permis d'amplifier et de cloner les cadres de lectures complets.



Figure 24. Stratégie générale d'amplification des sous-unités auxiliaires du canal Na_v. Les segments transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs. Les traits pleins représentent les régions 5' et 3' non-codantes. La PCR#1 (bleu) correspond à l'amplification réalisée avec les amorces dégénérées. Les 5' RACE-PCR#1 et 2, et 3'RACE-PCR#1 et 2 correspondent aux amplifications des régions non-codantes 5' et 3' de la protéine. Les PCR réalisées pour amplifier les transcrits complets et les cadres ouverts de lecture sont représentées en noir (PCR#1 et PCR#2).

D-2 Amplification des régions conservées des différentes sousunités

D-2-1 Conception des amorces dégénérées

Le génome de *P. americana* n'ayant pas encore été séquencé, nous ne disposions d'aucune information sur les séquences des sous-unités auxiliaires du canal Na_v chez *P. americana*. Nous avons donc conçu des amorces dégénérées. Pour cela, un travail de bioinformatique a été nécessaire pour identifier et aligner les séquences des gènes codant les sous-unités auxiliaires chez d'autres espèces (*Drosophila melanogaster, Nasonia vitripennis, Tribolium castaneum, Pediculus humanus corporis, Anopheles gambiae, Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) afin de mettre en évidence des régions conservées. A partir de ces alignements, les régions les plus conservées ont permis de concevoir des amorces dégénérées. Les amorces dégénérées sont un mélange de molécules d'ADN non-dégénérées. Dans une amorce dégénérée c'est en fait la position du nucléotide qui est dégénérée et non le nucléotide lui-même. Par exemple, si dans une séquence conservée en acides aminés le codon codant la glycine est CAG pour une espèce et CTG pour une autre, le nucléotide central sera W

(Tableau 8). Par conséquent si un seul nucléotide est modifié dans une amorce (ici A ou T), le mélange d'amorces dégénérées sera composé de 50% d'une amorce avec le codon CAG et de 50% d'une amorce avec le codon CTG. Nous avons donc conçu les amorces en suivant le code de dégénérescence (Tableau 8) tout en limitant le nombre de nucléotides dégénérés. En effet, plus le nombre de nucléotides modifiés est important, plus il y aura d'amorces différentes dans le mélange constituant l'amorce dégénérée.

Tableau 8	Tableau 8 : Code de dégénéréscence des nucléoudes				
Nucléotide		Nucléotide			
dégénéré		dégénéré			
R =	G ou A	D =	G ou A ou T		
K =	G ou T	V =	G ou A ou C		
S =	G ou C	B =	G ou T ou C		
W =	A ou T	H =	A ou T ou C		
M =	A ou C	N =	A ou T ou C ou G		
Y =	T ou C				

0. C. J. J. J. . 12

Pour amplifier les ADNc des régions conservées il a été nécessaire de mettre au point les conditions PCR. Pour définir la température d'hybridation optimale des amorces, des PCR avec un gradient de température ont été réalisées pour chaque couple d'amorces. Le cycle type utilisé pour ces PCR est le suivant : 94°C 2min, 35*[94°C 30s, 50-60°C 30s, 72°C 1min], 72°C 5min.

Pour toutes les sous-unités nous avons conçu au total 18 amorces dégénérées (5 pour PaTipE, 7 pour PaTEH2, 4 pour PaTEH3 et 2 pour PaTEH4) mais seuls les couples répertoriés dans le tableau 9 ont permis l'amplification d'une région conservée de la sousunité ciblée.

Tableau 9 : Amorces dégénérées utilisées pour amplifier les régions conservées des sous-unités auxiliaires de P.americana.

Sous- unité	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques dégénérées	Région ciblée	Taille attendue d'après D.melanogaster
TinE	TP_3S	5'-CCBGCNTTCACSACDATYTTCATG-3'	Boucle	560 ph
пре	TP_5R	5'-RTAVCCRCADCCYTTBACRTTBGG-3'	extracellulaire	509 pb
TEUO	TP_48S	5'-ACKGCNWTYHTNTCNGTRTTTGCN-3'	Boucle	220 mb
IEH2	TP_51R	5'-NGGNGGATANCCACANCCYTCBGH-3'	extracellulaire	529 pb
TEU2	TP_24S	5'-TGYGGMGARTGGTGYCTNAGYAAR-3'	Boucle	1004 mb
ТЕПЭ	TP_26R	5'-RAARGGCATYTTNGCRTCGTCRCCNAC-3'	extracellulaire	1004 pb
TELLA	TP_34S	5'-GCVWSBTGYGGVGARTGGTGYYTS-3'	Boucle	707 mb
IEH4	TP_35R	5'-BCCNYKYARNGTRTTNACGCARCC-3'	extracellulaire	797 pb

D-2-2 Amplification des régions conservées

Une séquence partielle de l'ADNc de la sous-unité PaTipE a été amplifiée avec les oligonucléotides TP_3S et TP_5R (**Tableau 9**) et l'enzyme EuroTaq (Eurobio, France). Les conditions PCR ont été les suivantes : 94°C 4 min, 40* [94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 1 min], 72°C 2 min.

Pour la sous-unité PaTEH2, plusieurs tentatives d'amplification ont été nécessaires afin obtenir un ADNc partiel codant la sous-unité PaTEH2. Les premiers couples d'amorces conçus ont conduit à l'amplification de produits PCR non spécifiques.

Ce sont finalement les amorces TP_48S et TP_51R (**Tableau 9**) qui ont permis d'amplifier une séquence partielle de TEH2 avec l'enzyme Advantage (ClonTech Laboratories, Inc., Canada). Les conditions PCR ont été les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 52°C 30s, 68°C 30s], 68°C 30s.

Une séquence partielle correspondant à la sous-unité PaTEH3 a été amplifiée avec les amorces TP_24S et TP_26R (**Tableau 9**) et l'enzyme Advantage. Les conditions de PCR pour l'amplification ont été les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 60°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 2 min.

Les amorces TP_34S et TP_35R (**Tableau 9**) ont été utilisés pour tenter d'amplifier la sous-unité TEH4 avec l'enzyme Advantage suivant le cycle de température suivant : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 56°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 1 min.

D-3 Amplification des extrémités 5' et 3' non-codantes

D-3-1 Principe de la RACE-PCR et préparation des ADNc

Les ADNc utilisés pour amplifier les extrémités 3'et 5' non-codantes des sous-unités auxiliaires ont été obtenus à l'aide du kit GeneRacerTM (InvitrogenTM). Les ARN totaux ont tout d'abord été isolés en utilisant le kit RNA NOWTM comme indiqué dans la partie B. La préparation des ARN avant la transcription inverse s'est déroulée en plusieurs étapes (**Figure 25**). Pour commencer, les ARN totaux ont été traités avec une phosphatase CIP (pour <u>C</u>alf <u>I</u>ntestinal <u>P</u>hosphatase) qui permet la déphosphorylation des ARN non-messagers et des ARN messagers tronqués. La coiffe des ARNm a ensuite été enlevée grâce à l'action de la pyrophosphatase TAP (pour <u>T</u>obacco <u>A</u>cid <u>P</u>yrophosphatase). Enfin, un oligonucléotide spécifique a alors été ajouté à l'extrémité 5' des ARNm grâce à l'utilisation d'une T4 RNA ligase.

Les ARNm ainsi préparés ont ensuite été retro-transcrits comme décrit dans la partie C de ce chapitre avec un oligo(dT) spécifique présentant en 3' une séquence adaptatrice correspondant aux amorces utilisées pour la 3'RACE PCR.



Figure 25. Principe de la RACE-PCR. Avant de pouvoir amplifier les régions 5' et 3' des ADNc, il est nécessaire de préparer les ARN. La première étape (1) consiste à déphosphoryler les ARN tronqués et les ARN autres que des ARNm. Puis la deuxième étape (2) permet d'enlever la coiffe des ARNm pour pouvoir liguer un oligonucléotide à l'extrémité 5'(3). Les ARN peuvent alors être rétro transcrits (4) et les PCR peuvent être réalisées pour amplifier les régions 5' et 3' (5 et 6). Les amorces GR1TM à GR4TM sont spécifiques des régions ajoutées aux extrémités des ARNm lors des étapes 3 et 4.

D-3-2 Amplification des extrémités 5' non-codantes

Pour amplifier les régions 5' non-codantes de chaque sous-unité, 2 PCR successives ont été réalisées avec les amorces spécifiques du gène d'intérêt (**Tableau 10**) et des amorces ajoutées à l'extrémité 5' des ARNm. Cette technique est appelée PCR emboîtée ou "nested-PCR". Elle permet de limiter les amplifications parasites mais aussi d'économiser les ADNc car les produits d'amplification de la première PCR sont utilisés comme matrice pour la seconde PCR.

Tableau 10 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier les régions 5' codantes et non codantes des sous-unités auxiliaires de *P.americana*

Sous-unité	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Régions ciblées
TinE	TP_9R	5'-CCACTCCGAGTCGTTCCCCAT-3'	MGNDSEW
пре	TP_10R	5'-TCTCTTGGACCGCAGATATTCGTG-3'	HEYLRSKR
TEU2	TP_56R	5'-ATGCAGGTGACAGGGTTGGGGGTC-3'	DPNPVTCI
I EH2	TP_57R	5'-AATAGTCGAGATGGCGGGATCCAC-3'	VDPAISTI
TEU2	TP_39R	5'-CGTGAGGTTTTTGCACTCGTCGGC-3'	ADECKNLT
ТЕПЭ	TP_40R	5'-CTTGGCGTTCTCTTGATCGATACC-3'	GIDQENAK

Pour les différentes sous-unités, la première PCR a été réalisée avec l'ADN polymérase Advantage en présence de l'amorce $GR1^{TM}$ du kit GeneRacerTM (1 µM final) et des amorces TP_9R (PaTipE), TP_56R (PaTEH2) et TP_39R (PaTEH3) à 0,4 µM final (**Tableau 10 et 11**). 1 µl d'ADNc obtenu avec le kit GeneRacerTM a été utilisé dans un volume final de 25 µl. Les conditions de température de la PCR sont les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 1 min.

 Tableau 11 : Amorces spécifiques du kit GeneRacerTM pour l'amplification de la région 5' non codante

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques
GR1	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'
GR2	5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

La deuxième PCR a été réalisée avec la même ADN polymérase et 1 μ l de la PCR1 diluée au 1/100^{ème} comme matrice. Les amorces utilisées sont l'amorce interne GR2TM (**Tableau 11**) et les amorces TP_10R (PaTipE), TP_57R (PaTEH2) et TP_40R (PaTEH3) (**Tableau 10**). Les conditions de température de cette PCR sont les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 1 min.

D-3-3 Amplification des extrémités 3' non-codantes

Comme pour l'amplification de l'extrémité 5', 2 PCR emboitées ont été réalisées pour amplifier les extrémités 3' non-codantes avec des amorces spécifiques conçues à partir des séquences des régions conservées amplifiées précédemment (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Amorces spécifiques utilisés pour amplifier les régions 3' codantes et non codantes des sous-unités auxiliaires de *P.americana*

Sous-unité	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Régions ciblées
TinE	TP_14S	5'-GTGGCGGAGCTCCACGAATATCTGC-3'	VAELHEYLR
пре	TP_15S	5'-GGACTCATGGGGAACGACTCGGA-3'	GLMGNDSE
TEU2	TP_54S	5'-CCCTTCAGCGAGTGGGGTAACCG-3'	PFSEWGNR
IEH2	TP_55S	5'-GTCTGGGACGTGGGAGATACCAA-3'	VWDVGDTK
TEU2	TP_41S	5'-CTAGAGGGGACTTACAAACAATTC-3'	LEGTYKQF
TEHS	TP_42S	5'-GTGATATCGTGCTTCATGCTCGTG-3'	VISCFMLV

Les amorces utilisées pour la première PCR sont l'amorce $GR3^{TM}$ (**Tableau 13**) du kit et les amorces spécifiques TP_14S (PaTipE), TP_54S (PaTEH2) et TP_41S (PaTEH3) (**Tableau 12**). 1µl de la RT obtenue avec le kit GeneRacerTM est utilisée en présence de l'ADN polymérase Advantage. Les conditions de température de la PCR sont les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 1 min.

Tableau 13 : Amorces spécifiques du kit GeneRacerTM pour l'amplification de la région 3' non codante

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques
GR3	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
GR4	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

La deuxième PCR a été réalisée avec les amorces $GR4^{TM}$ (**Tableau 13**) du kit et TP_15S (PaTipE), TP_55S (PaTEH2) et TP_42S (PaTEH3) (**Tableau 12**). La matrice utilisée pour cette deuxième PCR est la première PCR diluée au 1/100^{ème} en présence de l'ADN polymérase Advantage. Les conditions de température de cette deuxième PCR sont les suivantes : 95°C 1 min, 35* [95°C 30s, 68°C 1 min], 68°C 1 min.

D-4 Amplification des cadres ouverts de lecture encadrés des régions non-codantes

Les données de séquençage obtenues grâce à l'amplification des extrémités 5' et 3' des séquences des différentes sous-unités auxiliaires ont permis de dessiner des amorces spécifiques ciblant les régions non codantes encadrant la totalité du cadre ouvert de lecture (ou ORF pour <u>Open Reading Frame</u>) pour chaque sous-unité (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier les ORF encadrés de régions noncodantes des sous-unités auxiliaires de *P.americana*.

Sous- unité	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Taille de la région amplifiée
TinE	TP_16S	5'-GGGTGCATTCAAAGCACGATGACT-3'	1404 ph
пре	TP_19R	5'-CCACACAAGGTTAAAGCCTGTGGC-3'	1494 po
	TP_60S	5'-CGGACTGGCTTTGGCCGATCA-3'	
TEH2	TP_61R	5'-TCATATTGTATTTCATTCATTGGTTG-3'	1168 et 1134 pb
	TP_62R	5'-AAAACTATCGGAATTATTATTGCG-3'	
TEU2	TP_43S	5'-GTGTGCTACTATGTGAATCTCGCA-3'	1002 ph
тепэ	TP_47R	5'-CCCCTCCTGGATGTGTGACAGATG-3'	1992 pb

Pour l'amplification de la sous-unité PaTipE, la polymérase utilisée est l'Advantage. Le cycle de température utilisé est le suivant: 95°C 1 min, 30*[95°C 30s, 68°C 3 min], 68°C 3 min. Pour cette PCR, 0,5 µl de matrice a été utilisé. Les résultats obtenus après séquençage ayant montré de grandes variations, une deuxième amplification a été réalisée avec la polymérase KOD, en conservant le même couple d'amorces. Avec cette enzyme les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95°C 2 min, 30*[95°C 20s, 68°C 10s, 70°C 30s], 70°C 1 min.

L'amplification des transcrits PaTEH2 a été réalisée en utilisant deux couples d'amorces : TP_60S et TP_61R, et TP_60S et TP_62R (**Tableau 14**). En effet les résultats obtenus en 3'RACE ont permis de mettre en évidence deux extrémités 3'non codantes différentes. Les deux PCR ont été réalisées avec la polymérase KOD à partir d'1µl de matrice, avec les mêmes conditions d'amplification : 95°C 2 min, 30*[95°C 20s, 55°C 15s, 70°C 20s], 70°C 20s.

L'amplification des ADNc codant la sous-unité PaTEH3 a été réalisée avec les amorces TP_43S et TP_47R (**Tableau 14**) avec la polymérase KOD. 1µl de matrice a été utilisée et le cycle de température de la PCR a été le suivant : 95°C 2 min, 30*[95°C 20s, 60°C 15s, 70°C 40s], 70°C 40s.

E-Extraction et purification des produits PCR

Les produits PCR obtenus pour toutes les amplifications ont été analysés sur gel d'agarose par électrophorèse. Lorsqu'une seule bande était visualisée, les produits d'amplification ont été purifiés directement. Lorsqu'il y avait plusieurs amplicons de tailles différentes, des extractions ont été réalisées à partir du gel.

E-1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR ont été séparés sur gel d'agarose dont le pourcentage est choisi en fonction de la taille attendue des amplicons (2% si leur taille est inférieure à 400 pb ; 1,5% si elle est comprise entre 400 pb et 800 pb ; 1% si ils font entre 800 pb et 2000 pb ; 0,8% pour des amplicons de plus de 2000 pb). Pour préparer un gel à 1% d'agarose, 1g d'agarose (InvitrogenTM) est dilué dans 100 ml de TAE (20 mM Tris Acétate, 0,05 M EDTA, pH=8,3, Eppendorf, Hambourg, Allemagne). L'ADN migre sous un champ électrique d'une tension de 50 ou 100 V dans une minicuve (Run OneTM Electrophoresis Cell, Embi-Tec, San Diego, Californie). La révélation se fait grâce au bromure d'éthidium (BET, Fisher Scientific) additionné lors de la préparation du gel à une concentration finale de $0,5\mu g/ml$. Le BET est un intercalant de l'ADN utilisé comme marqueur d'acides nucléiques. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements UV il devient fluorescent.

E-2 Purification des produits PCR

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Hoerdt, Allemagne). Ce kit permet la purification de fragments d'ADN résultant de réactions enzymatiques telles que la PCR (purification directe) ou de fragments d'ADN extrait de gel d'agarose (purification sur gel).

E-2-1 Purification directe

La purification directe a été réalisée de la façon suivante :

1) 2 volumes de tampon NT1 ont été ajoutés au produit de PCR puis bien mélangés

2) le mélange a été déposé sur une colonne contenant une membrane de silice. Les sels chaotropiques du tampon NT1 permettent à l'ADN de se fixer à la colonne de silice.

3) deux lavages ont été effectués avec le tampon NT3 additionné d'éthanol (4/5^{ème} du volume final). Ces étapes permettent l'élimination des sels chaotropiques et autres contaminants protéiques. Les résidus d'éthanol ont été éliminés par centrifugation à vide suivie d'une étape de séchage à 70°C pendant 5 min.

4) l'ADN a été élué avec une solution de Tris-HCl à 5mM, pH 8,5 (tampon NE). Pour améliorer le rendement d'ADN purifié, l'élution a été réalisée en deux étapes avec du NE préchauffé à 70°C.

E-2-2 Purification sur gel

Ce protocole de purification a été utilisé lorsque plusieurs bandes étaient observées à partir de la migration d'un seul produit PCR. Dans ce cas, les bandes de chaque taille ont été découpées à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube eppendorf[®]. Le gel prélevé a alors été pesé et 300 µl de tampon NT1 ont été ajoutés pour 100mg de gel. Ce mélange a alors été chauffé à 55°C pendant 20 min puis déposé sur une colonne contenant une membrane de silice. L'élimination des contaminations et l'élution de l'ADN a été réalisé comme indiqué cidessus (paragraphe E-2-1). Ce protocole a été modifié pour augmenter le rendement et la qualité des amplicons purifiés qui n'étaient pas satisfaisants en utilisant les recommandations du fournisseur.

F- Clonage des différents produits PCR obtenus

F-1 Principe général du clonage

Le clonage de l'ADN est une technique de biologie moléculaire qui permet l'isolement d'une séquence d'ADN spécifique dans un vecteur. L'opération consiste à introduire un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur ou un plasmide. L'insertion de l'ADN dans le vecteur va reposer sur l'utilisation de plusieurs techniques de biologie moléculaire qui vont permettre la recombinaison *in vitro* de l'ADN. Les plasmides ou vecteurs sont des molécules d'ADN circulaire qui permettent d'introduire l'ADN d'intérêt dans l'organisme hôte (ici ce sera la bactérie *Escherichia coli*). Ils assurent aussi le maintien de l'ADN d'intérêt dans la cellule hôte au cours des divisions cellulaires.

Cette technique permet d'une part, de réaliser des constructions dans des vecteurs d'expression et d'autre part de produire des molécules d'ADN recombinant et de les introduire dans des organismes hôtes pour permettre leur réplication.

F-2 Les vecteurs utilisés

Dans cette étude, deux vecteurs ont été utilisés. Le vecteur de clonage pCR[®]4 TOPO[®] (InvitrogenTM) a été utilisé pour le clonage des ADN partiels, des produits PCR obtenus en 5' et 3' RACE et des transcrits complets. Le vecteur d'expression pGEM a été utilisé pour le clonage des ORF.

F-2-1 Le vecteur de clonage pCR[®]4 TOPO[®]

Le vecteur plasmidique pCR[®]4 TOPO[®] (**Figure 26**) est fourni sous forme linéaire. Il possède une topoisomérase lié au vecteur de façon covalente et des extrémités 3'cohésives se terminant par une thymidine pour faciliter le clonage TA (méthode du « TA cloning »). Les produits PCR qui ont été insérés dans ce vecteur ont été obtenus en utilisant des polymérases ayant une activité terminale transférase qui permet l'ajout de désoxyadénosines aux extrémités 3' des amplicons. Les inserts ainsi obtenus vont se lier au vecteur grâce à une réaction de topoisomérisation.



Figure 26. Carte de restriction du vecteur pCR[®]4-TOPO[®] (modifié d'après InvitrogenTM).

Remarque : Les transcrits complets des sous-unités PaTEH2 et PaTEH3 ont été amplifiés avec une enzyme qui ne posséde pas d'activité terminale transférase. Pour réaliser l'insertion de ces transcrits dans le vecteur pCR[®]4 TOPO[®] des désoxyadénosines ont été ajoutées aux extrémités 3' après la PCR.

F-2-2 Le vecteur d'expression pGEM-HEJUEL

Les produits PCR correspondant aux transcrits codant le cadre de lecture des sousunités auxiliaires ont été clonés dans le plasmide d'expression pGEM HEJUEL (don du Pr Olaf Pongs, Institut de Transduction du Signal Neuronal, Hambourg, Allemagne) par la technique du clonage directionnel. Cette technique consiste à liguer l'insert au plasmide au niveau de sites de restriction compatibles.

Le vecteur pGEM HEJUEL est un vecteur conçu pour la transcription *in vitro* d'ARN (**Figure 27**). Il contient le promoteur T7 pour la transcription des ADNc clonés et les séquences 5' et 3' non codantes de la β -globine du xénope *Xenopus laevis* situées de part et d'autre du site de polyclonage. Ces séquences permettent de stabiliser les ARNm injectés dans les ovocytes.



Figure 27. Carte de restriction du vecteur pGEM-HEJUEL. 1: Promoteur T7, 2: 5'UTR β-globine de xénope, 3: 3'UTR β-globine de xénope, 4: Promoteur Ampicilline, 5: gène de résistance à l'ampicilline.

F-2-2-1 Préparation du vecteur pGEM-HEJUEL

Pour pouvoir recevoir l'insert, le vecteur pGEM-HEJUEL a été digéré par les endonucléases *Xma*I et *Xba*I⁸. Ces endonucléases ont été choisies car les sites qu'elles reconnaissent sont rares et ne sont pas présents dans les inserts. Le vecteur a donc été digéré à 37°C par les endonucléases *Xma*I (Promega) et *Xba*I (Invitrogen) dans un tampon compatible avec les deux enzymes (Tampon B (Promega) : 60 mM deTris-Hcl, 60 mM de MgCl₂, 500 mM de NaCl, 10 mM de DTT, pH=7,5). Les enzymes de restriction ont ensuite été inactivées à 65°C pendant 15 minutes. Le plasmide doublement digéré présente alors des extrémités cohésives. Afin d'éviter qu'il ne se re-circularise lors de la ligation de l'insert les extrémités 5' du vecteur ont été déphosphorylées avec la phosphatase alkaline d'intestin de veau (CIAP). Le vecteur ainsi digéré et déphosphorylé a été purifié avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) comme indiqué dans le paragraphe E-2-1.

⁸ Les séquences des sites reconnus par les endonucléases sont CCCGGG (Xmal) et TCTAGA (Xbal).

F-2-2-2 Clonage directionnel des transcrits codant les cadres ouverts de lecture des sous-unités auxiliaires

Les données de séquençage obtenues suite à l'amplification des extrémités 5' et 3' des séquences des différentes sous-unités auxiliaires et des transcrits amplifiés avec des amorces ciblant les régions non codantes, ont permis de dessiner des amorces spécifiques des cadres ouverts de lecture de chaque sous-unité auxiliaire. Pour pouvoir insérer ces transcrits dans le vecteur pGEM-HEJUEL, les séquences des endonucléases *Xma*I et *Xba*I ont été ajoutés à l'extrémité de la séquences des amorces (**Tableau 15**).

 Tableau 15 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier les ORF des sous-unités auxiliaires de *P.americana*

Sous- unité	Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Taille de la région amplifiée
	TP_17S	5'-aaacccgggccaaccATGGAcGAGCCGGAGATTGAGC-3'	
TipE	TP_18R	5'-caaaatctagaTCAGACTTCCGCTATCGGCCCAG-3'	1065 et 1191pb
-	TP_64R	5'-TTACTTGGGTCTCCAGGAGATGTT-3'	-
	TP_58S	5'-aaacccgggccaccATGGGTGCCGAGGGGGGGGGGA-3'	
TEH2	TP_59R	5'-caaaatctagaTTACTCTTCCTTGGTGGGGTATTT-3'	690 et 732pb
	TP_63R	5'-caaaatctagactTCAGTGTTCAGTACTCTTCCTC-3'	
TEH3	TP_44S	5'-aaacccgggccaccATGCCCAAACAAAAGCCGATCCC-3'	1269nh
	TP_45R	5'-caaaatctagaTCAGAGCGCCATAACCGAGTCTCC-3'	130800

Les régions soulignées et en italique correspondent aux sites de restriction des enzymes *XmaI* et *XbaI*. Pour ne pas avoir deux codons d'initiation (ATG) successifs dans la séquence de PaTipE le nucléotide "T" du deuxième codon a été remplacé par un "c", dans l'amorce TP_17S. En effet, la présence de deux ATG successifs pourrait engendrer des erreurs lors de la transcription *in vitro* (Chapitre 3, paragraphe D). Cette mutation ne modifie ni le cadre lecture, ni la séquence protéique.

Pour les amplifications des cadres ouverts de lecture de chaque sous-unité auxiliaire, nous avons réalisé une PCR emboitée : la matrice utilisée pour la PCR correspond au produit de la PCR1 réalisée avec les amorces ciblant les régions non codantes (paragraphe D-4). En effet les amorces répertoriées dans le **tableau 15** sont des amorces internes par rapport aux amorces du **tableau 14** qui sont dites amorces externes.

Pour la sous-unité auxiliaire TipE, la polymérase utilisée est l'Advantage. 1 μ l de la PCR1 diluée au 1/10^{ème} a été utilisé en présence des amorces TP_17S et TP_18R (**Tableau 15**). Le cycle de température utilisé est le suivant : 95°C 1 min, 30*[95°C 30 s, 68°C 3 min], 68°C 3 min. Les résultats obtenus après séquençage montrant de grandes variations, une deuxième PCR a été réalisée avec la polymérase KOD avec 1 μ l de la PCR1 diluée au 1/100^{ème}. Le cycle de température utilisé est le suivant : 95°C 2 min, 30*[95°C 20 s, 68°C 10 s, 70°C 20 s], 70°C 1 min.

Pour la sous-unité TEH2, deux couples d'amorces ont également été utilisés : TP_58S et TP_59R, et TP_58S et TP_63R (**Tableau 15**). Les deux PCR ont été réalisées avec la polymérase KOD, en utilisant 1µl de PCR 1 diluée au $1/10^{\text{ème}}$, avec le cycle de température suivant : 95°C 2min, 30*[95°C 20s, 64°C 15s, 70°C 15s], 70°C 15s.

L'amplification de l'ORF de la sous-unité PaTEH3 a été réalisée avec les amorces TP_44S et TP_45R (**Tableau 15**) avec la polymérase KOD et 1µl de matrice diluée au $1/10^{\text{ème}}$. Le cycle de température utilisé est le suivant : 95°C 2 min, 30*[95°C 20s, 68°C 10s, 70°C 40s], 70°C 40s.

Les produits PCR correspondant aux cadres ouverts de lecture ont été digérés par les endonucléases *Xma*I et *Xba*I puis ont été purifiés avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up. La ligation a alors été réalisée en mettant en présence des inserts et du plasmide digérés par *Xma*I et *Xba*I (proportion 3:1⁹) en présence d'une ligase (T4 DNA Ligase, Invitrogen) et du tampon approprié (250 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM de MgCl2, 5 mM d'ATP, 5 mM de DTT et 25% de polyéthylène glycol). Les produits de ligation ont ensuite été conservés à 4°C jusqu'à la transformation bactérienne.

F-3 La transformation bactérienne

La transfection est un processus qui permet l'introduction d'un ADN exogène dans des cellules. Lorsque les cellules sont des bactéries, ce processus est nommé transformation bactérienne. La cellule hôte utilisée dans ce travail est la bactérie *Escherichia coli*. Celle-ci a été rendu chimio-compétente par un traitement chimique qui a fragilisé sa membrane (Cellules chimio-compétentes DG1, Delphi Genetics/Eurogentec, Belgique). L'entrée de l'ADN dans la bactérie se fait par choc thermique.

2 à 5 µl de produit de ligation ont été placés dans un tube décongelé de bactéries (50 µl). Après une incubation de 10 à 20 min à 4°C, un choc thermique a été appliqué aux bactéries. Le tube a été placé dans un bain marie à 42°C pendant 30s puis aussitôt remis dans la glace pendant 2 min. Du milieu de culture (250 µl de SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10 mM chlorure de sodium 2,5 mM cholrure de potassium, 10 mM chlorure de magnesium), Delphi Genetics/Eurogentec) est ajouté aux bactéries pour permettre leur multiplication à 37°C pendant 1h. Cette étape se fait sous agitation (250 rpm) en plaçant le tube horizontalement pour augmenter la surface d'échange. Après cette incubation, les

⁹ Les quantités ont été calculées grâce à la formule suivante :

Quantité d'insert(en ng) = 3* (taille insert* quantité de vecteur en ng)/ taille vecteur

bactéries sont étalées sur un milieu de culture solide coulé dans des boîtes de Pétri et incubées pendant 14 -16h à 37°C. Le milieu de culture utilisé est un milieu LB (2% de Lennox Both Base (InvitrogenTM), 1,5% d'agar (InvitrogenTM) et 1% d'extrait de levure (BactoTM Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Lept de Claix, France)). Ce milieu a été supplémenté avec de l'ampicilline (100 μ g/ml) ce qui permet uniquement la croissance des bactéries qui ont intégré le plasmide.

Pour les bactéries transformées avec le vecteur pCR[®]4 TOPO[®], 40 μ l d'une solution d'X-Gal dilué dans du diméthylformamide (40 mg/ml) ont préalablement été étalé sur le milieu LB. Le vecteur pCR[®]4 TOPO[®] est porteur du gène *lacZa-ccdB* (codant la β -galactosidase). L'insert s'intègre au niveau du site de polyclonage situé entre le promoteur LacZ et la séquence codante de la betaGal. Si l'insert est présent, le gène ne sera plus exprimé et la réaction d'hydrolyse de l'X-Gal par la β -galactosidase n'aura pas lieu. Par conséquent, les bactéries recombinantes qui ont intégré le vecteur contenant l'insert seront translucides (betagal⁻) alors que les autres seront bleues (betagal⁺).

G-Identification des clones recombinants par PCR

Les colonies de bactéries qui ont poussé sur les boîtes de Pétri ont été mises en culture dans du milieu LB liquide (sans agar) avec de l'ampicilline (100 μ g/ml) pendant 1h à 1h30 à 37°C sous agitation. 40 μ l de cette pré-culture ont été centrifugés à 15000g pendant 5 min à 4°C pour récupérer les bactéries. Le culot obtenu est repris dans de l'eau ultrapure. Il servira de matrice pour la PCR de criblage.

La PCR qui permet le criblage des clones positifs est réalisée avec des amorces s'hybridant sur le plasmide. Dans le cas du vecteur pCR[®]4 TOPO[®] il s'agit des couples M13F/M13R ou T3/T7 (**Tableau 16**) alors que pour le vecteur pGEM, les amorces qui ont été utilisées sont pG-1S et Xen-3R (**Tableau 16**). Ces couples encadrent la région où le fragment d'ADN d'intérêt s'est inséré dans le vecteur. La taille des fragments obtenus après la PCR permet de vérifier que l'insert est bien présent dans le vecteur et de voir si les vecteurs ont intégré des inserts de tailles différentes.

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Tm
M13F (20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	50°C
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50°C
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	56°C
Τ7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	56°C
pG-1S	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'	70°C
Xen-3R	5'-GTAGCCATTCGTATCTGCTCC-3'	64°C

 Tableau 16 : Amorces utilisées pour le criblage des clones positifs

Les PCR ont été réalisées avec la polymérase GoTaq (Promega) dans un milieu réactionnel de 15 μ l. 1 μ l de matrice préparé à partir des pré-cultures a été utilisé et les conditions de température ont été les suivantes :

- avec M13F/M13R: 94°C 2 min, 30*(94°C 20s, 50°C 30s, 72° x min), 72°C 5 min,
- avec T3/T7: 94°C 2 min, 30*(94°C 20s, 56°C 30s, 72° x min), 72°C 5 min,
- avec pG-1S/Xen-3R: 94°C 2 min, 30*(94°C 20s, 60°C 30s, 72° x min), 72°C 5 min.

Les temps d'élongation (**x**) varient de 30s à 2 min en fonction de la taille attendue des fragments. Les clones sélectionnés par ces PCR ont été mis en culture dans 5 ml de milieu LB avec ampicilline (100 μ g/ml) et incubés pendant 16 à 20h, à 37°C, sous forte agitation (250 rpm).

H-Extraction de l'ADN plasmidique

Pour collecter les bactéries, les cultures ont été centrifugées à 6000g, pendant 5 min à 4°C. L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) selon la méthode de lyse alcaline. Les culots bactériens ont été repris dans un volume de tampon de resuspension (A1) contenant de la RNAse A. Puis les cellules bactériennes ont subi une lyse alcaline qui a permis la libération de l'ADN plasmidique grâce à un tampon (A2) contenant du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et du NaOH (hydroxyde de sodium). La réaction de lyse a été neutralisée par une solution contenant de l'acétate de potassium (tampon A3) et une centrifugation à 11000g pendant 10 min à température ambiante a permis de culotter les débris cellulaire et l'ADN génomique précipité. Le surnageant a été récupéré délicatement et chargé sur une colonne de silice. L'ADN est fixé sur cette membrane grâce à une centrifugation (1 min à 11000 rpm). 2 lavages ont ensuite été réalisés avec deux tampons du kit contenant de l'éthanol. Après séchage (5 min à l'étuve, 70°C), l'ADN plasmidique a été élué avec une solution aqueuse (5 mM Tris-HCl, pH 8,5 : tampon d'élution AE préchauffé à 70°C), en 2 passages de 10-50 µl.
I- Séquençage et analyse des séquences

Les inserts clonés dans les vecteurs pCR[®]4 TOPO[®] et pGEM ont été séquencés par la société Millegen (Labège, France) ou par la société GATC (Konstanz, Allemagne) dans les deux sens, au moins deux fois. Les électrophorégrammes obtenus ont été analysés avec le logiciel BioEdit. L'alignement des séquences a été réalisé avec la méthode ClustalW (Thompson et coll., 1994). Une recherche de type BLAST protéique et nucléique a été réalisée pour confirmer l'identification des différentes sous-unités auxiliaires (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Les séquences nucléiques et protéiques ont été déposées dans la GenBank et portent les numéros d'accession suivants : KC206367 (PaTEH1A), KC206368 (PaTEH1B), KC247670 (PaTEH1C), KC992733 (PaTipE).

J- Insertion d'un Tag-histidine (his-tag) à l'extrémité N-terminale des sous-unités auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B.

Pour procéder à l'insertion de l'his-tag juste après la méthionine initiant chaque sousunité nous nous sommes inspirés de la technique L.I.C (Ligation Independent Cloning, Kuzuya et coll., 2009). Pour cela, quatre amorces ont été dessinées (**Tableau 17**).

Tubleuu 17 Tilliotees utilisees pour Tillisertion ue Tillis tug							
Nom	Séquences nucléotidiques	Tm					
TH1-1S	5'-AGGAGCAGCAGCTCGGAGCTCCTT-3'	78°C					
TH1-2S	5'-ATGCGAGGTAGTCATCACCATCACAGGAGCAGCAGCTCGGAGCTCCTT-3'	78°C					
pGE-20R	5'-CATCCCGGGGAATTGATCTGCCAAAG-3'	74°C					
pGE-21R	5'-ATGGTGATGGTGACTACCTCGCATCCCGGGGGAATTGATCTGCCAA-3'	74°C					

Tableau 17 : Amorces utilisées pour l'insertion de l'his-tag

Les parties indiquées en rouge correspondent à la séquence codant le tag histidine RGSHHHH.

Les amorces TH1-2S et pGE-21R ont été phosphorylées sous l'action de la T4 polynucléotide kinase en présence de dATP (30 min à 37°C), dans le but de favoriser la recircularisation du plasmide transformé. Deux PCR ont été réalisées en parallèle avec les couples d'amorces TH1-2S et pGE20R, et TH1-1S et pGE21R avec la polymérase KOD Hot Start (**Figure 28**). La matrice utilisée pour chaque PCR est l'ADN plasmidique contenant l'ORF de PaTEH1A ou PaTEH1B. La PCR a été réalisée selon les conditions suivantes : 50 ng de matrice et 95°C 2 min, 30*(95°C 20s, 68°C 10s, 70°C 90s), 70°C 1 min. Les produits de PCR ont ensuite été séparés sur gel d'agarose à 0,8% puis purifiés avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up. L'endonucléase *Dpn*1¹⁰ (InvitrogenTM) a été utilisée pour éliminer l'ADN plasmidique parent méthylé qui pourrait contaminer l'ADN amplifié non méthylé. La recircularisation du vecteur est réalisée en mettant en contact, à des concentrations égales, les deux produits de PCR dans une solution contenant 300 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 100 mM de MgCl2, 100 mM de DTT et 10 mM d'ATP. Le mélange est ensuite soumis à une dénaturation et une renaturation lente dans un thermocycleur (95°C 5 min, 80°C 1 min, 70°C 1 min, 60°C 1 min, 50°C 1 min, 30°C 1 min, 30°C 1 min, 20°C 1 min, 14°C 1 min).

Le plasmide ainsi obtenu a ensuite été inséré dans une bactérie par transformation bactérienne, puis l'ADN plasmidique a été purifié comme indiqué ci-dessus (paragraphe **H**).

¹⁰ Endonucléase coupant l'ADN méthylé au niveau du site GATC.



Figure 28. Schéma récapitulatif des étapes réalisées pour insérer un tag histidine (his-tag) à l'extrémité N-terminale de la sous-unité PaTEH1.

K-Extraction d'ADN génomique (ADNg)

L'extraction d'ADNg a été réalisée sur 6 blattes mâles adultes (Figure 29) à partir du protocole modifié de Blin et Stafford (1976). Seuls les tissus mous présents au niveau du corps de la blatte ont été prélevés, congelés dans l'azote liquide, broyés au mortier et conservés sous forme de poudre à -80°C. Les tissus ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'une seringue 2 ml (Terumo®, Louvain, Belgique) équipée d'une aiguille stérile Neolus IM 40 mm 8/10 (Terumo®) dans un tampon d'extraction (1 mL pour 100 mg) contenant 10 mM de Tris-HCl pH8, 0,1 M d'EDTA pH8, RNase pancréatique à 20 µg/ml, et 0,5% de SDS et incubé 1h à 37°C. De la protéinase K (Sigma-Aldrich) a ensuite été ajoutée à une concentration finale de 100 µg/ml et la suspension cellulaire a été incubée à 50°C pendant 3h en mélangeant régulièrement avec une tige en verre. Une fois la solution redescendue à température ambiante, un volume équivalent de phénol (pH8.0) a été ajouté à l'homogénat. Le mélange a alors été agité en retournant doucement le tube de bas en haut jusqu'à ce que les deux phases forment une émulsion puis centrifugé 15 minutes à 5000g à température ambiante. La phase aqueuse a été transférée dans un tube propre et l'extraction au phénol a été répétée deux fois. L'ADN génomique a été précipité à l'acétate d'ammonium (ajout de 0,2 volume d'acétate d'ammonium à 10 M). Les tubes sont retournés doucement de bas en haut jusqu'à apparition d'une méduse d'ADN. L'ADN génomique forme un précipité épais qui a pu être récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur dont l'extrémité a été travaillée pour être en forme de U. L'ADN génomique a alors été placé dans un tube eppendorf de 1,5 ml et dissous dans du Tris EDTA pH8.0 pendant 48h à 4°C.



Figure 29 Extraction de l'ADN génomique.

Cette figure reprend les étapes réalisées pour extraire l'ADN génomique de la blatte P. americana.

L- Southern blot

La technique de Southern blot est une méthode d'analyse cartographique basée sur l'utilisation de sonde complémentaire d'une séquence spécifique ciblée. L'ADN génomique est digéré avec une ou plusieurs endonucléases et les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. L'ADN est ensuite transféré et fixé sur une membrane qui sera ensuite incubée avec la sonde radiomarquée choisie.

L-1 Préparation des sondes radioactives

Les sondes ont été choisies de telles sorte que la probabilité qu'elles contiennent un intron soit minimale (**Figure 30**).





Figure 30. Localisation des sondes utilisées pour le Southern Blot. Les amorces sont représentées par des flèches noires ; les segments transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs. Les flèches rouges indiquent la possible localisation des introns déduite des clones obtenus pour chaque sous-unité. Le trait plein représente la région 5' non-codante de la sous-unité TEH2.

Les sondes ont été préparées par PCR avec la polymérase GoTaq (Promega) en utilisant comme matrice l'ADN plasmidique correspondant à la sous-unité (40 ng) et les amorces répertoriées dans le **Tableau 18**. Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 μ l. Le même cycle de température a été utilisé pour amplifier chaque sonde : 95°C 2 min, 30*(95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 40s), 72°C 5 min.

Nom de	Taille de	Gène	Amorces utilisées pour l'amplification de la sonde			
la sonde	la sonde	cible	Noms	Séquences (5'-3')		
S1	498 pb	TipE	TP_17S	ATGGACGAGCCGGAGATTGAGC		
			TP_9R	CCACTCCGAGTCGTTCCCCAT		
S2	679 pb	TEH1	TEH1-11S	ATGAGGAGCAGCAGCTCGGAG		
			TEH1-5R	CGAAGTAATGGATGATGATGGCG		
S3 451 pb	TEU2	TP_60S	CGGACTGGCTTTGGCCGATCA			
	431 po	I EI12	TP_56R	ATGCAGGTGACAGGGTTGGGGTC		
S4	426 pb	TEH3	TP_44S	ATGCCCAAACAAAAGCCGATCCC		
			TP_39R	CGTGAGGTTTTTGCACTCGTCGGC		

Tableau 18 : Caractéristiques des sondes.

Les sondes ont ensuite été marquées extemporanément avec le kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham/GE Healthcare Life Sciences, Fribourg, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Les nucléotides non incorporés sont éliminés sur colonne Sephadex G-50 (ProbeQuant G-50 Micro Colums, Amersham/GE Healthcare Life Sciences).

L-2 Digestion de l'ADNg

Pour chaque condition, 2 digestions enzymatiques de l'ADNg ont été réalisées avec des endonucléases dont les sites de restriction ne sont pas présents dans la séquence des gènes d'intérêt. Les enzymes de restriction *Eco*RI (Promega) et *Kpn*I (Promega) ont été utilisées selon les instructions du fournisseur pour digérer 10 μ g d'ADNg. Les sites reconnus par ces deux enzymes contiennent 6 nucléotides. Elles vont couper l'ADN environ tous les 4096 nucléotides (1/4⁶) (Didier Peltier, communication personnelle).

L-3 Electrophorèse et transfert

Après digestion enzymatique, la totalité de l'ADN digéré a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% dans une solution de TAE à 0,5%. Après avoir vérifié que l'ADN avait bien été digéré par les endonucléases, le gel a été placé dans une solution de dépurination (HCl 0,25 M) pendant 10 min. Puis il a été placé dans une solution alcaline (NaOH 10 g/500 mL, NaCl 43,83 g/500 mL) pendant 30 min dans le but de dénaturer les fragments d'ADN double brin. Ces fragments ont ensuite été transférés sur une membrane d'hybridation (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Une empreinte du gel a ainsi été réalisée. Pour fixer l'ADN, la membrane a été placée entre 2 papiers Whatmann et incubée 1h à 80°C, puis conservée à température ambiante.

L-4 Hybridations et lavages

Les solutions d'hybridation sont préparées à partir d'une solution SSPE 20X contenant 3 M de NaCl, 0,2 M de NaH₂PO₄, H₂O (phosphate de sodium monobasique, monohydraté) et 25 mM d'EDTA (Acide Ethylènediaminetétraacétique), pH = 7,4 (ajusté avec une solution de NaOH 5N).

Les membranes ont été imbibées dans une solution de SSPE 2X puis enroulées dans des drains en nylon et placées dans un tube à hybridation. Elles ont ensuite été incubées pendant 4 h à 65°C dans 15 ml de tampon de préhybridation (SSPE 5X, Denhart 5X, SDS 0,5% et 100 μ g/ml de sperme de saumon soniqué et dénaturé).

L'hybridation a ensuite été effectuée pendant une nuit à 65°C dans 15 ml de tampon d'hybridation (tampon de préhybridation + sonde marquée préalablement dénaturée par chauffage). Après hybridation, les membranes sont lavées 2 fois pendant 15 min à 65°C dans une solution de SSPE 2X, 0,5% SDS puis dans une solution SSPE 0,2X, 0,5% SDS.

L-5 Révélation

Les membranes ont ensuite été positionnées contre un écran (Kodak, Imaging Screen K, BioRad) qui a été révélé après plusieurs heures d'exposition à température ambiante (Molecular Imager FX, BioRad).

Matériels et Méthodes. Chapitre 2

CHAPITRE 3 : TECHNIQUES D'ELECTROPHYSIOLOGIE

L'ovocyte de xénope est le seul système d'expression hétérologue qui permette aujourd'hui d'étudier les propriétés des courants Na⁺ d'insecte. Nous avons utilisé la technique de la double micro-électrode pour caractériser les effets des sous-unités auxiliaires sur les courants Na⁺.

A- Le xénope Xenopus laevis

Le xénope *Xenopus laevis* également appelé grenouille à griffe d'Afrique du Sud est un amphibien de la famille des Pipidés (**Figure 31**). C'est un animal aérobie mais totalement aquatique.



Figure 31. Le xénope Xenopus laevis

Les xénopes femelles sont élevées au laboratoire dans un bassin dont l'eau est filtrée en permanence. L'éclairage est réglé par minuterie pour assurer une photopériode de 12h jour/ 12h nuit. Les xénopes sont nourries avec des granulés pour truite, deux fois par semaine.

B- Les ovocytes de xénope

Les ovocytes de xénope sont prélevés à partir des lobes ovariens. Chez la femelle xénope les ovaires représentent 15% du poids total de la grenouille pendant la reproduction et sont chacun constitués de 24 lobes (Lofts, 1974). Chaque lobe contient des centaines d'ovocytes à tous les stades de développement (**Figure 32A**).

Les ovocytes utilisés pour les injections d'ARN sont des ovocytes de stade V et VI. Les ovocytes de stade V ont une taille d'environ 1 à 1,2 mm de diamètre. Ils possèdent un pôle animal brun et un pôle végétal (ou végétatif) peu pigmenté (**Figure 32B**). Les ovocytes de stade VI mesurent environ 1,3 mm de diamètre. Ils possèdent également deux hémisphères bien distincts entre lesquels se trouve un anneau non pigmenté appelé ceinture ou bande équatoriale (Rasar et Hammes, 2006). Dans les lobes ovariens chaque ovocyte est entouré d'une couche de cellules aplaties appelées cellules folliculaires (**Figure 32B**).



Figure 32. Les ovocytes de xénope. A. Ovocytes de xénope avant traitement à la collagénase. B. Représentation d'un ovocyte de xénope de stade V avant traitement à la collagénase (modifié d'après Bianchi et coll., 2006). C. Ovocytes de xénope après traitement à la collagénase.

De par leur capacité de synthèse d'une protéine codée par un ARNm qui leur a été injecté (Gurdon et coll. 1971), les ovocytes de xénope sont beaucoup utilisés comme système d'expression hétérologue. L'expression de canaux ioniques dans l'ovocyte de xénope a commencé au début des années 80 (Miledi et coll., 1982a et 1982b). Cette approche est très vite devenue une technique privilégiée pour les études électrophysiologiques des canaux ioniques, des transporteurs et des récepteurs membranaires (Bianchi et coll., 2006). Les ovocytes de xénope présentent de nombreux avantages. Tout d'abord, les femelles xénope sont facilement maintenues en captivité et les ovocytes sont simples à prélever. De plus, les ovocytes sont relativement faciles à transfecter par nano-injection de par leur large diamètre. Les cellules non injectées peuvent survivre plus d'une dizaine de jours en dehors de l'animal. Pour les études électrophysiologiques, le principal avantage est la faible expression de canaux et récepteurs endogènes et la capacité à exprimer fortement les protéines d'intérêt (Bianchi et coll., 2006 ; Goldin, 2006).

C- Prélèvement des ovocytes de xénope

Les femelles xénopes sont anesthésiées dans un bain de tricaïne (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) à 0,15% qui assure aussi le rôle d'analgésique. L'anesthésie et l'analgésie pourront être accentuées en maintenant l'animal sur un lit de glace pendant l'opération chirurgicale. Une incision de 0,5 à 1 cm est réalisée en laparotomie (au niveau du flanc du xénope) et les sacs d'ovocytes sont prélevés délicatement à l'aide de pinces. L'incision doit être recousue avec du fil résorbable (Ethicon France, Issy les Moulineaux, France) en réalisant des points serrés permettant de maintenir la plaie hermétiquement fermée. La xénope est ensuite placée sous l'eau pour enlever la tricaïne. Il est inutile d'appliquer des antibiotiques sur la plaie car la peau du xénope secrète des peptides ayant des activités antimicrobiennes à large spectre (Soravia et coll., 1988).

Les sacs ovariens prélevés sont lavés et séparés en paquets d'une centaine d'ovocytes dans une solution de SOS (<u>S</u>tandard <u>O</u>ocyte <u>S</u>aline) normal constitué de 100 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1,8 mM de CaCl₂, et de 5 mM d'Hepes (pH= 7,5 ajusté avec du NaOH 5N). Les ovocytes sont ensuite lavés avec une solution de SOS sans calcium constituée de 100 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, et de 5 mM d'Hepes (pH= 7,5 ajusté avec du NaOH 5N).

Une défolliculation enzymatique pendant environ 1 h (collagénase IA (2 mg/ml) et inhibiteur trypsique (0,8 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)) puis mécanique des ovocytes permet d'enlever la couche de cellules folliculaires qui entourent les ovocytes. Cette étape est cruciale, car les cellules folliculaires constituent une barrière mécanique gênant les nano-injections de matériels génétique et l'empalement des microélectrodes d'enregistrement. De plus, elles ralentissent le retour à un potentiel de membrane stable après la dépolarisation induite par l'empalement (Kusano et coll., 1982) et gênent l'accès des substances pharmacologiques à la membrane ovocytaire. Après lavage avec du SOS sans calcium les ovocytes ont été placés dans du SOS normal, puis triés manuellement sous loupe binoculaire. Les ovocytes ainsi défolliculés sont prêts à être injectés avec du matériel génétique (**Figure 32C**).

D- Transcription in vitro des ADN clonés

Avant leur expression dans les ovocytes de xénope, les différents ADN clonés ont été transcrits en ARN à l'aide du kit T7 mMESSAGE mMACHINE® (Ambion®, Austin, Texas, USA). Les plasmides servant de matrice à la réaction de transcription ont été précédemment linéarisés avec une endonucléase : *Spe*I (Promega) pour les sous-unités auxiliaires clonées dans le vecteur pGEM et *Not*I (Invitrogen) pour les sous-unités principales clonés dans pGH19 (Tan et coll., 2002a). La réaction de transcription a été faite à 37°C suivant les instructions du fournisseur. Les ARN ont ensuite été purifiés avec le kit MEGAclearTM (Ambion®) puis conservés à -80°C.

E- Injection des ovocytes

Pour chaque combinaison de sous-unité principale et auxiliaire, des essais d'expression ont été réalisés en faisant varier les quantités d'ARN injecté. En effet, cette mise au point est nécessaire pour déterminer les quantités d'ARN permettant l'obtention de courants Na⁺ compris entre 0,25 μ A et 2 μ A.

Les injections d'ARN dans l'ovocyte ont été réalisées grâce à un nano-injecteur automatique Nanoject II (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvanie, USA). Elles se font grâce des capillaires (Drummond) étirés avec une étireuse (Narashige, Japon). Pour l'expression des canaux Na_v, l'injection d'un mélange de sous-unité principale et de sous-unité auxiliaire dans un rapport 1 :1, a été faite dans le cytoplasme de l'ovocyte. Le volume injecté variait de 8,2 nl à 50,6 nl d'ARN pour une concentration allant de 0,2 à 0,5 $\mu g/\mu l$. Les quantités injectées étaient donc de l'ordre de 2 à 35 ng d'ARN. Après injection, les ovocytes ont été incubés à 4°C pendant 15 min, puis ils ont été placés dans du milieu d'incubation (SOS normal supplémenté de gentamycine 50 mM, pénicilline/streptomycine 100 mM et pyruvate de sodium 2,5 mM (Sigma-Aldricht)). L'incubation moyenne pour les différentes combinaisons de sous-unité principales et sous-unité auxiliaires était de 2-3 jours à 18°C. Pour la sous-unité principale injectée seule, une incubation beaucoup plus longue (10 jours) à une température plus faible (10°C) a été nécessaire.

F- Mise au point des conditions d'injection et du temps d'incubation des ovocytes

Pour obtenir des courants d'une taille comprise entre 0,25 et 2 μ A, il a été nécessaire de mettre au point les quantités d'ARN injecté ainsi que le temps d'incubation optimal, et ce pour chaque combinaison testée.

Ainsi pour toutes les combinaisons testées au cours de ce travail de thèse, plusieurs quantités d'ARN ont été injectées (**Tableau 19**). Pour chaque quantité d'ARN injecté, les ovocytes ont été testés au bout de 2 jours d'incubation puis tous les jours jusqu'à 11 jours (si aucun courant Na⁺ n'était mesuré plus tôt).

	DmNa _v 1-1 +								
Quantité d'ARN	-	DmTEH1	PaTEH1A	PaTEH1B	DmTipE	PaTipE	PaTEH1∆ (267-280)	PaTEH1∆ (270-280)	
1,8 ng	Х		Х	Х		Х	Х	Х	
2,7 ng				Х		Х	Х	Х	
3,7 ng		Х	Х	Х		Х			
5,5 ng		Х		Х		Х			
7 ng		Х			Х				
8,3 ng	Х	Х							
9 ng					Х				
11 ng	Х	Х							
12,4 ng					Х				
13,8 ng					Х	Х			
35 ng	Х								
Quantité d'ARN	-	DmTEH1	PaTEH1A	PaTEH1B	DmTipE	PaTipE			
5 ng	Х			Х		Х			
7,5 ng		Х	Х		Х				
11 ng	Х					Х]		
12,5 ng		X		Х]		
13,5 ng		Х	X]		
25 ng	X	Х	X		Х]		

Tableau 19 : Quantité d'ARN injectés testée pour chaque combinaison $\alpha + \beta$. Les croix indiquent les quantités d'ARN injecté pour chaque combinaison.

Pour obtenir l'intégralité des résultats présentés dans ce manuscrit, 3793 ovocytes ont été injectés, dont 650 pour les expériences d'immunohistochimie (voir Chapitre 4). Sur les 3143 ovocytes restants, 673 ont permis l'enregistrement d'un courant Na⁺, soit 21,41%. Sur les 673 ovocytes ayant permis l'enregistrement d'un courant Na⁺, seuls 295 ovocytes ont permis l'enregistrement d'un courant Na⁺ exploitable c'est-à-dire, d'une amplitude comprise entre 0,3 et 2 μ A. En effet, pour des quantités d'ARN injecté trop importantes ou lorsque le temps d'incubation était trop long, les courants Na⁺ enregistrés présentaient une amplitude comprise entre 3 et 10 μ A. Ces courants très importants ne pouvaient donc pas être correctement « clampés » et étaient par conséquent inexploitables. A contrario, des courants de trop faible amplitude (50 nA à 0,2 μ A) étaient parasités par le bruit et les pics des courants Na⁺ devenaient indétectables. En conclusion, **9,38%** des ovocytes injectés ont conduit aux résultats présentés dans ce manuscrit.

G- La technique de la double microélectrode en potentiel imposé

Cette technique électrophysiologique a été mise au point par Barnard et coll., en 1982. Elle fait intervenir deux microélectrodes (**Figure 33**). La première électrode (E1) mesure le potentiel de membrane de l'ovocyte. Elle est connectée à un amplificateur qui compare le signal enregistré au potentiel de commande. La deuxième électrode (E2) injecte le courant correspondant à la différence entre le potentiel de membrane mesuré et le potentiel de membrane désiré.

L'ovocyte est placé dans une cuve irriguée en continu avec du SOS normal grâce à un système de perfusion (VC-6 six channel valve controller, Warner Instrument Corporation, Hamden, Connecticut, USA). Un système d'évacuation lié à une pompe péristaltique (Minipuls 3 Gilson, Grosseron, Saint-Herblain, France) permet l'évacuation du SOS et des déchets. Après équilibration des résistances des électrodes, l'ovocyte est délicatement empalé avec les deux électrodes.



Figure 33. Technique de la double microélectrode en potentiel imposé. Schéma du montage utilisé pour la technique du potentiel imposé en double micro-électrode. E1 : électrode 1 E2: électrode 2; Im: courant membranaire; Vmb: potentiel de membrane de la cellule ; FBA: Feed Back amplifier (amplificateur de clamp).

Les deux électrodes sont étirées à partir de tubes de verre borosilicaté contenant un filament (diamètre externe : 1,5 mm ; diamètre interne : 1,17 mm, Harvard Apparatus, Royaume-Uni) avec une étireuse (Narishige). Elles sont ensuite remplies d'une solution de chlorure de potassium (KCl) à 1 M et d'acétate de potassium (KAc) à 2 M puis elles sont chacune fixées à une tête d'amplificateur (Axon Instruments, Foster City, USA) reliée à un amplificateur (TEV-200, Dagan Corporation, Minneapolis, Minessota, USA). Les résistances mesurées pour chaque électrode sont comprises entre 1 et 2 M Ω .

Les courants ioniques membranaires vont être mesurés par une électrode de bain (Ag chloruré) reliée à la terre. Grâce à un convertisseur analogique numérique Digidata 1440 (Axon CNS Molecular Devices, Californie, USA), le logiciel pClamp 10.0 (Axon Instruments, Foster City, USA) permet de programmer les protocoles de stimulation, d'effectuer l'acquisition et l'analyse des courants mesurés.

H- Protocoles de stimulation

Dans le but de caractériser les canaux Na_v , plusieurs propriétés ont été étudiées : l'activation, l'inactivation rapide, l'inactivation lente et la récupération de l'état inactivé. Pour chaque propriété un protocole différent a été utilisé. Pour chaque protocole utilisé, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de holding de -100 mV.

H-1 Mesure de l'activation

Pour tester l'activation du canal Na_v , les ovocytes ont été stimulés par des chocs dépolarisants d'une durée de 20 ms pour des potentiels allant de -70 mV à + 40 mV avec des incréments de 10 mV. La durée entre chaque stimulation est de 8 s. Pour ce protocole, l'échantillonnage est réalisé à 100 kHz et filtré à 5 kHz.

H-2 Mesure de l'inactivation rapide

Pour tester l'inactivation rapide du canal Na_v , les ovocytes ont été stimulés par des chocs dépolarisants d'une durée de 200 ms pour des potentiels allant de -80 mV à +40 mV avec des incréments de 5 mV suivi d'un choc à -5 mV d'une durée de 12 ms. La durée entre chaque stimulation est de 10s. Pour ce protocole, l'échantillonnage est réalisé à 100 kHz et filtré à 5 kHz.

H-3 Mesure de l'inactivation lente

Pour tester l'inactivation lente du canal Na_v, les ovocytes ont été stimulés par des chocs dépolarisants d'une durée de 60 s pour des potentiels allant de -100 mV à +20 mV avec des incréments de 10 mV suivi d'un choc à -5 mV d'une durée de 12 ms. La durée entre chaque stimulation estde 10s. Pour ce protocole, l'échantillonnage est réalisé à 10 kHz et filtré à 5 kHz.

H-4 Mesure de la récupération de l'état inactivé

Pour tester la récupération de l'état inactivé du canal Na_v , les courants Na^+ ont été générés avec un protocole présentant deux chocs successifs. L'ovocyte a été stimulé par un premier choc à -5 mV pendant 50 ms suivi d'un second choc à -5 mV pendant 14,5 ms. La durée entre les deux chocs augmentait d'1 ms après chaque doublet de chocs. La durée entre chaque stimulation est de 10s. Pour ce protocole, l'échantillonnage est réalisé à 100 kHz et filtré à 5 kHz.

I- Applications des molécules pharmacologiques

I-1 Application du DCJW

Une solution stock de DCJW a été préparée dans du Diméthyl sulfoxide (DMSO) à une concentration de 10^{-2} M. Cette solution a ensuite été aliquotée et conservée à -20° C. La solution de DCJW utilisée pour tester l'effet de cette molécule est préparée extemporanément à partir de la solution stock et diluée dans du SOS normal. La concentration en DMSO ne doit pas dépasser 0,1% au contact de l'ovocyte. Pour les tests pharmacologiques, le DCJW a été perfusé dans la cuve contenant l'ovocyte à tester, à une concentration de 2.10⁻⁶ M.

Les ovocytes ont été stimulés par des chocs dépolarisant à -5 mV d'une durée de 20 ms toutes les minutes pendant 45 minutes, temps au bout duquel l'inhibition est stable.

I-2 Application de la lidocaïne

La solution stock de lidocaïne à une concentration de 2 M a été initialement préparée dans du DMSO. Elle a été aliquotée et conservée à -20° C. Une solution à 2.10^{-3} M a été préparée à partir de la solution stock et diluée dans du SOS normal. Pour les tests pharmacologiques, la lidocaïne est perfusée dans la cuve contenant l'ovocyte à tester, à une concentration de 2 mM.

Les ovocytes sont stimulés par un choc dépolarisant à -5 mV d'une durée de 20 ms au bout de 10 minutes d'incubation.

J- Analyse des données

J-1 Courbes courants/potentiels (I/V)

Pour chaque ovocyte, les valeurs de courants mesurées pour des potentiels allant de -70 mV à 40 mV ont été normalisées par rapport à l'amplitude maximale du courant (Imax). Elles ont ensuite été moyennées pour chaque valeur de potentiel. Les courbes I/V ont été ajustées avec l'équation de Stühmer :

$$I = G * \left(1 - \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{1/2}}{K}\right)} \right) * \left(V - Vr\right)$$

où G représente la conductance, $V_{1/2}$ le potentiel pour lequel la moitié des canaux sont ouverts, K le facteur relatif au nombre de canaux ouverts pendant la stimulation et V_r le potentiel d'inversion.

J-2 Courbes d'activation

La conductance des canaux Na_v pour des potentiels allant de -70 mV à 40 mV a été calculée à partir de la formule suivante :

$$G = \frac{I}{\left(V - Vr\right)}$$

Puis les valeurs de conductance ont été normalisées par rapport à la valeur de conductance maximale pour chaque ovocyte. Les valeurs de conductance ont ensuite été moyennées pour chaque potentiel testé.

Les courbes d'activation qui représentent la conductance en fonction du potentiel ont été ajustées avec l'équation de Boltzmann :

$$G = \frac{1}{1 * \left(1 + \exp\left(\frac{V_{1/2} - V}{k}\right)\right)}$$

J-3 Courbes d'inactivation

L'analyse des données a été réalisée de la même façon pour l'inactivation rapide et pour l'inactivation lente. Les amplitudes de courants obtenus au niveau du deuxième pic ont été normalisées par rapport à l'amplitude maximale. Puis, les valeurs d'intensité obtenues ont été moyennées pour chaque potentiel.

