



HAL
open science

Implication des canaux sodium voltage-dépendant dans la réponse aux toxines chez *Crassostrea gigas* : le cas des phycotoxines paralysantes

Floriane Boullot

► To cite this version:

Floriane Boullot. Implication des canaux sodium voltage-dépendant dans la réponse aux toxines chez *Crassostrea gigas* : le cas des phycotoxines paralysantes. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT : 2017BRES0014 . tel-01578099

HAL Id: tel-01578099

<https://theses.hal.science/tel-01578099>

Submitted on 28 Aug 2017

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.



université de bretagne
occidentale

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Floriane Boullot

Préparée à l'Institut Universitaire Européen
de la Mer, Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin

Implication des canaux
sodium voltage-dépendant
dans la réponse aux
toxines chez *Crassostrea*
gigas : le cas des
phycotoxines paralysantes

Thèse soutenue le 8 Février 2017

devant le jury composé de :

Pascal FAVREL

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie / *rapporteur*

Jordi MOLGO

Directeur de recherche, CNRS CEA Saclay / *rapporteur*

Raphaele LE GARREC

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale /
examineur

Valérie FESSARD

Directrice de recherche, CNRS ANSES / *examineur*

Caroline FABILOUX

Maître de conférences, Université de Bretagne occidentale /
encadrant scientifique

Philippe SOUDANT

Directeur de recherche, CNRS LEMAR / *directeur de thèse*

Hélène HEGARET

Chargée de recherche, CNRS LEMAR / *membre invité*

Evelyne BENOIT

Chargée de recherche, CNRS CEA / *membre invité*

Université de Bretagne Occidentale
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer
Mention : Biologie Marine

Implication des canaux sodium voltage-dépendant dans la réponse aux toxines chez *Crassostrea gigas* : le cas des phycotoxines paralysantes

Institut Universitaire Européen de la Mer
Laboratoires des Sciences de l'Environnement Marin



Floriane BOULLOT

8 Février 2017

Remerciements

Je remercie toutes les personnes qui ont pu m'aider de près ou de loin, de quelques manières que ce soient à réaliser cette thèse. Cela n'aurait pas été possible seule.

Je souhaite remercier la Région Bretagne et l'Université de Bretagne Occidentale qui ont financé ma thèse, ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche qui a permis le financement de toutes mes expérimentations.

Je tiens à remercier Pascal Favrel et Jordi Molgo pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie également Raphaele Le Garrec et Valérie Fessard d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinatrices.

Je remercie Olivier Ragueneau et Luis Tito de Morais de m'avoir accueilli au sein du LEMAR.

J'aimerais remercier très sincèrement mon équipe de choc, mes encadrants.

Philippe, mon directeur de thèse, qui a été de bons conseils lors de nos réunions et qui a toujours été présent jusque dans la dernière ligne droite. Pierre qui a accepté d'être mon co-directeur, sachant que le sujet avait évolué, et qui a toujours répondu présent quand il le fallait. Hélène qui par sa bonne humeur et son expertise m'a formé au monde inconnu des micro-algues. Merci également pour toutes les discussions que l'on a pu avoir et qui m'ont aidé à réaliser cette thèse. Caroline, merci de m'avoir initié au métier de chercheur en me donnant ma chance pour le stage et cette thèse, de m'avoir guidé tout au long de ce parcours et d'avoir été aussi bienveillante et présente, même dans les derniers jours. Je crois que je n'aurai pas pu souhaiter un meilleur encadrement que celui-ci, 4 personnes différentes et complémentaires qui ont permis l'aboutissement de cette thèse dans les meilleures conditions.

Je souhaite également remercier Evelyne. Merci pour ton implication dans une partie de ma thèse et de m'avoir initié aux joies de l'électrophysiologie. Ces semaines de travail avec toi ont été d'une grande richesse, tant sur le plan scientifique que personnel.

Un très grand merci à Adeline, qui a eu le plaisir de se confronter au clonage du réfractaire canal sodium. Merci aussi pour tous tes précieux conseils en biologie moléculaire et pour ta gentillesse et ton soutien.

J'aimerais également remercier toutes les personnes qui ont participé aux expérimentations et à la fastidieuse étape des prélèvements : Ludo, Nelly, Christophe, Arnaud, Marc, Emilien, Virgile, Valentin, Anne-Laure, Fabienne.

Les stagiaires qui ont participé aux travaux de cette thèse : Justine et Natan, ainsi que Maëva et Antoine.

L'équipe d'Arcachon : Damien, Mickaël et Laura, qui m'ont permis d'expérimenter la dissection des ganglions dans le noir à 4h du matin, équipée d'une frontale à lumière rouge.

La fabuleuse équipe du CEA qui m'a chaleureusement accueilli pendant mes différents séjours dans leur laboratoire : Romulo, qui m'a initié au monde des ovocytes de xénopes et l'électrophysiologie high-tech, Muriel (Mumu), Denis, Gilles, Nicolas, Pascal, Tania, ainsi que Laura qui m'a gentiment accueilli à Oxford et avec qui j'ai passé des moments formidables.

Tous mes collègues de bureau, anciens et actuels : Camille, Seb, Romain, Nicolas, Régis, Aurélien, William et Audrey. Ainsi que mes voisins de bureau : Olivier, Vianney, Jean et Greg.

Mes copains thésards et docteurs : Margot, Adèle, Elodie, Buburne (Bruno), Laura, Nono, Mélanie, Gaëlle, Yanouck, Nina, Malwenn, Fabien, Gaël.

Un grand merci à l'équipe de l'école doctorale : Elisabeth et Fred pour votre investissement dans le bon déroulement de nos thèses.

Le personnel administratif du LEMAR : Gene, merci pour ta joie de vivre et tous tes petits compliments qui donnent toujours le sourire, Anne So pour ta bonne humeur en toutes circonstances, Yves d'avoir géré au mieux toutes mes impossibilités administratives, mes missions et mes commandes de dernières minutes, ainsi que Céline.

Tous ceux avec qui j'ai travaillé pendant les TP à l'UBO : Marie, Marie-Dominique, Mélaine, Laura, Manon.

La station Ifremer d'Argenton qui a fourni les algues nécessaires à mes manip d'expositions.

Elsa et Agnès de l'association des petits débrouillards et Yann de Radio évasion, avec qui j'ai pu expérimenter l'enregistrement en studio de radio.

Merci, Seb H. de m'avoir formé aux logiciels photo/dessin/mise en page et pour tes précieux conseils qui m'ont permis de gagner un peu de temps dans la réalisation de tous mes schémas. Vincent, de m'avoir prêté le matos pour faire des jolies photos et pour ta gentillesse. Doudou Kraffe, de m'avoir gracieusement prêté son logement la veille de mon entretien de thèse.

Merci, également aux ostréiculteurs et toutes les personnes qui m'ont fourni des huîtres ou des échantillons.

Un énorme merci à tous mes amis, qui étaient loin pendant ces 3 ans mais qui m'ont toujours soutenu : Astrid, Olivia, Marine, Aurore, Florent, Jérôme, Aurélien, Martin, Terry, Emeric, Anne So, Geoffrey, Mireille, Guillaume.

J'aimerais également remercier Béa et Jean-Louis, qui sont des personnes formidables et qui ont toujours été présent, même pour les dernières corrections.

De tout mon cœur, j'aimerais remercier ma famille. Merci à mes parents et mon frère qui, depuis toujours, m'ont soutenu dans mes choix. Même s'il y a eu des changements de parcours, ils m'ont toujours soutenu. Merci pour vos encouragements, votre soutien et votre amour.

Mes plus sincères remerciements vont à ma moitié, Maxime. Merci de m'avoir soutenu et encouragé jusqu'au bout. Merci pour ta patience, ton optimisme et ton aide dans la dernière (et longue...) ligne droite. Merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu m'apportes.

SOMMAIRE

Abréviations	10
Liste des figures	12
Liste des tableaux	15
Avant-propos	16
Chapitre 1 Introduction	19
Introduction générale.....	20
I. Les micro-algues toxiques et les toxines paralysantes.....	20
1. Micro-algues et efflorescences.....	20
2. Micro-algues toxiques.....	21
3. Les principales phycotoxines et les symptômes associés.....	23
4. Les toxines paralysantes	26
5. Effets des PST sur les bivalves marins.....	28
6. Accumulation des PST par les bivalves marins	29
II. Le canal sodium voltage-dépendant.....	32
1. Rôle du canal sodium voltage-dépendant	32
2. Structure moléculaire des Na _v	34
3. Relation structure-fonction des canaux Na _v	42
4. Pharmacologie moléculaire des canaux Na _v face aux toxines paralysantes	46
III. Modulation de la structure et de l'activité des Na _v par des modifications pré- ou post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.....	50
1. Présentation des mécanismes générant de la diversité moléculaire	50
2. Le polymorphisme génétique	52
3. Diversité moléculaire des Na _v : modifications post-transcriptionnelles	53
4. Régulation et modifications post-traductionnelles des Na _v	61
IV. Le modèle biologique : l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	68
1. Systématique et écologie.....	68
2. Anatomie générale	68
3. Le système nerveux	70
Objectifs et contexte scientifique	77
Chapitre 2 Matériel et méthodes	81
I. Matériel biologique et expérimentations.....	82
1. L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	82
2. Dissection des nerfs cérébroviscéraux et des ganglions viscéraux des huîtres.....	85
3. Culture des micro-algues	86
4. Protocole expérimental de l'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques.....	86

II. Etude des canaux Na _v de <i>Crassostrea gigas</i> par une approche de biologie moléculaire.....	90
1. Extraction des ARN totaux et traitement à la DNase.....	90
2. Mesure de la concentration des ARN et évaluation de leur intégrité	91
3. Reverse transcription.....	92
4. Amplification de la séquence d'ADNc de la sous-unité α du Na _v	92
5. Sous-clonage des produits de PCR.....	95
6. Quantification par PCR en temps réel	97
7. Hybridation <i>in situ</i>	99
8. Analyses phylogénétiques des séquences protéiques du Na _v	104
9. Polymorphisme de type SNP (Single Nucleotid Polymorphism) du gène CgNa _v 1 (Na _v 9).....	106
10. Dosage des toxines par la méthode HPLC	107
11. Analyses des données et statistiques	108
III. Etude des canaux Na _v des nerfs de <i>Crassostrea gigas</i> par une approche d'électrophysiologie...	109
1. Principe de mesure directe de l'activité électrophysiologique	109
2. Activité électrophysiologique des nerfs d'huîtres	110
3. Analyse des enregistrements électrophysiologiques	112
4. Dosage des toxines par la méthode ELISA.....	114
5. Analyse statistiques des données	116
IV. Essai de mise au point du protocole d'expression hétérologue de la sous-unité α du Na _v de <i>Crassostrea gigas</i>	117
1. Principe de l'expression hétérologue dans les ovocytes de Xénopes	117
2. Expression hétérologue dans les ovocytes de Xénopes	118

Chapitre 3 Caractérisation du canal sodium voltage-dépendant de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.....121

I. Introduction.....	122
II. Partie 1 : Caractérisation du Na _v de <i>C. gigas</i>	124
1. Recherche des séquences des Na _v dans les bases de données.....	124
2. Analyse phylogénétique des canaux Na _v de <i>C. gigas</i>	126
3. Structure du gène codant pour la sous-unité α du Na _v	128
4. Expression des Na _v de <i>C. gigas</i>	131
5. Discussion	136
III. Partie 2 : Variabilité de CgNa _v 1	139
1. Polymorphisme au niveau du segment P, le site de fixation des PST.....	139
2. Variants d'épissage du Na _v	140
3. Discussion	143
IV. Partie 3 : Relation entre l'expression des variants et l'accumulation de PST.....	147
1. Accumulation des toxines et profil toxinique	147
2. Relation entre accumulation et expression des variants de CgNa _v 1.....	150
3. Discussion	151

Chapitre 4 Etude de la sensibilité aux PST de l’huître creuse *Crassostrea gigas*.....155

- I. Introduction..... 156
- II. Partie 1 : Sensibilité des nerfs d’huîtres à la STX et la TTX..... 158
 - 1. Stimulation et maintien des nerfs d’huîtres pour obtenir un potentiel d’action nerveux composé (CNAP) 158
 - 2. Sensibilité à la STX des nerfs d’huîtres 159
 - 3. Sensibilité des nerfs à la TTX..... 161
 - 4. Discussion 161
- III. Partie 2 : Sensibilité à la STX des nerfs d’huîtres exposées expérimentalement à *Alexandrium minutum* 163
 - 1. Effets de l’exposition aux PST sur le CNAP des nerfs d’huîtres 163
 - 2. Sensibilité à la STX des nerfs d’huîtres exposées ou non à *A. minutum*..... 164
 - 3. Relation entre la sensibilité à la STX des nerfs et l’accumulation de PST dans la glande digestive..... 169
 - 4. Discussion 170

Chapitre 5 Discussion et perspectives.....173

- I. Sensibilité des huîtres *Crassostrea gigas* aux PST..... 174
- II. Rôle du Nav chez *Crassostrea gigas*..... 183
- III. Lien entre l’accumulation des PST et la sensibilité de *Crassostrea gigas*..... 185
- IV. Mécanismes pouvant déterminer la variabilité interindividuelle de l’accumulation de PST. 188

Bibliographie..... 191

Abréviations

AD : adénylate cyclase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : acide désoxyribonucléique génomique

AKAP : A-kinase anchore protein

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ASP : amnesic shellfish poisoning

AST : amnesic shellfish toxin

ATP : adénosine triphosphate

BLAST : basic local alignment search tool

CaM : cell-adhesion molecule

CaMKII : protéine kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline

Ca_v : canal calcium voltage-dépendant

CNAP : compound nervous action potential

DAG : diacylglycérol

DIG : digoxigénine

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

DEPC : diéthylpyrocarbonate

DRG : dorsal root ganglion

DSP : diarrheic shellfish poisoning

DST : diarrheic shellfish toxin

EDTA : éthylène diamine tétraacétique

EF1 α : elongation factor 1 alpha

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GR : glutathion réductase

GST : glutathion S-transférase

GTX : gonyautoxine

HAB : harmful algal bloom

HPLC : high performance liquid chromatography

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-éthanesulfonique

HSP : heat shock protein

IP₃ : inositol trisphosphate

IP₃R : inositol trisphosphate receptor
INa : courant sodium voltage-dépendant
K_v : canal potassium voltage-dépendant
LB : luria broth
LWTX : lyngbyatoxine
Na_v : canal sodium voltage-dépendant
NCBI : national center for biotechnology information
NSP : neurotoxic shellfish poisoning
NST : neurotoxic shellfish toxin
ORF : open reading frame
PA : potentiel d'action
PCR : polymerisation chain reaction
PIP₂ : phosphatidylinositol bisphosphate
PKA : protéine kinase dépendant de l'AMPc
PKC : protéine kinase dépendant du calcium
PLC : phospholipase C
PSP : paralytic shellfish poisoning
PST : paralytic shellfish toxins
RCPG : récepteur couplé à une protéine G
REPHY : réseau de surveillance des phycotoxines
RIN : RNA integrity number
RNase : ribonucléase
RNAseq : RNA sequencing
ROS : reactive oxygen species
RT-PCR : reverse transcription polymerisation chain reaction
SDS : dodécylsulfate de sodium
SNP : single nucleotid polymorphism
SSC : saline-sodium citrate
STX : saxitoxine
TipE : temperature-induced paralysis locus E
TTX : tétrodotoxine
Tm : melting temperature ou température de fusion
UTR : untranslated transcribed region

Liste des figures

Figure 1 : Efflorescence de la micro-algue <i>Alexandrium monilatum</i> dans la baie de Chesapeake (Etats-Unis) le long de la rive nord de la rivière York en août 2015.	20
Figure 2 : Augmentation mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines.....	22
Figure 3 : Répartition et concentration maximale annuelle d' <i>Alexandrium</i> sur les côtes françaises (nombre de cellules par litre d'eau de mer) en 2014.	25
Figure 4 : Structure et réactions de biotransformation des toxines paralysantes (PST).....	27
Figure 5 : Potentiel d'action (PA) mesuré à partir d'axone de calmar et évolution des conductances Na^+ et K^+ . 32	
Figure 6 : Les différentes conformations des canaux sodium voltage-dépendant (Na_v) et potassium voltage-dépendant (K_v) lors des différentes phases du potentiel d'action	33
Figure 7 : Structure de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant chez les vertébrés	35
Figure 8 : Caractéristiques des différentes isoformes de la sous-unité α du Na_v chez les mammifères	37
Figure 9 : Structure des sous-unités β du canal sodium voltage-dépendant chez les vertébrés.	40
Figure 10 : Structure de la sous-unité TipE du canal sodium voltage-dépendant chez <i>Drosophila</i>	41
Figure 11 : Représentation schématique du modèle de « l'hélice coulissante » ou « la vis hélicoïdale ».....	43
Figure 12 : Structure, filtre de sélectivité et site de fixation de la TTX du canal sodium voltage-dépendant	44
Figure 13 : Représentation schématique de la sous-unité α du Na_v et des sites récepteurs de toxines.....	46
Figure 14 : Structure moléculaire de la tétródotoxine (TTX) et de la saxitoxine (STX).	47
Figure 15 : Représentation simplifiée de la transcription et de la traduction	51
Figure 16 : Représentation schématique de la mutation ponctuelle.	52
Figure 17 : Mécanisme de la réaction d'épissage et splicéosome.	55
Figure 18 : Les différents types d'épissage alternatif	56
Figure 19 : Représentation simplifiée de l'édition A→I d'un ARN pré-messager	60
Figure 20 : Interactions protéine-protéine associées au Na_v comprenant des protéines impliquées dans la régulation et des protéines liées à la localisation cellulaire	61
Figure 21 : Anatomie générale de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> dans sa valve gauche.	69
Figure 22 : Schéma du système nerveux de <i>Crassostrea gigas</i> vu du côté droit	70
Figure 23 : Schéma des ganglions viscéraux de <i>Crassostrea virginica</i> observés à travers la chambre épibranchiale.....	71
Figure 24 : Photographie des ganglions viscéraux (en pointillés) de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	72
Figure 25 : Coupe histologique d'un ganglion viscéral d'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	72
Figure 26 : Photographie du connectif cérébroviscéral (en pointillés) de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	73
Figure 27 : Cellules nerveuses isolées du ganglion viscéral d' <i>Ostrea edulis</i>	74
Figure 28 : Schéma simplifié de l'anatomie interne de l'huître creuse <i>C. gigas</i> dans sa valve inférieure et les différents tissus prélevés.	84
Figure 29 : Observation des ganglions viscéraux et des nerfs d'huître creuse <i>C. gigas</i>	85
Figure 30 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 1 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et expression des ARNm du Na_v	87

Figure 31 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 2 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et expression des ARNm du Na _v	88
Figure 32 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 3 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et sensibilité des nerfs.....	89
Figure 33 : Stratégie d'amplification de la séquence d'ADNc totale de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant de <i>C. gigas</i>	93
Figure 34 : Carte de restriction du plasmide pCR™4-TOPO® (Invitrogen).	96
Figure 35 : Représentation schématique des étapes de l'hybridation <i>in situ</i>	102
Figure 36 : Représentation schématique des coupes histologiques réalisées sur une huître <i>C. gigas</i>	103
Figure 37 : Les nerfs cérébroviscéraux de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> dans sa valve gauche	110
Figure 38 : Dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement du potentiel d'action nerveux composé (CNAP) de l'huître.	112
Figure 39 : Description des paramètres mesurés sur le potentiel d'action nerveux composé (CNAP).	113
Figure 40 : Représentation schématique des étapes du dosage de toxines par le test ELISA compétitif direct	115
Figure 41 : Ovocytes défolliculés de xénopes <i>Xenopus laevis</i> aux stades V et VI de maturation.	118
Figure 42 : Préparation de l'électrode et injection des ovocytes	120
Figure 43 : Phylogénie du maximum de vraisemblance des sous-unités α de la famille des canaux sodium voltage-dépendant.....	127
Figure 44 : Représentation schématique de la sous-unité α du Na _{v1} de <i>C. gigas</i>	128
Figure 45 : Alignement des séquences protéiques de la sous-unité α de CgNa _{v1} : la séquence de référence CGI_10001852, le variant A, le variant B et le variant C.	130
Figure 46 : Expression de la sous-unité α du Na _v chez l'huître <i>C. gigas</i> en fonction du stade de développement.	132
Figure 47 : Quantification relative des ARNm de la sous-unité α de CgNa _{v1} par rapport au gène EF1α mesurée par PCR en temps réel dans les tissus de l'huître <i>C. gigas</i>	133
Figure 48 : Localisation tissulaire de la sous-unité α du Na _{v1} de <i>C. gigas</i> par hybridation <i>in situ</i> en utilisant le marquage à la digoxigénine (DIG)	134
Figure 49 : Représentation schématique de coupe histologique des différents nerfs de <i>Crassostrea virginica</i> . 136	
Figure 50 : Épissage alternatif de la sous-unité α du Na _{v1} de <i>C gigas</i>	141
Figure 51 : Quantification relative des variants d'épissage A, B et C de la sous-unité α de CgNa _{v1} par rapport aux gènes EF1α et GAPDH mesurée par PCR en temps réel dans les tissus de l'huître <i>C. gigas</i>	142
Figure 52 : Accumulation de PST dans la glande digestive des huîtres <i>C. gigas</i> exposées à différentes souches d' <i>A. minutum</i> , Daoulas 1257 pour l'expérience 1 et AM89BM pour l'expérience 2.	147
Figure 53 : Profil toxinique des PST présents dans la glande digestive des huîtres <i>C. gigas</i> exposées à la souche toxique d' <i>A. minutum</i> Daoulas 1257 pendant 4 jours (exp1)	148
Figure 54 : Profil toxinique des PST présent dans la glande digestive des huîtres <i>C. gigas</i> exposées à la souche toxique d' <i>A. minutum</i> AM89BM pendant 6 jours (exp2).....	149
Figure 55 : Relation entre les niveaux d'expression des ARNm des variants de CgNa _{v1} dans le muscle strié et les ganglions viscéraux et l'accumulation de PST dans la glande digestive de l'huître <i>C. gigas</i> expérimentalement exposée à <i>Alexandrium minutum</i> (expériences 1 et 2).....	151
Figure 56 : Stimulation et maintien des nerfs d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> pour obtenir des CNAP.....	159
Figure 57 : Sensibilité à la STX des nerfs isolés à partir d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> sauvages et (*) issues de l'ostréiculture.....	160

Figure 58 : Comparaison des CNAP enregistrés à partir des nerfs d'huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins).....	163
Figure 59 : Effets de la STX sur les nerfs résistants (STX-R) d'huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins).....	165
Figure 60 : Effets de la STX sur les nerfs sensibles (STX-S) d'huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins).....	166
Figure 61 : Relations réponse-intensité des nerfs sensibles (STX-S) et résistants (STX-R) d'huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées, B et D) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins, A et C) avant (non-traitées, A et B) et après (prétraitées, C et D) leur prétraitement avec la STX 8,39 µM.....	169
Figure 62 : Quantité de PST bioaccumulée dans les huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées)	170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sensibilité des organismes à la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine (STX)	49
Tableau 2 : Les différents exons impliqués dans l'épissage alternatif de la sous-unité DmNa _v de <i>D. melanogaster</i>	59
Tableau 3 : Résumé des expérimentations réalisées au cours de la thèse	83
Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des 4 fragments de la séquence d'ADNc.	93
Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence d'ADNc du Na _v de <i>C. gigas</i> par étapes.....	94
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.	99
Tableau 7 : Séquences protéiques de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique.	105
Tableau 8 : Amorces utilisées pour l'amplification des sites de fixation aux PST des domaines I-IV.	107
Tableau 9 : Inventaire et description des séquences du Nav de <i>C. gigas</i> dans différentes bases de données RNAseq et ADN.....	125
Tableau 10 : Analyse du polymorphisme nucléotidique des régions entourant les sites de liaison aux PST pour chaque domaine (DI à DIV) de la sous-unité α du Na _v 1 de <i>C. gigas</i>	139
Tableau 11 : Caractéristiques structurales des variants d'épissage de la sous-unité α du Na _v 1 de <i>C. gigas</i>	140
Tableau 12 : Paramètres du CNAP déterminés à partir de nerfs d'huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées, n=25) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins, n=21) et non soumis à la STX.....	164
Tableau 13 : Paramètres du CNAP déterminés à partir de nerfs sensibles (STX-S) et résistants (STX-R) à la STX isolés des huîtres nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées, n=18) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins, n=18), avant le prétraitement des nerfs à la STX.	167
Tableau 14 : Paramètres des relations réponse-intensité établies à partir de nerfs « sensibles » (STX-S) et « résistants » (STX-R) à la STX isolés à partir d'huîtres issues de l'ostréiculture nourries avec <i>A. minutum</i> (huîtres exposées, n=12) ou <i>T. lutea</i> (huîtres témoins, n=10), avant (non traité) et après prétraitement des nerfs avec de la STX 8,39 μM.....	168
Tableau 15 : Toxicité évaluée pour un bloom monospécifique d' <i>Alexandrium minutum</i> AM89BM ou Daoulas 1257	175
Tableau 16 : Sensibilité des nerfs et blocage de leur potentiel d'action nerveux composé face à la saxitoxine chez plusieurs espèces de bivalves marins et un bivalve d'eau douce.	176
Tableau 17 : Paramètres utilisés lors des différentes expériences d'exposition réalisées au cours des travaux de thèse.....	187

Avant-propos

Ces travaux de cette thèse s'intègrent pleinement dans le projet ACCUTOX 13-CESA-0019 (2013-2017) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme CESA¹. Ce projet ACCUTOX porté par le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539 LEMAR) s'intéresse aux facteurs déterminant le niveau d'accumulation des toxines paralysantes PST chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Il a pour premier objectif de décrire et comprendre le déterminisme d'accumulation des PST chez les huîtres et ainsi mieux appréhender la variabilité individuelle de bioaccumulation des PST chez l'huître creuse *C. gigas*. Pour ceci, deux hypothèses non exclusives ont été émises. Cette variabilité pourrait provenir : i) d'un polymorphisme du canal sodium voltage-dépendant, cible des PST; ii) d'une plasticité physiologique des huîtres. Le deuxième objectif consiste à développer un modèle intégratif de l'accumulation de toxines et de la détoxification en prenant en compte les paramètres physiologiques des huîtres. Plus précisément, cette thèse, financée par la région Bretagne (bourse ARED, 50%) et l'Université de Bretagne Occidentale (50%), correspond à la tâche 2 du projet et permet de répondre à une partie du premier objectif, qui se concentre sur la relation entre l'accumulation de toxines et le polymorphisme du canal sodium voltage-dépendant chez l'huître creuse *C. gigas*.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction de Philippe Soudant et Pierre Boudry et l'encadrement scientifique de Caroline Fabioux et Hélène Hégaret au sein du LEMAR et de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) de l'Université de Bretagne Occidentale.

Les travaux sur le polymorphisme de CgNa_v (Chapitre 3) ont été financés en partie par le LabexMer (Axe 6) sous la forme d'un « petit projet à risques » ReGiTox.

Les travaux du chapitre 4 sur l'électrophysiologie des nerfs d'huîtres et sur les essais d'expression hétérologue du gène CgNa_v dans les ovocytes de xénope ont été réalisés en collaboration avec Evelyne Benoit et Romulo Araoz, respectivement, à l'Institut de

¹ Contaminants et Environnements : Santé, Adaptabilité, Comportements et Usages

Neurosciences Paris-Saclay, UMR 9197 CNRS/Université Paris-Sud et au CEA de Saclay, DSV/iBiTec-S/SIMOPRO, Equipe « Toxines, Récepteurs et Canaux ioniques » à Gif sur Yvette. Pour ces travaux et mes missions, j'ai bénéficié d'un financement du GdR Phycotox (petit projet exploratoire PhaGiTox). Ma participation au congrès International Society of Toxinology à Oxford a été financée en partie par une bourse de mobilité doctorante du LabexMer (Axe 6).

CHAPITRE 1

INTRODUCTION



Introduction générale

I. Les micro-algues toxiques et les toxines paralysantes

1. Micro-algues et efflorescences

Les micro-algues sont des organismes de taille microscopique, eucaryotes et unicellulaires. Elles sont photosynthétiques, mais peuvent aussi être hétérotrophes. Elles vivent en suspension dans la colonne d'eau et constituent ainsi la base des réseaux trophiques aquatiques. Des proliférations importantes de micro-algues surviennent naturellement, elles sont généralement localisées au niveau des zones côtières en milieu marin. Pendant ces efflorescences ou « blooms », les concentrations peuvent atteindre des millions de cellules par litre d'eau de mer (Figure 1). Ces efflorescences peuvent provoquer des perturbations de l'environnement avec une accumulation de biomasse phytoplanctonique, provoquant l'hypoxie, voir l'anoxie et l'ombrage de la végétation submergée (Sellner *et al.*, 2003 ; Glibert *et al.*, 2005).



Figure 1 : Efflorescence de la micro-algue *Alexandrium monilatum* dans la baie de Chesapeake (Etats-Unis) le long de la rive nord de la rivière York en août 2015.

Ces vingt dernières années, il a été constaté une augmentation de la fréquence et de l'intensité de ces efflorescences dans les zones littorales (Hallegraeff, 2004), notamment le long des côtes françaises. Cela s'expliquerait principalement par des facteurs anthropiques comme l'eutrophisation du milieu (Anderson *et al.*, 2002 ; Heisler *et al.*, 2008).

2. Micro-algues toxiques

Sur environ 30 000 espèces de micro-algues décrites et capables de former des efflorescences, certaines sont connues pour produire des toxines, qui sont appelées phycotoxines (Smayda, 1997 ; Whittle et Gallacher, 2000 ; Hallegraeff, 2004). Elles appartiennent majoritairement aux groupes des dinoflagellés et des diatomées (Sellner *et al.*, 2003 ; Zaccaroni et Scaravelli, 2008). Les efflorescences de ces micro-algues toxiques ont augmenté en nombre ces dernières années (Figure 2). Elles peuvent avoir des impacts sanitaires, socio-économiques et écologiques importants. Elles peuvent être responsables d'une diminution de la qualité de l'eau via une forte eutrophisation, une perte des herbiers et des espèces benthiques ou encore d'une forte hypoxie du milieu (Manivasagan et Kim, 2015). Des poissons et des bivalves d'intérêt commercial peuvent être contaminés en ingérant ces micro-algues. Les toxines s'accumulent dans les tissus des animaux, particulièrement au niveau du tissu digestif, on parle alors de bioaccumulation. Ces effets néfastes peuvent se répercuter sur l'ensemble de la chaîne trophique via la bioaccumulation des toxines (Burkholder, 1998 ; Zaccaroni et Scaravelli, 2008).

Les deux conséquences majeures concernent : i) la santé humaine, lors de la consommation des poissons ou bivalves contaminés (Van Dolah, 2000 ; Hégaret *et al.*, 2009b ; Manfrin *et al.*, 2012) ; ii) l'économie liée à la pêche ou à la conchyliculture, en raison de la fermeture de la pêche ou des interdictions de vente (Sellner *et al.*, 2003). Une estimation de l'impact économique lié aux efflorescences toxiques aux Etats-Unis durant la période 1987-1992 a reporté un coût annuel moyen de 46 millions de dollars (Hoagland *et al.*, 2002). Les espèces de bivalves d'intérêt commercial les plus exposées aux phycotoxines sont les moules, les pétoncles, les palourdes, les coques et les huîtres. La production de bivalves est un composant majeur de l'économie pour de nombreuses régions côtières françaises. Il est donc nécessaire de procéder à la surveillance des phycotoxines, de la qualité de l'eau et de la composition planctonique.

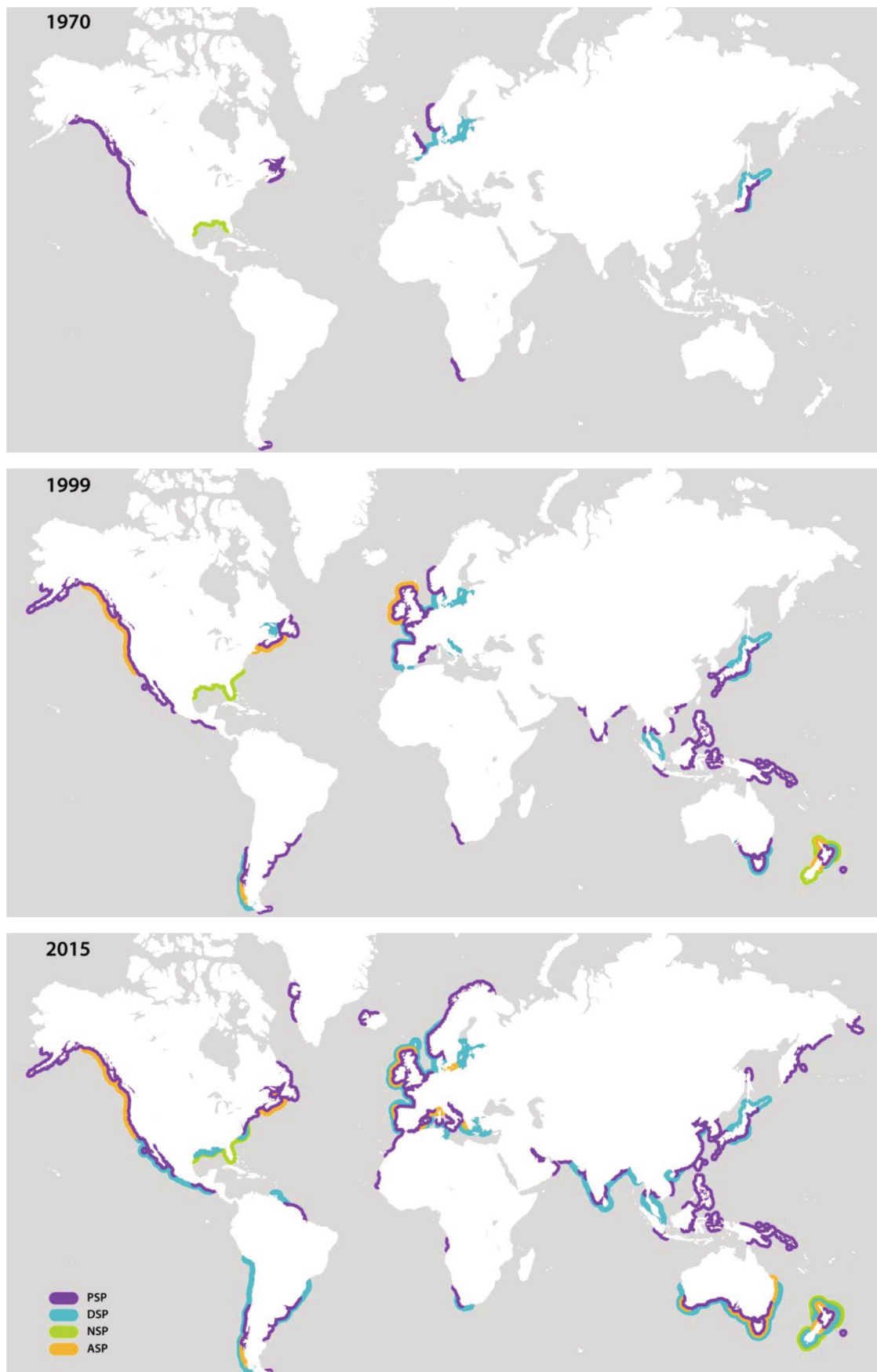


Figure 2 : Augmentation mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines. Les traits de côtes correspondent aux zones où les toxines ont été détectées à des niveaux ayant un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. PSP: paralytic shellfish poisoning, DSP: diarrhetic shellfish poisoning, NSP: neurotoxic shellfish poisoning, ASP: amnesic shellfish poisoning. Modifié d'après [Van Dolah \(2000\)](#) et [WHOI 2007](#)[®].

3. Les principales phycotoxines et les symptômes associés

Il existe différentes phycotoxines associées aux différents types de micro-algues. Elles sont répertoriées selon les symptômes qu'elles provoquent sur la santé humaine principalement. Ces différents symptômes sont les suivants : l'intoxication paralysante « paralytic shellfish poisoning » (PSP), l'intoxication neurotoxique « neurotoxic shellfish poisoning » (NSP), l'intoxication diarrhéique « diarrhetic shellfish poisoning » (DSP) et l'intoxication amnésique « amnesic shellfish poisoning » (ASP). De nouvelles toxines marines, appelées toxines émergentes, ont également été identifiées, comme les ciguatoxines (en Europe), les palytoxines et les imines cycliques. A ce jour, il n'existe pas assez d'informations sur l'activité de toutes les toxines méconnues, sur leur toxicité et sur leur risque pour la santé humaine pour les soumettre aux contrôles de législation.

3.1. Les diarrhetic shellfish poisoning (DSP) ou intoxications diarrhéiques par les fruits de mer

Cette intoxication est due à des toxines diarrhéiques (diarrhetic shellfish toxins, DST) produites par les dinoflagellés des genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*. Les toxines diarrhéiques sont principalement composées d'acide okadaïque et de ses dérivés les dinophysistoxines et des azaspiracides (Yasumoto *et al.*, 1985). Décrites pour la première fois en 1976 au Japon, elles ont depuis entraîné des milliers de cas d'intoxication non mortelle (Hallegraeff *et al.*, 1995). La répartition globale des DSP inclut l'Europe de l'Ouest, le Japon, la Thaïlande, le Chili, le Canada, la Nouvelle-Zélande et l'Australie (Van Dolah, 2000 ; Reguera *et al.*, 2012). L'intoxication se traduit par des troubles gastro-intestinaux, entraînant vomissements et diarrhées, qui disparaissent en quelques jours. La norme réglementaire CE n°853/2004 établit que la charge en toxines ne doit pas dépasser 16 µg/100 g de chair de coquillage pour l'acide okadaïque.

3.2. Les neurotoxic shellfish poisoning (NSP) ou intoxications neurotoxiques par les fruits de mer

Les NSP sont des intoxications provoquées par des neurotoxines (neurotoxic shellfish toxins, NST) produites par les dinoflagellés du genre *Karenia*. Les neurotoxines sont composées de brevétoxines. Elles ont été recensées pour la première fois en 1844 dans le Golfe du Mexique et le long de la côte est de la Floride, où elles sont toujours présentes ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (Hallegraeff, 2004 ; Plakas et Dickey, 2010). Elles provoquent un syndrome gastro-intestinal suivi de troubles neurologiques de type paresthésies. Outre les NSP, les brevétoxines sont aussi responsables de troubles respiratoires lorsqu'elles sont inhalées sous forme d'aérosols, formés par l'action des vagues lors d'efflorescence. Le seuil réglementaire est de 80 µg/100 g de chair de coquillage.

3.3. Les amnesic shellfish poisoning (ASP) ou intoxications amnésiques par les fruits de mer

Les ASP sont les seules intoxications causées par des diatomées notamment par le genre *Pseudo-nitzschia* (Van Dolah, 2000 ; Hallegraeff, 2004). Elles sont dues à une toxine amnésique (amnesic shellfish toxin, AST), l'acide domoïque. Découverte en 1987 au Canada, elle a provoqué 153 cas d'intoxications, dont trois mortels (Bates et al., 1989). La répartition des ASP est concentrée principalement en Amérique du Nord et au Canada et de façon moins importante en Europe, en Océanie et au Japon (Hallegraeff, 2004). Elles provoquent également des diarrhées et des vomissements, quelques heures après l'ingestion, ainsi que des problèmes neurologiques pouvant entraîner l'amnésie, puis la mort dans les cas les plus sévères. Le seuil réglementaire est de 2 mg/100 g de chair de coquillage.

3.4. Les paralytic shellfish poisoning (PSP) ou intoxications paralysantes par les fruits de mer

Les PSP sont dus à des toxines dites paralysantes (paralytic shellfish toxins, PST) produites par les dinoflagellés du genre *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*. Ces

toxines sont composées de saxitoxine (STX) et de ses dérivés (voir paragraphe 4). Avant les années 1970, leur répartition se limitait à l'Europe, l'Amérique du Nord et au Japon. Elles sont aujourd'hui présentes en Amérique du Sud, en Australie, en Asie du Sud-Est, ainsi qu'en Afrique du Sud ([Van Dolah, 2000](#)) (Figure 2). Lors de l'ingestion de coquillages ou de poissons contaminés, les symptômes liés aux PST sont tout d'abord gastro-intestinaux et apparaissent dans les 30-60 minutes après l'ingestion de coquillages contaminés. Des perturbations de la sensibilité du visage peuvent également être observées, suivies d'effets paralysants. Le taux de mortalité est de 8-10 % et 2000 cas d'intoxications sont rapportés chaque année dans le monde ([Sierra-Beltrán et al., 1998](#) ; [Van Dolah, 2000](#)). Il n'existe pas d'antidotes aux saxitoxines mais des traitements palliatifs sont utilisés dans le cas de problèmes respiratoires. La prévention des intoxications par les PST est donc nécessaire. La charge en toxine est soumise à une réglementation sanitaire définie par l'Union Européenne (règlement CE n°853/2004) qui interdit la vente des coquillages qui présentent plus de 80 µg éq. STX/100 g de chair de coquillage. Sur les côtes Françaises, les efflorescences sont principalement dues aux dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Figure 3) ([Lassus et al., 2004](#)).

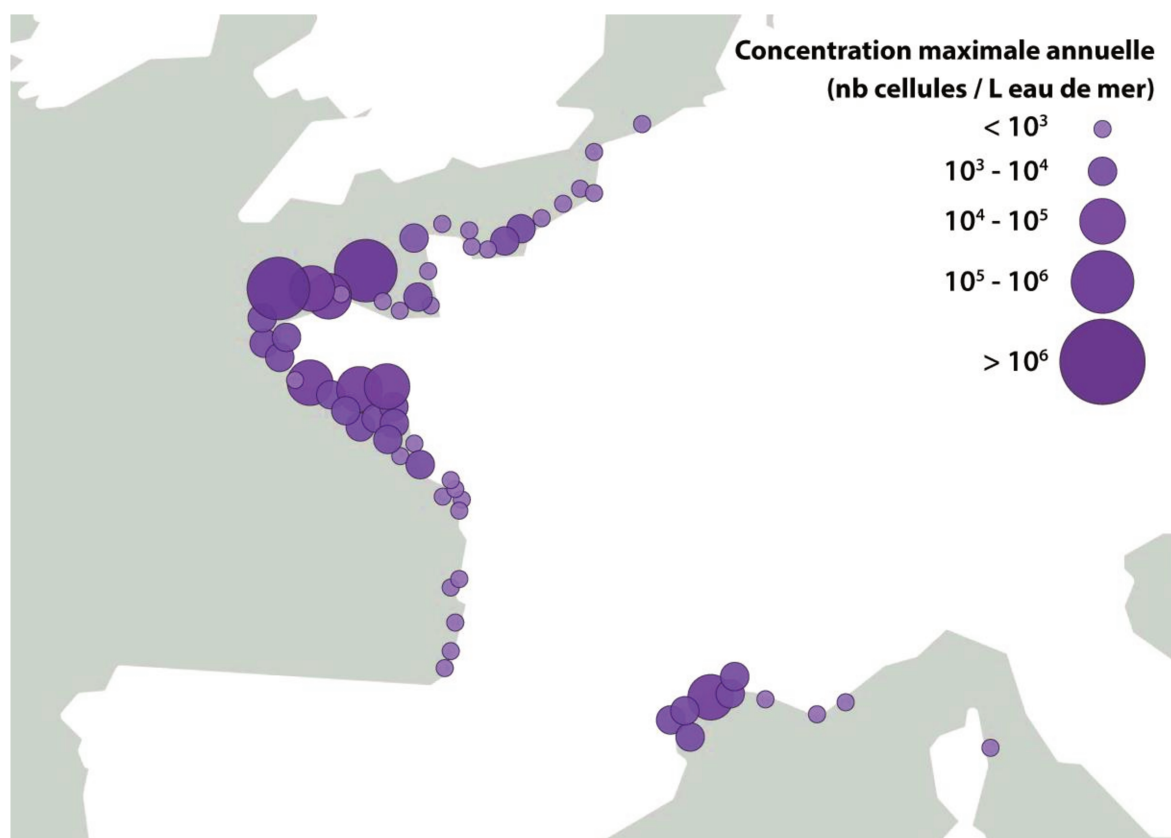


Figure 3 : Répartition et concentration maximale annuelle d'*Alexandrium* sur les côtes françaises (nombre de cellules par litre d'eau de mer) en 2014. D'après les données du réseau de surveillance REPHY-IFREMER.

En France et particulièrement en Bretagne, des efflorescences d'*A. minutum* ont été observées depuis 1988 (Fremy *et al.*, 1989). Pendant l'été 2012, une efflorescence toxique a eu lieu dans la rade de Brest, entraînant une importante contamination des coquillages par les PST et une interdiction de leur vente. Ce fut le premier cas de contamination des coquillages par ces toxines enregistré dans la rade de Brest, provoquant la fermeture de l'exploitation dans cette zone, avec une concentration maximale d'*Alexandrium minutum* de 41×10^6 cellules/L et une concentration de toxines atteignant 800 µg éq. STX/100 g de chair de coquillage, soit 10 fois le seuil sanitaire (Chapelle *et al.*, 2015).

4. Les toxines paralysantes

La saxitoxine (STX) a été isolée pour la première fois en 1957, à partir de tissu de la palourde *Saxidomus giganteus*, d'où elle tire son nom (Schantz *et al.*, 1957). La famille des STX comprend 57 analogues (Wiese *et al.*, 2010) dont la structure de base est constituée de trois cycles : pyrimidine, imidazole et pyrrole (Figure 4). Les STX sont classées en quatre grands groupes déterminés selon leur structure chimique : les saxitoxines (STX et NéoSTX), les gonyautoxines (GTX), les toxines C et les lyngbyatoxines (LWTX) isolées de la cyanobactérie *Lyngbya wollei* aux Etats-Unis. Des dérivés décarbamoylés ont également été identifiés (dcSTX et dcGTX) (Llewellyn, 2006). Les STX sont solubles dans l'eau mais pas dans les solvants organiques et sont stables en milieu légèrement acide mais sont oxydables à pH alcalin. Des transformations chimiques de certains analogues de la STX peuvent survenir dans le milieu naturel, conduisant à des analogues plus toxiques et pouvant augmenter la toxicité des coquillages contaminés (Jones et Negri, 1997).

Les organismes marins producteurs de STX sont représentés par une vingtaine d'espèces de dinoflagellés, tandis que dans les eaux douces ce sont les cyanobactéries qui produisent la STX (Llewellyn, 2009). Les organismes marins filtreurs, comme les bivalves, sont les premiers à bioaccumuler la STX. Cependant, d'autres organismes marins non-filtreurs, tels que les gastéropodes et les céphalopodes carnivores peuvent bioaccumuler de la STX dans leurs tissus (Chen et Chou, 1998 ; Robertson *et al.*, 2004), ainsi que des crabes appartenant à la famille des Xanthidae (Yasumoto *et al.*, 1983). La STX est également bioaccumulée chez certains vertébrés, principalement des poissons et des amphibiens. Un

cas très connu est celui du poisson globe, qui produit de la tétrodotoxine (TTX), mais qui peut également accumuler de la STX dans ses tissus selon son alimentation ([Kodama et al., 1983](#)).

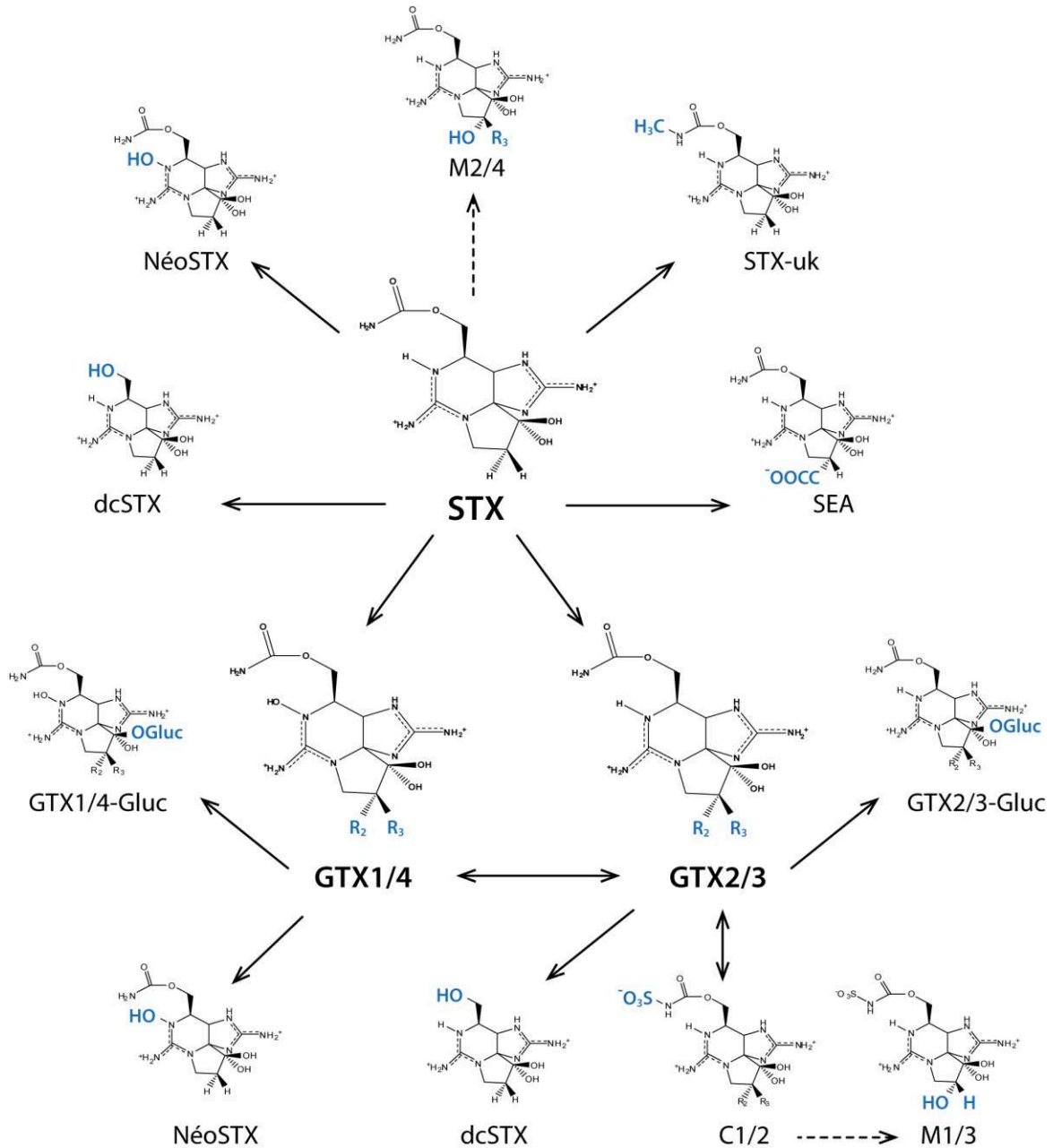


Figure 4: Structure et réactions de biotransformation des toxines paralysantes (PST). Les groupements indiqués en bleu sont ceux qui diffèrent de la saxitoxine (STX). Les lignes pointillées correspondent aux données expérimentales de conversion de toxines. dc-STX : décarbamoylé saxitoxine, GTX : gonyautoxines, SEA : acide 11-saxitoxinethanoïque, STX-uk : carbamoylé-N-méthylsaxitoxine, M1-4 : toxines M, C1-4 : toxines C. Modifié d'après [Wiese et al. \(2010\)](#).

5. Effets des PST sur les bivalves marins

Outre l'accumulation des toxines dans leurs tissus, les micro-algues toxiques peuvent affecter la physiologie des organismes marins, soit directement via le contact des cellules algales avec l'organisme, soit à cause des toxines libérées par les micro-algues lors de leur digestion dans le système digestif. Les micro-algues sont aussi capables de produire des composés extracellulaires qui peuvent avoir des effets hémolytiques, ichtyotoxiques ou encore allélopathiques (Arzul *et al.*, 1999 ; Ford *et al.*, 2008 ; Hégaret *et al.*, 2011). Ces composés extracellulaires peuvent aussi avoir des impacts sur les organismes marins. Il est d'ailleurs parfois difficile de faire la distinction entre les effets dus aux phycotoxines et à ces composés extracellulaires produits par les micro-algues.

Les phycotoxines affectent les bivalves marins à différents niveaux physiologiques. Les PST en particulier peuvent avoir des impacts aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire. Lors de la filtration, les micro-algues productrices de PST entrent en contact direct avec les bivalves. Chez l'huître, le contact avec les tissus avant ingestion peut provoquer plusieurs réponses. Dans un premier temps, une augmentation de la production de mucus peut être observée dans les branchies, traduisant ainsi une réaction de défense face aux cellules d'algues et probablement liée à la présence de composés actifs extracellulaires (Haberkorn *et al.*, 2010b). L'augmentation de mucus par les branchies permettrait d'agglutiner les cellules entre elles et de favoriser leur éjection via les pseudo-fèces². Des modifications du comportement sont également observées chez les bivalves nourris avec des micro-algues toxiques, telles qu'une modification de l'activité valvaire, notamment une augmentation de la fréquence des micro-fermetures (Tran *et al.*, 2010). Des perturbations de l'activité de filtration ont également été observées chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Lassus *et al.*, 2004) et les moules *Mytilus edulis* et *M. chilensis* (Bricelj *et al.*, 1990 ; Navarro *et al.*, 2008). Des modifications de l'activité cardiaque ont aussi été observées chez plusieurs espèces de bivalves (Gainey et Shumway, 1988), ainsi que des paralysies musculaires (Bricelj *et al.*, 2005 ; Hégaret *et al.*, 2007b). Des impacts ont également été mis en évidence sur les hémocytes et sur l'expression des gènes antioxydants

² « Fèces » expulsés avant ingestion

chez *C. gigas* (Haberkorn *et al.*, 2010a ; Fabioux *et al.*, 2015), ainsi que sur l'activité des enzymes antioxydantes chez le pétoncle *Nodipecten subnodosus* (Estrada *et al.*, 2007b). Les PST provoquent également des dommages tissulaires : comme la dégradation des tubules digestifs observée chez la moule *M. edulis* exposée à *A. fundyense* ou encore l'altération du tissu musculaire présente chez l'huître *C. gigas* exposée à *A. minutum* (Galimany *et al.*, 2008 ; Haberkorn *et al.*, 2010a). D'autres études montrent également un effet des micro-algues productrices de PST sur le développement embryonnaire et larvaire de plusieurs espèces de bivalves (Springer *et al.*, 2002 ; Yan *et al.*, 2003 ; Leverone *et al.*, 2006 ; Padilla *et al.*, 2006 ; Shumway *et al.*, 2006). Basti *et al.* (2013) ont montré, chez l'huître perlière *Pinctada fucata*, une réduction significative de la mobilité et de la vitesse des spermatozoïdes, de la viabilité des œufs, de la fécondité et du taux de développement des embryons exposés *in vitro* au dinoflagellé *Heterocapsa circularisquama*. Des études récentes mettent en évidence que l'exposition des gamètes de l'huître *C. gigas* à *A. minutum* entraîne une réduction de la mobilité et du contenu en ATP³, une modification du contenu en ADN des spermatozoïdes (Haberkorn *et al.*, 2010b ; Le Goïc *et al.*, 2013), ainsi qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les ovocytes (Le Goïc *et al.*, 2014).

6. Accumulation des PST par les bivalves marins

Même avec les différents mécanismes de défense utilisés par les bivalves marins, les efflorescences prolongées entraînent une bioaccumulation des toxines dans leurs tissus. La bioaccumulation observée varie selon les couples algues toxiques/bivalves. Cependant, la répartition tissulaire des toxines paralysantes est globalement toujours la même chez les bivalves. Les saxitoxines se concentrent principalement dans la glande digestive avec 65 à 95 % du contenu toxinique total (Bricelj et Shumway, 1998 ; Guéguen *et al.*, 2008). Chez le pétoncle *N. subnodosus* exposé expérimentalement à *Gymnodinium catenatum*, la masse viscérale (comprenant la glande digestive, l'intestin et les palpes labiaux) concentre plus de 80% des toxines, avec par ordre décroissant : la glande digestive, les palpes labiaux, l'intestin, le manteau, les branchies et le muscle (Estrada *et al.*, 2007a). Cet ordre de classement est également observé chez le pétoncle *Placopecten magellanicus* exposé à des

³ Adénosine TriPhosphate

efflorescences naturelles d'*Alexandrium* spp. (Cembella *et al.*, 1994). Il en est de même chez la palourde *Spisula solidissima*, exposée à des efflorescences naturelles, qui concentre la majorité des toxines au niveau de la glande digestive (Shumway *et al.*, 1994).

La charge en toxines va également dépendre des mécanismes d'intégration, de biotransformation et de dépuraction, propres à chaque espèce de bivalves. En effet, la plupart des espèces de bivalves sont capables de dépurier l'intégralité des PST en quelques semaines, tandis que d'autres comme la palourde *S. giganteus*, le pétoncle *Placopecten magellanicus* et la mactre *Spisula solidissima* peuvent retenir les PST pendant plusieurs mois ou années (Bourne, 1965 ; Kvittek et Beitler, 1991 ; Shumway *et al.*, 1994). Les profils toxiques, représentant l'ensemble des dérivés, des bivalves ayant accumulé des PST varient selon la toxicité des algues et selon leurs capacités à métaboliser et transformer les différentes toxines. Les bivalves exposés aux dinoflagellés du genre *Alexandrium* vont présenter des taux élevés de GTX, un dérivé de la STX, contrairement aux bivalves exposés aux dinoflagellés *P. bahamense* et *G. catenatum* qui possèdent peu de GTX (Deeds *et al.*, 2008).

L'accumulation de toxines dans les tissus présente également une forte variabilité interindividuelle. En effet, chez la mye *Mya arenaria*, il a été observé que la charge en toxine totale variait d'un facteur 10 entre les individus d'une même population exposée à une efflorescence naturelle (MacQuarrie et Bricelj, 2008). Par ailleurs, chez l'huître creuse *C. gigas*, une variabilité interindividuelle d'un facteur 80 dans la bioaccumulation de PST a été mesurée dans des huîtres exposées expérimentalement à une souche toxique d'*A. minutum* (Haberkorn *et al.*, 2011).

La variabilité de l'accumulation de PST chez les bivalves pourrait être liée aux différents paramètres physiologiques cités précédemment, ou encore à la cible même des PST. Celle-ci correspond à une protéine transmembranaire appelée le canal sodium voltage-dépendant. L'objectif de la prochaine section est la description du canal sodium voltage-dépendant aux niveaux moléculaire et pharmacologique. Tout d'abord, la structure du canal sera étudiée en décrivant les gènes codant les différentes sous-unités et isoformes qui le composent. Puis, l'influence de la structure du canal sur les fonctions qui lui sont associées

sera développée. Enfin, la pharmacologie moléculaire des canaux face aux toxines paralysantes sera détaillée dans le but de connaître les potentiels effets des PST sur les organismes au niveau moléculaire.

II. Le canal sodium voltage-dépendant

1. Rôle du canal sodium voltage-dépendant

Présent uniquement chez les animaux, le système nerveux a pour rôle de conduire un message nerveux entre les différentes cellules excitables comme les neurones, les myocytes et les cellules neuroendocrines ([Goldin, 2002](#)). La transmission de ce message nerveux ou signal électrique est réalisé grâce à des variations du potentiel membranaire des cellules excitables, appelées « potentiels d'action » (PA), via des conductances de sodium et de potassium (Figure 5). Ce phénomène a été découvert par [Hodgkin et Huxley \(1952\)](#) qui étudiaient le potentiel d'action de l'axone géant de calmar par la technique du voltage-clamp⁴. Ils ont ainsi démontré que les signaux électriques sont initiés par une activation voltage-dépendante du courant sodium, faisant entrer des ions sodium dans la cellule. Les ions sodium et potassium traversent la membrane via des protéines transmembranaires possédant un pore perméable aux ions appelés canaux voltage-dépendant.

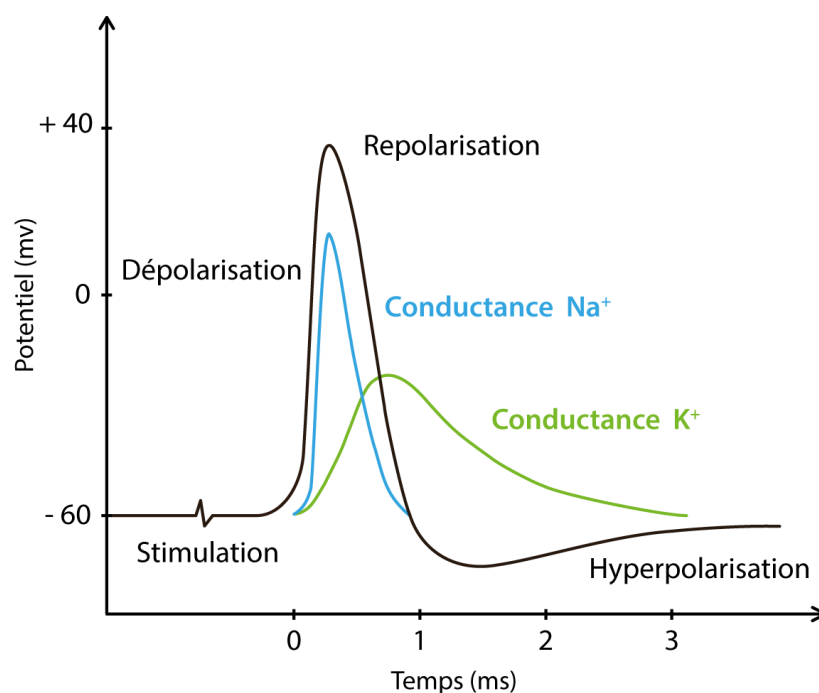


Figure 5 : Potentiel d'action (PA) mesuré à partir d'axone de calmar (Modifié d'après [Bezanilla \(2006\)](#) et évolution des conductances Na^+ et K^+ .

⁴ Technique de mesure du courant ionique en potentiel imposé

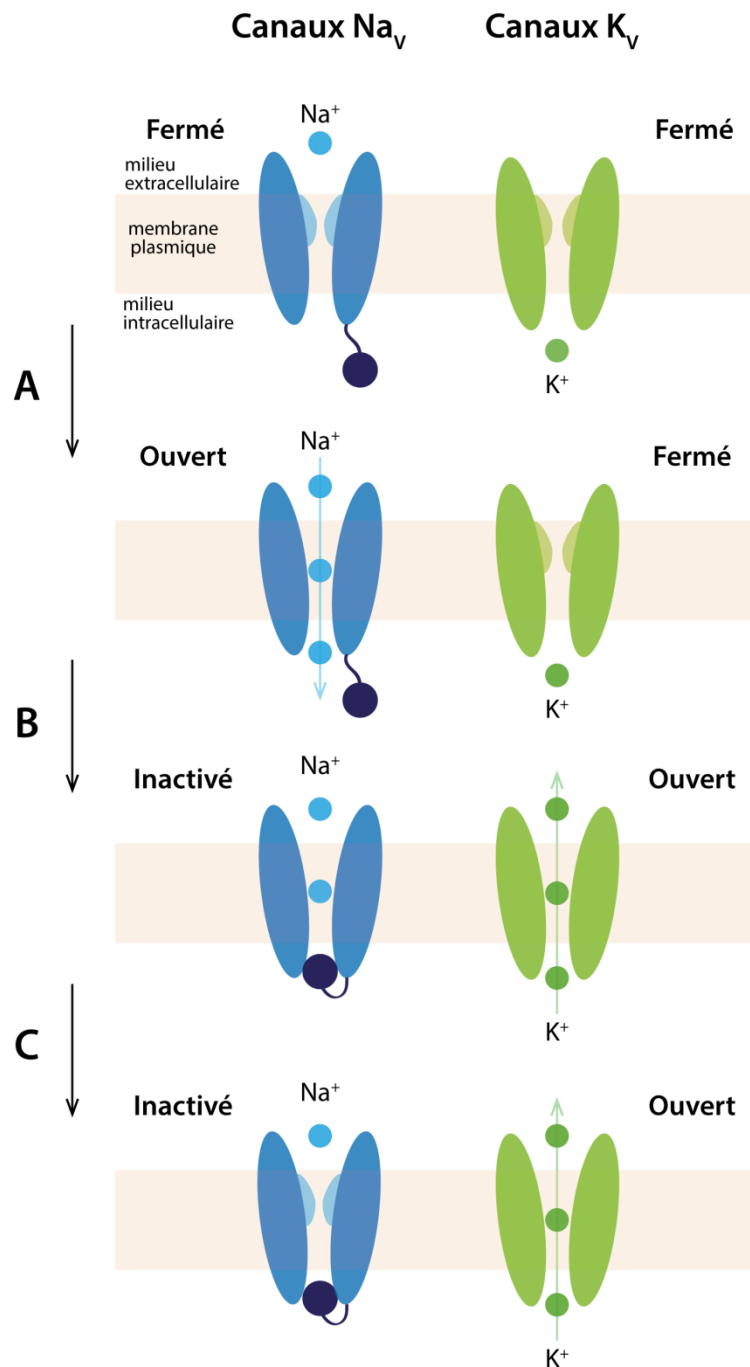


Figure 6 : Les différentes conformations des canaux sodium voltage-dépendant (Na_V) et potassium voltage-dépendant (K_V) lors des différentes phases du potentiel d'action : dépolarisation (A), repolarisation (B) et hyperpolarisation (C).

Le potentiel membranaire des cellules au repos est de -60 mV , il est négatif par rapport au milieu extracellulaire. Lors d'une stimulation, le potentiel membranaire augmente jusqu'au seuil de déclenchement du PA. Les canaux sodium voltage-dépendant (Na_V) sont activés et s'ouvrent (Figure 6). Un flux d'ions sodium entre alors dans la cellule et les charges positives s'accumulent jusqu'à provoquer la dépolarisation de la membrane ([Hodgkin et Huxley, 1952](#)). Les canaux s'inactivent et stoppent le flux d'ions sodium. Cette

dépolarisation de la membrane provoque l'ouverture des canaux potassium voltage-dépendant et la sortie d'ions potassium de la cellule. La diminution de charges positives à l'intérieur de la cellule permet la repolarisation de la membrane. De plus, les canaux potassium ayant une fermeture tardive entraînent l'hyperpolarisation de la membrane (**Bezanilla, 2006**). Ce processus empêche la cellule d'émettre un nouveau PA, il s'agit d'une période réfractaire. Le retour du potentiel membranaire à l'état de repos est possible grâce aux pompes Na/K-ATPase. Le canal sodium voltage-dépendant suit donc 3 stades : fermé, ouvert et inactivé.

2. Structure moléculaire des Na_v

Le canal sodium voltage-dépendant, présent chez tous les animaux, est une protéine transmembranaire formant un canal ionique qui permet le passage des ions sodium à travers la membrane cellulaire. Les canaux sont composés d'une sous-unité principale α (220-260 kDa) associée à des sous-unités auxiliaires β (30-40 kDa) chez les mammifères (**Cestèle et Catterall, 2000**) et TipE chez les insectes (**Feng et al., 1995**).

2.1. La sous-unité α

2.1.1. Identification et structure de la sous-unité α

La sous-unité α a été décrite pour la première fois par **Agnew et al. (1980)** grâce à la purification de la protéine qui se liait à la TTX chez le poisson *Electrophorus electricus*. La structure primaire du canal sodium fut ensuite découverte par **Noda et al. (1984)** également à partir d'*E. electricus*. Des analyses de biologie moléculaire ont ensuite permis d'isoler et de cloner les ADNc codant le canal sodium voltage-dépendant chez le rat, la taille de l'ADNc étant d'environ 5800 pb et la séquence protéique d'environ 1900 acides aminés (**Kayano et al., 1988**). Les domaines fonctionnels impliqués dans l'activation, l'inactivation et la sélectivité ont été identifiés plus récemment (**Heinemann et al., 1992**).

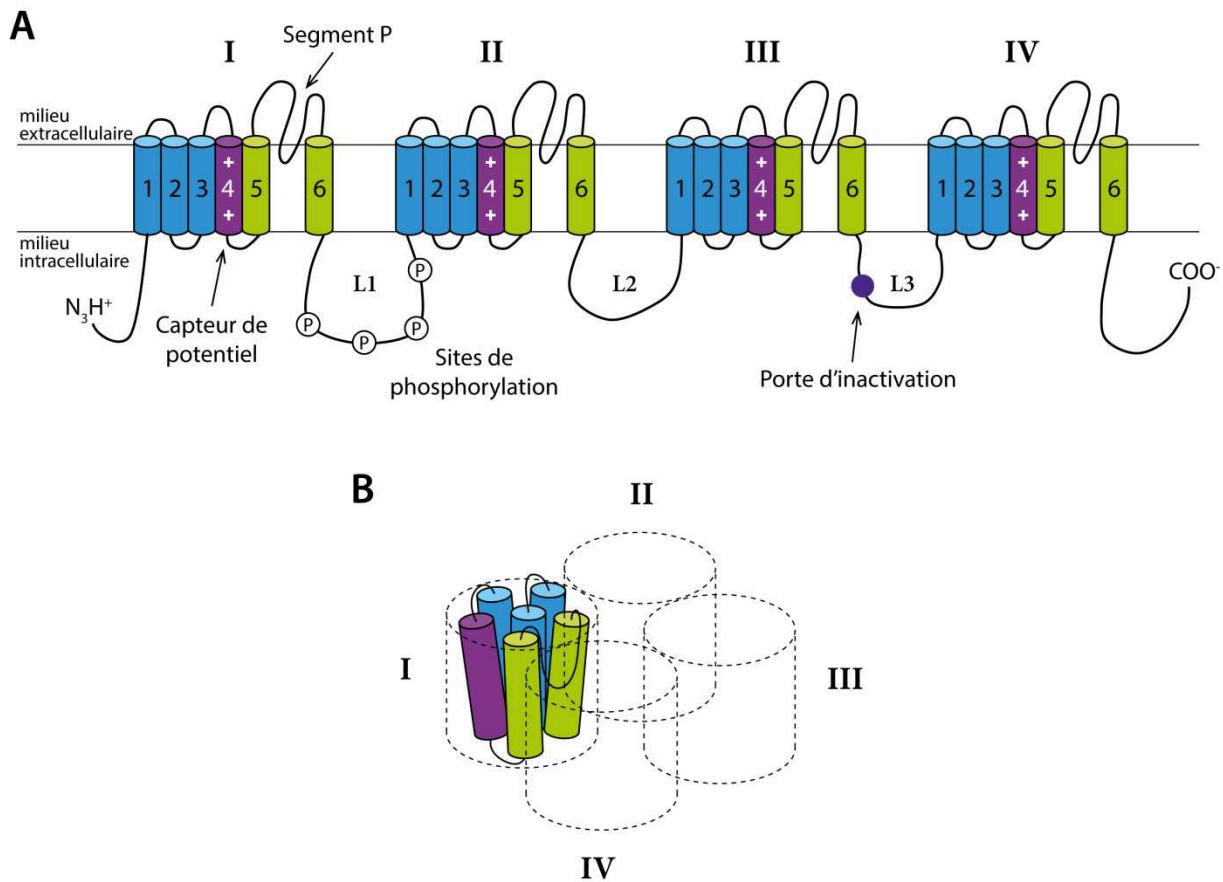


Figure 7 : Structure de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant chez les vertébrés. **A**, Le canal est composé de quatre domaines homologues (I-IV), ayant chacun six segments transmembranaires (1-6). Les segments 1 à 4 (en bleu et violet) de chaque domaine correspondent au domaine de détection du potentiel. Le segment 4 (en violet) est chargé positivement et correspond au capteur de potentiel. Le segment P et les segments 5 et 6 (en vert) de chaque domaine sont responsables de la sélectivité du pore pour les ions Na^+ . Les boucles intracellulaires entre les différents domaines sont nommées L1, L2 et L3. La boucle L1 possède beaucoup de sites de phosphorylation. La porte d'inactivation représentée par un point violet est située sur la boucle L3. **B**, Structure 3D du Na_v représentant les 4 domaines et les segments transmembranaires. Modifié d'après [Nieto et al. \(2012\)](#).

La sous-unité α des Na_v est une protéine très conservée chez tous les organismes où elle a été identifiée. La sous-unité α est composée de 4 domaines homologues (DI-DIV) reliés par des boucles intracellulaires (L1, L2 et L3) et contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1-S6) (Figure 7). Les parties amino- et carboxy-terminales (N-term et C-term) sont intracellulaires. La sous-unité α possède les structures fonctionnelles du pore central, le filtre de sélectivité des ions et les capteurs de potentiel. D'après la description de [Catterall \(2000\)](#), une boucle extracellulaire entre les segments 5 et 6 forme une partie du pore du canal, nommé segment P et contient des acides aminés composant le filtre de sélectivité aux ions sodium. Les segments 1 à 4 de chaque domaine correspondent au

domaine de détection du potentiel et le segment 4 joue le rôle de capteur de potentiel. Il contient des motifs répétés analogues dans lesquels un résidu lysine ou arginine est suivi de deux acides aminés hydrophobes (Noda *et al.*, 1984). Les charges positives des résidus lysine ou arginine, appelées « gating charges », se déplacent à travers le champ électrique lors de la modification du potentiel de membrane, modifiant la conformation du canal et permettant l'ouverture du pore (Catterall, 2010). Le site d'inactivation, localisé dans la boucle intracellulaire L3, contient 3 résidus hydrophobes : l'isoleucine, la phénylalanine et la méthionine (motif IFM) (Vassilev *et al.*, 1988 ; West *et al.*, 1992). Après le mouvement des capteurs de potentiel, le site d'inactivation se branche sur le pore et empêche le flux d'ions sodium à travers le canal. Les mécanismes d'activation et d'inactivation ainsi que le filtre de sélectivité seront détaillés dans le paragraphe 3.

2.1.2. Diversité des sous-unités α chez les vertébrés

Chez les mammifères, neuf gènes codant des sous-unités α ont été caractérisés ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$). Ils sont nommés selon une nomenclature systématique basée sur le modèle de la classification des canaux potassium et calcium (Goldin, 2000). Celle-ci s'applique également aux canaux identifiés chez d'autres vertébrés et invertébrés, comme chez les poissons *Danio rerio* et *Sternopygus macrurus* (Goldin, 2002). Chez les mammifères, une dixième isoforme (Na_x) possède des fonctions similaires, mais ne partage que 50% d'homologie de séquence avec les autres isoformes. Le capteur de potentiel de la sous-unité Na_x possède moins de résidus acides aminés positifs et le site d'inactivation IFM est absent. Cette isoforme est non-voltage-dépendante et pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie⁵ du sodium extracellulaire (Watanabe *et al.*, 2000). Cette isoforme ne sera pas considérée dans la suite de l'introduction.

Les neuf sous-unités α de Na_v de mammifères se distinguent selon leur homologie de séquence, la localisation chromosomique des gènes, leur profil d'expression tissulaire et leur sensibilité à la TTX et peuvent être classées en quatre groupes (Figure 8) (Ogata et Ohishi, 2002). L'homologie de séquence protéique est importante, environ 80% pour les $\text{Na}_v1.1$, 1.2,

⁵ Processus de régulation maintenant les constantes cellulaires

1.3 et 1.7, mais les neuf isoformes possèdent des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques différentes (Catterall *et al.*, 2005).

Les gènes codant pour les sous-unités α sont exprimés différemment selon les tissus excitables (Figure 8) (Vacher *et al.*, 2008 ; Eijkelkamp *et al.*, 2012). Quatre isoformes, $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$, sont fortement exprimées dans le système nerveux central (SNC) (Goldin, 2001). Les gènes codant pour $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ ont été initialement isolés à partir du SNC de rat (Noda *et al.*, 1986 ; Kayano *et al.*, 1988) et nommés respectivement SCN1A, SCN2A et SCN3A. $Na_v1.1$ a été identifié dans le SNC mais il est également fortement exprimé dans le système nerveux périphérique (SNP). Tandis que $Na_v1.2$ et $Na_v1.3$ sont beaucoup plus exprimés dans le SNC que dans le SNP (Beckh, 1990). $Na_v1.6$ a été isolé à partir de cerveau, de ganglions de la racine dorsale (DRG) et de rétine de rat, ainsi que de cerveau de souris (Burgess *et al.*, 1995 ; Schaller *et al.*, 1995 ; Caldwell *et al.*, 2000). $Na_v1.6$ est l'isoforme la plus exprimée du SNC. La séquence totale codante de $Na_v1.6$ a pu être identifiée chez l'Homme et nommée SCN8A (Plummer *et al.*, 1998).

Relation phylogénétique	Isoforme	Gène	Localisation chromosomique	Distribution tissulaire
	$Na_v1.6$	SCN8A	Chromosome 15	SNP, SNC
	$Na_v1.2$	SCN2A	Chromosome 2	SNC
	$Na_v1.1$	SCN1A		
	$Na_v1.3$	SCN3A		
	$Na_v1.7$	SCN9A		
	$Na_v1.4$	SCN4A	Chromosome 11	Muscle squelettique
	$Na_v1.5$	SCN5A		Muscle cardiaque
	$Na_v1.8$	SCN10A	Chromosome 9	SNP
	$Na_v1.9$	SCN11A		

Figure 8 : Caractéristiques des différentes isoformes de la sous-unité α du Na_v chez les mammifères : relation phylogénétique, gène codant la sous-unité α , localisation chromosomique et distribution tissulaire. SNP : système nerveux périphérique, SNC : système nerveux central. Modifié d'après Catterall *et al.* (2005).

Deux isoformes sont très présentes dans les muscles, $Na_v1.4$ dans le muscle squelettique adulte et $Na_v1.5$ dans les muscles squelettiques dénervés et embryonnaires et dans le muscle cardiaque (Goldin, 2001). $Na_v1.4$ et $Na_v1.5$ ont été initialement isolés à partir de muscle squelettique de rat (Trimmer *et al.*, 1989 ; Kallen *et al.*, 1990). Les gènes codant pour ces deux isoformes sont nommés respectivement SCN4A et SCN5A. $Na_v1.4$ est fortement exprimé dans le muscle squelettique adulte mais très peu dans le muscle squelettique néonatal et pas du tout dans le cerveau ou le cœur (Trimmer *et al.*, 1989). Contrairement à $Na_v1.4$, $Na_v1.5$ est très exprimé dans le cœur (Rogart *et al.*, 1989).

Les trois autres isoformes $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont principalement exprimées dans le SNP et ont été initialement isolées à partir de ganglions de la racine dorsale (DRG) de rat (Akopian *et al.*, 1996 ; Sangameswaran *et al.*, 1997 ; Dib-Hajj *et al.*, 1998). Les gènes codant pour $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont nommés respectivement SCN9A, SCN10A et SCN11A. $Na_v1.7$ est exprimé dans tout le SNP et est présent dans les neurones de DRG, les cellules de Schwann⁶ excitables et les cellules neuroendocrines (Belcher *et al.*, 1995 ; Klugbauer *et al.*, 1995). $Na_v1.8$ est exprimé localement dans les neurones sensoriels des DRG et dans le ganglion trigéminal (ganglion du nerf trijumeau). $Na_v1.9$ est exprimé dans les petites fibres des DRG et également dans le ganglion trigéminal (Dib-Hajj *et al.*, 1999).

2.1.3. Les sous-unités α chez les insectes et autres invertébrés

La structure primaire des canaux Na_v est très étudiée chez les insectes car elle permet de comprendre les relations structure/fonction entre le Na_v et les insecticides (Davies *et al.*, 2007). Les sous-unités α des canaux Na_v d'insectes sont similaires à celles des vertébrés et sont également associées à des sous-unités auxiliaires. Chez *Drosophila melanogaster*, modèle très étudié, c'est le gène « para » qui code pour les sous-unités α , nommée aussi Dm Na_v (Dong, 2007). D'autres arthropodes comme le scorpion et l'araignée, permettent également d'étudier les relations des Na_v avec les toxines, dans un intérêt pharmacologique (Zuo *et al.*, 2006 ; Bosmans *et al.*, 2007 ; Gordon *et al.*, 2007).

⁶ Cellules gliales périphériques fabriquant la gaine de myéline entourant l'axone des neurones

Deux types de gènes codant pour la sous-unité α existent chez les invertébrés, Na_v1 et Na_v2 , tandis que les vertébrés possèdent au moins neuf gènes qui codent tous pour des sous-unités α de la famille Na_v1 (Zakon, 2012). Chez les insectes, deux gènes codant pour des sous-unités α de Na_v (para et DSC1) ont été mis en évidence et classés comme étant de type Na_v1 (Dong, 2007). Des études ont ensuite montré que le gène DSC1 chez la drosophile *D. melanogaster* coderait plutôt pour un nouveau type de canal calcium et non un canal uniquement sélectif aux ions sodium. De plus, chez la blatte *Blattella germanica*, le gène BSC1 (homologue de DSC1) possède également une sélectivité pour les ions calcium (Zhou et al., 2004). Les gènes DSC1 et BSC1 appartiendraient donc aux canaux de types Na_v2 sélectif aux ions calcium et sodium. Les deux canaux Na_v1 et Na_v2 se distinguent principalement selon la composition de leur filtre de sélectivité (détaillé dans le paragraphe 3.2 de cette section). Par ailleurs, le gène du Na_v qui prédomine chez les invertébrés et qui est le gène ancestral chez les vertébrés est Na_v1 . Il est à noter que plusieurs duplications de ce gène ancestral ont permis de générer les différentes isoformes de Na_v1 chez les vertébrés (Goldin, 2002). De plus, d'après des analyses phylogénétiques, il apparaît que les canaux de types Ca_v (calcium voltage-dépendant) et Na_v2 seraient apparus avant les canaux de types Na_v1 (Moran et al., 2015).

2.2. Les sous-unités auxiliaires

2.2.1. Diversité et structure des sous-unités β chez les vertébrés

Les sous-unités β s'associent à la sous-unité α des canaux et permettent la modulation des phases d'activation et d'inactivation. Les sous-unités α sont capables de générer des courants sodium en l'absence de sous-unité β , mais ils présentent des cinétiques différentes. Chez les mammifères, il existe quatre gènes SCN1B, SCN2B, SCN3B et SCN4B codant respectivement pour les sous-unités $Na_v\beta1$, $Na_v\beta2$, $Na_v\beta3$ et $Na_v\beta4$ (Morgan et al., 2000 ; Qu et al., 2001 ; Yu et Catterall, 2003). Ces sous-unités sont divisées en deux groupes selon leur association avec la sous-unité α . $Na_v\beta1$ et $Na_v\beta3$ se lient avec des liaisons non-covalentes, tandis que $Na_v\beta2$ et $Na_v\beta4$ se lient au domaine extracellulaire par des ponts disulfures (Yu et Catterall, 2003 ; Catterall, 2012). Des sous-unités homologues ont été caractérisées chez le poisson *Danio rerio* et sont nommées zbeta1, zbeta2, zbeta4.1 et

zbeta4.2 ([Chopra et al., 2007](#)). $\text{Na}_v\beta 1$ possède un variant, dû à l'épissage alternatif, nommé $\text{Na}_v\beta 1\text{B}$ (précédemment nommé $\text{Na}_v\beta 1\text{A}$) ce qui amène à 5 le nombre total de sous-unité β connues à ce jour ([Kazen-Gillespie et al., 2000](#) ; [Qin et al., 2003](#)). Comme les sous-unités α auxquelles elles sont associées, les sous-unités β sont principalement exprimées dans les neurones centraux et périphériques, les cardiomyocytes et les cellules excitables des muscles squelettiques ([Morgan et al., 2000](#) ; [Yu et Catterall, 2003](#) ; [Maier et al., 2004](#) ; [Vacher et al., 2008](#)). Elles peuvent aussi être exprimées dans des cellules non-excitables comme les cellules souches, gliales et endothéliales vasculaires ([Brackenbury et Isom, 2011](#)).

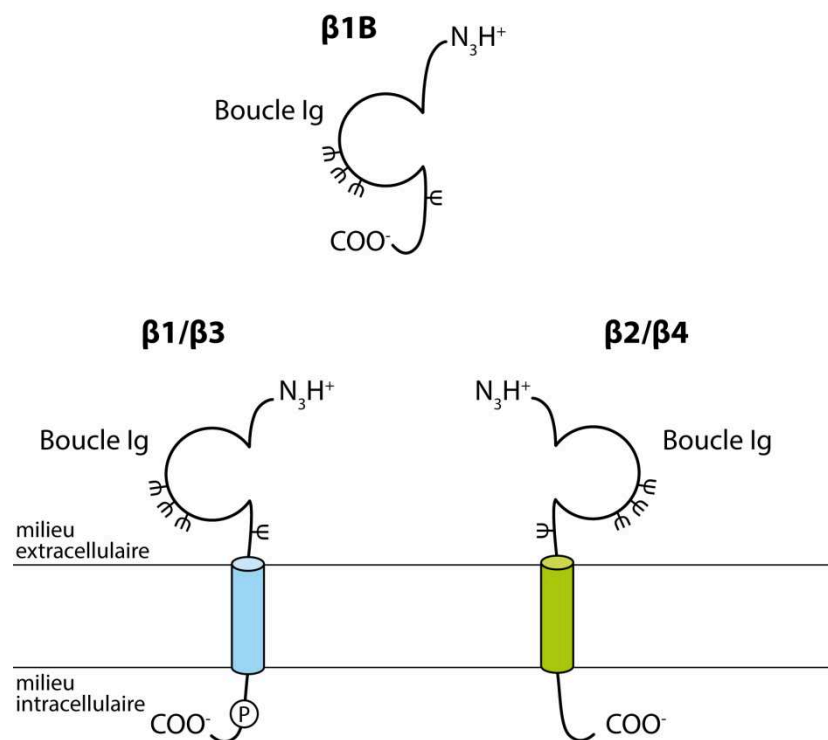


Figure 9 : Structure des sous-unités β du canal sodium voltage-dépendant chez les vertébrés. Les sous-unités $\beta 1$, 2 , 3 et 4 sont composées d'un seul segment transmembranaire et possèdent une boucle immunoglobuline (Ig) extracellulaire. La sous-unité $\beta 1\text{B}$ est cytosolique et possède également la boucle Ig. $\beta 1$ et $\beta 3$ présentent un site de phosphorylation au niveau de l'extrémité C-term et se lient à la sous-unité α par des liaisons non-covalentes. $\beta 2$ et $\beta 4$ se lient à la sous-unité α par des ponts disulfures. P : site de phosphorylation. Ψ : sites de glycosylation. Modifié d'après [Brackenbury et Isom \(2011\)](#).

La structure de la sous-unité β ressemble à celle de la famille des CAM⁷ (cell adhesion molecules) et des études ont montré son rôle dans la localisation et l'immobilisation des canaux sodium voltage-dépendant dans des zones spécifiques des cellules excitables ([Isom et al., 1995](#) ; [Brackenbury et Isom, 2011](#)). La sous-unité β est composée d'un seul domaine

⁷ Protéines intervenant dans les mécanismes de liaison cellulaire

transmembranaire et possède une grande extrémité N-term extracellulaire et une petite extrémité C-term intracellulaire (Figure 9). L'extrémité N-term possède un domaine immunoglobuline (Ig) qui chez $\text{Na}_v\beta 1$ contient des cystéines pouvant former des ponts disulfures avec la sous-unité α (Isom, 2001). Cette extrémité N-term possède également plusieurs sites de N-glycosylation importants dans la régulation des sous-unités β (Isom et Catterall, 1996). La partie C-term peut également interagir avec la sous-unité α . Le domaine Ig des sous-unités β a un rôle de liaison similaire aux CAM qui interagissent avec les protéines extracellulaires (Catterall, 2014).

2.2.2. Les sous-unités β chez les insectes

La structure des sous-unités β des insectes est différente de celle des vertébrés. Une protéine nommée TipE (pour Temperature-induced paralytic E) a été retrouvée chez *D. melanogaster* et possède des fonctions similaires aux sous-unités β de vertébrés (Feng et al., 1995). Plusieurs homologues sont retrouvés chez les insectes, comme le moustique *Anopheles gambiae* et la mouche *Musca domestica* (Tseng et al., 2007). La sous-unité TipE est une protéine transmembranaire possédant deux domaines reliés par une boucle extracellulaire, les extrémités N-term et C-term sont intracellulaires (Figure 10). La sous-unité TipE est associée à la sous-unité para et aide à l'insertion membranaire et la stabilisation des Na_v chez la drosophile (Feng et al., 1995).

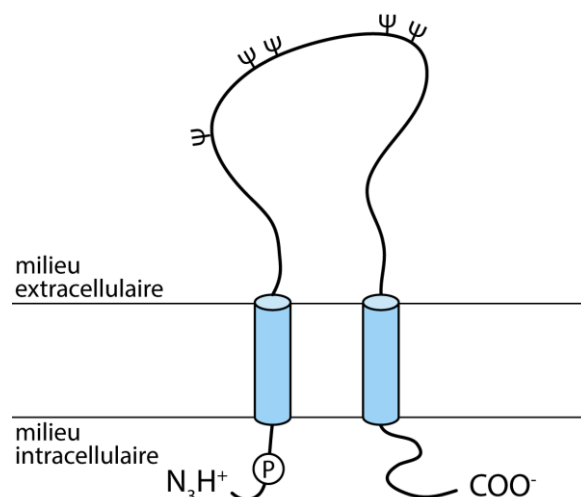


Figure 10 : Structure de la sous-unité TipE du canal sodium voltage-dépendant chez *Drosophila*. La sous-unité est composée de deux segments transmembranaires reliés par une large boucle extracellulaire. Les extrémités N-term et C-term sont intracellulaires. P : site de phosphorylation. Ψ : sites de glycosylation. Modifié d'après Feng et al. (1995).

3. Relation structure-fonction des canaux Na_v

Pendant le potentiel d'action, le Na_v passe par plusieurs états en commençant par l'activation, puis l'inactivation qui facilite la repolarisation au potentiel de repos. En effet, le canal possède deux portes, la porte d'activation et la porte d'inactivation, devant être ouvertes toutes les deux pour que la conduction ait lieu. Le segment 4 qui est le capteur de potentiel joue un rôle important dans l'activation du canal Na_v , via ses charges positives. La boucle intracellulaire L3, située entre les domaines III et IV, est importante dans l'inactivation du canal Na_v . Les ions sodium passent à travers le pore du canal grâce au filtre de sélectivité présent sur les segments P de chaque domaine. Les trois processus clés, l'activation, la sélectivité et l'inactivation, sont détaillés dans les paragraphes suivants.

3.1. Activation

L'activation du canal est possible grâce aux déplacements de charges positives lors de la dépolarisation (Noda *et al.*, 1984). Les charges positives proviennent de motifs répétés d'acides aminés arginine et lysine et sont présentes sur les segments 4 de chaque domaine (de 3 à 7 charges selon le domaine) (Stühmer *et al.*, 1989). La structure des segments 4 est également déterminante dans leur fonction de capteur du potentiel (Kontis *et al.*, 1997). L'ouverture de la porte d'activation nécessite l'activation des segments 4 dans les domaines I, II et III et une activation partielle du segment 4 dans le domaine IV (Chanda et Bezanilla, 2002 ; Armstrong, 2006). En réponse à la dépolarisation, les segments S4 fortement chargés se déplacent vers le milieu extracellulaire, modifiant ainsi la conformation du canal et permettant l'ouverture du pore pour laisser passer les ions sodium (Figure 11). Le déplacement des segments 4 et l'activation du canal sont basés sur un modèle appelé « hélice coulissante » ou « vis hélicoïdale » (Guy et Seetharamulu, 1986 ; Catterall, 2010).

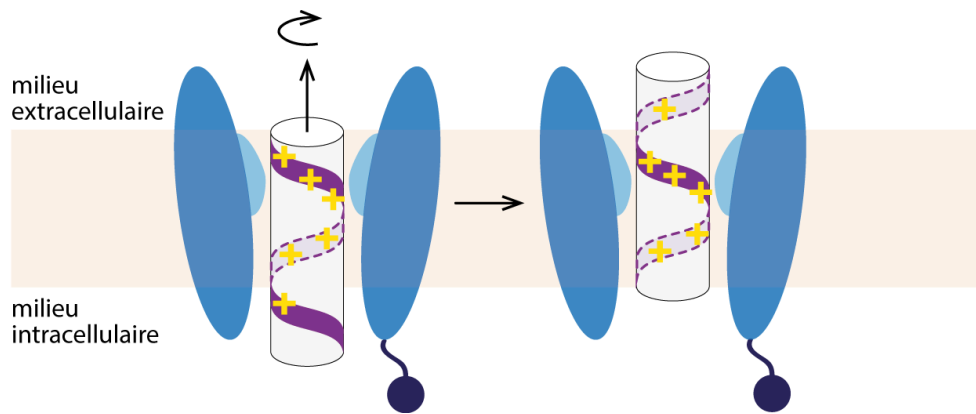


Figure 11 : Représentation schématique du modèle de « l'hélice coulissante » ou « la vis hélicoïdale ». Le segment 4 d'un domaine est ici illustré comme un cylindre rigide dans le canal. Les charges positives représentées par des croix jaunes sont neutralisées par l'interaction avec des charges négatives provenant du canal. Lors de la dépolarisation, les segments 4 se déplacent vers l'extérieur en tournant le long du canal. Modifié d'après [Catterall \(2000\)](#).

