

Table des matieres

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ABREVIATIONS	12
PREAMBULE	16

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. PRESENTATION GENERALE ET STRUCTURE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS NICOTINIQUES.

.....	22
1) LES RECEPTEURS NICOTINIQUES DES VERTEBRES : UN MODELE DE RECEPTEUR PENTAMERIQUE.	22
1.1) <i>La famille des récepteurs canaux activés par un ligand (LGIC).</i>	22
1.2) <i>Structure tridimensionnelle du récepteur nicotinique de la torpille.</i>	23
2) STRUCTURE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS NICOTINIQUES ET NOMENCLATURE.....	26
2.1) <i>Structure des sous-unités formant le récepteur.</i>	26
2.2) <i>Diversité des sous-unités chez les Vertébrés.</i>	28
2.3) <i>Classification pharmacologique des récepteurs nicotiniques.</i>	28
3) SITES DE LIAISON DES LIGANDS.....	29
3.1) <i>Topologie des sites de liaison.</i>	29
3.2) <i>Identification des résidus impliqués dans la liaison des ligands.</i>	31
4) STRUCTURE DYNAMIQUE DU RECEPTEUR NICOTINIQUE.	34

CHAPITRE 2. DIVERSITE DES SOUS-UNITES DE RECEPTEURS NICOTINIQUES CHEZ LES INSECTES.

1) LES GENES CODANT POUR LES SOUS-UNITES DE NACHRS CHEZ LES INSECTES.	37
2) DIVERSITE DES SOUS-UNITES PAR MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES.	41
2.1) <i>Modification de sous-unités d'insectes par épissage alternatif.</i>	41
2.1.1) Les différents mécanismes d'épissage alternatif.	41
2.1.2) Identification d'isoformes épissées chez les insectes	43
2.1.3) Implications fonctionnelles de l'épissage alternatif.....	45

2.2) Edition des sous-unités d'insectes.	47
2.2.1) Identification d'isoformes éditées chez les insectes.	47
2.2.2) Conséquences fonctionnelles de l'édition.	49
2.2.3) Lien entre les mécanismes d'édition et d'épissage.	50
CHAPITRE 3. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES RECEPTEURS NICOTINIQUES D'INSECTES.	52
1) IDENTIFICATION DE DIFFERENTS SOUS-TYPES PHARMACOLOGIQUES.	52
1.1) Caractérisation des différents sous-types de nAChRs d'insectes par des approches électrophysiologiques.	52
1.2) Identification de sous-types de récepteurs par des tests de liaison par affinité.	54
2) INFLUENCE DE LA NATURE DES SOUS-UNITES SUR LES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES RECEPTEURS.	57
CHAPITRE 4. MODE D'ACTION DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES SUR LES RECEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX DES INSECTES.	60
1) HISTORIQUE	60
2) TOXICITE DES NEONICOTINOÏDES IN VIVO.	65
3) PHARMACOLOGIE DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES.	66
3.1) Effet des néonicotinoïdes sur les nAChRs synaptiques et extrasynaptiques.	66
3.2) Sites de liaison des insecticides néonicotinoïdes sur les nAChRs.	68
3.3) Site de liaison des néonicotinoïdes chez le puceron : disparité des données obtenues.	72
3.4) Nature des sous-unités impliquées dans la liaison des néonicotinoïdes	73
3.5). Modulation du mode d'action des insecticides néonicotinoïdes par les voies de régulation intracellulaire.	74
4) MECANISMES DE RESISTANCE AUX NEONICOTINOÏDES.	76
DEUXIEME PARTIE: PRESENTATION DES MODELES BIOLOGIQUES	
CHAPITRE 1. LE PUCERON DU POIS ACYRTHOSIPHON PISUM: UN MODELE DE RAVAGEURS.	82
1) CYCLE DE VIE PARTICULIER DU PUCERON DU POIS.	82
2) CONDITIONS D'ELEVAGE.	84
3) INTERET DU PUCERON COMME MODELE D'ETUDE.	84

CHAPITRE 2. LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA: UN MODELE POUR LES ETUDES

ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	85
1) PRESENTATION DE LA BLATTE.....	85
2) CONDITIONS D'ELEVAGE.....	86
3) LE SYSTEME NERVEUX DE LA BLATTE.....	86

TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION

AVANT PROPOS.....	90
--------------------------	-----------

CHAPITRE 1. CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES RECEPTEURS NICOTINIQUES D'INSECTES EN TANT QUE CIBLE DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES.	92
--	-----------

1) ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE L'EFFICACITE DE MOLECULES INSECTICIDES ET LEURS CAPACITES DE LIAISON A DIFFERENTS SOUS-TYPES DE NACHRS.	92
1.1) Mise en évidence de différents sous-types pharmacologiques présentant différentes affinités pour les insecticides néonicotinoïdes.	92
1.2) Toxicité de trois néonicotinoïdes (IMI, TMX, CLT) chez le puceron du pois.	94
1.3) Adéquation entre les données pharmacologiques et toxicologiques.	94
1.4) Variation de l'expression des sous-unités de nAChRs au cours du développement et après exposition aux insecticides.	95
2) ETUDE DU MODE D'ACTION DE DEUX DERIVES FLUORESCENT DU THIAMETHOXAM CHEZ A. PISUM ET P. AMERICANA.	106
3) DETERMINATION DE LA TOXICITE DE L'ACETAMIPRIDE (ACE) CHEZ LE PUCERON A. PISUM ET DEUX SOUCHES DIFFERENTES DE M. PERSICAE.....	112
3.1) Contexte de l'étude	112
3.2) Comparaison de la toxicité de l'acétamipride chez A. pisum et M. persicae	113

CHAPITRE 2. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUS-UNITES DE RECEPTEURS NICOTINIQUES CHEZ LA BLATTE P. AMERICANA ET LE PUCERON A. PISUM.	116
--	------------

1) DIVERSITE DES SOUS-UNITES DE NACHRS CHEZ LA BLATTE P. AMERICANA ET LE PUCERON A. PISUM.....	116
1.1) Identification des sous-unités de nAChRs exprimées chez la blatte et le puceron.	116
1.2).Structure des gènes codant les sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois.....	121

2) ETUDE DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES DE NACHRS CHEZ LA BLATTE ET LE PUCERON.	126
2.1) Des sous-unités plus ou moins exprimées chez l'adulte	126
2.2) Présence d'isoformes épissées de la sous-unité $\alpha 4$	133
CHAPITRE 3. CARACTERISATION DE LA PROTEINE KINASE CALCIUM-CALMODULINE DEPENDANTE DE	
TYPE II (CAMKII) ET DE SON ROLE DANS LA REGULATION DE LA SENSIBILITE DES NACHRS VIS-A-VIS DES	
INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES CHEZ LA BLATTE.....	136
1) CONTEXTE DE L'ETUDE.	136
2) IDENTIFICATION DE DIFFERENTES ISOFORMES DE LA CAMKII CHEZ LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA.	138
3) INFLUENCE DE L'ISOFORME E DE LA CAMKII SUR LES COURANTS NICOTINIQUES DANS LES DUM (DORSAL UNPAIRED	
MEDIAN) NEURONES DE LA BLATTE.....	153
QUATRIEME PARTIE: CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	
1) CONCLUSIONS GENERALES	164
1.1) HYPOTHESES SUR LA COMPOSITION DES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE RECEPTEURS NICOTINIQUES	164
1.2) LE THIAMETHOXAME : UN INSECTICIDE AU MODE D'ACTION PARTICULIER.	167
1.3) CONSEQUENCES DE LA MODIFICATION DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES APRES EXPOSITION AUX NEONICOTINOÏDES	168
1.4) FACTEURS INFLUENÇANT LA TOXICITE IN VIVO DES NEONICOTINOÏDES	170
1.5) IMPACT SUR L'UTILISATION DES NEONICOTINOÏDES DANS LA GESTION DES INSECTES RAVAGEURS DE CULTURE.	171
2) PERSPECTIVES DE RECHERCHE	173
2.1) ETUDIER LES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES RECEPTEURS NICOTINIQUES RECOMBINANTS DU PUCERON DU	
POIS.	173
2.2) ETUDIER LES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES RECEPTEURS NATIFS MAINTENUS DANS LEUR CONTEXTE	
MEMBRANAIRE.....	174
LISTE DES FIGURES.....	178
LISTE DES TABLEAUX	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	182
ANNEXE	210

Liste des abréviations

α -Bgt : α -bungarotoxine

ACE : acétamipride

ACh : acétylcholine

AChBP : acetylcholine binding protein

ADAR : adénosine désaminase agissant sur l'ARN

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

Bmax : liaison maximale

Ca/CaM : complexe calcium calmoduline

Ca²⁺_i : calcium intracellulaire

CaM : calmoduline

CaMKII : protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II

CCh : carbamylcholine

CLT : clothianidine

CP : crossing point

CV : coefficient de variation

cysLGIC : LGIC à « cys-loop »

DEC : domaine extracellulaire

DIC : domaine intracellulaire

DMSO : diméthylsulfoxyde

dTC : d-tubocurarine

DTF : dinotéfurane

DTM : domaine transmembranaire

DUM : dorsal unpaired median

D β HE : dihydro- β -érythroïdine

EPI : épibatidine

GABA : acide γ -amino butyrique

HEX : hexamethronium

IC₅₀ : concentration induisant 50 % de mortalité

IC95% : intervalle de confiance à 95 %

IMI : imidaclopride

KC : cellule de Kenyon

Kd : constante de dissociation

Ki : constante d'inhibition

LA : lobe antennaire

LGIC : récepteur canal activé par un ligand (Ligand Gated Ion Channel)

MB : corps pédonculés

MC : méthylcarbamates

MEC : mécamylamine

MLA : méthyllycaconitine

nAChR : récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

NIC : nicotine

NIT : nitenpyrame

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

OP : organophosphorés

pb: paire de base

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PKA : protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique

PKC : protéine kinase dépendant du calcium

pyr : pyréthréinoïdes

qPCR : PCR quantitative

RF : facteur de résistance

RIC3 : resistance to inhibitors of cholinesterase 3

RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne avec transcription inverse

SFX : sulfoxaflor

SNC : système nerveux central

TGA : dernier ganglion abdominal

THI : thiaclopride

TM : segment transmembranaire

TMX : thiaméthoxame

UTR : untranslated region

Rapport-Gratuit.com

Préambule

Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) ont la plus ancienne histoire d'études expérimentales parmi les récepteurs connus. En effet, dès le début du XX^{ème} siècle, John Newport Langley suggère l'existence de récepteurs impliqués dans la transduction et la reconnaissance des signaux chimiques (Langley 1907). Dans ses études concernant la contraction musculaire chez la grenouille, il démontre que le curare abolit la contraction tonique observée en présence de nicotine. En 1914, Dale démontre la présence de deux types de récepteurs à l'acétylcholine en fonction de leur profil pharmacologique: les récepteurs muscariniques sensibles à la muscarine et les récepteurs nicotiniques sensibles à la nicotine (Dale 1914).

Les premiers nAChRs étudiés en détail sont ceux de la torpille (*Torpedo californica* ou *Torpedo marmorata*) à partir des années 30 (Feldberg 1940). L'organe électrique de la torpille représente une source abondante (plusieurs mg/kg) (Cohen et coll. 1972; Kalamida et coll. 2007), homogène et accessible en électroplaques contenant des nAChRs, permettant des études électrophysiologiques. Cependant, à cette époque, aucun outil pharmacologique n'était assez sélectif pour permettre d'isoler et de caractériser les protéines capables de lier l'acétylcholine (ACh) au sein des extraits bruts d'organe électrique de torpille (Nachmansohn 1959). C'est finalement la découverte d'une α -toxine présente dans le venin du serpent *Bungarus multicinctus*, l' α -Bungarotoxine (α -Bgt), à la fin des années 60 qui a permis les premières approches biochimiques (Lee et Chang 1966). L' α -Bgt présente une forte affinité et une importante sélectivité pour les nAChRs présents dans l'organe électrique de la torpille, ce qui a permis de les isoler et de les purifier (Changeux et coll. 1970; Corringer et coll. 2000). Le développement des techniques de biologie moléculaire et d'électrophysiologie marque le début d'une nouvelle ère dans l'étude des nAChRs. Ainsi, les nAChRs de l'organe électrique de la torpille sont également les premiers récepteurs à neurotransmetteur dont les sous-unités ont été clonées et caractérisées dans un système d'expression hétérologue dès le début des années 80 (Mishina et coll. 1984; Grutter et Changeux 2001). Depuis plusieurs décennies, les études concernant la structure, la fonction et la régulation de ces récepteurs se multiplient et les nAChRs de Vertébrés font partie des

récepteurs canaux les mieux caractérisés (Unwin et Fujiyoshi 2012). Cependant, la structure moléculaire, le rôle physiologique et les propriétés pharmacologiques des différents sous-types qui composent les nAChRs d’Invertébrés, tels que ceux des insectes, restent encore à élucider. Ainsi, les nAChRs d’insectes, qui sont de plus des cibles moléculaires des insecticides néonicotinoïdes, font l’objet de nombreuses recherches à l’heure actuelle.

Parmi les thématiques de recherche du laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), l’étude électrophysiologique, pharmacologique et la caractérisation moléculaire des récepteurs canaux tels que les nAChRs d’insectes sont une préoccupation majeure afin de déterminer le mode d’action et les mécanismes de résistance des insectes vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont démontré que plusieurs sous-types de nAChRs étaient présents dans les DUM (Dorsal Unpaired Median) neurones de la blatte *Periplaneta americana* avec des sensibilités différentes vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes (Courjaret et Lapied 2001; Courjaret et coll. 2003). Cette sensibilité face aux néonicotinoïdes étaient également modulée par des facteurs externes comme la phosphorylation du récepteur et des voies de régulation intracellulaire impliquant la PKA, la PKC, l’AMPc et la CaMKII (Courjaret et Lapied, 2001; Courjaret et coll. 2003; Thany et coll. 2008; Calas-List et coll. 2013). Récemment, dans le cadre d’une collaboration avec l’INRA, le laboratoire s’est intéressé au mode d’action des insecticides néonicotinoïdes chez les espèces invasives en agriculture, notamment le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* dont le génome est entièrement séquencé depuis 2010.

Le travail présenté dans ce mémoire de doctorat a pour objectif d’améliorer nos connaissances sur la diversité des nAChRs neuronaux des insectes et le mode d’action des insecticides néonicotinoïdes sur ces récepteurs. Cette thèse est organisée en quatre parties:

La première partie de ce mémoire fait un état des lieux des connaissances actuelles sur la structure moléculaire, les propriétés pharmacologiques des nAChRs d’insectes et sur le mode d’action des insecticides néonicotinoïdes.

La seconde partie présente les deux modèles biologiques utilisés au cours de ce travail: le puceron du pois *A. pisum* et la blatte *P. americana*.

La troisième partie est consacrée aux résultats qui sont présentés sous la forme de publications scientifiques acceptées (4 publications) et de données non publiées (pour certaines soumises).

Enfin, la dernière partie de ce mémoire est consacrée aux conclusions générales et aux perspectives de ce travail de thèse.



PREMIERE PARTIE :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Présentation générale et structure moléculaire des récepteurs nicotiniques.

1) Les récepteurs nicotiniques des Vertébrés: un modèle de récepteur pentamérique.

1.1) La famille des récepteurs canaux activés par un ligand (LGIC).

Les récepteurs canaux activés par un ligand (LGICs, « Ligand Gated Ion Channels »)¹ sont répartis en trois superfamilles (Le Novère et Changeux 2001; pour revue Connolly et Wafford 2004):

- ❖ La superfamille des récepteurs au glutamate, comprenant les récepteurs au NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs à l'AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et les récepteurs au kainate. Ces récepteurs sont constitués de quatre sous-unités homologues comprenant chacune quatre domaines transmembranaires (Wollmuth et Sobolevsky 2004).
- ❖ La superfamille des récepteurs à l'ATP (adénosine triphosphate) qui sont formés de trois sous-unités homologues à deux domaines transmembranaires (Brake et coll. 1994).
- ❖ La superfamille des récepteurs à « cys-loop » (cysLGICs)

Chez les Vertébrés, la superfamille des cysLGICs comprend à la fois des récepteurs avec une perméabilité anionique ou cationique et l'analyse phylogénétique montre que ces récepteurs partagent un ancêtre commun (Ortells et Lunt 1995; pour revue Connolly et Wafford 2004).

¹ Des informations détaillées sur ces récepteurs sont disponibles sur la « Ligand-gated ion channel database » ; <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/LGIC/LGIC.html>.

On distingue quatre grandes classes de récepteurs cysLGICs:

- ❖ Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) perméables aux cations.
- ❖ Les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) de type GABA_A et GABA_C, majoritairement perméables aux anions.
- ❖ Les récepteurs à la glycine perméables aux anions.
- ❖ Les récepteurs à la sérotonine de type 5-HT₃ perméables aux cations.

Les récepteurs de la « super-famille » des cysLGICs présentent une structure homogène et sont notamment constitués de cinq sous-unités homologues. Les sous-unités composant ces récepteurs présentent un profil d'hydrophobicité similaire et une structure caractéristique (Grutter et Changeux 2001; Le Novère et Changeux 2001):

- ❖ Un large domaine hydrophile amino terminal (N-terminal) extracellulaire
- ❖ Quatre segments transmembranaires hydrophobes (notés TM1 à TM4)
- ❖ Une large boucle intracellulaire entre les domaines TM3 et TM4
- ❖ Un petit domaine hydrophile carboxy terminal (C-terminal) extracellulaire

La principale caractéristique de ces sous-unités est la présence d'une boucle de cystéines (« cys-loop ») au niveau du domaine N-terminal, correspondant à un pont disulfure entre deux cystéines séparées par 13 acides aminés (Le Novère et coll. 2002a; Brejck et coll. 2001).

Parmi les cysLGICs, les nAChRs constituent le modèle de référence de ces récepteurs pentamériques (Lindstrom 2001). En effet, l'étude des nAChRs purifiés de la torpille (*Torpedo californica* ou *Torpedo marmorata*) et le perfectionnement des techniques d'imagerie, en particulier la microscopie électronique à faible dose et la cryo-microscopie électronique, ont permis de collecter des informations de plus en plus précises sur la structure de ces récepteurs (Unwin et Fujiyoshi 2012).

1.2) Structure tridimensionnelle du récepteur nicotinique de la torpille.

La structure tridimensionnelle des nAChRs de l'organe électrique de la torpille a tout d'abord été déterminée à une résolution de 9 Å (Unwin 1993). Les coupes transversales et longitudinales ainsi obtenues par microscopie électronique montrent déjà clairement une

structure pentamérique de 80 Å de diamètre et 110 Å de long. De plus, les cinq sous-unités transmembranaires constituant le récepteur s'avèrent être situées à équidistance autour d'un axe pseudo-symétrique central formant un pore de 65 Å de diamètre (Miyazawa et coll. 1999). La structure du récepteur a ensuite été précisée à une résolution de 4,6 Å (Unwin 2003) puis à 4 Å, permettant la construction d'un modèle affiné (Unwin 2005). Dans ce modèle, le nAChR semble avoir une longueur d'environ 160 Å perpendiculairement à la membrane et est organisé en trois parties: (1) un domaine extracellulaire (DEC) ou domaine de liaison des ligands, qui présente un vestibule central d'environ 60 Å de long pour 20 Å de large, et qui possède deux sites de liaison pour l'ACh; (2) un domaine transmembranaire (DTM) qui constitue le pore du canal et (3) un domaine intracellulaire (DIC), qui possède un vestibule de plus petite taille que celui du DEC et enfin une courte extrémité C-terminale extracellulaire (figure 1). Le DEC est organisé autour de deux séries de feuillets β alignées formant une structure appelée « sandwich β » qui sont associées par des ponts disulfures. Le DTM est constitué de quatre segments d'hélices α transmembranaires (TM1 à TM4) qui délimitent le pore du canal. Les hélices TM2 sont rapprochées et forment une ceinture hydrophobe au niveau du pore du canal, constituant ainsi une barrière imperméable aux ions lorsque le récepteur est à l'état fermé. Au contraire, le TM4 est situé à distance du pore et est plus en interaction avec la membrane plasmique. De plus, comme son nom l'indique, le DTM traverse complètement la membrane mais, de manière plus surprenante, environ 25% de chaque hélice α se situe au dessus de la membrane au niveau extracellulaire (Unwin 2003; Unwin 2005). Par ailleurs, le DIC (situé entre les TM3 et TM4) semble constitué d'une seule grande hélice α chez *Torpedo* mais serait plutôt formé d'un mélange d'hélices α et de feuillets β pour les autres sous-unités de nAChRs (Unwin 2005; Albuquerque et coll. 2009).