Les courbes d'inactivation ont été ajustées avec l'équation de Boltzmann :

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\exp\left(V - V_{1/2}\right)}{k}\right)}$$

J-4 Courbes de récupération de l'état inactivé

Les amplitudes du courant mesurées au deuxième pic ont été normalisées par rapport à l'amplitude du premier pic d'un même doublon. Les valeurs de courants obtenues ont ensuite été moyennées par rapport au temps entre les deux pics pour chaque ovocyte.

Les courbes de récupération de l'état inactivé ont été ajustées avec l'équation suivante :

$$I = I_o + (I_{\max} - I_0) * (1 - \exp(k * (t - t_0)))$$

J-5 Inhibition du courant Na⁺

Pour mesurer l'inhibition du courant Na⁺ induite par la lidocaïne ou le DCJW, les courants enregistrés au bout de 10 min et 30 min d'incubation, respectivement, ont été normalisés par rapport au contrôle.

Les valeurs d'inhibition ont ensuite été moyennées pour chaque ovocyte.

J-6 Cinétiques de ¹/₂ activation et de ¹/₂ d'inactivation

Les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Na^+ ont été déterminées comme indiqué dans Lapied et coll. (1990). Le temps de demi-activation ($t_{1/2}$ activation) correspond au temps nécessaire pour que le courant Na^+ aille de la moitié de son amplitude maximale ($I_{50\%}$) jusqu'à sa valeur maximale (I_{max}) (**Figure 34**).



Figure 34. Détermination des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺. I_{max} : amplitude maximale du courant Na⁺. $I_{50\%}$: 50% de l'amplitude du courant.

Le temps de demi-inactivation ($t_{1/2}$ inactivation) correspond au temps nécessaire pour que le courant Na⁺ aille de son amplitude maximale (I_{max}) à 50 % de son I_{max} (**Figure 34**). Les cinétiques d'activation et d'inactivation ont été mesurées à partir des courants Na⁺ obtenus avec le protocole d'activation, pour des potentiels allant de -30 à +40 mV.

K- Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism4 (GraphPad Software, Inc). Dans chaque cas, il a été nécessaire d'effectuer un grand nombre d'enregistrements sur des ovocytes différents pour minimiser l'impact d'une part de la variabilité biologique et d'autre part des imprécisions expérimentales.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons statistiques pour les différentes mesures sont réalisées grâce à plusieurs tests statistiques :

- Le test de Student lorsque deux résultats sont comparés entre eux
- L'ANOVA suivi d'un test post hoc de Tukey lorsque plus de deux résultats sont comparés entre eux, et deux à deux.

Les différences sont considérées comme étant significatives quand p < 0.05 (*), p < 0.01 (**) et p < 0.001 (***).

CHAPITRE 4 : TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE

A- Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Les microscopes optiques conventionnels sont limités par l'émission de la fluorescence des structures situées en dehors du plan focal ce qui dégrade l'image (Erie et coll., 2009). La technique d'imagerie confocale a été décrite pour la première fois par Minsky en 1957. Le principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan en éliminant les signaux provenant de régions situés en dehors du plan focal. Elle permet d'obtenir des images de grande résolution à différents niveaux de l'épaisseur d'un échantillon, ce qui donne accès à des informations situées à l'intérieur de l'échantillon.



Figure 35. Schéma illustrant le fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser (modifié d'après Paddock, 2009).

Un rayon laser excitateur (source de lumière) va pénétrer dans l'échantillon qui a été auparavant marqué par un ou plusieurs fluorochromes (**Figure 35**). Des rayons lumineux vont donc être émis par les différents plans de la préparation et être transmis vers le photodétecteur grâce à un miroir dichroïque. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs. Grâce à un diaphragme en trou d'épingle, il est possible de sélectionner uniquement les rayons émis par le plan focal. Seuls les rayons issus du plan focal sélectionné peuvent arriver dans le détecteur. Les rayons issus des régions situées au-dessus ou en-dessous du plan focal ne passe par la diaphragme et ne sont donc pas représenté sur l'image obtenue grâce à la conversion du signal lumineux en signal numérique (Erie et coll., 2009 ; Paddock, 2000 ; Tovey et coll., 2005).

B- Les anticorps

B-1 Les anticorps primaires

L'anticorps (Ac) primaire utilisé pour marquer la sous-unité DmNa_v1.1 est l'anticorps anti-SP19 (Alomone Labs, Jérusalem, Israël) obtenu à partir de lapin immunisés avec le peptide SP19 (French et coll., 1993). Ce peptide correspond aux résidus 1501 à 1518 situés dans le linker 3 du canal Na_v de type I chez le rat. Cet anticorps reconnaît le canal Na_v au niveau de plusieurs tissus de vertébrés et d'invertébrés tels que le cerveau, le muscle squelettique et le cœur chez le rat, le cerveau chez l'anguille et le système nerveux central chez le criquet, la blatte, la sauterelle, la mouche et le papillon de nuit (Amat et coll., 1998).

L'anticorps utilisé pour identifier les sous-unités auxiliaires est l'anticorps RGS-His (Quiagen, Valencia, Californie, USA) qui est obtenu chez la souris. Cet anticorps reconnaît le tag histidine RGSHHHH qui a été inséré à l'extrémité N-terminale de chaque sous-unité auxiliaire.

B-2 Les anticorps secondaires

Les anticorps secondaires utilisés sont des immunoglobulines G de chèvre conjuguées à un Alexa Fluor® (InvitrogenTM). L'anticorps secondaire qui permet l'identification de la sous-unité principale DmNa_v1-1 est anti-lapin et est couplé à l'Alexa Fluor® 488. Celui qui permet l'identification de la sous-unité auxiliaire PaTEH1A ou PaTEH1B est anti-souris et est couplé à l'Alexa Fluor® 546.

C-Immunomarquage des ovocytes de xénope exprimant les canaux Na_v

C-1 Conditions à tester

Tout d'abord, il est indispensable de réaliser un certain nombre de contrôles pour vérifier que la fluorescence observée est bien spécifique des deux sous-unités. Les différents contrôles effectués sont les suivants :

- Ovocytes injectés en absence d'anticorps pour identifier l'auto-fluorescence des sousunités dans la membrane des ovocytes. Ce contrôle a été fait pour les ovocytes injectés avec de l'eau, avec DmNa_v1-1/PaTEH1A et DmNa_v1-1/PaTEH1B.
- Ovocytes injectés avec de l'eau en présence des anticorps primaires et secondaires pour vérifier que le signal observé est bien spécifique des sous-unités du canal Na_v.
- Ovocytes injectés avec DmNav1-1 et PaTEH1A en présence de l'un ou l'autre des anticorps primaires (anti-SP19 ou anti-RGS) pour mesurer l'auto-fluorescence des anticorps primaires
- Ovocytes injectés avec DmNa_v1-1 et PaTEH1A en présence de l'un ou l'autre des anticorps secondaires (immunoglobulines G de chèvre anti-lapin conjugués à l'Alexa Fluor® 546 ou immunoglobulines G de chèvre anti-souris conjugués à l'Alexa Fluor® 488) pour vérifier leurs spécificités.
- Ovocytes injectés avec DmNav1-1 et PaTEH1A en croisant les anticorps primaires et secondaires pour vérifier leurs spécificités.

C-2 Protocole de marquage des ovocytes

Une centaine d'ovocytes albinos a été injectée avec environ 3 ng d'ARN de $DmNa_v1$ -1 et de l'une ou l'autre des sous-unités auxiliaires, à savoir PaTEH1A ou PaTEH1B présentant un tag histidine (RGSHHHH).

Cinq jours après injection et après vérification de l'expression de canaux Na_v par la technique de la double micro électrode, les ovocytes ont été rincés dans une solution de PB à 0,09 M. Puis, ils ont été fixés pendant 30 min à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 2%, préparée dans du PB à 0,09 M. Les ovocytes ont ensuite été rincés par 3 lavages de 5 min chacun dans du PB 0,09 M suivi de 3 lavages de 5 min chacun dans du PBS 1X. Les ovocytes ont ensuite été perméabilisés dans du PBS-Triton 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25% pendant 1h (3 incubations de 20 minutes chacune). Le Triton va permettre la

Matériels et Méthodes. Chapitre 4

perméabilisation de la membrane pour faciliter l'entrée des anticorps dans l'ovocyte. La gélatine de poisson permet d'éviter une fixation non-spécifique des anticorps primaires en se fixant sur les sites non spécifiques. Les ovocytes ont alors été incubés avec les anticorps primaires toute la nuit à 4°C :

- Ac anti SP19 dilué au 1/100^{ème} dans du PBS-T 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25%

- Ac anti RGS-His dilué au $1/500^{em}$ dans du PBS-T 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25%

Après incubation avec les anticorps primaires les ovocytes ont été rincés par 3 lavages de 5 min chacun dans du PBS-T 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25%. Ils ont ensuite été incubés avec les anticorps secondaires pendant 1h30 min à température ambiante :

 Immunoglobulines G de chèvre anti-lapin conjugués à l'Alexa Fluor® 546 (Invitrogen) dilué au 1/3000^{ème} dans du PBS-T 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25%

Immunoglobulines G de chèvre anti-souris conjuguées à l'Alexa Fluor®
488 (Invitrogen) dilué au 1/3000^{ème} dans du PBS-T 0,2% additionné de gélatine de poisson à 0,25%

Après incubation les ovocytes ont été rincés par 3 lavages de 5 min chacun dans du PBS 1X et recouverts d'une solution de PBS/glycérol 20% filtrée.

Le microscope confocal à balayage laser utilisé est un Nikon A1S1 (Nikon Instruments, Melville, NY) équipé d'un laser argon à 488 nm et d'une diode à 561 nm. Les ovocytes ont été observés grâce à l'objectif 10x avec une ouverture numérique de 0,3 mm. L'Alexa® 488 a été excité à 488 nm et la fluorescence émise a été collectée en utilisant un filtre allant de 500 à 550 nm tandis que l'Alexa® 546 a été excité à 561 nm et la fluorescence émise a été récupérée grâce à un filtre allant de 570 à 600 nm.

Les images obtenues ont ensuite été analysées avec le logiciel Image J (version 1.4.3.67).

CHAPITRE 5 : ETUDE DES RELATIONS PHYLOGENETIQUES DES SOUS-UNITES AUXILIAIRES DU CANAL $\rm NA_V$

L'alignement multiple des séquences homologues aux gènes DmTipE, DmTEH1, DmTEH2, DmTEH3 et DmTEH4 a été réalisé selon la méthode ClustalW (Thompson et coll., 1994). Les numéros d'accession des séquences nucléiques utilisées pour la réalisation de l'arbre phylogénétique sont répertoriés dans le **tableau 20**. L'arbre a été enraciné avec les sous-unités β du canal BKCa : hslo β 1 (numero d'accession Genbank : NM_004137.3), hslo β 2 (NM_005832.3), hslo β 3 (NM_171828.1), hslo β 4 (NM_014505.5).

Par la suite, les paramètres du modèle de substitutions nucléotidiques le plus parcimonieux ont été recherchés à partir de la méthode statistique AIC implémentée au logiciel MODELTEST v.3.7 (Posada et coll., 1998). L'arbre phylogénétique a alors été élaboré en prenant en compte les paramètres du modèle sélectionné et selon une recherche de maximum de vraisemblance à partir du logiciel MEGA5.0 (Tamura et coll., 2011). La robustesse des nœuds a été évaluée selon une analyse de « bootstrap » basée sur 1000 réplications. L'arbre est visualisé avec le logiciel MEGA5.0.

Nom des espèces	Préfixe	TipE	TEH1	TEH2	TEH3	TEH4
Acyrthosiphon pisum	Ар	XM_003247842	XM_001944580	-	XM_003247843	XM_003247846
Aedes aegypti	Aa	XM_001654675	-	XM_001654677	XM_001654676	-
Anopheles gambiae	Ag	XM_563317	XM_310354	XM_312094	XM_312093	-
Apis florea	Af	XM_003697956	XM_003689858	XM_003697957	XM_003697954 (A) XM_003697955 (B)	XM_003697996
Apis mellifera	Am	-	XM_001120804	-	XM_003251583	XM_003251582
Bombus impatiens	Bi	XM_003492148	XM_003487611	XM_003492150	XM_003492149	XM_003492151
Bombus terrestris	Bt	XM_003393369	XM_003393464	XM_003393371	XM_003393372	XM_003393368
Culex quinquefasciatus pipiens	Cq	XM_001845887	XM_001847934	XM_001845889	XM_001845888	-
Drosophila melanogaster	Dm	NM_079196	NM_141702 (A) NM_001275513 (B)	NM_139610	NM_144078	NM_139609
Musca domestica	Md	AF131734	-	-	-	-
Nasonia vitripennis	Nv	XM_003425721	XM_003425719 (A) XM_003425720 (B)	XM_001606821	-	XM_001606830
Periplaneta americana	Ра	KC992733	KC206367 (A) KC206368 (B)	-	-	-
Pediculus humanus corporis	Phum	XM_002430448	XM_002430447	XM_002430450	XM_002430449	XM_002430451
Tribolium castaneum	Tc	XM_964916	XM_964728	XM_964775	XM_964845	XM_964710

Tableau 20 : Numéro d'accession des séquences nucléotidiques des sous-unités utilisées pour l'étude phylogénétique.

Matériels et Méthodes. Chapitre 5

Résultats et Discussion

Très peu d'informations sont actuellement disponibles sur les sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte. Les seules études réalisées portent sur celles de la drosophile et sur la sous-unité TipE de *M. domestica* (Feng et coll., 1995b ; Lee et coll., 2000 ; Derst et coll., 2006). Par ailleurs, les conséquences de la présence de ces différentes sous-unités sur les propriétés pharmacologiques du canal Na_v sont actuellement peu connues. Pour compléter les connaissances actuelles, nous avons entrepris la caractérisation des sous-unités auxiliaires chez la blatte *P. americana*.

- Le premier chapitre porte sur une sous-unité particulière, TEH1, qui chez la drosophile a été mise en évidence uniquement dans le système nerveux. La première partie de ce chapitre, relate la découverte de deux variants de la sous-unité PaTEH1 résultant d'une rétention d'intron. La caractérisation fonctionnelle et pharmacologique des deux variants est expliquée. Enfin, des expériences en microscopie confocale ont été réalisées sur les ovocytes de xénope injectés avec les ARN des sous-unités principales et auxiliaires.
- Le deuxième chapitre est consacré à la découverte de 7 nouvelles sous-unités auxiliaires du canal Nav chez *P. americana* (PaTipE, PaTEH2 et PaTEH3). La première partie de ce chapitre traite de la caractérisation de l'homologue de la protéine DmTipE (PaTipE), qui est la première sous-unité mise en évidence chez la drosophile. Nous mettons en évidence, pour la première fois, une diversité moléculaire générée par des mécanismes post-transcriptionnels pour ces différentes sous-unité S. Dans la seconde partie, la caractérisation de quatre variants de la sous-unité PaTEH2 est décrite. Enfin, la troisième partie de ce chapitre traite du clonage de la sous-unité PaTEH3. La quatrième partie concerne le clonage de la sous-unité PaTEH4.
- Le troisième chapitre est consacré à l'étude des relations phylogénétiques entre les sous-unités auxiliaires du canal Na_v.

Résultats et Discussion. Chapitre 1

CHAPITRE 1 : LA SOUS-UNITE TEH1 DE P. AMERICANA : PaTEH1

Notre choix s'est en priorité porté sur la sous-unité homologue à DmTEH1 d'une part à cause de son expression exclusivement observée dans le SNC chez la drosophile et d'autre part en raison de son effet modulateur particulièrement important sur la sous-unité DmNa_v, dans l'ovocyte de xénope (Derst et coll., 2006). Les résultats concernant la caractérisation moléculaire, électrophysiologique et pharmacologique de la sous-unité PaTEH1 chez *P. americana* ont fait l'objet d'une publication dans le journal PlosOne (voir Annexe).

A- Clonage de la sous-unité PaTEH1 et analyse de sa structure

Le clonage des variants de la sous-unité homologue à DmTEH1 chez *P. americana* a été réalisé par Bénédicte Moignot au cours de sa thèse. Ces résultats de clonage sont rappelés ici.

A-1 Identification de deux transcrits : PaTEH1A et PaTEH1B

En utilisant une stratégie de clonage par homologie (voir Matériels et Méthodes), deux populations d'ADNc correspondant à la sous-unité TEH1 ont été identifiées, clonées et séquencées chez *P. americana*. Ces deux populations d'ADNc ont été nommées PaTEH1A (1721 pb avec un cadre ouvert de lecture de 843 pb codant une protéine de 280 acides aminés) et PaTEH1B (1815 pb avec un cadre ouvert de lecture de 840 pb codant une protéine de 279 acides aminés) (**Figure 36**). L'interrogation de type Blast dans la banque de données GenBank à partir des séquences protéiques a indiqué que les deux protéines PaTEH1A et PaTEH1B sont homologues à DmTEH1 (47% d'identité de séquence partagée). La région 3' non codante de ces transcrits est dépourvue de site de polyadénylation (aataaa), ce qui avait également été observé pour le transcrit de la sous-unité α du canal Na_v chez *P. americana*, PaNa_v1 (Moignot et coll., 2009). En revanche, une queue poly(A) de 34 pb a été identifiée à l'extrémité 3' non-codante des ADNc séquencés.

d'après Moignot, 2010).



Les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B présentent la même séquence nucléotidique jusqu'au nucléotide 806. La région C-terminale de PaTEH1B est codée par une partie de la région identifiée en rouge alors que celle de PaTEH1A est codée par la région identifiée en bleu. Les régions non codantes communes aux deux variants sont en minuscules noires. Les sites de N-glycosylation sont représentés par des triangles verts inversés (▼) et le site de phosphorylation par un rond orange (●) (modifié

L'analyse des deux variants révèle que l'extrémité 3' du variant PaTEH1B présente une insertion d'une séquence de 94 pb (cadre rouge, **Figure 36**). Celle-ci contient un codon STOP (TAG) conduisant à une extrémité C-terminale de la protéine PaTEH1B différente de celle de PaTEH1A (**Figure 36**). L'analyse des séquences protéiques de PATEH1A et PaTEH1B montre que les deux protéines se différencient uniquement au niveau des 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale. Deux hypothèses avaient été émises quant à l'origine de ces deux variants (Moignot, 2009). La première est la rétention d'intron et la seconde la duplication de gène. Les PCR réalisées avec des amorces encadrant la séquence de 94 pb n'avaient pas donné de résultat suggérant la présence d'un intron de grande taille (Moignot, 2009).

A-2 Conservation de la structure de la sous-unité

L'analyse des profils d'hydrophobie des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B montre que les deux variants présentent deux régions très hydrophobes correspondant aux segments transmembranaires TM1 et TM2 (**Figure 37**). Les deux segments sont reliés par une boucle hydrophile. Cette prédiction correspond aux observations faites précédemment sur la topologie des sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte (Feng et coll., 1995a ; Derst et coll., 2006).



Figure 37. Profils d'hydrophobie des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B. Cette analyse a été réalisée en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982). Les deux variants diffèrent au niveau des 11 derniers acides aminés de leur extrémité C-terminale. Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont indiqués. Ils correspondent aux régions pour lesquelles l'hydrophobie est la plus élevée.

L'alignement multiple des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B avec les sous-unités de type TEH1 chez d'autres espèces d'insectes montrent les régions conservées des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte (**Figure 38**). De plus, il permet de déduire que PaTEH1A et PaTEH1B partagent le maximum d'identité de séquence protéique avec la sous-unité PhumTEH1 (62,6 et 62,8%) et le minimum d'identité de séquence protéique avec les sous-unités sous-unités DmTEH1 et NvTEH1 (45,9 à 46,8%) (**Tableau 21**).

Sous unité auviliaira	N-	M1	Boucle extracellulaire	M2	C-terminale		Total	
	terminale				PaTEH1A	PaTEH1B	PaTEH1A	PaTEH1B
DmTEH1	56,8	64,2	48,7	64,2	14,5	14,5	46,3	46,8
AgTEH1	65,9	67,8	49,3	71,4	16,6	16,6	49,6	50,1
CqTEH1A	61,3	64,2	49,3	64,2	20,0	20,5	51,0	51,2
CqTEH1B	61,3	64,2	49,3	64,2	14,5	16,6	48,0	48,0
PhumTEH1	82,5	82,1	59,0	71,4	29,0	30,0	62,6	62,8
TCTEH1	59,0	67,8	55,8	85,7	13,6	11,3	53,6	53,6
NvTEH1.1	46,1	64,2	50,0	71,4	11,1	12,9	45,9	46,2
NvTEH1.2	46,1	64,2	50,0	71,4	9,8	9,8	46,3	46,8
AmTEH1	35,6	64,2	55,1	82,1	11,7	12,1	49,3	49,5
ApTEH1	47,6	71,4	49,3	67,8	2,7	2,7	46,7	47,2

Tableau 21 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B et leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes.

Les numéros d'accession des sous-unités sont répertoriés dans le tableau 6.

Premièrement, toutes les sous-unités TEH1 présentent une extrémité N-terminale assez courte (une quarantaine d'acides aminés) à l'exception de la sous-unité AmTEH1 (**Figure 38**). Les homologies de séquence entre les régions N-terminales de la sous-unité PaTEH1 et celles des sous-unités homologues à DmTEH1 sont supérieures ou proches de 50% indiquant que cette région a subit une pression peu élevée de conservation (**Tableau 21**). La taille de cette région est relativement conservée sauf chez l'abeille, ce qui impacte son homologie avec les autres séquences de notre étude (**Tableau 21**). De plus, chez toutes les espèces, l'extrémité N-terminale comprend de nombreux résidus d'acides aminés chargés positivement (lysine (K), arginine (R) et histidine (H)). Selon les espèces, le nombre de charges varient de 11 à 15 avec un maximum de 21 charges pour l'extrémité N-terminale chez *A. mellifera* (AmTEH1). Les lysines et les arginines représentent jusqu'à 28% de l'extrémité N-terminale de PaTEH1A et PaTEH1B. (**Figure 38**). Chez les sous-unités auxiliaires d'un canal potassique (K_{ir}), les groupes de charges positives portées par la lysine, l'arginine ou l'histidine fonctionneraient comme des signaux d'exportation du réticulum endoplasmique, et il a été suggéré qu'ils ont le

même rôle chez les sous-unités auxiliaires du canal Na_v (Maurer-Stroh et coll., 2004 ; Derst et coll., 2006).

Deuxièmement, les segments transmembranaires M1 et M2 des sous-unités PaTEH1 partagent entre 64,2 à 82,1% d'homologie de séquence pour le segment M1 et 64,2 à 85,7% pour le segment M2 (**Tableau 21**). Ceci indique que les segments transmembranaires sont relativement bien conservés entre les espèces d'insectes.

Troisièmement, la boucle extracellulaire de PaTEH1A (et PaTEH1B) représente plus de 50% de la taille de la protéine. Elle est caractérisée par huit $\frac{1}{2}$ cystines conservées chez les autres sous-unités de type TEH1 (**Figure 38**). Quatre $\frac{1}{2}$ cystines (encadrées en jaune sur la **Figure 38**) sont connues pour former des ponts disulfures au niveau de la sous-unité auxiliaire β du canal BKCa (Derst et coll., 2006). Par conséquent, la structure tertiaire des sous-unités de type TEH1 est déterminée par quatre ponts disulfures au maximum. Les sites de N-glycosylation intégrant les asparagines localisées en position 98 et 205 de la sous-unité PaTEH1A sont conservés chez les autres sous-unités, indiquant un rôle fonctionnel majeur (**Figure 38**). Au contraire, les sites d'O-glycosylation sont uniques à PaTEH1A (**Figure 36**).

Quatrièmement, les extrémités C-terminales des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B partagent très peu d'homologie de séquence avec celles des sous-unités homologues à DmTEH1 (2,7 à 30%).

	M1	
PaTEH1A	MRSSSSELLLDOOPERTCREEIWFYT	44
PaTEH1B	MRSSSSELLLDOOPKKKPFKTCREFIWFYT	44
DmTEH1	MRSGSSELLLEOOKNGNRFRSWREARFYG	47
AgTEH1	MRSDSSELLLEOOAEELRKKKLLELAAAKKAKNGPPFKRSLRENASFYT	49
CoTEH1A	MRSDSSELLLEOOELARKKKLLELAAAKKAKSGPAPKRTLRENASFYT	49
CoTEH1B	MRSDSSELLLEOOEELARKKKLLELAAAKKAKSGPAPKRTLRENASFYT	49
PhumTEH1	MRSSSSELLIDOOPKKKKAPKRTCROFIWFYT	45
TCTEH1	MRSSSSELLLDQQRSCREQALFYS	47
NVTEH1.1	MHAGSSELLLDAKCRQLLRDPRRTCKQFLTFYA	57
NvTEH1.2	MHAGSSELLLDAKCRQLLRDPPRRTCKQELTFYA	57
AmTEH1	mrgssellleascvqcqsdhhadqhtgtrhhqqhqvnekhdfqeqelrrkllelgfgasrrpprrtcrqffnfya	78
ApTEH1	<u>QQQlrkkkllelaa</u> akk <u>o</u> krgvprtl <mark>rekvwfys</mark>	41
	M1 * * * * *	
PaTEH1A	TSFLAMTAVGGGSSLLFLVPLYVDPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYVMYTT	124
PaTEH1B	TSFLAMTAVGGGSSLLFLVPLYVDPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYVMYTT	124
DmTEH1	TSTLAFFSVTAGASLLFLVPLYVDPAISTLSHDFIEKPTLCTTTRREDLVGIFNCSWSSCREGCTSDLYRCVHIYVTFIE	127
AGTEHI	TSGLAFISVTAGASLIFLVPIAVDPAISTLVGDFVERPTMCVTTRREDMTGIFNCSWSSCREGCTSVVFKCTHIVVTFID	129
CqTEHIA Commula	TSSLAFISVTAGASILFLVPIVVPAISTLVGDFVERPTECVTFKREDMTGIFFCSWSSCREGCTSDVFKCTHIVVFFID	129
CQIERIE Dhummeul		129
FIGHTERI TOTEH1	IS IVALIAN SACSSIDE LVEN VUPALISTINADE VETEVICE UTTRACTIGATION INSCREDE CONSCREDE CONSTRUCTION OF THE VICTOR OF TH	124
NVTEH1 1	TSSLATVATSGCALLFLVPLVVDPATSTLSADFFPEVTCTTSKREDIWGLFPCSWSSCREGCTSEVVFCTHTVVTT	136
NVTEH1.2	TSSLALVATSGCALLFLVPLYVPATSTLSADFFPEPVICTTSKREDLWGLFNCSWSSCREGCTSEVYHCTHIYVTYT-	136
AmTEH1	TSALAFVATSGGAALLFLVPLYVDPAISTLAADFSPDPVICTTSRREELAGLFNCTWSSCREGCTSDVYRCFHIYVTY-	157
ApTEH1	TLSFAMIAVGSGSALLFLVPLYVDPAVSTLLADFVPEPVCCTTVRREQLAGLYNCTWSSCREGCTSDVYNCSHIYVAYR-	120
-	* * *	
PaTEH1A	APYYTDDGDGNWTSTSTSPSTSTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPEVDCDNFTTMYCKVNAEFPCY	200
PaTEH1B	APYYTDDGDGNWTSTSTSPSTSTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPEVDCDNFTTMYGKVNAEF <mark>PC</mark> Y	200
DmTEH1	QNITIPENMTDYSNF-TSDMEQSGEATLLVNIKGCGYPPSVTCKNFNGYYGIEGAIFECF	186
AgTEH1	DLNFTFPFNATPAELFNLTDIERSEEAILLVNIKGCGYPPAVKCKNFTDLYGFEGAVFPCY	190
CqTEH1A	DLNFTFPFNATPSELFNLTDIERSDEAILLVNIKGCGYPPTVTCKNFTDMYGFEGAVFPCY	190
CqTEH1B	DLNFTFPFNATPSELFNLTDIERSDEAILLVNIKGCGYPPTVTCKNFTDMYGFEGAVFPCY	190
PhumTEH1	NYTTLMTSNNNRFDDVSPSQTMNGSDEAVLLVNIKGCGYPPEVNCGQFTATYGIEGTEFPCH	186
TCTEH1	SEAHNQTDDAVLLVNIKGCGYPPTVLCVNFTEAYGNEGTVFPCY	171
NVTEH1.1	PWSNSSLNATEDELDAVPSIGTTREEEPEIVEAVLLVNIKGCGYPPVVDCENFTRELGYEGSRFPCY	203
NVTEH1.2	PWSNSSLNATEDELDAVPSIGTTREEPEIVEAVLLVNIKGCGYPPVVDCENFTREIGYEGSRFPCU	203
AmTEH1		105
APTERI		100
DatEH12	VSBENDEUUT, THYDREEHVATT THYPAUDETUTT, ATSUUT, CUMYCDCBCCSEDDBBBRABBC	270
PaTEH1B	VSRENRTVVLIHYDREEHVAITIHYFAVPFIVTLATSVVLCVMYCDCRCGSERNRRRBARCAVEDARY	270
DmTEH1	YSRKNKTVVLTSYNHDDOVAMIIHFFAVPFVITVISSIALCIMHCDCRCKKDRSHRNRPOCRRPRIENLSD	258
AgTEH1	YSKONKTVVMTAYNREDOVNTIIHFFVVPFIVTVVSSVFLCIMHCDCRCKKERRRHRHRRPRIENLSD	260
CqTEH1A	YSKLNKTVVMTAYNREDQVQTIVHFFVIPFIVTVISSVLLCIMHCDCRCKKERRR-RHRRRPRIENLRG	259
CqTEH1B	YSKLNKTVVMTAYNREDQVQTIVHFFVIPFIVTVISSVLLCIMHCDCRCKKERRR-RHRHRRPRIENLSK	259
PhumTEH1	SRENSTVVLTHYDRDEQVEIIINYFAVPFIVTIVSSVVLCIMHYDCQCSG-RQSRRRRPRFENAR*	252
TcTEH1	HSRENRTVVLTHYERDEQVALIIHYFAVPFVITLATSVALCVMHCDCRCHPTTHHKRARRPRIHDLSD	239
NvTEH1.1	YSRVNGSIVMADYDRDAELTIIMHYFAAPLVMTLATTAVLCVMHCDCRCOPPPRRYPPGSRRIPSKSTSGSRPNDLSE	281
NvTEH1.2	YSRVNGSIVMADYDRDAELTIIMHYFAAPLVMTLATTAVLCVMHCDCRCOPPPRRYPPGSRRIPSKSTSGSRPNDLRY	281
AmTEH1	YSRVNGSIVMANYNREAQVTTIIHFFAAPFVVTLATSVALCVMHCDCRCSPPPRHSSRGIRRGRGNDLR*	297
ApTEH1	YSRQNHTLAVVGYDKRQQYAD <mark>IVHYFAVPFAVCVVTSIVLCVMHCDCQQ</mark> AAAAAGQQALPETSRSSAGHSHTEGYRY	263
D-071113	31 - DOTEDDR#1 201	
Parenia Domeule		
DmTEH1	TSISTRVDMLTPAIEVYKPPL*- 280	
AGTEH1	SSISTRVDMLTPAIEVYKPPL*- 282	
CqTEH1A	ND* 262	
CqTEH1B	NINNNKSNYNNNKPPPPSSVVSALLN* 286	
- PhumTEH1	252	
TcTEH1	GSISIGVDLRHNTSYHSDLVAFRPT*- 265	
NvTEH1.1	HSISTRVERRGHPVHCECGEVMRPL*- 307	
NvTEH1.2	WWLCFYVGECRVKPGFRAVSQD* 304	
AmTEH1	297	
ApTEH1	YCRLDVM* 271	

Figure 38. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B, et des sous-unités DmTEH1, AgTEH1, CqTEH1A, CqTEH1B, PhumTEH1, TcTEH1, NvTEH1.1, NvTEH1.2, AmTEH1 et ApTEH1. L'alignement a été réalisé avec la méthode ClutalW implémentée dans le logiciel BioEdit. Les résidus d'acides aminés identiques sont surlignés en gris foncé et les résidus similaires sont surlignés en gris clair. Les domaines transmembranaires M1 et M2 sont encadrés en rouge. Les ½ cystines conservées entre les sous-unités TEH1 sont signalées par une étoile (*). Celles qui sont connues pour former des ponts disulfures chez la sous-unité β du canal BKCa sont encadrées en jaunes (Derst et coll., 2006). Les sites de N-glycosylation conservés entre les espèces sont signalés par des triangles inversés verts (\mathbf{V}) (modifié d'après Moignot, 2010).

A-3 Distribution tissulaire

Pour étudier la distribution tissulaire des variants PaTEH1A et PaTEH1B, le couple d'amorce utilisé permet l'amplification de la totalité du cadre de lecture des deux variants. L'amorce antisens cible la région encadrée en bleu dans la **Figure 36**. Ces amplifications révèlent que la sous-unité PaTEH1 est uniquement exprimée dans les tissus nerveux qui sont la tête, les ganglions thoraciques et la chaîne nerveuse (**Figure 39**). Dans la chaîne nerveuse et les ganglions thoraciques, le variant PaTEH1A est exprimé plus fortement que le variant PaTEH1B. A l'inverse, dans la tête, le variant PaTEH1B est plus fortement exprimé que le variant PaTEH1A. Dans les autres tissus (non nerveux), la sous-unité PaTEH1 n'est pas exprimée. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux obtenus pour la sous-unité TEH1 chez *D. melanogaster* suggérant une conservation de la distribution tissulaire de la sous-unité TEH1 entre les espèces (Derst et coll., 2006).



Figure 39. Distribution tissulaire des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B. A. Expression de la sous-unité PaTipE dans la tête, les ganglions thoraciques, la chaîne nerveuse, les muscles, les glandes reproductrices et l'intestin. Les produits PCR ont été séparés sur un gel d'agarose à 1% (pour PaTEH1) ou à 1,5% (actine). Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5 μ g) et de matrice d'ADNc (1 μ l d'une dilution au 1/10^{ème}) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine.
B- Mise en évidence de la rétention d'intron à l'origine du variant PaTEH1B

Les variants PaTEH1A et PaTEH1B ont une origine qui peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. Premièrement, ils peuvent résulter de l'épissage alternatif d'un même gène. La séquence de 94 pb s'insérant à l'extrémité 3' de la séquence nucléique peut être un exon épissé alternativement ou il peut s'agir d'un intron qui a été retenu lors de la maturation des ARNm. Deuxièmement, ces deux variants résultent de l'expression de deux gènes distincts. Le gène codant la sous-unité PaTEH1 aurait subi une duplication dans le génome de *P. americana*.

Pour vérifier notre première hypothèse, nous avons réalisé une amplification du gène PaTEH1 sur l'ADNg avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture. L'électrophorèse des produits d'amplification a révélé la présence de deux bandes à environ 900 et 1300 pb (**Figure 40A**). La bande observée à environ 900 pb semble être de la même taille que la bande supérieure obtenue suite à l'amplification réalisée sur l'ADNc (**Figure 40B**).



Figure 40. Electrophorèse des produits PCR obtenus en utilisant l'ADNg ou l'ADNc comme matrice. A. La PCR réalisée avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture sur l'ADNg conduit à l'amplification de deux amplicons d'environ 900 pb et 1300 pb. B. La PCR réalisée avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture sur l'ADNc conduit à l'amplification de deux amplicons d'environ 850 et 900 pb.

Le clonage et le séquençage des amplicons montrent que la séquence de 900 pb amplifiée à partir de l'ADN génomique est parfaitement identique à celle du variant PaTEH1B. En revanche, la séquence d'environ 1300 pb ne contient pas de séquence codante de PaTEH1, elle résulte donc d'une amplification non spécifique. Par rapport aux ADNc clonés coodant la sous-unité PaTEH1A, les amplicons de 900 pb contiennent une séquence supplémentaire de 94 pb. L'analyse de cette séquence montre que celle-ci présente toutes les caractéristiques d'un intron (Cartegni et coll., 2002). En effet, cette séquence de 94 pb est bornée par un site donneur d'épissage et un site accepteur d'épissage (**Figure 41A**). Le dinucléotide présent en 5' est conforme au site donneur consensus (GT) induisant l'épissage. En revanche, la séquence nucléotidique observée en 3' (ttttgtgctgtg) diffère légèrement du site accepteur consensus (yyyyyyynyag¹¹). En effet, ce site est dit faible de par la présence de trois purines (aux positions -3, -6 et -8) et par son dinucléotide terminal TG au lieu de AG (Bourinet et coll., 1999 ; Szafranski et coll., 2007). La protéine PaTEH1B est donc formée par l'exon 1 et une partie de l'intron (**Figure 41B**).



Figure 41. Origine des variants PaTEH1A et PaTEH1B.

A. Le gène codant la sous-unité PaTEH1 est constitué de deux exons (de 806 et 37 pb), et d'un intron de 94 pb dont la séquence est en lettres minuscules. Le site donneur d'épissage, le site accepteur d'épissage et le site de branchement sont soulignés. Le codon de terminaison (TAG) présent dans l'intron est en lettres majuscules. B. Séquences nucléiques et protéiques des régions C-terminales des deux protéines codées par le gène *Pateh1*. La protéine PaTEH1A est codée par les exons 1 et 2 alors que la protéine PaTEH1B est codée par l'exon 1 et une partie de l'intron.

¹¹ Y : pyrimidine (T ou C), N : nucléotide aléatoire (A, T, C ou G)

Pour évaluer notre deuxième hypothèse (deux gènes distincts), nous avons réalisé une hybridation par Southern blot. L'ADNg de la blatte *P. americana*, préalablement digéré par une enzyme de restriction (EcoRI ou KpnI), a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. La sonde utilisée pour s'hybrider sur le (ou les) gène(s) codant la sous-unité TEH1 a été choisie dans une région commune à PaTEH1A et PaTEH1B (voir Matériels et Méthodes, **Figure 30**). Premièrement, les signaux spécifiques observés sur les pistes 3 et 4 (**Figure 42**) nous indiquent que la sonde utilisée se fixe bien sur l'ADN de la sous-unité PaTEH1. Deuxièmement, un signal spécifique est observé sur la piste 1 alors que deux signaux sont observés sur la piste 2 (**Figure 42**). Ces résultats sont contradictoires. En effet, les résultats obtenus sur la piste 1 suggèrent qu'il n'y a qu'un seul gène qui code les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B. A contrario, les résultats observés sur la piste 2 suggèrent que deux gènes pourraient chacun coder un variant.



Figure 42. Résultats d'hybridation Southern à partir d'ADNg de *P. americana.* Les signaux spécifiques sont indiqués par des flèches noires. Piste 1 : ADNg digéré par l'endonucléase EcoRI ($10 \mu g$), piste 2 : ADNg digéré par l'endonucléase KpnI ($10 \mu g$), piste 3 : témoin positif (10 ng), piste 4 : témoin positif (10 pg); taille des ADN témoin : 4000 pb. En présence de l'enzyme de restriction EcoRI, un seul signal est observé. En présence de l'enzyme de restriction KpnI, deux signaux sont observés. Les pistes 3 et 4 permettent de contrôler la fixation de la sonde sur l'ADN cible (expériences réalisées par Benoit CALMES et Thomas GUILLEMETTE, Equipe Fungisem, IRHS).

Dans l'hypothèse où il y aurait deux gènes, il est possible que l'enzyme EcoRI ait libéré des fragments de même taille (environ 4500 pb), indissociables sur le gel d'agarose. Pour confirmer les résultats obtenus, il faudrait envisager de digérer l'ADNg avec d'autres endonucléases. Par ailleurs, les signaux observés sont relativement faibles, ce qui est probablement dû à une quantité d'ADNg trop faible. Pour confirmer ce résultat, il serait nécessaire de refaire une hybridation Southern en augmentant la quantité d'ADNg. Pour ces expériences nous avions digéré 10 μ g d'ADNg. A la vue des résultats obtenus, une quantité de 20 μ g serait plus adéquate.

C-Mise en évidence d'un troisième variant dans les neurones DUM, PaTEH1C

Afin d'étudier la distribution cellulaire de la sous-unité PaTEH1 nous avons réalisé une RT-PCR sur les cytoplasmes des neurones DUM. Pour identifier les variants de la sousunité PaTEH1 dans les neurones DUM, une PCR emboîtée a été réalisée. La première PCR a été réalisée avec des amorces ciblant les régions non-codantes de la sous-unité PaTEH1. La seconde PCR a été réalisée avec le couple d'amorce utilisé pour étudier la distribution tissulaire de la sous-unité PaTEH1. L'électrophorèse des amplicons montre une seule bande ce qui nous indique qu'un seul des deux variants est exprimé dans les neurones DUM (**Figure 43**). Les ADNc obtenus suite à cette RT-PCR ont été clonés dans le vecteur pGEM puis séquencés.



Figure 43. Distribution tissulaire du variant PaTEH1C. Expression de la sous-unité PaTEH1C dans les neurones DUM. Les produits PCR ont été séparés sur un gel d'agarose à 1% (pour PaTEH1C) ou à 1,5% (actine). Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5 μ g) et de matrice d'ADNc (1 μ l d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme en témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine.

Les 11 clones séquencés présentent tous exactement la même séquence, constituée de 840 pb. L'analyse de la séquence protéique déduite montre que ces clones possèdent la même extrémité C-terminale que la sous-unité PaTEH1A (**Figure 44**). Cependant, ils contiennent un acide aminé de moins, une thréonine, située dans la boucle extracellulaire de la sous-unité (**Figure 44**). Cette délétion se situe dans un ensemble de thréonines qui, d'après les prédictions, sont des sites d'O-glycosylation putatifs (**Figure 36**).

	TM1	
PaTEH1A	MRSSSSELLLDQQQELRKRKLLELAQPKKKPPKRTCRERIWFYTTSFLAMTAVGGGSSLL	60
PaTEH1B	MRSSSSELLLDQQQELRKRKLLELAQPKKKPPKRTCRERIWFYTTSFLAMTAVGGGSSLL	60
PaTEH1C	mrssssellldqqqelrkrkllelaqpkkkppkrtcreriwfyttsflamtavgggssll TM1	60
PaTEH1A	FLVPLYVDPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYV	120
PaTEH1B	FLVPLYVDPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYV	120
PaTEH1C	FLVPLYVDPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYV	120
PaTEH1A	MYTTAPYYTDDGDGNWTSTSTSPSTSTTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPE	180
PaTEH1B	MYTTAPYYTDDGDGNWTSTSTSPSTSTTTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPE	180
PaTEH1C	MYTTAPYYTDDGDGNWTSTSTSPSTS-TTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPE TM2	179
PaTEH1A	VDCDNFTTMYGKVNAEFPCYYSRENRTVVLIHYDREEHVAIIIHYFAVPFIVTLATSVVL	240
PaTEH1B	VDCDNFTTMYGKVNAEFPCYYSRENRTVVLIHYDREEHVAIIIHYFAVPFIVTLATSVVL	240
PaTEH1C	vdcdnfttmygkvnaefpcyysrenrtvvlihydreehvaiiihyfavpfivtlatsvvl TM2	239
PaTEH1A	CVMYCDCRCGSERDRRRRRRRRRCAVEDARVALLDCEEDRT* 281	
PaTEH1B	CVMYCDCRCGSERDRRRRRRRRRRARCAVEDAR YVPLSVHDTR*- 280	
PaTEH1C	CVMYCDCRCGSERDRRRRRRRRCAVEDARVALLDCEEDRT* 280	

Figure 44. Alignement des séquences déduites en acides aminés des variants PaTEH1A, PaTEH1B et PaTEH1C. Les tirets indiquent l'emplacement des « gaps » et les * représentent les codons STOP. Les segments transmembranaires TM1 et TM2 sont indiqués par des traits noirs. Le variant PaTEH1C possède la même extrémité C-terminale que le variant PaTEH1A (encadrée en bleu). Cependant la sous-unité PaTEH1C présente une délétion dans l'ensemble de neuf thréonines (T) situés dans la boucle extracellulaire de la protéine (encadrée en rouge).

D- Expression des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B dans l'ovocyte de xénope

D-1 Caractérisation fonctionnelle des sous-unités auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B

Dans le but d'étudier le rôle des sous-unités de la famille TEH1 sur le courant Na⁺, les variants PaTEH1A et PaTEH1B, ainsi que la sous-unité DmTEH1 ont chacun été exprimés avec une sous-unité principale, PaNa_v1 ou DmNa_v1-1, dans l'ovocyte de xénope. Les différents protocoles de stimulation utilisés nous ont permis d'une part de caractériser les courants Na⁺ enregistrés avec chaque sous-unité auxiliaire et d'autre part de montrer l'effet de la rétention d'intron sur les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v.

D-1-1 Effets des sous-unités auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B sur la densité du courant Na $^+$

Pour étudier l'effet des sous-unités auxiliaires sur le canal Na_v nous avons tout d'abord essayé d'exprimer la sous-unité PaNa_v1 clonée par Bénédicte Moignot au cours de sa thèse (Moignot et coll., 2009). Malgré plusieurs tentatives d'expression (voir Matériels et Méthodes, chapitre 3, paragraphe F), nous ne sommes jamais parvenus à obtenir un courant Na⁺ que se soit avec la sous-unité PaNa_v1 seule ou lorsque celle-ci était exprimée avec une sous-unité auxiliaire (**Figure 45A**). Pour contourner ce problème nous avons décidé d'exprimer les sous-unité principale d'une espèce d'insectes avec une sous-unité auxiliaire d'une autre espèce d'insecte ou d'arachnide a déjà été utilisée pour plusieurs études (Lee et coll., 2000 ; Tan et coll., 2002a ; Song et coll., 2004 ; Song et coll., 2006 ; Du et coll., 2009). La sous-unité DmTipE a été co-exprimée avec la sous-unité Vssc1 de *M. domestica* (Lee et coll., 2000), avec la sous-unité BgNa_v (Tan et coll., 2002a ; Song et coll., 2004, 2006) et avec la sous-unité principale VdNa_v1a de *V. destructor* (Du et coll., 2009). Ces études ont mis en évidence une conservation de la fonction des sous-unités auxiliaires.

Ainsi, la sous-unité DmNa_v1-1 a été exprimée seule ou avec les sous-unités auxiliaires DmTEH1, PaTEH1A et PaTEH1B, dans l'ovocyte de xénope. Après plusieurs essais nous sommes parvenus à enregistrer un courant Na⁺ d'une amplitude maximale de 0,3 μ A avec la sous-unité DmNa_v1-1 seule au bout de 10 jours d'incubation à 10°C (**Figure 45B**). Cette sous-unité s'exprimant difficilement seule, la qualité des courants obtenus a considérablement limité leur caractérisation. La co-expression de la sous-unité DmTEH1 avec DmNa_v1-1 augmente la densité de courant Na⁺ obtenue avec la sous-unité DmNa_v1-1 seule, comme observée précédemment (Derst et coll., 2006) (**Figure 45B**). La densité de courant Na⁺ observée en présence de la sous-unité DmTEH1 est 17,2 fois plus importante que celle mesurée avec DmNa_v1-1 seule (**Figure 46**). La combinaison DmNa_v1-1/DmTEH1 permet donc d'obtenir des courants Na⁺ mesurables dont les propriétés peuvent être caractérisées. L'équipe de Derst (2006) a observé une stimulation de l'amplitude du courant Na⁺ d'un facteur 30 en présence de DmTEH1, soit un effet deux fois plus important sur l'expression du canal Na_v. Même si les vecteurs d'expression sont très similaires, le type de variant utilisé ne correspond pas à DmNa_v1-1 et les quantités d'ARN qu'ils avaient injectées ne sont pas précisées, il est difficile de comparer nos résultats avec les leurs.

Α



Figure 45. Expression des sous-unités PaNa_v1 et DmNa_v1-1 avec ou sans sous-unité auxiliaire. Les familles de courant Na⁺ ont été mesurées à des potentiels allant de -70 mV à + 40 mV à partir d'un potentiel de holding de -100 mV. A. Aucun courant n'a pu être détecté après injection de PaNa_v1 seule (11 ng d'ARN, 6 jours d'incubation) ou avec DmTEH1 (13,5-50 ng d'ARN, 8 jours d'incubation), DmTipE (7.4 ng d'ARN, 11 jours d'incubation), PaTEH1A (7.4 ng d'ARN, 10 jours incubation) et PaTEH1B (5.5 ng d'ARN, 3 jours d'incubation). B. Courants Na⁺ obtenus après injection de DmNa_v1-1 seule (35 ng d'ARN, 10 jours d'incubation) ou avec DmTEH1 (8 ng d'ARN, 3 jours d'incubation), PaTEH1A (2 ng d'ARN, 3 jours incubation), PaTEH1B (3 ng d'ARN, 3 jours d'incubation) et PaTEH1 Δ (267-280). (2 ng d'ARN, 2 jours d'incubation).

Nous avons pu observer une augmentation de la densité du courant Na⁺, de 108,9 fois avec DmNa_v1-1/PaTEH1A (p < 0,01) et de 49 fois avec DmNa_v1-1/PaTEH1B (p > 0,05) par rapport à DmNa_v1-1 seule (**Figures 45A** et **46**). Les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B sont donc aussi capables d'augmenter l'expression ou de stimuler les courants Na⁺ produits par DmNa_v1-1, mais avec une plus forte intensité que DmTEH1. En conclusion, les sous-unités PaTEH1 et DmTEH1 partagent non seulement une forte identité de séquence (47%), mais également une propriété chaperone pour le canal Na_v.

Les variants PaTEH1A et PaTEH1B diffèrent uniquement au niveau de leur extrémité C-terminale. De plus, la densité de courant Na⁺ est 2,2 fois plus faible qu'avec le variant PaTEH1A. Ceci indique donc que la rétention d'intron conduisant au variant PaTEH1B, et qui ne change que les 11 derniers résidus de l'extrémité C-terminale, aurait un rôle régulateur sur le niveau d'expression des canaux Na_v dans le système nerveux.

Pour préciser le rôle de l'extrémité C-terminale nous avons construit deux mutants tronqués au niveau de l'extrémité C-terminale. Le premier mutant possède une extrémité C-terminale tronquée de 14 acides aminés (PaTEH1 Δ (267-280)). Le raccourcissement de l'extrémité C-terminale du second mutant est de 11 acides aminés (PaTEH1 Δ (270-280)) correspondant à la portion de séquence qui différencie PaTEH1A et PaTEH1B. La co-expression, dans l'ovocyte de xénope, de la sous-unité DmNav1-1 avec de l'un ou l'autre des deux variants tronqués montre une densité de courant Na⁺ similaire à celle observée avec le variant PaTEH1A. De plus, la densité de courant Na⁺ mesurée en présence de PaTEH1 Δ (270-280) ou de PaTEH1 Δ (270-280) est significativement différente de celle calculée en présence de PaTEH1B (**Figure 46**). Ceci suggère que l'extrémité C-terminale n'est pas impliquée dans l'effet chaperon déclenché par les sous-unités TEH1 et que les 11 derniers acides aminés (YVPLSVHDTR) de la sous-unité PaTEH1B interfèrent avec cet effet en diminuant la densité de courant Na⁺.



Figure 46. Densité de courants Na⁺ obtenus en co-exprimant la sous-unité DmNa_v1-1 avec les sous-unités auxiliaires DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1A(270-280). Les chiffres inscrits dans les barres d'histogramme indiquent le nombre d'ovocytes testés. Test statistique ANOVA, $F_{(66,5)} = 13,26$; test post-hoc Tukey p < 0,001). L'augmentation de la densité du courant Na⁺ est significative entre DmNav1-1/PaTEH1A et DmNav1-1/PaTEH1B d'un facteur 2,2 (p < 0,01).

D-1-2 Effets de la modification de l'extrémité C-terminale sur les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺

Ici, nous avons regardé comment la rétention d'intron affecte les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺. Nous avons donc étudié quatre propriétés qui sont l'activation, l'inactivation rapide à l'état stable, l'inactivation lente à l'état stable et la récupération de l'état inactivé (**Figure 47** et **Tableau 22**).

Premièrement, nous observons un déplacement de la dépendance au potentiel de l'activation de la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1A comparé à DmNa_v1-1/DmTEH1 (8,1 mV, p < 0,001) et DmNa_v1-1/PaTEH1B (5,1 mV, p < 0.05) (**Figure 47A** et **Tableau 22**). Les potentiels de demi-activation (Va_{1/2})¹² varient donc de façon significative entre les différentes combinaisons de sous-unité principale et de sous-unité auxiliaire. Les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A s'activent donc à des potentiels légèrement plus négatifs que les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1B et DmNa_v1-1/DmTEH1. En revanche les Va_{1/2} déterminées pour les deux variants tronqués (PaTEH1 Δ (267-280) et PaTEH1 Δ (270-280)) sont similaires à celle de DmNa_v1-1/PaTEH1A (**Tableau 22**). Ceci nous indique que l'extrémité C-terminale n'est pas impliquée dans l'activation du canal Na_v. Cependant l'extrémité C-terminale particulière de PaTEH1B affecte les propriétés d'activation suggérant une interaction avec la sous-unité principale et un rôle modulateur.

Deuxièmement, nous observons un déplacement de la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide de DmNav1-1/PaTEH1A comparé à DmNa_v1-1/PaTEH1B (2,9 mV, p < 0,01) et à DmNa_v1-1/DmTEH1 (2,7 mV, p < 0,05) (**Tableau 22** et **Figure 47B**). Les potentiels de demi-inactivation rapide (Vi_{1/2}) ¹³ varient donc de façon significative entre les différentes combinaisons. Les Vi_{1/2} des combinaisons DmNa_v1-1/PaTEH1Δ(267-280) et DmNa_v1-1/PaTEH1Δ(270-280) sont similaires à celles observées pour DmNa_v1-1/PaTEH1A. Ceci nous indique que l'extrémité C-terminale n'est pas impliquée dans la propriété d'inactivation rapide. En revanche, les 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1B modulent l'inactivation à l'état stable. En conclusion, la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide à l'état stable est également affectée par la nature de la sous-unité auxiliaire (**Figure 47B**).

Par rapport à PaTEH1A, le potentiel de demi-inactivation lente ($V_{1/2}$) est déplacé vers des potentiels hyperpolarisants pour DmNa_v1-1/DmTEH1 (6,8 mV), DmNa_v1-1/PaTEH1B

¹² Valeur de potentiel pour laquelle 50% des canaux sont activés (ouverts)

¹³ Valeur de potentiel pour laquelle 50% des canaux sont inactivés

(6,1 mV), DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (267-280) (5,3 mV) et DmNa_v1-1/ PaTEH1 Δ (270-280) (5 mV). Bien que ces résultats montrent une tendance très nette, ils ne sont pas significatifs. Ces résultats montrent ici que l'extrémité C-terminale n'impacte pas la propriété d'inactivation lente. Cependant, les 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1A pourraient moduler cette propriété.

Tableau 22 : Dépendance au potentiel de l'activation, l'inactivation lente et l'inactivation rapide, et constante de temps de la récupération de l'inactivation rapide des canaux Na_v obtenus en coexprimant DmNa_v1-1 avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1 Δ (267-280) et PaTEH1 Δ (270-280). Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

	Activation	ctivation Inactivation rapide			Inactivation lente	Récupération de l'état inactivé	
	Va ½ (mV)	k	Vi ½ (mV)	k	V ½ (mV)	К	τ (ms)
DmTEH1	-28,1 ± 0,6 (17)	$7,3\pm0,5$	-55,1 ± 0,3 (21)	$5,7\pm0,2$	-48,7 ± 1,2 (6)	$11,0\pm1,0$	2,1 ± 0,1 (19)
PaTEH1A	-36,2 ± 0,5 (23)	$6{,}9\pm0{,}5$	-57,8 ± 0,1 (27)	$4,9\pm0,1$	-55,5 ± 1,8 (9)	$10,7 \pm 1,4$	1,9 ± 0,1 (20)
PaTEH1B	-31,1 ± 0,5 (23)	$\textbf{5,8} \pm \textbf{0,5}$	-54,9 ± 0,1 (22)	$4,\!9\pm0,\!1$	-49,4 ± 1,8 (5)	11,5 ± 1,6	1,8 ± 0,1 (19)
PaTEH1Δ (267-280)	-35,7 ± 0,6 (13)	$7,7\pm0,5$	-57,7 ± 0,2 (12)	4,9 ± 0,2	-50,2 ± 1,4 (9)	11,4 ± 1,2	2,2 ± 0,1 (12)
PaTEH1Δ (270-280)	-34,6 ± 0,9 (6)	$4,9\pm0,5$	-57,7 ± 0,5 (6)	$6,2\pm0,4$	-50,5 ± 2,3 (6)	15,3 ± 2,3	2,4 ± 0,2 (6)

Troisièmement, la constante de temps de la récupération de l'état inactivé est comprise entre $1,8 \pm 0,1$ et $2,4 \pm 0,2$ ms pour les différentes combinaisons étudiées (**Tableau 22**). Il n'y a donc aucune différence significative entre toutes les combinaisons testées. Ceci indique, d'une part que, quelque soit la sous-unité auxiliaire utilisée, les canaux Na_v ont la même cinétique de récupération (**Figure 47D**), et d'autre part que la modification de l'extrémité Cterminale n'affecte pas cette propriété.



Figure 47. Propriétés électrophysiologiques des courants Na⁺ obtenus en co-exprimant la sousunité DmNav1-1 avec les sous-unités auxiliaires DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A267-**280 et PaTEH1Δ270-280.** A. Courbe d'activation des courants Na⁺ enregistrés lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1A(270-280). G représente la conductance et est calculé comme indiqué dans le Matériel et Méthode. Encart : protocole utilisé pour étudier l'activation. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 22**. B. Courbe d'inactivation rapide à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés lorsque DmNa_v1-1 est coexprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1 Δ (267-280) et PaTEH1 Δ 270-280. Encart : protocole utilisé pour étudier l'inactivation rapide à l'état stable. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 22**. C. Courbe d'inactivation lente à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés lorsque DmNav1-1 est co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1 Δ (270-280). Encart : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 22.D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1A(270-280). Encart : protocole utilisé pour étudier la récupération de l'état inactivé. Le nombre d'ovocvtes testés est indiqué dans le tableau 22.

D-1-3 Effet de la rétention d'intron sur les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺

Les cinétiques d'activation et d'inactivation sont déterminées comme indiquées dans la partie Matériels et Méthodes (chapitre 3, paragraphe J-6). Les courbes représentant les cinétiques d'activation (**Figure 48A**) présentent des différences en fonction des combinaisons testées. En effet, la cinétique d'activation des canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A est plus rapide que celle des canaux DmNa_v1-1/DmTEH1 pour les potentiels les plus négatifs (-30 à -10 mV ; p < 0,05). En revanche, les cinétiques des canaux DmNa_v1-1/PaTEH1B et DmNa_v1-1/DmTEH1 sont similaires. Pour voir l'effet de l'extrémité C-terminale sur la cinétique d'activation, nous avons déterminé les cinétiques d'activation du courant Na⁺ avec les variants tronqués PaTEH1 Δ (267-280) et PaTEH1 Δ (267-280). Pour les deux mutants, les résultats sont similaires. Les résultats obtenus avec ces deux mutants sont surprenants car, pour chaque potentiel testé, la cinétique d'activation reste relativement stable comparée à ce qui est observé avec les autres sous-unités auxiliaires (**Figure 48A**).

Α

В



Figure 48. Cinétiques d'activation (A) et d'inactivation (B) du courant Na⁺ lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1 Δ (267-280) ou PaTEH1 Δ (270-280). La méthode utilisée pour déterminer les temps de ½ activation et de ½ inactivation en fonction du potentiel est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes. Comme reporté dans la littérature, les valeurs des cinétiques d'activation sont plus faibles que celles des cinétiques d'inactivation (Lapied et coll., 1990).

La cinétique d'inactivation des courants Na⁺ déterminée pour les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A est plus rapide que celles obtenues avec les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1B et DmNa_v1-1/DmTEH1 (**Figure 48B**). Les courants enregistrés avec la sous-unité auxiliaire PaTEH1A s'inactivent donc plus rapidement que ceux enregistrés avec les sous-unités PaTEH1B ou DmTEH1. Les cinétiques d'inactivation des courants Na⁺ obtenues avec les deux mutants sont similaires à celles observées avec la sous-unité auxiliaire PaTEH1B. Ces résultats suggèrent que les 11 derniers acides aminés de la sous-unité PaTEH1A contribuent à une légère accélération de l'inactivation du canal Na_v.

En conlusion, nous avons montré que les 11-14 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1 ne sont pas indispensables pour les propriétés chaperonnes, et pour les propriétés d'activation et d'inactivation rapide. L'extrémité Cterminale particulière de la sous-unité PaTEH1B a un effet modulateur sur les propriétés d'activation et d'inactivation du canal alors que celle de PaTEH1A semble moduler l'inactivation lente. Nous avons noté que la sous-unité PaTEH1A a aussi un effet sur la cinétique d'inactivation du canal Na_v. Ceci suggère donc que les deux sous-unités auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B interragissent avec la sous-unité principale mais de façon différente. Ces résultats indiquent que la rétention d'intron qui conduit à la modification des 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1B a un rôle fonctionnel. D-2 Impact des sous-unités auxiliaires sur la sensibilité des courants Na⁺ à un anesthésique local (la lidocaïne) et à un insecticide (le DCJW).

Pour étudier l'impact des sous-unités auxiliaires sur la sensibilité des canaux Na_v d'insecte vis-à-vis de ses ligands pharmacologiques, nous avons utilisé deux molécules dont les modes d'action sont relativement bien connus. La première molécule que nous avons testée est un anesthésique local, la lidocaïne. Il a récemment été montré que celle-ci agit sur les canaux Na_v d'insecte et plus particulièrement sur ceux de la blatte *B. germanica* (Song et coll., 2011). La seconde molécule est un pro-insecticide, le DCJW, appartenant à la famille des oxadiazines et dont la cible est le canal Na_v (Lapied et coll., 2001). Cet insecticide agit préférentiellement sur le canal Na_v lorsqu'il est à l'état inactivé (Zhao et coll., 2005 ; Song et coll., 2006).

D-2-1 Modification des propriétés des courants Na⁺ par la lidocaïne

D-2-1-1 Inhibition du courant Na⁺ par la lidocaïne

L'application de la lidocaïne a été réalisée pour obtenir un blocage tonique (Song et coll., 2011). Pour cela, les ovocytes sont soumis à un choc dépolarisant de 20 ms avant application de la lidocaïne pour déterminer l'amplitude du courant Na⁺. Puis la lidocaïne est perfusée dans la cuve pendant 10 minutes sans que l'ovocyte ne subisse de stimulation. Au bout de 10 minutes, l'ovocyte subit un deuxième choc dépolarisant et l'amplitude du courant Na⁺ est relevée. Les traces de courants enregistrées pour chaque combinaison sont présentées dans la figure 49A. Les traces de courants grises représentent les courants enregistrés avant l'application de la lidocaïne et les traces de courants noires sont celles obtenues 10 minutes après application de la lidocaïne. L'inhibition induite par la lidocaïne est différente en fonction de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec la sous-unité DmNav1-1 (Figure 49A). L'inhibition moyenne observée pour chaque combinaison est reportée dans la figure 49B. La lidocaïne induit une inhibition de $44.8 \pm 3.62\%$ en présence de la sous-unité PaTEH1B et de $28.4 \pm 2.97\%$ en présence de la sous-unité PaTEH1A (p < 0.05). L'inhibition obtenue avec la sous-unité DmTEH1 ($34.8 \pm 2.58\%$) n'est pas significativement différente de celle observée avec les autres sous-unités auxiliaires, de même que celle mesurée avec les deux mutants $(PaTEH1\Delta(267-280): 38,8 \pm 4,18\% \text{ et } PaTEH1\Delta(270-280): 36,6 \pm 2,9\%)$. Ces résultats montrent que l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1A n'a pas d'impact sur

l'inhibition du courant Na^+ par la lidocaïne, mais que la nouvelle extrémité C-terminale du variant PaTEH1B conduit à une sensibilité plus importante du canal Na_v pour la lidocaïne.