3.2. Filtre de sélectivité

Les canaux Na_v ont la capacité de sélectionner les ions sodium parmi le mélange ionique présent dans le milieu extracellulaire. Ils peuvent discriminer les ions sodium des ions potassium ayant la même charge, ainsi que les ions calcium. Le filtre de sélectivité, qui est la partie la plus étroite du pore, contrôle la sélectivité du canal en modifiant sa structure et en entraînant une perte partielle ou totale de sélectivité ([Dudev et Lim, 2014](#)). Quatre acides aminés clés ont été identifiés au sein du filtre de sélectivité des Na_v correspondant au motif DEKA (aspartate, glutamate, lysine et alanine) et formant un anneau interne (Figure 12) ([Terlau et al., 1991](#) ; [Heinemann et al., 1992](#)). Chaque acide aminé provient d'un des 4 segments P des domaines I-IV. Il a été démontré que la mutation du motif DEKA du Na_v en DEEE entraînait une sélectivité du canal pour le calcium ([Heinemann et al., 1992](#)). De plus, des études de mutagenèse dirigée sur chacun des domaines des canaux sodium ont démontré l'importance des acides aminés dans la sélectivité aux ions sodium ([Favre et al., 1996](#) ; [Lipkind et Fozzard, 2008](#)). En effet, chez les insectes une étude a démontré que le glutamate (E) dans le domaine III du canal BSC1 (précédemment classé comme un Na_v) joue un rôle clé dans la sélectivité aux ions calcium ([Zhou et al., 2004](#)). Par ailleurs, une étude réalisée sur les Na_v de rat a permis d'identifier d'autres acides aminés provenant du domaine IV et étant impliqués dans la sélectivité des ions ([Tsushima et al., 1997](#)). Un second

anneau dit externe, participe également à la conductance des ions sodium. Il correspond au motif EEDD chez les mammifères ([Chiamvimonvat et al., 1996](#)).

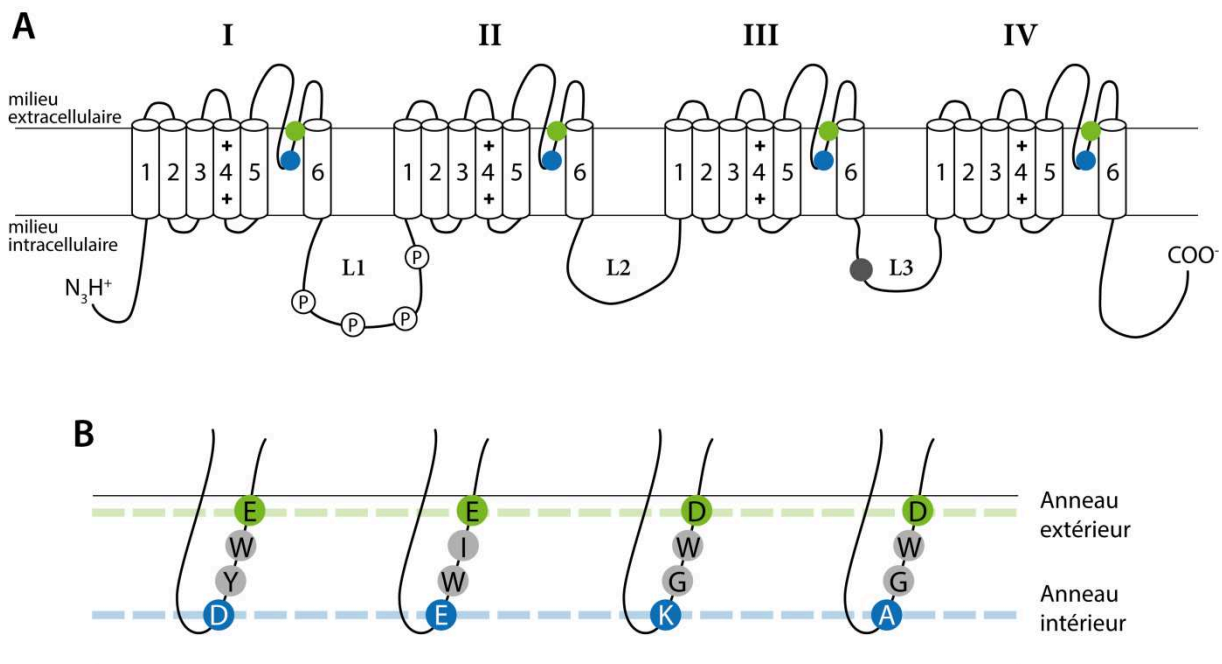


Figure 12 : Structure, filtre de sélectivité et site de fixation de la TTX du canal sodium voltage-dépendant. **A**, Structure du Na_v avec les 4 domaines homologues (I-IV) et les 6 segments transmembranaires (1-6) pour chaque domaine. Le segment P relie les segments 5 et 6 de chaque domaine. En bleu sont représentés les acides aminés de l'anneau intérieur et en vert ceux de l'anneau extérieur. **B**, Partie entrante des segments P de chaque domaine. Les acides aminés responsables du filtre de sélectivité DEKA (cercle bleu) forment l'anneau intérieur (tiret bleu). Les acides aminés EEDD (cercle vert) forment l'anneau extérieur (tiret vert). Les molécules de TTX vont interagir avec les acides aminés des deux anneaux. Modifié d'après [Soong et Venkatesh \(2006\)](#).

Les acides aminés du filtre de sélectivité jouent un rôle clé dans l'affinité de liaison de la TTX et la STX au Na_v ([Noda et al., 1989](#)). Des études d'électrophysiologie ont démontré que ces deux toxines agissaient comme des bloqueurs du filtre de sélectivité au niveau de l'extérieur du pore des Na_v ([Hille, 1984](#)). Les sites récepteurs des toxines TTX et STX comprennent les anneaux intérieur (DEKA) et extérieur (EEDD) du pore ([Soong et Venkatesh, 2006](#)). En effet, les molécules de STX et TTX interagissent avec les acides aminés des deux anneaux et bloquent le pore du canal de façon stérique et/ou électrostatique. Par ailleurs, des études de mutagenèse dirigée sur les acides aminés de l'anneau extérieur ont montré des variations de sensibilité à la TTX ([Satin et al., 1992](#) ; [Du et al., 2009](#)).

3.3. Inactivation

L'inactivation est un processus empêchant le Na_v de s'ouvrir à nouveau pendant une période réfractaire. Cette période d'inactivation est le plus souvent rapide (1 ms) mais elle peut durer plus longtemps, c'est l'inactivation lente (> 1 s) ou ultra-lente (1 min) (**Ulbricht, 2005**). L'inactivation rapide est importante pour la repolarisation du potentiel d'action, c'est la seule force repolarisante outre le courant de fuite dans les nœuds de Ranvier des mammifères. L'inactivation lente peut jouer un rôle dans la régulation de l'excitabilité en modulant les décharges en rafale. Les deux types d'inactivation ont des mécanismes différents impliquant des zones différentes du canal.

Plusieurs études de biochimie et de mutagénèses dirigées ont démontré l'importance de la boucle intracellulaire L3 dans l'inactivation du canal $Na_v1.2$ de rat (**Stühmer et al., 1989 ; Patton et al., 1992 ; West et al., 1992**). Les acides aminés associés à l'inactivation rapide sont situés sur la boucle L3 et correspondent au peptide IFMT (Isoleucine, Phénylalanine, Méthionine, Thréonine) (**Motoike et al., 2004 ; Yu et al., 2005**). Le peptide IFMT, aussi appelé particule d'inactivation, a pour rôle de bloquer le pore du canal du côté cytoplasmique, selon le principe de « couvercle à charnière » ou « boule et chaîne » (**Kellenberger et al., 1996 ; Goldin, 2003**). Lors de la dépolarisation, le déplacement du segment S4 de chaque domaine, favorise la liaison du peptide IFMT à ses récepteurs situés au niveau du segment transmembranaire IVS6 et de la boucle intracellulaire IVS4-S5 (**McPhee et al., 1995, 1998**). La partie C-term du Na_v joue également un rôle dans la stabilisation du canal à l'état inactivé (**Motoike et al., 2004**).

Pour l'inactivation rapide, une partie du canal forme un « couvercle à charnière » au niveau de l'ouverture du pore du côté cytoplasmique. Pour l'inactivation lente, c'est le changement conformationnel de la structure du pore qui amène à une réduction de la conductance des ions sodium. Les acides aminés importants dans ce processus ont été identifiés au niveau des segments IVS4 et IIS6 et de la boucle IIS5-S6 (**Goldin, 2003 ; Ulbricht, 2005**).

4. Pharmacologie moléculaire des canaux Na_v face aux toxines paralysantes

Les Na_v sont la cible de nombreuses molécules naturelles ou synthétiques comme les neurotoxines, les anesthésiques locaux ou les insecticides, qui entraînent de fortes modifications fonctionnelles en se fixant sur différents récepteurs des Na_v (Catterall *et al.*, 2007). Parmi eux, sept récepteurs des neurotoxines ont pu être identifiés sur le Na_v : le site 1 est la cible des TTX, STX et μ -conotoxines qui bloquent la conductance des ions, le site 2 est la cible des batrachotoxines et vétratridines qui provoquent une activation persistante, le site 3 est la cible des α -toxines de scorpion et toxines des anémones de mer qui ralentissent et bloquent l'inactivation, le site 4 est la cible des β -toxines de scorpion qui modifient le potentiel membranaire d'activation, le site 5 est la cible des brevétoxines et ciguatoxines qui déplacent la courbe d'activation, le site 6 est la cible des δ -conotoxines qui empêchent l'inactivation et le site 7 est la cible des pyréthriinoïdes qui altèrent différemment les fonctions du Na_v selon le type de molécules (Figure 13) (Cestèle et Catterall, 2000 ; Denac *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2013). Cette partie s'intéressera uniquement aux toxines paralysantes (TTX et STX) ciblant le site 1 (segment P) du Na_v et à leur mode d'action.

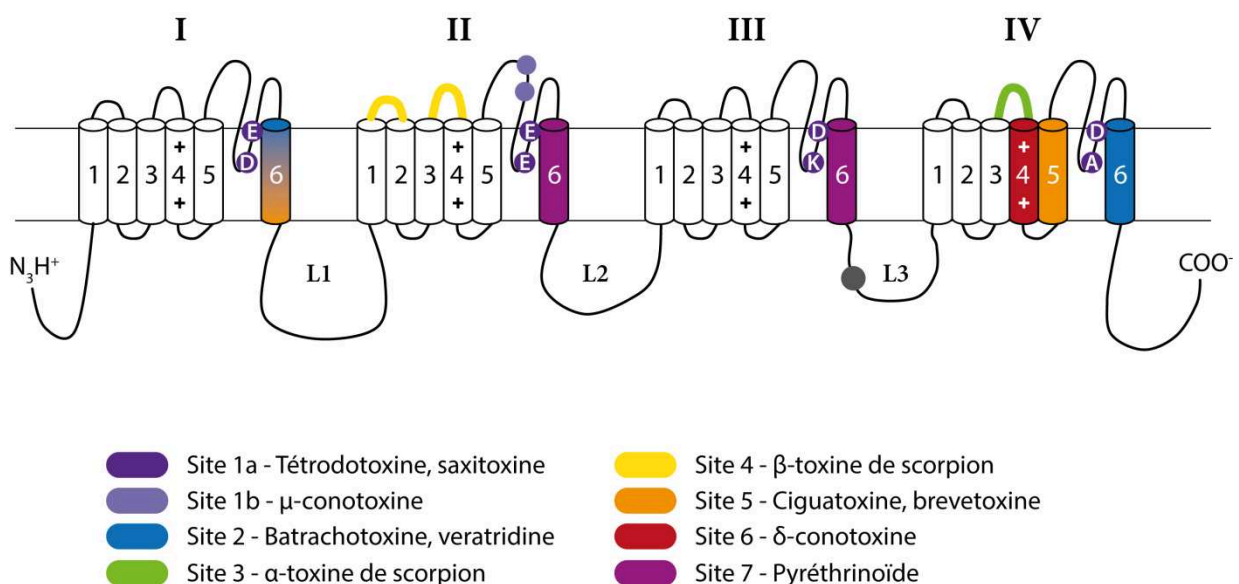


Figure 13 : Représentation schématique de la sous-unité α du Na_v et des sites récepteurs de toxines. La localisation des sites de fixations des différentes neurotoxines est représentée par couleur selon la légende ci-dessus. Modifié d'après Zhang *et al.* (2013).

4.1. Site de fixation et mode d'action des toxines, STX et TTX

Le site 1 est la cible de deux groupes de toxines, des guanidines hétérocycliques composées de STX et TTX et des toxines peptidiques avec les μ -conotoxines (Catterall *et al.*, 2007). Les toxines se fixant au site 1 sont appelées des bloqueurs de pore car leur liaison au Na_V va obstruer le pore du canal empêchant la conductance des ions. Le site 1 correspond au segment P reliant les segments 5 et 6 de chaque domaine du canal (Figure 13). L'interaction la plus forte entre les toxines et le Na_V est située au niveau de l'anneau intérieur du segment P avec les 4 acides aminés DEKA décrits précédemment (Al-Sabi *et al.*, 2006).

Alors que leur structure chimique est très différente, la TTX et la STX partagent la même fonction biologique, en partie grâce à leur groupe guanidinium (Figure 14) et ciblent avec une grande affinité le même site de fixation. Chez la TTX, le groupe 1,2,3-guanidinium et les groupes hydroxyles en C4, C9 et C10 possèdent des interactions électrostatiques attractives avec les résidus acides du filtre de sélectivité et l'anneau extérieur (Penzotti *et al.*, 1998 ; Lipkind et Fozzard, 2000 ; Blumenthal et Seibert, 2003). De plus, l'extrémité C-term proche de l'aspartate du motif DEKA et un tryptophane conservé du domaine II sont impliqués dans ces interactions (Scheib *et al.*, 2006). Chez la STX, le groupe 7,8,9-guanidinium chargé positivement et deux groupes hydroxyles en C12 sont impliqués dans la fixation au Na_V (Lipkind et Fozzard, 1994 ; Llewellyn, 2006). Les charges positives du groupe guanidinium interagissent avec les charges négatives des groupes carboxyles du site 1 (Catterall, 1980).

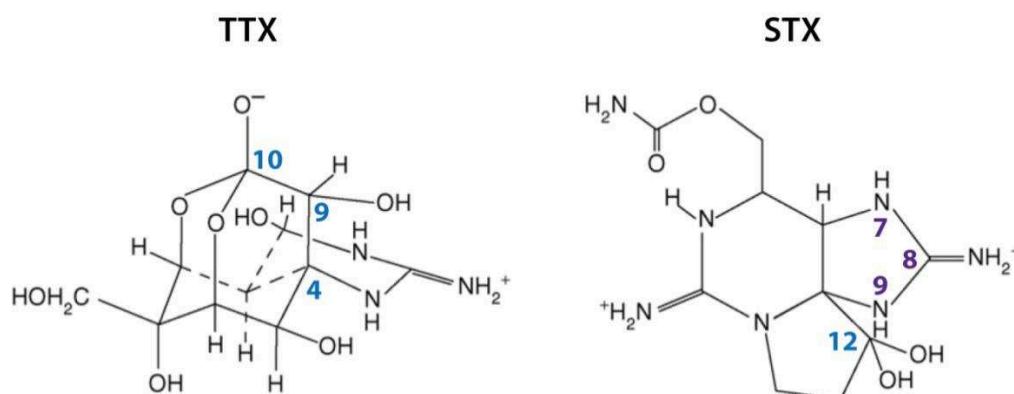


Figure 14 : Structure moléculaire de la tétrodotoxine (TTX) et de la saxitoxine (STX). Pour la TTX, le groupe guanidinium et les hydroxyles C4, C9 et C10 (en bleu) sont important pour la fixation au Na_V . Pour la STX, c'est le groupe 7,8,9-guanidinium (en violet) et l'hydroxyle C12 (en bleu) qui sont impliqués dans la fixation. Modifié d'après Blumenthal et Seibert (2003) et Soong et Venkatesh (2006).

4.2. Sensibilité des Na_v aux toxines, TTX et STX

Les organismes peuvent présenter des sensibilités différentes du Na_v face à la TTX et la STX. Les Na_v étant assez vulnérables face au blocage par les toxines, de nombreux animaux régulièrement exposés aux toxines dans leur milieu naturel vont posséder des Na_v relativement insensibles pour survivre. En effet, il a été démontré chez plusieurs organismes une résistance des Na_v à la TTX et la STX, comme des méduses, des crabes, des mollusques et des serpents (Tableau 1) (Twarog *et al.*, 1972 ; Anderson, 1987 ; Daigo *et al.*, 1988 ; Geffeney *et al.*, 2002). Chez les vertébrés, les différentes isoformes de Na_v possèdent différentes sensibilités à la TTX et peuvent être classées selon cette sensibilité. Les $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$ sont bloqués par des concentrations de TTX de l'ordre du nanomolaire et sont appelés TTX-sensibles (TTX-S). Les $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ sont bloqués à partir de concentrations de TTX dépassant le micromolaire et sont appelés TTX-résistants (TTX-R) (de Lera Ruiz et Kraus, 2015). Il a été démontré chez le $Na_v1.2$ de rat que la mutation de l'acide aminé glutamate (E) du domaine I en glutamine (Q) entraînait une résistance à la TTX et la STX (Noda *et al.*, 1989). Il a été démontré chez la mye, *Mya arenaria*, que la résistance à la STX est liée à un acide aminé du segment P dans le domaine II (Bricelj *et al.*, 2005). Lorsque l'acide aminé (en position 632) est un glutamate (E) le canal est sensible à la STX alors qu'une substitution par un aspartate (D) confère une résistance du canal. Ce qui différencie ces deux acides aminés est la présence d'un groupe méthylène en plus dans le glutamate. Les myes portant l'acide aminé D responsable de la résistance à la STX, qualifiées de résistantes, font partie d'une population régulièrement exposée aux PST. Les PST ont exercé une pression de sélection aboutissant à l'augmentation de la fréquence de l'allèle résistant dans les populations de myes régulièrement exposées. Les myes dites sensibles vont présenter l'acide aminé E et font partie d'une population non exposée aux PST.

Tableau 1 : Sensibilité des organismes à la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine (STX). Les concentrations efficaces de toxines sont exprimées selon la constante de dissociation (K_d) ou la concentration requise pour inhiber 50 % (IC_{50}) ou 100 % (IC_{100}) du courant Na^+ ou des potentiels d'action.

Embranchement	Espèces	Concentration efficace de toxines (M)				Références
		TTX		STX		
Vertébrés	Rat	$1,8 \times 10^{-10}$	IC_{50}	$1,2 \times 10^{-10}$	IC_{50}	Terlau <i>et al.</i> , 1991
	Couleuvres rayées	$3 \times 10^{-8} - 4 \times 10^{-5}$	K_d			Geffeney <i>et al.</i> , 2002
	Poissons globes	$> 3 \times 10^{-5}$	K_d	2×10^{-7}	K_d	Kidokoro, 1974
Mollusques	Moule commune	$> 3 \times 10^{-5}$		$> 3 \times 10^{-4}$		Twarog, 1972
	Pétoncle géant	$> 3 \times 10^{-5}$		$> 3 \times 10^{-4}$		
	Pétoncle de baie	3×10^{-6}	IC_{100}	3×10^{-4}	IC_{100}	
	Huître américaine	3×10^{-7}	IC_{100}	3×10^{-7}	IC_{100}	
	Mye	$> 3 \times 10^{-5}$		3×10^{-5}	IC_{100}	Twarog, 1972
	sensible	$1,1 \times 10^{-8}$	IC_{50}	$1,7 \times 10^{-9}$	IC_{50}	Bricelj <i>et al.</i> , 2005
résistante	$3,5 \times 10^{-5}$	IC_{50}	$2,7 \times 10^{-6}$	IC_{50}		
Arthropodes	Crabes	10^{-4}	IC_{50}	10^{-4}	IC_{50}	Daigo <i>et al.</i> , 1988
	Drosophiles	2×10^{-10}	IC_{50}	2×10^{-9}	K_d	Feng <i>et al.</i> , 1995
Plathelminthes	Bdelloura	10^{-8}	IC_{50}	$> 10^{-4}$		Blair et Anderson, 1993
Cnidaires	Méduses	$> 10^{-3}$		$> 10^{-5}$		Anderson, 1987 ; Spafford <i>et al.</i> , 1999

L'analyse des données de caractérisation a permis de mettre en évidence qu'il existait une variabilité importante des isoformes du Na_v , possédant chacune des propriétés pharmacologiques et biophysiques différentes. Il est donc intéressant de connaître les mécanismes permettant de générer une telle diversité moléculaire et de comprendre les processus permettant de moduler l'activité et la sensibilité des Na_v . La prochaine section s'intéressera donc à la modulation de la structure et de l'activité des Na_v , en décrivant tout d'abord l'importance des modifications génétiques. Puis, seront décrites les modifications post-transcriptionnelles, telles que l'épissage alternatif et l'édition. Enfin, la régulation des Na_v par des modifications post-traductionnelles et des interactions avec d'autres protéines sera détaillée.

III. Modulation de la structure et de l'activité des Na_v par des modifications pré- ou post-transcriptionnelles et post-traductionnelles

1. Présentation des mécanismes générant de la diversité moléculaire

Le fonctionnement d'un organisme est basé sur trois éléments fondamentaux composant l'unité cellulaire et moléculaire : les ADN, les ARN et les protéines. Brièvement, l'ADN responsable du stockage de l'information génétique est divisé en gènes et régions non-codantes. Leur expression permet la synthèse de l'ARN, puis de protéines. La séquence d'une protéine est une structure primaire correspondant à un enchaînement d'acides aminés, qui va ensuite se replier et prendre une conformation particulière déterminant sa fonction. Les ARN peuvent être codants et permettre la synthèse d'une protéine ou être non-codants et avoir un rôle de régulateur en se comportant comme une protéine. Chacun de ces trois éléments est régulé à différents niveaux. L'ADN peut être soumis à de la diversité génétique comme du polymorphisme nucléotidique. L'ARN est soumis à des régulations post-transcriptionnelles qui vont générer des protéines avec des structures moléculaires différentes. Les protéines vont subir des régulations post-traductionnelles qui vont moduler brièvement leur activité (Figure 15).

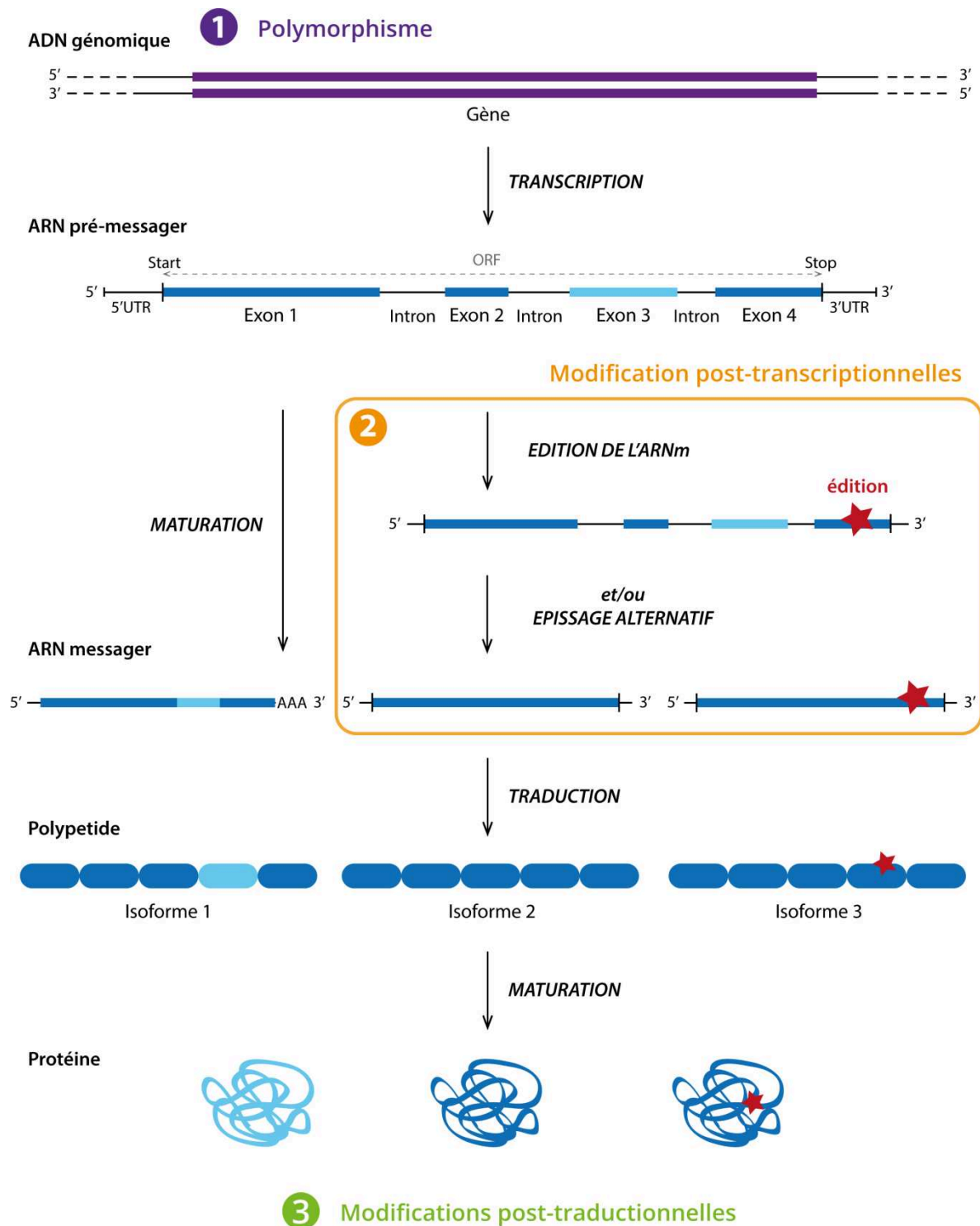


Figure 15: Représentation simplifiée de la transcription et de la traduction, comprenant la localisation du polymorphisme de type SNP (1), les modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif et/ou édition) (2) et post-traductionnelles (3). ORF (Open Reading Frame) : cadre ouvert de lecture, start : début du gène, stop : fin du gène.

2. Le polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique est le plus souvent représenté par le polymorphisme de nucléotide simple (SNP) ou mutation ponctuelle. En effet, les SNP correspondent aux variations de séquence présentes dans le génome et sont les plus abondantes. Par convention, un SNP correspond à la variation d'un seul nucléotide de la séquence d'ADN génomique et cette variation est présente dans plus de 1% de la population (Figure 16). Un SNP peut être présent dans les régions codantes ou non-codantes de l'ADN et ne modifie pas nécessairement la séquence protéique. Le SNP peut conduire à une mutation non-synonyme, c'est-à-dire qu'il y a substitution d'un nucléotide entraînant une modification de l'acide aminé et de la séquence protéique. A l'inverse, la mutation synonyme n'entraîne pas de modification d'acide aminé et de la séquence protéique, grâce à la redondance du code génétique. Le polymorphisme nucléotidique est un critère de variabilité génétique important et il permet d'étudier d'éventuelles adaptations et pressions de sélection sur des gènes ciblés.

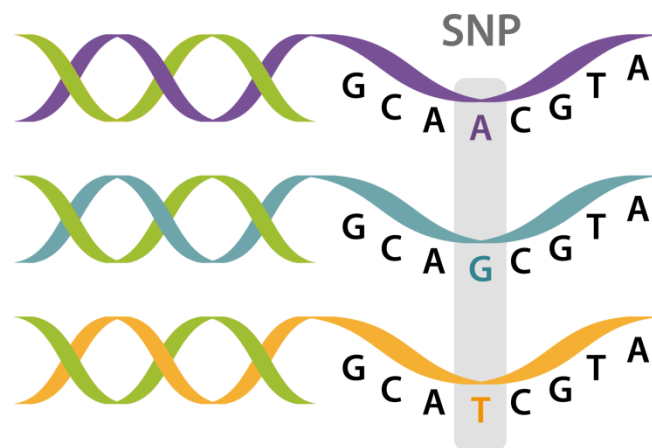


Figure 16 : Représentation schématique de la mutation ponctuelle. SNP : single nucleotid polymorphism.

Les mollusques marins sont reconnus comme ayant l'un des plus grands taux de polymorphisme du règne animal (Solé-Cava et Thorpe, 1991). Le polymorphisme du bivalve *C. gigas* est l'un des plus élevés avec un SNP pour 40 pb dans les régions non-codantes et un SNP pour 60 pb dans les régions codantes (Hedgecock *et al.*, 2005 ; Sauvage *et al.*, 2007).

Le polymorphisme nucléotidique entraîne de nombreuses modifications fonctionnelles des Na_v . Chez les vertébrés, il a été observé l'existence de SNP entraînant des modifications du $Na_v1.7$ et associé à l'augmentation de la perception de la douleur (**Reimann et al., 2010**). Par ailleurs, l'existence de polymorphisme dans le promoteur du $Na_v1.5$ est fonctionnellement liée à la diminution de l'expression du courant sodium dans certaines maladies cardiaques (**Yang, 2004 ; Wilde et Brugada, 2011**). Chez la mye, *Mya arenaria*, il a été démontré qu'un SNP dans le segment P du domaine II entraînait une modification du Na_v et ainsi une résistance à la STX (**Bricelj et al., 2005**). Plusieurs insectes présentent également du polymorphisme entraînant une résistance aux insecticides pyréthriinoïdes (**Forcioli et al., 2002 ; Araujo et al., 2011 ; Tan et Soderlund, 2011 ; Martins et Valle, 2012**). Les insecticides ou les toxines tels que les PST agissant comme une pression de sélection, des génotypes spécifiques associés à une forme résistante du Na_v vont être sélectionnés et leur fréquence va ainsi augmenter au sein d'une population.

3. Diversité moléculaire des Na_v : modifications post-transcriptionnelles

3.1. L'épissage alternatif

3.1.1. Principe de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif a lieu après la transcription de l'ADN génomique en ARN pré-messager. Les introns qui correspondent à des régions non-codantes sont excisés et les exons sont liés entre eux pour former l'ARN mature. Certains exons appelés alternatifs peuvent être excisés et suivant le même principe, certains introns peuvent être conservés. La sélection des exons est dépendante d'une machinerie cellulaire capable de différencier les exons des introns et de reconnaître leur jonction (**Kelemen et al., 2013**).

L'épissage alternatif est un processus important de régulation chez les eucaryotes qui contribue à la diversité fonctionnelle des protéines par sa capacité à contrôler l'expression des gènes. Son existence a été démontrée grâce à l'étude des modifications post-transcriptionnelles (**Gilbert, 1978**). Environ 50% des gènes humains exprimés seraient

régulés par l'épissage alternatif et cela concernerait principalement le système immunitaire ainsi que le système nerveux et la transduction du signal (**Modrek et al., 2001 ; Letunic et al., 2002**). Le mécanisme de l'épissage alternatif, reposant sur des combinaisons différentes d'exons, permet la synthèse de plusieurs variants de transcription (**Black, 2003**). Ces transcrits vont coder pour des séquences protéiques différentes avec des activités chimique et biologique distinctes. Ce processus est une étape essentielle lors de la différenciation tissulaire et le développement car il permet d'obtenir une diversité protéique complexe (**Lopez, 1998**). Il est également considéré comme le mécanisme générant le plus de diversité protéique. L'exemple le plus marquant est celui du gène Dscam présent chez les drosophiles, impliqué dans le développement, la migration et la connexion des neurones. L'ARN pré-messager qui lui est associé peut générer 38000 ARNm différents par épissage alternatif (**Graveley, 2001**).

3.1.2. Mécanisme de la réaction d'épissage

La machinerie de l'épissage alternatif regroupe plusieurs éléments, dont le splicéosome qui est un macrocomplexe ribonucléoprotéique composé de cinq petits ARN nucléaires (small nuclear RNA ou snRNA) associés à des protéines pour former les particules snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) et environ 150 protéines (**Zhou et al., 2002 ; House et Lynch, 2008**). Le splicéosome est responsable de l'excision des introns et doit reconnaître 4 séquences spécifiques de l'ARN pré-messager : le site 5' d'épissage, la région du point de branchement, une région riche en pyrimidines et le site 3' d'épissage (**Black, 2003**). Les sites 5' et 3' sont aussi appelés sites donneurs et accepteurs et possèdent un motif GT et AG, correspondant généralement aux extrémités de l'intron. La région du point de branchement est définie par une adénosine située entre 20 et 40 nucléotides en amont du site 3'. La région riche en pyrimidines est localisée entre le point de branchement et le site 3' (Figure 17).

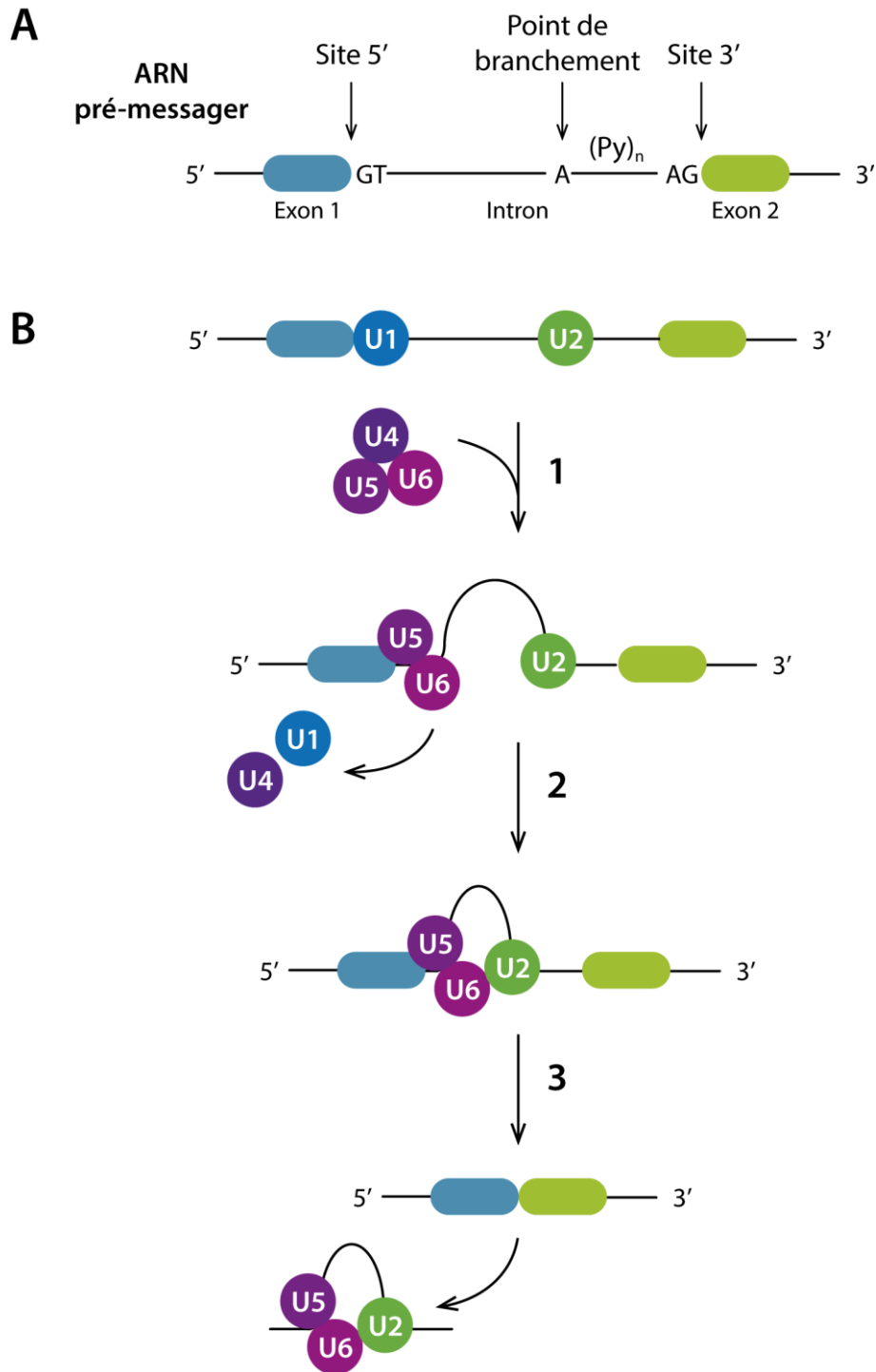


Figure 17 : Mécanisme de la réaction d'épissage et splicéosome. **A**, Sites consensus de l'assemblage du splicéosome *in vitro*. (Py)_n : région d'un intron riche en pyrimidines. **B**, Schéma simplifié de la réaction d'épissage. Les snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) U1 et U2 se fixent respectivement sur le site donneur GT et sur le point de branchement. 1 : Les snRNP U4, U5 et U6 vont se fixer sur U1, puis par activation catalytique U1 et U4 sont libérés. 2 : U2, U5 et U6 se rassemblent en un complexe catalytique et produisent un intermédiaire en forme de lasso. 3, L'intron en lasso est libéré, puis dégradé et les exons sont liés pour former un ARN messager mature. L'ensemble des snRNP utilisées lors de la réaction forment le splicéosome.

La réaction d'épissage se fait en deux étapes au sein du complexe catalytique du spliceosome (**Moore et al., 1993**) (Figure 17). La première étape correspond à la libération de l'exon 5' et à la production d'un intermédiaire en forme de lasso composé de l'exon 3' encore lié à l'intron et formant une boucle au niveau du point de branchement. La seconde est la libération de l'intron en lasso, qui sera dégradé, et la formation d'une liaison entre les exons 5' et 3' (**Black, 2003**).

3.1.3. Les différents types d'épissage alternatif

Chez les eucaryotes, différents types d'épissage alternatif ont été décrits (Figure 18) : les exons cassettes qui sont soit inclus, soit exclus de l'ARNm ; les exons mutuellement exclusifs qui ne sont jamais présents simultanément dans l'ARNm ; les exons définis par des sites 5' ou 3' d'épissage qui sont des exons avec deux sites 5' ou deux sites 3' en compétition pour être reconnus ; les exons alternatifs de la région 5' non-codante ou 3' non-codante qui permettent d'utiliser un promoteur alternatif en 5' ou un site de polyadénylation alternatif en 3' ; la rétention d'intron qui va ignorer certains sites d'épissage et conserver un intron dans l'ARNm (**Blencowe, 2006 ; Wang et Burge, 2008**).

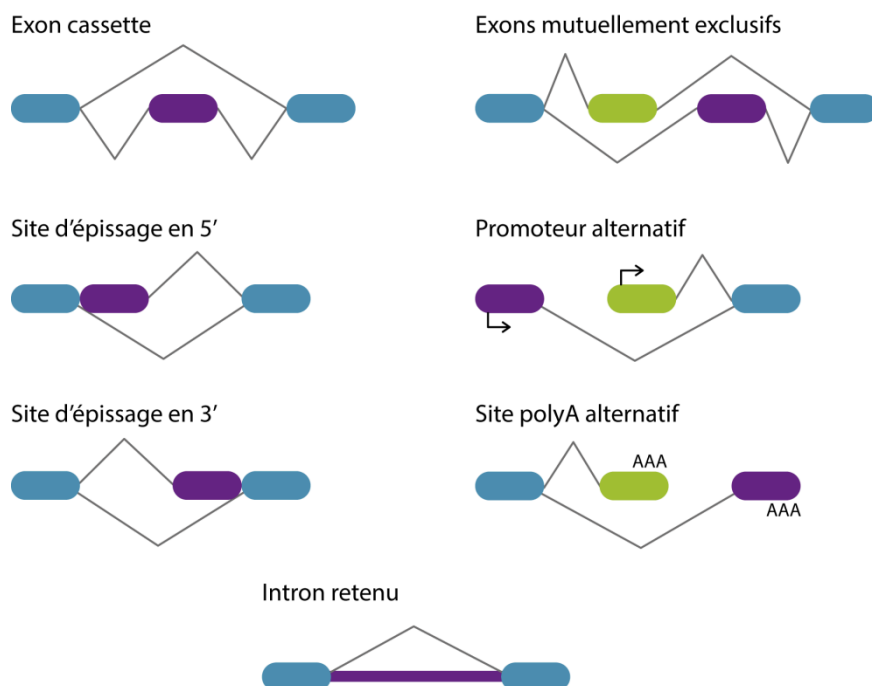


Figure 18 : Les différents types d'épissage alternatif. Les différentes couleurs représentent des exons différents. Modifié d'après **Li et al. (2007)**.

3.1.4. Effet de l'épissage alternatif sur la sous-unité α des Na_v

Plusieurs études ont démontré l'existence d'un épissage alternatif au sein des différents gènes codant la sous-unité α des Na_v de mammifères. L'épissage alternatif est très présent dans la régulation des gènes du système nerveux du fait de la nécessité d'ajuster rapidement les propriétés d'excitabilité des neurones (**Grabowski et Black, 2001**).

Les Na_v1.1 et Na_v1.7 possèdent des variants d'épissages qui diffèrent par la taille de l'exon 11. Cet exon code pour une partie de la boucle intracellulaire L1 entre les domaines I et II. Il existe deux variants plus courts pour le Na_v1.1 avec une perte de 33 ou 84 nucléotides à la fin de l'exon 11 par rapport à la forme complète. Ces modifications altèrent la capacité d'inactivation du canal et font persister le courant sodium entrant. Chez l'Homme, ce mécanisme est potentiellement impliqué dans l'épilepsie (**Lossin et al., 2002**). Le Na_v1.7 possède deux variants qui diffèrent par la présence ou l'absence de 11 acides aminés au sein de l'exon 11. Cette différence ne semble cependant pas altérer les propriétés du canal (**Chatelier et al., 2008**).

Les Na_v1.3 et Na_v1.6 possèdent des variants d'épissage de l'exon 12, qui correspond à l'exon 11 chez Na_v1.1 et Na_v1.7 et qui codent pour une partie de la boucle intracellulaire L1. Des modifications d'acides aminés au sein de l'exon 12 entraînent de légères différences dans l'activation et l'inactivation du canal pouvant entraîner une altération de l'excitabilité neuronale (**Raymond et al., 2004 ; Thimmapaya et al., 2005**).

Le Na_v1.5 présente une variation d'un acide aminé dans l'exon 18 provoquant son excision. Cet exon 18 code pour une partie de la boucle intracellulaire L2 entre les domaines II et III. L'absence de l'exon 18 entraîne une perte de 53 acides aminés et provoque des modifications dans l'inactivation du canal (**Kerr et al., 2007**).

Le Na_v1.9 possède un variant d'épissage où l'exon 16 est absent. Cependant, il est très peu exprimé dans les DRG humains et les propriétés de la protéine codée par ce variant n'ont pas pu être analysées (**Raymond et al., 2004**).

Par ailleurs, des variants d'épissage tissu-spécifiques et régulés au cours du développement ont été identifiés pour les $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$, correspondants aux exons mutuellement exclusifs 5N (néonatal) et 5A (adulte) (Sarao *et al.*, 1991 ; Plummer *et al.*, 1997 ; Lu et Brown, 1998 ; Copley, 2004 ; Raymond *et al.*, 2004). Ces exons 5N et 5A codent pour une partie du segment 3 et pour la quasi-totalité du segment 4 du domaine I. Dans le cas de $Na_v1.7$, un seul acide aminé est affecté par l'épissage, un aspartate pour l'exon 5A et une sérine pour l'exon 5N. Cette modification entraîne un léger décalage de l'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés pour l'exon 5A, exprimé dans le SNP et le SNC, comparé à l'exon 5N, exprimé dans les DRG (Raymond *et al.*, 2004 ; Chatelier *et al.*, 2008).

Des exons mutuellement exclusifs ont également été identifiés chez le $Na_v1.6$, il s'agit des exons 18N et 18A (Plummer *et al.*, 1997 ; Raymond *et al.*, 2004 ; Zubovic *et al.*, 2012). Ces exons 18N et 18A codent pour les segments 3 et 4 du domaine III. L'exon 18N possède un codon stop et entraîne la formation d'une protéine tronquée, ce variant étant exprimé dans le cerveau fœtal et dans les tissus non-neuronaux. La présence de l'exon 18A permet à la protéine d'être fonctionnelle et est exprimé dans les neurones du SNC et du SNP (Plummer *et al.*, 1997).

Chez les insectes, un seul gène code la sous-unité α des Na_v (Dong, 2007). Le processus d'épissage alternatif permet donc d'obtenir une grande diversité moléculaire. L'étude de la sous-unité $DmNa_v$, chez *D. melanogaster*, a démontré qu'elle possédait plusieurs exons d'épissage : 11 exons optionnels nommés a, b, e, f, i, j, h, exon 7, exon 8, exon 22 et exon 23 et quatre exons mutuellement exclusifs c, d et k, l (nommés G2, G1 pour les autres espèces d'insectes) (Loughney *et al.*, 1989 ; Thackeray et Ganetzky, 1994 ; O'Dowd *et al.*, 1995 ; Olson *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2009). Les exons a, b, i, j, e, f, h et 22 codent pour les boucles intracellulaires tandis que les exons c, d, k, l, 7, 8 et 23 codent pour des segments transmembranaires (Tableau 2). Les exons k et l sont homologues aux exons 18N et 18A du $Na_v1.6$ et l'exon 8 est l'homologue de l'exon 5A décrit précédemment (Sarao *et al.*, 1991 ; Plummer *et al.*, 1997). Les effets de certains exons alternatifs ont notamment pu être étudiés chez *B. germanica*. La présence de l'exon G2 entraîne une augmentation de l'amplitude des courants sodium par rapport à G1 (Tan *et al.*, 2002). De plus, l'exon G1

réduirait la sensibilité du canal à la deltaméthrine, qui est un insecticide. L'exon b, lorsqu'il est présent, entraîne une diminution de l'amplitude du courant sodium (Song *et al.*, 2004). Chez *D. melanogaster*, la présence des exons j, e et f entraîne principalement des modifications de l'activation du canal. Les exons h et j entraînent un décalage de l'inactivation à l'état stable vers des potentiels dépolarisants et hyperpolarisants (Lin *et al.*, 2009). Par ailleurs, la présence de l'exon k entrainerait un courant sodium persistant.

Tableau 2 : Les différents exons impliqués dans l'épissage alternatif de la sous-unité DmNa_v de *D. melanogaster*.

Exons	Région du Na _v	Effets de l'épissage	Références
j	N-term	modification de l'activation	Lin <i>et al.</i> , 2009
exon 7 (K)	IS2-S3	protéine non complète (région IS2-S3 manquante)	Song <i>et al.</i> , 2004
exon 8	IS3-S4	protéine tronquée (homologue de l'exon 5 chez les mammifères)	Lin <i>et al.</i> , 2009
a	boucle L1	possède un site de phosphorylation (PKA)	Loughney <i>et al.</i> , 1989
b		diminution du courant Na ⁺ (exon b absent)	Song <i>et al.</i> , 2004
c/d	II S4-S5	exon c possède 2 sites de glycosylation exon d possède 1 site de glycosylation	Loughney <i>et al.</i> , 1989
e et f		modification de l'activation	
h	boucle L2	modification de la dépolarisation	Lin <i>et al.</i> , 2009
22 et 23		protéine tronquée (exons absents)	
k/l (G2/G1)	III S3-S4	courant Na ⁺ persistant (exon k présent) l (G1) diminue la sensibilité à la deltaméthrine	Tan <i>et al.</i> , 2002

3.2. L'édition de l'ARNm

L'édition de l'ARN est un processus qui a lieu après la transcription et qui modifie l'ARNm par insertion, délétion ou substitution ponctuelle (Bass, 2002). Cette modification de la séquence codante peut entraîner la formation d'une protéine différente. Le processus de substitution de nucléotides lors de l'édition implique une désamination qui va convertir l'adénosine (A) en inosine (I) (A→I) et l'uracile (U) en cytosine (C) (U→C) (Benne, 1996 ; Simpson et Emeson, 1996 ; Dong, 2007). Cette désamination est réalisée par des désaminases, comme l'adénosine désaminase (Figure 19) (Bass *et al.*, 1997 ; Keegan *et al.*, 2004). La plupart des éditions décrites entraînent des modifications dans l'activation et l'inactivation du canal (Liu *et al.*, 2004). L'édition serait donc un processus permettant de réguler finement l'activité neuronale (Higuchi *et al.*, 2000).

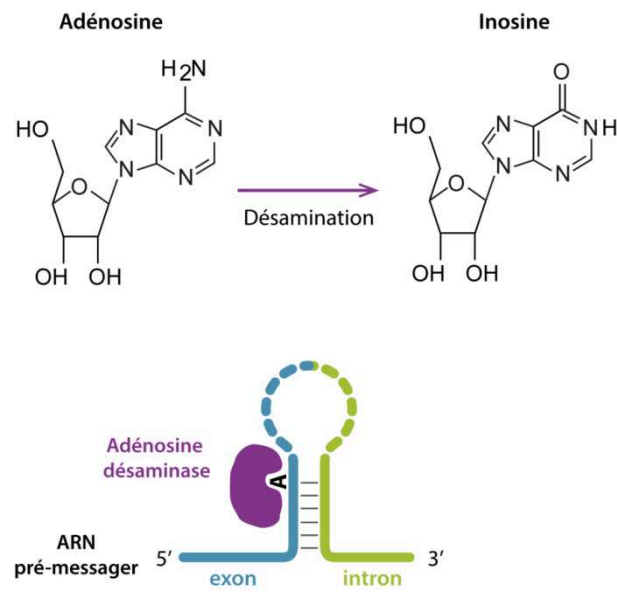


Figure 19: Représentation simplifiée de l'édition A→I d'un ARN pré-messager. L'adénosine désaminase procède à une désamination de l'adénosine pour la transformer en inosine.

4. Régulation et modifications post-traductionnelles des Nav

Dans les paragraphes précédents, il a été démontré l'importance de sites spécifiques dans la structure primaire des Nav. Cependant, il existe bien d'autres facteurs qui contribuent à leur diversité fonctionnelle. La sous-unité α seule est fonctionnelle mais fait partie d'un complexe de protéines pouvant réguler sa fonction, sa localisation cellulaire et son expression à la membrane (Figure 20). Ces protéines sont diverses et appartiennent à plusieurs catégories : les enzymes pouvant moduler la structure du canal et impliquant des modifications post-traductionnelles (protéine kinase A, PKA ; protéine kinase C, PKC ; calcium-calmoduline kinase II, CaMKII ; tyrosine kinase) et les protéines interagissant avec le canal et jouant un rôle dans le transport et la localisation du canal (sous-unités β , calmoduline, ankyrine, syntrophine, p11, Nedd4/Nedd4-2).

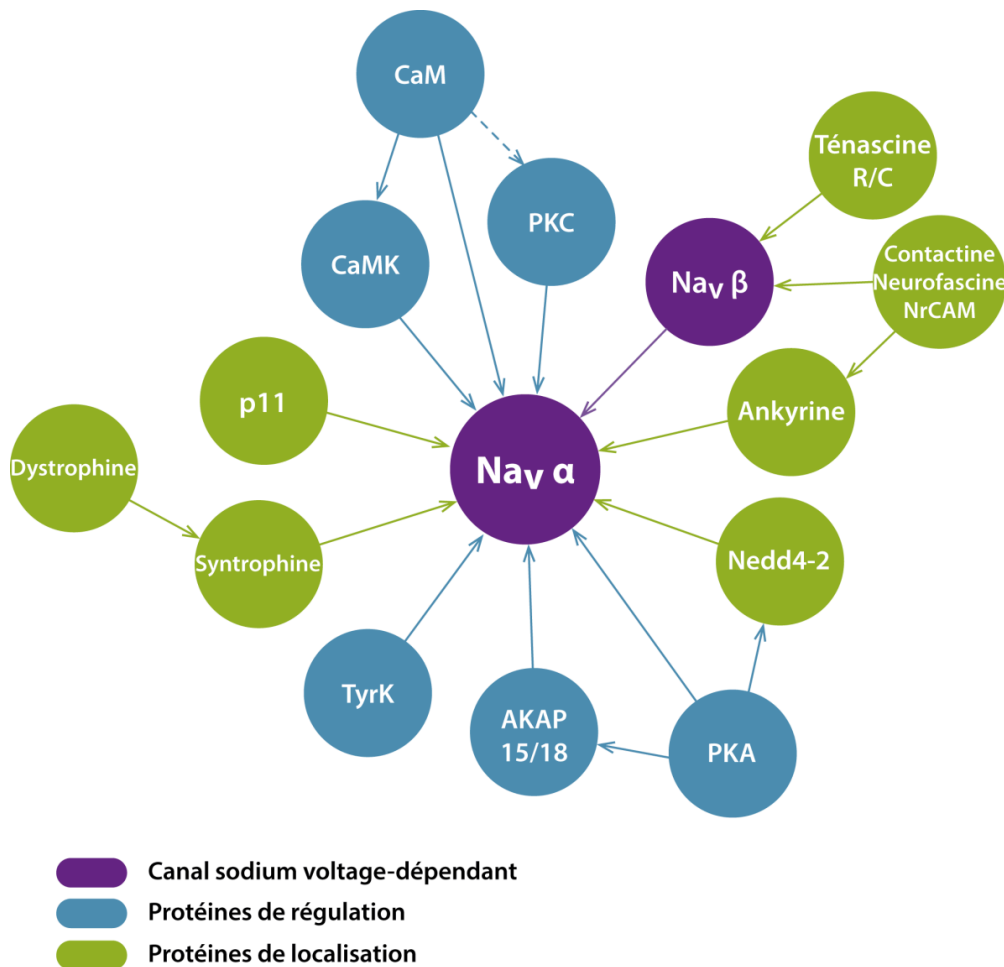


Figure 20 : Interactions protéine-protéine associées au Nav comprenant des protéines impliquées dans la régulation et des protéines liées à la localisation cellulaire. La ligne pointillée indique une inhibition de la PKC par la CaM. Modifié d'après *Shao et al. (2009a)*.

4.1. La phosphorylation

La régulation des Na_v par la phosphorylation est complexe. Les principales protéines qui phosphorylent le Na_v sont : la protéine kinase dépendante de l'AMPc⁸ (PKA), la protéine kinase C (PKC), la calcium-calmoduline kinase II (CaMKII) et la tyrosine kinase (**Cantrell et Catterall, 2001 ; Diss et al., 2004**). Pour toutes les isoformes de Na_v , les sites de phosphorylation sont situés sur les boucles intracellulaires L1 et L3. De plus, les isoformes s'exprimant dans le système nerveux ont leur boucle intracellulaire L1 plus grande que dans les autres tissus. Après phosphorylation, les groupements phosphates ajoutés sont ensuite rapidement clivés par des phosphatases, comme la calcineurine, une phosphatase dépendante de la calmoduline et du calcium, et la phosphatase 2A (**Murphy et al., 1993 ; Chen et al., 1995**).

4.1.1. La protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA)

Les premières études ont démontré que les Na_v purifiés à partir de cerveau étaient phosphorylés par la PKA et qu'il s'agissait uniquement de la sous-unité α (**Costa et al., 1982 ; Rossie et Catterall, 1987**). Puis, il a été démontré que cette PKA modulait l'activité de $\text{Na}_v1.2$ de rat en diminuant jusqu'à 50% l'amplitude du courant sodium (**Li et al., 1992 ; Smith et Goldin, 1996**). Cette réduction du courant n'impliquait pas de modification de la structure ou de la localisation des Na_v . Il a également été observé que l'activation de la PKA par des récepteurs de la dopamine permettait de phosphoryler des sites présents dans la boucle L1 et entraînait une diminution du courant sodium (**Cantrell et al., 1997**).

Par ailleurs, il a été observé que l'activation de la PKA augmentait l'amplitude du courant chez $\text{Na}_v1.8$, tandis qu'elle le diminue pour les $\text{Na}_v1.1$ et $\text{Na}_v1.7$ (**Vijayaragavan et al., 2004**). Cependant, lorsque le $\text{Na}_v1.7$ est exprimé dans des cellules métastatiques de rat, la PKA augmente l'expression fonctionnelle via l'expression des canaux à la surface membranaire (**Brackenbury et Djamgoz, 2006**). Le $\text{Na}_v1.4$ est également phosphorylé par la PKA malgré l'absence d'une grande boucle intracellulaire L1 possédant de nombreux sites de

⁸ L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) fait partie des messagers secondaires

phosphorylation (Yang et Barchi, 1990). Cependant, cette phosphorylation entraîne peu de modifications sur le courant sodium (Smith et Goldin, 1996). De même, le Na_v1.6 est peu sensible à l'activité de la PKA (Chen *et al.*, 2008). Chez le Na_v1.5, l'activation de la PKA entraîne une augmentation du courant sodium due à un décalage hyperpolarisant (Ono *et al.*, 1993).

La voie de signalisation de la PKA implique la liaison d'un ligand extracellulaire à un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) qui, via la protéine G, va réguler des adénylates cyclases (AD) et permettre la génération d'AMPc (Taskén et Aandahl, 2004). Les Na_v sont rapidement phosphorylés sur de multiples sites après activation de la PKA par des dérivés de l'AMPc (Diss *et al.*, 2004).

La PKA peut être couplée à une autre protéine appelée protéine d'ancrage de la PKA (AKAP). Cette protéine fonctionne comme une protéine d'échafaudage et peut se lier simultanément à la PKA et à une phosphatase (Taskén et Aandahl, 2004). Il a été démontré que l'AKAP15 était impliquée dans la régulation par la PKA et qu'elle interagissait directement sur le Na_v1.2 via la boucle intracellulaire L1 (Tibbs *et al.*, 1998 ; Few *et al.*, 2007).

4.1.2. La protéine kinase C (PKC)

La PKC est une protéine dépendante des phospholipides et activée par le calcium (Takai *et al.*, 1979). Plusieurs études ont démontré que la PKC phosphorylait le Na_v sur au moins trois sites différents (Costa et Catterall, 1984 ; Murphy et Catterall, 1992). Ces sites ont été identifiés par des études de mutagenèse dirigée sur le Na_v1.2, ils correspondent à des serines situées sur la boucle intracellulaire L1 et une sérine du site d'inactivation sur la boucle L3 (West *et al.*, 1991 ; Cantrell, 2002).

La voie de signalisation de la PKC nécessite l'action d'un RCPG qui va activer une phospholipase C (PLC). La PLC va ensuite cliver le phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) pour générer de l'inositol trisphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). L'IP₃ active ensuite des récepteurs spécifiques (IP₃R) permettant l'augmentation de calcium intracellulaire,

pendant que le DAG active la PKC (**Dai et al., 2009**). Le calcium ainsi libéré est nécessaire à l'activité de la PKC.

De nombreuses études ont pu démontrer que l'activation de la PKC entraînait une forte diminution de l'amplitude du courant sodium et un ralentissement de l'inactivation des Na_v (**Sigel et Baur, 1988 ; Dascal et Lotan, 1991 ; Numann et al., 1991 ; Schreibmayer et al., 1991 ; Chen et al., 2006**). En effet, l'activation de la PKC entraîne une importante diminution du courant chez les $\text{Na}_v1.4$ et $\text{Na}_v1.5$ et plus faiblement chez le $\text{Na}_v1.6$ (**Numann et al., 1991 ; Qu et al., 1994 ; Bendahhou et al., 1995 ; Chen et al., 2008**). Chez les $\text{Na}_v1.7$ et $\text{Na}_v1.8$, l'activation de la PKC provoque, en plus de la diminution du courant, un changement hyperpolarisant dans l'activation du courant (**Vijayaragavan et al., 2004**).

4.1.3. La protéine kinase CaMKII

La protéine CaMKII est une kinase qui est dépendante du complexe calcium-calmoduline. Plusieurs études ont démontré que la CaMKII était capable de phosphoryler les Na_v , entraînant un ralentissement des cinétiques de décroissance du courant sodium (**Wagner et al., 2006 ; Maltsev et al., 2008**). Une autre étude a démontré que cette CaMKII agissait comme un régulateur de l'activité du Na_v cérébral en réduisant l'amplitude du courant sodium (**Carlier et al., 2000**). La phosphorylation par la CaMKII s'effectue sur la boucle intracellulaire L1 dans le cas du $\text{Na}_v1.5$ (**Ashpole et al., 2012**). En effet, il a été observé que la surexpression de l'isoforme cardiaque de la CaMKII entraînait des modifications complexes du courant sodium, incluant un changement hyperpolarisant, une augmentation de l'inactivation intermédiaire et un ralentissement de la récupération après l'inactivation intermédiaire (**Wagner et al., 2006**). De même, une inhibition de la CaMK ralentit la décroissance du courant sodium et modifie l'état intermédiaire d'inactivation vers un potentiel plus dépolarisé (**Deschênes et al., 2002**).

4.1.4. Les tyrosines kinases

La régulation du Na_v par les tyrosines kinases est différente selon les isoformes. Pour le $\text{Na}_v1.5$, une tyrosine du site d'inactivation, situé sur la boucle L3, est phosphorylée par la

Fyn kinase (Ahern *et al.*, 2005). Cette phosphorylation entraîne un décalage de l'inactivation vers un potentiel plus positif et accélère le retour à l'état activable. Parallèlement, la phosphorylation de la tyrosine dans le Na_v1.2 entraîne un décalage de l'inactivation vers un potentiel plus négatif (Ahn *et al.*, 2007). La phosphorylation et la déphosphorylation des tyrosines modulent donc l'inactivation du canal (Hilborn *et al.*, 1998 ; Scheuer et Catterall, 2006).

4.2. Interactions protéine-protéine

4.2.1. Les sous-unités β

Les sous-unités β , décrites précédemment, jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'activation et de l'inactivation du canal. En effet, une étude a démontré que la co-expression de β 1 avec le Na_v1.5 entraînait une accélération de la récupération après l'inactivation (Kupersmidt *et al.*, 1998). Les sous-unités β ont également un rôle dans le trafic cellulaire en interagissant avec des protéines d'ancrage. En effet, la boucle Ig leur permet de se lier à différentes protéines de type CAM comme la NrCAM, la neurofascine-186 et la contactine (Davis *et al.*, 1996 ; Zhou *et al.*, 1998 ; Ratcliffe, 2001 ; McEwen *et al.*, 2004). La sous-unité β 2 peut également se lier avec des molécules extracellulaires, la ténascine-R et la ténascine-C qui jouent un rôle dans les interactions cellulaires pendant le développement neuronal (Srinivasan *et al.*, 1998).

4.2.2. La calmoduline (CaM)

La calmoduline est une petite protéine ubiquitaire qui se lie au calcium. Elle agit comme un détecteur du calcium intracellulaire et traduit ce signal calcique en interagissant avec d'autres protéines (Diss *et al.*, 2004). Il a été démontré que le motif IQ (isoleucine-glutamine) du Na_v, composé de 11 acides aminés, interagissait avec la partie C-term de la calmoduline (Mori *et al.*, 2000). Lorsque cette interaction est perturbée, une diminution de l'amplitude du courant est observée chez les Na_v1.4 et Na_v1.6 (Herzog *et al.*, 2003 ; Mori *et al.*, 2003). Par ailleurs, la signalisation réalisée par la calmoduline modifie le courant sodium de façon différente selon les isoformes du Na_v. Pour les Na_v des muscles squelettiques, il

s'agit d'une interaction directe et pour les Na_v du cœur l'action de la CaMK entre en jeu (**Deschênes et al., 2002**). La calmoduline joue un rôle dans la stabilisation du site d'inactivation et permet de réduire l'activité importante du canal pendant la dépolarisation (**Kim et al., 2004**).

4.2.3. L'ankyrine

Les ankyrines font partie de la famille des protéines d'échafaudage et elles ont pour rôle de transporter et d'ancrer les canaux au cytosquelette. Il existe plusieurs ankyrines chez les vertébrés : l'ankyrine-R (distribution réduite), l'ankyrine-B (distribution large) et l'ankyrine-G (distribution générale). Les ankyrine-G et -B interagissent avec le Na_v, mais aucune interaction n'a été démontrée entre le Na_v et l'ankyrine-R. Le site de liaison de l'ankyrine-G au Na_v correspond à un motif de 9 acides aminés situé sur la boucle intracellulaire L2 (**Lemaillet et al., 2003**). Cela est confirmé par l'étude d'une mutation dans ce motif qui empêche la fixation de l'ankyrine-G au Na_v1.5 et diminue par conséquent l'expression du canal (**Mohler et al., 2004**). Par ailleurs, il a été observé une diminution de la densité de courant sodium dans des cardiomyocytes de souris dépourvus d'ankyrine-B, démontrant ainsi son rôle dans la régulation du Na_v (**Chauhan et al., 2000**).

4.2.4. La syntrophine

Les syntrophines sont des protéines dites adaptatrices impliquées dans la localisation des protéines de signalisation à la membrane. Il existe trois types de syntrophines : α , β et γ , qui se lient toutes à d'autres protéines appartenant à la famille des dystrophines (**Shao et al., 2009a**). Les syntrophines interagissent simultanément avec plusieurs protéines grâce à deux domaines d'homologie à la pleckstrine, un domaine PDZ et une région conservée de la syntrophine. Le domaine PDZ est impliqué dans l'interaction avec deux Na_v (Na_v1.4 et Na_v1.5) en se liant aux trois derniers acides aminés de l'extrémité C-term (**Haenggi et Fritschy, 2006**). Les syntrophines seraient impliquées dans la stabilisation des Na_v à la membrane et la réduction de leur internalisation.

4.2.5. La protéine p11

Les protéines p11 sont également appelées chaînes légères de l'annexine II et appartiennent à la famille des protéines S100, caractérisées par la présence de deux sites de fixation au calcium de type EF-hand (Rescher et Gerke, 2008). Il a été démontré que p11 se fixait à l'extrémité N-term du Na_v1.8 et permettait ainsi son expression à la membrane (Okuse *et al.*, 2002 ; Poon *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'étude de neurones de souris dépourvue de p11 a montré une diminution de la densité du courant sodium reflétant un déficit en Na_v1.8 (Foulkes *et al.*, 2006).

4.2.6. La protéine Nedd4

La protéine Nedd4 est un précurseur neuronal appartenant à la famille des ubiquitines ligases E3. Ces protéines possèdent un domaine catalytique HECT en C-term qui permet d'établir la liaison avec l'ubiquitine, un domaine C2 en N-term interagissant avec les lipides et des domaines WW composés de tryptophanes (Ingham *et al.*, 2004 ; Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006). Il a été démontré que les domaines WW de Nedd4-2 se liaient avec des motifs PY présents chez tous les Na_v excepté pour Na_v1.4 et Na_v1.9 (Shao *et al.*, 2009a). De plus, l'activité des Na_v1.2, Na_v1.7 et Na_v1.8 est inhibée par Nedd4-2 lorsqu'ils sont exprimés dans des ovocytes de xénopes (Fotia *et al.*, 2004). Nedd4-2 agit également sur le Na_v1.5 en diminuant la densité des canaux au niveau de la membrane (van Bemmelen *et al.*, 2004).

La caractérisation du Na_v et des différents mécanismes permettant de moduler ses propriétés fonctionnelles permet de mieux connaître la cible moléculaire des toxines paralysantes (PST). Il a été décrit précédemment que ces PST sont principalement accumulées dans les tissus de bivalves se nourrissant de micro-algues toxiques. La section suivante portera sur la description d'un de ces bivalves, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. La systématique et l'écologie de l'huître seront d'abord étudiées, puis l'anatomie générale sera décrite. Enfin, le système nerveux de l'huître creuse sera détaillé précisément.

IV. Le modèle biologique : l'huître creuse *Crassostrea gigas*

1. Systématique et écologie

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est un mollusque bivalve lophotrochozoaire⁹ de l'ordre des *Ostreida*, famille des *Ostreidae* et du genre *Crassostrea*. Originnaire du Japon et du sud-est de l'Asie, elle a été introduite dans de nombreux pays pour l'aquaculture, notamment en France en remplacement de l'huître *Crassostrea angulata* décimée par l'iridovirose en 1971 (**Moraga et al., 1989 ; Grizel et Héral, 1991**). Elle-même a succédé à la culture d'*Ostrea edulis*, l'huître endémique des côtes françaises.

L'habitat naturel de *C. gigas* correspond aux eaux marines côtières et estuariennes principalement aux zones intertidales, mais peut également se trouver en profondeur (15 m environ) (**Lapègue et al., 2009**). Elle se fixe principalement au substrat rocheux, aux débris ou d'autres coquilles d'huîtres, mais peut également être retrouvée sur des fonds vaseux. L'huître *C. gigas* peut supporter des variations de température (eurytherme) et de salinité (euryhaline) lui permettant de s'adapter à une large gamme de conditions environnementales (**Boudry, 2008**). Le cycle de vie de *C. gigas* est composé de 2 phases : une vie larvaire pélagique suite à la fécondation des gamètes et une vie benthique après fixation des larves sur le substrat. Les bivalves suspensivores tels que les huîtres s'alimentent principalement à partir de phytoplancton. Le processus d'alimentation comporte différentes phases, dont la filtration et l'ingestion (**Ward et Shumway, 2004**).

2. Anatomie générale

L'huître creuse est un animal à corps mou enfermé dans une coquille avec deux valves asymétriques articulées autour d'une charnière antérieure et maintenues par un muscle adducteur. La valve gauche (inférieure) est concave, tandis que la valve droite (supérieure) est plate ou légèrement convexe. La forme de la coquille est variable et dépend

⁹ Groupe possédant une larve trochophore et/ou un lophophore (anneau de cils entourant la bouche)

du type de fond sur lequel elle vit. Un ligament élastique permet de réunir les deux valves en faisant office de charnière (**Marteil, 1976**).

Le corps mou de l'huître est enveloppé dans le manteau composé de deux lobes soudés dorsalement près de la bouche (Figure 21). La respiration se fait grâce aux 4 feuillets branchiaux composés de filaments ciliés assurant la circulation de l'eau, des particules alimentaires et l'apport d'oxygène. Les branchies jouent donc également un rôle dans l'alimentation en sélectionnant, avec l'aide des palpes labiaux, les particules alimentaires, puis en les apportant à la bouche pour être ingérées. Les branchies produisent également du mucus pour coller les algues rejetées et les évacuées sous forme de pseudo-fèces (**Ward et Shumway, 2004**). Le système digestif est composé de la bouche entourée de quatre palpes labiaux, l'œsophage, l'estomac et l'intestin entourés par la glande digestive, le rectum et l'anus.

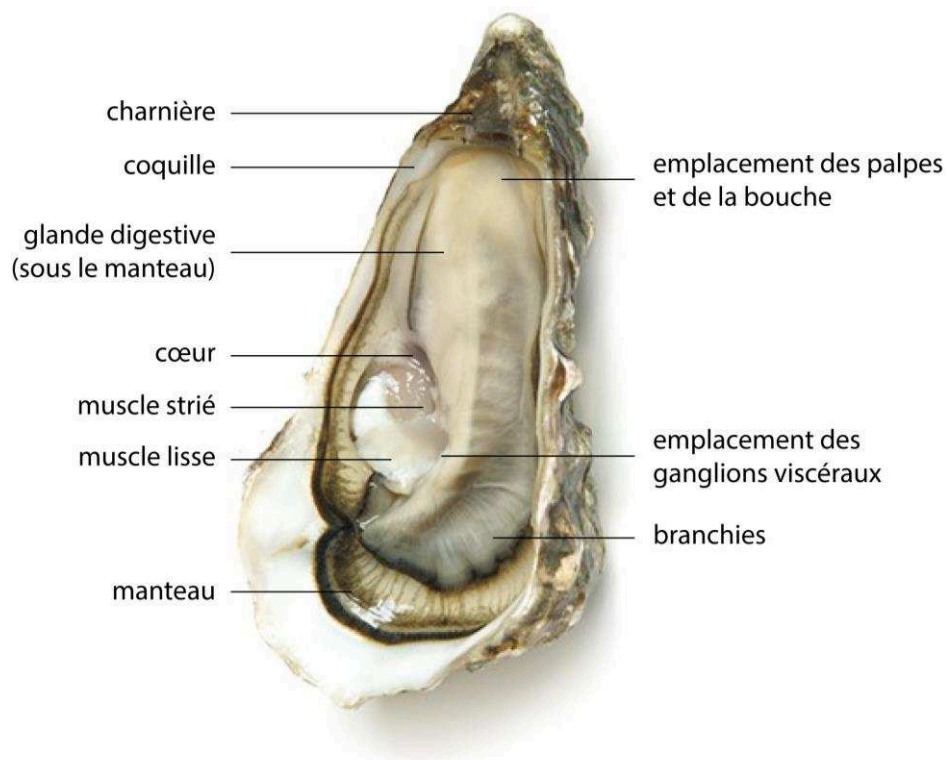


Figure 21 : Anatomie générale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans sa valve gauche.

Le système circulatoire de l'huître est qualifié de semi-ouvert car l'hémolymphe n'est pas confinée au cœur ou aux vaisseaux et circule librement dans les tissus. Le cœur, composé de deux oreillettes et d'un ventricule, est situé le long du muscle adducteur. Le système reproducteur de l'huître est essentiellement composé de la gonade qui est un

organe diffus entourant la glande digestive. Le système musculaire de l'huître adulte est composé d'un muscle adducteur divisé en deux types : le muscle strié et le muscle lisse (Galtsoff, 1964 ; Millman, 1967). Le muscle lisse, opaque et blanc, assure la fermeture prolongée (Abbott et Lowy, 1958 ; Millman, 1964 ; Galler, 2008). Le muscle strié, translucide, joue un rôle dans les contractions rapides et les micro-fermetures, notamment lors de la prise alimentaire (Marceau, 1909 ; Hopkins, 1936).

3. Le système nerveux

Le système nerveux est réduit chez l'huître et décentralisé. Il est composé de deux paires de ganglions nerveux et d'un réseau de nerfs (Figure 22) (Marteil, 1976). L'intégration des différentes parties est réalisée par des connections entre les ganglions à travers les connectifs cérébroviscéraux, la commissure cérébrale et les troncs nerveux les plus larges.

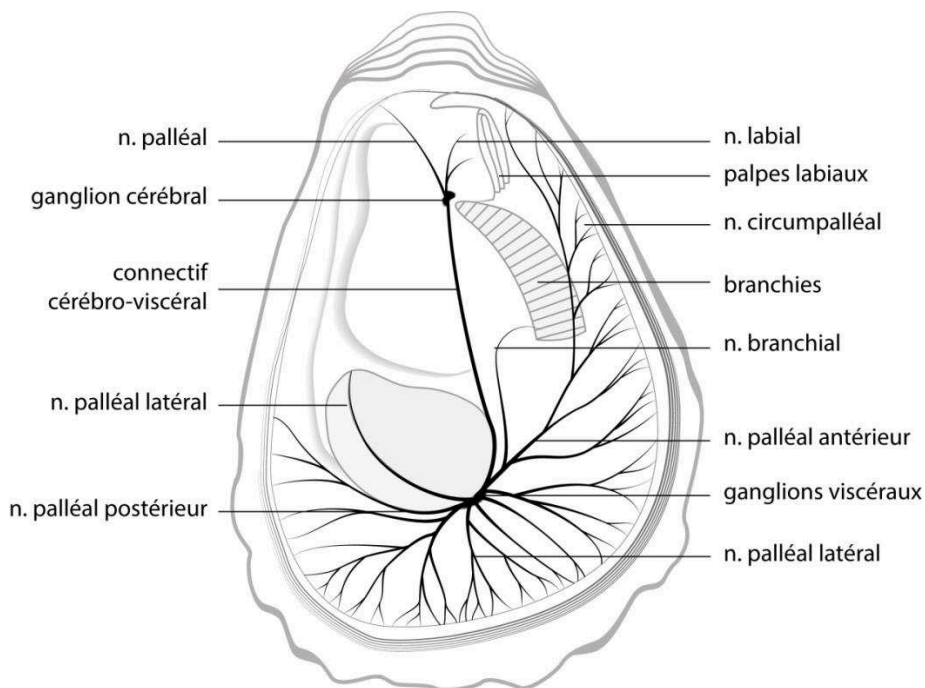


Figure 22 : Schéma du système nerveux de *Crassostrea gigas* vu du côté droit. n. : nerf. D'après le système nerveux de *C. virginica* décrit par Galtsoff (1964).

3.1. Le système nerveux central

3.1.1. Les ganglions

Les ganglions cérébraux sont faiblement développés et petits et sont situés en position antérieure, près de la bouche et à la base des palpes labiaux, avec un ganglion de chaque côté de l'œsophage. Les deux ganglions cérébraux sont reliés par la commissure cérébrale qui s'arque au-dessus de la bouche (Bullock et Horridge, 1965). Les ganglions cérébraux innervent la partie antérieure du manteau et les palpes.

Les ganglions viscéraux, plus grands, sont situés le long du muscle adducteur et à la jonction du muscle strié et du muscle lisse (Figure 23 et 24). Ils sont près de l'extrémité ventrale de la glande digestive et généralement masqués par la gonade. Les nerfs reliant les paires de ganglions cérébraux et viscéraux sont les connectifs cérébroviscéraux (Galtsoff, 1964). Les ganglions viscéraux innervent la partie postérieure du manteau, le muscle adducteur, les branchies, l'osphradium, le cœur, la gonade et l'intestin. Ils ont une fonction autonome mais ils reçoivent également des signaux provenant des organes sensoriels du manteau.

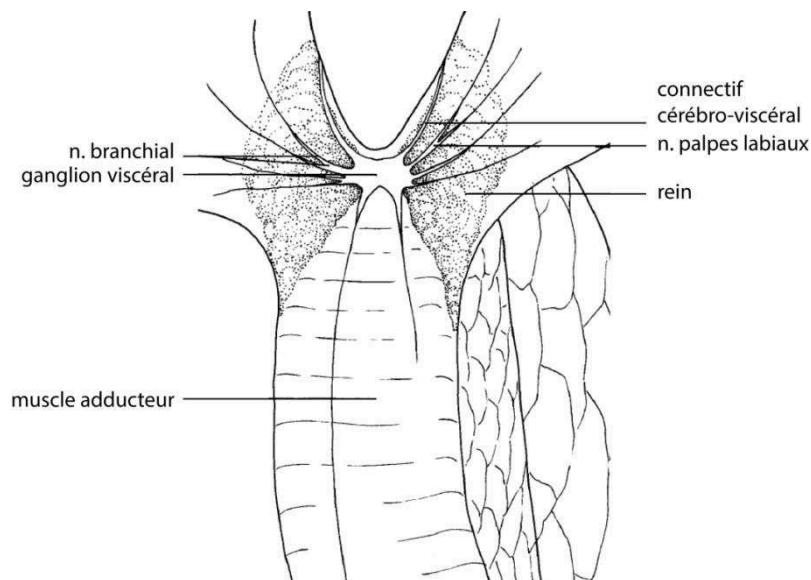


Figure 23 : Schéma des ganglions viscéraux de *Crassostrea virginica* observés à travers la chambre épibranchiale. n. : nerf. Modifié d'après Galtsoff (1964).



Figure 24 : Photographie des ganglions viscéraux (en pointillés) de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Les ganglions sont formés d'un noyau central ou neuropile composé de faisceaux serrés de fibres nerveuses et d'un cortex fait de plusieurs couches de cellules nerveuses (Figure 25). Cette disposition donne aux ganglions une ressemblance avec la matière blanche et grise du système nerveux central des vertébrés. Le cortex est composé d'une couche continue de cellules nerveuses dont les corps cellulaires sont rassemblés en une couche à l'extérieur du ganglion. Le neuropile est un plexus de fibres avec des dendrites, des terminaisons axonales et des synapses. Des cellules nerveuses dispersées peuvent également être présentes dans le neuropile. Une couche de tissu conjonctif constitue la gaine extérieure des ganglions. La partie ventrale du ganglion faisant face à la chambre épibranchiale est recouverte d'une couche unicellulaire d'épithélium (Galtsoff, 1964).

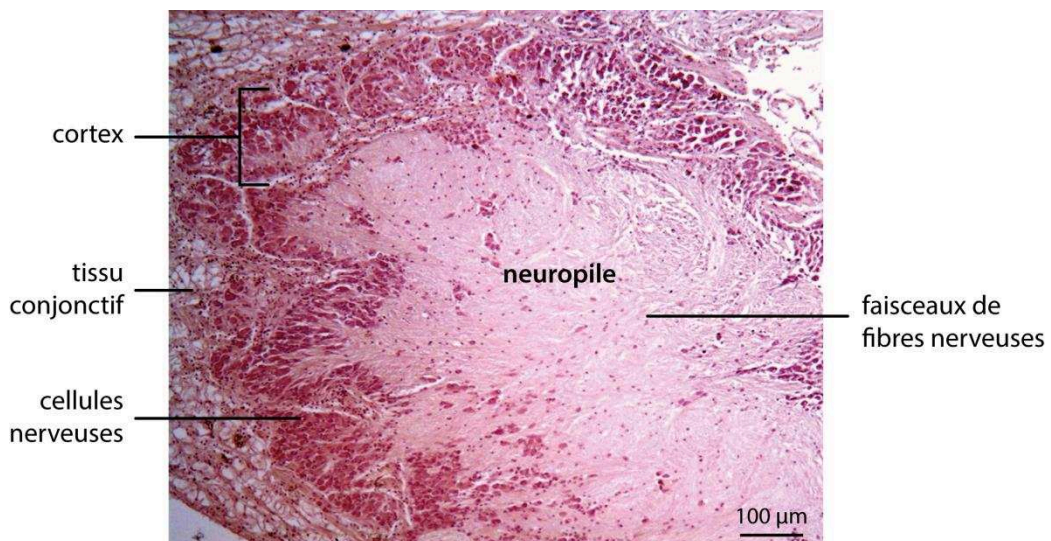


Figure 25 : Coupe histologique d'un ganglion viscéral d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Coloration à l'éosine-hématoxyline.

3.1.2. Les connectifs cérébroviscéraux

Les connectifs cérébroviscéraux (Figure 26) agissent comme le lien principal de la communication entre les ganglions cérébraux et viscéraux. Le connectif se compose principalement d'axones non spécialisés. Il est dépourvu de cellules ganglionnaires et de la plupart des fibres motrices et sensorielles (Kraus *et al.*, 1988). Le connectif fonctionne avec une communication bidirectionnelle, caractéristique des nerfs non-myélinisés avec des axones de petits diamètres (Horridge, 1958).



Figure 26 : Photographie du connectif cérébroviscéral (en pointillés) de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

La structure du connectif cérébro-viscéral est similaire à celle des ganglions. Une épaisse couche de grandes cellules nerveuses entourent le neuropile, qui est divisé en plusieurs faisceaux. Il n'y a pas de gainage bien formé, mais des petites cellules de tissu connectif sont trouvées le long de la périphérie du ganglion et sont dispersées dans toute sa structure. Un modèle similaire de la structure ganglionnaire se répète dans de nombreux nerfs issus des ganglions. Ce plan d'organisation est notamment retrouvé dans le nerf circumpalléal et dans le nerf branchial (Galtsoff, 1964).

3.1.3. Les cellules nerveuses, neurosécrétrices et gliales

Les cellules nerveuses individuelles des huîtres sont en forme de poire avec une, deux ou plusieurs excroissances qui s'étendent à partir du corps cellulaire (Figure 27). Le corps cellulaire nerveux est la partie du neurone contenant le noyau et le cytoplasme. Les

excroissances ou axones peuvent être définis comme des excroissances spécialisées anatomiquement et physiologiquement dans la distribution ou la conduction de l'influx nerveux sur de grandes distances. Les axones des cellules donnent naissance aux fibres nerveuses, qui entrent dans le neuropile où elles se combinent avec d'autres fibres nerveuses pour former plusieurs faisceaux compacts. Selon le nombre d'axones qu'elles possèdent, les cellules sont appelées unipolaires, bipolaires et multipolaires. Les cellules unipolaires sont plus abondantes que les deux autres. Les cellules apolaires, dépourvues d'axones, n'ont pas été trouvées chez les bivalves. La taille des cellules nerveuses varie. Les cellules multipolaires sont généralement les plus grandes et les cellules unipolaires et bipolaires sont plus petites (Galtsoff, 1964).

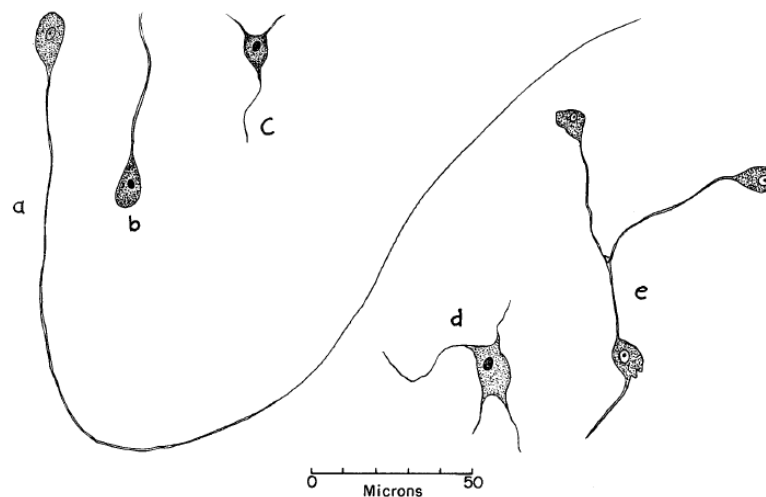


Figure 27 : Cellules nerveuses isolées du ganglion viscéral d'*Ostrea edulis*. a, b : cellules unipolaires ; c, d : cellules multipolaires ; e : cellules bipolaires Galtsoff (1964).

Les cellules neurosécrétrices sont présentes chez de nombreux bivalves, y compris les huîtres. Ces cellules sont de petits neurones caractéristiques des ganglions cérébraux et viscéraux. La quantité de sécrétion qu'elles contiennent varie selon la saison et est liée au cycle sexuel, de par son augmentation avec la maturation des gonades (Galtsoff, 1964). Chez la moule, *M. edulis*, les cellules nerveuses ont été décrites comme étant des cellules neurosécrétrices et trois catégories ont été distinguées (Illanes, 1979). Les cellules de type a_1 sont petites (6-15 μm), unipolaires et piriformes ou allongées. Les cellules de type a_2 sont plus grandes (20-25 μm), multipolaires et sphériques. Les cellules de type a_3 sont de taille similaire aux cellules a_2 (20-25 μm) mais sont unipolaires et piriformes comme les cellules a_1 (Lubet et Mathieu, 1982). Chez la moule, les ganglions cérébraux possèdent 75% de la

totalité des cellules neurosécrétrices avec une proportion relative de 73,5% pour a_1 , 1% pour a_2 et 0,5% pour a_3 , tandis que les ganglions viscéraux en ont 10% et sont composées de 9% de cellules a_1 et 1% de cellules a_2 et a_3 (Lubet et Streiff, 1982). Les 15% restants correspondent aux ganglions pédieux, absents chez l'huître.

L'axone des cellules nerveuses ou neurosécrétrices est souvent, mais pas toujours, entouré de cellules, appelées « névroglies » ou « cellules gliales » au sein du système nerveux central (Bullock et Horridge, 1965). Les cellules nerveuses et leurs axones sont pris en charge par un ensemble de cellules du tissu conjonctif qui proviennent de la gaine extérieure du ganglion. Ces cellules ont été reportées comme étant de type glial. Les éléments interstitiels du neuropile n'isolent pas les éléments nerveux, tandis que dans les nerfs et les commissures, les cellules gliales entourent un certain nombre de fibrilles nerveuses qui forment des voies distinctes. Il y a 3 groupes de cellules gliales, mais un seul serait observé chez *C. virginica*, les cellules fusiformes (Galtsoff, 1964).

3.2. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique est déployé dans tout l'organisme de l'huître par le biais des nerfs branchiaux, des nerfs palléaux antérieurs, latéraux et postérieurs et des nerfs labiaux (Figure 22). Ces nerfs sont fins, non-pigmentés et intégrés dans le tissu conjonctif. Ils sont composés de faisceaux de fibres nerveuses de tailles très différentes selon leurs caractéristiques fonctionnelles (Bullock et Horridge, 1965).

3.2.1. Les nerfs liés aux ganglions cérébraux

Le ganglion cérébral est lié à plusieurs nerfs du système nerveux périphérique. Les nerfs palléaux antérieurs vont vers la partie antérieure du manteau. Les branches de ces nerfs s'anastomosent les uns avec les autres et avec les branches des nerfs palléaux postérieurs du ganglion viscéral et forment de cette manière un nerf circumpalléal dans le bord du manteau. Un nerf ou des nerfs buccaux alimentent les palpes labiaux, la région buccale et un plexus de l'œsophage et de l'estomac. Le nerf du statocyste rejoint le ganglion cérébral via le connectif cérébral.

3.2.2. Les nerfs liés aux ganglions viscéraux

Le ganglion viscéral donne un grand nombre de nerfs. Un grand nerf branchial alimente l'épithélium et les muscles des branchies et leur zone d'attachement et continue dans l'axe des branchies. Il est généralement fortement entouré de cellules ganglionnaires. Les nerfs palléaux postérieurs, nombreux, vont vers la partie postérieure du manteau. Les nerfs palléaux dorsaux alimentent la région sous la charnière et les nerfs palléaux ventraux, la majeure partie du manteau. Des anastomoses se produisent entre les branches de celui-ci et les nerfs palléaux et certaines forment le nerf circumpalléal dans le bord du manteau. Les nerfs adducteurs postérieurs alimentent le muscle adducteur postérieur. Des petits nerfs cutanés vont vers la région rectale. Du ganglion viscéral ou du connectif cérébroviscéral, surgissent des nerfs allant à l'estomac, l'intestin, la glande intestinale, la gonade et les sinus veineux. Le péricarde, les glandes péricardiques et le cœur sont reliés aux branches du plexus palléal postérieur ou manteau dorsal.

3.2.3. Les organes sensoriels

Les seuls organes sensoriels chez l'huître sont : les tentacules, présentes le long du bord du manteau, les statocystes et l'osphradium situé le long du muscle dans la cavité palléale. L'osphradium est une zone d'épithélium spécialisé, sans plis ou caractéristiques visibles à l'œil nu. Les statocystes sont généralement formés d'une paire symétrique, présents chez les larves mais pas chez l'adulte. Des plexus périphériques, composés de cellules nerveuses, sont également retrouvés dans les bords du manteau et les palpes (Bullock et Horridge, 1965).

Objectifs et contexte scientifique

Les efflorescences de phytoplancton toxique sont de plus en plus fréquentes et intenses dans les zones littorales du monde entier depuis quelques décennies ([Van Dolah, 2000](#)). En France, et notamment en Bretagne, des efflorescences de dinoflagellés toxiques du genre *Alexandrium*, producteurs de toxines paralysantes (PST), sont enregistrées régulièrement depuis les années 1980 ([Fremy et al., 1989](#)).