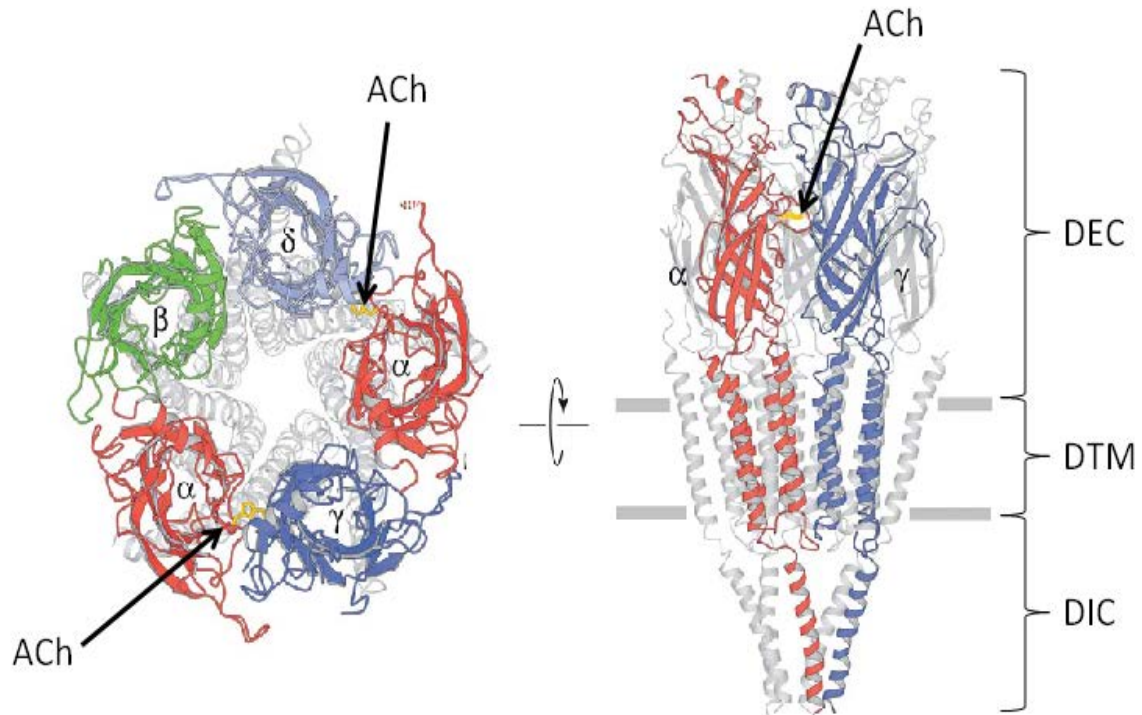


Figure 1. Structure tridimensionnelle des récepteurs nicotiniques de la torpille. A) Vue de la fente synaptique, avec les domaines de liaison des ligands en couleur. B) Vue parallèle à la membrane plasmique, avec en couleur les deux sous-unités situées au premier plan (Modifié d'après Unwin 2005).

2) Structure moléculaire des récepteurs nicotiniques et nomenclature.

2.1) Structure des sous-unités formant le récepteur.

Les sous-unités participant à la formation des récepteurs présentent toutes une structure similaire, les motifs fonctionnels importants dans la liaison de l'ACh étant notamment conservés. Ainsi, chaque sous-unité est constituée d'un domaine N-terminal extracellulaire suivi de quatre domaines transmembranaires (TM1 à TM4) et d'une boucle carboxy-terminale extracellulaire (Grutter et Changeux 2001; Le Novère et Changeux 2001) (figure 2A et B). De plus, l'assemblage de ces sous-unités pour former le canal ionique leur confère un rôle particulier dans le fonctionnement du récepteur (figure 2C). En effet, la région N-terminale est impliquée dans la liaison des agonistes et comprend six boucles notées A à F et est caractérisée par la présence d'une « cys-loop », qui est indispensable à la formation des nAChRs. En effet, la mutation d'une des cystéines de la « cys-loop » entraîne un blocage de l'assemblage des sous-unités au stade de trimère chez la torpille (Green et Wanamaker 1997). D'autre part, le segment TM1 est lié au domaine de liaison de l'ACh suggérant un rôle d'intermédiaire dans l'activation du récepteur (Rush et coll. 2002). Ce segment serait également impliqué dans l'assemblage des sous-unités adjacentes (Wang et coll. 1996; Alves et coll. 2011). Le segment TM2 constitue l'essentiel du pore du canal ionique et contient des acides aminés qui influencent la conductance du canal (Imoto et coll. 1986; Imoto et coll. 1988). Enfin, les domaines TM3 et TM4 sont impliqués dans le co-assemblage des sous-unités et l'expression fonctionnelle des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire (Kuo et coll. 2005). Par ailleurs, on observe la présence d'une large boucle cytoplasmique située entre les domaines TM3 et TM4 et dont la longueur varie en fonction des sous-unités. Cette boucle est impliquée dans la régulation des récepteurs nicotiniques. En outre, des acides aminés spécifiques de cette boucle peuvent être phosphorylés et par conséquent entraîner la modulation de la réponse physiologique (Grutter et Changeux 2001; Unwin 2005; Castelan et coll. 2007). Certains acides aminés hydrophobes de cette boucle, principalement des leucines (L351, L357, L358 pour la sous-unité $\alpha 4$; L343, L349, L350 pour la sous-unité $\beta 2$; L321 pour la sous-unité $\alpha 7$), sont importants pour l'expression des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire (Ren et coll. 2005; Castelan et coll. 2007).

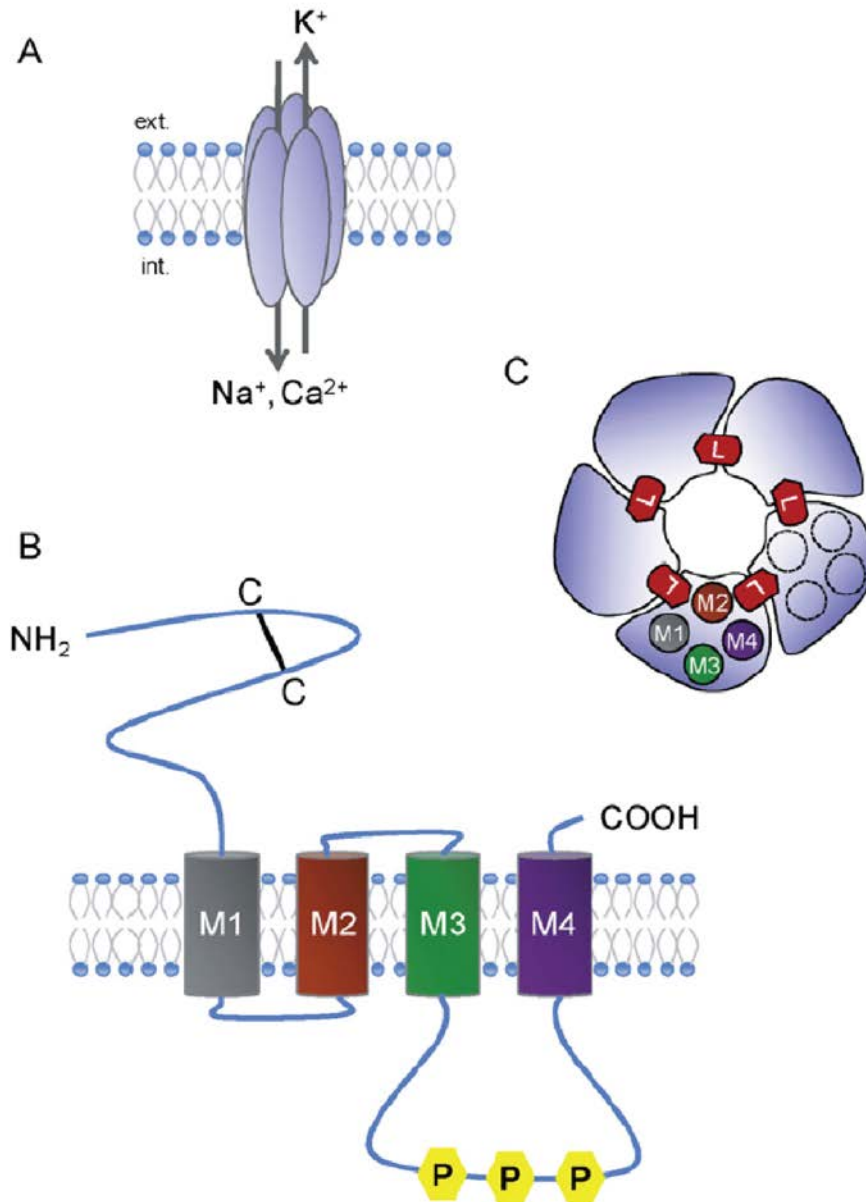


Figure 2. Structure des récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs). (A) Représentation schématique d'un nAChR constitué de cinq sous-unités organisées en rosette autour d'un pore central perméable aux cations. (B) Représentation schématique d'une sous-unité de nAChR avec un large domaine N-terminal contenant un pont disulfure entre deux cystéines, quatre domaines transmembranaires (M1-M4) et une large boucle intracellulaire entre M3 et M4 présentant des sites de phosphorylation (en jaune). (C) Vue en coupe transversale d'un récepteur pentamérique. Le pore du canal est formé par les segments M2 de chaque sous-unité. Le site de liaison de l'ACh (rouge) est situé à l'interface de deux sous-unités adjacentes (D'après Dupuis et coll. 2012).

2.2) Diversité des sous-unités chez les Vertébrés.

Chez les Vertébrés, le développement des techniques de clonage a permis l'identification de 17 sous-unités de structure homologue. Ces sous-unités sont constituées d'environ 450 acides aminés (Lindstrom 2001) et peuvent être classées en deux types de sous-unités (Lukas et coll. 1999). Les sous-unités dites α sont définies par la présence d'un motif caractéristique YxCC avec deux cystéines adjacentes au niveau de la boucle C du domaine extracellulaire. Ces deux cystéines qui participent au site de liaison de l'ACh, sont distinctes de celles impliquées dans la structure de la « cys-loop ». Les sous-unités qui ne présentent pas ce motif sont définies comme étant des sous-unités non- α (Noda et coll. 1982; Tassonyi et coll 2002).

Chez les Vertébrés, l'expression des sous-unités est différente selon le type de tissu considéré. En effet, on distingue deux catégories de nAChRs: (1) les nAChRs dits « musculaires » qui sont situés au niveau de l'élément post-synaptique de la jonction neuro-musculaire. Ces récepteurs sont analogues aux nAChRs de l'organe électrique de la torpille et jouent un rôle dans l'initiation de la contraction musculaire (Unwin 1998); (2) les nAChRs dits « neuronaux » qui sont situés dans le système nerveux central (SNC) et qui sont impliqués dans la transmission synaptique rapide. Ainsi, parmi les sous-unités identifiées chez les Vertébrés, 5 sont des sous-unités musculaires ($\alpha 1$, $\beta 1$, ϵ , δ et γ) et 12 sont des sous-unités neuronales ($\alpha 2$ -10 et $\beta 2$ -4). Il est important de noter que les sous-unités neuronales ont été désignées ainsi du fait de leur isolement à partir de tissus nerveux. Bien que la plupart soient effectivement exprimées dans les neurones du système nerveux central et périphérique (Albuquerque et coll. 2009), plusieurs études mettent en évidence l'expression de certaines de ces sous-unités dans des cellules non-neuronales (pour revues Conti-Fine et coll. 2000; Wessler et Kirkpatrick 2008). On observe principalement l'expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ et $\beta 4$ (Heeschen et coll. 2002) dans des cellules non-neuronales tels que les kératinocytes de l'épiderme (Kurzen et coll. 2007), les cellules β du pancréas (Delbro 2012) ou les cellules endothéliales (Li et Wang 2005).

2.3) Classification pharmacologique des récepteurs nicotiniques.

L'assemblage des sous-unités selon différentes combinaisons permet une grande diversité des propriétés physiologiques et pharmacologiques des récepteurs (D'Hoedt et

Bertrand 2009). Ainsi, les nAChRs peuvent être hétéromériques, comprenant au moins deux sous-unités différentes qui peuvent être de type α ou non- α , ou homomériques, s'ils sont constitués d'une même sous-unité α (Matsuda et coll. 2000). Chez les Vertébrés, les nAChRs sont classés en deux groupes pharmacologiques selon leurs affinités à l' α -bungarotoxine:

(1) *les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine* qui sont généralement considérés comme des récepteurs homomériques: c'est le cas du récepteur neuronal $\alpha 7$. Cependant, il existe des exceptions de récepteurs hétéromériques sensibles à l' α -Bgt: c'est le cas du récepteur $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen et coll. 2001; Lustig 2006) situé dans la cochlée ainsi que du récepteur musculaire dont la stoechiométrie est $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ chez le fœtus et de type $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\epsilon$ chez l'adulte (Mishina et coll. 1986; Le Novère et coll. 2002a).

(2) *les récepteurs insensibles à l' α -bungarotoxine* qui sont hétéromériques (Cordero-Erausquin et coll. 2000). Parmi ces nAChRs, les sous-types $\alpha 4\beta 2$ (Nelson et coll. 2003) et $\alpha 3\beta 4$ (Krashia et coll 2010) sont présents *in vivo* et peuvent être exprimés selon deux stœchiométries différentes, $(\alpha)_3(\beta)_2$ et $(\alpha)_2(\beta)_3$, qui influencent les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles de ces récepteurs (Krashia et coll. 2010; Mazzaferro et coll. 2011). Les nAChRs $\alpha 4\beta 2$ sont les plus exprimés dans le SNC des Vertébrés (Govind et coll. 2009).

3) Sites de liaison des ligands.

3.1) Topologie des sites de liaison.

Le site de liaison de l'ACh, ainsi que des agonistes et antagonistes compétitifs, est situé à l'interface entre deux sous-unités adjacentes (Sine 2002; Corringer et coll. 2000; Le Novère et coll. 2002b). Le site de liaison comprend donc deux composantes (figure 3):

- La composante principale constituée des boucles A, B et C du domaine N-terminal d'une sous-unité α .

- La composante complémentaire formée par les boucles D, E et F de la sous-unité adjacente, qui peut être de type α ou non- α (Grutter et Changeux 2001; Corringer et coll. 2000).

Ainsi, la nature des sous-unités formant le récepteur détermine le nombre de site de liaison. En effet, chez la torpille, les récepteurs de type musculaire de type $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ possèdent deux sites de liaison, correspondant aux deux sous-unités α (Reynolds et Karlin 1978). Les nAChRs neuronaux ayant une stœchiométrie de type $(\alpha)_2(\beta)_3$ présentent ainsi deux sites de liaison tandis que les nAChRs homomériques α possèdent théoriquement jusqu'à cinq sites de liaison (Le Novère et coll. 2002b).

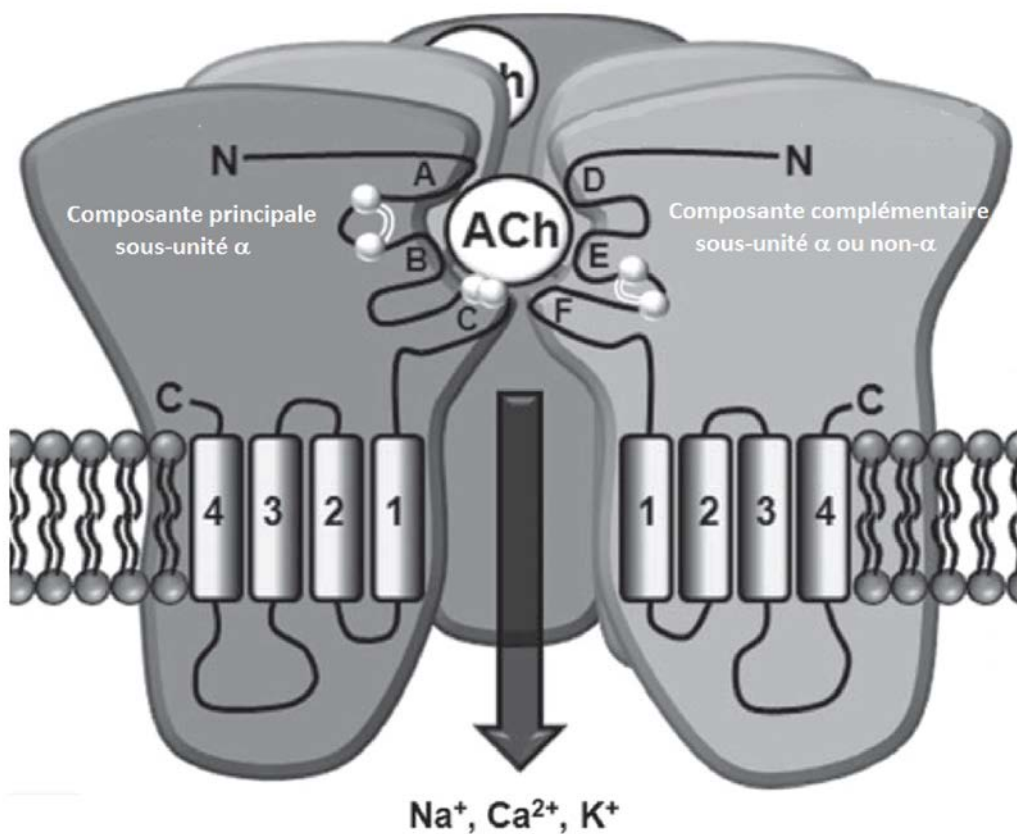


Figure 3. Représentation schématique du site de liaison de l'acétylcholine à l'interface entre deux sous-unités. Les cystéines formant la « cys-loop » ainsi que le doublet de cystéines caractéristiques des sous-unités α sont représentées par des ronds gris (Modifié d'après Jones et Sattelle 2010).

3.2) Identification des résidus impliqués dans la liaison des ligands.