Figure 49. Effet inhibiteur de la lidocaïne sur le courant Na⁺. A. Traces de courant Na⁺ obtenues suite à un choc dépolarisant de 20 ms à -10 mV en absence (traces grises) ou en présence (traces noires) de 2 mM de lidocaïne. u.a : unité arbitraire. B. Pourcentage d'inhibition par bloc tonique induit par la lidocaïne (2mM, 10 min) pour DmNa_v1-1 co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1 Δ (267-280) ou PaTEH1 Δ (270-280). Test statistique: ANOVA: $F_{(4,27)} = 3,21$; p < 0,05; test post-hoc Tukey. Les nombres situés dans les barres d'histogramme correspondent aux nombres d'ovocytes testés.

D-2-1-2 Modulation des propriétés biophysiques du courant Na⁺ par la lidocaïne

Pour comprendre les différences observées quant à l'inhibition du courant Na⁺ par la lidocaïne, nous avons regardé l'effet de cette molécule sur les propriétés biophysiques du courant Na⁺. Pour toutes les combinaisons testées nous avons observé un décalage important de la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels dépolarisants par rapport aux conditions contrôles (**Figure 50A** et **Tableaux 22** et **23**). Ces observations indiquent que

l'inhibition des courants Na^+ par la lidocaïne est fortement dépendante du potentiel membranaire comme décrit précédemment (Bean et coll., 1983). Cet effet peut s'expliquer pas l'interaction de la lidocaïne avec les segments S4 des domaines III et IV, également impliqués dans l'activation du canal Na_v (Sheets et Hanck, 2003). Le déplacement de la dépendance au potentiel de l'activation par la lidocaïne vers des potentiels dépolarisants a également été observé pour les canaux Na_v de mammifères $Na_v1.5$ et $Na_v1.8$ (Chevrier et coll., 2004 ; Fan et coll., 2010). Cependant, c'est la première fois que ce phénomène est mis en évidence pour des canaux Na_v d'insectes.

presence de nuocame. Le nombre d'ovocytes testes est indique entre parentneses.							
	Activation		Inactivation rapide	ictivation Inactivation bide lente			Récupération de l'état inactivé
	Va ½ (mV)	K	Vi ½ (mV)	k	V ½ (mV)	k	τ (ms)
DmTEH1	$-22,4 \pm 1,6$ (5)	$8,8\pm1,5$	-58,1 ± 1,3 (6)	$8,9\pm0,9$	-62,9 ± 1,3 (6)	8,7 ± 1,0	$2,9 \pm 0,5$ (4)
PaTEH1A	$-26,9 \pm 2,1 (5)$	11,4 ± 1,9	-61,2 ± 1,4 (6)	$9,3\pm0,8$	-70,5 ± 5,1 (5)	13,2 ± 2,9	3,1 ± 0,2 (4)
PaTEH1B	-20,6 ± 1,4 (6)	9,2 ± 1,3	-59,2 ± 1,5 (5)	11,9 ± 0,9	-59,1 ± 2,6 (5)	15,8 ± 2,1	$3,2 \pm 0,2$ (6)
PaTEH1∆ (267-280)	-21,2 ± 2,2 (7)	13,8 ± 2,2	-64,9 ± 4,5 (7)	$12,7\pm2,1$	-68,0 ± 2,6 (5)	11,6 ±1,7	3,6 ± 0,2 (7)
PaTEH1∆ (270-280)	-19,9 ± 2,1 (6)	11,9 ± 2,0	-61,0 ± 1,1 (6)	$7{,}5\pm0{,}8$	-66,0 ± 1,6 (6)	9,8 ±1,3	3,5 ± 0,2 (6)

Tableau 23 : Paramètres des propriétés électrophysiologiques des courants Na⁺ enregistrés en présence de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

Dans un deuxième temps nous avons observé l'effet de la lidocaïne sur les propriétés d'inactivation du canal Na_v. Pour toutes les combinaisons testées, la lidocaïne modifie à la fois l'inactivation rapide à l'état stable et l'inactivation lente à l'état stable, en déplaçant les dépendances au potentiel vers des potentiels hyperpolarisants (**Figures 50B** et **50C**, **Tableaux 22** et **23**). Ces résultats sont cohérents avec ceux qui ont été décrits précédemment et qui montrent que la lidocaïne agit sur le canal Na_v en stabilisant à la fois l'inactivation rapide et l'inactivation lente (Balser et coll., 1996 ; Chen et coll., 2000). En effet, la lidocaïne est depuis longtemps connue pour se fixer préférentiellement sur les canaux Na_v lorsqu'ils sont à l'état inactivé (Bean et coll., 1983). Cependant, deux modèles ont été proposés concernant l'affinité de la lidocaïne pour le canal Na_v. Le premier modèle (« modulated receptor hypothesis ») considère que les canaux ioniques ont une affinité variable pour les molécules pharmacologiques en fonction de leur état fonctionnel (Hille, 1977 ; Hondeghem et Katzung, 1977 ; Hanck et coll., 1994). Par exemple, les canaux ouverts ou à l'état inactivé (Hanck et coll., 1994). Le second modèle (« guarded receptor hypothesis ») suggère que le site de

fixation des anesthésiques locaux a une affinité constante quelque soit l'état fonctionnel du canal et que la différence de sensibilité observée est due à la disponibilité transitoire des canaux Na_v (Starmer et coll., 1984 ; Hanck et coll., 1994). Les canaux ne sont pas tous au même stade, au même moment.

Troisièmement, la lidocaïne ralentit la récupération de l'état inactivé rapide et ce pour toutes les combinaisons testées. Ces observations confirment l'effet stabilisateur de la lidocaïne sur l'état inactivé du canal Na_v. De plus, nous avons également observé un effet particulier de la lidocaïne sur cette propriété. En effet, le courant Na⁺ ne récupère pas totalement en présence de lidocaïne (**Figure 50D**). Avec DmNa_v1-1/PaTEH1A, la récupération après 20 ms est de 87,08 \pm 2,65%. Elle est significativement plus faible (p < 0,05) avec DmNa_v1-1/PaTEH1B (79,21 \pm 1,54%), DmNa_v1-1/DmTEH1 (76,20 \pm 1,85%), DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (267-280) (78,61 \pm 1,65%) et DmNa_v1 Δ (270-280) (75,71 \pm 1,29%). C'est la première fois que cet effet est observé, suggérant qu'une partie des canaux Na_v sensibilisés par la lidocaïne reste à l'état inactivé.



Figure 50. Propriétés électrophysiologiques après application de lidocaïne. A. Courbe d'activation des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. G représente la conductance et est calculé comme indiqué dans le Matériel et Méthode. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'activation. B. Courbe d'inactivation rapide à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation rapide à l'état stable. C. Courbe d'inactivation lente à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation rapide à l'état stable. C. Courbe d'inactivation lente à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (bleu) ou en absence (noir) de lidocaïne. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le **tableau 23**. *Encart* : protocole utilisé pour étudier la récupération de l'état ina

D-2-1-3 Modulation des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺ par la lidocaïne

Ici, nous avons comparé les cinétiques du courant Na⁺déterminées après application de la lidocaïne et en condition contrôle. L'application de la lidocaïne à 2 mM ne modifie pas les cinétiques d'activation des courants enregistrés avec les sous-unités PaTEH1A, PaTEH1B et DmTEH1 (**Figure 51A**). En revanche, la cinétique d'activation est accélérée pour les deux mutants tronqués pour les potentiels allant de -30 à -10 mV (p < 0,05, test de Student ; **Figure 51A**). Seule la cinétique d'inactivation de la sous-unité PaTEH1A est affectée par la lidocaïne (**Figure 51B**). Nous observons en effet une accélération de la cinétique pour les potentiels allant de -30 mV à -10 mV (p < 0,05, test de Student).



Figure 51. Cinétiques d'activation et d'inactivation en absence ou en présence de lidocaïne. La méthode utilisée pour déterminer les temps de ½ activation et de ½ inactivation en fonction du potentiel est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes. Les courbes en pointillés correspondent aux résultats obtenus en absence de lidocaïne et les courbes en trait plein correspondent aux résultats obtenus en présence de lidocaïne. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent aux nombres d'ovocytes testés.

En conclusion, nous avons montré un effet important de la lidocaïne sur les propriétés d'activation comme cela avait été montré précédemment pour les canaux $Na_v 1.5$ et $Na_v 1.8$ chez les mammifères (Chevrier et coll., 2004 ; Fan et coll., 2010). Nos résultats montrent également les effets de la lidocaïne sur les propriétés d'inactivation. D'une part, le déplacement de la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide vers des potentiels hyperpolarisants ainsi que l'augmentation du temps de récupération de l'état inactivé en présence de lidocaïne montrent une stabilisation de cet état. D'autre part, nous avons montré

que la dépendance au potentiel de l'inactivation lente est fortement déplacée vers des potentiels hyperpolarisants. Nous avons précedemment observé que les combinaisons DmNa_v1-1/PaTEH1B et DmNa_v1-1/DmTEH1 montrent des propriétés électrophysiologiques similaires. Nous avons également observé des similarités dans les propriétés pharmacologiques de ces deux combinaisons. Enfin, nous avons montré que bien que l'extrémité C-terminale de PaTEH1A conduise à une diminution significative par rapport à PaTEH1B de la sensibilité du canal à la lidocaïne, nous avons observé des effets similaires aux autres sur les propriétés d'activation et d'inactivation du canal Na_v. Ceci indique que l'extrémité C-terminale n'impacte pas la fixation de la lidocaïne sur le canal Na_v.

D-2-2 Modification des propriétés des courants Na⁺ par le DCJW

D-2-2-1 Inhibition du courant Na⁺ par le DCJW

Pour déterminer la sensibilité des canaux Nav au DCJW, les ovocytes ont été incubés pendant 30 minutes avec une solution de DCJW à 2 µM. Une première série de chocs dépolarisants a été réalisée avant application du DCJW, toutes les minutes, pour s'assurer de la stabilité du courant Na⁺ avant application de la molécule insecticide. Les traces de courants grises représentent le courant Na⁺ avant application du DCJW et les traces noires sont celles enregistrées 30 minutes après application du DCJW. Les canaux Nav obtenus avec chaque combinaison montrent une sensibilité différente au DCJW en fonction de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec DmNav1-1 (Figure 52A). Les canaux DmNav1-1/DmTEH1 (39,4 \pm 3,6%) et DmNa_v1-1/PaTEH1B (31,4 \pm 7,1%) sont plus sensibles au DCJW que les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A (25,1 \pm 2,1%) (Figure 52B). Ces observations indiquent que l'extrémité C-terminale du variant PaTEH1B génère, lorsque cette sous-unité est co-exprimée avec DmNav1-1, un canal plus sensible au DCJW. De plus, la sensibilité du canal Nav au DCJW est très fortement réduite lorsque la sous-unité DmNav1-1 est co-exprimée avec l'un ou l'autre des variants tronqués. En effet, l'inhibition observée est de $8,4 \pm 3,2\%$ avec le mutant PaTEH1 Δ (267-280) et de 8,3 ± 1,9% pour PaTEH1 Δ (270-280) (Figure 52B). Ces résultats suggèrent donc que les 11-14 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale des sous-unités PaTEH1 contribuent de façon spectaculaire à la diminution de la sensibilité du canal Na_v au DCJW.



Figure 52. Effet inhibiteur du DCJW sur le courant Na⁺. A. Traces de courant Na⁺ obtenus suite à un choc dépolarisant de 20 ms à -10 mV en absence (traces grises) ou en présence (traces noires) de 2 μ M de DCJW. u. a : unité arbitraire. B. Pourcentage d'inhibition par bloc tonique induit par le DCJW (2 μ M, 30 min) pour DmNa_v1-1 co-exprimé avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1 Δ (267-280) ou PaTEH1 Δ (270-280). Test statistique: ANOVA: F_(4,26) = 14,66 ; p < 0,0001; test post-hoc Tukey. Les nombres situés dans les barres d'histogramme correspondent aux nombres d'ovocytes testés.

D-2-2-2 Effets du DCJW sur les propriétés biophysiques des courants Na⁺

Pour expliquer les différences d'inhibition par le DCJW observées pour les courants Na⁺ engendrés par les différentes combinaisons, nous avons étudié l'effet du DCJW sur les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺ (**Figure 53** et **Tableau 24**).

-1	Activation		Inactivation		Inactivation		Récupération de
	1200,0000		rapide		lente		l'état inactivé
	Va ½ (mV)	k	Vi ½ (mV)	k	V ½ (mV)	k	τ (ms)
DmTEH1	-26,3 ± 0,9 (8)	$7,9\pm0,8$	-57,4 ± 0,9 (7)	$7{,}5\pm0{,}7$	$-51,9 \pm 1,6$ (6)	$10,2 \pm 1,5$	2.8 ± 0.4 (7)
PaTEH1A	-36,4 ± 1,1 (7)	$8,2 \pm 0,9$	$-61,6\pm0,7$ (8)	$6{,}1\pm0{,}5$	$-61,2\pm2,6$ (7)	11,6 ± 2,0	2.6 ± 0.6 (7)
PaTEH1B	-22,4 ± 1,4 (5)	$7,3 \pm 1,2$	$-58,8\pm0,8\ (9)$	$6{,}7\pm0{,}6$	$-60,9 \pm 2,0$ (5)	$11,4 \pm 1,7$	2.9 ± 0.4 (8)
PaTEH1∆ (267-280)	-33,5 ± 0,8 (7)	$7,3 \pm 0,7$	$-59,0\pm0,4$ (9)	$5,8\pm0,3$	$-54,0 \pm 1,6$ (6)	8,3 ± 1,5	2.5 ± 0.2 (8)
PaTEH1Δ (270-280)	-31,7 ± 0,9 (5)	7,3 ± 0,9	-58,7 ± 1,2 (5)	8,6 ± 0,8	-54,6 ± 2,8 (5)	12,3 ± 2,1	2.5 ± 0.1 (6)

Tableau 24 : Paramètres des propriétés électrophysiologiques des courants Na⁺ enregistrés en présence de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

Dans un premier temps, nous avons observé un déplacement du $Va_{1/2}$ vers des potentiels dépolarisants (8,7 mV, p < 0,01) par rapport aux conditions contrôles pour la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1B (**Figure 53A** et **Tableaux 22** et **24**). Ceci montre que le DCJW modifie la dépendance au potentiel de l'activation uniquement lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimée avec PaTEH1B

Dans un deuxième temps, nous avons observé que la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide est déplacé de -3,9 mV (p < 0,001) pour la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1B et de -3,9 mV (p < 0,001) pour la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1A par rapport au contrôle (**Figure 53B**, **Tableaux 22** et **24**). Ceci indique que le DCJW affecte la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide. Aucun effet n'est observé pour les combinaisons DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (267-280) et DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (270-280), ce qui suggère que les 11-14 derniers acides de l'extrémité C-terminale module l'effet du DCJW sur l'inactivation rapide.

Pour la combinaison $DmNa_v1-1/PaTEH1B$ la dépendance au potentiel de l'inactivation lente est décalé de -11,5 mV (p < 0,05) par rapport au contrôle (**Figure 53C** et **Tableaux 22** et **24**). Aucune différence significative n'est observée pour les autres combinaisons. Ces résultats indiquent d'une part que l'extrémité C-terminale de PaTEH1A

n'affecte pas l'effet du DCJW sur la dépendance au potentiel de l'inactivation lente. D'autre part, la nouvelle extrémité C-terminale de PaTEH1B module l'effet du DCJW sur cette propriété.

Enfin, en présence de DCJW à 2μ M, la récupération de l'état inactivé rapide est ralentie de 0,7 ms pour DmNa_v1-1/DmTEH1 (p < 0,05) et de 1,1 ms pour DmNa_v1-1/PaTEH1B (p < 0,001) par rapport au contrôle (**Figure 53D** et **Tableaux 22** et **24**). Pour les trois autres combinaisons, aucune différence significative n'est observée. Ceci montre que l'extrémité C-terminale de PaTEH1A ne modifie pas l'effet du DCJW sur la récupération de l'état inactivé mais que l'extrémité C-terminale de PaTEH1B module son effet. Contrairement aux résultats obtenus précédemment avec la lidocaïne, les courants Na⁺ récupèrent en totalité de l'état inactivé.



Figure 53. Propriétés électrophysiologiques des courants Na⁺ obtenus en exprimant la sous-unité DmNa_v1-1 seule ou avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A267-280 et PaTEH1A270-280 en absence ou en présence de DCJW. A. Courbe d'activation des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. G représente la conductance et est calculé comme indiqué dans le Matériel et Méthode. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'activation. B. Courbe d'inactivation rapide à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'activation lente à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants Na⁺ enregistrés en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué dans le tableau 24. *Encart* : protocole utilisé pour étudier la récupération de l'état inact

D-2-2-3 Effets du DCJW sur les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Na⁺

Pour étudier les effets du DCJW sur les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Na⁺, nous avons comparé les cinétiques déterminées après application du DCJW et en condition contrôle. Premièrement, l'application du DCJW à 2 μ M contribue à une accélération des cinétiques d'activation des courants enregistrés avec les sous-unités PaTEH1A, PaTEH1B et DmTEH1 pour des potentiels allant de -30 à -10 mV (**Figure 54A**). Deuxièmement, en présence du DCJW, les courbes des cinétiques d'activation prennent la même allure que celles obtenues pour les courants enregistrés en présence des deux mutants. C'est-à-dire que la cinétique d'activation est relativement stable pour tous les potentiels testés (**Figure 54A**). Troisièmement, les cinétiques d'activation des courants enregistrés avec les deux mutants, en présence de DCJW, sont similaires à celles déterminées en condition contrôle, et ce pour tous les potentiels testés (courbes marron et roses, **Figure 54A**). Enfin, les cinétiques d'inactivation déterminées pour chaque combinaison sont similaires en présence ou en absence de DCJW (**Figure 54B**).



Figure 54. Cinétiques d'activation (A) et d'inactivation (B) du courant Na⁺ pour différentes combinaisons de la sous-unité DmNa_v1-1 avec les sous-unités auxiliaires, avant et après application du DCJW. Pour les cinétiques d'activation et d'inactivation, les traits en pointillé correspondent aux conditions contrôles et les traits pleins correspondent aux résultats obtenus après application de DCJW à 2 μ M pendant 30 minutes. Le nombre d'ovocytes testés pour chaque condition est indiqué entre parenthèses.

En conclusion, nous avons montré que l'absence des 11-14 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale diminue de façon très importante la sensibilité du canal au DCJW. De plus, le DCJW n'a pas d'effet significatif sur l'inactivation lente pour les combinaisons DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (267-280) et DmNa_v1-1/PaTEH1 Δ (270-280). Le DCJW ayant une affinité préférentielle pour l'état inactivé, ceci explique la faible sensibilité de ces combinaisons au DCJW. Les combinaisons DmNa_v1-1/PaTEH1B et DmNa_v1-1/DmTEH1 sont les plus sensibles au DCJW. La récupération de l'état inactivé est significativement ralentit en présence de DCJW pour ces deux mêmes combinaisons. Ceci confirme que le DCJW stabilise l'état inactivé du canal Na_v.

Ici, nous avons utilisé deux inhibiteurs du courant Na^+ , la lidocaïne et le DCJW, connus pour se fixer préférentiellement sur l'état inactivé du canal. Nous avons montré que ces deux molécules ont un mode d'action différent sur le canal Na_v . Contrairement à la lidocaïne, le DCJW n'affecte pas les propriétés d'activation du canal Na_v . En revanche, les deux molécules modifient les propriétés d'inactivation du canal. Nous avons également mis en évidence, en présence de lidocaïne, qu'une partie des canaux Na_v ne récupéraient pas de l'état inactivé. Enfin, nous avons montré que la sensibilité des canaux Na_v pour la lidocaïne et le DCJW dépend du type de sous-unité auxiliaire co-exprimée avec la sous-unité principale DmNa_v1-1 dans l'ovocyte de xénope.

E- Co-localisation des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B avec la sousunité DmNa_v1-1 par microscopie confocale

La sous-unité PaTEH1B diminue la densité du courant Na⁺ d'un facteur 2,2 par rapport à PaTEH1A. Afin de comprendre l'effet du changement de l'extrémité C-terminale de PaTEH1, nous avons caractérisé l'expression des sous-unités DmNav1-1, PaTEH1A et PaTEH1B dans la membrane de l'ovocyte par immunocytochimie. Pour identifier la sousunité DmNa_v1-1 dans la membrane des ovocytes, nous avons utilisé l'anticorps anti-SP19, dirigé contre un peptide correspondant à la portion localisée entre les résidus 1501 et 1518 du Nav1.1 de rat (Noda et coll., 1986). Cette séquence peptidique est située dans le linker 3 du canal qui est une région très conservée entre les espèces de Vertébrés et d'Invertébrés (Figure 55). Ceci explique pourquoi l'anticorps SP19 reconnait également les canaux Nav chez l'anguille, l'araignée, le criquet, la blatte, la mouche et le papillon (Gordon et coll., 1988, 1990 ; French et coll., 1993 ; Seyfarth et coll., 1995). Pour localiser les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B, nous avons inséré un tag-histidine au niveau de leur extrémité N-terminale (voir Matériels et Méthodes) (Figure 55). Nous avons en effet montré que PaTEH1A et PaTEH1B sont différentes par leur extrémité C-terminale, et que cette dernière a un impact sur les propriétés du courant Na⁺. Préalablement, en utilisant les sites de prédiction disponibles¹⁴, nous avions également vérifié l'absence de signal peptide chez la protéine PaTEH1, car ce dernier aurait conduit à l'excision du tag-histidine.



Figure 55. Localisation des sites reconnus par les anticorps sur la sous-unité $DmNa_v1-1$ et sur la sous-unité auxiliaire. La région ciblée par l'anticorps anti-SP19 est indiquée en vert, et le taghistidine reconnu par l'anticorps anti-RGSHHHH est indiqué en rouge.

¹⁴<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</u>

http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0

E-1 L'insertion du tag-histidine ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v.

Pour s'assurer que le tag-histidine inséré en N-terminal de la protéine ne modifiait pas les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v nous avons testé les protocoles d'activation, d'inactivation rapide et de récupération de l'état inactivé avec la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1Ah. Les résultats obtenus montrent que la présence du tag-histidine n'affecte pas les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v (**Tableau 25**). De plus, la densité du courant n'est pas modifiée, indiquant que l'extrémité N-terminale n'a pas d'impact sur la densité du courant Na⁺ (DmNa_v1-1/PaTEH1A (n= 15) : 3,70 ± 0,44 μ A/nF/ng d'ARN injecté versus DmNa_v1-1/PaTEH1Ah (n=8) : 3,30 ± 0,30 μ A/nF/ng d'ARN injecté ; test de Student : p = 0,61).

Tableau 25 : Propriétés électrophysiologiques des canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A et DmNa_v1-1/PaTEH1Ah. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

	Activation		Inactivation rapide		Récupération de l'état inactivé
	V ½ (mV)	k	V ½ (mV)	K	τ (ms)
DmNav1-1 + PaTEH1A	-36,2 ± 0,5 (23)	$6{,}9\pm0{,}5$	$-57,8 \pm 0,1$ (27)	$4{,}9\pm0{,}1$	1,9 ± 0,1 (20)
DmNav1-1 + PaTEH1Ah	$-36,4 \pm 0,6$ (8)	$7,2\pm0,5$	$-57,6\pm0,3$ (7)	$5,5\pm0,3$	$2,0\pm 0,3$ (5)

En conclusion, l'extrémité N-terminale n'a pas d'impact ni sur la densité du courant Na⁺, ni sur les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺.

E-2 Localisation subcellulaire des sous-unités par immunocytochimie

Toutes les expériences de microscopie confocale ont été réalisées sur des ovocytes albinos. L'utilisation de ces ovocytes permet de s'affranchir d'une partie de l'autofluorescence des ovocytes due aux pigments granulaires du pôle animal, mais aussi de l'absorbance par les pigments du pôle animal de la lumière émise (Müller, 2001 ; Dahan et coll., 2004 ; Limon et coll., 2007). Un autre type d'auto-fluorescence due aux plaquettes de vitellus est observée (Müller, 2001). La figure 56 montre les images d'immunofluorescence obtenues en microcopie confocale, pour des ovocytes injectés avec de l'eau (contrôle négatif) et avec DmNa_v1-1/PaTEH1A ou DmNa_v1-1/PaTEH1B. La fluorescence verte correspond au marquage de la sous-unité DmNav1-1 et la fluorescence rouge correspond au marquage de la sous-unité auxiliaire (PaTEH1A ou PaTEH1B). Les diagrammes, représentés sous chaque image, montrent l'intensité de fluorescence mesurée pour chaque point. Dans un premier temps, une valeur de fluorescence à 488 nm assez élevée est observée pour les ovocytes injectés avec de l'eau (contrôle pour le marquage de sous-unité DmNa_v1-1). Ceci s'explique par la présence de canaux Na_v endogènes dans l'ovocyte de xénope (Terhag et coll., 2010), qui vont aussi être marqués par l'anticorps anti-SP19. Nous observons également un niveau de fluorescence relative plus élevé à 488 nm lorsque DmNav1-1 est co-injectée avec PaTEH1A que lorsque les ovocytes sont injectés avec de l'eau ou avec DmNav1-1/PaTEH1B (Figure 56). Les variations de fluorescence à 456 nm sont en revanche moins visibles entre les 3 conditions. Il apparaît cependant que le niveau de fluorescence est plus important avec la sous-unité PaTEH1B qu'avec les deux autres conditions (contrôle et DmNa_v1-1/PaTEH1A). Pour mesurer l'intensité de fluorescence relative pour chaque condition, nous avons utilisé le logiciel ImajeJ (version 1.4.3.67). Pour chaque mesure, nous avons déterminé une zone d'intérêt (ou ROI pour <u>Region Of Interest</u>) de 5002,2 µm² (292 * 36 pixels) et nous avons quantifié la fluorescence moyenne dans cette zone. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure 57.



Figure 56. Modulation de l'expression des canaux Nav à la surface de l'ovocyte de xénope par les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B. Images d'immunofluorescence obtenues en microscopie confocale sur des ovocytes injectés avec de l'eau (contrôle) ou avec 3 ng d'ARN DmNav1-1/PaTEH1A ou DmNav1-1/PaTEH1B. A. Représentation en instantanée du marquage de la sous-unité DmNav1-1 dans la membrane de l'ovocyte avec l'anticorps anti-SP19 (Alexa®488) et représentation en instantanée du marquage de la sous-unité auxiliaire dans la membrane de l'ovocyte avec l'anticorps anti-SP19 (Alexa®488) et représentation en instantanée du marquage de la sous-unité auxiliaire dans la membrane de l'ovocyte avec l'anticorps anti-RGSHHHH (Alexa®546) et représentation tridimensionnelle associée. C. Représentation en instantanée du marquage des sous-unités DmNav1-1 et PaTEH1 (Alexa®488 et Alexa®546)

Les résultats présentés sur la **figure 57** montrent que la densité de la sous-unité DmNa_v1-1 dans la membrane de l'ovocyte est plus importante en présence de la sous-unité PaTEH1A qu'en présence de la sous-unité PaTEH1B. En effet, une augmentation significative de 1,8 fois est observée avec PaTEH1A par rapport à PaTEH1B (p < 0,01), indiquant que la sous-unité PaTEH1A stimule l'expression de DmNa_v1-1 dans la membrane de l'ovocyte. De façon surprenante, l'intensité de fluorescence relative mesurée pour la sous-unité PaTEH1A est plus faible que celle mesurée pour PaTEH1B, indiquant que la sous-unité PaTEH1A est moins exprimée que la sous-unité PaTEH1B au sein de la membrane de l'ovocyte.



Figure 57. Modulation de l'expression des canaux Nav par les variants PATEH1A et PaTEH1B. La fluorescence relative a été mesurée avec le logiciel ImajeJ. Pour chaque mesure, une région d'intérêt identique de 5002,2 μ m² (292 * 36 pixels) a été définie. Les barres d'histogramme blanches correspondent aux valeurs d'intensité de fluorescence relative obtenues pour la sous-unité DmNav1-1 et les barres d'histogramme grises correspondent aux valeurs obtenues pour les sous-unités auxiliaires PaTEH1A et PaTEH1B. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, pour 6 ovocytes par conditions. Test statistiques ANOVA: Alexa®488: $F_{(2,16)}$ =24,86, p < 0,0001 and Alexa®546: $F_{(2,15)}$ =39,81, p < 0,0001, test post hoc Tukey)

Jusqu'à maintenant aucune étude n'avait montré que les sous-unités auxiliaires d'insecte étaient membranaires. Ici, nous avons pu voir que celles-ci sont exprimées dans la membrane de l'ovocyte de xénope, comme la sous-unité DmNa_v1-1. Nous avons montré que l'extrémité C-terminale des sous-unités auxiliaires contrôle également la densité de sousunités principales et auxiliaires dans la membrane. La sous-unité PaTEH1B s'intègre 1,8 plus dans la membrane mais elle diminue d'un facteur 1,8 l'intégration de la sous-unité principale par rapport à PaTEH1A. L'extrémité C-terminale des sous-unités auxiliaires pourrait donc influencer le renouvellement (ou « turnover ») des protéines dans la membrane. En présence de la sous-unité PaTEH1B, le renouvellement pourrait être ralentit, ce qui expliquerait la diminution de la densité de sous-unité principale dans la membrane de l'ovocyte. L'extrémité C-terminale pourrait également modifier la stoechiométrie des sous-unités principales et auxiliaires. Celle-ci est actuellement inconnue pour les canaux Na_v d'insectes. Enfin il est possible que la sous-unité PaTEH1B s'associe à d'autres protéines que la sous-unité principale du canal Na_v dans l'ovocyte. Ceci expliquerait la forte densité de PaTEH1B dans la membrane par rapport à celle de DmNa_v1-1.

F- Discussion générale

Par des approches de biologie moléculaire, nous avons montré qu'il existe trois sousunités homologues à la sous-unité DmTEH1 : PaTEH1A, PaTEH1B et PaTEH1C. Les sousunités PaTEH1A et PaTEH1B diffèrent au niveau des 11 derniers acides aminés de leur extrémité C-terminale. Le variant PaTEH1B est le résultat d'une rétention d'intron. Le troisième variant, PaTEH1C, possède la même extrémité C-terminale que le variant PaTEH1A, mais présente une délétion d'un codon codant une thréonine dans la boucle extracellulaire. Dans ce chapitre nous avons montré que les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B présentent des propriétés similaires à celles de DmTEH1: 1) PaTEH1A et PaTEH1B induisent une augmentation de la densité du courant Na⁺ de 108,9 fois et de 49 fois, respectivement, lorsqu'elles ont co-exprimées avec DmNa_v1-1, par rapport à DmNa_v1-1 seule. 2) La distribution tissulaire des trois variants est uniquement neuronale, comme pour DmTEH1 (Derst et coll., 2006). Dans ce chapitre, nous avons également montré que l'extrémité C-terminale de PaTEH1B induit une diminution de la densité de courant Na⁺ par rapport à PaTEH1A et qu'elle modifie les propriétés d'ouverture et de fermeture des canaux Na_v. De plus, nous avons montré que les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des combinaisons DmNav1-1/PaTEH1A et DmNav1-1/PaTEH1B sont différentes.

F-1 Distribution tissulaire

Les trois variants de PaTEH1 sont exclusivement exprimés dans le système nerveux. Comparativement à l'étude réalisée sur *D. melanogaster*, nous avons également observé une distribution exclusivement neuronale de la sous-unité PaTEH1 (Derst et coll., 2006). Nos résultats combinés à ceux de Derst et son équipe suggèrent une conservation de l'expression tissulaire de la sous-unité TEH1. De plus, cette distribution exclusivement neuronale suggère un rôle spécifique et particulier des sous-unités de type TEH1 au sein du système nerveux des insectes.

Nous avons montré que le niveau d'expression de PaTEH1A et PaTEH1B diffère dans la tête et dans la chaîne nerveuse. Il apparaît que, dans la chaîne nerveuse, le variant PaTEH1A est plus fortement exprimé que le variant PaTEH1B. A l'inverse, PaTEH1B est plus exprimé dans la tête que PaTEH1A. Toutefois, pour être plus précis sur l'aspect quantitatif de ces observations il serait nécessaire de déterminer le niveau d'expression de chacun des variants dans ces différents tissus par PCR quantitative. La PCR quantitative en temps réelle (q-PCR) réalisée avec des amorces spécifiques de chaque variant permettrait d'évaluer le niveau d'expression relatif de PaTEH1A et PaTEH1B dans les tissus neuronaux. Lorsque nous avons examiné la distribution de la sous-unité PaTEH1 dans un type cellulaire, le neurone DUM, l'électrophorèse n'a révélé qu'une seule population de transcrit suggérant l'expression d'un seul des deux variants dans ces cellules. Le clonage et le séquençage ont montré qu'il s'agissait en fait d'un troisième variant, PaTEH1C. Ces résultats montrent une distribution tissulaire et cellulaire spécifique en fonction de la forme de la sous-unité.

F-2 Conservation du mécanisme de rétention d'intron entre les espèces d'insectes ?

Nous avons montré que le gène Patehl contient 2 exons, exon 1 et exon 2, séparés par un intron de petite taille. L'exon 2 est très court et code les 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1A. La rétention de l'intron conduit à une nouvelle extrémité C-terminale codée par une partie de l'intron qui contient un codon STOP. Pour déterminer si ce mécanisme est conservé chez d'autres espèces d'insectes nous avons étudié les séquences d'ADNg disponibles dans la banque de données GenBank. L'analyse de la séquence d'ADNg de D. melanogaster (numéro d'accession Dmal CG12806) révèle la présence d'un intron de grande taille (36 kb) séparant les deux exons contenus dans le gène Dmteh1. Le deuxième exon est, comme pour le gène Pateh1, de petite taille (73 pb) et code l'extrémité C-terminale de la protéine. L'examen de la séquence de l'intron montre la présence d'un codon STOP (TGA), 4 pb après le début de l'intron. Ces observations suggèrent qu'il pourrait exister, chez la drosophile, un variant de la sous-unité DmTEH1 issu de la rétention d'un intron. Chez la guêpe, N. vitripennis, deux transcrits correspondant à la sous-unité TEH1 ont été identifiés par annotation du génome. Ces deux transcrits nommés N_vTEH1.1 et N_vTEH1.2 dans cette étude diffèrent également au niveau de leur extrémité Cterminale (24 acides aminés). L'analyse de la séquence d'ADNg (numéro d'accession NC 015869) montre que le deuxième variant est vraisemblablement le résultat d'une rétention d'intron. En effet, dans l'intron de 20 kb, un codon STOP (TGA) est retrouvé 70 pb après le début de l'intron. Cette possible rétention est aussi présente chez A. gambiae (1 pb après le début de l'intron), et A. mellifera (74 pb après le début de l'intron). Contrairement aux gènes codant la sous-unité TEH1 chez d'autres espèces d'insectes, le premier exon du gène Phumtehl de P. humanus corporis est très court (19 pb). Il est séparé du 2^{ème} exon (881

pb) par un intron de 199 pb. Pour ce gène un codon STOP est également présent dans l'intron (50 pb après le début de l'intron), mais dans ce cas présent, la rétention d'intron conduirait à un peptide de 23 acides aminés qui ne possèderait probablement pas les propriétés d'une sousunité auxiliaire du canal Na_v.

Un autre mécanisme conduisant à deux variants a aussi été identifié chez *C. pipiens quinquefasciatus*. L'interrogation de type Blast réalisée dans la banque de données GenBank montre la présence de deux variants de TEH1 chez ce moustique. Ces deux variants (nommés CqTEH1A et CqTEH1B dans ce manuscrit), sont codés par deux gènes distincts contenant chacun deux exons séparés par un intron. Dans les deux gènes, l'exon 1 a la même taille et la même séquence. En revanche, dans le gène codant le variant CqTEH1A, l'intron fait 1511 pb et l'exon 2 fait 70 pb alors que le gène codant CqTEH1B contient un intron de 1584 pb et un exon 2 de 13 pb.

Le mécanisme de rétention d'intron est une forme d'épissage alternatif rare, dont la fréquence est inférieure à 5% chez les Vertébrés et chez les Invertébrés (Kim et coll., 2008 ; Khodor et coll., 2011). Toutefois, ce mécanisme a également été mis en évidence pour la sous-unité β 1 chez le rat et chez l'homme (voir Introduction, chapitre 1, paragraphe B-2-1-3-2, Kazen-Gillespie et coll., 2000 ; Qin et coll., 2003). Dans ces deux cas, la rétention d'intron conduit à une modification de l'extrémité C-terminale de la protéine qui induit un changement des propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺. Ces résultats montrent que la régulation fonctionnelle des canaux Na_v d'insectes par épissage alternatif est un phénomène conservé chez les mammifères et chez les insectes.

F-3 Effets de la modification de l'extrémité C-terminale sur les propriétés électrophysiologiques

En présence du variant PaTEH1B, une diminution d'un facteur 2,2 de la densité de courant Na⁺ est observée, comparé à PaTEH1A. Cette observation coïncide avec une diminution équivalente de l'incorporation de la sous-unité DmNa_v1-1 dans la membrane de l'ovocyte lorsque DmNa_v1-1 est injectée avec PaTEH1B. Les densités similaires des courants Na⁺ observées avec la co-expression de DmNa_v1-1 avec PaTEH1A ou l'un des variants tronqués montrent que l'extrémité C-terminale cytoplasmique des sous-unités PaTEH1 ne module pas l'expression des canaux Na_v. D'un autre côté, la nouvelle extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1B générée par la rétention d'intron conduit à une diminution de la densité de courant Na⁺. La nouvelle extrémité C-terminale de PaTEH1B pourrait interagir
avec d'autres protéines membranaires et ne plus être recrutée pour l'adressage de la sous-unité DmNa_v1-1 à la membrane.

Nous avons montré que les propriétés d'activation et d'inactivation de DmNav1-1 dépendent de son association avec les sous-unités auxiliaires. La dépendance au potentiel de l'activation est identique pour PaTEH1A et les mutants tronqués, alors qu'avec la sous-unité PaTEH1B elle est déplacée vers des potentiels dépolarisants. Ceci indique que l'extrémité Cterminale de PaTEH1A n'affecte pas les propriétés d'activation du canal Na_v, mais que celle de PaTEH1B les module. En présence des sous-unités DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B ou de l'un des deux mutants tronqués, la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide est peu modifiée, indiquant que l'extrémité C-terminale de ces protéines n'est pas impliquée dans la modulation de l'inactivation rapide. Nous avons montré que les $V_{1/2}$ de l'inactivation lente sont similaires avec DmTEH1, PaTEH1B et les mutants tronqués, alors que PaTEH1A déplace le V_{1/2} de l'inactivation lente vers des potentiels hyperpolarisants. Ceci indique que l'extrémité de PaTEH1B n'affecte pas l'inactivation lente du canal. Nous suggérons donc que l'extrémité C-terminale de PaTEH1A module les propriétés d'inactivation lente. Chez les mammifères, le changement d'extrémité C-terminale de la sous-unité B1A de rat conduit également à un déplacement des dépendances au potentiel de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels dépolarisants (Kazen-Gillespie et coll., 2000).

Le mécanisme de rétention d'intron apparaît donc comme étant un nouveau mécanisme capable de réguler l'excitabilité neuronale en modulant finement les niveaux d'expression, l'activation et l'inactivation lente des canaux Na_v. Ici, les sous-unités de type TEH1 déplacent les dépendances au potentiel de l'activation et de l'inactivation des courants Na⁺ vers des potentiels hyperpolarisants comparé à DmTipE (Olson et coll., 2008). De plus, les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Na⁺ sont accélérées avec TEH1. Toutes les études ayant permis la caractérisation des sous-unités principales de *D. melanogaster* et *B. germanica* ont été réalisées avec DmTipE, nous suggérons que les autres sous-unités auxiliaires pourraient changer les cinétiques et les propriétés d'ouverture et de fermeture de ces canaux Na_v.

F-4 Effets de la modification de l'extrémité C-terminale sur les propriétés pharmacologiques

Le bloc tonique de la lidocaïne est causé par la fixation de celle-ci sur le canal Na_v lors qu'il est à l'état de repos (Hille, 1977 ; Bean et coll., 1983). Ici, nous avons montré que la lidocaïne se fixe sur les canaux de drosophile à l'état fermé et qu'elle induit un décalage important de la dépendance au potentiel de l'activation, indiquant une importante dépendance au potentiel du bloc induit par la lidocaïne comme décrit précédemment (Bean et coll., 1983). Cet effet peut s'expliquer par son interaction avec les segments S4 des domaines III et IV (Sheets and Hanck, 2003). Le déplacement positif du V_{1/2} de l'activation par la lidocaïne a déjà été observé pour les canaux de mammifères Nav1.5 et Nav1.8 mais pas pour les canaux Nav1.7 (Chevrier et coll., 2004; Fan et coll., 2010). Le bloc phasique par la lidocaïne est expliqué par la fixation préférentielle sur l'état inactivé du canal Na_v (Bean et coll., 1983). Nos résultats montrent que la lidocaïne provoque un déplacement vers des potentiels hyperpolarisants des dépendances au potentiel de l'inactivation rapide et de l'inactivation lente. Ceci concorde avec les études précédentes montrant que le mécanisme d'action de la lidocaïne est de stabiliser les états d'inactivation rapide et d'inactivation lente (Balser et coll., 1996 ; Chen et coll., 2000). Ceci est renforcé par le ralentissement de la récupération de l'état inactivé rapide des canaux DmNav1-1. De façon surprenante, nos résultats montrent que les canaux DmNav1-1 ne récupèrent pas complètement en présence de lidocaïne. Ceci indique qu'une partie des canaux reste à l'état inactivé. Nos résultats montrent également que tous les canaux ne sont sensibles de la même façon à la lidocaïne en fonction de la sous-unité TEH1 co-exprimée avec la sous-unité principale. La plus faible sensibilité est observée avec la sousunité PaTEH1A, pour laquelle une plus faible proportion de canaux est bloquée dans l'état inactif que pour les autres combinaisons. L'idée que l'interaction entre α/β détermine la pharmacologique des canaux Nav est cohérente avec ce qui est observé chez les mammifères (Makielski et coll., 1996,1999 ; Lenkowski et coll., 2003). Donc, nos résultats montrent que le mécanisme par lequel la lidocaïne bloque les canaux Na_v semble être similaire chez les insectes et chez les mammifères comme cela a été récemment montré (Song et coll., 2011).

Nous avons montré ici que le DCJW n'a pas d'effet sur la dépendance au potentiel de l'activation des courants Na⁺ obtenus avec DmNa_v1-1/DmTEH1 ou DmNa_v1-1.PaTEH1A dans l'ovocyte de xénope. Ceci est cohérent avec les précédentes études réalisées dans l'ovocyte de xénope (*B. germanica*, Silver et coll., 2009) ou dans les neurones natifs de *P. americana* (Lapied et coll., 2001 ; Zhao et coll., 2005). Etonnamment, en présence du variant

Résultats et Discussion. Chapitre 1

PaTEH1B, nous observons une modification de l'activation par le DCJW. Donc, l'effet du DCJW sur l'activation dépend de la combinaison sous-unité principale/sous-unité auxiliaire. Contrairement à des observations précédentes, nos résultats montrent un déplacement modéré des dépendances au potentiel de l'inactivation rapide et de l'inactivation lente des courants obtenus avec la co-expression des sous-unités de type TEH1 avec DmNa_v1-1 (Song et coll., 2006 ; Silver et coll., 2009). De façon intéressante, la dépendance au potentiel de l'inactivation lente de la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH1B est plus sensible au DCJW que les autres. Ceci indique que les canaux Na_v formés par cette combinaison possèdent des propriétés d'inactivation lente distinctes, renforçant l'hypothèse selon laquelle le C-terminal généré par la rétention d'intron interagit avec la région de la sous-unité α impliquée dans l'inactivation lente.

CHAPITRE 2 : LES SOUS-UNITES AUXILIAIRES TIPE, TEH2, TEH3 et TEH4 CHEZ *P. AMERICANA*

Ce chapitre est dédié aux résultats obtenus lors de l'étude des quatre autres sous-unités auxiliaires du canal Na_v c'est-à-dire, la sous-unité TipE et les sous-unités TEH2, TEH3 et TEH4. La première partie, décrit la caractérisation de la sous-unité TipE chez *P. americana* par une approche moléculaire puis par une approche électrophysiologique. Dans un deuxième temps, le clonage des sous-unités TEH2 et TEH3 est détaillé. Enfin, le clonage de la sous-unité TEH4 est abordé dans la dernière partie de ce chapitre.

A- La sous-unité TipE

A-1 Clonage des ADNc codant la sous-unité auxiliaire PaTipE

A-1-1 Caractérisation des séquences nucléiques et protéiques déduites des deux transcrits isolés : PaTipE et PaTipEB

Les alignements des séquences protéiques des sous-unités homologues à DmTipE nous ont permis de concevoir des amorces dégénérées ciblant des régions conservées de cette sous-unité. Quatre amorces dégénérées ont été dessinées au niveau des segments transmembranaires et de la boucle extracellulaire des sous-unités homologues à DmTipE : deux amorces sens et deux amorces antisens. Pour amplifier une région conservée de la sous-unité TipE deux couples d'amorces ont été testés en réalisant une PCR avec un gradient de température (voir Matériel et Méthodes, chapitre 2, D-2-1). Un seul couple d'amorces (TP_3S et TP_5R, **Tableau 9**) a permis l'amplification d'une séquence d'ADNc dont la taille déduite à partir du gel d'électrophorèse était proche de celle attendue. Si les autres amorces dégénérées n'ont pas permis d'amplifier un fragment d'ADNc, cela peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, la dégénérescence des amorces peut être trop forte, et pour amplifier le fragment il faudrait donc augmenter considérablement la quantité d'amorce dans la réaction de PCR. Les amorces correspondant à la séquence d'intérêt ne représentent qu'une faible fraction de l'ensemble des amorces présentes dans le mélange. Par conséquent, l'amorce correcte peut ne pas se fixer sur l'ADN et donc ne pas amplifier la séquence recherchée.

Deuxièmement, la région n'est pas conservée chez *P. americana* donc les amorces ne peuvent pas se fixer.

Les amplicons obtenus avec le couple d'amorce TP 3S/TP 5R ont été clonés et cinq clones ont pu être séquencés. L'alignement des séquences des cinq clones a révélé un ADNc partiel de 417 pb (Figure 58). Les séquences nucléiques des cinq clones diffèrent cependant par des substitutions nucléotidiques ponctuelles (C remplace T, G remplace A et deux G remplace A). Une seule de ces substitutions engendre une modification de la séquence protéique (une sérine devient une proline). En conclusion, cet ADNc partiel possède une taille plus petite que la taille attendue, d'après la séquence de la sous-unité DmTipE (569 pb). Ce résultat n'est pas surprenant car les sous-unités homologues de la sous-unité DmTipE, dont les séquences sont disponibles dans les banques de données, présentent des tailles variables en acides aminés. En fonction des espèces, la séquence correspondant à cet ADNc partiel est comprise entre 131 acides aminés (Danaus plexipus) et 260 acides aminés pour Anopheles darlingii (Tableau 6). Une interrogation de type Blast de la banque de données Genbank réalisée avec la séquence protéique déduite de l'ADNc partiel conduit à l'identification des protéines homologues à DmTipE avec de fortes homologies. Cette analyse de la séquence de l'ADNc partiel isolé chez P. americana, par homologie à DmTipE indique que nous avons bien une sous-unité de type TipE. Nous l'avons donc appelée PaTipE. Cette première étape a été cruciale, car elle nous a permis de concevoir des amorces spécifiques pour amplifier les régions 5' et 3' des ADNc codant la sous-unité PaTipE (Tableau 10 et 12, Figure 58).



100 pb

Figure 58 Stratégie d'amplification de la sous-unité PaTipE.

Les segments transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs. Les traits pleins représentent les régions 5' et 3' non-codantes. La PCR réalisée avec les amorces dégénérées TP_3S et TP_5R a permis l'amplification d'un ADNc de 417 pb. Les 5' et 3'RACE-PCR ont permis d'amplifier respectivement des ADNc de 616 et 1206 pb. Les amorces TP_16S et TP_19R ciblant les régions non-codantes ont permis l'amplification d'une séquence de 1494 pb contenant un ORF de 1065 pb. Les amorces TP_17S et TP_18R ciblent l'ORF de la sous-unité PaTipE.

Les amorces TP_9R et TP_10R (**Tableau 10**) ont été dessinées pour réaliser une PCR emboîtée ciblant la région 5' (5'RACE). Les ADNc obtenus ont été clonés pour être séquencés. Ici, nous avons obtenu une séquence consensus de 616 pb contenant une partie non-codante (5'UTR de 214 pb) et le début du cadre ouvert de lecture contenant 402 pb (**Figure 58**). Une expérience de 3'RACE, avec les amorces TP_14S et TP_15S (**Tableau 12**) a été réalisée selon le même principe que précédemment. Un fragment d'ADNc de 1206 pb a été obtenu. Il contient une partie codante de 469 pb correspondant à l'extrémité 3' de la protéine et une région 3'UTR de 737 pb (**Figure 58**). Ce 3'UTR inclut un signal de polyadénylation (aataaa), 263 pb en amont d'une queue polyA de 24 nt (**Figure 59**).

A ce jour, les expériences de clonage et de RACE-PCR n'ont été menées que chez deux espèces d'insecte : *D. melanogaster* (Feng et coll., 1995a) et *M. domestica* (Lee et coll., 2000). Chez *D. melanogaster*, les régions non-codantes en 5' et en 3' de la sous-unité DmTipE contiennent respectivement 1045 pb et 1549 pb (Feng et coll., 1995a). Chez *M. domestica*, la sous-unité MdTipE (Vssc β) possède une région 5'-UTR contenant 616 pb et une région 3'-UTR contenant 1511 pb. Les régions non-codantes identifiées pour la sous-unité PaTipE sont plus courtes que pour ces deux espèces que ce soit du côté 5' ou du côté 3'.

Deux couples d'amorces spécifiques ciblant d'une part les régions non-codantes encadrant le cadre ouvert de lecture de la protéine et d'autre part l'intégralité du cadre ouvert de lecture ont alors été conçus (**Tableau 14 et 15**). Les amorces TP_16S et TP_19R ont permis l'amplification d'une séquence de 1494 pb qui a été clonée dans le vecteur pCR[®]4 TOPO[®] puis séquencée. L'ORF a une taille de 1065 pb et code une protéine de 355 acides aminés. Une analyse de type BLAST réalisée avec cette séquence protéique complète de PaTipE indique que cette séquence présente de forte homologie de séquence avec des sous-unités TipE chez d'autres espèces et en particulier des hyménoptères, telles qu'*Apis florea* (64%), *N. vitripennis* (63,6%) et *B. terrestris* (63,1%). Chez les mammifères, les séquences protéiques des sous-unités β partagent plus de 90% d'homologie d'une espèce à l'autre. En revanche, l'homologie est assez faible entre les sous-unités β 1 à β 4 (voir Introduction, chapitre 1, B-2-1-1).

Par la suite, nous avons utilisé le couple d'amorces TP_17S et TP_18R pour amplifier le cadre ouvert de lecture de PaTipE (**Tableau 15**). Ces deux amorces contiennent à leur extrémité les sites de restriction *Xma*I et *Xba*I pour un clonage unidirectionnel dans le vecteur d'expression pGEM-HE (voir Matériels et Méthodes). Sur 15 clones analysés, un clone s'est révélé être différent des autres au niveau de son extrémité 3', conduisant à une extrémité Cterminale différente des autres. Nous avons appelé ce nouveau variant PaTipEB. Celui-ci présente une séquence supplémentaire de 78 nucléotides insérée après le nucléotide 1001 (encadrée en rouge, **Figure 59**). Après cette séquence se trouve la séquence codant l'extrémité C-terminale du variant PaTipE (encadrée en bleu, **Figure 59**) et une partie de la région non codante qui devient codante (encadrée en vert) pour le variant PaTipEB (**Figure 59**). L'insertion de cette séquence de 78 nucléotides modifie le cadre de lecture, ce qui déplace le codon STOP dans la région identifiée comme 3'UTR. En conclusion, les extrémités C-terminales de PaTipE et PaTipEB diffèrent par leur taille (PaTipE, 20 aa ; PaTipEB, 62 aa) et leurs séquences (**Figure 59**). L'alignement de la séquence protéique du variant PaTipEB montre une homologie de séquence de 84,1% avec PaTipE et de 36,2% avec DmTipE.

L'analyse bioinformatique des séquences protéiques des sous-unités PaTipE et PaTipEB suggère la présence de trois sites putatifs de N-glycosylation ¹⁵(triangles inversés vert, **Figure 59**) pour les deux variants. L'extrémité C-terminale particulière du variant PaTipEB possède trois sites putatifs de phosphorylation pour la protéine kinase C ¹⁶ (ronds orange, **Figure 59**) qui ne sont pas trouvés pour la séquence de PaTipE. La localisation des sites de N-glycosylation dans la boucle extracellulaire, de même que celle des sites de phosphorylation dans l'extrémité C-terminale intracellulaire, confirme l'orientation de la protéine PaTipE.

¹⁵ http://www.cds.dtu.dk/services/NetNGlyc

¹⁶ http://www.cds.dtu.dk/services/NetPhos



Figure 59 Alignement des séquences nucléiques et protéiques des sous-unités PaTipE et PaTipEB. Les séquences des sous-unités PaTipE et PaTipEB sont identiques jusqu'au nucléotide 1001, puis les deux variants présentent des extrémités C-terminales différentes. Cette différence est liée à l'insertion d'une séquence de 78 nucléotides (encadrée en rouge) dans le variant PaTipEB. Les régions en lettres minuscules correspondent aux régions 5' et 3' non codantes de la protéine. Un site de polyadénylation est localisé 263 pb en amont d'une queue polyA de 24 pb. Les segments transmembranaires TM1 et TM2 sont soulignés en noir. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par des triangles verts (\checkmark) et les sites de phosphorylation par des ronds orange (\bullet).

A-1-2 Analyse des variants PaTipE et PaTipEB

A-1-2-1 Origine des deux variants

L'insertion d'une séquence supplémentaire au niveau du 3' de l'ORF du variant PaTipEB rappelle le phénomène de rétention d'intron observé pour la sous-unité PaTEH1 (voir Résultats et Discussion, chapitre 1). Nous avons tout d'abord pensé que cette séquence supplémentaire pouvait également être due à une rétention d'intron (**Figure 60A**). Dans cette séquence de 78 pb les nucléotides constituant le site donneur d'épissage en 5' (GT) et le site accepteur d'épissage en 3'(AG) ne sont pas présents. Celle-ci débute par les nucléotides GG et se termine par les nucléotides AC. De plus il n'y a pas de séquence correspondant au site de branchement (YNCURAY¹⁷) (Cartegni et coll., 2002). Même si la proportion en pyrimidine est importante dans la partie 3' de ce fragment, l'ensemble des données indiquent qu'il ne s'agit pas d'un intron transformé en séquence codante par rétention.

Par conséquent, notre hypothèse est que cet insert de 78 pb correspond à un exon du gène *PaTipE*. Ceci induit trois possibilités :

- cet exon peut être épissé (PaTipE) ou non (PaTipEB) (Figure 60B).

- cette séquence de 78 pb peut être une partie d'un exon qui possède un site accepteur ou un site donneur alternatif (**Figure 60C**).

- un deuxième gène issu d'une duplication du gène *PatipE* code le variant PaTipEB (**Figure 60D**).

¹⁷ Y : pyrimidine (T ou C) ; R : purine (A ou G) ; N : nucléotide aléatoire (A, T, G ou C).



A – Rétention d'intron

C – Site donneur (haut) ou accepteur alternatif (bas)



Figure 60 Hypothèse sur les mécanismes conduisant aux variants PaTipE et PaTipEB. A. Rétention d'intron. B. Saut d'exon. C. Site donneur ou accepteur alternatif. D. Famille multigénique.

L'analyse de type Blast réalisée avec la séquence protéique (GASRLASRGKLSTRRGLKGCPRKNVYH) codée par cette séquence de 78 pb montre que cette séquence n'est pas présente chez d'autres espèces d'insectes au niveau du gène *tipE*. De plus, les faibles scores (40 et moins) et les valeurs élevées des « e-value » (supérieure à 1) suggèrent que la similarité entre les séquences est le résultat du hasard (**Tableau 26**).

Tableau 26 : Résultats de l'interrogation blast réalis l'insert de 78 pb.	ée avec la	séquence pro	otéique	déduite de
Description	Score	% de	E value	Identité

Description	maximal	recouvrement*	E value	maximale
Hypothetical protein [Halomonas sp. KM-1]	34,6	40%	1,2	100%
Hypothetical protein THAOC_04162 [Thalassiosira oceanica]	32,0	66%	8,8	61%
Hypothetical protein THAOC_00730 [Thalassiosira oceanica]	32,0	66%	9,0	61%
Putative BolA protein [Neofusicoccum parvum UCRNP2]	31,6	77%	12	62%
GI11265 [Drosophila mojavensis]	31,6	55%	12	62%
Hypothetical protein [Photobacterium profundum]	31,6	37%	13	100%
Hypothetical protein PBPRA2016 [Photobacterium profundum SS9]	31,6	37%	13	100%
Hypothetical protein [Photobacterium damselae]	31,6	37%	13	100%
Hypothetical protein [Photobacterium leiognathi]	31,6	37%	13	100%
Hypothetical protein [Photobacterium angustum]	31,6	37%	13	100%
Hypothetical protein [Photobacterium sp. SKA34]	31,6	37%	13	100%
Integrator complex subunit, putative [Phytophthora infestans T30-4]	31.6	81%	13	59%

* Le pourcentage de recouvrement correspond aux nombres d'acides aminés de la séquence qui s'aligne avec notre séquence d'intérêt par rapport à la taille totale de la protéine.

Une analyse de la structure du ou des gènes *PatipE* aurait dû permettre de conclure. Cependant, une PCR emboîtée réalisée sur l'ADNg avec les amorces TP_16S/TP_19R (pour la PCR1) et TP_18S/TP_19R (pour la PCR2) n'a malheureusement pas permis l'amplification d'une séquence d'ADN. Celles-ci auraient permis de déterminer la localisation et la taille des introns et donc de déduire l'organisation génomique du gène *tipE* chez *P. americana*. L'absence de succès des PCR peut s'expliquer par la présence d'intron de grande taille comme par exemple chez *C. pipiens quinquefasciatus* où le deuxième intron est constitué de plus de 7000 pb¹⁸.

La deuxième hypothèse est que l'insert est présent dans un deuxième gène *PatipE*. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une hybridation Southern qui n'a malheureusement donné aucun résultat exploitable. En effet, comme indiqué dans le chapitre 1, les quantités d'ADNg utilisées pour l'hybridation étaient sans doute trop faibles. Le séquençage complet du génome de *P. americana* nous permettrait d'éliminer avec certitude plusieurs hypothèses et donc de conclure quant à l'origine des variants PaTipE et PaTipEB.

¹⁸ Recherche réalisée sur www.ncbi.nlm.nih.gov.

A-1-2-2 L'ADNc codant l'extrémité C-terminale de la sousunité PaTipEB code également l'extrémité C-terminal d'une autre protéine

Une analyse de type BLAST a été réalisée sur les 62 acides aminés formant l'extrémité C-terminale particulière du variant PaTipEB. Celle-ci a dans un premier temps révélé la plus forte homologie avec les sous-unités homologues à TipE chez deux espèces de fourmis, *Acromymex echiniator* (AeTipE) et *Harpegnathos saltator* (HsTipE). Un alignement de ces séquences montre que la sous-unité PaTipEB présente une extrémité C-terminale similaire à celle des sous-unités AeTipE (70%) et HsTipE (73%) (**Figure 61**).

```
AeTipEREDLASFGHQLKVAMADDISRESLDGIPNSLSIQGFTFVFTFQKLEQDDDDEYLNSPWAD60HsTipEREDLASFGHQLKVAMADDISRESLDGIPNSLSVQGLLF---FQKLEQDDDDEYLNSPWAD57PaTipEBASRLASRG---KLS----TRRGLKGCPRKN-----VYHKLEQDDDDQYLNAAWAD43AeTipEGSSLKRHFQGLNNISWRPH79HsTipEGGSLKRHFQGLDNISWRPH76PaTipEBSGSLKKSFHGLSNISWRPK62
```

Figure 61. Alignement des extrémités C-terminales des sous-unités PaTipEB, AeTipE et HsTipE. Les régions grisées correspondent aux acides aminés conservés entre les trois protéines. Les tirets indiquent l'emplacement des espaces introduits pour optimiser l'alignement.

Dans un deuxième temps, cette analyse a permis de mettre en évidence une région conservée, appelée DUF2870 dans la banque de données Genbank. Cette région appartient à une protéine présente chez les insectes et chez les mammifères. Chez la drosophile, cette région partage 57,1% d'homologie de séquence protéique avec celle de l'homme. Chez les mammifères cette protéine est codée par le gène c210rf59 et son orthologue chez *D. melanogaster* est appelé CG18675. Les protéines codées par ces deux gènes possèdent 49% d'homologie de séquence. Chez les insectes comme chez les mammifères, la fonction de cette protéine n'est pas encore connue. Cependant, plusieurs études ont montré que l'expression de ce gène est reliée à plusieurs pathologies humaines. En effet, cette protéine a été trouvée en quantité importante dans la moelle osseuse de patients atteints de leucémie (Bullinger et coll., 2004). De plus, chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'expression de la protéine c210rf59 est diminuée dans les cellules sanguines (Maes et coll., 2007 ; Maes et coll., 2009). En outre, le gène c210rf59 serait situé dans une région importante dans le syndrome de Down (Moncaster et coll., 2010).

Dans une étude récente, Li et coll. (2011) ont montré que chez *D. melanogaster* le dernier intron du gène CG18675 contient les gènes codant les sous-unités TipE, TEH2, TEH3

et TEH4 et un gène codant une pompe ATPase H⁺ (**Figure 62**). Cet arrangement particulier est conservé pour la plupart des espèces d'insectes (les moustiques, les drosophiles, les abeilles, les guêpes et le puceron du pois, *A. pisum*), à l'exception de *B. mori* et de *T. castaneum* (Li et coll., 2011). Chez les espèces d'insectes possédant cet arrangement, les gènes orthologues à CG18675 et *tipE* possèdent des régions non codantes et codantes communes. Cependant, les cadres ouverts de lecture des deux ADN sont différents et conduisent à deux peptides terminaux distincts. Dans notre étude, l'insertion des 78 nucléotides chez le variant PaTipEB induit un décalage du cadre de lecture conduisant à une modification de l'extrémité C-terminale de la protéine qui devient très proche de celle de la protéine c21orf59 chez l'homme et de la protéine CG18675 chez *D. melanogaster*. Cette observation suggère donc qu'il existe un gène orthologue à CG18675 chez la blatte *P. americana* avec un arrangement conservé.



Figure 62 Arrangement des gènes codant les sous-unités auxiliaires chez les insectes : exemple de la drosophile. A. Chez la Drosophile, les gènes *tipE*, *teh2*, *teh3 et teh4* sont situés au sein du gène CG18675. B. Les gènes codant les sous-unités auxiliaires sont localisés dans l'intron 3 du gène CG18675. Le deuxième exon du gène *tipE* partage sa séquence nucléotidique avec celle de l'exon 4 du gène CG18675. Le cadre ouvert de lecture de chaque gène détermine la séquence protéique codée par ce dernier exon. En plus des gènes codant les sous-unités auxiliaires du canal Na⁺, cet intron renferme le gène d'une pompe ATPase H⁺. Les introns sont représentés en bleu clair et les exons en bleu foncé. Les flèches indiquent l'orientation des gènes.

