

Mémoire de Maîtrise en médecine

Douleur chronique et mécanismes moléculaires

*Étude d'une mutation du canal sodique Nav1.7 associée à un
syndrome douloureux chronique*

Étudiante

Muriel Schaller

Tutrice

Prof. Isabelle Décosterd

Service d'anesthésiologie, centre d'antalgie, CHUV

Co-tuteur

Dr. Marc Suter

Service d'anesthésiologie, centre d'antalgie, CHUV

Expert

Dr. Christian Wider, PD, MER

Service de neurologie, CHUV

Lausanne, janvier 2012

«Les malheurs humains ont des teintes multiples, jamais
ne se retrouve même nuance de douleurs.»

Eschyle, *Les Suppliantes*

Abstract

La douleur est définie par l'*International association for the study of pain (IASP)* comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou à une lésion potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion. Sa fonction est de signaler une menace potentielle pour l'intégrité de l'organisme. Mais ce ressenti peut persister ou être présent en l'absence d'une telle menace. Il s'agit dans ce cas d'une douleur pathologique dont les mécanismes étiologiques et physiopathologiques ne sont pas encore bien compris.

Ce travail de maîtrise a pour objectif l'étude d'une mutation génétique responsable d'un syndrome douloureux chronique. Cette mutation génétique a été décelée chez une famille de patients lausannois atteints de PEPD (*paroxysmal extreme pain disorder*) et touche le canal sodique Nav1.7. Ce canal est exprimé principalement dans les neurones des ganglions sensitifs et des ganglions sympathiques. Il est considéré comme responsable de la transmission de la douleur vers le SNC car des mutations « perte de fonction » de ce canal sont à l'origine d'une insensibilité congénitale à la douleur. Les mutations « gain de fonction » de ce canal sont à l'origine de syndromes douloureux chroniques tel le syndrome PEPD ou l'érythromélgie. La mutation présente chez les patients lausannois est située entre les segments transmembranaires S4 et S5 sur le 4^{ème} domaine de la sous-unité α du canal sodique Nav1.7. Cette mutation ne touche qu'un seul acide aminé, en position 1612 où une leucine est remplacée par une proline.

Les méthodes employées dans ce travail sont la mutagenèse pour générer des plasmides contenant le gène SCN9A muté (T4835C) codant pour le canal Nav1.7 muté (L1612P), l'amplification de ces plasmides dans des bactéries et la transfection de cellules HEK293 avec les plasmides contenant le gène SCN9A muté (T4835C). Nous avons ainsi pu induire l'expression du canal muté dans des cellules HEK293. Ces cellules pourront être utilisées par la suite pour enregistrer les courants ioniques transitant à travers les canaux exprimés à la membrane plasmique. Cela permettra de comparer les propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.7 muté L1612P avec celles du canal non muté. Nous avons également recherché l'expression d'ARNm codant pour les composants des canaux sodiques (sous-unités α et β) dans les cellules HEK293 non transfectées par la technique de qRT-PCR. Ceci afin de répertorier les composants des canaux sodiques exprimés constitutivement par les cellules HEK293 qui pourraient avoir une influence sur les mesures électrophysiologiques qui seront effectuées sur ces cellules.

Ce travail a permis de générer des plasmides contenant le gène SCN9A muté T4835C qui sont des outils nécessaires à la réalisation d'études plus détaillées sur le fonctionnement et les propriétés du canal Nav1.7 muté L1612P. Ce travail a également permis, par la méthode de la qRT-PCR, une analyse de l'expression d'ARNm codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7 et des sous-unités β 1 à 4 par les cellules HEK293. Les résultats ainsi obtenus permettent de mieux caractériser le transcriptome des cellules HEK293 et seront utiles pour interpréter avec plus de précisions les expérimentations électrophysiologiques utilisant ces cellules. L'étude électrophysiologique des cellules HEK293 exprimant le canal Nav1.7 muté par la technique du patch clamp est en cours. Elle sera poursuivie dans le cadre d'un travail de recherche dépassant le cadre de ce travail de maîtrise. Les cellules HEK293 exprimant le canal Nav1.7 muté (L1612P) pourront être également utilisées pour tester l'effet de divers médicaments sur ce canal. Ce qui pourrait d'une part permettre d'optimiser le traitement des patients souffrant de PEPD et d'autre part être utile pour tout traitement à but antalgique.

Mots clés : douleur, neuropathie, canal sodique Nav1.7, PEPD

Table des matières

1. Introduction.....	5
2. Objectifs.....	8
3. Méthodes et résultats.....	9
3.1 Expression du canal muté par les cellules HEK293.....	9
3.1.1 Méthodes.....	9
3.1.1.1 Protocole de mutagenèse du gène SCN9A.....	11
3.1.2 Résultats et discussion.....	14
3.2 Caractérisation de l'expression des sous-unités α et β par les cellules HEK293.....	16
3.2.1 Méthodes.....	16
3.2.2 Résultats.....	17
3.2.2.1 qPCR gène codant pour Nav1.7 (qPCR1 du 17.03.11).....	18
3.2.2.2 qPCR gène codant pour β 1 (qPCR2 du 02.03.11).....	19
3.2.2.3 qPCR gène codant pour β 2 (qPCR2 du 17.03.11).....	20
3.2.2.4 qPCR gène codant pour β 3 (qPCR2 du 02.03.11).....	21
3.2.2.5 qPCR gène codant pour β 4 (qPCR3 du 02.03.11).....	22
3.2.2.6 Tableau des résultats.....	23
3.2.3 Discussion et limitations.....	25
4. Conclusion et perspectives.....	26
5. Remerciements.....	27
6. Bibliographie.....	27
7. Annexes.....	28
Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ARNm de cellules HEK293.....	28
Annexe 2 : Protocole de reverse transcription.....	28
Annexe 3 : Protocole de PCR quantitative en temps réel.....	29

1.Introduction

La douleur est une fonction essentielle pour la survie d'un organisme. Elle a pour but de signaler une menace potentielle pour la survie et également d'entraîner un apprentissage de la cause de ce danger afin de permettre la mise en place de comportements d'évitement dans le futur. La nociception est le processus neuronal permettant l'intégration et le traitement d'un stimulus nociceptif. Par abus de langage, ce terme est souvent utilisé de façon interchangeable avec le terme de douleur. Cependant le terme « nociception » se réfère uniquement à l'aspect sensoriel de la perception d'un stimulus alors que le terme « douleur » prend également en compte l'aspect émotionnel. La fonction nociceptive augmente fortement les chances de survie d'un organisme car elle lui permet de tout faire pour stopper précocement une stimulation délétère à son intégrité.

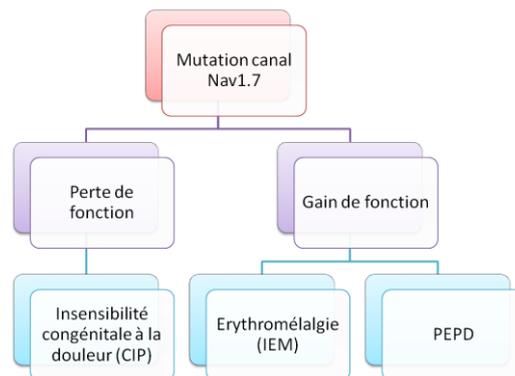
La douleur est définie par l'IASP (*International association for the study of pain*) comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou à une lésion potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion (1). La douleur est une expérience consciente influencée par des facteurs pathologiques, génétiques, cognitifs, émotionnels, psychologiques, psychiatriques, mnésiques et socioculturels. Le terme « douleur » est donc défini comme un ressenti subjectif qui a trait à une sensation désagréable. Ce ressenti est produit par la conduction d'une information depuis une région lésée du corps vers le SNC et également par de nombreuses connections cérébrales qui viennent moduler cette information. Les régions cérébrales impliquées dans cette modulation ne sont pas encore toutes connues mais les régions limbiques impliquées dans les émotions et les régions amygdaliennes ont été identifiées comme étant des régions importantes dans la régulation du sentiment de douleur (2)(3). Il semble exister une grande complexité dans la régulation de la douleur ce qui signifierait également que cette fonction présente un avantage évolutif. En effet, les personnes incapables de ressentir la douleur en raison d'une mutation génétique ont une espérance de vie réduite car il leur est plus difficile d'acquérir certains mécanismes de protection dont l'apprentissage est clairement favorisé par la capacité de ressentir la douleur (4)(5).

Il existe différents types de douleurs : la douleur nociceptive, la douleur inflammatoire, la douleur neuropathique et la douleur fonctionnelle. La douleur nociceptive est un mécanisme utile à la survie de l'individu car elle permet la reconnaissance de stimuli menaçant l'intégrité de l'organisme (stimuli nociceptifs). La douleur inflammatoire est également utile car elle entraîne des comportements qui permettent de protéger une zone du corps lésée et ainsi favoriser sa guérison. Les autres types de douleurs sont des douleurs pathologiques qui peuvent être ressenties en l'absence de cause nociceptive et qui n'apportent aucun bénéfice en termes de survie. Ces douleurs sont le plus souvent chroniques et ne répondent pas bien au traitement pharmacologique. Les douleurs chroniques sont aujourd'hui de plus en plus prises en considération par les professionnels de la santé car elles entraînent d'importantes répercussions sur la vie quotidienne des patients atteints, autant sur les plans physique que psychique. Les douleurs chroniques ont souvent pour conséquence une perte de fonctionnalité chez les patients qui en souffrent avec un impact socio-économique (6). Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la douleur chronique permettrait un traitement plus efficace de ces symptômes pour réduire au maximum leurs conséquences sur la vie des patients.

Les mécanismes qui mènent à la chronicisation de la douleur ne sont pas encore bien compris. Le groupe de recherche d'Isabelle Décosterd (laboratoire de recherche du centre d'antalgie) concentre ses recherches sur l'étude des mécanismes moléculaires de la douleur neuropathique. Ce projet de maîtrise s'insère dans ce cadre en prenant part à l'étude d'une mutation génétique

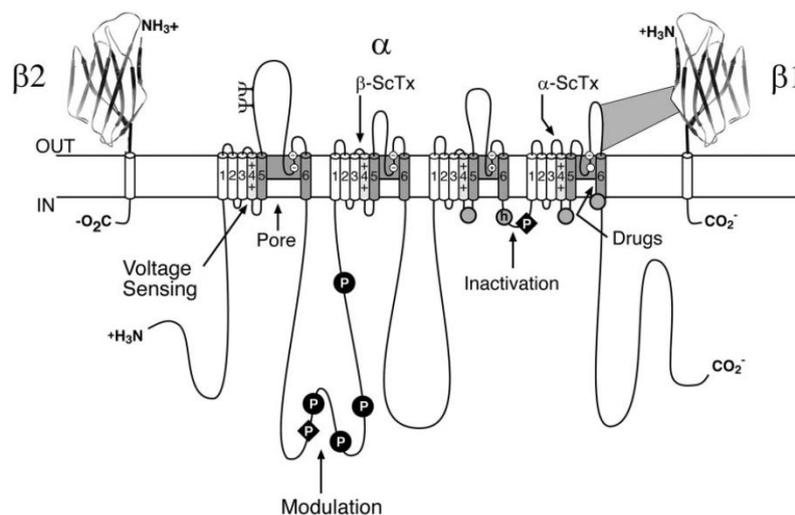
associée à un syndrome douloureux chronique, le syndrome PEPD (*paroxysmal extreme pain disorder*). Cette mutation touche un canal sodique voltage dépendant, le canal Nav1.7 (7). Ce canal sodique est considéré comme nécessaire à la transmission de la sensation de douleur depuis les nocicepteurs périphériques vers le SNC et il est exprimé principalement dans les nocicepteurs (neurones sensitifs répondant à des stimuli nociceptifs). Les mutations « perte de fonction » de ce canal entraînent une insensibilité congénitale à la douleur (*congenital insensitivity to pain ou CIP*) (8). Les mutations « gain de fonction » de ce canal entraînent quant à elles des syndromes douloureux chroniques tels le syndrome PEPD et l'érythromélgie (9). Les mutations responsables de ces syndromes touchent le gène SCN9A codant pour la sous-unité α du canal sodique voltage dépendant Nav1.7.

Figure 1 : Mutations du canal sodique Nav1.7



Les canaux sodiques médiés par le voltage (canaux Nav) sont exprimés dans tous les types de cellules excitables et permettent de générer des potentiels d'action. Il existe 9 types différents de canaux Nav (Nav1.1 à Nav1.9). Ceux-ci sont exprimés dans des types cellulaires différents, possèdent différentes propriétés pharmacologiques, mais partagent tous la même structure (10). Les canaux Nav sont composés d'une sous-unité α et de deux sous-unités β . La sous-unité α dont il existe 9 types différents (1.1 à 1.9) forme la structure même d'un canal (c'est-à-dire le pore) et détermine son isoforme. Les sous-unités β sont impliquées dans la régulation de l'expression des canaux à la membrane plasmique. Les sous-unités β modulent également la cinétique d'ouverture des canaux et leur dépendance au voltage (11).

Figure 2 : Organisation transmembranaire des sous-unités des canaux sodiques (10)

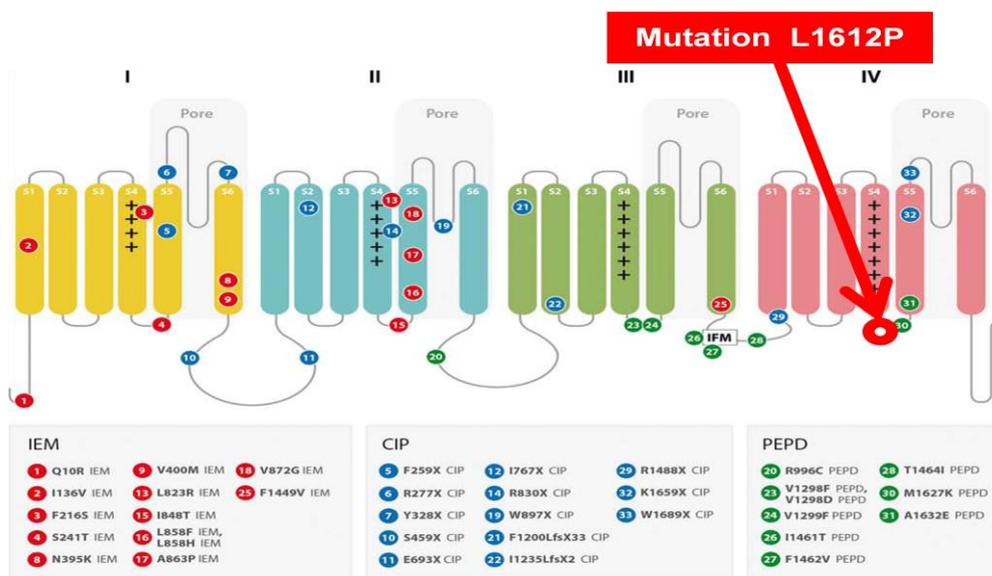


Les canaux Nav1.7 semblent jouer un rôle déterminant dans l'apparition de la sensation de douleur. Ils sont exprimés dans les neurones des ganglions sensitifs et des ganglions

sympathiques. Actuellement une vingtaine de mutations « gain de fonction » distinctes ont été identifiées chez des patients souffrant d'érythromélgie ou de PEPD (4). Ces deux syndromes provoquent des crises douloureuses déclenchées par des stimuli non nociceptifs comme, par exemple, des activités de la vie quotidienne. L'érythromélgie est caractérisée par des crises douloureuses des extrémités des membres. Les patients perçoivent une sensation de brûlure et le membre touché devient fortement érythémateux. Le syndrome PEPD est caractérisé par des douleurs paroxystiques rectales, oculaires ou maxillaires qui peuvent être accompagnées par un érythème. Les crises sont déclenchées par la défécation, l'air froid, la déglutition ou encore les émotions. Certains patients atteints de PEPD peuvent également souffrir de crises non convulsives avec asystolie (7).