Le taux de PST bioaccumulés par les bivalves peut dépendre de leur sensibilité à ces toxines. Ainsi, la moule *Mytilus edulis*, connue pour être très peu sensible aux PST, est l'une des espèces de bivalves accumulant les plus grandes quantités de PST lors des efflorescences ([Twarog, 1974](#)). Chez la mye, *Mya arenaria*, sur la côte est Nord-Américaine, deux populations ont été étudiées par [Bricelj et al. \(2004\)](#). L'une d'elles, régulièrement exposée aux efflorescences d'*Alexandrium* spp., s'est révélée résistante aux PST, les myes accumulant des niveaux élevés de PST sans mourir. Il a été démontré qu'une mutation ponctuelle, modifiant un seul acide aminé au niveau du site de liaison à la STX de la séquence du Na_v , était associée à une diminution de l'affinité pour la STX, jusqu'à 1000 fois. Cela explique la sensibilité nerveuse inférieure et l'accumulation plus élevée de PST dans des populations résistantes de myes exposées à *Alexandrium* spp. par rapport aux populations sensibles ([Bricelj et al., 2005](#)). Outre des mutations au niveau de l'ADN, des phénotypes contrastés de sensibilité des Na_v aux toxines peuvent résulter de régulations post-transcriptionnelles générant également de la diversité moléculaire chez le Na_v . Ainsi, chez la blatte *Blattella germanica*, l'épissage alternatif conduit à la formation de deux variants distincts de Na_v (para) avec une sensibilité différente à un insecticide pyréthrianoïde, l'un étant 100 fois moins sensible à l'insecticide que le second ([Tan et al., 2002](#)). Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, une forte variabilité interindividuelle de la bioaccumulation de PST est régulièrement observée lors des efflorescences naturelles d'*Alexandrium* spp., mais aussi chez des huîtres exposées expérimentalement à une souche toxique d'*A. minutum* ([Haberkorn et al., 2011](#)). D'un point de vue fondamental, il est nécessaire de comprendre le déterminisme de l'accumulation de PST chez *C. gigas*, pour connaître les mécanismes

impliqués et savoir s'il existe un lien entre le niveau d'accumulation et la sensibilité des huîtres et si cette sensibilité résulte d'une différence de sensibilité des Na_v , comme cela a pu être observé chez la mye et la blatte. D'un point de vue plus appliqué, une meilleure compréhension de l'accumulation des PST, permettrait d'évaluer plus précisément les risques pour la santé humaine. La variabilité d'accumulation étant élevée, il apparaît important de pouvoir définir précisément les gammes d'accumulation pour éviter une sous-estimation du niveau de contamination.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est de déterminer si la différence d'accumulation des PST observée chez des huîtres exposées à *Alexandrium sp.*, résulte d'une sensibilité différente des huîtres aux PST et si cette différence de sensibilité dépend du Na_v et de ses potentielles isoformes. Ce travail de thèse se divise en deux objectifs principaux.

1) Caractériser le canal sodium voltage-dépendant de l'huître creuse *C. gigas* et ses potentielles isoformes par une approche de biologie moléculaire

Ce premier objectif consiste à caractériser le(s) gène(s) Na_v chez *C. gigas*, ce qui implique de déterminer le nombre de gènes codant pour le(s) Na_v , leur structure génétique et protéique et leur positionnement d'un point de vue phylogénétique. Pour cela deux approches ont été menées en parallèle : une approche *in silico* à partir de bases de données et une approche de biologie moléculaire par PCR et séquençage, puis analyse des séquences. Le polymorphisme de type SNP du Na_v a ensuite été étudié dans plusieurs populations, afin de déterminer s'il existe des mutations au niveau du site de fixation des PST qui pourraient être responsables d'une potentielle résistance. Puis, des phénomènes d'épissage alternatif ont été recherchés. Pour déterminer si les isoformes de Na_v ont des sensibilités différentes aux PST et si ce phénomène induit une différence d'accumulation de PST entre les individus, deux aspects doivent être abordés :

i) Si les isoformes du Na_v ont des sensibilités différentes aux PST, des huîtres présentant des quantités d'accumulation de PST contrastées pourraient exprimer des isoformes différentes ou présenter des niveaux d'expression différentielle de chacune des isoformes. Cette étude a été réalisée dans le chapitre 3.

ii) La sensibilité aux PST de chacune des isoformes doit être déterminée. Pour cela, il est nécessaire de faire exprimer chacune des isoformes dans un système cellulaire hétérologue, afin de tester la réponse électrophysiologique en présence de STX. Cette partie n'a pas pu être accomplie en raison des difficultés rencontrées lors du sous-clonage du Na_v . La méthodologie testée est, cependant, expliquée dans le chapitre 2. Pour pallier ce problème technique, une autre voie a été utilisée. En effet, les PST ciblent les Na_v , qui sont responsables de la communication neuro-musculaire et sont exprimés principalement dans le système nerveux. Ainsi, la réponse des nerfs d'huîtres peut être considérée comme un proxy de la sensibilité des Na_v aux PST. La sensibilité du système nerveux de l'huître vis-à-vis des PST a donc été étudié par électrophysiologie sur des nerfs d'huîtres isolés. Cette partie a fait l'objet du second objectif de la thèse.

2) Etudier la sensibilité aux PST de l'huître creuse *C. gigas* par une approche d'électrophysiologie

Pour répondre à cet objectif, une approche d'électrophysiologie a été mise au point afin d'étudier la sensibilité à la STX des nerfs cérébroviscéraux des huîtres. Une première étape de mise au point de la technique d'enregistrement sur les nerfs a été effectuée à partir d'huîtres collectées sur le terrain et non exposées aux PST. Les premières analyses de traitement des nerfs à la STX ont permis d'établir des courbes dose-réponse qui ont ensuite été analysées. Puis, des mesures ont été réalisées sur des huîtres exposées expérimentalement ou non à *A. minutum*, pour déterminer si une pré-exposition des huîtres aux PST modifiait leur sensibilité à la STX. Parallèlement, la charge en PST de leur glande digestive a été mesurée à l'aide d'analyses biochimiques.

Le manuscrit est construit de la façon suivante : un premier chapitre introductif qui a présenté une introduction bibliographique permettant d'avoir une vue globale des connaissances déjà présentes dans la littérature concernant les micro-algues toxiques et leurs impacts, ainsi que les canaux sodium voltage-dépendant.

Le second chapitre portera sur la description détaillée du matériel et des méthodes utilisés lors de ce travail de thèse, ainsi que les mises au point techniques qui ont permis

cette étude. Les résultats obtenus au cours de la thèse sont ensuite présentés dans deux chapitres, faisant l'objet de deux articles scientifiques.

Le chapitre 3 correspondant au premier objectif, présentera la caractérisation du canal sodium voltage-dépendant de l'huître creuse *C. gigas* par une approche de biologie moléculaire. Les données de ce chapitre sont valorisées par l'article 1 (Annexe 1) publié dans le numéro spécial Marine Neurotoxins du journal Marine Drugs.

Le chapitre 4 répondant au second objectif, décrira l'étude de la sensibilité aux PST de l'huître creuse *C. gigas* par une approche d'électrophysiologie. Les données résultant de ce chapitre sont valorisées dans l'article 2 (Annexe 2) soumis au journal Toxicological Sciences.

Enfin, un dernier chapitre de synthèse permettra de discuter des résultats présentés et de les mettre en perspectives.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES



Matériel et méthodes

I. Matériel biologique et expérimentations

Une partie des travaux de thèse a pour objectif d'évaluer les effets de l'accumulation des PST sur l'expression du Na_v et la sensibilité des huîtres. Durant cette thèse, trois expérimentations d'exposition aux micro-algues toxiques *Alexandrium* ont été réalisées et sont nommées « expérience 1 », « expérience 2 » et « expérience 3 » tout au long de ce manuscrit. La démarche consiste à exposer des huîtres à différentes souches de la micro-algue toxique *Alexandrium minutum*, puis d'évaluer deux paramètres physiologiques : soit l'expression du Na_v (expériences 1 et 2), soit la sensibilité des nerfs des huîtres (expérience 3). Les caractéristiques de chacune des trois expérimentations sont détaillées dans le Tableau 3.

1. L'huître creuse *Crassostrea gigas*

Les huîtres utilisées dans la caractérisation du canal sodium voltage-dépendant (Na_v) et de ses variants (Chapitre 3, Parties 2 et 3) ont été prélevées sur les rochers et provenaient du Dellec (Brest, Finistère). Les huîtres ont été prélevées en dehors de la période d'efflorescence toxique et ne contenaient donc pas de toxines. Neuf tissus ont été disséqués sur chaque individu: manteau (M), branchies (B), cœur (C), muscle lisse (MI), muscle strié (Ms), palpes labiaux (P), ganglions viscéraux (GI), gonade (G) et glande digestive (D) (Figure 28). Immédiatement après la dissection, les tissus ont été broyés avec un homogénéisateur ultraturax dans du tampon TRI Reagent® (Ambion™) ou placés dans du RNA $later$ ® (Ambion™) et stockés à -80°C jusqu'à extraction.

Tableau 3 : Résumé des expérimentations réalisées au cours de la thèse, avec : la localisation des résultats associés dans le manuscrit ; l'origine des huîtres utilisées et leur effectif ; la nature de l'exposition aux PST, ainsi que les souches utilisées ou la saxitoxine ; les analyses réalisées.

Expérimentations	Chapitres (résultats)	Huîtres (origine)	Effectif	Exposition aux PST	Analyses
Caractérisation des Nav	Chap. 3, Partie 1	Naturelles (Brest, Finistère, France)	10		Extraction ARN, RT-PCR, PCR, clonage, qPCR
Etude du polymorphisme SNP	Chap. 3, Partie 2	4 populations naturelles : Logonna-Daoulas (Finistère, France)	50		Extraction ADN, séquençage, analyse du polymorphisme
		Larmor Baden (Morbihan, France)	50		
		St Clément des Baleines (Charente Maritime, France)	50		
		Sendai (Miyagi, Japon)	20		
Expérience 1 : Relation entre expression du Nav et accumulation de PST	Chap. 3, Partie 3	Ecloserie de La Tremblade (Charente-Maritime)	96	Culture d' <i>A. minutum</i> souche Daoulas 1257	Expression des variants : Extraction ARN, RT-PCR, qPCR Dosage des toxines
Expérience 2 : Relation entre expression du Nav et accumulation de PST	Chap. 3, Partie 3	Ostréiculteur d'Arcachon (Gironde, France)	176	Culture d' <i>A. minutum</i> souche AM89BM	Expression des variants : Extraction ARN, RT-PCR, qPCR Dosage des toxines
Electrophysiologie : caractérisation de la sensibilité des nerfs	Chap. 4, Partie 1	Naturelles (Brest, Finistère, France)	40	Saxitoxine purifiée	Enregistrements électrophysiologiques
Expérience 3 : Relation entre sensibilité et accumulation de PST	Chap. 4, Partie 2	Ostréiculteur de Brest (Finistère, France)	53	Culture d' <i>A. minutum</i> souche Daoulas 1257	Enregistrements électrophysiologiques Dosage des toxines

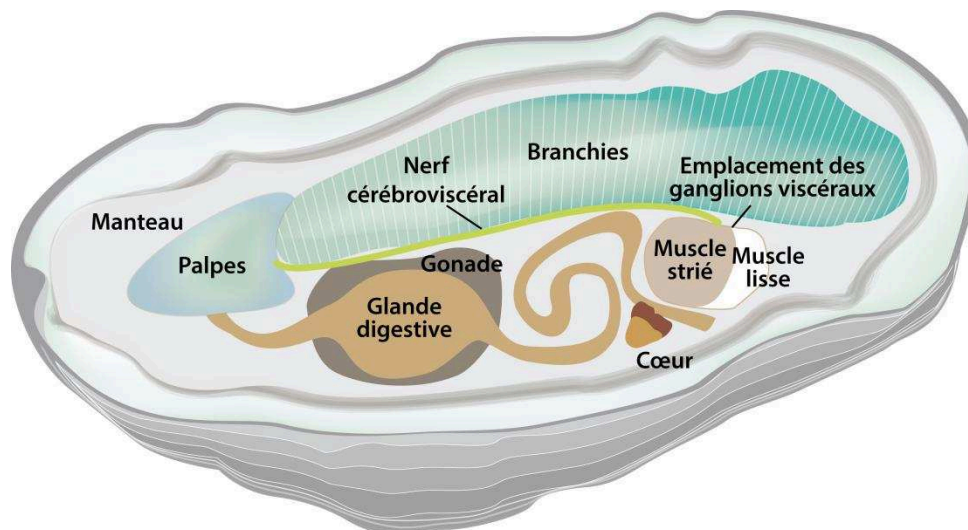


Figure 28 : Schéma simplifié de l'anatomie interne de l'huître creuse *C. gigas* dans sa valve inférieure et les différents tissus prélevés.

Les huîtres utilisées pour les analyses de polymorphisme (Chap. 3, Partie 2) provenaient de 4 populations différentes d'huîtres, *C. gigas*, sauvages ou ramassées sur les rochers. Trois populations françaises de la côte ouest, régulièrement exposées à des efflorescences de PST, ont été choisies : Logonna-Daoulas (Brest, Finistère), Larmor Baden (Morbihan) et St Clément des Baleines (Ile de Ré, Charente-Maritime), avec 50 individus par population. La population japonaise, avec 20 individus, provenait de la Baie de Sendai (préfecture de Miyagi) connue pour être exposée aux efflorescences de PST depuis des années. Les branchies de ces huîtres ont été prélevées et placées dans de l'éthanol pour une extraction future de l'ADN.

Les huîtres utilisées pour les trois expérimentations d'exposition proviennent : de parcs ostréicoles de La Tremblade (naissain d'écloserie) (Charente-Maritime, France) pour l'expérience 1 (Chap. 3, Partie 3) ; d'un ostréiculteur de la baie d'Arcachon (captage naturel) (Gironde, France) pour l'expérience 2 (Chap. 3, Partie 3); d'un ostréiculteur de la rade de Brest (captage naturel) (Finistère, France) pour l'expérience 3 (Chap. 4, Partie 2). Toutes les huîtres sont diploïdes et celles des expériences 2 et 3 sont issues de captage naturel. Les expériences sont décrites dans les paragraphes 4.1 (p. 86) et 4.2 (p. 89) de cette partie.

Les huîtres utilisées dans l'étude de la sensibilité des nerfs à la STX et la détermination de la courbe dose-réponse (Chap. 4, Partie 1) provenaient également du Dellec (Brest, Finistère) décrit précédemment. Les nerfs cérébroviscéraux ont été prélevés pour effectuer des mesures d'électrophysiologie.

2. Dissection des nerfs cérébroviscéraux et des ganglions viscéraux des huîtres

Pour la dissection des ganglions viscéraux et des nerfs, il faut ouvrir l'huître par la charnière (côté antérieur). Cela permet de préserver le muscle adducteur et donc les ganglions viscéraux. L'huître est sortie de sa coquille et placée sur la « tranche », puis le manteau et les branchies sont retirés du côté postérieur pour laisser apparaître la zone où se trouvent les ganglions viscéraux (Figure 29). Ils sont localisés à la jonction entre le muscle strié et le muscle lisse, du côté des branchies. La paire de ganglions en forme d'amande est de couleur foncée (jaune à marron) selon la pigmentation de l'huître. Une fois les ganglions localisés, le prélèvement du nerf cérébroviscéral, qui rejoint les ganglions viscéraux et cérébraux, est réalisé à l'aide de micro ciseaux ophtalmologiques. Le nerf part du ganglion viscéral et continue vers l'avant entre le muscle et la gonade (le nerf est coincé sous la gonade lorsque celle-ci est très développée), puis le long des branchies jusqu'au ganglion cérébral très peu visible. Ce prélèvement du nerf permet d'avoir une longueur maximale de 3 cm. Le deuxième nerf, situé sur l'autre côté de l'huître, est prélevé de la même façon. Le prélèvement des ganglions viscéraux est ensuite réalisé en surface du muscle adducteur, en glissant les ciseaux entre les ganglions et le muscle.

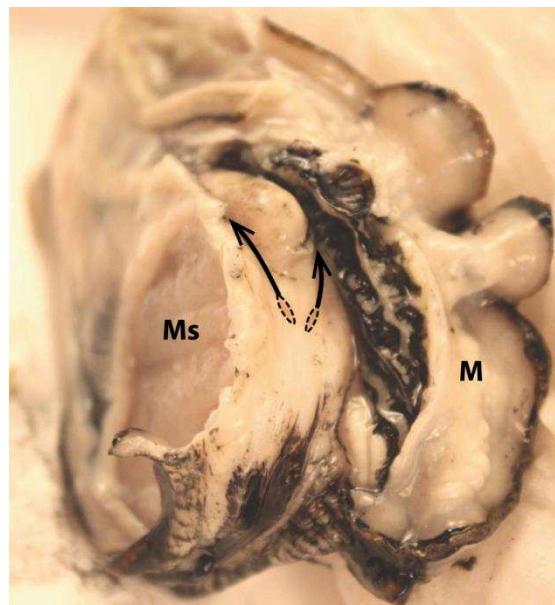


Figure 29 : Observation des ganglions viscéraux et des nerfs d'huître creuse *C. gigas*. L'huître est placée sur le côté dorsal, le manteau et les branchies ont été découpés et mis sur le côté. Les flèches représentent les deux nerfs cérébroviscéraux partant des ganglions viscéraux (en pointillés) et allant vers la partie antérieure de l'huître. Ms : muscle strié, M : manteau.

3. Culture des micro-algues

Différentes cultures de micro-algues ont été réalisées pour nourrir les huîtres lors des expérimentations d'exposition aux micro-algues toxiques. Le dinoflagellé *Alexandrium minutum* Halim (1960) souche Daoulas 1257 (isolé en Rade de Brest, Finistère) a été utilisé pour les expériences 1 et 3. La souche d'*A. minutum* AM89BM (isolée en baie de Morlaix, Finistère) a été utilisée pour l'expérience 2 uniquement. Le dinoflagellé non toxique *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein, souche HT99PZ (isolé en Baie de Penzé, Finistère) a servi de contrôle dans les expériences 1 et 2 en raison de sa similitude de taille et de forme avec *A. minutum*. Tandis que pour l'expérience 3, c'est *Tisochrysis lutea* (Bendif et al., 2013) qui a été utilisée comme contrôle. Les cultures ont été réalisées en milieu L1 (Guillard et Hargraves, 1993) pour les dinoflagellés et en milieu de Conway (Walne, 1966) pour *T. lutea*, à 16°C avec un cycle lumière:obscurité de 12:12h et ont été récoltées pendant la phase de croissance exponentielle. Les densités de cellules d'algues ont été déterminées par comptage en utilisant des cellules de Nageotte ou Malassez sous un microscope optique.

4. Protocole expérimental de l'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques

4.1. Relations entre l'expression du gène du Na_v et l'accumulation de toxines

Pour caractériser la relation possible entre l'expression du canal Na_v et l'accumulation de toxines, les huîtres ont été exposées à deux souches différentes d'*A. minutum* (Daoulas 1257 et AM89BM) et au dinoflagellé non toxique *Heterocapsa triquetra* (HT99PZ). Pour les deux expériences, deux phases ont été considérées: la période d'acclimatation et la période d'exposition. Chaque bac a été alimenté avec des cultures de micro-algues à l'aide d'une pompe péristaltique. Des air-lifts centraux ont été utilisés pour homogénéiser la concentration de micro-algues dans l'eau des bacs.

4.1.1. Expérience 1

Cette expérience, nommée « Ploïtox » dans le cadre du projet ANR ACCUTOX, a été réalisée en Octobre 2015 au sein du LEMAR¹⁰ à l'IUEM¹¹. Les huîtres ont été distribuées de manière aléatoire dans des bacs de 18 L (triplicat ; 12 H/bac), selon deux conditions: les huîtres contrôles (n=36) et les huîtres exposées (n=60) (Figure 30). Au cours de la période d'acclimatation de 7 jours, les huîtres ont été nourries avec un flux continu de 19 L d'eau de mer par jour avec *H. triquetra* (10^6 cellules/L). L'exposition de 4 jours a été réalisée avec le même débit continu d'*A. minutum* (3×10^6 cellules/L), correspondant à la concentration d'un bloom en conditions naturelles, ou d'*H. triquetra* (10^6 cellules/L).

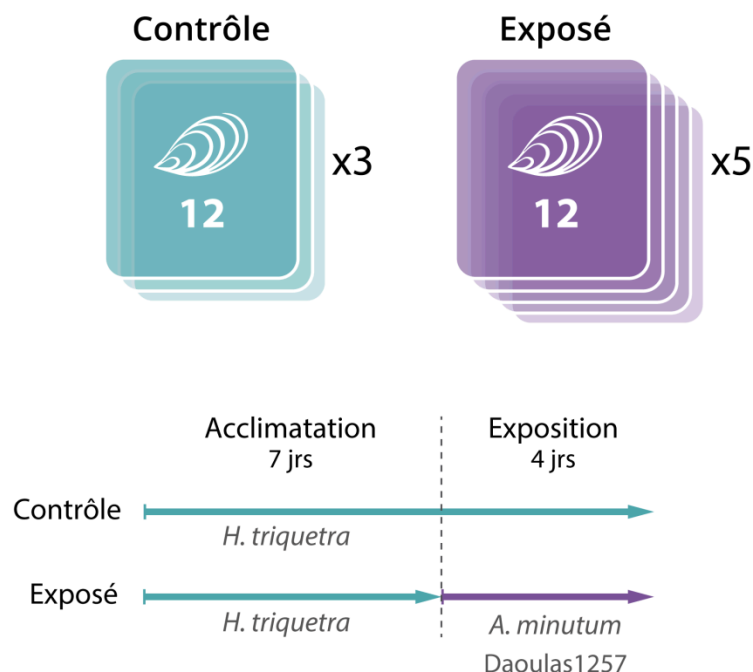


Figure 30 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 1 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et expression des ARNm du Nav. Les huîtres sont acclimatées pendant 7 jours avec *H. triquetra*, puis divisées en deux groupes exposés (4 jours) à : *H. triquetra* (contrôle) ou *A. minutum* Daoulas 1257 (exposé).

A la fin de la période d'exposition, les huîtres ont été disséquées et les glandes digestives ont été prélevées, pesées et stockées dans l'azote jusqu'au dosage toxinique. Les ganglions viscéraux et les muscles striés ont été prélevés et stockés dans du RNA/later® (Ambion™) à -80°C.

¹⁰ Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin

¹¹ Institut Universitaire Européen de la Mer

4.1.2. Expérience 2

Cette expérience, nommée « CgRhythm » dans le cadre du projet ANR ACCUTOX, a été réalisée en Décembre 2015 à la station marine d’Arcachon en collaboration avec l’UMR EPOC¹² et dans le cadre de la thèse de Laura Payton. Les huîtres ont été distribuées de manière aléatoire dans des bacs en triplicats, selon deux conditions: les huîtres contrôles (n=88) et les huîtres exposées (n=88) (Figure 31). Au cours de la période d'acclimatation de 7 jours, les huîtres ont été nourries avec un flux continu de 144 L d’eau de mer par jour avec *H. triquetra* (10^6 cellules/L). L’exposition de 6 jours a été réalisée avec un débit continu de 144 L d’eau de mer par jour avec *A. minutum* (10^6 cellules/L) ou *H. triquetra* (10^6 cellules/L).

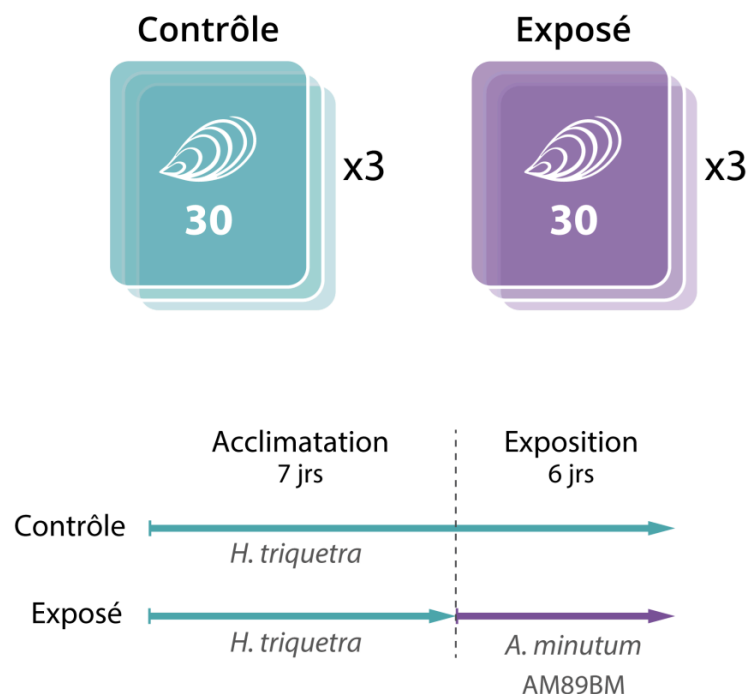


Figure 31 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 2 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et expression des ARNm du Na_v . Les huîtres sont acclimatées pendant 7 jours avec *H. triquetra*, puis divisées en deux groupes exposés (6 jours) à *H. triquetra* (contrôle) ou *A. minutum* AM89BM (exposé).

A la fin de la période d'exposition, les huîtres ont été disséquées et les glandes digestives ont été prélevées, pesées et stockées dans l'azote jusqu'au dosage toxinique. Les ganglions viscéraux et les muscles striés ont été prélevés et stockés dans du RNA/later® (Ambion™) à -80°C.

¹² Environnement et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux

4.2. Relations entre la sensibilité des nerfs et l'accumulation de toxines (Expérience 3)

Pour caractériser la sensibilité des nerfs d'huîtres et voir l'effet d'une pré-exposition aux PST, les huîtres ont été exposées à la souche d'*A. minutum* Daoulas 1257 et à la micro-algue non toxique *T. lutea*. Cette expérience, nommée « Nereltox » dans le cadre du projet ANR ACCUTOX, a été réalisée en Mai 2016 au sein du LEMAR à l'IUEM. Les huîtres ont été distribuées de manière aléatoire dans des bacs de 18 L (triplicats), selon deux conditions : les huîtres contrôles (n=23) et les huîtres exposées (n=30) (Figure 32). Chaque bac a été alimenté avec des cultures de micro-algues à l'aide d'une pompe péristaltique. Des air-lifts centraux ont été utilisés pour homogénéiser la concentration de micro-algues dans l'eau des bacs. L'exposition de 4 jours a été réalisée avec un débit continu de 4,3 L d'eau de mer par jour avec *A. minutum* (16×10^6 cellules/L), correspondant à la concentration d'un bloom en conditions naturelles, ou *T. lutea* (4×10^8 cellules/L).

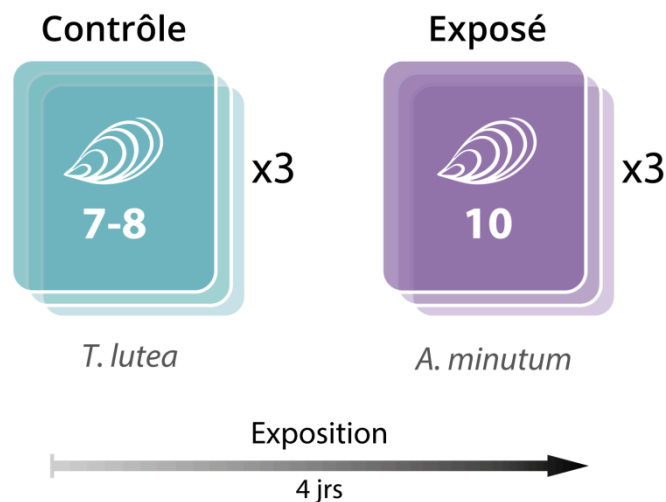


Figure 32 : Schéma représentant le protocole expérimental de l'expérience 3 permettant d'analyser la relation entre accumulation de toxines et sensibilité des nerfs. Les huîtres sont divisées en deux groupes, exposés (4 jours) à *T. lutea* (contrôle) ou *A. minutum* Daoulas 1257 (exposé).

A la fin de la période d'exposition, les glandes digestives des huîtres ont été prélevées, pesées et stockées dans l'azote jusqu'au dosage toxinique (ELISA). Les ganglions viscéraux, les muscles striés et un nerf ont été prélevés et stockés dans du RNA/later® (Ambion™) à -80°C.

II. Etude des canaux Na_v de *Crassostrea gigas* par une approche de biologie moléculaire

Dans cette partie, l'étude des Na_v de *C. gigas* a été réalisée à partir des séquences Na_v de type 9 et 5 annotées comme étant homologues des canaux sodium voltage-dépendant par [Zhang et al. \(2012\)](#). Suite à leur caractérisation (Chapitre 3, Partie 1), ces séquences ont été renommées Cg Na_v 1 (Na_v 9) et Cg Na_v 2 (Na_v 5). Les deux séquences ont été étudiées dans le cadre de l'analyse phylogénétique (Chapitre 3, Partie 1) et de l'expression des ARNm pendant l'ontogénèse de l'huître (Chapitre 3, Partie 2). Cependant, pour toutes les autres analyses réalisées sur les Na_v , seule la séquence Cg Na_v 1 a été étudiée (explications dans le Chapitre 3, Partie 1).

1. Extraction des ARN totaux et traitement à la DNase

L'extraction des ARN totaux est réalisée en conditions RNase free. Les fragments de tissus conservés dans le *RNA/later*[®] (Ambion[™]) sont placés dans 1,5 mL de TRI Reagent[®] (Ambion[™]), broyés et homogénéisés à l'aide d'un ultraturax. L'homogénat incube ensuite à température ambiante pendant 5 min, pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. Une centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C est réalisée et le surnageant est prélevé. L'ajout de 200 µL de chloroforme et une incubation de 10 minutes sur glace permet de séparer les phases aqueuse et organique. Après, une centrifugation à 12000 g pendant 20 min à 4°C, la solution est divisée en 3 phases : la phase inférieure organique rose contenant phénol-chloroforme, ADN et protéines, une interphase contenant ADN et protéines et la phase supérieure aqueuse incolore contenant les ARN. Cette dernière est prélevée et 500 µL d'isopropanol sont ajoutés dans le but de précipiter l'ARN. Une incubation de 2 h min à -20°C et une centrifugation à 10000 g pendant 30 min à 4°C permettent de culoter l'ARN. Le culot est ensuite lavé 3 fois avec 1mL d'éthanol 75 %, préparé avec de l'eau traitée au DEPC¹³ et centrifugé à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Ce culot est séché pendant 5 à 10 min puis repris dans de l'eau RNase-free. L'ARN est conservé à -80°C.

¹³ Diéthyl pyrocarbonate qui permet de détruire les RNases

Les ARN totaux subissent un traitement à la DNase afin de dégrader toutes traces d'ADN dans l'échantillon, à l'aide du kit DNase Max® (MO BIO Laboratories). Pour cela, 20 µg d'ARN totaux sont mélangés à 1 µL d'enzyme DNase, 5 µL de tampon de réaction 10X et 24 µL d'eau RNase free. Le mélange incube à 37°C pendant 20 min, pour activer l'enzyme. La DNase est ensuite éliminée grâce à 5 µL de résine, qui a pour rôle de fixer l'enzyme, et une incubation de 10 min à température ambiante. L'enzyme fixée aux billes de la résine est retirée après centrifugation à 13000 g pendant 1 min. Le surnageant contenant l'ARN total est prélevé et conservé à -80°C.

2. Mesure de la concentration des ARN et évaluation de leur intégrité

La concentration des ARN totaux (avant et après le traitement à la DNase) a été analysée avec un spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Le rapport des densités optiques mesurées à 260 nm et 280 nm permet d'évaluer la contamination en protéines de la solution. L'absorbance maximale des acides nucléiques se fait à 260 nm et celles des protéines à 280 nm. Le rapport doit être compris entre 1,8 et 2,1 pour les ARN. Le rapport des densités optiques à 260 nm et 230 nm permet lui d'évaluer la présence de solvants résiduels et de résidus organiques. Il doit être supérieur à 1,8. L'intégrité de l'ARN est également évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose.

L'intégrité de l'ARN total (après le traitement à la DNase) a été vérifiée avec un bioanalyseur Agilent. Pour cela, 1 µL d'ARN total est ajouté à un marqueur fluorescent, émettant une fluorescence en fonction du temps de rétention des molécules d'ARN. Les ARN dégradés et courts ont un temps de rétention plus faible et une fluorescence moindre que les ARN de bonne qualité et de grande taille. Un indice est déterminé pour évaluer l'intégrité des ARN, il s'agit du RIN (RNA Integrity Number), qui doit être proche de 2 (ARN non dégradé).

3. Reverse transcription

La reverse transcription permet d'obtenir de l'ADNc à partir des ARN totaux extraits. La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN total en utilisant des Oligo(dT)₁₈ et le kit RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). Ce kit permet la rétro-transcription de l'ARN en ADNc simple brin. Les Oligo(dT)₁₈ se fixent à la queue poly-A des ARNm et permet ainsi de sélectionner les ARN codant pour des protéines. Cela offre plus de chance de sélectionner les ARN d'intérêts. Un mix contenant 1 µg d'ARN total et 1 µL d'Oligo(dT)₁₈ est incubé à 65°C pendant 5 min pour dissocier les structures secondaires de l'ARN. Sont ensuite ajoutés, 4 µL de tampon de réaction 5X, 1 µL de Ribolock qui est un inhibiteur de RNases, 2 µL de dNTPs 10 mM et 1 µL de reverse transcriptase. L'enzyme est activée par une incubation pendant 1 h à 42°C puis inactivée à 70°C pendant 5 min. Les échantillons d'ADNc sont dosés au Nanodrop et conservés à 4°C.

4. Amplification de la séquence d'ADNc de la sous-unité α du Na_v

La séquence génomique de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant (associée à CgNa_v1) de l'huître creuse a été obtenue par [Zhang et al. \(2012\)](#) et téléchargée à partir du site OysterBase¹⁴. Cette séquence (CGI_10001852) a été utilisée comme référence pour concevoir les amorces de toutes les amplifications d'ADNc. Seule CgNa_v1 a été étudiée ici (voir Chapitre 3, Partie 1, expliquant pourquoi CgNa_v2 n'a pas été étudié).

L'amplification de l'intégralité de l'ADNc du Na_v en une fois a été testée à plusieurs reprises mais sans succès. La stratégie adoptée a donc été d'amplifier la séquence totale d'ADNc en 4 fragments qui sont clonés ensuite (Figure 33). L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µL. Chaque réaction contenait 4 µL d'ADNc, 200 µM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce (Tableau 4), 10 µl de Buffer 5X Phusion™ HF et 1 U de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzyme). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 98°C 2 min, 40 cycles [98°C 10 sec, 63°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 10 min. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis une seconde PCR a été réalisée sur ces produits de PCR dans le but d'obtenir une concentration plus grande. La deuxième

¹⁴ <http://www.oysterdb.com>

amplification a été réalisée selon le même protocole que précédemment, en utilisant 2 μL de produits de PCR et en ajoutant 1,5 μL de DMSO et 1 μL de GoTaq Flexi DNA (Promega) permettant d'ajouter des adénosines à la fin de la séquence, nécessaires pour le clonage. Les produits de PCR finaux ont été clonés dans le plasmide pCR™4-TOPO® grâce au kit de clonage TOPO® TA (Invitrogen) (voir paragraphe 5.3, p. 96).

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des 4 fragments de la séquence d'ADNc.

Nom des amplicons	Nom des amorces	Séquence des amorces (5' - 3')	Longueur (pb)
Fragment 1	CgNav9_TF	CAGAACGGATAGTTGGGGAAT	21
	CgNav9_Var2R	CTTCCCGTAGTTCGTCATGC	20
Fragment 2	CgNav9_Var2F	GTGATACTGCTGGGCTCGTT	20
	CgNav9_2Rs	GCTTGTTCTCTCTCGTTCG	20
Fragment 3	CgNav9_Ch6F	GGAAGATGGGTCAAAGTCAAAG	22
	CgNav9_Var1R	GCGGAGACTTAGACGACATC	20
Fragment 4	CgNav9_Var1F	G TTCATCGGTGTCATCATTG	20
	CgNav9_TR	GGGTTGATAACAGTGGGTGAA	21

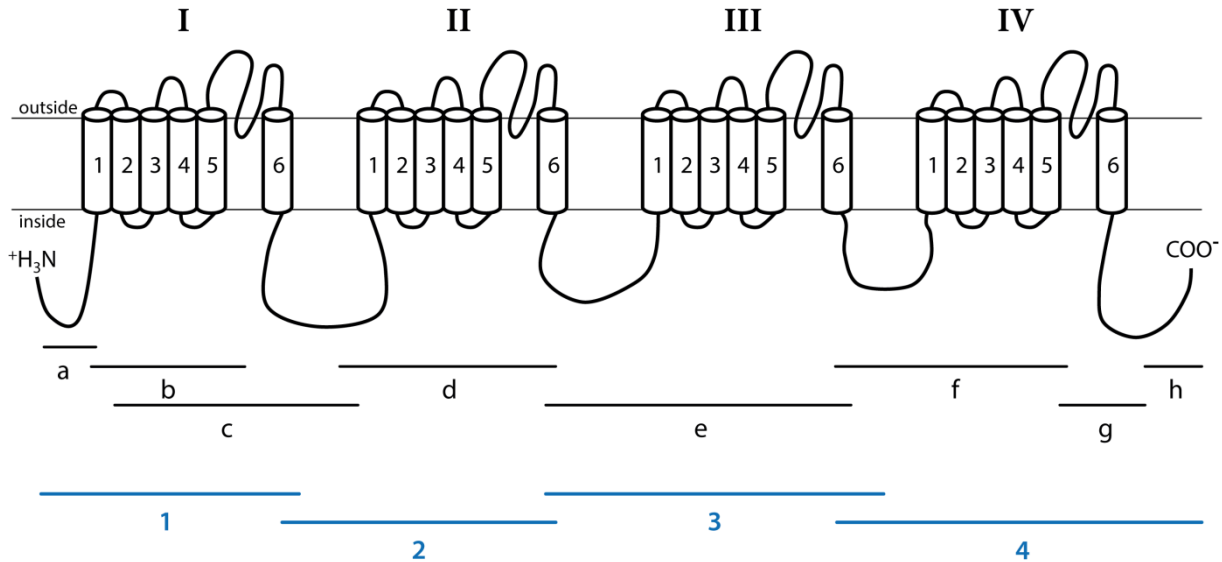


Figure 33 : Stratégie d'amplification de la séquence d'ADNc totale de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant de *C. gigas*. Le canal est composé de quatre domaines homologues (I-IV), ayant chacun six segments transmembranaires (1-6). Les fragments a, b, c, d, e, f, g et h ont été utilisés pour obtenir la séquence complète du Nav_α . Les fragments 1, 2, 3 et 4 ont été utilisés pour cloner la totalité de la séquence ADNc du Nav_α . Les lignes indiquent l'emplacement des amplicons de PCR par rapport à la structure du canal.

Pour pouvoir séquencer proprement chaque fragment et étudier l'existence de variants d'épissage, la séquence d'ADNc complète a été amplifiée étape par étape en 8 fragments plus petits (« a » à « h ») que les fragments 1 à 4. Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 5. Les amplicons de PCR couvrant la séquence complète d'ADNc sont présentés dans la Figure 33. Les variants d'épissage du canal Nav des huîtres ont été recherchés par clonage et séquençage d'ADNc à partir des 9 tissus de 5 individus. L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µL. Chaque réaction contenait 2 µL d'ADNc, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,1 µM de chaque amorce, 10 µl de Buffer 5X et 1,5 U de polymérase GoTaq Flexi DNA (Promega). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C 2 min, 40 cycles [95°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 4 min], 72°C 5 min. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et clonés dans le plasmide pCR™4-TOPO® grâce au kit de clonage TOPO® TA (Invitrogen) (voir paragraphe 5.2, p. 95) avant de l'envoyer à séquencer (Sanger ABI 3730xl) par la société GATC (Allemagne).

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence d'ADNc du Nav de *C. gigas* par étapes.

Nom des amplicons	Nom des amorces	Séquence des amorces (5' - 3')	Longueur (pb)
a	CgNav9_TF2	GCTGTGTACGACTAAAATGGAG	22
	CgNav9_e1R	ACGCGCTGAATAATGGATG	19
b	CgNav9_Ch2F	AGCCCCTTTAACCCACTCAG	20
	CgNav9_1R	AACGAGCCCAGCAGTATCAC	20
c	CgNav9_Ch2F	AGCCCCTTTAACCCACTCAG	20
	CgNav9_Ch4R	CAAAAGCATCCAACACGATG	20
d	CgNav9_Ch5F	AGCGACTACCTTCCTTTTCGAG	21
	CgNav9_2Rs	GCTTGGTTCTCTCTCGTTTCG	20
e	CgNav9_Ch6F	GGAAGATGGGTCAAAGTCAAAG	22
	CgNav9_3r'2	GCGTCATTCACTTTCGATCC	22
f	CgNav9_Ch8F	CCTGAATCTGTTTCATCGGTGT	21
	CgNav9_4R	TTACAACCCTCCTCGTTCGT	20
g	CgNav9_Ch9F	CACGTTCCGGATGAGTTTCT	20
	CgNav9_e25R	GCGGTATCTTCGTGAATGGT	20
h	CgNav9_Ch10F	ACTACGCCGCAAGGGTTAT	19
	CgNav9_TR	GGGTTGATAACAGTGGGTGAA	21

5. Sous-clonage des produits de PCR

5.1. Principe du sous-clonage

La méthode consiste à intégrer un fragment d'ADN d'intérêt au sein d'un organisme unicellulaire, le plus souvent, les bactéries *Escherichia coli*. Elles possèdent des capacités de multiplication et une grande vitesse de prolifération nécessaire pour reproduire le fragment d'intérêt. Cet ADN est tout d'abord inséré dans un plasmide servant de vecteur et correspondant à de l'ADN circulaire. Le plasmide portant le fragment d'intérêt est ensuite injecté dans les bactéries compétentes qui sont mises en culture. Les plasmides en très grand nombre peuvent être extraits au moment de la phase exponentielle de croissance des bactéries.

5.2. Clonage avec les plasmides pCR™4-TOPO® et pCR-XL-TOPO® dans des cellules TOP10

Le clonage des petits fragments de produits de PCR (« a » à « h ») a été réalisé grâce au kit de clonage TOPO® TA (Invitrogen), tandis que les fragments (> 1 kb) sont clonés à l'aide du kit de clonage TOPO® XL PCR (Invitrogen). Le protocole étant le même pour les deux plasmides utilisés, il sera détaillé ci-dessous en prenant comme exemple le plasmide pCR™4-TOPO® (Figure 34). La ligation des ADNc au plasmide pCR™4-TOPO® est réalisée en incubant 3 µL d'ADNc et 1 µL de plasmide à température ambiante pendant 30 min. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 1 µL de solution stop 6X et en mélangeant pendant plusieurs secondes. Le mélange est centrifugé brièvement et placé sur glace. La seconde étape correspond à la transformation de bactéries chimio-compétentes *Escherichia coli* (TOP10, Invitrogen), en ajoutant 2 µL du mélange précédent au tube de bactéries fourni. Le plasmide est introduit dans les bactéries grâce à un choc thermique, de 0 à 42°C, puis à nouveau sur glace. Les bactéries transformées sont placées dans 400 µL de milieu S.O.C. et incubées pendant 1 h à 37°C sous agitation de 200 rpm. Les cultures sont ensuite étalées sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB agar et 50 µg/mL de kanamycine pour incubation d'une nuit à 37°C. Les colonies de bactéries transformées (résistantes à la kanamycine) sont

sélectionnées, repiquées dans du milieu LB liquide contenant 50 µg/mL de kanamycine et incubées à 37°C sous agitation de 300 rpm pendant 8 h minimum. Cette étape est renouvelée pour permettre de sélectionner les bactéries au niveau de la phase de croissance de la colonie. La troisième étape consiste à récupérer les plasmides contenus dans les bactéries. Pour cela, la méthode de la miniprep est utilisée via le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant. La dernière étape correspond à la vérification du clonage en réalisant une digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction EcoRI (Promega) à 37°C pendant 1h30. Le mélange réactionnel contient 2 µL de tampon H EcoRI, 1 µL d'enzyme EcoRI, 6 µL d'ADN plasmidique, 0,2 µL d'albumine de sérum bovin et de l'eau. La totalité des produits digérés est déposée sur gel d'agarose 1,5 %, ainsi que 5 µL de produits non digérés servant de témoin. Les plasmides sont ensuite envoyés à séquencer (Sanger ABI 3730xl) à la plateforme GATC (Allemagne).

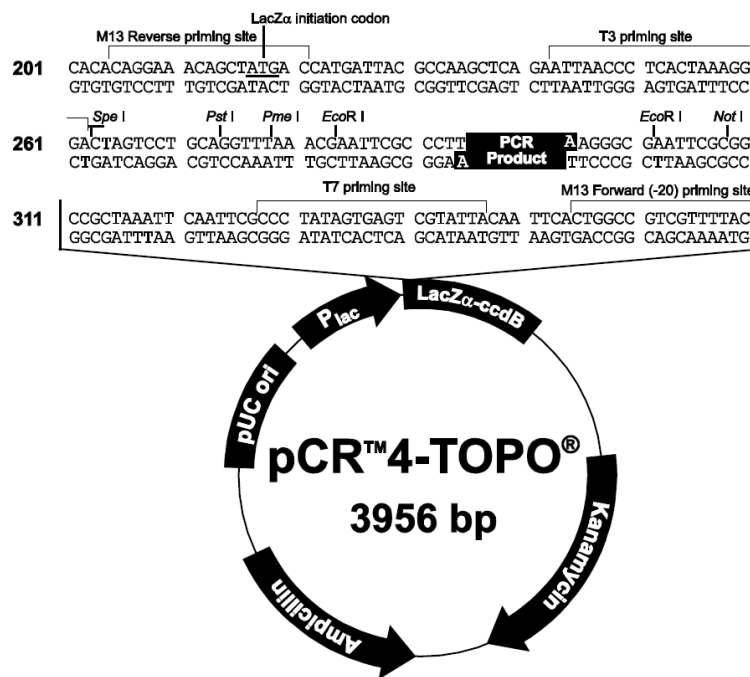


Figure 34 : Carte de restriction du plasmide pCR™4-TOPO® (Invitrogen).

5.3. Clonage avec le plasmide pCR™4-TOPO® dans des cellules Stbl2

Le clonage des fragments d'ADNc du Na_v a été très problématique et a nécessité une très longue période de mise au point. Les séquences des Na_v sont connues pour être difficiles à sous-cloner. Un nouveau protocole a donc été mis au point d'après le protocole

de **Feldman et Lossin (2014)** et le clonage des 4 fragments (voir paragraphe 4, p. 92) a été réalisé dans les plasmides pCR™4-TOPO® avec les cellules compétentes MAX Efficiency® Stbl2™ (Invitrogen). La ligation des ADNc au plasmide pCR™4-TOPO® est réalisée en incubant 3 µL d'ADNc et 1 µL de plasmide à température ambiante pendant 30 min. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 1 µL de solution stop 6X et en mélangeant pendant plusieurs secondes. Le mélange est centrifugé brièvement et placé sur glace. La transformation des bactéries compétentes Stbl2™ (Invitrogen) est réalisée en ajoutant 3 µl du mélange précédent à 25 µL de bactéries et en incubant 25 min sur glace. La solution est ensuite placée à 42°C pendant 40 sec, puis à nouveau sur glace. Les bactéries transformées sont placées dans 400 µL de milieu S.O.C. et incubées pendant 1h30 à 30°C sous agitation de 200 rpm. Les cultures sont ensuite étalées sur du milieu LB agar contenant 50 µg/mL d'ampicilline pour incubation de 3 à 5 jours à 30°C. Les colonies de bactéries transformées sont sélectionnées, repiquées dans du milieu LB liquide contenant 50 µg/mL d'ampicilline et incubées à 30°C sous agitation de 200 rpm pendant 3 jours. Les plasmides sont récupérés selon le procédé décrit précédemment en réalisant une miniprep avec le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant. Les plasmides sont ensuite envoyés à séquencer aux plateformes GATC et Eurofins (Sanger ABI 3730xl).

6. Quantification par PCR en temps réel

6.1. Principe de la PCR en temps réel (qPCR)

La qPCR est une technique de biologie moléculaire utilisée notamment dans le but de quantifier le niveau d'expression des gènes, en mesurant la quantité d'ADNc des gènes cibles et donc la quantité d'ARNm dans l'échantillon initial. Un marqueur fluorescent est utilisé comme agent intercalant qui va se fixer à l'ADN double brin néoformé de la PCR. Pendant la phase exponentielle de la PCR, l'augmentation de la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de produits de PCR formés et à la quantité d'ADNc initial. Cette quantité est mesurée relativement à la quantité d'ADNc de gènes de référence, dont l'expression ne varie pas dans les conditions d'expérimentation. Chaque réaction de qPCR présente différents contrôles : le blanc qui correspond à de l'eau RNase free à la place de

l'ADNc pour vérifier la non-contamination dans la réaction ; le contrôle RT- qui consiste à remplacer l'ADNc par de l'ARN traité à la DNase pour vérifier l'absence de contamination des ARN par de l'ADN génomique ; le contrôle ADNc (calibrateur) qui correspond à un pool d'ADNc provenant ici de différents tissus et qui permet de normaliser les réactions de qPCR inter-plaques.

6.2. Quantification des ARNm du Na_v

La quantification des ARNm du canal Na_v et de ses variants d'épissage a été réalisée par la PCR en temps réel (qPCR). La spécificité de chaque couple d'amorces a été validée par l'analyse du profil de fusion réalisé à la fin de la qPCR. La courbe de fusion est réalisée en augmentant la température de 60°C à 97°C par paliers de 0,1°C/sec, dans le but de déterminer le T_m (température de fusion) de l'amplicon. L'observation de plusieurs pics à des T_m différents indique la présence d'un mélange d'amplicons. L'efficacité des amorces a été déterminée grâce à une gamme de dilutions des ADNc contrôle (ADNc pur, 1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000). L'efficacité de l'amplification a été calculée à partir de la pente de la courbe standard construite avec cinq dilutions en série d'un pool d'ADNc (témoin). Chaque amplification a été réalisée en triplicat en utilisant le kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) dans un volume final de 10 µL contenant 5 µL de SYBR Green I Master Mix (2X), 0,5 µL de chaque amorce (10 µM) pour le Na_v ou les gènes de référence GAPDH et EF1α (Tableau 6), 1 µL d'ADNc, d'ARN traité à la DNase (contrôle RT-) ou d'eau (blanc) et 3 µL d'eau. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C 10 min, 40 cycles [95°C 10 sec, 57°C 20 sec, 72°C 15 sec], 40°C 10 sec. Toutes les réactions de PCR ont été effectuées en triplicats et les valeurs de C_p (crossing point) utilisées correspondent à la moyenne des réplicats. Le C_p correspond au cycle à partir duquel la fluorescence de l'échantillon dépasse la fluorescence de fond. Un échantillon avec une concentration initiale faible d'ADN aura besoin de plus de cycles pour atteindre le C_p . Trois gènes de références ont été testés (actine, EF1α, GAPDH). La validation du gène de référence a été réalisée en utilisant l'algorithme NormFinder v.0953 (Andersen *et al.*, 2004) sous forme d'un module complémentaire du logiciel Microsoft® Office Excel. La meilleure valeur de stabilité (0,003) a été obtenue pour la combinaison des deux gènes GAPDH et EF1α. Les quantités d'ARNm ont donc été normalisées en utilisant la moyenne géométrique des gènes de référence GAPDH

et EF1 α et quantifiés avec la « E-method » en utilisant le logiciel LightCycler® 480 1.5 (Roche) (Hoffmann *et al.*, 2008), qui utilise comme base la méthode des $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001). La « E-method » utilise les efficacités de PCR individuelles des gènes de référence et des gènes cibles, pour éviter les erreurs de calcul générées par les différences d'amplification entre les deux types de gènes.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel. Les amorces de l'actine ne sont pas présentées car ce gène n'a pas été utilisé pour les analyses.

Nom des amplicons	Nom des amorces	Séquences des amorces (5' - 3')	Longueur (pb)
Variant A	CgNav9_a5F	CTCTTGTGCTCATTCCAGCA	20
	CgNav9_s7R	GACCCATTTATTGACCCCTTCT	22
Variant B	CgNav9_s5F	CGAAAGATTCAACAAACAATGCATG	25
	CgNav9_a7R1	TTAAAGGTTGATGGTCAGCGTGATT	25
Variant C	CgNav9_s5F	CGAAAGATTCAACAAACAATGCATG	25
	CgNav9_s7R	GACCCATTTATTGACCCCTTCT	22
Variant D	CgNav9_a5F	CTCTTGTGCTCATTCCAGCA	20
	CgNav9_a7R1	TTAAAGGTTGATGGTCAGCGTGATT	25
GAPDH	qFw_GAPDH	GGAGACAAGCGAAGCAGCAT	20
	qRev_GAPDH	CACAAAATTGTCATTCAAGGCAAT	24
EF1 α	EF1qF	ACCACCCTGGTGAGATCAAG	20
	EF1qR	ACGACGATCGCATTCTCTT	20

7. Hybridation *in situ*

7.1. Principe de l'hybridation *in situ* (ISH)

L'hybridation a été réalisée lors du stage de Master 1 de Justine Castrec (Castrec, 2014). L'hybridation *in situ* (ISH) correspond à la localisation de séquences d'acides nucléiques dans des cellules ou des tissus. Cette technique repose sur l'hybridation d'une molécule simple brin d'ADN ou ARN, appelée sonde ou ribosonde, avec une séquence complémentaire cible. L'ISH est réalisée, ici, sur des coupes histologiques de tissus et permet la localisation tissulaire et cellulaire des molécules d'intérêts grâce aux sondes qui sont préalablement marquées. La sonde marquée et fixée au gène d'intérêt est ensuite visualisée selon la méthode de marquage utilisée.

7.2. Synthèse de la ribosonde

La localisation tissulaire et cellulaire des canaux sodium voltage-dépendant chez *C. gigas*, a été déterminée par hybridation *in situ* (Figure 35). Pour cela des sondes ARN (sens et antisens) simple brin spécifiques d'une portion de l'ARNm (exon 24) de CgNav_v1 ont été synthétisées. La sonde antisens est complémentaire à l'ARNm du Na_v et va s'hybrider à celui-ci. La sonde sens est identique à l'ARNm du Na_v et sert de témoin négatif car elle ne s'hybride pas à celui-ci. La synthèse de la sonde est réalisée en plusieurs étapes : i) amplification par PCR et clonage des ADNc ; ii) préparation des plasmides ; iii) synthèse des sondes.

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL. Chaque réaction contenait 1 µL d'ADNc (mélange de branchies, muscle strié et ganglions viscéraux), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,1 µM de chaque amorce (CgNav9_e25F AGGCGGGTGTATGTTCTTG et CgNav9_e25R GCGGTATCTTCGTGAATGGT), 5 µL de Buffer 5X et 1,5 U de polymérase GoTaq Flexi DNA (Promega). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C 2 min, 35 cycles [95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min], 72°C 5 min. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ils sont ensuite extraits à partir du gel et purifiés grâce au kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Les produits de PCR sont sous-clonés pour permettre de synthétiser les sondes ARN. Le clonage est effectué dans le plasmide pCRTM4-TOPO[®] selon le protocole du kit de clonage TOPO[®] TA (Invitrogen) (voir paragraphe 5.2, p. 95).

Les plasmides sont ensuite linéarisés avec soit *SpeI*, soit *NotI*, dont les sites de restriction encadrent l'insert (Figure 35) pendant 4 h à 37°C. Le mélange réactionnel contient (en concentration finale) l'enzyme (0,1 U/µL), le tampon de l'enzyme (1X), de l'albumine de sérum bovin (1 µg/µL), le plasmide (50 ng/µL) et de l'eau (qsp 100 µL). La linéarisation des plasmides est vérifiée en déposant les produits digérés sur gel d'agarose 1,5 %, comme décrit dans les paragraphes précédents. Les plasmides linéarisés sont ensuite précipités à -20°C pendant 30 min, après ajout de 5 µL d'EDTA 0,5 M, 10 µL d'acétate d'ammonium 5 M et 600 µL d'éthanol absolu. Après centrifugation à 20000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est repris dans 20 µL d'eau. Les plasmides sont ensuite traités à la protéinase K (100 µg/mL) pendant 30 min à 50°C avec du SDS 0,5 %. Les plasmides traités sont purifiés au phénol-chloroforme-IAA et le culot est repris dans 15 µL d'eau.

Les sondes sont alors synthétisées par transcription *in vitro* à partir des plasmides linéarisés précédemment (Figure 35) et incorporation de digoxigénine (DIG) lors de leur synthèse par l'incorporation de nucléotides modifiés UTP-DIG (DIG RNA Labeling Mix, Roche). Les plasmides linéarisés avec *NotI* sont transcrits avec l'ARN polymérase T3 et les plasmides linéarisés avec *SpeI* sont transcrits avec l'ARN polymérase T7 (MEGAscript kit, Ambion). Le marquage des sondes est vérifié par un dot blot. Pour cela, les sondes sont diluées de 0,01 à 100 pg/ μ L et 1 μ L de ces solutions est déposé sur une membrane de nylon. Après révélation, l'intensité des tâches permet de tester la réactivité de l'anticorps avec la sonde. Elle est proportionnelle au nombre de UTP-DIG incorporé dans la sonde. Une comparaison est effectuée avec des ADN contrôles marqués à la DIG (Roche Diagnostics).

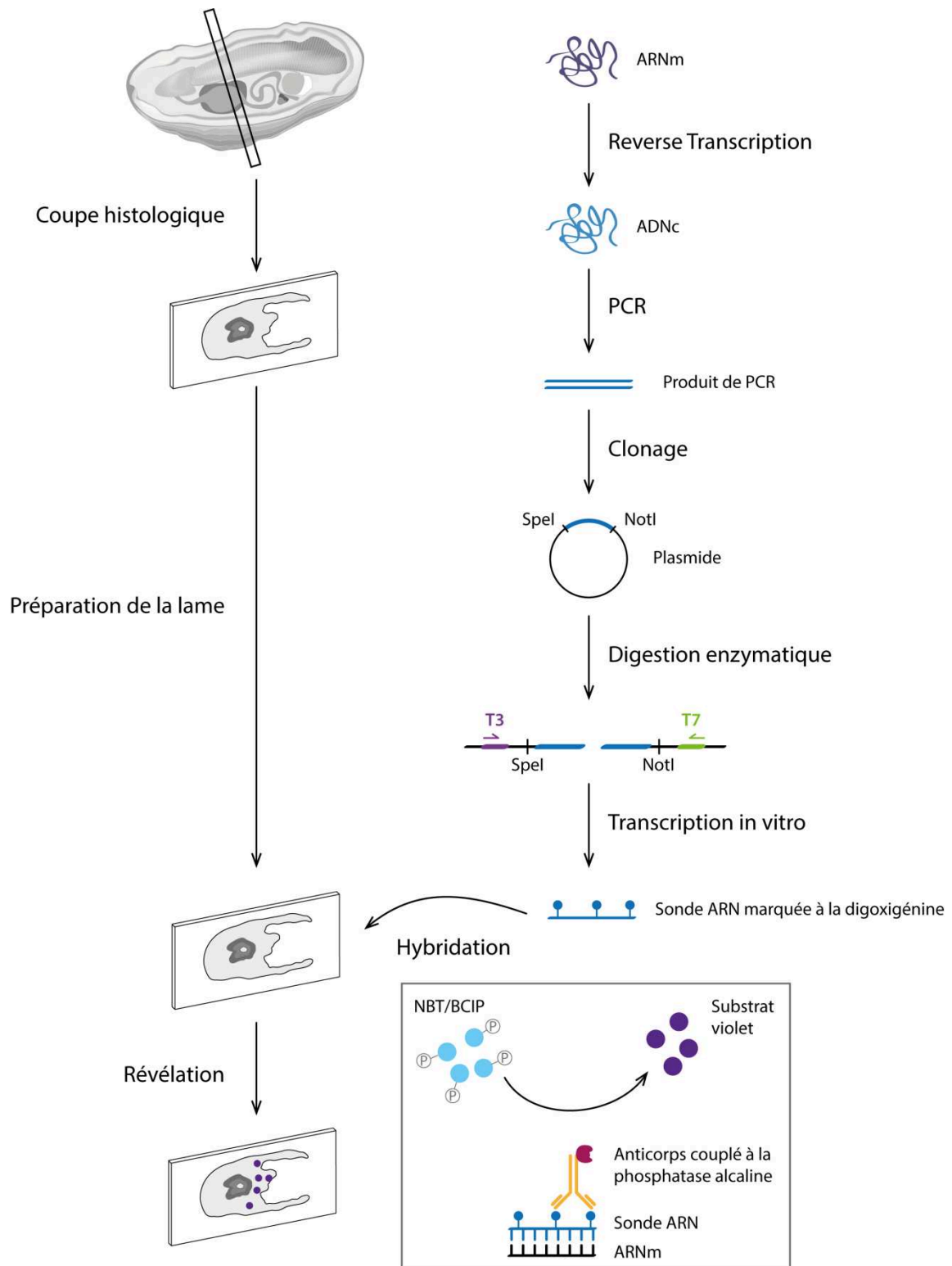


Figure 35 : Représentation schématique des étapes de l'hybridation *in situ*. Les ARNm extraits sont rétro-transcrits en ADNc puis un fragment est amplifié par PCR. Ce fragment est cloné dans un plasmide qui est ensuite inséré dans des bactéries *E. coli* chimio-compétentes. Les plasmides sont récupérés par miniprep et une digestion enzymatique avec les enzymes Spel et NotI permet de les linéariser. Une transcription *in vitro* permet de synthétiser les sondes ARN marquées à la digoxigénine (DIG). L'hybridation de ces sondes marquées sur les coupes histologiques permet de révéler la présence des ARNm cibles. L'ajout d'un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline transforme le substrat NBT/BCIP en un composé bleu-violet. D'après [Castrec \(2014\)](#).

7.3. Préparation des coupes histologiques pour l'ISH

Pour chaque individu (n=10), 4 coupes transversales d'une épaisseur de 5 mm ont été réalisées pour étudier tous les tissus (Figure 36). Les coupes de tissus ont été fixées immédiatement dans du Davidson modifié (contenant pour 1 L : 500 mL d'eau traitée au DEPC 0,1 %, 300 mL de formaldéhyde 40 % filtré, 150 mL d'éthanol absolu et 50 mL d'acide acétique glacial ajouté extemporanément) et placées à 4°C. Après 24 h, les coupes sont transférées dans de l'éthanol 70 % à 4°C, jusqu'à l'inclusion.

L'inclusion dans la paraffine a été réalisée grâce à un automate (Citadel 2000, Shandon) selon le programme suivant : déshydratation dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70 %, 80 %, 90 % et éthanol absolu), perméabilisation des tissus dans des bains d'agents clarifiants (Clarlal®, RAL Diagnostics) et infiltration des tissus dans deux bains de paraffine liquide chauffée. Les échantillons ont ensuite été inclus dans des blocs de paraffine et conservés à 4°C. Les tissus ont ensuite été sectionnés à 5 µm d'épaisseur avec un microtome. Les coupes ont été montées sur des lames de verre traitées avec de la polylysine pour permettre une meilleure adhérence et les lames contrôles ont été colorées à l'hématoxyline/éosine.

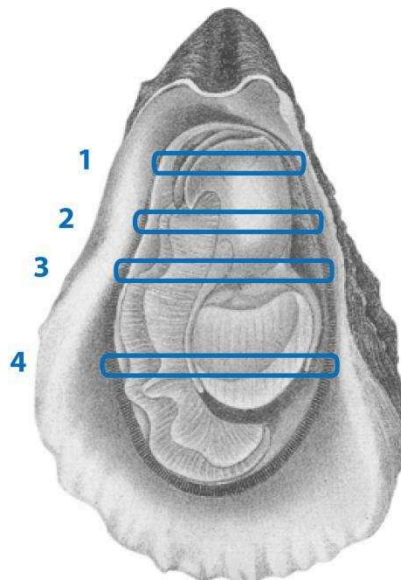


Figure 36 : Représentation schématique des coupes histologiques réalisées sur une huître *C. gigas*. Les rectangles bleus représentent l'emplacement des coupes transversales. Tissus présent sur les coupes, 1 : manteau et palpes labiaux, 2 : manteau, branchies et système digestif, 3 : branchies, cœur, muscle strié, manteau et glande digestive, 4 : branchies, ganglions viscéraux, muscle strié, muscle lisse et manteau.

7.4. Hybridation des sondes sur les coupes histologiques

Le protocole d'hybridation est adapté de [Santerre et al. \(2012\)](#). Les coupes de tissus ont été pré-hybridées avec une solution de pré-hybridation (Formamide 50 %, SSC 4X, 2 mM d'EDTA, solution de Denhardt à 1 %, sulfate de dextran 10 %) avec des ARNt de levure pendant 1h30 à 50°C. L'hybridation a ensuite été effectuée par incubation des coupes de tissus avec les sondes sens ou antisens marquées à la DIG dans un tampon d'hybridation (Formamide 50 %, SSC 4X, 2 mM d'EDTA, solution de Denhardt à 1 %, sulfate de dextran 10 % et 0,5 mg/mL d'ARNt de levure) pendant 16 heures à 55°C. Après plusieurs lavages avec du formamide 50 %, SSC 2X à 45°C, SSC 2X et SSC 1X à 37°C, l'hybridation de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) a été réalisée en incubant les coupes pendant 2 h à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 h à l'obscurité dans un tampon de détection (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M). Les coupes ont été examinées et photographiées en utilisant un microscope optique (Leica DM-IRB). L'hybridation avec les sondes sens a été utilisée comme témoin. La contre-coloration des coupes a été réalisée au Brown de Bismarck. Le montage entre lame et lamelle a été réalisé avec du baume du Canada (Sigma-Aldrich).

8. Analyses phylogénétiques des séquences protéiques du Na_v

Dans le but de connaître la position phylogénétique du Na_v d'huître parmi d'autres invertébrés, des alignements de séquences d'acides aminés ont été réalisés selon la méthode d'alignement de séquence multiple en utilisant le programme MAFFT 7 ([Kato et Standley, 2013](#)). Les alignements ont ensuite été affinés pour sélectionner les positions alignées de manière fiable à l'aide de Gblocks ([Castresana, 2000](#)). Le modèle de substitution a été sélectionné à l'aide de ProtTest 3.4.2 ([Darriba et al., 2011](#)) et correspond au modèle « LG +I +G +F ». L'arbre phylogénétique a été construit avec le programme PhyML 3.0 ([Guindon et al., 2010](#)) et la robustesse de l'arbre a été évaluée avec 100 itérations de bootstrap. La visualisation de l'arbre a été réalisée avec FigTree v1.4.2¹⁵. Les séquences utilisées sont présentées dans le Tableau 7.

¹⁵ <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Tableau 7 : Séquences protéiques de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique. * : séquences protéiques prédites provenant de JGI Genome portal.

Espèces	Nom du Na _v	Nom commun	Numéro d'accèsion GenBank	Longueur (aa)	Références
<i>Cyanea capillata</i>	CcNa _v	Méduse à crinière de lion	AAA75572	1740	Anderson <i>et al.</i> (1993)
<i>Polyorchis penicillatus</i>	PpNa _v	Méduse	AAC09306	1695	Spafford <i>et al.</i> (1999)
<i>Aiptasia pallida</i>	ApNa _v	Anémone de mer	AAB96953	1810	White <i>et al.</i> (1998)
<i>Capitella teleta</i>	CtNa _v 2	Ver polychète	JGI 134859*	1694	
<i>Crassostrea gigas</i>	CgNa _v 2 (Na _v 5)	Huître creuse	EKC21550	1986	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Blattella germanica</i>	BgNa _v 2 (BSC1)	Blatte germanique	AAK01090	2304	Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>Danaus plexippus</i>	DpNa _v 2	Monarque	EHJ64356	1991	Zhan <i>et al.</i> (2011)
<i>Drosophila melanogaster</i>	DmNa _v 2 (DSC1)	Mouche	ABF70206	2409	Salkoff <i>et al.</i> (1987)
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	CpNa _v	Triton commun japonais	AAD17315	2007	Hirota <i>et al.</i> (1999)
<i>Capitella teleta</i>	CtNa _v 1	Ver polychète	JGI 210954*	1690	
<i>Doryteuthis opalescens</i>	DoNa _v	Calmar	AAA16202	1784	Rosenthal et Gilly (1993)
<i>Aplysia californica</i>	AcNa _v 1	Aplysie	NP_001191637	1993	Dyer <i>et al.</i> (1997)
<i>Mya arenaria</i>	MaNa _v	Mye	AAX14719	1435	Bricelj <i>et al.</i> (2005)
<i>Crassostrea gigas</i>	CgNa _v 1 (Na _v 9)	Huître creuse	EKC22630	1734	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Cancer borealis</i>	CbNa _v	Crabe Jonah	ABL10360	1989	Schulz <i>et al.</i> (2007)
<i>Blattella germanica</i>	BgNa _v 1 (para)	Blatte germanique	AAC47483	2031	Dong (1997)
<i>Danaus plexippus</i>	DpNa _v 1 (para)	Monarque	EHJ74501	2112	Zhan <i>et al.</i> (2011)
<i>Drosophila melanogaster</i>	DmNa _v 1 (para)	Mouche	AAB59195	2131	Loughney <i>et al.</i> (1989)
<i>Aedes aegypti</i>	AaNa _v 1 (para)	Moustique de la fièvre jaune	ACB37023	2140	Chang <i>et al.</i> (2009)
<i>Culex pipiens pallens</i>	CpNa _v 1 (para)	Moustique commun	AGO33659	2043	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	CqNa _v 1 (para)	Moustique commun	AGO33660	2052	

9. Polymorphisme de type SNP (Single Nucleotid Polymorphism) du gène CgNav1 (Nav9)

L'objectif de cette étude est de déterminer si un polymorphisme du Nav peut être associé à différentes sensibilités et entraîner une différence d'accumulation de PST lors d'exposition à *A. minutum*. Pour cela, l'étude du polymorphisme est réalisée dans la région de fixation des PST, le segment P. Le polymorphisme nucléotidique de la région de fixation des PST sur le gène CgNav1 (Nav9) a été analysé par PCR et séquençage. L'analyse a été menée sur 3 populations françaises (n=50 par population) et une population japonaise (n=20) de l'huître creuse *C. gigas*. L'étude du polymorphisme ciblait une région entourant le site de fixation aux PST pour chaque domaine du canal CgNav1 (Nav9) (voir le Chapitre 3 expliquant pourquoi le polymorphisme de CgNav2 (Nav5) n'a pas été étudié). L'ADN génomique a été extrait à partir de branchies d'huîtres avec le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) selon la description du fabricant. La concentration et la pureté de tous les ADN ont été analysées avec un spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Scientific).

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µL. Chaque réaction contenait 2 µL d'ADN, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,1 µM de chaque amorce (Tableau 8), 10 µl de Buffer 5X et 1,5 U de polymérase GoTaq Flexi DNA (Promega). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C 2 min, 40 cycles [95°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec], 72°C 5 min. La durée d'élongation est ajustée en fonction de la taille attendue des amplicons selon le critère 1 min/kb. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose avant le séquençage (Sanger ABI 3730xl). Les chromatogrammes des séquences d'ADN ont été vérifiés, corrigés à la main si nécessaire et alignés pour localiser les sites polymorphes de type SNP. Une variation dans la séquence a été considérée comme un SNP seulement lorsque son occurrence était au-dessus du seuil de 5% du nombre total d'huîtres échantillonnées. Les alignements de séquences multiples ont ensuite été traduits avec le serveur ExpASY Proteomics pour identifier des mutations synonymes ou non-synonymes.

Tableau 8 : Amorces utilisées pour l'amplification des sites de fixation aux PST des domaines I-IV.

Région amplifiée	Nom des amorces	Séquence des amorces (5' - 3')	Longueur (pb)
DI	CgNav9_1f	TGACACTCACACAAACCCAGA	21
	CgNav9_1r	AACGAGCCCAGCAGTATCAC	20
DII	CgNav9_2f	TGTTCTTGCCATTGTGGTGT	20
	CgNav9_2r	AAAGAACGGGACACAGATCG	20
DIII	CgNav9_3f'2	GGTGTGCCTCATTTTCTGGT	20
	CgNav9_3r'2	CTGCACCGATATTCTCAGCA	20
DIV	CgNav9_4f	GACGTCATGGACCAATTCCT	20
	CgNav9_4r	TTACAACCCTCCTCGTTCGT	20

10. Dosage des toxines par la méthode HPLC

Le dosage des toxines dans les glandes digestives, des expériences 1 et 2, a été réalisé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) par le laboratoire Phycotoxines d'Ifremer (Nantes, France). Pour extraire les PST, 5 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N ont été ajoutés aux échantillons de glandes digestives, puis mélangés avec un homogénéisateur à grande vitesse (15000 tr/min) pendant 2 min. Le pH a été ajusté entre 2,0 et 4,0, puis les échantillons ont été centrifugés à 4200 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été filtrés sur des filtres de polyethersulfone (PES) de 10 kDa et la charge en toxines a été analysée en utilisant la méthode de chromatographie liquide avec détection par fluorescence (LC/FD) de [Van de Riet et al. \(2011\)](#). Les toxines GTX, dc-GTX, dc-STX et STX ont été séparées en utilisant une colonne de chromatographie inverse (Zorbax Bonus RP, 3,5 µM, 4,6 x 150 mm, Agilent Technologies, Massy, France) avec un débit de 0,8 mL/min. Le pH de l'éluant et/ou la température de la colonne ont été optimisés pour séparer les dc-GTX3/GTX5/dc-GTX-2 et C1/C2. Les concentrations de toxines ont été déterminées en utilisant des normes certifiées fournies par CNRC (Halifax, Canada) et exprimées en µg d'équivalent STX pour 100 g de glande digestive.

11. Analyses des données et statistiques

La recherche de séquences homologues ou partiellement correspondantes aux Na_v de *C. gigas* a été réalisée dans les bases de données suivantes : NCBI¹⁶, Ensembl Metazoa¹⁷, dbATM¹⁸ et GigaTON¹⁹. La base de données GigaTON a également permis d'obtenir l'expression de CgNa_v1 (Na_v9) et CgNa_v2 (Na_v5) en fonction des différents stades de développement de l'huître. Les analyses de BLAST²⁰ ont été effectuées en ligne via NCBI BLAST. Des alignements de séquences multiples ont été réalisés avec Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). La structure exon-intron des séquences a été évaluée en alignant les séquences d'ARNm aux séquences génomiques avec le programme MGAlign (Lee *et al.*, 2003). La séquence consensus ADNc pour CgNa_v1 a été obtenue grâce au logiciel Geneious® 7.0.6. Les sites donneurs et accepteurs ont été prédits en utilisant un prédicteur de site d'épissage, NNSPLICE version 0.9 (Reese *et al.*, 1997). Les séquences d'acides aminés déduites ont été traduites par le serveur Expasy Proteomics²¹. L'analyse de la structure 2D prédite des isoformes protéiques a été réalisée avec le programme HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) à partir du portail Mobylye (Callebaut *et al.*, 1997). Les sites de phosphorylation ont été prédits par le serveur NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 2004) et les sites de la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) ont été prédits par les serveurs KinasePhos 2.0 (Wong *et al.*, 2007) et pkaPS (Neuberger *et al.*, 2007). Toutes les analyses statistiques ont été exécutées avec R 3.2.2 (R Core Team, 2015). Les comparaisons entre les niveaux d'ARNm (relatif à la moyenne géométrique des ARNm EF1 α /GAPDH) entre variants d'épissage au sein d'un même tissu ont été réalisées avec des tests de Kruskal-Wallis, puis deux à deux avec un test de rang signé Wilcoxon. Les mêmes tests ont été utilisés pour comparer les niveaux d'ARNm d'un variant entre les différents tissus. La corrélation de Pearson a été utilisée pour évaluer la relation entre l'accumulation de toxines et l'expression du Na_v . Aucune corrélation n'a été testée lorsque le nombre des échantillons étaient inférieurs à trois.

¹⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

¹⁷ <http://metazoa.ensembl.org/index.html>

¹⁸ <http://dbatm.mbc.nctu.edu.tw/php/browse.php?species=cgi>

¹⁹ <http://ngspipelines-sigenae.toulouse.inra.fr:9061/>

²⁰ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

²¹ http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html

III. Etude des canaux Na_v des nerfs de *Crassostrea gigas* par une approche d'électrophysiologie

Une deuxième partie de ces travaux de thèse a pour objectif d'évaluer la sensibilité des nerfs d'huîtres face aux PST et particulièrement la saxitoxine. Pour cela, une première série de mesures a été réalisée sur les nerfs d'huîtres dans le but de mettre au point les conditions optimales d'enregistrement du signal. Puis, des expérimentations d'exposition des nerfs à la STX et la TTX ont été réalisées pour mesurer leurs effets sur le potentiel d'action nerveux composé (CNAP). Une dernière expérimentation d'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques (paragraphe 4.2, p. 89) a été réalisée dans le but de déterminer si l'exposition des nerfs aux PST modifiait leurs réponses.

Toutes les expérimentations d'électrophysiologie ont été réalisées au laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies au CEA Saclay²² en collaboration avec l'équipe Toxines, Récepteurs et Canaux Ioniques.

1. Principe de mesure directe de l'activité électrophysiologique

L'électrophysiologie correspond à l'étude des propriétés électriques des cellules et de la production de courants électriques. Cette méthode permet de suivre précisément l'évolution temporelle de l'activité des canaux et des potentiels d'action. En utilisant des électrodes externes sur un nerf entier, il est possible de suivre un potentiel d'action nerveux composé (CNAP) représentant l'ensemble des potentiels d'actions des différentes fibres activées. Une stimulation va permettre la dépolarisation de la membrane et si celle-ci est suffisamment importante, cela entraîne un potentiel d'action, correspondant à l'ouverture des canaux voltage-dépendant. Passé ce seuil d'excitabilité, les réponses des nerfs ont une amplitude croissante lorsque l'intensité de stimulation augmente, correspondant au nombre de fibres nerveuses stimulées. Les amplitudes de chaque fibre s'ajoutent jusqu'au maximum où elles sont toutes excitées. En appliquant cette méthode à l'huître creuse, on peut mesurer la réponse des nerfs lors d'expositions à différentes toxines.

²² Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Gif sur Yvette

2. Activité électrophysiologique des nerfs d'huîtres

2.1. Prélèvements des nerfs cérébroviscéraux et exposition aux toxines

Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués sur les nerfs cérébroviscéraux isolés des huîtres (Figure 37). L'huître est ouverte par la charnière et sortie de sa coquille. Elle est ensuite placée sur la « tranche », puis le manteau et les branchies sont retirés du côté postérieur pour laisser apparaître la zone où se trouvent les ganglions viscéraux. Ils servent de point de repère pour la dissection du nerf. Le prélèvement du nerf cérébroviscéral, qui rejoint les ganglions viscéraux et cérébraux, est réalisé à l'aide de micro ciseaux ophtalmologiques. Le nerf part du ganglion viscéral et continue vers l'avant entre le muscle et la gonade (le nerf est coincé sous la gonade lorsque celle-ci est très développée), puis le long des branchies jusqu'au ganglion cérébral très peu visible. Le deuxième nerf, situé sur l'autre côté de l'huître, est prélevé de la même façon. Les nerfs disséqués étaient habituellement d'environ 1 mm de diamètre et d'au moins 2 cm de longueur, et étaient prélevés en 10 minutes environ. Lorsqu'ils sont isolés, les nerfs sont testés directement pour déterminer leur état fonctionnel, puis maintenus dans une solution physiologique standard jusqu'aux expériences d'exposition aux toxines. La réponse des nerfs est testée après une incubation de 30 min dans une solution de STX ou TTX.

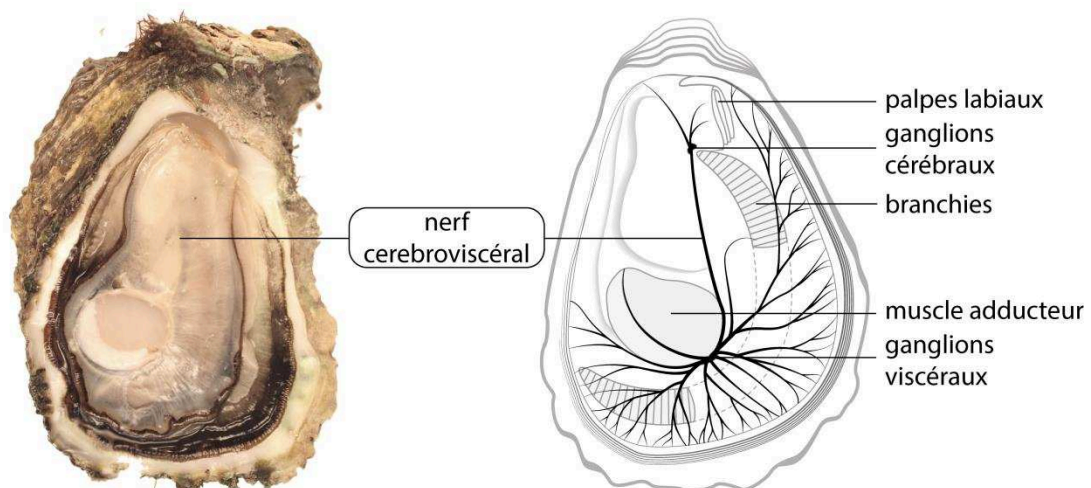


Figure 37 : Les nerfs cérébroviscéraux de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans sa valve gauche. Cette paire de nerfs, qui partent du côté postérieur des ganglions cérébraux jusqu'au côté antérieur des ganglions viscéraux, est intégrée dans le tissu conjonctif de la masse viscérale.

2.2. Préparation des solutions physiologiques et de toxines

Pour les mesures électrophysiologiques, le nerf cérébroviscéral a été isolé et placé dans une solution physiologique saline jusqu'à l'analyse. La solution physiologique est composée de NaCl 436 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 52 mM, CaCl₂ 10 mM, HEPES 10 mM et le pH a été ajusté à 7,39 avec du NaOH et adaptée d'après [Twarog \(1967\)](#). Les concentrations de solutions de STX ont été préparées à partir de Saxitoxine dihydrochloride (Novakits), comme suit : $2,5 \times 10^{-6}$ g/mL, 5×10^{-7} g/mL, 10^{-7} g/mL et 2×10^{-8} g/mL correspondant à 8,39 μ M, 1,67 μ M, $3,3 \times 10^{-1}$ μ M et $6,7 \times 10^{-2}$ μ M, respectivement. Les concentrations de solutions de TTX ont été préparées, à partir de Tétrodotoxine citrate (Alomone Labs) comme suit : $2,5 \times 10^{-6}$ g/mL et 2×10^{-8} g/mL correspondant à 7,8 μ M et $6,3 \times 10^{-2}$ μ M, respectivement. Toutes les solutions de toxines ont été diluées dans la solution physiologique.

2.3. Mesure du potentiel d'action global des nerfs d'huîtres

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés à température ambiante (20-22°C) en utilisant une technique d'électrophysiologie classique (Figure 38), comme décrit précédemment par [Benoit et al., 2000](#). En bref, le nerf cérébroviscéral est placé sur cinq électrodes de platine non isolées et fixées dans une chambre humide en plexiglas. Deux électrodes de stimulation (S1 et S2) sont connectées à un convertisseur numérique-analogique par lequel l'ordinateur délivre, à une fréquence de 5 Hz, une série d'impulsions d'onde carrée de 0,1 à 1 ms de durée et une intensité croissante de 0 à 300 μ A par paliers de 10 μ A. Deux autres électrodes d'enregistrement (E1 et E2) sont connectées à un premier amplificateur d'entrée différentielle à gain élevé puis à un deuxième, pour enregistrer le potentiel d'action nerveux composé (CNAP). Le signal sortant du second amplificateur est alors numérisé, par le convertisseur analogique-numérique, et stocké sur l'ordinateur. Le matériel et le logiciel Axon pCLAMP 10.5 ont été utilisés pour stimuler le nerf et pour enregistrer le CNAP, en réponse. La cinquième électrode (T), située à mi-chemin entre les paires d'électrodes de stimulation et d'enregistrement, est reliée à la terre. Le nerf n'est pas baigné, ni perfusé pendant la période d'enregistrement pour éviter les effets de dérivation

du milieu. Cependant, la chambre en plexiglas était couverte et l'humidité à l'intérieur était assurée par des bouts de coton imbibés de solution physiologique standard.

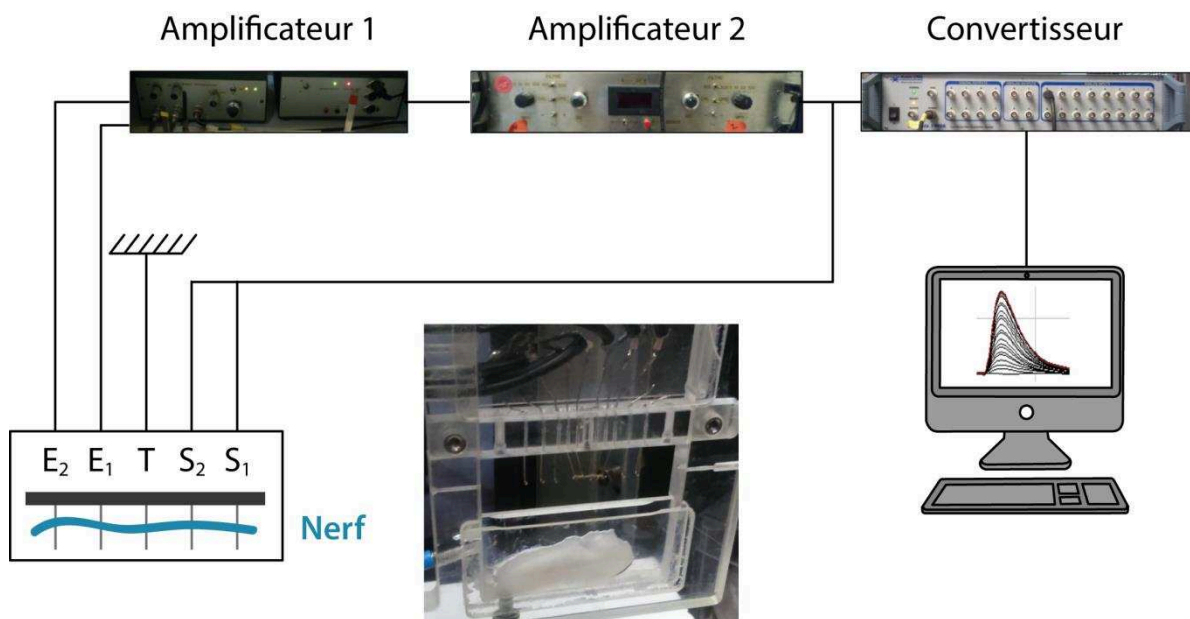


Figure 38 : Dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement du potentiel d'action nerveux composé (CNAP) de l'huître. Un nerf cérébroviscéral isolé est placé sur cinq électrodes de platine non isolées et fixées dans une chambre en plexiglas couverte. Deux électrodes de stimulation (S1 et S2) sont connectées au convertisseur numérique-analogique. Deux électrodes d'enregistrement (E1 et E2) sont connectées à un premier amplificateur, puis à un deuxième pour enregistrer le CNAP. La sortie du deuxième amplificateur est numérisée, par le convertisseur et stockée sur l'ordinateur. Une électrode (T) est reliée à la terre.

3. Analyse des enregistrements électrophysiologiques

Pour évaluer le niveau d'excitabilité membranaire des nerfs, les relations réponse-intensité ont été établies en traçant l'amplitude du pic (A) du CNAP, exprimée par rapport à son amplitude maximale (A_{max}) enregistrée en réponse à de fortes intensités de stimulus en fonction de l'intensité du stimulus (I). Les courbes théoriques correspondent aux ajustements de points de données, selon l'équation de Boltzmann (logiciel GraphPad Prism 5):

$$\frac{A}{A_{\max}} = 1 - \left(\frac{1}{1 + e^{\frac{(I-150)}{S}}} \right)$$

où I₅₀ est l'intensité du stimulus produisant un CNAP avec 50 % d'amplitude maximale du pic et S la pente de la courbe.

Pour caractériser la cinétique d'un CNAP donné, six paramètres ont été mesurés (Figure 39) : l'amplitude maximale du pic (en mV), la largeur à 50 % d'amplitude du pic (demi-largeur en ms), l'aire (en mV.ms), le temps entre le début de la stimulation et le pic (temps de pic en ms), la pente ascendante maximale (en mV/ms) et la pente descendante maximale (en mV/ms). La vitesse de propagation du CNAP a été approximée en calculant le rapport de la distance entre les électrodes de stimulation et celles d'enregistrement, c'est-à-dire 15 mm, et le temps de pic.

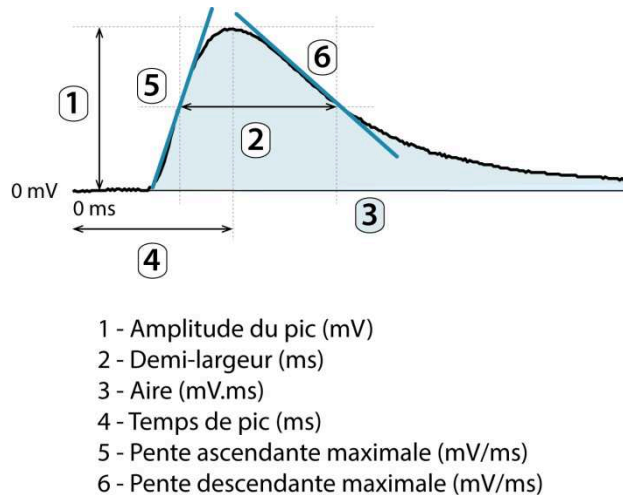


Figure 39 : Description des paramètres mesurés sur le potentiel d'action nerveux composé (CNAP). Six paramètres sont mesurés pour caractériser le CNAP enregistré dans diverses conditions expérimentales.

Pour évaluer la sensibilité nerveuse face à la STX, les relations dose-réponse ont été établies en traçant l'amplitude maximale du pic du CNAP, enregistrée à partir des nerfs prétraités à la STX (AmaxS) et exprimée en pourcentage de sa valeur obtenue en l'absence de toxine (AmaxC) en fonction de la concentration de STX ([STX]). Les courbes théoriques ont été calculées à partir des régressions non linéaires sigmoïdes typiques par points de données, selon l'équation de Hill (logiciel GraphPad Prism 5):

$$\frac{A_{\text{maxS}}}{A_{\text{maxC}}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{STX}]}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{nH}}}$$

où nH est le nombre de Hill et IC₅₀ est la concentration de STX nécessaire pour bloquer 50 % de l'amplitude maximale du pic du CNAP.

4. Dosage des toxines par la méthode ELISA

Les glandes digestives ont été décongelées sur glace, puis broyées avec un homogénéisateur ultraturax et extraites dans de l'HCl 0,1 M (100 µL pour 100 mg de tissus). Le mélange a été chauffé à 104°C pendant 10 min, puis refroidi à température ambiante. Après centrifugation de 3500 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été prélevé pour le dosage de toxines. La concentration en toxines est évaluée avec le kit Saxitoxine (PSP) ELISA Microtiter Plate (Abraxis) (Figure 40). Les extraits de glande digestive sont dilués dans la solution tampon, fournie par le kit, avec un facteur de 1/2000. Cette dilution permet de rester dans la gamme de dosage de la STX. Les standards du kit sont amenés à température ambiante et homogénéisés. A chaque puits, contenant soit 50 µL de standard STX, soit 50 µL d'échantillon, sont ajoutés : 50 µL d'enzyme conjuguée et 50 µL d'anticorps. La plaque est ensuite agitée 30 sec avant une incubation de 30 min à température ambiante. Les puits sont vidés par retournement de la plaque et lavés 4 fois avec 300 µL de solution de lavage. Puis, 100 µL de substrat sont ajoutés avant agitation de 30 sec et incubation de 30 min à température ambiante à l'obscurité. La réaction est stoppée par l'ajout de 100 µL de solution stop et l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration des échantillons est calculée à partir de la gamme étalon obtenue grâce aux standards de STX. Les résultats sont exprimés en µg STX pour 100 g de glande digestive.