A-1-3 Diversité moléculaire : un polymorphisme nucléotidique est observé chez la sous-unité PaTipE

Comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes, deux amplifications de l'intégralité du cadre de lecture ont été réalisées avec deux polymérases différentes. Avec l'amplification réalisée avec la polymérase Advantage, nous avons séquencé dix clones correspondant à l'intégralité du cadre de lecture (amorces TP 17S et TP 18S) et 10 clones correspondant au cadre de lecture flanqué des régions 5' et 3' non-codantes (amorces TP 16S et TP_19R). Pour quatre de ces clones, les données obtenues au séquençage n'étaient pas exploitables. De plus un clone présentait une mutation au niveau du codon d'initiation (A substitué par un G) et deux autres clones présentaient chacun une délétion d'un nucléotide (G en position 343 et T en position 499) conduisant à l'apparition d'un codon de terminaison prématuré. Ces deux délétions donnent lieu à deux protéines tronquées, constituées de 175 acides aminés. Un autre clone présentant une insertion de 78 nucléotides correspondait au variant PaTipEB. Parmi les douze clones restants, trois substitutions nucléotidiques ont été observées chez plusieurs clones : quatre clones présentaient une substitution d'un C par un T en position 87, trois clones présentaient une substitution d'un G par un A en position 450 et deux clones présentaient une substitution d'un C par un T en position 744 (Tableau 27). Ces trois mutations sont silencieuses donc elles ne modifient pas la séquence de la protéine. En revanche, 29 autres mutations ponctuelles, dont 18 modifiant la séquence protéique, ont été identifiées chez ces douze clones (Tableau 27).

Nous avons tout d'abord pensé que les mutations ou substitutions étaient dues à des erreurs de la polymérase utilisée. Pour vérifier cette hypothèse, les amplifications ont été refaites avec une ADN polymérase possédant une activité 3'-5' exonucléase et de relecture lui conférant une faible fréquence d'erreur. De plus, cette ADN polymérase (la KOD Hot start DNA polymérase de Novagen) présente également une propriété « hot start », c'est-à-dire une activation par la chaleur qui minimise la production de produits non spécifiques. Les ADNc amplifiés avec les amorces TP_17S et TP_18R ont été clonés, puis séquencés. Sur sept clones séquencés (pGTipE11 à pGTipE17) plusieurs mutations ont encore été observées. Tout d'abord, les sept clones contenaient les substitutions identifiées lors de la première amplification, indiquant que ces trois substitutions ne sont pas dues à des erreurs de la polymérase. Par exemple, un clone présentait une substitution d'un C par un T en position 744 et deux clones présentaient la substitution d'un C par un T en position 744 (**Tableau 27**). Ces trois

substitutions sont silencieuses. Au niveau de ces sept clones nous avons également identifié sept nouvelles mutations ponctuelles dont six qui modifient la séquence protéique (**Tableau** 27).

La mise en évidence de nombreuses substitutions dans les ADNc avec des ADN polymérases différentes suggère un polymorphisme nucléotidique individuel. Les ADNc ont été produits à partir de 15 individus. Certaines des substitutions observées (A par G et C par T) suggèrent un phénomène de régulation du gène par édition de l'ARNm qui est mécanisme fréquent chez les insectes (Hanrahan et coll., 2000 ; Palladino et coll., 2000 ; Dong, 2007 ; Es-Salah et coll., 2008 ; Olson et coll., 2008 ; Ramaswami et coll., 2013). L'édition d'ARN est une modification post-transcriptionnelle qui correspond à l'insertion, la délétion ou la substitution ponctuelle d'un nucléotide au niveau de l'ARN primaire (Bass, 2002). La substitution des nucléotides repose sur des désaminations convertissant la cytosine (C) en uracile (U) et l'adénosine (A) en inosine (I). Dans les séquences d'ADNc que nous avons isolé, l'uracile a été remplacé par la thymidine (T) et l'inosine (I) par la guanosine (G). Pour confirmer ces éditions de l'ARNm, le gène PatipE doit être séquencé chez chaque individu. Pour une question de temps, nous n'avons pas pu réaliser cette expérience, mais nos arguments sont assez forts pour prétendre à une régulation par édition d'ARN. C'est la première fois que ce mécanisme de modification post-transcriptionnelle est mis en évidence pour la sous-unité auxiliaire du canal Na_v chez l'insecte.

De nombreuses éditions d'ARN ont été mises en évidence chez la sous-unité principale du canal Na_v chez la drosophile et chez *B. germanica*. Ce mécanisme contribue à la diversité moléculaire et fonctionnelle des canaux Na_v d'insectes. Il a par ailleurs été montré que les variants issus d'une édition d'ARN présentent des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques différentes (Song et coll., 2004 ; Song et coll., 2006). Chez les mammifères, aucune étude n'a montré l'existence de l'édition d'ARN chez les canaux Na_v.

N	Nucléoti	des présents aux po	Mutations ponctuelles		
Nom du cione	87	450	744	Nucléotidique	Protéique
nGTinE2	C	۸	т	A574G	K192E
ponpez	0	~	1	A914T	Q305L
				C567T	m.s
nGTinF4	т	G	C	C692T	A231V
ponper		0	0	T846C	m.s
	-	-		A919G	K307E
pGTipE5	С	A	Т	G891A	m.s
				G9A	m.s
	_			183C	F28S
pGTipE6		G	С	1583A	S195C
				1836C	P279L
				A1021G	T341A
pGTipE7	т	G	С	A380G	H127R
p • · · p = ·		-	-	A475G	M159V
				G459A	m.s
nGTinE9	С	G	С	A653G	D218G
ponpeo	Ũ	U	Ŭ	A767G	D256G
				A946G	R316G
nGTinE10	т	G	C	C192T	m.s
periperio	1	0	0	G591A	m.s
n4TinE-2	C	Δ	т	A733G	T245A
		~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	•	G900A	m.s
p4TipE-3	С	A	Т	G900A	m.s
p4TipF-4	С	G	С	T211C	S71P
·····	-	-	-	G459A	m.s
p4TipE-5	T	G	C	C765T	m.s
p4TipE-9	С	A	T	G900A	m.s
				A318G	m.s
				G459A	m.s
n4TinF-10	C	G	С	A647G	E216G
pp=	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	C C	C C	A655G	V219M
				G817A	A273T
				A933G	m.s
pGTipE11	C	A	Т		
pGTipE12	C	G	C	A323G	E108G
pGTipE13	С	A	С		
pGTipE14	С	А	т	G67A	V23I
ponperi			•	G900A	m.s
				A318G	m.s
pGTipE15	Т	G	C	G320A	G320A
				C791T	A264V
pGTipE16	C	G	С	A413C	D138A
pGTipE17	С	G	С	A347G	E116G

Tableau 27 Mutations répertoriées pour les clones de la sous-unité PaTipE

G7A signifie G est remplacé par A à la position 7. m.s : mutation silencieuse

#### A-2 Analyse de la structure des sous-unités PaTipEB

#### A-2-1 Profil d'hydrophobie

L'analyse des profils d'hydrophobie des deux variants PaTipE et PaTipEB révèle sans ambigüité la présence de deux domaines hydrophobes correspondant aux segments transmembranaires TM1 et TM2 (**Figure 63A**). Nous avons également noté que le segment transmembranaire TM2 est entouré de deux régions relativement hydrophobes par rapport au centre de la boucle extracellulaire qui est au contraire plutôt hydrophile. De plus, les profils d'hydrophobie des deux variants sont très similaires à celui déterminé pour la sous-unité DmTipE, indiquant une conservation structurale (**Figure 63B**).



**Figure 63.** Profil d'hydrophobie des sous-unités auxiliaires de la famille TipE. A. Profils d'hydrophobie des sous-unités PaTipE et PaTipEB. Les extrémités C-terminales des deux variants diffèrent par leurs tailles (PaTipE, 20 aa ; PaTipEB, 62 aa) et leurs séquences. B. Profil d'hydrophobie de la sous-unité DmTipE. Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont indiqués sur chaque profil. Ils correspondent aux régions pour lesquelles l'hydrophobie est la plus élevée.

### A-2-2 Analyse des régions conservées de la sous-unité TipE entre les espèces d'insecte

Un alignement multiple des séquences protéiques de PaTipE et des sous-unités TipE chez *D. melanogaster*, *M. domestica*, *A. aegypti*, *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus pipiens*, *B. terrestris*, *A. florea*, *N. vitripennis*, *A. pisum*, *P. humanus corporis* et *T. castaneum* a permis d'établir un niveau d'identité de séquence en acides aminés très élevé de ces dernières avec les sous-unités PaTipE et PaTipEB. La plus forte identité de séquence partagée concerne la sous-unité AfTipE (64 et 54,5%) et la plus faible avec ApTipE (25,4 et 22,4%). Cet

alignement permet également de mettre en évidence les motifs conservés de la sous-unité auxiliaire TipE (**Figure 64**). Cette analyse montre qu'il existe une relation d'homologie entre nos deux nouvelles protéines, PaTipE et PaTipEB, et les protéines identifiées comme des homologues de DmTipE.

Toutes les sous-unités TipE présentent une extrémité N-terminale très courte (une vingtaine de pb) à l'exception de la sous-unité ApTipE (**Figure 64**). Les homologies de séquence entre les régions N-terminales de la sous-unité PaTipE et celles des sous-unités orthologues à DmTipE sont supérieures à 50% indiquant que cette région a subit une pression de conservation peu élevée (**Tableau 28**). La taille de cette région est relativement conservée sauf chez le puceron, ce qui impacte son homologie ou identité avec les autres séquences de notre étude (**Tableau 28**). Contrairement à la sous-unité DmTipE qui possède quatre charges positives (3 portées par des lysines et 1 portée par une arginine), l'extrémité N-terminale de la protéine PaTipE ne possède qu'une seule charge positive (portée une lysine). Chez les autres sous-unités auxiliaires, les groupes de charges positives portées par la lysine, l'arginine ou l'histidine fonctionneraient comme des signaux d'exportation du réticulum endoplasmique (Maurer-Stroh et coll., 2004 ; Derst et coll., 2006).

Deuxièmement, les segments transmembranaires M1 et M2 des sous-unités PaTipE et PaTipEB sont, quant à eux, particulièrement conservés. Ils partagent entre 84 à 92% d'homologie de séquence pour le segment M1 et 86 à 95% pour le segment M2 (**Tableau 28**). Encore une fois, la plus faible homologie est observée avec le puceron pour lequel la sousunité ApTipE partage 72% pour le segment M1 et de 54% pour le segment M2 d'homologie de séquence avec PaTipE ou PaTipEB (**Tableau 28**).

é
ns
T
at c
0, 0
ť
Ä
ŝ
S
Sic
ă
$\sim$
ž
а В
Ŧ
ъ,
Ν

_

	M1 * * * * *	
PaTipE	MDEP-EIEOTLAOKLLFYTAFFVLLGTSSLFAFLFVPFVIDPAFTTIFMOFDPVALCOTVHTTRHGASNCTWSSCREGCTKEVVFCTOTRVNVKILPPVKOEGEEGNAG-EDEGTD	119
DmTipE		120
MdTipE		120
AaTipE		119
AqTipE		119
CqTipE		120
NvTipE		115
AfTipE		120
BtTipE		120
ApTipE	MDDDGPAAVDDAAAAIEKQLEQQQREEAERKRLEELRERVLFYLTFFILLGIVSLFVFLFLVPFLIEPAITTLLMEFDETPTTCVTAYSQIREGASNCSLPGGWASCREGCTREIYFCAQIFVNYTVPEDRAGDLNARHRRSLLVRGYR	150
PhumTipE		122
TcTipE	MEEAPE-IKQTWQQKLLFYT <mark>TAFFVLLGTFSLFSFLFLVPFVID</mark> PAFTIFMEFDETPVLCMTVRVDRRLGVSNCSWTSCREGCTKDIYIC <mark>CTQ</mark> ILVHYKKVPPDY	104
		174
ParipE		1/4
MdTipE		220
MaripE		231
AaripE		220
ComipE		207
NuTion		176
AfTipE		182
BtTipE		182
ApTipE		169
PhumTipE	DELOSSSRIRKRSTFHYLFKMAETYESFFNRDRYNORETRA	201
TCTipE		1.5.9
- 1	* * * M2	
PaTipE	NVK <mark>C</mark> ; YPPMLNCSIFVKMYCEPGTNFS <mark>C</mark> YYSKVDPGLVMSELDMWQVYMNLVYAMAIPIPSFIISVIYLTFAYFKIYNDDDEEALVNAAGETVEGDAAENGETVEGDAAENG	276
DmTipE	NVKGCSYPPMLNCTIWLKRYTKIGMKFFCYYSKVDFSLVISDLDYWONTLNLVYSMAIPIPSFIISVIYLTYAYFKIYNEDEETAPLDKNAEDMDIDDIDAVDDSDGAVLADNVAGSQIINM-DSTTNDSCLEG	358
MdTipE	NVKGCSYPPVLNCTIWFKRYTKLGVKFFCYSKVDFSVVISELDYWONTLNLIYSMAIPIPSFIISVIYLTYAYFKIYNEDEETAPLDKNAEDMDIDD-EGVDDSDGAALADNAAGSOVINMHDSTTGESCIVDG	365
AaTipE	NVK <mark>C</mark> SYPPILNCTIWTKKYWKIGTNFT <mark>C</mark> FYSRVDPGLVISDLDMWQNTLM <mark>IVYAMAIPIPSFIISVIYLAFAY</mark> FVIFNEDEEAALLDKNGEEEEGIEDEMDETDEGNDNKIN-ESEAEITANHISDNNVVEDG	359
AgTipE	NVK <mark>C</mark> SYPPILNCTIWTKKYWTIGTNFS <mark>CY</mark> YSRVDPELVISDLDMWQNTLM <mark>I</mark> LVYAMAIPIPSFIISVIYLAFAY <mark>F</mark> VIFNEDEEAGLLDKNGEDEAGEDDLEQETDEGNDNKINNENEVEVTANHINEKQQQQSADEENGVHTTTTTPIQ	417
CqTipE	NVKGC SYPPMLNCTIWTKKYWKIGNNFTCYSSNDPGLVISDLDMWQNTLMIVFAMAIPIPSFIISVIYLAFAYEVIYNEDEEAALLDKNGEEE-GTEDELAETDEGNDNKIN-ESEAEITANHINENNVDGGGNTAPTTTTTPVQQ	373
NvTipE	NVK <mark>CC</mark> \$YPPMLNCTIFIRQYATLGQNFS <mark>CY</mark> YSKVNPGIVISDLDMWQVYM <mark>N</mark> LVYAMAIPIPSFIISVIYLTIAY <mark>F</mark> KIYNEDEVALVGAEEDGGQGEEGTDMEAGND	282
AfTipE	NVK <mark>CC</mark> \$YPPMLNCSIFYRQYAIIGQNFS <mark>CY</mark> YSKVDPGIVISDLDMWQVYM <mark>N</mark> LVYAMAIPIPSFIISVIYLTIAY <mark>F</mark> KIYNEDEVVLVGGEEGEEGGEGEGSN	283
BtTipE	NVK <mark>GC</mark> 3YPPMLNCSIFYRQYANIG <u>ONFSCY</u> YSKVDPGIVISELDMWQVYM <mark>N</mark> LVYAMAIPIPSFIISVIYLTIAY <mark>F</mark> KIYNEEEVVLVGGEEGEDGGEGEGSN	283
ApTipE	NVK <mark>CC</mark> SYPPHLNCTEFRNRYFEVGASYF <mark>CY</mark> YSRKEPWVVITELDLAKSTR <mark>C</mark> LVYSMVFPIPCFVVSVVVALAY <mark>F</mark> CVVAGRHRKPKVKRRVVRRMVGGGGATGSGACYGPGGSASRAKSAGSEATPLTNNSGAAAAPSSPTGTG-TPGSE	318
PhumTipE	NVK <mark>CC</mark> \$YPPILNCSIFLKTYKTIGTNFS <mark>CY</mark> FSRIDPSLVINEFDLDQVYLNLIYAMAIPIPSFIISVVYLTIAY <mark>E</mark> VIYAEEPPPKPRIISPSMPSMPSM	294
TcTipE	NVK <mark>GC</mark> \$YPPMLNCSIFLKLYKGLGTNYTCYYSRVDPSMVISHLDMWQVYMNLVYAMAIPIPSFILSVIYLAIAYFKIYNDDEETAPLEKNAEAMDVEGE <u>S</u> G	260
PaTipE	ADAVPVIANSNSIPGNLSKTMATSISTPDGPIAEV* 355	
DmTipE		
MdTipE		
AaTipE	LUPNGTANSITNVNNTNTNTTATTNTNGSSKPITPNSTSDMNSFGHOLKVKMADEMSRESIDGGLLSNSASIOG	
AgTipE	PLPNGTANSINNINTTATTNINGSSKPITPNSTSDLNSFGHOLKVKMADEMSRESIDGGLLSNSASYOGNISKIMITSISTPDGPIAAV* 507	
CqTipE	QLPNGTANSITNMNNTNTNTTATTNTNGSSKFITPNSTSDLNSFGHQLKVKMADEMSRESIDGCLLSNSASIOGNLSKTMTTSISTPDGPIAAV* 468	
NvTipE	GTPIP-PASGAITPGSEAFREDLASFGHOFKVAMADDISRE	
AfTipE		
BtTipE		
ApTipE	PLYRRRGDENEDDDTSGTYYGDQLRSTLAVDDSAADYVNALRLSEHTLRQSDSNEPSRGEWSDADGDCDDDDCEASVCDSSLEQSRKTVSATAPTAPFPTNSTGNITKTMTTCLLTPPGPTAEV* 443	
PhumTipE		
TcTipE		

Figure 64 Alignement multiple des séquences protéiques de la sous-unité PaTipE et des sous-unités DmTipE, MdTipE, AaTipE, AgTipE, CqTipE, NvTipE, AfTipE, BtTipE, ApTipE, PhumTipE et TcTipE. L'alignement à été réalisé avec la méthode ClutalW implémentée dans le logiciel BioEdit. Les résidus d'acides aminés identiques sont surlignés en gris foncé et les résidus similaires sont surlignés en gris clair. Les domaines transmembranaires M1 et M2 sont encadrés en rouge. Les  $\frac{1}{2}$  cystines conservées entre les sous-unités TipE sont signalées par une étoile (*). Celles qui sont connues pour former des ponts disulfure chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa sont encadrées en jaunes (Derst et coll., 2006). Les triangles inversés verts ( $\checkmark$ ) représentent les sites de N-glycosylation conservés entre les espèces.

Troisièmement, la boucle extracellulaire des sous-unités TipE présente 30 à 60% d'homologie de séquence avec celle de PaTipE (**Tableau 28**). L'alignement des séquences protéiques montre que les extrémités de la boucle extracellulaire des sous-unités sont très conservées alors que le centre de cette boucle ne l'est pas du tout. D'une part, la taille de la boucle extracellulaire de la sous-unité TipE est très variable d'une espèce à l'autre (149 à 273 résidus d'acides aminés). D'autre part, on retrouve au sein des régions les plus conservés, huit  $\frac{1}{2}$  cystines qui sont présentes dans la boucle extracellulaire des autres sous-unités orthologues (**Figure 64**). Les quatre  $\frac{1}{2}$  cystines qui sont encadrées en jaune sont également présentes dans la boucle extracellulaire de la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa. Ces  $\frac{1}{2}$  cystines sont certainement engagées dans des ponts disulfures, suggérant leur importance dans la structure tertiaire des protéines TipE. Enfin, les trois sites de N-glycosylation identifiés chez PaTipE sont conservés chez la majorité des espèces d'insectes (triangles inversés verts, **Figure 64**).

Quatrièmement, la région C-terminale de la sous-unité TipE est relativement peu conservée entre les espèces (**Tableau 28**). Chez les sous-unités de la famille TipE l'extrémité C-terminale est relativement longue (plus d'une centaine d'acides aminés). La longueur de cette région varie d'une espèce à l'autre et présente 3 domaines assez bien conservés (**Figure 64**). Les extrémités de la région C-terminale ainsi que 22 résidus consécutifs de la région centrale sont très conservés. Contrairement à la sous-unité TEH1 pour laquelle l'extrémité C-terminale était très différente d'une espèce à l'autre, les 20 derniers acides aminés de la sous-unité TipE sont très conservés entre les espèces.

Eanàana d'inagata	N-	N/1	Boucle M2 -		C-terminale		Total		
Espèces d'insecte	terminale	IVI I	extracellulaire	IVIZ	PaTipE	PaTipEB	PaTipE	PaTipEB	
D melanogaster	52,3	88	41,9	90,9	31,6	18.5	42,1	36.2	
D. melanogaster	(20)	(25)	(231)	(22)	(154)	10,5	(452)	00,Z	
M domestica	57,1	84	37,6	86,3	20,7	15.0	36	33.0	
M. domestica	(20)	(25)	(237)	(22)	(134)	15,5	(438)	55,Z	
A poquatii	61,9	84	34,9	95,4	24,6	10.5	38,7	35.3	
A. aegyptii	(20)	(25)	(231)	(22)	(137)	19,5	(435)	55,5	
A cambiae	61,9	88	32,1	95,4	33,1	10.0	34,8	33.6	
A. gambiae	(20)	(25)	(273)	(22)	(166)	19,9	(506)	33,0	
C quinquefasciatus	66,6	92	35,4	86,3	34,7	21.2	41,9	36.1	
O. quinquerasciatus	(20)	(25)	(234)	(22)	(166)	21,2	(467)	50,1	
N vitrinonnia	59	92	60,4	95,4	53	30.3	63,6	54.4	
	(22)	(25)	(180)	(22)	(102)	50,5	(351)	54,4	
A flores	66,6	88	57,9	95,4	59,2	33.5	64	54 5	
A. norea	(20)	(25)	(188)	(22)	(101)	55,5	(356)	54,5	
B terrestris	66,6	88	58,5	95,4	55,7	30.0	63,1	53.9	
D. lenesuis	(20)	(25)	(188)	(22)	(101)	30,9	(356)	55,6	
A nisum	13	72	31,3	54,5	17,9	0.8	25,4	22.4	
A. pisulli	(46)	(25)	(149)	(22)	(200)	9,0	(442)	22,4	
P humanua correctio	52,1	88	45,2	86,3	46,5	27 4	53,9	13.7	
	(23)	(25)	(204)	(22)	(119)	21,4	(393)	43,7	
T castaneum	76,1	92	46,5	86,3	53,2	20.8	54,1	45.8	
i. castaneum	(21)	(25)	(164)	(22)	(104)	29,0	(336)	40,0	

Tableau 28 Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTipE et leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes.

Les numéros d'accession des sous-unités sont répertoriés dans le **tableau 6**. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent au nombre d'acides aminés constituant chaque région.

#### A-3 Distribution tissulaire de la sous-unité PaTipE

Pour déterminer la distribution tissulaire du gène codant la sous-unité TipE, une RT-PCR semi quantitative a été réalisée avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture (TP_17S et TP_18R, **Tableau 15**), sur plusieurs tissus de la blatte *P. americana* (tête, ganglions thoraciques, chaîne nerveuse, muscles, glandes reproductrices et intestin). L'actine est utilisée comme contrôle pour montrer que la même quantité d'ADNc a été utilisée pour chaque PCR. L'analyse des produits PCR sur gel d'agarose montre que le transcrit de *PaTipE* est exprimé dans tous les tissus étudiés et en particulier dans les tissus neuronaux (**Figure 65A**). Ce résultat est en accord avec la distribution tissulaire observée pour la sous-unité DmTipE (Derst et coll., 2006) et montre pour la première fois la conservation de la distribution tissulaire d'une sous-unité homologue à DmTipE.

Dans la chaîne nerveuse, le variant PaTipEB est faiblement exprimé (1 clone sur 20). Par conséquent la RT-PCR permet de visualiser uniquement l'expression tissulaire du variant PaTipE. Au niveau cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'expression de PaTipE dans les neurones DUM du DGA. Ici, la PCR a été réalisée « en 2 PCR emboitées » avec les amorces TP_17S et TP_18R ciblant le cadre ouvert de lecture et avec un couple d'amorces internes (TP_9S/ TP_10R) (**Tableaux 10** et **12**). Étonnamment, la sous-unité auxiliaire PaTipE n'est pas exprimée dans les neurones DUM (**Figure 65B**). Nos résultats suggèrent donc que la sous-unité PaTipE est exprimée dans d'autres cellules du tissu nerveux.



**Figure 65 Distribution tissulaire de la sous-unité PaTipE.** A. Expression de la sous-unité PaTipE dans la tête, les ganglions thoraciques, la chaîne nerveuse, les muscles, les glandes reproductrices et l'intestin. B. Expression de la sous-unité PaTipE dans les neurones DUM. Les produits PCR ont été séparés sur un gel d'agarose à 1% (pour PaTipE) ou à 1,5% (actine). Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5  $\mu$ g) et de matrice d'ADNc (1  $\mu$ l d'une dilution au 1/10^{ème}) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine.

### A-4 Amplification d'un ADN partiel codant la sous-unité auxiliaire TipE de *B. germanica*

En utilisant les amorces dégénérées TP_3S et TP_5R, nous avons isolé et cloné les ADNc codant une partie de la boucle extracellulaire de la sous-unité TipE chez la blatte allemande *B. germanica*. Cet ADNc partiel amplifié avec les amorces dégénérées contient 495 pb. La séquence protéique déduite de trois clones possède 165 acides aminés soit 26 acides aminés de plus que pour celle observée pour *P. americana* (**Figure 66**). Ces deux séquences partagent 68,4% d'homologie.

В.	germanica	PAFTTIFMQFDPVAAFCQTVDTESRRGVSNCTWSSCREGCTKEVYECTQIRVNYKILPVI	60
P.	americana	PAFTTIFMQFDPVAALCQTVHTETRHGASNCTWSSCREGCTKEVYECTQIRVNYKILPPV	60
в.	germanica	KSEEDDEGNAEEDEGAEGSTNDNIVAELHEYLRSRRAAKSVGNTNIRSKRAIREYDYEED	120
P.	americana	KQEEGEEGNAGEDEGTDEDIVAELHEYLRSKRAIRDYDYSSE	102
в.	germanica	EDEIEDEDKIGDLIEPTERSGLMGNDSEWYYTKAKLYPNVKGCGY 165	
P.	americana	DEEIALQEP-EPTGLMGNDSEWYYTQAKLFPNVKGCGY 139	

**Figure 66 Alignement des séquences protéiques partielles déduites obtenues pour** *P. americana* **et** *B. germanica*. Les régions grisées correspondent aux acides aminés conservés entre les deux protéines. Les tirets indiquent l'emplacement des espaces introduits pour optimiser l'alignement.

Les séquences nucléiques des trois clones correspondant à une région de la sous-unité BgTipE diffèrent également par des substitutions ponctuelles. En effet, nous avons pu noter quatre mutations : une substitution d'un G par un A (position 201 de la séquence partielle), une substitution d'un T par un C (position 339), une substitution d'un A par un G (position 457) et une substitution d'un G par un A (position 459). La troisième substitution induit une modification de la séquence protéique avec la substitution d'une lysine (K) par un glutamate (E). Ces premières observations suggèrent la présence d'un polymorphisme nucléotidique pour la sous-unité TipE de la blatte *B. germanica*. Comme observé pour la sous-unité PaTipE, ces substitutions ponctuelles pourraient résulter de l'édition de l'ARNm.

#### A-5 Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaTipE

Pour caractériser la sous-unité PaTipE, nous avons utilisé une approche fonctionnelle par électrophysiologie permettant d'étudier les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des courants Na⁺. L'expression dans l'ovocyte de xénope n'a été réalisée que pour le variant PaTipE. Pour pouvoir comparer l'effet de la sous-unité PaTipE nous avons réalisé en parallèle les mêmes expériences avec la sous-unité DmTipE.

#### A-5-1 Effet de la sous-unité PaTipE sur la densité de courant Na⁺

Ici, nous nous sommes intéressés aux effets de DmTipE et de PaTipE sur la densité de courants  $Na^+$ . Des ovocytes de xénope ont été injectés avec les ARN  $PaNa_v1/PaTipE$  et  $PaNa_v1/DmTipE$  et ont été testés au bout de 3 à 10 jours d'incubation. Malgré toutes les conditions testées (voir Matériel et Méthodes, chapitre 3, paragraphe F, **Tableau 19**) nous ne sommes pas parvenus à enregistrer un courant  $Na^+$  avec la sous-unité  $PaNa_v1$  (**Figure 67**).



Figure 67 Familles de courant Na⁺ enregistrées avec le protocole d'activation, dans l'ovocyte de xénope. Les courants sont enregistrés à différents potentiels allant de -70 mV à + 40 mV à partir d'un potentiel imposé de -100 mV. L'intervalle de temps entre deux enregistrements est de 10 ms. Pour les ovocytes co-injectés avec la sous-unité PaNa_v1 et les sous-unités DmTipE ou PaTipE, aucun courant n'a pu être détecté.

Nous avions été confrontés au même problème dans le chapitre 1, lors de la caractérisation fonctionnelle des variants de la sous-unité PaTEH1. Pour contourner cette difficulté nous avons choisi d'utiliser la sous-unité principale DmNa_v1-1. Les quantités d'ARN à injecter pour obtenir un courant mesurable et exploitable ont été mises au point en

faisant varier la quantité d'ARN injectés et le temps d'incubation. Les conditions optimales définies dans cette étude sont les suivantes :

- DmNav1-1/PaTipE : injection de 3,5 ng et 3 jours d'incubation
- DmNa_v1-1/DmTipE : injection de 7 ng et 3 jours d'incubation.

Pour mesurer la densité de courant Na⁺ en présence de la sous-unité PaTipE, nous avons utilisé le protocole permettant d'étudier l'activation du canal Na_v (voir Matériels et Méthodes, chapitre 3, paragraphe H-1) au bout de trois jours d'incubation. Ce protocole permet l'obtention d'une famille de courant Na⁺ (Figure 67). Pour chaque ovocyte testé, l'amplitude maximale du courant Na⁺ a été relevée et cette valeur a été divisée par la quantité d'ARN injectés en ng et par la capacité membranaire (en nF) de l'ovocyte. Ce calcul a permis de calculer la densité du courant Na⁺ (en µA/nF/ng d'ARN injecté). Les moyennes des valeurs obtenues pour l'ensemble des ovocytes testés avec chaque combinaison sont présentées dans l'histogramme de la Figure 68A. Le canal DmNav1-1/PaTipE présente une densité de courant Na⁺ 22,8 fois plus importante que DmNa_v1-1 seule (p < 0,001). Ceci montre que PaTipE a également un effet chaperon sur les courants Na⁺, comme observé avec les autres sous-unités du canal Nav d'insecte caractérisées à ce jour (Feng et coll., 1995; Warmke et coll., 1997 ; Lee et coll., 2000 ; Derst et coll., 2006). La sous-unité PaTipE induit une augmentation de la densité du courant Na⁺ plus importante que celle obtenue en présence de DmTipE (5,4 fois plus qu'avec DmNav1-1 seule). Nous avons également observé un effet activateur des courants Na⁺ plus important pour PaTEH1 que DmTEH1. Par conséquent, il semble que cet effet activateur ou chaperon soit plus fort pour les sous-unités de P. americana. De plus, la sous-unité PaTipE induit une densité de courant Na⁺ 4.7 fois plus faible qu'avec PaTEH1A (p < 0.01) (Figure 68B). En conclusion, les effets stimulateurs des sous-unités auxiliaires sont significativement plus importants avec les sous-unités de P. americana, qu'avec leurs homologues de drosophile. Mais, nous avons retrouvé les mêmes caractéristiques, à savoir que les sous-unités de type TEH1 induisent un effet chaperon plus important que les sous-unités de type TipE.



Figure 68 Densité de courant Na⁺ en fonction de la sous-unité auxiliaire injectée avec la sousunité DmNa_v1-1. A. Densités de courants Na⁺ mesurés sans sous-unité auxiliaire ou en présence des sous-unités auxiliaires DmTipE, PaTipE ou DmTEH1. Test statistique : ANOVA à un facteur suivie du test « post-hoc » de Tukey B. Densités de courants Na⁺ mesurés en présence des sous-unités auxiliaires PaTipE, PaTEH1A ou PaTEH1B. Test statistique: Kruskal-Wallis suivi du test « post-hoc » de Dunn.

## A-5-2 Effets de la sous-unité PaTipE sur les propriétés biophysiques du courant Na⁺

Ici, nous avons étudié l'effet de cette sous-unité auxiliaire sur les propriétés d'activation, d'inactivation et de récupération de l'état inactivé du canal  $Na_v$ . Les résultats obtenus sont répertoriés dans le **tableau 29** et la **figure 69**.

Tableau 29 Paramètres biophysiques des courants  $Na^+$  obtenus en co-exprimant Dm $Na_v$ 1-1 avec DmTipE ou PaTipE dans l'ovocyte de xénope. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

	Activation		Inactivation rapide		Inactivation lente		Récupération de l'état inactivé	
	Va 1/2 (mV)	k	Vi 1/2 (mV)	k	$V_{\frac{1}{2}}(mV)$	k	τ (ms)	
DmTipE	-20,2 ± 1,4 (5)	$10,6\pm1,3$	-47.3 ± 0.5 (7)	$7.1\pm0.4$	-51.1 ± 1.0 (4)	$6.8\pm0.9$	$1.2 \pm 0.1$ (6)	
PaTipE	$-15.7 \pm 2.0$ (7)	$14.4\pm2.1$	$\text{-53.1} \pm 0.5 \ \text{(5)}^{\text{a}}$	$6.5\pm0.4$	$-54.6 \pm 0.9 \; (7)$	$8.9\pm0.8$	$3.8 \pm 0.3$ (5) ^b	

^a différence significative avec DmTipE ; p < 0,05

^b différence significative avec DmTipE ; p < 0,001

Les valeurs de demi-activation¹⁹ (Va_{1/2}) obtenues pour les combinaisons DmNa_v1-1/DmTipE et DmNa_v1-1/PaTipE ne diffèrent pas de façon significative, indiquant que les deux sous-unités auxiliaires ont le même effet sur l'activation du canal Na_v (**Tableau 29** et **Figure 69A**). Sur notre installation, nous avons obtenu une valeur de Va_{1/2} pour la

 $^{^{19}}$  Va_{1/2} activation : valeur de potentiel pour laquelle 50% des canaux Na $_{\rm v}$  sont activés.

combinaison DmNa_v1-1/DmTipE inférieure à celle obtenue par Olson et coll. (2008) (-24,6  $\pm$  0,8 mV). Cette différence peut être liée à deux facteurs : 1) cela peut provenir de la soustraction P/N que nous avons utilisée. Dans notre étude N est égale à 6 mais ce facteur n'est pas précisé dans l'étude de Olson et coll. (2008) ; 2) l'amplitude des courants Na⁺ mesurés peut aussi être liée à cette différence. La capacité des amplificateurs à injecter rapidement du courant varie d'un amplificateur à l'autre. En fonction de l'amplificateur utilisé, le courant sera plus ou moins « clampé » ce qui peut conduire à des différences de dépendance au potentiel de l'activation.

En ce qui concerne l'inactivation, nous avons observé que PaTipE déplace le Vi¹/₂ inactivation²⁰ rapide à l'état stable vers des potentiels hyperpolarisants (- 5,8 mV ; p < 0,05 ; **Tableau 29** et **Figure 69B**) par rapport à DmTipE. En d'autres termes, l'inactivation rapide à l'état stable des courants Na⁺ s'effectuent à des potentiels plus négatifs pour DmNa_v1-1/PaTipE que pour DmNa_v1-1/DmTipE. En revanche, aucune différence significative n'est observée pour l'inactivation lente à l'état stable entre les deux combinaisons (**Tableau 29** et **Figure 69C**).

L'analyse des constantes de récupération de l'état inactivé rapide en présence des sous-unités DmTipE et PaTipE montre que les courants Na⁺ obtenus avec la sous-unité PaTipE récupèrent 3,2 fois plus lentement que ceux enregistrés avec la sous-unité DmTipE (p < 0.001; **Tableau 29** et **Figure 69D**).

 $^{^{20}\,\}text{Vi}_{1/2}$  inactivation : valeur de potentiel pour laquelle 50% des canaux Na $_{v}$  sont inactivés



Figure 69 Propriétés biophysiques des courants  $Na^+$  obtenus en co-exprimant  $DmNa_v1-1$  avec DmTipE (rond noir) ou PaTipE (carré blanc). A. Courbe d'activation des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 6) ou PaTipE (n = 7). G représente la conductance (voir le Matériel et Méthode, pour son calcul). *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'activation. B. Courbe d'inactivation rapide à l'état stable des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 7) ou PaTipE (n = 7). *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation rapide à l'état stable. C. Courbe d'inactivation lente à l'état stable des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 5) ou PaTipE (n = 4). *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 6) ou PaTipE (n = 7). *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 6) ou PaTipE (n = 7). *Encart* : protocole utilisé pour étudier l'inactivation lente à l'état stable. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE (n = 6) ou PaTipE (n = 7). *Encart* : protocole utilisé pour étudier la récupération de l'état inactivé.

## A-5-3 Effets de la sous-unité PaTipE sur les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺

Les traces des courants Na⁺ obtenus pour les potentiels de membrane testés avec le protocole d'activation ont permis d'appréhender les cinétiques d'activation et d'inactivation en calculant les temps de demi-activation et de demi-inactivation des potentiels allant de -30 mV à 40 mV (**Figure 70**). Cette analyse montre que les courants obtenus avec les combinaisons DmNa_v1-1/DmTipE et DmNa_v1-1/PaTipE présentent des cinétiques d'activation similaires (**Figure 70A**). Il en est de même pour les cinétiques d'inactivation (**Figure 70B**). A +40 mV, une différence significative (p = 0,0401 ; unpaired t-test) est observée, indiquant une vitesse d'inactivation plus rapide pour DmNa_v1-1/PaTipE que pour DmNa_v1-1/DmTipE. Cependant, à ce potentiel, l'amplitude du courant est particulière faible, et ce résultat n'est donc pas probant. En conclusion, les sous-unités PaTipE et DmTipE ont le même effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺.



**Figure 70 Cinétique d'activation et d'inactivation du courant Na⁺.** La méthode utilisée pour déterminer les temps de ½ activation et de ½ inactivation en fonction du potentiel est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes. Comme reporté dans la littérature, les valeurs des cinétiques d'activation sont 2 à 2,5 fois plus faibles que celles des cinétiques d'inactivation (Lapied et coll., 1990).

## A-5-4 Effets de la sous-unité auxiliaire PaTipE sur les propriétés pharmacologiques du courant Na⁺

Pour aborder d'éventuelles différences des propriétés pharmacologiques liées aux sous-unités DmTipE et PaTipE, nous avons utilisé un insecticide, le DCJW. Le choix de cet inhibiteur a été motivé par le fait que les sous-unités DmTipE et PaTipE ont des effets modulateurs différents sur les propriétés d'inactivation rapide et de récupération de l'état inactivé.

A-5-4-1 La sous-unité PaTipE diminue l'intensité du blocage du canal DmNa_v1-1 au DCJW comparé à DmTipE

Pour évaluer et comparer les effets du DCJW sur les courants produits par les combinaisons DmNa_v1-1/DmTipE et DmNa_v1-1/PaTipE, les ovocytes ont été perfusés avec une solution de DCJW à 2  $\mu$ M. Avant l'application du DCJW, plusieurs enregistrements ont été réalisés pendant 10 minutes pour s'assurer de la stabilité de l'amplitude du courant Na⁺ enregistré. Puis le DCJW a été appliqué et le courant Na⁺ a été enregistré toutes les minutes à un potentiel de -10 mV pendant 45 minutes. La **Figure 71** montre l'inhibition du courant Na⁺ par le DCJW observée au cours du temps. La valeur de l'amplitude du courant a été normalisée par rapport au courant maximal enregistré sans DCJW (condition contrôle).

L'application de DCJW induit une inhibition lente du courant  $Na^+$  généré par DmNa_v1-1/DmTipE, se stabilisant à 30% au bout de 20 minutes. A l'opposé, l'effet du DCJW est beaucoup moins prononcé sur le courant  $Na^+$  généré par DmNa_v1-1/PaTipE, où le maximum d'inhibition est de 5-10%. Il apparaît donc dans cet exemple, une différence de sensibilité au DCJW en fonction de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec DmNa_v1-1 (**Figure 71**).



Figure 71 Cinétiques de l'inhibition des courants  $Na^+$  générés par les combinaisons  $DmNa_v1-1/DmTipE$  (en noir) et  $DmNa_v1-1/PaTipE$  (en rouge) après application de DCJW. La courbe noire est la cinétique déterminée pour un ovocyte exprimant  $DmNa_v1-1/DmTipE$  et la courbe rouge est la cinétique déterminée pour un ovocyte exprimant  $DmNa_v1-1/PaTipE$ . L'amplitude du courant  $Na^+$  en présence de DCJW est normalisée par rapport au courant maximal enregistré en condition contrôle (sans DCJW). Le DCJW est appliqué au bout de 10 min d'enregistrement pour s'assurer de la stabilité du courant  $Na^+$ .

Pour déterminer le pourcentage d'inhibition induite par le DCJW sur les deux constructions DmNa_v1-1/DmTipE et DmNa_v1-1/PaTipE, nous avons relevé les amplitudes de courants Na⁺ au bout de 30 minutes d'application de DCJW à 2  $\mu$ M (**Figure 72**). La **Figure 72A** montre des exemples de traces de courants Na⁺ enregistrés avant l'application du DCJW (en gris) puis au bout de 30 minutes d'incubation (en noir). L'inhibition induite par le DCJW est de 32,2 ± 3,7% (n=5) pour DmNa_v1-1/DmTipE alors qu'elle n'est que de 7,7 ± 3,5 % (n=5) pour DmNa_v1-1/PaTipE (**Figure 72B**). L'inhibition du courant Na⁺ en présence de DmTipE est donc 4,2 fois plus importante qu'en présence de la sous-unité PaTipE (p < 0,01).



Figure 72 Inhibition du courant Na⁺ par le DCJW.

A. Traces de courant enregistrées à -10mV, avant application du DCJW (gris) et 30 minutes après l'application du DCJW (noir). B. Inhibition du courant Na⁺ par le DCJW au bout de 30 minutes d'incubation lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimée avec DmTipE ou PaTipE. Test statistique : test de Student.

A-5-4-2 Effets du DCJW sur les propriétés biophysiques du canal  $Na_v$  co-exprimé avec DmTipE et PaTipE

Nous avons montré précédemment que l'effet inhibiteur du DCJW est 4,2 fois moins fort sur la combinaison  $DmNa_v1-1/PaTipE$  par rapport à  $DmNa_v1-1/DmTipE$ . Pour expliquer cette différence, nous avons fait 2 hypothèses : la différence de sensibilité observée est liée à 1) une modification de l'affinité du DCJW pour son site de fixation ; 2) un effet sur la conductance du canal  $Na_v$ . Nous avons donc caractérisé les paramètres électrophysiologiques du canal  $Na_v$  en présence de DCJW. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le **Tableau 30** et la **Figure 73**.

Pour les deux combinaisons testées, le DCJW ne modifie pas de façon significative la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation (**Tableau 30** et **Figure 73A**). De même, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation rapide (**Tableau 30** et **Figure 73B**). Ces résultats indiquent que le DCJW n'agit pas sur les propriétés d'activation et d'inactivation rapide à l'état stable des deux combinaisons testées.

	Activation		Inactivation rapide		Inactivation lent	Récupération de l'état inactivé		
	Va ½ (mV)	k	Vi ½ (mV)	k	V ½ (mV)	К	τ (ms)	
Contrôle								
DmTipE	$-20,2 \pm 1,4$ (5)	$10,6 \pm 1,3$	-47,3 ± 0,5 (7)	$7,1\pm0,4$	-51,1 ± 1,0 (4)	$6{,}8\pm0{,}9$	$1,2 \pm 0,1$ (6)	
PaTipE	-15,7 ± 2,0 (7)	$14{,}4\pm2{,}1$	-53,1 ± 0,5 (5)	$6{,}5\pm0{,}4$	-54,6 ± 0,9 (7)	$8{,}9\pm0{,}8$	3,8 ± 0,3 (5)	
DCJW								
DmTipE	$-24,7 \pm 0,4$ (6)	$7,7 \pm 0,4$	-48,7 ± 0,5 (6)	$6,0\pm0,4$	$-46,5 \pm 0,6 (5)^{a}$	$7{,}7\pm0{,}5$	1,1 ± 0,2 (5)	
PaTipE	$-17,7 \pm 0,8 (7)$	$11,7\pm0,8$	$-54,7 \pm 0,4$ (6)	$6,5\pm0,4$	-48,9 ± 0,8 (6)	$7{,}5\pm0{,}7$	$4,8 \pm 0,3$ (7) ^b	

Tableau 30 Paramètres des propriétés biophysiques des courants  $Na^+$  obtenus en co-exprimant  $DmNa_v1-1$  avec DmTipE ou PaTipE dans l'ovocyte de xénope. Le nombre d'ovocytes testés est indiqué entre parenthèses.

^a différence significative avec DmTipE en condition contrôle ; p < 0.05^b différence significative avec PaTipE en condition contrôle ; p < 0.01

Le DCJW déplace le V_{1/2} de l'inactivation lente vers des potentiels plus positifs (+ 4,6 mV pour DmNa_v1-1/DmTipE et + 5,7 mV pour DmNa_v1-1/PaTipE) (**Tableau 30** et **Figure 73C**). Cependant, ce résultat n'est significatif que pour la combinaison DmNa_v1-1/DmTipE (p < 0,05). Cet effet est en contradiction avec la littérature qui montre que le V_{1/2} de l'inactivation lente est déplacé vers des potentiels hyperpolarisants (Song et coll., 2006 ; Zhao et coll., 2005). Le canal Na_v est donc stabilisé dans son état d'inactivation lente. Dans le cas des courants enregistrés dans des neurones de *P. americana* les déplacements vers des potentiels plus négatifs en présence de DCJW sont très importants (-8,3 mV pour les courants de type I et -16,2 mV pour les courants de type II). Il faut cependant noter que la concentration de DCJW utilisée dans cette étude (100 nM) est vingt fois plus faible que la notre. En conclusion, nos résultats indiquent une stabilisation du canal dans l'état inactivé rapide contrairement à ce qui a été montré dans les études précédentes.

Enfin, un effet important est observé sur la récupération de l'état inactivé. Le DCJW ralentit de façon significative la récupération de l'état inactivé rapide de la combinaison DmNa_v1-1/PaTipE (p < 0,01; **Tableau 30** et **Figure 73D**). En revanche, le DCJW n'a aucun effet sur cette propriété avec la combinaison DmNa_v1-1/DmTipE. Ces résultats montrent que la DCJW stabilise l'état inactivé du canal DmNa_v1-1/PaTipE, indiquant qu'il se fixe bien sur le canal. Le faible effet inhibiteur du DCJW sur la combinaison DmNa_v1-1/PaTipE n'est donc pas lié à une modification de l'affinité du DCJW pour son site de fixation.



Figure 73 Propriétés biophysiques des courants  $Na^+$  obtenus en co-exprimant  $DmNa_v1-1$  avec DmTipE (ronds) ou PaTipE (carrés) en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. A. Courbes d'activation des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE ou PaTipE. G représente la conductance (équation indiqué dans le Matériel et Méthode). B. Courbes d'inactivation rapide à l'état stable des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE ou PaTipE ou PaTipE. C. Courbes d'inactivation lente à l'état stable des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE ou PaTipE. D. Courbes de récupération de l'état inactivé rapide des courants  $Na^+$  enregistrés lorsque  $DmNa_v1-1$  est co-exprimée avec DmTipE ou PaTipE. Le nombre d'ovocytes pour chaque condition est indiqué dans le **Tableau 30**.

A-5-4-3 Effets du DCJW sur les cinétiques du courant Na⁺ en présence de PaTipE ou DmTipE

La **Figure 74** montre les cinétiques d'activation et d'inactivation relevées avant et après application du DCJW, pour les combinaisons DmNa_v1-1/DmTipE et DmNa_v1-1/PaTipE. Le DCJW n'a aucun effet sur la cinétique d'activation du courant Na⁺ induit par la combinaison DmNa_v1-1/PaTipE (**Figure 74A**). En revanche, la cinétique d'activation en présence de la sous-unité DmTipE est modifiée par le DCJW. Cet insecticide accélère la cinétique d'activation pour des potentiels allant de -30 mV à +20 mV (p < 0,05 ; **Figure 74A**). Ces résultats suggèrent que le DCJW se fixe sur le canal à l'état fermé et qu'il favorise l'ouverture du canal. Ce résultat est en accord avec les observations faites sur la dépendance au potentiel de l'activation. Bien que la différence ne soit pas significative, nous observons pour DmTipE un déplacement du Va_{1/2} vers des potentiels hyperpolarisants (-4,5 mV) en présence de DCJW par rapport au contrôle (**Tableau 30** et **Figure 74**). Par contre, le DCJW n'aucun effet significatif sur les cinétiques d'inactivation des courants Na⁺ obtenus avec les deux combinaisons sauf à -30 mV pour DmNa_v1-1/PaTipE (p < 0,001 ; **Figure 74B**).



**Figure 74 Cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na⁺ en présence ou en absence de DCJW.** A. Cinétiques de demi-activation du courant Na⁺ en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. B. Cinétiques de demi-inactivation du courant Na⁺ en présence (rouge) ou en absence (noir) de DCJW. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent au nombre d'ovocyte testé.

#### A-6 Discussion générale des résultats

La sous-unité auxiliaire TipE de *D. melanogaster* est un constituant important du canal Na_v d'insectes. Elle module à la fois les cinétiques d'inactivation et la densité du courant Na⁺ lorsqu'elle est co-exprimée avec une sous-unité principale dans l'ovocyte de xénope (Feng et coll., 1995 ; Warmke et coll., 1997 ; Lee et coll., 2000 ; Derst et coll., 2006). Dans cette partie nous avons décrit le clonage de deux sous-unités homologues à DmTipE chez la blatte *P. americana*, PaTipE et PaTipEB. Nous avons montré que la sous-unité PaTipE présente des propriétés fonctionnelles similaires à celles de DmTipE : 1) PaTipE augmente la densité de courant Na⁺ de 22,8 fois lorsqu'elle est co-exprimée avec DmNa_v1-1 dans l'ovocyte de xénope par rapport à DmNa_v1-1 seule. 2) Comme DmTipE, PaTipE a une expression tissulaire ubiquitaire. Dans cette partie nous avons également comparé les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des courants Na⁺ résultant de la co-expression de DmNa_v1-1/PaTipE et DmNa_v1-1/DmTipE diffèrent par leurs propriétés d'inactivation, et que ces différences leur confèrent une sensibilité différente au DCJW.

#### A-6-1 Distribution tissulaire : ubiquitaire ou non?

Les ARNm de PaTipE ont une distribution tissulaire ubiquitaire, à la fois dans les tissus neuronaux et dans les tissus non-neuronaux. Nous avons cependant remarqué que le plus fort niveau d'expression se situe dans les tissus neuronaux (tête et chaîne nerveuse) ce qui correspond à la distribution tissulaire de la sous-unité PaNa_v1 (Moignot et coll., 2009). Les résultats que nous présentons ici concordent avec l'expression tissulaire de DmTipE qui est jusqu'à maintenant la seule information disponible concernant la distribution tissulaire des sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte (Derst et coll., 2006). Nous avons donc montré que la distribution tissulaire ubiquitaire de la sous-unité TipE est conservée chez *P. americana*. De plus, nous avons montré que la sous-unité PaTEH1 présente la même distribution tissulaire, exclusivement neuronale, que son homologue DmTEH1 (voir Résultats et Discussion, chapitre 1). Par conséquent nous suggérons que la distribution tissulaire de PaTipE est également ubiquitaire chez les autres espèces d'insectes.

Au niveau cellulaire, nous avons constaté que PaTipE n'est pas exprimée dans les neurones DUM du DGA. Comme son expression est forte dans la chaîne nerveuse, nous suggérons qu'elle est exprimée dans d'autres types cellulaires tels que les neurones VUM

215
(pour <u>V</u>entral <u>U</u>npaired <u>M</u>edian), les neurones DPM (pour <u>D</u>orsal <u>P</u>aired <u>M</u>edian), les neurones intergéants et les neurones locaux, tous présents dans les ganglions abdominaux et thoraciques (Nassel, 1996).

#### A-6-2 Conservation de la structure

L'alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités de type TipE montre que PaTipE partage de forte homologie avec les sous-unités des Hyménoptères (*A. florea, B. terrestris* et *N. vitripennis*). Bien que la longueur des protéines TipE varie beaucoup d'une espèce à l'autre, nous avons identifié trois régions bien conservées, suggérant qu'elles sont fonctionnellement impliquées dans la modulation de la fonction des canaux Na_v. La première région contient le segment transmembranaire TM1, les 8 acides aminés qui le précèdent et les 55 acides aminés qui le suivent. La deuxième région contient le segment transmembranaire TM2, les 69 acides aminés qui le précèdent et les 8 acides aminés qui le suivent. La troisième région est constituée des 20 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale. La conservation des acides aminés de cette dernière région suggère qu'elle est impliquée dans une fonction conservée chez les insectes.

Pour les sous-unités de type TEH1, l'alignement multiple des séquences protéiques montre que la région C-terminale n'est absolument pas conservée. Cependant les résultats que nous avons obtenus montrent bien que l'extrémité C-terminale de PaTEH1 module non seulement les propriétés chaperonnes de la sous-unité, mais aussi ses propriétés régulatrices sur le canal Na_v.

Plusieurs études réalisées sur les canaux BKCa de mammifères et les sous-unités  $\beta$  qui leur sont associés ont montré que les extrémités C-terminales cytoplasmiques des sous-unités  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 était importantes dans la modulation des propriétés d'ouverture et de fermeture du canal BKCa (Orio et coll., 2002 ; Wang and Brenner, 2006). Ceci suggère qu'il y a vraisemblablement une interaction, soit directe soit par un mécanisme allostérique, entre le domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2, et plusieurs régions de la sous-unité Slo1 (Lee et coll., 2010).

## A-6-3 Effets sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal Na_v

La caractérisation fonctionnelle des canaux  $Na_v$  formés par l'association des sousunités  $DmNa_v1-1$  et DmTipE ou PaTipE montre dans un premier temps que la sous-unité auxiliaire PaTipE augmente 4,2 fois plus la densité du courant  $Na^+$  que la sous-unité DmTipE. Ces résultats sont similaires à ceux observés avec les sous-unités PaTEH1A, PaTEH1B et DmTEH1, indiquant que les sous-unités auxiliaires du canal  $Na_v$  de *P. americana* possèdent un effet chaperon plus important que celles du canal  $Na_v$  de *D. melanogaster* sur la sous-unité principale  $DmNa_v1-1$ .

#### A-6-3-1 Propriétés d'activation

Nous avons montré ici que quelque soit la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec  $DmNa_v1-1$  (PaTipE ou DmTipE), les  $V_{1/2}$  de l'activation et les cinétiques d'activation sont similaires. L'application du DCJW ne modifie pas significativement la dépendance au potentiel de l'activation, mais nous avons observé une tendance à un déplacement du Va1/2 vers des potentiels hyperpolarisants. De plus, nous avons montré que le DCJW accélère la cinétique d'activation pour la combinaison  $DmNa_v1-1/DmTipE$ . Ceci est en faveur d'une fixation du DCJW sur l'état fermé du canal  $Na_v$ , ce qui n'a jamais été montré jusque là.

### A-6-3-2 Propriétés d'inactivation rapide et de récupération de l'état inactivé

D'importantes modifications sont observées au niveau de la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide, et de la récupération de l'état inactivé. En présence de PaTipE, le Vi_{1/2} est plus négatif qu'avec DmTipE. Dans la littérature, il a été montré que plus le Vi_{1/2} est déplacée vers des potentiels hyperpolarisant (BgNa_v1-4 et BgNa_v1-1 ne différant que d'un résidu), plus l'inhibition du courant Na⁺ par le DCJW est importante (Song et coll., 2006), indiquant une forte interaction de la molécule avec le canal Na_v dans son état inactivé. Or, ici nous avons observé l'effet contraire : les canaux DmNa_v1-1/DmTipE sont 4,2 fois plus sensibles au DCJW que les canaux DmNa_v1-1/PaTipE.

Nous avons également montré que la récupération de l'état inactivé en présence de la sous-unité PaTipE est 3,2 fois plus lente que lorsque DmNa_v1-1 est co-exprimée avec DmTipE. Ces résultats indiquent que, lors de dépolarisations successives, les canaux Na_v issus

de la co-expression des sous-unités DmNa_v1-1/PaTipE seront moins rapidement disponibles que les canaux Na_v issus de la co-expression des sous-unités DmNa_v1-1/DmTipE. Le processus de récupération de l'état inactivé est à la base de la période réfractaire absolue, période suivant l'initiation d'un PA, au cours de laquelle aucun nouveau PA ne peut être initié même si la membrane de la cellule est dépolarisée. Plusieurs études réalisées sur des canaux Na_v de mammifères ont montré que ce processus jouait un rôle important dans la régulation de la fréquence des PA. En effet, des canaux susceptibles d'engendrer une fréquence de décharge de PA rapide, présentent une récupération de l'état inactivé plutôt rapide (Everill et coll., 2001 ; Herzog et coll., 2003). A contrario, des canaux Na_v supportant des décharges de PA à faible fréquence montrent une récupération de l'état inactivé plutôt lente (Elliott et Elliot, 1993 ; Cummins et Waxman, 1997). Ces données suggèrent que des canaux Na_v natifs présentant les mêmes caractéristiques que celles observées lors de la co-expression de DmNa_v1-1 et PaTipE, induiraient une fréquence de décharge de PA plus lente que des canaux Na_v formés par les sous-unités DmNa_v1-1 et DmTipE.

Après application de  $2\mu$ M de DCJW, la récupération de l'état inactivé des canaux DmNa_v1-1/PaTipE est modifiée par rapport au contrôle alors qu'aucun effet n'est relevé sur la dépendance au potentiel de l'inactivation rapide. La récupération de l'état inactivé est ralentie d'1 ms, indiquant que sans avoir d'effet inhibiteur très important le DCJW module la récupération de l'état inactivé des canaux DmNa_v1-1/PaTipE.

#### A-6-3-3 Propriété d'inactivation lente

Nous avons montré que la dépendance au potentiel de l'inactivation lente n'est pas significativement différente entre les combinaisons  $DmNa_v1-1/DmTipE$  et  $DmNa_v1-1/PaTipE$ . Cependant, après application de 2µM de DCJW, le  $V_{1/2}$  de l'inactivation lente des courants  $Na^+$  obtenus avec la combinaison  $DmNa_v1-1/DmTipE$  est déplacé vers des potentiels dépolarisants par rapport au contrôle. Le sens de ce déplacement est surprenant car dans toutes les études réalisées avec le DCJW, ce dernier induit un déplacement des courbes d'inactivation rapide et/ou lente vers des potentiels hyperpolarisants (Song et coll., 2006 ; Zhao et coll., 2005).

#### B- Les sous-unités TEH2 et TEH3

#### B-1 La sous-unité PaTEH2

#### **B-1-1 Clonage des ADNc**

#### B-1-1-1 Clonage d'un ADNc partiel de la sous-unité PaTEH2

Comme pour le clonage des sous-unités PaTEH1 et PaTipE, nous avons conçu des amorces dégénérées ciblant une région conservée de la sous-unité TEH2, à partir d'un alignement des séquences codant la sous-unité TEH2 chez d'autres espèces (Figure 75). Pour cette sous-unité, quelques difficultés ont été rencontrées lors du clonage de l'ADNc partiel et plusieurs couples d'amorces ont été nécessaires avant de pouvoir identifier un ADNc partiel correspondant à la sous-unité TEH2 de P. americana (Tableau 31). La première difficulté rencontrée a été de mettre au point les conditions PCR avec le premier couple d'amorce (TP_20S/ TP_22R, Figure 75). Pour cela nous avons réalisé deux PCR avec un gradient de température allant de 50 à 60°C ou de 60 à 70°C avec la polymérase EuroTaq. Dans les deux cas, aucun ADN n'a été amplifié. Nous avons donc réalisé une nouvelle PCR avec un gradient de température avec la polymérase Advantage. Avec une température d'hybridation de 60°C nous avons pu amplifier des amplicons de différentes tailles (250 pb, 300 pb, 450 pb et 550 pb). Le séquençage de quatre clones a révélé que l'ADNc amplifié était un ADN non spécifique qui présentait le même oligonucléotide au niveau de ces extrémités 3' et 5', indiquant que ce dernier s'était hybridé à chacune des deux extrémités lors de la PCR. Un deuxième couple d'amorces a alors été utilisé (TP_21S/ TP_22R). La PCR réalisée avec la polymérase Advantage a permis l'amplification d'un ADNc d'environ 500 pb. Les onze clones séquencés se sont révélés être de l'ADN non spécifique.



#### 100 pb

**Figure 75. Stratégie d'amplification de la sous-unité PaTEH2.** Les segments transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs. Les traits pleins représentent les régions 5' et 3' non-codantes. A. Localisation des amorces dégénérées utilisées pour cloner un ADNc partiel de la sous-unité PaTEH2. B. La PCR réalisée avec les amorces dégénérées TP_48S et TP_51R a permis l'amplification d'un ADNc de 321 pb. Les 5' et 3'RACE-PCR ont permis d'amplifier respectivement des ADNc de 510 et, 590 et 861 pb. Les amorces TP_60S et TP_61R d'une part et TP_60S et TP_62R, ciblant les régions non-codantes, ont permis l'amplification de séquences de 1134 et 1168 pb contenant respectivement un ORF de 690 et 732 pb. Les amorces TP_58S et TP_59R d'une part et TP_58S et TP_63R d'autre part ciblent les ORFs de la sous-unité PaTEH2.

Suite à ces deux échecs, quatre nouvelles amorces dégénérées ont été dessinées et testées : avec le couple d'amorces TP_48S/TP49R, une PCR avec un gradient de température allant de 50 à 70°C a été réalisée avec deux polymérases (la KOD polymérase et la polymérase GoTaq). Aucun ADN n'a été amplifié avec ces deux PCR. A une température d'hybridation de 60°C et avec la polymérase KOD, plusieurs bandes de tailles très nettement supérieures à celles attendues ont été obtenues avec les couples d'amorce TP_48S/TP_51R et TP_50S/TP_49R (**Tableau 31**). Par conséquent, ces amplicons n'ont pas été séquencés.

Enfin, deux PCR avec un gradient de température allant de 50 à 65°C ont été réalisées avec la polymérase Advantage en utilisant les couples d'amorces TP_48S/TP_51R et TP_50S/TP_49R. Les deux couples d'amorces ont permis l'amplification d'ADNc de plusieurs tailles variant de 200 à 1500 pb. Les bandes correspondant à la taille attendue (autour de 300 pb) ont été découpées et clonées dans le vecteur pCR®4-TOPO®. Une interrogation de type Blast, dans la banque de données GenBank, réalisée sur les séquences protéiques déduites des séquences nucléiques des huit clones séquencés (quatre pour chaque

couple d'amorces), a montré que 6 clones correspondaient à de l'ADN non spécifique et que deux clones présentaient plus de 70% d'identité de séquence avec des protéines homologues à DmTEH2.