Les expériences de marquage par photo-affinité², historiquement menées chez la torpille, ont permis d'identifier les acides aminés de la sous-unité α impliqués dans la liaison de l'ACh et des antagonistes et agonistes compétitifs (Karlin 2002). Il s'agit des deux cystéines α Cys192³ et α Cys193 qui forment le doublet de cystéines caractéristique (Kao et coll. 1984) ainsi que de quatre résidus aromatiques (α Tyr93, α Tyr149, α Tyr190 et α Tyr198) (Galzi et coll. 1990; Middleton et Cohen 1991). Ces résidus sont conservés pour toutes les sous-unités α de nAChRs à l'exception de la Tyr190 qui est remplacée par l'Asp190 dans la sous-unité α 5 (Karlin 2002). Néanmoins, au niveau des nAChRs musculaires de la torpille, la présence de la sous-unité α (nommée α 1) est nécessaire mais non suffisante pour la formation du site de liaison de l'ACh. En effet, la formation du site de liaison nécessite l'association de la sous-unité α avec les sous-unités γ ou δ (Kurosaki et coll. 1987; Blount et Merlie 1989). Les résidus des sous-unités γ et δ appartenant au site de liaison de l'ACh n'ont pu être déterminés par photoaffinité. Par contre, ceux impliqués dans la liaison d'antagonistes compétitifs ont été identifiés grâce à l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs photo-activables tels que la d-tubocurarine qui a permis de marquer les résidus δ Arg113, δ Trp55, γ Trp53, γ Tyr111, γ Tyr117 (Sine 1993) et la benzoylbenzoylcholine qui a mis en évidence le rôle des résidus γ Leu109 et δ Leu111 (Wang et coll. 2000). Quelques années plus tard, c'est la mutagenèse dirigée qui a démontré pour la première fois l'implication de résidus de sous-unités non- α dans la liaison de l'ACh : γ Trp55 et δ Trp57 (Xie et Cohen 2001). Cette technique de mutagenèse dirigée a également permis d'approfondir les connaissances sur le rôle des acides aminés clés de la sous-unité α . Ainsi, la mutation du doublet α Cys192/193 (Mishina et coll. 1985) ou d'un résidu aromatique (α Tyr93/190/198 ou α Trp149) (Galzi et coll. 1991; Tomaselli et coll. 1991), altère la liaison des agonistes et antagonistes compétitifs ainsi que l'ouverture du canal. D'autre part, la liaison des antagonistes compétitifs est le seul paramètre altéré lorsque des résidus des sous-unités non- α , tels que la Tyr111 (Sine et coll. 1995) ou la Thr119 (Sine 1993) sont mutés, la liaison

² le marquage par affinité est une méthode pour marquer les parties fonctionnelles d'une protéine, tel qu'un récepteur, par liaison covalente d'une molécule (agoniste ou antagoniste) marquée qui se lie en temps normal à la protéine.

³ Afin de simplifier la dénomination des résidus, l'acide aminé est précédé du type de sous-unité à laquelle il appartient.

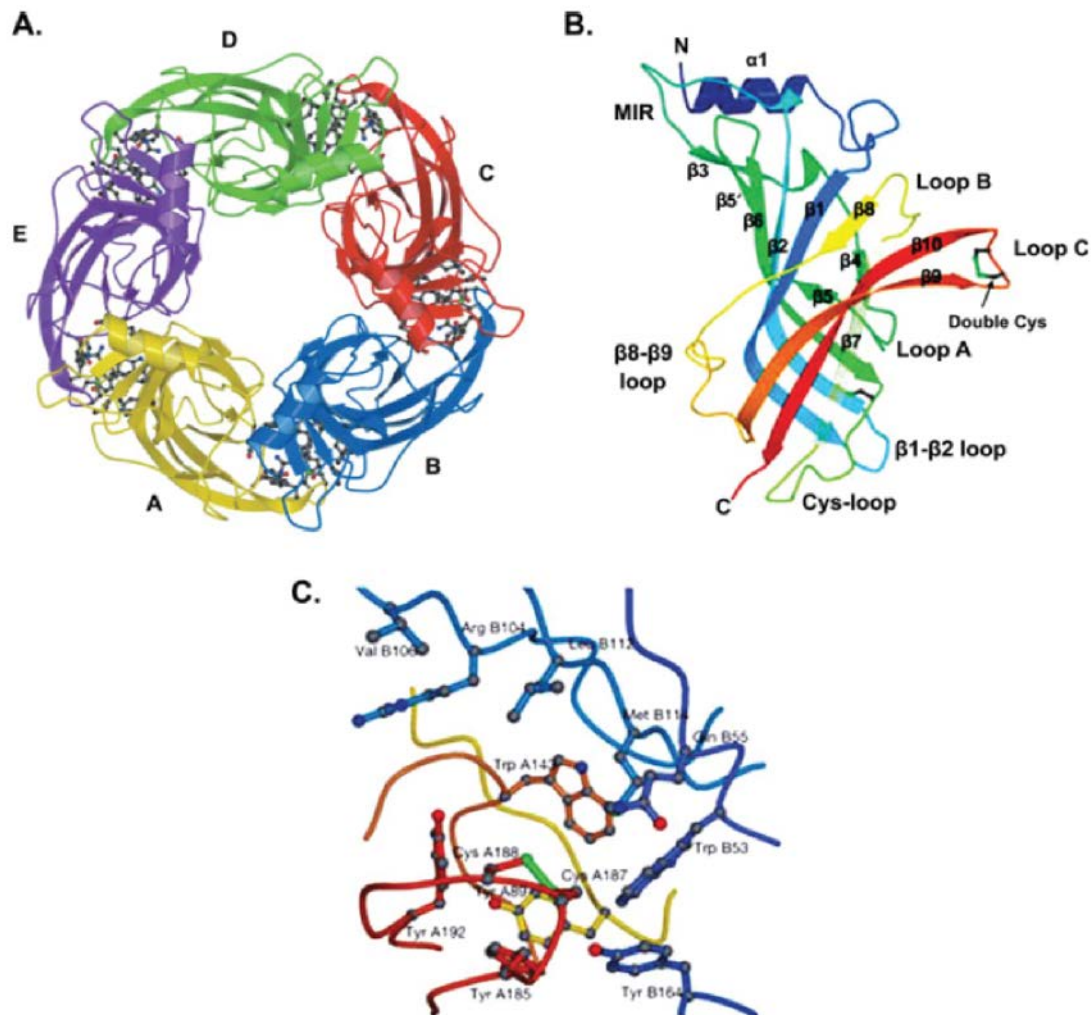
des agonistes et les propriétés d'ouverture du canal étant conservées. Ainsi, la sous-unité α semble impliquée dans l'affinité des ligands et l'ouverture du canal tandis que la sous-unité complémentaire (γ ou δ) serait responsable de la sélectivité pour les antagonistes (Karlin 2002).

Plus tard, l'étude de l'acétylcholine binding protein (AChBP⁴) soluble des mollusques (qui présente une homologie avec le domaine N-terminal des nAChRs), a permis de déterminer pour la première fois la structure du site de liaison de l'ACh à une résolution atomique. En effet, la structure de l'AChBP a été déterminée par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2,7 Å chez l'escargot *Lymnaea stagnalis* (Brejc et coll. 2001; Smit et coll. 2006) et de 1,96 Å chez *Aplysia californica* (Ulens et coll. 2006). L'étude de l'AChBP a confirmé les résidus identifiés par photoaffinité chez *Torpedo* (avec un décalage de la numérotation des acides aminés) au niveau de la composante principale et d'identifier pour la première fois les résidus de la composante secondaire impliqués dans la liaison de l'ACh. Ainsi, le site de liaison est formé par des résidus de la **boucle A** (Tyr89), de la **boucle B** (Trp143 et Trp145) et de la **boucle C** (Tyr185, le doublet Cys187/188 et Tyr192) au niveau de la composante principale, qui sont très conservés dans la famille des LGICs; et par des résidus moins conservés au niveau de la **boucle D** (Trp53 et Gln55), la **boucle E** (Arg104, Val116, Leu112, Met114) et de la **boucle F** (Tyr164) au niveau de la composante secondaire du site de liaison (Brejc et coll. 2001) (figure 4). De plus, la molécule d'HEPES contenue dans le tampon de cristallisation mimant les ligands cholinergiques (car contient un ammonium quaternaire⁵), se trouve être stabilisée par des interactions cations- π avec le résidu conservé Trp143 (équivalent du Trp149 de *Torpedo*). Ainsi, le complexe AChBP-HEPES a été considéré comme un modèle pour étudier la structure du DEC des nAChRs dans son état désensibilisé (Grutter et Changeux 2001). Récemment, la détermination de la structure tridimensionnelle du DEC de la sous-unité $\alpha 1$ de la souris en interaction avec l' α -bungarotoxine a révélé une structure du site de liaison des ligands similaire à celle de l'AChBP, du moins pour la composante principale du site de liaison (Dellisanti et coll. 2007). Cette étude a permis de

⁴ L'AChBP est une protéine homopentamérique soluble sécrétée par les cellules gliales au niveau des synapses cholinergiques des escargots. Elle lie les agonistes et antagonistes compétitifs des nAChRs et possède un spectre d'affinité similaire à celui des nAChRs neuronaux homomériques $\alpha 7$ et $\alpha 9$ (Smit et coll. 2001).

⁵ Les agonistes et antagonistes compétitifs possèdent au minimum un groupement ammonium quaternaire qui correspond à un ion ammonium dans lequel l'azote est lié à quatre carbones. Ils ont la particularité d'être chargés en permanence, indépendamment du pH.

mettre en évidence l'importance des interactions protéine-protéine et protéine-sucre dans la liaison des ligands (Dellisanti et coll. 2007).



4) Structure dynamique du récepteur nicotinique.

La liaison de l'ACh ou d'un agoniste avec le récepteur entraîne l'ouverture du canal et le passage d'un flux d'ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane (Edelstein et Changeux 1996; Zia et coll. 2000; Fucile 2004). Ceci se traduit par une dépolarisation de la membrane cellulaire et conduit, selon la localisation des nAChRs, à la modulation de l'activité neuronale ou de la contraction musculaire (Zouridakis et coll. 2009). La comparaison des structures des nAChRs en absence ou en présence d'ACh, a permis de mettre en évidence la structure dynamique des nAChRs (Unwin 1995). Les différents états de transition du récepteur peuvent être décrits selon le modèle de Monod-Wyman-Changeux (Monod et coll. 1965; Karlin 1967) qui suppose la présence du récepteur sous deux formes: une forme tendue en absence de ligand et une forme relâchée en présence du ligand. Selon ce modèle, la liaison du ligand provoque un changement concerté au niveau des sous-unités et l'état d'ouverture du canal dépend du ratio entre les sous-unités en état tendu ou en état relâché. Ainsi, les nAChRs peuvent adopter trois états fonctionnels différents (figure 5A): (a) un **état de repos** ou état fermé, qui est non conducteur et de faible affinité pour les agonistes, (b) un **état activé** ou état ouvert, qui est conducteur et de haute affinité pour la liaison des agonistes et (c) un **état désensibilisé**, qui est non-conducteur mais de haute affinité pour la liaison des agonistes. La liaison de l'ACh ou des agonistes permet la transition du nAChR de l'état fermé à l'état ouvert tandis qu'une exposition prolongée des récepteurs aux agonistes conduit à leur désensibilisation et donc à l'arrêt du flux d'ions au travers du canal (Edelstein et coll. 1996; Sine et Engel 2006; Zouridakis et coll. 2009).

La conformation ouverte du récepteur existe seulement pendant environ 1 ms après son activation par l'ACh (Clements 1996). Le mécanisme de cette activation transitoire a pu être décrit à une résolution de 6 Å et montre que l'ouverture du canal est due à un changement conformationnel concerté entre les sous-unités du récepteur (figure 5B). En effet, la liaison de l'ACh initie une série de réarrangements des acides aminés au niveau de la sous-unité α du site de liaison (DEC) qui se répercutent jusqu'à la sous-unité β (au niveau du DTM). Ceci induit un déplacement du DIC de la sous-unité β vers l'extérieur et permet ainsi l'ouverture du pore du canal et le passage des ions (Unwin et Fuliyoishi 2012).

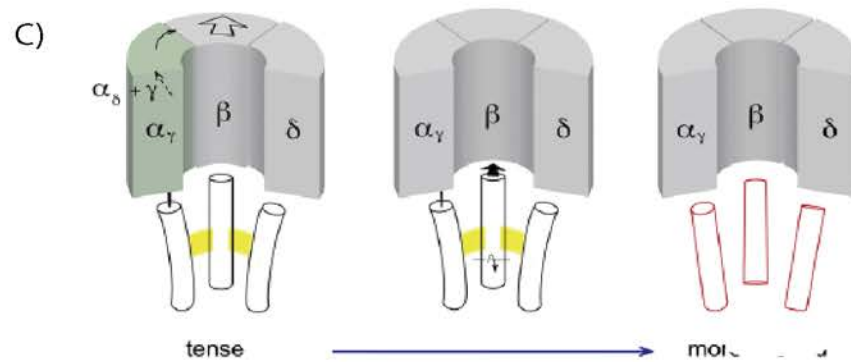
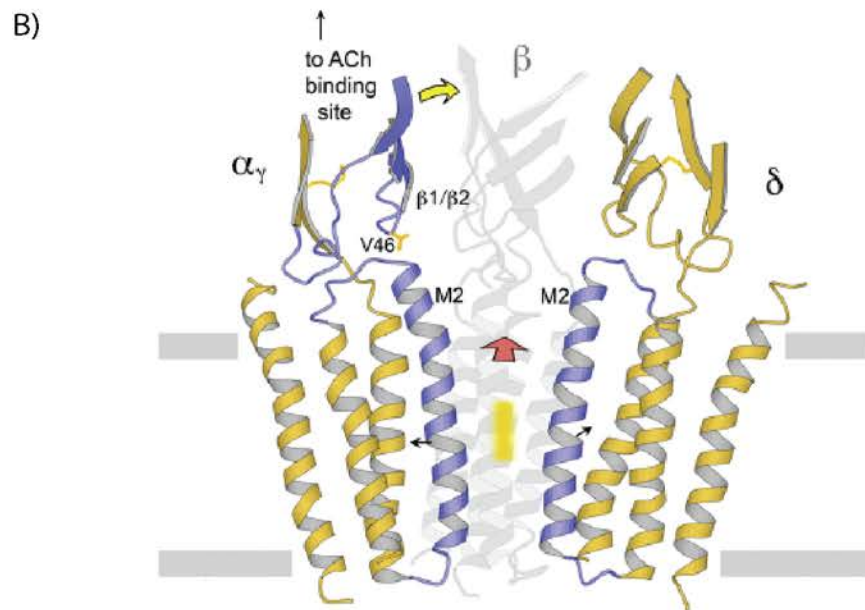
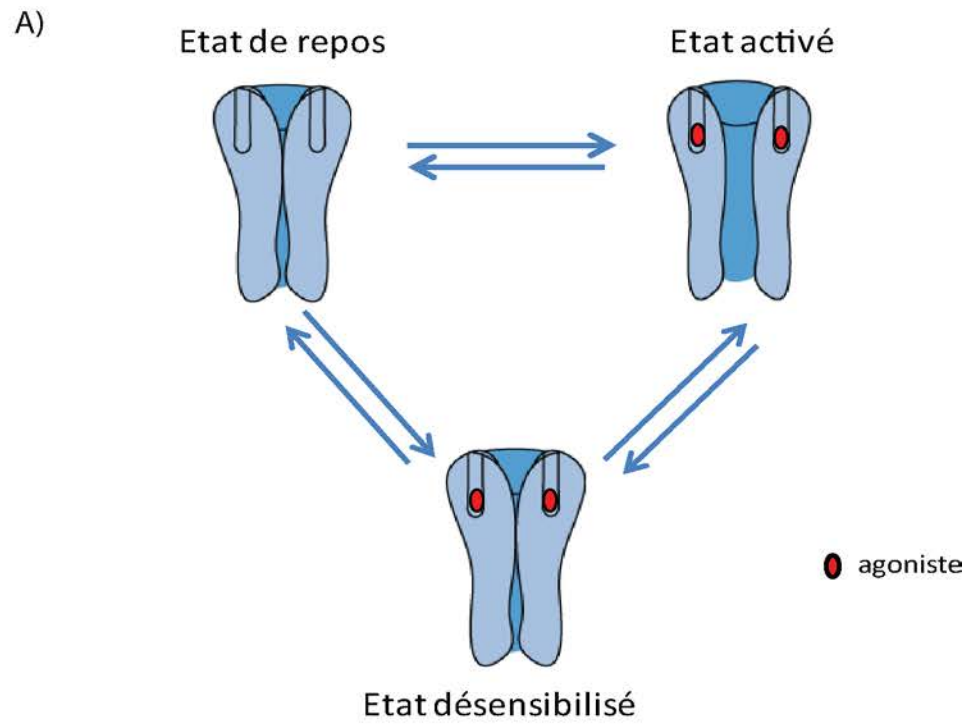


Figure 5. Mécanisme d'ouverture du canal ionique des récepteurs nicotiniques de la torpille.

A) Représentation schématique des différents états fonctionnels des récepteurs (D'après Sine et Engel 2006). Le canal ionique est fermé à l'état de repos. La liaison de l'agoniste (acétylcholine, ACh) provoque l'ouverture du canal permettant le flux ionique et donc l'activation du récepteur. Si la fixation de l'agoniste se prolonge, le canal se ferme et passe dans un état dit désensibilisé.

B) Proposition de mécanisme d'ouverture du canal (D'après Sine et Engel 2006).

C) Modèle allostérique global: La liaison de l'ACh induit des « distorsions » au niveau des sous-unités α qui se combinent pour pousser le domaine extracellulaire de la sous-unité β . Ce mouvement se propage dans la membrane brisant des liaisons symétriques entre les hélices constituant le pore du canal leur permettant ainsi d'adopter une conformation perméable aux ions (D'après Unwin et Fujiyoshi 2012).

Chapitre 2. Diversité des sous-unités de récepteurs nicotiques chez les insectes.

1) Les gènes codant pour les sous-unités de nAChRs chez les insectes.

Contrairement aux mammifères, qui possèdent des nAChRs au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, les nAChRs d'insectes sont exclusivement situés au niveau du SNC (Breer 1981; Tassonyi et coll. 2002). Actuellement, parmi les espèces d'insectes dont le génome est entièrement séquencé, entre 10 et 12 gènes codant pour des sous-unités de nAChRs ont été identifiés (tableau I) chez *Drosophila melanogaster* (pour revue Sattelle et coll. 2005), *Anopheles gambiae* (Jones et coll. 2005), *Apis mellifera* (Jones et coll. 2006), *Acyrtosiphon pisum* (Dale et coll. 2010; Liu et coll. 2013), *Bombyx mori* (Shao et coll. 2007) et *Tribolium castaneum* (Jones et Sattelle 2007). La guêpe parasite *Nasonia vitripennis* possède la plus grande famille de gènes identifiée chez les insectes avec 16 gènes codant des sous-unités de nAChRs (Jones et coll. 2010) (tableau I). Une telle diversité n'a été observée que chez le nématode *Caenorhabditis elegans* qui possède 27 gènes codant pour des sous-unités de nAChRs, dont plusieurs présentent des motifs d'acides aminés inhabituels caractéristiques des nématodes (Jones et Sattelle 2004; Buxton et coll. 2014). Ainsi, selon leur homologie de séquence en acides aminés, les sous-unités de nAChRs d'insectes sont classées en sept groupes conservés (figure 6) (Jones et coll. 2007; Jones et Sattelle 2010). Les sous-unités d'un même groupe présentent une homologie de séquence en acides aminés supérieure à 60% entre les différentes espèces d'insectes (Jones et Sattelle 2010). En outre, l'analyse phylogénétique montre qu'un seul de ces groupes de sous-unités ($\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$) partage un ancêtre commun avec des sous-unités de Vertébrés ($\alpha 7$ et $\alpha 8$) (Thany et coll. 2007). De plus, les différentes espèces d'insectes présentent le même nombre de sous-unités appartenant à des groupes conservés, à deux exceptions près. En effet, *T. castaneum* possède une sous-unité supplémentaire dans le groupe des $D\beta 2$, qui proviendrait sûrement d'une duplication de gène (Jones et Sattelle 2007). *A. pisum* ne possède pas d'orthologue de la sous-unité $D\alpha 5$ (Dale et coll. 2010) alors que le gène codant la sous-unité $Apisum\alpha 7$ présente une duplication en tandem d'exons qui pourrait ainsi représenter un événement

ancestral de diversification ayant conduit à la formation d'un gène distinct codant pour les sous-unités $\alpha 5$ chez d'autres espèces au cours de l'évolution (Dale et coll. 2010).