Une famille porteuse d'une mutation « gain de fonction » du canal sodique Nav1.7 et souffrant de PEPD a été identifiée au CHUV. Les membres affectés par cette mutation présentent des douleurs chroniques, dont les épisodes de crises douloureuses se manifestent de manière paroxystique. La mutation présente chez les patients lausannois est située entre les segments transmembranaires S4 et S5 sur le 4^{ème} domaine de la sous-unité α du canal sodique Nav1.7. Cette mutation ne touche qu'un seul acide aminé en position 1612 où une leucine est remplacée par une proline. L'objectif de ce travail de maîtrise est l'étude de la mutation L1612P.

Figure 3 : Sous-unité α du canal sodique Nav1.7, mutations pathogéniques identifiées (4)



L'hypothèse retenue dans ce travail est que la mutation L1612P du canal Nav1.7 découverte chez cette famille de patients lausannois atteints de PEPD participe à un gain de fonction du canal Nav1.7, ce qui entrainerait la symptomatologie présentée par les sujets porteurs de cette mutation (12). Diverses étapes expérimentales sont requises pour parvenir à l'étude des propriétés de ce canal muté. Il est tout d'abord nécessaire de créer un plasmide contenant le gène SCN9A muté T4835C, mutation génétique présente chez les patients lausannois. Puis il s'agit d'induire l'expression du canal muté dans des cellules HEK293. Ces cellules seront par la suite utilisées pour enregistrer les courants ioniques transitant à travers les canaux exprimés à la membrane plasmique (13). Cet enregistrement pourra être effectué grâce à la technique du patch clamp. Les propriétés électrophysiologiques des canaux mutés pourront ainsi être comparées à celles des canaux non mutés (wild type), ce qui permettra de déduire l'effet du changement d'un seul acide aminé sur la cinétique du canal sodique Nav1.7.

Les propriétés de ce canal muté méritent d'être investiguées puisque les canaux Nav1.7 semblent être essentiels dans l'apparition des symptômes de PEPD. La perturbation de fonction

induite par cette mutation permettra peut être de mieux comprendre la fonction physiologique du canal Nav1.7. De plus, le canal sodique Nav1.7 serait une cible thérapeutique privilégiée pour tout traitement à but antalgique. Les canaux Nav1.7 sont également impliqués dans le développement d'une sensibilité augmentée à la douleur dans les situations de lésions tissulaires et d'inflammation. Une meilleure compréhension du fonctionnement des canaux Nav1.7 pourrait permettre d'améliorer les connaissances actuelles sur les mécanismes qui sous-tendent l'apparition de douleurs chroniques.

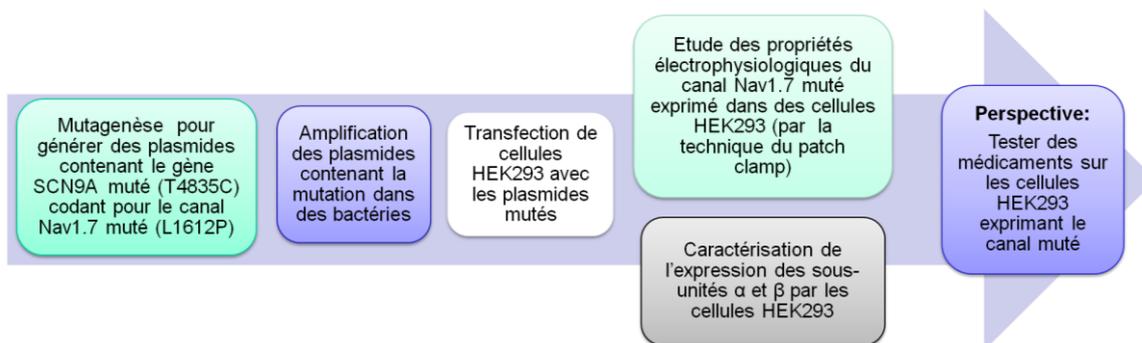
2. Objectifs

Pour ce travail nous avons défini deux objectifs principaux à atteindre et un troisième qui devra être réalisé sur une durée plus longue que celle allouée à ce projet de master.

1. Exprimer le canal Nav1.7 muté (L1612P) dans des cellules HEK293.
2. Caractériser l'expression des sous-unités α et β (ces dernières pouvant intervenir sur les propriétés biophysiques du courant) dans les cellules HEK293.
3. Etudier les différentes propriétés électrophysiologiques du canal Nav 1.7 muté (L1612P) et les comparer à celles du canal Nav1.7 non muté (wild type ou WT).

Le schéma suivant (fig. 4) liste les différentes étapes nécessaires à la réalisation de nos objectifs.

Figure 4 : Objectifs



Afin d'atteindre notre premier objectif j'ai généré des plasmides contenant le gène SCN9A muté T4835C à l'aide d'un protocole de mutagenèse que nous avons élaboré. Une étape d'amplification de ces plasmides a été ensuite effectuée en utilisant la transformation bactérienne. Puis j'ai transfecté ces plasmides dans des cellules HEK293. Par la méthode de la qRT-PCR j'ai analysé l'expression constitutive des sous-unités α du canal sodique Nav1.7 et des sous unités β 1, β 2, β 3 et β 4 par les cellules HEK293 afin de mener à bien le second objectif. Nous avons également pu débiter l'étude du canal Nav1.7 muté L1612P par la technique du patch-clamp. Mais les expérimentations électrophysiologiques qui permettent d'analyser les propriétés du canal muté comparées à celles du canal WT nécessitent des compétences spécialisées et leur réalisation demande beaucoup de temps. Ce dernier objectif sera poursuivi par la suite dans le cadre du projet d'étude de la mutation L1612P. Nous envisageons à l'avenir de pouvoir tester l'action de différents médicaments sur le canal muté.

Les méthodes utilisées dans ce travail et les résultats ainsi obtenus sont détaillés dans la section suivante.

3. Méthodes et résultats

3.1 Expression du canal muté par les cellules HEK293

Pour réaliser notre premier objectif il est essentiel d'obtenir un plasmide contenant le gène SCN9A muté T4835C (codant pour le canal Nav1.7 muté L1612P) en quantité suffisante. Je vais décrire ici les démarches qui ont abouti à la réalisation de cet objectif.

3.1.1 Méthodes

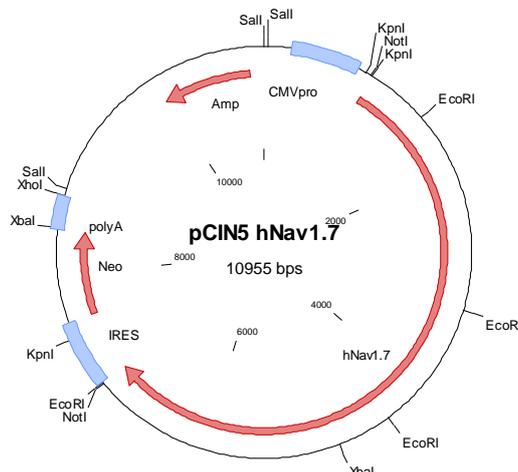
La mutation génétique étudiée et ses répercussions sur la traduction du gène en protéine sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1 :

Gène	SCN9A <i>Homo Sapiens</i> (sur le chromosome 2)
Acide nucléique	Mutation T4835C : mutation d'une thymine en cytosine en position 4835 (CDS NM_002977.3, nombre total de nucléotides : 5943)
Codon	CTA changé en CCA (nucléotides 4834 à 4836)
Acide aminé	Mutation L1612P : mutation d'une leucine en proline en position 1612 (nombre total d'acides aminés : 1977)

Nous avons obtenu le plasmide *pCIN5h Nav1.7* contenant le gène SCN9A WT codant pour la sous-unité α du canal sodique Nav1.7 par le Dr S. Tate (Convergence Pharmaceuticals, Cambridge, UK). Le plasmide *pCIN5h Nav1.7* est composé du gène SCN9A WT et contient également des sites de restriction pour EcoRI, Sall, KpnI, NotI, XbaI et XhoI (enzymes de restriction). Il contient aussi un gène de résistance à l'ampicilline qui sera utile dans la suite de l'expérimentation pour détecter les bactéries ayant acquis le plasmide lors de l'étape de transformation. Un gène de résistance à la néomycine est inclus dans le plasmide pour pouvoir sélectionner les cellules de mammifères qui auront été transfectées avec ce plasmide. Le site IRES (*internal ribosome entry site*) sert à la traduction de l'ARNm.

Figure 5 : Plasmide *pCINh Nav1.7*



Le principe de la mutagenèse est une technique permettant de remplacer une base par une autre dans une séquence d'acides nucléiques. La mutagenèse utilise la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) dans le but d'introduire la mutation d'un seul acide nucléique sur les brins d'ADN pendant la réaction d'amplification. L'introduction de cette mutation est possible grâce à l'utilisation d'amorces (ou primers) qui ne s'apparient pas parfaitement au brin d'ADN correspondant mais qui contiennent elles-mêmes le changement d'un seul acide nucléique. La DNA polymérase, qui est l'enzyme responsable de l'amplification des brins d'ADN parentaux, continuera à construire la chaîne d'acide nucléique malgré ce léger défaut d'appariement. A la fin de la PCR la mutation voulue aura été insérée à chaque cycle de réplication et sera ainsi présente sur tous les brins d'ADN. Les brins d'ADN parentaux présents au départ et ne contenant pas la mutation seront éliminés grâce à l'enzyme DpnI qui dégrade les brins d'ADN méthylés spécifiques du plasmide parental.

Cette technique m'a permis d'obtenir un plasmide contenant le gène SCN9A muté T4835C à partir du gène WT contenu dans le plasmide *pCIN5h Nav1.7*. J'ai tout d'abord tenté d'effectuer cette mutagenèse à l'aide du kit *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*. Ce protocole a toujours échoué malgré mes nombreux essais. Afin de pouvoir arriver à un résultat nous avons conçu un nouveau protocole de mutagenèse pour le gène SCN9A. Je détaillerai en deuxième lieu le protocole qui m'a permis de réaliser cette mutagenèse.

Figure 6 : Résumé du procédé de mutagenèse (selon le kit QuikChange)

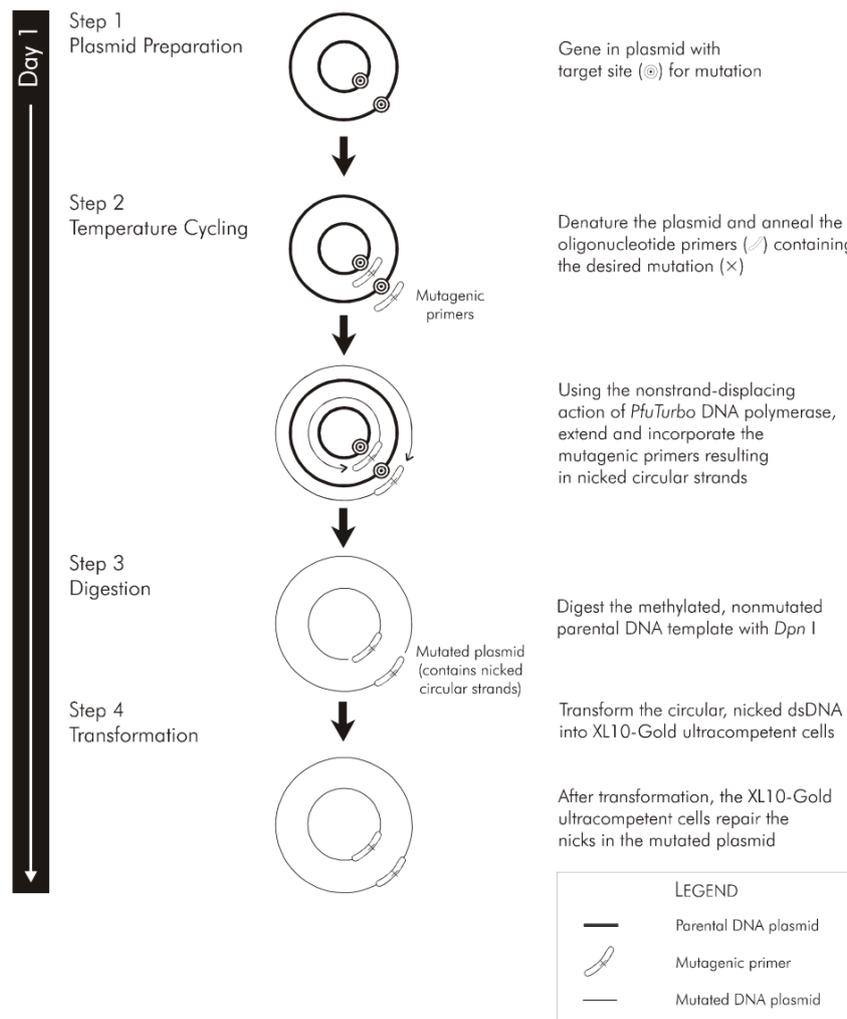
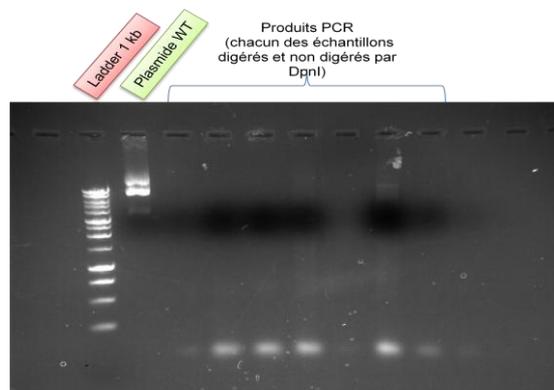


FIGURE 1 Overview of the QuikChange® XL site-directed mutagenesis method.