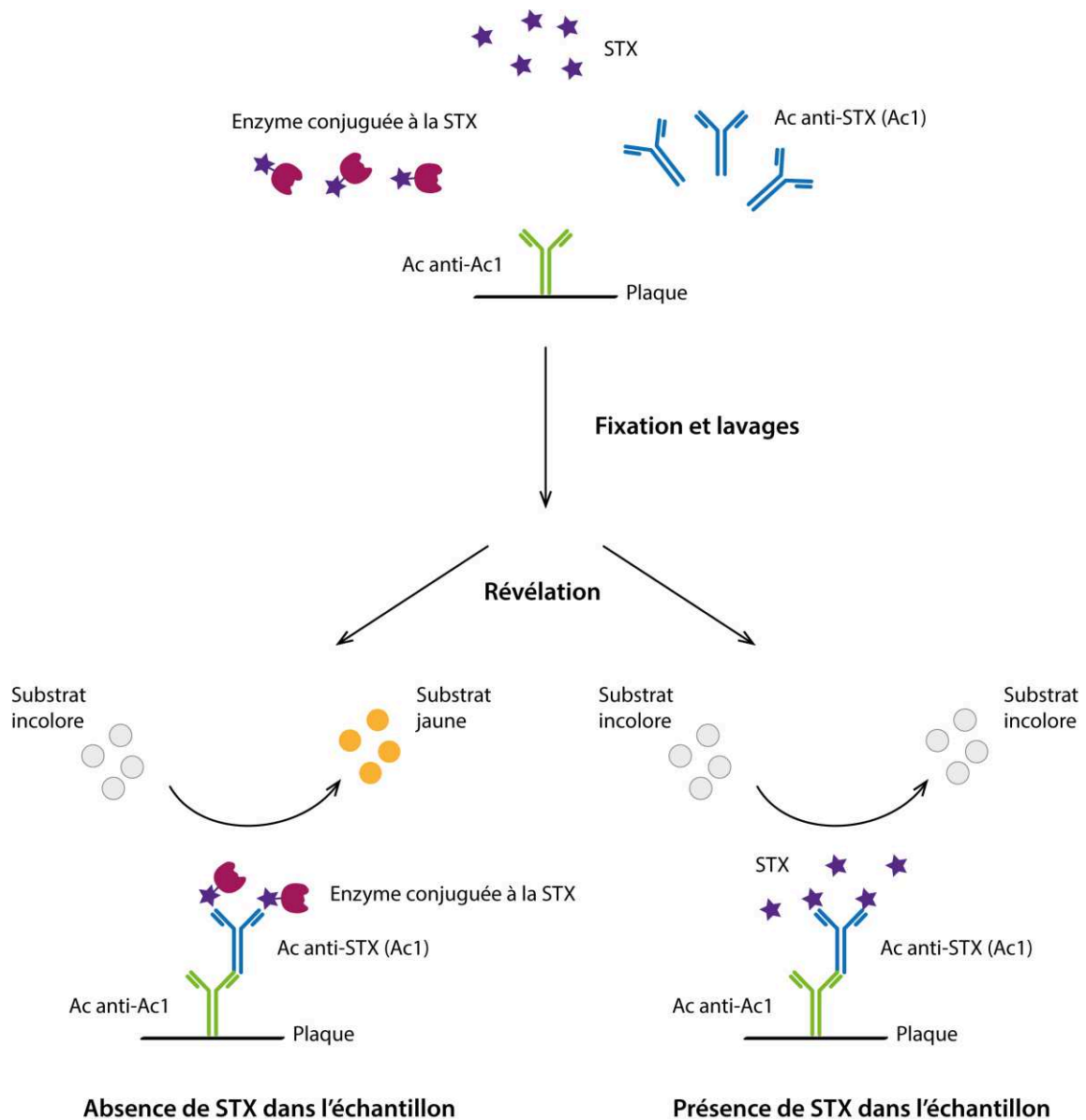


Figure 40 : Représentation schématique des étapes du dosage de toxines par le test ELISA compétitif direct. Les extraits de glandes digestives sont incubés avec de l'enzyme conjuguée à la STX et des anticorps anti-STX (Ac1). L'enzyme conjuguée et la STX de l'échantillon entrent en compétition pour se fixer à l'Ac1. Des anticorps anti-Ac1 sont fixés sur la plaque au fond des puits. Après plusieurs lavages, le substrat spécifique de l'enzyme conjuguée est ajouté. Après incubation, une solution stop est ajoutée pour arrêter la réaction. Si l'enzyme conjuguée s'est fixée à l'Ac1, c'est qu'il y a peu ou pas de STX. Le substrat est digéré par l'enzyme et donne une couleur jaune à la solution. Si la STX s'est fixée à l'Ac1, alors l'enzyme conjuguée a été éliminée lors des lavages et le substrat n'est pas digéré. La solution reste incolore. La concentration en STX dans les échantillons est donc inversement proportionnelle à la coloration des solutions.

5. Analyse statistiques des données

Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm erreur-standard (SE) de n nerfs. Les analyses statistiques ont été réalisées avec R 3.2.2 ([R Core Team, 2015](#)). La comparaison des données déterminées à partir d'une population d'huîtres a été effectuée avec le test t de Student apparié lorsque la normalité et l'homoscédasticité étaient observées ou, dans le cas contraire, avec le test Wilcoxon signé. La comparaison des données obtenues à partir de deux populations d'huîtres a été réalisée avec le test t deux échantillons de Welch lorsque la normalité et l'homoscédasticité étaient observées, ou sinon avec le test de la somme des rangs de Wilcoxon.

IV. Essai de mise au point du protocole d'expression hétérologue de la sous-unité α du Na_v de *Crassostrea gigas*

Une partie des travaux de thèse avait pour objectif d'évaluer la sensibilité des canaux Na_v des huîtres face aux PST et particulièrement la saxitoxine. Pour cela, il fallait faire exprimer les Na_v à la membrane de cellules que l'on peut étudier ensuite. Le but étant d'utiliser de l'ADNc d'huître, il n'était pas possible de procéder de la même façon que chez la mye et de faire exprimer les Na_v dans des lignées cellulaires humaines (Bricelj *et al.*, 2005). La technique choisie a donc été celle de l'expression hétérologue dans les ovocytes de xénopes.

Les essais de mise au point du protocole ont été réalisés au laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies au CEA Saclay en collaboration avec l'équipe Toxines, Récepteurs et Canaux Ioniques.

1. Principe de l'expression hétérologue dans les ovocytes de Xénopes

L'expression hétérologue consiste à faire exprimer un gène d'intérêt dans une cellule provenant d'une espèce différente et ne possédant pas naturellement ce gène. Pour cela, des ovocytes de xénopes sont transformés avec un plasmide contenant la séquence ADNc d'intérêt, ici la sous-unité α de CgNa_v1 , afin d'obtenir une expression de la protéine à la membrane de l'ovocyte. Il est ensuite possible de tester différentes molécules sur les canaux exprimés à la membrane. Cela est possible du fait de l'absence de Na_v actifs à la surface des ovocytes de xénope.

Les ovocytes de xénopes *Xenopus laevis* (amphibien) sont très utilisés en laboratoire car ils présentent de nombreux avantages, notamment: le maintien peu coûteux des xénopes et la production de milliers d'ovocytes ; la taille des ovocytes facilite la manipulation et l'injection, réalisées à température ambiante et en milieu non stérile ; la membrane des ovocytes n'expriment pas de Na_v ; les ovocytes sont capables de traduire l'ARN ou l'ADN injecté. L'ovocyte de xénope est donc le seul système d'expression hétérologue permettant, à ce jour, d'étudier les propriétés des Na_v d'huître creuse. Les ovocytes de xénopes sont prélevés sur les lobes ovariens des femelles, contenant chacun des centaines d'ovocytes à des stades de développement différents. Pour l'expression en hétérologue, les ovocytes

utilisés sont de stade V et VI (stades matures) et font 1 mm de diamètre. L'ovocyte possède deux pôles, nommés pôle animal (en marron) et pôle végétal (en blanc) (Figure 41).

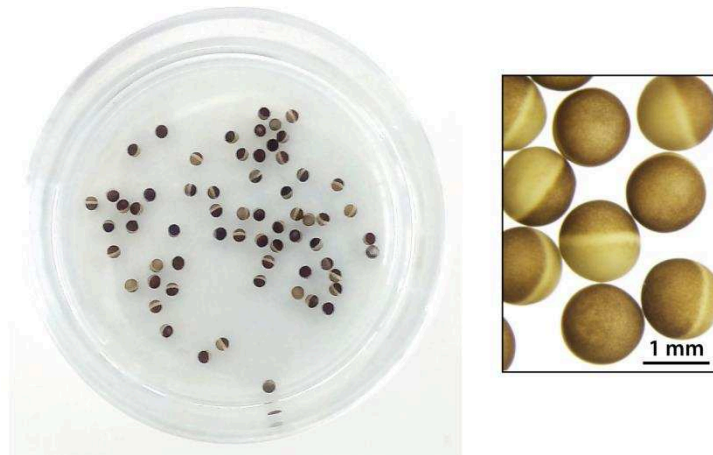


Figure 41 : Ovocytes défolliculés de xénopes *Xenopus laevis* aux stades V et VI de maturation.

2. Expression hétérologue dans les ovocytes de Xénopes

2.1. Préparation des ovocytes de Xénopes

Lors du prélèvement, les ovocytes sont amassés en grappe et entourés d'une couche de cellules folliculaires. Avant injection, il est nécessaire de retirer cette membrane de façon mécanique ou chimique. Le procédé mécanique consiste à pincer la membrane folliculaire et pousser l'ovocyte pour le faire sortir sans l'abimer. Cette méthode est très délicate et nécessite beaucoup d'entraînement, mais permet de préparer les ovocytes en quelques minutes et de ne pas endommager la membrane des ovocytes, contrairement à la technique chimique qui utilise de la collagénase. Les ovocytes sont conservés pendant plusieurs jours à 18°C dans une solution Barth composée de NaCl 88 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,4 mM, Ca(NO₃)₂ 0,3 mM, MgSO₄ 0,8 mM, HEPES 10 mM à pH 7,4 et contenant de la kanamycine 2 mg/mL (concentration finale). Les ovocytes utilisés sont fournis par le laboratoire de toxicologie moléculaire et biotechnologies (CEA, Gif sur Yvette, France).

2.2. Extraction et purification des ARNm de *C. gigas*

Les ARN totaux de *C. gigas* sont extraits à partir de muscle strié et de ganglions viscéraux provenant d'un pool de 20 huîtres, comme décrit précédemment (paragraphe 1, p. 90). Cette extraction permet d'obtenir environ 160 µg d'ARN pour chaque tissu. Les ARN totaux sont ensuite purifiés grâce au kit NucleoTrap® mRNA (Macherey-Nagel). Un volume de 400 µL de buffer RM0 est ajouté à 400 µL d'ARN total. Puis, 25 µL de billes Oligo(dT) resuspendues sont ajoutées, la solution est mélangée et incubée 5 min à 68°C, pour isoler les ARNm du reste des ARN. L'incubation se poursuit à température ambiante en retournant les tubes toutes les 2 min. Le mélange est centrifugé à 2000 g pendant 15 sec, puis 11000 g pendant 2 min. Le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 600 µL de buffer RM2, puis transféré sur un microfiltre NucleoTrap® et centrifugé à 2000 g pendant 15 sec et à 11000 g pendant 2 min. Deux autres lavages successifs sont réalisés en ajoutant 500 µL de buffer RM3 au microfiltre, qui est ensuite centrifugé à 2000 g pendant 15 sec, puis 11000 g pendant 2 min. Le microfiltre est ensuite séché par centrifugation à 11000 g pendant 1 min. Les ARNm sont ensuite élués avec 50 µL d'eau chauffée à 68°C, puis incubés 7 min à 68°C et centrifugés à 11000 g pendant 1 min. La concentration et l'intégrité des ARNm sont déterminées grâce au spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Scientific) et le bioanalyseur Agilent (paragraphe 2, p. 91). Les ARNm sont conservés à -80°C jusqu'à l'injection.

2.3. Injection des ARNm

Les ovocytes sont immobilisés sur le fond en résine d'une boîte de pétri, toujours baignés dans une solution Barth contenant de la kanamycine à 18°C. L'injection se fait sous loupe binoculaire grâce à un capillaire servant de microélectrode et pré-rempli d'huile colorée (rouge) évitant la formation de bulles d'air (Figure 42A). L'électrode est reliée à un injecteur à pression d'air permettant d'injecter 60 nL par ovocyte, ce qui correspond au volume maximal pouvant être injecté sans détruire l'ovocyte. Une fois l'électrode remplie de solution d'ARNm (Figure 42B), les ovocytes sont injectés un à un via un micromanipulateur

(Figure 42C). Les ovocytes sont ensuite replacés à 18°C, pendant 2 ou 3 jours avant d'être testés. Tous les jours, les ovocytes sont triés pour éliminer ceux qui sont abimés.

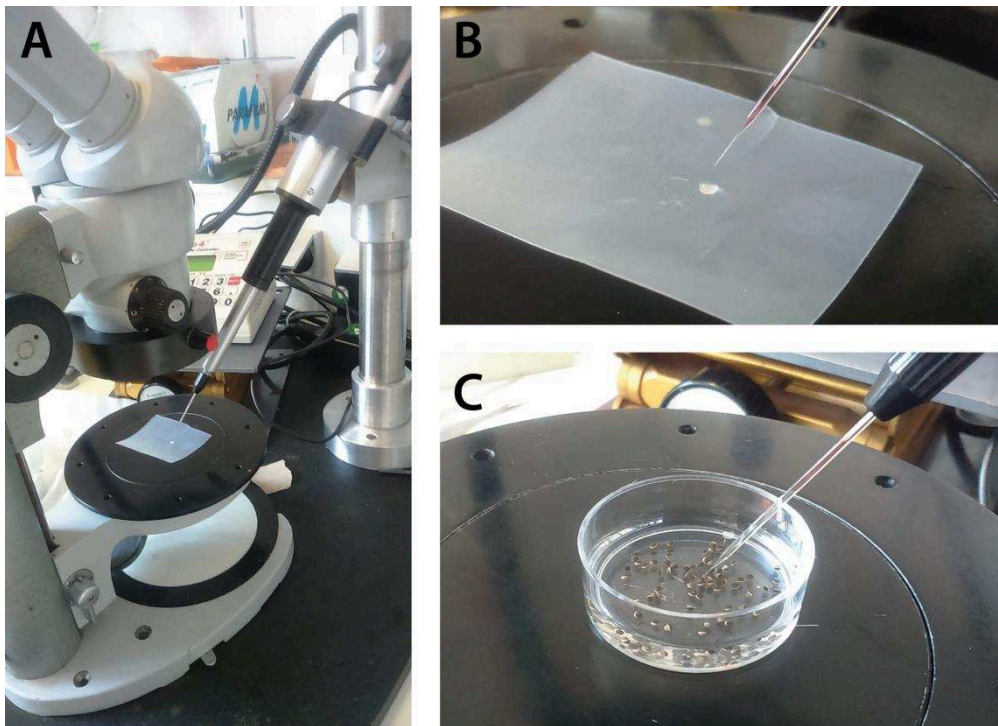
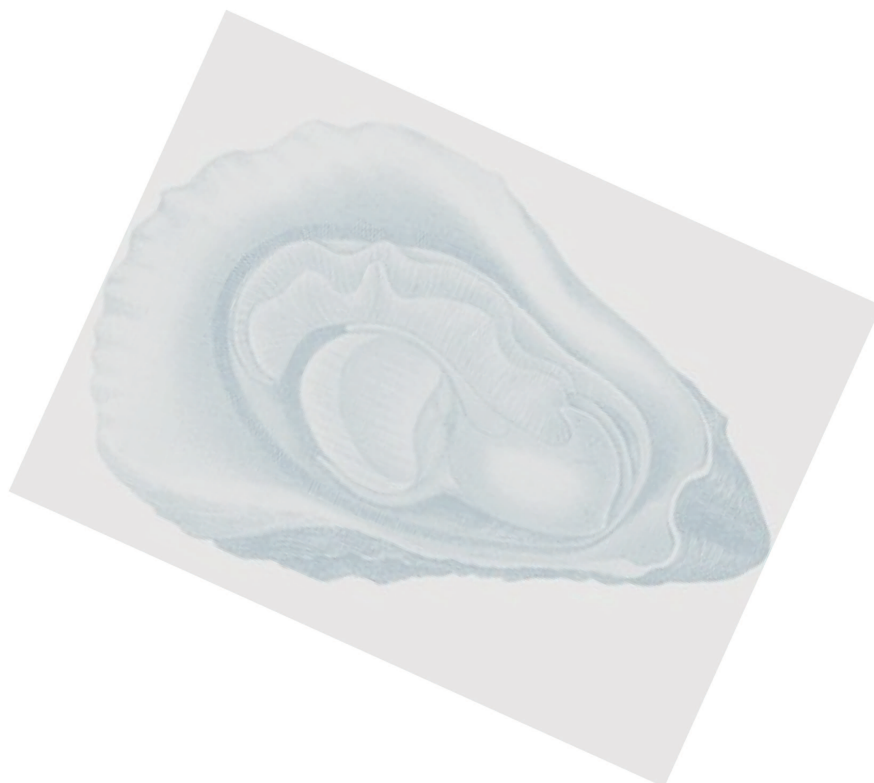


Figure 42 : Préparation de l'électrode et injection des ovocytes. **A**, Loupe binoculaire et micromanipulateur relié à l'électrode. **B**, Remplissage de l'électrode avec la solution d'ARNm déposée sur de la paraffine. L'électrode est pré-remplie d'huile colorée pour éviter les bulles d'air. **C**, Injection des ovocytes grâce à l'électrode remplie de solution d'ARNm.

L'idéal pour cette expérimentation aurait été d'injecter des plasmides spécifiques contenant l'ADNc total de $CgNa_v1$. Cela n'a pas été possible étant donné les difficultés rencontrées lors de l'amplification et du clonage de $CgNa_v1$. Les premiers tests réalisés n'ont pas permis d'observer d'expression des canaux à la membrane. Il faudrait réessayer en utilisant des plasmides contenant l'ADNc de $CgNa_v1$, mais également en allongeant la durée d'incubation des ovocytes à 5 jours minimum.

CHAPITRE 3

CARACTÉRISATION DU CANAL SODIUM
VOLTAGE-DÉPENDANT DE L'HUÎTRE
CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*



Chapitre 3

I. Introduction

Les PST sont composés de nombreux dérivés toxiques de la saxitoxine (STX), la toxine principale et la plus toxique. La STX et ses dérivés se lient aux canaux sodium voltage-dépendant (Na_v) et bloquent la conduction du potentiel d'action, perturbant ainsi la communication neuromusculaire. Le Na_v joue un rôle crucial dans l'excitabilité de la membrane, ce qui en fait la cible de nombreuses neurotoxines produites par des animaux ou des plantes, comme la STX et la tétrodotoxine (TTX).

Les canaux Na_v sont de larges protéines transmembranaires responsables de l'excitabilité électrique des cellules (Catterall, 2000). Une augmentation de la perméabilité du sodium induit la dépolarisation de la membrane, produisant des potentiels d'action et la conduction électrique (Cestèle et Catterall, 2000). Les canaux Na_v sont composés d'une sous-unité α principale responsable de la sélectivité du canal. L'expression de la sous-unité α seule est généralement suffisante, au moins chez les mammifères, pour produire des courants sodium dans un système hétérologue. Deux types de gènes codant pour la sous-unité α du canal Na_v existent chez les invertébrés (codant pour les canaux Na_v1 et Na_v2), alors que les vertébrés possèdent au moins neuf gènes de la sous-unité α du Na_v , tous codant pour la famille des canaux Na_v1 (Zakon, 2012).

Chaque domaine de la sous-unité α possède 6 segments transmembranaires (S1-6) reliés par des boucles intra et extracellulaires (Yu et Catterall, 2003 ; Al-Sabi *et al.*, 2006). Les segments S4 sont chargés positivement et responsables de la sensibilité au potentiel (Cestèle et Catterall, 2000 ; Anderson *et al.*, 2005). La boucle entre les segments S5 et S6 forme le filtre de sélectivité ionique et est appelée la boucle du pore ou « segment P » (Marban *et al.*, 1998). Le filtre de sélectivité contient un motif spécifique d'acides aminés sélectifs pour les ions sodium uniquement: D400 (acide aminé D en position 400 de la séquence protéique du $\text{Na}_v1.4$ du rat) dans le domaine I, E755 dans le domaine II, K1237 dans le domaine III et A1529 dans le domaine IV (Terlau *et al.*, 1991). La STX, comme la TTX, est connue pour se lier au segment P du Na_v , également appelé site 1 (Cestèle et Catterall, 2000 ; Anderson *et al.*, 2005).

Chez la mye, *Mya arenaria*, sur la côte est des Etats-Unis, deux populations ont été étudiées par [Bricelj et al. \(2004\)](#): l'une, régulièrement exposée aux blooms d'*Alexandrium* spp, a été identifiée comme résistante aux PST, ces myes accumulant des hauts niveaux de PST sans mourir. L'autre population, jamais exposée aux blooms d'*Alexandrium* spp, a été désignée comme sensible en raison de la mort des individus exposés expérimentalement ([Bricelj et al., 2004](#)). Les myes résistantes diffèrent des myes sensibles par une mutation d'un seul acide aminé au niveau du site de liaison à la STX de la séquence de la sous-unité α du Na_v . Cette mutation a été montrée comme étant associée à une diminution de l'affinité de la STX pour le Na_v , jusqu'à 1000 fois. Cela explique une sensibilité faible des nerfs et une accumulation élevée de PST dans les populations résistantes de myes exposés à *Alexandrium* spp par rapport aux sensibles ([Bricelj et al., 2005](#)).

Alternativement, la régulation post-transcriptionnelle peut générer de la diversité moléculaire chez la sous-unité α du Na_v et a été associée à des phénotypes contrastés de sensibilité des Na_v aux neurotoxines. Ainsi, chez la blatte *Blattella germanica*, un épissage alternatif conduit à la formation de deux variants distincts de canaux para (homologue de Na_v1) ayant des sensibilités différentes à un pyréthrianoïde, l'un étant 100 fois moins sensible à l'insecticide que le second ([Tan et al., 2002](#)). Chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, une variabilité interindividuelle élevée de la bioaccumulation de PST est régulièrement mesurée dans des huîtres exposées à une souche toxique d'*A. minutum*, notamment en expérimental ([Haberkorn et al., 2011](#)). Cette variabilité pourrait provenir de sensibilités différentes du canal sodium voltage-dépendant.

La première partie de cette thèse avait pour objectif de déterminer si le canal sodium voltage-dépendant et ses potentielles isoformes sont impliqués dans la variabilité de l'accumulation des PST chez les huîtres. Le présent chapitre est décomposé en 3 parties décrivant dans un premier temps la caractérisation des Na_v , avec leur position phylogénétique, leurs structures génétiques et protéiques, ainsi que leur expression tissulaire et durant l'ontogenèse. Puis, la variabilité des Na_v a été recherchée en analysant le polymorphisme de type SNP et en recherchant les potentiels variants d'épissage ainsi que leur expression aux niveaux tissulaire et cellulaire. Enfin, la relation entre l'accumulation de PST par les huîtres et l'expression des différents variants a été analysée, ainsi que le profil toxinique observé dans les cellules de micro-algues et au sein de la glande digestive des huîtres.

II. Partie 1 : Caractérisation du Na_v de *C. gigas*

1. Recherche des séquences des Na_v dans les bases de données

L'étude des différentes bases de données existantes (NCBI, Ensembl Metazoa, dbATM, GigaTON) a permis de répertorier toutes les séquences ayant une homologie avec les deux séquences de type 9 et 5 annotées par [Zhang et al. \(2012\)](#) comme des « voltage-gated sodium channel » (Tableau 9). Une première recherche effectuée dans les bases de données NCBI (Genbank) et Ensembl Metazoa, a révélé, en plus des séquences de Na_v9 (EKC22630, CGI_10001852) et Na_v5 (EKC21550, CGI_10003777) reportée chez l'huître *C. gigas*, l'existence de deux séquences protéiques homologues de Na_v9 (EKC38943 et XP_011425890) avec leur séquence ADNc (CGI_10001852 et CGI_10026710, respectivement), ainsi que cinq isoformes protéiques de Na_v5 (XP_011417727, XP_011417728, XP_011417729, XP_011417730 et XP_011417731) et leur séquence ADNc (respectivement, XM_011419425, XM_011419426, XM_011419427, XM_011419428 et XM_011419429). L'étude de bases de données provenant de RNAseq a permis d'identifier des séquences supplémentaires. La base de données dbATM (database of Aquatic animals' Transcritome Map) donne accès aux données de RNAseq de [Zhao et al. \(2012\)](#) et a permis de trouver deux homologues de Na_v9 : CGI.37885 et CGI.19299, incluant les séquences protéiques et leurs séquences ADNc respectives. L'analyse de la base de données GigaTON ([Riviere et al., 2015](#)) a révélé l'existence de trois séquences ADNc homologues de Na_v9 : CHOYP_LOC100533425.1.2, CHOYP_LOC100533425.2.2 et CHOYP_SCN4A.1.1, ainsi qu'une séquence homologue de Na_v5, CHOYP_SCN1.1.2. L'ensemble de ces recherches révèle l'existence de plusieurs séquences se rapportant au Na_v9 et au Na_v5 et démontre la nécessité de caractériser précisément, par des techniques d'analyses moléculaires, les séquences des Na_v chez l'huître creuse *C. gigas*. L'ensemble de ces séquences et leurs caractéristiques sont décrits dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Inventaire et description des séquences du Nav de *C. gigas* dans différentes bases de données RNAseq et ADN.

Homologue	Numéro de la séquence	Annotation de la séquence	Nature	Longueur (pb ou aa)	Séquencage	Base de données	Référence
Nav9	CGI_37885	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	ADnc Protéine	8287 1958	RNAseq	dbATM	Zhao <i>et al.</i> , 2012
	CGI_19299	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	ADnc Protéine	6123 1834	RNAseq	dbATM	Zhao <i>et al.</i> , 2012
	CHOYP_LOC100533425.1.2		ADnc	2787	RNAseq	GigaTON	Rivière <i>et al.</i> , 2015
	CHOYP_LOC100533425.2.2		ADnc	4131			
	CHOYP_SCN4A.1.1		ADnc	7094			
	CGI_10001852	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	ARNm	5205	Génome	Ensemble metazoa	Zhang <i>et al.</i> , 2012
EKC22630 / K1Q165 (UniProt)		Protéine	1734		NCBI (PRINA70283, BioProject) / Ensemble metazoa		
Nav5	CGI_10026710	Sodium channel protein para	ADnc	420	Génome	Ensemble metazoa	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	EKC38943 / K1QZ37 (UniProt)		Protéine	139		NCBI (PRINA70283, BioProject) / Ensemble metazoa	
	XM_011421692	sodium channel type 4 subunit alpha B-like	ARNm partiel	8703	Génome	NCBI (PRINA276446, BioProject)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	XM_011427588	sodium channel type 4 subunit alpha B-like	ARNm (predicted)	1824			
	XP_011425890	sodium channel type 4 subunit alpha B-like	Protéine (predicted)	248			
	CGI_10003777	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	ADnc	5961	Génome	NCBI (PRINA70283, BioProject)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	EKC21550 / K1PVF7 (UniProt)	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	Protéine	1986		NCBI (PRINA70283, BioProject) / Ensemble metazoa	
	CHOYP_SCN1.1.2		ADnc	6465	RNAseq	GigaTON	Rivière <i>et al.</i> , 2015
	XM_011419425	Sodium channel protein 1 brain-like transcript variant X1	ARNm (predicted)	8785	Génome	NCBI (PRINA276446, BioProject)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	XP_011417727	Sodium channel protein 1 brain-like isoform X1	Protéine (predicted)	2020			
	XM_011419426	Sodium channel protein 1 brain-like transcript variant X2	ARNm (predicted)	9095			
	XP_011417728	Sodium channel protein 1 brain-like isoform X2	Protéine (predicted)	2018			
	XM_011419427	Sodium channel protein 1 brain-like transcript variant X3	ARNm (predicted)	9080			
	XP_011417729	Sodium channel protein 1 brain-like isoform X3	Protéine (predicted)	2013			
XM_011419428	Sodium channel protein 1 brain-like transcript variant X4	ARNm (predicted)	9056				
XP_011417730	Sodium channel protein 1 brain-like isoform X4	Protéine (predicted)	2005				
XM_011419429	Sodium channel protein 1 brain-like transcript variant X5	ARNm (predicted)	8741				
XP_011417731	Sodium channel protein 1 brain-like isoform X5	Protéine (predicted)	1900				

2. Analyse phylogénétique des canaux Na_v de *C. gigas*

Les relations phylogénétiques entre les séquences protéiques annotées comme des sous-unités α du Na_v caractérisées chez *C. gigas* (EKC22630 et EKC21550) et les Na_v précédemment décrits chez d'autres espèces d'invertébrés ont été étudiées (Figure 43). Les analyses ont révélé que les séquences annotées comme Na_v9 (EKC22630) et Na_v5 (EKC21550) chez *C. gigas* ne se regroupent pas ensemble, mais appartiennent aux ramifications provenant de deux clades différents de canaux Na_v (Na_v1 et Na_v2) : la séquence de Na_v9 se regroupe avec les canaux de type Na_v1, tandis que celle de Na_v5 se regroupe avec les canaux de type Na_v2. De plus, le motif protéique DEKA de l'anneau interne du filtre de sélectivité (correspondant à un acide aminé de chacun des quatre domaines) caractéristique des canaux Na_v1, est retrouvé chez Na_v9, alors que le motif DEEA des Na_v2 est observé chez Na_v5. Le motif DEKA du filtre de sélectivité confère une sélectivité des canaux Na_v1 aux ions sodium uniquement. Tandis que, le motif DEEA est observé chez les Na_v2 d'anchozoaires et de bilatériens, suggérant que ce canal Na_v2 est susceptible d'être sensible aux ions sodium et calcium. Par conséquent, nous avons décidé de renommer Na_v9 en **CgNa_v1** et Na_v5 en **CgNa_v2**. Les canaux de type Na_v1 comprennent les canaux para (Na_v1 des insectes) et les canaux de type Na_v2 comprennent les canaux BSC1/DSC1 (des insectes). Le canal Na_v1 de *C. gigas* montre une relation phylogénétique étroite avec le canal Na_v de la mye *Mya arenaria* (71,9% d'identité d'après l'arbre phylogénétique) et avec les canaux de type Na_v1 caractérisés chez d'autres espèces de mollusques : le gastéropode *Aplysia californica* (70,7%) et le céphalopode *Doryteuthis opalescens* (70,8%). Parallèlement, le canal Na_v2 de *C. gigas* a montré une relation étroite avec le canal Na_v2 de l'annélide *Capitella teleta* (64,2%) et les canaux BSC1 (63,3%) et DSC1 (62,2%) des insectes *Blatella germanica* et *Drosophila melanogaster*, respectivement. Il est intéressant de noter que l'identité de séquence entre CgNa_v1 et CgNa_v2, d'après la construction de l'arbre, est seulement de 56,6%. À notre connaissance, CgNa_v2 est le premier membre du groupe de canaux Na_v2 caractérisé chez les bivalves. Compte tenu de ces résultats, seul le canal CgNa_v1 a été considéré pour les futures étapes de caractérisation dans l'étude des relations entre l'accumulation de PST et le canal sodium voltage-dépendant, connu pour être la principale cible des PST. CgNa_v2 sera uniquement considéré pour l'étude de l'expression durant l'ontogénèse.

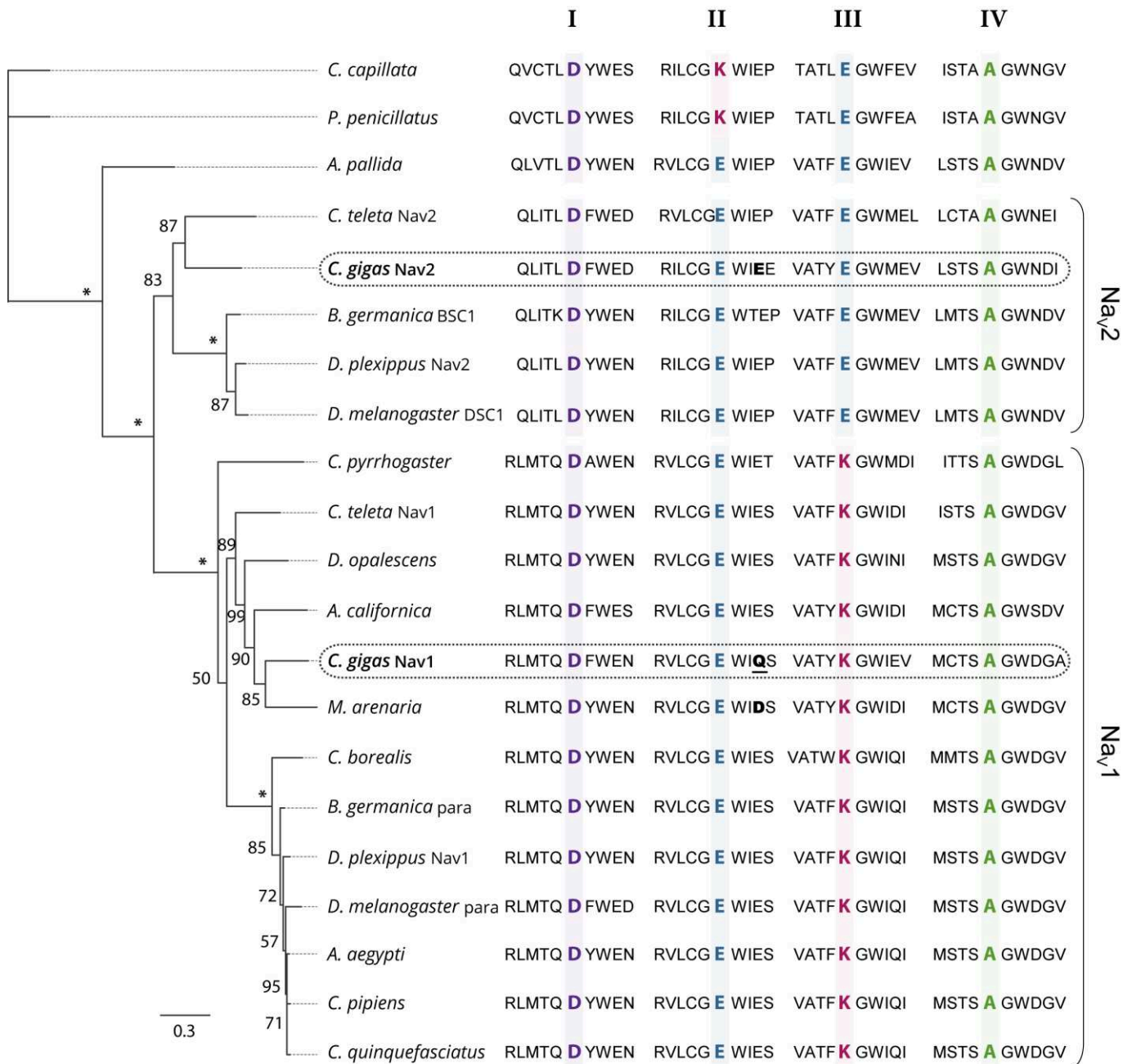


Figure 43 : Phylogénie du maximum de vraisemblance des sous-unités α de la famille des canaux sodium voltage-dépendant. Les dix acides aminés du filtre de sélectivité, dans chaque domaine, sont présentés et les acides aminés essentiels pour la sélectivité dans chaque domaine (DKEA, DEEA et DEKA) sont surlignés en couleur et en gras. L'acide aminé responsable de la sensibilité à la STX est en gras pour CgNav₂ et le Nav_v de *M. arenaria* et en gras et souligné pour CgNav₁. Les chiffres indiquent le score des bootstraps pour 100 réplifications, les étoiles indiquant un score de 100%. Espèces utilisées pour l'analyse phylogénétique et le numéro d'accèsion associé à la séquence du Nav : *Cyanea capillata* (AAA75572), *Polyorchis penicillatus* (AAC09306), *Aiptasia pallida* (AAB96953), *Capitella teleta* Nav₂ (JGI protein ID 134859), *Crassostrea gigas* Nav₂ (EKC21550), *Blattella germanica* BSC1 (AAK01090), *Danaus plexippus* Nav₂ (EHJ64356), *Drosophila melanogaster* DSC1 (ABF70206), *Cynops pyrrhogaster* (AAD17315), *Capitella teleta* Nav₁ (JGI protein ID 210954), *Doryteuthis opalescens* (AAA16202A), *Aplysia californica* (NP_001191637), *Mya arenaria* (AAX14719), *Crassostrea gigas* Nav₁ (EKC22630), *Cancer borealis* (ABL10360), *Blattella germanica* para (AAC47483), *Danaus plexippus* Nav₁ (EHJ74501), *Drosophila melanogaster* para (AAB59195), *Aedes aegypti* (ACB37023), *Culex pipiens* (AGO33659), *Culex quinquefasciatus* (AGO33660) (voir le Tableau 7, p. 105 pour les références).

3. Structure du gène codant pour la sous-unité α du Na_v

La séquence ADNc de la sous-unité α de CgNa_v1 a été vérifiée par amplification, étape par étape, à l'aide de 8 fragments d'ADNc chevauchants couvrant tout le cadre de lecture ouvert (ORF) (Figure 44). Les tailles des 8 fragments chevauchants correspondent à : (a) 575pb de l'UTR 5' au segment 1 du domaine I (IS1), (b) 444pb de IS1 à IS5-IS6, (c) 1813pb de IS1 à IS6-IIS1, (d) 904pb de IS6-IIS1 à IIS6-IIIS1, (e) 1337pb de IIS6-IIIS1 à IIIS6-IVS1, (f) 736pb de IIIS6 à IVS5-IVS6, (g) 724pb de IVS5-IVS6 au codon stop, (h) 533pb du codon stop à l'UTR 3'. L'alignement des séquences d'ADNc amplifiées avec la séquence d'ADN génomique OYG_10001852 (Zhang *et al.*, 2012) de la sous-unité α de CgNa_v1 a permis d'identifier 25 exons et 24 introns (Figure 45). Les exons sont numérotés de 1 à 25. La taille des exons est comprise entre 27pb et 1235pb et la taille des introns va de 89pb à 2389pb.

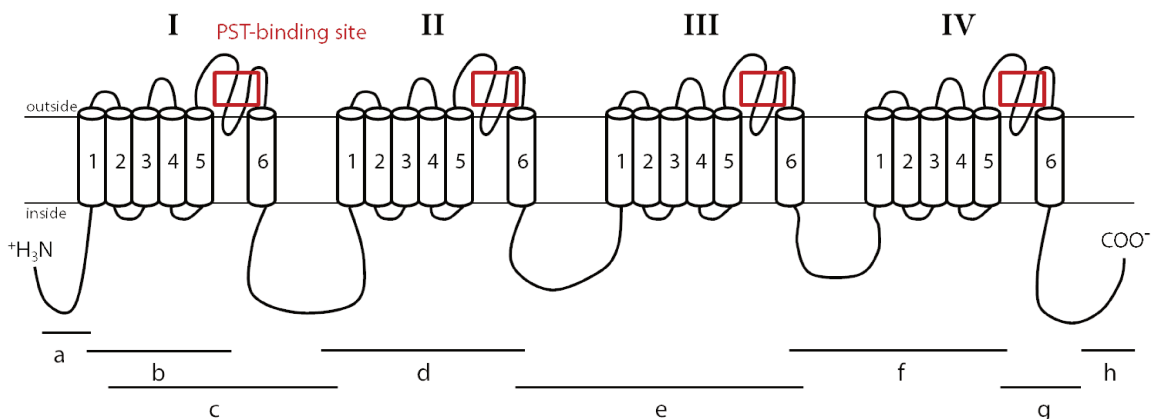


Figure 44 : Représentation schématique de la sous-unité α du Na_v1 de *C. gigas*. Le canal est composé de quatre domaines homologues (I-IV), ayant chacun six segments transmembranaires (1-6). Les fragments a, b, c, d, e, f, g et h ont été utilisés pour obtenir la séquence ADNc totale du Na_v. Les lignes indiquent l'emplacement des amplicons de PCR par rapport à la structure du canal. Les rectangles indiquent les régions séquencées, comprenant le site de liaison aux PST, utilisées pour l'étude du polymorphisme génomique du Na_v.

CGI_10001852	-----	0
VariantA	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQEAHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
VariantB	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQEAHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
VariantC	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQEAHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
CGI_10001852	-----	0
VariantA	GKKLPLSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFVVVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFNP	120
VariantB	GKKLPLSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFVVVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFNP	120
VariantC	GKKLPLSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFVVVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFNP	120
CGI_10001852	-----	0
VariantA	LRRGALYVLVHPLFSALIIITIIINCAFAMTEVPAGWIEYVFTGVYTLAMIKITARGF	180
VariantB	LRRGALYVLVHPLFSALIIITIIINCAFAMTEVPAGWIEYVFTGVYTLAMIKITARGF	180
VariantC	LRRGALYVLVHPLFSALIIITIIINCAFAMTEVPAGWIEYVFTGVYTLAMIKITARGF	180
	IS1 IS2	
CGI_10001852	-----	0
VariantA	IINNFTYLRDPWNWLDFAVISLAYVTEVVDLGNLSALRTRFVRLRALKTVAVIPGLKTIVG	240
VariantB	IINNFTYLRDPWNWLDFAVISLAYVTEVVDLGNLSALRTRFVRLRALKTVAVIPGLKTIVG	240
VariantC	IINNFTYLRDPWNWLDFAVISLAYVTEVVDLGNLSALRTRFVRLRALKTVAVIPGLKTIVG	240
	IS3 IS4	
CGI_10001852	-----MGLTRQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	29
VariantA	ALLEAVRRLRDVMLITVFMLSIFALVGMQLYMGLTRQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
VariantB	ALLEAVRRLRDVMLITVFMLSIFALVGMQLYMGLTRQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
VariantC	ALLEAVRRLRDVMLITVFMLSIFALVGMQLYMGLTRQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
	IS5 *****	
CGI_10001852	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDTHTNPDFNFTHFDNFG	89
VariantA	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDTHTNPDFNFTHFDNFG	360
VariantB	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDTHTNPDFNFTHFDNFG	360
VariantC	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDTHTNPDFNFTHFDNFG	360

CGI_10001852	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSAYFVIVILLGSFYLVNLLILAVAMSYDET	149
VariantA	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSAYFVIVILLGSFYLVNLLILAVAMSYDET	420
VariantB	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSAYFVIVILLGSFYLVNLLILAVAMSYDET	420
VariantC	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSAYFVIVILLGSFYLVNLLILAVAMSYDET	420

	IS6	
CGI_10001852	QKQDQADAEAEAEERKDDNSCAHSSIQQTMHDELREYDHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	209
VariantA	QKQDQADAEAEAEERKDDNSCAHSSIQQTMHDELREYDHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	480
VariantB	QKQDQADAEAEAEERK-----IQQTMHDELREYDHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	471
VariantC	QKQDQADAEAEAEERK-----IQQTMHDELREYDHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	471

	Exon 5	
CGI_10001852	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKKQPSSLPLGTPFVRRNTKKKYKPNHADHQPLMLDNL	269
VariantA	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK-----	504
VariantB	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKKQPSSLPLGTPFVRRNTKKKYKPNHADHQPLMLDNL	531
VariantC	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK-----	495

	Exon 7	
CGI_10001852	PFIDDPNAVTPCSDDLTMNLTYKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRSLPKS	329
VariantA	-----	504
VariantB	PFIDDPNAVTPCSDDLTMNLTYKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRSLPKS	591
VariantC	-----	495
CGI_10001852	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLHPHDAGDRGKLVENSSINGSRMDIEKKSHDGEIC	389
VariantA	-----GSSINGSRMDIEKKSHDGEIC	525
VariantB	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLHPHDAGDRGKLVENSSINGSRMDIEKKSHDGEIC	651
VariantC	-----GSSINGSRMDIEKKSHDGEIC	516

CGI_10001852	HPHGKGVDPDRMMVLKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPFEEEEEPKDRLYKRFCSWTC	449
VariantA	HPHGKGVDPDRMMVLKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPFEEEEEPKDRLYKRFCSWTC	585
VariantB	HPHGKGVDPDRMMVLKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPFEEEEEPKDRLYKRFCSWTC	711
VariantC	HPHGKGVDPDRMMVLKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPFEEEEEPKDRLYKRFCSWTC	576

CGI_10001852	CPCYLKQEIIVGLIVLDAFVDLFTTICILANTAFMAADQHPKSPELTEILQNGNYASVFT	509
VariantA	CPCYLKQEIIVGLIVLDAFVDLFTTICILANTAFMAADQHPKSPELTEILQNGNY--VFT	643
VariantB	CPCYLKQEIIVGLIVLDAFVDLFTTICILANTAFMAADQHPKSPELTEILQNGNY--VFT	769
VariantC	CPCYLKQEIIVGLIVLDAFVDLFTTICILANTAFMAADQHPKSPELTEILQNGNY--VFT	634

	IIS1 IIS2	
CGI_10001852	AIFASEAFKLIALSPMYFRDGNCFDFLIVFLSFLEMALDGVSGLSVLRSFRLLRVFK	569
VariantA	AIFASEAFKLIALSPMYFRDGNCFDFLIVFLSFLEMALDGVSGLSVLRSFRLLRVFK	703
VariantB	AIFASEAFKLIALSPMYFRDGNCFDFLIVFLSFLEMALDGVSGLSVLRSFRLLRVFK	829
VariantC	AIFASEAFKLIALSPMYFRDGNCFDFLIVFLSFLEMALDGVSGLSVLRSFRLLRVFK	694

	IIS3 IIS4	
CGI_10001852	LARSWQTLNMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFI FAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	629
VariantA	LARSWQTLNMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFI FAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	763
VariantB	LARSWQTLNMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFI FAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	889
VariantC	LARSWQTLNMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFI FAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	754

	IIS5	
CGI_10001852	FTDFLHSFMIIFRVLCGEWIQSMWGCTNANGPICVPFFLLTYVIGNLVNLFLLALLNS	689
VariantA	FTDFLHSFMIIFRVLCGEWIQSMWGCTNANGPICVPFFLLTYVIGNLVNLFLLALLNS	823
VariantB	FTDFLHSFMIIFRVLCGEWIQSMWGCTNANGPICVPFFLLTYVIGNLVNLFLLALLNS	949
VariantC	FTDFLHSFMIIFRVLCGEWIQSMWGCTNANGPICVPFFLLTYVIGNLVNLFLLALLNS	814

	IIS6	
CGI_10001852	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKRFGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	749
VariantA	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKRFGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	883
VariantB	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKRFGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	1009
VariantC	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKRFGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	874

Chapitre 3 - Caractérisation du Na_v de *C. gigas*

CGI_10001852	VNGKETIPDGEATFSNGTLIEMQTKFDDDEISVQ	-----DKSTTIVVEDEKKA	798
VariantA	VNGKETIPDGEATFSNGTLIEMQTKFDDDEISVQ	GDVLDVNHSP DKSTTIVVEDEKKA	943
VariantB	VNGKETIPDGEATFSNGTLIEMQTKFDDDEISVQ	-----DKSTTIVVEDEKKA	1058
VariantC	VNGKETIPDGEATFSNGTLIEMQTKFDDDEISVQ	GDVLDVNHSP DKSTTIVVEDEKKA	934
	***** Exon 15 *****		
CGI_10001852	DTTRPNSRASPRESLSSNHHSMSDDDTKLSLTKVDADGEPEINEVKVITYANYPDCCFC		858
VariantA	DTTRPNSRASPRESLSSNHHSMSDDDTKLSLTKVDADGEPEINEVKVITYANYPDCCFC		1003
VariantB	DTTRPNSRASPRESLSSNHHSMSDDDTKLSLTKVDADGEPEINEVKVITYANYPDCCFC		1118
VariantC	DTTRPNSRASPRESLSSNHHSMSDDDTKLSLTKVDADGEPEINEVKVITYANYPDCCFC		994

CGI_10001852	ICRRKCPCCIRFENTKWGKAKWIRCLAYALVEHKYFETFIITMILASSIALAIEDVYLE		918
VariantA	ICRRKCPCCIRFENTKWGKAKWIRCLAYALVEHKYFETFIITMILASSIALAIEDVYLE		1063
VariantB	ICRRKCPCCIRFENTKWGKAKWIRCLAYALVEHKYFETFIITMILASSIALAIEDVYLE		1178
VariantC	ICRRKCPCCIRFENTKWGKAKWIRCLAYALVEHKYFETFIITMILASSIALAIEDVYLE		1054

CGI_10001852	ERPTLEQIILEITDKFFTFVFIIEFMFKWTFAGFKKYFTD AWCWLDFVIVGISIVMLV FEL		978
VariantA	ERPTLEQIILQITDKFFTFVFIIEFMFKWTFAGFKKYFTD AWCWLDFVIVGISIVMLV FEL		1123
VariantB	ERPTLEQIILQITDKFFTFVFIIEFMFKWTFAGFKKYFTD AWCWLDFVIVGISIVMLV FEL		1238
VariantC	ERPTLEQIILQITDKFFTFVFIIEFMFKWTFAGFKKYFTD AWCWLDFVIVGISIVMLV FEL		1114

	IIS1		
CGI_10001852	LGMEK VGAIKAMRTL RALRPLRAVSRWEGMRV [▼] VVVALIKAIPSIAN VMMCLIFWLI FGI		1038
VariantA	LGMEK VGAIKAMRTL RALRPLRAVSRWEGMRV [▼] VVVALIKAIPSIAN VMMCLIFWLI FGI		1183
VariantB	LGMEK VGAIKAMRTL RALRPLRAVSRWEGMRV [▼] VVVALIKAIPSIAN VMMCLIFWLI FGI		1298
VariantC	LGMEK VGAIKAMRTL RALRPLRAVSRWEGMRV [▼] VVVALIKAIPSIAN VMMCLIFWLI FGI		1174

	IIS2		
	IIS3		
CGI_10001852	VGVOFFAG KFYKCVDEEDGNKLSVNI [▼] TKNKFEKLEKNYTW [▼] INSKINFDDVLM SYAL LFQVA		1098
VariantA	VGVOFFAG KFYKCVDEEDGNKLSVNI [▼] TKNKFEKLEKNYTW [▼] INSKINFDDVLM SYAL LFQVA		1243
VariantB	VGVOFFAG KFYKCVDEEDGNKLSVNI [▼] TKNKFEKLEKNYTW [▼] INSKINFDDVLM SYAL LFQVA		1358
VariantC	VGVOFFAG KFYKCVDEEDGNKLSVNI [▼] TKNKFEKLEKNYTW [▼] INSKINFDDVLM SYAL LFQVA		1234

CGI_10001852	TYK GWIE VMNDAI [▼] DSKEID EQPEREV N VMYLYV FFVFFI IFGS FFTL NLFIGV IIENFNQ		1158
VariantA	TYK GWIE VMNDAI [▼] DSKEID EQPEREV N VMYLYV FFVFFI IFGS FFTL NLFIGV IIENFNQ		1303
VariantB	TYK GWIE VMNDAI [▼] DSKEID EQPEREV N VMYLYV FFVFFI IFGS FFTL NLFIGV IIENFNQ		1418
VariantC	TYK GWIE VMNDAI [▼] DSKEID EQPEREV N VMYLYV FFVFFI IFGS FFTL NLFIGV IIENFNQ		1294

	IIS6		
CGI_10001852	KKK AGGS LEMFTED QKKYK AMKR MAAKS PQK S IPR P G AGGS LEMFT DDQ K Y YAMAK		1218
VariantA	KKK AGGS LEMFT----- MTDDQ K Y YAMAK		1327
VariantB	KKK AGGS LEMFT----- MTDDQ K Y YAMAK		1442
VariantC	KKK AGGS LEMFT----- MTDDQ K Y YAMAK		1318

CGI_10001852	RMSSK S PQK S IPR PS NI IMGW IFD AVTNQ K FDIG IMII IIM N MLT MALE HYK Q SQ MF TT I		1278
VariantA	RMSSK S PQK S IPR PS NI IMGW IFD AVTNQ K FDIG IMII IIM N MLT MALE HYK Q SQ MF TT I		1387
VariantB	RMSSK S PQK S IPR PS NI IMGW IFD AVTNQ K FDIG IMII IIM N MLT MALE HYK Q SQ MF TT I		1502
VariantC	RMSSK S PQK S IPR PS NI IMGW IFD AVTNQ K FDIG IMII IIM N MLT MALE HYK Q SQ MF TT I		1378

	IVS1		
CGI_10001852	L NHVN MS FI II FT EC VLK L IGL RHFY K FP WN IF DFV VV V LS IL GV ALSD VM DQ FL VSP		1338
VariantA	L NHVN MS FI II FT EC VLK L IGL RHFY K FP WN IF DFV VV V LS IL GV ALSD VM DQ FL VSP		1447
VariantB	L NHVN MS FI II FT EC VLK L IGL RHFY K FP WN IF DFV VV V LS IL GV ALSD VM DQ FL VSP		1562
VariantC	L NHVN MS FI II FT EC VLK L IGL RHFY K FP WN IF DFV VV V LS IL GV ALSD VM DQ FL VSP		1438

	IVS2		
	IVS3		
CGI_10001852	TI L RV V RV FRV GR VL RV S AK GI RTL L FS L AV SL PA LEN I ALL FL VM FI AT FG MS FF		1398
VariantA	TI L RV V RV FRV GR VL RV S AK GI RTL L FS L AV SL PA LEN I ALL FL VM FI AT FG MS FF		1507
VariantB	TI L RV V RV FRV GR VL RV S AK GI RTL L FS L AV SL PA LEN I ALL FL VM FI AT FG MS FF		1622
VariantC	TI L RV V RV FRV GR VL RV S AK GI RTL L FS L AV SL PA LEN I ALL FL VM FI AT FG MS FF		1498

	IVS4		
	IVS5		
CGI_10001852	M H V K H Q Y G ID DC FN F ET FR SMI Y L F Q M CT S AG WD G AL AGI T NE ED C N K E T V R FD NG TT I		1458
VariantA	M H V K H Q Y G ID DC FN F ET FR SMI Y L F Q M CT S AG WD G AL AGI T NE ED C N K E T V R FD NG TT I		1567
VariantB	M H V K H Q Y G ID DC FN F ET FR SMI Y L F Q M CT S AG WD G AL AGI T NE ED C N K E T V R FD NG TT I		1682
VariantC	M H V K H Q Y G ID DC FN F ET FR SMI Y L F Q M CT S AG WD G AL AGI T NE ED C N K E T V R FD NG TT I		1558

CGI_10001852	Y S D C G Y KA G VM FL TS YL VI S FL VV VNM Y IA VL LEN FS Q AT ED V Q GL TS DE FD L FY E KW		1518
VariantA	Y S D C G Y KA G VM FL TS YL VI S FL VV VNM Y IA VL LEN FS Q AT ED V Q GL TS DE FD L FY E KW		1627
VariantB	Y S D C G Y KA G VM FL TS YL VI S FL VV VNM Y IA VL LEN FS Q AT ED V Q GL TS DE FD L FY E KW		1742
VariantC	Y S D C G Y KA G VM FL TS YL VI S FL VV VNM Y IA VL LEN FS Q AT ED V Q GL TS DE FD L FY E KW		1618

	IVS6		
CGI_10001852	E K F D PE AT K F I Q LS Q LS D FD Y LE E PL RL PK PN H F ML V KL D I P IC ED D K V Y CR D I L D AL T		1578
VariantA	E K F D PE AT K F I Q LS Q LS D FD Y LE E PL RL PK PN H F ML V KL D I P IC ED D K V Y CR D I L D AL T		1687
VariantB	E K F D PE AT K F I Q LS Q LS D FD Y LE E PL RL PK PN H F ML V KL D I P IC ED D K V Y CR D I L D AL T		1802
VariantC	E K F D PE AT K F I Q LS Q LS D FD Y LE E PL RL PK PN H F ML V KL D I P IC ED D K V Y CR D I L D AL T		1678

CGI_10001852	KN F L G T S D T P G E I DN EV D K DE K E I Y H VT S ST LM R Q KE H Y A AR V I Q KA W RR Y R N E K GN L		1638
VariantA	KN F L G T S D T P G E I DN EV D K DE K E I Y H VT S ST LM R Q KE H Y A AR V I Q KA W RR Y R N E K GN L		1747
VariantB	KN F L G T S D T P G E I DN EV D K DE K E I Y H VT S ST LM R Q KE H Y A AR V I Q KA W RR Y R N E K GN L		1862
VariantC	KN F L G T S D T P G E I DN EV D K DE K E I Y H VT S ST LM R Q KE H Y A AR V I Q KA W RR Y R N E K GN L		1738

CGI_10001852	P S P P P Y DM V IS K ES D MT S KE S D M AT S K D SK D T A TT I H E D T A S T K S V K S D T S T K Q T A GS S		1698
VariantA	P S P P P Y DM V IS K ES D MT S KE S D M AT S K D SK D T A TT I H E D T A S T K S V K S D T S T K Q T A GS S		1807
VariantB	P S P P P Y DM V IS K ES D MT S KE S D M AT S K D SK D T A TT I H E D T A S T K S V K S D T S T K Q T A GS S		1922
VariantC	P S P P P Y DM V IS K ES D MT S KE S D M AT S K D SK D T A TT I H E D T A S T K S V K S D T S T K Q T A GS S		1798

CGI_10001852	ID V H I E I PE S E I TE E T A ML S P EN RT VEL R A D S D V V A	1734	
VariantA	ID V H I E I PE S E I TE E T A ML S P EN RT VEL R A D S D V V A	1843	
VariantB	ID V H I E I PE S E I TE E T A ML S P EN RT VEL R A D S D V V A	1958	
VariantC	ID V H I E I PE S E I TE E T A ML S P EN RT VEL R A D S D V V A	1834	

Figure 45 : Alignement des séquences protéiques de la sous-unité α de $CgNa_v1$: la séquence de référence CGI_10001852, le variant A, le variant B et le variant C. Les quatre domaines homologues sont annotés I, II, III et IV. Les segments transmembranaires (S1-S6) sont surlignés en noir. Le motif DEKA responsable de la sélectivité pour les ions sodium, dans la boucle reliant les segments S5 et S6, est surligné en noir. Les exons d'épissage sont encadrés par une ligne pleine. L'exon 15 est encadré par une ligne pointillée. Les flèches noires indiquent la séparation entre les exons.

4. Expression des Na_v de *C. gigas*

4.1. Expression des Na_v pendant l'ontogénèse de l'huître

D'après l'étude de la base de données GigaTON (Riviere *et al.*, 2015) rassemblant les données de RNAseq de Zhang *et al.* (2012) effectué sur l'huître *C. gigas*, la séquence CHOYP_SCN4A.1.1 correspondant à CgNa_v1 a pu être analysée. De même, pour cette analyse seulement, la séquence CHOYP_SCN1.2.2 correspondant à CgNa_v2 a aussi été étudiée. Cette base de données permet de déterminer l'expression de CgNa_v1 et CgNa_v2 selon les différents stades de développement de l'huître, de l'œuf jusqu'au juvénile (Figure 46). Les résultats montrent qu'il n'y a quasiment aucune expression de CgNa_v1 pendant les premières étapes de la division cellulaire jusqu'au stade de la morula. Tandis que pour CgNa_v2, une faible expression est observée pendant la division cellulaire jusqu'au stade de la morula où l'expression atteint un pic de 3200 copies. A partir de la blastula, correspondant à une phase de différenciation cellulaire, le nombre de copies de CgNa_v1 augmente jusqu'à atteindre un maximum de 1200 au stade de la gastrulation, tandis que celui de CgNa_v2 diminue à environ 500. Cette étape correspond à la seconde phase du développement embryonnaire, c'est-à-dire la formation précoce des feuillets embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme. L'expression de CgNa_v1 augmente ensuite pendant la phase de larve trochophore (600 copies) et est légèrement supérieure pendant la phase de larve D (800 copies). CgNa_v2 augmente légèrement pendant la phase de larve D, jusqu'à 1000 copies. Une diminution de l'expression de CgNa_v1 et CgNa_v2 est observée pendant la phase de larve umbo jusqu'à 500-600 copies et 300-400 copies (respectivement), puis l'expression ré-augmente jusqu'à atteindre 700 et 500 copies (respectivement) au stade juvénile.

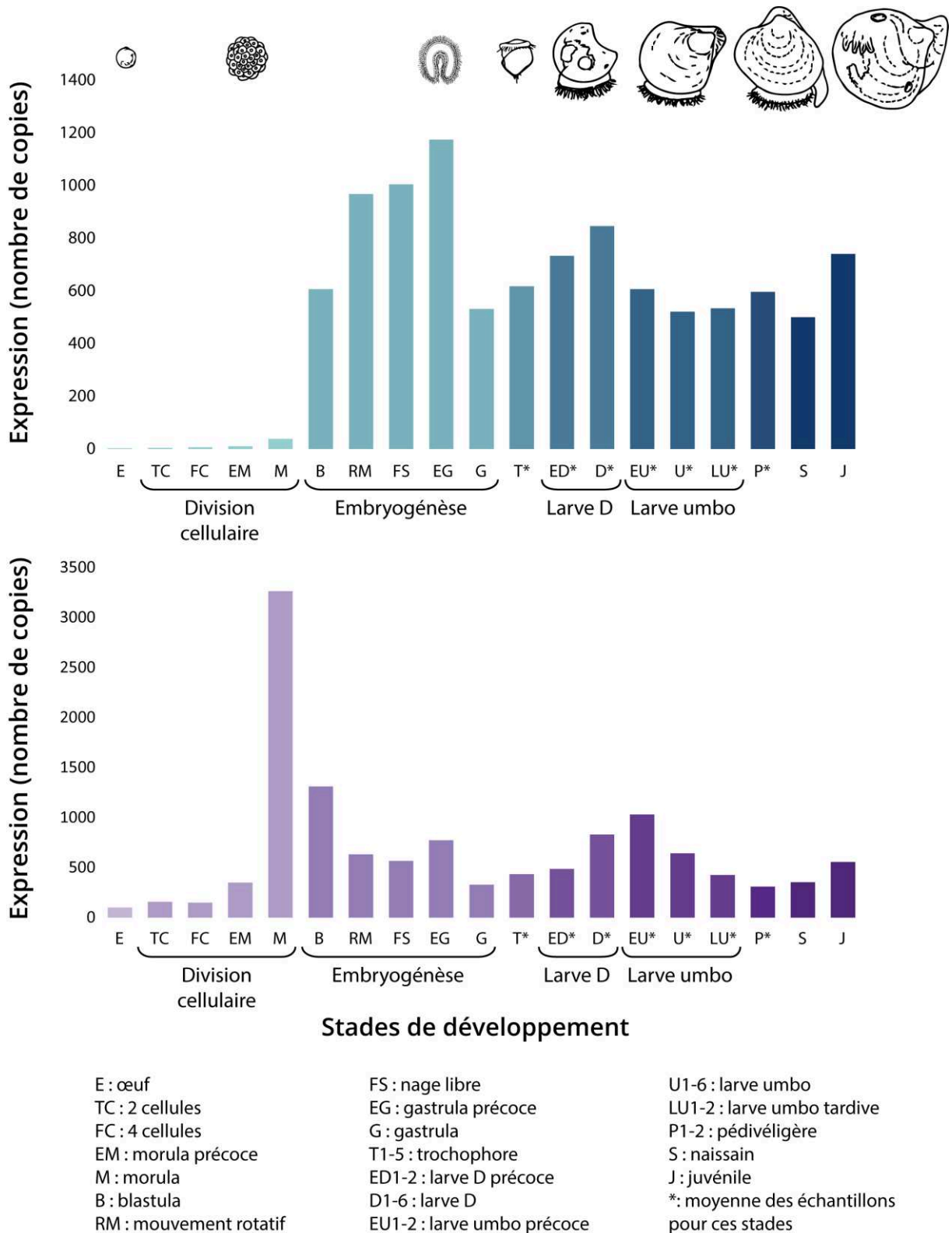


Figure 46 : Expression de la sous-unité α du Na_v chez l'huître *C. gigas* en fonction du stade de développement. $CgNa_v1$ en bleu et $CgNa_v2$ en violet. D'après les données RNAseq de Zhang *et al.* (2012), et représentation schématique des différents stades de développement.

4.2. Expression tissulaire des Na_v

Comme décrit précédemment (paragraphe 2), seul CgNa_v1 est considéré ici car il apparaît comme étant le seul vrai Na_v, comparé à CgNa_v2. L'étude de l'expression globale de CgNa_v1 chez l'huître a été réalisée par PCR en temps réel (Figure 47) et par hybridation *in situ* (Figure 48) en utilisant des amorces amplifiant une séquence commune à tous les variants. Le gène CgNa_v1 est très majoritairement exprimé dans les ganglions viscéraux (quantification relative Qr = 14). Puis par ordre décroissant, CgNa_v1 est également exprimé dans le muscle strié (Qr = 3,2), les branchies (Qr = 2,3), le manteau (Qr = 1) et les palpes labiaux (Qr = 0,5). Le gène CgNa_v1 est moins exprimé dans le muscle lisse (Qr = 0,3) et presque absent dans la gonade (Qr = 0,2), le cœur et la glande digestive (Qr = 0,1 pour les deux).

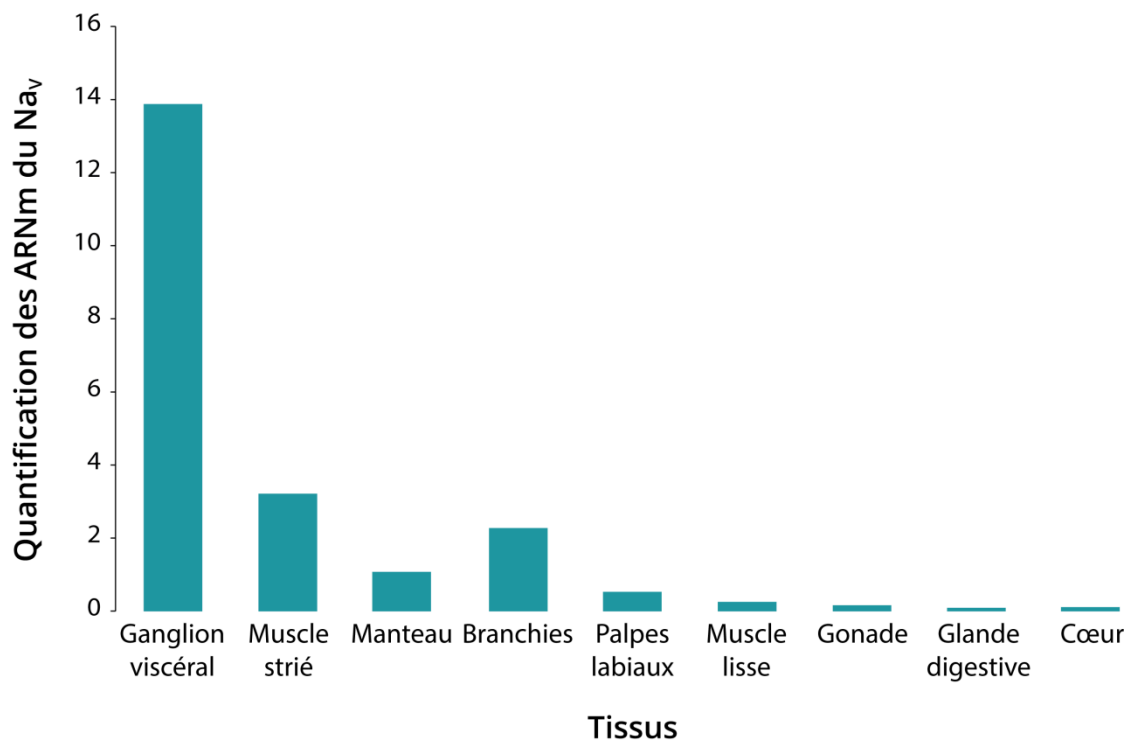
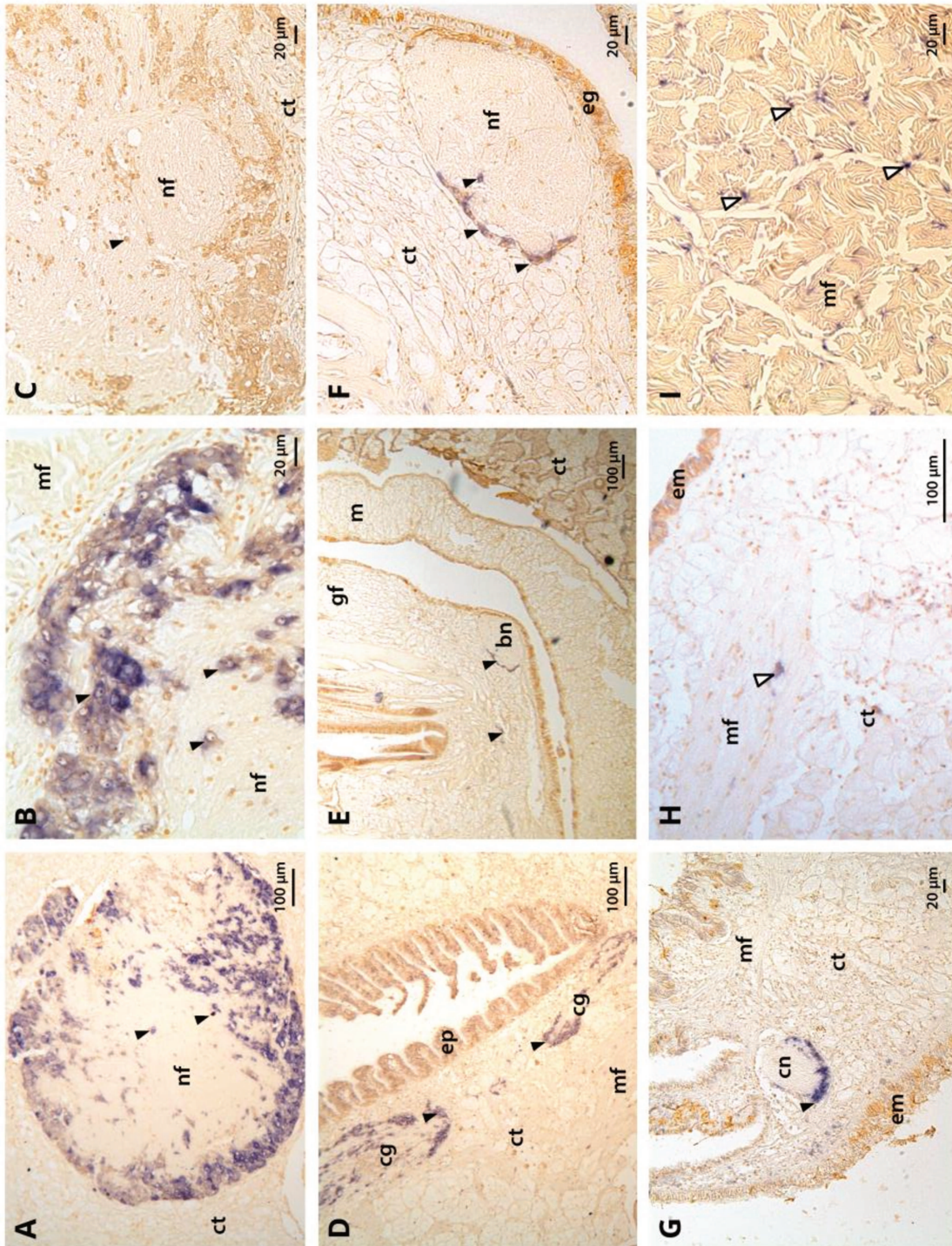


Figure 47 : Quantification relative des ARNm de la sous-unité α de CgNa_v1 par rapport au gène EF1 α mesurée par PCR en temps réel dans les tissus de l'huître *C. gigas*. La quantité relative des transcrits de Na_v a été calculée selon la méthode E (Roche), en utilisant un pool de 10 individus pour chaque tissu.

Figure 48 : Localisation tissulaire de la sous-unité α du Nav1 de *C. gigas* par hybridation in situ en utilisant le marquage à la digoxigénine (DIG). A et B : cellules nerveuses et fibres nerveuses constituant le ganglion viscéral, C : contrôle négatif pour le ganglion viscéral, D : ganglion cérébral situé à la base des palpes labiaux, E et F : nerf branchial à la base des branchies, G : nerf circumpalléal dans le bord du manteau, H : jonction neuromusculaire dans le manteau, I : jonctions neuromusculaires et fibres musculaires dans le muscle strié. Les flèches noires correspondent à des cellules nerveuses (A, B, C, D, E, F et G) et les flèches blanches aux jonctions neuromusculaires (H et I) contenant de l'ARNm de CgNav1. ct : tissu conjonctif, nf : fibres nerveuses, mf : fibres musculaires, cg : ganglion cérébral, ep : cellules épithéliales des palpes labiaux, bn : nerf branchial, gf : filaments branchiaux, m : manteau, eg : cellules épithéliales des branchies, em : cellules épithéliales du manteau, cn : nerf circumpalléal.



L'hybridation *in situ* a montré que dans les ganglions viscéraux CgNa_v1 est exprimé de façon spécifique dans le soma (ou corps cellulaire) des cellules nerveuses, situées sur la périphérie des ganglions viscéraux (Figure 48A, 48B and 48C). L'ARNm de CgNa_v1 a également été détecté dans le soma des cellules nerveuses des ganglions cérébraux à la base des palpes labiaux mais pas dans le tissu conjonctif adjacent (Figure 48D). Comme dans les ganglions viscéraux, les cellules nerveuses sont situées à la périphérie des ganglions cérébraux. Un marquage net a été détecté dans les cellules nerveuses du nerf branchial, situé près de l'axe des branchies (Figure 48E et 48F) et dans les cellules nerveuses du nerf circumpalléal qui longe le bord du manteau (Figure 48G). Des zones de coloration de 5-6 µm ont été observées en abondance dans les fibres musculaires du muscle strié et sporadiquement dans le manteau (Figure 48H) et dans les deux tissus le marquage n'était pas localisé dans une structure cellulaire délimitée (Figure 48I). D'après la description du muscle adducteur de l'huître *C. virginica* par [Morrison \(1993\)](#), cette coloration serait localisée dans les terminaisons nerveuses qui sont généralement à proximité du sarcolemme, correspondant aux jonctions neuromusculaires. Aucun signal n'a été observé dans le muscle lisse, que ce soit dans les fibres musculaires ou nerveuses. Dans tous les tissus, le marquage observé de l'ARNm de CgNa_v1 correspond au soma des cellules nerveuses ou aux jonctions neuromusculaires, mais pas aux axones des neurones. A titre de comparaison et pour vérifier la correspondance des tissus, la Figure 49 représente des coupes schématiques des différents nerfs observés chez *Crassostrea virginica* ([Galtsoff, 1964](#)).

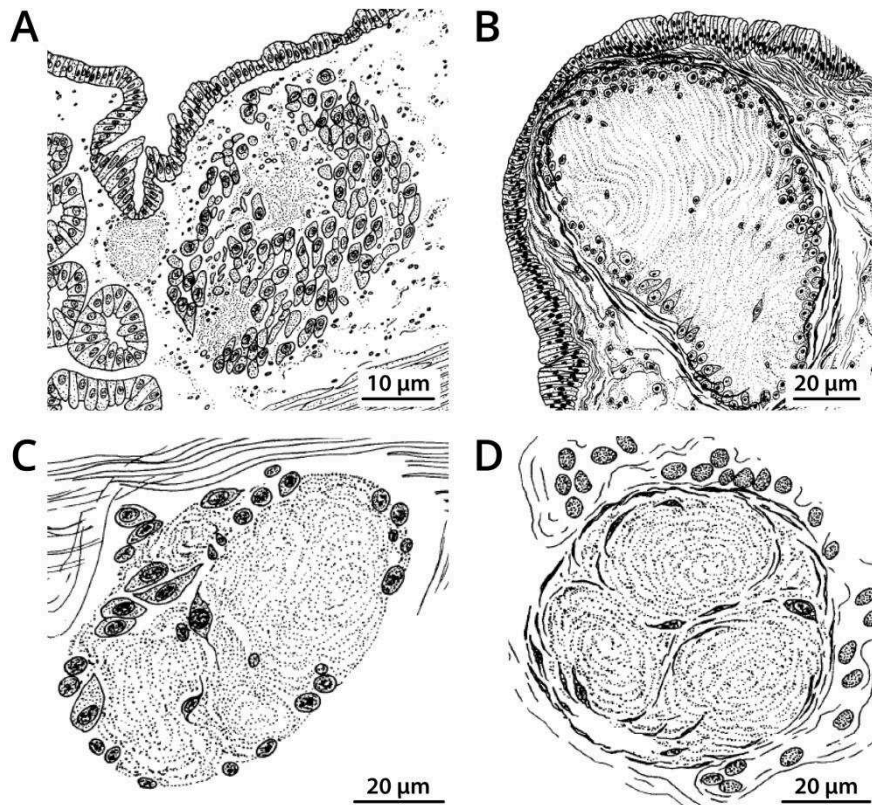


Figure 49 : Représentation schématique de coupe histologique des différents nerfs de *Crassostrea virginica*. **A**, Coupe transversale du nerf cérébroviscéral avec une abondance de cellules nerveuses en périphérie. **B**, Coupe transversale du nerf circumpalléal. **C**, Coupe transversale du nerf branchial. Les branchies sont représentées au-dessus du nerf. **D**, Coupe du nerf radial dans le manteau, composé de 3 troncs nerveux. Des hémocytes sont dispersés tout autour du nerf dans la gaine de tissu conjonctif. Modifié d'après [Galtsoff \(1964\)](#).

5. Discussion

L'objectif principal de cette étude était de caractériser la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant chez l'huître creuse *C. gigas*. Dans les bases de données de NCBI, deux séquences sont annotées comme étant des gènes de Na_v (Na_v9 et Na_v5) chez *C. gigas*. L'analyse phylogénétique a révélé que Na_v9 (EKC22630) et Na_v5 (EKC21550) se regroupent, respectivement, avec les gènes de type Na_v1 et ceux de type Na_v2 caractérisés chez les invertébrés ([Zakon, 2012](#)). Par conséquent, nous avons proposé de renommer les gènes de Na_v chez *C. gigas* en tant que $CgNa_v1$ (Na_v9) et $CgNa_v2$ (Na_v5). La séquence EKC22630, résultant du séquençage du génome de l'huître, s'est révélée incomplète, il manquait l'extrémité 5'. Cela souligne la nécessité de vérifier les différentes bases de données ou de contrôler les séquences candidates par amplification et séquençage pour être certain de travailler avec une séquence précise et correcte, comme l'a souligné [Riviere et al. \(2015\)](#).

Les canaux sodium voltage-dépendant partagent une même séquence d'acides aminés DEKA (pour les domaines I, II, III et IV, respectivement) responsable du filtre de sélectivité du pore (entre les segments S5 et S6 de chaque domaine) (Heinemann *et al.*, 1992 ; Anderson *et al.*, 2005). Nos résultats ont montré que la séquence DEKA se retrouve dans la séquence protéique de CgNa_v1 comme dans les autres protéines de type Na_v1, tandis que la protéine CgNa_v2 présente une séquence DEEA, caractéristique des protéines de type Na_v2. L'acide aminé lysine (K) dans le domaine III des canaux Na_v1 améliore la sélectivité pour le sodium (Schlief *et al.*, 1996 ; Lipkind et Fozzard, 2008). A l'inverse, l'acide glutamique (E) présent dans le domaine III des canaux Na_v2 est caractéristique des canaux calcium. Des études de mutagenèse dirigée chez la blatte *Blattella germanica* ont mis en évidence que l'acide glutamique du domaine III du gène BSC1 (Na_v2) joue un rôle clé dans la sélectivité pour le calcium (Zhou *et al.*, 2004). Chez les insectes, les deux gènes para (Na_v1, DEKA) et DSC1 (Na_v2, DEEA), ont d'abord été classés en tant que canaux sodium (Dong, 2007). Récemment, des études fonctionnelles ont démontré que le gène DSC1 serait plutôt un nouveau type de canal voltage-dépendant cationique (Zhang *et al.*, 2011) et jouerait un rôle dans la modulation de la stabilité des circuits neuronaux sous des contraintes environnementales (Zhang *et al.*, 2013). Une étude récente propose que le filtre de sélectivité des choanoflagellés et des métazoaires (DEEA) soit un intermédiaire entre le canal calcium (EEEE) et le canal sodium (DEKA) et resterait présent dans le Na_v2 des invertébrés (Zakon, 2012). Ces canaux seraient sélectifs à la fois des ions calcium et sodium (Dong *et al.*, 2015). Nos résultats soulèvent la question de la nature et de la sélectivité du canal CgNa_v2 chez l'huître creuse. CgNa_v2 pourrait être un canal intermédiaire entre les canaux sodium et calcium. Ces incertitudes sur la nature de CgNa_v2 ont conduit l'étude à se concentrer uniquement sur CgNa_v1, un membre des canaux sodium voltage-dépendant connus pour être la cible des toxines PST.

L'analyse de l'expression de CgNa_v1 et CgNa_v2 durant l'ontogénèse de l'huître, a démontré une absence d'expression de CgNa_v1 tout au long de la division cellulaire, suggérant qu'il n'y a pas d'expression maternelle du Na_v. L'expression de CgNa_v1 débute au stade blastula, c'est-à-dire au moment de la transition maternelle-zygote. Tandis que pour CgNa_v2, une expression faible est observée avec un pic au niveau de la morula, suggérant une expression maternelle du Na_v. L'expression de CgNa_v1 et CgNa_v2 semble précoce par rapport au développement du système nerveux, qui débute généralement au stade de la

larve trochophore. En effet, chez des larves de gastéropodes *Ilyanassa obsoleta*, l'étude du développement du système nerveux a démontré que les premiers neurones étaient observés dans l'organe apical et les régions postérieures durant le stade trochophore (Dickinson et Croll, 2003). Cela suggérerait que, soit le système nerveux se développe plus tôt que ce qui est observé chez les gastéropodes, soit il y a une expression de CgNa_v1 et CgNa_v2 indépendamment du développement du système nerveux qui pourrait correspondre au développement de cellules excitables non-nerveuses.

Conformément au rôle du Na_v dans les cellules excitables, l'ARNm de CgNa_v1 semble s'exprimer dans le soma des cellules nerveuses (corps cellulaire) du système nerveux central des huîtres, composé des ganglions viscéraux (sur le muscle adducteur) et cérébraux (à la base des palpes labiaux), ainsi que dans le système nerveux périphérique composé des nerfs innervant les tissus tels que le nerf branchial (à la base des branchies) ou le nerf circumpalléal (le long du bord du manteau). Awad *et al.* (2001) ont précisé dans une étude sur le rat que la distribution des ARNm de Na_v1 correspond généralement à la localisation de la protéine qu'ils codent. En conséquence, la localisation des ARNm de CgNav1 traduirait la distribution des canaux de CgNav1, même si d'autres études sur les protéines sont nécessaires pour confirmer ce modèle. L'expression de CgNa_v1 observée dans les muscles des huîtres est probablement liée à la fonction des canaux Na_v dans la communication neuromusculaire. En effet, les canaux Na_v sont localisés au niveau des jonctions neuromusculaires et participent à la propagation du potentiel d'action dans la membrane post-synaptique, permettant ainsi la contraction du muscle.

III. Partie 2 : Variabilité de CgNa_v1

1. Polymorphisme au niveau du segment P, le site de fixation des PST

Le polymorphisme a été étudié au niveau de l'ADN génomique de la région des sites de liaison aux PST des 4 domaines (I, II, III et IV) de la sous-unité α du CgNa_v1. L'analyse a été menée sur 3 populations françaises (n=50 par population) et une population japonaise (n=20) de l'huître creuse *C. gigas*. La taille des amplicons était de 428pb, 136pb, 328pb et 301pb pour les domaines I, II, III et IV, respectivement. Dans les 644 séquences analysées (4 régions séquencées par gène, analysées sur 161 huîtres échantillonnées dans les 4 populations), seulement 3 mutations non-synonymes ont été identifiées. Ces 3 mutations sont situées à l'extérieur des 10 acides aminés constituant les sites de liaison aux PST. Ainsi, la séquence protéique des sites de liaison aux PST est apparue parfaitement conservée chez tous les individus analysés.

Tableau 10 : Analyse du polymorphisme nucléotidique des régions entourant les sites de liaison aux PST pour chaque domaine (DI à DIV) de la sous-unité α du Na_v1 de *C. gigas*. LOG : Logonna-Daoulas, LB : Larmor Baden, RE : St Clément des Baleines, JAP : Japon. N : nombre d'huîtres analysées, Pe : nombre de SNP dans les exons, Pi : nombre de SNP dans les introns, Le : longueur des exons, Li : longueur des introns, Π_e : nombre de SNP par sites codants (Pe/Le), Π_i : nombre de SNP par sites non-codant (Pi/Li), Π_t : nombre total de SNP par sites ((Pe+Pi)/(Le+Li)), tiret : pas de données.

Domaines	Populations	N	Pe	Pi	Le	Li	Π_e	Π_i	Π_t
DI	LOG	15	1	3	117	311	0,009	0,010	0,009
	LB	12	1	2	117	311	0,009	0,060	0,007
	RE	20	1	3	117	311	0,009	0,010	0,009
	JAP	13	1	3	117	311	0,009	0,010	0,009
DII	LOG	48	5	-	136	-	0,037	-	0,037
	LB	46	5	-	136	-	0,037	-	0,037
	RE	42	5	-	136	-	0,037	-	0,037
	JAP	19	6	-	136	-	0,044	-	0,044
DIII	LOG	14	0	7	140	188	0	0,037	0,021
	LB	8	0	6	140	188	0	0,032	0,018
	RE	11	0	5	140	188	0	0,027	0,015
	JAP	7	0	5	140	188	0	0,027	0,015
DIV	LOG	26	4	-	301	-	0,013	-	0,013
	LB	25	5	-	301	-	0,017	-	0,017
	RE	25	5	-	301	-	0,017	-	0,017
	JAP	20	4	-	301	-	0,013	-	0,013

Le nombre de SNP (Single Nucleotide Polymorphism), calculé par population et par domaine de la sous-unité α du CgNav1, varie entre 0 et 5 dans les régions exoniques et de 2 à 7, dans les zones introniques (Tableau 10). Le niveau de SNP est de 1/61 pb dans les régions codantes et 1/40 pb dans les régions non-codantes. La diversité génétique globale calculée comme la moyenne Π des 4 domaines est similaire dans toutes les populations (Π moyenne = 0,016).

2. Variants d'épissage du Nav

2.1. Caractérisation des variants d'épissage

Dans le but de déterminer de potentiels variants d'épissage, des fragments d'ADNc allant de « a » à « h » (Figure 44) ont été amplifiés dans les 9 tissus de 5 huîtres. Les variants d'épissage ont été discriminés selon leur taille par électrophorèse. Le fragment « c » (d'une longueur de 361 pb à 2234 pb) a été le seul amplicon à présenter des variations de taille entre les échantillons. Les analyses de séquençage et l'alignement multiple des ADNc de CgNav1 avec la séquence CGI_10001852 ont révélé l'existence de trois variants d'épissage différents, nommés A, B et C. Les caractéristiques des trois variants A, B et C sont décrits dans le Tableau 11 et la Figure 50. Les séquences ont été déposées sur GenBank avec les numéros d'accèsion suivant : KY020155, KY020156 et KY020157 pour les variants A, B et C, respectivement.

Tableau 11 : Caractéristiques structurales des variants d'épissage de la sous-unité α du Nav1 de *C. gigas*.

Nom des séquences	Taille totale de l'ADNc (pb)	Taille totale de la protéine (aa)	Fragments d'ADNc épissés	Taille des fragments d'ADNc (pb)	Taille des fragments protéiques (aa)
CGI_10001852	5205	1734	/	/	/
Variant A	5532	1844	- exon 7	- 405	- 135
			+ exon 15	+ 33	+ 11
Variant B	5877	1959	- exon 5	- 27	- 9
Variant C	5505	1835	- exons 5 and 7	- 432	- 144
			+ exon 15	+ 33	+ 11

Le variant A ne possède pas l'exon 7 (135 acides aminés), qui code pour une partie de l'inter-domaine intracellulaire entre les domaines I et II (ID I-II) qui est riche en résidus proline et sérine. Le variant B ne dispose pas d'exon 5 (9 acides aminés), qui code également pour une partie de ID I-II. Enfin, le variant C ne possède aucun des deux exons. Les exons 5 et 7 semblent être des exons mutuellement exclusifs, car aucune séquence complète possédant les deux exons n'a été observée. Les variants A et C présentent également une rétention d'une partie de l'intron 14 (11 acides aminés) qui pourrait en réalité correspondre à un exon alternatif (nommé exon 15) et qui coderait pour une partie de ID II-III.

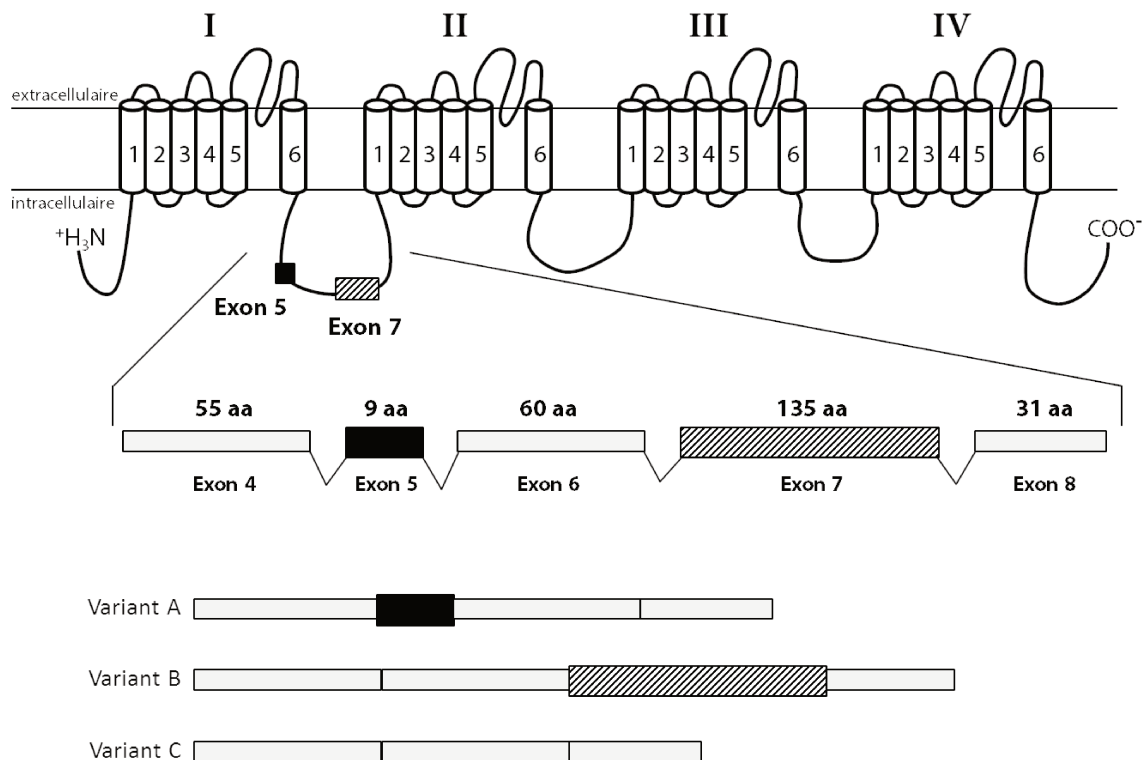


Figure 50 : Épissage alternatif de la sous-unité α du Na_v1 de *C. gigas*. Le canal est composé de quatre domaines homologues (I-IV), ayant chacun six segments transmembranaires (1-6). L'emplacement des exons épissés alternativement est indiqué par des rectangles sur la structure protéique. Le détail de la structure de l'ARNm est présenté, où deux exons alternatifs ont été trouvés (exons 5 et 7), ce qui entraîne 3 isoformes différentes (variants A, B et C).

Les analyses de la prédiction de la structure protéique des variants d'épissage ont montré que l'exon 5 possède trois résidus sérine qui sont des acides aminés polaires pouvant être phosphorylés. L'exon 7 possède beaucoup de résidus importants, avec 15 résidus proline au début et à la fin de l'exon et 17 résidus sérine dans le milieu de l'exon, correspondant à de nombreux sites de phosphorylation. L'exon alternatif 15, qui est présent dans les variants A et C, ne possède qu'un seul résidu glycine et un résidu proline. Ces

résultats ont été confirmés par la prédiction des sites phosphorylés dans les deux exons. En effet, l'exon 5 posséderait deux sites de la protéine kinase C (PKC), tandis que l'exon 7 posséderait 12 sites de la protéine kinase A (PKA).

2.2. Expression des variants d'épissage

L'expression des variants d'épissage A, B et C de la sous-unité α du CgNa_v1 a été déterminée par PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques de chaque variant (Figure 51). Le variant A est majoritairement exprimé dans le muscle strié (Qr = 10,4), puis dans l'ordre décroissant, dans le manteau (Qr = 4,8), le muscle lisse (Qr = 0,6), les branchies (Qr = 0,1) et aucune expression n'a été détectée dans les ganglions viscéraux, les palpes labiaux, la glande digestive et le cœur. Le variant B est principalement exprimé dans les ganglions viscéraux (Qr = 24,1) par rapport aux autres tissus et faiblement exprimé, par ordre décroissant, dans le manteau (Qr = 2,4) (comparaisons inter-organe, $p < 0,001$), les branchies (Qr = 2,1), les palpes labiaux (Qr = 1,4) ($p = 0,016$), la glande digestive (Qr = 0,4), le muscle strié (Qr = 0,2) ($p = 0,01$), le muscle lisse (Qr = 0,1) et le cœur (Qr = 0,1).