Tableau I. Bilan des sous-unités de nAChRs identifiées chez les insectes dont le génome est séquencé.

espèce	Taille du génome (Mega bases)	nombre de sous-unité α	nombre de sous-unité β	nombre de sous-unités	groupe Da1 ($\alpha 1$ -like subunit)	groupe Da2 (second α -like subunit Drosophila)	groupe Da3	groupe Da4	groupe Da5-7	groupe D β 1 (acetylcholine receptor Drosophila)	groupe D β 2 = SBD (second beta- like subunit Drosophila)	sous-unités divergentes	références	année de séquencage
<i>Drasophila melanogaster</i>	118	7	3	10	Da1 = $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -like subunit)	Da2 = SAD (second α -like subunit Drosophila)	Da3	Da4	Da5 Da6 Da7	D β 1 = ARD (acetylcholine receptor Drosophila)	D β 2 = SBD (second beta- like subunit Drosophila)	D β 3	Adams et coll. 2000; Sattelle et coll. 2005	2000
<i>Anopheles gambiae</i>	278	9	1	10	Agama1	Agama2	Agama3	Agama4	Agama5 Agama6 Agama7	Agam β 1	Agama8	Agama9	Holt et coll. 2002; Jones et coll. 2005	2002
<i>Apis mellifera</i>	262	9	2	11	Amela1	Amela2 (Apis $\alpha 2$)	Amela3	Amela4	Amela5 (Apis $\alpha 7-2$) Amela6 Amela7 (Apis $\alpha 7-1$)	Amel β 1	Amela8 (Apis $\alpha 3$)	Amela9 Amel β 2	Consortium T.H.G.S. 2006; Jones et coll. 2006	2006
<i>Tribolium castaneum</i>	204	11	1	12	Tcasa1	Tcasa2	Tcasa3	Tcasa4	Tcasa5 Tcasa6 Tcasa7	Tcas β 1	Tcasa8 Tcasa11	Tcasa9 Tcasa10	Tribolium Genome Sequencing 2008; Jones et Sattelle 2007	2008
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	517	9	2	11	Apisuma1	Apisuma2	Apisuma3	Apisuma4	Apisuma6 Apisuma7	Apisum β 1	Apisuma8	Apisuma9 Apisuma10 Apisum β 2	Consortium T.I.A.G. 2010; Dale et coll. 2010	2010
<i>Bombyx mori</i>	429	9	3	12	Bma1	Bma2	Bma3	Bma4	Bma5 Bma6 Bma7	Bm β 1	Bma8	Bma9 Bm β 2 Bm β 3	Xia et coll. 2004; Shao et coll. 2007	2004
<i>Nasonia vitripennis</i>	239	12	4**	16	Nvita1	Nvita2	Nvita3	Nvita4	Nvita5 Nvita6 Nvita7	Nvit β 1	Nvita8	Nvita9 Nvita10 Nvita11 Nvita12 Nvit β 2 Nvit β 3 Nvit β 4	Werren et coll. 2010; Jones et coll. 2010	2010
<i>Locusta migratoria*</i>	6500	9	2	11	Lma1	Lma2	Lma3	Lma4	Lma5 Lma6 Lma7	Lm β 1	Lma8	Lma9 Lm β 2	Wang et coll. 2014; Zhang et coll. non publié	2014

* 17 gènes prédicts à l'analyse du génome mais 11 séquences de sous-unités dans les bases de données

** Nvit β 4 serait plutôt un pseudogène non transcrit

Enfin, on peut noter que tous les orthologues de la sous-unité D β 2 sont des sous-unités α , suggérant un changement du rôle fonctionnel de cette sous-unité chez la drosophile (Jones et Sattelle 2010).

L'analyse du génome chez ces espèces d'insectes met en évidence la présence d'un nombre variable de sous-unités divergentes, avec au moins une sous-unité divergente qui présente une très faible homologie de séquence (<29%) avec toutes les autres sous-unités d'insectes (Jones et Sattelle 2010) (tableau I, figure 6). Ainsi, trois sous-unités divergentes sont présentes chez le puceron du pois *A. pisum* (Apisum α 9, Apisum α 10 et Apisum β 2) (Dale et coll. 2010) et le papillon *B. mori* (Bm α 9, Bm β 2 et Bm β 3) (Shao et coll. 2007), tandis que l'abeille *A. mellifera* en possède deux (Amel α 9 et Amel β 2) (Jones et coll. 2006) et qu'une seule sous-unité divergente est observée chez le moustique *A. gambiae* (Agam α 9) (Jones et coll. 2005) et la mouche *D. melanogaster* (D β 3) (Lansdell et Millar 2002; Sattelle et coll. 2005). Le plus grand nombre de sous-unités divergentes est observé chez la guêpe *N. vitripennis* qui en possède sept (Nvita α 9-12 et Nvit β 2-4) (Jones et coll. 2010). Le rôle de ces sous-unités divergentes est peu connu mais certaines caractéristiques structurales pourraient influencer le fonctionnement du récepteur qui les implique. Ainsi, la plupart des sous-unités divergentes ont une boucle intracellulaire entre les TM3 et TM4 de petite taille (Jones et Sattelle 2010), ce qui pourrait influencer la régulation des nAChRs dont elles font partie, notamment par modification des mécanismes de phosphorylation (Castelan et coll. 2007). Certaines sous-unités divergentes, comme celles de *B. mori* (Shao et coll. 2007) et *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010), montrent une absence du motif conservé GEK en amont du TM2, qui est important pour la sélectivité cationique des récepteurs (Jensen et coll. 2005). Par ailleurs, les sous-unités divergentes Apisum α 9 et Apisum α 10 du puceron *A. pisum* sont très particulières car ce sont les seules sous-unités de nAChRs d'insectes qui ne possèdent pas les deux cystéines caractéristiques de la « cys-loop » (Dale et coll. 2010) nécessaire à l'assemblage des récepteurs (Green et Wanamaker 1997). La mutation d'une des cystéines de cette « cys-loop » de la sous-unité α a des conséquences variables selon l'espèce considérée. Ainsi, c'est la liaison des ligands qui est altérée chez *Torpedo* (Sumikawa et Gehle 1992) alors que ce sont les propriétés d'ouverture du canal ionique qui sont modifiées chez *C. elegans* (Jones et coll. 2011). De même, les sous-unités Tcas α 9 chez *T. castaneum* (Shao et coll. 2007) et Nvita α 11 chez *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010) possèdent un motif d'acides aminés

atypique FxCC à la place du motif conservé YxCC au niveau de la boucle C qui pourrait influencer la liaison des ligands (Galzi et coll. 1991). Par ailleurs, la sous-unité divergente de *D. melanogaster* D β 3 est capable de se co-assembler avec d'autres sous-unités afin de former des nAChRs fonctionnels dont les propriétés de liaison des ligands sont modifiées du fait de la présence de cette sous-unité divergente (Lansdell et Millar 2002). Ces sous-unités divergentes sont donc particulièrement intéressantes car elles pourraient conférer des caractéristiques fonctionnelles particulières aux nAChRs (Dale et coll. 2010; Jones et Sattelle 2010).

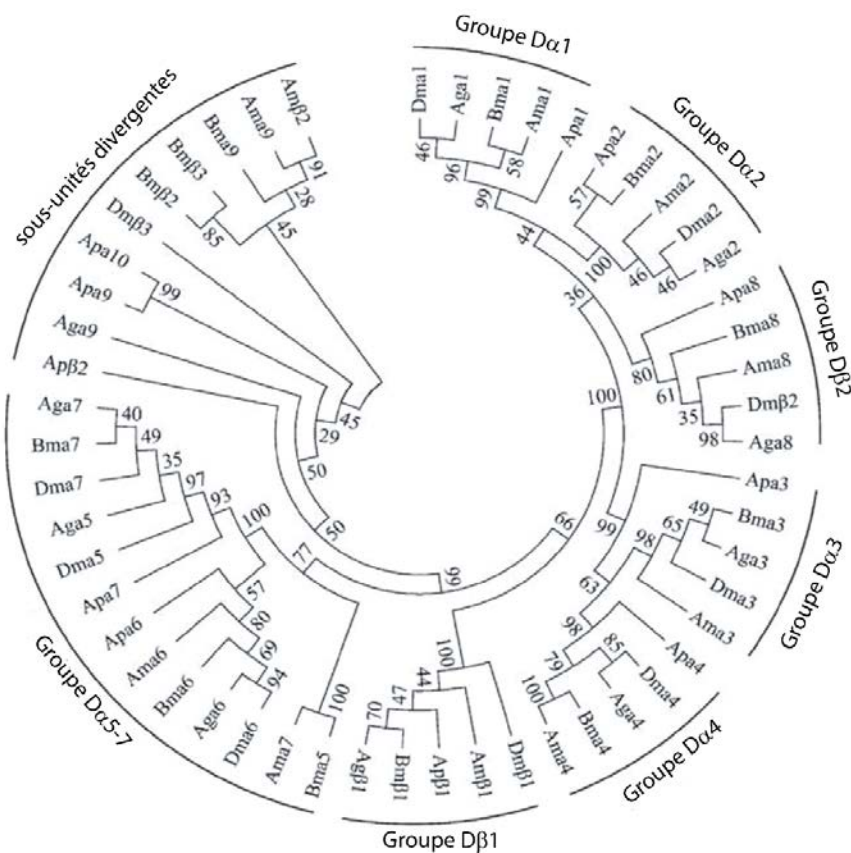


Figure 6. Arbre phylogénétique des sous-unités de récepteurs nicotiniques chez différentes espèces d'insectes. Dm, *Drosophila melanogaster* ; Ag, *Anopheles gambiae* ; Bm, *Bombyx mori* ; Ap, *Acyrtosiphon pisum* ; Am, *Apis mellifera* (Modifié d'après Liu et coll. 2013).

2) Diversité des sous-unités par modifications post-transcriptionnelles.

Le nombre de gènes codant les sous-unités de nAChRs chez les insectes est plus faible que chez les mammifères. Cependant, le nombre de sous-unités exprimées est relativement élevé du fait de modifications post-transcriptionnelles importantes liées à des mécanismes d'édition et d'épissage alternatif des transcrits (Jin et coll. 2007).

2.1) Modification de sous-unités d'insectes par épissage alternatif.

2.1.1) Les différents mécanismes d'épissage alternatif.

Il existe différents mécanismes d'épissage alternatif qui peuvent être regroupés selon cinq modèles principaux (Keren et coll. 2010). Le premier modèle est le saut d'exon, dans lequel un exon est complètement retenu ou exclu du transcrit mature (figure 7A). Ce mécanisme d'épissage serait le plus répandu chez les eucaryotes (environ 40% des événements d'épissage) (Keren et coll. 2010). Les deuxième et troisième modèles correspondent à la reconnaissance d'un site d'épissage alternatif au niveau des extrémités 3' et 5' (figure 7B et C respectivement) et semblent être plus rares chez les eucaryotes (Keren et coll. 2010). Le quatrième modèle est la rétention d'intron dans lequel un intron est conservé dans le transcrit mature et concernerait moins de 5 % des événements d'épissage chez les Invertébrés (Keren et coll. 2010) (figure 7D). Enfin le cinquième modèle correspond à l'épissage d'exons mutuellement exclusifs. Dans ce cas, les transcrits matures contiendront l'un ou l'autre des exons (figure 7E). La présence d'exons mutuellement exclusifs serait liée à une duplication d'exon (Kondrashov et Koonin 2001) et serait peu fréquent chez les eucaryotes (Keren et coll. 2010).

La majorité de ces événements post-transcriptionnels ne produit pas d'arrêt du cadre de lecture, mais conduit à l'expression de différentes isoformes protéiques. L'épissage alternatif peut ainsi affecter la séquence protéique de deux façons: (i) Les quatre premiers

modèles d'épissage alternatif conduisent à la délétion ou l'insertion de séquence générant des isoformes plus courtes ou plus longues (Kondrashov et Koonin 2001). Les formes tronquées agissent souvent comme régulateurs dominant négatifs de l'activité des isoformes complètes (Jin et coll. 2007). (ii) Le cinquième modèle d'épissage alternatif qui correspond à la substitution d'une portion de séquence par une autre (Kondrashov et Koonin 2001) n'entraîne généralement pas de modification de la taille du transcrit et permet l'expression d'une multitude d'isoformes protéiques fonctionnellement distinctes (Jin et coll. 2007).

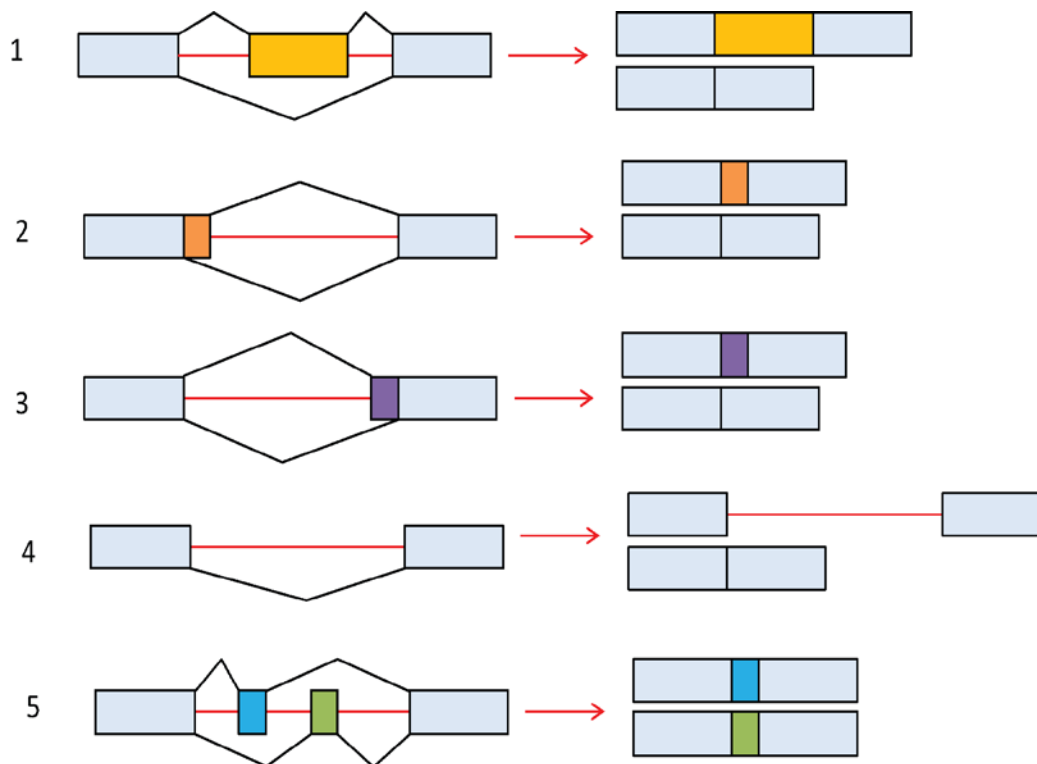


Figure 7. Principaux mécanismes d'épissage alternatif. Les cinq modèles d'épissage alternatif sont présentés: 1) Saut d'exon; 2) et 3) Site d'épissage alternatif en 5' et 3' respectivement; 4) Rétention d'intron; 5) Exons mutuellement exclusifs (généralement de même taille). Les exons constitutifs sont représentés par des rectangles gris et les exons alternatifs par des rectangles de couleur; les lignes rouges correspondent aux introns et les lignes noires indiquent les options d'épissage (Modifié d'après Keren et coll. 2010).

2.1.2) Identification d'isoformes épissées chez les insectes

L'épissage alternatif est un mécanisme très conservé entre les différentes espèces d'insectes (Jin et coll. 2007). Ainsi, plusieurs isoformes épissés de sous-unités de nAChRs ont été identifiés chez les insectes (tableau II). En particulier, **l'épissage d'exons mutuellement exclusifs** au niveau des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 6$ apparaît conservé pour la majorité des espèces d'insectes. Ainsi, le gène codant pour la sous-unité $\alpha 4$ présente deux exons 4 alternatifs (exon 4 et exon 4') qui sont intégrés de façon mutuellement exclusive chez *A. mellifera* (Kondrashov et Koonin 2001), *D. melanogaster* (Lansdell et Millar 2000a), *A. gambiae* (Jones et coll. 2005), *B. mori* (Shao et coll. 2007), *A. pisum* (Dale et coll. 2010) et *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010). La sous-unité $\alpha 6$ présente deux formes alternatives de l'exon 3 chez *D. melanogaster* (Grauso et coll. 2002 ; Jin et coll. 2007), *A. gambiae* (Jones et coll. 2005), *B. mori* et *T. castaneum* (Jin et coll. 2007), ce qui n'est pas le cas chez *A. mellifera* (Jones et coll. 2006). D'autre part, cette sous-unité présente un nombre de formes alternatives variable de l'exon 8. Ainsi, on observe la présence de deux versions de l'exon 8 chez *A. gambiae* (Jones et coll. 2005), *A. pisum* (Dale et coll. 2010) et *B. mori* (Shao et coll. 2007) tandis que trois exons alternatifs sont présents chez *D. melanogaster* (Grauso et coll. 2002), *A. mellifera* (Jones et coll. 2005), *T. castaneum* (Jin et coll. 2007) et *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010). Parmi les mécanismes d'épissage alternatif, **l'épissage par saut d'exon** apparaît au contraire moins conservé chez les insectes et concerne notamment l'exon 4 des sous-unités $\alpha 4$ chez *A. mellifera* (Jones et coll. 2006), *A. gambiae* (Jones et coll. 2005) et *D. melanogaster* (Sattelle et coll. 2005) ainsi que les exons 5 et 4 des sous-unités $\alpha 5$ chez *D. melanogaster* (Grauso et coll. 2002) et *B. mori* (Shao et coll. 2007) respectivement. De plus, certains mécanismes d'épissage apparaissent spécifiques d'une sous-unité ou d'une espèce d'insectes. En effet, la formation d'isoformes par **modification du site d'épissage** n'a été observée que pour la sous-unité Amel $\alpha 3$ chez *A. mellifera* (Jones et coll. 2006) tandis que la **rétenion d'intron** ne semble toucher que la sous-unité $\alpha 7$ chez *D. melanogaster* (Grauso et coll. 2002), *A. gambiae* (Jones et coll. 2005) et *A. mellifera* (Jones et coll. 2006).