La figure 7 montre l'électrophorèse des produits PCR de l'une de nos tentatives de réalisation de la mutagenèse à partir de ce kit. Les produits PCR d'une mutagenèse réussie devraient avoir une taille identique au plasmide WT initial. Or aucune de nos multiples tentatives n'a abouti à ce résultat malgré le fait que nous ayons tenté de varier les concentrations du plasmide WT et divers paramètres (température, nombre de cycles d'amplification) du protocole.

Figure 7 : Produits PCR de différents essais de mutagenèse selon le kit QuikChange II XL



Nous avons donc décidé de ne plus utiliser le protocole du kit et nous avons élaboré le protocole suivant.

3.1.1.1 Protocole de mutagenèse du gène *SCN9A*

Les nouveaux primers de mutagenèse ont été élaborés en utilisant le programme de design de primer *PrimerX* (disponible en ligne à l'adresse suivante : <http://www.bioinformatics.org/primerx/>). Nous avons choisi de générer les primers à partir de la séquence d'ADN que nous voulions changer. Puis nous avons inséré la séquence du gène d'intérêt répertoriée dans *Pubmed nucleotide* sous la dénomination NM_002977.3 dans le programme *PrimerX* et sélectionné la mutation T4835C ainsi que le protocole de design des primers selon le kit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit by Stratagene®, ce qui nous a permis de générer quatre paires de primers contenant la mutation d'intérêt. Nous avons choisi arbitrairement d'utiliser les primers numéro 2 et 4. Les 4 paires de primers générés à l'aide du programme *PrimerX* sont les suivants :

Primer pair 1

```

*
Forward: 5' GCCGAATCCTACGTCAGTCAAAGGAGCAAAG 3'
Reverse: 5' CTTTGCTCCTTTGACTGGACGTAGGATTCGGC 3'
*

GC content: 53.12%      Location: 4820-4851
Melting temp: 79.1°C   Mismatched bases: 1
Length: 32 bp          Mutation: Substitution
5' flanking region: 15 bp Forward primer MW: 9836.52 Da
3' flanking region: 16 bp Reverse primer MW: 9813.47 Da

```

Primer pair 2

```

*
Forward: 5' GGCCGAATCCTACGTCAGTCAAAGGAGCAAAG 3'
Reverse: 5' CTTTGCTCCTTTGACTGGACGTAGGATTCGGCC 3'
*

GC content: 54.55%      Location: 4819-4851
Melting temp: 80.6°C   Mismatched bases: 1
Length: 33 bp          Mutation: Substitution
5' flanking region: 16 bp Forward primer MW: 10165.73 Da
3' flanking region: 16 bp Reverse primer MW: 10102.66 Da

```

Primer pair 3

```

*
Forward: 5' GGCCGAATCCTACGTCAGTCAAAGGAGCAAAGG 3'
Reverse: 5' CCTTTGCTCCTTTGACTGGACGTAGGATTCGGCC 3'
*

GC content: 55.88%      Location: 4819-4852
Melting temp: 81.6°C   Mismatched bases: 1
Length: 34 bp          Mutation: Substitution

```

5' flanking region: 16 bp Forward primer MW: 10494.94 Da
3' flanking region: 17 bp Reverse primer MW: 10391.85 Da

Primer pair 4

*

Forward: 5' GATTGGCCGAATCCTACGTC**C**AGTCAAAGGAGCAAAGGGG 3'
Reverse: 5' CCCTTTGCTCCTTTGACT**G**GACGTAGGATTCGGCCAATC 3'

*

GC content: 55.00% Location: 4815-4854
Melting temp: 84.2°C Mismatched bases: 1
Length: 40 bp Mutation: Substitution
5' flanking region: 20 bp Forward primer MW: 12404.18 Da
3' flanking region: 19 bp Reverse primer MW: 12190.04 Da

Matériel PCR pour la mutagenèse :

- plasmide WT [83,9 ng/μl]
- primer 1 forward 100μM
- primer 1 reverse 100μM
- primer 4 forward 100μM
- primer 4 reverse 100μM
- DMSO (doit être à une concentration de 5-10% dans le volume final)
- dNTPmix (*Promega*) 10 mM
- Pfu DNA polymérase (*Promega*)
- Buffer spécifique à la Pfu 10x
- dd H2O

Nous avons décidé d'utiliser du DMSO (diméthylsulfoxyde, C₂H₆OS) dans la moitié de nos échantillons. Il s'agit d'un solvant organique ayant une forte polarité qui peut potentiellement augmenter le rendement de la mutagenèse car il permet une meilleure séparation des brins d'ADN. Il peut aussi potentiellement entraver l'appariement des primers.

Préparation :

Échantillons avec DMSO :

- DMSO : 5 μl
- Buffer Pfu : 5 μl
- DNA WT : 0,5 μl
- dNTP : 1 μl
- Primer 1 (for) : 0,125 μl
- Primer 1 (rev) : 0,125 μl
- Primer 4 (for) : 0,125 μl
- Primer 4 (rev) : 0,125 μl
- Pfu DNA polymérase : 1 μl
- ddH2O : 37 μl

Échantillons sans DMSO :

- DMSO : Ø
- Buffer Pfu : 5 μl
- DNA WT : 0,5 μl
- dNTP : 1 μl
- Primer 1 (for) : 0,125 μl
- Primer 1 (rev) : 0,125 μl
- Primer 4 (for) : 0,125 μl
- Primer 4 (rev) : 0,125 μl
- Pfu DNA polymérase : 1 μl
- ddH2O : 42 μl

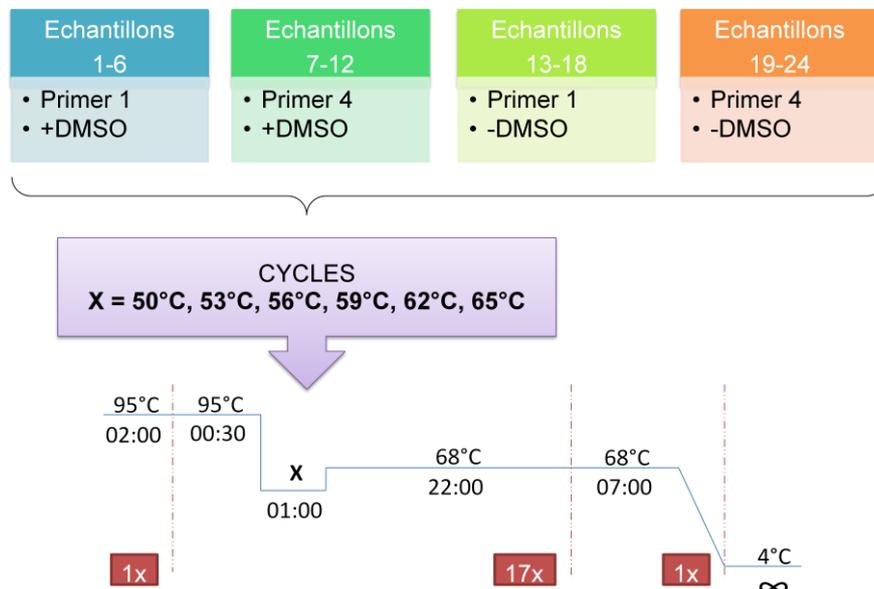
Le volume total de chaque échantillon est de 50 μl. Nous avons préparé 4 groupes d'échantillons :

- Echantillons 1) à 6) : Primer 1 avec DMSO
- Echantillons 7) à 12) : Primer 4 avec DMSO
- Echantillons 13) à 18) : Primer 1 sans DMSO
- Echantillons 19) à 24) : Primer 4 sans DMSO

Les six échantillons dans chaque groupe ont chacun subi la PCR avec une température d'appariement des primers différente (50°C, 53°C, 56°C, 59°C, 62°C, 65°C). Nous avons utilisé une machine PCR avec vitesse de changement de température lent, environ 2-3°C/seconde. Les

cycles de PCR sont décrits dans la figure suivante (fig. 8). Elle illustre nos quatre groupes d'échantillon ainsi que les différentes températures d'appariement des amorces que nous avons testées (représentées par X). Les résultats que nous avons obtenus à l'aide de ce protocole sont décrits dans le chapitre suivant.

Figure 8 : Résumé du protocole de mutagenèse du gène SCN9A inséré dans le plasmide pCIN5h Nav1.7



J'ai ensuite effectué une étape de transformation de bactéries avec les plasmides des échantillons 6, 10, 18 et 20. Cette étape permet une amplification des plasmides par les bactéries. Elle a été réalisée avec les XL10-Gold® ultracompetent cells (E. Coli) qui proviennent du kit *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*. Pour cette étape nous avons suivi le protocole décrit dans le kit.

J'ai ensuite déposé les bactéries sur un milieu de culture (Agar) imprégné d'ampicilline. Les bactéries ayant acquis un gène de résistance à l'ampicilline grâce au plasmide muté seront ainsi sélectionnées. J'ai isolé 3 colonies de bactéries des échantillons 10, 18 et 20 pour poursuivre l'expérience. J'ai mis en culture ces 9 échantillons puis j'ai extrait l'ADN des bactéries. La lyse bactérienne et l'obtention d'un stock de plasmides mutés ont été effectuées selon la méthode *NucleoSpin® Plasmid QuickPure* (Miniprep).

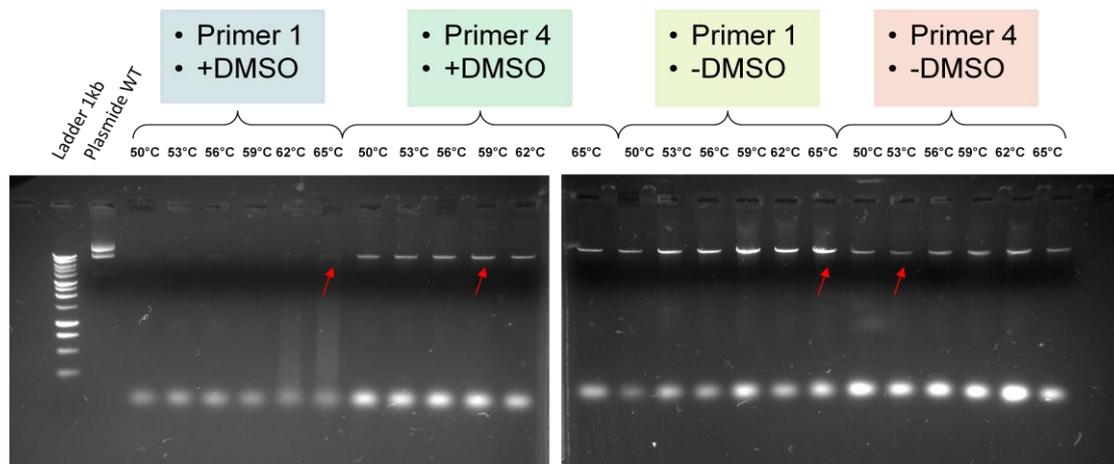
Puis les plasmides ainsi amplifiés par les bactéries ont été digérés par EcoRI (enzyme de restriction) afin de réaliser une électrophorèse de contrôle. Cette étape permet de détecter les échantillons contenant des plasmides ayant le même profil de restriction que le plasmide WT.

L'insertion de la mutation T4835C dans le gène SCN9A a été ensuite démontrée par séquençage. Nous avons effectué le génotypage complet d'un échantillon pour exclure l'apparition d'autres mutations durant la procédure. Le séquençage complet de l'échantillon choisi (échantillon 10a) a nécessité la création de primers de séquençage spécifiques. Les bactéries de l'échantillon 10a ont été mises en culture et nous avons effectué une Maxiprep (selon *NucleoBond® plasmid purification*) pour obtenir une grande quantité de plasmide *pCIN5h Nav1.7* contenant le gène SCN9A muté T4835C. Puis nous avons transfecté ce plasmide muté dans des cellules HEK293 (cellules HEK Bern) et avons débuté l'**expérimentation électrophysiologique** (par la technique du **patch clamp**) sur ces cellules pour étudier les propriétés du canal muté.

3.1.2 Résultats et discussion

Grâce à ce protocole de mutagenèse nous sommes parvenus à obtenir un plasmide contenant le gène SCN9A muté T4835C. La figure 9 explicite les résultats obtenus. Nous avons sélectionné 4 produits PCR (échantillons 6, 10, 18 et 20, mis en évidence par des flèches rouges sur fig. 9) pour poursuivre l'expérience. Ces produits PCR sont de même taille que le plasmide WT, ce qui indique l'intégrité des plasmides suite à la mutagenèse.

Figure 9 : Electrophorèse des produits PCR obtenus avec notre protocole de mutagenèse



Légendes : contenu des puits (de gauche à droite) :

- | | |
|---|--|
| 1. BenchTop Ladder 1 kb (Promega) | 14. Echantillon 12) Primer 4 +DMSO, t° appariement 65°C |
| 2. Nav 1.7 WT (500ng) | 15. Echantillon 13) Primer 1 - DMSO, t° appariement 50°C |
| 3. Echantillon 1) Primer 1 + DMSO, t° appariement 50°C | 16. Echantillon 14) Primer 1 - DMSO, t° appariement 53°C |
| 4. Echantillon 2) Primer 1 + DMSO, t° appariement 53°C | 17. Echantillon 15) Primer 1 - DMSO, t° appariement 56°C |
| 5. Echantillon 3) Primer 1 + DMSO, t° appariement 56°C | 18. Echantillon 16) Primer 1 - DMSO, t° appariement 59°C |
| 6. Echantillon 4) Primer 1 + DMSO, t° appariement 59°C | 19. Echantillon 17) Primer 1 - DMSO, t° appariement 62°C |
| 7. Echantillon 5) Primer 1 + DMSO, t° appariement 62°C | 20. Echantillon 18) Primer 1 - DMSO, t° appariement 65°C |
| 8. Echantillon 6) Primer 1 + DMSO, t° appariement 65°C | |
| 9. Echantillon 7) Primer 4 +DMSO, t° appariement 50°C | 21. Echantillon 19) Primer 4 - DMSO, t° appariement 50°C |
| 10. Echantillon 8) Primer 4 +DMSO, t° appariement 53°C | 22. Echantillon 20) Primer 4 - DMSO, t° appariement 53°C |
| 11. Echantillon 9) Primer 4 +DMSO, t° appariement 56°C | 23. Echantillon 21) Primer 4 - DMSO, t° appariement 56°C |
| 12. Echantillon 10) Primer 4 +DMSO, t° appariement 59°C | 24. Echantillon 22) Primer 4 - DMSO, t° appariement 59°C |
| 13. Echantillon 11) Primer 4 +DMSO, t° appariement 62°C | 25. Echantillon 23) Primer 4 - DMSO, t° appariement 62°C |
| | 26. Echantillon 24) Primer 4 - DMSO, t° appariement 65°C |

La figure 10 (voir ci-après) illustre l'étape de transformation bactérienne avec les plasmides des échantillons 6, 10, 18 et 20. Les bactéries transformées avec les plasmides de l'échantillon 6 n'ont pas pu croître sur le milieu imprégné d'ampicilline. Cela indique qu'elles n'ont pas acquis le plasmide contenant le gène de résistance ou que le plasmide acquis ne contenait pas le gène de résistance. Seules les bactéries provenant des échantillons 10, 18 et 20 ont été mises en culture. Trois colonies (a, b, c) ont été isolées dans chacun de ces trois échantillons.