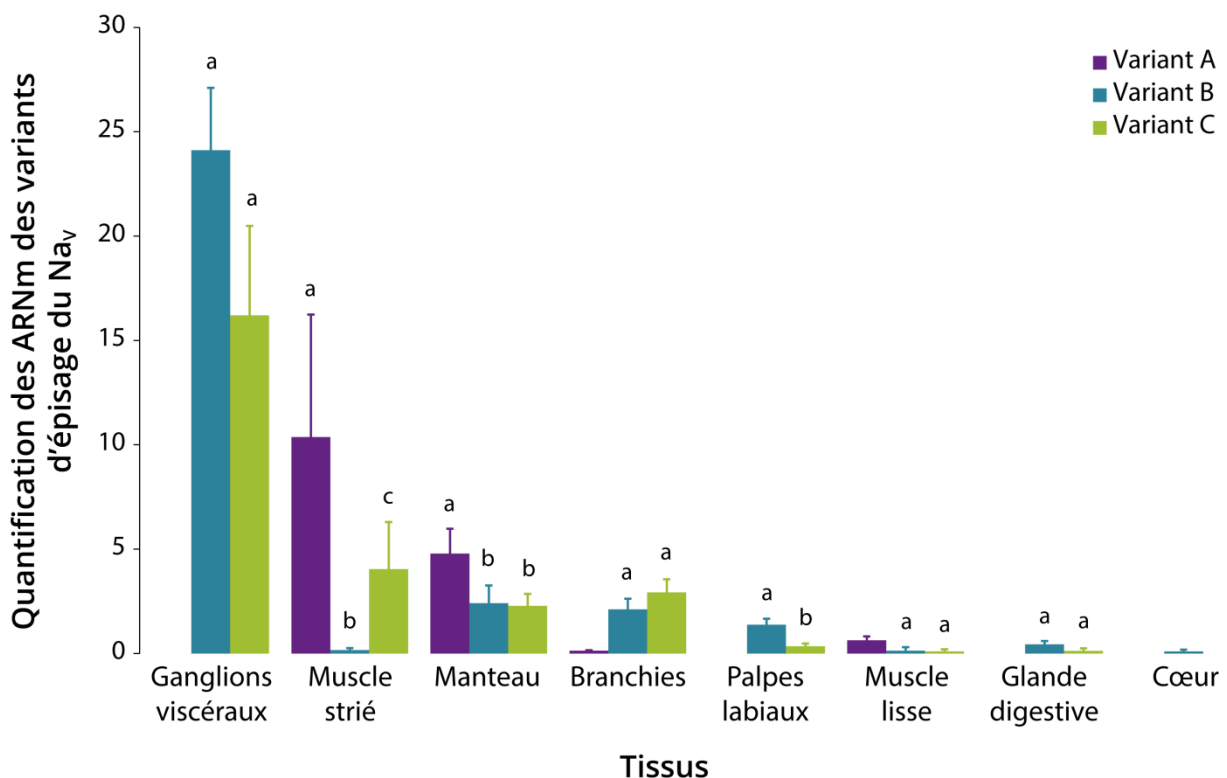


Figure 51 : Quantification relative des variants d'épissage A, B et C de la sous-unité α de CgNa_v1 par rapport aux gènes EF1 α et GAPDH mesurée par PCR en temps réel dans les tissus de l'huître *C. gigas*. La quantité relative des transcrits de Na_v a été calculée selon la méthode E (Roche) et en utilisant la moyenne géométrique des deux gènes de référence.

Le variant C est exprimé dans tous les tissus et principalement dans les ganglions viscéraux (Qr = 16,2), le muscle strié (Qr = 4) ($p = 0,009$), les branchies (Qr = 2,9), le manteau (Qr = 2,3), les palpes labiaux (Qr = 0,4) ($p < 0,001$), la glande digestive (Qr = 0,1), le muscle lisse (Qr = 0,1) et il n'est presque pas exprimé dans le cœur (Qr = 0,02). Ces résultats indiquent que le variant A n'est jamais exprimé dans les ganglions viscéraux, la glande digestive et les palpes labiaux. Le variant B n'est presque jamais exprimé dans le muscle strié.

3. Discussion

Pour étudier si la variabilité de l'accumulation des PST entre les huîtres pourrait être liée à l'existence de plusieurs formes de CgNa_v1 avec une sensibilité différente aux PST, la variabilité de CgNa_v1 a été explorée à l'échelle du polymorphisme génétique et des modifications post-transcriptionnelles.

L'analyse du polymorphisme sur 161 individus a révélé que les 10 acides aminés des sites de liaison aux PST étaient strictement monomorphes, malgré le polymorphisme nucléotidique élevé de CgNa_v1, qui est similaire au taux de SNP global décrit pour cette espèce ([Sauvage et al., 2007](#)). Les canaux Na_v sont codés par des gènes hautement conservés à travers l'évolution. Cela reflète le rôle fonctionnel critique et conservé de ces protéines dans la régulation de l'excitabilité ([Goldin, 2002](#)), en particulier dans la région la plus conservée du pore, la zone critique pour la sélection des ions et leur flux ([Marban et al., 1998](#) ; [Jost et al., 2008](#)). Chez les myes nord-américaines, la résistance aux PST est induite par une substitution de l'acide aminé E (acide glutamique) par l'acide aminé D (acide aspartique) dans le site de liaison aux PST du domaine II du Na_v ([Bricelj et al., 2005](#)). Pour cette espèce, l'exposition répétée aux PST, dus aux blooms récurrents d'*Alexandrium* spp, constitue une forte pression de sélection car les PST entraînent la mortalité des myes sensibles, permettant ainsi l'augmentation de l'allèle résistant dans la population régulièrement exposée. Chez l'huître creuse, à la même position de la séquence du Na_v, un acide aminé Q est observé pour CgNa_v1. Des études de sensibilité du Na_v1.2 chez le rat ont révélé que la mutation E945Q dans le domaine II, à la même position que celle concernée chez la mye (E/D) et l'acide aminé Q chez l'huître, conduit à une résistance à la STX et

diminue la conductance du sodium (Terlau *et al.*, 1991 ; Kontis et Goldin, 1993). Par conséquent, l'acide aminé Q de CgNa_v1 pourrait conférer une certaine résistance des huîtres à la STX, ce qui est cohérent avec l'absence de mortalités observées dans les populations d'huîtres pendant les efflorescences d'*Alexandrium*. La fréquence élevée de ce génotype « résistant » de CgNa_v1 dans les populations de *C. gigas* pourrait résulter d'un ancien cas de mutation suivi d'une sélection sous pression des PST dans les origines asiatiques de l'huître creuse, le même génotype étant observé dans les populations japonaise et française. Cette hypothèse devra être confirmée par des études électrophysiologiques fonctionnelles en utilisant une expression hétérologue de ces gènes dans des ovocytes de xénopes comme cela a été réalisé chez des insectes (Dong, 2007).

Les trois variants (A, B et C), caractérisés pour CgNa_v1 résultent d'un épissage alternatif des deux exons 5 et 7, susceptibles d'être mutuellement exclusifs puisque la forme complète de l'ADNc comprenant les deux exons n'a jamais été détectée. La forme de référence du génome correspondrait probablement à une forme incomplète résultant d'une éventuelle erreur d'assemblage. De plus, les données de RNAseq effectuées sur les branchies d'huîtres ont démontré l'existence de deux séquences protéiques correspondant à CgNa_v1B (CGI.37885) et CgNa_v1C (CGI.19299) (Zhao *et al.*, 2012). L'absence de séquence correspondant à CgNa_v1A dans cette base de données confirme nos résultats indiquant que CgNa_v1A ne s'exprime pas dans les branchies. Cependant, d'après les données provenant de la base GigaTON (RNAseq sur tous les tissus), il existe une séquence similaire à CgNa_v1A (CHOYP_SCN4A.1.1) et deux séquences correspondant à des séquences modifiées de CgNa_v1B : une séquence tronquée après 785 acides aminés (CHOYP_LOC100533425.1.2) et une séquence dont 148 acides aminés de l'extrémité 5' et 458 de l'extrémité 3' sont manquants (Riviere *et al.*, 2015).

Le variant B s'exprime dans le soma des cellules nerveuses des ganglions ou des nerfs, mais pas dans les autres tissus. Le CgNa_v1B pourrait donc être une forme de CgNa_v1 spécifique aux cellules nerveuses des ganglions et des nerfs. A l'inverse, le variant A, est exprimé uniquement dans les muscles ou dans les tissus riches en fibres musculaires, c'est-à-dire dans le muscle strié, dans le manteau, et dans une moindre mesure dans le muscle lisse et les branchies. Par conséquent, CgNa_v1A pourrait être la forme spécifique des jonctions neuromusculaires. La forme la plus courte de CgNa_v1, le variant C semble avoir une expression ubiquitaire. L'expression tissu-spécifique des variants pourrait être visualisée par

hybridation *in situ* avec la synthèse de sondes spécifiques pour chaque variant. Il serait également intéressant de regarder l'expression de chaque variant durant l'ontogénèse de l'huître.

Les résultats ont montré que les exons épissés sont localisés dans l'inter-domaine intracellulaire entre les domaines I et II (ID I-II). Cette région est une zone commune d'épissage alternatif des canaux sodium voltage-dépendant pour de nombreuses espèces, comme chez *Drosophila melanogaster* (Thackeray et Ganetzky, 1994 ; Lin et al., 2009), *Musca domestica* (Lee et al., 2002), *Bombyx mori* (Shao et al., 2009b), *Cancer borealis* (Dai et al., 2010), ou dans les canaux sodium de mammifères (Schaller et al., 1992 ; Plummer et al., 1998). Le variant B de CgNa_v1 exprimé dans le système nerveux des huîtres code pour une plus grande protéine que celles issues des variants A et C. Ce variant résulte de la rétention de l'exon 7 codant pour un plus grand inter-domaine intracellulaire ID I-II, avec 12 sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA). L'inter-domaine ID I-II est connu pour être une région importante dans la régulation de l'expression des protéines, en raison de sa richesse en sites de phosphorylation de la PKA. L'épissage alternatif des exons contenant des sites de la PKA permet une phosphorylation conditionnelle des canaux Na_v. Smith et Goldin (1996) ont montré chez le rat que l'inter-domaine ID I-II du canal Na_v est plus long dans le cerveau que dans le muscle squelettique. Le canal du cerveau possédait de nombreux sites de phosphorylation dans l'inter-domaine ID I-II et était donc le seul à être modulé par la PKA (Smith et Goldin, 1996). Cela est également compatible avec la présence du variant B dans le système nerveux et non dans le muscle strié. Par conséquent, l'épissage alternatif serait un mécanisme impliqué dans la régulation de l'expression des canaux sodium chez l'huître creuse. Il a été démontré que la phosphorylation des canaux sodium par la PKA et la protéine kinase C (PKC) entraînait une diminution de l'amplitude du courant sodium et modulait les phases d'activation et d'inactivation du Na_v (Smith et Goldin, 1996). Une étude chez la blatte a identifié deux types de courant sodium avec deux voies de signalisation différentes, dont l'une est la phosphorylation par la PKA (Lavialle-Defaix et al., 2006). En parallèle, chez cette même espèce, deux types de courant ont été proposés comme résultant d'un épissage alternatif du gène codant pour le Na_v (Zhao et al., 2005). Cela pourrait suggérer que chez *C. gigas* le variant B exclusivement présent dans le système nerveux pourrait être régulé par la voie de la PKA, tandis que les variants A et C seraient régulés par d'autres voies. De la même manière, les différents variants d'épissage de CgNa_v1

pourraient générer différents types de courant sodium. Des études fonctionnelles de chaque forme de CgNa_v1 permettraient l'étude des propriétés électrophysiologiques de ces canaux.

IV. Partie 3 : Relation entre l'expression des variants et l'accumulation de PST

1. Accumulation des toxines et profil toxinique

Après une exposition des huîtres à l'algue toxique *A. minutum*, l'accumulation des PST dans la glande digestive, organe qui accumule le plus, allait de 2 à 302 μg eq. STX/100g de glande digestive (expérience 1, exp1) et de 2 à 900 μg eq. STX/100g de glande digestive (expérience 2, exp2) (Figure 52). Par conséquent, la charge en toxine varie d'un facteur 150 (exp1) et 450 (exp2) entre les huîtres qui ont accumulé le moins et le plus de PST. Des différences sont également observées en ce qui concerne le profil toxinique des PST accumulés dans la glande digestive (Figure 53 et 54).

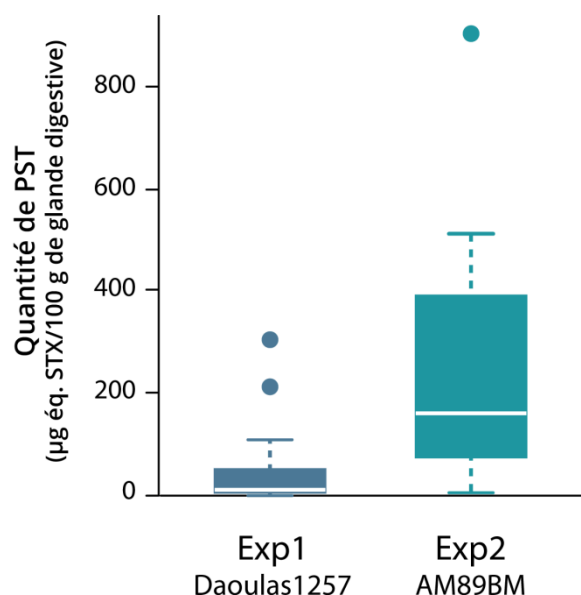


Figure 52 : Accumulation de PST dans la glande digestive des huîtres *C. gigas* exposées à différentes souches d'*A. minutum*, Daoulas 1257 pour l'expérience 1 et AM89BM pour l'expérience 2.

Pour l'expérience 1 utilisant la souche Daoulas 1257, le profil est composé de 10 toxines différentes : dc-GTX3, GTX5, dc-GTX2, GTX3, GTX2, Néo-STX, dc-STX, STX, C1 et C2 (Figure 53A). Les toxines STX et Néo-STX, lorsqu'elles sont retrouvées, correspondent à environ 3% de la quantité totale de PST, pour les huîtres accumulant beaucoup (> 200 μg eq. STX/100 g de glande digestive ; 52, 55, 58, 61 et 63). Tandis que pour les huîtres accumulant peu (< 200 μg eq. STX/100 g de glande digestive ; 50, 51, 53, 54, 56, 59, 62 et 64), les toxines STX et NéoSTX ensemble représentent en moyenne 74 % de la quantité totale de PST. Il est à

noter que la STX est observée uniquement dans les 3 individus ayant accumulés le plus (55, 58, 61).

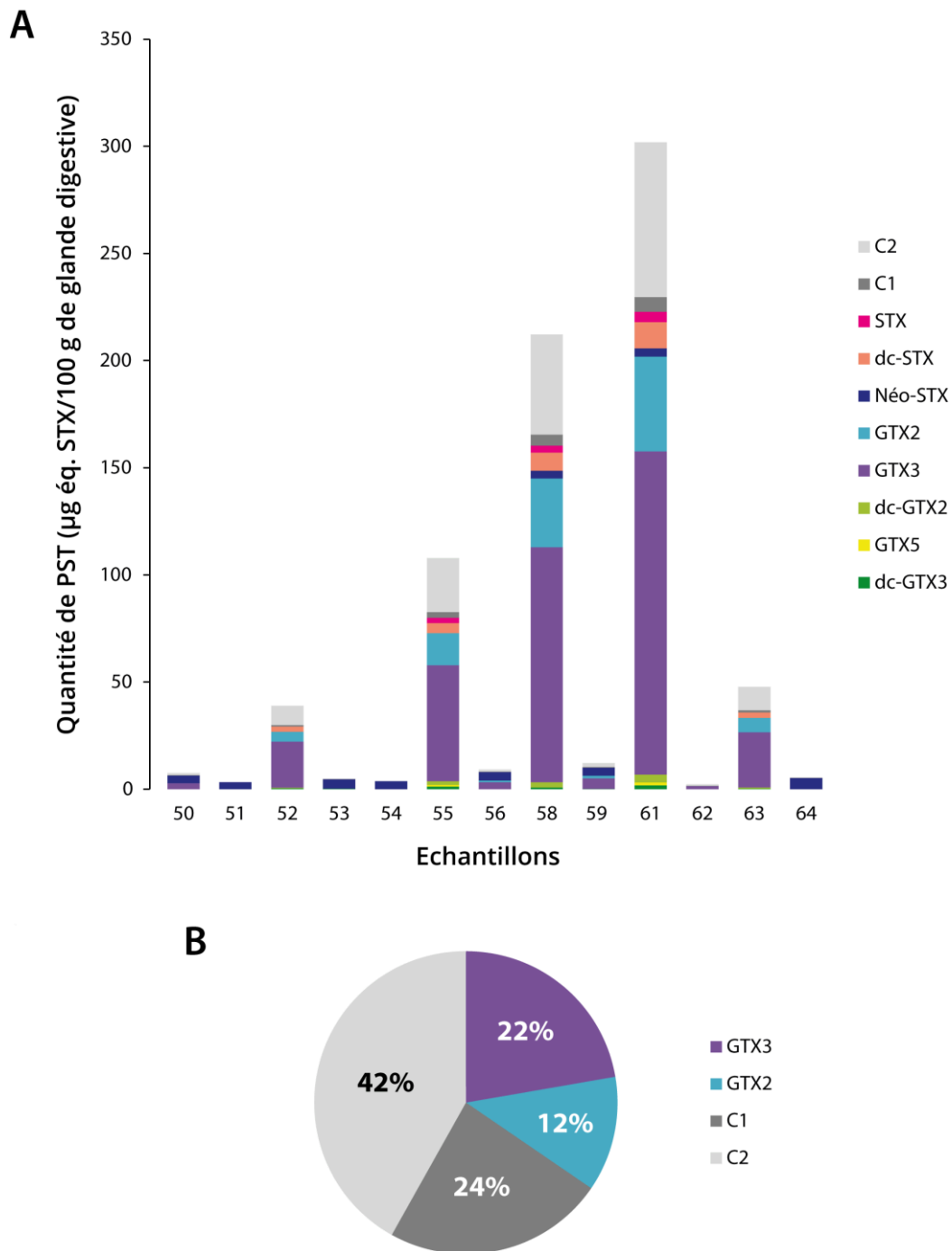


Figure 53 : Profil toxinique des PST présents dans la glande digestive des huîtres *C. gigas* exposées à la souche toxique d'*A. minutum* Daoulas 1257 pendant 4 jours (exp1). **A**, Quantité de toxines accumulées mesurées par HPLC dans la glande digestive (en μg équivalent STX/100 g de glande digestive). **B**, Quantité de toxines mesurées par HPLC dans les cellules d'*A. minutum* (en μg équivalent STX/100 g de glande digestive).

Les toxines GTX2 et GTX3, également fortement toxiques, représentent, lorsqu'elles sont retrouvées, 66% de la quantité totale de PST pour les huîtres accumulant beaucoup et

51% pour celles accumulant peu. La souche Daoulas 1257 possède une toxicité de 0,05 pg éq. STX/cellules. Son profil toxinique indique la présence de quatre toxines : C2 (42%), C1 (24%), GTX3 (22%) et GTX2 (12%) (Figure 53B). La comparaison des concentrations (en $\mu\text{mol/L}$) d'épimères β (GTX3 et C2) sur les épimères α (GTX2 et C1) montre un ratio β/α de 1,78 pour la souche et 0,71 pour les huîtres, suggérant une biotransformation des dérivés dans les glandes digestives des huîtres (Bricelj et Shumway, 1998).

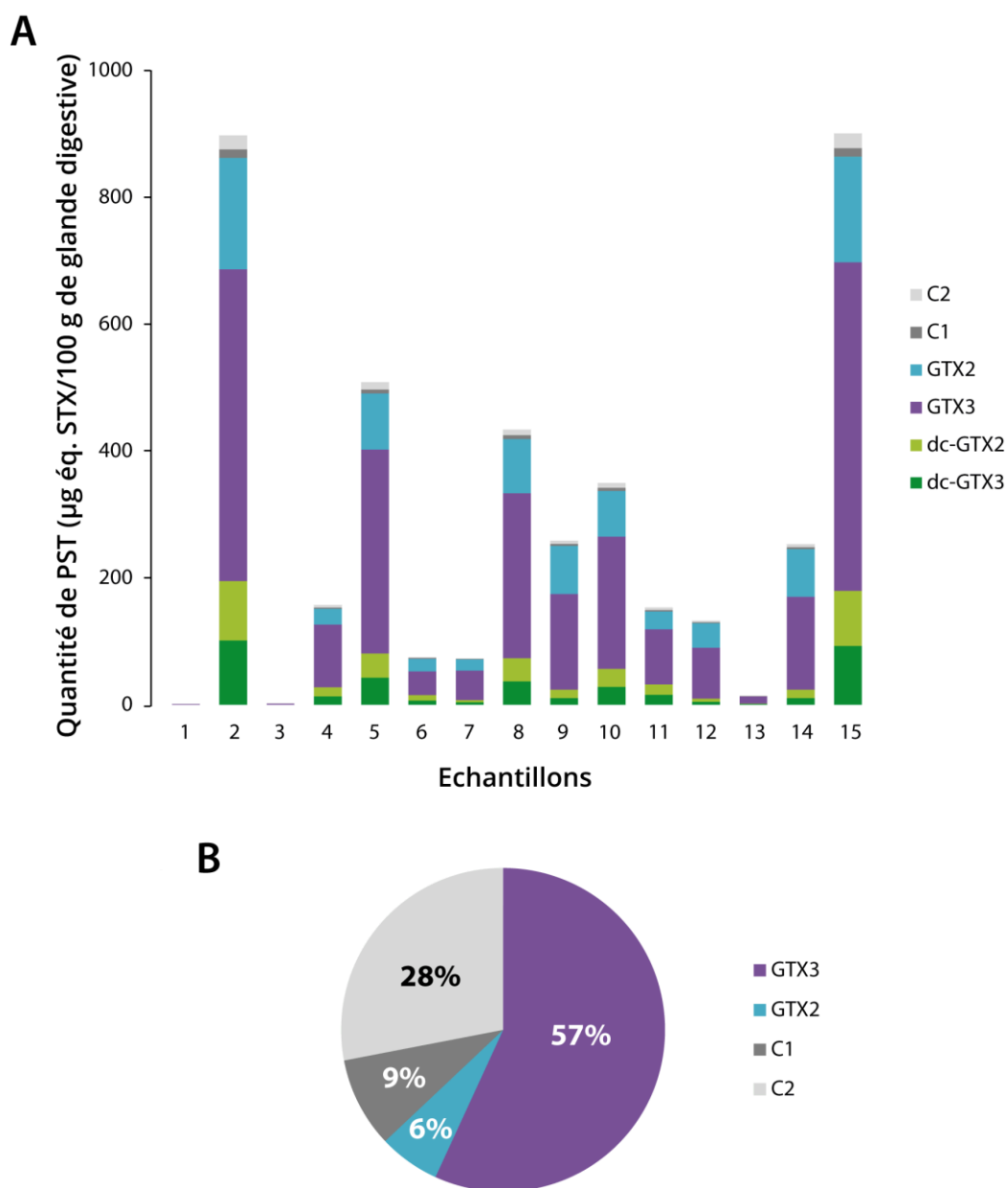


Figure 54 : Profil toxinique des PST présent dans la glande digestive des huîtres *C. gigas* exposées à la souche toxique d'*A. minutum* AM89BM pendant 6 jours (exp2). **A**, Quantité de toxines accumulées mesurées par HPLC dans la glande digestive (en μg équivalent STX/100 g de glande digestive). **B**, Quantité de toxines mesurées par HPLC dans les cellules d'*A. minutum* (en μg équivalent STX/100 g de glande digestive), d'après Fabioux *et al.* (2015).

Pour l'expérience 2, le profil toxinique est composé de seulement six toxines, toutes retrouvées dans l'expérience 1, avec (en moyenne) : GTX3 (65%), GTX2 (22%), dc-GTX3 (8%), dc-GTX2 (8%), C1 (2%) et C2 (2%) (Figure 54A). GTX3 est la toxine majoritaire de la quantité totale de PST, avec environ 65% du profil toxinique. La souche AM89BM possède une toxicité de 1,3 pg éq. STX/cellules, qui est nettement supérieure à celle de la souche Daoulas 1257. Le profil toxinique de cette souche AM89BM indique la présence des quatre mêmes toxines que celles retrouvées chez la souche Daoulas 1257, mais avec des proportions différentes : GTX3 (57%), C2 (28%), C1 (9%) et C2 (6%) (Figure 54B). Le ratio β/α , permettant de comparer les épimères β sur les épimères α , est de 5,59 pour la souche et 1,08 pour les huîtres, suggérant une biotransformation des dérivés dans les glandes digestives des huîtres.

2. Relation entre accumulation et expression des variants de CgNa_v1

Selon les résultats présentés dans la Figure 51, les variants A et C uniquement sont représentés pour le muscle strié et les variants B et C pour les ganglions viscéraux, dans les deux expériences (Figure 55). Dans le muscle strié, aucune corrélation statistiquement significative n'a été observée entre l'expression des variants de CgNa_v1 (A et C) et l'accumulation de toxine (en μg éq. STX/100 g) dans la glande digestive pour les deux expériences. Cependant, l'expression de CgNa_v1A ($R^2=0,78$, $n=6$, exp1 ; $R^2=0,99$, $n=4$, exp2) tend à augmenter selon l'accumulation de PST pour les huîtres avec une charge en toxines relativement faible ($< 100 \mu\text{g}$ éq. STX/100 g de glande digestive). Dans les ganglions viscéraux, une grande variabilité interindividuelle des niveaux d'expression de CgNa_v1B et C a été observée pour les huîtres avec de faibles charges en toxines. Aucune corrélation n'a été observée entre la charge en toxine totale et l'expression dans ce tissu.

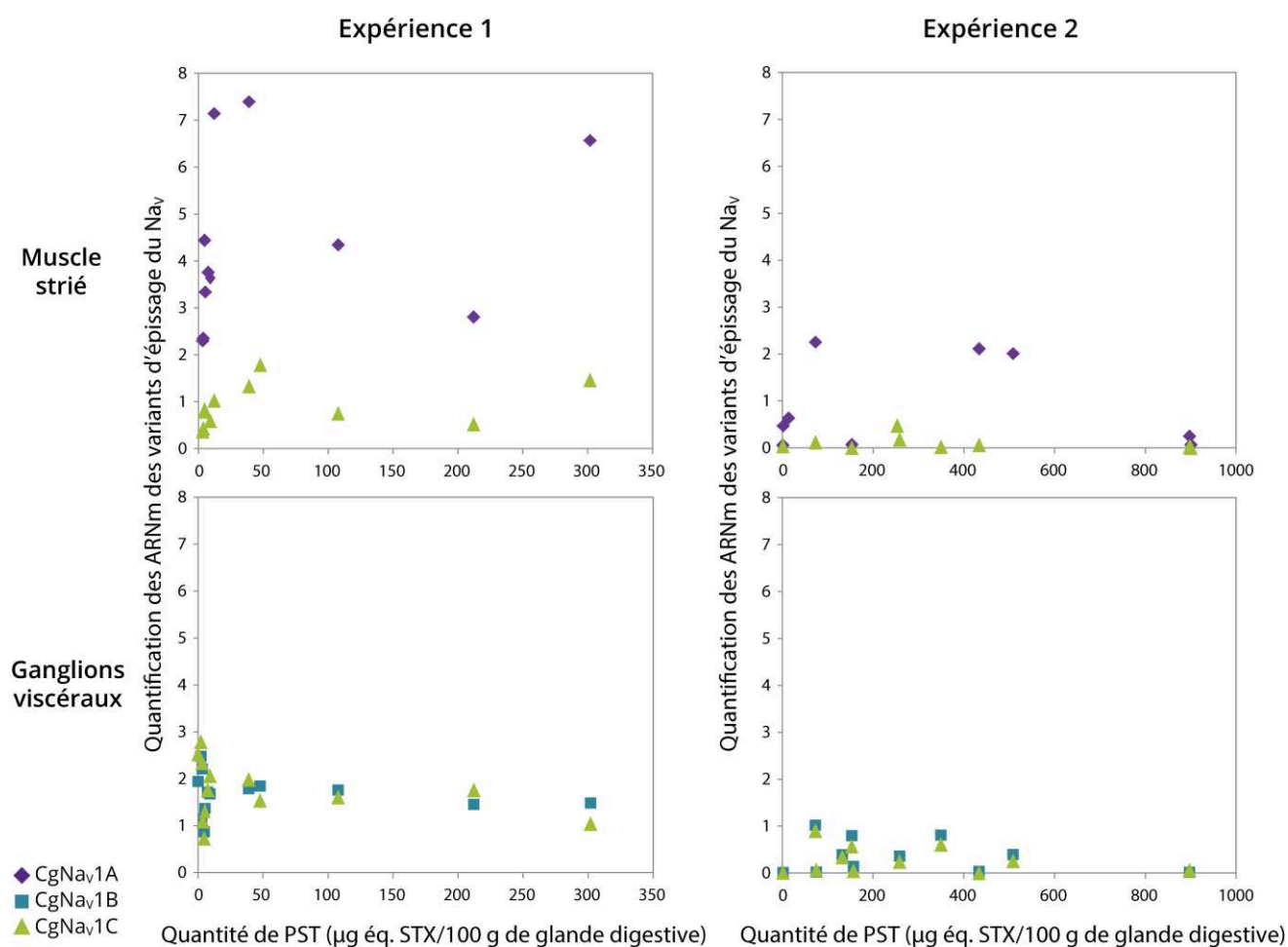


Figure 55 : Relation entre les niveaux d'expression des ARNm des variants de CgNav₁ dans le muscle strié et les ganglions viscéraux et l'accumulation de PST dans la glande digestive de l'huître *C. gigas* expérimentalement exposée à *Alexandrium minutum* (expériences 1 et 2). L'expression des ARNm est mesurée par PCR en temps réel en utilisant la moyenne des deux gènes de référence EF1 α et GAPDH. La quantité de PST est mesurée par HPLC et exprimée en μ g d'équivalent STX/100 g de glande digestive.

3. Discussion

L'exposition des huîtres à *A. minutum* producteurs de PST, en conditions expérimentales, a entraîné une grande variabilité individuelle de l'accumulation de toxines dans la glande digestive des huîtres, jusqu'à 450 fois. Cette variabilité est largement supérieure à celle décrite dans une étude antérieure (Haberkorn *et al.*, 2011). Une variabilité de la composition du profil toxinique a également pu être observée entre les deux expériences. En effet, seules les huîtres exposées à la souche Daoulas 1257 contiennent de la STX et de la Néo-STX qui sont les composés les plus toxiques. Cependant, toutes les huîtres exposées présentent un profil riche en GTX3 et GTX2 qui ont également un fort pouvoir

toxique mais moindre que la STX. En effet, une étude précédente a montré que les profils toxiniques d'huîtres exposées à *A. minutum* AM89BM étaient composés d'environ 40% GTX3, 11% GTX2, 20% C1, 21% C2 et d'une faible quantité de dcGTX3 et dcGTX2 (2% et 3%, respectivement) (Fabioux *et al.*, 2015). Il semblerait donc que lorsque des huîtres sont exposées à la souche d'*A. minutum* AM89BM, la STX n'est pas retrouvée dans la glande digestive de l'huître. Cela peut-être dû à la biotransformation des toxines au sein de l'huître, qui ne serait pas la même entre les deux souches d'*A. minutum*. Il serait intéressant d'effectuer d'autres expérimentations d'exposition à la souche Daoulas 1257, pour confirmer la présence de STX dans la glande digestive des huîtres exposées.

L'expression des 3 variants de CgNa_v1 a été analysée et comparée individuellement à la charge en toxine. La variabilité de l'accumulation de PST n'était pas corrélée aux niveaux d'expression des variants d'épissage de CgNa_v1. Cependant, dans le muscle strié, l'expression de CgNa_v1A et C avait tendance à augmenter selon l'accumulation de PST jusqu'à un seuil de 100 µg éq. STX/100 g de glande digestive. Cela pourrait suggérer que lorsque que les toxines se lient au canal et bloque l'influx nerveux, l'huître doit compenser et exprimer plus de canaux pour maintenir un flux suffisant de sodium au niveau des membranes plasmiques. Des études ont révélé que le traitement des canaux Na_v avec des inhibiteurs (comme les PST) augmentait l'expression des canaux Na_v à la membrane (Shiraishi *et al.*, 2003). Cependant, dans les ganglions viscéraux aucune corrélation n'a été observée entre l'expression de CgNa_v1 (B et C) et la charge en toxine. L'activité de CgNa_v1B pourrait être régulée au niveau post-translationnelle par la voie de signalisation de la PKA, plutôt que par une modification du niveau de transcription, comme le suggère la structure de ce variant. Le variant CgNa_v1C, forme la plus courte et la moins exprimée, semble être régulée comme CgNa_v1A dans le muscle strié mais pas dans les ganglions viscéraux et pourrait avoir une régulation tissu-spécifique. Dans ces expériences, les canaux Na_v d'huîtres semblent avoir une régulation activité-dépendante dans le but d'optimiser cette activité et éviter l'hyperexcitabilité. Lorsque la charge en toxine dans la glande digestive dépassait 100 µg éq. STX/100 g de glande digestive, la synthèse de l'ARNm de CgNa_v1, dans le muscle strié n'a pas augmenté davantage, probablement en raison de troubles physiologiques provoqués par les PST, qui pourrait perturber les processus de régulation des gènes. Dans les huîtres avec la charge la plus élevée en toxines, autour de 900 µg éq. STX/100 g de glande digestive, l'expression de CgNa_v1 était proche de zéro. Cela pourrait correspondre à l'impossibilité

pour les huîtres de maintenir la communication neuromusculaire, conduisant à la paralysie. Cette hypothèse reste à confirmer, en utilisant un effectif beaucoup plus grand permettant d'observer une potentielle corrélation.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX PST DE
L'HUÎTRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*



Chapitre 4

I. Introduction

Les PST sont un large groupe d'alcaloïdes neurotoxiques naturels, composés de saxitoxine (STX) et d'analogues, qui de manière similaire à la tétrodotoxine (TTX) bloquent les canaux sodium voltage-dépendant (Na_v) et inhibent ainsi les potentiels d'action dans de nombreuses cellules excitables ([Catterall, 2000](#)).

L'accumulation de PST dans les coquillages peut dépendre de leur sensibilité à ces toxines. Dans les populations Nord-Américaines de myes, *Mya arenaria*, deux génotypes du Na_v produisent des myes sensibles ou résistantes aux PST. Les sensibles meurent lorsqu'elles sont exposées à des efflorescences d'*Alexandrium* spp., tandis que les résistantes survivent et accumulent des quantités élevées de PST ([Bricelj et al., 2004](#)). En revanche, lorsque des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, ont été exposées à une souche toxique d'*A. minutum*, tous les individus ont survécu malgré une très grande variabilité interindividuelle (jusqu'à 80 fois entre les individus accumulant le plus et le moins) dans la bioaccumulation de PST ([Haberkorn et al., 2011](#)).

Plusieurs études ont été menées dans le but d'analyser les effets des PST et de la TTX sur les canaux Na_v de bivalves, localisés notamment dans les nerfs. En particulier, lorsque l'on classe les espèces de bivalves selon leur sensibilité nerveuse à la STX et la TTX, il a été démontré que d'une manière générale les bivalves résistants aux toxines accumulaient des quantités élevées de PST ([Twarog, 1974](#)). De même, certaines espèces de bivalves présentant une faible bioaccumulation de PST ont été identifiées comme très sensibles à ces toxines ([Bricelj et Shumway, 1998](#)). Cependant, la sensibilité aux PST des huîtres creuses *C. gigas* n'a pas encore été évaluée.

Dans le but d'analyser la sensibilité aux PST des huîtres creuses *C. gigas*, la sensibilité à la STX et la TTX des nerfs cérébroviscéraux a été évaluée par une approche électrophysiologique. Le présent chapitre est divisé en 2 parties, décrivant dans un premier temps la mise au point de la technique d'enregistrement électrophysiologique. Puis, la sensibilité des nerfs cérébroviscéraux d'huîtres sauvages face à la STX et la TTX a été déterminée par une mesure directe. La deuxième partie de ce chapitre a eu pour but de

déterminer la sensibilité à la STX d'huîtres exposées expérimentalement ou non à *A. minutum*. La relation entre la sensibilité des nerfs aux PST et l'accumulation de toxines par les huîtres a également été analysée.

II. Partie 1 : Sensibilité des nerfs d'huîtres à la STX et la TTX

1. Stimulation et maintien des nerfs d'huîtres pour obtenir un potentiel d'action nerveux composé (CNAP)

Dans des conditions expérimentales *ex vivo*, un nerf cérébroviscéral d'huître a produit des potentiels d'action nerveux composés (CNAP) monophasiques en réponse à des stimuli électriques uniques (Figure 56A). L'observation d'une forme unique pour ce CNAP monophasique suggère fortement que ce type de nerf est composé d'axones ayant une distribution relativement homogène en taille de diamètre. L'amplitude du pic du CNAP dépend de l'intensité du stimulus. Par conséquent, en réponse à des stimuli de durée fixe (1 ms) et à des intensités croissantes (0-300 μ A), l'amplitude du pic du CNAP a augmenté, a atteint une valeur plateau et est restée constante malgré des augmentations d'intensité supplémentaires (Figure 56B). L'intensité de stimulation d'1 ms produisant un CNAP ayant 50 % d'amplitude maximale du pic (I_{50}) était de $33 \pm 3 \mu$ A ($n=22$). Il est intéressant de noter que l'amplitude du pic du CNAP se comportait de manière similaire en réponse à des stimuli de durée réduite (0,1 ms) avec, cependant, une valeur I_{50} augmentée, c'est-à-dire $99 \pm 8 \mu$ A ($n=34$). Le fait que l'amplitude du pic du CNAP atteigne un plateau indique que tous les axones susceptibles d'être électriquement stimulés, dans les conditions expérimentales présentes, ont été recrutés par des stimuli de 0,1-1 ms et 200-300 μ A. Dans ces conditions, l'amplitude maximale du pic du CNAP était de $0,42 \pm 0,09$ mV et se propageait à une vitesse de $2,6 \pm 0,7$ m/s pour 34 nerfs fraîchement disséqués provenant d'huîtres sauvages (prélevées en Octobre 2015) et maintenus dans une solution physiologique standard pendant 15-30 min. Malgré le fait que les nerfs n'aient pas été baignés, ni perfusés au cours des enregistrements, leur CNAP n'a pas été modifié lorsqu'ils étaient maintenus dans une solution physiologique standard, à température ambiante, avec moins de 2 h entre les sessions d'enregistrement d'environ 5 min ($n=34$). Cependant, la survie des nerfs a été favorisée en les conservant dans une solution physiologique standard à 4°C. Dans ces conditions, 50 % des nerfs ($n=17$) ont survécu pendant environ 24 h après leur dissection, c'est-à-dire qu'ils pouvaient produire un CNAP en réponse à une stimulation électrique, mais

seulement 9 % (n=3) ont survécu pendant 48 h et aucun n'était fonctionnel au bout de 72 h (Figure 56C).

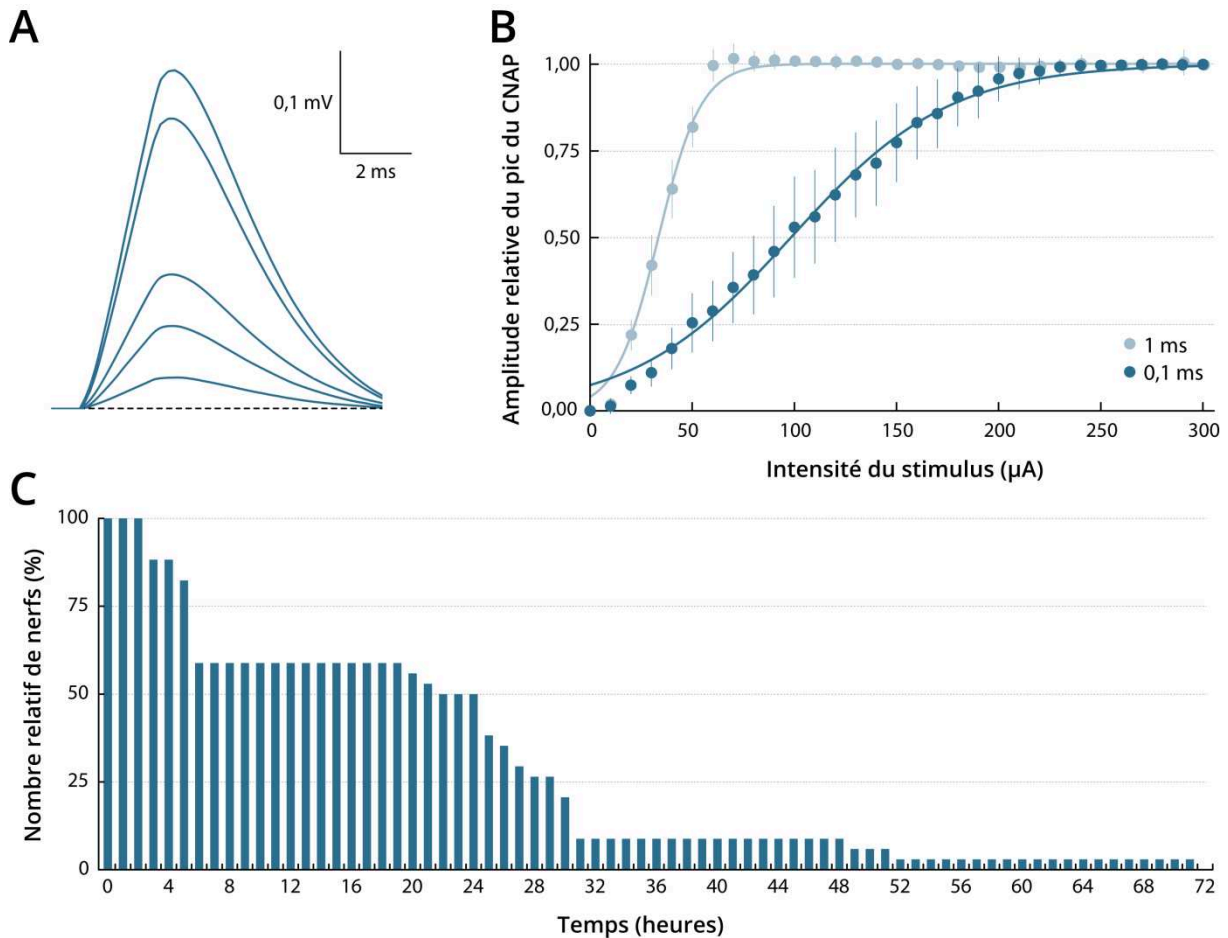


Figure 56 : Stimulation et maintien des nerfs d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* pour obtenir des CNAP. **A**, Traces superposées de CNAP enregistrées à partir du nerf cérébroviscéral stimulé avec des intensités d'impulsion de 20, 50, 80, 170 et 300 μA et une durée de 1 ms. **B**, Amplitude du pic du CNAP (moyenne \pm erreur standard, n=22-34) en fonction de l'intensité du stimulus de 0,1 ms et 1 ms. L'amplitude du pic est exprimée relativement par rapport à son amplitude maximale. **C**, Nombre de nerfs capables de produire un CNAP en réponse à une stimulation électrique, exprimé en pourcentage du nombre total de nerfs fonctionnels au temps zéro (n=34), en fonction du temps après leur dissection.

2. Sensibilité à la STX des nerfs d'huîtres

La sensibilité à la STX des nerfs isolés a été étudiée à partir d'huîtres sauvages en Avril 2014 et Octobre 2015 et d'huîtres issues de parcs ostréicoles en Mai 2016. Pour cela, les nerfs disséqués sont maintenus dans une solution physiologique standard pendant 15-30 min avant une première session d'enregistrement, puis dans une solution de STX pendant

20-30 min avant une deuxième session d'enregistrement. Auparavant, des nerfs ont été prétraités pendant 20 à 30 min avec une solution physiologique standard contenant seulement 0,38 mM d'acide chlorhydrique pour estimer l'impact du solvant de la solution de STX. L'amplitude maximale du pic du CNAP prétraité était de 97 ± 13 % (n=11), exprimée relativement à celle des nerfs avant le prétraitement. Ceci indique que le solvant de STX n'a, à lui seul, aucun effet décelable sur l'amplitude du CNAP. L'effet de blocage de la STX a été quantifié en établissant des relations dose-réponse, c'est-à-dire l'amplitude maximale du pic du CNAP en fonction de la concentration de toxines, et en déterminant la concentration efficace requise pour bloquer 50 % de l'amplitude maximale du pic (IC_{50}). Comme le montre la Figure 57, les courbes dose-réponse de l'effet de la STX sur l'amplitude maximale du pic du CNAP ont révélé un IC_{50} de 0,28 et 1,29 μ M pour les nerfs d'huîtres prélevées respectivement en Avril 2014 et en Octobre 2015. Pour les nerfs d'huîtres issues de l'ostréiculture et analysés en Mai 2016, l' IC_{50} était de 5,44 μ M.

Il apparaît donc que le CNAP des huîtres prélevées en Avril 2014 était plus sensible à la STX que celui des huîtres prélevées en Octobre 2015 par un facteur 5 et celui des huîtres de Mai 2016 par un facteur 20.

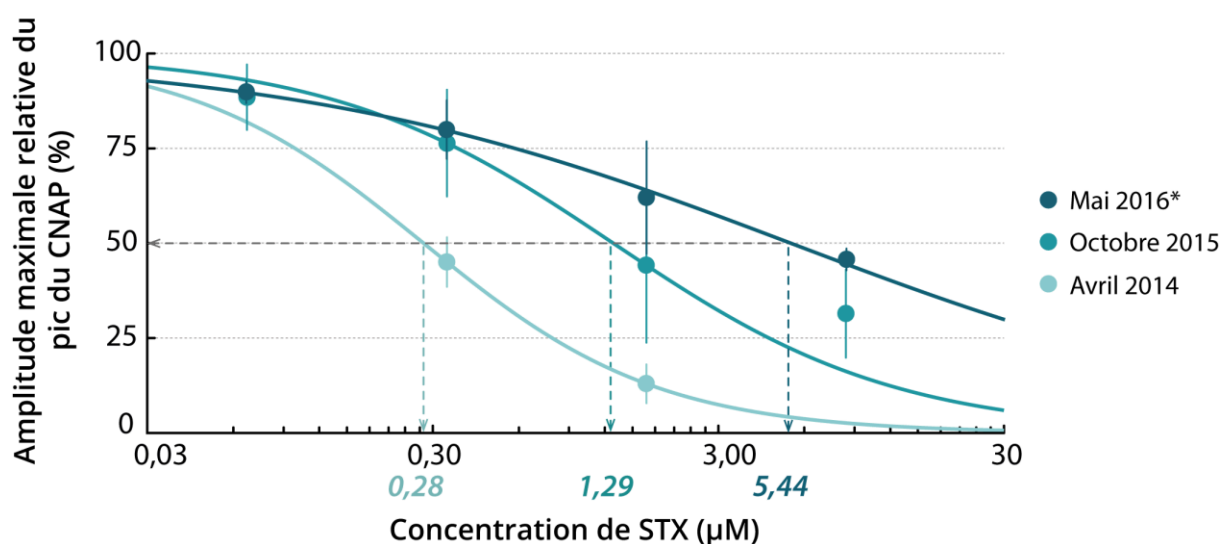


Figure 57 : Sensibilité à la STX des nerfs isolés à partir d'huîtres *Crassostrea gigas* sauvages et (*) issues de l'ostréiculture. Courbes dose-réponse des effets de la STX sur l'amplitude maximale du pic du CNAP enregistrée à partir d'huîtres prélevées en Avril 2014, en Octobre 2015 et en Mai 2016. Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard et est exprimée en pourcentage de sa valeur obtenue en l'absence de toxine. Les valeurs en italiques correspondent aux valeurs d' IC_{50} .

L'effet de blocage induit par la STX sur l'amplitude du CNAP est réversible en maintenant les nerfs en solution physiologique standard (SPS) pendant au moins 2 h. Pour les huîtres d'Octobre 2015, après incubation des nerfs dans la SPS, l'amplitude maximale du pic du CNAP était de $82 \pm 12 \%$ (n=7), par rapport à celle mesurée avant le prétraitement des nerfs avec la STX $8,39 \mu\text{M}$.

3. Sensibilité des nerfs à la TTX

La sensibilité à la TTX des nerfs isolés à partir d'huîtres sauvages et issues de l'ostréiculture a été étudiée en raison de la similarité du mode d'action de la STX et la TTX sur les canaux Na_v . Les résultats montrent qu'aucun des nerfs isolés à partir des huîtres sauvages en Octobre 2015 n'a été détecté comme étant sensible à la TTX. En particulier, l'amplitude maximale du pic du CNAP mesurée après prétraitement des nerfs avec de la TTX $7,85 \mu\text{M}$ était de $96 \pm 11 \%$ (n=7), relativement à la valeur déterminée avant le prétraitement. Des résultats similaires ont été obtenus avec des nerfs isolés à partir d'huîtres exposées à *A. minutum* (huîtres exposées) ou *T. lutea* (huîtres témoins), l'amplitude maximale relative du pic du CNAP, après prétraitement avec la TTX $7,85 \mu\text{M}$, était respectivement de $91 \pm 14 \%$ (n=12) et de $96 \pm 15 \%$ (n=11), de celles mesurées avant prétraitement.

4. Discussion

Les résultats révèlent que l'amplitude maximale du pic du CNAP du nerf cérébroviscéral de l'huître *C. gigas* est d'environ $0,42 \text{ mV}$ et se propage à une vitesse de $2,6 \text{ m/s}$ dans les conditions contrôles de cette étude. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles précédemment décrites pour les nerfs cérébroviscéraux provenant d'autres bivalves comme *Anodonta cataracta* et *Elliptio complanata* (deux espèces de moules d'eau douce), la moule *Mytilus edulis* et la palourde *Saxidomus giganteus* (Twarog et al., 1972 ; Kvittek et Beitler, 1991). Le nerf cérébroviscéral des huîtres a été prélevé avec une relative facilité et possède une bonne capacité de survie (jusqu'à 72 h). Le nerf d'huître *C.*

gigas est donc un modèle approprié pour étudier les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des axones non-myélinisés.

De plus, il a été montré que la STX agit sur les nerfs d'huîtres en diminuant l'amplitude du pic des potentiels d'action individuels des fibres, sans modification de leurs paramètres d'excitabilité. Un blocage partiel du CNAP a été observé à une concentration de STX de $2,5 \times 10^{-6}$ g/mL (correspondant à 8,39 μ M). La sensibilité des nerfs de *C. gigas* semble similaire à celle des deux autres bivalves *Tresus capax* et *Protothaca staminea*, qui montrent un blocage partiel du CNAP à 10^{-6} g/mL de STX (Kvitek et Beitler, 1991). En revanche, chez d'autres bivalves, comme *S. giganteus* et *S. nuttalli*, une concentration de 10^{-3} g/mL de STX est nécessaire pour bloquer complètement le CNAP, suggérant une plus grande résistance à la STX que chez *C. gigas* (Twarog et al., 1972). Chez une autre huître *C. virginica*, un blocage complet du CNAP a été observé avec seulement 10^{-7} g/mL de STX, ce qui signifie que les nerfs de *C. gigas* sont plus résistants que ceux de *C. virginica*. Plusieurs autres études ont démontré que la résistance des fibres nerveuses à la STX et/ou la TTX variait en fonction des espèces étudiées. En effet, une résistance des nerfs à la STX et la TTX a été décrite chez des poissons globes, des crabes, des tritons et des mollusques (Kao et Fuhrman, 1967 ; Twarog et al., 1972 ; Twarog, 1974 ; Daigo et al., 1988). Par conséquent, les nerfs des huîtres *C. gigas* sont décrits, pour la première fois, comme possédant une sensibilité intermédiaire à la STX, comparée à d'autres bivalves. Cependant, l'absence d'effet de la TTX sur les nerfs d'huîtres *C. gigas* montre que ces nerfs sont résistants à la TTX.

Par ailleurs, il a été observé que les nerfs des huîtres prélevées en Avril 2014 étaient environ 5 fois plus sensibles à la STX que celles d'Octobre 2015 et 20 fois plus sensibles que celles de Mai 2016. Ce résultat est intéressant sachant que les efflorescences toxiques, en partie dues à *A. minutum*, se produisent sur la période estivale dans la rade de Brest. Toutefois, les efflorescences des étés 2014, 2015 et 2016 n'ont pas affecté le site d'échantillonnage des huîtres. Dans ces conditions, il est probable que les différences observées dans la sensibilité à la STX entre les trois lots d'huîtres dépendent de leurs conditions physiologiques. Par exemple, elles pourraient présenter un stade différent de gamétogenèse, étant donné que la gamétogenèse survient pendant l'été. De plus, les huîtres élevées en poche (Mai 2016) pourraient présenter des paramètres physiologiques différents de ceux des huîtres sauvages (Avril 2014 et Octobre 2015), en raison de leurs modes de vie différents.

III. Partie 2 : Sensibilité à la STX des nerfs d'huîtres exposées expérimentalement à *Alexandrium minutum*

1. Effets de l'exposition aux PST sur le CNAP des nerfs d'huîtres

Pour savoir si des expositions répétées à des efflorescences de micro-algues toxiques peuvent modifier la réponse des huîtres aux PST, des huîtres issues de l'ostréiculture ont été nourries avec une souche toxique d'*A. minutum* (huîtres exposées) ou une micro-algue non-toxique (huîtres témoins), avant d'étudier les effets de la STX sur leur CNAP. Le maintien des nerfs disséqués, dans une solution physiologique standard jusqu'aux enregistrements, a d'abord été vérifié dans le but de ne pas modifier l'impact éventuel de l'exposition des huîtres sur le comportement des CNAP. Pour cela, les nerfs fraîchement isolés des huîtres ont été soumis directement à une première session d'enregistrement, puis conservés dans une solution physiologique standard (SPS) pendant moins de 1 min, avant de subir une deuxième session d'enregistrement (Figure 58).

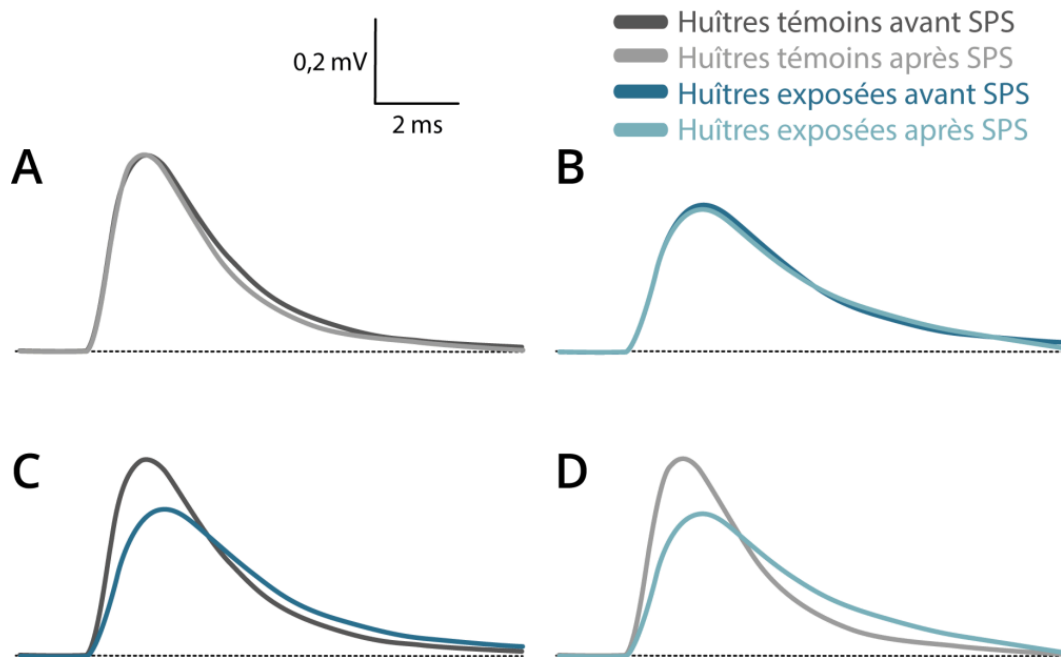


Figure 58 : Comparaison des CNAP enregistrés à partir des nerfs d'huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées) ou *T. lutea* (huîtres témoins). Traces superposées de CNAP enregistrées en réponse à des stimuli d'une durée de 1 ms et à une intensité de 300 μA. A et B, Comparaison des CNAP entre les deux sessions d'enregistrements. C et D, Comparaison des CNAP entre huîtres exposées et témoins.

Dans ces conditions, aucune différence n'a été détectée dans la cinétique des CNAP entre les deux sessions d'enregistrements, quelle que soit l'alimentation, toxique ou non

toxique, des huîtres (Figure 58A et 58B). En effet, aucun des 6 paramètres mesurés pour caractériser la cinétique des CNAP n'était statistiquement différent (Tableau 12). En revanche, la comparaison entre les nerfs des huîtres exposées et témoins a révélé des différences significatives dans la cinétique et les paramètres du CNAP, à la suite des deux sessions d'enregistrements (Figure 58C et 58D et Tableau 12). En particulier, le CNAP des nerfs d'huîtres exposées à *A. minutum* avait une amplitude maximale du pic plus faible, une demi-largeur et un temps de pic plus élevés, ainsi qu'une diminution des pentes ascendante et descendante, bien que l'aire du CNAP soit restée similaire entre les deux conditions.

Tableau 12 : Paramètres du CNAP déterminés à partir de nerfs d'huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées, n=25) ou *T. lutea* (huîtres témoins, n=21) et non soumis à la STX. SPS: solution physiologique standard. *p-value* : * < 0,05 ; ** < 0,01, comparé avec les huîtres témoins.

	Amplitude maximale du pic (mV)		Demi-largeur (ms)		Aire (mV.ms)		Temps de pic (ms)		Pente maximale ascendante (mV/ms)		Pente maximale descendante (mV/ms)	
	Avant SPS	Après SPS	Avant SPS	Après SPS	Avant SPS	Après SPS	Avant SPS	Après SPS	Avant SPS	Après SPS	Avant SPS	Après SPS
Huîtres témoins	0,374 ± 0,097	0,358 ± 0,081	5,124 ± 0,794	5,025 ± 0,607	2,088 ± 0,336	1,995 ± 0,316	56,079 ± 0,396	55,995 ± 0,249	0,250 ± 0,090	0,252 ± 0,076	0,116 ± 0,047	0,105 ± 0,038
Huîtres exposées	0,269** ± 0,102	0,303* ± 0,095	6,201** ± 1,156	5,780** ± 1,026	1,822 ± 0,530	1,930 ± 0,405	56,364* ± 0,346	56,265** ± 0,308	0,179** ± 0,076	0,193* ± 0,084	0,075** ± 0,036	0,087 ± 0,047

2. Sensibilité à la STX des nerfs d'huîtres exposées ou non à *A. minutum*

La sensibilité à la STX des nerfs provenant d'huîtres exposées et témoins a ensuite été étudiée. Après prétraitement des nerfs avec des concentrations de STX allant de 0,07 μM à 8,39 μM , les huîtres ont présenté des réponses différentes au sein des deux conditions expérimentales. Elles ont été séparées en deux groupes selon la sensibilité de leurs nerfs à la STX. D'une part, les huîtres possédant des nerfs résistants à la STX (STX-R), c'est-à-dire dont l'amplitude maximale du pic du CNAP reste supérieure à 80 % après un prétraitement avec la concentration la plus forte de STX. D'autre part, les huîtres possédant des nerfs sensibles à la STX (STX-S), dont l'amplitude maximale du pic est inférieure à 80 % après le même prétraitement.

Pour les huîtres exposées à *A. minutum* producteurs de toxines paralysantes, 67 % des 18 nerfs isolés étaient résistants à la STX, tandis que 33 % étaient sensibles. En

particulier, l'amplitude maximale relative du pic du CNAP mesurée après prétraitement des nerfs avec la STX 8,39 μM était en moyenne de $96 \pm 10 \%$ pour les nerfs STX-R (Figure 59A) et $62 \pm 9 \%$ pour les nerfs STX-S (Figure 60A). Pour les huîtres témoins, non-exposées à *A. minutum*, 56 % des 18 nerfs isolés étaient résistants à la STX, alors que 44 % étaient sensibles. L'amplitude maximale relative du pic du CNAP, après prétraitement des nerfs avec la STX 8,39 μM , était de $98 \pm 15 \%$, pour les nerfs STX-R (Figure 59A) et de $46 \pm 3 \%$ pour les nerfs STX-S (Figure 60A).

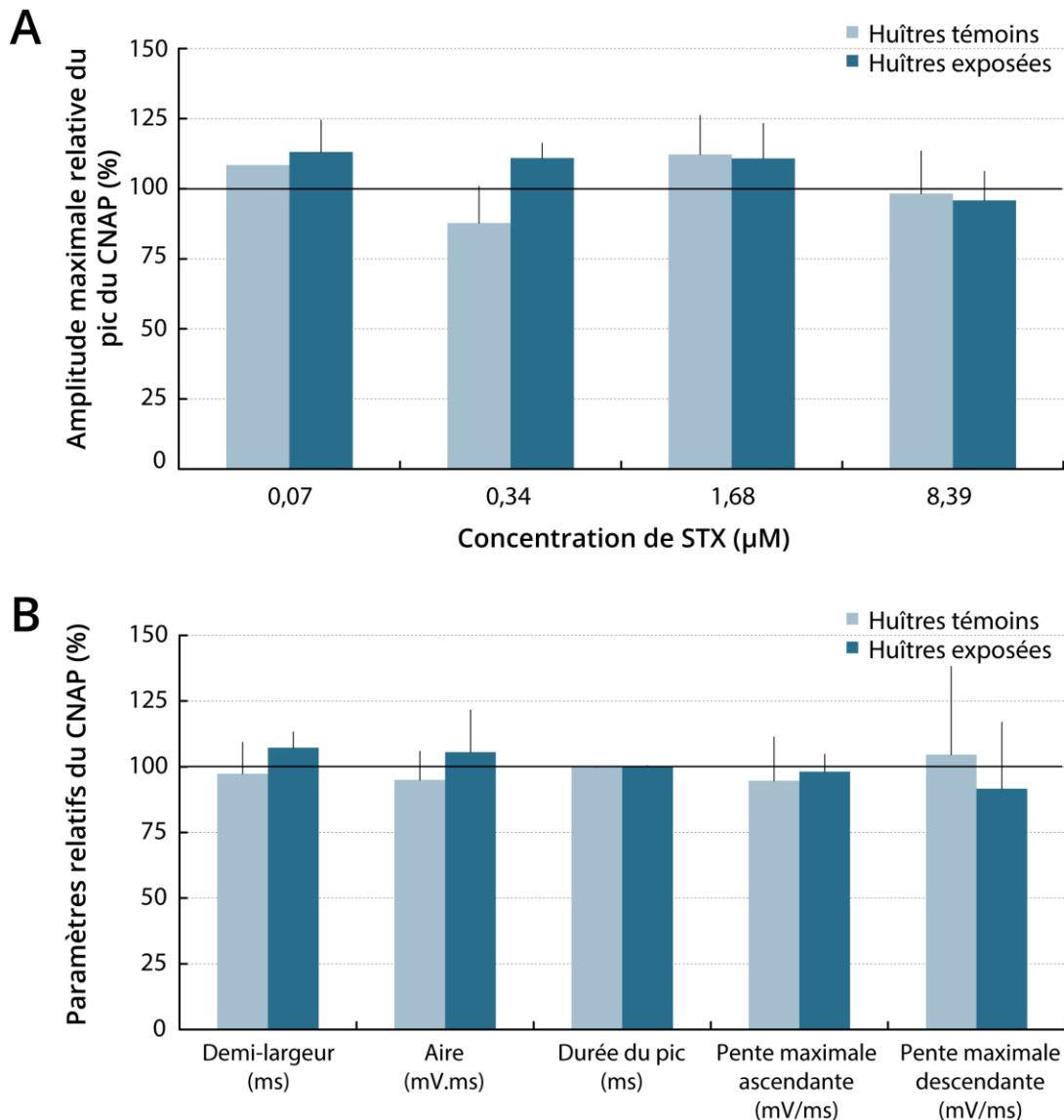


Figure 59 : Effets de la STX sur les nerfs résistants (STX-R) d'huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées) ou *T. lutea* (huîtres témoins). **A**, Histogramme des effets de la STX (0,07-8,39 μM) sur l'amplitude maximale du pic du CNAP enregistrée à partir des huîtres exposées et témoins. **B**, Histogramme des paramètres caractérisant la cinétique du CNAP des nerfs isolés à partir des huîtres exposées et témoins et prétraités avec 8,39 μM de STX.

L'amplitude maximale du pic du CNAP des nerfs STX-R n'a pas été affectée par les différentes concentrations de STX (0,07 à 8,39 μM), pour les huîtres exposées et témoins (Figure 59A). En revanche, pour les nerfs STX-S des huîtres exposées et témoins, les valeurs d'IC₅₀ déterminées à partir des relations dose-réponse, (amplitude maximale du pic du CNAP en fonction de la concentration de STX), étaient de 8,02 μM et 5,44 μM , respectivement (Figure 60A).

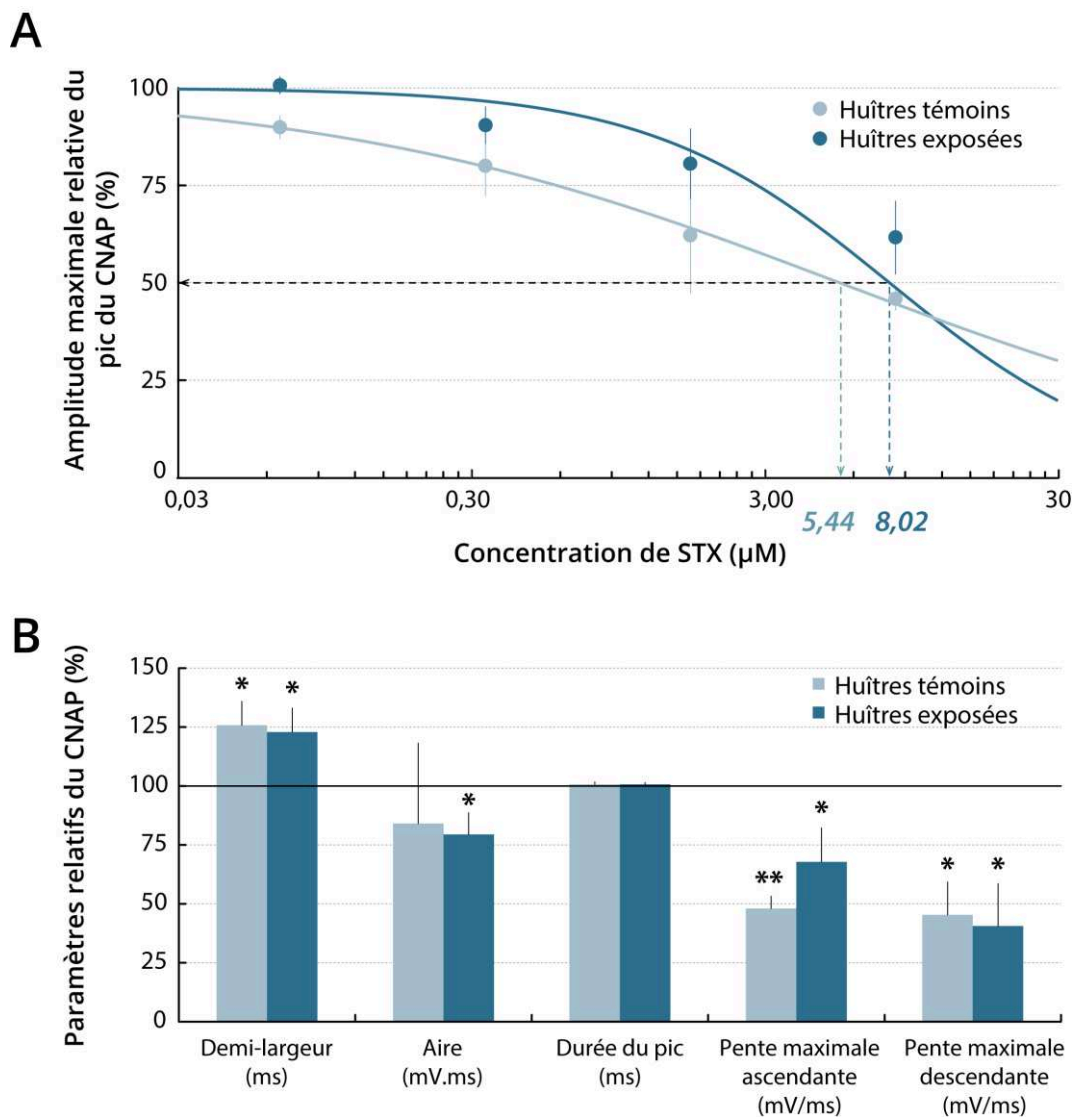


Figure 60 : Effets de la STX sur les nerfs sensibles (STX-S) d'huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées) ou *T. lutea* (huîtres témoins). **A**, Courbes dose-réponse des effets de la STX sur l'amplitude maximale du pic du CNAP enregistrée à partir des huîtres exposées et témoins. Les valeurs en italiques correspondent aux valeurs d'IC₅₀. **B**, Histogramme des paramètres caractérisant la cinétique du CNAP des nerfs isolés à partir des huîtres exposées et témoins et prétraités avec 8,39 μM de STX. *p*-value : * < 0,05 ; ** < 0,01, comparativement aux valeurs déterminées avant le prétraitement des nerfs à la STX.

Il apparaît donc que le CNAP des nerfs STX-S provenant des huîtres exposées était environ 1,5 fois plus résistant à la STX que celui des huîtres témoins. La réversibilité du blocage induit par la STX sur l'amplitude du CNAP des nerfs STX-S est possible en maintenant les nerfs dans une solution physiologique standard pendant au moins 2 h. Dans ces conditions, les amplitudes maximales du pic du CNAP étaient de $93 \pm 8 \%$ (n=6) et $92 \pm 21 \%$ (n=7) pour les nerfs STX-S des huîtres exposées et témoins, respectivement.

Les cinétiques du CNAP enregistrées à partir de nerfs des huîtres exposées et témoins ont été analysées en mesurant les paramètres du CNAP avant et après prétraitement des nerfs avec la STX $8,39 \mu\text{M}$. Pour les huîtres témoins, la comparaison des paramètres des nerfs STX-R avant prétraitement à la STX, a révélé que le CNAP avait une amplitude maximale de pic plus faible, une demi-largeur augmentée, ainsi qu'une diminution des pentes ascendante et descendante, mais un temps de pic et une aire similaires, en comparaison avec les nerfs STX-S. En revanche, pour les huîtres exposées, aucune différence significative n'a été détectée dans la cinétique du CNAP entre les nerfs STX-R et STX-S avant le prétraitement à la STX (Tableau 13).

Tableau 13 : Paramètres du CNAP déterminés à partir de nerfs sensibles (STX-S) et résistants (STX-R) à la STX isolés des huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées, n=18) ou *T. lutea* (huîtres témoins, n=18), avant le prétraitement des nerfs à la STX. *p-value* : * < 0,05, nerfs STX-R versus STX-S des huîtres témoins.

	Amplitude maximale du pic (mV)		Demi-largeur (ms)		Aire (mV.ms)		Temps de pic (ms)		Pente maximale ascendante (mV/ms)		Pente maximale descendante (mV/ms)	
	nerfs STX-S	nerfs STX-R	nerfs STX-S	nerfs STX-R	nerfs STX-S	nerfs STX-R	nerfs STX-S	nerfs STX-R	nerfs STX-S	nerfs STX-R	nerfs STX-S	nerfs STX-R
Huîtres témoins	0,393 ± 0,051	0,317* ± 0,069	4,705 ± 0,387	5,294* ± 0,652	1,935 ± 0,292	1,923 ± 0,339	55,992 ± 0,301	56,004 ± 0,250	0,274 ± 0,068	0,176* ± 0,073	0,126 ± 0,030	0,086* ± 0,033
Huîtres exposées	0,387 ± 0,074	0,339 ± 0,083	5,154 ± 0,374	5,445 ± 0,915	1,891 ± 0,248	2,035 ± 0,377	56,389 ± 0,354	56,139 ± 0,308	0,215 ± 0,298	0,196 ± 0,038	0,133 ± 0,035	0,100 ± 0,050

Après le prétraitement des nerfs à la STX $8,39 \mu\text{M}$, les nerfs STX-R des huîtres exposées et témoins ne présentaient pas de différence significative des paramètres du CNAP, en comparaison avec les valeurs déterminées avant le prétraitement (Figure 59B). En revanche, les CNAP des nerfs STX-S (huîtres exposées et témoins), prétraités avec de la STX

8,39 μM , avaient une demi-largeur augmentée, ainsi qu'une diminution des pentes maximales ascendante et descendante, mais un temps de pic similaire, ainsi qu'une aire similaire pour les huîtres témoins, en comparaison avec les valeurs déterminées avant le prétraitement des nerfs (Figure 60B).

Le niveau d'excitabilité membranaire des nerfs STX-S et STX-R des huîtres exposées et témoins a également été analysé en établissant leurs relations réponse-intensité et en déterminant les paramètres correspondants avant et après le prétraitement des nerfs avec la STX 8,39 μM (Figure 61 et Tableau 14). La comparaison des relations réponse-intensité des nerfs non traités d'huîtres exposées ou témoins n'a révélé aucune différence significative, ainsi que dans les valeurs I_{50} et S entre les nerfs STX-S et STX-R. Des résultats similaires ont été obtenus après prétraitement des nerfs avec de la STX 8,39 μM . De plus, les relations intensité-réponse, après le traitement préalable à la STX des nerfs STX-S ou STX-R, étaient également similaires et leurs paramètres correspondant n'étaient pas statistiquement différents, comparés à ceux des nerfs non traités, quelle que soit l'alimentation des huîtres.

Tableau 14 : Paramètres des relations réponse-intensité établies à partir de nerfs « sensibles » (STX-S) et « résistants » (STX-R) à la STX isolés à partir d'huîtres issues de l'ostréiculture nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées, n=12) ou *T. lutea* (huîtres témoins, n=10), avant (non traité) et après prétraitement des nerfs avec de la STX 8,39 μM . I_{50} : intensité de stimulation produisant un CNAP avec 50 % d'amplitude maximale du pic, S : pente de la courbe.

	I_{50} (μA)				S (μA^{-1})			
	Non-traité STX-S	Pré-traité STX-S	Non-traité STX-R	Pré-traité STX-R	Non-traité STX-S	Pré-traité STX-S	Non-traité STX-R	Pré-traité STX-R
Huîtres témoins	33.16 ± 0.95	33.47 ± 1.06	34.18 ± 0.51	34.59 ± 0.62	10.10 ± 0.59	9.09 ± 0.24	10.77 ± 0.33	10.81 ± 0.28
Huîtres exposées	33.97 ± 0.74	34.10 ± 0.82	32.12 ± 3.81	34.06 ± 0.97	10.82 ± 0.23	10.58 ± 0.18	10.04 ± 2.10	10.70 ± 0.27

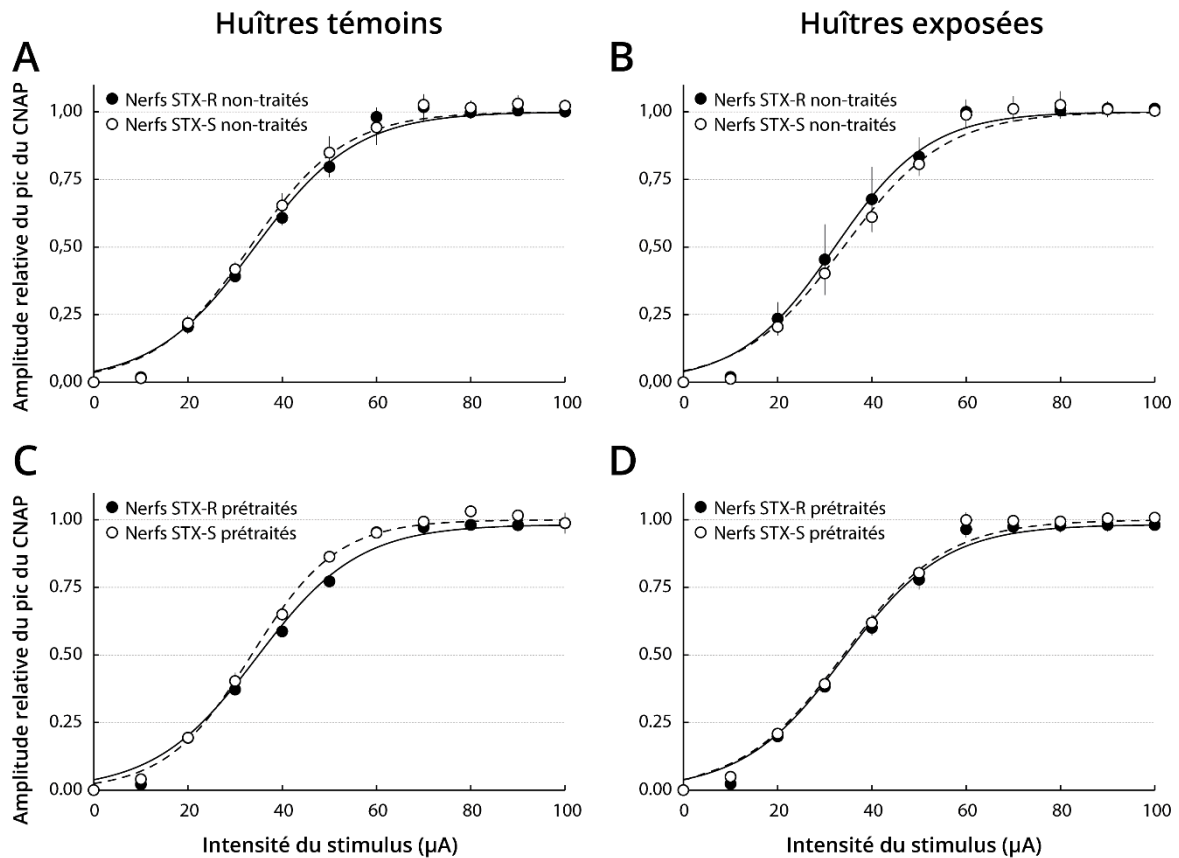


Figure 61 : Relations réponse-intensité des nerfs sensibles (STX-S) et résistants (STX-R) d'huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées, B et D) ou *T. lutea* (huîtres témoins, A et C) avant (non-traitées, A et B) et après (prétraitées, C et D) leur prétraitement avec la STX 8,39 μM . Les amplitudes de pic du CNAP ont été exprimées par rapport à leur amplitude maximale respective, en fonction de l'intensité du stimulus de 1 ms. Les courbes correspondent aux ajustements de données selon l'équation de Boltzmann avec les valeurs I_{50} et S indiquées dans le Tableau 14.

3. Relation entre la sensibilité à la STX des nerfs et l'accumulation de PST dans la glande digestive

La charge en PST dans la glande digestive a été déterminée pour chacune des huîtres exposées aux micro-algues toxiques et non toxiques. La quantité de PST bioaccumulée était de $75 \pm 32 \mu\text{g STX}/100 \text{ g}$ de glande digestive (GD) pour les huîtres exposées ($n=18$), tandis que pour les huîtres témoins ($n=10$), la charge en PST était nulle. La charge en PST dans la glande digestive des huîtres exposées a été analysée en fonction de la sensibilité des nerfs à la STX. En dépit d'une variabilité individuelle élevée des niveaux de PST bioaccumulés (Figure 62), aucune différence significative de la charge en PST n'a été observée entre les huîtres possédant des nerfs STX-S, $76 \pm 29 \mu\text{g STX}/100 \text{ g GD}$ ($n=6$) et celles possédant des nerfs STX-R, $74 \pm 34 \mu\text{g STX}/100 \text{ g GD}$ ($n=12$). De plus, aucune corrélation significative n'a été observée

entre la charge en PST et les paramètres du CNAP, que les huîtres possèdent des nerfs STX-S ou STX-R.

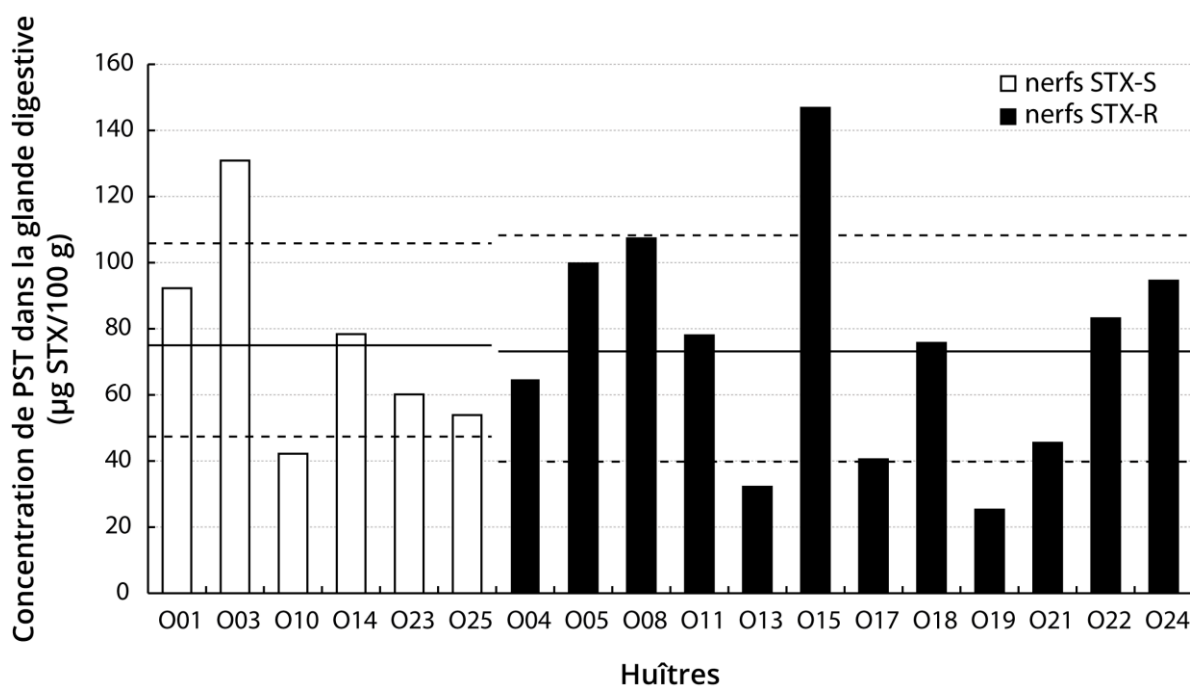


Figure 62 : Quantité de PST bioaccumulée dans les huîtres nourries avec *A. minutum* (huîtres exposées). Concentration de PST ($\mu\text{g STX}/100\text{ g}$ de glande digestive) mesurée dans la glande digestive des huîtres exposées possédant des nerfs sensibles à la STX (STX-S) et des nerfs résistants à la STX (STX-R). Les lignes pleines et pointillées indiquent les valeurs moyennes et l'écart-type respectivement.

4. Discussion

L'étude de la sensibilité à la STX des huîtres exposées ou non à *A. minutum* a révélé que la STX avait un effet sur une partie des nerfs seulement. Cela suggère l'existence de deux groupes de nerfs qualifiés de « sensibles » et « résistants ». Ces deux groupes de nerfs reflètent l'existence éventuelle de deux types différents de courants. En effet, chez les sangsues et les méduses, des études électrophysiologiques ont montré deux types de courants sodium présentant une cinétique et une sensibilité à la STX différentes (Anderson, 1987 ; Johansen et Kleinhaus, 1987).

Le caractère « résistant » des nerfs à la STX est associé à un CNAP ayant une amplitude maximale du pic relativement faible, une demi-largeur élevée et des pentes maximales ascendante et descendante faibles, le niveau d'excitabilité membranaire des

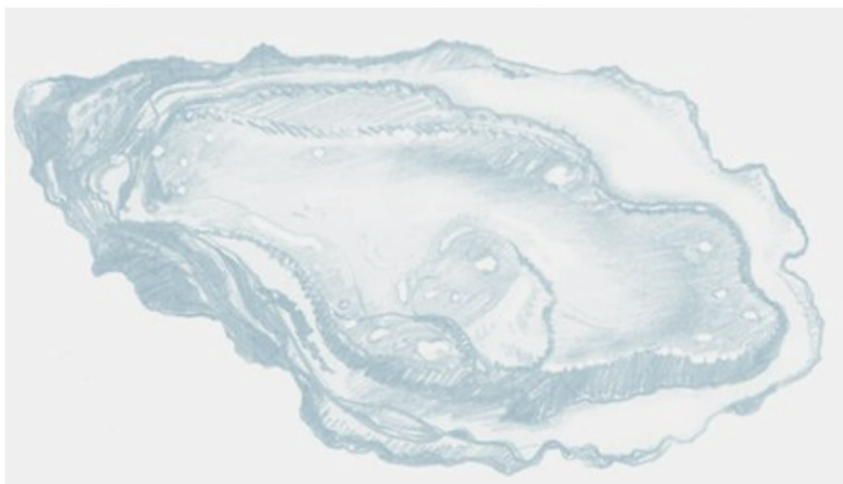
nerfs n'étant pas un critère distingué. D'après le pourcentage de nerfs sensibles à la STX et leurs valeurs d'IC₅₀, les résultats suggèrent fortement que les huîtres exposées aux microalgues toxiques, *A. minutum*, sont plus résistantes à la STX que les huîtres témoins. Une étude précédente a analysé la sensibilité des nerfs de la mye, *Mya arenaria*, entre une population régulièrement exposée aux PST et une population non-exposée (Bricelj *et al.*, 2005). L'exposition des nerfs de la mye à la STX a montré des différences inter- et intra-population. La population non-exposée avait 69 % des individus qui montrait un blocage complet avec environ 10⁻⁵ g/mL, alors que la population exposée aux PST avait 91 % des individus résistants jusqu'à 10⁻⁴ g/mL. Cette étude suggère l'existence d'une pression de sélection des individus résistants à la STX dans la population régulièrement exposée aux PST, contrairement aux individus jamais exposés qui restent sensibles. Par ailleurs, Kvitek et Beitler (1991) ont révélé qu'aucune différence de sensibilité à la STX n'a été observée entre des palourdes *S. giganteus* provenant de 3 sites avec des histoires différentes d'exposition aux PST. Les auteurs suggèrent que la résistance des palourdes à la STX serait innée et non acquise avec les expositions. Pour les huîtres *C. gigas*, plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette diminution de sensibilité à la STX des huîtres exposées par rapport aux huîtres témoins: i) l'existence de nerfs avec des sensibilités différentes, reflétant la présence de différents courants sodium ; ii) une plasticité physiologique des huîtres.

La charge en PST dans la glande digestive des huîtres exposées varie entre 25 et 147 µg STX/100 g de glande digestive et présente une variabilité interindividuelle (jusqu'à 5 fois). De plus, une grande variabilité interindividuelle de la charge en PST (jusqu'à 80 fois) a été mesurée chez des huîtres *C. gigas* exposées à cette même souche toxique d'*A. minutum* (Haberkorn *et al.*, 2011). Par conséquent, la charge en PST observée dans notre étude est relativement faible par rapport à ces expériences, probablement en raison d'une plus faible concentration d'exposition de cellules d'*A. minutum* et d'une différence de toxicité entre les souches. Malgré une accumulation relativement élevée de PST, aucune corrélation n'a été observée entre la sensibilité des nerfs à la STX et la charge en PST dans la glande digestive. De plus, il a été démontré qu'en général les bivalves résistants à la STX accumulaient des niveaux élevés de toxines et que certaines espèces ayant un faible niveau de toxines accumulées étaient très sensibles à la STX (Bricelj et Shumway, 1998).

En conclusion, les nerfs des huîtres *C. gigas* sont décrits, pour la première fois, comme possédant une sensibilité à la STX de l'ordre du micromolaire, qui diminue quand les huîtres sont préalablement exposées aux dinoflagellés producteurs de PST.

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET PERSPECTIVES



Discussion et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'hypothèse selon laquelle la variabilité individuelle de bioaccumulation des toxines paralysantes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* s'expliquerait par l'existence de plusieurs formes de canaux sodium voltage-dépendant ayant des sensibilités différentes vis-à-vis des PST. La littérature dans ce domaine met en évidence que la résistance à différents types de toxines ciblant les Na_v peut être associée à des isoformes protéiques spécifiques. Des études ont mis en évidence des isoformes « résistantes » résultant soit d'un polymorphisme de l'ADN entraînant des mutations non-synonymes, soit d'un épissage alternatif des ARN conduisant à des protéines aux propriétés différentes. Dans ce contexte, il était nécessaire dans un premier temps de caractériser les Na_v et leurs potentielles isoformes chez *C. gigas* puis de déterminer si ces isoformes jouaient un rôle dans la réponse des huîtres aux PST et en particulier lors d'expositions au dinoflagellé toxique *Alexandrium*. Puis, la sensibilité des huîtres creuses *C. gigas* aux PST a été évaluée par une approche électrophysiologique. Une troisième partie de la thèse consistait à déterminer la relation entre trois variables : l'expression du Na_v et ses isoformes, la sensibilité nerveuse des huîtres aux toxines et l'accumulation de toxines par les huîtres.

I. Sensibilité des huîtres *Crassostrea gigas* aux PST

Dans le but de déterminer la sensibilité des huîtres *C. gigas* face aux PST, des analyses d'électrophysiologie ont été réalisées sur des nerfs d'huîtres. Ces analyses ont montré que le potentiel d'action nerveux composé (CNAP) des nerfs diminuait après une exposition à la saxitoxine (STX), mais que la plus forte concentration utilisée ($> 10^{-6}$ g/mL) ne bloquait pas le courant sodium. Les nerfs de l'huître *C. gigas* étaient donc relativement résistants à la STX, lorsque l'on compare aux données existantes sur plusieurs espèces de bivalves. Afin de savoir si ces concentrations en STX présentent une réalité écologique, une estimation de la quantité de PST à laquelle les huîtres ont été exposées lors de l'efflorescence naturelle d'*A. minutum* en Rade de Brest en 2012 a été réalisée (Tableau 15). Cette estimation considère la concentration de cellules algales enregistrées et utilise comme référence la toxicité des

deux souches utilisées lors des expérimentations en laboratoire et isolées en Bretagne. Ainsi, la concentration théorique de STX à laquelle les huîtres ont été exposées en Rade de Brest est de $5,2 \times 10^{-8}$ g éq. STX/mL si l'on considère la souche AM89BM et de 2×10^{-9} g éq. STX/mL pour la souche Daoulas 1257, isolée dans la Rade de Brest (baie de Daoulas) en juillet 2013, lors du bloom. Ces valeurs sont nettement inférieures à la solution de STX de $2,5 \times 10^{-6}$ g/mL utilisée pour tester les nerfs, ce qui suggère que le CNAP des nerfs d'huîtres n'a pas été affecté par l'efflorescence d'*A. minutum* de 2012 en Rade de Brest, qui était pourtant une efflorescence record en terme de concentration algale enregistrée (plus de 4×10^7 cellules/mL). Cependant, ces estimations sont réalisées sur la base d'une efflorescence monospécifique ne considérant qu'une seule souche et sont exprimées en équivalent STX, prenant en compte les différents dérivés de la STX. De plus, les toxines sont contenues dans les cellules et non purifiées, contrairement à la STX utilisée pour tester les nerfs.

Tableau 15 : Toxicité évaluée pour un bloom monospécifique d'*Alexandrium minutum* AM89BM ou Daoulas 1257, avec les concentrations utilisées lors des 3 expériences et celle du bloom de 2012 en rade de Brest et les concentrations de STX évaluées (en équivalent STX) pour chaque souche.