Polymérases	Th		Couples	Couples d'amorces dégénérées   P_21S/TP_22R TP_48S/TP_49R TP_48S/TP_51R TP_50S/TP_49R   - - - - -								
		TP_20S/TP_22R	TP_21S/TP_22R	TP_48S/TP_49R	TP_48S/TP_51R	TP_50S/TP_49R						
EuroTog	50-60°C	Pas de produits PCR détectable	-	-	-	-						
	60-70°C	Pas de produits PCR détectable	-	-	-	-						
	60°C	4 clones non spécifiques de 250, 300, 450 et 550 pb	-	-	-	-						
Advantage	65 C	1 bande à 1200 pb non séquencée	11 clones non spécifiques de 500 pb									
	50-65°C	-	-	-	2 bandes à 200 et 300 pb 2 clones non spécifiques et <u>2 clones TEH2</u>	2 bandes à 200 et 300 pb 4 clones non spécifiques						
GoTaq	50-70°C	-	-	Pas de produits PCR détectable	-	-						
	60°C	-	-	Pas de produits PCR détectable	Plusieurs bandes entre 600 et 1600 pb	Une bande à environ 900 pb						
NOD	50-70°C	_	_	Pas de produits PCR détectable	_	-						

Tableau 31 : Résultats obtenus avec différents couples d'amorces et plusieurs polymérases

#### B-1-1-2 Clonage des régions 5' et 3' de la sous-unité PaTEH2

Les résultats du séquençage des deux clones partiels de la sous-unité PaTEH2 nous ont permis de concevoir des amorces spécifiques de la sous-unité PaTEH2 pour amplifier les régions 5' et 3' de la protéine par RACE-PCR. Les amplicons obtenus par 5' RACE-PCR avec les amorces TP_56R et TP_57R (**Figure 75B** et **Tableau 10**) ont été clonés et séquencés. Les 4 clones séquencés contenaient tous une même séquence de 510 pb dont 346 pb correspondant à la région non-codante et 164 pb correspondant à la région 5' de la protéine.

L'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus avec la technique de la 3'RACE-PCR avec les amorces TP_54S et TP_55R (Figure 75 et Tableau 12), a révélé la

présence de deux bandes à environ 650 et 850 pb. Ces deux bandes ont été isolées par purification sur gel (voir Matériels et Méthodes, chapitre 2, E-2-2) et clonées dans le vecteur pCR[®]4 TOPO[®]. Malgré plusieurs tentatives, le clonage de la bande correspondant à 850 pb n'a jamais donné de résultat, alors le produit PCR purifié a été directement séquencé. Le séquençage de l'insert et du produit PCR a révélé la présence de deux séquences nucléiques de tailles différentes (590 pb et 861 pb) dont la séquence diffère à partir du 330^{ème} nucléotide. Ces premières observations suggèrent deux extrémités C-terminales possibles pour la sous-unité TEH2 de *P. americana*. L'analyse de ces séquences montre que la séquence de 590 pb contient 329 pb correspondant à la région 3' de la protéine, et 261 pb correspondant à la région non-codante. La séquence de 861 pb contient quant à elle 371 pb correspondant à la région 3' de la protéine, et 490 pb correspondant à la région non codante. Les deux séquences amplifiées présentent toutes les deux une queue poly-A, mais aucun signal de polyadénylation (aataaa) n'est observé (**Figure 76**).

#### B-1-1-3 Clonage du cadre ouvert de lecture de la sous-unité PaTEH2

Les données obtenues avec le séquençage des régions 3' et 5' de la protéine nous ont permis de concevoir des amorces spécifiques ciblant d'une part les régions non codantes encadrant le cadre ouvert de lecture et d'autre part le cadre ouvert de lecture lui-même. Les expériences de 3'RACE ayant mis en évidence la présence de deux séquences différentes en 3', 4 amorces ont donc été conçues (2 ciblant la région non-codante et 2 ciblant les régions codant les 2 extrémités C-terminales de la protéine). Les couples d'amorces TP_60S/TP_61R et TP_60S/TP_62R (**Tableau 14** et **Figure 75B**) ont permis l'amplification de deux séquences de 1167 et 1134 pb, contenant respectivement un cadre ouvert de lecture de 690 et 732 pb. Les deux protéines déduites de ces séquences nucléiques partagent 50,4% et 51,7 % d'homologie avec le variant A de la sous-unité DmTEH2 et 50,1 % et 49,8% avec le variant B de la sous-unité DmTEH2. De plus une analyse de type Blast indique que ces deux sous-unités partagent de forte identité de séquences avec des sous-unités de la famille TEH2 chez d'autres espèces d'insectes. Nous les avons donc nommées PaTEH2A (1167 pb avec un cadre ouvert de lecture de 732 pb) (**Figure 76**).



**Figure 76 Alignement des séquences nucléiques et protéiques des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B.** Les séquences des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B sont identiques jusqu'au nucléotide 686, puis les deux variants présentent des extrémités C-terminales différentes. Cette différence est liée au fait que les deux variants présentent une extrémité 3' non codante différente. Les régions en lettres minuscules correspondent aux régions 5' et 3' non codantes de la protéine. Les segments transmembranaires TM1 et TM2 sont soulignés en noir.

#### **B-1-2** Analyse des régions conservées

L'analyse des profils d'hydrophobie des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B montre que ces sous-unités possèdent deux segments transmembranaires TM1 et TM2 (**Figure 77A**). La comparaison avec les deux variants chez *D.melanogaster* montre que cette topologie est conservée chez les sous-unités auxiliaires de type TEH2 (**Figure 77B**). Cependant nous pouvons remarquer en regardant ces deux profils que les sous-unités DmTEH2 présentent une extrémité N-terminale de taille plus importante que celle des sous-unités PaTEH2.



**Figure 77.** Profil d'hydrophobie des sous-unités auxiliaires de la famille TEH2 A. Profils d'hydrophobie des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B. Les extrémités C-terminales des deux variants diffèrent par leurs tailles (PaTEH2A, 22 aa; PaTEH2B, 36 aa) et leurs séquences. B. Profil d'hydrophobie des sous-unités DmTEH2A et DmTEH2B. Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 sont indiqués sur chaque profil. Ils correspondent aux régions pour lesquelles l'hydrophobie est la plus élevée.

L'alignement multiple des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B avec les sous-unités de type TEH2 chez d'autres espèces d'insectes montrent les régions conservées des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte (**Figure 78**). De plus, il permet de déduire que PaTEH2A et PaTEH2B partagent le maximum d'identité de séquence protéique avec les sous-unités des espèces de moustiques (AgTEH2, AaTEH2 et CqTEH2) (53,2 à 56,8%) et le minimum d'identité de séquence protéique avec la sous-unité NvTEH2 (43,7 et 45,1%) (**Tableau 32**).

<b>.</b>	N-	M1	Boucle extracellulaire	M2	C-terminale		Total	
Sous-unité auxiliaire	terminale				PaTEH2A	PaTEH2B	PaTEH2A	PaTEH2B
DmTEH2A	11,7	88,4	64,9	82,6	34,2	43,5	49,8	50,9
DmTEH2B	11,7	88,4	64,9	82,6	33,3	30,2	49,5	49
AgTEH2	7,5	96,1	71,5	86,9	33,3	43,5	55,3	56,7
AaTEH2	10,4	96,1	70,8	86,9	33,3	43,5	55,4	56,8
CqTEH2	7,5	86,2	67,8	86,9	54,1	34,2	55,9	53,2
PhumTEH2	29,4	92,3	61,7	52,1	19,6	22,9	50,7	51,4
TCTEH2	13,3	88,4	61,4	65,2	27,5	25,0	54,7	53,6
NvTEH2	14,0	80,7	58,8	52,1	17,0	26,8	43,7	45,1

Tableau 32 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B et leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes.

Les numéros d'accession des sous-unités sont répertoriés dans le tableau 6.

Premièrement, les extrémités N-terminales des sous-unités TEH2 de P. americana, de P. humanus corporis et de T. castaneum sont plus courtes que celles des autres sous-unités auxiliaires (Figure 78). Les homologies de séquence entre les régions N-terminales de la sous-unité PaTEH2 et celles des sous-unités homologues à DmTEH2 très faibles (< 30%) indiquant que cette région a subit une forte pression de sélection (Tableau 32). Le nombre de résidus chargés positivement dans l'extrémité N-terminale est très variable d'une espèce à l'autre. Il est faible chez P. americana (2), chez T. castaneum (3), chez P. humanus corporis (4) et chez N. vitripennis (6). Chez les autres espèces d'insectes, 10 à 11 résidus sont chargés positivement. Ces charges sont supposées fonctionner comme des signaux d'exportation du réticulum endoplasmique (Maurer-Stroh et coll., 2004 ; Derst et coll., 2006). Deuxièmement, les segments transmembranaires M1 et M2 des sous-unités PaTEH2 partagent de forte homologie protéique avec ceux des sous-unités de type TEH2. Elles partagent 80,7 à 96,1% d'homologie de séquence pour le segment M1, et 52,1 à 86,9% pour le segment M2 (Tableau 32). Troisièmement, comme pour la sous-unité PaTEH1, la boucle extracellulaire des sousunités PaTEH2A et PaTEH2B représente plus de 50% de la taille de la protéine (134 acides aminés). Elle est également caractérisée par huit 1/2 cystines conservées chez les autres sousunités de type TEH2 (Figure 78). Quatre de ces ½ cystines (encadrées en jaune sur la Figure **78**) forment des ponts disulfures chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa (Derst et coll., 2006). Les homologies de séquences partagées entre les sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B, et les autres sous-unités de type TEH2 sont relativement fortes (58,8 à 71,5%) suggérant un rôle important de la boucle extracellulaire (Tableau 32 et Figure 78). Quatrièmement, les extrémités C-terminales des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B partagent peu d'homologie de séquence avec celles des sous-unités homologues à DmTEH2 (17 à 54,1%).

		M1
	WC3 FCCCCCT TC	EVTS 27
DaTEH2A		<b>EVTS</b> 27
Dwwww27	MANAGEGET I MENTE AND A COMPANY CANTER AND A COLORA COCCAR CONDER COCCUPATION AND A COMPANY AND A COMPANY A COCCUPATION AND A COCUPATION AND A	
DmTEH2R		
AGIENZ		
Commu2		
CQTEHZ DhummmuQ		FIIS 09
TCTEH2		FITS 22
NVTEH2	MGGGDETDELETDVVSNGSRRRSSSLAGSSVFGAGSEAGTTVAGGDEGPGGVLGGVLPFIEVASLMEKA M1 * * * * *	KEYTS /5
PaTEH2B	LCLGTTAIISVFAFLFLIPFVVDPAISTIMSDYDPNPVTCIAVSYTYAEGLRNCSWSSCREGCTTAALECILIVNYTRVPF	SEWGN 114
PaTEH2A	LCLGTTAIISVFAFLFLIPFVVDPAISTIMSDYDPNPVTCLAVSYTYAEGLENCSWSSCREGCTTAALFCHLILVNYTRVPF	SEWGN 114
DmTEH2A	VCLGTTAILSVFTFLFLIPFVVDPAISTIIADYDPVPVTCIVIDHIYAEGIKNCSWSSCREGCTSSLTFC.40LFVNYTRIPFS	SEWER 176
DmTEH2B	VCLGTTAILSVFTFLFLIPFVVPPAISTIIADYDPVPVTCIVIDHIYAEGIKNCSWSSCREGCTSSLTKCHOLFVNYTRIPFS	SEWER 176
AgTEH2	LCLGTTAILSVFAFLFLIPFVVDPAISTIVADYDPVPVTCVVTDHVYAEGMRNCTWSSCREGCTTAAIFCHOLLVNYTKIAF	HEWHK 156
AaTEH2	LCLGTTAILSVFAFLFLIPFVVDPAISTIVADYDPVPVCLLTEHVYAEGMRNCTWSSCREGCTTAAIFC JOILVNYSKIAY	HEWOK 156
CoTEH2	LCLGKKGTTAILSVFAFLFLIPFVV) PAISTIVADYDPVPVTCVVTDHVYSEGRRNCTWSSCREGCTTEAIRCHOLLVNYTKIAY	<b>EWOK</b> 159
PhumTEH2	LCMGTTAILSVFAFLFLIPFVVDPAISTILADYEOEPVICKVIEHVYSEGLENCTWASCREGCTTAVLKCHOITVSYSKNSY	<b>DFLK</b> 125
TcTEH2	LCLGITAFISVFAFLFLIPFIVDPAITSLMADYEPEPYTC/GTOHYAEGLTNCSWASCREGCTREATECTOIYVNYSKIPF	RDW 107
NVTEH2	LCLGSTATLAVFAFLFATPFIVEPAISTILADFSPRPVACISTSHVLAEGLKNCSWASCREGCTAVTSCTOTRVNYTKLTFF	<b>EEFSA</b> 162
	* * * M2	101
PaTEH2B	RTIDSVVWDVGDTKFFINTEGC;YPPR-VNCSVFAKQYGLKNLMKPFPCYYSRTYPEMVVARYSWEDNLKHIVLSLIVPNVLF	SVSIG 201
PaTEH2A	RTIDSVVWDVGDTKFFINTEGCOYPR-VNCSVFAKOVGLKNLMKPFPCYSRTYPEMVVARYSWEDNLKHLVLSLIVPNVLF	SVSIG 201
DmTEH2A	NPROLDTVNWDVSYTKFLINSEGC(3YPPT-TNCSIFARQYGFSHIGEPFPCFYSRAYPEVVIGRYSWENNLYFLILSLIIPNVLF/	AISIG 265
DmTEH2B	NPROLDTVNWDVSYTKFLINSEGC YPPT-TNCSIFAROYGFSHIGEPFPCFYSRAYPEVVIGRYSWENNLYHLILSLIIPNVLF	AISIG 265
AgTEH2	HPROLDSIEWDVMDTKFLVNTEGCGYPPR-VNCSEFAKOYGYSHVGEPFPCYSRAYPEIVVARYSWDDNLKHLILSLIIPNVLF/	vsig 245
AaTEH2	EPROLNSVEWDVMDTKFLVNTEGCGYPPR-VNCTEFAKKYGSAHOGEPFPCYSRAYPEMVVARYSWDDNLKHLILSLIIPNVLF/	vsig 245
CoTEH2	OPROLONVEWDVMDTKFLVNTEGCOVPR-VNCTEFAKKYGYSHVGEPFPCYFSRAVPEMVVARYSWDDNLKHLILSLIIPNVLF	VSIG 248
PhumTEH2	D-ODLTSMNWDVNETKFFINTEGC3YPPK-INCSEFASQYGNKNVGKIFPCYSKTYPEIVVAHYSWDDNLRHLILALVVPTTCF	<b>VAIT</b> 213
TcTEH2	KPALNVOWDVVDTRFLINAEGC(3YPPS-VNCTEFARQYGYSTAGTPFPCYSRVYPDIVVARYSWDETLKHLILSITIPNLF/	ASVG 194
NvTEH2	KPLGS I PWDVVDTKFYVNAEGC 3YPDTGVVCSEFAKKYGNLSNGKI FPC YSSRTYPETVVSKYSWDENLENLI LALT I PVLLFV	<b>/LSLA</b> 250
	<u></u>	
PaTEH2B	VLSYWYCPSCNRACNKKTYVDKYPTKEDENEDDDYYEEEEY*244	
PaTEH2A	VLSYWYCPSCNRACNKKTYVDKYPTKEE* 230	
DmTEH2A	VLSYWYCPCCEKACNKSSRVYAEKFPTKEDKLLCHSD-EDDDMEY* 310	
DmTEH2B	VLSYWYCPCCEKACNKSSRVYAEKFPTKEEIVNCMKCNTE-KSLSLNVF* 314	
AgTEH2	VLSYWYCPCCDKACHKSPRVYAEKYPTKENKLLCRSDDEEDELDY* 291	
AaTEH2	VLSYWYCPCCDKACHKSPRVYAEKYPTKENKLLCRSDDEEDELDY* 291	
CqTEH2	VLSYWYCPCCDKACHKSPRVYAEKYPTKEK*	
PhumTEH2	ILTYWYCPGCQKGCSKRRLRDKYPSKEELKNEEYDEEEEEEEEDDDDDDDDDADLRARGVGGVGGGY* 281	
TcTEH2	VLSYWYCPGCCKTCNKYMHHFPAEDEDYDENSY*228	
NvTEH2	VICYWYCPPVSKSCGGPSRGGSLIDKYDSRKEDTQAEDDFDEYEEKY* 298	

Figure 78. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B, et des sous-unités DmTEH2A, DmTEH2B, AgTEH2, AaTEH2, CqTEH2, PhumTEH2, TcTEH2, NvTEH2. L'alignement à été réalisé avec la méthode ClustalW implémentée dans le logiciel BioEdit. Les résidus d'acides aminés identiques sont surlignés en gris foncé et les résidus similaires sont surlignés en gris clair. Les domaines transmembranaires M1 et M2 sont encadrés en rouge. Les ½ cystines conservées entre les sous-unités TEH2 sont signalées par une étoile (*). Celles qui sont connues pour former des ponts disulfures chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa sont encadrées en jaunes (Derst et coll., 2006).

#### B-1-3 Diversité moléculaire de la sous-unité PaTEH2

#### B-1-3-1 Origine des variants PaTEH2A et PaTEH2B

Les sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B diffèrent au niveau de leur extrémité Cterminale. Dans le cas des sous-unités PaTEH1 et PaTipE, nous avons observé des variants différents résultant de l'insertion d'une séquence de plusieurs dizaines de nucléotides. Ici, les deux variants présentent des extrémités 3' non-codantes différentes avec chacun une queue polyA. L'analyse de l'extrémité C-terminale de PaTEH2A révèle la présence du di-nucléotide GT au début de la séquence spécifique à ce variant. De plus, la séquence nucléotidique qui suit ce di-nucléotide (AAGTAT) correspond à la séquence consensus du site donneur d'épissage (Cartegni et coll., 2002). Ces premières observations suggèrent donc que la séquence présente à l'extrémité 3' du variant PaTEH2A est un intron et que par conséquent ce variant est issu d'une rétention d'intron. Le variant PaTEH2B serait quant à lui un variant épissé. Pour confirmer cette hypothèse il serait nécessaire de réaliser une PCR sur l'ADN génomique, afin de déterminer l'organisation du ou des gènes *Pateh2*.

#### B-1-3-2 Quatre variants résultant d'un épissage alternatif

Dans le but d'exprimer les sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B dans l'ovocyte de xénope, nous avons cloné les séquences correspondant au cadre ouvert de lecture de chaque sous-unité dans le vecteur d'expression pGEM. Pour amplifier les ADNc codant les cadres ouverts de lecture nous avons utilisé les couples d'amorces TP_58S/TP_59R et TP_58S/TP_63R (**Tableau 15**). Les amplicons ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM. Lors de la vérification de la présence de l'insert dans le vecteur au moyen d'une PCR, nous avons observé pour quelques clones, la présence d'un insert d'une taille plus petite que celle attendue, et ce pour les deux variants. Le séquençage de ces clones « courts » a révélé l'existence de deux nouveaux variants. Le premier variant, obtenu avec les amorces TP_58S/TP_59R, contient 318 pb et possède la même extrémité C-terminale que le variant PaTEH2A (**Figure 79**). Ce variant présente une délétion de 372 pb correspondant à la région codant la quasi-totalité de la boucle extracellulaire. Ce variant a été nommé PaTEH2C (**Figure 79**).

M1

PaTEH2A	MGAEGGGGGITSVEVITLMEKAKFYTSLCLGTTA	IISVFAFLFL	IPFVVDPAISTIMSDYDPNPVTCIAV	70
PaTEH2B	MGAEGGGGGITSVEVITLMEKAKFYTSLCLGTTA	IISVFAFLFL	IPFVVDPAISTIMSDYDPNPVTCIAV	70
PaTEH2C	MGAEGGGGGGITSVEVITLMEKAKFYTSLCLGTTA	IISVFAFLFL	IPFVV	49
PaTEH2D	MGAEGGGGGGITSVEVITLMEKAK	IISVFAFLFL	<u>IPFVV</u>	49
PaTEH2A	SYTYAEGLRNCSWSSCREGCTTAALRCHLILVNY	TRVPFSEWGN	RTIDSVVWDVGDTKFFINTEGCGYPP	140
PaTEH2B	SYTYAEGLRNCSWSSCREGCTTAALRCHLILVNY	TRVPFSEWGN	RTIDSVVWDVGDTKFFINTEGCGYPP	140
PaTEH2C				49
PaTEH2D				49
			M2	
PaTEH2A	RVNCSVFAKQYGLKNLMKPFPCYYSRTYPEMVVA	RYSWEDNLKH	LVLSLIVPNVLFGVSIGVLSYWYCPS	210
PaTEH2B	RVNCSVFAKQYGLKNLMKPFPCYYSRTYPEMVVA	RYSWEDNLKH	LVLSLIVPNVLFGVSIGVLSYWYCPS	210
PaTEH2C	A	RYSWEDNLKH	LVLSLIVPNVLFGVSIGVLSYWYCPS	86
PaTEH2D	A	RYSWEDNLKH	LVLSLIVPNVLFGVSIGVLSYWYCPS	86
PaTEH2A	CNRACNKKTYVDKYPTKEE*	230		
PaTEH2B	CNRACNKKTYVDKYPTKEDENEDDDDYYEEEEY*	244		
PaTEH2C	CNRACNKKTYVDKYPTKEE*	106		
PaTEH2D	CNRACNKKTYVDKYPTKEDENEDDDDYYEEEEY*	120		

**Figure 79.** Alignement des séquences protéiques des quatre ADNc codant la sous-unité PaTEH2 dans la chaîne nerveuse de *P. americana*. Quatre variants correspondant à la sous-unité PaTEH2 ont été clonés dans la chaîne nerveuse de *P. americana*. Les variants PaTEH2A et PaTEH2B diffèrent au niveau de leur extrémité C-terminale. Les variants PaTEH2C et PaTEH2D possèdent la même extrémité C-terminale que les variants PaTEH2A et PaTEH2B, respectivement, mais présentent une large délétion de la quasi-totalité de la boucle extracellulaire. Les segments transmembranaires (M1 et M2) sont encadrés en noir et les variations du C-terminal sont encadrées en orange.

Le deuxième variant, obtenu avec les amorces TP_58S/TP_63R, contient 360 pb et possède la même extrémité C-terminale que le variant PaTEH2B (**Figure 79**). Comme le variant PaTEH2C, il présente une délétion de 372 pb conduisant à une protéine contenant une boucle extracellulaire très raccourcie. Ce variant a été appelé PaTEH2D (**Figure 79**). Sur la totalité des colonies bactériennes mises en culture, la fréquence d'expression des variants PaTEH2C et PaTEH2D est de 4/84 et de 3/32, respectivement. L'analyse des séquences nucléiques codant les sous-unités TEH2 chez d'autres espèces d'insectes ainsi que leur organisation en exon et en intron suggère que les 372 pb absentes de la séquence de ces deux variants correspondent à l'intégralité d'un exon.

#### B-1-3-3 Edition d'ARN ou SNP

Le séquençage de 22 clones correspondant aux cadres ouverts de lecture des 4 variants codant les sous-unités PaTEH2A (8 clones), PaTEH2B (8 clones), PaTEH2C (3 clones) et PaTEH2D (3 clones), révèlent la présence de quelques substitutions nucléotidiques ponctuelles. La majorité de ces substitutions est silencieuse. En effet, sur les 22 clones, 7 clones possèdent une substitution d'un C par un T en position 27, 5 clones possèdent une substitution d'un T par un G et 1 clone présente une substitution d'un A par un G en position

21. En revanche, un clone présente une substitution conduisant à la substitution d'une valine(V) par une isoleucine (I) en position 70 (le nucléotide 278A est substitué par un G).

#### **B-1-4 Distribution tissulaire**

Pour étudier la distribution tissulaire des sous-unités PaTEH2 (PaTEH2A et PaTEH2B), des RT-PCR ont été réalisées sur plusieurs tissus en utilisant deux couples d'amorces ciblant chacun le cadre ouvert de lecture d'un variant (TP_58S/TP_59R pour PaTEH2A et TP_58S/TP_63R pour PaTEH2B, **Tableau 15**). L'intensité des bandes obtenues pour le variant PaTEH2B est plus faible que celles des bandes obtenues pour le variant PaTEH2A et ce dans tous les tissus étudiés (**Figure 80A**). L'absence de bande au niveau de la tête et des intestins pour le variant PaTEH2B ne signifie donc pas nécessairement que ce dernier n'est pas exprimé dans ces tissus. En effet, il peut être exprimé en très faible quantité non détectable par RT-PCR. Une PCR quantitative en temps réelle pourrait nous permettre de vérifier cette hypothèse.

De plus, les deux variants PaTEH2A et PATEH2B sont majoritairement exprimés dans la chaine nerveuse (**Figure 80A**). Le variant PaTEH2A est également fortement exprimé dans les ganglions thoraciques et les muscles du coxa.

La distribution des variants PaTEH2A et PaTEH2B dans les neurones DUM a été étudiée en réalisant des PCR emboîtées. Les couples d'amorces utilisés pour chacune des PCR1 ciblent les régions non-codantes de chaque sous-unité (TP_60S/TP_61R pour PaTEH2A et TP_60S/TP_62R pour PaTEH2B, **Tableau 14**). L'électrophorèse de 10 µl de produits PCR sur gel d'agarose n'ayant donné aucun résultat, une deuxième PCR a été réalisée en utilisant la PCR1 comme matrice, avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture de chaque variant (TP_58S/TP_59R pour PaTEH2A et TP_58S/TP_63R pour PaTEH2B, **Tableau 15**). L'électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose ne montre aucune bande indiquant qu'aucun des deux variants n'est exprimé dans les neurones DUM ou est exprimé en très faible quantité, non détectable par cette technique (**Figure 80B**).



Figure 80. Distribution tissulaire des variants PaTEH2A et PaTEH2B A. Expression des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B dans la tête, les ganglions thoraciques, la chaîne nerveuse, les muscles, les glandes reproductrices et l'intestin. B. Expression des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B dans les neurones DUM. Les produits PCR ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5%. Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5  $\mu$ g) et de matrice d'ADNc (1  $\mu$ l d'une dilution au 1/10^{ème}) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine.

#### B-1-5 Expression dans l'ovocyte de xénope

Seuls quelques ovocytes exprimant des courants  $Na^+$  ont pu être enregistrés avec les sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B. Les premiers résultats obtenus montrent que l'amplitude de courant  $Na^+$  enregistrés suite à leur co-expression avec la sous-unité DmNa_v1-1 dans l'ovocyte de xénope est similaire pour les deux sous-unités (~ 1,5 µA ; **Figure 81**). Cependant, l'amplitude du courant obtenu avec la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH2B semble être un peu plus importante qu'avec la combinaison DmNa_v1-1/PaTEH2A. Ces résultats préliminaires suggèrent que l'extrémité C-terminale régulerait la densité de courant Na⁺.



Figure 81. Traces de courants obtenus en co-exprimant la sous-unité DmNa_v1-1 avec les sousunités PaTEH2A (A) et PaTEH2B (B). Familles de courant Na⁺ enregistrées avec le protocole d'activation, dans l'ovocyte de xénope. Les courants sont enregistrés à différents potentiels allant de -70 mV à + 40 mV à partir d'un potentiel imposé de -100 mV. L'intervalle de temps entre deux enregistrements est de 10 ms.

Par manque de temps nous n'avons pas pu tester l'effet des variants PaTEH2C et PaTEH1D sur la densité de courant  $Na^+$ . L'absence de la boucle extracellulaire chez ces deux variants devrait probablement avoir un effet important sur les propriétés électrophysiologiques du canal  $Na_v$ . En effet, nous avons mis en évidence dans le paragraphe B-1-2 que cette région est très conservée chez les espèces d'insectes.

B-2 La sous-unité PaTEH3

#### **B-2-1** Clonage des ADNc

Pour amplifier un ADNc partiel codant la sous-unité PaTEH3, nous avons conçu des amorces dégénérées ciblant une région conservée de la sous-unité TEH3 entre les espèces. Les amorces TP_24S et TP_26R (**Tableau 9**) ont permis l'amplification d'un fragment de 1023 pb dont la protéine déduite partage 67% d'homologie de séquence avec la sous-unité DmTEH3 (**Figure 82**).





**Figure 82. Stratégie d'amplification de la sous-unité PaTEH3.** Les segments transmembranaires sont représentés par des rectangles noirs. Les traits pleins représentent les régions 5' et 3' non-codantes. B. La PCR réalisée avec les amorces dégénérées TP_24S et TP_26R a permis l'amplification d'un ADNc de 1023pb. Les 5' et 3'RACE-PCR ont permis d'amplifier respectivement des ADNc de 866 et, 272 et 455 pb. Les amorces TP_43S et TP_47R, ciblant les régions non-codantes, ont permis l'amplification d'une séquence de 1992 pb contenant un ORF de 1368 pb. Les amorces TP_44S et TP_45R ciblent l'ORF de la sous-unité PaTEH3.

Les informations de séquence obtenues suite au séquençage de ces ADNc partiels ont permis de concevoir des amorces spécifiques pour amplifier les régions 5' et 3' de la protéine. La technique de 5'RACE-PCR a permis d'amplifier une séquence de 866 pb contenant 479 pb correspondant à la région 5' non codante de la protéine et 387 pb correspondant à la partie 5' de la protéine (**Figure 82**). La technique de 3'RACE-PCR a permis d'amplifier deux séquences de 272 pb et 455 pb (**Figure 82**). Ces deux séquences sont identiques sur les premières 177 pb qui correspondent à la région 3' de la protéine. Puis la séquence de 272 pb contient 278 pb correspondant à la région an codante de la protéine. Ces résultats nous indiquent qu'il existe

deux régions 3'UTR différentes pour les transcrits PaTEH3. Les deux 3' UTR ont 74 pb en commun et seul le plus grand contient une séquence ressemblant à un site de polyadénylation (aataa au lieu de aataaa). Les deux séquences amplifiées par la 3' RACE-PCR possèdent toutes deux une queue poly-A (**Figure 83**).

Les données obtenues grâce au séquençage des régions 3' et 5' de la protéine nous ont permis de concevoir des amorces spécifiques ciblant d'une part les régions non codantes encadrant le cadre ouvert de lecture et d'autre part le cadre ouvert de lecture lui-même. L'amorce antisens ciblant la région 3'UTR (TP_47R) a été dessinée à partir du 3'UTR contenant un signal de polyadénylation putatif. Le couple d'amorce TP_43S/TP_47R (**Tableau 14**) a permis l'amplification d'une séquence de 1992 pb contenant un cadre ouvert de lecture de 1368 pb. La protéine déduite partage 66% d'homologie de séquence avec la sous-unité DmTEH3. Une interrogation de type Blast dans la banque de données GenBank révèle la plus forte identité de séquence entre PaTEH3 et TcTEH3 (71%).

attctcgtggcttgtttgtacgcccagagtgtcgggattacttagcaaatcgatttaqaaacactgtqatcaqatttqtacqcqaaaaatattqcqcaacttttqtqtqctactatqtqaatct cgcatcattttaatgcggtagtgcgtgtatttcgttccgatttcaccttttcaattaactttacgcagattctacactcgtcgatctcgtaaaagcagccaggcacgcaagggtcgccgcagaactatttcactaatcagtg agatcgtggaaaatacggccggcacctcaacgccatctatagtaacaccatcgcttgcagtgcttgcaaca tgagaatatagtcgatttaaaacctccgtcgtggatagaataaaactgcatctgtcacccatttatatcggATGCCCAAACAAAAGCCGATCCCTCCTGAAGACTTGATAATCCCGCCGCAAGACAACCGGATCTGTGGCACGATTTGCAT 80 M P K Q K P I P P E D L I I P P Q D N R <u>I</u> G Μ TM1  ${\tt GTGTCAGATGACGGCGGTCTTGAGTAGCGTGGCACTGGTGTACCTCACGGTGGCCGTGTACATGCCCACCTTGAGGGCCT_160$ C O M T A V L S S V A L V Y L T V A V Y M P T L R A TM1 TCCAGTCAGGCATATCCGAGGTGCCTGCGATGTGTACAACCACGCGACTGTGGAAGAAGGACGACTGCGAGTGGGGGCACA 240 FQSGISEVPAMCT TTRLWKKDDCEWGT TGCGGTGAGTGGTGCCTGAGTAAGAGCTCGGGAGCGTGCGAGCAAATATATGTCAACCTGCGACGCAACGGTTCGGAGCT 320 G E W C L S K S S G A C E Q I Y V N L R R Ν GSEL  ${\tt cattitcgagaactgtaccaacagtgcccaataagacttgttacggtatcgatcaagagaacgccaagaccagccgttgca} \quad 4\,0\,0\,$ I F E N C T N S A N K T C Y G I D Q E N A K T S R C  ${\tt tcgccgacgacgacgacacttcacggcgcactttcaactgcaccgccggtaactgcatcaacatcacagatgcttttgag } 480$ IADECKŅLTGTFŅCTAGNCIŅITDAFE TGCGTGTTCAAAGATACGGACCCGCCCCTGAAGTGCTCCGGTCGGAGAGGTAAGATAACGTGCATAGATTTAGATGGTCT 560 C V F K D T D P P L K C S G R R G K I T C I D L D G L  ${\tt GCAGAGTTGTGCGAGGGGACTTGTGAAAAAATTCGGACACCTTACAACTGTGACAGACGTTGCGTCGATATTCCCACTA \ \ 64\,0\,0$ Q S C V R G T C E K I R T P Y N C D R R C V D I P R N K N V I V L S G D K V F L S L C O R A L A T M D GAACCGCAGAAAGAAGTATGGACAGAGGATCAGGAAAACATCCTGATAACGTCTTGTTACACTGTGGAGAACACAACTCT 800 E P Q K E V W T E D Q E N I L I T S C Y T V E N T T L AGGAGTGATAGCTAATGACTGCATCAACGGGTCTCTTCTGTCGAAGGATACTCTTAGCGACCTGGCCAACTTCACCTATC 880 G V I A N D C I N G S L L S K D T L S D L A N F T Y  ${\tt TGAATTACCTGAGCGTTACGAACACCGGAACTTTTGGACCCCACCCGAGTCGTGGCACCCCTGGAAGTGGACCTGCTGAT 960$ NYLSVTNTELLDPTRVVAPLEVDLL  $\texttt{GCCAACGAGAGTCGCTTGCACATCAATATGGAGGGCTGTGTCAACACCTCCGCGACGAGTGCAGGGATTTCTTCCGCGA 1040$ A N E S R L H I N M E G C V N T L R D E C R D F F R E ATATGGTAAAGACGGTTCCAACCACAATGCCAGGGCGAGATTCCCCTGTTTCTATGCTGAGGCGGACCCCCAACAAAGTGG 1120 Y G K D G S N H N A R A R F P C F Y A E A D P N K V VAHFDLEGTYKQFLVAS Ρ т S F V TM2 TGCTTCATGCTCGTGTTCTGTCAGAAGACAGTCGAGGTGGGCGACGACGACGACGACGCCAAGATGCGCTTCAAGGGCTGTGCAAAACTC 1280 М V F C Q K T V E V G D D A K M R F K G C A N S F Τ. TM2  ${\tt CGACCTCATCATCGCTCCTGGAGACAATAGCGTCTGTGCCAACAACCTCGGTGACGGTGGCGGGGGAGACTCGGTTATGG \ 1360$ DLIIAPGDNSVCANNLGDGGGDS V Μ CGCTCTGA 1368 AL* OU gtcacgcattcccctcctgctcgagagcccggtccatcaccagcacgtgttcccgcttcaggatcactgaa gaataa gaaga catca a a cact ccg cacga c cacca cct cct gt at t ct ctt gt t g ca caca a c caca c cac cact c t g t t c t c t t g t t g ca caca a c caca c cac cac c c t c t g t t g ca caca a c caca c c caca c caca c c caca c c caca c caca c c caca c c caca c caca $\tt gttttctgcatgatgggcacttaacacgcggtgcggggcggatacttccacacaatacacggagccaggcc$ 

**Figure 83. Séquences nucléiques et protéiques de la sous-unité PaTEH3.** Les régions en lettres minuscules correspondent aux régions 5' et 3' non codantes de la protéine. Pour cette sous-unité, deux séquences différentes ont été mises en évidence pour la région 3' non codante. Les segments transmembranaires TM1 et TM2 sont soulignés en noir. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par des triangles verts.

#### B-2-2 Diversité moléculaire de la sous-unité PaTEH3

Comme observé précédemment pour la sous-unité PaTipE, un important polymorphisme nucléotidique a été identifié chez la sous-unité PaTEH3. 14 clones obtenus avec les amorces TP_44S et TP_45R et 5 clones obtenus avec les amorces TP_43S et TP_47R ont été séquencés. Sur ces 19 clones, 7 présentaient une séquence avec un décalage du cadre de lecture, dû à la délétion d'un nucléotide. Parmi les 12 clones restants, 21 substitutions nucléotidiques ont été identifiées dont 11 silencieuses (**Tableau 33**).

Nom du clone	Nucléotide présent aux positions :					Substitutions ponctuelles	
	24	441	588	664	961	Nucléotidiques	Protéiques
pGTEH3.1	С	Т	G	С	Т	G1249A	A417T
pGTEH3.2						T632C	I211T
•	т	C	Δ	C	С	T772C	S258P
	1	C	Α	C	C	G1074A	m.s
						A1080G	m.s
pGTEH3.3						T151C	m.s
						T560C	L187P
	C	Т	G	С	Т	A738G	m.s
						A1125G	m.s
						T1187C	L396P
pGTEH3.6						T139C	Y47H
-	С	Т	G	С	Т	C615T	m.s
						C906T	m.s
pGTEH3.8	Т	С	А	С	С	A945G	m.s
pGTEH3.12	т	C	۸	C	C	A86G	Q29R
_	I	C	Л	C	C	C1158T	m.s
pGTEH3.14	т	C	٨	C	C	T785C	V262A
^	I	C	A	C	C	A793G	T265A
p4TEH3.1	С	Т	G	Т	Т	G564A	m.s
p4TEH3.2	C	т	G	т	т	T594C	m.s
•	C	1	0	1	1	G628A	D210N
p4TEH3.3	С	Т	G	Т	Т		
p4TEH3.4	Т	С	А	С	Т		
p4TEH3.5	C	Т	G	Т	C		

Tableau 33 : Substitutions nucléotidiques identifiées chez la sous-unité PaTEH3.

G1249A signifie G est remplacé par A à la position 1249. m.s : mutation silencieuse.

En plus des substitutions nucléotidiques ponctuelles, 5 substitutions récurrentes ont été déterminées (**Tableau 33**). Les trois premières permettent de séparer les clones en deux groupes. Le premier groupe est constitué des clones pGTEH3.2, pGTEH3.8, pGTEH3.12, pGTEH3.14 et p4TEH3.4. Le second groupe est formé des clones pGTEH3.1, pGTEH3.3, pGTEH3.6, p4TEH3.1, p4TEH3.2, p4TEH3.3 et p4TEH3.5. Les deux dernières substitutions dérogent à la règle. Ces substitutions récurrentes pourraient être le résultat d'une édition de l'ARNm.

#### B-2-3 Analyse de la structure primaire de la sous-unité PaTEH3

#### B-2-3-1 Profil d'hydrophobie

L'analyse du profil d'hydrophobie de la sous-unité PaTEH3 montre que cette sousunité possède deux régions transmembranaires (M1 et M2, **Figure 84A**). Au regard du profil d'hydrophobie de la sous-unité DmTEH3 (**Figure 84B**), la topologie de cette protéine est conservée entre ces deux espèces d'insectes. Nous avons également noté que la boucle extracellulaire des deux sous-unités (PaTEH3 et DmTEH3) présente 5 régions relativement hydrophobes (**Figure 84**).



**Figure 84. Profil d'hydrophobie des sous-unités TEH3.** A. Profils d'hydrophobie de la sous-unité PaTEH3. B. Profil d'hydrophobie de la sous-unité DmTEH3. Les domaines transmembranaires M1 et M2 sont indiqués sur chaque profil. Ils correspondent aux régions pour lesquelles l'hydrophobie est la plus élevée.

### B-2-3-1 Conservation des motifs chez les sous-unités homologues à PaTEH3

L'alignement multiple de la sous-unité PaTEH3 avec les sous-unités de type TEH3 chez d'autres espèces d'insectes montre les régions conservées des sous-unités auxiliaires TEH3 des canaux  $Na_v$  d'insecte (**Figure 85**). La sous-unité PaTEH3 partage la plus forte identité de séquence protéique avec la sous-unité TcTEH3 (70,9%) et la plus faible avec la sous-unité ApTEH3 (55,1%) (**Tableau 34**).

Sous-unité auxiliaire	N-terminale	M1	Boucle extracellulaire	M2	C-terminale	Total
DmTEH3	60,0	89,2	67,0	52,3	51,0	65,7
AgTEH3	75,0	75,0	69,1	38,0	56,8	66,9
AaTEH3	70,0	75,0	68,5	42,8	52,9	66,0
CqTEH3	70,0	75,0	69,1	42,8	58,8	67,1
PhumTEH3	75,0	85,7	68,2	61,9	44,8	66,8
ТСТЕНЗ	80,0	82,1	72,9	57,1	53,0	70,9
AfTEH3	60,0	92,8	70,0	61,9	57,1	69,2
АрТЕНЗ	75,0	89,2	55,1	52,3	29,4	55,1
BtTEH3	60,0	89,2	71,2	57,1	55,1	69,4
AmTEH3	60,0	92,8	70,0	57,1	57,1	69,0
BiTEH3	60,0	92,8	71,2	66,6	55,1	70,1

Tableau 34 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre la sous-unité PaTEH3 et ses homologues chez d'autres espèces d'insectes.

Les numéros d'accession des sous-unités sont répertoriés dans le tableau 6.

Premièrement, les extrémités N-terminales des sous-unités TEH3 sont très courtes (20 acides aminés) comparées à la taille des sous-unités TEH3 (447 à 456 acides aminés). L'extrémité N-terminale de la sous-unité PaTEH3 partage de fortes homologies de séquences avec celles des autres sous-unités PaTEH3 (60 à 80%) indiquant que cette région a subit une pression de conservation peu élevée (**Tableau 34**). Contrairement aux sous-unités TEH1 et TEH2, les sous-unités TEH3 présentent peu de charges positives au niveau de leur extrémité N-terminale (2 à 4 selon les espèces d'insectes).

Deuxièmement, le segment transmembranaire M1 de PaTEH3 partage de forte homologie de séquence avec celui des sous-unités de type TEH3 (75 à 92,8%) alors que pour le segment M2, l'homologie de séquence est beaucoup plus faible (38 à 66,6%) (T**ableau 34**).

Troisièmement, la boucle extracellulaire de la sous-unité PaTEH3 représente presque 80% de la taille de la protéine (358 acides aminés) (**Figure 85**). Elle présente également 24  $\frac{1}{2}$  cystines conservées chez les autres sous-unités de type TEH3 (**Figure 85**). Quatre de ces  $\frac{1}{2}$  cystines (encadrées en jaune sur la **Figure 85**) forment des ponts disulfures chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa (Derst et coll., 2006). Les homologies de séquences partagées entre la sous-unité PaTEH3 et les autres sous-unités de type TEH3 sont relativement fortes (55,1 à 72,9%) suggérant un rôle important de la boucle extracellulaire (**Tableau 34** et **Figure 85**).

Quatrièmement, l'extrémité C-terminale de PaTEH3 partage des homologies de séquence moyennes avec celles des sous-unités homologues à DmTEH3 (29,4 à 58,8%).

	M1 * * * * *	
PaTEH3 DmTEH3	MPKQKPIPPEDLIIPPQDNRICGTICMCQMTAVLSSVALVYLTVAVYMPTLRAFQSGISEVPANCTTTRLWKKDDCEWGTCGEWCLSKSSGACEQIYVNL MGKKK-VPVEDLVVPPQDTRICGTICICQMTLVLSSVALVYLTVAIYMPSTRAFKSGIDPTPVMCTTTRAVNKDNCEWGSCGEWCLSKTSGACIQIYVNL	100 99
AgTEH3	mgkkkptpeedliippqdt <mark>r</mark> icgiicvcqltfvlstvaivxltvaiym <mark>p</mark> ssrafksgidetpvmctttralnqdacewgscgewclsktsga <mark>c</mark> iqiyvhl	100
AaTEH3	MGKKKPIPEEDLIIPPQNSQICGVICVCQLTFVLSTVAIVYLTVAIYMPSSRVMKSGIDETPVMCTTTKALNKDACEWGSCGEWCLSKTSGACIQIFVHL	100
CqTEH3	MGKKKPTPVEDLIIPPQDGKICGVICICQLTFVLSTVAIVYLTVAIYMPSSRAFKSGIDETPVMCFTTKALNKDACEWGSCGEWCLSKTSGACIQIYVHL	100
PhumTEH3	MGKKK-IPPEDLLIPPQDQRICGTICICQMTAVLSTVALVYLTVAIYVPSMKAFQSGISEVPVMCFTLRAVNNETCKWESCGEWCLSKSSGACIQIIVHS	99
TCTEH3	MPRKKPVPVEDLIIPPQDTRICGTICLCQMTLVLSSVÄIVYLTVÄIYVPSTRALKSGISEDPVMCTTTRAVQVEACDWGSCGEWCLSKTSGACMQIYVNL	100
AITEH3	MP - KOVPENLVIPPODGRICGTICICOMTAVLSSVALVYLTVAIVMPSTRAFOSGISEVPVNCFTIRAVNADACEWGSCGEWCLSKTSGFCVDINNL	98
ADIEU3	MPAKE I VEDLVVF QD I AIGHT CVCMI AVLSSVAI VI HIVAT IMPIME ASGISEDVVCI TANVSSADWSSSWCLSAF SGGCAQI VI	100
AmTEH3	MP-KOVPUENT VI PODOGEICCETT COMTAVISI VALVII TVAI VOSTBAFOSCI SEVEVICITAT VAD NOCHEGOSCI SEVEVICI SE SCI SE SC	98
BiTEH3	MP KOVPUENT VI PODGEICGTICICOMTAVI, SVALVYLTVA I VMPSTBAFOSGISEI PV/CTTIBATNAD/CEWGSCGEWCI, SKTSGPCVOIFUNT	98
PaTEH3	${\tt RRNGSELIFE} NCTNS {\tt ANKTCYGIDQENAKTSRCIADECKNLTGTFNCTAGNCINITDAFECVFKDTDPPLKCSGRRGKITCIDLDGLQSCVRGTCEKIRT}$	200
DmTEH3	${\tt RS} {\tt NGSNLIF} {\tt O} {\tt NCTNSANKTCYGID {\tt O} {\tt DRAD} {\tt KARCINDECKNLTGTFNCTAG {\tt O} {\tt Clnitdafecifh} {\tt NS} {\tt DAFV} {\tt KCSGRRGKINCMDISGLYSCSRGTCRKIRT}$	199
AgTEH3	${\tt RM} {\tt NGSSLLFT} {\tt NCTNSANKTCYGIDQENAKKSRCIADECKNLTGTFNCSAGMCINITDAFECVFKNTDPPLKCSGRRGKITCIDITGLFSCNRGTCRKIRT$	200
AaTEH3	${\tt rtngssltf} {\tt o} {\tt nctnsanktcygid} {\tt enakkarciadecknltgtfncttgmcinitdafecvfkntds} {\tt plkcsgrrgkitcidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrkirtittictidinglfscnrgtcrkirtistictidinglfscnrgtcrk$	200
CqTEH3	RNNGSSLTFQ NCTNSANKTCYGIDQENAKKARCIADECKNLTGTFNCTTGMCINITDAFECVFHNTDVPLKCSGRRGKITCIDINGLFSCNRGTCRKIKT	200
PhumTEH3	RRNGSDLLFANCTNTANKTCYGIDQESAVKYRCIADECKNLTGTFNCSAGVCINITDAFECEFKMTDPPSKCSGRRGKITCSTIEGLQYCDRGTCERIRT	199
TCTEH3	RENGSNILLANCTNTANKTCYGIDØENAKKSRCIADDCKNLTGTFNCTTGMCINITDAFECIFKDTDPPLKCSGRRGKITCIDLNGLYSCNRGTCERIRT	200
ATTEN3	RENGSTILLANCTNTTNKTCYGIDOENAKISKCIADECENLIGTFNCSSGVCINITDAFECIFHDTDPPMKCSGRRGKITCIDIDGLFNCNRGTCERIT	198
APTERS BAMENS	RONGSALLINGSNVNNTGFEDPENARTICIRDELATETGTENGEGVINITDAFREFENTEPPLACOSINGNITAAIGENGEGSILLE	200
AmTEH3	RENGSATIANCINIINALCIGIDQUNARSACIADERALIGIENCISGVENTIDAEECIERDIDEPAKESGRAGATICIDIDGE PAUNGELERIKI	190
BiTEH3	RENGS AT TLANCING THAT CYGIDOENAKKSKCI ADECRUITGTENCTS GVCINITDAFECI FHDTDPENKCSGREKITCIDIDGI FNCNKGICERIET	198
	* * * * *	100
PaTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNVIVLSGDKVFLSLCQRALATMDDEPQKEVWTEDQENILITSCYTVENTTLGVIANDCINGS	278
DmTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNVVVLSGDKVYLSQCQNAINAETLEEVWNESSENVAMTSCYFIRHTSDQVDAVDCINGS	274
AgTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNMILLSGDKVYLSQCSSAIDMETKQEVWNEAEDKVIMSSCYNIQNTSLGIEAIDCVNGS	275
AaTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNMILLSGDKVYLSQCSNAIDTVKNTEVWNESDNKVIMASCYTIQNTSNGIQATDCVNGS	275
CqTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNMILLSGDKVYLSQCSVAIDAATNQEVWNESDGKVIMSSCYTIQNTTNGIQATDCVNGS	275
PhumTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNIILLSGDQAYLSQCR	274
TCTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNVILLSGDKVYLSQCQRAIDLDSGEEVNNESQDNIMMSSCYNICATTRGVVAIDCVNGS	275
ALIERS ADTENS	FINCDERCYDIFIERERMILLIDIVILGUC - RAIDYUNERERDIGET - SIDYLAYDCHARGON CHARACTER - SIDYLAYDCHARGON CHARGON CHARACTER - SIDYLAYDCHARGON CHARACTER - SIDYLAYDCHARGON CHARACTER - SIDYLAYDCHARGON CHARGON CH	2/3
артенз в+тенз	FINCEARCY DIFFINING VIG BARANCE STREET FOR DEALERS AND THE STREET STRE	273
AmTEH3	PYNCDRRCVD I PTRNNMT LLTGDKVYLSOCE	273
BiTEH3	PYNCDRRCVDIPTRNKNMILLSGDKVYLSQCERAIDVETNREIWHEDRGDVMMASCYGIFNSTLGVEAVDCINGS	273
	* * *	
PaTEH3	LLSKDTLSDLANFTYLNYLSVTNTELLDPTRVVAPPEVDLLIANESRLHINMECCVNTLRDECRDFFREYGKDGSDHNARARFFCFYAEADPNKVVAHFD	378
DmTEH3	TLETNMLSDLTNFTYLSHLHVSVATPVPEIAPPDVDLTISNESKLMINLEGCVNTLMDECKEFLKDFGRDGSDHNARARFFCFYSPGKKDVVVARFD	371
AgTEH3	VLEKTELTDLTNFTYLSYLHYAVSKPIKVIAPQEQDLTLSNESRLMINLEGCVNTLQDECKEFIKEFGKDGTDHNARARFFCYSKSKMQQVVARFD	372
Compus	LLEXDELTIDITIET ILSI LEIAVSTPIAT IAPLEQULTISEESALMINEEGOVITLOBECKDE LEEIGKUGTURAAREEGOTISTAAPDMV VARED	372
CQIENS PhumTFH3	In DECIDENTIAL INTERFILIS IN TAX - VSTPARTAR DEDUCTION IN DECOMPANY AND ADDRESS OF THE STRUCTURE OF THE STRU	374
TOTEH3	LI PNVINDI TNETVI SVI SVENUVI DEKRITA POPODI LI ANESKI LI TNESKI U TNESKI U TNESKI SVENUVARED	375
AfTEH3	VLEKDLITDLTNFTYLSYLNIFATKPLDETRMVAPPEODLIIANESRLLINLECCVNTLREECKEFLEEYGKDGSDHNARARFFCYYAESNTGIVVSRFN	373
ApTEH3	LLRODYLADFANFSHLTNLNAQSDRPIVAGDVVAPREHKLLIAKDSHLHINLEGCVNTLRGECDVFIRRFGKDGSDHNARARFFCFYATGIPELAVVRFD	400
- BtTEH3	VLEKDLLSDLTNFTYLSYLNIFATKPLDETRMVAPPEQDLIIANESRLLINLEGCVNTLREECKEFLHVYGKDGSDHNARARFFCYAEGDTGIVVSRFN	373
AmTEH3	VLEKDLLTDLTNFTYLSYLNIFATKPLDETRMVAPPEQDLIIANESRLLINLEG <mark>C</mark> VNTLREECKEFLHEYGKDGSDHNARARFF <mark>C</mark> YAESNTGIVVSRFN	373
BiTEH3	VLEKDLLSDLTNFTYLSYLNIFATKPLDETRMVAPPEQDLIIANESRLLINLEG <mark>C</mark> VNTLREECKEFLHVYGKDGSDHNARARFFCYAEGNTEVVVSRFN	373
	M2	
Paten3	LEGTYKGFIVASILPSTLFVISCFMLVFCQATVEVGDDTKMKFKGCANSDLILAPGDNSVCANNLGDGGGOSVMAL* 450	
DMIEHS		
Agrens	MEASYKOFMUGFFUPTILFAUSCLTLIFCOKTIHIGDDARMEFUGGADKEALSASGGUNGKSKANSGDGGGGGDAVMAL* 452	
Calens	LETTYKOFVVGTVLFAVSCLTLIFCONTIHVGDDAKMFVGCANKEGSTANGCAKNKANANSGDGGGGDSVMAL* 452	
PhumTEH3	LATTYKEFLIASVLPSVLFVVSCLTLLLCORTVVVGDDAKMRFKCANNSQIIGIEKTASGSIREVGSAMAL* 446	
TCTEH3	LATTTKQFLIASVLPTVLFVVSCLTLILCQRTVVVGDDAKMRFQSCVAGDGETIEKTTSANNMTDRGGGNSIMAL* 451	
AfTEH3	LENTYKE FLIALLEPSILFVVSCLTLIFCOKTVVVGDDAKMRFKGTVGA-LSSMEKSASGNLGDAGGGNSAMAL* 447	
ApTEH3	LGRTYKEFLVASVVPVVMLVISCLTLILCQRTVEVGDDAKMRFKRKSIRTLFPLHDRELDSIAGHRPSTVDLDNTSL* 478	
BtTEH3	LESTYKEFLISLVFPSVLFVISCLTLIFCQRTVVVGDDAKMRFKGTVGAGLTSIEKSASGNLGDAGGGNSAMAL* 448	
AmTEH3	LENTYKEFMIALLLPSILFVVSCLTLIFCQKTVVVGDDAKMRFKGTVGA-LSSMEKSASGNLGDAGGGNSAMAL* 447	
BiTEH3	Lestykeflialvlpsvlfviscltlif¢qrtvvvgddakmrfkgtvgagltsieksasgnlgdagggnsamal* 448	

Figure 85 Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH3, DmTEH3, AgTEH3, AaTEH3, CqTEH3, PhumTEH3, TcTEH3, AfTEH3, ApTEH3, BtTEH3, AmTEH3 et BiTEH3. Les segments transmembranaires M1et M2 sont encadrés en rouge. Les  $\frac{1}{2}$  cystines sont indiquées par des étoiles (*). Celles qui sont connues pour former des ponts disulfures chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa sont encadrées en jaune. Les sites de N-glycosylation conservés entre les espèces sont indiqués par des triangles inversés verts ( $\checkmark$ ).

#### **B-2-4 Distribution tissulaire**

Pour étudier la distribution tissulaire de la sous-unité PaTEH3, des RT-PCR ont été réalisées sur différents tissus avec les amorces TP_44S et TP_45R (**Tableau 14**). L'électrophorèse sur gel d'agarose montre que la sous-unité PaTEH3 est majoritairement exprimée dans la chaîne nerveuse et le tissu musculaire (**Figure 86A**). Elle est moyennement exprimée dans les glandes reproductrices et les ganglions thoraciques, et est très faiblement exprimée dans l'intestin. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Derst et coll (2006) pour la sous-unité DmTEH3. En effet, la sous-unité DmTEH3 est majoritairement exprimée dans le système nerveux central de la drosophile.

La distribution de PaTEH3 dans les neurones DUM a été étudiée en réalisant des PCR emboîtées. Les couples d'amorce utilisés pour chacune des PCR1 ciblent les régions noncodantes de la sous-unité (TP_43S/TP_47R, **Tableau 14**). L'électrophorèse de 10 µl de produits PCR sur gel d'agarose n'ayant donné aucun résultat, une deuxième PCR a été réalisée en utilisant la PCR1 comme matrice, avec les amorces ciblant le cadre ouvert de lecture de la sous-unité (TP_44S/TP_45R, **Tableau 15**). L'électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose ne montre aucune bande indiquant que la sous-unité PaTEH3 n'est pas exprimée dans les neurones DUM ou est exprimé en très faible quantité, non détectable avec cette technique (**Figure 86B**).



**Figure 86. Distribution tissulaire de la sous-unité PaTEH3.** A. Expression de la sous-unité PaTEH3 dans la tête, les ganglions thoraciques, la chaîne nerveuse, les muscles, les glandes reproductrices et l'intestin. B. Expression de la sous-unité PaTEH3 dans les neurones DUM. Les produits PCR ont été séparés sur un gel d'agarose à 1% (pour PaTEH3) ou à 1,5% (actine). Des quantités équivalentes d'ARN totaux (5  $\mu$ g) et de matrice d'ADNc (1  $\mu$ l d'une dilution au 1/10^{ème}) ont été utilisées pour réaliser les différentes RT-PCR, comme le témoigne les intensités similaires des transcrits du gène de l'actine.

#### B-3 Discussion générale

#### B-3-1 Une diversité moléculaire propre à chaque type de sous-unité

B-3-1-1 Des variants issus de l'épissage alternatif

Dans cette partie nous avons identifié 4 variants différents pour la sous-unité PaTEH2. Deux de ces variants, PaTEH2A et PaTEH2B, diffèrent au niveau de leur extrémité Cterminale. Comme observé pour la sous-unité PaTEH1, la séquence nucléique codant l'extrémité C-terminale du variant PaTEH2A présente la séquence du site consensus donneur d'épissage commençant par le di-nucléotide GT. Ces observations suggèrent donc que cette séquence est un intron et que le variant PaTEH2A est le résultat d'une rétention d'intron. PaTEH2B serait donc un variant issu de l'épissage de cet intron. Pour la sous-unité PaTEH2, deux autres variants rares (moins de 5% des clones pour PaTEH2C et 9% pour PaTEH2D), ont été identifiés lors du clonage de la sous-unité dans le vecteur d'expression pGEM. Ces deux variants sont dépourvus de la séquence correspondant à la boucle extracellulaire reliant les deux segments transmembranaires. Une étude réalisée sur les séquences d'ADN génomiques des sous-unités TEH2 disponibles dans la banque de données GenBank nous a permis d'identifier les régions correspondants aux introns et aux exons. Ces observations suggèrent que cette boucle extracellulaire est codée par un exon. Ces deux variants, PaTEH2C et PaTEH2D sont donc des variants épissés. D'autre part, le variant PaTEH2C à la même extrémité C-terminale que PaTEH2A. L'ARNm aurait donc subi deux modifications posttranscriptionnelles pour conduire à la sous-unité PaTEH2C : 1) une rétention d'intron et 2) l'épissage d'un exon.

En revanche, un seul variant a été identifié pour la sous-unité TEH3. Ceci peut s'expliquer par le fait que chez les autres espèces d'insectes, le gène *teh3* ne contient pas d'intron. Par conséquent il ne peut pas y avoir d'épissage alternatif. Cependant, nous avons identifié deux régions 3'UTR différentes. Il a été montré que des ARNm présentant la même séquence codante mais des extrémités 3' non codantes différentes pouvaient avoir des demivies différentes (Sureau et Perbal, 1994). Ce mécanisme pourrait participer à la régulation de l'expression de la sous-unité PaTEH3 via les ARNm.

241

#### B-3-1-2 Le polymorphisme individuel

Chez la sous-unité PaTEH3, nous avons observé un polymorphisme individuel important. En effet, les douze clones complets séquencés ont révélé la présence de 21 substitutions nucléotidiques ponctuelles dont 5 récurrentes suggérant une édition de l'ARNm. Jusqu'à 5 substitutions ponctuelles ont été relevées pour un même clone. Ces observations ont également été faites avec la sous-unité PaTipE, pour laquelle 6 substitutions (dont la moitié sont silencieuses) ont été identifiées pour un seul clone. Pour la sous-unité PaTEH2, peu de substitutions ont été identifiées.

Avec les sous-unités PaTEH2 et PaTEH3, nous avons pu observer deux mécanismes distincts conduisant à une diversité moléculaire importante. La sous-unité PaTEH2 doit sa diversité moléculaire à l'épissage alternatif qui conduit à 4 variants distincts. La diversité moléculaire de la sous-unité PaTEH3 serait quant à elle probablement due à de l'édition d'ARN. Pour confirmer ces observations, il serait nécessaire de réaliser des PCR sur l'ADN génomique. En conclusion, les résultats obtenus précédemment avec les sous-unités PaTEH1 et PaTipE, suggèrent que les variants des sous-unités PaTEH2 et PaTEH3 auront un effet régulateur différent sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal Na_v.

#### **B-3-2** Conservation de la structure

L'alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités de type TEH2 et TEH3 a révélé la conservation de nombreux motifs et déterminants moléculaires. Pour les deux types de sous-unités nous avons mis en évidence la conservation des  $\frac{1}{2}$  cystines (8 pour TEH2 et 24 pour TEH3). Parmi toutes les  $\frac{1}{2}$  cystines identifiées, 4 sont connues pour être impliquées dans la formation de ponts disulfures chez les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa de mammifères (Derst et coll., 2006). Le nombre très important de  $\frac{1}{2}$  cystines présentes dans la boucle extracellulaire des sous-unités de type TEH3 ainsi que la taille importante de cette boucle (près de 80% de la taille de la protéine) suggèrent la présence d'autres ponts disulfures conduisant à une structure tertiaire plus complexe que celles des sous-unités de type TEH1 et TEH2. De plus, 3 des 6 sites putatifs de N-glycosylation de la sous-unité PaTEH3 sont conservés chez les autres espèces d'insectes indiquant que les asparagines impliquées dans ses sites jouent un rôle fonctionnel important.

L'alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités de type TEH2 montre que les deux variants PaTEH2A et PaTEH2B partagent les plus fortes homologies de séquences (de l'ordre de 55%) avec les sous-unités TEH2 des espèces de moustiques (*A. gambiae*, *A. aegypti* et *C. pipiens quinquefasciatus*). Pour cette sous-unité, les régions les plus conservées sont les segments transmembranaires M1 et M2, ainsi que la boucle extracellulaire qui les relie. Cette forte conservation suggère donc que ces régions sont impliquées dans des rôles fonctionnels conservés entre les espèces d'insectes.

La sous-unité PaTEH3 présente quant à elle de fortes homologies de séquence avec les autres sous-unités de type TEH3. Comme nous avons pu le voir sur l'alignement multiple des séquences TEH3, toutes les régions de la protéine sont conservées ce qui nous indiquent d'une part que la sous-unité TEH3 doit avoir un rôle fonctionnel conservé entre les espèces d'insectes et d'autre part que le gène qui la code, *teh3*, a subi une faible pression de sélection.