La figure 11 détaille les contrôles effectués avec l'enzyme de restriction EcoRI. Les échantillons 10a, 18a, 18b et 18c (signalés par des flèches bleues sur la fig. 11) présentent un profil de restriction identique à celui du plasmide WT. Cela nous indique que les sites de restriction d'EcoRI présents dans le plasmide WT ont conservé leur intégrité pendant les différentes étapes de notre expérience. Leur séquence n'a donc pas subi de modification lors de la réaction de PCR ou lors de l'étape de transformation bactérienne. Nous avons sélectionné l'échantillon 10a pour poursuivre l'expérience. Comme mentionné dans la section précédente l'insertion de la mutation T4835C dans le gène SCN9A contenu dans les plasmides de cet échantillon a été démontrée par séquençage. Cette étape est également nécessaire pour exclure l'apparition d'autres mutations durant la procédure. C'est à partir de l'échantillon 10a que nous avons obtenu un stock de

plasmides *pCIN5h Nav1.7* contenant le gène *SCN9A* muté T4835C codant pour le canal Nav1.7 muté L1612P.

Figure 10 : Transformation et amplification bactérienne

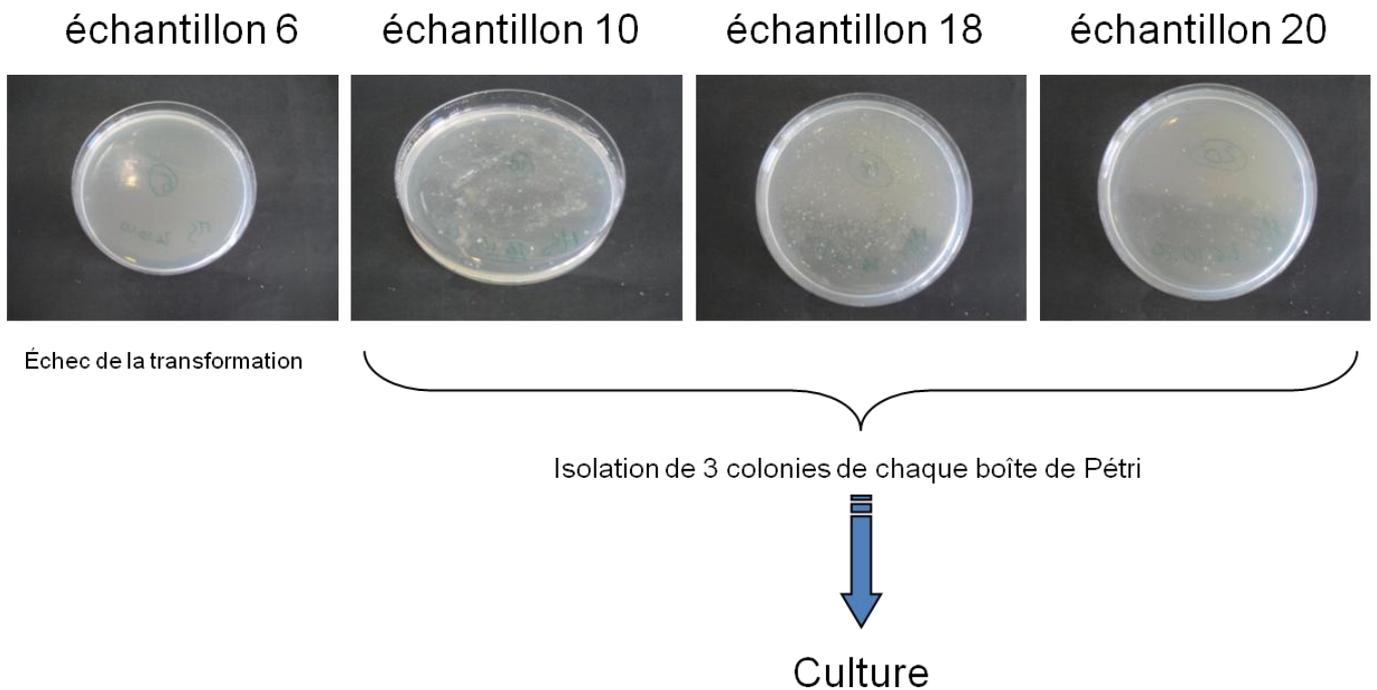
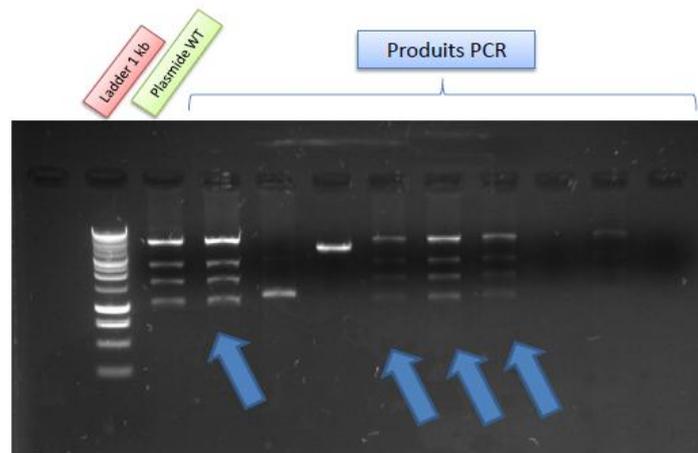


Figure 11 : Electrophorèse des produits PCR amplifiés par transformation bactérienne. Puits de gauche à droite : ladder 1kb, plasmide WT, produits PCR 10a, 10b, 10c, 18a, 18b, 18c, 20a, 20b, 20c.



Nous avons débuté les expériences de patch clamp sur les cellules HEK293 exprimant le canal Nav1.7 muté L1612P mais nous n'avons pas encore obtenu assez de données pour permettre une interprétation fiable des résultats. Il est aussi nécessaire de connaître mieux le transcriptome propre aux cellules HEK293 afin de pouvoir interpréter au mieux les résultats des expérimentations électrophysiologiques sur ces cellules (obtenus par la technique du patch clamp). C'est le sujet de la section suivante de ce travail de maîtrise.

3.2 Caractérisation de l'expression des sous-unités α et β par les cellules HEK293

3.2.1 Méthodes

Nous cherchons à quantifier l'expression d'ARNm codant pour les sous-unités α et β des canaux sodiques dans les cellules HEK293 par la technique de la qRT-PCR. Ceci afin connaître leur transcriptome usuel avant de commencer la transfection des plasmides mutés L1612P dans ces cellules. Nous avons tout d'abord extrait l'ARNm des deux échantillons de cellules suivants (selon le protocole décrit dans l'annexe 1) :

1. échantillon 1 : cellules HEK Nav1.7 (transfectées de manière stable avec des plasmides contenant le gène SCN9A).
2. échantillon 2 : cellules HEK (non transfectées).

Ces deux échantillons de cellules proviennent du laboratoire du groupe de recherche du Professeur Hugues Abriel à Berne (*Ion Channel Research Group Department of Clinical Research, University of Bern*) où les expériences électrophysiologiques ultérieures seront effectuées. Puis nous avons effectué une « reverse transcription » (transcription inverse) des ARNm extraits de chacun de ces échantillons de cellules pour obtenir ainsi les ADNc (ADN complémentaires) correspondants (selon protocole décrit dans l'annexe 2).

Par cette expérience nous avons recherché la présence de transcrits des gènes codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7, des sous-unités β 1, β 2, β 3 et β 4 dans différentes lignées cellulaires. Les 12 lignées cellulaires utilisées sont listées dans le tableau 2. Nous avons utilisé 1 échantillon de cellules par lignée pour notre expérience (n=1).

Tableau 2 :

966	HEK 1.7 Bern (transfection stable)
967	HEK Bern
511	Lignée 1.7 (transfection stable)
513	Lignée 1.7 (transfection stable) + β 1 (transfection transitoire)
515	Lignée 1.7 (transfection stable) + β 2 (transfection transitoire)
518	HEK + 1.7 (transfection non stable)
971	HEK
972	HEK + 1.7 (transfection non stable)
973	HEK + 1.7 + β 1 (transfection non stable)
974	HEK + 1.7 + β 2 (transfection non stable)
975	HEK + 1.7 + β 3 (transfection non stable)
976	HEK + 1.7 + β 4 (transfection non stable)

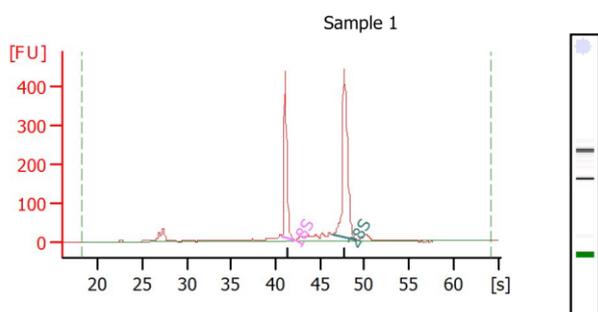
La qRT-PCR permet de suivre le processus d'amplification par PCR des ADNc en continu grâce à la détection de la fluorescence émise par les produits PCR néoformés. Ceci grâce à un fluorophore (SYBR green) qui augmente son émission de fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Une augmentation de la fluorescence est enregistrée au cours de la réaction PCR. La quantité de molécules cibles d'ADN qui se trouvait dans l'échantillon d'origine peut se déduire par le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence. Le cycle seuil (C_t ou *cycle threshold*) est défini comme étant le point où l'émission de fluorescence est statistiquement plus élevée que le bruit de fond. Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nombre de molécules cibles qui se trouvaient dans l'échantillon à l'origine. **Autrement dit, plus la quantité de départ d'ADNc est grande, moins il faudra de cycles pour atteindre le cycle seuil.**

Par la technique de qRT-PCR nous avons recherché la présence d'ADNc codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7 ainsi que des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ dans nos échantillons à l'aide de primers permettant d'amplifier ces ADNc. Nous avons testé ces lignées cellulaires selon le protocole décrit dans l'annexe 3.

3.2.2 Résultats

Nous avons mesuré la qualité des ADNc obtenus grâce à la reverse transcription. Le *RNA integrity number (RIN)* de l'échantillon 1 (HEK Nav1.7) ainsi mesuré est de 9,7. Et celui de l'échantillon 2 (HEK) est de 9,9. Cette mesure dénote une très bonne qualité des ADNc obtenus par la reverse transcription (fig. 12 et 13). J'ai donc pu effectuer l'expérience de PCR quantitative en temps réel avec des ADNc de bonne qualité.

Figure 12 :



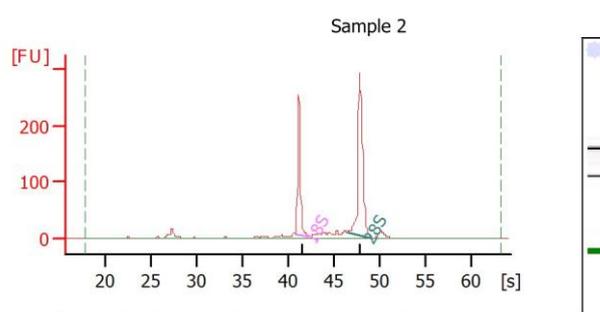
Overall Results for sample 1 : Sample 1

RNA Area: 1'414.7
 RNA Concentration: 2'267 ng/ μ l
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.03)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.70

Fragment table for sample 1 : Sample 1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.71	42.11	378.3	26.7
28S	46.30	49.15	601.6	42.5

Figure 13 :



Overall Results for sample 2 : Sample 2

RNA Area: 814.7
 RNA Concentration: 1'305 ng/ μ l
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.9 (B.02.03)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.90

Fragment table for sample 2 : Sample 2

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.78	42.16	210.0	25.8
28S	46.37	49.17	354.4	43.5

Pour nous permettre d'avoir une idée des quantités d'ADNc présentes dans chacun de nos échantillons nous allons d'abord présenter nos résultats sous la forme de courbes d'amplification PCR puis sous la forme de tableaux représentant les valeurs des Ct (cf. ci-dessous point 3.2.2.6, p.23). Dans la première partie de la présentation des résultats, il est également important d'analyser les courbes de fusion (ou *melt curves*), car elles nous permettent d'évaluer la qualité et la spécificité de l'amplification. Les graphiques illustrant la réaction de qPCR présentent la fluorescence émise (RFU ou *relative fluorescence units*) en fonction du nombre de cycles PCR. Le seuil de détection de la fluorescence pour chaque réaction PCR est représenté par une droite horizontale de couleur verte. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre cette valeur d'émission de fluorescence représente le Ct (*cycle threshold*). Comme décrit précédemment la valeur du Ct sera différente selon la quantité de matériel génétique présente dans chaque échantillon au début de la réaction de qPCR. Les courbes de fusion sont obtenues en détectant la fluorescence émise en fonction de la température. Plus la température est élevée, plus les interactions entre les séquences d'ADN seront spécifiques. Donc la quantité de fluorescence émise sera moins importante à des températures élevées car elle ne proviendra que d'interactions spécifiques. La température à laquelle les interactions sont spécifiques dépend de la séquence testée. Nous avons choisi de montrer les graphiques de courbes de fusion qui montrent la dérivée de la quantité de fluorescence émise en fonction de la température afin de pouvoir mettre en évidence des pics de courbes de fusion pour chaque échantillon. Si les pics de chaque échantillon

peuvent être superposés, cela indique que ces échantillons contiennent des séquences d'ADN de même composition. Cela nous est utile pour évaluer la spécificité du matériel amplifié lors de la qPCR.