	Concentration d' <i>A. minutum</i> (cellules/L)	Toxicité d'un bloom d' <i>A. minutum</i> AM89BM (g éq. STX/mL)	Toxicité d'un bloom d' <i>A. minutum</i> Daoulas 1257 (g éq. STX/mL)
Expérience 1	3×10^3	$3,9 \times 10^{-12}$	$1,5 \times 10^{-13}$
Expérience 3	$1,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^{-11}$	8×10^{-13}
Expérience 2	4×10^5	$5,2 \times 10^{-10}$	2×10^{-11}
Bloom de 2012	4×10^7	$5,2 \times 10^{-8}$	2×10^{-9}

D'après les données de la littérature, il est possible d'établir un classement des bivalves les plus résistants et sensibles à la STX (Tableau 16). La sensibilité des huîtres *C. gigas* semble similaire à celle de deux autres bivalves *Tresus capax* et *Protothaca staminea*, qui présentent un blocage partiel à la même concentration de STX (Kvitek et Beitler, 1991). Le record de résistance à la STX est détenu par la moule *Mytilus edulis*, dont le CNAP des nerfs n'est pas affecté avec la concentration la plus forte de 10^{-3} g/mL de STX (Twarog et al., 1972 ; Twarog, 1974). Chez une autre espèce d'huître, *Crassostrea virginica*, un blocage total a été observé avec seulement 10^{-7} g/mL de STX, ce qui signifie que *C. gigas* est plus résistante que *C. virginica* à la STX (Twarog et al., 1972 ; Twarog, 1974). Les nerfs des huîtres *C. gigas* semblent donc avoir une sensibilité intermédiaire à la STX, comparativement aux

autres bivalves. Cependant, les données présentes dans la littérature proviennent d'une seule étude réalisée en 1972. Il serait intéressant de refaire des mesures de sensibilité sur ces bivalves pour obtenir des données plus récentes, mais aussi de prendre des bivalves avec des historiques différents d'expositions aux PST. De plus, les efflorescences toxiques se sont intensifiées depuis les années 1970 et les sensibilités des bivalves pourraient être différentes à ce jour.

Tableau 16 : Sensibilité des nerfs et blocage de leur potentiel d'action nerveux composé face à la saxitoxine chez plusieurs espèces de bivalves marins et un bivalve d'eau douce. 0 : pas de blocage, (+) : blocage partiel, + : blocage total, nd : non déterminé, * : bivalve d'eau douce.

Espèces	Famille	Concentration de saxitoxine (g/mL)						Références
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	
<i>Mytilus edulis</i>	Mytilidae	0	0	0	0	0	nd	Twarog, 1972, 1974
<i>Placopecten magellanicus</i>	Pectinidae	0	0	0	0	0	nd	Twarog, 1972, 1974
<i>Humilaria kennerlyi</i>	Veneridae	0	0	0	0	0	(+)	Kvitek, 1991
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Veneridae	0	0	0	0	(+)/0	nd	Twarog, 1972, 1974
<i>Saxidomus giganteus</i>	Veneridae	0	0	0	0	(+)	+	Kvitek, 1991
<i>Saxidomus nuttalli</i>	Veneridae	0	0	0	0	(+)	+	Kvitek, 1991
<i>Modiolus demissus</i> (= <i>Geukensia demissa</i>)	Mytilidae	0	0	0	0	+	nd	Twarog, 1972
<i>Mya truncata</i>	Myidae	0	0	0	(+)	+	+	Kvitek, 1991
<i>Pecten irradians</i> (= <i>Argopecten irradians</i>)	Pectinidae	0	0	0	(+)/0	+	nd	Twarog, 1972, 1974
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostreidae	0	0	(+)	nd	nd	nd	
<i>Mya arenaria</i>	Myidae	0	0	(+)/0	+	+	+	Twarog, 1972, 1974
résistantes		0	0	0	0	0	nd	Bricelj, 2005
sensibles		0	0	0	+	+	+	Bricelj, 2005
<i>Tresus capax</i>	Mactridae	0	0	(+)	+	+	+	Kvitek, 1991
<i>Protothaca staminea</i> (= <i>Leukoma staminea</i>)	Veneridae	0	(+)	(+)	+	+	+	Kvitek, 1991
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostreidae	0	+	+	+	+	nd	Twarog, 1972, 1974
<i>Elliptio complanata</i> *	Unionidae	0	+	+	+	+	nd	Twarog, 1972, 1974

Les bivalves plutôt résistants à la STX, comme la moule *M. edulis*, ont tendance à accumuler beaucoup de PST, tandis que les bivalves plus sensibles comme *C. virginica* accumuleraient moins (Twarog, 1974). A ce jour, il est difficile d'affirmer qu'il existe une corrélation directe entre la sensibilité à la STX et l'accumulation de PST, étant donné que lors des études précédentes, les mesures de sensibilité des nerfs et de quantité de toxines accumulées réalisées sur ces bivalves n'étaient pas faites sur les mêmes individus. Cependant, nos données démontrent que les huîtres dont les nerfs présentent une sensibilité intermédiaire à la STX ont aussi des niveaux d'accumulation intermédiaires lors des efflorescences. En effet, au niveau de l'espèce, les données mesurées en Rade de Brest sont globales et ne prennent pas en compte la variabilité individuelle. A une même période et au même site d'échantillonnage, les moules, *M. edulis*, accumulaient 4 fois plus de PST que les huîtres, *C. gigas* (REPHY, 2013). La faible sensibilité des nerfs d'huîtres *C. gigas* à la STX confère une faible sensibilité globale à l'huître et expliquerait l'absence de mortalités observées dans les populations d'huîtres pendant les efflorescences d'*Alexandrium*.

La faible sensibilité des nerfs d'huîtres à la STX pourrait être due à la faible sensibilité du canal sodium voltage-dépendant CgNa_v1, cible des PST. En effet, la séquence protéique de CgNa_v1 pourrait conférer au canal Na_v une faible sensibilité à la STX, qui serait due, en particulier, à la présence d'un acide aminé Q (glutamine) dans le domaine II, plutôt qu'à l'acide aminé E (acide glutamique) retrouvé chez les myes sensibles, *Mya arenaria* (Bricelj et al., 2005). L'acide aminé à cette position semble être déterminant pour la sensibilité à la STX car chez la mye, les formes sensibles et résistantes sont respectivement dues à des acides aminés E ou D (acide aspartique) à la même position. Il serait intéressant de comparer les séquences protéiques d'autres bivalves en considérant leur sensibilité respective à la STX. Cependant, très peu de ces séquences sont disponibles actuellement. L'étude de la mutation E945Q, chez le rat, a montré une résistance à la STX qui se traduit par une diminution considérable (19000 fois) de l'affinité pour la STX (Terlau et al., 1991 ; Kontis et Goldin, 1993). Dans notre étude, il n'a pas été observé de polymorphisme de type SNP au niveau du site de fixation des PST et le même génotype (donnant l'acide aminé Q en position 945) est observé dans la population japonaise et les populations françaises échantillonnées. La fréquence élevée de ce génotype « Q945 » de CgNa_v1 dans les populations de *C. gigas* pourrait résulter d'une ancienne mutation d'une forme plus sensible vers cette forme plus

résistante (Q945) suivie d'une sélection sous pression des PST lors de blooms de microalgues productrices de STX, comme cela a été observé dans les populations de myes régulièrement exposées à des blooms toxiques d'*Alexandrium*. En Asie, zone d'origine des huîtres *C. gigas*, les contaminations de bivalves par les PST ont été décrites pour la première fois dans les années 1970 au Japon (Imai *et al.*, 2006). Depuis les années 1990, des contaminations de bivalves ont lieu presque tous les ans. Les huîtres *C. gigas* ont été importées en France dans les années 1970, or c'est à cette période que les blooms de type PSP ont été décrits pour la première fois au Japon. On ne peut donc pas déterminer si les huîtres ont subi une pression de sélection due aux blooms. Cependant, il est possible que des efflorescences aient eu lieu avant 1970. Il serait intéressant d'échantillonner des populations naturelles d'huîtres dans des zones indemnes de PST. Or, il est très difficile de trouver, d'une part des populations d'huîtres vraiment naturelles, étant donné les pratiques ostréicoles et les échanges entre les stocks et d'autre part, n'ayant jamais subi d'efflorescences toxiques.

Afin de confirmer que la faible sensibilité des huîtres à la STX est conférée par une faible sensibilité des Na_v , il sera nécessaire de réaliser des études fonctionnelles sur $CgNa_v1$. Par exemple, en réalisant une expression hétérologue de $CgNa_v1$ dans des ovocytes de xénopes, comme cela a été réalisé chez des insectes pour tester des molécules d'insecticides (Dong, 2007), puis de tester ces ovocytes transformés en électrophysiologie par voltage-clamp. La technique consiste à transformer des ovocytes de xénopes avec un plasmide contenant la séquence ADNc de la sous-unité α de $CgNa_v1$, afin d'obtenir une expression de la protéine $CgNa_v1$ à la membrane de l'ovocyte. Ainsi, il est possible de tester différentes molécules toxiques, comme la STX ou certains de ses dérivés, sur les différents canaux exprimés à la membrane. Cela est possible du fait de l'absence de Na_v actifs à la surface des ovocytes de xénope. Cette technique a été en partie réalisée dans cette thèse, à partir de l'injection du pool total des ARNm extraits à partir de ganglions viscéraux et de muscle strié d'huîtres. Cependant, l'injection dans les ovocytes de xénopes n'a pas permis d'observer une expression des canaux Na_v (Chapitre 2, IV). Cela pourrait s'expliquer, soit parce que les ARNm $CgNa_v$ étaient en trop faible quantité par rapport à la quantité totale d'ARNm, soit parce que les canaux issus des ARNm ne se sont pas exprimés à la membrane des ovocytes.

De plus, l'examen du potentiel caractère résistant de l'acide aminé Q de CgNa_v1 pourrait être réalisé en modifiant la séquence du canal, en utilisant une technique d'édition du génome, tel que le complexe CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 est une enzyme capable de détecter une zone précise de l'ADN et de la dégrader en coupant l'ADN double brin (Hsu *et al.*, 2014). Un fragment d'ADN, présentant la séquence d'intérêt, remplace ensuite le fragment manquant. Pour cette étude, il s'agirait d'introduire une séquence possédant une mutation qui remplacerait l'acide aminé Q par l'acide aminé E. Cette technique n'est pas encore disponible chez l'huître, mais pourrait constituer une perspective intéressante à ce travail de thèse.

Dans ces travaux de thèse, les nerfs d'huîtres ont montré des réponses différentes à la STX entre des individus préalablement exposés et non-exposés à un dinoflagellé produisant des PST. En effet, le CNAP des nerfs d'huîtres exposées est moins inhibé par la STX que celui des huîtres témoins. Cela suggère une diminution de la sensibilité des huîtres après une exposition expérimentale aux micro-algues toxiques. Cela pourrait s'expliquer par une acclimatation rapide de certaines huîtres. Plusieurs études ont démontré que la pré-exposition de crustacés *Daphnia* sp. à des doses faibles de cyanobactéries toxiques *Microcystis aeruginosa* entraînait une tolérance aux toxines lors des expositions suivantes (Gustafsson *et Hansson*, 2004 ; Guo *et Xie*, 2006). Cette tolérance proviendrait d'une plasticité dans l'activité et/ou l'expression de protéases (chymotrypsines et trypsines) dans l'intestin de *Daphnia* sp., face aux inhibiteurs de protéases produits par *M. aeruginosa* (Tillmans *et al.*, 2011 ; von Elert *et al.*, 2012 ; Kuster *et von Elert*, 2013). Il serait intéressant de réaliser des expositions successives à *A. minutum* pour étudier l'hypothèse d'une potentielle acclimatation chez les huîtres.

De plus, une sensibilité différentielle à la STX a pu être observée entre deux groupes d'huîtres échantillonnées sur le terrain, au niveau de la plage du Dellec (en sortie de la Rade de Brest), à des périodes différentes. Les nerfs des huîtres du premier groupe, prélevées en Avril 2014, possèdent une sensibilité à la STX 5 fois plus grande que les nerfs des huîtres du second groupe, prélevées en Octobre 2015. Entre ces deux temps de prélèvements, deux efflorescences toxiques ont été observées dans la rade de Brest (en fond de rade vers Daoulas), mais pas au niveau du site d'échantillonnage des huîtres. Une des causes possibles

de la différence de sensibilité pourrait être la condition physiologique des huîtres au moment du prélèvement. Les huîtres prélevées en Avril démarraient probablement leur gamétogénèse, celle-ci ayant lieu pendant l'été, contrairement à celles d'Octobre qui ont pondu quelques jours avant les enregistrements électrophysiologiques. De plus, une étude de **Mat et al. (2012)** chez l'huître creuse *C. gigas*, a démontré l'existence d'un rythme biologique différent selon les saisons. Les huîtres sont nocturnes en automne-hiver et diurnes à la période printemps-été. Cette dualité de comportement pourrait potentiellement influencer sur l'expression des Na_v et/ou modifier certains paramètres physiologiques (filtration, ingestion, etc.) qui pourraient expliquer les variations de sensibilités à la STX entre les huîtres d'Avril et d'Octobre.

Par ailleurs, les analyses en électrophysiologie nous ont permis de mettre en évidence l'existence de deux types de nerfs chez l'huître dont l'un serait potentiellement plus résistant que l'autre. Cela pourrait correspondre aux deux canaux $CgNa_v1$ et $CgNa_v2$ qui s'exprimeraient de manière différente selon les huîtres et possèderaient des sensibilités différentes à la STX. Chez les sangsues et les méduses, des études électrophysiologiques ont permis d'observer deux types de courants sodium avec une cinétique et une sensibilité à la STX différentes, suggérant l'existence de deux canaux sodium différents (**Anderson, 1987 ; Johansen et Kleinhaus, 1987**). Dans notre étude, il a été observé que $CgNa_v2$ possédait un acide aminé E dans le domaine II, à la même position que l'acide aminé E décrit chez les myes sensibles aux PST (**Bricelj et al., 2005**). Pour vérifier cette différence de sensibilité, le canal $CgNa_v2$ doit tout d'abord être caractérisé comme cela a été fait pour $CgNa_v1$ dans cette thèse. Il serait ensuite nécessaire de faire exprimer $CgNa_v2$ en hétérologue dans des ovocytes de xénopes pour tester sa sensibilité à la STX, mais également pour déterminer la nature exacte de ce canal. A savoir, s'il s'agit d'un canal sélectif des ions sodium comme $CgNa_v1$ ou sélectif des ions sodium et/ou calcium, comme cela a pu être mentionné précédemment.

L'étude de l'expression des Na_v a également permis d'observer une différence du niveau d'expression de $CgNa_v1$ entre les huîtres sauvages et les huîtres exposées provenant d'ostréiculteurs. En effet, l'expression des Na_v pour les huîtres sauvages est supérieure à celle mesurée dans les huîtres provenant des parcs ostréicoles. Il est possible que les huîtres

cultivées expriment moins de Na_V de par leurs conditions de vie. Ces huîtres sont cultivées en poches au fond de la Rade de Brest, serrées les unes contre les autres et sont moins exposées aux courants et à la prédation que les huîtres fixées sur les rochers. Tandis que les huîtres, se développant sur les rochers à la sortie de la Rade de Brest et soumises aux courants et la prédation, possèderaient une musculature et un système nerveux potentiellement plus développés et exprimeraient donc plus de canaux Na_V . De plus, les huîtres provenant du terrain sont nettement plus difficiles à ouvrir que celles élevées dans les poches. Cela peut suggérer un muscle adducteur plus développé ou possédant des fibres musculaires permettant une contraction plus forte chez les huîtres du terrain. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait comparer physiologiquement des huîtres élevées en poches dans les parcs ostréicoles et des huîtres sauvages. Pour cela, la contraction musculaire pourrait être évaluée en réalisant des enregistrements de tension et d'activité électrique, comme cela a été réalisé chez la moule *Mytilus edulis* (Twarog, 1960).

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de déterminer que la variabilité de sensibilité de l'huître aux PST ne semble pas avoir de base génétique au niveau des Na_V . Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence de diversité protéique, au niveau du site de fixation des PST des Na_V potentiellement lié à une résistance à la STX.

i) L'effort d'échantillonnage est trop faible et n'a pas permis de mettre en évidence des mutations impliquées dans la résistance à la STX, qui pourraient être présentes à des fréquences faibles dans les populations. De plus, les populations étudiées (trois françaises et une japonaise) ne sont pas totalement naturelles, étant donné les flux génétiques importants entre les différents sites dus notamment à l'activité ostréicole. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres populations, comme celles de la côte est des Etats-Unis ou encore d'autres populations du Japon, en comparant, si possible, des populations régulièrement exposées à des efflorescences toxiques à d'autres indemnes d'efflorescences.

ii) Les efflorescences toxiques n'induisent pas de pression de sélection efficace dans les populations étudiées, ou alors la sélection d'un allèle résistant a peut-être déjà eu lieu en Asie avant que l'huître creuse *C. gigas* ne soit introduite dans les zones où on la retrouve actuellement.

iii) La diversité protéique des Na_V n'est pas due à du polymorphisme génétique mais à des modifications post-transcriptionnelles, incluant l'épissage alternatif et l'édition de l'ARN

messenger. L'analyse de l'épissage alternatif durant cette thèse a permis de caractériser trois variants d'épissage mais n'a pas permis de tester leur sensibilité à la STX.

L'hypothèse de l'édition des ARNm est encore à explorer. Cela correspond à l'insertion, la délétion ou la substitution de nucléotides de l'ARNm primaire pouvant conduire à la traduction d'une protéine distincte. L'édition d'ARN concerne essentiellement les gènes du système nerveux et a été décrite de nombreuses fois chez les Na_V d'insectes ([Hoopengardner et al., 2003](#)). A ce jour, aucune étude n'a montré l'existence d'une édition de l'ARN chez les Na_V de mammifères. Il serait donc intéressant d'étudier l'édition des ARNm chez les Na_V de *C. gigas*.

Les Na_V pourraient également être soumis à des mécanismes épigénétiques. L'épigénétique correspond à l'étude de la régulation des gènes durant le développement et la prolifération cellulaire ([Jaenisch et Bird, 2003](#)). Ce phénomène est essentiel lors du développement mais peut également être présent au stade adulte, soit par modification aléatoire, soit sous l'influence de l'environnement cellulaire ou de celui de l'organisme. L'épigénétisme est le plus souvent caractérisé par des méthylations de l'ADN qui se localisent sur des séquences CpG (cytosine-phosphate-guanine), regroupées en îlots impliqués dans la régulation de l'expression génétique. Dans le cas de l'huître *C. gigas*, il serait intéressant de voir si l'exposition aux PST peut modifier la régulation épigénétique de certains gènes, notamment les Na_V , si ces modifications sont transmises d'une génération à l'autre et comment elles influencent la sensibilité des huîtres aux PST. Le niveau de méthylation des gènes $CgNa_V$ pourrait être étudiée avant et après exposition aux PST en utilisant des techniques de PCR méthylation spécifique.

Lors de l'analyse du polymorphisme génétique, l'étude s'est focalisée sur une petite partie du gène $CgNa_V1$ correspondant aux sites de fixations des PST dans chaque domaine. Pour rejeter complètement l'hypothèse du lien entre génotype du Na_V et sensibilité aux PST, il faudrait étudier l'intégralité de la séquence du gène (environ 20 kb) de $CgNa_V1$, mais aussi observer le polymorphisme génétique sur l'intégralité du gène de $CgNa_V2$.

II. Rôle du Na_v chez *Crassostrea gigas*

Dans cette étude, deux gènes ont été caractérisés comme appartenant à la famille des canaux sodium voltage-dépendant : CgNa_v1 et CgNa_v2. Les canaux de type Na_v2 sont retrouvés chez certains invertébrés, mais ils n'ont jamais été décrit chez les mammifères. Les analyses phylogénétiques et de séquences protéiques ont révélé que CgNa_v1 était un vrai canal sodium, tandis que CgNa_v2 pourrait être un canal sélectif à la fois des ions sodium et calcium. En effet, les Na_v partagent un motif spécifique d'acides aminés DEKA, correspondant au filtre de sélectivité, qui est retrouvé dans la séquence protéique de CgNa_v1 comme dans les autres protéines de type Na_v1. Contrairement aux canaux de type Na_v2 qui présentent un motif DEEA retrouvé chez CgNa_v2. Il a été démontré que l'acide aminé E du domaine III était caractéristique d'une sélectivité aux ions calcium. Le filtre de sélectivité chez les métazoaires est composé du motif DEEA, qui est à l'intersection entre les motifs EEEE des canaux calcium voltage-dépendant (Ca_v) et DEKA des Na_v (Zakon, 2012). Chez les méduses, l'acide aminé lysine (K) remplace l'acide aminé glutamate (E) du domaine II pour former le motif DKEA, augmentant ainsi la sélectivité aux ions sodium (Lipkind et Fozzard, 2008). Le motif DEKA des « vrais » canaux sodium apparaît chez les bilatériens et confère une sélectivité encore plus grande aux ions sodium que DKEA (Liebeskind et al., 2011). Les canaux Na_v résulteraient de l'évolution des canaux potassium voltage-dépendant (K_v), apparus il y a 3 milliards d'années chez les bactéries (Anderson et Greenberg, 2001). Ainsi, les canaux K_v seraient à la base de la famille des canaux ioniques composée notamment des canaux voltage dépendant Na_v, K_v et Ca_v. Le canal K_v est composé de 4 protéines (similaires aux domaines) associées en tétramères, chaque protéine étant composée de 6 segments transmembranaires (Moran et al., 2015), contrairement aux Na_v et Ca_v qui sont formés d'une seule protéine composée de 4 domaines. Les gènes codant les Na_v et Ca_v auraient évolué grâce à deux évènements successifs de duplication du gène ancestral codant le canal K_v à un domaine (Zakon, 2012), expliquant ainsi la forte homologie entre les canaux Na_v et Ca_v.

Il a été observé dans cette étude que l'épissage alternatif de CgNa_v1 permettait d'obtenir 3 variants ayant chacun des propriétés particulières. Le phénomène d'épissage alternatif permet, en général, d'obtenir différentes isoformes et présente un avantage

adaptatif. Chez les mammifères, il existe 9 gènes codant pour 9 isoformes différentes de Na_v , mais celles-ci appartiennent toutes aux canaux de type Na_v1 . Chaque gène possède également de nombreux variants, observés le plus souvent dans des pathologies. Les isoformes des Na_v de mammifères possèdent des propriétés distinctes spécifiques de leur rôle fonctionnel pendant le développement et au sein des différents tissus (Yu et Catterall, 2003).

Chez l'huître creuse, l'expression des canaux Na_v apparaît très tôt au cours du développement embryon-larvaire de l'huître. $CgNa_v2$ est exprimé dès le stade œuf ce qui correspond à une expression maternelle jusqu'à la transition maternelle-zygote qui a lieu autour du stade morula-blastula. Tandis que pour $CgNa_v1$, l'expression est uniquement zygotique et commence au stade de la blastula. Les études réalisées jusque-là considèrent que le développement du système nerveux chez les mollusques débute au stade de la larve trochophore, au niveau de l'organe sensoriel apical, région antérieure ciliée possédant des cellules sensorielles et neurosécrétrices, et dans les régions postérieures (Dickinson et al., 2000 ; Dickinson et Croll, 2003 ; Croll et Dickinson, 2004). Or, l'expression précoce du Na_v chez l'huître pourrait potentiellement coïncider avec un développement de cellules excitables non-neuronales et/ou la nécessité d'une transmission de signaux électriques, mais il n'y a à ce jour pas assez de données pour confirmer cette hypothèse. Chez le poisson *Danio rerio*, l'expression la plus précoce d'une isoforme de Na_v (*scn4ab*) a été détectée au stade deux-cellules, indiquant une expression maternelle, puis ensuite 10 heures post-fertilisation, c'est-à-dire à la fin de la gastrula, dans le mésoderme (Novak et al., 2006). Par homologie avec les Na_v de mammifères, *scn4ab* s'exprimerait principalement dans les muscles (Novak et al., 2006). Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, il a été observé que les canaux Ca_v étaient importants dans l'induction et le contrôle de la différenciation neuronale (Drean et al., 1995) et qu'ils apparaissaient avant les canaux Na_v . Cela pourrait expliquer l'apparition de l'expression de $CgNa_v2$ avant celle de $CgNa_v1$. L'expression précoce de $CgNa_v1$ et $CgNa_v2$ pourrait être étudiée par hybridation *in situ*, en parallèle du suivi du développement du système nerveux, potentiellement en utilisant des marqueurs spécifiques des cellules nerveuses/excitables de l'huître. La plupart des études concernant le développement du système nerveux chez les mollusques se concentrent sur les stades allant de la larve trochophore jusqu'au juvénile.

Au stade adulte, les Na_v présentent des expressions spécifiques selon les tissus. En effet, CgNa_v1 est majoritairement exprimé dans les ganglions viscéraux et le muscle strié, tandis que CgNa_v2 est principalement exprimé dans les branchies et les palpes. De plus, CgNa_v1 s'exprime dans le soma des cellules nerveuses du système nerveux central des huîtres (ganglions viscéraux et cérébraux), ainsi que dans le système nerveux périphérique composé des nerfs innervant les tissus. L'expression de CgNa_v1 observée dans les muscles correspondrait à la jonction neuromusculaire, les canaux Na_v étant impliqués dans la propagation du potentiel d'action dans la membrane post-synaptique.

Le phénomène d'épissage alternatif du gène de CgNa_v1 chez l'huître creuse pourrait être un mécanisme critique permettant la production de canaux CgNa_v1 adaptés à différentes fonctions nerveuses. De plus, la régulation tissu-spécifique des isoformes de CgNa_v1 pourrait présenter des canaux possédant différentes propriétés. En effet, CgNa_v1B spécifique des cellules nerveuses pourrait être régulé par la voie de signalisation de la PKA correspondant à une régulation post-traductionnelle. Par ailleurs, les deux autres variants CgNa_v1A , spécifique de la jonction neuro-musculaire, et CgNa_v1C , ayant une expression ubiquitaire, seraient régulés par des voies différentes et potentiellement post-transcriptionnelles. La régulation différentielle des variants peut être déterminée en réalisant une étude fonctionnelle des canaux via l'utilisation des ovocytes de xénopes, comme cité précédemment. L'état de phosphorylation des Na_v peut également être observé, en réalisant une purification des protéines suivi d'un western blot ou de la technique ELISA. Ces deux techniques permettent de mettre en évidence les formes phosphorylées ou non-phosphorylées des protéines.

III. Lien entre l'accumulation des PST et la sensibilité de *Crassostrea gigas*

Les expériences d'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques ont toutes montré une forte variabilité interindividuelle de l'accumulation des PST dans la glande digestive, avec un facteur maximal de 450. Cette variabilité est largement supérieure à celle observée dans une précédente étude ([Haberkorn et al., 2011](#)) et généralement observée lors des suivis environnementaux réalisés par le LEMAR dans le cadre des programmes de

recherche DAOULEX (2013-2015, en collaboration avec Ifremer Dyneco) et ACCUTOX. Les paramètres utilisés lors des différentes expérimentations (Tableau 17) semblent indiquer qu'une exposition de 6 jours et un débit élevé de 100 mL/min (expérience 2) entraînent des niveaux maximums d'accumulation de PST et une variabilité interindividuelle (450) plus élevée par rapport aux expositions de 4 jours (variabilité individuelle de 151 et 5 pour les expériences 1 et 3, respectivement). Par ailleurs, la toxicité des souches d'*A. minutum* diffère, elle est de 0,05 pg éq. STX/cellules pour les expériences 1 et 3, et de 1,3 pg éq. STX/cellules pour l'expérience 2, c'est-à-dire presque 30 fois plus toxique que pour les expériences 1 et 3. Cette variation de toxicité pourrait contribuer aux différences observées entre les expositions. Il semblerait dans ce cas que les paramètres influant le plus sur l'accumulation maximale et la variabilité soient la toxicité de la souche, la durée d'exposition et le débit d'apport d'algues. Dans l'expérience 3, réalisée en Mai, le débit est faible, mais la concentration d'algues apportées aux bacs est supérieure aux deux autres expériences. L'apport journalier d'algues aux huîtres est plus élevé que dans les autres expériences (7×10^6 cellules/huître/jour), pourtant l'accumulation maximale de PST dans les glandes digestives est plus faible et varie moins entre les individus. Par ailleurs, l'étude de [Guéguen et al. \(2012\)](#) s'est intéressée à l'accumulation de PST dans la chair totale d'huîtres exposées expérimentalement à *A. minutum* (AM89BM) à deux périodes distinctes : la première en Juin pendant le pic de gamétogénèse et la seconde en Novembre après la gamétogénèse. Il a été observé que les huîtres exposées en Novembre accumulaient 3,5 fois plus, au bout de 4 jours, que celles exposées en Juin. Cette observation pourrait expliquer les différences observées entre les expériences 1 et 3 qui ont été réalisées en Octobre et en Mai, respectivement. Il serait intéressant de réaliser des expérimentations d'exposition à la souche Daoulas 1257, aux deux périodes clés (Mai-Juin et Octobre-Novembre) et d'appliquer exactement les mêmes paramètres de concentration, débit, etc.

Tableau 17 : Paramètres utilisés lors des différentes expériences d'exposition réalisées au cours des travaux de thèse : nom de l'expérience, souche d'*Alexandrium minutum*, période à laquelle l'expérience a été réalisée, concentration d'algues apportées dans chaque bac, débit de cet apport d'algues, nombre d'huîtres réparties dans les bacs, apport journalier d'algues en nombre de cellules par huître et par jour, concentration de PST mesurée dans les glandes digestives, toxicité des souches et toxicité théorique pour l'huître.

Exp	Souche	Période	Durée (jrs)	Concentration d'algues (cellules/mL)	Débit (mL/min)	Nombre huîtres/bac	Apport journalier (cellules/H/jr)	Concentration de PST (μg éq. STX/100g)	Toxicité algue (μg éq. STX/cellule)	Toxicité théorique (μg éq. STX/H/jr)
1	Daoulas 1257	Oct. 2014	4	3×10^3	13	12	$4,7 \times 10^6$	2-302	0,05	0,23
2	AM89BM	Déc. 2014	6	10^3^*	100	30	2×10^6	2-900	1,30	6,24
3	Daoulas 1257	Mai 2016	4	$1,6 \times 10^4$	3	10	7×10^6	25-147	0,05	0,35

En ce qui concerne la relation entre la sensibilité du canal Na_v et l'accumulation de PST, nos résultats suggèrent que l'accumulation de PST dans les huîtres pourrait moduler l'expression des canaux Na_v ; plutôt qu'une sensibilité différentielle des variants de CgNa_v1 qui contrôlerait le niveau d'accumulation de PST. Nous avons démontré que la sensibilité des nerfs d'huîtres n'était pas corrélée à l'accumulation de PST dans la glande digestive. Ces résultats semblent indiquer que ce n'est pas la sensibilité nerveuse des huîtres qui détermine leur capacité à accumuler les PST. Par contre, il semblerait que l'exposition des huîtres aux PST pourrait modifier la sensibilité nerveuse et entraîner une résistance relative à la STX. Il serait intéressant de voir si cet effet est cumulatif en réalisant des expositions successives des huîtres aux PST.

Cette potentielle acclimatation des huîtres pourrait entraîner une expression différentielle des canaux possédant des sensibilités différentes aux PST. Cependant, aucune corrélation n'a été établie, d'une part, entre l'expression des différents variants de CgNa_v1 et l'accumulation de PST dans la glande digestive des huîtres et d'autre part entre la sensibilité des nerfs et l'accumulation de PST. Il faudrait, toutefois déterminer la relation entre la sensibilité des nerfs à la STX et l'expression des différents variants de CgNa_v1 au sein

même de ces nerfs. De même, il est nécessaire d'étudier l'expression de $CgNa_v2$ et de ses potentiels variants en fonction de l'accumulation de PST pour compléter cette étude.

Au regard des résultats qui ont été discutés précédemment, il apparaît que la variabilité de l'accumulation des PST par les huîtres résulterait plutôt d'une grande plasticité physiologique que d'une sensibilité différentielle des huîtres. Cette plasticité pourrait se traduire par une variabilité individuelle de la physiologie des huîtres, dont en particulier la filtration, l'ingestion et l'assimilation. Les différents paramètres physiologiques pouvant expliquer cette variabilité sont discutés dans le prochain paragraphe.

IV. Mécanismes pouvant déterminer la variabilité interindividuelle de l'accumulation de PST

Certains paramètres physiologiques pourraient être impliqués dans la variabilité d'accumulation des PST chez l'huître *C. gigas*, tels que la **filtration, l'ingestion et/ou l'assimilation**. En effet, l'exposition des huîtres aux micro-algues toxiques entraînent des modifications de la **filtration** (Bricelj *et al.*, 1990 ; Lassus *et al.*, 2004). Une inhibition temporaire de l'activité de filtration a pu être observée chez *C. gigas* et *Mytilus chilensis* après une exposition à des micro-algues toxiques du genre *Alexandrium*. Cependant, chez la moule, il a été observé un phénomène d'acclimatation traduit par une activité de filtration qui reprend au bout de quelques heures (Navarro *et al.*, 2008). La modification de l'activité de filtration varie selon les espèces de bivalves et de micro-algues toxiques étudiées (Hégaret *et al.*, 2007a). L'inhibition de la filtration pourrait être un moyen de défense pour les bivalves, en limitant l'ingestion de cellules algales contenant des toxines. Les huîtres peuvent présenter une variabilité de l'activité de filtration (Bougrier *et al.*, 2003). En effet, certaines huîtres continueraient de filtrer et accumuleraient beaucoup plus que celles qui ont diminué leur activité de filtration. Lors de l'**ingestion**, les cellules toxiques passent dans le système digestif pour être digérées. La présence de cellules intactes dans les fèces met en évidence le fait que les cellules ingérées ne sont pas toutes digérées, ni assimilées. Les huîtres vont rejeter une partie des cellules dans les fèces, en particulier les cellules ayant formé des kystes temporaires plus résistants à la digestion (Laabir et Gentien, 1999). Lors du

passage dans le système digestif de l'huître, les cellules d'*Alexandrium* digérées libèrent leurs toxines paralysantes qui vont, pour la majeure partie, se fixer aux cellules de la paroi du tubule digestif, tandis qu'une plus faible quantité diffuse vers les autres tissus (Blanco *et al.*, 2003). Une variabilité entre les huîtres peut également être observée à cette étape. L'activité d'**assimilation** des bivalves peut également être modifiée lorsqu'ils sont exposés aux PST. En effet, l'exposition de palourdes et de pétoncles à *A. tamarense* a montré une diminution de l'efficacité d'assimilation avec l'augmentation de la concentration en algue toxique (Li *et al.*, 2001). De plus, il a été observé que l'exposition de bivalves aux microalgues toxiques, entraînait une diapédèse hémocytaire, c'est-à-dire la migration des hémocytes du tissu conjonctif vers la lumière de l'intestin (Galimany *et al.*, 2008 ; Hégaret *et al.*, 2009a). Les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire des bivalves, lors de l'inflammation, la réparation des tissus, ou encore la phagocytose. Cependant, on ne sait pas à ce jour quel est l'implication exacte des hémocytes dans l'accumulation et/ou la détoxification cellulaire. Selon leur **comportement alimentaire**, filtration, ingestion et assimilation, les huîtres peuvent donc présenter des accumulations de PST différentes. Les liens directs entre ces différents paramètres écophysologiques et le niveau d'accumulation des PST n'a cependant pas été établi à ce jour.

Par ailleurs, le devenir des toxines libérées dans l'organisme va aussi dépendre de plusieurs processus de **biotransformation** (épimérisation, réduction et hydrolyse), ainsi que de la capacité des huîtres à les mettre en place. Une étude a montré que, chez certains bivalves dont l'huître *Ostrea edulis*, des bactéries de la flore interne pouvaient également intervenir dans la biotransformation des toxines (Smith *et al.*, 2001). De plus, l'huître *C. gigas* est connue pour avoir des capacités de biotransformation limitées par rapport à d'autres bivalves (Bricelj *et al.*, 1990 ; Jaime *et al.*, 2007). La capacité de **dépuration** des huîtres pourrait reposer sur ces réactions de biotransformations et peut également présenter une variabilité individuelle. Une étude de Haberkorn *et al.* (2011) a conclu que plus les huîtres accumulaient de toxines, moins celles-ci étaient biotransformées, probablement en raison de mécanisme de saturation.

Plusieurs études ont montré une surexpression des gènes du cytochrome P450, impliqué dans les mécanismes de **détoxication cellulaire**, chez des huîtres *C. gigas* exposées à *Alexandrium catenella* et *Gymnodinium catenatum* (García-Lagunas *et al.*, 2013 ; Rolland *et al.*, 2014). D'autres gènes impliqués dans la détoxication cellulaire et le **système**

antioxydant, codant pour la glutathion S-transférase (GST), la glutathion réductase (GR) et la ferritine, présentait une surexpression chez des huîtres *C. gigas* exposées à *A. minutum* (Fabioux et al., 2015). De plus, une étude a montré que les gènes HSP90 et HSP70, impliqués dans la **réponse aux stress** thermiques, étaient également surexprimés chez des moules *M. chilensis* exposées à une injection de STX *in vivo* (Núñez-Acuña et al., 2013). Des gènes liés à l'**apoptose**, Bax et BI-1, sont également surexprimés lorsque des huîtres *C. gigas* sont exposées à *A. catenella* pendant 48h, suggérant une inhibition de l'apoptose due à l'accumulation de PST (Rolland et al., 2014). La surexpression de l'ensemble de ces gènes indique que les bivalves déploient des mécanismes de défense face aux PST. Il serait intéressant de déterminer l'implication exacte de ces gènes sur la variabilité d'accumulation, de biotransformation et de dépuration des PST chez les huîtres.

Il est également possible que les huîtres présentent une variabilité individuelle au niveau de leur **rythme biologique**. En effet, de nombreuses fonctions métaboliques et physiologiques sont réglées par une horlogerie moléculaire (Mat et al., 2012). Il a été observé qu'une exposition des huîtres à *A. minutum* affectait leur rythme biologique, ainsi que leur activité valvaire (Tran et al., 2010 ; Haberkorn et al., 2011). La modification de l'activité valvaire de l'huître reflète une modification du comportement alimentaire. Cela peut se traduire par une modification des activités de filtration, d'ingestion et d'assimilation et par conséquent une modification de l'accumulation de toxines. Si une huître possède intrinsèquement un rythme biologique subtilement différent d'une autre, il est également possible qu'elle ne réponde pas de la même manière face à une exposition de micro-algues toxiques et accumule plus ou moins de PST.

Dans le but d'observer quelles voies métaboliques sont impliquées dans l'accumulation des PST chez l'huître, il serait intéressant de réaliser une étude comparative des transcriptomes d'huîtres exposées et non-exposées aux micro-algues toxiques *A. minutum*, par une approche de type RNAseq (séquençage haut-débit des ARN). Ainsi, il serait possible de déterminer quels gènes sont surexprimés et sous-exprimés. Une fois ces gènes identifiés, leur rôle dans l'accumulation et la variabilité interindividuelle pourrait être investigué, comme cela a été réalisé pour le canal sodium voltage-dépendant.

Bibliographie

A

- Abbott B. C. et Lowy J., 1958. Contraction in molluscan smooth muscle. *Journal of Physiology*, **141**: 385-397.
- Agnew W. S., Moore A. C., Levinson S. R. et Raftery M. A., 1980. Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **92(3)**: 860-866.
- Ahern C. A., Zhang J.-F., Wookalis M. J. et Horn R., 2005. Modulation of the Cardiac Sodium Channel Na_v1.5 by Fyn, a Src Family Tyrosine Kinase. *Circulation Research*, **96(9)**: 991-998.
- Ahn M., Beacham D., Westenbroek R. E., Scheuer T. et Catterall W. A., 2007. Regulation of Na_v1.2 Channels by Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB, and Associated Fyn Kinase. *The Journal of Neuroscience*, **27(43)**: 11533-11542.
- Akopian A. N., Sivilotti L. et Wood J. N., 1996. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, **379**: 257-262.
- Al-Sabi A., McArthur J., Ostroumov V. et French R. J., 2006. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, **4(3)**: 157-192.
- Andersen C. L., Jensen J. L. et Ørntoft T. F., 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, **64(15)**: 5245-5250.
- Anderson D. M., Glibert P. M. et Burkholder J. M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries*, **25**: 704-726.
- Anderson P. A., 1987. Properties and pharmacology of a TTX-insensitive Na⁺ current in neurones of the jellyfish *Cyanea capillata*. *Journal of Experimental Biology*, **133**: 231-248.
- Anderson P. A., Holman M. A. et Greenberg R. M., 1993. Deduced amino acid sequence of a putative sodium channel from the scyphozoan jellyfish *Cyanea capillata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90(15)**: 7419-7423.
- Anderson P. A. V. et Greenberg R. M., 2001. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **129(1)**: 17-28.
- Anderson P. A. V., Roberts-Misterly J. et Greenberg R. M., 2005. The evolution of voltage-gated sodium channels: were algal toxins involved? *Harmful Algae*, **4(1)**: 95-107.

- Araujo R. A., Williamson M. S., Bass C., Field L. M. et Duce I. R., 2011. Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage-gated sodium channel. *Insect Molecular Biology*, **20**(4): 437-445.
- Armstrong C. M., 2006. Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(47): 17991-17996.
- Arzul G., Seguel M., Guzman L. et Erard-Le Denn E., 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic Alexandrium species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **232**(2): 285-295.
- Ashpole N. M., Herren A. W., Ginsburg K. S., Brogan J. D., Johnson D. E., Cummins T. R., Bers D. M. et Hudmon A., 2012. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel Na_v1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(24): 19856-19869.
- Awad S. S., Lightowlers R. N., Young C., Chrzanowska-Lightowlers M. A., Lomo T. et Slater C. R., 2001. Sodium Channel mRNAs at the Neuromuscular Junction: Distinct Patterns of Accumulation and Effects of Muscle Activity. *The Journal of Neuroscience*, **21**(21): 8456-8463.

B

- Bass B. L., 2002. RNA Editing by Adenosine Deaminases That Act on RNA. *Annual Review of Biochemistry*, **71**: 817-846.
- Bass B. L., Nishikura K., Keller W., Seeburg P. H., Emeson R. B., O'Connell M. A., Samuel C. E. et Herbert A., 1997. A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA. *RNA*, **3**(9): 947-949.
- Basti L., Nagai K., Tanaka Y. et Segawa S., 2013. Sensitivity of gametes, fertilization, and embryo development of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, to the harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*. *Marine Biology*, **160**(1): 211-219.
- Bates S. S., Bird C. J., Freitas A. S. W. d., Foxall R., Gilgan M., Hanic L. A., *et al.*, 1989. Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the Primary Source of Domoic Acid, a Toxin in Shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **46**(7): 1203-1215.
- Beckh S., 1990. Differential expression of sodium channel mRNAs in rat peripheral nervous system and innervated tissues. *FEBS Letters*, **262**(2): 317-322.
- Belcher S. M., Zerillo C. A., Levenson R., Ritchie J. M. et Howe J. R., 1995. Cloning of a sodium channel alpha subunit from rabbit Schwann cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(24): 11034-11038.
- Bendahhou S., Cummins T. R., Potts J. F., Tong J. et Agnew W. S., 1995. Serine-1321-independent regulation of the mu 1 adult skeletal muscle Na⁺ channel by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**(26): 12003-12007.

- Bendif E. M., Probert I., Schroeder D. C. et de Vargas C., 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology*, **25**(6): 1763-1776.
- Benne R., 1996. The long and the short of it. *Nature*, **380**(6573): 391-392.
- Benoit E., Charpentier G., Mateu L., Luzzati V. et Kado R., 2000. Electrophysiology of the olfactory nerve of the pike, *Esox lucius*: a pilot study on optimal experimental conditions. *Cybium*, **24**: 241-248.
- Bezanilla F., 2006. The action potential: From voltage-gated conductances to molecular structures. *Biological Research*, **39**: 425-435.
- Black D. L., 2003. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, **72**(1): 291-336.
- Blair K. L. et Anderson P. A. V., 1993. Properties of voltage-activated ionic currents in cells from the brains of the triclad flatworm *Bdelloura candida*. *Journal of Experimental Biology*, **185**(1): 267-286.
- Blanco J., Reyero M. I. et Franco J., 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, **42**: 777-784.
- Blencowe B. J., 2006. Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. *Cell*, **126**(1): 37-47.
- Blom N., Sicheritz-Pontén T., Gupta R., Gammeltoft S. et Brunak S., 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, **4**(6): 1633-1649.
- Blumenthal K. M. et Seibert A. L., 2003. Voltage-gated sodium channel toxins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **38**: 215-237.
- Bosmans F., Martin-Eauclaire M. F. et Tytgat J., 2007. Differential effects of five 'classical' scorpion beta-toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **218**(1): 45-51.
- Boudry P., 2008. Review on Breeding and Reproduction of European aquaculture species: Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). 1-12.
- Bougrier S., Lassus P., Bardouil M., Masselin P. et Truquet P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources*, **16**: 347-352.
- Bourne N., 1965. Paralytic Shellfish Poison in Sea Scallops (*Placopecten magellanicus*, Gmelin). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **22**(5): 1137-1149.
- Brackenbury W. J. et Djamgoz M. B. A., 2006. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na(+) channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of Physiology*, **573**(Pt 2): 343-356.
- Brackenbury W. J. et Isom L. L., 2011. Na(+) Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Frontiers in Pharmacology*, **2**: 53.

- Bricelj M., Lee J., Cembella A. et Anderson D. M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, **63**: 177-188.
- Bricelj V. M., Connell L., Konoki K., MacQuarrie S. P., Scheuer T., Catterall W. A. et Trainer V. L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature*, **434**: 763-767.
- Bricelj V. M., MacQuarrie S., Twarog B. M. et Trainer V. L., 2004. Characterization of sensitivity to PSP toxins in North American populations of the softshell clam *Mya arenaria*. L. J. H. Steidinger K.A., Tomas C.R. and Vargo G.A. Harmful Algae 2002. Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France: 172-174.
- Bricelj V. M. et Shumway S. E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*, **6**(4): 315-383.
- Bullock T. H. et Horridge G. A., 1965. *Structure and function in the nervous systems of invertebrates*, San Francisco, W.H. Freeman
- Burgess D. L., Kohrman D. C., Galt J., Plummer N. W., Jones J. M., Spear B. et Meisler M. H., 1995. Mutation of a new sodium channel gene, *Scn8a*, in the mouse mutant "motor endplate disease". *Nature Genetics*, **10**(4): 461-465.
- Burkholder J. M., 1998. Implications of harmful microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries. *Ecological Applications*, **8**(1): S37-S62.

C

- Caldwell J. H., Schaller K. L., Lasher R. S., Peles E. et Levinson S. R., 2000. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(10): 5616-5620.
- Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B. et Mornon P. J., 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**(8): 621-645.
- Cantrell A., 2002. Molecular Mechanism of Convergent Regulation of Brain Na⁺ Channels by Protein Kinase C and Protein Kinase A Anchored to AKAP-15. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **21**(1): 63-80.
- Cantrell A. et Catterall W. A., 2001. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Neuroscience*, **2**: 397-407.
- Cantrell A. R., Smith R. D., Goldin A. L., Scheuer T. et Catterall W. A., 1997. Dopaminergic Modulation of Sodium Current in Hippocampal Neurons via cAMP-Dependent Phosphorylation of Specific Sites in the Sodium Channel α Subunit. *The Journal of Neuroscience*, **17**(19): 7330-7338.
- Carrier E., Dargent B., De Waard M. et Couraud F., 2000. Na⁺ Channel Regulation by Calmodulin Kinase II in Rat Cerebellar Granule Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**(2): 394-399.

- Castrec J., 2014. Localisation cellulaire, par hybridation *in situ*, des ARNm de deux gènes codant des canaux sodium voltage-dépendant chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Mémoire de stage de Master 1, Institut Universitaire Européen de la Mer*.
- Castresana J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, **17**(4): 540-552.
- Catterall W. A., 1980. Neurotoxins that Act on Voltage-Sensitive Sodium Channels in Excitable Membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **20**(1): 15-43.
- Catterall W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **26**: 13-25.
- Catterall W. A., 2010. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron*, **67**(6): 915-928.
- Catterall W. A., 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *Journal of Physiology*, **590**(11): 2577-2589.
- Catterall W. A., 2014. Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, **99**(1): 35-51.
- Catterall W. A., Cestèle S., Yarov-Yarovoy V., Yu F. H., Konoki K. et Scheuer T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, **49**(2): 124-141.
- Catterall W. A., Goldin A. L. et Waxman S. G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, **57**(4): 397-409.
- Cembella A. D., Shumway S. E. et Larocque R., 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **180**(1): 1-22.
- Cestèle S. et Catterall W. A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, **82**: 883-892.
- Chanda B. et Bezanilla F., 2002. Tracking Voltage-dependent Conformational Changes in Skeletal Muscle Sodium Channel during Activation. *The Journal of General Physiology*, **120**(5): 629-645.
- Chang C., Shen W. K., Wang T. T., Lin Y. H., Hsu E. L. et Dai S. M., 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**(4): 272-278.
- Chapelle A., Le Gac M., Labry C., Siano R., Quere J., Caradec F., Le Bec C., Nezan E., Doner A. et Gouriou J., 2015. The Bay of Brest (France) a new risky site for toxic *Alexandrium minutum* blooms and PSP shellfish contamination. *Harmful Algae News*, **51**: 4-5.
- Chatelier A., Dahllund L., Eriksson A., Krupp J. et Chahine M., 2008. Biophysical Properties of Human Na_v1.7 Splice Variants and Their Regulation by Protein Kinase A. *Journal of Neurophysiology*, **99**(5): 2241-2250.

Bibliographie

- Chauhan V. S., Tuvia S., Buhusi M., Bennett V. et Grant A. O., 2000. Abnormal Cardiac Na⁺ Channel Properties and QT Heart Rate Adaptation in Neonatal AnkyrinB Knockout Mice. *Circulation Research*, **86**(4): 441-447.
- Chen C.-Y. et Chou H.-N., 1998. Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins, from dinoflagellate to gastropod. *Toxicon*, **36**(3): 512-522.
- Chen T.-c., Law B., Kondratyuk T. et Rossie S., 1995. Identification of Soluble Protein Phosphatases That Dephosphorylate Voltage-sensitive Sodium Channels in Rat Brain. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(13): 7750-7756.
- Chen Y., Yu F. H., Sharp E. M., Beacham D., Scheuer T. et Catterall W. A., 2008. Functional Properties and Differential Neuromodulation of Na(v)1.6 Channels. *Molecular and cellular neurosciences*, **38**(4): 607-615.
- Chen Y., Yu F. H., Surmeier D. J., Scheuer T. et Catterall W. A., 2006. Neuromodulation of Na⁺ Channel Slow Inactivation via cAMP-Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C. *Neuron*, **49**(3): 409-420.
- Chiamvimonvat N., Pérez-García M. T., Tomaselli G. F. et Marban E., 1996. Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels. *The Journal of Physiology*, **491**(Pt 1): 51-59.
- Chopra S. S., Watanabe H., Zhong T. P. et Roden D. M., 2007. Molecular cloning and analysis of zebrafish voltage-gated sodium channel beta subunit genes: implications for the evolution of electrical signaling in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, **7**: 113.
- Copley R. R., 2004. Evolutionary convergence of alternative splicing in ion channels. *Trends in Genetics*, **20**(4): 171-176.
- Costa M. R., Casnellie J. E. et Catterall W. A., 1982. Selective phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **257**(14): 7918-7921.
- Costa M. R. C. et Catterall W. A., 1984. Phosphorylation of the α subunit of the sodium channel by protein kinase C. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **4**(3): 291-297.
- Croll R. P. et Dickinson A. J. G., 2004. Form and function of the larval nervous system in molluscs. *Invertebrate reproduction and development*, **46**(2-3): 173-187.

D

- Dai A., Temporal S. et Schulz D. J., 2010. Cell-specific patterns of alternative splicing of voltage-gated ion channels in single identified neurons. *Neuroscience*, **168**(1): 118-129.
- Dai S., Hall D. D. et Hell J. W., 2009. Supramolecular Assemblies and Localized Regulation of Voltage-Gated Ion Channels. *Physiological Reviews*, **89**(2): 411-452.
- Daigo K., Noguchi T., Miwa A., Nobufumi K. et Hashimoto K., 1988. Resistance of nerves from certain toxic crabs to paralytic shellfish poison and tetrodotoxin. *Toxicon*, **26**(5): 485-490.

- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R. et Posada D., 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, **27**(8): 1164-1165.
- Dascal N. et Lotan I., 1991. Activation of protein kinase C alters voltage dependence of a Na⁺ channel. *Neuron*, **6**(1): 165-175.
- Davies T. G., Field L. M., Usherwood P. N. et Williamson M. S., 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology*, **16**(3): 361-375.
- Davis J. Q., Lambert S. et Bennett V., 1996. Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin- binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *The Journal of Cell Biology*, **135**(5): 1355-1367.
- de Lera Ruiz M. et Kraus R. L., 2015. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**(18): 7093-7118.
- Deeds J. R., Landsberg J. H., Etheridge S. M., Pitcher G. C. et Longan S. W., 2008. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs*, **6**(2): 308-348.
- Denac H., Mevissen M. et Scholtysik G., 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **362**: 453-479.
- Deschênes I., Neyroud N., DiSilvestre D., Marbán E., Yue D. T. et Tomaselli G. F., 2002. Isoform-Specific Modulation of Voltage-Gated Na⁺ Channels by Calmodulin. *Circulation Research*, **90**(4): e49-e57.
- Dib-Hajj S. D., Tyrrell L., Black J. A. et Waxman S. G., 1998. NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(15): 8963-8968.
- Dib-Hajj S. D., Tyrrell L., Cummins T. R., Black J. A., Wood P. M. et Waxman S. G., 1999. Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Letters*, **462**(1-2): 117-120.
- Dickinson A. J. G. et Croll R. P., 2003. Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *The Journal of Comparative Neurology*, **466**(2): 197-218.
- Dickinson A. J. G., Croll R. P. et Voronezhskaya E. E., 2000. Development of Embryonic Cells Containing Serotonin, Catecholamines, and FMRFamide-Related Peptides in *Aplysia californica*. *Biological Bulletin*, **199**: 305-315.
- Diss J. K., Fraser S. P. et Djamgoz M. B., 2004. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *European Biophysics Journal*, **33**(3): 180-193.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, **27**(2): 93-100.
- Dong K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, **7**(1): 17-30.

- Dong K., Du Y., Rinkevich F., Wang L. et Xu P., 2015. The *Drosophila* Sodium Channel 1 (DSC1): The founding member of a new family of voltage-gated cation channels. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **120**: 36-39.
- Drean G., Leclerc C., Duprat A. M. et Moreau M., 1995. Expression of L-type Ca^{2+} channel during early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *The International Journal of Developmental Biology*, **39**: 1027-1032.
- Du Y., Nomura Y., Liu Z., Huang Z. Y. et Dong K., 2009. Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(49): 33869-33875.
- Dudev T. et Lim C., 2014. Ion Selectivity Strategies of Sodium Channel Selectivity Filters. *Accounts of Chemical Research*, **47**(12): 3580-3587.
- Dyer J. R., Johnston W. L., Castellucci V. F. et Dunn R. J., 1997. Cloning and tissue distribution of the *Aplysia* Na^+ channel α -subunit cDNA. *DNA and Cell Biology*, **16**(3): 347-356.

E-F

- Eijkelkamp N., Linley J. E., Baker M. D., Minett M. S., Cregg R., Werdehausen R., Rugiero F. et Wood J. N., 2012. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*, **135**(9): 2585-2612.
- Estrada N., Lagos N., García C., Maeda-Martínez A. et Ascencio F., 2007a. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Biology*, **151**: 1205-1214.
- Estrada N. A., de Jesús Romero M., Campa-Córdova A., Luna A. et Ascencio F., 2007b. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **146**: 502-510.
- Fabioux C., Sulistiyani Y., Haberkorn H., Hégaret H., Amzil Z. et Soudant P., 2015. Exposure to toxic *Alexandrium minutum* activates the detoxifying and antioxidant systems in gills of the oyster *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, **48**: 55-62.
- Favre I., Moczydlowski E. et Schild L., 1996. On the structural basis for ionic selectivity among Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} in the voltage-gated sodium channel. *Biophysical Journal*, **71**: 3110-3125.
- Feldman D. H. et Lossin C., 2014. The Nav channel bench series: Plasmid preparation. *MethodsX*, **1**: 6-11.
- Feng G., Deak P., Chopra M. et Hall L. M., 1995. Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances *drosophila para* sodium channel function. *Cell*, **82**: 1001-1011.
- Few W. P., Scheuer T. et Catterall W. A., 2007. Dopamine modulation of neuronal Na^+ channels requires binding of A kinase-anchoring protein 15 and PKA by a modified leucine zipper motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(12): 5187-5192.

- Forcioli D., Frey B. et Frey J. E., 2002. High Nucleotide Diversity in the para-Like Voltage-Sensitive Sodium Channel Gene Sequence in the Western Flower Thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, **95**(4): 838-848.
- Ford S. E., Bricelj V. M., Lambert C. et Paillard C., 2008. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarensense* on bivalve hemocytes. *Marine Biology*, **154**(2): 241-253.
- Fotia A. B., Ekberg J., Adams D. J., Cook D. I., Poronnik P. et Kumar S., 2004. Regulation of Neuronal Voltage-gated Sodium Channels by the Ubiquitin-Protein Ligases Nedd4 and Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(28): 28930-28935.
- Foulkes T., Nassar M. A., Lane T., Matthews E. A., Baker M. D., Gerke V., Okuse K., Dickenson A. H. et Wood J. N., 2006. Deletion of Annexin 2 Light Chain p11 in Nociceptors Causes Deficits in Somatosensory Coding and Pain Behavior. *The Journal of Neuroscience*, **26**(41): 10499-10507.
- Fremy J. M., Ledoux M., Nezan E., Piclet G. et Belvez H., 1989. Evolution de la présence de toxines paralysantes dans les coquillages lors de l'épisode toxique en Aber Wrac'h (1988). *Toxicorama*, **1**(1): 23-28.
- ## G
- Gainey L. F. J. et Shumway S. E., 1988. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research*, **7**(4): 623-628.
- Galimany E., Sunila I., Hégaret H., Ramón M. et Wikfors G. H., 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae*, **7**(5): 702-711.
- Galler S., 2008. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **29**(2-5): 73-99.
- Galtsoff P. S., 1964. *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*.
- García-Lagunas N., Romero-Geraldo R. et Hernández-Saavedra N. Y., 2013. Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas*' Defense System and Detoxification Genes. *PLOS ONE*, **8**(9): e72323.
- Geffeney S., Brodie E. D., Ruben P. C. et Brodie E. D., 2002. Mechanisms of Adaptation in a Predator-Prey Arms Race: TTX-Resistant Sodium Channels. *Science*, **297**(5585): 1336-1339.
- Gilbert W., 1978. Why genes in pieces? *Nature*, **271**(5645): 501-501.
- Glibert P. M., Anderson D. M., Gentien P., Granéli E. et Sellner K. G., 2005. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography*, **18**(2): 136-147.
- Goldin A. L., 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **28**: 365-368.
- Goldin A. L., 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual Review of Physiology*, **63**: 871-894.

- Goldin A. L., 2002. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *Journal of Experimental Biology*, **205**(5): 575-584.
- Goldin A. L., 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology*, **13**(3): 284-290.
- Gordon D., Karbat I., Ilan N., Cohen L., Kahn R., Gilles N., Dong K., Stühmer W., Tytgat J. et Gurevitz M., 2007. The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. *Toxicon*, **49**(4): 452-472.
- Grabowski P. J. et Black D. L., 2001. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, **65**: 289-308.
- Graveley B. R., 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics*, **17**(2): 100-107.
- Grizel H. et Héral M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil - Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, **47**: 399-403.
- Guéguen M., Bardouil M., Baron R., Lassus P., Truquet P., Massardier J. et Amzil Z., 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources*, **21**(1): 13-20.
- Guéguen M., Baron R., Bardouil M., Haberkorn H., Soudant P., Truquet P. et Lassus P., 2012. Influence of *Crassostrea gigas* (Thunberg) sexual maturation stage and ploidy on uptake of paralytic phycotoxins. *Toxicon*, **60**(1): 40-43.
- Guillard R. R. L. et Hargraves P. E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, **32**(3): 234-236.
- Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. et Gascuel O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, **59**(3): 307-321.
- Guo N. et Xie P., 2006. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution*, **143**(3): 513-518.
- Gustafsson S. et Hansson L.-A., 2004. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology*, **38**(1): 37-44.
- Guy H. R. et Seetharamulu P., 1986. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(2): 508-512.

H

- Haberkorn H., Lambert C., Le Goic N., Gueguen M., Moal J., Palacios E., Lassus P. et Soudant P., 2010a. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, **97**(2): 96-108.

- Haberkorn H., Lambert C., Le Goïc N., Moal J., Suquet M., Guéguen M., Sunila I. et Soudant P., 2010b. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, **9**(5): 427-439.
- Haberkorn H., Tran D., Massabuau J. C., Ciret P., Savar V. et Soudant P., 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Marine Pollution Bulletin*, **62**(6): 1191-1197.
- Haenggi T. et Fritschy J.-M., 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**(14): 1614-1631.
- Hallegraeff G. M., 2004. Harmful algal blooms a global overview. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO: Paris, Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. : 25-49.
- Hallegraeff G. M., Anderson D. M. et Cembella A. D., 1995. *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO 1995.
- Hedgecock D., Gaffney P. M., Gouletquer P., Guo X., Reece K. et Warr G. W., 2005. The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*, **24**(2): 429-441.
- Hégaret H., da Silva P. M., Sunila I., Shumway S. E., Dixon M. S., Alix J., Wikfors G. H. et Soudant P., 2009a. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **371**(2): 112-120.
- Hégaret H., da Silva P. M., Wikfors G. H., Haberkorn H., Shumway S. E. et Soudant P., 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biology and Toxicology*, **27**(4): 249-266.
- Hégaret H., Wikfors G. H. et Shumway S. E., 2007a. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *Journal of Shellfish Research*, **26**(2): 549-559.
- Hégaret H., Wikfors G. H. et Shumway S. E., 2009b. Biotxin contamination and shellfish safety. *Shellfish safety and quality*. Shumway S.E and Rodrick G.E.: 43-80.
- Hégaret H., Wikfors G. H., Soudant P., Lambert C., Shumway S. E., Bérard J. B. et Lassus P., 2007b. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Marine Biology*, **152**(2): 441-447.
- Heinemann S. H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K. et Numa S., 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, **356**: 441-443.
- Heisler J., Glibert P. M., Burkholder J. M., Anderson D. M., Cochlan W., Dennison W. C., et al., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, **8**(1): 3-13.
- Herzog R. I., Liu C., Waxman S. G. et Cummins T. R., 2003. Calmodulin Binds to the C Terminus of Sodium Channels Nav1.4 and Nav1.6 and Differentially Modulates Their Functional Properties. *The Journal of Neuroscience*, **23**(23): 8261-8270.

- Higuchi M., Maas S., Single F. N., Hartner J., Rozov A., Burnashev N., Feldmeyer D., Sprengel R. et Seeburg P. H., 2000. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*, **406**(6791): 78-81.
- Hilborn M. D., Vaillancourt R. R. et Rane S. G., 1998. Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases Acutely Regulate Neuronal Sodium Channels through the Src Signaling Pathway. *The Journal of Neuroscience*, **18**(2): 590-600.
- Hille B., 1984. *Ionic channels in excitable membranes*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Hirota K., Kaneko Y., Matsumoto G. et Hanyu Y., 1999. Cloning and distribution of a putative tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel in newt retina. *Zoological Science*, **16**(4): 587-594.
- Hoagland P., Anderson D. M., Kaoru Y. et White A. W., 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries*, **25**(4): 819-837.
- Hodgkin A. L. et Huxley A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, **117**: 500-544.
- Hoffmann M., Geulen O. et Weilke C., 2008. The LightCycler® 480 real-time PCR system: a versatile platform for genetic variation research. *Nature Methods*, **5**(3).
- Hoopengardner B., Bhalla T., Staber C. et Reenan R., 2003. Nervous System Targets of RNA Editing Identified by Comparative Genomics. *Science*, **301**(5634): 832-836.
- Hopkins A. E., 1936. Activity of the adductor muscle in oysters. *Physiological Zoology*, **9**(4): 498-507.
- Horridge G. A., 1958. Transmission of excitation through the ganglia of *Mya* (lamellibranchiata). *The Journal of Physiology*, **143**: 553-572.
- House A. E. et Lynch K. W., 2008. Regulation of Alternative Splicing: More than Just the ABCs. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(3): 1217-1221.
- Hsu P. D., Lander E. S. et Zhang F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, **157**: 1262-1278.
- ## I-J
- Illanes J., 1979. Recherches cytologiques et expérimentales sur la neurosécrétion de la moule *Mytilus edulis* L., Université de Caen: 134.
- Imai I., Yamaguchi M. et Hori Y., 2006. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton and Benthos Research*, **1**(2): 71-84.
- Ingham R. J., Gish G. et Pawson T., 2004. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, **23**(11): 1972-1984.
- Isom L. L., 2001. Sodium channel β subunits: anything but auxiliary. *The Neuroscientist*, **7**(1): 42-54.
- Isom L. L. et Catterall W. A., 1996. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature*, **383**(6598): 307-308.

- Isom L. L., Ragsdale D. S., De Jongh K. S., Westenbroek R. E., Reber B. F. X., Scheuer T. et Catterall W. A., 1995. Structure and function of the $\beta 2$ subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, **83**: 433-442.
- Jaenisch R. et Bird A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, **33**: 245-254.
- Jaime E., Gerdtts G. et Luckas B., 2007. In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae*, **6**(3): 308-316.
- Johansen J. et Kleinhaus A. L., 1987. Saxitoxin differentiates between two types of Na^+ -dependent potentials in the Retzius cell of hirudinid leeches. *Journal of Experimental Biology*, **131**(1): 351-363.
- Jones G. J. et Negri A. P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research*, **31**(3): 525-533.
- Jost M. C., Hillis D. M., Lu Y., Kyle J. W., Fozzard H. A. et Zakon H. H., 2008. Toxin-resistant sodium channels: parallel adaptive evolution across a complete gene family. *Molecular Biology and Evolution*, **25**(6): 1016-1024.

K

- Kallen R. G., Sheng Z.-H., Yang J., Chen L., Rogart R. B. et Barchi R. L., 1990. Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron*, **4**(2): 233-242.
- Kao C. Y. et Fuhrman F. A., 1967. Differentiation of the actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Toxicon*, **5**: 25-34.
- Katoh K. et Standley D. M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(4): 772-780.
- Kayano T., Noda M., Flockerzi V., Takahashi H. et Numa S., 1988. Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Letters*, **228**(1): 187-194.
- Kazen-Gillespie K. A., Ragsdale D. S., D'Andrea M. R., Mattei L. N., Rogers K. E. et Isom L. L., 2000. Cloning, Localization, and Functional Expression of Sodium Channel $\beta 1A$ Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(2): 1079-1088.
- Keegan L. P., Leroy A., Sproul D. et O'Connell M. A., 2004. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs): RNA-editing enzymes. *Genome Biology*, **5**(2): 209-209.
- Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M., Falaleeva M. et Stamm S., 2013. Function of alternative splicing. *Gene*, **514**(1): 1-30.
- Kellenberger S., Scheuer T. et Catterall W. A., 1996. Movement of the Na^+ Channel Inactivation Gate during Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(48): 30971-30979.

- Kerr N. C. H., Gao Z., Holmes F. E., Hobson S.-A., Hancox J. C., Wynick D. et James A. F., 2007. The sodium channel Na(v)1.5a is the predominant isoform expressed in adult mouse dorsal root ganglia and exhibits distinct inactivation properties from the full-length Na(v)1.5 channel. *Molecular and cellular neurosciences*, **35**(2): 283-291.
- Kidokoro Y., Grinnell A. D. et Eaton D. C., 1974. Tetrodotoxin sensitivity of muscle action potentials in pufferfishes and related fishes. *Journal of comparative physiology*, **89**(1): 59-72.
- Kim J., Ghosh S., Liu H., Tateyama M., Kass R. S. et Pitt G. S., 2004. Calmodulin Mediates Ca²⁺ Sensitivity of Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(43): 45004-45012.
- Klugbauer N., Lacinova L., Flockerzi V. et Hofmann F., 1995. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *The EMBO Journal*, **14**(6): 1084-1090.
- Kodama M., Ogata T., Noguchi T., Maruyama J. et Hashimoto K., 1983. Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Toxicon*, **21**(6): 897-900.
- Kontis K. J. et Goldin A. L., 1993. Site-directed mutagenesis of the putative pore region of the rat IIA sodium channel. *Molecular Pharmacology*, **43**(4): 635-644.
- Kontis K. J., Rounaghi A. et Goldin A. L., 1997. Sodium Channel Activation Gating Is Affected by Substitutions of Voltage Sensor Positive Charges in All Four Domains. *The Journal of General Physiology*, **110**(4): 391-401.
- Kraus D. W., Doeller J. E. et Smith P. R., 1988. A physiological Comparison of Bivalve Mollusc Cerebrovisceral Connectives With and Without Neurohemoglobin. I. Ultrastructural and Electrophysiological Characteristics. *Biological Bulletin*, **174**: 54-66.
- Kupershmidt S., Yang T. et Roden D. M., 1998. Modulation of Cardiac Na⁺ Current Phenotype by β 1-Subunit Expression. *Circulation Research*, **83**(4): 441-447.
- Kuster C. J. et von Elert E., 2013. Interspecific Differences between *D. pulex* and *D. magna* in Tolerance to Cyanobacteria with Protease Inhibitors. *PLoS ONE*, **8**(5): e62658.
- Kvitek R. G. et Beitler M. K., 1991. Relative insensitivity of butter clam neurons to saxitoxin: a pre-adaptation for sequestering paralytic shellfish poisoning toxins as a chemical defense. *Marine Ecology Progress Series*, **69**: 47-54.

L

- Laabir M. et Gentien P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research*, **18**: 217-222.
- Lapègue S., Boudry P. et Goulletquer P., 2009. Pacific cupped oyster - *Crassostrea gigas*. *Genimpact final scientific report*: 76-82.
- Lassus P., Baron R., Garen P., Truquet P., Masselin P., Bardouil M., Leguay D. et Amzil Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, **17**(2): 207-214.

- Lavialle-Defaix C., Gautier H., Defaix A., Lapied B. et Grolleau F., 2006. Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *Journal of Neurophysiology*, **96**(5): 2437-2450.
- Le Goïc N., Hégaret H., Boulais M., Béguel J.-P., Lambert C., Fabioux C. et Soudant P., 2014. Flow cytometric assessment of morphology, viability, and production of reactive oxygen species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to Toxic dinoflagellate (*Alexandrium minutum*) exposure. *Cytometry Part A*, **85**(12): 1049-1056.
- Le Goïc N., Hégaret H., Fabioux C., Miner P., Suquet M., Lambert C. et Soudant P., 2013. Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. *Aquatic Living Resources*, **26**(3): 221-228.
- Lee B. T. K., Tan T. W. et Ranganathan S., 2003. MGAlignIt: a web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences. *Nucleic Acids Research*, **31**(13): 3533-3536.
- Lee S. H., Ingles P. J., Knipple D. C. et Soderlund D. M., 2002. Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *Vssc1* sodium channel gene. *Invert Neurosci*, **4**(3): 125-133.
- Lemaillet G., Walker B. et Lambert S., 2003. Identification of a Conserved Ankyrin-binding Motif in the Family of Sodium Channel α Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(30): 27333-27339.
- Letunic I., Copley R. R. et Bork P., 2002. Common exon duplication in animals and its role in alternative splicing. *Human Molecular Genetics*, **11**(13): 1561-1567.
- Leverone J. R., Blake N. J., Pierce R. H. et Shumway S. E., 2006. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxicon*, **48**(1): 75-84.
- Li M., West J. W., Lai Y., Scheuer T. et Catterall W. A., 1992. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron*, **8**(6): 1151-1159.
- Li Q., Lee J.-A. et Black D. L., 2007. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature Reviews: Neuroscience*, **8**(11): 819-831.
- Li S.-C., Wang W.-X. et Hsieh D., 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. *Marine Biology*, **139**(4): 617-624.
- Liebeskind B. J., Hillis D. M. et Zakon H. H., 2011. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(22): 9154-9159.
- Lin W. H., Wright D. E., Muraro N. I. et Baines R. A., 2009. Alternative splicing in the voltage-gated sodium channel DmNav regulates activation, inactivation, and persistent current. *Journal of Neurophysiology*, **102**(3): 1994-2006.
- Lipkind G. M. et Fozzard H. A., 1994. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophysical Journal*, **66**(1): 1-13.
- Lipkind G. M. et Fozzard H. A., 2000. KcsA Crystal Structure as Framework for a Molecular Model of the Na⁺ Channel Pore. *Biochemistry*, **39**(28): 8161-8170.

- Lipkind G. M. et Fozzard H. A., 2008. Voltage-gated Na⁺ channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. *The Journal of General Physiology*, **131**(6): 523-529.
- Liu Z., Chung I. et Dong K., 2001. Alternative splicing of the *BSC1* gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**: 703-713.
- Liu Z., Song W. et Dong K., 2004. Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from U-to-C RNA editing of an insect sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**: 11862-11867.
- Llewellyn L. E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports*, **23**(2): 200-222.
- Llewellyn L. E., 2009. Sodium Channel Inhibiting Marine Toxins. *Marine Toxins as Research Tools*. N. Fusetani et W. Kem. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 67-97.
- Lopez A. J., 1998. ALTERNATIVE SPLICING OF PRE-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics*, **32**(1): 279-305.
- Lossin C., Wang D. W., Rhodes T. H., Vanoye C. G. et George Jr A. L., 2002. Molecular Basis of an Inherited Epilepsy. *Neuron*, **34**: 877-884.
- Loughney K., Kreber R. et Ganetzky B., 1989. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell*, **58**(6): 1143-1154.
- Lu C.-M. et Brown G. B., 1998. Isolation of a human-brain sodium-channel gene encoding two isoforms of the subtype III α -subunit. *Journal of Molecular Neuroscience*, **10**(1): 67-70.
- Lubet P. et Mathieu M., 1982. The action of internal factors on gametogenesis in pelecypod molluscs. *Malacologia*, **22**(1-2): 131-136.
- Lubet P. et Streiff W., 1982. Contrôle neuroendocrine de la reproduction chez les Mollusques. *Journal of Physiology*, **78**: 537-542.

M

- MacQuarrie S. et Bricelj M., 2008. Behavioral and physiological responses to PSP toxins in *Mya arenaria* populations in relation to previous exposure to red tides. *Marine Ecology Progress Series*, **366**: 59-74.
- Maier S. K., Westenbroek R. E., McCormick K. A., Curtis R., Scheuer T. et Catterall W. A., 2004. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*, **109**(11): 1421-1427.
- Maltsev V. A., Reznikov V., Undrovinas N. A., Sabbah H. N. et Undrovinas A., 2008. Modulation of the late sodium current by Ca(2+), calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **294**(4): H1597-H1608.

- Manfrin C., De Moro G., Torboli V., Venier P., Pallavicini A. et Gerdol M., 2012. Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates. *Invertebrate Survival Journal*, **9**(2): 184-199.
- Manivasagan P. et Kim S.-K., 2015. Chapter 34 - An Overview of Harmful Algal Blooms on Marine Organisms. *Handbook of Marine Microalgae*. Boston, Academic Press: 517-526.
- Marban E., Yamagishi T. et Tomaselli G. F., 1998. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of Physiology*, **508**(3): 647-657.
- Marceau F., 1909. Recherche sur la morphologie, l'histologie et la physiologie comparées des muscles adducteurs des Mollusques acéphales. *Archives de zoologie expérimentale et générale*, **5**(2): 295-469.
- Marteil L., 1976. La conchyliculture française. Biologie de l'huître et de la moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **40**(2): 149-346.
- Martins A. J. et Valle D., 2012. The Pyrethroid Knockdown Resistance. *Insecticides - Basic and Other Applications*.
- Mat A. M., Massabuau J.-C., Ciret P. et Tran D., 2012. Evidence for a Plastic Dual Circadian Rhythm in the Oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiology International*, **29**(7): 857-867.
- McEwen D. P., Meadows L. S., Chen C., Thyagarajan V. et Isom L. L., 2004. Sodium Channel β 1 Subunit-mediated Modulation of Nav1.2 Currents and Cell Surface Density Is Dependent on Interactions with Contactin and Ankyrin. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(16): 16044-16049.
- McPhee J. C., Ragsdale D. S., Scheuer T. et Catterall W. A., 1995. A Critical Role for Transmembrane Segment IVS6 of the Sodium Channel α Subunit in Fast Inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(20): 12025-12034.
- McPhee J. C., Ragsdale D. S., Scheuer T. et Catterall W. A., 1998. A Critical Role for the S4-S5 Intracellular Loop in Domain IV of the Sodium Channel α -Subunit in Fast Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(2): 1121-1129.
- Millman B. M., 1964. Contraction in the opaque part of the adductor muscle of the oyster (*Crassostrea angulata*). *Journal of Physiology*, **173**: 238-262.
- Millman B. M., 1967. Mechanism of contraction in Molluscan Muscle. *American Zoologist*, **7**: 583-591.
- Modrek B., Resch A., Grasso C. et Lee C., 2001. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Research*, **29**(13): 2850-2859.
- Mohler P. J., Rivolta I., Napolitano C., LeMaillet G., Lambert S., Priori S. G. et Bennett V., 2004. Na(v)1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Na(v)1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(50): 17533-17538.
- Moore M. J., Query C. C. et Sharp P. A., 1993. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. *THE RNA world*: 303-357.

- Moraga D., Osada M., Lucas A. et Nomura T., 1989. Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* en France (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). *Aquatic Living Resources*, **2**: 135-143.
- Moran Y., Barzilai M. G., Liebeskind B. J. et Zakon H. H., 2015. Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *The Journal of Experimental Biology*, **218**(4): 515-525.
- Morgan K., Stevens E. B., Shah B., Cox P. J., Dixon A. K., Lee K., Pinnock R. D., Hughes J., Richardson P. J., Mizuguchi K. et Jackson A. P., 2000. $\beta 3$: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(5): 2308-2313.
- Mori M., Konno T., Morii T., Nagayama K. et Imoto K., 2003. Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**(2): 290-296.
- Mori M., Konno T., Ozawa T., Murata M., Imoto K. et Nagayama K., 2000. Novel Interaction of the Voltage-Dependent Sodium Channel (VDSC) with Calmodulin: Does VDSC Acquire Calmodulin-Mediated Ca^{2+} -Sensitivity? *Biochemistry*, **39**(6): 1316-1323.
- Morrison C. M., 1993. The histology and ultrastructure of the adductor muscle of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *American Malacological Bulletin*, **10**(1): 25-38.
- Motoike H. K., Liu H., Glaaser I. W., Yang A. S., Tateyama M. et Kass R. S., 2004. The Na^+ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *Journal of General Physiology*, **123**(2): 155-165.
- Murphy B. J. et Catterall W. A., 1992. Phosphorylation of purified rat brain Na^+ channel reconstituted into phospholipid vesicles by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(23): 16129-16134.
- Murphy B. J., Rossie S., De Jongh K. S. et Catterall W. A., 1993. Identification of the Sites of Selective Phosphorylation and Dephosphorylation of the Rat Brain Na^+ Channel α Subunit by cAMP-dependent Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**(36): 27355-27362.
- ## N-O
- Navarro J. M., Contreras A. M. et Chaparro O. R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Revista chilena de historia natural*, **81**: 41-49.
- Neuberger G., Schneider G. et Eisenhaber F., 2007. pkaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biology Direct*, **2**(1): 1-23.
- Nieto F. R., Cobos E. J., Tejada M. A., Sanchez-Fernandez C., Gonzalez-Cano R. et Cendan C. M., 2012. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. *Marine Drugs*, **10**(2): 281-305.
- Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M. et Numa S., 1986. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, **322**(6082): 826-828.

- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., *et al.*, 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, **312**(5990): 121-127.
- Noda M., Suzuki H., Numa S. et Stühmer W., 1989. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *Federation of European Biochemical Societies*, **259**(1): 213-216.
- Novak A. E., Taylor A. D., Pineda R. H., Lasda E. L., Wright M. A. et Ribera A. B., 2006. Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel α -subunit genes. *Developmental Dynamics*, **235**(7): 1962-1973.
- Numann R., Catterall W. et Scheuer T., 1991. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science*, **254**(5028): 115-118.
- Núñez-Acuña G., Aballay A. E., Hégaret H., Astuya A. P. et Gallardo-Escárate C., 2013. Transcriptional responses of *Mytilus chilensis* exposed in vivo to saxitoxin (STX). *Journal of Molluscan Studies*, **79**(4): 323-331.
- O'Dowd D. K., Gee J. R. et Smith M. A., 1995. Sodium current density correlates with expression of specific alternatively spliced sodium channel mRNA in single neurons. *The Journal of Neuroscience*, **15**(5): 4005-4012.
- Ogata N. et Ohishi Y., 2002. Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **88**(4): 365-377.
- Okuse K., Malik-Hall M., Baker M. D., Poon W. Y. L., Kong H., Chao M. V. et Wood J. N., 2002. Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature*, **417**(6889): 653-656.
- Olson R. O., Liu Z., Nomura Y., Song W. et Dong K., 2008. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(5): 604-610.
- Ono K., Fozzard H. A. et Hanck D. A., 1993. Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics. *Circulation Research*, **72**(4): 807-815.
- ## P-Q
- Padilla D. K., Doall M. H., Gobler C. J., Hartson A. et O'Boyle K., 2006. Brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens*, can affect growth but not survivorship of *Mercenaria mercenaria* larvae. *Harmful Algae*, **5**(6): 736-748.
- Patton D. E., West J. W., Catterall W. A. et Goldin A. L., 1992. Amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation: Charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**: 10905-10909.
- Penzotti J. L., Fozzard H. A., Lipkind G. M. et Dudley Jr S. C., 1998. Differences in Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Revealed by Mutagenesis of the Na⁺ Channel Outer Vestibule. *Biophysical Journal*, **75**: 2647-2657.

- Pfaffl M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**(9): e45-e45.
- Plakas S. M. et Dickey R. W., 2010. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon*, **56**(2): 137-149.
- Plummer N. W., Galt J., Jones J. M., Burgess D. I., Sprunger L. K., Kohrman D. C. et Meisler M. H., 1998. Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. *Genomics*, **54**: 287-296.
- Plummer N. W., McBurney M. W. et Meisler M. H., 1997. Alternative Splicing of the Sodium Channel SCN8A Predicts a Truncated Two-domain Protein in Fetal Brain and Non-neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(38): 24008-24015.
- Poon W. Y. L., Malik-Hall M., Wood J. N. et Okuse K., 2004. Identification of binding domains in the sodium channel NaV1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11. *FEBS Letters*, **558**(1-3): 114-118.
- Qin N., D'Andrea M. R., Lubin M.-L., Shafae N., Codd E. E. et Correa A. M., 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel β 1B subunit, a novel splicing variant of the β 1 subunit. *European Journal of Biochemistry*, **270**(23): 4762-4770.
- Qu Y., Curtis R., Lawson D., Gilbride K., Ge P., DiStefano P. S., Silos-Santiago I., Catterall W. A. et Scheuer T., 2001. Differential Modulation of Sodium Channel Gating and Persistent Sodium Currents by the β 1, β 2, and β 3 Subunits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **18**(5): 570-580.
- Qu Y., Rogers J., Tanada T., Scheuer T. et Catterall W. A., 1994. Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(8): 3289-3293.

R

- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Ratcliffe C. F., 2001. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of Cell Biology*, **154**(2): 427-434.
- Raymond C. K., Castle J., Garrett-Engele P., Armour C. D., Kan Z., Tsinoremas N. et Johnson J. M., 2004. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(44): 46234-46241.
- Reese M. G., Eeckman F. H., Kulp D. et Haussler D., 1997. Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology*, **4**(3): 311-323.
- Reguera B., Velo-Suárez L., Raine R. et Park M. G., 2012. Harmful Dinophysis species: A review. *Harmful Algae*, **14**: 87-106.

- Reimann F., Cox J. J., Belfer I., Diatchenko L., Zaykin D. V., McHale D. P., *et al.*, 2010. Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in SCN9A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(11): 5148-5153.
- REPHY, 2013. Bulletin de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral. *Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources LER/BO*: 1-141.
- Rescher U. et Gerke V., 2008. S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, **455**(4): 575-582.
- Riviere G., Klopp C., Ibouniyamine N., Huvet A., Boudry P. et Favrel P., 2015. GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics*, **16**: 401.
- Robertson A., Stirling D., Robillot C., Llewellyn L. et Negri A., 2004. First report of saxitoxin in octopi. *Toxicon*, **44**(7): 765-771.
- Rogart R. B., Cribbs L. L., Muglia L. K., Kephart D. D. et Kaiser M. W., 1989. Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**: 8170-8174.
- Rolland J.-L., Medhioub W., Vergnes A., Abi-khalil C., Savar V., Abadie E., Masseret E., Amzil Z. et Laabir M., 2014. A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs*, **12**(9): 5035-5054.
- Rosenthal J. J. et Gilly W. F., 1993. Amino acid sequence of a putative sodium channel expressed in the giant axon of the squid *Loligo opalescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(21): 10026-10030.
- Rossie S. et Catterall W. A., 1987. Cyclic-AMP-dependent phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels in primary cultures of rat brain neurons. *Journal of Biological Chemistry*, **262**(26): 12735-12744.

S

- Salkoff L., Butler A., Wei A., Scavarda N., Giffen K., Ifune C., Goodman R. et Mandel G., 1987. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science*, **237**(4816): 744-749.
- Sangameswaran L., Fish L. M., Koch B. D., Rabert D. K., Delgado S. G., Ilnicka M., Jakeman L. B., Novakovic S., Wong K., Eglén R. M. et Hunter J. C., 1997. A Novel Tetrodotoxin-sensitive, Voltage-gated Sodium Channel Expressed in Rat and Human Dorsal Root Ganglia. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(23): 14805-14809.
- Santerre C., Sourdain P. et Martinez A. S., 2012. Expression of a natural antisense transcript of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: first demonstration in the gonads of a lophotrochozoa species. *Sex Dev*, **6**(4): 210-221.
- Sarao R., Gupta S. K., Auld V. J. et Dunn R. J., 1991. Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Research*, **19**(20): 5673-5679.

- Satin J., Kyle J. W., Chen M., Bell P., Cribbs L. L., Fozzard H. A. et Rogart R. B., 1992. A Mutant of TTX-Resistant Cardiac Sodium Channels with TTX-Sensitive Properties. *Science*, **256**(5060): 1202-1205.
- Sauvage C., Bierne N., Lapegue S. et Boudry P., 2007. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, **406**: 13-22.
- Schaller K. L., Krzemien D. M., McKenna N. M. et Caldwell J. H., 1992. Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *The Journal of Neuroscience*, **12**(4): 1370-1381.
- Schaller K. L., Krzemien D. M., Yarowsky P. J., Krueger B. K. et Caldwell J. H., 1995. A Novel, Abundant Sodium Channel Expressed in Neurons and Glia. *The Journal of Neuroscience*, **15**(5): 3231-3242.
- Schantz E. J., Mold J. D., Stanger D. W., Shavel J., Riel F. J., Bowden J. P., Lynch J. M., Wyler R. S., Riegel B. et Sommer H., 1957. Paralytic Shellfish Poison. VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues. *Journal of the American Chemical Society*, **79**(19): 5230-5235.
- Scheib H., McLay I., Guex N., Clare J. J., Blaney F. E., Dale T. J., Tate S. N. et Robertson G. M., 2006. Modeling the pore structure of voltage-gated sodium channels in closed, open, and fast-inactivated conformation reveals details of site 1 toxin and local anesthetic binding. *Journal of Molecular Modeling*, **12**: 813-822.
- Scheuer T. et Catterall W. A., 2006. Control of neuronal excitability by phosphorylation and dephosphorylation of sodium channels. *Biochemical Society Transactions*, **34**(6): 1299-1302.
- Schlieff T., Schönherr R., Imoto K. et Heinemann H. S., 1996. Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *European Biophysics Journal*, **25**(2): 75-91.
- Schreibmayer W., Dascal N., Lotan I., Wallner M. et Weigl L., 1991. Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel α -subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letters*, **291**(2): 341-344.
- Schulz D. J., Goillard J.-M. et Marder E. E., 2007. Quantitative expression profiling of identified neurons reveals cell-specific constraints on highly variable levels of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(32): 13187-13191.
- Sellner K. G., Doucette G. J. et Kirkpatrick G. J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**(7): 383-406.
- Shao D., Okuse K. et Djamgoz M. B., 2009a. Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**(7): 1471-1481.
- Shao Y. M., Dong K., Tang Z. H. et Zhang C. X., 2009b. Molecular characterization of a sodium channel gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**(2): 145-151.
- Shearwin-Whyatt L., Dalton H. E., Foot N. et Kumar S., 2006. Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays*, **28**(6): 617-628.

- Shiraishi S., Yokoo H., Yanagita T., Kobayashi H., Minami S.-i., Saitoh T., Takasaki M. et Wada A., 2003. Differential effects of bupivacaine enantiomers, ropivacaine and lidocaine on up-regulation of cell surface voltage-dependent sodium channels in adrenal chromaffin cells. *Brain Research*, **966**(2): 175-184.
- Shumway S. E., Burkholder J. M. et Springer J., 2006. Effects of the estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae*, **5**(4): 442-458.
- Shumway S. E., Sherman S. A., Cembella A. D. et Selvin R., 1994. Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the gulf of maine: Seasonal changes, distribution between tissues, and notes on feeding habits. *Natural Toxins*, **2**(4): 236-251.
- Sierra-Beltrán A. P., Cruz A., Núñez E., Del Villar L. M., Cerecero J. et Ochoa J. L., 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon*, **36**(11): 1493-1502.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D. et Higgins D. G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7**: 539-539.
- Sigel E. et Baur R., 1988. Activation of protein kinase C differentially modulates neuronal Na⁺, Ca²⁺, and gamma-aminobutyrate type A channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**(16): 6192-6196.
- Simpson L. et Emeson R. B., 1996. RNA Editing. *Annual Review of Neuroscience*, **19**(1): 27-52.
- Smayda T. J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, **42**(5): 1137-1153.
- Smith E. A., Grant F., Ferguson C. M. J. et Gallacher S., 2001. Biotransformations of Paralytic Shellfish Toxins by Bacteria Isolated from Bivalve Molluscs. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(5): 2345-2353.
- Smith R. D. et Goldin A. L., 1996. Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Neuroscience*, **16**(6): 1965-1974.
- Solé-Cava A. M. et Thorpe J. P., 1991. High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biological Journal of the Linnean Society*, **44**(1): 65-80.
- Song W., Liu Z., Tan J., Nomura Y. et Dong K., 2004. RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(31): 32554-32561.
- Soong T. W. et Venkatesh B., 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. *Trends in Genetics*, **22**(11): 621-626.
- Spafford J. D., Spencer A. N. et Gallin W. J., 1999. Genomic organization of a voltage-gated Na⁺ channel in a hydrozoan jellyfish: insights into the evolution of voltage-gated Na⁺ channel genes. *Receptors and Channels*, **6**(6): 493-506.

Springer J. J., Shumway S. E., Burkholder J. M. et Glasgow H. B., 2002. Interactions between the toxic estuarine dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and two species of bivalve molluscs. *Marine Ecology Progress Series*, **245**: 1-10.

Srinivasan J., Schachner M. et Catterall W. A., 1998. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(26): 15753-15757.

Stühmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X., Noda M., Yahagi N., Kubo H. et Numa S., 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, **339**: 597-603.

T

Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T. et Nishizuka Y., 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, **254**(10): 3692-3695.

Tan J., Liu Z., Nomura Y., Goldin A. L. et Dong K., 2002. Alternative splicing on an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *The Journal of Neuroscience*, **22**(13): 5300-5309.

Tan J. et Soderlund D. M., 2011. Actions of Tefluthrin on Rat Na(v)1.7 Voltage-Gated Sodium Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **101**(1): 21-26.

Taskén K. et Aandahl E. M., 2004. Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiological Reviews*, **84**(1): 137-167.

Terlau H., Heinemann S. H., Stühmer W., Pusch M., Conti F., Imoto K. et Numa S., 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letter*, **293**(1-2): 93-96.

Thackeray J. R. et Ganetzky B., 1994. Developmentally regulated alternative splicing generates a complex array of *Drosophila para* sodium channel isoforms. *The Journal of Neuroscience*, **14**(5): 2569-2578.

Thimmapaya R., Neelands T., Niforatos W., Davis-Taber R. A., Choi W., Putman C. B., Kroeger P. E., Packer J., Gopalakrishnan M., Faltynek C. R., Surowy C. S. et Scott V. E., 2005. Distribution and functional characterization of human Nav1.3 splice variants. *European Journal of Neuroscience*, **22**(1): 1-9.

Tibbs V. C., Gray P. C., Catterall W. A. et Murphy B. J., 1998. AKAP15 Anchors cAMP-dependent Protein Kinase to Brain Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(40): 25783-25788.