#### **B-3-3** Conservation de la distribution tissulaire

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence la conservation de la distribution tissulaire des sous-unités PaTEH1 et PaTipE, par comparaison avec leurs homologues chez la drosophile, DmTEH1 et DmTipE. Chez D. melanogaster, les sous-unités TEH2 et TEH3 présentent une distribution tissulaire ubiquitaire (Derst et coll., 2006). Les résultats que nous avons obtenus pour la sous-unité PaTEH2 montrent une distribution tissulaire différente pour les deux variants. La sous-unité PaTEH2A a une distribution tissulaire ubiquitaire alors que la sous-unité PaTEH2B n'est pas exprimée dans la tête, ni dans l'intestin. Cependant, l'étude de Derst et son équipe montre la distribution tissulaire d'un seul des deux variants de DmTEH2. Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure quant à la conservation de la distribution tissulaire de la sous-unité PaTEH2. La sous-unité PaTEH3 est exprimée dans tous les tissus sauf la tête. La distribution tissulaire de la sous-unité DmTEH3 n'ayant pas été réalisée sur cette partie, il est difficile de conclure à une distribution tissulaire différente pour la sous-unité PaTEH3. Les RT-PCR semi-quantitatives réalisées dans les différents tissus montrent que les deux variants de PaTEH2 et PaTEH3 sont majoritairement exprimés dans la chaîne nerveuse, indiquant un rôle important des sous-unités auxiliaires dans le tissu nerveux. Cependant, ces trois sous-unités (PaTEH2A, PATEH2B et PaTEH3) ne sont pas présentes dans les neurones DUM, comme observé pour PaTipE.

#### C- La sous unité TEH4

#### C-1 Amplification des ADNc codant la sous-unité PaTEH4

La même stratégie de clonage a été utilisée pour tenter d'amplifier la sous-unité PaTEH4. L'utilisation du couple d'amorces dégénérées TP_34S et TP_35R a permis l'amplification de plusieurs fragments d'ADN de 513 pb à 942 pb. Après avoir soumis ces différents fragments à une analyse de type BLAST, il est apparu que ces amplicons correspondaient à la sous-unité PaTEH3 (4 clones) ou à des ADNc non spécifiques (transporteur de phosphate dans la mitochondrie (2 clones) et précurseur d'une protéine de la famille des cadhérines (4 clones)).

#### C-2 Comment expliquer la difficulté d'amplifier la sous-unité PaTEH4 ?

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'incapacité à cloner la sous-unité PaTEH4. Tout d'abord, comme indiqué dans l'introduction bibliographique (paragraphe C-2-1-1), le gène codant la sous-unité TEH4 n'existe pas chez toutes les espèces. Il est en effet absent du génome des moustiques *A. gambiae*, *A. albopictus*, *A. aegypti* et *C. pipiens quinquefasciatus* et du ver à soie *B. mori*. Une des hypothèses probables serait qu'il n'y ait pas de gène codant la sous-unité TEH4 chez la blatte *P. americana*.

La deuxième hypothèse repose sur la forte homologie de séquence entre les sousunités TEH3 et TEH4. En effet, chez toutes les espèces présentant les deux sous-unités, TEH3 et TEH4 partagent de forte homologie de séquence (34% chez *D. melanogaster*). De plus, l'alignement des séquences correspondant à la sous-unité TEH4 chez plusieurs espèces d'insectes (*D. melanogaster, A. mellifera, N. vitripennis, T. castaneum, A. pisum* et *P. humanus corporis*) montre très peu de régions conservées qui en plus présentent une très forte homologie de séquence avec la sous-unité TEH3. (**Figure 87**).

En conclusion, il est possible que la sous-unité TEH4 existe chez la blatte *P. americana* mais que sa forte homologie de séquence avec la sous-unité PaTEH3 ne permette pas de l'amplifier avec des amorces dégénérées. Dans ce cas, seul le séquençage complet du génome de *P. americana* pourra permettre d'identifier la séquence du gène codant cette sous-unité.

	M1 TP_34S	
DmTEH3	MGK-KKVPVEDLVVPPODTRICGTICICOMTLVLSSVALVYLTVAIYMPSTRAFKSGIDPTPVMCTTTRAVNKDNCEWGSCGEWCLS	86
PhumTEH3	MGK-KKIPPEDLLIPPODORICGTICICOMTAVLSTVALVYLTVAIYVPSMKAFOSGISEVPVMCTTLRAVNNETCKWESCGEWCLS	86
TOTEH3	MPKKKPVPVEDLITPPODTRTCGTTCTCOMTLYLSSVATVYLTVATYVPSTRALKSGTSEDPVMCTTTRAVOVEACDWGSCGEWCLS	87
ADDER3		07
APIENS Ammeus		05
AMIERS		0.0
DmTEH4	MGRR-KDKPRVIPEQDARICRAICCQLTMVLSCVSIVYLSVAIYSPSLKAFKSGFELDPVMCQTVDRQMPNNCPWASCGEWCLT	84
PhumTEH4	MPRR-ENKERIIPKQNKALVAGICSCQLTVVLSLVAFIYLSVAIYMPSFRAFKSGFETIPVTCQTVETVMINNCSWASCGEWCLT	84
TcTEH4	MGRRNKCKPRMIPQQDKRICGCICFCQLVVVFSCVSLIYLTVAIYIPSYRAFHSGFEERPVMCQTVNTSMLNNCSWASCGEWCLT	85
ApTEH4	MAAKDRGGNSAGGGSRKKKHEPPPKPIPEQDRHICGLICV <mark>C</mark> QLTFVLSSVSLVYLSVAIYVPG <mark>Y</mark> RAFNAAIETVPLMCQTINSTVSNNCEWASCGEWCLT	100
AmTEH4	MGRKHKRRLIPEQDRRICGSICF <mark>CQFTIVISCVALVYLSVAIYMPSH</mark> RAFHAGIDPDPVMCQTVNTTLTNNCGWASCGEWCLT	83
NvTEH4	MGRKYKPRSIPEQDRKLCGSICVCQFTIVISCVALVYLSVAIYMPSHRAFNAGIDPDPVMCQTVNATLVNQCTWASCGEWCLT	83
DmTEH3	KTSGACIOTYVNLRSNGSNLIFONCTNSANKTCYGIDODRADKARCIND-ECKNLTGTFNCTAGOCLNTTDAFECIFHNSDAFVKCSGRRGKINCMDISG	185
PhumTEH3	KSSGACTOTTVHSDBNGSDLIFANCTNTANKTCVGTDOFSAVKVRCTAD-FCKNLTGTENCSAGVCTNTTDAFFCFFKMTDDDSKCSGDBGKTTCSTTEG	185
mempu2		100
TCTERS		100
Артенз	RPSGGCAQIIVNIRQNGSALLLHNCSHVVNATCFGFDENAKRITCIRD-ECKTLTGTFNCTEGVINITDAFRCFFRNTEPPIRCNEIRGAITCMAIAG	180
AmTEH3	KTSGPCVQIHVNLRRNGSRILLANCTNTTNKTCYGIDQENAKKSKCIAD-ECRNLTGTFNCSSGVCINITDAFECIFHDTDPPMKCSGRRGKITCIDIDG	184
DmTEH4	KTSGFCPQIHSIVRRNGTDIQLNNCTRVTNTSCAMIDLSRLNKFNCNNGTACNNIRGVFNCSNGHCKNMSEFFLCHHKADGLTVNSQKDNTKLNG	179
PhumTEH4	KTTGFCPQIHVTVRKNGTDMILENCSRMSRSSCPPAKPETLHKYNCNNGKECNSLTGLFNCSLGHCINISQIYLCDYKTESIFIDSEKDNTKLNG	179
TcTEH4	KTSGFCPQIHATTRQNGTTIQLQNCTNFRTSHCPPVNANDLKKHNCNNGTECSSLKGVFNCSLGHCTNVSQIYECHYRADGFTVDSDKDNAKLNG	180
ApTEH4	KPSGNCPQYLVTVRQNGTEIGVENCTRLTSVSCPQANPDTLKRYNCNNNRECLGLTGIMACRLGHCSNMSELYQCYYNKSGSPINSDIENLKLNG	195
AmTEH4	RTTGFCPQIHATVRRNGTDIVFENCTKFNSISCPQVNTASLKKYNCNNGSECSVLSGLFNCSLGHCVNISELMLCHYKADGIVVDSEKDNMKLNG	178
NvTEH4	KTTGFCPQIYSSVRRNGSDLVFENCTRIGSVACPMVNVAAVKRYNCNNGSECGMLTGVFECKLGHCSNLSEVMOCHDHPDGVVVDAEKDNMKLNG	178
DmTEH3	LYSCSRCTORKTRTPYNCDRRCVD-TPTRNKNUVULSCDKUYLSCCONATNAETLER	259
PhimTEHS	LOY OR OTHER TREPAY OF REPAY OF THE NEW TILLS OF A VISO FRATE TO DESCORE	259
TATEU2		200
TCTERS		200
Артенз	LNSCLRGE/SKILEPINCDRRCVD-IPIRNKNVIVLSGDRIFLARCDARAHLPGIMEGDPLPGEIEDGDGGIIENERRRRIWSEEQDDVLIASCMSVV	283
AmTEH3	LFNCNRGTCERIRTPYNCDRRCVD-IPTRNKMMILLTGDKVYLSQCERAIDVQTNREIWHEDRGDVMMASCYGIF	258
DmTEH4	FFECHGVHCTKIKKPFSCDRYCSK-ITTTNVNTLIMHEDNLIAADCENAVAFNQARGSEHGVRIEPFEFWK-EDDGNLLTNCATVT	263
PhumTEH4	FFECKNSRCAKIKKAMTCDRYCQK-ITTSGMNVYISYDNDVYSLDCQKMFSDEESKKEIWSEERYSDVLFVSCTKV	254
TcTEH4	IFECKGSKCTKIKRGFSCDRICKENITSVGKNVFITSGNKVYQASCESAVASTIANGNEEGNEIEPTQFWTRKNEEVFMVSCHTIR	266
ApTEH4	YFICDNCSCFTIKWPFDCDRYCNK-ITTTGVNVFLRLGDTVHTGDCQRVVAYNKANGNAAHGEPLATPKEIWTDENSTIGIFMASCNGIT	284
AmTEH4	YFSCHNSRCTKIKSPFSCDRYCPD-IVTSDVNVFLMQDDNIVTVKCERGLALNKANGNLPGVRLTTPHQFWEDRNGSIIVSCLAVD	263
NvTEH4	NFRCVNSRCTRIKHHFSCDRYCPK-MSTTGANVFLMQGDNVLTAACSRALALNKANGNKPGRLSKPVEVWKKGDDAIIASCFAVN	263
DmTEH3	HTSDQVDAVDCINGSTLETNMLSD-LTNFTYLSHLHVSV-ATPVPEIAPPDVDLTISNESKLMINLEGCVNTLMDECKEFLKDFGRDGSDHNARA	352
PhumTEH3	NTSNGVEAVDCINGTLLPKTALHD-VTNFTYLAYLSVWS-SVPLDERKLIAPPEHELIIANESRLKINLDGCVNTLRDECKEFLREYGKDGTDHNARA	355
TCTEH3	NTTRGVVAIDCVNGSLLPNNVLND-LTNFTYLSYLSVEN-TVPLDEKRIIAPPEPDLLIANESKLLINLEGCVNTLRDECKEFLRVYGKDGTDENARA	356
ADTEH3	LCCPDCDLLATDOWNCSLIFODVLAD-FANFSHLTNINAOS-DRDIVACDVLADPEHKILLAKDSHLHTNLECOVNTLPCPDVFTPFFCKDCSDHARA	3.81
APTEU2	NOT CHEAT CALL AND THE TRUCK AND A THE AND THE AND THE AND AND AND THE AND AND THE AND	251
Demetid		261
DMTEH4	RESONK-ITATOCINGTILLEADTLPAPPMNFTQFWATTENS-TRSVDPEQRILPNQANTTISWALLFINLEGUNTLRGECUNTRGECUNTVARIGNDODNITAQS	201
PhumTEH4	DKVDnmTLKGnDCIngTLVPESSIPTPFINHTLFWTIIHNS-TKSFDTTDEFLPDQKSLTIINISKLIIINLGCVNTLKGECKEFLSTHGKDGKNKTAIS	303
TcTEH4	YNIDEHYINASDCINGTLYNSEDLPSPFMTFKEFWNLTGRW-KAVLDPQEKYVPMQSALTIYNTSRLYINLDGCVNTLKGECLDFLNSHGSDGKNQTAQS	365
ApTEH4	RDSVNS-LRAFDCINGTVLNESQMPQLFINFTTFWSIYEAS-DRLLDETNTFVPAQSALTIYNSTRLYINQQGCVNTLRNECKDFSFTHGRAGDNHTALS	382
AmTEH4	-KKMND-VRTQDCVNGTLLKEIPLPQPTINFTSFLNIYEKSLQYPVDPTNIYVPAQRSLTIYNSSRLYINFEGCVNTLKGECKDFLATHGRDGDDQTAQS	361
NvTEH4	-kvadr-iraedcvngtlisaslipQpyvnfttfigLygvslQrkvDpndtyvpsQrsltiynnsrlyinlegcvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgddnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgddnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgddnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgddnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgddnQtaQstructurescvntlrgecrdflvshgadgdddnqtnqtructurescvntlrgecrdflvshgadgdddddddnqtnqtructurescvntlrgecrdflvshgadgdddddddddddddddddddddddddddddddddd	361
	<u>M2</u>	
DmTEH3	RFPCFYSPGKKDVVVARFDLEVTYRQFVFASVVPSVLFVVSCSILIMCQTTVYVGDDAKMRFKGCVDTETVLN	425
PhumTEH3	RFPCYYSENNPDMVVARFDLATTYK <mark>E</mark> FLIASVLFSVLFVVSCLTLLLC <mark>Q</mark> RTVVVGDDAKMRFKCANNSQIIGI	428
TcTEH3	RFPCFYSNDNPGVVVARFDLATTTKQFLIASVLPTVLFVVSCLTLILCQRTVVVGDDAKMRFQSCVAGDGETI	429
АрТЕНЗ	RFRCFYATGIPELAVVRFDLGRTYKEFLVASVVPVVMLVISCLTLILCORTVEVGDDAKMRFKRKSIRTLFPL	454
AmTEH3	RFPCYYAESNTGIVVSRFNLENTYKEFMIALLLPSILFVVSCLTLIFCOKTVVVGDDAKMRFKGTVG-ALSSM	426
DmTEH4	RYOCYYNKDSN-VEFWARYDLDKYYRFLLYSLIVFTVLFVISSISLCIITKSVKVGDDAKMRCYCAGDDSDNGGFGDGLANKOODOMYDTDDDVVDLF	460
TOTEUA		120
ACTERIA		409
Артын4	REFERENTIANDS - FSALARFDLINNTWWELDWGVTVFGILFAVSFLTLLIVHQTVKVGDDARMTCQWCADDDAGAA	455
AmTEH4	XYPUYYNKNNSLLVVARFDLNXTRTELLIAIIVPSGLFVISLTTLIVI <mark>T</mark> RSVQVGDDAKMRCRYCVDKQEVEG	434
NvTEH4	RYPCFYNKNDSFFVVARFDLNKTRTDLLIAVIVPSCLFVVSLTTLVVITRSVQVGDDAKMRCRYCIDKQSNES	434
	-	
DmTEH3	449	
PhumTEH3	446	
TcTEH3		
АрТЕНЗ	HDRELDSIAGHRPSTVDLDNTSL* 478	
AmTEH3		
DmTEH4	HOAVDGOELSDHGLPLDNOELIGSTKSLIPISPYGESGTSDOIFDODOEKATTCDVPEKPLVIL* 525	
PhumTEH4		
TOTEUA		
ADTER4		
APIER4		
AMTEH4		
NVTEH4		

**Figure 87. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités DmTEH1, PhumTEH3, TcTEH3, ApTEH3, AmTEH3, DmTEH4, PhumTEH4, TcTEH4, ApTEH4, AmTEH4 et NvTEH4.** Les segments transmembranaires M1et M2 sont encadrés en rouge. Les séquences ciblées par les amorces dégénérées TP_34S et TP_35R sont encadrées en vert.

Résultats et Discussion. Chapitre 2

### CHAPITRE 3 : RELATIONS PHYLOGENETIQUES DES SOUS-UNITES AUXILIAIRES

Pour étudier les relations phylogénétiques entre les sous-unités auxiliaires du canal  $Na_v$  d'insecte, nous avons réalisé une étude phylogénétique à partir des séquences nucléiques des sous-unités des espèces d'insectes suivantes : *P. americana, D. melanogaster, M. domestica, A. gambiae, A.aegypti, C.pipiens quinquefasciatus, B. terrestris, B. impatiens, A. mellifera, A. florea, N. vitripennis, P. humanus corporis, T. castaneum et A. pisum. Les alignements de séquences ont été réalisés avec la méthode ClustalW implémentée dans le logiciel MEGA5.0 et réajustés manuellement. En effet pour avoir un bon alignement, les régions les moins conservées ont été supprimées. Dans la majorité des cas, les régions concernées sont les extrémités N-terminales et/ou C-terminales, et la boucle extracellulaire. Puis l'arbre a été réalisé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (logiciel MEGA5.0). Les valeurs de « bootstrap » ont été déterminées à partir de 1000 réplications.* 

Les nœuds présents à la base de chaque branche symbolisent l'ancêtre commun des séquences présentent dans la branche à la base de la quelle il se trouve. Les ancêtres communs sont toujours hypothétiques. Les valeurs de « bootstrap » sont comprises entre 0 et 100%. Elles traduisent le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions. Cette valeur permet de juger de la crédibilité de la branche. En d'autres termes plus la valeur de « bootstrap » est élevée plus la jonction entre deux branches est robuste. La longueur des branches horizontales représente les substitutions nucléotidiques entre les séquences et leurs ancêtres. Donc plus une branche sera longue, plus les séquences correspondantes seront éloignées par rapport à leur ancêtre et entre elles.



Figure 88. Arbre phylogénétique des sous-unités auxiliaires des canaux Na_v d'insecte. L'arbre phylogénétique a été défini selon les paramètres du modèle de substitution nucléotidique GTR et a été déterminé selon la méthode de maximum de vraisemblance implémenté au logiciel MEGA 5.0. Il est enraciné avec les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa humain. Les valeurs de « bootstrap » ont été déterminées à partir de 1000 réplications. L'échelle indique la distance entre les séquences et correspond au nombre de substitutions nucléotidiques par site.

L'arbre phylogénétique présenté dans la figure 88 montre que les 5 familles de sousunités auxiliaires sont réparties en deux clades. Le premier clade est formé par la famille des sous-unités TEH1(en violet), la famille des sous-unités TEH2 (en rouge) et la famille des sous-unités TipE (en vert). Le second clade est formé par la famille des sous-unités TEH3 (en bleu foncé) et la famille des sous-unités TEH4 (en bleu clair). Cette répartition suggère donc la présence d'un ancêtre commun A pour les sous-unités TEH1/TEH2/TipE et d'un ancêtre commun B pour les sous-unités TEH3/TEH4. Les valeurs de « bootstrap » relevées pour les nœuds A et B, respectivement 81 et 100, appuient cette hypothèse. Il apparaît donc que les ancêtres communs A et B serait le résultat de la duplication d'un gène ancestral. A l'intérieur du clade TEH1/TEH2/TipE, les valeurs de « bootstrap » à la base de chaque famille sont aussi élevées (99, 94 et 90) appuyant la robustesse de l'appartenance des sous-unités à leur famille respective. Les résultats présentés ici sont similaires à ceux obtenus par Li et ses collaborateurs (2011). En effet, leur étude phylogénétique montre que les protéines TipE, TEH1 et TEH2 forment un clade distinct de celui formé par les protéines TEH3 et TEH4. La répartition des deux groupes de sous-unités suggère donc une divergence fonctionnelle des membres de chaque clade. Les études électrophysiologiques réalisées par Derst et ses collaborateurs (2006) ainsi que la mise en évidence de deux domaines de type-EGF dans les boucles extracellulaires des sous-unités TEH3 et TEH4 supportent cette hypothèse. La coexpression de la sous-unité DmTEH3 avec la sous-unité principale DmNav1 conduit à une augmentation de l'amplitude du courant Na⁺ beaucoup plus faible qu'avec les sous-unités DmTipE, DmTEH1 et DmTEH2. De même, la sous-unité DmTEH4 ne modifie pas l'amplitude du courant Na⁺. Ces données suggèrent que ces deux types de sous-unités auxiliaires pourraient avoir un autre rôle que la régulation du canal Na_v. Chez les mammifères, il a été montré que les sous-unités β du canal Na_v agissent comme molécules d'adhésion cellulaire (Yu et coll., 2005).

Pour vérifier l'appartenance des sous-unités que nous avons clonées chez *P. americana* à chaque famille de sous-unité auxiliaires, nous avons intégré les séquences des sous-unités PaTEH1A, PaTEH1B, PaTipE, PaTipEB, PaTEH2A-D et PaTEH3 à la base de données utilisée pour construire l'arbre phylogénétique. Les noms de ces séquences sont en gras dans l'arbre phylogénétique (**Figure 88**). Nous pouvons observer que les sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B sont rattachées à la famille des sous-unités TEH1. Elles sont phylogénétiquement proches des sous-unités TEH1 de *T. castaneum* (TcTEH1) et de *P. humanus corporis* (PhumTEH1). Les 4 sous-unités PaTEH2 sont intégrées dans la famille des

sous-unités TEH2. Elles sont phylogénétiquement proches des sous-unités des 3 espèces de moustiques *A. gambiae* (AgTEH2) *A. aegypti* (AaTEH2) et *C. pipiens quinquefasciatus* (CqTEH2). Les sous-unités PaTipE et PaTipEB sont quant à elles rattachées à la famille des sous-unités TipE. La branche portant ces deux sous-unités présente un nœud commun à celle portant la sous-unité TipE de *T. castaneum*, suggérant que les sous-unités TipE de ces deux espèces ont un ancêtre commun. Enfin, la sous-unité PaTEH3 est rattachée à la famille des sous-unités TEH3. Cependant celle-ci se trouve sur une branche indépendante, tout comme la sous-unité TEH3 de *P. humanus corporis* (**Figure 88**).

L'arbre phylogénétique présenté ici a été enraciné avec les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa de l'Homme. L'étude de Derst et collaborateurs (2006) montrent que les sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insectes présentent des similarités structurales avec les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa de mammifères. Les deux types de sous-unités auxiliaires sont formés par deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire. Les ½ cystines impliquées dans la formation de ponts disulfures chez la sous-unité  $\beta$  du canal BKCa sont conservées dans les boucles extracellulaires de toutes les sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte (**Figures 38, 64, 78 et 85**). Cet arbre nous montre que les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa de l'Homme sont phylogénétiquement assez éloignées des sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte. En dépit de la conservation de leur structure et des ½ cystines, les homologies de séquences entre ces sous-unités sont inférieures à 30% (Derst et coll., 2006). Cependant, nous ne pouvons écarter la possibilité de l'existence d'un ancêtre commun aux sous-unités  $\beta$  du canal BKCa et aux sous-unités auxiliaires du canal Na_v d'insecte.

# Conclusions et Perspectives

Depuis la découverte et le clonage de la sous-unité DmTipE dans les années 90, toutes les études réalisées sur la caractérisation de nouveaux variants de la sous-unité  $\alpha$ , chez *D. melanogaster* et *B. germanica* ont été réalisées avec cette sous-unité auxiliaire. Il en est de même pour les études pharmacologiques effectuées avec de nouvelles molécules insecticides actives sur le canal Na_v d'insecte telles que le DCJW et le métaflumizone. La découverte de 4 nouveaux membres de la famille des sous-unités auxiliaires chez *D. melanogaster* (Derst et coll., 2006) pourrait remettre en cause les conclusions des études électrophysiologiques et pharmacologiques réalisées uniquement avec la sous-unité DmTipE. En effet, il a été montré que ces nouvelles sous-unités auxiliaires (DmTEH1-4) modulent de façon différente les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v, et notamment les propriétés d'inactivation (Derst et coll., 2006). Or les insecticides de la famille des phénylpyrazolines agissent principalement sur le canal Na_v à l'état inactivé (Hille, 1997 ; Bean et coll., 1983 ; Salgado, 1992 ; Zhao et coll., 2005 ; Song et coll., 2006). Ceci suggère que les propriétés pharmacologiques du canal Na_v et notamment sa sensibilité vis-à-vis des insecticides pourraient dépendre du type de sous-unité auxiliaire associée à la sous-unité principale.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé les séquences de nouvelles sous-unités du canal Na_v chez la blatte américaine *P. americana*. Il s'agit des sous-unités PaTipE, PaTEH1, PaTEH2 et PaTEH3, homologues des sous-unités DmTipE, DmTEH1, DmTEH2 et DmTEH3 de *D. melanogaster*. L'analyse des structures primaires indique que toutes ces sousunités ont une organisation avec 2 segments transmembranaires reliés par une boucle extracellulaire, comme cela a déjà été montré chez *D. melanogaster* (Feng et coll., 1995 ; Derst et coll., 2006) et *M. domestica* (Lee et coll., 2000). Nous avons identifié et cloné plusieurs formes pour les sous-unités PaTEH1 (3 formes), PaTipE (2 formes), PaTEH2 (4 formes) et une seule forme pour la sous-unité PaTEH3. De plus, pour les sous-unités PaTipE et PaTEH3, nous avons observé un important polymorphisme nucléotidique individuel. Au total, nous avons cloné 85 ADNc²¹ codant les sous-unités auxiliaires du canal Na_v chez *P*.

²¹ 21 ADNc pour PaTipE, 25 pour PaTEH1, 26 pour PaTEH2, 13 pour PaTEH3
*americana*. L'étude phylogénétique que nous avons réalisée démontre que les sous-unités que nous avons clonées appartiennent bien aux familles des gènes TipE, TEH1, TEH2 et TEH3.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle des sous-unités PaTEH1 et PaTipE sur les propriétés électrophysiologiques du courant Na⁺. Ne pouvant exprimer la sousunité PaNa_v1 dans l'ovocyte de xénope, pour des raisons inconnues, nous avons utilisé la sous-unité DmNa_v1-1. L'étude des propriétés d'activation, d'inactivation rapide et lente, et de la récupération de l'état inactivé rapide nous a permis de mettre en évidence des propriétés différentes en fonction de la combinaison sous-unité principale/sous-unité auxiliaire injectée (V_{1/2} activation, V_{1/2} inactivation rapide et lente et constante de temps de la récupération de l'état inactivé rapide). Les différences observées suggérant un effet sur la sensibilité des molécules pharmacologiques agissant sur l'état inactivé du canal Na_v, nous avons examiné l'effet de deux molécules sur le courant Na⁺ mesuré en présence de différentes sous-unités auxiliaires.

Dans une troisième partie, nous avons caractérisé les effets de deux inhibiteurs du canal Na_v, la lidocaïne et le DCJW, sur le courant Na⁺ en fonction de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec DmNa_v1-1. Nous avons observé des différences de sensibilité importantes en fonction de l'origine de la sous-unité auxiliaire (*D. melanogaster* ou *P. americana*).

#### **CHAPITRE 1 CONCLUSIONS GENERALES**

#### A- Une diversité moléculaire importante

Au cours de notre étude nous avons pu observer une importante diversité moléculaire au sein des sous-unités auxiliaires du canal Na_v de *P. americana*. Au total, nous avons identifié et cloné 85 ADNc codant quatre types de sous-unités auxiliaires. Ces ADNc présentent pour chaque sous-unité deux types de différences. Le premier type concerne les différences qui modifient des régions entières de la protéine telles que l'épissage alternatif. Ce premier type a conduit à la découverte de 2 variants pour la sous-unité PaTEH1, 2 variants pour la sous-unité PaTipE, 4 variants pour la sous-unité PaTEH2 et 1 seul variant pour la sous-unité PaTEH3. Le deuxième type concerne les substitutions ponctuelles et a conduit à l'identification de 16 clones différents pour PaTipE, 2 clones pour PaTEH2, 13 pour PaTEH3. L'analyse des séquences nucléiques et protéiques de ces clones a permis de mettre en évidence les mécanismes à l'origine des différents variants.

#### A-1 Variabilité induite par un mécanisme de rétention d'intron

Ce mécanisme est une forme d'épissage assez rare chez les Vertébrés comme chez les Invertébrés (moins de 5% ; Kim et coll., 2008 ; Kodhor et coll., 2011). Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'implication de cette modification post-transcriptionnelle dans la formation des variants PaTEH1A et PaTEH1B. Nous avons en effet montré que le variant PaTEH1B était issu d'une rétention d'intron. L'analyse de la séquence génomique du gène *teh1* chez *D. melanogaster* et chez *A. gambiae* montre que chez ces espèces il est possible qu'il existe également des variants issu de l'épissage alternatif puisque nous avons observé de possibles codons STOP au sein de l'intron séparant les deux exons chez ces espèces.

Chez la sous-unité PaTEH2, nous avons également mis en évidence deux variants différent au niveau de leur extrémité C-terminale. La séquence codant la nouvelle extrémité C-terminale commençant par la séquence consensus du site donneur d'épissage traditionnellement retrouvée au début des introns suggère un évènement de rétention d'intron.

#### A-2 Variabilité induite par le saut d'exon

Le saut d'exon est un mécanisme d'épissage alternatif beaucoup plus fréquent que la rétention d'intron (40% chez les eucaryotes, Kim et coll., 2008). Chez les sous-unités PaTipE et les sous-unités PaTEH2, nous suggérons un évènement d'épissage alternatif au cours duquel la totalité d'un exon est excisé. Ceci conduit à la modification de l'extrémité C-terminale pour la sous-unité PaTipE et à la suppression de la boucle extracellulaire des variants PaTEH2C et PaTEH2D. Ce mécanisme d'épissage alternatif est déjà connu pour engendrer une importante diversité moléculaire au niveau de la sous-unité principale du canal sodium chez l'insecte. En effet, bien qu'il n'y ait qu'un seul gène homologue à *para*, ou DmNav1, codant la sous-unité principale chez la drosophile, de nombreux variants ont été identifiés, clonés et caractérisés au cours des 20 dernières années chez la drosophile, la mouche domestique, la blatte allemande et la blatte américaine (Thackeray et Ganetzky., 1995 ; Williamson et coll., 1996 ; Tan et coll., 2002a ; Olson et coll., 2008 ; Moignot, 2010).

#### A-3 Variabilité induite par édition de l'ARN

Chez les sous-unités PaTipE, PaTEH2, PaTEH3, plusieurs substitutions récurrentes ont été identifiées suggérant une édition d'ARN. Dans cette étude, ces substitutions ponctuelles sont majoritairement silencieuses. Seules quelques unes conduisent à un changement d'acide aminé, mais une seule substitution peut conduire à des modifications de la fonction de la sous-unité (Song et coll., 2006). L'édition d'ARN est très étudiée pour la sous-unité principale du canal Na_v (Hanrahan et coll., 2000 ; Song et coll., 2004). Dans le cas du canal BgNa_v1, la substitution d'un résidu glutamate par une lysine (E1689K) induit une modification des propriétés d'inactivation du canal Na_v et une augmentation de la sensibilité du canal au DCJW (Song et coll., 2006).

# **B-** Co-localisation des sous-unités principales et des sous-unités auxiliaires dans l'ovocyte de xénope

Lors des premières études réalisées sur le canal Na_v de mammifères, la purification de la sous-unité  $\alpha$  à partir de cerveau de rat a montré que cette dernière est associée à des sousunités  $\beta$  (Hartshorne et coll., 1982 ; Hartshorne et Catterall, 1984). En revanche, aucune information n'est disponible concernant les interactions entre les sous-unités principales et les sous-unités auxiliaires chez les insectes. Seuls les profils d'hydrophobie et les prédictions des sites de glycosylation putatifs suggèrent fortement la présence des sous-unités auxiliaires dans la membrane des cellules, ainsi que son orientation (extrémités N-terminales et C-terminales cytoplasmiques et boucle extracellulaire) (Feng et coll., 1995b ; Lee et coll., 2000 ; Derst et coll., 2006). Pour la première fois nous avons montré que, dans l'ovocyte de xénope, les sousunités principales et auxiliaires sont co-localisées au niveau de la membrane de l'ovocyte. Pour confirmer ces observations *in vivo*, il serait nécessaire de mettre au point des anticorps dirigés contre les sous-unités auxiliaires du canal Na_v.

# C- Modification des propriétés électrophysiologiques du canal $Na_v$ par les sous-unités PaTEH1 et PaTipE

Les premières études électrophysiologiques réalisées avec la sous-unité TipE de drosophile dans l'ovocyte de xénope ont montré que cette sous-unité module les propriétés électrophysiologiques du canal Na_v d'insecte (Feng et coll., 1995b ; Warmke et coll., 1997). La découverte et la caractérisation de nouvelles sous-unités auxiliaires ont montré que chaque sous-unité module différemment les propriétés du canal Na_v (Derst et coll., 2006). Ici, nous avons co-exprimé la sous-unité principale de *D. melanogaster*, DmNa_v1-1, avec, d'une part les sous-unités auxiliaires de la drosophile, TipE et TEH1, et d'autre part celles de *P. americana*, PaTEH1B et PaTipE.

#### C-1 Effets chaperons des sous-unités auxiliaires

Ici, nous avons montré que les sous-unités auxiliaires de *P. americana* augmentent considérablement la densité de courant Na⁺ par rapport à celles de *D. melanogaster*. Toutefois, la sous-unité qui induit la plus forte amplitude de courant Na⁺ est de la famille des sous-unités TEH1 pour les deux espèces d'insectes. Par ailleurs, nous avons pu observer que le changement de l'extrémité C-terminale de la sous-unité PaTEH1B causée par une rétention

d'intron conduit à une diminution de moitié de la densité de courant  $Na^+$ , associée à une diminution de même grandeur de l'incorporation dans la membrane de la sous-unité  $DmNa_v1$ -1. Les résultats préliminaires obtenus avec les sous-unités PaTEH2 suggèrent également une densité de courant plus importante qu'avec la sous-unité DmTEH2.

#### C-2 Modulation des propriétés biophysiques

L'étude des propriétés d'activation, d'inactivation rapide et lente, et de la récupération de l'état inactivé rapide a montré des différences plus ou moins importantes en fonction de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec DmNa_v1-1. Dans le cas de la sous-unité PaTEH1, nous avons montré que la nouvelle extrémité de PaTEH1B confère au courant Na⁺ des propriétés différentes par rapport au courant enregistré avec PaTEH1A. De plus les propriétés observées avec PaTEH1B sont similaires à celles observées avec DmTEH1. L'utilisation de mutants tronqués au niveau de l'extrémité C-terminale permet de préciser que cette région est impliquée dans la modulation de ces propriétés.

# D- Effets des sous-unités auxiliaires sur les propriétés pharmacologiques du canal $Na_{\rm v}$

Lors de cette étude nous avons utilisé deux molécules pharmacologiques : la lidocaïne et le DCJW. Ces deux molécules sont connues pour agir principalement sur le canal  $Na_v$  à l'état inactivé (Hille, 1977 ; Bean et coll., 1983 ; Salgado, 1992 ; Zhao et coll., 2005 ; Song et coll., 2006).

## D-1 Effets des sous-unités auxiliaires sur la sensibilité du canal Nav aux molécules pharmacologiques

Dans le cas de la lidocaïne, nous avons montré que la sensibilité du canal  $Na_v$  est dépendante de la sous-unité auxiliaire co-exprimée avec  $DmNa_v1-1$ . L'extrémité C-terminale du variant PaTEH1B conduit à un canal plus sensible à la lidocaïne que celle de PaTEH1A. Avec le DCJW, nous avons pu mettre en évidence que l'extrémité C-terminale de la sous-unité est impliquée dans la sensibilité du canal  $Na_v$  au DCJW, suggérant une interaction de cette extrémité avec la sous-unité principale.

# D-2 Effets de la lidocaïne et du DCJW sur les propriétés électrophysiologiques du canal Nav

L'étude des propriétés électrophysiologiques du canal Na_v après application de la lidocaïne a révélé que non seulement la lidocaïne modifie les propriétés d'inactivation du canal Na_v, mais aussi qu'elle affecte les propriétés d'activation. Nous avons également montré qu'une partie des canaux ne récupère pas de l'état inactivé. Cette étude montre donc que le mode d'action de ce composé, qui est très étudié chez les mammifères, est quelque peu différent chez les insectes. Ces observations sont concordantes avec des études précédemment menées qui démontrent que des éléments importants dans la fixation de la lidocaïne sur les canaux Na_v de mammifères, ne le sont pas nécessairement dans le cas du canal Na_v d'insecte (Silver et coll., 2010; Song et coll., 2011). Dans le cas du DCJW, les principales modifications des propriétés électrophysiologiques ont été observées pour les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1B. En effet, nous avons montré des modifications des propriétés d'activation. Pour les deux molécules, nous avons observé un ralentissement de la récupération de l'état inactivé.

#### **E- Relations phylogénétiques**

L'étude phylogénétique que nous avons réalisée montre que les sous-unités auxiliaires que nous avons clonées chez *P. americana* appartiennent aux familles des sous-unités TipE, TEH1, TEH2 et TEH3. De plus, nos résultats sont concordants avec ceux observés dans une étude précédente (Li et coll., 2011). L'arbre des sous-unités auxiliaires du canal Na_v chez l'insecte se divise en 2 clades : le premier contient les sous-unités des familles TipE/TEH1/TEH2 et le second les sous-unités des familles TEH3/TEH4. La présence de ces deux clades suggère l'existence d'un ancêtre commun pour chaque groupe de sous-unité.

Concernant la proximité phylogénétique des sous-unités auxiliaires du canal  $Na_v$ d'insecte et des sous-unités  $\beta$  du canal BKCa de mammifères évoquée par Derst et ses collaborateurs (2006), notre étude montre que les sous-unités  $\beta$  du canal BKCa ne sont pas très proches des sous-unités auxiliaires du canal  $Na_v$  d'insecte. Cependant, il est possible que ces deux types de sous-unités auxiliaires aient un ancêtre commun. Conclusions et Perspectives. Chapitre 1

#### **CHAPITRE 2 : PERSPECTIVES**

# A- Identification des résidus de l'extrémité C-terminale des sous-unités PaTEH1 impliqués dans la modulation des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du courant Na⁺

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence les effets des deux sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du courant Na⁺. Ces deux sous-unités diffèrent uniquement par les 11 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale, soit un tiers de la totalité de cette région. Nous avons observé des modifications des propriétés d'activation et d'inactivation des courants enregistrés avec les canaux DmNa_v1-1/PaTEH1A et DmNa_v1-1/PaTEH1B. De plus, nous avons mis en évidence un rôle majeur de ces 11 derniers acides aminés dans la sensibilité du canal Na_v au DCJW. Cependant pour mieux comprendre le rôle de l'extrémité C-terminale de la sous-unité TEH1, il est nécessaire de concevoir de nouveaux mutants et de réaliser leur caractérisation en électrophysiologique. Dans ce but nous avons conçu un mutant totalement dépourvu du Cterminale (PaTEH1 $\Delta$ (250-280)).

#### B- Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité PaTEH2

Le clonage de la sous-unité TEH2 chez *P. americana* a conduit à la découverte de 4 formes différentes : 2 variants résultant vraisemblablement d'une rétention d'intron conduisant à des extrémités C-terminales distinctes (PaTEH2A et PaTEH2B) et 2 variants caractérisés par la rétention d'intron modifiant l'extrémité C-terminale et la délétion de la quasi-totalité de la boucle extracellulaire (PaTEH2C et PaTEH2D). Nous avons montré avec la sous-unité PaTEH1 que des variants possédant des extrémités C-terminales distinctes modulent différemment les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du courant Na⁺. Il serait donc intéressant de regarder les effets de chacun de ces variants sur le courant Na⁺ dans l'ovocyte de xénope.

# C- Co-expression de la sous-unité PaNa_v1 avec les sous-unités auxiliaires de *P. americana*

Chez la blatte P. americana, deux gènes codant la sous-unité principale du canal Na_v ont été découverts et clonés : PaNav1 et PaFPC (Moignot et coll., 2009). Nous ne sommes pas parvenus à enregistrer un courant Na⁺ en exprimant la sous-unité PaNa_v1 seule ou avec les sous-unités DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, DmTipE et PaTipE. Pour poursuivre les expériences d'expression et essayer d'obtenir un courant il faudrait exprimer la sous-unité PaNav1 avec chacun des 4 variants de la sous-unité PaTEH2 ou avec la sous-unité PaTEH3. L'expression des 4 sous-unités (PaTipE, PaTEH1-3) ayant été localisée dans le système nerveux, tout comme la sous-unité PaNav1 (Moignot et coll., 2009), il serait judicieux d'injecter, dans l'ovocyte de xénope, un mélange de toutes les sous-unités auxiliaires avec PaNav1. En effet, il est possible que l'expression de la sous-unité PaNav1 nécessite la présence de plusieurs sous-unités différentes. Chez les mammifères, in vivo, la sous-unité principale est associée à deux sous-unités auxiliaires : une qui se lie de facon covalente ( $\beta$ 2 ou  $\beta$ 4) et une qui se lie de façon non covalente ( $\beta$ 1 ou  $\beta$ 3) (Catterall et coll., 2005). De plus, aucune donnée n'est disponible à ce jour sur la stœchiométrie des sous-unités principales et auxiliaires chez les insectes. Il serait donc nécessaire de tester plusieurs ratio  $\alpha$  : $\beta$  (w/w et  $c/c^{22}$ ).

#### D-Distribution tissulaire des sous-unités auxiliaires chez P. americana

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé la distribution tissulaire par RT-PCR semi-quantitative de chaque sous-unité clonée chez *P. americana*. Pour approfondir cette analyse il serait indispensable d'évaluer cette distribution tissulaire par qPCR. Pour pouvoir comparer le niveau d'expression des 4 transcrits (PaTipE, PaTEH1-3) dans les différents tissus nous envisageons de réaliser une qPCR en quantification relative (Bustin et coll., 2009). De plus, il serait intéressant de visualiser la localisation par immunohistochimie sur chaque tissu avec des anticorps spécifiques des sous-unités auxiliaires de *P. americana*.

²² w pour poids moléculaire et c pour concentration

#### E- Etude du rôle des sous-unités auxiliaires in vivo

Pour étudier le rôle des sous-unités auxiliaires chez la blatte *P. americana*, nous envisageons l'utilisation d'ARN double brin (dsARN). L'utilisation de ces dsARN permettra d'éteindre l'expression du ou des gènes codant les sous-unités auxiliaires à l'échelle de l'individu. Des tests pharmacologiques avec des insecticides pourront par la suite être envisagés. Pour cela il est nécessaire, d'une part de mettre au point les dsARN et leur injection dans l'animal. L'utilisation de dsARN a déjà été réalisée chez *P. americana* pour éteindre l'expression d'un gène au niveau des cerques. Les dsARN avaient été injectés au niveau des cerques chez les larves de premier stade de *P. americana* (Marie et coll., 2000). Dans notre cas, il faudrait éteindre l'expression du gène dans tous les tissus, ce qui demande un important travail de mise au point. D'autre part, une étude pharmacologique approfondie devra être réalisée en amont pour déterminer la concentration optimale d'insecticide à utiliser.

#### F- Etude des relations structure-fonction

Les relations structure-fonction sont bien connues pour les sous-unités principales de mammifères mais aussi d'insectes. De nombreuses études ont montrées l'implication des boucles P dans la sélectivité du canal aux ions Na⁺, des segments S4 dans l'activation du canal Na_v et de la particule IFMT/MFMT dans l'inactivation du canal Na_v (pour revue, Catterall, 2012). Pour déterminer les relations structure-fonction des sous-unités auxiliaires, des expériences de mutagenèse dirigée sont nécessaires. La modification ou la suppression des acides aminés ou des régions conservés chez plusieurs espèces d'insectes permettraient d'avoir des indications sur la fonction de ces acides aminés ou de ces régions conservées.

# G-Identification des régions des sous-unités auxiliaires qui interagissent avec la sous-unité principale.

Plusieurs études de mutagenèse dirigée suggèrent que la sous-unité  $\beta$ 1 interagit avec la sous-unité  $\alpha$  au niveau d'une région formée par les boucles extracellulaires reliant les segments S5 et S6 du domaine I et les segments S5 et S6 du domaine IV (pour revue, Isom, 2001). Des expériences similaires réalisées sur la boucle extracellulaire et sur les extrémités

#### Conclusions et Perspectives. Chapitre 2

N-terminales et C-terminales des sous-unités auxiliaires permettraient d'identifier la ou les régions de la sous-unité auxiliaire qui interagissent avec la sous-unité principale.

En conclusion, les résultats obtenus lors de cette thèse montrent l'importance des sousunités auxiliaires dans la régulation des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal  $Na_v$  d'insecte. Il serait donc interessant de poursuivre les études sur ces sous-unités auxiliaires pour mieux connaitre leur fonctionnement et éventuellement les utiliser comme site de fixation pour de futurs insecticides.

## Liste des figures

## Introduction bibliographique

Figure 1. Le potentiel d'action	. 14
Figure 2. Les états fonctionnels du canal Nav	. 15
Figure 3. Relations structure-fonction du canal Nav	24
Figure 4. Modélisation du mouvement des segments S4 à la suite d'une dépolarisation	26
Figure 5. Modélisation du mécanisme d'inactivation du canal Nav	
Figure 6. Représentation schématique de l'inactivation rapide et de l'inactivation lente d'un	
courant Na ⁺	. 29
Figure 7. Structure des canaux de type Na _v 1, BSC1/DSC1 et PaFPC, et courants qui leurs sont	
associés	. 35
Figure 8. Représentation schématique de la structure des sous-unités β	
Figure 9. Les différents types d'épissage alternatif	45
Figure 10. Structure des sous-unités auxiliaires du canal Na _v chez l'insecte et du canal BKCa de	
mammifères	. 49
Figure 11. Représentation schématique de la sous-unité α du canal Na _v et des sites récepteurs de	
neurotoxines	. 61
Figure 12. Structure chimique du DDT et du Méthoxychlore	62
Figure 13. Structure chimique de différents pyréthrinoïdes de type I et de type II	. 64
Figure 14. Mode d'action des pyréthrinoïdes sur le canal sodium	. 66
Figure 15. Localisation des mutations impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes	. 69
Figure 16. L'indoxacarbe et son métabolite actif le DCJW	.71
Figure 17. Structure du métaflumizone	.74
Figure 18. Structure chimique de la lidocaïne	76

#### Matériels et Méthodes

Figure 19. La blatte Periplaneta americana	. 81
Figure 20. Représentation du système nerveux central de la blatte P. americana	83
Figure 21. Les neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) du dernier ganglion abdominal (DGA)	
de la chaîne nerveuse de la blatte P. americana	83
Figure 22. Schéma récapitulatif de la stratégie utilisée pour cloner les sous-unités auxiliaires du	
canal Na _v de <i>P. americana</i>	85
Figure 23*. Technique d'extraction des ARN totaux avec le réactif RNA NOW®	87
Figure 24. Stratégie générale d'amplification des sous-unités auxiliaires du canal Nav	91
Figure 25. Principe de la RACE-PCR	95
Figure 26. Carte de restriction du vecteur pCR®4-TOPO®	102
Figure 27. Carte de restriction du vecteur pGEM-HEJUEL	103
Figure 28. Schéma récapitulatif des étapes réalisées pour insérer un tag histidine à l'extrémité N-	
terminale de la sous-unité PaTEH1	110
Figure 29*. Extraction de l'ADN génomique	112
Figure 30. Localisation des sondes utilisées pour le Southern Blot	113
Figure 31. Le xénope Xenopus laevis	117
Figure 32. Les ovocytes de xénope	118
Figure 33. Technique de la double microélectrode en potentiel imposé	122
Figure 34. Détermination des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na ⁺	127
Figure 35. Schéma illustrant le fonctionnement de la microscopie confocale à balayage laser	129

### **Résultats et Discussion**

Figure 36. Séquences nucléiques et protéiques déduites des ADNc PaTEH1A et PaTEH1B 138
Figure 37 Profils d'hydrophobie des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B139
Figure 38 Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B,
et des sous-unités DmTEH1, AgTEH1, CqTEH1A, CqTEH1B, PhumTEH1, TcTEH1, NvTEH1.1,
NvTEH1.2, AmTEH1 et ApTEH1
Figure 39. Distribution tissulaire des sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B143
Figure 40. Electrophorèse des produits PCR obtenus en utilisant l'ADNg ou l'ADNc comme
matrice
Figure 41. Origine des variants PaTEH1A et PaTEH1B145
Figure 42. Résultats d'hybridation Southern à partir d'ADNg de P. americana
Figure 43. Distribution tissulaire du variant PaTEH1C147
Figure 44. Alignement des séquences déduites en acides aminés des variants PaTEH1A, PaTEH1B
et PaTEH1C
Figure 45. Expression des sous-unités PaNav1 et DmNav1-1 avec ou sans sous-unité auxiliaire
Figure 46. Densités de courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant la sous-unité DmNa _v 1-1 avec les
sous-unités auxiliaires DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1A(270-
280)
Figure 47. Propriétés électrophysiologiques des courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant la sous-
unité DmNav1-1 avec les sous-unités auxiliaires DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-
280) et PaTEH1Δ(270-280)
Figure 48. Cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na ⁺ lorsque DmNa _v 1-1 est co-
exprimée avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1Δ(267-280) ou PaTEH1Δ(270-280)
Figure 49. Effet inhibiteur de la lidocaïne sur le courant Na ⁺
Figure 50. Propriétés électrophysiologiques après application de lidocaïne
Figure 51. Cinétiques d'activation et d'inactivation en absence ou en présence de lidocaïne
Figure 52. Effet inhibiteur du DCJW sur le courant Na ⁺
Figure 53. Propriétés électrophysiologiques des courants Na ⁺ obtenus en exprimant la sous-unité
DmNav1-1 seule ou avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et PaTEH1A(270-
280) en absence ou en présence de DCJW167
Figure 54. Cinétiques d'activation et d'inactivation du courant Na ⁺ pour différentes combinaisons
de la sous-unité DmNa _v 1-1 avec les sous-unités auxiliaires avant et après application du DCJW 168
Figure 55 Localisation des sites reconnus par les anticorps sur la sous-unité DmNav1-1 et sur la
sous-unité auxiliaire
Figure 56. Modulation de l'expression des canaux Na _v à la surface de l'ovocyte de xénope par les
sous-unités PaTEH1A et PaTEH1B173
Figure 57. Modulation de l'expression des canaux Nav par les variants PATEH1A et PaTEH1B 174
Figure 58. Stratégie d'amplification de la sous-unité PaTipE184
Figure 59. Alignement des séquences nucléiques et protéiques des sous-unités PaTipE et PaTipEB 187
Figure 60 Hypothèses sur les mécanismes conduisant aux variants PaTipE et PaTipEB
Figure 61. Alignement des extrémités C-terminales des sous-unités PaTipEB, AeTipE et HsTipE 191
Figure 62. Arrangement des gènes codant les sous-unités auxiliaires chez les insectes : exemple de
la drosophile
Figure 63. Profil d'hydrophobie des sous-unités auxiliaires de la famille TipE
Figure 64. Alignement multiple des séquences protéiques de la sous-unité PaTipE et des sous-
unités DmTipE, MdTipE, AaTipE, AgTipE, CqTipE, NvTipE, AfTipE, BtTipE, ApTipE,
PhumTipE et TcTipE
Figure 65. Distribution tissulaire de la sous-unité PaTipE
Figure 66. Alignement des séquences protéiques partielles déduites obtenues pour <i>P. americana</i> et
<i>B. germanica</i>

Figure 67. Familles de courant Na ⁺ enregistrées avec le protocole d'activation, dans l'ovocyte de	
xénope	203
Figure 68. Densité de courant Na ⁺ en fonction de la sous-unité auxiliaire injectée avec la sous- unité DmNa _v 1-1	205
Figure 69. Propriétés biophysiques des courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant DmNa _v 1-1 avec DmTipE ou PaTipE	207
Figure 70 Cinétique d'activation et d'inactivation du courant Na ⁺	208
Figure 70 Cinétique de l'inhibition des courants Na ⁺ générés les combinaisons DmNa 1-	-00
1/DmTipE et DmNa _v 1-1/PaTipE après application du DCJW	210
Figure 72. Inhibition du courant Na ⁺ par le DCJW	211
Figure 73. Propriétés biophysiques des courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant DmNa _v 1-1 avec	
DmTipE ou PaTipE en présence ou en absence de DCJW	213
Figure 74. Cinétiques de demi-activation et de demi-inactivation du courant Na ⁺ en présence ou	
en absence de DCJW	214
Figure 75. Stratégie d'amplification de la sous-unité PaTEH2	220
Figure 76. Alignement des séquences nucléiques et protéiques des sous-unités PaTEH2A et	
PaTEH2B	223
Figure 77. Profil d'hydrophobie des sous-unités auxiliaires de la famille TEH2	224
Figure 78. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH2A et PaTEH2B,	
et des sous-unités DmTEH2A, DmTEH2B AgTEH2, AaTEH2, CqTEH2, PhumTEH2, TcTEH2,	
NvTEH2	226
Figure 79. Alignement des séquences protéiques des quatre ADNc codant la sous-unité PaTEH2	
dans la chaîne nerveuse de <i>P. americana</i>	228
Figure 80. Distribution tissulaire des variants PaTEH2A et PaTEH2B	230
Figure 81. Traces de courants obtenus en co-exprimant la sous-unité DmNa _v 1-1 avec les sous-	
unités PaTEH2A et PaTEH2B	231
Figure 82. Stratégie d'amplification la sous-unité PaTEH3	232
Figure 83. Séquences nucléiques et protéiques de la sous-unité PaTEH3	234
Figure 84. Profil d'hydrophobie des sous-unités TEH3	236
Figure 85. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités PaTEH3, DmTEH3,	
AgTEH3, AaTEH3, CqTEH3, PhumTEH3, TcTEH3, AfTEH3, ApTEH3, BtTEH3, AmTEH3 et	
BiTEH3	238
Figure 86. Distribution tissulaire de la sous-unité PaTEH3	240
Figure 87. Alignement multiple des séquences protéiques des sous-unités DmTEH1, PhumTEH3,	
TcTEH3, ApTEH3, AmTEH3, DmTEH4, PhumTEH4, TcTEH4, ApTEH4, AmTEH4 et NvTEH42	245
Figure 88. Arbre phylogénétique des sous-unités auxiliaires des canaux Nav d'insecte	248

* Les figures 23 et 29 ont été réalisées à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

Liste des figures

### Liste des tableaux

### Introduction bibliographique

Tableau 1 : Sous-unités α du canal Na _v chez les vertébrés	17
Tableau 2 : Recensement des sous-unités principales identifiées chez les arthropodes	19
Tableau 3 : Les sous-unités auxiliaires chez les mammifères	36
Tableau 4 : Effets des sous-unités auxiliaires de mammifères sur les courants Na ⁺	40
Tableau 5 : Pathologies associées aux sous-unités auxiliaires de mammifères	48
Tableau 6 : Les sous-unités auxiliaires chez les insectes	52
Tableau 7 : Effets des sous-unités auxiliaires d'arthropodes sur les courants Na ⁺ enregistrés dans	
un système d'expression hétérologue	55

#### Matériels et Méthodes

Tableau 8 : Code de dégénérescence des nucléotides
Tableau 9 : Amorces dégénérées utilisées pour amplifier les régions conservées chez les sous-
unités auxiliaires de <i>P. americana</i>
Tableau 10 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier la région 5' non codante des sous-unités
auxiliaires de P. americana
Tableau 11 : Amorces spécifiques du kit GeneRacer TM pour l'amplification de la région 5' non
codante
Tableau 12 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier la région 3' non codante des sous-unités
auxiliaires de P. americana
Tableau 13 : Amorces spécifiques du kit GeneRacer TM pour l'amplification de la région 3' non
codante
Tableau 14 : Amorces spécifiques utilisées pour amplifier les ORF encadrés de régions non-
codantes des sous-unités auxiliaires de <i>P. americana</i>
Tableau 15 : Amorces spécifiques utilisés pour amplifier les ORF des sous-unités auxiliaires de P.
americana
Tableau 16 : Amorces utilisées pour le criblage des clones positifs 107
Tableau 17 : Amorces utilisées pour l'insertion de l'his-tag 109
Tableau 18 : Caractéristiques des sondes
Tableau 19 : Quantité d'ARN injectés testée pour chaque combinaison $\alpha + \beta$ 121
Tableau 20 : Numéros d'accession des séquences nucléotidiques utilisées pour l'étude
phylogénétique133

#### **Résultats et Discussion**

Tableau 21 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTEH1A et	
PaTEH1B et leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes1	40
Tableau 22 : Dépendance au potentiel de l'activation, l'inactivation lente et l'inactivation rapide,	
et constante de temps de la récupération de l'inactivation rapide des canaux Na _v obtenus en co-	
exprimant DmNav1-1 avec DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, PaTEH1A(267-280) et	
PaTEH1Δ(270-280)	54
Tableau 23 : Paramètres des propriétés électrophysiologiques des courants Na ⁺ enregistrés en	
présence de lidocaïne1	60
Tableau 24 : Paramètres des propriétés électrophysiologiques des courants Na ⁺ enregistrés en	
présence de DCJW 1	66

Tableau 25 : Propriétés électrophysiologiques des canaux DmNa _v 1-1/PaTEH1A et DmNa _v 1-	
1/PaTEH1Ah	171
Tableau 26 : Résultats de l'interrogation blast réalisée avec la séquence protéique déduite de	
l'insert de 78 pb	190
Tableau 27 : Mutations répertoriées chez les clones de la sous-unité PaTipE	195
Tableau 28 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTipE et	
leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes	200
Tableau 29 : Paramètres biophysiques des courants Na ⁺ obtenus en co-exprimant DmNa _v 1-1 avec	
DmTipE ou PaTipE dans l'ovocyte de xénope	205
Tableau 30 : Paramètres des propriétés biophysiques des courants Na ⁺ après application du	
DCJW obtenus en co-exprimant DmNav1-1 avec DmTipE ou PaTipE dans l'ovocyte de xénope	212
Tableau 31 : Résultats obtenus avec différents couples d'amorces et plusieurs polymérases	221
Tableau 32 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre les sous-unités PaTEH2A et	
PaTEH2B et leurs homologues chez d'autres espèces d'insectes	225
Tableau 33 : Substitutions nucléotidiques identifiées chez la sous-unité PaTEH3	235
Tableau 34 : Pourcentage d'homologie de séquence protéique entre la sous-unité PATEH3 et ses	
homologues chez d'autres espèces d'insectes	237

#### **Références bibliographiques**

- Adelman JP (1995) Proteins that interact with the pore-forming subunits of voltage-gated ion channels. Curr Opin Neurobiol 5:286-295.
- Agnew WS, Levinson SR, Brabson JS, Raftery MA (1978) Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from Electrophorus electricus electroplax membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 75:2606-2610.
- Alves-Silva J, Ribeiro JM, Van Den Abbeele J, Attardo G, Hao Z, Haines LR, Soares MB, Berriman M, Aksoy S, Lehane MJ (2010) An insight into the sialome of Glossina morsitans morsitans. BMC Genomics 11:213.
- Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL, Raman IM (2009) Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. J Neurosci 29:2027-2042.
- Amat C, Lapied B, French AS, Hue B (1998) Na+-Dependent neuritic spikes initiate Ca2+-dependent somatic plateau action potentials in insect dorsal paired median neurons. J Neurophysiol 80:2718-2726.
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL (2010) Cardiac sodium channelopathies. Pflugers Arch 460:223-237.
- Anderson PA, Greenberg RM (2001) Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129:17-28.
- Anderson PA, Holman MA, Greenberg RM (1993) Deduced amino acid sequence of a putative sodium channel from the scyphozoan jellyfish Cyanea capillata. Proc Natl Acad Sci U S A 90:7419-7423.
- Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. J Gen Physiol 62:375-391.
- Audenaert D, Claes L, Ceulemans B, Lofgren A, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2003) A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. Neurology 61:854-856.
- Balser JR, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Perez-Garcia MT, Marban E, Tomaselli GF (1996a) External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. J Physiol 494 (Pt 2):431-442.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF (1996) Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. J Gen Physiol 107:643-658.
- Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in Xenopus oocytes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 215:241-246.
- Bass BL (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. Annu Rev Biochem 71:817-846.
- Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW (1983) Lidocaine block of cardiac sodium channels. J Gen Physiol 81:613-642.
- Bendahhou S, Cummins TR, Tawil R, Waxman SG, Ptacek LJ (1999) Activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel: role of segment S5 revealed by a novel hyperkalaemic periodic paralysis mutation. J Neurosci 19:4762-4771.
- Bennett PB, Jr., Makita N, George AL, Jr. (1993) A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na+ channels. FEBS Lett 326:21-24.
- Bianchi L, Driscoll M (2006) Heterologous expression of C. elegans ion channels in Xenopus oocytes. WormBook 1-16.

- Bicker G, Schafer S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1988) Glutamate-like immunoreactivity in identified neuronal populations of insect nervous systems. J Neurosci 8:2108-2122.
- Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res 3:2303-2308.
- Bonasio R, Zhang G, Ye C, Mutti NS, Fang X, Qin N, Donahue G, Yang P, Li Q, Li C, Zhang P, Huang Z, Berger SL, Reinberg D, Wang J, Liebig J (2010) Genomic comparison of the ants Camponotus floridanus and Harpegnathos saltator. Science 329:1068-1071.
- Borjesson SI, Elinder F (2008) Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltagegated ion channels. Cell Biochem Biophys 52:149-174.
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. Nat Neurosci 2:407-415.
- Braünig P, Pflüger HS (2001) The unpaired median neurons of insect. Adv Insect Physiol 28:185-266.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR (2004) Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. The New England journal of medicine 350:1605-1616.

Burrows M (1996) The Neurobiology of an Insect Brain. Oxford: Oxford University Press.

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry 55:611-622.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-298.
- Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. Annu Rev Entomol 58:99-117.
- Catterall WA (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. Annu Rev Biochem 55:953-985.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26:13-25.
- Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. Toxicon 49:124-141.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2003) International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. Pharmacol Rev 55:575-578.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. Pharmacol Rev 57:397-409.
- Catterall WA (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. J Physiol 590:2577-2589.
- Chahine M, O'Leary ME (2011) Regulatory Role of Voltage-Gated Na Channel beta Subunits in Sensory Neurons. Front Pharmacol 2:70.
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005) Gating charge displacement in voltagegated ion channels involves limited transmembrane movement. Nature 436:852-856.
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM (2009) A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in Aedes aegypti. Insect Biochem Mol Biol 39:272-278.
- Charalambous K, Wallace BA (2011) NaChBac: the long lost sodium channel ancestor. Biochemistry 50:6742-6752.
- Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, McEwen DP, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL, Scheuer T, Shrager P, Catterall WA, Isom LL (2004) Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. J Neurosci 24:4030-4042.

- Chen LQ, Santarelli V, Horn R, Kallen RG (1996) A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. J Gen Physiol 108:549-556.
- Chen Z, Ong BH, Kambouris NG, Marban E, Tomaselli GF, Balser JR (2000) Lidocaine induces a slow inactivated state in rat skeletal muscle sodium channels. J Physiol 524 Pt 1:37-49.
- Chevrier P, Vijayaragavan K, Chahine M (2004) Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. Br J Pharmacol 142:576-584.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159.
- Chopra SS, Watanabe H, Zhong TP, Roden DM (2007) Molecular cloning and analysis of zebrafish voltage-gated sodium channel beta subunit genes: implications for the evolution of electrical signaling in vertebrates. BMC Evol Biol 7:113.
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, Kaufman TC, Kellis M, Gelbart W, al. (2007) Evolution of genes and genomes on the Drosophila phylogeny. Nature 450:203-218.
- Coats JR (1990) Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. Environ Health Perspect 87:255-262.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS (2002) Secondary structure of the human cardiac Na+ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. J Biol Chem 277:9233-9241.
- Cornwell P (1968) The cockroach. Volume 1., A laboratory insect and an industrial pest London Hutchinson.
- Cummins TR, Aglieco F, Renganathan M, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2001) Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. J Neurosci 21:5952-5961.
- Cummins TR, Sigworth FJ (1996) Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. Biophys J 71:227-236.
- Cummins TR, Waxman SG (1997) Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. J Neurosci 17:3503-3514.
- Cusdin FS, Nietlispach D, Maman J, Dale TJ, Powell AJ, Clare JJ, Jackson AP (2010) The sodium channel {beta}3-subunit induces multiphasic gating in NaV1.3 and affects fast inactivation via distinct intracellular regions. J Biol Chem 285:33404-33412.
- Dahan DS, Dibas MI, Petersson EJ, Auyeung VC, Chanda B, Bezanilla F, Dougherty DA, Lester HA (2004) A fluorophore attached to nicotinic acetylcholine receptor beta M2 detects productive binding of agonist to the alpha delta site. Proc Natl Acad Sci U S A 101:10195-10200.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007a) A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. Insect Mol Biol 16:361-375.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007b) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life 59:151-162.
- Derst C, Karschin A (1998) Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K+ channels. J Exp Biol 201:2791-2799.
- Derst C, Walther C, Veh RW, Wicher D, Heinemann SH (2006) Four novel sequences in Drosophila melanogaster homologous to the auxiliary Para sodium channel subunit TipE. Biochem Biophys Res Commun 339:939-948.
- Deschenes I, Baroudi G, Berthet M, Barde I, Chalvidan T, Denjoy I, Guicheney P, Chahine M (2000) Electrophysiological characterization of SCN5A mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes. Cardiovasc Res 46:55-65.