3.2.2.1 qPCR gène codant pour Nav1.7 (qPCR1 du 17.03.11)

Les contrôles positifs sont tous les échantillons de cellules contenant le gène codant pour la sous-unité α du canal sodique Nav1.7 (échantillons 966, 511, 513, 515, 518, 972, 973, 974, 975, 976). Les contrôles positifs servent de référence pour comparer l'expression du gène d'intérêt dans tous les autres échantillons de cellules.

Nous constatons visuellement sur la fig. 14 (point 4) qu'il y a peu d'ARNm codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7 dans les cellules HEK de l'échantillon 971 car l'amplification de matériel génétique débute plus tardivement dans l'expérience et nécessite donc plus de cycles PCR pour atteindre le Ct. Les échantillons 967 et 518 montrent également une amplification tardive (point 3 sur fig. 14). Les autres échantillons montrent une amplification plus précoce (points 1 et 2 sur fig. 14). Nous constatons que les cellules transfectées de manière stable (point 1 sur fig. 14) ont plus d'expression que les cellules transfectées de manière transitoire.

Les échantillons contrôles positifs, dont fait partie l'échantillon 966 (point 6 sur fig. 15), ont un pic de courbe de fusion unique correspondant à la courbe typique de la séquence codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7. Celle-ci est donc la courbe de référence qui permettra d'interpréter les résultats obtenus à partir des autres échantillons.

L'échantillon 971 présente deux pics de courbe de fusion ; celle-ci ne correspond donc pas à la courbe typique du gène codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7 (voir fig. 15). La courbe de fusion correspondant aux cellules HEK Bern de l'échantillon 967 correspond à celle des cellules HEK transfectées avec des plasmides contenant le gène Nav1.7 (échantillons contrôles positifs). Nous pouvons donc déduire par ce résultat que les cellules HEK Bern (échantillon 967) pourraient contenir de manière intrinsèque des ARNm codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7, mais en faible quantité puisque l'amplification de matériel génétique dans cet échantillon est plus tardive.

Figure 14 : qPCR gène codant pour Nav1.7

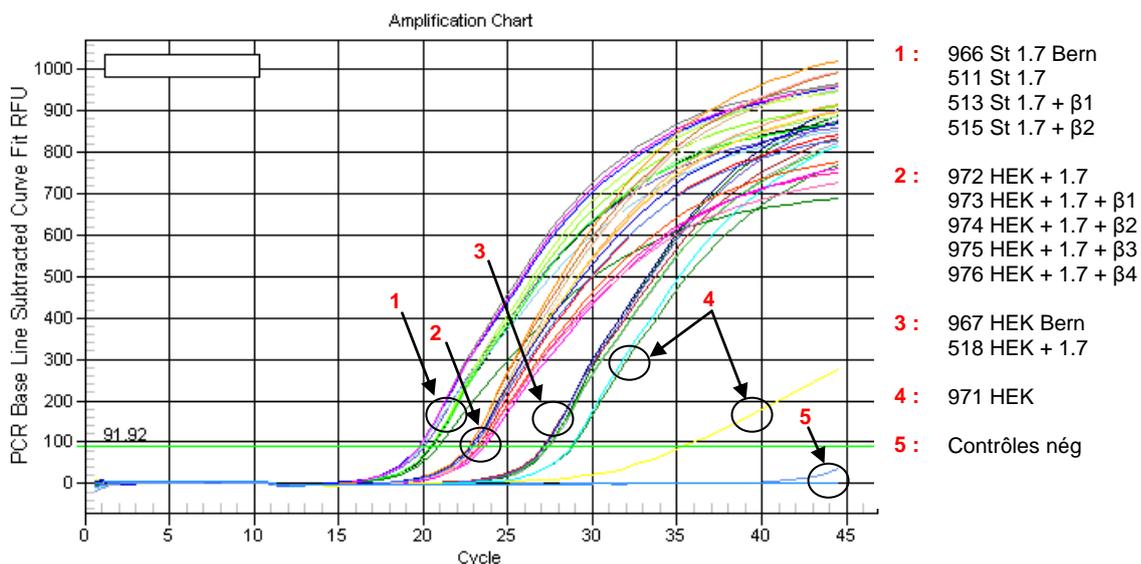
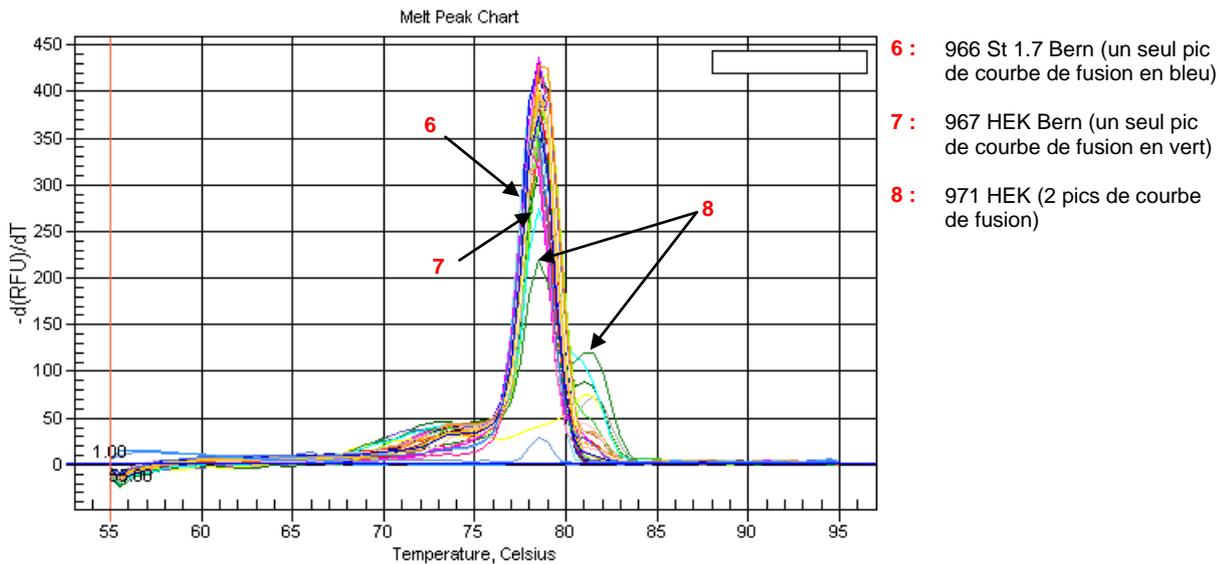


Figure 15 : Courbes de fusion (qPCR gène codant pour Nav1.7)



3.2.2.2 qPCR gène codant pour $\beta 1$ (qPCR2 du 02.03.11)

Les échantillons 513 et 973 sont nos contrôles positifs. Nous constatons que les échantillons 511, 515, 518 (point 2 sur fig. 16) présentent une amplification plus tardive que les autres échantillons. Les échantillons 513 et 973 (contrôles positifs) présentent un pic de courbe de fusion unique correspondant à la séquence codant pour $\beta 1$ (points 4 et 7 sur fig. 17). Les échantillons 511 et 515 ont deux pics de courbe de fusion dont l'un correspond à la séquence codant pour $\beta 1$. Ces échantillons pourraient donc contenir un peu d'ARNm codant pour $\beta 1$. Tous les autres échantillons montrent une amplification aspécifique car leurs pics de courbe de fusion ne correspondent pas aux pics des contrôles positifs. Ces cellules ne contiennent donc pas d'ARNm codant pour $\beta 1$.

Figure 16 : qPCR gène codant pour $\beta 1$

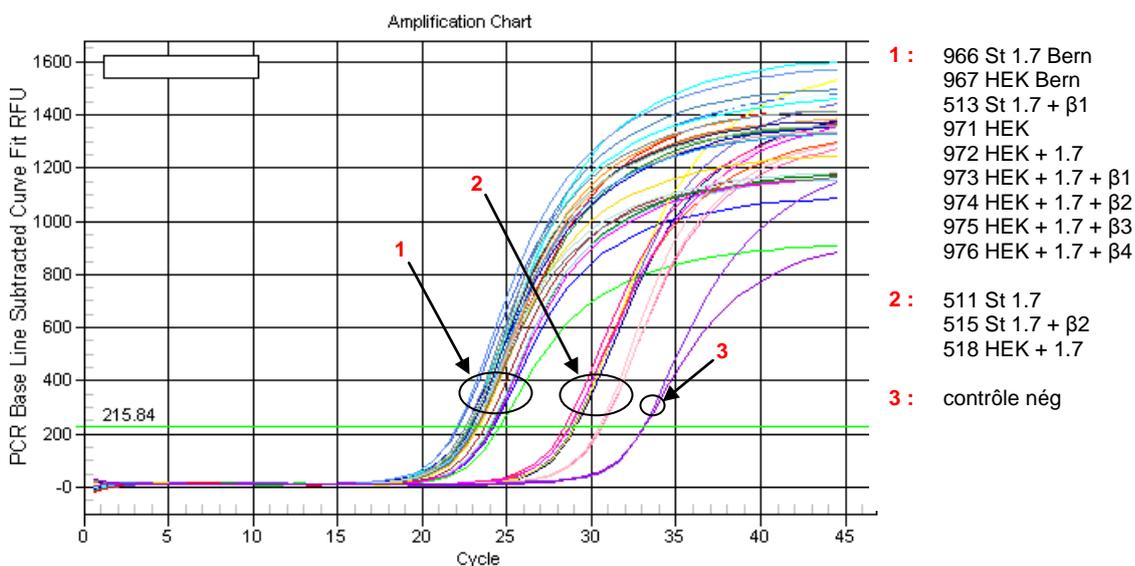
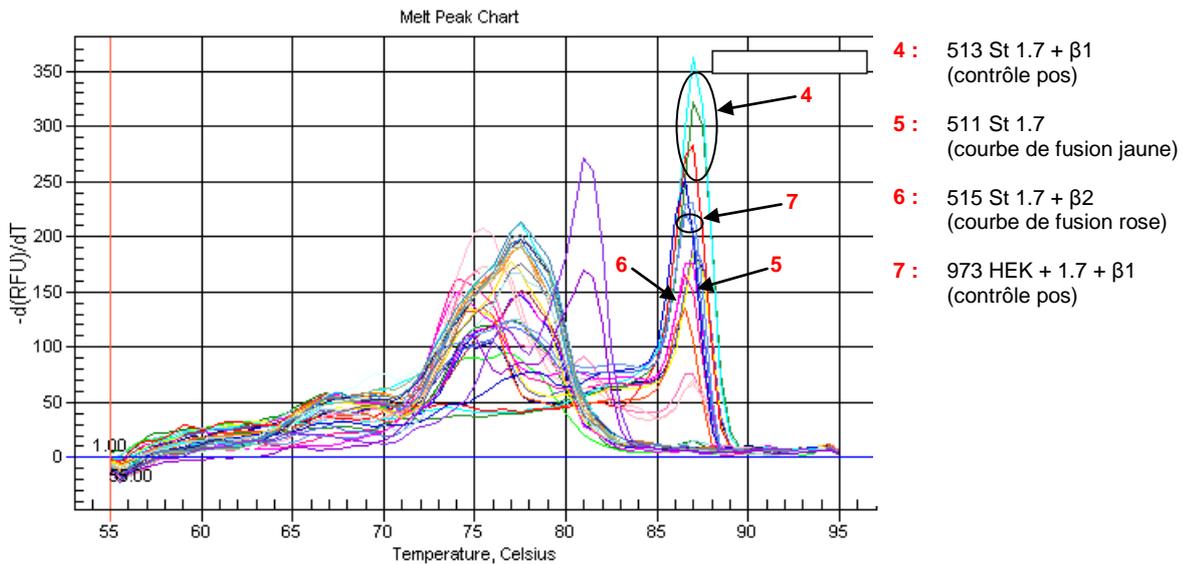


Figure 17 : Courbes de fusion (qPCR gène codant pour $\beta 1$)



3.2.2.3 qPCR gène codant pour $\beta 2$ (qPCR2 du 17.03.11)

Les échantillons 515 et 974 sont les contrôles positifs. Nous pouvons conclure qu'aucun des autres échantillons ne contient de l'ARNm codant pour $\beta 2$ car ils présentent une amplification tardive et car les pics de leurs courbes de fusion ne correspondent pas aux pics des contrôles positifs. Les échantillons 511, 513 et 518 ont plusieurs pics de courbe de fusion dont l'un correspond au pic $\beta 2$ détecté dans les contrôles positifs. Tous les autres échantillons dont l'échantillon 967 (HEK Bern) ont des pics ne correspondant pas à celui de $\beta 2$ (fig. 19). Cela indique donc une amplification aspécifique qui ne correspond pas à une amplification des séquences codant pour la sous-unité $\beta 2$.