Tillmans A. R., Burton S. K. et Pick F. R., 2011. *Daphnia* Pre-Exposed to Toxic Microcystis Exhibit Feeding Selectivity. *International Review of Hydrobiology*, **96**(1): 20-28.

Tran D., Haberkorn H., Soudant P., Ciret P. et Massabuau J.-C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, **298**(3-4): 338-345.

- Trimmer J. S., Cooperman S. S., Tomiko S. A., Zhou J., Crean S. M., Boyle M. B., Kalen R. G., Sheng Z., Barchi R. L., Sigworth F. J., Goodman R. H., Agnew W. S. et Mandel G., 1989. Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron*, **3**(1): 33-49.
- Tseng T. T., McMahon A. M., Johnson V. T., Mangubat E. Z., Zahm R. J., Pacold M. E. et Jakobsson E., 2007. Sodium Channel Auxiliary Subunits. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **12**(3-4): 249-262.
- Tsushima R. G., Li R. A. et Backx P. H., 1997. Altered Ionic Selectivity of the Sodium Channel Revealed by Cysteine Mutations within the Pore. *The Journal of General Physiology*, **109**(4): 463-475.
- Twarog B. M., 1960. Innervation and activity of a molluscan smooth muscle. *Journal of Physiology*, **152**: 220-235.
- Twarog B. M., 1967. Excitation of *Mytilus* smooth muscle. *Journal of Physiology*, **192**: 857-868.
- Twarog B. M., 1974. "Immunity" to paralytic shellfish toxin in bivalve molluscs. *Proceedings of the Second International Coral Reef Symposium*. Cameron A.M., Cambell B.M., Cribb A.B. et al. (eds.), The Great Barrier Reef Committee, Brisbane, Australia, 505-512.
- Twarog B. M., Hidaka T. et Yamagushi H., 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve molluscs. *Toxicon*, **10**: 273-278.

U-V

- Ulbricht W., 2005. Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiological Reviews*, **85**(4): 1271-1301.
- Vacher H., Mohapatra D. P. et Trimmer J. S., 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiological Reviews*, **88**(4): 1407-1447.
- van Bemmelen M. X., Rougier J.-S., Gavillet B., Apothéoz F., Daidié D., Tateyama M., Rivolta I., Thomas M. A., Kass R. S., Staub O. et Abriel H., 2004. Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by Nedd4-2 Mediated Ubiquitination. *Circulation Research*, **95**(3): 284-291.
- Van de Riet J., Gibbs R. S., Muggah P. M., Rourke W. A., MacNeil J. D. et Quilliam M. A., 2011. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Oysters, and Scallops: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, **94**: 1154-1176.
- Van Dolah F. M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, **108**: 133-141.
- Vassilev P., Scheuer T. et Catterall W., 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, **241**(4873): 1658-1661.
- Vijayaragavan K., Boutjdir M. et Chahine M., 2004. Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 Peripheral Nerve Sodium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Journal of Neurophysiology*, **91**(4): 1556-1569.

von Elert E., Zitt A. et Schwarzenberger A., 2012. Inducible tolerance to dietary protease inhibitors in *Daphnia magna*. *The Journal of Experimental Biology*, **215**: 2051-2059.

W

Wagner S., Dybkova N., Rasenack E. C. L., Jacobshagen C., Fabritz L., Kirchhof P., Maier S. K. G., Zhang T., Hasenfuss G., Brown J. H., Bers D. M. et Maier L. S., 2006. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na(+) channels. *Journal of Clinical Investigation*, **116**(12): 3127-3138.

Walne P. R., 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis*. *Fisheries Investigations London. Series II*, **25**(4): 1-53.

Wang Z. et Burge C. B., 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, **14**(5): 802-813.

Ward E. J. et Shumway S. E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**(1-2): 83-130.

Watanabe E., Fujikawa A., Matsunaga H., Yasoshima Y., Sako N., Yamamoto T., Saegusa C. et Noda M., 2000. Nav2/NaG Channel Is Involved in Control of Salt-Intake Behavior in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, **20**(20): 7743-7751.

West J., Numann R., Murphy B., Scheuer T. et Catterall W., 1991. A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science*, **254**(5033): 866-868.

West J. W., Patton D. E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A. L. et Catterall W. A., 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺ channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**: 10910-10914.

White G. B., Pfahnl A., Haddock S., Lamers S., Greenberg R. M. et Anderson P. A., 1998. Structure of a putative sodium channel from the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Invert Neurosci*, **3**(4): 317-326.

Whittle K. et Gallacher S., 2000. Marine toxins. *British Medical Bulletin*, **56**(1): 236-253.

Wiese M., D'Agostino P. M., Mihali T. K., Moffitt M. C. et Neilan B. A., 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs*, **8**(7): 2185-2211.

Wilde A. A. M. et Brugada R., 2011. Phenotypical Manifestations of Mutations in the Genes Encoding Subunits of the Cardiac Sodium Channel. *Circulation Research*, **108**(7): 884-897.

Wong Y.-H., Lee T.-Y., Liang H.-K., Huang C.-M., Wang T.-Y., Yang Y.-H., Chu C.-H., Huang H.-D., Ko M.-T. et Hwang J.-K., 2007. KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Research*, **35**(Web Server issue): W588-W594.

Y

- Yan T., Zhou M., Fu M., Yu R., Wang Y. et Li J., 2003. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Aquaculture*, **217**(1-4): 167-178.
- Yang J. et Barchi R., 1990. Phosphorylation of the Rat Skeletal Muscle Sodium Channel by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Journal of Neurochemistry*, **54**(3): 954-962.
- Yang P., 2004. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovascular Research*, **61**(1): 56-65.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G. K. et Clardy J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, **41**(6): 1019-1025.
- Yasumoto T., Oshima Y., Tajiri M. et Kotaki Y., 1983. Paralytic shellfish toxins in previously unrecorded species of coral reef crabs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **49**(4): 633-636.
- Yu F. H. et Catterall W. A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, **4**(3): 1-7.
- Yu F. H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G. A. et Catterall W. A., 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, **57**(4): 387-395.

Z

- Zaccaroni A. et Scaravelli D., 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. V. Evangelista et al. (eds): 91-158.
- Zakon H. H., 2012. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 10619-10625.
- Zhan S., Merlin C., Boore Jeffrey L. et Reppert Steven M., 2011. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell*, **147**(5): 1171-1185.
- Zhang F., Xu X., Li T. et Liu Z., 2013. Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, **11**(12): 4698-4723.
- Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, **490**: 49-54.
- Zhang T., Liu Z., Song W., Du Y. et Dong K., 2011. Molecular characterization and functional expression of the DSC1 channel. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41**(7): 451-458.
- Zhao X., Ikeda T., Salgado V. L., Yeh J. Z. et Narahashi T., 2005. Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neuro Toxicology*, **26**: 455-465.
- Zhao X., Yu H., Kong L. et Li Q., 2012. Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *PLOS One*, **7**(9): 8.

Bibliographie

- Zhou D., Lambert S., Malen P. L., Carpenter S., Boland L. M. et Bennett V., 1998. Ankyrin(G) Is Required for Clustering of Voltage-gated Na Channels at Axon Initial Segments and for Normal Action Potential Firing. *The Journal of Cell Biology*, **143**(5): 1295-1304.
- Zhou W., Chung I., Liu Z., Goldin A. L. et Dong K., 2004. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron*, **42**(1): 101-112.
- Zhou Z., Licklider L. J., Gygi S. P. et Reed R., 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, **419**(6903): 182-185.
- Zubovic L., Baralle M. et Baralle F. E., 2012. Mutually exclusive splicing regulates the Nav 1.6 sodium channel function through a combinatorial mechanism that involves three distinct splicing regulatory elements and their ligands. *Nucleic Acids Research*, **40**(13): 6255-6269.
- Zuo X.-P., He H.-Q., He M., Liu Z.-R., Xu Q., Ye J.-G. et Ji Y.-H., 2006. Comparative pharmacology and cloning of two novel arachnid sodium channels: Exploring the adaptive insensitivity of scorpion to its toxins. *FEBS Letters*, **580**(18): 4508-4514.

Article 1

Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their expression with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Article publié dans le journal Marine Drugs,
numéro spécial Marine Neurotoxins

Article

Molecular Characterization of Voltage-Gated Sodium Channels and Their Relations with Paralytic Shellfish Toxin Bioaccumulation in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*

Floriane Boullot ^{1,*}, Justine Castrec ¹, Adeline Bidault ¹, Natanael Dantas ², Laura Payton ³, Mickael Perrigault ³, Damien Tran ³, Zouher Amzil ⁴, Pierre Boudry ⁵, Philippe Soudant ¹, Hélène Hégaret ¹ and Caroline Fabioux ^{1,*}

¹ Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, 29280 Plouzané, France; justine.castrec@univ-brest.fr (J.C.); adeline.bidault@univ-brest.fr (A.B.); philippe.soudant@univ-brest.fr (P.S.); helene.hegaret@univ-brest.fr (H.H.)

² Laboratory of Immunology and Pathology of Invertebrates, Department of Molecular Biology, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba—Campus I, 58051-900 Jo o Pessoa, PB, Brazil; natan.cbio@gmail.com

³ UMR 5805 EPOC, CNRS— quipe  cotoxicologie Aquatique, Université de Bordeaux, Station Marine d'Arcachon, 33120 Arcachon, France; l.payton@epoc.u-bordeaux1.fr (L.P.); mickael.perrigault@u-bordeaux.fr (M.P.); d.tran@epoc.u-bordeaux1.fr (D.T.)

⁴ Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes, France; zouher.amzil@ifremer.fr

⁵ Ifremer, UMR 6539 LEMAR CNRS/UBO/IRD/Ifremer, 29280 Plouzan e, France; pierre.boudry@ifremer.fr

* Correspondence: floriane.boullot@gmail.com (F.B.); caroline.fabioux@univ-brest.fr (C.F.)

Academic Editor: Lucio Costa

Received: 16 November 2016; Accepted: 6 January 2017; Published: 19 January 2017

Abstract: Paralytic shellfish toxins (PST) bind to voltage-gated sodium channels (Nav) and block conduction of action potential in excitable cells. This study aimed to (i) characterize Nav sequences in *Crassostrea gigas* and (ii) investigate a putative relation between Nav and PST-bioaccumulation in oysters. The phylogenetic analysis highlighted two types of Nav in *C. gigas*: a Nav1 (*CgNav1*) and a Nav2 (*CgNav2*) with sequence properties of sodium-selective and sodium/calcium-selective channels, respectively. Three alternative splice transcripts of *CgNav1* named A, B and C, were characterized. The expression of *CgNav1*, analyzed by in situ hybridization, is specific to nervous cells and to structures corresponding to neuromuscular junctions. Real-time PCR analyses showed a strong expression of *CgNav1A* in the striated muscle while *CgNav1B* is mainly expressed in visceral ganglia. *CgNav1C* expression is ubiquitous. The PST binding site (domain II) of *CgNav1* variants possess an amino acid Q that could potentially confer a partial saxitoxin (STX)-resistance to the channel. The *CgNav1* genotype or alternative splicing would not be the key point determining PST bioaccumulation level in oysters.

Keywords: *Crassostrea gigas*; sodium channel; alternative splicing; *Alexandrium minutum*; paralytic shellfish toxins

1. Introduction

Phycotoxins are natural compounds produced by phytoplanktonic species that can be responsible for many human illnesses and poisoning linked to contaminated seafood consumption. With favorable environmental conditions, toxic microalgae can proliferate and aggregate to form harmful algal blooms (HAB). These natural phenomena have increased in recent years, both in frequency and in a worldwide

geographical distribution [1]. The HAB are a major health risk [2], can cause economic losses associated with fishery or aquaculture closure and sale prohibition, and can have ecological consequences on marine ecosystems [3,4]. Paralytic shellfish poisoning (PSP) is one of the highest threats to human health among poisoning by phycotoxins. The toxins involved in this syndrome are the paralytic shellfish toxins (PST), produced by dinoflagellates, mainly of the genus *Alexandrium*.

Suspension-feeders such as bivalve molluscs that consume phytoplankton can bioaccumulate large amounts of toxins during these blooms. Consumption of PST-contaminated shellfish represents one of the main vectors of PSP illnesses in humans. In Europe, shellfish toxin content is subjected to health regulations defined by the European Union (CE Regulation No. 854/2004), which prohibits the harvesting and sale of shellfish with more than 80 µg of STX equivalent to 100 g of shellfish meat. PST are composed of many toxic derivatives of saxitoxin (STX), the most potent toxin. STX and its derivatives bind to the voltage-gated sodium channels (Nav) and block conduction of action potential. The Nav channel plays a crucial role in membrane excitability in nerve cells, which makes it the target of many neurotoxins produced by animals or plants, such as STX and tetrodotoxin (TTX).

Nav channels are large and complex transmembrane proteins responsible for electrical excitability of cells [5]. Increased sodium permeability induces membrane depolarization, producing action potentials and electrical conduction [6]. Nav channels are composed of a main α subunit, responsible for the selectivity of the channel and an accessory subunit that can complete functions of the Nav channel. Expression of the α subunit alone may be sufficient to produce sodium currents in the heterologous system. Two types of genes encoding the α subunit Nav channel exist in invertebrates (coding for Nav1 and Nav2); whereas, vertebrates possess at least nine α subunit Nav genes, all coding for the Nav1 channel family [7]. Accessory subunits are called β subunit in mammals, and have homologous in other vertebrates [8,9]. Accessory subunits have been characterized in insects with a tipE subunit in *Drosophila*, and tipE-homologous in other insects [10,11]. The β subunits modulate gating and membrane expression of Nav channels [12]. The α subunit consists of 4 homologous domains (I–IV) (Figure 1). Each domain has 6 transmembrane segments (S1–S6) connected by intra- and extra-cellular loops [13–15]. The S4 segments are charged positively and are responsible for voltage sensitivity [6,14]. The loop between S5 and S6 segments forms the ion-selectivity filter and is named pore-loop or P segment [16]. The selectivity filter contains a specific pattern of amino acids selective for sodium ions only: D400 (of rat Nav1.4) in domain I, E755 in domain II, K1237 in domain III, and A1529 in domain IV [17]. STX, like TTX, is known to bind at the P segment, or site 1, of Nav [6,14].

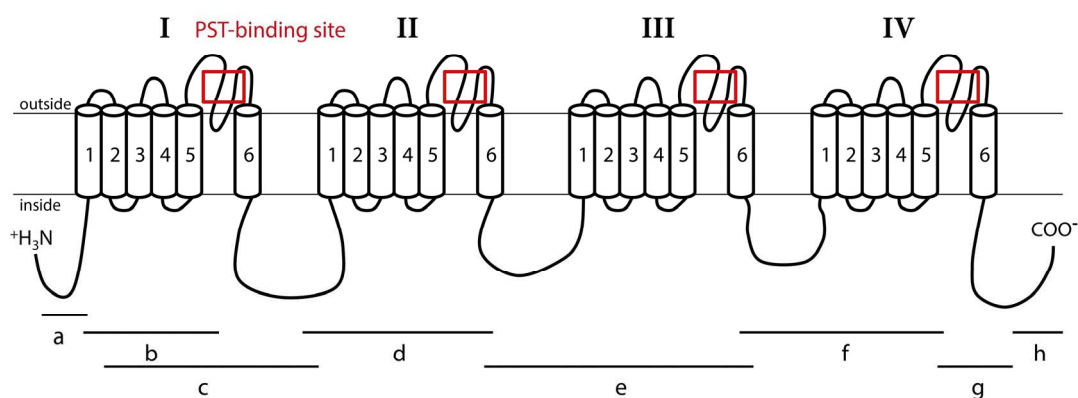


Figure 1. Representation of the Nav1 α subunit of *C. gigas* oysters. This channel is composed of four homologous domains (I–IV), each having six transmembrane segments (1–6). Fragments “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g” and “h” were used to obtain the complete sequence of the Nav. Lines indicate the location of PCR amplicons relative to the channel structure. Red boxes indicate sequenced regions including paralytic shellfish toxin (PST) binding site used for the study of Nav genomic polymorphism.

In the softshell clam, *Mya arenaria*, on the eastern coast of North America, two populations were studied by Bricej et al. [18]: one of them, regularly exposed to bloom of *Alexandrium* spp., was proved to be resistant to PST effects upon neuromuscular impairment, clams accumulating high levels of PST without dying. The other population, never exposed to *Alexandrium* blooms, was referred to as sensitive because of the death of experimentally-exposed individuals [18]. A polymorphism of a single amino acid at the STX binding site of the α subunit Nav sequence was shown to be associated with decreased affinity for STX up to 1000-fold, explaining the lower nerve sensitivity and the higher PST accumulation in resistant populations of softshell clams exposed to *Alexandrium* spp. compared to the sensitive population [4]. Alternatively, post-transcriptional regulations also can generate molecular diversity in Nav α subunit and have been associated with contrasting phenotypes of Nav sensitivity to neurotoxins. In insects, alternative splicing leads to the formation of two distinct variants of para channels (the Nav1 channels of insects) with different sensitivity to a pyrethroid insecticide, one being 100-fold less sensitive to insecticide than the second, as demonstrated in the German cockroach *Blattella germanica* [19]. In the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, high inter-individual variability in PST bioaccumulation was measured in oysters exposed to a toxic strain of *A. minutum* [20]. This variability could originate from physiological plasticity of oysters, for example from a variation of feeding behaviour between oysters as proposed by Haberkorn et al. [20], and/or different sensitivities of the voltage-gated sodium channel.

The present study investigated the implication of the voltage-gated sodium channel and its potential isoforms in the variability of PST accumulation in oysters. First, the analysis of the two sequences of Nav α subunit available in the *C. gigas* genome database (annotated Nav5 and Nav9) [21], allowed determination of the phylogenetic status of Nav genes in different invertebrate species. Nav9 and Nav5 were proposed to be renamed *CgNav1* and *CgNav2*, respectively, in accordance with phylogenetic positioning. Then, the study focused only on *CgNav1*, assessing the expression of *CgNav1* α subunit by in situ hybridization and real-time PCR in all tissues of oysters. The existence of *CgNav1* isoforms, either resulting from genetic polymorphism or from alternative mRNA splicing, was also investigated. Three alternative splice variants were characterized. Finally, we examined the link between PST accumulation and the expression of splice variants in oysters experimentally exposed to *A. minutum*.

2. Results

2.1. Phylogenetic Analysis of Nav Channels in *Crassostrea gigas*

Phylogenetic relationships between the protein sequences of Nav α subunit characterized in *C. gigas* (EKC22630 and EKC21550) and the Nav previously reported in other invertebrate species were studied (Figure 2). Analyses revealed that sequences annotated Nav9 (EKC22630) and Nav5 (EKC21550) channels in *C. gigas* did not cluster together but branched at the root defining the two clades of Nav channels (Nav1 and Nav2): the Nav9 sequence appeared grouped with Nav1 channels, but Nav5 grouped with Nav2. Accordingly, we renamed Nav9 as *CgNav1* and Nav5 as *CgNav2*. The Nav1 cluster includes para type channel and Nav2 includes BSC1/DSC1 type channel found in insects. The Pacific oyster Nav1 channel showed a very close phylogenetic relationship with the Nav channel of the clam *M. arenaria* and with para-like channels characterized in other mollusc species: in the gastropod *Aplysia californica* and in the cephalopod *Doryteuthis opalescens*. Contrastingly, *C. gigas* Nav2 channel presented a close relationship with the Nav2 channel of *Capitella teleta*, BSC1 and DSC1 channels of the insects *Blattella germanica* and *Drosophila melanogaster*, respectively. To our knowledge, *CgNav2* is the first member of Nav2 cluster characterized in bivalves. Analyses of the selectivity filters revealed a DEKA motif for the Nav1 of *C. gigas* as observed in all Nav1 channels. This sequence gives the channel selectivity to sodium ions only. For the Nav2 of *C. gigas*, a DEEA motif was revealed as observed in the Nav2 channels of anthozoans and bilaterians. These results suggest that the Nav2 channel is likely to be selective to sodium and calcium ions. Considering these results, only the *CgNav1* channel was considered for further characterization steps in the study of relationships

between paralytic shellfish toxins accumulation and sodium channel characteristics, as the sodium channel is known to be the first target of PST.

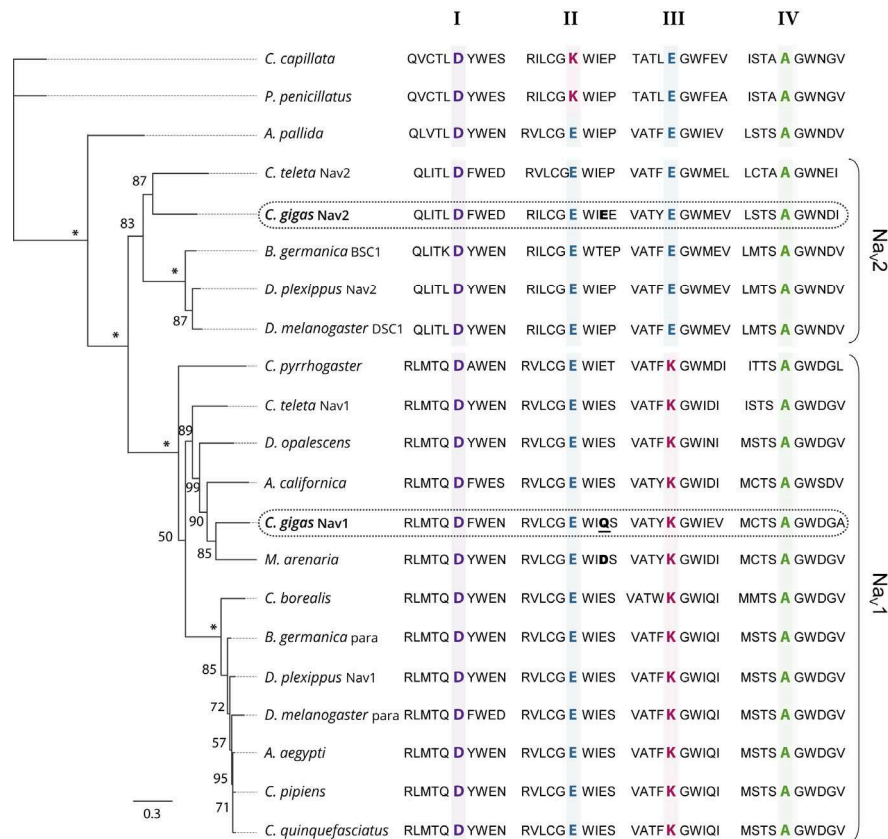


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of the voltage-gated sodium channel α subunit family. The ten amino acids of the selectivity filter, in each domain (I–IV), are represented and key amino acids for the selectivity in each domain (DKEA, DEEA, and DEKA) are highlighted and bold. The amino acid responsible of the sensitivity to STX is bold for *CgNav2* and *M. arenaria* Nav and bold and underlined for *CgNav1*. The numbers indicate the bootstraps score for 100 replications, with stars indicating scores of 100%. Species used for the phylogenetic analysis and the associated accession number of the Nav sequence: *Cyanea capillata* (AAA75572), *Polyorchis penicillatus* (AAC09306), *Aiptasia pallida* (AAB96953), *Capitella teleta* Nav2 (JGI protein ID 134859), *Crassostrea gigas* Nav2 (EKC21550), *Blattella germanica* BSC1 (AAK01090), *Danaus plexippus* Nav2 (EHJ64356), *Drosophila melanogaster* DSC1 (ABF70206), *Capitella teleta* Nav1 (JGI protein ID 210954), *Cynops pyrrhogaster* (AAD17315), *Doryteuthis opalescens* (AAA16202A), *Aplysia californica* (NP_001191637), *Mya arenaria* (AAX14719), *Crassostrea gigas* Nav1 (EKC22630), *Cancer borealis* (ABL10360), *Blattella germanica* para (AAC47483), *Danaus plexippus* Nav1 (EHJ74501), *Drosophila melanogaster* para (AAB59195), *Aedes aegypti* (ACB37023), *Culex pipiens* (AGO33659), *Culex quinquefasciatus* (AGO33660) (See Table 4 for references).

2.2. Structure of *CgNav1* α Subunit

The *CgNav1* α subunit was amplified and sequenced step by step using 8 overlapping cDNA fragments covering the entire open reading frame (ORF) (Figure 1). The 8 overlapping fragments correspond to: 575 bp from 5'UTR to segment 1 of domain I (IS1), 444 bp from IS1 to IS5-IS6, 1813 bp from IS1 to IS6-IIS1, 904 bp from IS6-IIS1 to IIS6-IIIS1, 1337 bp from IIS6-IIIS1 to IIIS6-IVS1, 736 bp from IIIS6 to IVS5-IVS6, 724 bp from IVS5-IVS6 to stop codon and 533 bp from stop codon to 3'UTR. The consensus sequence created using Geneious software has been compared to the Nav9 α subunit genomic reference sequence (CGI_10001852). This allowed the identification of 25 exons (including

an alternate exon, see Section 2.4) and 24 introns (Figure 3). The exons were numbered from 1 to 25. The size of exons ranges from 27 bp to 1235 bp and the size of introns ranges from 89 bp to 2389 bp.

CGI_10001852	-----	0
VariantA	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQAEHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
VariantB	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQAEHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
VariantC	MEEEFFRLLTPQSLVQIDERIAEEKAFKKAQAEHEEGEEELAAHEEEEPKPNPKFEA	60
CGI_10001852	-----	0
VariantA	GKKLP LSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFV VVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFPN	120
VariantB	GKKLP LSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFV VVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFPN	120
VariantC	GKKLP LSLKDLFPVEYTSKPLEDFDEFYDTQKTFV VVGKDMTIYRFSATNAVYLLSPFPN	120
CGI_10001852	-----	0
VariantA	LRRGALY VLVHPLFSALIIITIIINCFAMATE VPAGW TEYVFTGVYVLEAMIKIT ARGF	180
VariantB	LRRGALY VLVHPLFSALIIITIIINCFAMATE VPAGW TEYVFTGVYVLEAMIKIT ARGF	180
VariantC	LRRGALY VLVHPLFSALIIITIIINCFAMATE VPAGW TEYVFTGVYVLEAMIKIT ARGF	180
	IS1 IS2	
CGI_10001852	-----	0
VariantA	IINNFTYLRD PWNWLDFAVISLAYVTE VVDLGNLSALRTRFRVLRALKTVAVIPGLKTI	240
VariantB	IINNFTYLRD PWNWLDFAVISLAYVTE VVDLGNLSALRTRFRVLRALKTVAVIPGLKTI	240
VariantC	IINNFTYLRD PWNWLDFAVISLAYVTE VVDLGNLSALRTRFRVLRALKTVAVIPGLKTI	240
	IS3 IS4	
CGI_10001852	-----MGLRQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	29
VariantA	ALLEAVRRLRD VMILTVFMLSIFALVGMOLYMGTL RQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
VariantB	ALLEAVRRLRD VMILTVFMLSIFALVGMOLYMGTL RQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
VariantC	ALLEAVRRLRD VMILTVFMLSIFALVGMOLYMGTL RQKCVTFANFTYDNSTEGNDTLKSF	300
	IS5 *****	
CGI_10001852	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDHTNPDNFTDFDNFG	89
VariantA	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDHTNPDNFTDFDNFG	360
VariantB	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDHTNPDNFTDFDNFG	360
VariantC	DEAWYEWAMDTENWKQIEGTGFLICGNASGAGECPSEYICINDHTNPDNFTDFDNFG	360

CGI_10001852	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSA FVIVILLGFSYLVNLLAILAVMSYDET	149
VariantA	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSA FVIVILLGFSYLVNLLAILAVMSYDET	420
VariantB	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSA FVIVILLGFSYLVNLLAILAVMSYDET	420
VariantC	TALLCTFRLMTCDFWENLYQITLRAEGPYHSA FVIVILLGFSYLVNLLAILAVMSYDET	420
	***** IS6	
CGI_10001852	QKQDQADAEAEERK DDNSCAHSS IQQTMHDELREDDYHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	209
VariantA	QKQDQADAEAEERK DDNSCAHSS IQQTMHDELREDDYHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	480
VariantB	QKQDQADAEAEERK -----IQQTMHDELREDDYHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	471
VariantC	QKQDQADAEAEERK -----IQQTMHDELREDDYHEYLEEKMSQAKSQSDTSLSDH	471
	***** Exon 5	
CGI_10001852	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK QPSLSLPGTFFVRRNTKKYKPNHADHQPLMLDNL	269
VariantA	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK QPSLSLPGTFFVRRNTKKYKPNHADHQPLMLDNL	504
VariantB	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK QPSLSLPGTFFVRRNTKKYKPNHADHQPLMLDNL	531
VariantC	ENADKISLRSNKPDENGQFLSVMKK QPSLSLPGTFFVRRNTKKYKPNHADHQPLMLDNL	495
	***** Exon 7	
CGI_10001852	PFIDDPAVTFCSDDLTMNLTYSKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRLPKS	329
VariantA	PFIDDPAVTFCSDDLTMNLTYSKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRLPKS	504
VariantB	PFIDDPAVTFCSDDLTMNLTYSKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRLPKS	591
VariantC	PFIDDPAVTFCSDDLTMNLTYSKQFIASRRGSYASLLKRTGSSRRSSFASRDSRRLPKS	495
CGI_10001852	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLPHDAGDRGKLVN SGINGSRMDIEKKSHDGEIC	389
VariantA	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLPHDAGDRGKLVN SGINGSRMDIEKKSHDGEIC	525
VariantB	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLPHDAGDRGKLVN SGINGSRMDIEKKSHDGEIC	651
VariantC	PRSPLEKPGKLDTPWDWKKPKDSSLLPHDAGDRGKLVN SGINGSRMDIEKKSHDGEIC	516

CGI_10001852	HPHGGKHVDPRDMVVKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPEEEEEPLKDRLYKRFCSWTC	449
VariantA	HPHGGKHVDPRDMVVKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPEEEEEPLKDRLYKRFCSWTC	585
VariantB	HPHGGKHVDPRDMVVKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPEEEEEPLKDRLYKRFCSWTC	711
VariantC	HPHGGKHVDPRDMVVKSLLAHAEGHRNSRHSVMSDYLPEEEEEPLKDRLYKRFCSWTC	576

CGI_10001852	CPCYLKFQEIIVGLIVLDAFVDFLFTTICILANTA FMAADQHPKSPBELTEILQNGNYASVET	509
VariantA	CPCYLKFQEIIVGLIVLDAFVDFLFTTICILANTA FMAADQHPKSPBELTEILQNGNY--VET	643
VariantB	CPCYLKFQEIIVGLIVLDAFVDFLFTTICILANTA FMAADQHPKSPBELTEILQNGNY--VET	769
VariantC	CPCYLKFQEIIVGLIVLDAFVDFLFTTICILANTA FMAADQHPKSPBELTEILQNGNY--VET	634
	***** II S1 II S2	
CGI_10001852	AIFASEAFLKLIALS PMYYFRD GWNCDFLIVFLSFLMALD GVSGLSVLRSFRLLRVFK	569
VariantA	AIFASEAFLKLIALS PMYYFRD GWNCDFLIVFLSFLMALD GVSGLSVLRSFRLLRVFK	703
VariantB	AIFASEAFLKLIALS PMYYFRD GWNCDFLIVFLSFLMALD GVSGLSVLRSFRLLRVFK	829
VariantC	AIFASEAFLKLIALS PMYYFRD GWNCDFLIVFLSFLMALD GVSGLSVLRSFRLLRVFK	694
	***** II S3 II S4	
CGI_10001852	LARSWQTL NMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFIFAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	629
VariantA	LARSWQTL NMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFIFAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	763
VariantB	LARSWQTL NMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFIFAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	889
VariantC	LARSWQTL NMLIRIVAGTMGALGNLIFVLAIVVFIFAVMGQQLFRDGYIAEYGDMPRWS	754
	***** II S5	
CGI_10001852	FTDFLHSMIIFRVLCGEWIQSMWGCT NANGPICVPPFLLTYVIGNLVNLFLALLLNS	689
VariantA	FTDFLHSMIIFRVLCGEWIQSMWGCT NANGPICVPPFLLTYVIGNLVNLFLALLLNS	823
VariantB	FTDFLHSMIIFRVLCGEWIQSMWGCT NANGPICVPPFLLTYVIGNLVNLFLALLLNS	949
VariantC	FTDFLHSMIIFRVLCGEWIQSMWGCT NANGPICVPPFLLTYVIGNLVNLFLALLLNS	814
	***** II S6	
CGI_10001852	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKFRGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	749
VariantA	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKFRGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	883
VariantB	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKFRGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	1009
VariantC	FGAESLSGGESEEDKEPNKLSAIDRFKFRGRWVKVIVCLVKVMKAKPKANEREPSPR	874

Figure 3. Cont.

CGI_10001852	VNGKETIPDGEATFSNGTLEMQTKFDDDEISVQ-----DKSTTIVVEDEKKA	798
VariantA	VNGKETIPDGEATFSNGTLEMQTKFDDDEISVQ GDVDLVDNHS PKSTTIVVEDEKKA	943
VariantB	VNGKETIPDGEATFSNGTLEMQTKFDDDEISVQ-----DKSTTIVVEDEKKA	1058
VariantC	VNGKETIPDGEATFSNGTLEMQTKFDDDEISVQ GDVDLVDNHS PKSTTIVVEDEKKA	934
***** Exon 15 *****		
CGI_10001852	DTRRPNRASPRELSSNSHHSDDDTKLSLTKVDADGEPINEVKVTYANYPDDCFCK	858
VariantA	DTRRPNRASPRELSSNSHHSISDDDTKLSLTKVDADGEPINEVKVTYANYPDDCFCK	1003
VariantB	DTRRPNRASPRELSSNSHHSISDDDTKLSLTKVDADGEPINEVKVTYANYPDDCFCK	1118
VariantC	DTRRPNRASPRELSSNSHHSISDDDTKLSLTKVDADGEPINEVKVTYANYPDDCFCK	994

CGI_10001852	ICRRKPCPCIRFENTKWGKKAWKIRCLAYAL LVHKYFETPTITMILASSIALA IEDVYLE	918
VariantA	ICRRKPCPCIRFENTKWGKKAWKIRCLAYAL LVHKYFETPTITMILASSIALA IEDVYLE	1063
VariantB	ICRRKPCPCIRFENTKWGKKAWKIRCLAYAL LVHKYFETPTITMILASSIALA IEDVYLE	1178
VariantC	ICRRKPCPCIRFENTKWGKKAWKIRCLAYAL LVHKYFETPTITMILASSIALA IEDVYLE	1054
***** IIIS1 *****		
CGI_10001852	ERPTLE QLIETDKFFTTFVLIEMFIKWTAFGFKKYFTD AWCWLD FVIVGISIVMLVFEL	978
VariantA	ERPTLE QLIETDKFFTTFVLIEMFIKWTAFGFKKYFTD AWCWLD FVIVGISIVMLVFEL	1123
VariantB	ERPTLE QLIETDKFFTTFVLIEMFIKWTAFGFKKYFTD AWCWLD FVIVGISIVMLVFEL	1238
VariantC	ERPTLE QLIETDKFFTTFVLIEMFIKWTAFGFKKYFTD AWCWLD FVIVGISIVMLVFEL	1114
***** IIIS2 IIIS3 *****		
CGI_10001852	LGMEK VGAIKAMRTLRLRPLRAVSR MEGMRVVNALIKAIPSIAN VMVCLIFWLIFGI	1038
VariantA	LGMEK VGAIKAMRTLRLRPLRAVSR MEGMRVVNALIKAIPSIAN VMVCLIFWLIFGI	1183
VariantB	LGMEK VGAIKAMRTLRLRPLRAVSR MEGMRVVNALIKAIPSIAN VMVCLIFWLIFGI	1298
VariantC	LGMEK VGAIKAMRTLRLRPLRAVSR MEGMRVVNALIKAIPSIAN VMVCLIFWLIFGI	1174
***** IIIS4 IIIS5 *****		
CGI_10001852	VGVPFPAK FYKCVDEGNKLSVNI TKNFECLEKNY TWNSKINFDV MLMSYALQVA	1098
VariantA	VGVPFPAK FYKCVDEGNKLSVNI TKNFECLEKNY TWNSKINFDV MLMSYALQVA	1243
VariantB	VGVPFPAK FYKCVDEGNKLSVNI TKNFECLEKNY TWNSKINFDV MLMSYALQVA	1358
VariantC	VGVPFPAK FYKCVDEGNKLSVNI TKNFECLEKNY TWNSKINFDV MLMSYALQVA	1234

CGI_10001852	TYKGWIEVMNDAIDSKIEDQPEREVN VMYLYFVFII FGS FPTLNLFGVLIEN FNQ	1158
VariantA	TYKGWIEVMNDAIDSKIEDQPEREVN VMYLYFVFII FGS FPTLNLFGVLIEN FNQ	1303
VariantB	TYKGWIEVMNDAIDSKIEDQPEREVN VMYLYFVFII FGS FPTLNLFGVLIEN FNQ	1418
VariantC	TYKGWIEVMNDAIDSKIEDQPEREVN VMYLYFVFII FGS FPTLNLFGVLIEN FNQ	1294
***** IIIS6 *****		
CGI_10001852	KKKAGGSLEMFMTDQKKYKAMKRMAAKSPQKSI PRPGAGGSLEMFMTDQKKY MAMK	1218
VariantA	KKKAGGSLEMF-----MTDQKKY MAMK	1327
VariantB	KKKAGGSLEMF-----MTDQKKY MAMK	1442
VariantC	KKKAGGSLEMF-----MTDQKKY MAMK	1318

CGI_10001852	RMSKSPQKSI PRPSNI IMGWIFDA VTN Q KFDIGIMII ILIN MLTMALEHYKQSQMFTTI	1278
VariantA	RMSKSPQKSI PRPSNI IMGWIFDA VTN Q KFDIGIMII ILIN MLTMALEHYKQSQMFTTI	1387
VariantB	RMSKSPQKSI PRPSNI IMGWIFDA VTN Q KFDIGIMII ILIN MLTMALEHYKQSQMFTTI	1502
VariantC	RMSKSPQKSI PRPSNI IMGWIFDA VTN Q KFDIGIMII ILIN MLTMALEHYKQSQMFTTI	1378
***** IVS1 *****		
CGI_10001852	LNHNMSFIIIFTVECVLKLIGLRHFYFK FPWN IFDFVV VLSILGVALSDVM DQFLVSP	1338
VariantA	LNHNMSFIIIFTVECVLKLIGLRHFYFK FPWN IFDFVV VLSILGVALSDVM DQFLVSP	1447
VariantB	LNHNMSFIIIFTVECVLKLIGLRHFYFK FPWN IFDFVV VLSILGVALSDVM DQFLVSP	1562
VariantC	LNHNMSFIIIFTVECVLKLIGLRHFYFK FPWN IFDFVV VLSILGVALSDVM DQFLVSP	1438
***** IVS2 IVS3 *****		
CGI_10001852	TLLRVRVFRVGRVLRVRSAGKIR TLLFSLAVSLPALFN IALLLFLVMFIYATFGMSFF	1398
VariantA	TLLRVRVFRVGRVLRVRSAGKIR TLLFSLAVSLPALFN IALLLFLVMFIYATFGMSFF	1507
VariantB	TLLRVRVFRVGRVLRVRSAGKIR TLLFSLAVSLPALFN IALLLFLVMFIYATFGMSFF	1622
VariantC	TLLRVRVFRVGRVLRVRSAGKIR TLLFSLAVSLPALFN IALLLFLVMFIYATFGMSFF	1498
***** IVS4 IVS5 *****		
CGI_10001852	MHVKHQYGI DDCFNFETFFRSMIYLFQ MCTS AGWDGALAGITNEEDCNKETVRF DNGTTI	1458
VariantA	MHVKHQYGI DDCFNFETFFRSMIYLFQ MCTS AGWDGALAGITNEEDCNKETVRF DNGTTI	1567
VariantB	MHVKHQYGI DDCFNFETFFRSMIYLFQ MCTS AGWDGALAGITNEEDCNKETVRF DNGTTI	1682
VariantC	MHVKHQYGI DDCFNFETFFRSMIYLFQ MCTS AGWDGALAGITNEEDCNKETVRF DNGTTI	1558

CGI_10001852	YSDCGNK AGVMLFSYLVISFLVVVNM YIAVLENF SQATE DVQ QGLTSD DEFD LFYK W	1518
VariantA	YSDCGNK AGVMLFSYLVISFLVVVNM YIAVLENF SQATE DVQ QGLTSD DEFD LFYK W	1627
VariantB	YSDCGNK AGVMLFSYLVISFLVVVNM YIAVLENF SQATE DVQ QGLTSD DEFD LFYK W	1742
VariantC	YSDCGNK AGVMLFSYLVISFLVVVNM YIAVLENF SQATE DVQ QGLTSD DEFD LFYK W	1618
***** IVS6 *****		
CGI_10001852	EFKFDPEAT KFIQLS QSD FVDYLEEPLRLPKNH FMLVKLD IPICEDDKVYCRD ILDALT	1578
VariantA	EFKFDPEAT KFIQLS QSD FVDYLEEPLRLPKNH FMLVKLD IPICEDDKVYCRD ILDALT	1687
VariantB	EFKFDPEAT KFIQLS QSD FVDYLEEPLRLPKNH FMLVKLD IPICEDDKVYCRD ILDALT	1802
VariantC	EFKFDPEAT KFIQLS QSD FVDYLEEPLRLPKNH FMLVKLD IPICEDDKVYCRD ILDALT	1678

CGI_10001852	KNFLGTS DPG EIDVNEVDK KEKIEYHVT SSTLMR QKEHYAARVIQAWRRYRNEKGNL	1638
VariantA	KNFLGTS DPG EIDVNEVDK KEKIEYHVT SSTLMR QKEHYAARVIQAWRRYRNEKGNL	1747
VariantB	KNFLGTS DPG EIDVNEVDK KEKIEYHVT SSTLMR QKEHYAARVIQAWRRYRNEKGNL	1862
VariantC	KNFLGTS DPG EIDVNEVDK KEKIEYHVT SSTLMR QKEHYAARVIQAWRRYRNEKGNL	1738

CGI_10001852	PSPPPYDMV ISKESDMVTSKESDMATS KSDTATT I HEDT ASTKSVKSDT STKQTAGSS	1698
VariantA	PSPPPYDMV ISKESDMVTSKESDMATS KSDTATT I HEDT ASTKSVKSDT STKQTAGSS	1807
VariantB	PSPPPYDMV ISKESDMVTSKESDMATS KSDTATT I HEDT ASTKSVKSDT STKQTAGSS	1922
VariantC	PSPPPYDMV ISKESDMVTSKESDMATS KSDTATT I HEDT ASTKSVKSDT STKQTAGSS	1798

CGI_10001852	IDVHIEI PESEITE TAMLS PENRTVELRADSDVVA 1734	
VariantA	IDVHIEI PESEITE TAMLS PENRTVELRADSDVVA 1843	
VariantB	IDVHIEI PESEITE TAMLS PENRTVELRADSDVVA 1958	
VariantC	IDVHIEI PESEITE TAMLS PENRTVELRADSDVVA 1834	

Figure 3. Alignment of *CgNav1* α subunit protein sequences: the reference sequence CGI_10001852, variant A, variant B and variant C. The four homologous domains are annotated I, II, III and IV. The transmembrane segments (S1–S6) are highlighted in black. The motif DEKA responsible of selectivity for sodium ions, in S5–S6 linker, is highlighted in black. The spliced exons are boxed with bold line. The alternate exon 15 is boxed with dotted lines. Stars indicate shared amino acids.

2.3. CgNav1 DNA Polymorphism

The polymorphism was investigated in the DNA sequences of the region surrounding the PST binding sites of the 4 domains (I, II, III, and IV) of *CgNav1* α subunit. The size of amplicons was 428 bp, 136 bp, 328 bp and 301 bp for domains I, II, III and IV, respectively. In the 644 sequences analysed (4 regions sequenced per gene, analysed on 161 oysters sampled from all 4 populations) only 3 non-synonymous polymorphisms were identified. These are located outside of the 10 amino acids constituting the PST binding sites. Thus, the protein sequence of the PST binding site appeared perfectly conserved in all the individuals analysed. The number of SNP (Single Nucleotide Polymorphism), calculated per population and per domain of the *CgNav1* α subunit, varied from 0 to 5 in exonic regions and 2 to 7 in intronic zones (Table 1). The level of SNP was 1/61 bp in coding regions and 1/40 bp in non-coding regions. Global genetic diversity calculated as the mean Π t of the 4 domains was similar in all populations (Π t mean = 0.016).

Table 1. Analysis of the nucleotide polymorphism of regions including PST binding site for each domain (DI to DIV) of *C. gigas* Nav1 α subunit.

Domains	Populations	N	Pe	Pi	Le	Li	Π e	Π i	Π t
DI	LOG	15	1	3	117	311	0.009	0.010	0.009
	LB	12	1	2	117	311	0.009	0.060	0.007
	RE	20	1	3	117	311	0.009	0.010	0.009
	JAP	13	1	3	117	311	0.009	0.010	0.009
DII	LOG	48	5	-	136	-	0.037	-	0.037
	LB	46	5	-	136	-	0.037	-	0.037
	RE	42	5	-	136	-	0.037	-	0.037
	JAP	19	6	-	136	-	0.044	-	0.044
DIII	LOG	14	0	7	140	188	0	0.037	0.021
	LB	8	0	6	140	188	0	0.032	0.018
	RE	11	0	5	140	188	0	0.027	0.015
	JAP	7	0	5	140	188	0	0.027	0.015
DIV	LOG	26	4	-	301	-	0.013	-	0.013
	LB	25	5	-	301	-	0.017	-	0.017
	RE	25	5	-	301	-	0.017	-	0.017
	JAP	20	4	-	301	-	0.013	-	0.013

LOG: Logonna-Daoulas, LB: Larmor Baden, RE: St Clément des Baleines, JAP: Japan. N: number of oyster analysed, Pe: number of SNP in exon, Pi: number of SNP in intron, Le: exon length (bp), Li: intron length (bp), Π e: number of SNP per coding sites (Pe/Le), Π i: number of SNP per non-coding sites (Pi/Li), Π t: total number of SNP per sites ((Pe + Pi)/(Le + Li)), dash: no data.

2.4. Identification of CgNav1 Splice Variants

The cDNA fragments “a” to “h” (Figure 1) were individually amplified in 9 tissues of 5 oysters, to reveal potential splice variants. Splice variants were discriminated on the basis of size using electrophoresis. The fragment “c” (from 361 base pair (bp) to 2234 bp length) was the unique amplicon presenting size variations between samples. Sequencing analyses and alignment of *CgNav1* cDNA to CGI_10001852 revealed the existence of three different splice variants named A, B and C. The alignment of variant sequences on the CGI_10001852 reference sequence allowed determination of which exons were spliced (Figure 3). Sequences were deposited in GenBank with accession numbers KY020155, KY020156 and KY020157 for variant A, B and C, respectively.

Variant A lacks exon 7 (135 amino acids), which encodes a region of the intracellular inter-domain between domain I and II (ID I-II) rich in proline and serine residues. Variant B lacks exon 5 (9 amino acids), which also encodes a part of the ID I-II. Finally, variant C lacks both 5 and 7 exons. Exons 5 and 7 seem to be mutually exclusive exons, as no complete sequence with both exons has been found. Variants A and C also have retained a part of the intron 14 (33 bp), that could correspond to an alternate

exon, which is predicted to encode a part of the intracellular ID II-III. We named this alternate exon “15”. All the characteristics of transcript variants are summarized in Table 2 and Figure 4.

Table 2. Structural characteristics of splice variants of *C. gigas* Nav1 α subunit.

Name of Sequences	Total cDNA Size (bp)	Total Predicted Protein Size (aa)	Alternatively Spliced Fragments	Spliced cDNA Fragments Size (bp)	Spliced Protein Fragments Size (aa)
CGL_10001852	5205	1734	/	/	/
Variant A	5532	1844	–exon 7 +exon 15	–405 +33	–135 +11
Variant B	5877	1959	–exon 5	–27	–9
Variant C	5505	1835	–exons 5 and 7 +exon 15	–432 +33	–144 +11

Base pairs, bp; aa, amino acids.

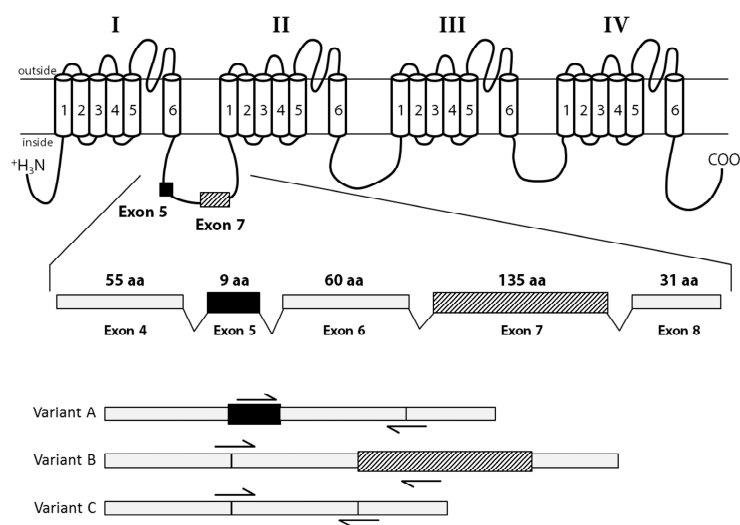


Figure 4. Alternative splicing of the *C. gigas* Nav1 α subunit. This channel is composed of four homologous domains (I–IV), each having six transmembrane segments (1–6). Location of alternatively spliced exons is noted on the protein structure with boxes. Detail of the mRNA structure is provided, where two alternative exons were found (exons 5 and 7), resulting in 3 splice isoforms (variants A, B and C). Variants-specific primers were represented by arrows.

Analyses of the predicted protein structure of splice variants showed that exon 5 has three serine residues, which are polar amino acids and could be phosphorylated. Exon 7 has many important residues. There are 15 proline residues at the beginning and the end of the exon 8 and 17 serine residues in the middle of the exon, all corresponding to many phosphorylation sites. The alternate exon 15, which is present in variants A and C, had only one proline residue. These results were confirmed by the prediction of the phosphorylated sites in both exons. Exon 5 has two protein kinase C (PKC) predicted sites; whereas, exon 7 had 12 protein kinase A (PKA) predicted sites.

2.5. Tissue-Level *CgNav1* α Subunit Expression Patterns

Expression of *CgNav1* channel was investigated by real-time PCR and by in situ hybridization (Figure 5) using primers amplifying a sequence common to all the variants. Real-time PCR analyses showed that *CgNav1* gene appeared predominantly expressed in visceral ganglia (relative quantification, $Q_r = 14$). *CgNav1* is also expressed in striated muscle ($Q_r = 3.2$). The expression of *CgNav1* in the gills ($Q_r = 2.3$) is twice as intense as in the mantle ($Q_r = 1$) and four times higher than in the labial palps ($Q_r = 0.5$). The *CgNav1* gene is expressed less in the smooth muscle ($Q_r = 0.3$) and almost absent in gonad ($Q_r = 0.2$), heart, and digestive gland ($Q_r = 0.1$ for both).

In situ hybridization showed that *CgNav1* is selectively expressed in the nerve cells of the visceral ganglia, located on the periphery of the ganglia (Figure 5A–C). *CgNav1* mRNA were also detected in the nerve cells of cerebral ganglia at the base of the labial palps but not in the adjacent connective tissue (Figure 5D). As in visceral ganglia, nerve cells are located on the periphery of the cerebral ganglia but seem less abundant. Clear staining was detected in the nerve cells of the branchial nerve near the gill axis (Figure 5E,F), and in the nerve cells of the circumpallial nerve which runs along the mantle edge Figure 5G). Staining spots of 5–6 μm -size were observed abundantly among the muscle fibres of the striated muscle and sporadically in mantle (Figure 5H); in both tissues, the staining was not localized in a delimited cell structure (Figure 5I). According to the description of the adductor muscle of the eastern oyster by Morrison [22], this staining could be localized in the nerve ending that often occurs close to the sarcolemma, corresponding to neuromuscular junctions. No signal was observed in the smooth muscle, neither inside the muscle fibres themselves nor in the nerve fibres. In all tissues, the observed staining of *CgNav1* mRNA corresponds to the nerve cell bodies or the neuromuscular junctions but not to the axons of the neurons.

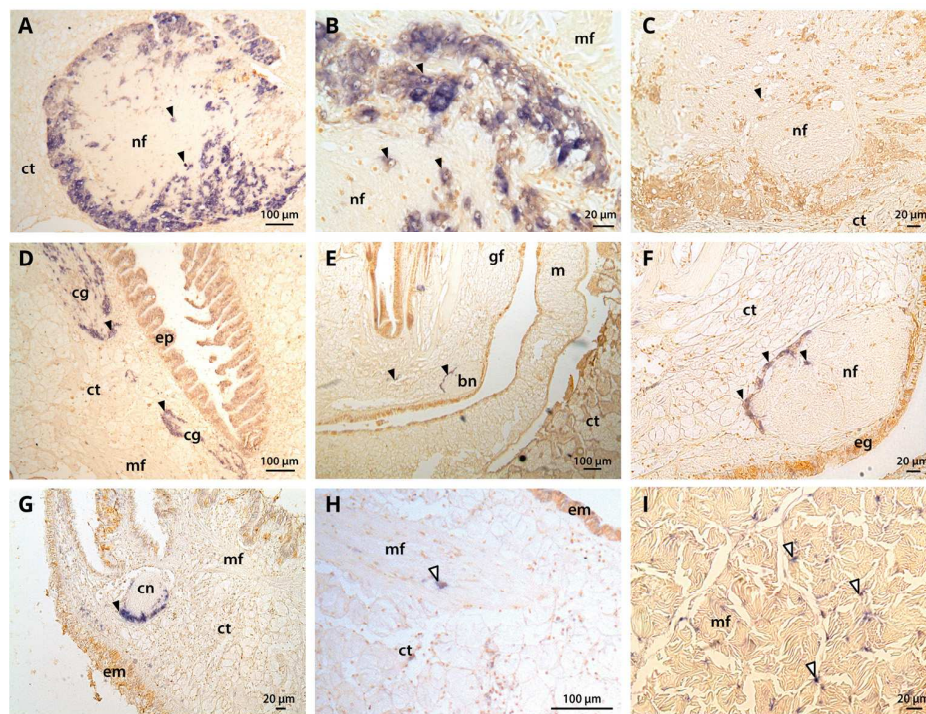


Figure 5. Tissue localization of the *C. gigas* Nav1 α subunit by in situ hybridization using DIG labelling. (A,B) nerve cells and nerve fibres constituting the visceral ganglion; (C) negative control for visceral ganglion; (D) cerebral ganglion located at the base of the labial palps; (E,F) branchial nerve at the base of the gills; (G) circumpallial nerve in the mantle edge; (H) neuromuscular junction in the mantle; (I) neuromuscular junctions and muscle fibres in striated muscle. Black arrow head corresponds to nerve cells (A, B, C, D, E, F, and G) and white arrow head to neuromuscular junctions (H and I) containing *CgNav1* mRNA. ct: connective tissue, nf: nerve fibres, mf: muscle fibres, cg: cerebral ganglion, ep: epithelial cells of labial palps, bn: branchial nerve, gf: gills filaments, m: mantle, eg: epithelial cells of gills, em: epithelial cells of mantle, cn: circumpallial nerve.

2.6. Expression Patterns of *CgNav1* α Subunit Splice Variants

The expression of the splice variants A, B and C of *CgNav1* α subunit was examined by real-time PCR using variant-specific primers (Table 3 and Figure 6). Variant A is most expressed in striated muscle ($Q_r = 10.4$), then in decreasing order, in mantle ($Q_r = 4.8$), smooth muscle ($Q_r = 0.6$), gills ($Q_r = 0.1$), and no expression was detected in visceral ganglia, labial palps, digestive gland, or heart.

Variant B is mainly expressed in visceral ganglia (Qr = 24.1) and weakly expressed, in decreasing order, in mantle (Qr = 2.4) (inter-organ comparisons, $n = 5$, $p < 0.001$), gills (Qr = 2.1), labial palps (Qr = 1.4) ($n = 5$, $p = 0.016$), digestive gland (Qr = 0.4), striated muscle (Qr = 0.2) ($n = 5$, $p = 0.01$), smooth muscle (Qr = 0.1) and heart (Qr = 0.1). Variant C also is highly expressed in visceral ganglia (Qr = 16.2), then more weakly in striated muscle (Qr = 4) ($n = 4$, $p = 0.009$), gills (Qr = 2.9), mantle (Qr = 2.3), labial palps (Qr = 0.4) ($n = 6$, $p < 0.001$), digestive gland (Qr = 0.1), smooth muscle (Qr = 0.1), and almost not expressed in heart (Qr = 0.02). These results indicate that variant A (with exon 5) is never expressed in visceral ganglia, digestive gland, or labial palps. Variant B (with exon 7) is almost never expressed in striated muscle.

Table 3. Primers used for in situ hybridization and real-time PCR. Accession number: GAPDH, XM_011446602 [23], EF1 α , AB122066.

Amplicon Names	Primer Names	Primer Sequences (5'–3')	Length (bp)
<i>Primers used for the in situ hybridization</i>			
Exon 24	<i>CgNav9_e25F</i>	AGGCGGGTGTATGTTCTTG	20
	<i>CgNav9_e25R</i>	GCGGTATCTTCGTGAATGGT	20
<i>Primers used in splice variants real-time PCR</i>			
Variant A	<i>CgNav9_a5F</i>	CTCTTGIGCTCATTCCAGCA	20
	<i>CgNav9_s7R</i>	GACCCATTTATTGACCCCTTCT	22
Variant B	<i>CgNav9_s5F</i>	CGAAAGATTCAACAAACAATGCATG	25
	<i>CgNav9_a7R1</i>	TTAAAGGTTGATGGTCAGCGTGATT	25
Variant C	<i>CgNav9_s5F</i>	CGAAAGATTCAACAAACAATGCATG	25
	<i>CgNav9_s7R</i>	GACCCATTTATTGACCCCTTCT	22
Variant D	<i>CgNav9_a5F</i>	CTCTTGIGCTCATTCCAGCA	20
	<i>CgNav9_a7R1</i>	TTAAAGGTTGATGGTCAGCGTGATT	25
GAPDH	qFw_GAPDH	GGAGACAAGCGAAGCAGCAT	20
	qRev_GAPDH	CACAAAATTGTCATTCAAGGCAAT	24
EF1 α	qfElongN	GATTGCCACACTGCTCACAT	20
	qrElongN	AGCATCTCCGTTCTTGATGC	20

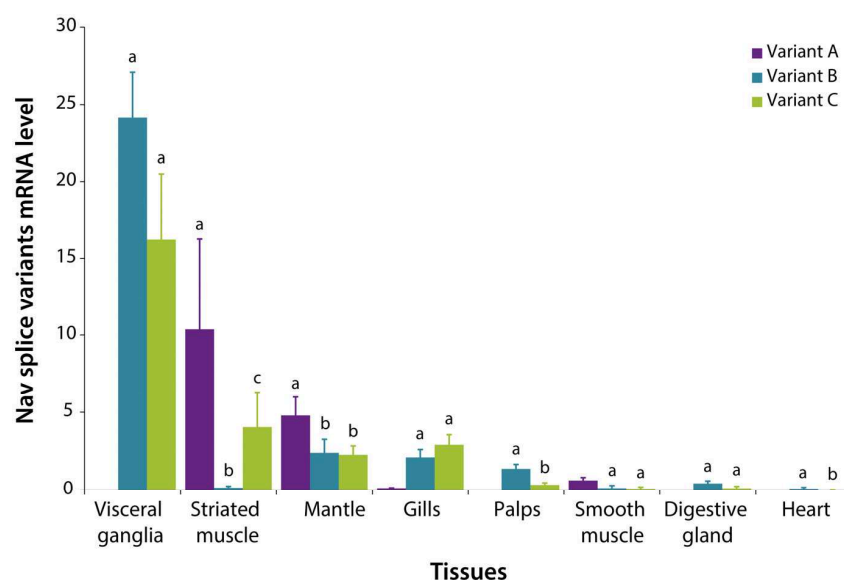


Figure 6. Expression of *CgNav1* α subunit splice variants A, B and C related to *EF1 α* and *GAPDH* genes measured by real-time PCR in tissues of *C. gigas* oyster. Relative quantity of Nav transcripts was calculated according to the E-method and using the mean of the two reference genes (Roche). Letters show significant differences between expression patterns of splice variants within the tissue. Homogeneous groups share letters.

2.7. Relationship between Expression of *CgNav1* α Subunit Splice Variants and PST Accumulation

PST accumulation in the digestive glands of oysters exposed to *A. minutum*, ranged from 2 to 302 (experiment 1) and from 2 to 900 (experiment 2) $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ of wet digestive gland, the organ that accumulated the most (Figure 7). As a result, the toxin content varied by a factor 150 (experiment 1) and 450 (experiment 2) between oysters. According to the results presented in Figure 6, only variants A and C are represented for striated muscle, and variants B and C in visceral ganglia, in both experiments (Figure 7). In the striated muscle, no statistical significant correlation was observed between the expression of *CgNav1* and toxin accumulation when the analyses were made on the full range of toxin accumulation values. However, *CgNav1A* and *CgNav1C* expression tended to increase according to PST accumulation for oysters with low toxin content ($<100 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ of digestive gland). In visceral ganglia, a high inter-individual variability of the expression levels of variants B and C were observed for oysters that have very low toxin content. No correlation was observed between toxin content and expression in this tissue.

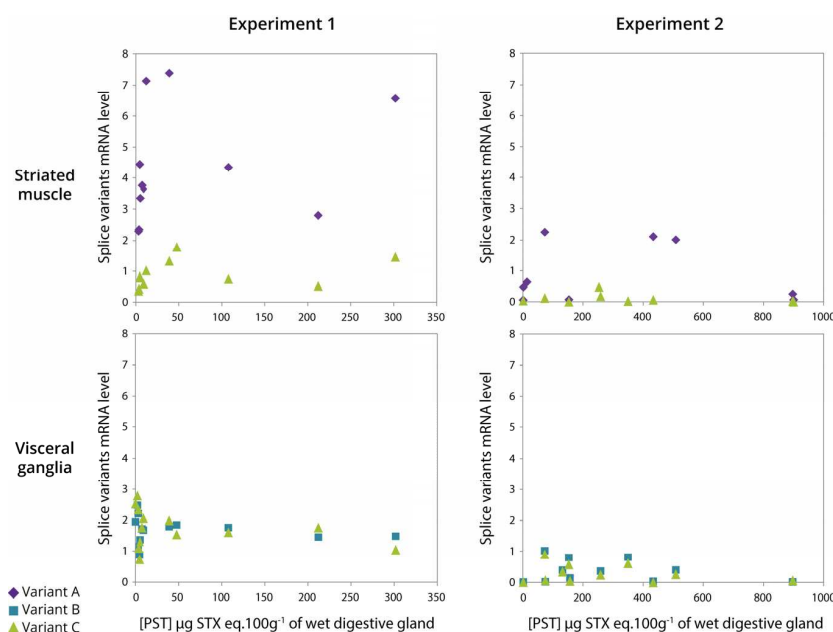


Figure 7. Relationship between *CgNav1* splice variants mRNA levels in striated muscle and visceral ganglia and PST accumulation in digestive gland of *C. gigas* oyster experimentally exposed to *Alexandrium minutum* (Experiments 1 and 2).

3. Discussion

3.1. Two Genes Encoding Two Types of Nav Channels (*Nav1* and *Nav2*) in *C. gigas*

The main objectives of our study were to characterize the voltage-gated sodium channel α subunit in the Pacific oyster *C. gigas* and explore a potential relationship between expression and PST bioaccumulation. In NCBI databases, two sequences are annotated as Nav genes (*Nav9* and *Nav5*) for *C. gigas* [21]. Our results revealed that *Nav9* and *Nav5* cluster, respectively, with *Nav1*-type and *Nav2*-type genes and we, therefore, proposed to rename the *C. gigas* Nav genes *CgNav1* (*Nav9*, EKC22630) and *CgNav2* (*Nav5*, EKC21550). The sequence EKC22630 appeared incomplete, although it results from the oyster genome sequencing. This underlines the necessity to check different databases or to control candidate sequences by amplification and sequencing to obtain the most accurate reference sequence as highlighted by Rivière et al. [24].

Voltage-gated sodium channels share the amino acid sequence DEKA (for domains I, II, III and IV, respectively) responsible for the selectivity filter of the pore (between S5 and S6 in each domain) [14,25].

Our results showed that the DEKA sequence is found in the *CgNav1* sequence as in the other Nav1-type proteins, but the protein *CgNav2* presents a DEEA sequence characteristic of Nav2-type proteins [26,27]. The lysine amino acid in the domain III of Nav1 channels enhances the selectivity for sodium [28,29]. Conversely, the glutamic acid found in Nav2 is characteristic of calcium channels. Site-directed mutagenesis studies in the cockroach, *Blattella germanica*, highlighted the likelihood that glutamic acid in domain III of *BSC1* gene plays a key role in the selectivity for calcium [30]. Similarly, in insects, the two genes *para* (DEKA) and *DSC1* (DEEA), were initially classified as sodium channels [12]. Recently, functional studies demonstrated that the *DSC1* gene could instead be a new type of voltage-gated cation channel [31]. A recent study proposed that the selectivity filter of choanoflagellates and metazoans (DEEA) is an intermediate between calcium channel (EEEE) and sodium channel (DEKA) and remains present in Nav2 of invertebrates [7]. These channels (DEEA) would be selective to both calcium and sodium ions [32]. Our results raise the issue of the nature and selectivity of *CgNav2* channel in the Pacific oyster. *CgNav2* could be a channel intermediate between the sodium and calcium channels. These uncertainties about the nature of *CgNav2* led the study to focus only on *CgNav1*, a member of the voltage-gated sodium channels known to be the target of PST.

3.2. *CgNav1* Genotype Could Confer a Certain Resistance of Oysters to PST

To investigate if the variability of PST accumulation between oysters is related to the existence of several forms of *CgNav1* with different sensitivity to PST, two hypotheses were explored: (i) genetic polymorphism in PST binding sites of *CgNav1* leads to different phenotypes of sensitivity to PST; (ii) alternative splicing of *CgNav1* produces protein isoforms with different sensitivity to PST.

DNA polymorphism analysis in *C. gigas* revealed that the 10 amino acids of the PST binding sites were strictly monomorphic, despite the high nucleotide polymorphism of *CgNav1*, similar to the global SNP level described for this species [33]. Nav are encoded by genes highly conserved through evolution. This probably reflects the critical functional role of these proteins in the regulation of excitability [34], in particular in the most conserved pore region, the critical zone for the selection of ions and their flow [16,35]. In softshell clams, PST resistance is conferred by the substitution of the glutamic acid into aspartic acid in the PST binding site of domain II of Nav channel [4]. For this species, exposure to PST constitutes a strong selection pressure because PST causes mortalities of sensitive clams, leading to the increase in the resistant allele in populations regularly exposed to *Alexandrium*. In the Pacific oyster, at the same position, a glutamine is observed for *CgNav1*. Sensitivity studies of rat Nav1.2 revealed that mutation E945Q in domain II leads to resistance to STX and decreases sodium conductance [17,36]. As a result, oysters could have some resistance to STX attributable to the glutamine, which is consistent with the absence of mortalities observed in Pacific oyster populations during *Alexandrium* blooms. The high frequency of this *CgNav1* "resistant" genotype in *C. gigas* populations could result from an ancestral polymorphism followed by selection under PST pressure in native Asian origins of the Pacific oyster, as the same genotype was found in the Japanese and French populations. This hypothesis needs to be confirmed by functional electrophysiological studies using heterologous expression of these genes in *Xenopus* oocytes as performed in insects [12].

3.3. *CgNav1* is Spliced in Tissue-Specific Variants

The three variants (A, B and C) characterized for *CgNav1* resulted from alternative splicing of the two exons 5 and 7, likely mutually exclusive because the complete form of the cDNA with exons 5 and 7 has never been detected. Our results showed that spliced exons were localised in the inter-domain region between domains I and II (ID I-II). This region is a common area of alternative splicing for voltage-gated sodium channels in many species, such as *Drosophila melanogaster* [37,38], *Musca domestica* [39], *Bombyx mori* [40], *Cancer borealis* [41], or in mammalian sodium channels [42,43]. In accordance with the role of Nav in excitable cells, *CgNav1* mRNA appeared to be expressed in nerve cells of the central nervous system of oysters composed of visceral and cerebral ganglia, as well as in the peripheral nervous system composed of nerves innervating the tissues, such as branchial (at the

base of the gills) or circumpallial (running along the mantle edge) nerves. Awad et al. specified in a study on rat that Nav1 mRNAs distribution generally corresponds to the localisation of the protein they encode [44]. As a result, *CgNav1* mRNAs localization would translate *CgNav1* channel distribution, even if further studies on protein are needed to confirm this pattern. The variant B was expressed in all the tissues; nerve cells of nerves or ganglia were stained by ISH, but not in the other tissues. The *CgNav1B* could be a form of *CgNav1* specific to nerve cells. Conversely, the variant A was only expressed in muscles or in tissues with abundant muscular fibres: in the striated muscle, the mantle, and to a lesser extent in the smooth muscle and gills. Expression of *CgNav1* observed in muscles of oysters is likely in relation to the function of Nav channels in neuromuscular communication. In fact, Nav channels are found in neuromuscular junctions and participate in the propagation of the action potential in the postsynaptic membrane, allowing the contraction of the muscle. As a result, *CgNav1A* and *CgNav1B* could be the specific form to neuromuscular junctions and nerve cells, respectively. The shortest form of *CgNav1*, the variant C seemed to present ubiquitous expression.

3.4. Potentially Different Pathways of Regulation Exist for *CgNav1*

The variant B of *CgNav1* expressed in the nervous system of oysters encodes a larger protein than proteins translated from variants A and C. This variant results from the retention of the exon 7, encoding a larger ID I-II with 12 putative protein kinase A sites. The ID I-II is known to be an important region for protein regulation because of its richness in PKA phosphorylation sites. The alternative splicing of exons containing PKA sites allow conditional phosphorylation of the Nav channels. Smith and Goldin demonstrated in the rat that the ID I-II of Nav channel is longer in brain than in skeletal muscle, and that the brain channel had many phosphorylation sites involved in PKA signalling pathways [45]. Similarly, in oysters the results suggest that only variant B of *CgNav1* could be modulated by PKA. It is also consistent with the presence of variant B in the nervous system and not in striated muscle. Accordingly, alternative splicing could be a mechanism involved in regulation of sodium channel expression in oysters. Phosphorylation of sodium channels by PKA and protein kinase C (PKC) has been shown to reduce the peak sodium current and modulates activation and inactivation phases [45]. A study in the cockroach identified two types of sodium current with two different signalling pathways, one of which was phosphorylation by PKA [46]. In parallel, in the same species, two current types were proposed to originate from the alternative splicing of one Nav gene [47]. Otherwise, this could suggest that variant B of *CgNav1*, exclusively present in the nervous system of the Pacific oyster, could be regulated by the PKA pathway, but variants A and C would be regulated by other pathways. In the same way, the different splice variants of *CgNav1* could generate different current types. Functional studies of each form of *CgNav1* would allow the study of electrophysiological properties of these channels.

3.5. The Level of PST Accumulation Would Be Independent of *CgNav1* Transcription Level

The exposure of oysters to the PST-producer *A. minutum*, caused large individual variability of toxin accumulation in the digestive gland of oysters, as reported in a previous study [20]. The expression of the 3 variants of *CgNav1* has been analysed and compared individually to toxin content. The variability of PST accumulation did not appear correlated to *Cg1* splice variant expression levels. However, in striated muscle, *CgNav1A* and *CgNav1C* expression tended to increase according to PST accumulation up to a threshold of 100 µg STX eq. 100 g⁻¹ of wet digestive gland. This could suggest that when toxins bind to the channel and block the nerve impulses, the oyster has to compensate and produce more channels to maintain a sufficient flow of sodium for cell function. Studies revealed that treatment with Nav channel blockers (like PST) increases cell-surface expression of Nav channels [48]; however, in visceral ganglia, no correlation was observed between *CgNav1* (B and C) expression and toxin content. The activity of *CgNav1B* could be regulated at post-translational level by PKA, as proposed in the previous section, rather than by modification of transcription rate. The *CgNav1C*, the shortest and less-expressed form, seemed to be regulated as *CgNav1A* in striated muscle but not in visceral ganglia and could have tissue-specific regulation. In these experiments,

oyster Nav channels seem to have an activity-dependent regulation to optimise activity and avoid hyper-excitability. When the toxin content in digestive gland exceeded $100 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$, the *CgNav1* mRNA synthesis in striated muscle did not increase further, possibly because of physiological disorders provoked by PST disturbing gene regulation processes. In oysters with the highest toxin content, ca. $900 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{g}^{-1}$ of digestive gland, *CgNav1* expression was near zero. This could correspond to the impossibility for oysters to maintain neuromuscular communication, leading to paralysis.

In conclusion, the alternative splicing of *CgNav1* gene in Pacific oysters may be a critical mechanism allowing the production of *CgNav1* channels adapted to different nervous functions. Specific regulation of *CgNav1* isoforms may result in different channel properties. Given the absence of protein polymorphism at the PST binding site of specific variants in oysters accumulating the less or the more PST, we can rule out the initial hypothesis that different forms of *CgNav1* could explain the inter-individual variability of the PST accumulation. Our results suggest that the blocking of Nav by PST in oysters could trigger the activation of regulatory pathways to modulate Nav channel expression. The protein sequence of *CgNav1* would confer to all the forms of oyster Nav1 a relative resistance to STX. To validate this hypothesis, the specific sensitivity of each *CgNav1* variant to PST needs to be investigated, using, for example, heterologous expression in *Xenopus* oocytes and an electrophysiological approach. Accordingly, in Pacific oysters the quantity of PST accumulated would result from individual variability in ecophysiological capacities such as filtration, detoxification or even biological rhythms rather than differential sensitivity of Nav channel.

4. Materials and Methods

4.1. Phylogenetic Analyses of the Voltage-Gated Sodium Channel α Subunit of *Crassostrea gigas*

Amino acid sequences alignment was based upon a multiple alignment method using MAFFT 7 [49]. Alignments were refined to select reliably-aligned positions by using Gblocks version 0.91b [50]. The substitution model LG (+I +G +F) used in this study was selected using ProtTest 3.4.2 [51]. The maximum likelihood phylogenetic tree was constructed using PhyML 3.0 [52], and tree robustness was assessed with 100 bootstrap replications. Tree visualization was performed using FigTree v1.4.2 [53]. Sequences used for the analysis are presented in Table 4.

Table 4. Protein sequences of Nav channel α subunit used for the phylogenetic tree construction.

Species Name	Nav Name	Common Name	GenBank Accession Number	Size (aa)	Reference
<i>Cyanea capillata</i>	<i>CcNav</i>	Lion's mane jellyfish	AAA75572	1740	[54]
<i>Polyorchis penicillatus</i>	<i>PpNav</i>	Hydrozoan jellyfish	AAC09306	1695	[55]
<i>Aiptasia pallida</i>	<i>ApNav</i>	Pale anemone	AAB96953	1810	[56]
<i>Capitella teleta</i>	<i>CtNav2</i>	Polychaete worm	JGI 134859 *	1694	
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>CgNav2</i> (Nav5)	Pacific oyster	EKC21550	1986	[21]
<i>Blattella germanica</i>	<i>BgNav2</i> (BSC1)	German cockroach	AAK01090	2304	[57]
<i>Danaus plexippus</i>	<i>DpNav2</i>	Monarch butterfly	EHJ64356	1991	[58]
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>DmNav2</i> (DSC1)	Fruit fly	ABF70206	2409	[59]
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	<i>CpNav</i>	Japanese common newt	AAD17315	2007	[60]
<i>Capitella teleta</i>	<i>CtNav1</i>	Polychaete worm	JGI 210954 *	1690	
<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>DoNav</i>	Opalescent inshore squid	AAA16202	1784	[61]
<i>Aplysia californica</i>	<i>AcNav1</i>	California sea hare	NP_001191637	1993	[62]
<i>Mya arenaria</i>	<i>MaNav</i>	Softshell clam	AAX14719	1435	[4]
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>CgNav1</i> (Nav9)	Pacific oyster	EKC22630	1734	[21]
<i>Cancer borealis</i>	<i>CbNav</i>	Jonah crab	ABL10360	1989	[63]
<i>Blattella germanica</i>	<i>BgNav1</i> (para)	German cockroach	AAC47483	2031	[64]
<i>Danaus plexippus</i>	<i>DpNav1</i> (para)	Monarch butterfly	EHJ74501	2112	[58]
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>DmNav1</i> (para)	Fruit fly	AAB59195	2131	[65]
<i>Aedes aegypti</i>	<i>AaNav1</i> (para)	Yellow fever mosquito	ACB37023	2140	[66]
<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>CpNav1</i> (para)	Northern house mosquito	AGO33659	2043	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>CqNav1</i> (para)	Southern house mosquito	AGO33660	2052	

* Predicted protein sequences from JGI Genome portal.

The oyster Nav2 was not studied for further experiments as its sequence suggested no selectivity for sodium ions only, meaning that it may not be a true Nav channel (see explanation in the result section).

4.2. Biological Material

4.2.1. *Crassostrea gigas* Oysters

For polymorphism analyses (Section 4.6), a study was conducted on 4 populations of *C. gigas*. Three French populations located on the west coast: Bay of Brest, North Brittany; Larmor Baden, South Brittany; Ile de Ré, Charente-Maritime, and regularly exposed to toxic bloom of PST ($n = 50$ per population) and one Japanese population ($n = 20$) located in the Bay of Sendai, known to be exposed to toxic blooms of PST for many years [67]. Gills were sampled from oysters and stored in ethanol for DNA extraction. For the characterization of Nav cDNA sequences (Section 4.7) and expression analysis (Sections 4.8 and 4.9), wild oysters were sampled in the Bay of Brest (Brittany, France). Nine different tissues were dissected from each individual: mantle, gills, heart, smooth muscle, striated muscle, labial palps, visceral ganglia, gonad, and digestive gland. Immediately after dissection, tissues were placed in RNA later solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until RNA extraction. For the study of *CgNav1* variant expression in experiments 1 and 2 (Section 4.3), oysters were obtained from the experimental hatchery of Ifremer in La Tremblade (Charente-Maritime, France), and from a shellfish farmer in the Bay of Arcachon (Gironde, France), respectively. Immediately after dissection, tissues were placed in RNA later solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until RNA extraction.

4.2.2. Microalgae Cultures

The dinoflagellates *Alexandrium minutum* Halim (1960) strain Daoulas 1257 (isolated from Brest Bay, France) and strain AM89BM (isolated from Morlaix Bay, France) were used for toxic algal exposure (experiment 1 and experiment 2, respectively), and the non-toxic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein, strain HT99PZ (isolated from Penzé Bay, France) was used as a control. Both dinoflagellate cultures were grown in L1 medium [68] at $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a light/dark cycle of 12:12 h and were harvested during exponential growth phase. Algal cell densities were determined by counts using Nageotte counting chamber (PolyLabo, France) under a light microscope.

4.3. Experimental Design for Oyster Exposure to PST

To test the possible relationship between *CgNav1* expression and PST accumulation, oysters were exposed to the toxic *A. minutum* or the non-toxic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* similar in size and shape to *A. minutum*. Both experiments were set up in two different phases: an acclimation period of 7 days to the non-toxic dinoflagellate followed by an exposure period of 4 or 6 days to the toxic dinoflagellate species or to the control. Each tank was supplied with microalgae using a peristaltic pump. Central air-lifts were used to homogenize microalgal concentration and water in each tank.

4.3.1. Experiment 1

Oysters were placed randomly in 18 L replicated tanks with 12 oysters per tank. During the acclimation period, all oysters were fed with a continuous flow of $19\text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ of seawater with *H. triquetra* ($10^6\text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$), then oysters were separated into two groups, exposed for 4 days to a continuous flow of $19\text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ of seawater with *A. minutum* strain Daoulas 1257 ($3.10^6\text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$; $n = 60$, 5 replicates of 12 individuals) or *H. triquetra* ($10^6\text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$; $n = 36$, 3 replicates of 12 individuals). At the end of the exposure period, digestive glands of oysters were dissected, weighed, frozen, and stored in liquid nitrogen until toxin analyses. Visceral ganglia and striated muscle also were dissected and stored in RNA later solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until mRNA expression analyses.

4.3.2. Experiment 2

Oysters were distributed randomly into six tanks, with 29–30 oysters per tank. During the acclimation period, oysters were fed with a continuous flow of 144 L·day⁻¹ of seawater with *H. triquetra* (10⁵ cells·L⁻¹). Then oysters were separated into two groups exposed for 6 days to a continuous flow of 144 L·day⁻¹ of seawater with *A. minutum* strain AM89BM (10⁵ cells·L⁻¹; *n* = 88; 3 replicates) or *H. triquetra* (10⁵ cells·L⁻¹; *n* = 88; 3 replicates). At the end of the exposure period, digestive glands, visceral ganglia, and striated muscle were sampled as in experiment 1.

4.4. Toxin Quantification by Liquid Chromatography/Fluorescence Detection

To extract the PST, 5 mL of 0.1 N hydrochloric acid were added, and the samples were mixed with a high-speed homogenizer (15,000 rpm) for 2 min. The pH was adjusted between 2.0 and 4.0, then the samples were centrifuged at 4200× *g* for 10 min at 4 °C. The supernatants were filtered on 10-kDa polyethersulfone (PES) filters, and the toxin content was analyzed using the liquid chromatography with fluorescence detection (LC/FD) PSP toxin analyses method of Van de Riet [69]. The toxins GTX, dc-GTX, dc-STX and STX were separated using a reverse chromatography column (Zorbax Bonus RP, 3.5 μM, 4.6 mm × 150 mm, Agilent Technologies, Massy, France) with a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The eluent pH and/or column temperature were optimized to separate dc-GTX3/GTX5/dc-GTX-2 and C1/C2. The toxin concentrations were determined using certified standards provided by CNRC (Halifax, NS, Canada).

4.5. DNA and RNA Extractions and cDNA Synthesis

Genomic DNA was extracted from oyster gills with the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of DNA were analysed with a Nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA was extracted using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following manufacturer's instructions. Samples were treated with RTS DNase™ kit (MO BIO Laboratories, Germantown, MD, USA) to avoid genomic DNA contamination. The concentration and purity of all RNA were estimated with a Nanodrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). RNA integrity was assessed by electrophoresis on agarose gel. cDNA synthesis was performed using 1 μg of total RNA primed with an Oligo(dT)₁₈ and reverse-transcribed into first strand cDNA with the RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, York, UK).

4.6. Single Nucleotide Polymorphism of *C. gigas* Nav1 α Subunit Gene

The DNA sequence of voltage-gated sodium channel α subunit (Nav1) of *C. gigas* was obtained from Zhang et al. [21]. This sequence (CGI_10001852) was first used as a reference sequence to design primers for DNA amplifications. The single nucleotide polymorphism of PST binding region was analysed by PCR amplification and sequencing (Figure 1). The region including the P segment of each domain of the Nav1, corresponding to the zone targeted by PST, was amplified by PCR with specific primer pairs (Table 5). Amplifications were performed in 25 μL of final reaction mixture. Each reaction contained 250 ng of DNA, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.1 μM of each primer, 5 μL of Buffer 5× and 1.5 U polymerase GoTaq Flexi DNA (Promega, Madison, WI, USA). Cycling conditions were 2 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation step for 45 s at 95 °C, annealing step for 45 s at 60 °C and elongation step for 45 s at 72 °C and a final step for 5 min at 72 °C. PCR products were verified by electrophoresis on agarose gel before sequencing (Sanger ABI 3730xl, GATC Biotech, Cologne, Germany). Chromatograms were checked and corrected by hand if needed and aligned to locate the SNP polymorphic site. A variation in the sequence was considered as a SNP only when its occurrence was above the threshold of 5% of the total number of oysters sampled. Nucleotide sequences then were translated into amino acid sequences to identify synonymous or non-synonymous mutations.

Table 5. Primers used for the amplification of PST binding site for domains I–IV and full length cDNA of *CgNav1* α subunit in *C. gigas* oyster.

Amplicon Names	Primer Names	Primer Sequences (5'–3')	Length (bp)	Amplicon Size (bp)
<i>Primers used for segment P region amplification</i>				
DI	<i>CgNav9_1f</i>	TGACACTCACACAAACCCAGA	21	491
	<i>CgNav9_1r</i>	AACGAGCCCAGCAGTATCAC	20	
DII	<i>CgNav9_2f</i>	TGTTCTTGCCATTGTGGTGT	20	214
	<i>CgNav9_2r</i>	AAAGAACGGGACACAGATCG	20	
DIII	<i>CgNav9_3f'2</i>	GGTGTGCCTCATTTTCTGGT	20	385
	<i>CgNav9_3r'2</i>	CTGCACCGATATTCTCAGCA	20	
DIV	<i>CgNav9_4f</i>	GACGTCATGGACCAATTCCT	20	353
	<i>CgNav9_4r</i>	TTACAACCCTCCTCGTTCGT	20	
<i>Primers used for the amplification of full length cDNA</i>				
a	<i>CgNav9_TF2</i>	GCTGTGTACGACTAAAATGGAG	22	425
	<i>CgNav9_e1R</i>	ACGCGCTGAATAATGGATG	19	
b	<i>CgNav9_Ch2F</i>	AGCCCCTTTAACCCACTCAG	20	863
	<i>CgNav9_1R</i>	AACGAGCCCAGCAGTATCAC	20	
c	<i>CgNav9_Ch2F</i>	AGCCCCTTTAACCCACTCAG	20	1873
	<i>CgNav9_Ch4R</i>	CAAAAGCATCCAACACGATG	20	
d	<i>CgNav9_Ch5F</i>	AGCGACTACCTTCTTTTCGAG	21	984
	<i>CgNav9_2Rs</i>	GCTTGGTTCTCTCTCGTTCG	20	
e	<i>CgNav9_Ch6F</i>	GGAAGATGGGTCAAAGTCAAAG	22	1172
	<i>CgNav9_3r'2</i>	GCGTCATTCATTACTIONTCGATCC	22	
f	<i>CgNav9_Ch8F</i>	CCTGAATCTGTTCATCGGTGT	21	801
	<i>CgNav9_4R</i>	TTACAACCCTCCTCGTTCGT	20	
g	<i>CgNav9_Ch9F</i>	CACGTTCCGGATGAGTTTCT	20	867
	<i>CgNav9_e25R</i>	GCGGTATCTTCGTGAATGGT	20	
h	<i>CgNav9_Ch10F</i>	ACTACCCGCAAGGGTTAT	19	590
	<i>CgNav9_TR</i>	GGGTTGATAACAGTGGGTGAA	21	

4.7. Amplification and Sequencing of the cDNA of *CgNav1* α Subunit

The full cDNA sequence was amplified step by step using the set of primers described in Table 5. The fragments “a” to “h” amplified to cover the full cDNA sequence are represented in Figure 1. A consensus sequence of the cDNA of *CgNav1* α subunit has been obtained from sequencing data using the Geneious software version 7.0.6 [70]. The fragments were amplified in 5 oysters and 9 tissues: striated and smooth muscles, mantle, visceral ganglia, heart, digestive gland, gills, gonad and labial palps. Amplification was performed in 50 μ L of final reaction mixture. Each reaction contained 2 μ L of cDNA, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.1 μ M of each primer (Table 5), 10 μ L of Buffer 5 \times and 1.5 U polymerase GoTaq Flexi DNA (Promega, Madison, WI, USA). Cycling conditions were 2 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles of denaturation step for 45 s at 95 $^{\circ}$ C, annealing step for 45 s at 60 $^{\circ}$ C and elongation step for 4 min at 72 $^{\circ}$ C and a final step for 5 min at 72 $^{\circ}$ C. Specificity of amplification were checked on agarose electrophoresis and cloned into pCR4-TOPO vector with the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) before sending to sequencing (Sanger ABI 3730xl). The characterization of splice variants was performed using PCR. Specific primers were designed to encompass the cytoplasmic loop linking domain I and domain II corresponding to fragment “c” which varies between variants.

4.8. Localization of *CgNav1* α Subunit mRNA Expression by In Situ Hybridization

The tissue localization of *CgNav1* mRNA was studied by in situ hybridization (ISH). For each individual, 4 transversal slices of 3 mm thickness were performed to study all sampled tissues: anterior region of the body (labial palps); anterior-middle region (digestive gland, gills, mantle, gonad); posterior-middle region (muscles, heart); posterior region (muscles, visceral ganglia). Samples were

fixed immediately in Davidson's fixative for 24 h at 4 °C, and then in ethanol 70% at 4 °C until inclusion, in RNase free conditions. Tissues were dehydrated and embedded in paraffin wax using classical histological protocol according to Howard et al. [71], then were sectioned to 5 µm thickness with a microtome. Sections were mounted on glass slides treated with polylysine.

Specific riboprobes were designed from the cDNA sequence of *C. gigas* Nav9 (CGI_10001852). A 643 bp fragment, designed from the cDNA sequence (CGI_10001852) of *CgNav1*, was used as the template to synthesize riboprobes specific to all variants of *CgNav1* (Table 3). The amplified sequence was cloned into pCR4-TOPO vector with the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sense and antisense riboprobes were synthesized by in vitro transcription from linearized plasmids (MEGAscript kit, Ambion, Austin, TX, USA). Digoxigenin (DIG) labeling was performed by the incorporation of modified nucleotides UTP-DIG with the DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

The in situ hybridization protocol was adapted from Santerre et al. [72]. Briefly, tissue sample sections were treated with 10 µg/mL proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 10 min, post-fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 7 min and pre-hybridized with yeast tRNA for 1 h 30 min at 50 °C. Hybridization was then performed by incubating tissue sections with DIG-labeled sense or antisense riboprobes in hybridization buffer (50% formamide, 4× saline-sodium citrate buffer (SSC), 2 mM EDTA, 1% Denhardt's solution, 10% dextran sulfate and 0.5 mg·mL⁻¹ of yeast tRNA) for 16 h at 55 °C. After extensive washes with 50% formamide, 2× SSC at 45 °C, 2X SSC and 1× SSC at 37 °C, revelation was performed by incubating sections with anti-DIG antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for 2 h at room temperature. Sections were then incubated in detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl) for 2–4 h in darkness. The mounting between slide and cover slip was performed with Canada balsam (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sections were examined and photographed using an optical microscope (Leica DM-IRB, Nussloch, Germany). Hybridization with sense riboprobes was used as negative control.

4.9. Expression of *CgNav1* mRNA by Real-Time PCR

Expression of *CgNav1* transcripts was studied by real-time PCR in 8 tissues of 6 oysters. The specificity of primers was validated by sequencing of PCR product and analysis of the melting profile. Each amplification was performed using LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in 10 µL final reaction mixture containing 5 µL of SYBR Green I Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 µL of each primer (10 µM) for Nav or reference genes *GAPDH* and *EF1α* (Table 3), 1 µL of cDNA, RNA DNase treated (negative control) or water (blank control) and 3 µL of free-RNase water. Cycling conditions were 10 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation step for 10 s at 95 °C, annealing step for 20 s at 57 °C and elongation step for 15 s at 72 °C. All PCR reactions were run in triplicate and crossing point (Cp) values used were the mean of this replicates. The efficiency of amplification was calculated from the slope of the standard curve constructed with five serial dilutions of a pool of cDNA (calibrator) from striated muscle and visceral ganglia in equal proportion. The expression stability of the reference genes (*EF1α*, *GAPDH* and *Actin*) was tested using NormFinder (Version 0.953) algorithm as an Excel add-in. The best stability value (0.003) was obtained for the combination of *EF1α* and *GAPDH* genes. As a result, *CgNav1* transcript levels were normalised using the geometric mean of *GAPDH* and *EF1α* as reference genes and quantified with the E-method using the LightCycler 480 software 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). mRNA levels of splice variants were expressed in relative quantity (Qr) compared to geometric mean of reference genes.