- Deschenes I, Trottier E, Chahine M (2001) Implication of the C-terminal region of the alpha-subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. J Membr Biol 183:103-114.
- Dib-Hajj SD, Waxman SG (1995) Genes encoding the beta 1 subunit of voltage-dependent Na+ channel in rat, mouse and human contain conserved introns. FEBS Lett 377:485-488.
- Dong K (1997) A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. Insect Biochem Mol Biol 27:93-100.
- Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. Invert Neurosci 7:17-30.
- Du Y, Nomura Y, Liu Z, Huang ZY, Dong K (2009) Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels. J Biol Chem 284:33869-33875.
- Du Y, Song W, Groome JR, Nomura Y, Luo N, Dong K (2010) A negative charge in transmembrane segment 1 of domain II of the cockroach sodium channel is critical for channel gating and action of pyrethroid insecticides. Toxicol Appl Pharmacol 247:53-59.
- Elinder F, Nilsson J, Arhem P (2007) On the opening of voltage-gated ion channels. Physiol Behav 92:1-7.
- Elliott AA, Elliott JR (1993) Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. J Physiol 463:39-56.
- Erie JC, McLaren JW, Patel SV (2009) Confocal microscopy in ophthalmology. Am J Ophthalmol 148:639-646.
- Es-Salah Z, Lapied B, Le Goff G, Hamon A (2008) RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. Neuroreport 19:939-943.
- Everill B, Cummins TR, Waxman SG, Kocsis JD (2001) Sodium currents of large (Abeta-type) adult cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons display rapid recovery from inactivation before and after axotomy. Neuroscience 106:161-169.
- Fahmi AI, Patel M, Stevens EB, Fowden AL, John JE, 3rd, Lee K, Pinnock R, Morgan K, Jackson AP, Vandenberg JI (2001) The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. J Physiol 537:693-700.
- Fan XR, Ma JH, Zhang PH, Xing JL (2010) Blocking effect of methylflavonolamine on human Na(V)1.5 channels expressed in Xenopus laevis oocytes and on sodium currents in rabbit ventricular myocytes. Acta Pharmacol Sin 31:297-306.
- Feng G, Deak P, Chopra M, Hall LM (1995b) Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances Drosophila para sodium channel function. Cell 82:1001-1011.
- Feng G, Deak P, Kasbekar DP, Gil DW, Hall LM (1995a) Cytogenetic and molecular localization of tipE: a gene affecting sodium channels in Drosophila melanogaster. Genetics 139:1679-1688.
- Fleig A, Fitch JM, Goldin AL, Rayner MD, Starkus JG, Ruben PC (1994) Point mutations in IIS4 alter activation and inactivation of rat brain IIA Na channels in Xenopus oocyte macropatches. Pflugers Arch 427:406-413.
- Forehand CJ (2009) The action potential, synaptic transmission, and maintenance of nerve function.In: Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine(Rhoades RA, B. D., eds., Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, ed), pp pp. 38-64 Philadelphia, USA.
- Fozzard HA, Hanck DA (1996) Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. Physiol Rev 76:887-926.
- French AS, Sanders EJ, Duszyk E, Prasad S, Torkkeli PH, Haskins J, Murphy RA (1993) Immunocytochemical localization of sodium channels in an insect central nervous system using a site-directed antibody. J Neurobiol 24:939-948.
- Galione A, Evans AM, Ma J, Parrington J, Arredouani A, Cheng X, Zhu MX (2009) The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca(2+) release channels. Pflugers Arch 458:869-876.
- Gandhi CS, Isacoff EY (2002) Molecular models of voltage sensing. J Gen Physiol 120:455-463.

- Ganetzky B, Loughney K, Wu CF (1986) Analysis of mutations affecting sodium channels in Drosophila. Ann N Y Acad Sci 479:325-337.
- Gaunt MW, Miles MA (2002) An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. Mol Biol Evol 19:748-761.
- Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. J Exp Biol 205:575-584.
- Goldin AL (2006) Expression of Ion Channels in Xenopus Oocytes. In "Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels". Edited by Jeffrey J. Clare and Derek J. Trezise. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim 1-25.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. Neuron 28:365-368.
- Gordh T (2010) Lidocaine: the origin of a modern local anesthetic. 1949. Anesthesiology 113:1433-1437.
- Gordon D, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Kahn R, Gilles N, Dong K, Stuhmer W, Tytgat J, Gurevitz M (2007) The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. Toxicon 49:452-472.
- Gordon D, Merrick D, Wollner DA, Catterall WA (1988) Biochemical properties of sodium channels in a wide range of excitable tissues studied with site-directed antibodies. Biochemistry 27:7032-7038.
- Gordon D, Moskowitz H, Zlotkin E (1990) Sodium channel polypeptides in central nervous systems of various insects identified with site directed antibodies. Biochimica et biophysica acta 1026:80-86.
- Grolleau F, 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 203:1633-1648.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature 233:177-182.
- Guy HR, Seetharamulu P (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 83:508-512.
- Hanck DA, Makielski JC, Sheets MF (1994) Kinetic effects of quaternary lidocaine block of cardiac sodium channels: a gating current study. J Gen Physiol 103:19-43.
- Hanrahan CJ, Palladino MJ, Ganetzky B, Reenan RA (2000) RNA editing of the Drosophila para Na(+) channel transcript. Evolutionary conservation and developmental regulation. Genetics 155:1149-1160.
- Hartshorne RP, Catterall WA (1981) Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 78:4620-4624.
- Hartshorne RP, Catterall WA (1984) The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. J Biol Chem 259:1667-1675.
- Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA (1982) The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. J Biol Chem 257:13888-13891.
- Hayward LJ, Brown RH, Jr., Cannon SC (1997) Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. Biophys J 72:1204-1219.
- Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. Nature 356:441-443.
- Herzog RI, Cummins TR, Ghassemi F, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2003) Distinct repriming and closedstate inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. J Physiol 551:741-750.
- Hilber K, Sandtner W, Kudlacek O, Glaaser IW, Weisz E, Kyle JW, French RJ, Fozzard HA, Dudley SC, Todt H (2001) The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation. J Biol Chem 276:27831-27839.

- Hilber K, Sandtner W, Kudlacek O, Schreiner B, Glaaser I, Schutz W, Fozzard HA, Dudley SC, Todt H (2002) Interaction between fast and ultra-slow inactivation in the voltage-gated sodium channel. Does the inactivation gate stabilize the channel structure? J Biol Chem 277:37105-37115.
- Hille B (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. J Gen Physiol 69:497-515.
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. . Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hodges DD, Lee D, Preston CF, Boswell K, Hall LM, O'Dowd DK (2002) tipE regulates Na+-dependent repetitive firing in Drosophila neurons. Mol Cell Neurosci 19:402-416.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. Science 298:129-149.
- Hondeghem LM, Katzung BG (1977) Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. Biochimica et biophysica acta 472:373-398.
- Ingles PJ, Adams PM, Knipple DC, Soderlund DM (1996) Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. Insect Biochem Mol Biol 26:319-326.
- Isom LL (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. Neuroscientist 7:42-54.
- Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA (1994) Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. Neuron 12:1183-1194.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA (1992) Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. Science 256:839-842.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA (1995a) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. Cell 83:433-442.
- Isom LL, Scheuer T, Brownstein AB, Ragsdale DS, Murphy BJ, Catterall WA (1995b) Functional coexpression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. J Biol Chem 270:3306-3312.
- Jackson FR, Wilson SD, Hall LM (1986) The tip-E mutation of Drosophila decreases saxitoxin binding and interacts with other mutations affecting nerve membrane excitability. J Neurogenet 3:1-17.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. Nature 423:42-48.
- Kazarinova-Noyes K, Malhotra JD, McEwen DP, Mattei LN, Berglund EO, Ranscht B, Levinson SR, Schachner M, Shrager P, Isom LL, Xiao ZC (2001) Contactin associates with Na+ channels and increases their functional expression. J Neurosci 21:7517-7525.
- Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. J Biol Chem 275:1079-1088.
- Kellenberger S, West JW, Catterall WA, Scheuer T (1997a) Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na+ channels. J Gen Physiol 109:607-617.
- Kellenberger S, West JW, Scheuer T, Catterall WA (1997b) Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na+ channels. J Gen Physiol 109:589-605.
- Keren H, Lev-Maor G, Ast G (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. Nat Rev Genet 11:345-355.
- Keynes RD, Elinder F (1999) The screw-helical voltage gating of ion channels. Proc Biol Sci 266:843-852.
- Khodor YL, Rodriguez J, Abruzzi KC, Tang CH, Marr MT, 2nd, Rosbash M (2011) Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in Drosophila. Genes Dev 25:2502-2512.

Kim E, Goren A, Ast G (2008) Alternative splicing: current perspectives. Bioessays 30:38-47.

- Knipple DC, Doyle KE, Marsella-Herrick PA, Soderlund DM (1994) Tight genetic linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2483-2487.
- Koishi R, Xu H, Ren D, Navarro B, Spiller BW, Shi Q, Clapham DE (2004) A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. J Biol Chem 279:9532-9538.
- Komagata O, Kasai S, Tomita T (2010) Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroidresistant Culex quinquefasciatus. Insect Biochem Mol Biol 40:146-152.
- Kuhn FJ, Greeff NG (1999) Movement of voltage sensor S4 in domain 4 is tightly coupled to sodium channel fast inactivation and gating charge immobilization. J Gen Physiol 114:167-183.
- Kulkarni SJ, Padhye A (1982) Temperature-sensitive paralytic mutations on the second and third chromosomes of Drosophila melanogaster. Genetical Research 40:191-199.
- Kusano K, Miledi R, Stinnakre J (1982) Cholinergic and catecholaminergic receptors in the Xenopus oocyte membrane. J Physiol 328:143-170.
- Kuzuya A, Tanaka K, Katada H, Komiyama M (2009) Restriction enzyme treatment/ligation independent cloning using caged primers for PCR. Nucleic acids symposium series 75-76.
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157:105-132.
- Lagan G, McClure H (2004) Review of local anaesthetic agents. Current Anaesthesia & Critical Care 15:247-254.
- Lapied B, Grolleau F, Sattelle DB (2001) Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. Br J Pharmacol 132:587-595.
- Lapied B, Malécot C, Pelhate M (1990) Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminoergic neurones. J Exp Biol 151:387-403.
- Lavialle-Defaix C (2005) Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodium dépendants du potentiel des Dorsal Unpaired Median neurones de la blatte *Periplaneta americana* Influence des mécanismes de régulation intracellulaires dans l'efficacité d'un insecticide de la famille des oxadiazines. p 278: Thèse de l'université d'Angers.
- Lavialle-Defaix C, Gautier H, Defaix A, Lapied B, Grolleau F (2006) Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. J Neurophysiol 96:2437-2450.
- Lavialle-Defaix C, Moignot B, Legros C, Lapied B (2010) How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? J Pharmacol Exp Ther 333:264-272.
- Lee SH, Gao JR, Yoon KS, Mumcuoglu KY, Taplin D, Edman JD, Takano-Lee M, Clark JM (2003) Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, Pediculus capitis (De Geer). Pestic Biochem Physiol 75:79-91.
- Lee SH, Smith TJ, Ingles PJ, Soderlund DM (2000) Cloning and functional characterization of a putative sodium channel auxiliary subunit gene from the house fly (Musca domestica). Insect Biochem Mol Biol 30:479-487.
- Lee US, Shi J, Cui J (2010) Modulation of BK channel gating by the ss2 subunit involves both membrane-spanning and cytoplasmic domains of Slo1. J Neurosci 30:16170-16179.
- Lenkowski PW, Shah BS, Dinn AE, Lee K, Patel MK (2003) Lidocaine block of neonatal Nav1.3 is differentially modulated by co-expression of beta1 and beta3 subunits. Eur J Pharmacol 467:23-30.
- Li HL, Galue A, Meadows L, Ragsdale DS (1999) A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. Mol Pharmacol 55:134-141.
- Li J, Waterhouse RM, Zdobnov EM (2011) A remarkably stable TipE gene cluster: evolution of insect Para sodium channel auxiliary subunits. BMC Evol Biol 11:337.

Liebeskind BJ, Hillis DM, Zakon HH (2011) Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. Proc Natl Acad Sci U S A 108:9154-9159.

- Limon A, Reyes-Ruiz JM, Eusebi F, Miledi R (2007) Properties of GluR3 receptors tagged with GFP at the amino or carboxyl terminus. Proc Natl Acad Sci U S A 104:15526-15530.
- Lin WH, Wright DE, Muraro NI, Baines RA (2009) Alternative splicing in the voltage-gated sodium channel DmNav regulates activation, inactivation, and persistent current. J Neurophysiol 102:1994-2006.
- Lipkind GM, Fozzard HA (2000) KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. Biochemistry 39:8161-8170.
- Lipkind GM, Fozzard HA (2008) Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. J Gen Physiol 131:523-529.
- Littleton JT, Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the Drosophila genome. Neuron 26:35-43.
- Liu Z, Tan J, Valles SM, Dong K (2002) Synergistic interaction between two cockroach sodium channel mutations and a tobacco budworm sodium channel mutation in reducing channel sensitivity to a pyrethroid insecticide. Insect Biochem Mol Biol 32:397-404.
- Lofts B (ed.) (1974) Reproduction. In "Physiology of the Amphibia" (Lofts, B., ed.) London.
- Lombet A, Lazdunski M (1984) Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na+ channel using Tityus toxin gamma. Eur J Biochem 141:651-660.
- Loughney K, Kreber R, Ganetzky B (1989) Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in Drosophila. Cell 58:1143-1154.
- Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM (2009) MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. Current genomics 10:154-168.
- Maes OC, Xu S, Yu B, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM (2007) Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. Neurobiology of aging 28:1795-1809.
- Makielski JC, Limberis J, Fan Z, Kyle JW (1999) Intrinsic lidocaine affinity for Na channels expressed in Xenopus oocytes depends on alpha (hH1 vs. rSkM1) and beta 1 subunits. Cardiovasc Res 42:503-509.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW (1996) Coexpression of beta 1 with cardiac sodium channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. Mol Pharmacol 49:30-39.
- Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL (2000) Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. J Biol Chem 275:11383-11388.
- Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A (2009) Late Na+ current produced by human cardiac Na+ channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit. J Physiol Sci 59:217-225.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T (2001) Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. Proc Natl Acad Sci U S A 98:15348-15353.
- Marie B, Bacon JP, Blagburn JM (2000) Double-stranded RNA interference shows that Engrailed controls the synaptic specificity of identified sensory neurons. Current biology : CB 10:289-292.
- Marionneau C, Carrasquillo Y, Norris AJ, Townsend RR, Isom LL, Link AJ, Nerbonne JM (2012) The sodium channel accessory subunit Navbeta1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K(+) channels. J Neurosci 32:5716-5727.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. Insect Mol Biol 7:179-184.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, BrunBarale A, Bergé J, Pasteur N, Pauron D (1999b) Voltagedependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. Pestic Sci 55:1012-1020.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS (1999a) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Mol Biol 8:339-346.

- Maurer-Stroh S, Gouda M, Novatchkova M, Schleiffer A, Schneider G, Sirota FL, Wildpaner M, Hayashi N, Eisenhaber F (2004) MYRbase: analysis of genome-wide glycine myristoylation enlarges the functional spectrum of eukaryotic myristoylated proteins. Genome biology 5:R21.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA (1998) Molecular determinants of Na+ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. J Biol Chem 273:3954-3962.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1994) A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. Proc Natl Acad Sci U S A 91:12346-12350.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. J Biol Chem 270:12025-12034.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. J Biol Chem 273:1121-1129.
- Meadows LS, Chen YH, Powell AJ, Clare JJ, Ragsdale DS (2002a) Functional modulation of human brain Nav1.3 sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary beta 1, beta 2 and beta 3 subunits. Neuroscience 114:745-753.
- Meadows LS, Malhotra J, Loukas A, Thyagarajan V, Kazen-Gillespie KA, Koopman MC, Kriegler S, Isom LL, Ragsdale DS (2002b) Functional and biochemical analysis of a sodium channel beta1 subunit mutation responsible for generalized epilepsy with febrile seizures plus type 1. J Neurosci 22:10699-10709.
- Miledi R, Parker I, Sumikawa K (1982a) Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in Xenopus oocytes. EMBO J 1:1307-1312.
- Miledi R, Parker I, Sumikawa K (1982b) Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. Proc R Soc Lond B Biol Sci 216:509-515.
- Mitrovic N, George AL, Jr., Horn R (2000) Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. J Gen Physiol 115:707-718.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, Matsumura F (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (Blattella germanica) and house fly (Musca domestica). Mol Gen Genet 252:61-68.
- Moignot B (2010) Caractérisation des sous-unités principales et auxiliaires des canaux sodium dépendant du potentiel exprimées dans le système nerveux central de l'insecte *P. americana*. In: Thèse de l'Université d'Angers, p 315.
- Moignot B, Lemaire C, Quinchard S, Lapied B, Legros C (2009) The discovery of a novel sodium channel in the cockroach Periplaneta americana: evidence for an early duplication of the para-like gene. Insect Biochem Mol Biol 39:814-823.
- Moncaster JA, Pineda R, Moir RD, Lu S, Burton MA, Ghosh JG, Ericsson M, Soscia SJ, Mocofanescu A, Folkerth RD, Robb RM, Kuszak JR, Clark JI, Tanzi RE, Hunter DG, Goldstein LE (2010) Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. PloS one 5:e10659.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP (2000) beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. Proc Natl Acad Sci U S A 97:2308-2313.
- Muller HA (2001) Of mice, frogs and flies: generation of membrane asymmetries in early development. Development, growth & differentiation 43:327-342.
- Nagahora H, Okada T, Yahagi N, Chong JA, Mandel G, Okamura Y (2000) Diversity of voltage-gated sodium channels in the ascidian larval nervous system. Biochem Biophys Res Commun 275:558-564.
- Narahashi T (1986) Nerve membrane ionic channels as the target of toxicants. Arch Toxicol Suppl 9:3-13.
- Narahashi T (2000) Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. J Pharmacol Exp Ther 294:1-26.

- Nassel DR (1996) Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. Prog Neurobiol 48:325-420.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, et al. (2007) Genome sequence of Aedes aegypti, a major arbovirus vector. Science 316:1718-1723.
- Nguyen HM, Miyazaki H, Hoshi N, Smith BJ, Nukina N, Goldin AL, Chandy KG (2012) Modulation of voltage-gated K+ channels by the sodium channel beta1 subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 109:18577-18582.
- Noda M, Ikeda T, Suzuki H, Takeshima H, Takahashi T, Kuno M, Numa S (1986) Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. Nature 322:826-828.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. (1984) Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature 312:121-127.
- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stuhmer W (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. FEBS Lett 259:213-216.
- Nuss HB, Chiamvimonvat N, Perez-Garcia MT, Tomaselli GF, Marban E (1995) Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (mu 1) sodium channel alpha subunits expressed in Xenopus oocytes. J Gen Physiol 106:1171-1191.
- O'Dowd DK, Aldrich RW (1988) Voltage-clamp analysis of sodium channels in wild-type and mutant Drosophila neurons. J Neurosci 8:3633-3643.
- O'Dowd DK, Germeraad SE, Aldrich RW (1989) Alterations in the expression and gating of Drosophila sodium channels by mutations in the para gene. Neuron 2:1301-1311.
- O'Malley HA, Shreiner AB, Chen GH, Huffnagle GB, Isom LL (2009) Loss of Na+ channel beta2 subunits is neuroprotective in a mouse model of multiple sclerosis. Mol Cell Neurosci 40:143-155.
- O'Reilly JP, Wang SY, Wang GK (2001) Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na(v)1.4 sodium channels. Biophys J 81:2100-2111.
- Oh Y, Waxman SG (1994) The beta 1 subunit mRNA of the rat brain Na+ channel is expressed in glial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9985-9989.
- Olson RO, Liu Z, Nomura Y, Song W, Dong K (2008) Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from Drosophila melanogaster. Insect Biochem Mol Biol 38:604-610.
- Orchard I, Lange AB, Cook H, Ramirez JM (1989) A subpopulation of dorsal unpaired median neurons in the blood-feeding insect Rhodnius prolixus displays serotonin-like immunoreactivity. J Comp Neurol 289:118-128.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel betasubunits. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 17:156-161.
- Oyama F, Miyazaki H, Sakamoto N, Becquet C, Machida Y, Kaneko K, Uchikawa C, Suzuki T, Kurosawa M, Ikeda T, Tamaoka A, Sakurai T, Nukina N (2006) Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. J Neurochem 98:518-529.
- Paddock SW (2000) Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. Mol Biotechnol 16:127-149.
- Palladino MJ, Keegan LP, O'Connell MA, Reenan RA (2000) A-to-I pre-mRNA editing in Drosophila is primarily involved in adult nervous system function and integrity. Cell 102:437-449.
- Papazian DM, Bezanilla F (1997) How does an ion channel sense voltage? News in Physiological Sciences 12:203-210.
- Park Y, Taylor MF, Feyereisen R (1999) Voltage-gated sodium channel genes hscp and hDSC1 of Heliothis virescens F. genomic organization. Insect Mol Biol 8:161-170.

- Pass G, Agricola H, Birkenbeil H, Penzlin H (1988) Morphology of neurones associated with the antennal heart of Periplaneta americana (Blattodea, Insecta). Cell Tissue Res 253:319-326.
- Patino GA, Brackenbury WJ, Bao Y, Lopez-Santiago LF, O'Malley HA, Chen C, Calhoun JD, Lafreniere RG, Cossette P, Rouleau GA, Isom LL (2011) Voltage-gated Na+ channel beta1B: a secreted cell adhesion molecule involved in human epilepsy. J Neurosci 31:14577-14591.
- Patino GA, Claes LR, Lopez-Santiago LF, Slat EA, Dondeti RS, Chen C, O'Malley HA, Gray CB, Miyazaki H, Nukina N, Oyama F, De Jonghe P, Isom LL (2009) A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. J Neurosci 29:10764-10778.
- Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL (1992) Amino acid residues required for fast Na(+)channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. Proc Natl Acad Sci U S A 89:10905-10909.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. Nature 475:353-358.
- Payne G, Deecher D, Soderlund DM (1998) Struture-Activity relationships for the action of dihydropyrazole insecticides on mouse brain sodium channels. Pestic Biochem Physiol 60:177-185.
- Plotnikova S (1969) Effector neurons with several axons in the ventral nerve cord of the asian grasshopper Locusta migratoria. J Evol Biochem Physiol 5:276-277.
- Plummer NW, Meisler MH (1999) Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. Genomics 57:323-331.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14:817-818.
- Postma SW, Catterall WA (1984) Inhibition of binding of [3H]batrachotoxinin A 20-alpha-benzoate to sodium channels by local anesthetics. Mol Pharmacol 25:219-227.
- Pusch M, Noda M, Stuhmer W, Numa S, Conti F (1991) Single point mutations of the sodium channel drastically reduce the pore permeability without preventing its gating. Eur Biophys J 20:127-133.
- Qin N, D'Andrea MR, Lubin ML, Shafaee N, Codd EE, Correa AM (2003) Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. Eur J Biochem 270:4762-4770.
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA, Scheuer T (2001) Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. Mol Cell Neurosci 18:570-580.
- Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE, Rogers JC, Tanada TN, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA (1995) Modulation of cardiac Na+ channel expression in Xenopus oocytes by beta 1 subunits. J Biol Chem 270:25696-25701.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994) Molecular determinants of state-dependent block of Na+ channels by local anesthetics. Science 265:1724-1728.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na+ channels. Proc Natl Acad Sci U S A 93:9270-9275.
- Ramaswami G, Zhang R, Piskol R, Keegan LP, Deng P, O'Connell MA, Li JB (2013) Identifying RNA editing sites using RNA sequencing data alone. Nature methods 10:128-132.
- Ramaswami M, Tanouye MA (1989) Two sodium-channel genes in Drosophila: implications for channel diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 86:2079-2082.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol 9:491-497.
- Rasar MA, Hammes SR (2006) The physiology of the Xenopus laevis ovary. Methods Mol Biol 322:17-30.
- Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. Invert Neurosci 5:119-133.

- Ren D, Navarro B, Xu H, Yue L, Shi Q, Clapham DE (2001) A prokaryotic voltage-gated sodium channel. Science 294:2372-2375.
- Roeder T (1999) Octopamine in invertebrates. Prog Neurobiol 59:533-561.
- Ruta V, Chen J, MacKinnon R (2005) Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K+ channel. Cell 123:463-475.
- Salgado VL (1992) Slow voltage-dependent block of sodium channels in crayfish nerve by dihydropyrazole insecticides. Mol Pharmacol 41:120-126.
- Salgado VL, Hayashi JH (2007) Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. Vet Parasitol 150:182-189.
- Salkoff L, Butler A, Wei A, Scavarda N, Giffen K, Ifune C, Goodman R, Mandel G (1987) Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in Drosophila. Science 237:744-749.
- Sato C, Matsumoto G (1992) Primary structure of squid sodium channel deduced from the complementary DNA sequence. Biochem Biophys Res Commun 186:61-68.
- Savalli N, Kondratiev A, de Quintana SB, Toro L, Olcese R (2007) Modes of operation of the BKCa channel beta2 subunit. J Gen Physiol 130:117-131.
- Scheffer IE, Harkin LA, Grinton BE, Dibbens LM, Turner SJ, Zielinski MA, Xu R, Jackson G, Adams J, Connellan M, Petrou S, Wellard RM, Briellmann RS, Wallace RH, Mulley JC, Berkovic SF (2007) Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. Brain 130:100-109.
- Schuler TH, Martinez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MS (1998) Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knowk-down resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Pestic Biochem Physiol 59:169-182.
- Seyfarth EA, Sanders EJ, French AS (1995) Sodium channel distribution in a spider mechanosensory organ. Brain Res 683:93-101.
- Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM (2005) Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. Environ Health Perspect 113:123-136.
- Shah BS, Stevens EB, Gonzalez MI, Bramwell S, Pinnock RD, Lee K, Dixon AK (2000) beta3, a novel auxiliary subunit for the voltage-gated sodium channel, is expressed preferentially in sensory neurons and is upregulated in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. Eur J Neurosci 12:3985-3990.
- Shao YM, Dong K, Tang ZH, Zhang CX (2009) Molecular characterization of a sodium channel gene from the Silkworm Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 39:145-151.
- Sheets MF, Hanck DA (2003) Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. J Gen Physiol 121:163-175.
- Shono T, Zhang L, Scott J (2004) Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. Pestic Biochem Physiol 80:106-112.
- Silver KS, Nomura Y, Salgado VL, Dong K (2009) Role of the sixth transmembrane segment of domain IV of the cockroach sodium channel in the action of sodium channel blocker insecticides. Neurotoxicology 30:613-621.
- Silver KS, Soderlund DM (2007) Point mutations at the local anesthetic receptor site modulate the state-dependent block of rat Na v1.4 sodium channels by pyrazoline-type insecticides. Neurotoxicology 28:655-663.
- Silver KS, Song W, Nomura Y, Salgado VL, Dong K (2010) Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pestic Biochem Physiol 97:87-92.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, Lapied B (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the accessory gland of the male cockroach *Periplaneta americana*. Cell Tissue Res 276:15-21.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, 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 367:147-163.

- Sinakevitch II, Geffard M, Pelhate M, Lapied B (1995) Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach Periplaneta americana. J Exp Biol 198:1539-1544.
- Smith MR, Goldin AL (1997b) Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. Biophys J 73:1885-1895.
- Smith RD, Goldin AL (1998a) Functional analysis of the rat I sodium channel in xenopus oocytes. J Neurosci 18:811-820.
- Smith TJ, Ingles PJ, Soderlund DM (1998b) Actions of the pyrethroid insecticides cismethrin and cypermethrin on house fly Vssc1 sodium channels expressed in Xenopus oocytes. Arch Insect Biochem Physiol 38:126-136.
- Smith TJ, Lee SH, Ingles PJ, Knipple DC, Soderlund DM (1997a) The L1014F point mutation in the house fly Vssc1 sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. Insect Biochem Mol Biol 27:807-812.
- Soderlund DM (2008) Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Manag Sci 64:610-616.
- Soderlund DM (2012) Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch Toxicol 86:165-181.
- Song W, Liu Z, Dong K (2006) Molecular basis of differential sensitivity of insect sodium channels to DCJW, a bioactive metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb. Neurotoxicology 27:237-244.
- Song W, Liu Z, Tan J, Nomura Y, Dong K (2004) RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. J Biol Chem 279:32554-32561.
- Song W, Silver KS, Du Y, Liu Z, Dong K (2011) Analysis of the action of lidocaine on insect sodium channels. Insect Biochem Mol Biol 41:36-41.
- Sookrung N, Chaicumpa W (2010) A revisit to cockroach allergens. Asian Pac J Allergy Immunol 28:95-106.
- Soravia E, Martini G, Zasloff M (1988) Antimicrobial properties of peptides from Xenopus granular gland secretions. FEBS Lett 228:337-340.
- Spafford JD, Spencer AN, Gallin WJ (1999) Genomic organization of a voltage-gated Na+ channel in a hydrozoan jellyfish: insights into the evolution of voltage-gated Na+ channel genes. Receptors Channels 6:493-506.
- Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15753-15757.
- Stankiewicz M, Dabrowski M, de Lima ME (2012) Nervous System of Periplaneta americana Cockroach as a Model in Toxinological Studies: A Short Historical and Actual View. J Toxicol 2012:143740.
- Starmer CF, Grant AO, Strauss HC (1984) Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. Biophys J 46:15-27.
- Stevenson PA (1999) Colocalisation of taurine- with transmitter-immunoreactivities in the nervous system of the migratory locust. J Comp Neurol 404:86-96.
- Stevenson PA, Pfluger HJ (1994) Colocalization of octopamine and FMRFamide related peptide in identified heart projecting (DUM) neurones in the locust revealed by immunocytochemistry. Brain Res 638:117-125.
- Strong M, Chandy KG, Gutman GA (1993) Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. Mol Biol Evol 10:221-242.
- Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 339:597-603.
- Sureau A, Perbal B (1994) Several mRNAs with variable 3' untranslated regions and different stability encode the human PR264/SC35 splicing factor. Proc Natl Acad Sci U S A 91:932-936.

- Suzuki DT, Grigliatti T, Williamson R (1971) Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. VII. A mutation (para-ts) causing reversible adult paralysis. Proc Natl Acad Sci U S A 68:890-893.
- Szafranski K, Schindler S, Taudien S, Hiller M, Huse K, Jahn N, Schreiber S, Backofen R, Platzer M (2007) Violating the splicing rules: TG dinucleotides function as alternative 3' splice sites in U2-dependent introns. Genome biology 8:R154.
- Takagi K, Hamaguchi H, Nishimatsu T, Konno T (2007) Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. Vet Parasitol 150:177-181.
- Takahashi MP, Cannon SC (1999) Enhanced slow inactivation by V445M: a sodium channel mutation associated with myotonia. Biophys J 76:861-868.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731-2739.
- Tan J, Liu Z, Nomura Y, Goldin AL, Dong K (2002a) Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. J Neurosci 22:5300-5309.
- Tan J, Liu Z, Tsai TD, Valles SM, Goldin AL, Dong K (2002b) Novel sodium channel gene mutations in Blattella germanica reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. Insect Biochem Mol Biol 32:445-454.
- Tan J, Liu Z, Wang R, Huang ZY, Chen AC, Gurevitz M, Dong K (2005) Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. Mol Pharmacol 67:513-522.
- Teng J, Goto R, Iida K, Kojima I, Iida H (2008) Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calciumchannel homologue Cch1 in Saccharomyces cerevisiae. Microbiology 154:3775-3781.
- Terhag J, Cavara NA, Hollmann M (2010) Cave Canalem: how endogenous ion channels may interfere with heterologous expression in Xenopus oocytes. Methods 51:66-74.
- Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. FEBS Lett 293:93-96.
- Thackeray JR, Ganetzky B (1995) Conserved alternative splicing patterns and splicing signals in the Drosophila sodium channel gene para. Genetics 141:203-214.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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.
- Thompson KJ, Siegler MVS (1989) Properties of the small dorsal unpaired median (DUM) neurons of the grasshopper. Abstr Soc Neurosci 15:1296.
- Todt H, Dudley SC, Jr., Kyle JW, French RJ, Fozzard HA (1999) Ultra-slow inactivation in mu1 Na+ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule. Biophys J 76:1335-1345.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S (2003) Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, Pediculus humanus capitis (Anoplura: Pediculidae). J Med Entomol 40:468-474.
- Tovey SC, Brighton PJ, Willars GB (2005) Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. Methods Mol Biol 312:57-85.
- Tsai CW, Tseng JJ, Lin SC, Chang CY, Wu JL, Horng JF, Tsay HJ (2001) Primary structure and developmental expression of zebrafish sodium channel Na(v)1.6 during neurogenesis. DNA Cell Biol 20:249-255.
- Tseng TT, McMahon AM, Johnson VT, Mangubat EZ, Zahm RJ, Pacold ME, Jakobsson E (2007) Sodium channel auxiliary subunits. J Mol Microbiol Biotechnol 12:249-262.
- Vais H, Williamson MS, Devonshire AL, Usherwood PN (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. Pest Manag Sci 57:877-888.
- Vais H, Williamson MS, Goodson SJ, Devonshire AL, Warmke JW, Usherwood PN, Cohen CJ (2000) Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin.

Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. J Gen Physiol 115:305-318.

- van Gassen KL, de Wit M, van Kempen M, van der Hel WS, van Rijen PC, Jackson AP, Lindhout D, de Graan PN (2009) Hippocampal Nabeta3 expression in patients with temporal lobe epilepsy. Epilepsia 50:957-962.
- Vassilev P, Scheuer T, Catterall WA (1989) Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. Proc Natl Acad Sci U S A 86:8147-8151.
- Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. Science 241:1658-1661.
- Vijayaragavan K, O'Leary ME, Chahine M (2001) Gating properties of Na(v)1.7 and Na(v)1.8 peripheral nerve sodium channels. J Neurosci 21:7909-7918.
- Vijayaragavan K, Powell AJ, Kinghorn IJ, Chahine M (2004) Role of auxiliary beta1-, beta2-, and beta3subunits and their interaction with Na(v)1.8 voltage-gated sodium channel. Biochem Biophys Res Commun 319:531-540.
- Vilin YY, Fujimoto E, Ruben PC (2001) A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na+ channel slow inactivation. Biophys J 80:2221-2230.
- von Stein RT, Soderlund DM (2012a) Role of the local anesthetic receptor in the state-dependent inhibition of voltage-gated sodium channels by the insecticide metaflumizone. Mol Pharmacol 81:366-374.
- von Stein RT, Soderlund DM (2012b) Compound-specific effects of mutations at Val787 in DII-S6 of Nav 1.4 sodium channels on the action of sodium channel inhibitor insecticides. Neurotoxicology 33:1381-1389.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr., Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na+-channel beta1 subunit gene SCN1B. Nat Genet 19:366-370.
- Wallner M, Weigl L, Meera P, Lotan I (1993) Modulation of the skeletal muscle sodium channel alphasubunit by the beta 1-subunit. FEBS Lett 336:535-539.
- Wang B, Brenner R (2006) An S6 mutation in BK channels reveals beta1 subunit effects on intrinsic and voltage-dependent gating. J Gen Physiol 128:731-744.
- Wang R, Huang ZY, Dong K (2003) Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (Varroa destructor). Insect Biochem Mol Biol 33:733-739.
- Warmke JW, Reenan RA, Wang P, Qian S, Arena JP, Wang J, Wunderler D, Liu K, Kaczorowski GJ, Van der Ploeg LH, Ganetzky B, Cohen CJ (1997) Functional expression of Drosophila para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. J Gen Physiol 110:119-133.
- Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, Saegusa C, Noda M (2000) Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. J Neurosci 20:7743-7751.
- Wei J, Wang DW, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden DM, George AL, Jr. (1999) Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na+ channel. Circulation 99:3165-3171.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A 89:10910-10914.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. Mol Gen Genet 252:51-60.
- Wing K, Schnee M, Sacher M, Connair M (1998) A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 37:91-103.
- Wu CF, Ganetzky B, Jan LY, Jan YN, Benzer S (1978) A Drosophila mutant with a temperature-sensitive block in nerve conduction. Proc Natl Acad Sci U S A 75:4047-4051.

- Wurm Y, Wang J, Riba-Grognuz O, Corona M, Nygaard S, Hunt BG, Ingram KK, Falquet L, Nipitwattanaphon M, Gotzek D, Dijkstra MB, Oettler J, Comtesse F, Shih CJ, Wu WJ, Yang CC, Thomas J, Beaudoing E, Pradervand S, Flegel V, Cook ED, Fabbretti R, Stockinger H, Long L, Farmerie WG, Oakey J, Boomsma JJ, Pamilo P, Yi SV, Heinze J, Goodisman MA, Farinelli L, Harshman K, Hulo N, Cerutti L, Xenarios I, Shoemaker D, Keller L (2011) The genome of the fire ant Solenopsis invicta. Proc Natl Acad Sci U S A 108:5679-5684.
- Xu Q, Wang H, Zhang L, Liu N (2006) Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, Culex quinquefasciatus (S.). Biochem Biophys Res Commun 345:774-780.
- Yarov-Yarovoy V, DeCaen PG, Westenbroek RE, Pan CY, Scheuer T, Baker D, Catterall WA (2012) Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 109:E93-102.
- Yoon KS, Kwon DH, Strycharz JP, Hollingsworth CS, Lee SH, Clark JM (2008) Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). J Med Entomol 45:1092-1101.
- Yotsu-Yamashita M, Nishimori K, Nitanai Y, Isemura M, Sugimoto A, Yasumoto T (2000) Binding properties of (3)H-PbTx-3 and (3)H-saxitoxin to brain membranes and to skeletal muscle membranes of puffer fish Fugu pardalis and the primary structure of a voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit (fMNa1) from skeletal muscle of F. pardalis. Biochem Biophys Res Commun 267:403-412.
- Yu FH, Catterall WA (2004) The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. Sci STKE 2004:re15.
- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R (2003) Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. J Neurosci 23:7577-7585.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA (2005) Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. Pharmacol Rev 57:387-395.
- Zakon HH (2012) Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. Proc Natl Acad Sci U S A 109 Suppl 1:10619-10625.
- Zhang X, Ren W, DeCaen P, Yan C, Tao X, Tang L, Wang J, Hasegawa K, Kumasaka T, He J, Clapham DE, Yan N (2012) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. Nature 486:130-134.
- Zhao J, O'Leary ME, Chahine M (2011) Regulation of Nav1.6 and Nav1.8 peripheral nerve Na+ channels by auxiliary beta-subunits. J Neurophysiol 106:608-619.
- Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ, Narahashi T (2005) Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. Neurotoxicology 26:455-465.
- Zhao Y, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Catterall WA (2004) A gating hinge in Na+ channels; a molecular switch for electrical signaling. Neuron 41:859-865.
- Zhou W, Chung I, Liu Z, Goldin AL, Dong K (2004) A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. Neuron 42:101-112.
- Zlotkin E (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. Annu Rev Entomol 44:429-455.

#### Annexe

#### **Publication 1:**

Bourdin CM, Moignot B, Wang L, Murillo L, Juchaux M, Quinchard S, Lapied B, Guérineau NC, Dong K, Legros C (2013) Intron retention in mRNA encoding ancillary subunit of insect voltage-gated sodium channel modulates channel expression, gating regulation and drug sensitivity. PlosOne, *In press*.

1	Intron retention in mRNA encoding ancillary subunit of insect voltage-
2	gated sodium channel modulates channel expression, gating regulation and
3	drug sensitivity
4	
5	
6 7	Céline M Bourdin ¹ , Bénédicte Moignot ¹ , Lingxin Wang ² , Laurence Murillo ^{1,3} , Marjorie Juchaux ⁴ , Sophie Quinchard ¹ , Bruno Lapied ¹ , Nathalie C Guérineau ⁵ , Ke Dong ² , Christian Legros ^{1,5*}
8	
9 10	1 Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences, Université d'Angers, Angers, France.
11 12	2 Department of Entomology, Genetics and Neuroscience Programs, Michigan State University, East Lansing, USA
13 14	<b>3</b> Laboratoire LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS, Institut du Littoral et de l'Environnement, Université de La Rochelle, La Rochelle, France.
15	4 IMAC, SFR QUASAV 4207, Université d'Angers, Beaucouzé, France
16 17	<b>5</b> Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée, UMR CNRS 6214, INSERM 1083, UFR de Sciences Médicales, Université d'Angers, Angers, France
18	
19	
20	
21	*E-mail: christian.legros@univ-angers.fr
22	
23	

24
## 25 Abstract

26 Insect voltage-gated sodium (Na_v) channels are formed by a well-known pore-forming  $\alpha$ -subunit 27 encoded by *para*-like gene and ancillary subunits related to TipE from the mutation "temperature-28 induced-paralysis locus E". The role of these ancillary subunits in the modulation of biophysical and 29 pharmacological properties of Na⁺ currents are not enough documented. The unique neuronal ancillary 30 subunit TipE-homologous protein 1 of Drosophila melanogaster (DmTEH1) strongly enhances the 31 expression of insect Nav channels when heterologously expressed in *Xenopus* oocytes. Here we report the cloning and functional expression of two neuronal DmTEH1-homologs of the cockroach, 32 Periplaneta americana, PaTEH1A and PaTEH1B, encoded by a single bicistronic gene. In PaTEH1B, 33 the second exon encoding the last 11-amino-acid residues of PaTEH1A is shifted to 3'UTR by the 34 retention of a 96-bp intron-containing coding-message, thus generating a new C-terminal end. We 35 36 investigated the gating and pharmacological properties of the Drosophila Nay channel variant (DmNa_v1-1) co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B or a truncated mutant 37 38 PaTEH1 $\Delta$ (270-280) in *Xenopus* oocytes. PaTEH1B caused a 2.2-fold current density decrease, concomitant with an equivalent  $\alpha$ -subunit incorporation decrease in the plasma membrane, compared 39 to PaTEH1A and PaTEH1A(270-280). PaTEH1B positively shifted the voltage-dependences of 40 activation and slow inactivation of DmNa_v1-1 channels to more positive potentials compared to 41 42 PaTEH1A, suggesting that the C-terminal end of both proteins may influence the function of the voltage-sensor and the pore of Na_v channel. Interestingly, our findings showed that the sensitivity of 43 DmNa_v1-1 channels to lidocaine and to the pyrazoline-type insecticide metabolite DCJW depends on 44 associated TEH1-like subunits. In conclusion, our work demonstrates for the first time that density, 45 gating and pharmacological properties of Nav channels expressed in Xenopus oocytes can be 46 47 modulated by an intron retention process in the transcription of the neuronal TEH1-like ancillary 48 subunits of P. americana.

49

Key words: alternative splicing; intron retention; insect voltage-gated sodium channel; auxiliary
subunit; pyrazoline-like insecticide; lidocaine; *Xenopus* oocyte

## 53 Introduction

54 Voltage-gated sodium (Na_v) channels are critical for the initiation of action potentials (APs) in excitable cells (Hille, 2001). Because of their crucial role in the regulation of membrane excitability in 55 56 the nervous system, the Na_v channels are major targets of numerous natural toxins and therapeutic 57 compounds, such as local anesthetics (LAs), antiepileptic drugs and antiarrythmics (Catterall et al., 58 2005). They also constitute a main molecular target of insecticides like pyrethroids and pyrazoline-59 type insecticides (PTIs) used in pest control (Silver and Soderlund, 2005, Davies et al., 2007b). They 60 consist in a pore-forming subunit ( $\alpha$ -subunit) associated with ancillary subunits. In insects, two *para*-61 related genes encode  $\alpha$ -subunits of Na_v channels (Goldin, 2002, Moignot et al., 2009), sharing high sequence identity with those of vertebrate. 62

Insect auxiliary subunits of Nav channels are structurally unrelated to well-known auxiliary β-63 subunits of vertebrate  $Na_v$  channels. While mammalian  $Na_v$  auxiliary  $\beta$ -subunits are single membrane-64 65 spanning proteins (Isom, 2001), Drosophila melanogaster auxiliary subunits (TipE and TEH1-4) contain two membrane-spanning segments (Feng et al., 1995b, Warmke et al., 1997, Derst et al., 66 67 2006). In contrast with most mammalian Na_v  $\alpha$ -subunit, expression of para (DmNa_v1) alone generates very small Na⁺ currents in *Xenopus* oocytes (Feng et al., 1995b, Warmke et al., 1997, Derst et al., 68 2006). The first insect auxiliary subunit described, TipE, strongly enhances Na⁺ currents when co-69 expressed with DmNa_v1 in *Xenopus* oocytes, indicating that these proteins have strong chaperone or 70 71 stabilizing effects on channel expression (Feng et al., 1995b, Warmke et al., 1997, Derst et al., 2006). 72 More recently, Derst et al. (Derst et al., 2006), show that TEH1 displays a stronger expression 73 stimulating effect than TipE on DmNa_v1 expression. By contrast, TEH2 and TEH3 stimulate channel expression to a lower extent, while TEH4 does not at all. Co-expression of DmNa_v1 and TipE results 74 75 in Na⁺ currents with same activation properties, but with accelerated current decay and also faster rate 76 of recovery from inactivation (Warmke et al., 1997, Derst et al., 2006). Moreover, Na⁺ currents 77 elicited by co-expression of DmNav1 channels and TipE or TEH1-4, display specific inactivation and repriming properties, reminding functional properties of mammalian  $\beta$ -subunits (Warmke et al., 1997, 78 Derst et al., 2006). 79

80 In D. melanogaster, TEH1 was found exclusively expressed in neuronal tissues, while TipE, TEH2 to TEH4 have a broad tissue distribution, including non-excitable cells (Derst et al., 2006). This 81 82 suggests that TEH1 and TEH1-like proteins of other insect species are relevant elements in the 83 modulation of neuronal excitability through the modulation of the gating and pharmacological properties of Nav channels. Indeed, TEH1 dramatically changes the inactivation properties (voltage-84 dependence and recovery from inactivation) of Na⁺ currents generated by DmNa_v1 channels in 85 Xenopus oocytes in comparison to TipE (Derst et al., 2006). Thus, we hypothesized that 86 87 DmNa_v1/TEH1 channels display different pharmacological properties compared to DmNa_v1/TipE 88 channels.

89 PTIs belong to a relatively new class of insecticides, including indoxacarb and metaflumizone 90 which kill a broad spectrum of insects by inhibiting  $Na_v$  channels (Silver et al., 2010). Indoxacarb acts as a proinsecticide, which is biotransformed into a toxic N-decarbomethoxyllated metabolite DCJW 91 92 (Wing et al., 2000). DCJW irreversibly blocks APs in preparations of lepidopteran (Manduca sexta) 93 larval motor nerve and induces a dose-dependent inhibition of Nav channels in cockroach Periplaneta americana neurons (Lapied et al., 2001, Zhao et al., 2005). The similarity between the blocking 94 95 mechanism induced by PTIs and LAs, such as lidocaine was early reported (Salgado, 1992). Indoxacarb/DCJW and lidocaine preferably bind to inactivated channels resulting in stabilization of 96 this state (Hille, 1977, Bean et al., 1983, Salgado, 1992, Lapied et al., 2001, Zhao et al., 2005, Song et 97 98 al., 2006). Since PTIs potency depends on the inactivation properties of Na_v channels (Salgado, 1992, 99 Lapied et al., 2001, Zhao et al., 2005), TEH1 could also differentially modulate the sensitivity of Nav 100 channel to insecticides.

101 The cockroach model is a usual tool to investigate whether and how do neurotoxic insecticides 102 modulate ion channels. *P. americana* is suitable neurobiological model, for which electrophysiological 103 and pharmacological studies have shown the existence of different Na⁺ currents with distinct 104 biophysical and pharmacological properties in isolated neurons (Zhao et al., 2005, Lavialle-Defaix et 105 al., 2006, Lavialle-Defaix et al., 2010). To gain further insights into the molecular characterization of 106 Na_v channels in *P. americana*, we cloned and characterized two novel variants of *teh1-like* gene. We 107 showed that these TEH1-like variants are exclusively expressed in the nervous system of *P. americana*  and resulted from exclusion or retention of an intron that modulates expression and gating properties of the DmNa_v1-1 variant expressed in *Xenopus* oocytes. Furthermore, we examined the biophysical properties of Na⁺ currents resulting from the co-expression of DmNa_v1-1 with TEH1 and TEH1-like variants of *P. americana*. Next, we characterized the pharmacological consequences of the coexpression of these auxiliary subunits and we observed marked differences in the blocking effects of lidocaine and DCJW on DmNa_v1-1 channels.

#### 115 Materiel and methods

116

117 Insects

Adult male American cockroaches *P. americana* were obtained from our laboratory stock colony maintained at 29°C on 12-h light/ dark cycle with food and water *ad libitum*. Intestine, ganglia, reproductive glands, muscles (extracted from the coxa of the legs), head and the ventral nerve cord (thoracic and abdominal ganglia, together with the connectives) were dissected from adult male cockroaches.

123

# 124 RNA extraction, RT-PCR and cloning of full length PaTEH1 cDNAs

Total RNA extraction was isolated from various tissues using the TRIzol® Reagent 125 (Ozyme/Biogentex, France). For polymerase chain reaction (PCR) experiments, first strand cDNAs 126 127 were synthesized from 5 µg of total RNA using SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System Super Mix (Invitrogen, USA) in the presence of oligo  $(dT)_{20}$ . The sequences of the primers used in our 128 129 experiments are listed in Table 1. For cloning PaTEH1 cDNA in the nerve cord, a degenerated primers pair (DPS1 and DPR1) was designed from conserved regions observed in an alignment of available 130 131 TEH1 subunit sequences. A PCR amplification of cDNA fragment was carried out using EuroTaq polymerase (Eurobio, France). PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and 132 133 purified using Nucleospin® Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel, Germany). The cDNA 134 fragments were cloned into PCR® 4 TOPO® (Invitrogen). Each clone was sequenced in both strands 135 by the company Millegen Biotechnology. For RACE (rapid amplification of cDNA ends) of 5' and 3' ends of PaTEH1, the RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends method (GeneRacer[™] 136 137 kit, Invitrogen) was used. For amplification of 5'end and 3'end regions, the gene-specific primer used were P-R1, P-R2, P-S1 and P-S2. PCR products were cloned and sequenced as described above. 138 139 Finally, the ORF of PaTEH1 cDNAs was amplified using the gene-specific primers P-S3 and P-R3, 140 containing the restriction enzyme sites *XmaI* and *XbaI* respectively, for directional cloning into 141 pGEM-HEJUEL plasmid suitable for expression in *Xenopus* oocytes (kindly provided by Pr. Olaf 142 Pongs, Institute for Neural Signal Transduction, Hamburg, Germany). Sequences analyses were 143 performed using BioEdit sequence analysis Software. Full- length ORFs were identified using BLAST 144 research in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Amino acid 145 sequences alignment was carried out using ClustalW method as described (Moignot et al., 2009).

Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed to study the tissue distribution pattern
of PaTEH1 using the P-S3/R3 primer pair. The experiments were repeated five times.

148

149 Extraction of genomic DNA and PCR.

150 Genomic DNA was extracted from five cockroach individuals using the procedure modified from Blin and Stafford (Blin and Stafford, 1976). Tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. 151 Frozen tissues were homogenized in an extraction buffer (1 ml per 100 mg tissue) containing Tris-Cl 152 10 mM (pH 8.0), EDTA 0.1 M (pH 8.0), pancreatic RNAase 20 µg/ml, 0.5% SDS and incubated for 153 1 h at 37°C. Proteinase K was added to a final concentration of 100 µg/ml and the suspension was 154 incubated at 50°C for 3 h. Three phenol extractions were carried out and the DNA in aqueous phase 155 was precipitated with 0.2 volume of 10 M acetate ammonium and 2 volumes of ethanol. High 156 molecular weight genomic DNA was recovered with a Pasteur pipette. DNA was dissolved in TE (pH 157 8.0) and stored at 4°C. Pateh1 gene was amplified by nested PCR using the P-S4/R4 primer pair, 158 followed by the P-S3/R3 primer pair with genomic DNA as template. The amplified product of the 159 second PCR was cloned and sequenced as described above. 160

161

162 Co-expression of DmTEH1 or PaTEH1 variants with DmNa_v1.1 in Xenopus laevis
 163 oocytes

A splice variant of the sodium channel from *D. melanogaster*, DmNa_v1.1, was used for co-expression experiments (Olson et al., 2008). pGEM-DmTEH1 construct was kindly provided by Dr Christian Derst (Institute for Integrative Neuroanatomy, Charité, Berlin, Germany). All recombinant plasmids were linearized with *Spe*I (Promega, Madison, USA) or *Not*I (Invitrogen), and capped RNA were transcribed in vitro using the T7 mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Austin, USA).

169 Ovarian lobes were surgically harvested from adult *Xenopus laevis* previously anesthetized in 170 tricaine (0.15 M, Sigma-Aldrich) and washed in a standard oocyte saline (SOS) solution composed of 171 (in mM): NaCl 100, KCl 2, CaCl₂ 1.8, Hepes 5, pH 7.5. Defolliculated oocytes were obtained after 1 h-treatment with 2 mg/ml collagenase (type 1A, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 172 173 0.8 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich) in calcium-free SOS. Depending on the combination of 174 DmNa_v1-1 and auxiliary subunits, various amounts (2 to 35 ng) of DmNa_v1-1 and auxiliary subunits 175 RNA mixture were injected in oocytes (1:1 ratio). Injected oocytes were incubated in sterile medium composed of SOS supplemented with gentamycin (50 µg/ml), penicillin (100 U/ml), streptomycin 176 (100 µg/ml) and sodium pyruvate (2.5 mM) at 18°C for 2 to 10 days before recordings. 177

178

#### 179 Ethics Statement

180 This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care 181 and Use of Laboratory Animals of the European Community. The protocol was approved by the 182 « Direction Départementale des services Vétérinaire du Maine et Loire » (N°B49071) and by the 183 "Comité d'éthique en expérimentation des Pays de la Loire» (N°CEEA.2012.68).

184

## 185 Electrophysiological recordings and analysis

186 Na⁺ currents were recorded using the two electrode voltage-clamp (TEVC) technique. Oocytes were

187 tested using 1 M-KCl/2 M-Kacetate-filled borosilicate glass electrodes connected to a TEVC amplifier

188 (TEV-200, Dagan Corporation, Minneapolis, Minessota, USA). Digidata 1440A interface (Axon CNS

189 Molecular Devices, California, USA) and pCLAMP 10 software (Axon CNS Molecular Devices) were used for acquisition (sampling rate: 10 or 100 kHz; band pass-filter: 5 kHz) and stimulation protocols. 190 191 All experiments are performed at room temperature (18-21°C) in SOS. Capacitive transient and leak 192 currents were corrected using P/N (N=6) subtractions. For activation experiments, families of Na⁺ current traces were generated by step depolarisations to test potentials from -70 to +40 mV (10 mV 193 increment) from a holding potential of -100 mV. Na⁺ channel conductance (G) was calculated using 194 the following equation  $G = I/(V-V_{rev})$  where I is the current amplitude, V is the test potential and  $V_{rev}$ 195 196 is the reverse potential (Barela et al., 2006). The reverse potential was determined from I/V curve fitted using Stühmer's equation:  $I=G^{(1-(1/(1+\exp((V-V_{1/2})/K))))}(V-V_{rev})$  (Barela et al., 2006). 197 198 Conductance values (G) were normalized to the maximum conductance and plotted against the test voltage. The resulting curves were fitted with the following Boltzmann's equation  $G=1/(1+exp((V_{1/2} -$ 199 V)/k)) where  $V_{1/2}$  is the potential at which half of the Na_v channels are activated and k is the slope 200 201 factor (Lavialle-Defaix et al., 2006). To determine the voltage dependence of steady state fast 202 inactivation, families of Na⁺ current traces were generated by a two-pulse protocol beginning with a 203 step of potential ranging from -80 mV to +40 mV (5 mV increment) for 200 ms. A second 12 ms test 204 pulse was applied to -5 mV, a potential at which the current amplitude was maximal. Each set of 205 double pulses was separated by 10 s. For determination of the voltage dependence of steady-state slow 206 inactivation, a two-pulse protocol was used, starting with a first step of potential ranging from -90 mV 207 to +20 mV (10 mV increment) for 60 s, followed by a 100 ms interval at the holding potential. A 208 second pulse to -5 mV for 10 ms allowed measuring the available current. For both fast and slow 209 inactivation, the peak current recorded during the second pulse was normalized to the maximum current peak and the data were fitted with Boltzmann's equation  $I/Imax = 1/(1 + (exp((V - V_{1/2})/k))))$ 210 where  $V_{1/2}$  is the potential at which half of the Na_v channels are inactivated and k is the slope factor 211 212 (Barela et al., 2006). For recovery from inactivation experiments, Na⁺ currents were generated by a 213 two-pulse protocol beginning with a first pulse to -5 mV for 50 ms followed by a second pulse to -5 214 mV for 14.5 ms. The duration between the two pulses was increased by 1 ms every set of double pulses and each set was separated by 10 s. Fractional recovery was calculated by dividing the 215 216 maximum current amplitude the second test pulse by the maximum current amplitude of the corresponding first pulse. The recovery data were fit with the following exponential equation:  $I = I_0 + (Imax-I_0)*(1 - exp(-k*(t-t_0)))$  where *k* is the rate constant and t is the time (GraphPad Software; equation name: plateau followed by one phase association equation).

220

221 DCJW and lidocaine sensitivity assays

222 Oocytes were perfused with 2  $\mu$ M DCJW (DPX-JT333, according to a Material Transfer Agreement 223 between Angers University and DuPont Crop Protection, Newark, USA) for 45 min. Before DCJW 224 was perfused, several stable recordings were performed. Oocytes were perfused with 2 mM lidocaine 225 (Sigma-Aldrich) for 10 min and Na⁺ channel blockade was measured at -5 mV. Then the ratio of peak 226 Na⁺ current after lidocaine perfusion was measured and compared to the control peak. Protocols 227 described above for activation, slow and fast steady-state inactivation and recovery from fast 228 inactivation were also performed after drug application.

229

# 230 Protein expression analysis using confocal laser scanning microscopy

For confocal microscopy experiments, albinos Xenopus oocytes were used. To detect auxiliary 231 subunits, a histidine tag (RGHHHHHH) was introduced by PCR at the 5' end of PaTEH1A and 232 PaTEH1B constructs. Five days after injection with water or with 3 ng RNA encoding DmNa_v1.1 and 233 234 PaTEH1A or PaTEH1B, oocytes were fixed in phosphate buffered saline (PBS) containing 2% paraformaldehyde for 30 min at 4°C. Fixed oocytes were washed in PBS and blocked in PBS-Triton 235 (PBS-T) 0.2% fish gelatine for 1 h at RT. Then, oocytes were incubated 10 h at 4°C with mouse RGS-236 237 His antibody (dilution 1:500; Qiagen) and rabbit Anti-Pan Na_v (SP19) antibody (1:100; Euromedex, France). Oocytes were washed three times in PBS-T 0.2% for 5 min and were next incubated 90 min 238 with Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 546 antibody and Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488 239 240 (dilution 1:3000, Invitrogen, USA) and washed three times in PBS. Oocytes were placed in dishes 241 (ibidi, Martinsried, Germany) in PBS/glycerol 5:1 solution and imaged through the x10/0.3 numerical

aperture objective of a Nikon (Nikon Instruments, Melville, NY) A1S1 confocal laser scanning 242 243 microscope equipped with argon-ion (488 nm) and diode (561 nm) lasers. Alexa Fluor® 488 was 244 excited at 488 nm and the fluorescence emission was collected using a 500-550 nm filter; Alexa 245 Fluor® 546 was excited at 561 nm and the fluorescence emission was collected using a 570- 600 nm 246 filter. ImajeJ software (version 1.4.3.67) was used to measure relative fluorescence. To quantify relative fluorescence intensity for each tested oocyte, an identical area of 5002.2  $\mu m^2$  was delimited 247 and the total number of pixels corresponding to AlexaFluor® 488 or AlexaFluor® 546 in this area was 248 249 determined. No fluorescence was measured for controls in which primary antibodies were omitted. Control of immunostaining specificity was performed using the same procedure in separate 250 experiments: first with rabbit Anti-Pan Na_v (SP19) and secondary Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 251 546 antibodies, and second with mouse RGS-His and secondary Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 252 488 antibodies. 253

254

## 255 Statistical analysis

Statistical analysis of all data was performed using GraphPad Prism software (version 5). All data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significance tests between groups of data were performed using a variance analysis (one-way ANOVA) followed by a Tukey post hoc test for comparison of all groups, or the unpaired Student's *t*-test. *p* values are specified. Statistical probabilities are expressed as * p<0.05, ** p<0.01 and *** p< 0.001.

#### 262 **Results**

263

# 264 Analysis of cDNA clones unmasks possible intron retention in PaTEH1 transcript

Since the genome sequence of Periplaneta americana is not available in databases, a 265 conventional RT-PCR strategy was performed to clone the cDNAs encoding the homolog of 266 DmTEH1 in the nerve chord of P. americana. Briefly, using degenerated primers P-S1 and P-267 268 R1 (Table 1) designed from conserved amino acid regions deduced from an alignment of TEH1 subunits of Drosophila melanogaster (Genbank accession number NP 649959), 269 Anopheles gambiae (accession number XP_310354), Apis mellifera (accession number 270 271 XP_001120804), Nasonia vitripennis (accession number XP_001606835) and Tribolium castaneum (number XP_969821), a 561 bp cDNA fragment was amplified. Blast analysis 272 indicated that the deduced amino acid sequence of this cDNA shares 51% of sequence 273 274 identity with the extracellular loop of DmTEH1 and it was thus identified as TEH1-like protein of *P. americana* (PaTEH1). This partial *PaTEH1* cDNA allowed us to design specific 275 primers for 5' and 3' RACE experiments. By 5' RACE experiment, we obtained a cDNA 276 fragment of 986 bp containing 432 bp of the ORF and 554 pb of the 5' untranslated region 277 278 (5'UTR). 3'RACE amplification led to the identification of two cDNA fragments of 618 bp 279 and 712 bp. The sequence of the long fragment differed from that of the short one only by 94 bp insertion 37 bp upstream the stop codon of the short fragment. This indicated the presence 280 of two transcripts with distinct ORF 3'ends. The 618 bp fragment contained the last 197 bp of 281 the first ORF; followed by a 421 bp 3'UTR, and the 712 bp fragment contained the last 194 282 bp of the second ORF, followed by 518 bp 3'UTR. Both 3'UTR sequences exhibited polyA 283 tail without the consensus 'AATAAA' polyadenylation site. Finally, using a primer pair 284 encompassing the ORF, we amplified two different cDNAs. Ten clones contained an ORF of 285

843 bp encoding a 280 amino acids protein, named PaTEH1A (accession number KC206367). 286 Six other clones displayed a longer insert (937 bp), containing an ORF of 840 bp encoding a 287 279 amino acids protein, named PaTEH1B (accession number KC206368). The nucleotide 288 289 sequence of PaTEH1B clones corresponded to PaTEH1A but with an insertion of 94 bp after the position 807. This 94 bp insert in *PaTEH1B* sequence contained a novel stop codon and 290 modified the coding sequence of the 3'end, leading to a deduced amino acid protein, 291 PaTEH1B that diverged from PaTEH1A sequence only by the last 11 residues of their C-292 termini (Figure 1A). These data indicated that *PaTEH1A* and *PaTEH1B* likely result from an 293 alternative splicing mechanism of a single gene. 294

295 Hydrophobicity analysis (Kyte and Doolittle, 1982) of amino acid sequences of PaTEH1A and PaTEH1B (Figure 1B) revealed two hydrophobic domains (from positions 40 to 67 and 225 to 243) 296 that aligned with the putative transmembrane domain of DmTEH1. Both hydrophobic profiles were 297 298 overlapped up to the amino acid residue 269. The three PaTEH1 variants contained four putative N-299 glycosylation sites (Asn residues at positions 98, 135, 161 and 205) common with DmTEH1 (Asn residues at positions 101, 129, 142 and 191) (Figure 1A). Twenty putative O-glycosylation sites (Thr 300 301 residues at positions 137, 139, 141, 145, 147 to 155 and 163 and Ser residues at positions 138, 140, 302 142, 144, 146 and 157) were detected in the region between the two membrane-spanning domains of 303 PaTEH1 variants (Figure 1A).