Tableau II. Bilan (non exhaustif) des isoformes épissées de sous-unités de nAChRs identifiées chez les insectes dont le génome est séquencé.

sous-unité	épissage alternatif		espèces	références
	localisation	mécanisme		
$\alpha 1$	exon 3	saut d'exon	<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll., unpublished
$\alpha 3$	intron 9	site d'épissage alternatif	<i>A.mellifera</i>	Jones et coll. 2006
$\alpha 4$	exon 4	2 exons alternatifs (4 et 4')	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007
			<i>A.gambiae</i>	Jones et coll. 2005
			<i>A.mellifera</i>	Kondrashov et Koonin 2001
			<i>T.castaneum</i>	Jin et coll. 2007
			<i>N.vitripennis</i>	Jones et coll. 2010
			<i>D.melanogaster</i>	Lansdell et Millar 2000a
			<i>A.pisum</i>	Dale et coll. 2010**; Liu et coll. 2013
			<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll. unpublished
		saut d'exon	<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll. unpublished
			<i>A.mellifera</i>	Jones et coll. 2006
			<i>A.gambiae</i>	Jones et coll. 2005
			<i>A.pisum</i>	Dale et coll. 2010**
			<i>D.melanogaster</i>	Sattelle et coll. 2005
	exon 6,7,8	saut d'exon	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007
	exon 2	saut d'exon	<i>D.melanogaster</i>	Sattelle et coll. 2005
$\alpha 5$	exon 4	saut d'exon	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007
	exon 5	saut d'exon	<i>D.melanogaster</i>	Grauso et coll. 2002; Sattelle et coll. 2005
$\alpha 6$	exon 3	2 exons alternatifs (3a et 3b)	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007; Jin et coll. 2007
			<i>D.melanogaster</i>	Jin et coll. 2007
			<i>A.gambiae</i>	Jones et coll. 2005; Jin et coll. 2007
			<i>T.castaneum</i>	Jin et coll. 2007
		saut d'exon	<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll. unpublished
	exon 8	3 exons alternatifs (8a, 8b et 8c)	<i>D.melanogaster</i>	Grauso et coll. 2002; Jin et coll. 2007
			<i>A.mellifera</i>	Jones et coll. 2006; Jin et coll. 2007
			<i>T.castaneum</i>	Jin et coll. 2007
			<i>N.vitripennis</i>	Jones et coll. 2010
		2 exons alternatifs (8b et 8c)	<i>A.gambiae</i>	Jones et coll. 2005; Jin et coll. 2007
			<i>A.pisum</i>	Dale et coll. 2010**
			<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007; Jin et coll. 2007
$\alpha 7$	intron 5	rétention intron	<i>D.melanogaster</i>	Grauso et coll. 2002
			<i>A.gambiae</i>	Jones et coll. 2005
			<i>A.mellifera</i>	Jones et coll. 2006
			<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll. unpublished
	exon 6 et 7	2 exons alternatifs	<i>A.pisum</i>	Dale et coll. 2010**
$\alpha 8$	exon 7	2 exons alternatifs	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007
	exon 8 / intron 9	2 exon alternatif / retention intron	<i>L.migratoria</i> *	Zhang et coll. unpublished
$\beta 2$	exon 2	saut d'exon	<i>N.lugens</i> *	Liu et coll. 2005; Liu et coll. unpublished

* analyse putative par comparaison avec la structure exonique de gènes déterminée pour d'autres espèces d'insectes dont le génome est disponible dans les bases de données

** épissage putatif déduit de l'analyse du génome (Dale et coll. 2010).

2.1.3) Implications fonctionnelles de l'épissage alternatif.

L'épissage alternatif concerne des régions fonctionnelles importantes et peut donc fortement influencer les propriétés des récepteurs (figure 8). Ainsi, l'épissage alternatif de l'exon 4 de la sous-unité $\alpha 4$ entraîne une modification d'acides aminés au niveau de la « cys-loop », qui est importante pour l'assemblage complet des récepteurs (cf chapitre 1). Chez la drosophile, des tests de liaison avec l' [125 I]- α -bungarotoxine et l' [3 H]-épibatidine sur des nAChRs hybrides $D\alpha 4/\beta 2$ de rat, montrent une liaison plus importante en présence de l'isoforme $D\alpha 4^{\text{exon4}}$ qu'en présence de l'isoforme $D\alpha 4^{\text{exon4'}}$ bien que ces deux isoformes présentent une stabilité similaire lors des tests d'immunomarquage (Lansdell et Millar 2000a). Ainsi l'isoforme $D\alpha 4^{\text{exon4}}$ s'assemblerait avec une plus grande efficacité que l'isoforme $D\alpha 4^{\text{exon4'}}$ (Lansdell et Millar 2000a). D'autre part, les isoformes issues de l'épissage alternatif sont différemment exprimées en fonction du stade de développement et du tissu considéré. Chez l'abeille *A. mellifera*, le transcrit $Am\alpha 4^{\text{exon4}}$ est présent à tous les stades et tissus testés alors que l'isoforme $Am\alpha 4^{\text{exon4'}}$ est absente à tous les stades larvaires mais est particulièrement abondant dans les corps pédonculés, les lobes optiques et le cerveau (Jones et coll. 2006). On peut supposer que la sous-unité $Am\alpha 4^{\text{exon4'}}$ modulerait l'assemblage des récepteurs durant les derniers stades de développement de l'abeille dans les tissus présentant une forte activité neuronale (Jones et coll. 2006). Il faut également ajouter que l'épissage caractéristique de la sous-unité $Am\alpha 3$ chez l'abeille conduit à la formation d'une isoforme longue $Am\alpha 3L$ qui possède deux sites de phosphorylation prédits supplémentaires par rapport à l'isoforme courte $Am\alpha 3S$. Etant donné que les mécanismes de phosphorylation sont impliqués dans le contrôle de la désensibilisation et de l'agrégation des récepteurs, la présence de ces deux isoformes pourrait modifier les propriétés et les mécanismes de régulation des nAChRs (Jones et coll. 2006). De même, la présence d'un exon 7 alternatif pour la sous-unité $Bm\alpha 8$ est caractéristique du papillon *B. mori* et pourrait conduire à la formation de transcrits spécifiques de cette espèce (Shao et coll. 2007). Ainsi, les mécanismes d'épissage alternatif pourrait conduire à la formation d'isoformes de sous-unités de nAChRs présentant des propriétés fonctionnelles propres à certaines espèces d'insectes, comme cela est suggéré pour la sous-unité $Agam\alpha 6$ du moustique (Jones et coll. 2005).

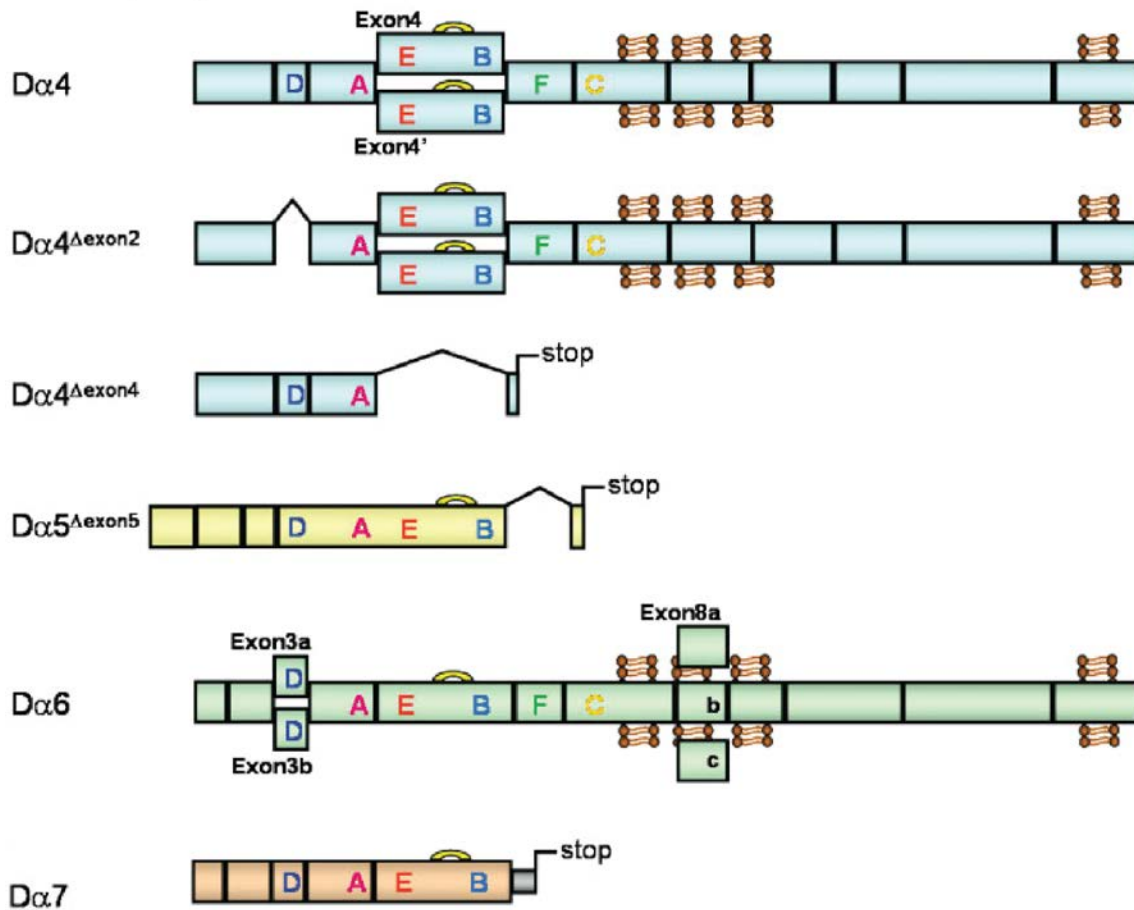


Figure 8. Représentation schématique de l'épissage alternatif des sous-unités de nAChRs chez *D. melanogaster*. Les boucles (A à F) du domaine de liaison ainsi que la « cys-loop » (barre jaune entre les boucles E et B) et les quatre domaines transmembranaires sont représentés (D'après Sattelle et coll. 2005).

Enfin, l'épissage par saut d'exon ou rétention d'intron conduit à la formation de transcrits tronqués présentant la perte d'au moins une région fonctionnelle importante telle que des domaines transmembranaires ou encore des boucles du domaine N-terminal formant le site de liaison des ligands, suggérant que ces isoformes ne sont pas capables de lier l'ACh ni de former des nAChRs fonctionnels (Jones et Sattelle 2010). Cependant la forte fréquence de ce phénomène pour différentes espèces et différentes sous-unités suppose un rôle fonctionnel de ces formes tronquées. Il a ainsi été envisagé que ces transcrits tronqués pourraient coder pour des protéines impliquées dans la régulation de la fonction des récepteurs (Rinkevich et Scott. 2009). En effet, chez la souris, les formes tronquées de la

sous-unité $\alpha 7$, issues d'une rétention de l'intron 9, présentent le même profil d'expression que le transcrit complet d' $\alpha 7$ et agissent comme dominant négatif, en diminuant les courants induits par les agonistes, lorsqu'elles sont co-transfectées avec des formes complètes de la sous-unité $\alpha 7$ (Saragoza et coll. 2003).

2.2) Edition des sous-unités d'insectes.

2.2.1) Identification d'isoformes éditées chez les insectes.

L'édition des ARNm permet également d'augmenter la diversité des sous-unités. Un des principaux mécanismes d'édition est la désamination de l'adénosine (A). Cette réaction est catalysée par l'enzyme ADAR (adenosine desaminase acting on RNA, « adénosine désaminase agissant sur l'ARN ») et produit de l'inosine (I). L'inosine peut s'apparier avec la cytosine et entraîner la production d'une protéine différente de celle prédite (Seeburg 2002) (figure 9A). Cette édition A-to-I a été observée pour la première fois chez une sous-unité de nAChRs d'insectes par l'équipe de Grauso en 2002 au niveau de la sous-unité $D\alpha 6$ de la drosophile *D. melanogaster* (Grauso et coll. 2002). L'édition de cette sous-unité est également observée chez *B. mori* (Shao et coll. 2007), *A. mellifera* (Jones et coll. 2006), *H. viriscens* (Grauso et coll. 2002), *M. domestica* (Gao et coll. 2007b), *T. castaneum* (Jones et coll. 2007) et *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010) avec des sites d'édition communs entre les différentes espèces (figure 9B), mais ne concerne pas la sous-unité $Agam\alpha 6$ du moustique *A. gambiae* (Jones et coll. 2005) (tableau III). Par ailleurs, on observe également la présence de sites d'édition supplémentaires spécifiques de certaines espèces qui pourraient conduire à la formation d'isoformes aux propriétés particulières (Yao et coll. 2009): 4 sites chez *A. mellifera* (Jones et coll. 2006) et 2 sites chez *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010).

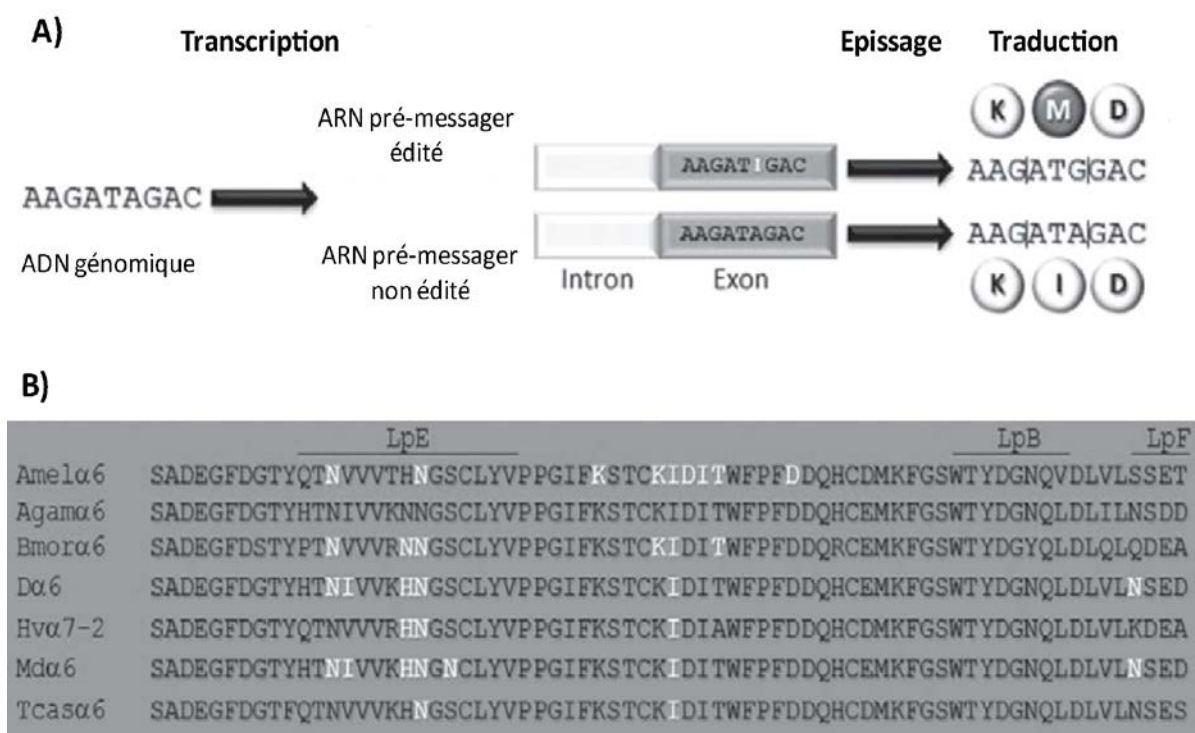


Figure 9. Recodage de l'information génétique par édition A-to-I des ARNs. A) représentation schématique du processus d'édition des ARN. B) Comparaison des sites d'édition (en blanc) de la sous-unité α6 chez *D. melanogaster*, *A. gambiae*, *B. mori*, *A. mellifera*, *H. viriscens*, *M. domestica* et *T. castaneum* (Modifié d'après Jones et Sattelle 2010).

Par ailleurs les mécanismes d'édition semblent particulièrement importants chez la drosophile. En effet, plusieurs sites d'édition observés chez *D. melanogaster* ne sont pas retrouvés pour les autres espèces d'insectes dont le génome est séquencé. Ainsi, l'édition des sous-unités Dα5, Dα7 et Dβ2 est caractéristique de *D. melanogaster* (Hoopengardner et coll. 2003; Fayyazuddin et coll. 2006) et l'édition d'un orthologue de la sous-unité Dβ1 n'a été observé que chez *T. castaneum* (Hoopengardner et coll. 2003; Jones et Sattelle 2007) (tableau III).

Tableau III. Mécanismes d'édition des ARNm identifiés au niveau des sous-unités de nAChRs d'insectes.

sous-unité	édition A-to-I		espèces	références
	nombre de sites	localisation		
$\alpha 6$	7	boucles E-F	<i>D.melanogaster</i>	Grauso et coll. 2002
	6	boucle E; cys-loop	<i>A.mellifera</i>	Jones et coll. 2006
	5	N-terminal	<i>B.mori</i>	Shao et coll. 2007
	6	N-terminal	<i>T.castaneum</i>	Jones et coll. 2007; Rinkevich et Scott 2009
	4	boucle E	<i>H.viriscens</i>	Grauso et coll. 2002
	5	N-terminal	<i>M.domestica</i>	Gao et coll. 2007
	5	N-terminal	<i>N.vitripennis</i>	Jones et coll. 2010
$\beta 1$	2	boucle D	<i>D.melanogaster</i>	Hoopengardner et coll. 2003
	1	N-terminal	<i>T.castaneum</i>	Jones et coll. 2007
$\alpha 5$	1	TM3	<i>D.melanogaster</i>	Hoopengardner et coll. 2003
	3	TM4		
$\beta 2$	1	TM2	<i>D.melanogaster</i>	Hoopengardner et coll. 2003
$\alpha 7$	1	TM4	<i>D.melanogaster</i>	Fayyazuddin et coll. 2006

2.2.2) Conséquences fonctionnelles de l'édition.

Le mécanisme d'édition semble toucher particulièrement les transcrits de gènes impliqués dans la signalisation neuronale (Hoopengardner et coll 2003; Sattelle et coll. 2005). Ces observations sont corroborées par l'étude de phénotypes neurologiques d'individus déficients pour l'enzyme ADAR chez *D. melanogaster* (Palladino et coll. 2000), *C. elegans* (Tonkin et coll. 2002) ou encore chez la souris (Higuchi et coll. 2000). Ainsi, des drosophiles dont l'activité ADAR est inhibée par mutation ont une morphologie similaire au phénotype sauvage mais présentent des déficits moteurs et sensoriels importants, tels que des paralysies thermosensibles, une perte de la coordination des mouvements ou des tremblements (Palladino et coll. 2000). L'édition peut en effet avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement des récepteurs dans la mesure où elle concerne des zones fonctionnelles majeures telles que celles impliquées dans le site de liaison des ligands, dans la maturation des récepteurs ou dans les propriétés électrophysiologiques du récepteur canal (tableau III) (Rueter 1999; Jin et coll. 2007). Par exemple, l'édition de la sous-unités D $\alpha 6$

chez *D. melanogaster* et de ses orthologues chez *A. mellifera*, *B. mori*, *T. castaneum*, *M. domestica* et *N. vitripennis* ainsi que l'édition des sous-unités D β 1 et Tcas β 1 chez *D. melanogaster* et *T. castaneum* respectivement, conduit à (i) des modifications de résidus au niveau des boucles du domaine N-terminal et/ou au niveau des domaines transmembranaires influençant la liaison et/ou les propriétés d'ouverture du canal (Grauso et coll. 2002; Corringer et coll. 2000; Guzman et coll. 2003; Tamamizu et coll. 1999) (ii) des pertes ou additions de sites de N-glycosylation (Gao et coll. 2007b; Jones et Sattelle 2010) qui affectent la maturation des récepteurs (Gehle et coll. 1997) ainsi que leur désensibilisation et leur conductance (Chen et coll. 1998; Nishizaki 2003). Un autre phénomène induit par l'édition est la déstabilisation des duplex d'ARN présents dans les régions non transcrites en 5' et 3' (UTRs) qui peut modifier la stabilité, le transport ou la traduction des ARN messagers (Maas et coll. 2001; Morse et coll. 2002).

2.2.3) Lien entre les mécanismes d'édition et d'épissage.