Figure 18 : qPCR gène codant pour $\beta 2$

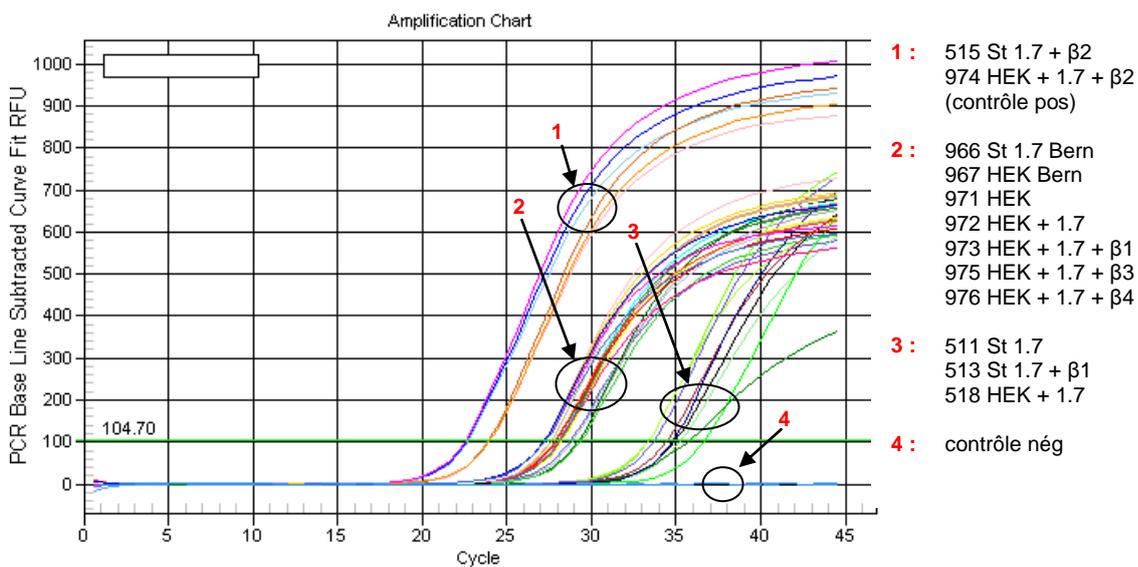
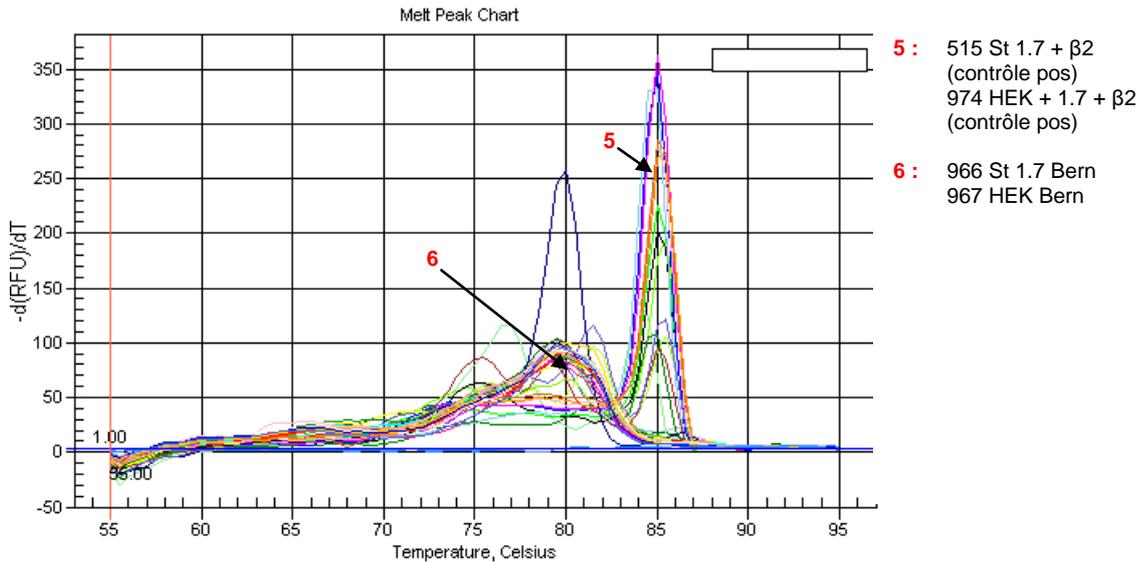


Figure 19 : Courbes de fusion (qPCR gène codant pour $\beta 2$)



3.2.2.4 qPCR gène codant pour $\beta 3$ (qPCR2 du 02.03.11)

L'échantillon 975 sert de contrôle positif. Nous pouvons constater qu'aucune autre cellule ne contient des ARNm codant pour $\beta 3$. Ceci également car l'amplification dans tous les échantillons démarre beaucoup plus tardivement que dans les contrôles positifs et les courbes de fusion ne correspondent pas parfaitement à celle de la séquence codant pour $\beta 3$ contenue dans le contrôle positif.

Nous constatons quand même que chaque échantillon de cellules a plusieurs pics de courbe de fusion dont l'un (petit ou grand) correspond à celui de $\beta 3$. Les échantillons 511, 513, 515 et 518 montrent un grand pic de courbe de fusion qui est superposable au pic correspondant à $\beta 3$ détecté dans le contrôle positif. Mais nous concluons tout de même à l'absence d'ARNm codant pour $\beta 3$ dans tous les échantillons en raison de l'amplification tardive du matériel génétique (fig. 20).

Figure 20 : qPCR gène codant pour $\beta 3$

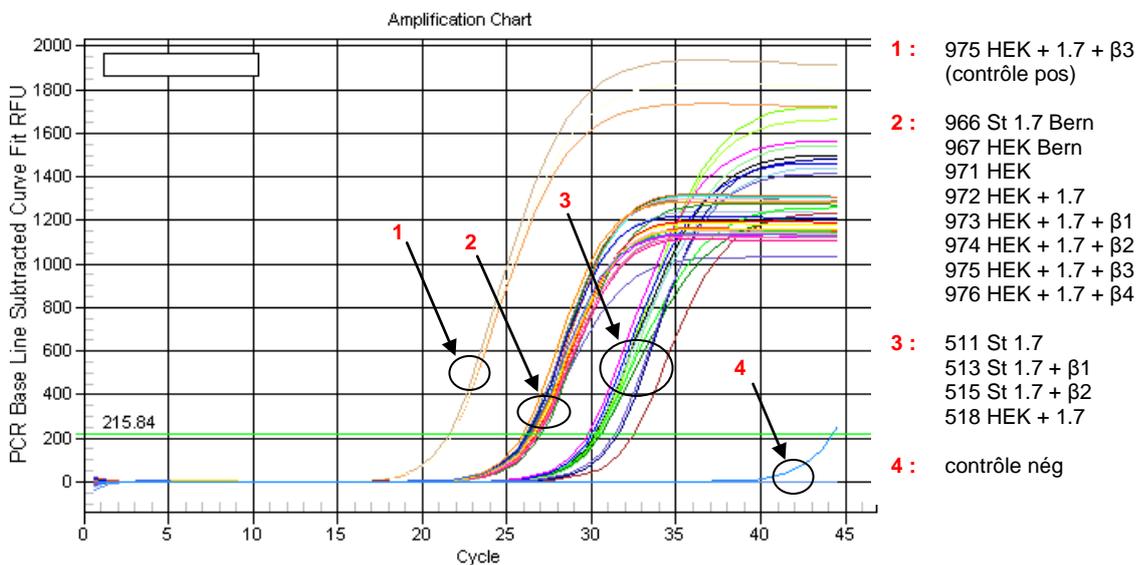
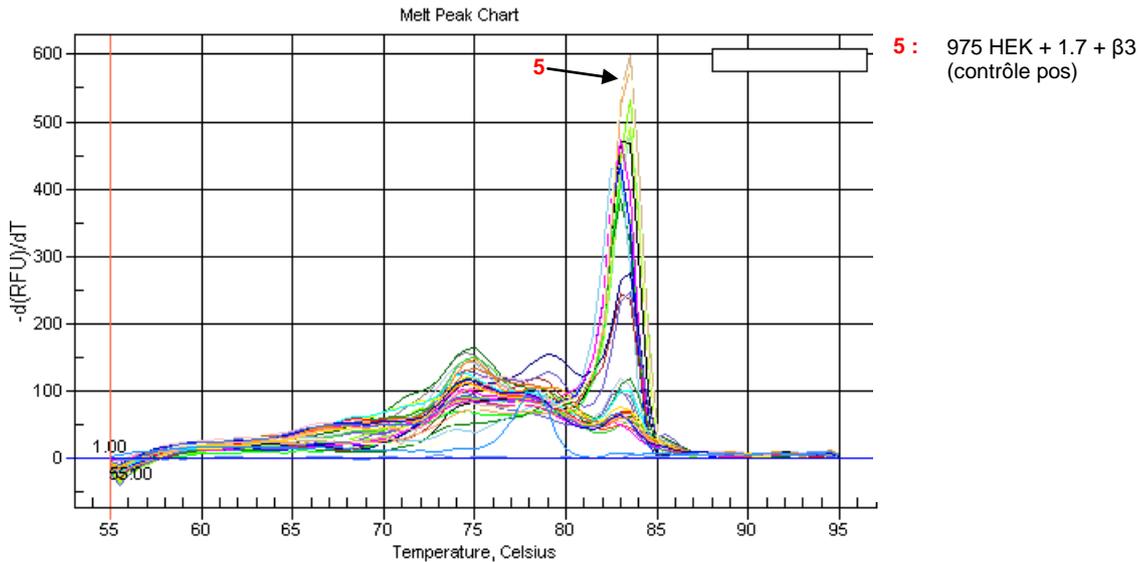


Figure 21 : Courbes de fusion (qPCR gène codant pour $\beta 3$)



3.2.2.5 qPCR gène codant pour $\beta 4$ (qPCR3 du 02.03.11)

L'échantillon 976 sert de contrôle positif. Nous constatons sur fig. 22 que tous les échantillons ont une amplification nettement plus tardive que notre échantillon de contrôle positif. Nous détectons une amplification encore plus tardive dans les échantillons 511, 513, 515 et 518 (point 3 sur fig. 22). Les échantillons 511, 513, 515 et 518 ont une courbe de fusion correspondant à la séquence codant pour $\beta 4$ car leur pic de courbe de fusion correspond à celui détecté dans le contrôle positif. Les échantillons 966, 967, 971, 972, 973, 974, et 975 présentent tous deux pics de courbe de fusion dont l'un est superposable au pic $\beta 4$ détecté dans le contrôle positif.

Nous pouvons supposer que les cellules HEK Bern (échantillon 967) contiennent un peu de transcrit codant pour $\beta 4$. Par contre nous détectons 2 pics de courbes de fusion dans cet échantillon, ce qui pourrait dénoter une amplification aspécifique. Donc nous ne pouvons pas exclure l'absence d'ARNm codant pour $\beta 4$ dans ces cellules.

Figure 22 : qPCR gène codant pour $\beta 4$

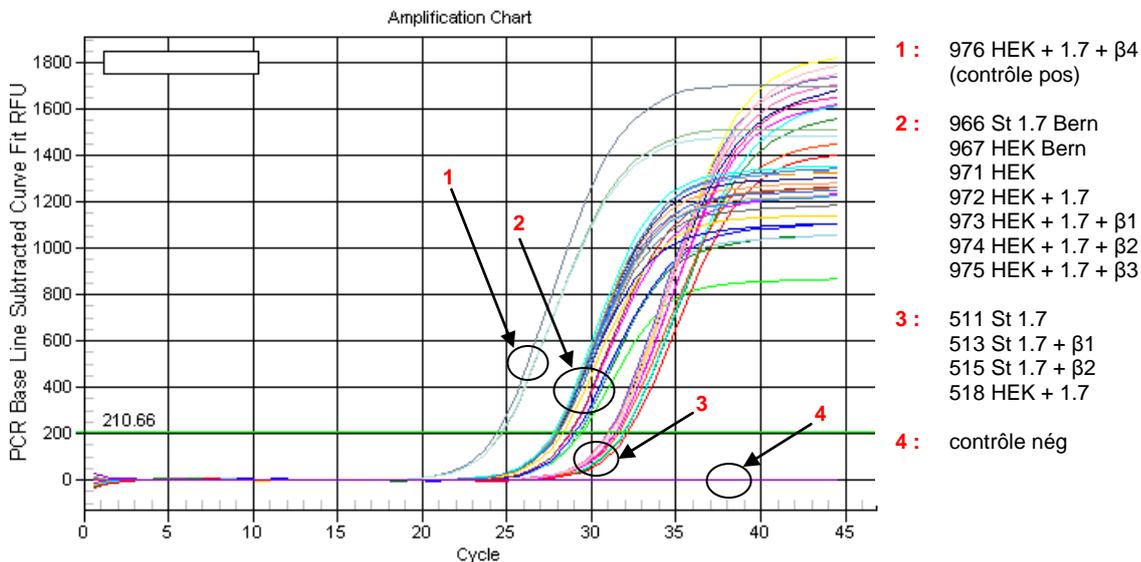
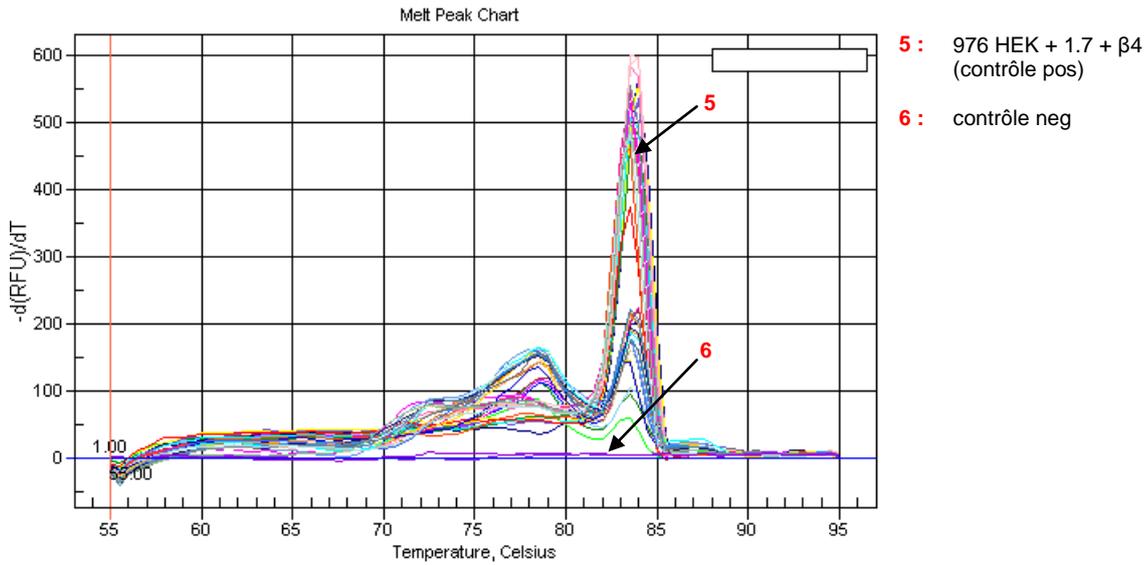


Figure 23 : Courbes de fusion (qPCR gène codant pour β4)



3.2.2.6 Tableau des résultats

Le tableau 3 (voir ci-dessous) présente en détails les différentes valeurs de Ct des triplicats de chaque échantillon, pour les différents gènes cibles recherchés par qPCR (gènes codant pour la GAPDH, la sous-unité α du canal Nav1.7, les sous-unités β1, β2, β3, et β4). Le mean Ct est obtenu en faisant la moyenne des Ct des triplicats pour un gène cible dans chaque échantillon de cellules. Puis le **delta Ct** est obtenu pour chaque gène cible en soustrayant le mean Ct du gène cible au mean Ct du gène de la GAPDH dans le même échantillon de cellules.