4.10. Data Analysis

BLAST searches were performed online at NCBI BLAST [73]. Multiple sequence alignments were carried out in Clustal Omega [74]. Exon-intron structure of sequences was assessed by aligning mRNA sequences to genomic sequences with the program MGAlign [75]. Donor and acceptor sites were

predicted using a splice site predictor, NNSPLICE version 0.9 [76]. The deduced amino acid sequences were calculated by the ExPASy Proteomics Server [77]. Analyses of the predicted 2D structure of protein isoform were performed with the HCA program (Hydrophobic Cluster Analysis) from Mobylye portal [78]. Phosphorylation sites were predicted by NetPhos 3.1 server [79] and protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) sites were predicted with KinasePhos 2.0 server [80] and pkaPS server [81]. All statistical analyses were executed with R 3.2.2 [82]. The validation of the optimal reference gene for the normalization of real-time PCR data was performed using the NormFinder version 0.953 algorithm as an Excel add-in. Log (natural) transformed Cp values were used as input data. The analysis of the reference genes stability was completed by multiple-comparison test with Tukey's HSD method. Comparisons of mRNA levels (relative to geometric mean of *EF1 α* and *GAPDH* mRNA) between splice variants were performed with a Kruskal-Wallis test, followed by a non-parametric post-hoc with the Wilcoxon signed rank test. Pearson's correlation was applied to assess relation between toxins accumulation and Nav mRNA expression. No correlation was applied when samples are less than three.

Acknowledgments: The authors are grateful to Sylvie Lapègue, Lionel Degremont and Serge Heurtebise for providing oysters, to Luca Bargeloni for phylogenetic analysis pipeline, to Arnaud Huvet for his help in oysters sampling in experiment 2, to Véronique Savar, Korian Lhaute and Georges Rovillon for their technical assistance in toxins analysis, and to Maëva Leitwen, Antoine Beuzit and Anne-Laure Cassone for technical assistance in molecular analysis. Authors thank Gary Wikfors for his help with editing the English and his advice on the manuscript. This study was carried out with the financial support of the National Research Agency (ANR) "ACCUTOX" project 13-CESA-0019 (2013–2017), the LabexMer axis 6 "Regitox" project, and the Brittany Region and the University of Occidental Brittany (UBO) for funding the PhD of Floriane Boullot.

Author Contributions: F.B., H.H., L.P., M.P., D.T., C.F., P.S. and P.B. designed the experiments; F.B., L.P., A.B., J.C., N.D. and Z.A. performed the experiments; F.B., A.B., J.C., Z.A. and C.F. analysed the data; F.B. and C.F. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Dolah, F.M. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 133–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Manfrin, C.; De Moro, G.; Torboli, V.; Venier, P.; Pallavicini, A.; Gerdol, M. Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates. *Invertebr. Surviv. J.* **2012**, *9*, 184–199.
3. Sellner, K.G.; Doucette, G.J.; Kirkpatrick, G.J. Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 383–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bricelj, V.M.; Connell, L.; Konoki, K.; MacQuarrie, S.P.; Scheuer, T.; Catterall, W.A.; Trainer, V.L. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* **2005**, *434*, 763–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Catterall, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **2000**, *26*, 13–25. [[CrossRef](#)]
6. Cestèle, S.; Catterall, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **2000**, *82*, 883–892. [[CrossRef](#)]
7. Zakon, H.H. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: The first 800 million years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10619–10625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Catterall, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 493–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Chopra, S.S.; Watanabe, H.; Zhong, T.P.; Roden, D.M. 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.* **2007**, *7*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Feng, G.; Deak, P.; Chopra, M.; Hall, L.M. Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances drosophila *para* sodium channel function. *Cell* **1995**, *82*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
11. Gurnett, C.A.; Campbell, K.P. Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27975–27978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Dong, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebr. Neurosci.* **2007**, *7*, 17–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yu, F.H.; Catterall, W.A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* **2003**, *4*, 1–7.
14. Anderson, P.A.V.; Roberts-Misterly, J.; Greenberg, R.M. The evolution of voltage-gated sodium channels: Were algal toxins involved? *Harmful Algae* **2005**, *4*, 95–107. [[CrossRef](#)]
15. Al-Sabi, A.; McArthur, J.; Ostroumov, V.; French, R.J. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Mar. Drugs* **2006**, *4*, 157–192. [[CrossRef](#)]
16. Marban, E.; Yamagishi, T.; Tomaselli, G.F. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* **1998**, *508*, 647–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Terlau, H.; Heinemann, S.H.; Stühmer, W.; Pusch, M.; Conti, F.; Imoto, K.; Numa, S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 93–96. [[CrossRef](#)]
18. Bricelj, V.M.; MacQuarrie, S.; Twarog, B.M.; Trainer, V.L. Characterization of sensitivity to PSP toxins in North American populations of the softshell clam *Mya arenaria*. In *Harmful Algae 2002*; Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A., Eds.; Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Paris, France, 2004; pp. 172–174.
19. Tan, J.; Liu, Z.; Nomura, Y.; Goldin, A.L.; Dong, K. Alternative splicing on an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5300–5309. [[PubMed](#)]
20. Haberkorn, H.; Tran, D.; Massabuau, J.C.; Ciret, P.; Savar, V.; Soudant, P. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62*, 1191–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zhang, G.; Fang, X.; Guo, X.; Li, L.; Luo, R.; Xu, F.; Yang, P.; Zhang, L.; Wang, X.; Qi, H.; et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **2012**, *490*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Morrison, C.M. The histology and ultrastructure of the adductor muscle of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Am. Malacol. Bull.* **1993**, *10*, 25–38.
23. Sussarellu, R.; Fabioux, C.; Le Moullac, G.; Fleury, E.; Moraga, D. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genom.* **2010**, *3*, 133–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Riviere, G.; Klopp, C.; Ibouniyamine, N.; Huvet, A.; Boudry, P.; Favrel, P. GigaTON: An extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Heinemann, S.H.; Terlau, H.; Stuhmer, W.; Imoto, K.; Numa, S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **1992**, *356*, 441–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gur Barzilai, M.; Reitzel, A.M.; Kraus, J.E.M.; Gordon, D.; Technau, U.; Gurevitz, M.; Moran, Y. Convergent Evolution of Sodium Ion Selectivity in Metazoan Neuronal Signaling. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 242–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Liebeskind, B.J.; Hillis, D.M.; Zakon, H.H. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9154–9159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lipkind, G.M.; Fozzard, H.A. Voltage-gated Na⁺ channel selectivity: The role of the conserved domain III lysine residue. *J. Gen. Physiol.* **2008**, *131*, 523–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schlieff, T.; Schönherr, R.; Imoto, K.; Heinemann, H.S. Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur. Biophys. J.* **1996**, *25*, 75–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zhou, W.; Chung, I.; Liu, Z.; Goldin, A.L.; Dong, K. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron* **2004**, *42*, 101–112. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, T.; Liu, Z.; Song, W.; Du, Y.; Dong, K. Molecular characterization and functional expression of the DSC1 channel. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 451–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dong, K.; Du, Y.; Rinkevich, F.; Wang, L.; Xu, P. The Drosophila Sodium Channel 1 (DSC1): The founding member of a new family of voltage-gated cation channels. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *120*, 36–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sauvage, C.; Bierne, N.; Lapegue, S.; Boudry, P. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* **2007**, *406*, 13–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Goldin, A.L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 575–584. [[PubMed](#)]

35. Jost, M.C.; Hillis, D.M.; Lu, Y.; Kyle, J.W.; Fozzard, H.A.; Zakon, H.H. Toxin-resistant sodium channels: Parallel adaptive evolution across a complete gene family. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1016–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kontis, K.J.; Goldin, A.L. Site-directed mutagenesis of the putative pore region of the rat IIA sodium channel. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 635–644. [[PubMed](#)]
37. Thackeray, J.R.; Ganetzky, B. Developmentally regulated alternative splicing generates a complex array of *Drosophila para* sodium channel isoforms. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 2569–2578. [[PubMed](#)]
38. Lin, W.H.; Wright, D.E.; Muraro, N.I.; Baines, R.A. Alternative splicing in the voltage-gated sodium channel DmNav regulates activation, inactivation, and persistent current. *J. Neurophysiol.* **2009**, *102*, 1994–2006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lee, S.H.; Ingles, P.J.; Knipple, D.C.; Soderlund, D.M. Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly Vssc1 sodium channel gene. *Invertebr. Neurosci.* **2002**, *4*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shao, Y.M.; Dong, K.; Tang, Z.H.; Zhang, C.X. Molecular characterization of a sodium channel gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 145–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dai, A.; Temporal, S.; Schulz, D.J. Cell-specific patterns of alternative splicing of voltage-gated ion channels in single identified neurons. *Neuroscience* **2010**, *168*, 118–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Schaller, K.L.; Krzemien, D.M.; McKenna, N.M.; Caldwell, J.H. Alternatively spliced sodium channel transcripts in brain and muscle. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1370–1381. [[PubMed](#)]
43. Plummer, N.W.; Galt, J.; Jones, J.M.; Burgess, D.I.; Sprunger, L.K.; Kohrman, D.C.; Meisler, M.H. Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. *Genomics* **1998**, *54*, 287–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Awad, S.S.; Lightowlers, R.N.; Young, C.; Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.; Lomo, T.; Slater, C.R. Sodium channel mRNAs at the neuromuscular junction: Distinct patterns of accumulation and effects of muscle activity. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8456–8463. [[PubMed](#)]
45. Smith, R.D.; Goldin, A.L. Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1965–1974. [[PubMed](#)]
46. Laviaille-Defaix, C.; Gautier, H.; Defaix, A.; Lapied, B.; Grolleau, F. Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* **2006**, *96*, 2437–2450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhao, X.; Ikeda, T.; Salgado, V.L.; Yeh, J.Z.; Narahashi, T. Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neuro Toxicol.* **2005**, *26*, 455–465.
48. Shiraishi, S.; Yokoo, H.; Yanagita, T.; Kobayashi, H.; Minami, S.-I.; Saitoh, T.; Takasaki, M.; Wada, A. Differential effects of bupivacaine enantiomers, ropivacaine and lidocaine on up-regulation of cell surface voltage-dependent sodium channels in adrenal chromaffin cells. *Brain Res.* **2003**, *966*, 175–184. [[CrossRef](#)]
49. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. ProtTest 3: Fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1164–1165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rambaut, A. *Tree Figure Drawing Tool*, version 1.4.2; Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh: Edinburgh, UK, 2007.
54. Anderson, P.A.; Holman, M.A.; Greenberg, R.M. Deduced amino acid sequence of a putative sodium channel from the scyphozoan jellyfish *Cyanea capillata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7419–7423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Spafford, J.D.; Spencer, A.N.; Gallin, W.J. Genomic organization of a voltage-gated Na⁺ channel in a hydrozoan jellyfish: Insights into the evolution of voltage-gated Na⁺ channel genes. *Recept. Channels* **1999**, *6*, 493–506. [[PubMed](#)]
56. White, G.B.; Pfahnl, A.; Haddock, S.; Lamers, S.; Greenberg, R.M.; Anderson, P.A. Structure of a putative sodium channel from the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Invertebr. Neurosci.* **1998**, *3*, 317–326. [[CrossRef](#)]

57. Liu, Z.; Chung, I.; Dong, K. Alternative splicing of the *BSC1* gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *31*, 703–713. [[CrossRef](#)]
58. Zhan, S.; Merlin, C.; Boore, J.L.; Reppert, S.M. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell* **2011**, *147*, 1171–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Salkoff, L.; Butler, A.; Wei, A.; Scavarda, N.; Giffen, K.; Ifune, C.; Goodman, R.; Mandel, G. Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science* **1987**, *237*, 744–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hirota, K.; Kaneko, Y.; Matsumoto, G.; Hanyu, Y. Cloning and distribution of a putative tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel in newt retina. *Zool. Sci.* **1999**, *16*, 587–594. [[CrossRef](#)]
61. Rosenthal, J.J.; Gilly, W.F. Amino acid sequence of a putative sodium channel expressed in the giant axon of the squid *Loligo opalescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10026–10030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dyer, J.R.; Johnston, W.L.; Castellucci, V.F.; Dunn, R.J. Cloning and tissue distribution of the *Aplysia* Na⁺ channel α -subunit cDNA. *DNA Cell Biol.* **1997**, *16*, 347–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Schulz, D.J.; Goillard, J.-M.; Marder, E.E. Quantitative expression profiling of identified neurons reveals cell-specific constraints on highly variable levels of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13187–13191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Dong, K. 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.* **1997**, *27*, 93–100. [[CrossRef](#)]
65. Loughney, K.; Kreber, R.; Ganetzky, B. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* **1989**, *58*, 1143–1154. [[CrossRef](#)]
66. Chang, C.; Shen, W.K.; Wang, T.T.; Lin, Y.H.; Hsu, E.L.; Dai, S.M. 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.* **2009**, *39*, 272–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kamiyama, T.; Yamauchi, H.; Nagai, S.; Yamaguchi, M. Differences in abundance and distribution of *Alexandrium* cysts in Sendai Bay, northern Japan, before and after the tsunami caused by the Great East Japan Earthquake. *J. Oceanogr.* **2014**, *70*, 185–195. [[CrossRef](#)]
68. Guillard, R.R.L.; Hargraves, P.E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **1993**, *32*, 234–236. [[CrossRef](#)]
69. Van de Riet, J.; Gibbs, R.S.; Muggah, P.M.; Rourke, W.A.; MacNeil, J.D.; Quilliam, M.A. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Oysters, and Scallops: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1154–1176. [[PubMed](#)]
70. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Howard, D.W.; Lewis, E.J.; Keller, B.J.; Smith, C.S. *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*, 2nd ed.; NOAA: Oxford, MD, 2004; p. 218.
72. Santerre, C.; Sourdain, P.; Martinez, A.S. Expression of a natural antisense transcript of Cg-Foxl2 during the gonadic differentiation of the oyster *Crassostrea gigas*: First demonstration in the gonads of a lophotrochozoa species. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* **2012**, *6*, 210–221.
73. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
74. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Lee, B.T.K.; Tan, T.W.; Ranganathan, S. MGAlignIt: A web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3533–3536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Reese, M.G.; Eeckman, F.H.; Kulp, D.; Haussler, D. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **1997**, *4*, 311–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W597–W603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

78. Callebaut, I.; Labesse, G.; Durand, P.; Poupon, A.; Canard, L.; Chomilier, J.; Henrissat, B.; Mornon, P.J. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **1997**, *53*, 621–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Blom, N.; Sicheritz-Pontén, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Wong, Y.-H.; Lee, T.-Y.; Liang, H.-K.; Huang, C.-M.; Wang, T.-Y.; Yang, Y.-H.; Chu, C.-H.; Huang, H.-D.; Ko, M.-T.; Hwang, J.-K. KinasePhos 2.0: A web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W588–W594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Neuberger, G.; Schneider, G.; Eisenhaber, F. pkaPS: Prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol. Direct* **2007**, *2*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2015.



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2

Electrophysiological evaluation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sensitivity to paralytic shellfish toxins

Article en révision dans le journal Toxicological Sciences

Electrophysiological evaluation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sensitivity to paralytic shellfish toxins

Floriane Boullot^{*1}, Caroline Fabioux*, Hélène Hégaret*, Pierre Boudry†, Philippe Soudant*, and Evelyne Benoit‡

*Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, 29280, Plouzané, France; †Ifremer, UMR 6539 (LEMAR) CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre Ifremer Bretagne, ZI de la pointe du diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France; and ‡ DRF/iBiTec-S/SIMOPRO, CEA de Saclay, and Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI), UMR 9197 CNRS/Université Paris-Sud, 91190 Gif-sur-Yvette, France

E-mails: floriane.boullot@gmail.com, caroline.fabioux@univ-brest.fr, helene.hegaret@univ-brest.fr, pierre.boudry@ifremer.fr, philippe.soudant@univ-brest.fr, evelyne.benoit@cea.fr

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail: floriane.boullot@gmail.com.

Running title: *C. gigas* sensitivity to saxitoxin

Abbreviations: CNAP (Compound nerve action potential), Toxic alga-exposed oysters (Oysters experimentally fed *Alexandrium minutum*), Control oysters (Oysters experimentally fed *Tisochrysis lutea*, a non-toxic microalga), PST (Paralytic shellfish toxins), STX (Saxitoxin), TTX (Tetrodotoxin), Na_v (Voltage-gated sodium).

ABSTRACT

Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) may bio-accumulate high levels of paralytic shellfish toxins (PST) during harmful algal blooms of the genus *Alexandrium* that regularly occur in coastal waters, affecting their health and marketability. The aim of our study was to analyse the PST-sensitivity of Pacific oyster nerves in relation with toxin bio-accumulation. The results show that *C. gigas* nerves have micromolar range of saxitoxin (STX) sensitivity. The compound nerve action potential (CNAP) of wild oysters collected on April 2014 was about 5-fold more sensitive to STX than that of oysters subsequently collected on October 2015. The STX-sensitivity of CNAP recorded from oysters experimentally fed *A. minutum* (toxic alga-exposed oysters) or *Tisochrysis lutea*, a non-toxic microalga (control oysters) revealed that they could be separated into resistant and sensitive groups, independently of their diet. Moreover, the percentage of toxin-sensitive nerves was lower and the STX concentration necessary to inhibit 50% of their CNAP was higher in recently toxic alga-exposed than control oysters. However, no obvious correlation was observed between nerve sensitivity to STX and the estimated STX content in oyster digestive gland, despite an inter-individual variability in the level of bio-accumulated toxins. None of the nerves isolated from wild and farmed oysters was detected to be sensitive to tetrodotoxin (TTX). In conclusion, *C. gigas* nerves are shown, for the first time, to have micromolar range of STX sensitivity which decreases upon oyster exposition to dinoflagellates producing PST.

Keywords: *Crassostrea gigas*; compound nerve action potential; *Alexandrium minutum*; paralytic shellfish toxins

INTRODUCTION

Under appropriated environmental conditions, toxin producing microalgae may proliferate and amass to form blooms, known as “harmful algal blooms”, a worldwide geographical distribution phenomenon that has increased in frequency during the past few decades (Van Dolah, 2000). Notably, French coasts are regularly affected by harmful algal blooms. Some of them are due to dinoflagellates of the *Alexandrium* genus, mainly *A. minutum* and *A. catenella*, which produce paralytic shellfish toxins (PST) (Lassus et al., 2004). PST are a broad group of natural neurotoxic alkaloids, composed of saxitoxin (STX) and analogues which, similarly to tetrodotoxin (TTX), block voltage-gated sodium (Na_v) channels and thus inhibit action potentials in many

excitable cells (Catterall, 2000).

When harmful algal blooms occur, filter-feeders such as bivalve molluscs, that feed on phytoplankton, may bio-accumulate large amounts of PST. Consumption of PST-contaminated shellfish, the main vectors of PST to humans, leads to paralytic shellfish poisoning, one of the highest worldwide threats to human health among phycotoxin human poisoning (Van Dolah, 2000). In addition, this significant human health risk affects the economy linked to shellfish harvesting or aquaculture because of closures and sale prohibitions (Sellner et al., 2003). In Europe, STX load in shellfish is subjected to regulation, defined by the European Union (CE Regulation No. 854/2004), which prohibits the harvesting and sale of shellfish that have more than 80 µg equivalent STX/100 g shellfish meat. Several studies showed that, besides the impact on consumers, expositions to toxic dinoflagellates induce marked behavioural, physiological and reproductive changes in bivalve molluscs (Connell et al., 2007; Fabioux et al., 2015; Haberkorn et al., 2010; Lassus et al., 2004; Le Goïc et al., 2013; Tran et al., 2010).

The bio-accumulation of PST in bivalve molluscs was reported to be dependent on the sensitivity of the species to these toxins. Hence, in the American populations of *Mya arenaria* softshell clams, two Na_v genotypes distinguish PST-sensitive and PST-resistant clams (Bricelj et al., 2005). Sensitive clams die when exposed to *Alexandrium* spp. blooms while resistant clams survive and bio-accumulate high levels of PST. In contrast, all individuals survive when Pacific oysters are experimentally exposed to a toxic strain of *A. minutum*, showing a very high inter-individual variability (up to 450 fold difference) in PST bio-accumulation (Boullot et al., 2017; Haberkorn et al., 2011).

Several studies were undertaken to investigate the effects of PST and TTX on Na_v channels of bivalve molluscs, notably focussing on their nerves. Comparing different species of bivalves for the sensitivity of their nerves to STX and TTX, Twarog (1974) demonstrated that, in general, toxin-resistant species bio-accumulate higher levels of PST. Similarly, some bivalve species showing low level of bio-accumulated PST were reported to be highly sensitive to these toxins (Bricelj and Shumway, 1998). However, toxin-sensitivity of *Crassostrea gigas* and its relation with PST bio-accumulation remained to be investigated.

The aim of our study was thus to analyse the STX and TTX nerve sensitivities of *C. gigas* in relation to PST bio-accumulation. For this purpose, STX and TTX sensitivities of cerebrovisceral nerves of Pacific oysters were evaluated using an electrophysiological approach. These analyses were realized on oysters collected in the wild and on oysters obtained from shellfish farming. The latter were experimentally exposed or not to a toxic strain of *A. minutum*. In parallel, the STX content in their digestive gland was estimated using ELISA assay. The results

reveal, for the first time, that *C. gigas* nerves have an intermediate STX sensitivity among bivalve species. Furthermore, their nerve sensitivity to STX decreased when individuals are previously exposed to dinoflagellates producing PST. Although an inter-individual variability in the level of bio-accumulated toxins was observed, no statistically significant correlation with the STX sensitivity of nerves could be established.

MATERIALS AND METHODS

Oysters. A first set of two preliminary experiments was performed on Pacific oysters, *C. gigas*, collected on the rocks on April 2014 and October 2015 in the Bay of Brest (Le Dellec, Brittany, France). Oysters were kept in tanks filled with aerated seawater for a few days, until their use for experiments. A second set of experiments was carried out on Pacific oysters obtained on May 2016 from a shellfish farm in the Bay of Brest (Logonna-Daoulas, Brittany, France). These oysters were exposed to toxic and non-toxic microalgae (see below).

Microalgal cultures. The dinoflagellate *A. minutum* Halim (1960) strain Daoulas 1257 (isolated in Brittany, France), known to produce PST, was used for toxic algal exposure of oysters, and *Tisochrysis lutea* was used for non-toxic algal exposure of oysters, as control. The dinoflagellate *A. minutum* was cultured in L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) at 16°C, with a light/dark cycle of 12/12 h, and was harvested during the exponential growth phase. *T. lutea* microalga was grown in Conway medium (Walne, 1966). Algal cell densities were determined by counts using Nageotte or Malassez cells under a light microscope.

Experimental design for exposure to toxic and non-toxic microalgae. On May 2016, oysters were distributed randomly in 18 L-replicated tanks. Each tank was supplied with microalgae using a peristaltic pump, and central air-lifts were used to homogenize microalgal concentration and water. Oysters were fed during 4 days with a continuous seawater flow of 4.3 L/day containing either *A. minutum* ($16 \cdot 10^3$ cells/mL, which is in the range of a natural bloom concentration, n = 30 toxic alga-exposed oysters, i.e. 3 replicates of 10 individuals) or *T. lutea* ($4 \cdot 10^5$ cells/mL, n = 23 control oysters, i.e. 3 replicates of 7-8 individuals). At the end of the exposure period (end-point phase), the digestive glands were dissected, weighed, frozen and stored in liquid nitrogen until biochemical analyses.

ELISA assay for estimated STX content analyses. Digestive glands were ground with an “ultraturax” homogenizer and extracted in 0.1M HCl (1:1, w:w). Mixture was boiled at 104°C for 10 min and then cooled to room temperature. After centrifugation (3500 g, 10 min, 4°C), supernatants were collected for analysing toxin content. The toxin content was assessed with the Saxitoxin (PSP) ELISA, Microtiter Plate kit (Abraxis, Warminster, PA, U.S.A.), according to the manufacturer’s instructions, and expressed in μg STX/100 g of digestive gland wet weight (μg STX/100 g DG).

Electrophysiological recordings. Electrophysiological recordings were performed on the cerebrovisceral nerves isolated from oysters. This pair of nerves originates from the cerebral ganglia and, while running to the visceral ganglia, is soon buried in the connective tissue of the visceral mass (Fig. 1). This renders the dissection of non-stretching nerves rather difficult. The dissected nerves were usually about 1 mm in diameter and at least 2 cm in length, and could be obtained in about 10 min. When isolated, the nerves were either tested directly for their functional state (see below) or kept in standard physiological solution until experiments. The standard physiological solution contained 436 mM NaCl, 10 mM KCl, 52 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 and 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.39 with NaOH). It is worth noting that this solution respects the molarity of major ions present in the chemical composition of salinity 35 sea water, with the exception of HEPES introduced to avoid pH changes that may affect the electrophysiological response of nerves.

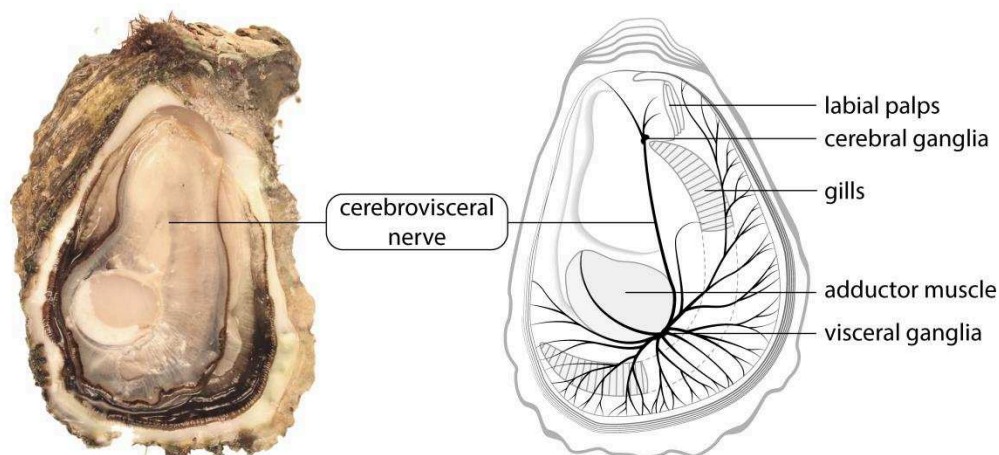


FIG. 1. The cerebrovisceral nerves of the Pacific oyster, *C. gigas*, in the left valve. This pair of nerves, which rises from the posterior side of cerebral ganglia to the anterior side of visceral ganglia, is embedded in the connective tissue of the visceral mass. The visceral ganglia, located on the anteroventral side of the adductor muscle, at the junction between smooth and striated muscles, send nerves to the adductor muscle, the posterior part of the mantle, the gills, the heart, the gonad, and the digestive gland.

Electrophysiological recordings were performed at room temperature (20-22°C) using a conventional electrophysiological technique (Supplementary Fig. 1A), as previously described (Benoit et al., 2000). Briefly, the cerebrovisceral nerve was placed on five uninsulated platinum wires fixed in a moist Plexiglas chamber. Two wires (stimulating electrodes) were connected to a digital-analogic converter (Axon™ Digidata® 1440A Digitizer, Molecular Devices, Sunnyvale, California, U.S.A.) through which the computer delivered, at a frequency of 5 Hz, a series of square-wave pulses of 0.1-1 ms duration and increasing intensity from 0 to 300 μ A with 10 μ A steps. Two other wires (recording electrodes) were connected to a first high-gain differential input amplifier and then to a second one (home-made amplifiers, Ray Kado, CNRS, Gif-sur-Yvette, France), to record the compound nerve action potential (CNAP). The amplified signal of the second was then digitalized, through the analogic-digital converter, and stored on the computer. Axon pCLAMP 10.5 hardware and software (Molecular Devices, Sunnyvale, California, U.S.A.) were used to both stimulate the nerve and, in response, to record the CNAP. The fifth wire, located midway between the stimulating and recording pairs of wires, was connected to the ground. The nerve was neither bathed nor superfused during the recording period (which lasted less than 5 min) to avoid shunting effects of the medium. However, the Plexiglas chamber was covered and the humidity inside was ensured by wads of cotton soaked with standard physiological solution.

Toxins. Saxitoxin dihydrochloride (STX), reference NRC-CRM-STX provided by Novakits (Nantes, France), was prepared as a 66 μ M stock solution in aqueous 3 mM hydrochloric acid, and then diluted in the standard physiological solution to give final concentrations of between 0.07 and 8.39 μ M. The final concentration of hydrochloric acid in the STX media did not exceed 0.38 mM. Tetrodotoxin citrate (TTX), purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), was prepared as a 1 mg/mL stock solution in distilled water, and then diluted in the standard physiological solution to give final concentrations of 0.06 and 7.83 μ M. The nerve responsiveness was tested before and after being pre-treated by 20-30 min incubation in a given STX or TTX medium.

Data analyses. To evaluate the membrane excitability level of nerves, response-intensity relationships were established by plotting the peak amplitude (A) of CNAP, expressed relatively to its maximum amplitude (A_{\max}) recorded in response to large stimulus intensities, as function of the stimulus intensity (I). The theoretical curves correspond to data point fits, according to the

Boltzmann equation (GraphPad Prism 5 software): $A / A_{\max} = 1 - [1 / (1 + \exp ((I - I_{50}) / S))]$, where I_{50} is the stimulus intensity producing a CNAP with 50% maximum peak amplitude, and S is the slope of the curve.

To characterise the kinetics of a given CNAP, six parameters were measured (Supplementary Fig. 1B): the maximum peak amplitude (in mV), the width at 50% peak amplitude (half-width in ms), the area (in mV.ms), the time between stimulation onset and peak (time of peak in ms), the maximum rise slope (in mV/ms), and the maximum decay slope (in mV/ms). The velocity of CNAP propagation was approximated by calculating the ratio of the distance between stimulating and recording electrodes, i.e. 15 mm, and the time of peak.

To evaluate the nerve sensitivity to STX, dose-response relationships were established by plotting the maximum peak amplitude of CNAP, recorded from STX-pre-treated nerves ($A_{\max S}$) and expressed as percentage of its value obtained in absence of toxin ($A_{\max C}$), against the STX concentration ($[STX]$). The theoretical curves were calculated from typical sigmoid nonlinear regressions through data points, according to the Hill equation (GraphPad Prism 5 software): $A_{\max S} / A_{\max C} = 1 / [1 + ([STX] / IC_{50})^{n_H}]$, where n_H is the Hill number and IC_{50} is the STX concentration necessary to inhibit 50% of CNAP maximum peak amplitude.

Data are given as the mean \pm standard error (SE) of n nerves. Statistical analyses were executed with R 3.2.2 (R Core Team, 2015). Comparison of data between different experimental conditions applied to the same oyster group of nerves was performed with paired Student's t-test when normality and homoscedasticity were observed or, otherwise, with Wilcoxon signed rank test. Comparison of data between two different oyster groups of nerves submitted to the same experimental conditions was performed with Welch two sample t-test when normality and homoscedasticity were observed or, otherwise, with Wilcoxon rank sum test.

RESULTS

Stimulation and keeping oyster nerve conditions to obtain consistent CNAP

Under our experimental conditions, oyster cerebrovisceral nerves produced monophasic compound action potentials in response to single electrical stimuli (Fig. 2A). The observation of a single form for these monophasic CNAP strongly suggests that this type of nerve is composed of axons having a relatively homogeneous distribution in diameter size. The CNAP peak amplitude was dependent on the stimulus intensity. Hence, in response to stimuli of fixed duration (i.e. 1 ms) and increasing intensities (0-300 μ A), the CNAP peak amplitude increased, reached a plateau

value and remained constant despite further intensity increases (Fig. 2B). The 1ms-stimulus intensity producing a CNAP having 50% maximum peak amplitude (I_{50}) was found to be $33 \pm 3 \mu\text{A}$ ($n = 22$). The CNAP peak amplitude behaved similarly in response to stimuli of decreased duration (i.e. 0.1 ms) with, however, an increased I_{50} value, i.e. $99 \pm 8 \mu\text{A}$ ($n = 34$). The fact that the CNAP peak amplitude attained a plateau indicates that all the axons which could be electrically stimulated, under our experimental conditions, were recruited by stimuli of 0.1-1 ms and 200-300 μA . Under these conditions, the CNAP maximum peak amplitude was found to be $0.422 \pm 0.094 \text{ mV}$ and to propagate at a velocity of $2.6 \pm 0.7 \text{ m/s}$ for 34 nerves freshly dissected from wild oysters (collected on October 2015) and kept in standard physiological solution for 15-30 min.

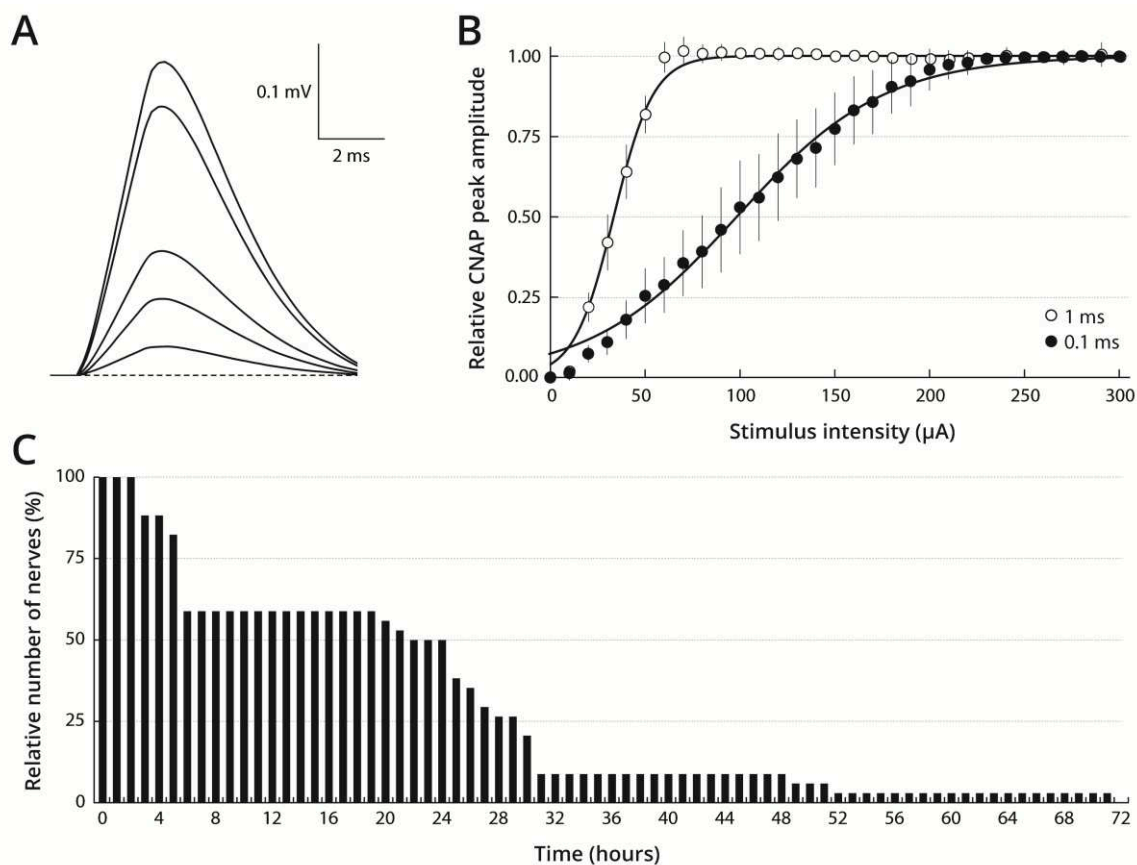


FIG. 2. Stimulation and keeping oyster nerve conditions to obtain consistent CNAP. (A) Superimposed traces of typical CNAP recorded from the cerebrovisceral nerve stimulated with pulse intensities of 20, 50, 80, 170 and 300 μA and 1-ms duration. (B) CNAP peak amplitude (mean \pm SE of 22-34 nerves) as function of the intensity of 0.1-ms (\bullet) and 1-ms (\circ) duration stimulus. For each nerve, the peak amplitude was expressed relatively to its maximum amplitude. The curves correspond to data fits according to the Boltzmann equation with $I_{50} = 99 \pm 8 \mu\text{A}$ and $S = 39 \pm 7 \mu\text{A}^{-1}$ (\bullet) and $I_{50} = 33 \pm 3 \mu\text{A}$ and $S = 10 \pm 1 \mu\text{A}^{-1}$ (\circ). (C) Number of nerves able to produce a CNAP in response to electrical stimulation, expressed as the percentage of total number of functional nerves at time zero ($n = 34$), as function of time after their dissection. The nerves were kept in standard physiological solution at 4°C between recording sessions.

Despite the fact that the nerves were neither bathed nor superfused during the recording periods of less than 5 min duration (see Materials and Methods), their CNAP was not significantly modified if the nerves were kept in standard physiological solution, for less than 2 h at room temperature, between recordings ($n = 34$). However, nerve survival was favoured by storing them in standard physiological solution at 4°C. Under these conditions, 50% of the nerves ($n = 17$) survived for 24 h after their dissection (i.e. they could produce a CNAP in response to electrical stimulation), but only 9% ($n = 3$) survived for 48 h and none were functional at 72 h (Fig. 2C).

STX sensitivity of nerves isolated from oysters collected in the wild

The STX sensitivity of nerves isolated from wild oysters, collected on April 2014 and then October 2015, was studied by keeping the dissected nerves in standard physiological solution for 15-30 min before a first recording session and then, in a given STX-containing solution for 20-30 min before a second recording session. As shown in Figure 3, the dose-response curves of STX on the CNAP maximum peak amplitude revealed IC_{50} of 0.28 and 1.29 μM for the nerves isolated from oysters collected on April 2014 and October 2015, respectively. It thus appears that the CNAP of oysters collected on April 2014 was about 5 fold more sensitive to STX than that of oysters collected on October 2015.

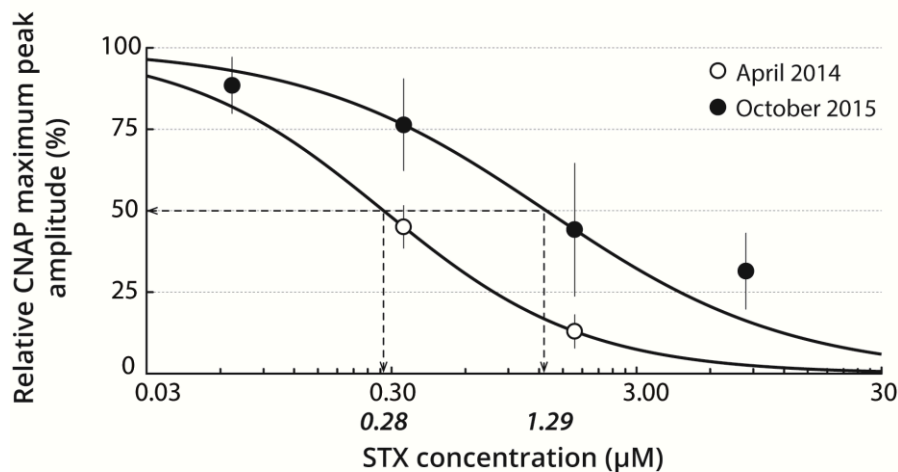


FIG. 3. STX sensitivity of nerves isolated from wild oysters. Dose-response curves of STX effects on the CNAP maximum peak amplitude recorded from wild oysters collected on April 2014 (\circ) and October 2015 (\bullet). Each value represents the mean \pm SE of data obtained from 2-9 nerves, and is expressed as percentage of its value obtained in absence of toxin. The curves were calculated from typical sigmoid nonlinear regressions through data points, according to the Hill equation, with IC_{50} values (italic numbers) of 0.28 and 1.29 μM and n_H values of 1.06 and 0.87 for nerves isolated from oysters collected on April 2014 and October 2015, respectively.

The STX-induced blocking effect on CNAP amplitude was reversed by keeping the nerves in standard physiological solution for at least 2 h. Under these conditions, the CNAP maximum

peak amplitude, relative to that before pre-treatment of nerves with 8.39 μM STX, was 0.82 ± 0.12 ($n = 7$). In addition, the nerves were pre-treated for 20-30 min with standard physiological solution containing 0.38 mM of hydrochloric acid to verify that STX solvent had, by itself, no detectable effect on the CNAP. The CNAP maximum peak amplitude was 0.97 ± 0.13 ($n = 11$) when expressed relatively to that of nerves before pre-treatment, indicating the absence of solvent effects on the CNAP.

STX sensitivity of nerves isolated from oysters exposed to toxic and non-toxic microalgae

To investigate the possible influence of *A. minutum* dinoflagellate exposure of oysters on their nerve STX sensitivity, farmed oysters were fed a toxic strain of *A. minutum* (toxic alga-exposed oysters) or a non-toxic microalgae (control oysters) just prior studying STX effects on their CNAP. Keeping dissected nerves in standard physiological solution prior to recording was first ensured to not modify the potential impact of toxic-exposure on their CNAP kinetics and parameters. For this purpose, the nerves, when isolated from oysters, were submitted directly to a first recording session and then, kept in standard physiological solution for less than 1 min, before undergoing a second recording session. Under these conditions, no noticeable difference was detected in the kinetics of CNAP between first and second recordings, i.e. those occurring after having soaked nerves in standard physiological solution, regardless of the microalgae species (toxic or non-toxic) (Supplementary Fig. 2A and B). Indeed, none of the 6 parameters measured to characterise CNAP kinetics were statistically different (Table 1). In contrast, comparison between nerves isolated from toxic alga-exposed and control oysters revealed significant differences in CNAP kinetics and parameters, following both first and second recordings (Supplementary Fig. 2C and D, and Table 1). In particular, the CNAP of toxic alga-exposed oyster nerves had smaller maximum peak amplitude, increased half-width and time of peak as well as decreased maximum rise and decay slopes, but similar area, when compared with that of control oyster nerves.

Table 1. CNAP parameters determined from STX-untreated nerves of farmed oysters fed *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters).

	Maximum peak amplitude (mV)		Half-width (ms)		Area (mV.ms)		Time of peak (ms)		Maximum rise slope (mV/ms)		Maximum decay slope (mV/ms)	
	Before SPS	After SPS	Before SPS	After SPS	Before SPS	After SPS	Before SPS	After SPS	Before SPS	After SPS	Before SPS	After SPS
Control oysters (n = 21 nerves)	0.374 ± 0.097	0.358 ± 0.081	5.124 ± 0.794	5.025 ± 0.607	2.088 ± 0.336	1.995 ± 0.316	56.079 ± 0.396	55.995 ± 0.249	0.250 ± 0.090	0.252 ± 0.076	0.116 ± 0.047	0.105 ± 0.038
Toxic-exposed oysters (n = 25 nerves)	0.269** ± 0.102	0.303* ± 0.095	6.201** ± 1.156	5.780** ± 1.026	1.822 ± 0.530	1.930 ± 0.405	56.364* ± 0.346	56.265** ± 0.308	0.179** ± 0.076	0.193* ± 0.084	0.075** ± 0.036	0.087 ± 0.047

SPS: standard physiological solution. *: $0.01 < p < 0.05$ and **: $0.001 < p < 0.01$, compared with control oysters. See Figure SD1B for details.

After pre-treatment of nerves with 0.07-8.39 μM STX, toxic alga-exposed and control oysters could be separated into two groups according to their response to 8.39 μM STX compared to that before pre-treatment: the relatively resistant individuals correspond to oysters whose relative CNAP maximum peak amplitude was higher than 80% and, inversely, the relatively sensitive individuals to oysters with relative CNAP maximum peak amplitude lower than 80%. Under these conditions, 67% of the eighteen nerves isolated from toxic alga-exposed oysters were relatively resistant to the toxin while 33% were relatively sensitive. In particular, the CNAP maximum peak amplitudes of resistant and sensitive nerves pre-treated with 8.39 μM STX were $96 \pm 10\%$ (n = 6) and $62 \pm 9\%$ (n = 4), respectively, of their values determined prior pre-treatment (Supplementary Fig. 3A and Fig. 4A). In comparison, only 56% of the eighteen nerves isolated from control oysters were relatively resistant to STX while 44% of nerves were relatively sensitive to 8.39 μM STX: their relative CNAP maximum peak amplitudes were $98 \pm 15\%$ and $46 \pm 3\%$, respectively, of their relative values prior pre-treatment (Supplementary Fig. 3A and Fig. 4A). Indeed, the CNAP maximum peak amplitude of relatively resistant nerves of both toxic alga-exposed and control oysters was not affected by 0.07-8.39 μM STX (Supplementary Fig. 3A). However, IC_{50} values determined from dose-response relationships, i.e. the CNAP maximum peak amplitude as function of STX concentration, were found to be 8.02 and 5.44 μM for relatively sensitive nerves of toxic alga-exposed and control oysters, respectively (Fig. 4A). It thus appears that the relative STX sensitivity of CNAP of toxic alga-exposed oysters was about 1.5 fold lower than that of control oysters.

The STX-induced blocking effect on CNAP amplitude of relatively sensitive nerves was reversed by keeping the nerves in standard physiological solution for at least 2 h since, under these conditions, the CNAP maximum peak amplitudes were $93 \pm 8\%$ ($n = 6$) and $92 \pm 21\%$ ($n = 7$) for toxic alga-exposed and control oysters, respectively.

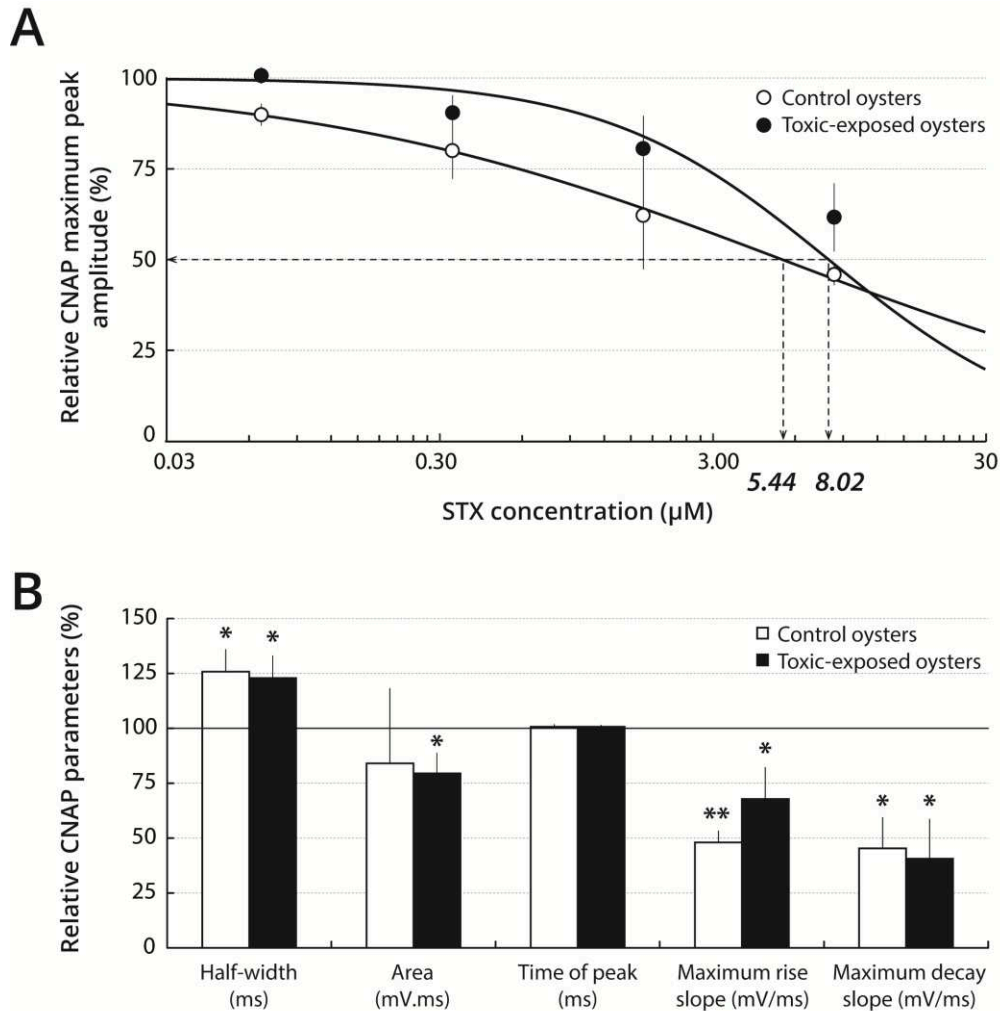


FIG. 4. STX effects on relatively sensitive nerves of farmed oysters fed *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters). (A) Dose-response curves of STX effects on the CNAP maximum peak amplitude recorded from toxic-exposed (●) and control (○) oysters. Each value represents the mean \pm SE of data obtained from 2-5 nerves, and is expressed as percentage of its value obtained in absence of toxin. The curves were calculated from typical sigmoid nonlinear regressions through data points, according to the Hill equation, with IC₅₀ values (italic numbers) of 8.02 and 5.44 μ M and n_H values of 1.06 and 0.49 for nerves isolated from toxic-exposed and control oysters, respectively. (B) Histogram of parameters characterising the CNAP kinetics of nerves isolated from toxic-exposed (■) and control (□) oysters and pre-treated with 8.39 μ M STX. Each value represents the mean \pm SE of data obtained from 3-4 nerves, and is expressed as percentage of its value measured in absence of toxin. *: 0.01 < p < 0.05 and **: 0.001 < p < 0.01, compared with values determined before pre-treatment of nerves with STX.

The kinetics of CNAP recorded from STX-sensitive and STX-resistant nerves of toxic alga-exposed and control oysters were analysed by measuring the CNAP parameters before and after pre-treatment of nerves with 8.39 μM STX. Comparison of parameters of untreated-nerves isolated from control oysters revealed that the CNAP of STX-resistant nerves had smaller maximum peak amplitude, increased half-width as well as decreased maximum rise and decay slopes, but similar time of peak and area, when compared with that of STX-sensitive nerves. In contrast, despite parameter tendencies to behave similarly to those of control oysters, no significant difference was detected in the kinetics of CNAP between untreated STX-resistant and STX-sensitive nerves isolated from toxic alga-exposed oysters (Table 2). After pre-treatment of nerves with 8.39 μM STX, the CNAP half-width, time of peak, area as well as maximum rise and decay slopes of STX-resistant nerves isolated from toxic alga-exposed and control oysters were not statistically different from their respective values determined before pre-treatment of nerves (Supplementary Fig. 3B). In contrast, the CNAP of STX-sensitive nerves isolated from toxic alga-exposed and control oysters, and pre-treated with 8.39 μM STX, had increased half-width as well as decreased maximum rise and decay slopes, but similar time of peak and, at least for control oysters, area, when compared with their respective values determined before pre-treatment of nerves (Fig. 4B). Taken altogether, these results suggest that the “resistance” character of nerves to STX was consistently associated with CNAP having relatively small maximum peak amplitude, high half-width and low maximum rise and decay slopes.

Table 2. CNAP parameters determined from STX-sensitive (STX-S) and STX-resistant (STX-R) nerves isolated from farmed oysters fed *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters), before STX pre-treatment of nerves.

	Maximum peak amplitude (mV)		Half-width (ms)		Area (mV.ms)		Time of peak (ms)		Maximum rise slope (mV/ms)		Maximum decay slope (mV/ms)	
	STX-S nerves	STX-R nerves	STX-S nerves	STX-R nerves	STX-S nerves	STX-R nerves	STX-S nerves	STX-R nerves	STX-S nerves	STX-R nerves	STX-S nerves	STX-R nerves
Control oysters (n = 18 nerves)	0.393 \pm 0.051	0.317* \pm 0.069	4.705 \pm 0.387	5.294* \pm 0.652	1.935 \pm 0.292	1.923 \pm 0.339	55.992 \pm 0.301	56.004 \pm 0.250	0.274 \pm 0.068	0.176* \pm 0.073	0.126 \pm 0.030	0.086* \pm 0.033
Toxic-exposed oysters (n = 18 nerves)	0.387 \pm 0.074	0.339 \pm 0.083	5.154 \pm 0.374	5.445 \pm 0.915	1.891 \pm 0.248	2.035 \pm 0.377	56.389 \pm 0.354	56.139 \pm 0.308	0.215 \pm 0.298	0.196 \pm 0.038	0.133 \pm 0.035	0.100 \pm 0.050

*: 0.01 < p < 0.05, STX-resistant versus STX-sensitive nerves of control oysters.

The membrane excitability level of STX-sensitive and STX-resistant nerves isolated from toxic alga-exposed and control oysters was also analysed by establishing their response-intensity relationships, and determining the corresponding parameters, before and after nerve pre-treatment with 8.39 μM STX (Fig. 5 and Table 3). Comparison of response-intensity relationships of untreated-nerves isolated from either toxic alga-exposed or control oysters revealed no significant difference in response-intensity relationships, as well as in I_{50} and S values, between STX-sensitive and STX-resistant nerves. Similar results were obtained after pre-treatment of nerves with 8.39 μM STX. Moreover, the response-intensity relationships were also similar, and their corresponding parameters were not statistically different, after toxin pre-treatment of either STX-sensitive or STX-resistant nerves when compared with those of untreated nerves, whatever the oysters were fed toxic or non-toxic microalgae. These results indicate that the membrane excitability parameters of nerves were not a distinguished criterion of their sensitive or resistance character to the toxin.

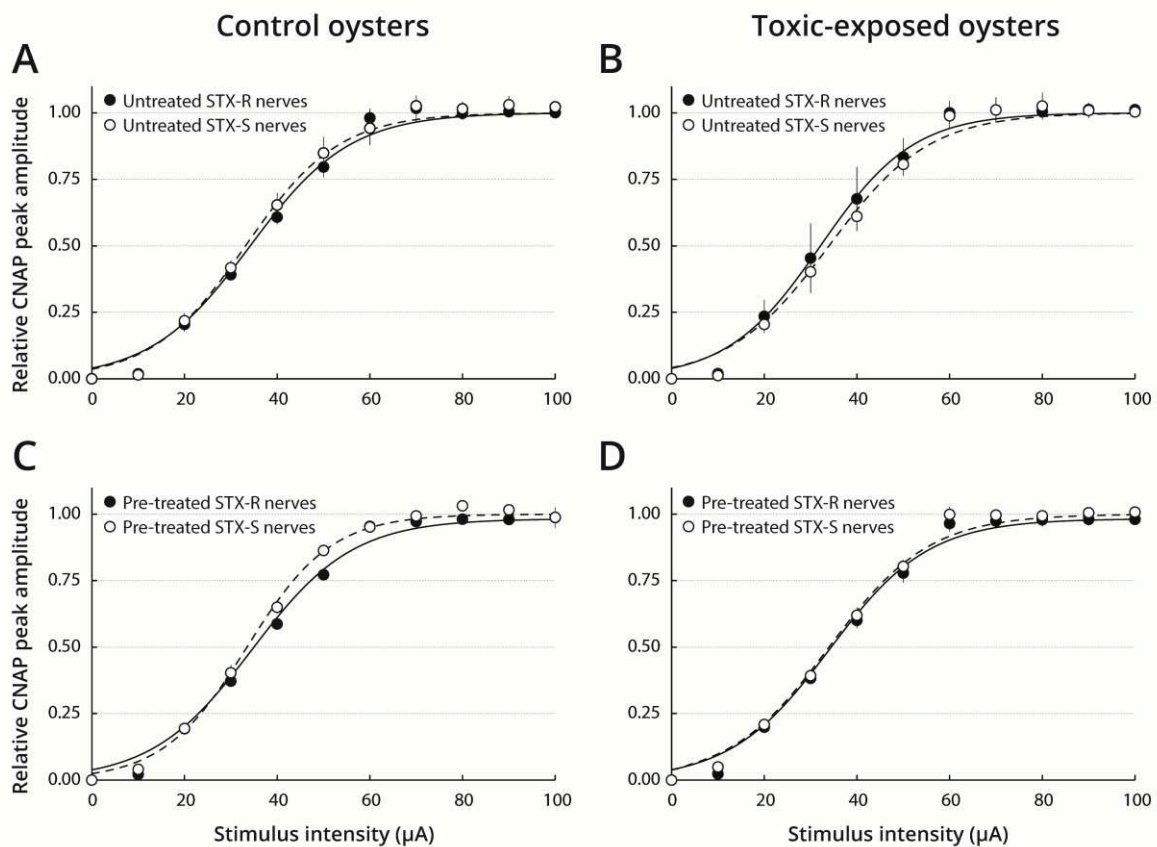


FIG. 5. Response-intensity relationships of nerves isolated from farmed oysters. Response-intensity relationships of relatively sensitive (STX-S, \circ) and relatively resistant (STX-R, \bullet) nerves isolated from farmed oysters fed A. minutum (toxic-exposed oysters, B and D) or T. lutea (control oysters, A and C), before (untreated, A and B) and after (pre-treated, C and D) their pre-treatment with 8.39 μM STX. CNAP peak amplitudes (means \pm SE of 2-8 nerves) were expressed relatively to their respective maximum amplitude, as function of the intensity of 1-ms duration stimulus. The curves correspond to data fits according to the Boltzmann equation with the I_{50} and S values indicated in Table 3.

Table 3. Parameters of response-intensity relationships determined from STX-sensitive (STX-S) and STX-resistant (STX-R) nerves isolated from farmed oysters fed *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters), before (untreated) and after pre-treatment of nerves with 8.39 μM STX.

	I_{50} (μA)		S (μA^{-1})					
	Untreated STX-S	Pre-treated STX-S	Untreated STX-R	Pre-treated STX-R	Untreated STX-S	Pre-treated STX-S	Untreated STX-R	Pre-treated STX-R
Control oysters (n = 10 nerves)	33.16 ± 0.95	33.47 ± 1.06	34.18 ± 0.51	34.59 ± 0.62	10.10 ± 0.59	9.09 ± 0.24	10.77 ± 0.33	10.81 ± 0.28
Toxic-exposed oysters (n = 12 nerves)	33.97 ± 0.74	34.10 ± 0.82	32.12 ± 3.81	34.06 ± 0.97	10.82 ± 0.23	10.58 ± 0.18	10.04 ± 2.10	10.70 ± 0.27

I_{50} : stimulus intensity producing a CNAP with 50% maximum peak amplitude and S: slope of the curve.

TTX sensitivity of nerves isolated from wild and farmed oysters

The TTX sensitivity of nerves isolated from wild and farmed oysters was studied because of previously reported similarity between STX and TTX interactions with Na_v channels. The results show that none of the nerves isolated from oysters collected in the wild on October 2015 was detected to be TTX-sensitive. In particular, their CNAP maximum peak amplitude measured after pre-treatment of nerves with 7.85 μM TTX, and expressed as percentage of its value determined before pre-treatment, was $96 \pm 11\%$ (n = 7). Similar results were obtained with nerves isolated from farmed oysters exposed to toxic and non-toxic microalgae since their relative CNAP maximum peak amplitudes, determined after nerve pre-treatment with 7.85 μM TTX, were $91 \pm 14\%$ (n = 12) and $96 \pm 15\%$ (n = 11), respectively.

Relation between STX sensitivity of nerves and estimated STX content in the digestive gland of oysters

The estimated STX content in the digestive gland was individually quantified from each of the farmed oysters exposed to toxic and non-toxic microalgae. It was $75 \pm 32 \mu\text{g STX}/100 \text{ g DG}$ for toxic alga-exposed oysters (n = 18) while, as expected, no PST was detected in the digestive gland of control oysters (n = 10). The estimated STX content in the digestive gland of toxic alga-exposed oysters was analysed in regard to the STX sensitivity of their nerves. No significant difference in the estimated STX content was detected between oysters possessing STX-sensitive nerves, i.e. $76 \pm 29 \mu\text{g STX}/100 \text{ g DG}$ (n = 6), and those having STX-resistant nerves, i.e. $74 \pm 34 \mu\text{g STX}/100 \text{ g DG}$ (n = 12) (Fig. 6). Moreover, no statistically significant correlation was observed between the estimated STX content and any of the CNAP parameters in oysters possessing either STX-sensitive or STX-resistant nerves.

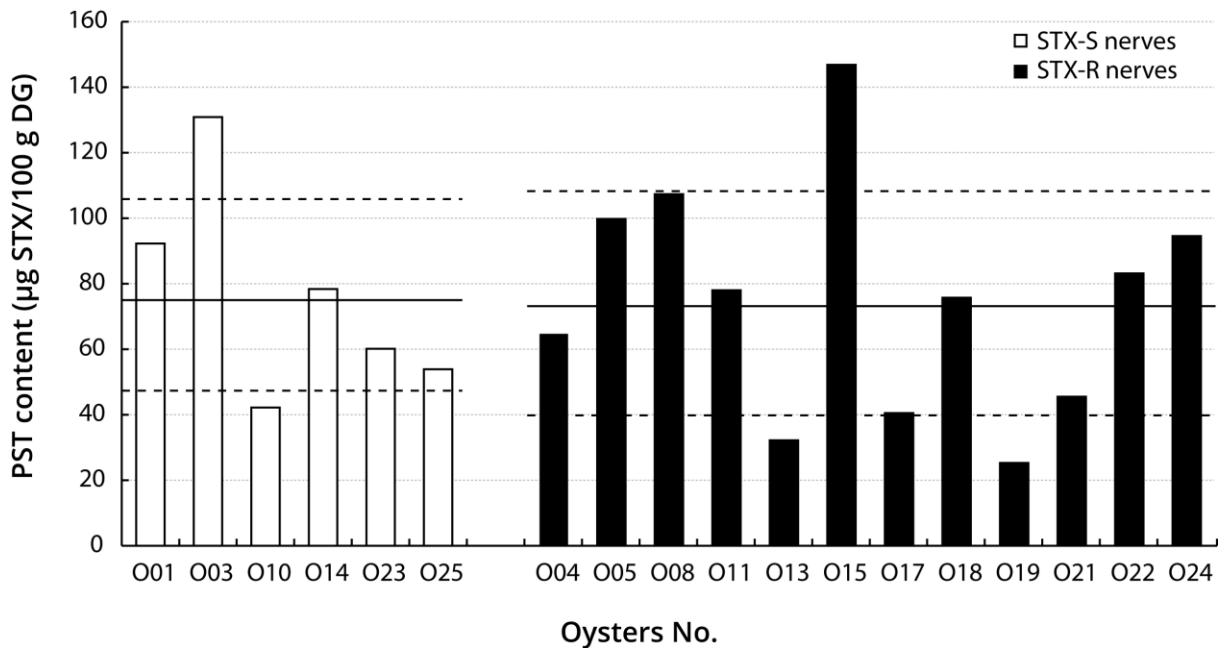


FIG. 6. Individual levels of bio-accumulated PST in farmed oysters fed *A. minutum* (toxic-exposed oysters). Histogram of individual PST content in digestive gland of toxic-exposed oysters possessing STX-sensitive (STX-S) nerves (□, n = 6) and those having STX-resistant (STX-R) nerves (■, n = 12). In each case, full and dashed lines indicate mean and SE values, respectively, i.e. $76 \pm 29 \mu\text{g STX}/100 \text{ g DG}$ (□) and $74 \pm 34 \mu\text{g STX}/100 \text{ g DG}$ (■).

DISCUSSION

The present electrophysiological evaluation of STX and TTX sensitivities of cerebrovisceral nerves isolated from *C. gigas* points out that (1) the CNAP maximum peak amplitude was found to be on average ~ 0.42 mV and to propagate at a velocity of 2.6 m/s under control conditions, (2) it was inhibited by micromolar range of STX concentrations whereas similar TTX concentrations were ineffective, (3) two groups of farmed oyster nerves were detected according to their relative STX sensitivity, (4) no significant difference in the digestive gland estimated STX content was detected between oysters possessing STX-sensitive nerves and those having STX-resistant nerves, despite a high inter-individual variability in bio-accumulated PST levels, and (5) the STX sensitivity of nerves was lower when oysters were exposed to the PST-producer *A. minutum* dinoflagellate, compared with those fed a non-toxic microalga.

Cerebrovisceral nerves of Pacific oysters are suitable for electrophysiological and pharmacological studies

The cerebrovisceral nerve of *C. gigas* was obtained with relative ease and showed a good

survivability (until 72 h), which makes this nerve a suitable model to study the electrophysiological and pharmacological properties of shellfish unmyelinated axons. Our results reveal that the CNAP maximum peak amplitude of *C. gigas* cerebrovisceral nerve was consistently found to be ~0.42 mV and to propagate at a velocity of 2.6 m/s under control conditions. These values are of the same magnitude order than those previously reported for the cerebrovisceral nerve dissected from other bivalves such as *Anodonta cataraacta* and *Elliptio complanata*, two species of freshwater mussel, *Mytilus edulis*, a marine mussel (Twarog et al., 1972), and the butter clam *Saxidomus giganteus* (Kvitek and Beitler, 1991).

Cerebrovisceral nerves of Pacific oysters have an intermediate STX sensitivity compared with other bivalves

We show that STX acted on *C. gigas* nerves by decreasing the peak amplitude of individual action potentials of fibres, without any marked change in their membrane excitability parameters. A partial inhibition of CNAP was observed with micromolar STX concentrations, indicating that the sensitivity of *C. gigas* nerves to STX is intermediate among bivalve species. This sensitivity appears similar to that of two other bivalves, *Tresus capax* and *Protothaca staminea*, whose CNAP has been reported to be partially inhibited by micromolar STX concentrations (Kvitek and Beitler, 1991). In contrast, in other bivalves such as *S. giganteus* and *S. nuttalli*, millimolar STX concentrations were necessary to fully block the CNAP, suggesting a higher resistance to this toxin than *C. gigas* nerves (Twarog et al., 1972). In *C. virginica*, a full blockage was observed with sub-micromolar STX concentrations, indicating that *C. virginica* nerves are more sensitive to the toxin than those of *C. gigas*. Several other studies demonstrated that the resistance character of nerve fibres to STX and/or TTX mainly depends on species. Indeed, STX and TTX resistance of nerves was reported in pufferfishes, crabs, newts and molluscs (Daigo et al., 1988; Kao and Fuhrman, 1967; Twarog, 1974; Twarog et al., 1972). The absence of TTX effect on CNAP of *C. gigas* nerves reveals that these nerves are resistant to TTX. Discrepancy between the sensitivity of nerves to STX and TTX has ever been observed for several bivalve species including *M. arenaria* and *S. nuttalli* (Bricelj and Shumway, 1998).

Existence of two groups of nerves, according to their relative STX sensitivity, in toxic alga-exposed and control Pacific oysters

Studying the STX sensitivity of toxic alga-exposed and control oyster nerves reveals that, at the highest concentration tested, the toxin partially inhibited the CNAP of some nerves while being ineffective on others. This prompts us to postulate the existence of sensitive and resistant groups

of nerves in Pacific oysters. It is likely that these two groups may be correlated to the relative expression of the three alternative splice transcripts of Na_v channels recently reported in *C. gigas* (Boullot et al., 2017) that could have different electrophysiological and pharmacological properties. Indeed, in leeches and jellyfishes, electrophysiological studies showed two types of sodium currents with different kinetics and STX sensitivity (Anderson, 1987; Johansen and Kleinhaus, 1987). However, this hypothesis needs to be tested by recording the STX sensitivity of each splice variant of oyster Na_v channels using, for example, heterologous expression in mammal cell lines or *Xenopus* oocytes, before definitive conclusion.

Absence of correlation between STX sensitivity of nerves and estimated STX content in the digestive gland of Pacific oysters

The estimated STX content in the digestive gland of toxic alga-exposed Pacific oysters ranges from 25 to 147 µg STX/100 g DG and shows a noticeable inter-individual variability (up to 5 fold). A higher maximum accumulation of PST in oysters exposed to a different strain of *A. minutum* (i.e. 300 µg STX/100 g DG) was previously reported (Haberkorn et al., 2010). Also, a higher inter-individual variability in estimated STX content (up to 80 fold) was measured experimentally in *C. gigas* exposed to a toxic strain of *A. minutum* (Haberkorn et al., 2011). Such differences are possibly due to a lower exposure concentration of *A. minutum* cells under our experimental conditions. No correlation was found between the STX sensitivity of nerves and the estimated STX content in digestive gland. In general, STX-resistant bivalve species bioaccumulate higher levels of toxins than STX-sensitive species (Bricelj and Shumway, 1998; Twarog et al., 1972) but our results show that this relation appears more complex when considering intra-specific variability.

Decreased STX sensitivity of nerves isolated from Pacific oysters recently exposed to PST-producer dinoflagellates

The resistance character of nerves to STX was consistently associated with CNAP having relatively small maximum peak amplitude, high half-width and low maximum rise and decay slopes, the membrane excitability parameters of nerves being not a distinguished criterion. Based on the percentages of toxin-sensitive nerves and their IC₅₀ values, our results strongly suggest that the nerves of oysters recently exposed to *A. minutum* were more resistant to STX than control ones. This may be, once again, correlated to the relative expression of alternative splice transcripts of Nav channels (Boullot et al., 2017). A previous study analysed the nerve sensitivity to STX of a population having a long-term history of PST exposure in the field and a non-exposed population

of *M. arenaria* softshell clams (Bricelj et al., 2005). The non-exposed population had 69% of individuals with STX-sensitive nerves, i.e. showing a full blockage of CNAP with sub-micromolar STX concentrations, whereas the PST-exposed population had 91% of softshell clams whose nerves were resistant to hundred micromolar toxin concentrations. The authors conclude to a selection pressure of individuals which become resistant to STX when they are regularly exposed to PST while never-exposed softshell clams remain sensitive. Consistent with genetic adaptation, these authors identified a natural single amino-acid mutation in Na_v channels of resistant, but not sensitive, clams. However, Kvittek and Beitler (1991) revealed no STX-sensitivity difference between *S. giganteus* butter clams collected from 3 sites known to have different histories of PST exposures. These authors suggested that the resistance of butter clams to STX is independent of recent exposure history rather than acquired through mutation with increased exposure episodes.

The STX sensitivity of nerves isolated from Pacific oysters may reveal putative seasonal variation

The nerves of oysters collected on April 2014 were ~5 fold more sensitive to STX than those of oysters collected on October 2015. This result is of particular interest knowing that STX-producer *A. minutum* blooms often occur during the summer period in the bay of Brest (including 2014 and 2015) although not specifically in the sites where oysters were sampled. A parallel could be made with the fact that a decreased nerve STX-sensitivity of oysters experimentally exposed to *A. minutum* was observed in our study. The observed difference in STX sensitivity between groups of oysters may also reflect seasonal variation. This hypothesis needs to be tested by further experiments performed monthly on oysters, and not only on two samplings, before definitive conclusion and further mechanistic exploration. It is worth noting that the nerves of oysters collected on April 2014 and October 2015 were, respectively, at least ~20 and 4 fold more sensitive to STX than farmed oysters, possibly because their growing conditions are different (wild oysters cemented on rock and farmed oysters free in bags).

In conclusion, *C. gigas* nerves are shown, for the first time, to have micromolar range of STX sensitivity which decreases when oysters are exposed to dinoflagellates producing PST.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Fig. 1. Experimental set-up for recording oyster compound nerve action potential (A) and description of measured parameters (B).

Supplementary Fig. 2. Comparison of compound nerve action potential (CNAP) recorded from nerves of farmed oysters fed *A. minutum* (toxic alga-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters).

Supplementary Fig. 3. STX effects on relatively resistant nerves of farmed oysters fed *A. minutum* (toxic alga-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters).

FUNDING

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) [13-CESA-0019-ACCUTOX], the French Research Network PHYCOTOX, the French National Center for Scientific Research (CNRS), and the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA). F.B. was supported by a pre-doctoral fellowship from the Région Bretagne and the Université de Bretagne Occidentale (UBO).

ACKNOWLEDGEMENTS

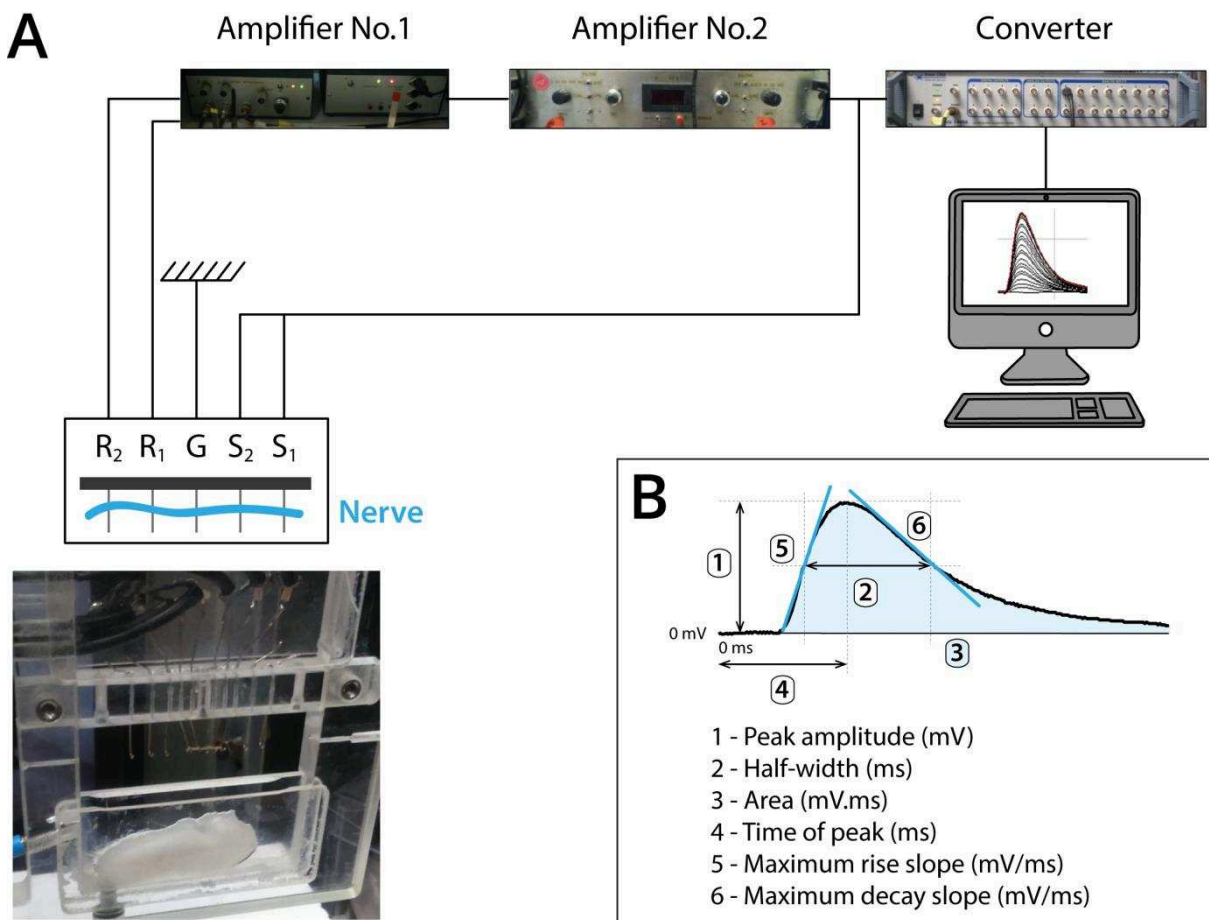
The authors are grateful to Emilien Pousse, Marc Long and the Ifremer staff at Argenton (Brittany, France) for their help in phytoplankton cultures.

REFERENCES

- Anderson, P. A. (1987). Properties and pharmacology of a TTX-insensitive Na⁺ current in neurones of the jellyfish *Cyanea capillata*. *J Exp Biol* **133**, 231-248.
- Benoit, E., Charpentier, G., Mateu, L., Luzzati, V., and Kado, R. (2000). Electrophysiology of the olfactory nerve of the pike, *Esox lucius*: a pilot study on optimal experimental conditions. *Cybiurn* **24**, 241-248.
- Boullot, F., Castrec, J., Bidault, A., Dantas, N., Payton, L., Perrigault, M., Tran, D., Amzil, Z., Boudry, P., Soudant, P., Hégaret, H., and Fabioux, C. (2017). Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their relations with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Drugs* **15**, 21.
- Bricelj, V. M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S. P., Scheuer, T., Catterall, W. A., and Trainer, V. L. (2005). Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* **434**, 763-767.
- Bricelj, V. M., and Shumway, S. E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev Fish Sci* **6**, 315-383.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.
- Connell, L. B., MacQuarrie, S. P., Twarog, B. M., Iszard, M., and Bricelj, V. M. (2007). Population differences in nerve resistance to paralytic shellfish toxins in softshell clam, *Mya arenaria*, associated with sodium channel mutations. *Mar Biol* **150**, 1227-1236.
- Daigo, K., Noguchi, T., Miwa, A., Nobufumi, K., and Hashimoto, K. (1988). Resistance of nerves from certain toxic crabs to paralytic shellfish poison and tetrodotoxin. *Toxicon* **26**, 485-490.

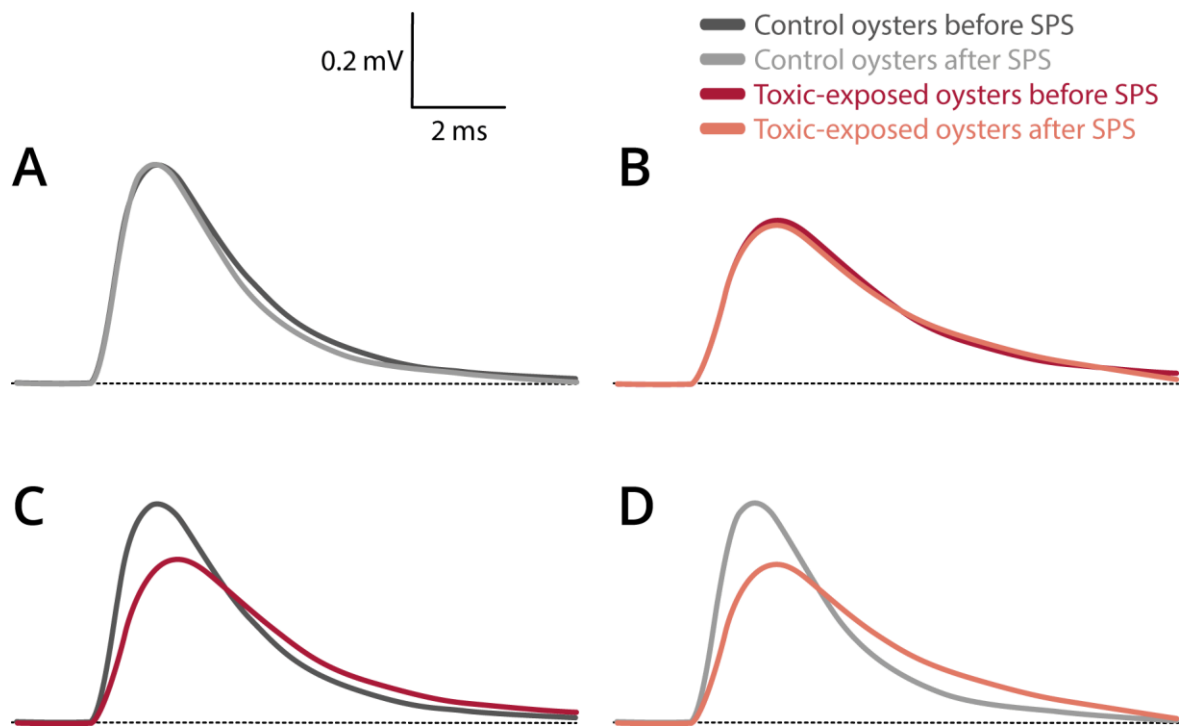
- Fabioux, C., Sulistiyani, Y., Haberkorn, H., Hégaret, H., Amzil, Z., and Soudant, P. (2015). Exposure to toxic *Alexandrium minutum* activates the detoxifying and antioxidant systems in gills of the oyster *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **48**, 55-62.
- Guillard, R. R. L., and Hargraves, P. E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **32**, 234-236.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., and Soudant, P. (2010). Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **9**, 427-439.
- Haberkorn, H., Tran, D., Massabuau, J. C., Ciret, P., Savar, V., and Soudant, P. (2011). Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar Pollut Bull* **62**, 1191-1197.
- Johansen, J., and Kleinhaus, A. L. (1987). Saxitoxin differentiates between two types of Na⁺-dependent potentials in the Retzius cell of hirudinid leeches. *J Exp Biol* **131**, 351-363.
- Kao, C. Y., and Fuhrman, F. A. (1967). Differentiation of the actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Toxicon* **5**, 25-34.
- Kvitek, R. G., and Beitler, M. K. (1991). Relative insensitivity of butter clam neurons to saxitoxin: a pre-adaptation for sequestering paralytic shellfish poisoning toxins as a chemical defense. *Mar Ecol Prog Ser* **69**, 47-54.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., and Amzil, Z. (2004). Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* **17**, 207-214.
- Le Goïc, N., Hégaret, H., Fabioux, C., Miner, P., Suquet, M., Lambert, C., and Soudant, P. (2013). Impact of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on Pacific oyster reproductive output: application of flow cytometry assays on spermatozoa. *Aquat Living Resour* **26**, 221-228.
- Sellner, K. G., Doucette, G. J., and Kirkpatrick, G. J. (2003). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**, 383-406.
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., and Massabuau, J.-C. (2010). Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* **298**, 338-345.
- Twarog, B. M. (1974). "Immunity" to paralytic shellfish toxin in bivalve molluscs. In: *Proceedings of the Second International Coral Reef Symposium*. Cameron A.M., Cambell B.M., Cribb A.B., Endean R., Jell J.S., Jones O.A., Mather P., Talbot F.H. (eds.). The Great Barrier Reef Committee, Brisbane, Australia, Vol. 1, pp. 505-512.
- Twarog, B. M., Hidaka, T., and Yamagushi, H. (1972). Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve molluscs. *Toxicon* **10**, 273-278.
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect* **108**, 133-141.
- Walne, P. R. (1966). Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis*. *Fish Invest Lond, Series II* **25**, 1-53.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1



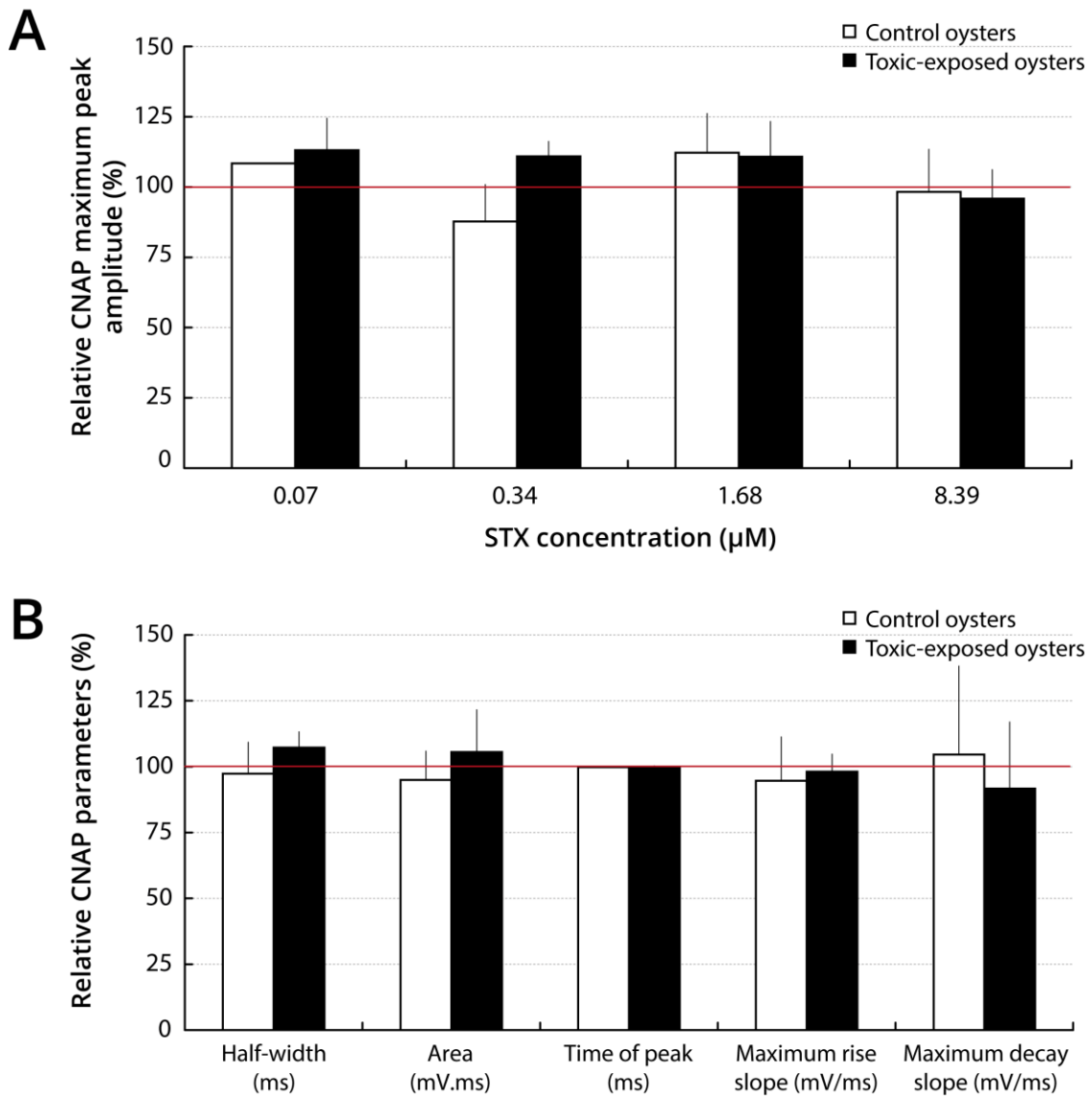
Experimental set-up for recording oyster compound nerve action potential (A) and description of measured parameters (B). (A) A given isolated cerebrovisceral nerve was placed on five uninsulated platinum wires fixed in a Plexiglas chamber. The stimulating electrodes (S₁ and S₂) were connected to a digital-analogic converter through which the computer delivered square-wave pulses. The recording electrodes (E₁ and E₂) were connected to a first high-gain differential input amplifier and then to a second one, to record the compound nerve action potential (CNAP). The output of the second amplifier was digitalized, through the analogic-digital converter, and stored on the computer. An electrode, located midway between the stimulating and recording pairs of electrodes, was connected to the ground. The Plexiglas chamber was covered and the humidity inside was ensured by wads of cotton soaked with standard physiological solution. (B) Six parameters (indicated in inset) were measured to characterize the CNAP recorded under various experimental conditions.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2



Comparison of CNAP recorded from nerves of farmed oysters fed with *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters). Superimposed traces of typical CNAP recorded in response to stimuli of 1 ms duration and 300 μ A intensity from cerebrovisceral nerves isolated from toxic-exposed (in red) and control (in black) oysters and submitted directly to a first recording session (dark colours) and then, kept in standard physiological solution (SPS) for less than 1 minute before undergoing a second recording session (light colours).

SUPPLEMENTARY FIGURE 3



STX effects on relatively resistant nerves of farmed oysters fed with *A. minutum* (toxic-exposed oysters) or *T. lutea* (control oysters). (A) Histogram of STX effects (0.07-8.39 μM) on the CNAP maximum peak amplitude recorded from toxic-exposed (■) and control (□) oysters. Each value represents the mean \pm SE of data obtained from 3-7 nerves, and is expressed as percentage of its value obtained in absence of toxin. (B) Histogram of parameters characterising the CNAP kinetics of nerves isolated from toxic-exposed (■) and control (□) oysters and pre-treated with 8.39 μM STX. Each value represents the mean \pm SE of data obtained from 6-7 nerves, and is expressed as percentage of its value measured in absence of toxin.

Involvement of the voltage-gated sodium channels in the response to toxins in *Crassostrea gigas*: the case of paralytic shellfish toxins

Abstract

During bloom of microalgae producing paralytic shellfish toxins (PST), filtering bivalves can bio-accumulate a large quantity of toxins and become toxic for human consumption. The amount of accumulated PST can greatly vary from one individual to another within a bivalve population. Indeed, under our experimental conditions, the amount of accumulated PST by Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*, varied by a factor of 450. To explain such variability we hypothesized the existence of several forms of voltage-gated sodium channel (Na_v), target of the PST, resulting in different sensitivities to PST. The main objective of this thesis was to understand whether there are relationships between nerve sensitivity to PST, the different forms of Na_v and the amount of accumulated PST.

The Na_v was first characterized in *C. gigas* by a molecular biology approach. Two Na_v genes were reported in *C. gigas*: CgNa_v1 , encoding a sodium channel and CgNa_v2 encoding a channel potentially selective for sodium and calcium. Alternative splicing of CgNa_v1 produced three variants (A, B and C) with different expression profiles: at the neuromuscular junctions for CgNa_v1A , in the nerve cells for CgNa_v1B and in both for CgNa_v1C . The amino acid Q observed in the binding site of PST (domain II), of the sequence CgNa_v1 for the 3 variants and in all individuals from the 4 studied populations possibly provide some PST resistance to oysters. Thus, the variants resulting from the genotyping/splicing of CgNa_v1 would not therefore be the determining factor of the level of bioaccumulation in oysters.

A second part allowed studying the nerve sensitivity to PST of *C. gigas* oyster in relation to the accumulation of PST by an electrophysiology approach. The sensitivity to saxitoxin (STX, a PST) of the cerebro-visceral nerves from oysters was assessed by studying their action potential (CNAP). *C. gigas* nerves have been shown to have sensitivity to STX of the micromolar range, which gives them intermediate sensitivity among bivalves. This nerve sensitivity may vary depending on the period at which the oysters were collected and potentially according to their physiological condition. A pre-exposure of oysters to *A. minutum* appears to increase nerve resistance to STX. However, there was no significant correlation between STX nerve sensitivity and PST content in the oyster digestive gland.

Overall, it appears that the variability of the PST accumulation by oysters would result rather from a physiological plasticity, in terms of filtration, ingestion and assimilation, than from a differential sensitivity of the Na_v .

Keywords: *Crassostrea gigas*, paralytic shellfish toxins, *Alexandrium minutum*, voltage-gated sodium channel

Implication des canaux sodium voltage-dépendant dans la réponse aux toxines chez *Crassostrea gigas*: le cas des phycotoxines paralysantes

Résumé

Lors des efflorescences de micro-algues productrices de toxines paralysantes (PST), les bivalves filtreurs peuvent bioaccumuler une grande quantité de toxines et devenir à leur tour toxiques, notamment pour l'homme. La quantité de toxines PST accumulée d'un individu à l'autre s'avère être très variable au sein même d'une population de bivalves. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la quantité de PST accumulées par des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, d'un même lot, exposées au dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*, variait d'un facteur 450. L'origine de cette variabilité est inconnue jusqu'alors mais l'une des hypothèses pour l'expliquer serait l'existence de plusieurs formes de canaux sodium voltage-dépendant (Na_v), cible des PST, qui confèreraient aux bivalves des sensibilités différentes aux PST. L'objectif principal de cette thèse était de comprendre s'il existe une sensibilité individuelle aux PST différente entre les huîtres et si cette variabilité pouvait être due à des formes différentes de Na_v .

Une première partie a permis de caractériser le Na_v chez *C. gigas* par une approche de biologie moléculaire. Deux gènes Na_v ont été mis en évidence chez *C. gigas* : $CgNa_v1$, codant un canal sodium et $CgNa_v2$ codant un canal potentiellement sélectif du sodium et du calcium. L'épissage alternatif de $CgNa_v1$ produit trois variants (A, B et C) avec des profils d'expression différents : au niveau des jonctions neuromusculaires pour $CgNa_v1A$, dans les cellules nerveuses pour $CgNa_v1B$ et dans les deux pour $CgNa_v1C$. L'acide aminé Q, observé dans le site de liaison aux PST (domaine II) de la séquence $CgNa_v1$ pour les 3 variants et chez tous les individus des 4 populations étudiées, pourrait conférer aux huîtres une certaine résistance aux PST. Ainsi, les variants issus du génotypage/épissage de $CgNa_v1$ ne seraient donc pas le point déterminant du niveau de bioaccumulation des huîtres.

Une deuxième partie a permis d'étudier la sensibilité aux PST des nerfs de l'huître creuse *C. gigas* en relation avec l'accumulation de PST par une approche d'électrophysiologie. La sensibilité à la STX des nerfs cérébroviscéraux d'huîtres a été évaluée en étudiant leur potentiel d'action (CNAP). Il a été montré que les nerfs de *C. gigas* possédaient une sensibilité à la STX de l'ordre du micromolaire, ce qui leur confère une sensibilité intermédiaire parmi les bivalves. Cette sensibilité des nerfs peut varier selon la période à laquelle les huîtres ont été prélevées et potentiellement selon leur condition physiologique. Une pré-exposition des huîtres à *A. minutum* semble augmenter la résistance des nerfs à la STX. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre la sensibilité nerveuse à la STX et la charge en PST dans la glande digestive des huîtres.

Il apparaît donc que la variabilité de l'accumulation des PST par les huîtres résulterait plutôt d'une plasticité physiologique, en terme de filtration, d'ingestion et d'assimilation, que d'une sensibilité différentielle des Na_v .

Mots-clés : *Crassostrea gigas*, toxines paralysantes, *Alexandrium minutum*, canal sodium voltage-dépendant