L'édition et l'épissage alternatif jouent un rôle important dans l'augmentation de la diversité des sous-unités et nécessitent tous deux des structures exoniques et introniques conservées, ce qui suppose une corrélation entre ces deux mécanismes (Jin et coll. 2007). Etant donné que l'édition des ARNs a généralement lieu à proximité des liaisons exon/intron, l'influence des mécanismes d'édition sur les événements d'épissage alternatifs pourrait également être un phénomène général (Rueter et coll. 1999). Ainsi, deux grands mécanismes pouvant expliquer la régulation de l'épissage d'exons mutuellement exclusifs par l'édition sont décrits dans la littérature. Le premier mécanisme serait lié à **l'apparition ou la suppression d'un site d'épissage suite à l'édition des ARNs**, ce qui a été décrit dans plusieurs études chez les mammifères (Rueter et coll. 1999; Maas et coll. 2001; Flomen et coll. 2004; Bratt et Ohman 2003; Laurencikienė et coll. 2006). En revanche, chez les insectes, ce mécanisme de régulation de l'épissage alternatif par l'édition n'a été observé que pour le gène codant la sous-unité D α 5 chez *D. melanogaster* où l'édition d'un site de l'exon 8 induit un épissage par saut des exons 9 à 11, conduisant à la production d'une isoforme courte qui n'avait jamais été identifiée précédemment (Agrawal et Stormo 2005). Plus récemment, **un**

second mécanisme de régulation n'impliquant pas un nouveau site d'épissage a été mis en évidence chez *B. mori* (Jin et coll. 2007). Ainsi, chez le papillon *B. mori* on observe trois profils d'épissage alternatif de l'exon 3 de la sous-unité Bm α 6: type I (exon 3a), type II (exon 3b) et type III (exon 3a + exon 3b). L'isoforme III présente 2 sites d'édition dans l'exon4, qui sont absents des isoformes I et II et qui n'ont pas été retrouvés au sein des isoformes de l'exon 4 de la sous-unité α 6 chez *D. melanogaster*, *A. mellifera* et *T. castaneum* (Jin et coll. 2007). Ainsi, la présence de sites d'édition spécifique pourrait conduire à la formation d'isoforme épissée spécifique d'une espèce.

Il faut cependant noter que le phénomène d'édition n'est pas constant au cours du développement. Chez *D. melanogaster*, l'enzyme ADAR est elle-même concernée par l'édition et on observe la présence d'un transcrit édité uniquement chez l'adulte. L'enzyme éditée est plus active *in vivo* et est corrélée à une augmentation de la fréquence des phénomènes d'édition chez l'adulte (Keegan et coll. 2005). Chez *A. mellifera*, l'édition de la sous-unité Amel α 6 augmente au cours du développement permettant une augmentation de la diversité des récepteurs nicotiniques jusqu'au stade adulte (Jones et coll. 2006). De plus, chez *B. mori*, 2 sites d'édition supplémentaires sont présents au niveau de l'exon4 de la sous-unité Bm α 6 chez l'adulte par rapport à l'embryon, ce qui est corrélé à la présence d'une isoforme épissée supplémentaire (l'isoforme de type III) chez l'adulte (Jin et coll. 2007). Il apparait ainsi que les mécanismes d'édition et d'épissage sont étroitement liés et que l'édition pourrait participer, au moins en partie, à la régulation de l'épissage des sous-unités au cours du développement.

Chapitre 3. Etude pharmacologique des récepteurs nicotiniques d'insectes.

1) Identification de différents sous-types pharmacologiques.

1.1) Caractérisation des différents sous-types de nAChRs d'insectes par des approches électrophysiologiques.

Les propriétés pharmacologiques des nAChRs neuronaux natifs des insectes ont été décrites chez plusieurs espèces. De manière générale, on peut définir, comme chez les mammifères, deux types de récepteurs sensibles et insensibles à l' α -Bgt à partir d'études électrophysiologiques (pour revue Thany 2010). La majorité des récepteurs décrits le sont à partir de neurones isolés maintenus en culture, et par conséquent extrasynaptiques (Pour revue Thany et coll., 2007). En effet, les propriétés pharmacologiques de ces récepteurs ont été précédemment décrites sur le motoneurone Df (fast depressor) et les interneurones géants de la blatte *P. americana* (David et Pitman 1993; Buckingham et coll. 1997). Mais leurs caractéristiques ont particulièrement été étudiées sur les corps cellulaires des neurones des corps pédonculés et des lobes antennaires chez l'abeille *A. mellifera* (Deglise et coll. 2002; Barbara et coll. 2008 et 2005; Wüstenberg et Grünwald 2004; Goldberg et coll. 1999. Dupuis et coll. 2011) et des neurones situés dans les ganglions thoraciques (Salgado et Saar 2004) et le ganglion terminal de la blatte *P. americana* (Courjaret et Lapied 2001; Courjaret et coll. 2003; Thany et coll. 2008; Calas-List et coll. 2012).

Ainsi, chez l'abeille *A. mellifera*, des récepteurs nicotiniques sensibles à l' α -Bgt ont été identifiés dans les cellules de Kenyon (KC) des corps pédonculés au stade pupe. En effet, l' α -Bgt bloque 80 % du courant induit par l'ACh de manière irréversible, indiquant qu'une grande partie du courant est liée à l'activation de nAChRs sensibles à l' α -Bgt (Goldberg et coll. 1999). Sur le même type de cellules, différents agonistes et antagonistes ont été utilisés pour caractériser les nAChRs (Wüstenberg et Grünwald 2004). Cette étude démontre que la carbamylcholine (CCh) est un agoniste plein présentant un profil de réponse dépendant de la

dose distinct de celui de l'ACh tandis que la nicotine (NIC) et l'épipatidine (EPI) sont des agonistes partiels. De plus, les antagonistes tels que la dihydro- β -érythroïdine (D β HE), la méthyllycaconitine (MLA) et la mécamylamine (MEC) bloquent complètement les courants induits par l'ACh alors que l'héxaméthronium (HEX) et la d-tubocurarine (dTC) n'inhibent que partiellement ces courants (Wüstenberg et Grünwald 2004). Ces données mettent en évidence la présence de différents sous-types de nAChRs avec des sensibilités différentes pour les agonistes et antagonistes. Récemment, l'activité des antagonistes sur les nAChRs des KC a été étudiée chez l'adulte en utilisant les courants induits par la NIC qui présentent une amplitude plus élevée que ceux induits par l'ACh (Dupuis et coll. 2011). A forte concentration, la D β HE, la MLA et l' α -Bgt bloquent complètement les courants induits par la NIC. Cependant, pour de plus faibles concentrations, l'inhibition des courants est dépendante de la dose et montre que l'action de la D β HE et de la MLA n'est que partiellement réversible tandis que l'action de l' α -Bgt l'est totalement (Dupuis et coll. 2011). Il est intéressant de noter qu'on observe une différence de profil pharmacologique chez l'adulte et chez la pupe. En effet, la NIC, qui est un agoniste partiel chez la pupe (Wüstenberg et Grünwald 2004), est un agoniste plein chez l'adulte (Dupuis et coll. 2011) et les antagonistes D β HE et MLA sont plus efficaces ($5 \cdot 10^6$ fois et $2 \cdot 10^3$ fois respectivement) sur les nAChRs des KC au stade pupe que chez l'adulte (Dupuis et coll. 2011). Les nAChRs des KC présentent également une perméabilité au calcium différente (Goldberg et coll. 1999; Dupuis et coll. 2011). Par ailleurs, l'étude des lobes antennaires (LA) chez l'abeille adulte a montré que 90 % des neurones sont sensibles à l'ACh et que 10 % présentent une faible affinité pour l'ACh (Barbara et coll. 2008). La NIC est un agoniste partiel au niveau des LA (Barbara et coll. 2008) contrairement à ce qui a été montré pour les KC des corps pédonculés (Dupuis et coll. 2011). Au niveau des LA, les courants induits par l'ACh sont totalement bloqués par les antagonistes (D β HE, MLA et α -Bgt) dont l'action est réversible (Barbara et coll. 2008). Cependant, même si les récepteurs sont sensible aux mêmes antagonistes, MLA et DHE sont 34 et 71 fois plus efficaces sur les nAChRs des LA que sur les nAChRs des KC contrairement à l' α -Bgt qui est 3 fois moins efficace sur les récepteurs des LA. Ces données suggèrent la présence de différents sous-types de nAChRs avec des propriétés distinctes en fonction des tissus et des stades de développement.

Chez la blatte *P. americana*, deux types de récepteurs sensible et insensible à l' α -Bgt ont été identifiés sur les corps cellulaires des neurones DUM. Les récepteurs insensibles à l' α -Bgt sont caractérisés par la présence de deux types de récepteurs nommés nAChR1 et nAChR2 pour lesquels la composition en sous-unités n'est pas connue. Mais ils présentent des propriétés pharmacologiques et des mécanismes de régulation différents. nAChR1 est bloqué par la d-TC alors que nAChR2 est bloqué par la MEC (Courjaret et Lapied 2001). En outre, la sensibilité de nAChR1 vis-à-vis des ligands est modulée par la protéine kinase A (PKA) et deux protéines kinases C (PKC) différentes qui ne semblent pas affectées l'activité de nAChR2 (Courjaret et coll. 2003). Cependant, il semble que lorsque nAChR1 est bloqué par la d-TC, l'activité de nAChR2 est modulée par des variations de calcium intracellulaire (Thany et coll. 2008). Des données récentes ont permis de montrer que les récepteurs situés sur les DUM neurones avaient une pharmacologie beaucoup plus complexe. En effet, l'application de nornicotine induit deux types de courants, nommés type 1 et type 2, les courants de type 1 sont diminués en présence de d-TC et de MEC (Calas-List et coll. 2012). Le courant de type 1 est rapidement désensibilisé par l' α -Bgt tandis que le courant de type 2 est complètement bloqué par l' α -Bgt. Ainsi, les courants de type 1 seraient liés à l'activation de nAChRs sensibles et insensibles à l' α -Bgt tandis que les courants de type 2 seraient dus uniquement à des nAChRs sensibles à l' α -Bgt (Calas-List et coll. 2012). Ces données confortent l'hypothèse de l'existence de différents sous-types de nAChRs ayant des propriétés pharmacologiques différentes.

1.2) Identification de sous-types de récepteurs par des tests de liaison par affinité.

Les travaux menés sur des neurones isolés mis en culture ont permis de montrer l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs natifs chez les insectes. Cependant, la détermination du nombre de sites de liaison potentiels avec les différents ligands a été apportée par les études de liaison par affinité utilisant des ligands radiomarqués (Kenn et MacDermot 1993; Frey et Albin 2001). Une rapide revue de la littérature montre qu'il y a peu de travaux concernant la liaison de l' α -Bgt radiomarqué sur des nAChRs natifs chez les insectes (tableau IV). Les tests de saturation ont permis de mettre en évidence la présence

de différents sites de liaison pour cette toxine chez plusieurs espèces. Ainsi, la présence d'un seul site de liaison pour l' α -Bgt a été observée chez *M. sexta* (Eastham et coll. 1998), *A. mellifera* (Tomizawa et coll. 1995) et *L. migratoria* (Wiesner et Kayser 2000) tandis que des sites de haute et de basse affinité pour l' α -Bgt ont été identifiés chez *M. persicae* (Lind et coll. 1999). Les données disponibles concernant les sites de liaison de cette toxine chez *D. melanogaster* sont contradictoires. En effet, les premières études montrent la présence de deux sites de liaison (Schloss et coll. 1988) alors que des données plus récentes indiquent la présence d'un seul site de liaison (Zhang et coll. 2004). De plus, la comparaison des valeurs de Bmax, reflétant la quantité de sites de liaison dans la préparation testée, met en évidence une différence du nombre de sites de liaison pour l' α -Bgt. Le nombre de sites est plus faible au stade embryonnaire ou larvaire par rapport à l'adulte chez *M. sexta* (Eastham et coll. 1998) et *D. melanogaster* (Schloss et coll. 1988) respectivement.

Par ailleurs, chez *D. melanogaster*, les nAChRs natifs présentent un nombre important de sites de liaison pour l'EPI (950 ± 30 fmol/mg protéines) (Tomizawa et coll. 2005) comparable à la quantité de sites sensible à l' α -Bgt (1400 fmol/mg protéines) chez cette même espèce (Zhang et coll. 2004). Afin de déterminer si ces deux ligands se fixent sur des sites/sous-types de récepteurs différents ou sur des domaines/sites étroitement liés, l'EPI ($[^3\text{H}]\text{-EPI}$) et l' α -Bgt ($[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$) ont été utilisés simultanément lors de tests de liaison (Zhang et coll. 2004; Tomizawa et coll. 2005). La radioactivité mesurée avec la combinaison de $[^3\text{H}]\text{-EPI}$ et l' $[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$ est inférieure à la somme des radioactivités obtenues pour chaque ligand radiomarqué utilisé seul, démontrant une compétition des deux ligands. Il apparaît donc que l' α -Bgt et l'EPI reconnaissent les mêmes sites de liaison ou des sites couplés chez la drosophile (Tomizawa et coll. 2005). L'ensemble de ces études confirment les données électrophysiologiques sur la présence de différents sous-types de nAChRs chez les insectes.

Tableau IV. Récapitulatif non exhaustif des sites de liaison de l' α -bungarotoxine (α -Bgt) identifiés par des tests de saturation pour différentes espèces d'insectes. Le K_d , constante de dissociation, reflète l'affinité des récepteurs pour l' α -Bgt marqué et le B_{max} , liaison maximale, reflète la densité des sites de liaison dans la préparation. Le coefficient de Hill ainsi que la nature des préparations biologiques sont également indiqués.

Espèces	Ordre	Matériel Biologique	Site de haute affinité		Site de basse affinité		coefficient de Hill		référence
			Kd1 (nM)	Bmax1 (fmol/mg)	Kd2 (nM)	Bmax2 (fmol/mg)	nH		
<i>Myzus persicae</i>	Hemiptera	mélange de générations	1.2 ±0.2	167 ±6	33.7 ±1.5	640 ±180	0.71 ±0.03		Lind et coll. 1999
<i>Manduca sexta</i>	Lepidoptera	cerveau d'adultes			6.5	815			Eastham et coll. 1998
		premier stade larvaire			7.6 ±0.2	119 ±19			
<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	têtes			7.45 ±0.89	451 ±21.9			Tomizawa et coll. 1995
<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera	embryons	0.4 ±0.26	5 ±3.9	7.4 ±4.4	68 ±18			Schloss et coll. 1988
		têtes	0.15 ±0.07	240 ±93	4.3 ±1.7	1080 ±97			
		têtes			2.7 ±0.3	1400 ±100	0.98 ±0.01		Zhang et coll. 2004
<i>Locusta migratoria</i>	Hemiptera	chaines nerveuses de mâles et femelles	1.0 ±0.2	910 ±100					Wiesner et Kayser 2000

2) Influence de la nature des sous-unités sur les propriétés pharmacologiques des récepteurs.

La microinjection d'ARN codant pour différentes sous-unités dans les ovocytes de xénope permet l'expression de nAChRs à la membrane des ovocytes et l'étude de leurs propriétés électrophysiologiques. L'expression de récepteurs dans ce système d'expression hétérologue est utilisée pour étudier les nAChRs d'insectes depuis presque trente ans (Breer et Benke 1986). Cependant, peu de sous-unités d'insectes ont permis l'expression de nAChRs recombinants fonctionnels dans les ovocytes de xénope. Les seules données disponibles à ce jour concernent l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ de *S. gregaria* qui est capable de former un récepteur homomérique dont les courants sont bloqués par l' α -Bgt (Marshall et coll. 1990; Amar et coll. 1995). L'expression de nAChRs homomériques $D\alpha 2$, $Mp\alpha 1$ et $Mp\alpha 2$ chez la drosophile et le puceron du pêcher a été rapportée dans la littérature (Sawruk et Schloss 1990a; Sgard et coll. 1998). Toutefois, ces récepteurs ne répondaient qu'à de très fortes concentrations en agonistes et des tentatives ultérieures d'expressions similaires ont échoué (Bertrand et coll. 1994; Huang et coll. 1999). Les difficultés rencontrées pour exprimer des récepteurs fonctionnels contenant uniquement des sous-unités d'insectes ont imposé l'étude de nAChRs hybrides, co-exprimant des sous-unités α d'insectes avec des sous-unités β de Vertébrés (Millar 2009). Les résultats les plus pertinents ont été obtenus chez le puceron *M. persicae* (Huang et coll. 1999 et 2000) et la drosophile *D. melanogaster* (Bertrand et coll. 1994; Schulz et coll. 1998; Lansdell et Millar 2000a et b; Ihara et coll. 2003).

Ainsi, chez *D. melanogaster*, les sous-unités $D\alpha 1$ et $D\alpha 3$ forment des récepteurs sensibles à l' α -Bgt tandis que la sous-unité $D\alpha 2$ forme des récepteurs insensibles à l' α -Bgt, lors de leur co-expression avec une sous-unité $\beta 2$ de Vertébrés (Lansdell et Millar 2000b; Bertrand et coll. 1994). La coexpression des sous-unités $D\alpha 1$, $D\alpha 2$, $D\alpha 3$ ou $D\alpha 4$ avec la sous-unité $\beta 2$ de rat permet la formation de nAChRs sensibles à l'EPI (Lansdell et Millar 2000 a et b). Comme chez *D. melanogaster*, la participation des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ à la formation de récepteurs respectivement sensibles et insensibles à l' α -Bgt, a été observé chez la puce *C. felis* (Dederer et coll. 2011) et la mouche *L. cuprina* (Dederer et coll. 2013). Chez *M. persicae*, la co-expression avec la sous-unité $\beta 2$ de rat des sous-unités $Mp\alpha 1$, $Mp\alpha 2$ ou $Mp\alpha 3$ forment des

nAChRs sensibles à l'EPI (Huang et coll. 1999). Par contre, la sous-unité Mp α 4 participe à la formation de récepteurs insensibles à l'EPI chez ce puceron (Huang et coll. 1999).

Une étude récente, réalisée avec des sous-unités de drosophile, montre une expression de nAChRs fonctionnels homomériques D α 5 et D α 7 et hétéromériques D α 5/D α 6/D α 7 en présence de la protéine accessoire de nématode Ce-RIC3 (resistance to inhibitors of cholinesterase 3) (Lansdell et coll. 2012). De plus, l'ensemble de ces récepteurs apparaissent sensible à l' α -Bgt (Lansdell et coll. 2012), ce qui est en accord avec une étude précédente qui a mis en évidence l'implication de la sous-unité D α 5 dans la formation de site de liaison pour cette toxine (Wu et coll. 2005). Cette étude montre qu'il est possible d'exprimer des récepteurs fonctionnels composés uniquement de sous-unités d'insectes et d'étudier leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Ainsi, le défaut d'expression de récepteurs d'insectes fonctionnels dans des systèmes hétérologues serait lié à l'absence de protéines accessoires telles que RIC3.

Cependant, des études antérieures avaient déjà permis d'appréhender la composition des nAChRs d'insectes. Ainsi, chez *D. melanogaster*, l'association de tests de co-immunoprécipitation et de chromatographie d'affinité pour l' α -Bgt a démontré la présence de trois assemblages potentiels de sous-unités qui constitueraient des nAChRs sensibles à l' α -Bgt (Schulz et coll. 2000; Chamaon et coll. 2000; Chamaon et coll. 2002). Le premier contiendrait les sous-unités D β 1 et D α 3, le second les sous-unités D β 2 et D β 1 et le troisième associerait au minimum les sous-unités D α 1, D α 2 et D β 2 (Schulz et coll. 2000 ; Chamaon et coll. 2000; Chamaon et coll. 2002). De plus, des expériences de co-expression avec la sous-unité divergente D β 3 ont montré que cette sous-unité, bien qu'incapable de former des nAChRs fonctionnels en absence de sous-unité β de Vertébrés, peut se co-assembler avec d'autre sous-unités α et β de la drosophile. Ainsi, l'assemblage de la sous-unité D β 3 avec la sous-unité D α 4 ou D β 2 participerait à la formation de nAChRs insensibles à l' α -Bgt (Lansdell et Millar 2002). Chez *M. persicae*, les tests de co-immunoprécipitation montrent que la sous-unité Mp β 1 est capable de s'associer avec les sous-unités Mp α 1 et Mp α 2 mais pas avec Mp α 3 ni Mp α 4 (Huang et coll. 2000). La même approche a mis en évidence le co-assemblage des sous-unités Nl α 3 et Nl α 8 chez *N. lugens* (Yixi et coll. 2009), ce qui est en accord avec la

présence de ces deux sous-unités dans un récepteur sensible à l'EPI lors de leur co-expression avec une sous-unité $\beta 2$ de rat (Liu et coll. 2009).