To determine whether *PaTEH1A* and *PaTEH1B* were the result of an alternative splicing 304 305 event, a PCR was carried out using genomic DNA of P. americana and primers encompassing the 306 ORF of PaTEH1A. A single 900 bp PCR fragment was cloned and its sequence totally matched with the sequence of *PaTEH1B* cDNA. A 94 bp insert, which was not present in *PaTEH1A*, found in this 307 partial Pateh1 gene sequence was delimited by donor and acceptor splice sites (Figure 2A). While the 308 309 5' splice site sequence conformed to the consensus sequence that is known to promote splicing, the 3' 310 splice site sequence (tttttgtgctgtg) did not (Cartegni et al., 2002). This 3' splice site was considered as weak since it contained three unusual "G" (at positions -8, -6 and -3) and it ended with "TG" instead 311 of the highly conserved dinucleotide "AG" (Figure 2A). The unusual TG splice acceptor was reported 312

in both insect and mammalian genes (Bourinet et al., 1999, Szafranski et al., 2007). The additional
94 bp sequence found in *Pateh1* gene also showed a consensus branch site (TAGCGAC) close to the
end of the putative intron. In conclusion, assuming that only one copy of *teh1* gene is present in *P*. *americana* genome, the 94 bp insert most likely corresponds to an intron that is unspliced in *PaTEH1B*(Figure 2B). Altogether, these observations demonstrate that the variant *PaTEH1B* results from an
intron retention mechanism.

319

## 320 Tissue distribution of PaTEH1 transcripts

Semi-quantitative RT-PCRs using P-S3 and P-R3 primers encompassing the ORF were performed to 321 322 determine the expression pattern of *PaTEH1* transcripts, in six different tissues. First, amplification of 323 PaTEH1 cDNAs were detected in head, thoracic ganglia and nerve cord (Figure 3), indicating that 324 PaTEH1 variants were exclusively expressed in neuronal tissues. The agarose gel showed two bands with different intensity. The lower band matched perfectly with *PaTEH1A* (expected size: 843 bp) and 325 326 the upper band exactly corresponded to PaTEH1B (expected size: 936 bp). PaTEH1A transcripts appeared to be less abundant in head than *PaTEH1B*. By contrast, *PaTEH1A* transcripts were 327 expressed at higher levels than *PaTEH1B* both in thoracic ganglia and in nerve cord. 328

# 329 Na⁺ current densities are modulated by PaTEH1 variants in *Xenopus* oocytes

We first characterized the Na⁺ currents elicited by the expression of  $DmNa_v1-1$  (Olson et al., 2008), 330 alone or in combination with DmTEH1, PaTEH1A and PaTEH1B in Xenopus oocytes (Figure 4). No 331 332 current was measurable in oocytes injected with DmTEH1, PaTEH1A and PaTEH1B alone as control 333 (data not shown). We observed that the required amounts of RNA (1.8 to 35 ng) to record Na⁺ currents 334 with appropriate amplitudes (with maximum peak comprised between 0.25 and 2 µA) varied in each case. Unfortunately, we were unable to compare these effects with the co-expression of the Na_v  $\alpha$ -335 336 subunit of P. americana (Moignot et al., 2009) and DmTEH1, DmTipE, PaTEH1A or PaTEH1B, because Na⁺ currents were not detectable even after prolonged incubation time (Figure S1). As 337 338 illustrated in Figure 4A, 35 ng of DmNa_v1-1 RNA were injected in oocytes to obtain a maximum peak

339 of  $\sim 0.25 \,\mu A$  after ten days without any auxiliary subunits. On the other hand, when co-injected with 340 DmTEH1, 4.2-fold fewer DmNa_v1-1 RNAs were needed to yield 0.4 µA maximum current after 3-341 days incubation, indicating a chaperone-like effect that had been previously reported (Derst et al., 342 2006). Interestingly, this effect was significantly stronger with PaTEH1A (1.2 µA, 3-days incubation) and PaTEH1B (0.6 µA, 4-days incubation), even for lower amounts of injected RNAs (1.8 and 2.8 ng, 343 respectively). For an accurate comparison of the chaperone-like effect of these different  $\beta$ -subunits, 344 the current densities of Na⁺ currents were measured as a ratio of maximum current density and RNA 345 346 amount after 3 days of injection (Figure 4B). In comparison to DmTEH1, PaTEH1A had the strongest chaperone-like effect (6.3-fold, p<0.001), followed by PaTEH1B (2.8-fold, p<0.001). We also 347 observed a decrease in the proportion of oocytes expressing detectable currents with PaTEH1B 348 (~50%) compared with PaTEH1A (~90%). PaTEH1A appeared to be more efficient (2.2-fold, 349 350 p<0.001) than PaTEH1B to increase Na⁺ current densities. Since both differed in sequence only by their last 11 amino acids residues, the unique modification by PaTEH1B was the result of the novel C-351 352 terminal extremity generated by the intron retention mechanism. A truncated form of PaTEH1s lacking the 11 last amino-acid residues (PaTEH1 $\Delta$ (270-280)) modulated Na⁺ current densities 353 354 similarly to PaTEH1A (Figure 4B). The high sequence identity shared by DmNa_v1 with PaNa_v1 (81%) and with the Na_v channel of the German cockroach *Blatella germanica*, BgNa_v1 (77%) (Moignot et 355 al., 2009) led us to postulate that the consequence of the interaction between  $\alpha$ -subunit and auxiliary 356 subunit would be conserved in insects. To confirm this assumption, we co-expressed the variant 357 BgNav1-1a, containing a similar exon organization as DmNav1-1 with PaTEH1A or PaTEH1B 358 (Figures S2). The resulting Na⁺ current densities were roughly twice-fold higher in oocytes expressing 359 BgNa_v1-1a/PaTEH1A than BgNa_v1-1a/PaTEH1B, arguing that the C-terminal end of PaTEH1B 360 modulated Drosophila and cockroach Nav channel expression to a similar extent. Altogether, our data 361 indicate that the last 11 amino-acid residues of PaTEH1A are not involved in the chaperone-like 362 363 effects and the presence of the unique C-terminal sequence in PaTEH1B encoded by the retained 364 intron interferes with the chaperone-like properties.

In order to assess whether the enhancement of Na⁺ current densities reflect an increase of 365 DmNav1-1 accumulation in Xenopus oocytes membrane, we designed two Histag-PaTEH1A and 366 367 PaTEH1B constructs for double immunostaining. We ensured that the addition of the N-terminal His-368 tag to PaTEH1A and PaTEH1B did not modify the electrophysiological properties of Na⁺ currents elicited by co-expression with DmNa_v1-1, even their chaperone-like effects (data not shown). Figure 369 5A and 5B show immunofluorescent confocal images recorded for oocyte injected with water 370 (negative control) and with DmNav1.1 together with PaTEH1A or PaTEH1B RNAs. The data show a 371 372 significant increase (1.8 fold, p<0.01, Figure 5C) in the membrane relative fluorescence intensity (Alexa®488 for DmNav1-1) in oocytes expressing DmNav1-1/PaTEH1A compared with oocytes 373 374 expressing DmNa_v1-1/PaTEH1B. This indicated that PaTEH1A induced a stronger expression of the DmNa_v1-1 channels in oocytes membrane than PaTEH1B. Unexpectedly, we also observed a higher 375 376 level of membrane relative fluorescence intensity (Alexa®546 for PaTEH1A or PaTEH1B) in oocytes injected with DmNav1-1/PaTEH1B than with DmNav1-1/PaTEH1A RNAs (2.2 fold, p<0.001, 377 Figure 5C). These findings demonstrated that the C-terminal extremity encoded by the intronic 378 sequence of PaTEH1B was responsible for the decrease in the density of DmNa_v1-1 channels, 379 suggesting that the intron retention mechanism is likely involved in the regulation of Na⁺ channels 380 expression in neurons of *P. americana*. 381

382

Biophysical properties of Na⁺ currents are modified by TEH1 variants in *Xenopus*oocytes

Activation and inactivation properties of the  $DmNa_v1-1$  channel co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B or PaTEH1 $\Delta$ (270-280) were reported in Table 2. The expression of  $DmNa_v1-1$ alone led to very small current amplitude either with injection of large amount of RNA (up to 35 ng) and long incubation time (up to 10 days). Thus, we could not accurately assay Na⁺ currents elicited by DmNa_v1-1 expression alone. Figure 6A shows the voltage-dependence of activation of DmNa_v1-1 with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B or PaTEH1 $\Delta$ (270-280). We observed a significant negative

391 shift in the voltage-dependence of activation by PaTEH1A compared with DmTEH1 (8.1 mV, 392 p<0.001) and PaTEH1B (5.1 mV, p<0.05) (Table 2). In contrast, the voltage-dependence of activation 393 regulated by PaTEH1B was not significantly different from that of DmTEH1. The voltage-394 dependences of activation of Na⁺ currents were positively shifted to the same extent by PaTEH1B (3.6 mV, p<0.01) when co-expressed with BgNav1-1a in comparison with PaTEH1A (Figure S3A, 395 Table S1). Interestingly, the voltage-dependence of activation of  $DmNa_v1-1$  with PaTEH1 $\Delta$ (270-280) 396 was similar to that of DmNa_v1-1/PaTEH1A. This indicated that the 11-amino-acid C-terminal end of 397 398 PaTEH1B modulated activation properties of Na⁺ currents, but not that of PaTEH1A.

399 Figure 6B and 6C show the voltage-dependences of steady-state fast and slow inactivation. 400 The voltage-dependences of fast inactivation of Na⁺ currents are not significantly different between 401 DmNa_v1-1/DmTEH1 and DmNa_v1-1/PaTEH1B, and between DmNa_v1-1/PaTEH1A and DmNa_v1-402  $1/PaTEH1\Delta(270-280)$  (Table 2). Compared with PaTEH1B, both PaTEH1A and PaTEH1 $\Delta(270-280)$ 403 caused a small but significant negative shifts in the voltage-dependences of fast inactivation (2.8 mV 404 and 2.9 mV for PaTEH1A and PaTEH1 $\Delta$ (270-280), respectively, p<0.01). By contrast, no significant 405 difference in the voltage-dependences of fast inactivation was found between BgNav1-1a/PaTEH1A 406 and BgNa_v1-1a/PaTEH1B (Figure S3B, Table S1). Also, the voltage-dependence of slow inactivation 407 between Na⁺ currents obtained with DmTEH1, PaTEH1B, or PaTEH1 $\Delta$ (270-280) was not modified. 408 Interestingly, PaTEH1A shifted the voltage-dependence of slow inactivation to a more negative 409 potential, compared to DmTEH1 (-6.8 mV, p<0.05), PaTEH1B (-6.1 mV, no significant) and 410 PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (-5.0 mV, p<0.05) (Table 2). For all combinations, the rate of recovery as illustrated in Figure 6D, showed no significant difference (One-way ANOVA: F_(3,60)=2.104, p=0.1098, 411 412 post hoc Tukey test) between the different TEH1s.

413

414 Blocking effects by Na_v channel inhibitors depend on TEH1 subtypes

415 We next examined the involvement of the C-terminal end of TEH1 on the pharmacological properties 416 of  $DmNa_v1-1$  channels. First, we measured the inhibition of  $Na^+$  currents by the LA, lidocaine (2 mM) 417 (Figure 7A and 7B). Interestingly, lidocaine caused a significant (p<0.01) greater inhibition of Na⁺ currents with PaTEH1B (44.8  $\pm$  3.62%) than with PaTEH1A (28.4  $\pm$  2.97%). No significant difference 418 419 was observed between DmTEH1 (34.8 ± 2.58%) and PaTEH1A. We also found no significant difference between PaTEH1B and PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (36.6 ± 2.9%). These data indicated that the 420 particular C-terminal end of PaTEH1A (VALLDWEEDRT) played a role in the decrease of the Na⁺ 421 current sensitivity to lidocaine. To understand these differences, we analysed the effect of lidocaine on 422 423 Na⁺ channel gating properties (Figure 8A-D). Lidocaine significantly shifted the voltage-dependence 424 of activation towards depolarizing potentials in each case (Figure 8A and Table 2) by 9.3 mV 425 (PaTEH1A, p=0.0036), 10.5 mV (PaTEH1B, p=0.0005), 5.7 mV (DmTEH1, p=0.0466) and 14.7 mV 426 (PaTEH1 $\Delta$ (270-280), p=0.008) compared to the control (Table 2). Lidocaine also induced a shift of 427 the voltage-dependence of fast inactivation towards hyperpolarizing potentials: -3.4 mV for PaTEH1A 428 (p=0.0340), -4.3 mV for PaTEH1B (p=0.0009), -3.0 mV for DmTEH1 (p=0.0280) and -3.3 mV for 429 PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (p=0.0396) compared to the control. Similarly, lidocaine induces a shift in the 430 voltage-dependence of slow inactivation towards hyperpolarizing potentials: -15 mV for PaTEH1A (p=0.0121), -9.7 mV for PaTEH1B (p=0.0426), -14.2 mV for DmTEH1 (p=0.0069) and -16.5 mV for 431 PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (p=0.0101). Lidocaine significantly increased the time constant of recovery from 432 inactivation by 1.2 ms (PaTEH1A, p=0.0006), 1.4 ms (PaTEH1B, p<0.0001), 0.8 ms (DmTEH1, 433 434 p=0.0338) and 1.1 ms (PaTEH1 $\Delta$ (270-280), p=0.0115) compared to control. Lidocaine slowed down the recovery of all tested Na⁺ channels combinations to the same extent (One-way ANOVA: 435  $F_{(3,20)}=1.178$ , p=0.35, post hoc Tukey test). In addition, in the presence of lidocaine, Na⁺ currents 436 recovered partially, meaning a partial block of Na⁺ channels in the inactivation state (Figure 9A). The 437 recovery of lidocaine-blocked Na⁺ currents was significantly lower (p<0.01) with PaTEH1A 438 439  $(87.08 \pm 2.65\%)$ , than with DmTEH1  $(76.20 \pm 1.85\%)$ , PaTEH1B  $(79.21 \pm 1.54\%)$  and 440 (PaTEH1∆(270-280) (75.71 ± 1.29%) (Figure 9B).

We also assessed the sensitivity of DmNav1-1 co-expressed with the four TEH1 subtypes to DCJW, the active metabolite of indoxacarb which is a Na⁺ channel-targeting insecticide (Wing et al., 2000, Lapied et al., 2001). The Na⁺ currents obtained with DmTEH1 were found more sensitive (39.4 444 ± 3.6% inhibition) to DCJW (2 μM), than those obtained with PaTEH1A (25.1 ± 2.1%, p<0.05) and 445 with the truncated form, PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (8.3 ± 1.9%, p<0.001) (Figure 7C and 7D). By contrast, 446 no significant difference of sensitivities to DCJW was observed between DmTEH1 and PaTEH1B 447 (31.4 ± 7.1%). Thus, our findings indicate that the truncation of 11 amino acid residues at the C-448 terminal end of TEH1 β-subunits strongly decreased the sensitivity of Na⁺ channels to DCJW.

449 We also analyzed the effects of DCJW (2  $\mu$ M) on the gating properties of DmNa_v1-1 channels. DCJW shifted the voltage-dependence of activation towards depolarized potentials by 8.7 mV 450 (p=0.0036; Figure 8A, Table 2) only for  $DmNa_v1-1$  co-expressed with PaTEH1B. It appeared that 451 452 DCJW slightly shifted the voltage-dependences of both fast and slow inactivation of Na⁺ currents towards more negative potentials (Figure 8B and 8C). A small negative shift by -3.8 mV and -3.9 mV 453 (p=0.0034 and p=0.0060) of the voltage-dependence of fast inactivation was observed with PaTEH1A 454 455 and PaTEH1B, respectively (Table 2). Surprisingly, we observed that DCJW caused a relative large 456 shift of the slow inactivation towards hyperpolarized potentials by -11.5 mV (p=0.0470), concerning Na⁺ currents obtained with PaTEH1B. DCJW significantly increases the time constant of recovery 457 458 from fast inactivation by 0.7 ms (DmTEH1, p<0.05) and by 1.1 ms (PaTEH1B, p<0.001) compared to 459 control, but not for PaTEH1A and PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (Figure 8D, Table 3). However, these effects 460 are similar for DmTEH1 and PaTEH1B (p=0.864, unpaired t test).

461 In conclusion, lidocaine caused similar modifications on activation, fast and slow inactivation 462 properties of Na⁺ currents regardless which TEH1 variant is co-expressed. Concerning DCJW, the 463 mode of action of inhibition and its effects on gating properties varied depending on the type of TEH1 variants co-expressed. Like lidocaine, DCJW also slowed the recovery rate from fast inactivation of 464  $Na^+$  channels, except for PaTEH1 $\Delta$ (270-280). Remarkably, lidocaine impaired the total recovery of 465 466 Na⁺ channels after inactivating pulse, while DCJW did not (Figure 9C). However, DCJW had little effects on the voltage-dependences of activation, fast and slow inactivation. Interestingly, the C-467 terminal end of PaTEH1 modulated the action of DCJW by affecting the voltage-dependence of 468 activation and the recovery from fast inactivation. Altogether, our findings reveal the involvement of 469 470 TEH1 variants in modulating the blocking action of lidocaine and DCJW on insect Na_v channels.

#### 472 **Discussion**

473

This study reports for the first time the consequences of an intron retention mechanism of 474 ancillary subunits of insect neuronal Na_v channels on regulation of channel expression, gating and 475 476 sensitivity to sodium channel inhibitors. We found that two TEH1-like variants, PaTEH1A and 477 PaTEH1B, were exclusively and differentially expressed in the nervous system of *P. americana*. While PaTEH1A is a spliced form, PaTEH1B result from an intron retention mechanism converting an 478 479 undecapeptide to a novel decapeptide at the C-terminal end of the protein. This causes a decrease in the Na⁺ current density and also modifies both gating properties of Na⁺ channels. In addition, our 480 481 findings pointed out marked differences in the blocking mechanism induced by lidocaine and DCJW. Sensitivities of Na⁺ channels to LAs and PTIs appear to be modulated by TEH1-like variants. Thus, 482 the intron retention process of *teh1-like* genes constitutes a novel mechanism that contributes to the 483 484 functional and pharmacological diversity of Na_v channels in insects.

485

#### 486 Neuronal distribution of TEH1-like subunits

The tissue distribution of PaTEH1 variants matches with that of PaNav1 which has been detected in 487 various tissues with different expression level (Moignot et al., 2009). However, as reported for 488 489 DmTEH1 (Derst et al., 2006), PaTEH1 is exclusively expressed in neuronal tissues, indicating that 490 these two homologous subunits are involved in the regulation of neuronal Na_v channels. Because D. *melanogaster* and *P. americana* are phylogenetically distant in high diverse order, we can reasonably 491 predict that TEH1 homologs of other insect species are also exclusively expressed in neuronal tissue 492 493 and may constitute a subfamily of auxiliary subunits involved in modulation of the neuronal  $Na_{y}$ 494 channels.

495

496 Potential conservation of an intron retention event in  $Na_v$  channel auxiliary subunits of 497 insects and mammals 498 We showed that Pateh1 gene displays two exons, exon 1 and exon 2, separated by a short intron sequence, intron 1. Exon 2 is short and encodes the last 11 amino-acid residues of C-terminal 499 500 end of PaTEH1A variant. The retention of intron 1 results in a short coding sequence with an early 501 stop codon in PaTEH1B, leading to a novel C-terminal end. To determine whether a similar intron 502 retention splicing mechanism targeting the C-terminal end of TEH1 occurs in other insect species, we examined available genomic sequences in the GenBank database. teh1 gene of D. melanogaster 503 504 contains an intron of variable length that disrupts the end of the coding sequence (accession number 505 Dmel_CG12806). Bioinformatic analysis of the genome of N. vitripennis (accession number 506 NC_015869) led us to the same conclusion. Two transcript variants have been annotated and they only 507 differ by the end of their 3' coding sequence (accession number XM 003425719, transcript variant 1 508 and XM_003425720, transcript variant 2), resulting from the presence of the first 72 bp of the intron 1 509 of the gene (accession number LOC100123225), and leading to a different 24-amino-acid C-terminal 510 end. Since only one copy of teh1-like gene has been found in N. vitripennis genome, TEH1-like variants 1 and 2 reported in the GenBank may result from a retention intron mechanism. Blast analysis 511 also revealed the existence of two tehl bicistronic genes in the genome of the mosquito, Culex 512 513 quinquefasciatus (accession numbers CpipJ_CPIJ006103 and CpipJ_CPIJ006104). Both genes differ by the length of exon 2 (13 bp and 85 bp). Accordingly, the deduced amino acid sequences of both 514 515 transcripts (accession numbers XM 001847934 and XM 001847935) differ in their length and C-516 terminal end. Concerning D. melanogaster and Anopheles gambiae, only one gene and one transcript 517 have been described (accession numbers Dmel CG12806 and AgaP AGAP003797). Nevertheless, the 518 presence of a short coding sequence with an early stop codon in the intron sequences of both genes 519 predicts the possibility of a conserved intron retention process in these insects. Therefore, we suggest 520 that intron retention mechanism might be a common mechanism enabled to generate molecular 521 variability of TEH1-like proteins.

522 Splicing mechanism by intron retention is relatively rare, occurring at less than 5% in both 523 vertebrates and invertebrates (Kim et al., 2008, Khodor et al., 2011). Two intron retention events have 524 been documented in the transcription of mammalian SCN1B genes. The first concerns the retention of 525 intron 5 of rat SCN1B and does not change the coding sequence (Dib-Hajj and Waxman, 1995). The second mechanism involves the retention of intron 3, as reported in both rat and human SCN1B genes (Kazen-Gillespie et al., 2000, Qin et al., 2003). In this case, like PaTEH1, the intron retention event generates two proteins with distinct C-terminal ends, linked to Na⁺ currents with distinct properties. These findings demonstrate that the functional regulation of Na_v channel through alternative splicing of auxiliary subunit genes is a conserved process in mammals and insects.

531 Consequences of intron retention mechanism on Na_v channel biophysical properties

532 The unspliced variant PaTEH1B caused a 2.2-fold current density decrease, concomitant with an equivalent α-subunit incorporation increase in the plasma membrane, compared to PaTEH1A. The 533 cytoplasmic C-terminal end of TEH1-like subunits is unlikely involved in the enhanced expression of 534 535  $Na_v$  channels, as evidenced by similar  $Na^+$  current densities with co-expression of PaTEH1A or the C-536 terminal truncated construction. On the other hand, the novel C-terminal end of PaTEH1B generated by the intron retention process leads to a decrease in Na⁺ current density. This likely results from a 537 decrease i) in the number of oocyte expressing detectable currents and ii) in  $\alpha$ -subunit accumulation in 538 oocyte membranes even though the membrane expression level of PaTEH1B is higher than PaTEH1A. 539 540 We suggest that the accumulation of PaTEH1B in the membrane is toxic for oocytes. We also cannot rule out that the novel C-terminal end of PaTEH1B interacts with other membrane proteins during its 541 542 trafficking and thereby decreasing PaTEH1B availability for addressing DmNa_v1-1  $\alpha$ -subunit to the 543 membrane.

544 Here, we showed that the activation and inactivation properties of DmNa_v1-1 depend on the associated auxiliary subunits. In the presence of DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B or a truncated 545 PaTEH1, lacking the last 11-amino-acid residues, Na⁺ currents exhibit small differences in its voltage-546 dependences of fast inactivation. This indicates that the C-terminal region of these proteins is not 547 involved in the modulation of fast inactivation. However, while  $V_{1/2}$  of slow inactivation is similar 548 with DmTEH1, PaTEH1B and truncated PaTEH1, PaTEH1A shifts the voltage-dependence of slow 549 inactivation in the hyperpolarized direction. Collectively, we assume that the C-terminal extremity of 550 551 PaTEH1A (VALLDWEEDRT) modulates only slow inactivation properties, while the one of PaTEH1B (YVPLSVHDTR) does not. Concerning the modulation of channel activation properties, 552 with PaTEH1A and truncated PaTEH1, the voltage-dependences of channel activation are not 553

554 changed, while with PaTEH1B, channel voltage-dependence of activation is shifted to depolarized direction. Thus, the C-terminal extremity of PaTEH1B is implied in the modulation of channel 555 activation. Interestingly, the change of the C-terminal end in rat B1A also leads to a shift of the 556 voltage-dependences of activation and inactivation to more depolarized direction (Kazen-Gillespie et 557 558 al., 2000). Collectively, the intron retention mechanism appears to be a novel mechanism that could 559 regulate neuronal excitability by finely modulating expression level, activation and slow inactivation 560 of Na_v channels in cockroaches. TEH1 and TEH1-like variants shift the voltage-dependences of both 561 activation and inactivation of  $Na^+$  currents to more negative potentials when compared with TipE 562 (Olson et al., 2008). Moreover, kinetics of activation and inactivation of Na⁺ currents are accelerated 563 with TEH1 (data not shown). Since all studies attempting to characterize  $Na_v$  channel variants of D. melanogaster and B. germanica properties were carried out using TipE, we predict that the other 564 565 subunits may dramatically change the kinetic and gating properties of these variants. The similar consequences of the C-terminal end conversion of TEH1 observed with Na_v channels from D. 566 567 melanogaster and B. germanica strongly suggest that the modulation of Na⁺ currents by TEH1 568 splicing does not depend on the  $\alpha$ -subunit origin. This argues for a highly conserved function of the auxiliary subunit in insect. 569

570 Consequences of intron retention mechanism on  $Na_v$  channel pharmacological 571 properties

572 Tonic block by lidocaine is caused by binding to the resting state of  $Na_{y}$  channels with lower affinity (Hille, 1977, Bean et al., 1983). Here, we show that lidocaine binds to *Drosophila* resting  $Na_y$ 573 channels and induced a marked depolarizing shift of the voltage-dependence of activation, indicating a 574 strong voltage-dependence of lidocaine-block as described previously (Bean et al., 1983). This effect 575 can be explained by its interaction with S4 segments of domains III and IV (Sheets and Hanck, 2003). 576 Positive shift of  $V_{1/2}$  of activation by lidocaine has already been reported for mammalian Na_v1.5 and 577 578 Nav1.8, but not for Nav1.7 (Chevrier et al., 2004, Fan et al., 2010). Besides, phasic block by lidocaine 579 is explained by preferential binding to inactivated state of Na_v channels (Bean et al., 1983). According to this statement, our findings show that lidocaine causes a leftward shift of voltage-dependences of 580

581 both fast and slow inactivation. These are also in good agreement with previous studies showing that the mechanism of lidocaine inhibition operates by stabilizing both fast- or slow-inactivated state 582 583 (Balser et al., 1996, Chen et al., 2000). This was reinforced by slower recovery rate of fast inactivation 584 of lidocaine-block DmNa_v1-1 channels. Unexpectedly, our data show that DmNa_v1-1 channels do not totally recover under lidocaine block from fast inactivation in steady-state conditions. The impairment 585 of recovery of Na⁺ channels after inactivating pulse has not been yet reported. This indicates that a 586 587 part of lidocaine-DmNa_v1-1 remains in inactivated state. More interestingly, our data also report that  $Na_v$  channels are not equally sensitive to lidocaine depending on TEH1 homologs co-expressed with 588 589 the same  $\alpha$ -subunit. The lower sensitivity of DmNa_v1-1 towards lidocaine is observed with PaTEH1A, 590 for which a lower part of DmNa_v1-1 is blocked in inactivated state by lidocaine compared to the other 591 auxiliary subunits. The idea that  $\alpha/\beta$ -subunits interaction crucially determines the pharmacology of 592 insect Na_v channels is a coherent assumption as reported for lidocaine effects on mammalian Na_v channels (Makielski et al., 1996, Makielski et al., 1999, Lenkowski et al., 2003). Thus, our findings 593 594 show that the mechanism of lidocaine channel blockade appears to be similar for both insect and mammalian Na_v channels and extend a recently published study (Song et al., 2011). 595

596 DCJW has no effect on the voltage-dependence of activation of Na⁺ currents elicited by DmNa_v1-1/DmTEH1 or DmNa_v1-1/PaTEH1A co-expressions in Xenopus oocytes. This is in 597 agreement with previous reports carried out both in transfected Xenopus oocytes with German 598 cockroach Nav channel (Silver et al., 2009) and in native DUM neurons of *P. americana* (Lapied et al., 599 600 2001, Zhao et al., 2005). Surprisingly, in the presence of PaTEH1B variant, we show that DCJW 601 modifies Na⁺ current activation. Thus, we assume that the modification of activation by DCJW 602 depends on the combination of  $\alpha$ -subunit/auxiliary subunits. We also show that DCJW does not affect the voltage-dependence of fast inactivation as already reported (Song et al., 2006, Silver et al., 2009). 603 604 By contrast with previous observations, our data show that DCJW moderately shifts both voltage-605 dependences of fast and slow inactivation of Na⁺ currents elicited by co-expression of DmNa_v1-1 with 606 TEH1 homologs. Interestingly, the voltage-dependence of slow inactivation of Na⁺ current elicited by 607 the co-expression of PaTEH1B and DmNa_v1-1 appears more sensitive to DCJW. This indicates that 608 Nav channels formed by DmNav1-1/ PaTEH1B displays distinct slow inactivation property, 609 reinforcing the hypothesis that the C-terminal end generated by intron retention interacts with region 610 of α-subunit involved in slow inactivation.

611 The idea that LAs and PTIs block Na_v channels by similar mechanisms is partially based on evidence that lidocaine and DCJW possibly share a common or overlapping binding site on insect Nav 612 613 channels (Lapied et al., 2001). Site-directed mutagenesis experiments have shown that the two key LA-interacting residues identified in mammalian Nav channels are important but not critical for 614 615 lidocaine binding and mode of action on insect Na_v channels (Song et al., 2011). Our findings also 616 point out remarkable differences in the mechanisms by which lidocaine and DCJW block insect Na_v 617 channels. While lidocaine induces a marked depolarizing shift of the voltage-dependence of activation, 618 DCJW has a weak effect on activation property. In addition, lidocaine causes more pronounced effects 619 on steady-state fast and slow inactivation than DCJW. Repriming of drug bound DmNa_v1-1 channels 620 is slow, due to strong stabilizing effects of inactivated state by both molecules, but lidocaine seems to block channel in this state. Thus, lidocaine and DCJW inhibitory effects are not equally sensitive to 621 622 potential. Finally, lidocaine behaves more like a gating modifier of insect Nav channels with a very complex mechanism. 623

In conclusion, our work demonstrates that ancillary subunits of insect Na⁺ channels can be 624 625 subjected to an intron retention process, which constitutes an unanticipated mechanism that modulates 626 the electrical excitability of neurons by tuning expression, gating and pharmacological properties of Na_v channels. This modulation mechanism occurs by converting the C-terminal end of TEH1-like 627 proteins in the American cockroach. Our findings strongly suggest that this mechanism could likely 628 happen in other insect species, such as D. melanogaster. To confirm this hypothesis, the search of 629 TEH1 variant and the neuronal characterization of *teh1* gene in *D. melanogaster* mutant are required. 630 631 Additionally, our results clearly indicate that it is no longer tenable to investigate the mechanisms 632 underlying the mode of action of insecticides targeting Na_v channels without considering the intricate 633 interactions between the pore-forming and auxiliary subunits. Although this study was focused on PTI, we believe that the examination of auxiliary Nav channel subunits should be extended to other 634 635 insecticide families such as pyrethroids. Supporting this, recent data have shown that mammalian

- $Na_v 1.3$  and  $Na_v 1.6$  channels display different sensitivities to pyrethroids when co-expressed with rat
- $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 subunits or alone (Meacham et al., 2008, Tan et al., 2011).

# 639 Acknowledgements

640

- 641 We are indebted to Dr Hervé Le Corronc for his helpful advices concerning confocal imaging. We
- thank Selma Kane for critical reading of the manuscript. We greatly thank Dr Daniel Cordova for
- 643 providing the insecticide compound DCJW.

# 645 **References**

- 646 Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF (1996) Functional consequences of 647 lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. J Gen Physiol 107:643-658.
- Barela AJ, Waddy SP, Lickfett JG, Hunter J, Anido A, Helmers SL, Goldin AL, Escayg A (2006) An
  epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability. J
  Neurosci 26:2714-2723.
- 651 Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW (1983) Lidocaine block of cardiac sodium channels. J Gen Physiol 652 81:613-642.
- 653 Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from 654 eukaryotes. Nucleic Acids Res 3:2303-2308.
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch
   TP (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type
   calcium channels. Nat Neurosci 2:407-415.
- 658 Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic 659 mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-298.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII.
   Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels.
   Pharmacol Rev 57:397-409.
- Chen Z, Ong BH, Kambouris NG, Marban E, Tomaselli GF, Balser JR (2000) Lidocaine induces a slow
   inactivated state in rat skeletal muscle sodium channels. J Physiol 524 Pt 1:37-49.
- Chevrier P, Vijayaragavan K, Chahine M (2004) Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8
   peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. Br J Pharmacol 142:576 584.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007b) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect
   sodium channels. IUBMB Life 59:151-162.
- 670 Derst C, Walther C, Veh RW, Wicher D, Heinemann SH (2006) Four novel sequences in Drosophila
  671 melanogaster homologous to the auxiliary Para sodium channel subunit TipE. Biochem
  672 Biophys Res Commun 339:939-948.
- 673Dib-Hajj SD, Waxman SG (1995) Genes encoding the beta 1 subunit of voltage-dependent Na+674channel in rat, mouse and human contain conserved introns. FEBS Lett 377:485-488.
- Fan XR, Ma JH, Zhang PH, Xing JL (2010) Blocking effect of methylflavonolamine on human Na(V)1.5
   channels expressed in Xenopus laevis oocytes and on sodium currents in rabbit ventricular
   myocytes. Acta Pharmacol Sin 31:297-306.
- Feng G, Deak P, Chopra M, Hall LM (1995b) Cloning and functional analysis of TipE, a novel
   membrane protein that enhances Drosophila para sodium channel function. Cell 82:1001 1011.
- 681 Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. J Exp Biol 205:575-584.
- Hille B (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor
   reaction. J Gen Physiol 69:497-515.
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. . Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Isom LL (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. Neuroscientist 7:42-54.
- Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL (2000) Cloning,
  localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. J Biol Chem
  275:1079-1088.
- Khodor YL, Rodriguez J, Abruzzi KC, Tang CH, Marr MT, 2nd, Rosbash M (2011) Nascent-seq indicates
   widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in Drosophila. Genes Dev 25:2502-2512.
- 691 Kim E, Goren A, Ast G (2008) Alternative splicing: current perspectives. Bioessays 30:38-47.
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J
   Mol Biol 157:105-132.
- Lapied B, Grolleau F, Sattelle DB (2001) Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal
   sodium channels. Br J Pharmacol 132:587-595.

- Lavialle-Defaix C, Gautier H, Defaix A, Lapied B, Grolleau F (2006) Differential regulation of two
   distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor
   activation in insect pacemaker neurons. J Neurophysiol 96:2437-2450.
- Lavialle-Defaix C, Moignot B, Legros C, Lapied B (2010) How does calcium-dependent intracellular
   regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine
   insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker
   neurons? J Pharmacol Exp Ther 333:264-272.
- Lenkowski PW, Shah BS, Dinn AE, Lee K, Patel MK (2003) Lidocaine block of neonatal Nav1.3 is
   differentially modulated by co-expression of beta1 and beta3 subunits. Eur J Pharmacol
   467:23-30.
- Makielski JC, Limberis J, Fan Z, Kyle JW (1999) Intrinsic lidocaine affinity for Na channels expressed in
   Xenopus oocytes depends on alpha (hH1 vs. rSkM1) and beta 1 subunits. Cardiovasc Res
   42:503-509.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW (1996) Coexpression of beta 1 with cardiac sodium
   channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. Mol Pharmacol 49:30-39.
- Meacham CA, Brodfuehrer PD, Watkins JA, Shafer TJ (2008) Developmentally-regulated sodium
   channel subunits are differentially sensitive to alpha-cyano containing pyrethroids. Toxicol
   Appl Pharmacol 231:273-281.
- Moignot B, Lemaire C, Quinchard S, Lapied B, Legros C (2009) The discovery of a novel sodium
   channel in the cockroach Periplaneta americana: evidence for an early duplication of the
   para-like gene. Insect Biochem Mol Biol 39:814-823.
- Olson RO, Liu Z, Nomura Y, Song W, Dong K (2008) Molecular and functional characterization of
   voltage-gated sodium channel variants from Drosophila melanogaster. Insect Biochem Mol
   Biol 38:604-610.
- Plotnikova SN (1969) Effector neurons with several axons in the ventral nerve cord of the asian
   grasshopper *Locusta migratoria*. J Evol Biochem Physiol 5:276-277.
- Qin N, D'Andrea MR, Lubin ML, Shafaee N, Codd EE, Correa AM (2003) Molecular cloning and
   functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant
   of the beta1 subunit. Eur J Biochem 270:4762-4770.
- Salgado VL (1992) Slow voltage-dependent block of sodium channels in crayfish nerve by
   dihydropyrazole insecticides. Mol Pharmacol 41:120-126.
- Sheets MF, Hanck DA (2003) Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium
   channels. J Gen Physiol 121:163-175.
- Silver KS, Nomura Y, Salgado VL, Dong K (2009) Role of the sixth transmembrane segment of domain
   IV of the cockroach sodium channel in the action of sodium channel blocker insecticides.
   Neurotoxicology 30:613-621.
- Silver KS, Soderlund DM (2005) Action of pyrazoline-type insecticides at neuronal targets sites. Pestic
   Biochem Physiol 81:136-143.
- Silver KS, Song W, Nomura Y, Salgado VL, Dong K (2010) Mechanism of action of sodium channel
   blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. Pesticide Biochemistry and Physiology
   97:87-92.
- Song W, Liu Z, Dong K (2006) Molecular basis of differential sensitivity of insect sodium channels to
   DCJW, a bioactive metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb. Neurotoxicology
   27:237-244.
- Song W, Silver KS, Du Y, Liu Z, Dong K (2011) Analysis of the action of lidocaine on insect sodium
   channels. Insect Biochem Mol Biol 41:36-41.
- Szafranski K, Schindler S, Taudien S, Hiller M, Huse K, Jahn N, Schreiber S, Backofen R, Platzer M
   (2007) Violating the splicing rules: TG dinucleotides function as alternative 3' splice sites in
   U2-dependent introns. Genome biology 8:R154.
- Tan J, Choi JS, Soderlund DM (2011) Coexpression with Auxiliary beta Subunits Modulates the Action
   of Tefluthrin on Rat Na(v)1.6 and Na(v)1.3 Sodium Channels. Pestic Biochem Physiol 101:256 264.

- Warmke JW, Reenan RA, Wang P, Qian S, Arena JP, Wang J, Wunderler D, Liu K, Kaczorowski GJ, Van
   der Ploeg LH, Ganetzky B, Cohen CJ (1997) Functional expression of Drosophila para sodium
   channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. J Gen Physiol
   110:119-133.
- Wing D, Sacher M, Kagaya Y, Tsurubuchi Y, Mulderig L, Connair M, Schnee M (2000) Bioactivation and
   mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Protection 19:537-545.
- Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ, Narahashi T (2005) Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. Neurotoxicology 26:455-465.
- 756
- 757
- 758

759 Legends

760

Figure 1. Primary structure analysis of TEH1-like auxiliary subunits of P. americana. A. Clustal 761 W alignment of PaTEH1A (GenBank accession number KC206367), PaTEH1B (accession number 762 763 KC206368) and DmTEH1 (accession number NP_649959). Transmembrane segments (M1 and M2) are indicated with bold line above the sequences. Conserved N-glycosylation sites are indicated by 764 closed inverted triangles (♥) and O-glycosylation sites of PaTEH1s subunits are indicated by asterisk 765 766 (*) (www.cbs.dtu.dk). Gaps are indicated by dashes. The undecapeptide (VALLDCEEDRT) and the 767 decapeptide (YVPLSVHDTR) at the C-terminal ends of PaTEH1 variants are boxed. B. 768 Hydrophobicity profile and deduced topological organization of PaTEH1A and PaTEH1B. 769 Hydrophobicity analysis was performed using the algorithm of Kyte and Doolittle (1982). The amino 770 acid residue position is plotted along the x-axis and the calculated mean hydrophobicity is plotted 771 along the y-axis. Regions above the line are hydrophobic. The two putative membrane-spanning segments are indicated as M1 and M2. 772

773

Figure 2. Organization of genomic region and mRNA and encoding TEH1-like subunit of *P. americana*. A. The genomic region of *Pateh1* consists in two exons interrupted by a short intron. The intron sequence is in lowercase letters and splice donor site, branch site and splice acceptor site are underlined. Sizes of exons and intron are indicated in parentheses. *: stop codon. B. Exclusion or retention of the intron led to PaTEH1A and PaTEH1B variants with different C-terminal ends. The 94 bp intron sequence contains a short new coding sequence followed by an in-frame stop codon. This generates a second protein (PaTEH1B) with a novel C-terminal end.

781

Figure 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of PaTEH1 expression in various *P. americana*tissues. RT-PCR was performed using 5 µg of mRNA extracted from head, thoracic ganglia, nerve
cord, muscles, gut and mushroom-shaped accessory gland. Actin (Genbank accession number
AY116670) was used as internal quantitative control.

787 Figure 4. Modulation of Na⁺ current densities by different TEH1 auxiliary subunit subtypes. A. Family of Na⁺ currents measured at test potentials of -70 mV to 40 mV from a holding potential of -788 100 mV for DmNa_v1-1 alone ( $\alpha$ ) or co-expressed with DmTEH1 ( $\alpha$  + DmTEH1), PaTEH1A ( $\alpha$  + 789 PaTEH1A), PaTEH1B ( $\alpha$  + PaTEH1B) or PaTEH1 $\Delta$ (270-280) ( $\alpha$  + PaTEH1 $\Delta$ (270-280)) injected 790 791 with about 35 ng, 8 ng, 2 ng, 3 ng and 2 ng of RNA ( $\alpha$ : $\beta$ , 1:1), respectively. The protocol of depolarizing voltage-clamp steps is shown. B. Na⁺ current density per ng of injected RNA after 3-days 792 incubation, except for DmNa_v1-1 (10 days after injection). Results are expressed in µA per nF per ng 793 of injected RNA (One-way ANOVA: F_(4,55)=15.11, p<0.0001 post hoc Tukey test). The number of 794 795 tested oocytes is indicated in the bar histogram.

796

Figure 5. Modulation of Na_v channels expression by intron retention mechanism of *teh1-like* 797 798 gene of *P. americana*. Immunofluorescent confocal images of representative oocytes injected with 799 water (control) or with 3 ng of DmNa_v1.1/PaTEH1A ( $\alpha$  + PaTEH1A) or PaTEH1B ( $\alpha$  + PaTEH1B) 800 RNAs. A. Immunostaining representative snapshot with an anti Pan-Na_v (Alexa®488) antibody and 801 associated wireframe plots drawn with ImajeJ software (version 1.4.3.67). B. Immunostaining 802 representative snapshot with an RGS-His (Alexa®546) antibody and associated wireframe plots drawn 803 with ImajeJ software. C. Relative fluorescence was measured using the ImajeJ software (version 1.4.3.67). For each measurement, an identical region of interest of 5002.2  $\mu$ m² (292 x 36 pixels) was 804 Mean relative fluorescence intensity values measured with Alexa®488 (white) and 805 defined. Alexa (grey) are mean  $\pm$  SEM for 6 oocytes. PaTEH1A shows a stronger expression of the  $\alpha$ -806 807 subunit than PaTEH1B in oocytes (One-way ANOVA: Alexa®488: F_(2,16)=24.86, p<0.0001 and 808 Alexa®546: F_(2,15)=39.81, p<0.0001, post hoc Tukey test). a.u: arbitrary unit.

809

Figure 6. Biophysical properties of Na⁺ currents elicited by co-expression of DmNa_v1-1 with DmTEH1 or PaTEH1-like subunits. A. Voltage-dependence of activation (One-way-ANOVA:  $F_{(3,65)}=6.67$ , p<0.0005, post-hoc Tukey test). G represents the conductance. B. Voltage dependence of fast steady-state inactivation (One-way-ANOVA:  $F_{(3,75)}=6.84$ , p=0.0009, post-hoc Tukey test). C. Voltage-dependence of slow steady-state inactivation (One-way-ANOVA:  $F_{(3,23)} = 4.49$ , p=0.014, post-hoc Tukey test). D. Recovery from fast inactivation (One-way-ANOVA:  $F_{(3,62)}=2.104$ , p=0.1098, post-hoc Tukey test). Na⁺ current amplitudes (I) were measured using the pulse protocols described in the Materials and Methods section and were normalized to the largest current amplitude (Imax). Values are mean  $\pm$  SEM. The number of individual experiments, each performed with a different oocyte, is indicated in parentheses. Standard protocols are shown in insets.

820

Figure 7. TEH1 isoforms-mediated changes in the sensitivity of DmNa_v1-1 to Na⁺ channel 821 822 inhibitors. A. Na⁺ current traces obtained by a 20 ms depolarizing pulse to -10 mV from a holding potential of -100 mV, in the absence (control, grey trace) and in the presence of 2 mM lidocaine at 823 10 min (black trace). B. Percentage of tonic inhibition of Na⁺ current induced by lidocaine (2 mM, 824 10 min) for DmNa_v1-1 co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B and PaTEH1\Delta(270-280) 825 (one-way ANOVA:  $F_{(3,18)}$ =4.85, p<0.0121, post-hoc Tukey test). C. Na⁺ current traces obtained by a 826 827 20 ms depolarizing pulse to -10 mV from a holding potential of -100 mV, in the absence (control, grey 828 trace) and in the presence of  $2 \mu M$  DCJW at 30 min (black trace). D. Percentage of inhibition of Na⁺ 829 current in response to DCJW (2 µM, 30 min) for DmNa_v1-1 co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B and PaTEH1 $\Delta$ (270-280) (one-way ANOVA: F_(3,22)=13.22, p<0.0001, post-hoc Tukey test). 830 Values are mean  $\pm$  SEM. a.u. arbitrary unit. The number of tested oocytes is indicated in the bar 831 histogram. 832

833

834 Figure 8. Effects of lidocaine and DCJW on gating properties of Na⁺ currents. Electrophysiological properties of DmNav1-1 co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B and 835 PaTEH1 $\Delta$ (270-280) in the absence (white) and the presence of 2 mM lidocaine (black) and 2  $\mu$ M 836 DCJW (grey). A. Mean data with SEM for  $V_{1/2}$  of activation. B. Mean data with SEM for  $V_{1/2}$  of fast 837 steady-state inactivation. C. Mean data with SEM for  $V_{1/2}$  of slow steady-state inactivation. D. 838 839 Summary data for recovery time constant from fast inactivation. Statistical tests were performed using 840 a two-tail unpaired t test (control versus lidocaine and control versus DCJW). The number of tested oocytes is indicated in the bar histogram. 841

## 843 Figure 9. Effects of lidocaine and DCJW on the recovery from fast inactivation of Na⁺ currents.

844 The protocol was the same as shown in Figure 6D. A. Time course of recovery from fast inactivation

in the presence of 2 mM lidocaine B. Histogram bars summarizing the effects of 2 mM lidocaine on

the rates of recovery from fast inactivation at 20 ms. Data were deduced from the curves shown in A

847 (one-way ANOVA:  $F_{(3,19)}=7.71$ , p<0.0021, post-hoc Tukey test). C. Time course of recovery from fast

848 inactivation in presence of  $2 \mu M$  DCJW.

Primers name	Nucleotide sequence	Domain					
1-Degenerated primer used to amplify PaTEH1							
DPS1	5'-GTGCCGCTSTACGTSGAYCCS-3'	MS1-MS2					
DPR1	5'-ATGCATTGYGACTGCMGSTG-3'	MS1-MS2					
2-Specific primers used in RACE							
P-R1	5'-CGATGGGGATGTTGATGTTGAC-3'	5'UTR partial ORF PaTEH1(PCR#1)					
P-R2	5'-CGTACATGGTGGTGAAGTTGTC-3'	5'UTR partial ORF PaTEH1(PCR#2)					
P-S1	5'-GTCAACATCAACATCCCCATCG-3'	3'UTR partial ORF PaTEH1(PCR#1)					
P-S2	5'-GACAACTTCACCACCATGTACG-3'	3'UTR partial ORF PaTEH1(PCR#2)					
3-Primers used to amplify the full-length ORF							
P-S3	5'-CAGAT <u>CCCGGG</u> ATGAGGAGCAGCAGCTCGGAG-3'	Full-length ORF PaTEH1					
P-S4	5'-AAAAGTTGTCAGCTGTTCGGCG-3'	Complete cDNA PaTEH1					
P-R3	5'-CTGAT <u>TCTAGA</u> CCGAATCATGTTCTATCTTCT-3'	Full-length ORF PaTEH1					
P-R4	5'-(T) ₂₃ CAAAATATAGGCCATGTATTTCTACC-'3	Complete cDNA PaTEH1					

## Table 1. Sequences of the oligonucleotides used in PCR and their corresponding region.

Designation of oligonucleotide mixtures: S=G+C; Y=C+T; M=A+C.

UTR, untranslated region; ORF, open-reading frame

Restriction enzyme recognition sequences are underlined and correspond to XmaI site (CCCGGG) and XbaI site (TCTAGA).

Table 2. Parameters of voltage-dependence of activation and fast and slow steady-state inactivation for DmNa_v1.1 co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B or PaTEH1 $\Delta$ (270-280) in *Xenopus* oocytes in the presence and absence of lidocaine and DCJW.

	Control		Lidocaine		DCJW	
	V ½ (mV)	k	V ½ (mV)	k	V ½ (mV)	k
Activation						
DmTEH1	-28.1 ± 0.6 (17)	$7.3 \pm 0.5$	$-22.4 \pm 1.6$ (5)	8.8 ± 1.5	-26.3 ± 0.9 (8)	$7.9\pm0.8$
PaTEH1A	-36.2 ± 0.5 (23)	6.9 ± 0.5	-26.9 ± 2.1 (5)	11.4 ± 1.9	-36.4 ± 1.1 (7)	8.2 ± 0.9
PaTEH1B	-31.1 ± 0.5 (23)	$5.8\pm0.5$	$-20.6 \pm 1.4$ (6)	9.2 ± 1.3	-22.4 ± 1.4 (5)	7.3 ± 1.2
PaTEH1∆(270-280)	-34.6 ± 0.9 (6)	4.9 ± 0.5	-19.9 ± 2.1 (6)	11.9 ± 2.0	-31.7 ± 0.9 (5)	7.3 ± 0.9
Fast inactivation						
DmTEH1	-55.1 ± 0.3 (21)	5.7 ± 0.2	-58.1 ± 1.3 (6)	8.9 ± 0.9	-57.4 ± 0.9 (7)	7.5 ± 0.7
PaTEH1A	-57.8 ± 0.1 (27)	4.9 ± 0.1	-61.2 ± 1.4 (6)	9.3 ± 0.8	-61.6 ± 0.7 (8)	6.1 ± 0.5
PaTEH1B	-54.9 ± 0.1 (22)	4.9 ± 0.1	-59.2 ± 1.5 (5)	11.9 ± 0.9	-58.8 ± 0.8 (9)	6.7 ± 0.6
PaTEH1∆(270-280)	-57.7 ± 0.5 (6)	6.2 ± 0.4	-61.0 ± 1.1 (6)	7.5 ± 0.8	-58.7 ± 1.2 (5)	8.6 ± 0.8
Slow inactivation						
DmTEH1	-48.7 ± 1.2 (6)	$11.0 \pm 1.0$	-62.9 ± 1.3 (6)	8.7 ± 1.0	-51.9 ± 1.6 (6)	$10.2 \pm 1.5$
PaTEH1A	-55.5 ± 1.8 (9)	10.7 ± 1.4	-70.5 ± 5.1 (5)	13.2 ± 2.9	-61.2 ± 2.6 (7)	11.6 ± 2.0
PaTEH1B	-49.4 ± 1.8 (5)	11.5 ± 1.6	-59.1 ± 2.6 (5)	15.8 ± 2.1	-60.9 ± 2.0 (5)	11.4 ± 1.7
PaTEH1∆(270-280)	-50.5 ± 2.3 (6)	15.3 ± 2.3	-66.0 ± 1.6 (6)	9.8 ±1.3	-54.6 ± 2.8 (5)	12.3 ± 2.1

Values are mean  $\pm$  SEM derived from the number of individual experiments, each performed with a different oocyte. The number of recorded oocytes is indicated in parenthesis.
Table 3. Parameters of recovery from fast inactivation for  $DmNa_v1-1$  co-expressed with DmTEH1, PaTEH1A, PaTEH1B, or PaTEH1 $\Delta$ (270-280) in the presence and absence of lidocaine and DCJW.

	Control	Lidocaine	DCJW
	τ (ms)	τ (ms)	τ (ms)
DmTEH1	2.1 ± 0.1 (19)	$2.9 \pm 0.5$ (4)	2.8 ± 0.4 (7)
PaTEH1A	1.9 ± 0.1 (20)	3.1 ± 0.2 (4)	2.6 ± 0.6 (7)
PaTEH1B	1.8 ± 0.1 (19)	3.2 ± 0.2 (6)	2.9 ± 0.4 (8)
PaTEH1∆(270-280)	2.4 ± 0.2 (6)	3.5 ± 0.2 (6)	2.5 ± 0.1 (6)

Values are mean  $\pm$  SEM derived from the number of individual experiments, each performed with a different oocyte. The number of recorded oocytes is indicated in parenthesis.

#### **Supporting information**

#### **Supporting Information Legends**

**Figure S1 Expression of PaNa**_v**1 channels with and without auxiliary subunits.** Family of Na⁺ currents were measured at test potentials of -70 mV to 40 mV from a holding potential of -100 mV. A. No currents were detected after injection of PaNa_v1 alone (11 ng RNA, 6-days incubation) or with DmTEH1 (13.5-27 ng RNA, 8-days incubation), DmTipE (7.4 ng RNA, 11-days incubation), PaTEH1A (7.4 ng RNA, 10-days incubation) and PaTEH1B (5.5 ng RNA, 3-days incubation).

Figure S2. Modulation of Na⁺ current densities of BgNav channel by PaTEH1A and PaTEH1B auxiliary subunits. A. Expression of BgNa_v1-1a channels with and without auxiliary subunits. Family of Na⁺ currents were measured at test potentials of -70 mV to 40 mV from a holding potential of -100 mV. B. Na⁺ currents were obtained after injection of 10 ng of mRNAs and 3-day incubation of BgNa_v1-1a alone or with PaTEH1A and PaTEH1B. Na⁺ current density per ng of injected RNA after 3-days incubation. Results are expressed in  $\mu$ A per nF per ng of injected RNA (One-way ANOVA: F(2,30)=42.94, p<0.0001 post hoc Tukey test). The number of tested oocytes is indicated in the bar histogram.

Figure S3. Biophysical properties of Na⁺ currents elicited by co-expression of BgNa_v1-1a with PaTEH1A or PaTEH1B subunits. A. Voltage-dependence of activation. G represents the conductance. B. Voltage dependence of fast steady-state inactivation. Values are mean  $\pm$  SEM. The number of individual experiments, each performed with a different oocyte, is indicated in parentheses.

Table S1. Voltage-dependence of activation and fast inactivation of BgNa_v1-1a with or without PaTEH1A or PaTEH1B.

Na _v channel	Activation		Fast inactivation	on	n
	$V_{1/2}({ m mV})$	<i>k</i> (mV)	$V_{1/2}({ m mV})$	<i>k</i> (mV)	
BgNa _v 1-1a	$-25.7 \pm 0.3$	$6.6 \pm 0.3$	$-48.8 \pm 0.2$	$5.0 \pm 0.2$	15
BgNav1-1a + PaTEH1A	$-40.8 \pm 0.8$	$6.6 \pm 0.7$	$-58.3 \pm 0.2$	$4.9 \pm 0.1$	10
BgNav1-1a + PaTEH1B	$-37.2 \pm 0.6$	5.9 ± 0.5	$-58.4 \pm 0.1$	$4.9 \pm 0.1$	10

The voltage-dependence of activation and fast inactivation data were fitted with Boltzmann equations to determine  $V_{1/2}$ , the voltage for half-maximal activation and k, the slop factor for activation or fast inactivation. Data represents mean  $\pm$  SEM.

### Figure 1

#### Α

	M1	
PaTEH1A	MRSSSSELLLDQQQ-ELRKRKLLELAQPKKKPPKRTCRERIWFYTTSFLAMTAVGGGSSLLFLVPLYV	67
PaTEH1B	MRSSSSELLLDQQQ-ELRKRKLLELAQPKKKPPKRTCRERIWFYTTSFLAMTAVGGGSSLLFLVPLYV	67
DmTEH1	${\tt MRSGSSELLLEQQQQ} {\tt ELRLRKIRELAPKKKNGNRRFRSWRERARFYGTSTLAFFSVTAGASLLFLVPLYV}$	70
	V V*	
PaTEH1A	DPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNCTWSSCREGCTSDMYSCTHIYVMYTTAPYYTDDGDGNWT	137
PaTEH1B	${\tt DPAISTLAADFAPEPVKCVTTRREELCGILNC} {\tt TWSSCREGCTSDMYSCTHIYVMYTTAPYYTDDGDGNWT}$	137
DmTEH1	DPAISTLSHDFIEKPTLCTTTRREDLVGIFNCSWSSCREGCTSDLYRCVHIYVTFIEQNIT	131
PaTEH1A PaTEH1B DmTEH1 PaTEH1A	***** ********** * V * STSTSPSTSTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPEVDCDNFTTMYGKVNAEFPCYY STSTSPSTSTTTTTTTTTPSPGENFTEDAVLLVNIKGCGYPPEVDCDNFTTMYGKVNAEFPCYY IPENMTDYSNFTSDMEQSGEATLLVNIKGCGYPPSVTCKNFNGYYGIEGAIFPCFY V <u>M2</u> SRENRTVVLIHYDREEHVAIIIHYFAVPFIVTLATSVVLCVMYCDCRCGSERDRRRRARRCAVEDARVA	201 201 187 271
PaTEH1B	$SRENRTVVLIHYDREEHVAIIIHYFAVPFIVTLATSVVLCVMYCDCRCGSERDRRRRARRCAVEDAR \underline{VV}$	271
DmTEH1	SRKNKTVVLTSYNHDDQVAMIIHFFAVPFVITVISSIALCIMHCDCRCKKDRSHRRNRPQCRRPRIENLS	257
PaTEH1A PaTEH1B DmTEH1	LLDCEEDRT       280         PLSVHDTR       279         DTSISTRVDMLTPAIEVYKPPL       279	

В



### Figure 2

#### Α



В

	E	xon 1								Ex	on 2					_
(	GAT	GCC	AG	AGTC	GCA	TTG	TTG	GAC	TGT	'GAA	.GAA	GAT	AGA	ACA	TGA	
•••	D	A	R	V	A	L	L	D	С	Ε	Ε	D	R	Т	*	(280 aa)

	E	xon 1		Intron											
	GAI	GCC	AG	GTAT	GTG	CCT	CTT	TCI	GTG	CAC	GAC	ACG	CGG	TAG	
• • •	D	A	R	Y	V	Ρ	L	S	V	Η	D	Т	R	*	(279 aa)









### Figure 5















# Figure S1

PaNa _v 1 + Dm	TipE
titilite and a subject of the subjec	and provide the state of the st
PaNa _v 1 + Dm	TEH1
PaNa,1 + PaT	EH1A
PaNa _v 1 + PaT	ΈH1Β
	1 µA

### Figure S2



### Figure S3







# Thèse de Doctorat

### Céline Bourdin

# Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte :

Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques

#### Résumé

Le canal sodium dépendant du potentiel (Nav) est un des principaux partenaires moléculaires de l'excitabilité cellulaire. Il constitue une cible de choix pour les insecticides neurotoxiques utilisés pour la lutte contre les insectes nuisibles. Les insecticides de la famille des phénylpyrazolines interagissent avec la sous-unité principale du canal Nav avec une préférence pour son état conformationnel dit « inactivé ». Or, il a été montré que les sous-unités auxiliaires de Drosophila melanogaster modifient cette conformation. Cependant, le rôle et la régulation de ces sous-unités auxiliaires sont, à ce jour, très peu connus. Les objectifs de cette thèse ont été de caractériser les sous-unités auxiliaires de la blatte Periplaneta americana par des approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques, afin d'en préciser les fonctions. La première partie de ce travail porte sur la sous-unité neuronale TEH1. Deux protéines résultant d'une rétention d'intron modifiant uniquement le C-terminal, PaTEH1A et PaTEH1B, ont été clonées. En utilisant l'ovocyte de xénope comme système d'expression et la technique de la double micro-électrode en potentiel imposé, nous avons mis en évidence l'implication du Cterminal dans la modulation des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal Nav. La deuxième partie porte sur les autres sous-unités pour lesquelles nous avons identifié plusieurs variants résultant de différents types d'épissage alternatif (2 pour PaTipE et 4 pour PaTEH2). Les sous-unités auxiliaires jouent donc un rôle important dans la modulation des courants Na⁺ et doivent être prises en considération pour améliorer les études pharmacologiques.

#### Mots clés

Canal sodium dépendant du potentiel, rétention d'intron, électrophysiologie, insecticides, ovocytes de xénope--

#### Abstract

Voltage-gated sodium (Nav) channel is a crucial molecular component of the cellular excitability. It represents a target of choice for neurotoxic insecticides used in pest control. Pyrazoline-type insecticide interacts with the main Nav channel subunit with a preference for its inactivated state. A recent study showed that auxiliary subunits of Drosophila melanogaster modified this conformation. However, little information is available concerning the role and the regulation of these auxiliary subunits. The objectives of this thesis were to characterize the auxiliary subunits of the American cockroach Periplaneta americana by molecular, electrophysiological and pharmacological approaches, in order to specify their functions. The first part of this work concerns the neuronal TEH1 subunit. Two variants, PaTEH1A and PaTEH1B resulting from an intron retention modifying only the C-terminal extremity, were cloned. Using the heterologous expression system Xenopus oocytes and the two microelectrodes voltage clamp technique, we highlighted that the C-terminal extremity was involved in the modulation of Nav channels electrophysiological and pharmacological properties. The second part concerns the discovery of other auxiliary subunits. We identified several variants resulting from alternative splicing events (2 variants for PaTipE and 4 for PaTEH2). Altogether, our results indicate that auxiliary subunits are diverse and play an important role in the modulation of Na⁺ current and should be considered to improve pharmacological studies ..

#### **Key Words**

Voltage-gated sodium channel, intron retention, insecticides, *Xenopus* oocytes, electrophysiology