Tableau 3 : Résultats quantitatifs (Ct) des qRT-PCR

	GAPDH		beta1			beta2			beta3			beta4			nav1.7		
	Ct	mean Ct	Ct	mean	delta Ct	Ct	mean Ct	delta Ct	Ct	mean Ct	delta Ct	Ct	mean Ct	delta Ct	Ct	mean Ct	delta Ct
966	18.55	18.3733333	24.58	24.1966667	-5.82333333	28.78	28.6166667	-10.2433333	26.74	26.32	-7.94666667	29.48	29.3333333	-10.96	20.05	19.88	-1.50666667
Stable 1.7 Bern	18.3		24.03			28.9			26.15			29.29			19.83		
	18.27		23.98			28.17			26.07			29.23			19.76		
967	18.93	18.76	24.2	24	-5.24	29.23	29.2666667	-10.5066667	26.85	26.5166667	-7.75666667	29.06	28.88	-10.12	27.54	27.4633333	-8.70333333
HEK Bern	18.66		24.1			29.22			26.22			28.82			27.44		
	18.69		23.7			29.35			26.48			28.76			27.41		
511	20.23	20.1933333	29.04	28.9866667	-8.79333333	35.26	34.01	-13.8166667	30.54	30.39	-10.1966667	31.09	31.1233333	-10.93	20.6	20.5333333	-0.34
Stable 1.7	20.15		28.93			33.4			30.38			30.99			20.51		
	20.2		28.99			33.37			30.25			31.29			20.49		
513	20.57	20.57	22.8	22.7466667	-2.17666667	34.95	35.8333333	-15.2633333	30.14	30.3233333	-9.75333333	31.94	32	-11.43	20.54	20.6366667	-0.06666667
Stable 1.7 + beta1	20.41		22.57			36.73			30.31			31.9			20.47		
	20.73		22.87			35.82			30.52			32.16			20.9		
515	20.09	19.98	28.71	28.61	-8.63	22.75	22.69	-2.71	30.06	29.9333333	-9.95333333	31.64	31.5366667	-11.5566667	19.86	19.7933333	0.18666667
Stables 1.7+beta2	19.92		28.39			22.7			29.97			31.5			19.75		
	19.93		28.73			22.62			29.77			31.47			19.77		
518	21.93	21.8066667	30.65	30.6	-8.79333333	34.49	34.35	-12.5433333	32.51	31.7966667	-9.99	31.06	31.17	-9.36333333	27.1	27.1633333	-5.35666667
HEK+1.7	21.75		30.47			34.84			31.56			31.32			27.18		
	21.74		30.68			33.72			31.32			31.13			27.21		
971	19.25	19.23	23.3	23.2133333	-3.98333333	28.25	28.1266667	-8.89666667	26.65	26.6733333	-7.44333333	27.88	27.8733333	-8.64333333	35.5	31.0433333	-11.8133333
HEK	19.26		23.12			28.12			26.98			27.89			28.85		
	19.18		23.22			28.01			26.39			27.85			28.78		
972	19.65	19.6333333	23.13	23.1366667	-3.50333333	27.92	27.9566667	-8.32333333	26.71	26.7366667	-7.10333333	28.71	28.1466667	-8.51333333	23.15	23.29	-3.65666667
HEK+1.7	19.54		22.99			27.86			26.68			28.01			23.35		
	19.71		23.29			28.09			26.82			28.33			23.37		
973	20.06	19.8666667	22.61	22.2433333	-2.37666667	27.25	27.2266667	-7.36	26.56	26.5533333	-6.68666667	28.02	27.9766667	-8.11	23.59	23.3833333	-3.51666667
HEK+1.7+beta1	19.84		22.11			27.23			26.75			27.93			23.42		
	19.7		22.01			27.2			26.35			27.98			23.14		
974	19.68	19.6533333	23.02	22.9166667	-3.26333333	24.02	23.98	-4.32666667	26.53	26.2833333	-6.63	27.99	27.9233333	-8.27	22.8	22.7433333	-3.09
HEK+1.7+beta2	19.62		22.89			23.9			26.43			27.81			22.72		
	19.66		22.84			24.02			25.89			27.97			22.71		
975	19.6	19.4533333	23.18	22.9533333	-3.5	27.62	27.6	-8.14666667	21.73	21.6666667	-2.21333333	28.06	27.99	-8.53666667	22.99	22.93	-3.47666667
HEK+1.7+beta3	19.49		22.89			27.65			21.57			27.96			22.9		
	19.27		22.79			27.53			21.7			27.95			22.9		
976	19.7	19.79	22.58	22.77	-2.98	27.18	27.21	-7.42	26.5	26.32	-6.53	24.46	24.6566667	-4.86666667	22.8	22.8633333	-3.07333333
HEK+1.7+beta4	19.77		22.72			27.17			26.15			24.77			22.85		
	19.9		23.01			27.28			26.31			24.74			22.94		

Le gène de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase) est utilisé comme gène de référence car son expression est considérée comme stable dans nos cellules. Il s'agit d'un gène qui joue un rôle important dans le métabolisme du glucose. Nous pourrions donc normaliser l'expression des gènes cibles choisis en fonction de l'expression du gène de la GAPDH dans chaque type cellulaire. Ainsi notre analyse ne devrait pas être biaisée par les différences de quantité de matériel génétique obtenue pour chaque échantillon.

Le tableau 4 (voir ci-dessous) présente nos résultats de façon plus résumée en indiquant uniquement les delta Ct de chaque gène cible dans nos différents échantillons de cellules. Il est important de rappeler que les valeurs de Ct élevées indiquent une faible quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon au départ, ce qui nécessite ainsi plus de cycles de PCR pour que la fluorescence émise atteigne le seuil de détection ou *cycle threshold* (Ct). En soustrayant la valeur du mean Ct pour chaque gène cible à la valeur du mean Ct de la GAPDH dans le même échantillon de cellule, nous obtenons des valeurs de delta Ct négatives. **Donc lorsque la valeur du delta Ct est très négative, cela indique que l'échantillon de départ contenait peu de matériel génétique. Inversement plus la valeur du delta Ct se rapproche de zéro, plus la quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon était importante.**

Tableau 4 : Résultats comparatifs de l'expression génique dans nos différents types cellulaires

Delta CT vs GAPDH	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	Nav1.7	
966 Stable 1.7 Bern	-5.82	-10.24	-7.95	-10.96	-1.51	stable 1.7
511 Stable 1.7	-8.79	-13.82	-10.20	-10.93	-0.34	
513 Stable 1.7 + $\beta 1$	2.18	-15.26	-9.75	-11.43	-0.07	
515 Stable 1.7 + $\beta 2$	-8.63	2.71	-9.95	-11.56	0.19	
971 HEK	-3.98	-8.90	-7.44	-8.64	-11.81	HEK
967 HEK Bern	-5.24	-10.51	-7.76	-10.12	-8.70	1.7 transfecté
518 HEK + 1.7	-8.79	-12.54	-9.99	-9.36	-5.36	
972 HEK + 1.7	-3.50	-8.32	-7.10	-8.51	-3.66	
973 HEK + 1.7 + $\beta 1$	2.38	-7.36	-6.69	-8.11	-3.52	
974 HEK + 1.7 + $\beta 2$	-3.26	-4.33	-6.63	-8.27	-3.09	
975 HEK + 1.7 + $\beta 3$	-3.50	-8.15	-2.21	-8.54	-3.48	
976 HEK + 1.7 + $\beta 4$	-2.98	-7.42	-6.53	-4.87	-3.07	

Nous sommes particulièrement intéressés à connaître le transcriptome des cellules HEK Bern (échantillon 967) car ce sont les cellules que nous projetons d'utiliser par la suite, pour y transférer notre plasmide contenant le gène Nav1.7 muté L1612P. Nous constatons que le gène 1.7 est transcrit dans les cellules HEK Bern (échantillon 967) en faible quantité mais de façon plus marquée que dans les cellules HEK (échantillon 971). Le gène $\beta 1$ est plus transcrit dans les cellules HEK que dans les cellules HEK Bern. Les gènes $\beta 2$, $\beta 4$ ne sont apparemment pas exprimés dans les cellules HEK Bern. Nous constatons une transcription de gène $\beta 3$ dans les cellules HEK Bern mais en faible quantité. Pour cette partie de l'analyse des résultats nous nous sommes focalisés sur les valeurs des Ct et nous nous sommes basés uniquement sur cette donnée pour déterminer si les cellules HEK Bern (échantillon 967) contenaient des ARNm codant pour les différentes sous-unités des canaux sodiques.

Le tableau 5 résume notre analyse du transcriptome des cellules HEK Bern (échantillon 967) par qRT-PCR. Nous y présentons notre analyse quantitative des delta Ct obtenus ainsi qu'une analyse qualitative des courbes de fusion, suivi d'une synthèse. Nous détectons des séquences codant pour la sous-unité α du canal Nav1.7 dans cet échantillon de cellules mais en quantité

négligeable par rapport à la quantité détectée dans les échantillons de cellules transfectées de manière stable. En ce qui concerne $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ nous pouvons conclure que ces transcrits pourraient être présents en quantité extrêmement faible et donc probablement négligeable.

Tableau 5 : Analyse des résultats de l'expression génique des cellules HEK Bern (échantillon 967)

	Analyse quantitative (delta Ct)	Analyse qualitative (courbes de fusion)	Synthèse
1.7	-8.7	<ul style="list-style-type: none"> Amplification tardive. Courbe de fusion superposable au contrôle positif. 	ARNm 1.7 probablement présent mais en faible quantité.
$\beta 1$	-5.24	<ul style="list-style-type: none"> Amplification précoce. Courbe de fusion non superposable au contrôle positif. 	Nous ne pouvons pas exclure la présence d'ARNm $\beta 1$. Une séquence est amplifiée mais ne correspond probablement pas à la séquence d'ARNm de $\beta 1$.
$\beta 2$	-10.51	<ul style="list-style-type: none"> Amplification tardive. Courbe de fusion non superposable au contrôle positif. 	ARNm $\beta 2$ absent.
$\beta 3$	-7.76	<ul style="list-style-type: none"> Amplification tardive. Courbe de fusion ayant deux pics dont l'un est superposable au contrôle positif. 	Nous ne pouvons exclure la présence d'ARNm $\beta 3$ en faible quantité (quantité négligeable étant donné l'amplification tardive).
$\beta 4$	-10.12	<ul style="list-style-type: none"> Amplification tardive. Courbe de fusion ayant deux pics dont l'un est superposable au contrôle positif. 	Nous ne pouvons exclure la présence d'ARNm $\beta 4$ en très faible quantité. (quantité négligeable étant donné l'amplification tardive).

3.2.3 Discussion et limitations

Les expériences de qRT-PCR réalisées permettent de détecter de l'ARNm de chaque gène testé (amplifié grâce aux primers correspondants) dans chaque échantillon de cellules. Les delta Ct reflètent une quantité relative d'ARNm présente dans chaque échantillon de cellules. Nous pouvons comparer la valeur du delta Ct d'un échantillon aux valeurs de delta Ct des contrôles positifs de chaque gène cible pour estimer si ce gène est exprimé ou non dans notre échantillon de cellules. Par contre, il n'existe pas de consensus pour déterminer à partir de quelle valeur de delta Ct nous pouvons considérer qu'il n'y a pas de transcription du gène cible dans notre échantillon. Nos expériences montrent donc la tendance de transcription des gènes cibles.

Nous ne pouvons pas présenter nos résultats en quantité d'ARNm présente dans chaque échantillon de cellules car nous ne connaissons pas l'efficacité réelle des PCR effectuées. Pour cela il faudrait tester différentes dilutions d'échantillon pour réaliser une courbe d'efficacité. Afin de déterminer la quantité absolue d'ARNm de chaque gène présente au départ il faudrait également avoir un échantillon étalon (contenant une quantité de matériel génétique connue). La capacité d'amplifier les cibles est estimée entre 80 et 100%. Nous supposons donc une efficacité de la qPCR similaire entre nos échantillons lors de l'analyse de nos résultats.

Pour une analyse plus approfondie des résultats nous pourrions séquencer les produits PCR obtenus pour être certains que l'amplification que nous avons obtenue était spécifique du gène

cible. Une limitation importante à l'analyse de nos résultats est qu'il est possible que les primers que nous avons utilisés produisent une amplification de matériel génétique aspécifique car nous n'avons pas testé leur spécificité. C'est-à-dire que nos primers pourraient amplifier une séquence ne correspondant pas à la séquence que nous cherchions à amplifier mais à une séquence différente. Pour notre expérience nous avons dû créer des primers GAPDH humains et des primers $\beta 2$. Le reste des primers utilisés provenait du stock de primers disponibles dans le laboratoire.

Nous avons normalisé l'expression de nos gènes cibles par rapport au gène de la GAPDH, gène de référence habituel dans la littérature. Cependant nous n'avons pas testé la stabilité de l'expression de la GAPDH dans notre situation particulière, ce qui constitue une limitation à ce travail. De plus, les PCR de chaque gène cible n'ont pas été réalisées le même jour, ce qui implique que nos résultats ont pu être biaisés par la variabilité de conditions de PCR.

Ces expériences de qRT-PCR permettent de donner une indication quant à la quantité d'ARNm présente dans les cellules HEK293. Mais elles ne nous permettent pas de savoir si ces ARNm sont traduits ou non en protéine dans ces cellules. Nous ne connaissons pas non plus la quantité de protéines qui peut être issue de la traduction d'une certaine quantité d'ARNm. Afin de déterminer la quantité de protéines (sous-unité α du canal Nav1.7 et sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, et $\beta 4$) contenue dans les cellules HEK293, nous pourrions utiliser la technique du Western Blot dans des expériences futures. Cela nous permettrait de compléter les résultats obtenus par la technique de qRT-PCR.

Par ces expériences nous avons constaté également que l'expression d'un gène d'intérêt transfecté dans des cellules de manière stable est nettement plus importante que dans les cellules transfectées de manière transitoire. Il serait donc pertinent d'utiliser une lignée de cellules transfectées de manière stable avec le gène SCN9A muté T4835C dans des expérimentations électrophysiologiques extensives.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail de master a permis de réaliser la mutagenèse du gène SCN9A pour y insérer la mutation T4835C correspondant à la mutation L1612P du canal Nav1.7 détectée chez une famille de patients lausannois atteints de PEPD. Le plasmide contenant le gène muté pourra être utilisé par la suite pour effectuer des expériences électrophysiologiques qui permettront d'étudier les propriétés du canal muté par rapport à celles du canal WT. Les canaux Nav1.7 (L1612P) pourraient présenter une durée d'ouverture plus longue ou un seuil d'ouverture plus bas comparés aux canaux WT. Cela entraînerait une hyperexcitabilité des neurones porteurs des canaux mutés et donc le déclenchement de crises douloureuses chez les patients porteurs de cette mutation. Les résultats obtenus par qRT-PCR sur les cellules HEK293 seront intéressants pour l'interprétation de des expérimentations électrophysiologiques à venir. Selon notre analyse, il est possible que les cellules HEK293 expriment intrinsèquement des canaux sodiques Nav1.7. D'ailleurs des courants sodiques voltage-dépendants peuvent être obtenus dans des cellules HEK293 non transfectées. Nous ne savons pas si ces courants proviennent du canal Nav1.7 ou d'une autre isoforme. Nous considérons par contre l'expression des sous-unités β des canaux sodiques voltage dépendant dans les cellules HEK comme négligeable.