Par ailleurs, les études récentes combinant les techniques de patch-clamp et de RT-PCR sur cellule unique ont permis de mettre en évidence chez l'abeille l'existence de récepteurs fonctionnels avec des compositions en sous-unités différentes. Ainsi, les sous-unités Amel $\alpha 2$, Amel $\alpha 8$ et Amel $\beta 1$ seraient impliquées dans la formation de nAChRs dans les cellules de Kenyon des corps pédonculés tandis que les sous-unités Amel $\alpha 2$, Amel $\alpha 8$, Amel $\beta 1$ et Amel $\alpha 7$ seraient présentes dans les nAChRs des lobes antennaires (Dupuis et coll. 2011). L'ensemble de ces résultats montrent que, contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, les insectes semblent présenter des récepteurs neuronaux hétéromériques à la fois sensibles et insensibles à l' α -Bgt (figure 10).

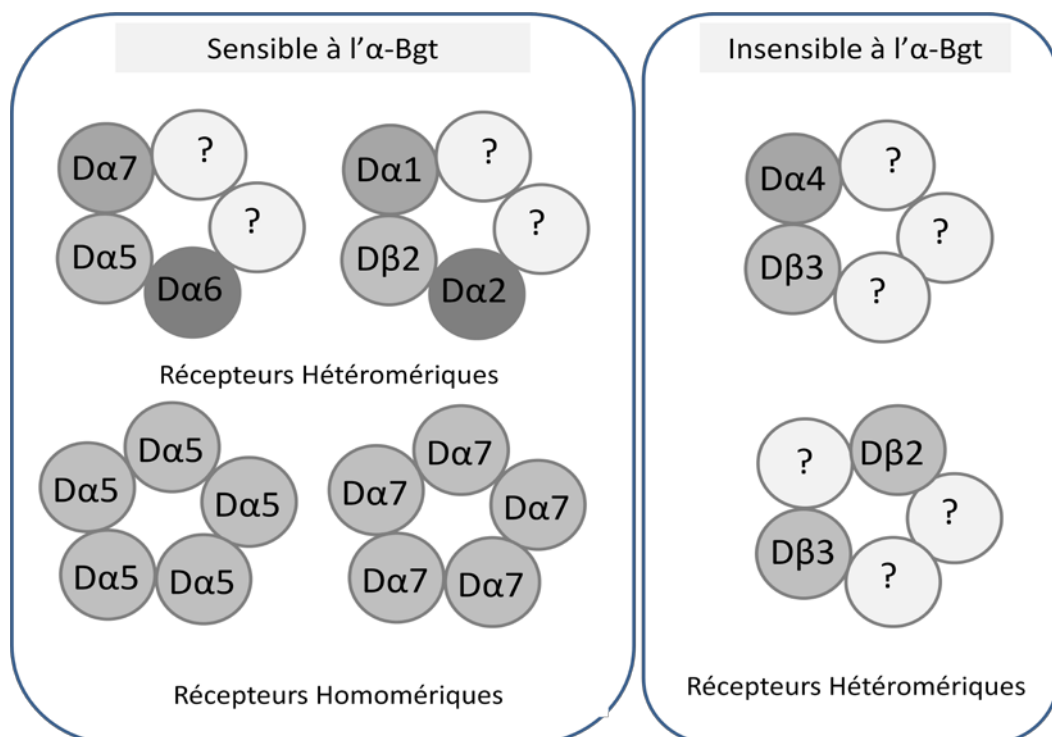


Figure 10. Sous-types de récepteurs nicotiniques chez la drosophile (Modifié d'après Millar et Lansdell 2010; Lansdell et coll. 2012).

Chapitre 4. Mode d'action des insecticides néonicotinoïdes sur les récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes.

1) Historique

La nicotine extraite du tabac fut utilisée pendant des siècles contre les insectes ravageurs de culture de type piqueur-suceur (Yamamoto 1965), bien que cet alcaloïde soit toxique pour les mammifères et peu efficace (Leonard et Julius 2000). La connaissance de la structure chimique de la nicotine a conduit à la recherche de nouvelles molécules plus efficaces et a abouti à la découverte et la synthèse des insecticides néonicotinoïdes, développés à partir des années 1970. Le premier néonicotinoïde synthétisé fut la nithiazine qui correspond à un nitrométhylène avec un noyau thiazine. Ce nitrométhylène, bien que plus efficace que la nicotine, n'a pas pu être utilisé à grande échelle du fait de son instabilité à la lumière (Soloway 1976; Nauen et coll. 2001a). Cependant, la structure de la nithiazine a servi de base pour le développement de nouveaux composés. En effet, le remplacement du groupement nitrométhylène par un groupement 6-chloro-3-pyridylméthyle a permis d'augmenter l'efficacité des molécules et de les rendre stables à la lumière (Yamamoto et coll. 1998; Kagabu 1997). Une première série d'insecticides chloropyridines a été développée, suivie peu de temps après par le groupe des nitroguanidines (Matsuda et coll. 2001; Tomizawa et Casida 2009). Actuellement, les néonicotinoïdes comprennent huit molécules qui correspondent à quatre générations de composés chimiques (figure 11):

- ❖ L'**imidaclopride** (IMI), chef de file des néonicotinoïdes, commercialisé en 1991 par BayerCropScience (Diehr et coll. 1991). Cette molécule active est présente dans de nombreuses formulations dont le Confidor® et le Gaucho® et reste aujourd'hui l'insecticide le plus vendu au monde (Jeschke et coll. 2011).
- ❖ L'**acétamipride** (ACE) (Yamada et coll. 1999), le **nitentpyrame** (NIT) (Akayama et Minamida et coll. 1999) et le **thiaclopride** (THI) (Jeschke et coll. 2001) constituent la deuxième génération de néonicotinoïdes.

Ces insecticides de première et deuxième génération sont des chlorpyridines qui possèdent un hétérocycle aromatique chloropyridinylméthyle associé soit à un groupement N-

nitroimine (IMI), soit à un groupement N-cyanoimine (cyclique pour le THI ou acyclique pour l'ACE), soit à un groupement 2-nitrométhylène (NIT).

- ❖ Le **thiamethoxame** (TMX) (Maienfisch et coll. 2001), la **clothianidine** (CLT) (Jeschke et Uneme 2003) et le **dinotefurane** (DTF) (Wakita et coll. 2003) constituent la troisième génération de composés. Le TMX et la CLT forment les chlorothiazoles, caractérisés par la présence d'un hétérocycle aromatique chlorothiazolylmethyl couplé à un groupement N-nitroimine cyclique (TMX) ou acyclique (CLT). Le DTF possède un groupement tétrahydrofurane caractéristique qui remplace le cycle de type pyridine présent chez les autres insecticides néonicotinoïdes.

- ❖ Le **sulfoxaflor** (SFX) est le premier insecticide de la classe des sulfoximines. Cet insecticide agissant sur les nAChRs fut tout d'abord considéré comme n'appartenant pas à la famille des néonicotinoïdes. En effet, aucune résistance croisée avec des néonicotinoïde, notamment l'IMI, n'avait été observée en lien avec une insensibilité du SFX au métabolisme oxydatif. De plus, le SFX présentait une structure unique par rapport aux néonicotinoïdes (Zhu et coll. 2011). Cependant, une étude récente montre que le SFX présente un profil similaire à l'IMI lors de tests de liaison par affinité chez *M. persicae* et que la mutation R81T responsable de la résistance aux néonicotinoïdes chez ce puceron affecte également la liaison du SFX (Cutler et coll. 2013). Le SFX serait donc bien un néonicotinoïde (Cutler et coll. 2013) et constituerait la quatrième génération de composés.

Les néonicotinoïdes sont homologués dans plus de 120 pays et sont parmi les insecticides les plus efficaces pour le contrôle des ravageurs de type piqueur-suceur tels que les pucerons. Au niveau du marché mondial, l'utilisation des néonicotinoïdes est en forte progression depuis 1997 tandis que celle des organophosphorés, méthylcarbamates et pyréthrinoides est en nette diminution (figure 12) (Elbert et coll. 2008; Casida et Durkin 2013). L'utilisation des insecticides néonicotinoïdes devrait continuer à augmenter au niveau mondial dans les années à venir. En effet, de nombreux brevets sur des molécules de cette famille d'insecticides sont expirés ou arrivent prochainement à expiration, (tableau V) et des versions génériques des insecticides néonicotinoïdes sont d'ores et déjà fabriquées et commercialisées sur de nombreux marchés comme l'Inde ou la Chine (Jeschke et coll. 2011). Le succès des néonicotinoïdes est principalement lié à leur sélectivité. En effet, les

néonicotinoïdes ont été conçus afin d'être plus toxiques pour les insectes que pour les mammifères, principalement du fait de plus nombreuses interactions avec les sites de liaison des nAChRs d'insectes qu'avec ceux de mammifères (Tomizawa et Casida 2005; Tomizawa et Casida, 2009). Les néonicotinoïdes ne sont pas protonés en conditions physiologiques et ont un pharmacophore électronégatif. Au contraire les nicotinoïdes, qui partagent des structures chimiques proches avec les néonicotinoïdes, ont des atomes d'azote basiques protonés à pH physiologiques et sont sélectifs des récepteurs de Vertébrés probablement *via* des liaisons cations- π (Tomizawa et coll. 1995; Tomizawa et Casida 2005). Par conséquent, l'IMI et la CLT sont respectivement 1300 et 36000 fois plus toxique pour le puceron *M. persicae* que pour le rat après une intoxication orale (Jeschke et coll. 2013).

Néanmoins, depuis quelques années, les insecticides néonicotinoïdes sont au centre d'une polémique importante et sont incriminés dans le syndrome de disparition des abeilles. Ainsi, les études démontrant les effets délétères des néonicotinoïdes sur les abeilles se multiplient (pour revue Blacquière et coll. 2012). Pour exemple, le TMX serait responsable d'une diminution du retour à la ruche chez *A. mellifera* (Henry et coll. 2012) et une exposition à l'IMI entrainerait une diminution de la croissance des colonies et de la production de nouvelles reines chez *B. terrestris* (Whitehorn et coll. 2012).

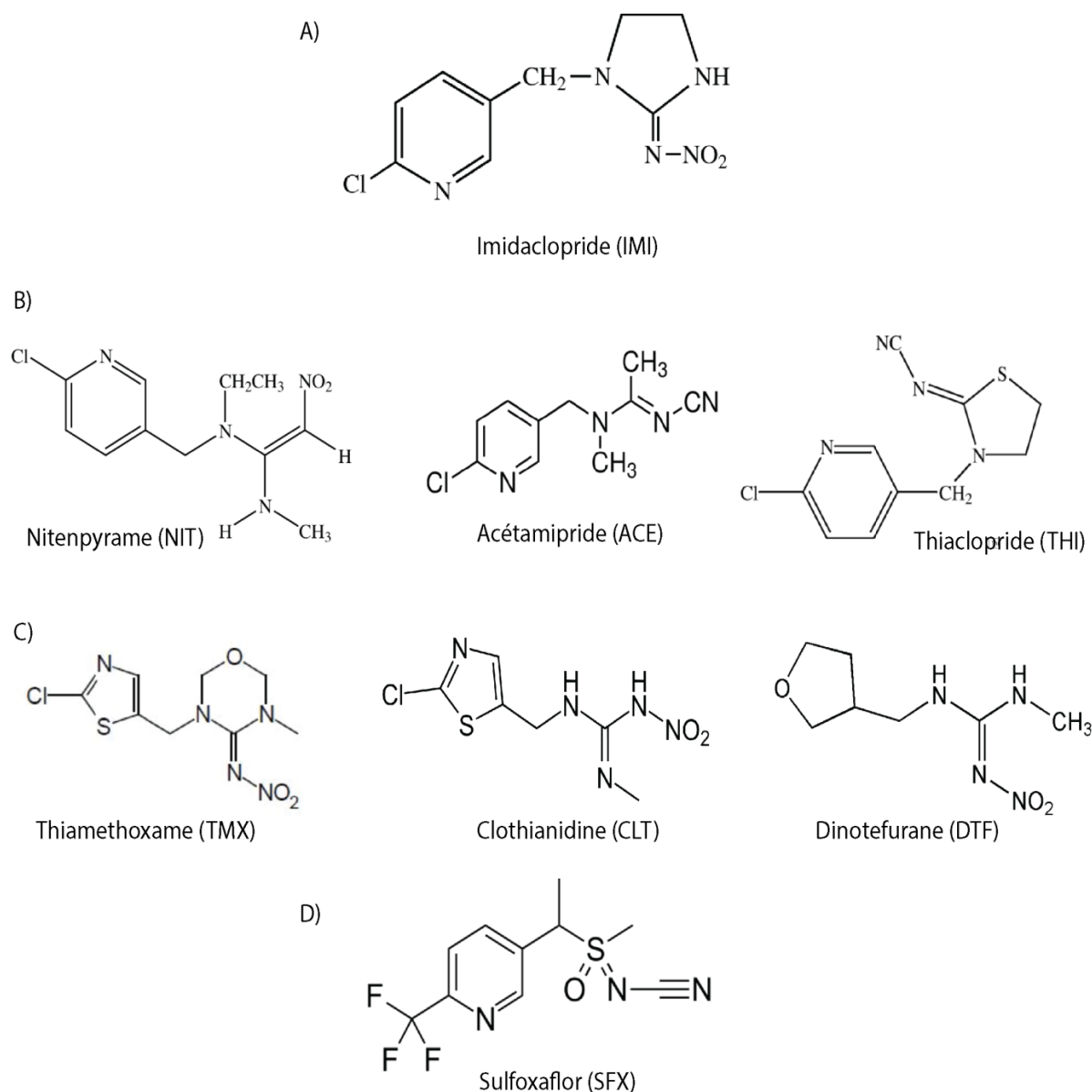


Figure 11. Structure chimique des huit insecticides néonicotinoïdes commercialisés. L'imidaclopride (IMI) est un insecticide de première génération (A); le nitenpyrame (NIT), l'acétamipride (ACE) et le thiaclopride (THI) représentent la seconde génération (B) tandis que le thiamethoxame (TMX), la clothianidine (CLT) et le dinotefurane (DTF) constituent la troisième génération de composés (C). Le sulfoxaflor (SFX) est un insecticide de quatrième génération (D).

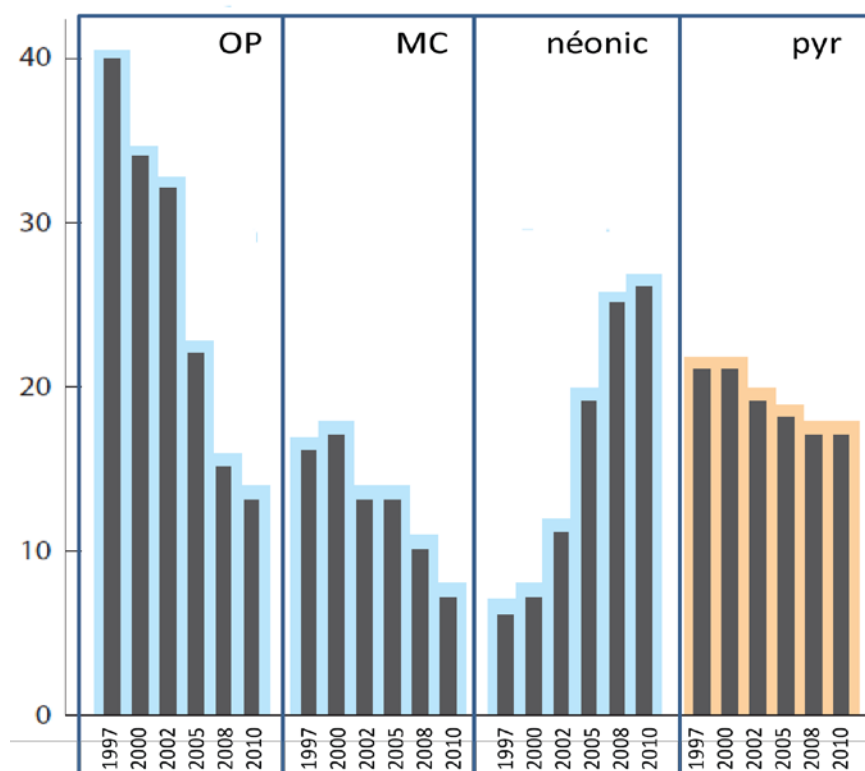


Figure 12. Evolution de l'utilisation des différentes classes d'insecticides entre 1997 et 2010. On observe une diminution de l'utilisation des organophosphorés (OP), des méthylcarbammates (MC) et des pyréthrinoides (pyr) tandis que les néonicotinoïdes (neonic) et les autres composés sont de plus en plus présents sur le marché (Modifié d'après Casida et Durkin 2013).

Tableau V. Protection par brevet des insecticides néonicotinoïdes (Modifié d'après Jeschke et coll. 2011)

Insecticide neonicotinoïde	Protection par brevet	
	début	expiration
imidacloprid	1985	2005
nitenpyram	1986	2006
thiacloprid	1987	2007
acetamiprid	1988	2008
clothianidin	1989	2009
thiamethoxam	1992	2012
dinotefuran	1993	2013

2) Toxicité des néonicotinoïdes *in vivo*.

Les néonicotinoïdes sont particulièrement efficaces dans la lutte contre les insectes piqueurs suceurs tels que les pucerons. Pour exemple, l'IMI est 40 fois plus efficace chez *M. persicae* que chez le doryphore *L. decemlineata* et 200 fois plus que chez le papillon *P. xylostella* (Tomizawa et Casida 2005). Cependant, la toxicité des néonicotinoïdes varie en fonction de la molécule et/ou de l'espèce considérée. L'évaluation de la toxicité des insecticides *in vivo* est réalisée selon différents modes d'intoxication, ce qui rend difficile la comparaison des valeurs de concentration létales obtenues. On peut cependant comparer l'ordre de toxicité de différents insecticides par ingestion ou par contact. A titre d'exemple, nous avons comparé les données disponibles dans la littérature sur la toxicité de trois néonicotinoïdes (IMI, TMX, CLT) pour différentes espèces d'insectes. Ainsi, des tests de toxicité en ingestion directe ou par contact montrent que la CLT est plus toxique que le TMX pour l'abeille *A. mellifera* (Laurino et coll. 2011). Chez le puceron *A. gossypii*, l'IMI est plus toxique que le TMX et la CLT (CL₅₀ de 0,32 1,60 et 1,82 µg/ml à 48h respectivement) alors que c'est la CLT qui est plus toxique que le TMX et l'IMI chez le puceron *M. persicae* (CL₅₀ de 0,034 0,068 et 0,090 ng/puceron à 72h respectivement) (Shi et coll. 2011; Foster et coll. 2008). Ainsi, l'ordre de toxicité des néonicotinoïdes varie fortement même entre des espèces proches comme *A. gossypii* et *M. persicae*.

En outre, chez les insectes deux types de réponses physiologiques aux néonicotinoïdes, nommées type A et B, ont été caractérisées (Tan et coll. 2007):

- ❖ Dans la réponse de type A, l'intoxication provoque dans un premier temps de forts symptômes excitatoires (mouvements non coordonnés, hyperexcitabilité et mouvements spontanés rapides, tremblements des pattes...), suivis d'une prostration avec de faibles mouvements non coordonnés et éventuellement la mort de l'insecte. A de faibles doses d'insecticides, cette succession de symptômes (effet « knock-down ») est réversible et l'insecte retrouve sa mobilité.
- ❖ Dans la réponse de type B, on n'observe quasiment pas de symptômes excitatoires. Les insectes deviennent lentement immobiles jusqu'à être paralysés. Ils peuvent éventuellement mourir sans présenter d'effet « knock-down ».