Les cellules HEK293 exprimant le canal muté (L1612P) pourraient être utilisées pour tester l'effet de médicaments sur ce canal. Les résultats obtenus pourraient permettre d'améliorer le traitement des patients souffrant de PEPD. D'autre part, ils permettront peut être de comprendre

un peu mieux les mécanismes biologiques à l'origine des douleurs chroniques et ainsi être utiles à la prise en charge de ces douleurs.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des syndromes douloureux chroniques est importante pour découvrir les mécanismes à l'origine de la sensation de douleur. La connaissance des propriétés et du fonctionnement du canal Nav1.7 muté L1612P pourrait apporter une meilleure compréhension des mécanismes étiologiques des syndromes douloureux chroniques et ouvrir ainsi la voie à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre ces douleurs. Un traitement capable d'agir sélectivement sur le canal Nav1.7 pourrait être un atout dans toute prise en charge à but antalgique. Mais nous ne savons pas si une molécule capable d'inhiber le canal Nav1.7 provoquerait la disparition de toute sensation douloureuse, comme chez les patients souffrants d'insensibilité congénitale à la douleur (CIP), ni quels effets secondaires une telle molécule pourrait occasionner.

La douleur est une fonction complexe qui est modulée au niveau du SNC. Elle entraîne également un processus de mémorisation. C'est une sensation construite par un cerveau ayant acquis des schémas de pensées à travers des expériences vécues. Le traitement et l'intégration de l'information douloureuse sont donc propres à chaque individu et une thérapie à but antalgique devrait également tenir compte des aspects cognitifs et émotionnels de la douleur ainsi que du vécu du patient. Il reste important de proposer une approche biopsychosociale pour aborder la prise en charge des patients souffrant de douleurs chroniques.

5. Remerciements

Je souhaite remercier cordialement Marc Suter qui a assuré au quotidien l'encadrement de ce travail, Miguel Van Bemmelen (DPT), Cédric Laedermann, Marie Pertin, Christian Wider et Isabelle Décosterd. Un grand merci à tout le groupe de l'unité de recherche douleur pour son accueil et son aide.

6. Bibliographie

1. International Association for the Study of Pain | Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, ©1994
2. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede R, Zubieta J. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*. 2005 Aoû;9(4):463-484.
3. Baliki MN, Geha PY, Apkarian AV, Chialvo DR. Beyond Feeling: Chronic Pain Hurts the Brain, Disrupting the Default-Mode Network Dynamics. *The Journal of Neuroscience*. 2008 Fév 6;28(6):1398 -1403.
4. Lampert A, O'Reilly AO, Reeh P, Leffler A. Sodium channelopathies and pain. *Pflugers Arch*. 2010 Juil;460(2):249-263.
5. Apkarian AV. Pain perception in relation to emotional learning. *Curr Opin Neurobiol*. 2008 Aoû;18(4):464-468.
6. Gore M, Sadosky A, Stacey BR, Tai K, Leslie D. The Burden of Chronic Low Back Pain. *Spine*. 2011 12;1.
7. Malmros IN, Pollitzer M, Rossiter M, Roulet-Perez E, Schubert R, Smith VV, et al. Paroxysmal extreme pain disorder (previously familial rectal pain syndrome). *Neurology*. 2007 Aoû 7;69(6):586-595.
8. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006 Déc 14;444(7121):894-898.
9. Fischer TZ, Waxman SG. Familial pain syndromes from mutations of the NaV1.7 sodium channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2010 Jan;1184:196-207.
10. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*. 2005 Déc;57(4):397-409.
11. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*. 2001 Fév;7(1):42-54.
12. Dib-Hajj S, Estacion M, Jarecki B, Tyrrell L, Fischer T, Lawden M, et al. Paroxysmal extreme pain disorder M1627K mutation in human Nav1.7 renders DRG neurons hyperexcitable. *Molecular Pain*. 2008;4(1):37.
13. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005 Juin;51(3):187-200.

7. Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ARNm de cellules HEK293

Matériel :

- Centrifugeuse, tubes Falcon de 5ml, tubes Falcon de 15ml, tubes Eppendorf de 1,5 ml, tube de collection de 2ml, QIAshredder Spin Column.
- Qiagen RNeasy Plus Mini Kit: RNA Later, RLT Plus Buffer (lysis), RPE Buffer, RW1 Buffer, RNase free water, Collection tubes 2 ml, gDNA Eliminator Mini Spin Columns, RNeasy Mini Spin Columns.
- Solutions : H₂O DEPC, NaOH 1M, Ethanol 70% en H₂O DEPC, β-mercaptoéthanol.
- 2 échantillons de cellules provenant du laboratoire du groupe de recherche du Professeur Hugues Abriel à Berne (*Ion Channel Research Group Department of Clinical Research, University of Bern*):
 1. Cellules HEK Nav1.7 (transfctées de manière stable avec des plasmides contenant le gène SCN9A).
 2. Cellules HEK (non tansfectées).

Méthode : adaptée selon protocole habituel du laboratoire du centre d'antalgie.

- 1) Lyse : ajouter le RLT Plus Buffer (2,6ml) et le β-mercaptoéthanol (26μl) mélangés au préalable aux 2 types de cellules :
 - Pour les cellules HEK Nav1.7 : 600μl.
 - Pour les cellules HEK : 2ml (car nous avons un échantillon de volume plus important).
- 2) Homogénéisation : pipeter 600μl de chaque lysat de cellules dans une QIAshredder Spin Column placée dans un tube de collection de 2 ml et centrifuger 2 minutes à Vmax.
- 3) Elimination de l'ADN génomique : transférer chaque lysat homogénéisé dans une gDNA Eliminator Mini Spin Column placée dans un tube de collection de 2ml et centrifuger 30 secondes à Vmax. Jeter la colonne et conserver le flow-through.
- 4) Ajouter 600μl d'éthanol 70% aux flow-through de l'étape 3.
- 5) Recueil de l'ARNm : transférer chaque échantillon (maximum 700μl à la fois) dans une RNeasy Mini Spin Column placée dans un tube de collection de 2ml. Centrifuger 15 secondes à Vmax. Répéter cette étape (700μl à la fois) jusqu'à ce que l'entier de chaque échantillon soit passé à travers une RNeasy Mini Spin Column. Jeter le flow-through après chaque centrifugation car lors de cette étape l'ARNm reste fixé sur la membrane de la column.
- 6) Ajouter 700μl de Buffer RW1 à chaque RNeasy Mini Spin Column. Centrifuger 15 secondes à Vmax. Jeter le flow-through.
- 7) Ajouter 500μl de Buffer RPE à chaque RNeasy Mini Spin Column. Centrifuger 15 secondes à Vmax. Jeter le flow-through.
- 8) Ajouter 500μl de Buffer RPE à chaque RNeasy Mini Spin Column. Centrifuger 2 minutes à Vmax.
- 9) Elution : placer chaque RNeasy Mini Spin Column sur un tube Eppendorf de 1,5ml. Ajouter 30μl de RNase free water dans chaque colonne. Laisser reposer 5 minuter à température ambiante. Centrifuger 1 minute à Vmax. Ajouter 20μl de RNase free water dans chaque colonne et centrifuger immédiatement 1 minute à Vmax. L'ARNm contenu dans chaque échantillon de cellules se retrouvera ainsi dans chacun des 2 Eppendorf de 1,5ml.
- 10) Nous avons ensuite mesuré la densité optique de chacun des échantillons d'ARNm à l'aide du NanoDrop Spectrophotometer :
 - Echantillon HEK Nav1.7 : 1280ng/μl (260/280 : 2,08)
 - Echantillon HEK : 1965ng/μl (260/280 : 2,06)

Annexe 2 : Protocole de reverse transcription

Matériel :

- dNTP 10x (*Qiagen, RT Omniscript Kit*)

- Buffer 10x (*Qiagen, RT Omniscript Kit*)
- Hexamers 0,5µg/µl (*Microsynth*)
- RNase inhibitor 40U/µl (*Promega*)
- Reverse Transcription Omniscript 4U/µl (*Qiagen, RT Omniscript Kit*)
- H2O RNase free (*Qiagen, RT Omniscript Kit*)
- 2 échantillons d'ARN :
 - Echantillon HEK Nav1.7
 - Echantillon HEK

Méthode :

Il est nécessaire de rajouter 2µg d'ARN de chaque échantillon dans les 2 mélanges suivants, c'est-à-dire 1,6µl pour l'échantillon HEK Nav1.7 et 1µl pour l'échantillon HEK.

Echantillon 1 (HEK Nav1.7)	Echantillon 2 (HEK)
4µl Buffer RT 10x	4µl Buffer RT 10x
4µl dNTP	4µl dNTP
2µl Hexamers	2µl Hexamers
0,5µl RNase inhibitor	0,5µl RNase inhibitor
2µl RT Omniscript	2µl RT Omniscript
1,6µl ARN	1µl ARN
25,9µl H2O RNase free	26,5µl
Total : 40µl	Total : 40µl

Chaque mélange a été incubé à 37°C pendant 60 minutes au bain-marie.

Annexe 3 : Protocole de PCR quantitative en temps réel

Matériel:

- My iQ iCycler Single color Real-Time PCR Detection System (*BioRad*), PCR Plates 96 well semi-skird Thermo Fast, Optical Tape (*BioRad*), Micro tube 1,5ml PP (tubes à vis), Multi Ultra PCR Tubes 0,65ml, Pointes de pipettes à filtre Art (aerosol resistant Tips).
- Solutions : BioRad iQ SYBR Green Supermix 2x, Water Eppendorf (Molecular Biology Grade), RNase ZAP.
- Echantillons d'ADNc : la liste des échantillons utilisés est présentée dans le tableau 2 (page 16).
Les échantillons d'ADNc 966 et 967 proviennent de la RT PCR décrite au paragraphe précédent (respectivement échantillon 1 et 2) sur les ARN extraits des cellules du laboratoire de Berne.
Les échantillons d'ADNc 511, 513, 515, 518 proviennent du stock d'ADNc du laboratoire du centre d'antalgie.
Les échantillons d'ADNc 971 à 976 proviennent d'une RT que nous avons effectuée avant de commencer la qPCR sur des échantillons d'ARN conservés dans le laboratoire de l'unité recherche douleur.
- Primers (amorces Forward et Reverse (*Microsynth*)):

Human Nav1.7
Human Nav β1
Human Nav β2
Human Nav β3
Human Nav β4
Human GAPDH

Méthode :

Marche à suivre selon protocole habituel du laboratoire du centre d'antalgie :

- 1) Nettoyer le poste de travail avec la RNase ZAP et exposer la hotte pendant 20 minutes aux UV.
- 2) Préparation de l'ADNc : nous estimons que tous les ADNc ont une concentration de 1µg/µl. Nous diluons ces stocks d'un facteur 100 pour obtenir des aliquots d'une concentration de 10ng/µl.
- 3) Préparation de primers : les primers que nous avons en stock sont à une concentration de 100µM. Nous les diluons pour obtenir une concentration de 3µM.
Le tableau 6 résume la disposition de nos plaques de PCR. Les puits contenant les primers β1, β2, β3, et β4 ne sont pas représentés mais ont été disposés de façon identique à ceux contenant les primers GAPDH et Nav1.7. Nous avons utilisé des triplicats pour chaque type de mélange ceci afin de moyennner les mesures et d'améliorer

la fiabilité des résultats. Nous avons utilisé des duplicats pour les contrôles négatifs: (contenant de l'eau à la place de l'ADNc).

Tableau 6: plaque de qRT-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A GAPDH	966 Stable 1.7 Bern	966 Stable 1.7 Bern	966 Stable 1.7 Bern	967 HEK Bern	967 HEK Bern	967 HEK Bern	511 Stable 1.7	511 Stable 1.7	511 Stable 1.7	513 Stable 1.7+b1	513 Stable 1.7+b1	513 Stable 1.7+b1
B GAPDH	515 Stable 1.7+b2	515 Stable 1.7+b2	515 Stable 1.7+b2	518 HEK+1.7	518 HEK+1.7	518 HEK+1.7	971 HEK	971 HEK	971 HEK	972 HEK+1.7	972 HEK+1.7	972 HEK+1.7
C GAPDH	973 HEK +1.7+b1	973 HEK +1.7+b1	973 HEK +1.7+b1	974 HEK +1.7+b2	974 HEK +1.7+b2	974 HEK +1.7+b2	975 HEK +1.7+b3	975 HEK +1.7+b3	975 HEK +1.7+b3	976 HEK +1.7+b4	976 HEK +1.7+b4	976 HEK +1.7+b4
D GAPDH	Neg	Neg										
E Nav 1.7	966 Stable 1.7 Bern	966 Stable 1.7 Bern	966 Stable 1.7 Bern	967 HEK Bern	967 HEK Bern	967 HEK Bern	511 Stable 1.7	511 Stable 1.7	511 Stable 1.7	513 Stable 1.7+b1	513 Stable 1.7+b1	513 Stable 1.7+b1
F Nav 1.7	515 Stable 1.7+b2	515 Stable 1.7+b2	515 Stable 1.7+b2	518 HEK+1.7	518 HEK+1.7	518 HEK+1.7	971 HEK	971 HEK	971 HEK	972 HEK+1.7	972 HEK+1.7	972 HEK+1.7
G Nav 1.7	973 HEK +1.7+b1	973 HEK +1.7+b1	973 HEK +1.7+b1	974 HEK +1.7+b2	974 HEK +1.7+b2	974 HEK +1.7+b2	975 HEK +1.7+b3	975 HEK +1.7+b3	975 HEK +1.7+b3	976 HEK +1.7+b4	976 HEK +1.7+b4	976 HEK +1.7+b4
H Nav1.7	Neg	Neg										

Chaque puits contient les éléments suivants (le volume final de chaque puits est de 20µl) :

	Volume dans 1 puits	Concentration/Quantité
iQ SYBR Green Mix 2X	10µl	1X
Primer fwd [3µM]	2µl	[300nM]
Primer rev [3µM]	2µl	[300nM]
H2O Eppendorf	1µl	
ADNc [10ng/µl]	5µl	50ng

4) Programme qPCR :

PCR	95°C	3min	1x
	95°C	10sec	45x
	60°C	45sec	
Melt curve (courbe de fusion)	55°C	1min	1x
	Élévation de la T° de 0,5°C en 0,5°C jusqu'à 95°C toutes les 10 sec		
	95°C	1min	1x