3) Pharmacologie des insecticides néonicotinoïdes.

3.1) Effet des néonicotinoïdes sur les nAChRs synaptiques et extrasynaptiques.

La toxicité des insecticides néonicotinoïdes est liée à leur fixation sur les nAChRs. En effet, tout comme la nicotine dont ils dérivent, les néonicotinoïdes agissent comme des agonistes des nAChRs. Leur fixation sur le récepteur entraîne l'ouverture du canal et la genèse d'un courant entrant, dont l'amplitude varie selon les molécules insecticides considérées.

Ainsi, des données obtenues chez l'abeille *A. mellifera* (Deglise et coll. 2002), la drosophile *D. melanogaster* (Brown et coll. 2006) et la blatte *P. americana* (Courjaret et Lapied. 2001; Tan et coll. 2007) montrent que l'IMI est un agoniste partiel des nAChRs, car sa liaison aux nAChRs induit un courant d'amplitude plus faible que celui obtenu en présence d'ACh (figure 13). D'autre part, la P-CH-CLT est un super-agoniste des nAChRs chez *D. melanogaster* (Brown et coll. 2006). De plus, l'étude des neurones du ganglion thoracique de la blatte *P. americana* montre que, tout comme l'IMI, le THI agit comme un agoniste partiel tandis que l'ACE, le DTF, la CLT et le NIT sont des agonistes pleins (Tan et coll. 2007). Curieusement, le TMX n'induit aucun courant et ne semble pas interagir avec les récepteurs exprimés sur les neurones présents dans les ganglions thoraciques (Tan et coll. 2007) et le dernier ganglion abdominal (Benzidane et coll. 2010). Cette absence d'effet sur des neurones isolés a conduit à l'hypothèse selon laquelle le TMX était une prodrogue qui est métabolisée en CLT par des cytochromes P450 dans l'insecte (Nauen et coll. 2003; Benzidane et coll. 2010).

Cependant, une analyse plus approfondie des données pharmacologiques obtenues avec le TMX et la CLT montre que le TMX est capable d'agir comme un agoniste des récepteurs nicotiniques situés au niveau synaptique. L'application de TMX induit une dépolarisation membranaire du sixième ganglion abdominal qui est bloquée par des antagonistes nicotiniques comme la MEC et la MLA. Le TMX serait ainsi un agoniste des récepteurs nicotiniques synaptiques et n'aurait aucun effet sur les récepteurs situés au niveau postsynaptique sur les corps cellulaires des neurones (Thany 2011). Ces résultats confortent les hypothèses suggérées dans des études précédentes qui montraient que le TMX était capable d'avoir une toxicité. Plusieurs études avaient avancé l'hypothèse selon laquelle, le TMX était également un agoniste des nAChRs en fonction du type cellulaire et de l'espèce

considérés (Wellman et coll., 2004; Wiesner et Kayser, 2000). Ce type de données contradictoires a été également observé avec la CLT qui se comporte comme un agoniste partiel au niveau des neurones présents dans les ganglions abdominaux de la blatte (Ihara et coll. 2006) et un super-agoniste au niveau des DUM neurones (Thany 2009).

De plus, au niveau des neurones des lobes antennaires de l'abeille, l'IMI agit soit comme agoniste partiel soit comme agoniste plein, suggérant ainsi une interaction de l'insecticide avec différents sous-types de récepteurs présents dans une même structure (Nauen et coll. 2001a). Ceci est en accord avec l'identification de différentes populations de nAChRs pouvant lier les insecticides. En effet, au niveau des DUM neurones de la blatte *P. americana*, les courants induits par la CLT ne sont que partiellement inhibés par l' α -Bgt alors que l'inhibition est totale en présence de d-tubocurarine (Thany 2009). Ainsi, la CLT agirait au moins sur deux sous-types de nAChRs différents: sensible et insensible à l' α -Bgt, ces derniers incluant les nAChR1 et nAChR2 (Thany 2009).

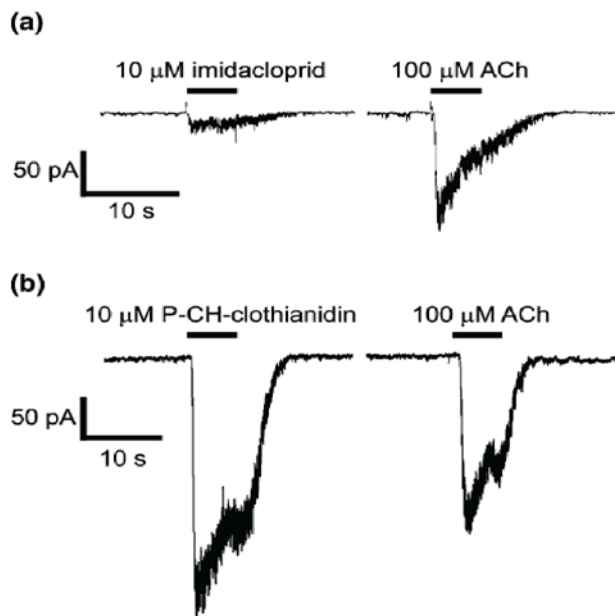


Figure 13. Effet agoniste de deux néonicotinoïdes chez la drosophile.

Les courants induits par l'imidaclopride (a) et la P-CH-clothianidine (b) sont enregistrés par patch-clamp sur des neurones en culture de larves de drosophile. Les courants sont comparés à ceux induits par l'acétylcholine (ACh) illustrant l'action d'agoniste partiel de l'imidaclopride et de super-agoniste de la P-CH-clothianidine (D'après Brown et coll. 2006).

3.2) Sites de liaison des insecticides néonicotinoïdes sur les nAChRs.

La caractérisation pharmacologique des nAChRs d'insectes a mis en évidence la présence de différents sites de liaison sensibles ou non à l' α -Bgt et l'EPI (voir chapitre 3). Afin de déterminer si ces sites de liaison sont également la cible des insecticides, des tests de liaison en compétition entre l'IMI et ces antagonistes ont été réalisés chez différentes espèces d'insectes. Ainsi, des tests de liaison menés sur des nAChRs natifs de *D. melanogaster* montrent que la capacité de liaison de l' $[^3\text{H}]$ -IMI n'est pas perturbée par l'utilisation simultanée d' $[^3\text{H}]$ -EPI ou d' $[^3\text{H}]$ - α -Bgt. En effet, on observe un effet purement additif de l'utilisation combinée des différents radioligands lors des mesures de radioactivité. L'IMI se lierait donc à des sites distincts de ceux sensibles à la fois à l'EPI et à l' α -Bgt (Tomizawa et coll. 2005). Ceci est en accord avec la faible compétition de l'IMI pour les sites marqués par l' α -Bgt chez *D. melanogaster* (Zhang et coll. 2004) et l'absence de compétition entre l' α -Bgt et l' $[^3\text{H}]$ -IMI chez *M. persicae* et *A. craccivora* (Wiesner et Kayser 2000). Au contraire, chez la blatte *P. americana*, l'IMI se lie à la fois aux nAChRs sensibles et insensibles à l' α -Bgt (Buckingham et coll. 1997) et à des récepteurs sensibles à l' $[^3\text{H}]$ -EPI (Orr et coll. 1997). Ces différents sites de liaison corroborent les observations *in vitro* sur les DUM neurones qui montrent l'existence de deux sous-types de récepteurs sensibles à l' α -Bgt présentant différentes affinités pour l'IMI (Courjaret et Lapied 2001). Par conséquent, l'IMI aurait différents profils de liaison en fonction de l'espèce considérée. Peu de données sont disponibles concernant la liaison des autres néonicotinoïdes sur ces sites. Ainsi une étude menée chez *P. americana*, montre que l'ACE, le DTF, la CLT et le TMX présentent une forte affinité pour les sites sensibles à l' $[^3\text{H}]$ -EPI et l' $[^3\text{H}]$ - α -Bgt tandis que le NIT présente une bonne affinité uniquement pour les sites sensibles à l'EPI (Orr et coll. 1997; Mori et coll. 2001). Les insecticides semblent donc se lier à différents sous-types pharmacologiques de nAChRs en fonction de la molécule considérée.

Il y a peu d'étude de liaison réalisée avec des insecticides radiomarqués autres que l'IMI et la caractérisation de la liaison des néonicotinoïdes se fait en compétition avec l' $[^3\text{H}]$ -IMI. Bien que plusieurs études suggèrent que les néonicotinoïdes se fixent sur différentes populations de récepteurs natifs situés au niveau synaptique et extrasynaptique, le nombre et les caractéristiques des sites de liaison de l'IMI ainsi déterminés varient selon les espèces

d'insectes (Tableau VI). Ainsi, plusieurs études indiquent la présence d'un seul site de liaison pour l'IMI chez *D. melanogaster* (Zhang et coll. 2004) et *M. domestica* (Zhang et coll. 2000) tandis que *N. lugens* et *L. migratoria* possèdent des sites de haute et de basse affinité pour l'IMI (Li et coll. 2010; Wiesner et Kayser 2000). Ces données suggèrent une différence entre les Diptères, possédant un seul site de liaison et les Hémiptères qui possèdent deux types de sites de liaison pour l'IMI, à l'exception de l'aleurode *B. argentifolli* qui ne présente qu'un site de haute affinité (Chao et coll. 1997), et que les sites de liaison de haute et/ou basse affinité pourraient correspondre à plusieurs sous-types de nAChRs. La grande majorité des études est encore aujourd'hui centrée sur l'étude de la liaison des néonicotinoïdes sur les sites marqués par l' $[^3\text{H}]$ -IMI (tableau VII). Ainsi, chez l'abeille, le NIT et l'ACE présente une capacité d'inhibition similaire à celle observée avec l'IMI pour les sites sensibles à l'IMI (Nauen et coll. 2001 a). De plus, le THI présente une affinité légèrement supérieure à celle de l'IMI pour les sites sensibles à l'IMI chez *A. mellifera*, *A. craccivora*, *M. persicae* et *M. domestica* contrairement à ce qui est observé chez *L. migratoria* (Nauen et coll. 2001 a; Wiesner et Kayser 2000; Liu et coll. 1995). Chez les pucerons *M. persicae* et *A. craccivora*, le mode d'inhibition de la liaison de l' $[^3\text{H}]$ -IMI permet de classer les néonicotinoïdes en deux catégories. Ainsi, la CLT, le NIT, l'ACE et le THI appartiennent à la première catégorie et montrent une interaction nettement compétitive avec l'IMI, suggérant une liaison sur un même site (Kayser et coll. 2004). Le TMX, qui fait partie de la seconde catégorie, est un inhibiteur non compétitif qui pourrait se lier à des sites différents ou d'une manière différente par rapport à l'IMI (Kayser et coll. 2004). Cette dernière hypothèse est soutenue par une autre étude qui montre que le $[^3\text{H}]$ -TMX est capable de se lier aux nAChRs natifs des pucerons *M. persicae* et *A. craccivora* (Wellmann et coll. 2004). D'autre part, une étude récente montre que le SFX partage un site de liaison de haute affinité avec l'IMI chez *M. persicae* (Cutler et coll. 2013). Pour résumer, les insecticides néonicotinoïdes se lient à différents types de sites de liaison avec des affinités variables en fonction de la molécule considérée, qui pourrait mettre en jeu différentes sous-unités ou des acides aminés différents.

Tableau VI. Récapitulatif non exhaustif des sites de liaison de l'imidaclopride identifiés par des tests de saturation pour différentes espèces d'insectes. Le Kd, constante de dissociation, reflète l'affinité des récepteurs pour l'IMI marqué et le Bmax, liaison maximale, reflète la densité des sites de liaison dans la préparation. Le coefficient de Hill ainsi que la nature des préparations biologiques sont également indiqués.

Espèces	Ordre	Matériel Biologique	Site de haute affinité		Site de basse affinité		coefficient de Hill	référence
			Kd1 (nM)	Bmax1 (fmol/mg)	Kd2 (nM)	Bmax2 (fmol/mg)		
<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>Hemiptera</i>	femelles trois jours, individus entiers	0,0035 ± 0,0006	4,1 ± 0,6	1,5 ± 0,2	18,3 ± 2,3		Li et coll. 2010
		femelles trois jours, individus entiers	< 0,01		1,5	16,7 ± 1		Liu et coll. 2005
<i>Nephotettix cincticeps</i>	<i>Hemiptera</i>	population mixte	0,0043	33	1,23	179	0,67	Lind et coll. 1998
<i>Locusta migratoria</i>	<i>Hemiptera</i>	chaines nerveuses d'adultes mâles et femelles						
			0,2 ± 0,05	153 ± 28	8,9 ± 5,7	336 ± 61	0,63 ± 0,07	Wiesner and Kayser 2000
<i>Myzus persicae</i>	<i>Hemiptera</i>	population mixte, individus entiers	0,6 ± 0,2	205 ± 78	7,2 ± 2,7	716 ± 57	0,85 ± 0,10	Wiesner and Kayser 2000
		population mixte, individus entiers	1,9 ± 0,9	257 ± 45			0,90 ± 0,4	Zhang et coll. 2000
		individus entiers	1,7 ± 0,4	915 ± 116				Kayser et coll. 2004
		population mixte	3,7 ± 0,7	1504 ± 74				Wellmann et coll. 2004
		population mixte	0,14 ± 0,01	284 ± 16	12,58 ± 1,83	486 ± 78	0,61 ± 0,02	Lind et coll. 1998
<i>Aphis craccivora</i>	<i>Hemiptera</i>	population mixte, individus entiers	0,8 ± 0,2	226 ± 70	21 ± 8,6	911 ± 32	0,77 ± 0,03	Wiesner and Kayser 2000
		population mixte, individus entiers	0,5 / 1,4 (a)	52 / 90 (a)			0,92 / 0,87 (a)	Zhang et coll. 2000
		individus entiers	6,1 ± 1,7	1332 ± 180				Kayser et coll. 2004
		population mixte, individus entiers			12,5 ± 2,2	1210 ± 114		Wellmann et coll. 2004
<i>Bemisia argentifolii</i>	<i>Hemiptera</i>	adultes entiers	2	101				Chao et coll. 1997
<i>Manduca sexta</i>	<i>Lepidoptera</i>	cerveaux d'adultes	1,3	150			0,99	Lind et coll. 1998
<i>Heliothis virescens</i>	<i>Lepidoptera</i>	têtes	1,51	134			0,92	Lind et coll. 1998
<i>Periplaneta americana</i>	<i>Blattodea</i>	têtes	3,14	2140			1,01	Lind et coll. 1998
<i>Ctenocephalides felis</i>	<i>Siphonaptera</i>	individus entiers	4,82	369			0,95	Lind et coll. 1998
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Diptera</i>	têtes	1	560				Tomizawa et coll. 1995
		têtes	2,2 ± 0,7	1344 ± 251			1,02 ± 0,10	Zhang et coll. 2000
		têtes	5,7 ± 0,1	980 ± 50			1,04 ± 0,02	Zhang et coll. 2004
		individus entiers	1,42	126			1,04	Lind et coll. 1998
<i>Musca domestica</i>	<i>Diptera</i>	têtes	2	850				Tomizawa et coll. 1995
		têtes	5,4 / 5,4 (a)	457 / 398 (a)			0,97 / 0,99 (a)	Zhang et coll. 2000
		têtes	1,2 ± 0,5	853 ± 15			1	Liu and Casida 1993
<i>Lucilia sericata</i>	<i>Diptera</i>	têtes d'adultes	1,75	539			1,02	Lind et coll. 1998

Tableau VII. Récapitulatif non exhaustif de la liaison des insecticides néonicotinoïdes en compétition avec l' [³H]-imidaclopride chez différentes espèces d'insectes. IC₅₀, concentration inhibant 50% de la liaison de l'IMI ; K_i, constante d'inhibition. Les valeurs sont indiquées ± SEM ou avec l'intervalle de confiance 95% entre parenthèses.

Espèce	Matériel biologique	Compétiteur						reference
		CLT		IMI		TMX		ACE
		IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	
<i>Drosophila melanogaster</i>	têtes	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4	3.0 ± 0.3			Tomizawa et coll. 2005
	têtes	2.2 ± 0.2		2.3 ± 0.4			8.3 ± 2.6	Zhang et coll. 2000
	têtes	1.8 ± 0.2		2.6 ± 1.4				Zhang et coll. 2000
<i>Locusta migratoria</i>	chaines nerveuses de mâles et femelles			1.5 ± 0.2		28000 ± 6000		Wiesner and Kayser 2000
	individus entiers		7.2 ± 0.8		2.3 ± 0.3	3180 ± 2840	8.4 ± 1.3	Kayser et coll. 2004
	individus entiers, population mixte	9.2 ± 3		3.1 ± 0.8			10 ± 3	Zhang et coll. 2000
<i>Myzus persicae</i>	individus entiers, population mixte			3.1 ± 0.9		4800 ± 320	6.3 ± 2.4	Wiesner and Kayser 2000
	population mixte					2800		Wellmann et coll. 2004
	individus entiers		24.2 ± 2.3	5.1 ± 0.7		2900	19.2 ± 5.7	Watson et coll. 2011
	population mixte		2.7	0.55				Cutler et coll. 2013
<i>Aphis craccivora</i>	individus entiers	25.2 ± 6.2		8.6 ± 1.5		2300 ± 1100	11.9 ± 3.6	Kayser et coll. 2004
	individus entiers, population mixte	2.3 ± 0.2		2.3 ± 0.1				Zhang et coll. 2000
	individus entiers, population mixte			2.3 ± 0.9		270 ± 70	4.8 ± 2.9	Wiesner and Kayser 2000
<i>A. mellifera</i>	têtes						2.1 (1.1-3.7)	Nauen et coll. 2001 (a)
Espèce	Matériel biologique	Compétiteur						reference
		THI		NIT		DTF		SFX
		IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	
<i>Drosophila melanogaster</i>	têtes							Tomizawa et coll. 2005
	têtes	7.5 ± 2.0		11 ± 2				Zhang et coll. 2000
	têtes							Zhang et coll. 2000
<i>Musca domestica</i>	chaines nerveuses de mâles et femelles	0.7 ± 0.1		6.8				Wiesner and Kayser 2000
	individus entiers	2.0 ± 0.5		10.8 ± 4.9				Kayser et coll. 2004
	individus entiers, population mixte	3.4 ± 0.5		21 ± 5				Zhang et coll. 2000
<i>Myzus persicae</i>	individus entiers, population mixte	0.19 ± 0.06		33.5 ± 14.6				Wiesner and Kayser 2000
	population mixte					2223 ± 712	265 ± 49	Wellmann et coll. 2004
	individus entiers	5.4 ± 1.4		7.3 ± 2.8		336		Watson et coll. 2011
	population mixte	0.17		3.5				Cutler et coll. 2013
	individus entiers	3.3 ± 0.85		35.3 ± 5.0				Kayser et coll. 2004
<i>Aphis craccivora</i>	individus entiers, population mixte							Zhang et coll. 2000
	individus entiers, population mixte							Wiesner and Kayser 2000
	population mixte	0.06 ± 0.04		21.7				Nauen et coll. 2001 (a)
<i>A. mellifera</i>	têtes	0.75 (0.47-1.3)		2.3 (1.2-4.5)				

3.3) Site de liaison des néonicotinoïdes chez le puceron : disparité des données obtenues

Nous avons pu voir plus haut que dans la littérature, deux sites de liaison pour l'IMI peuvent être décrits, de haute et de basse affinité. Cependant, on observe une disparité dans les données disponibles concernant les deux espèces de puceron *M. persicae* et *A. craccivora* (tableau VI). Ainsi, certaines études montrent la présence d'un seul site de liaison (Wellmann et coll. 2004; Kayser et coll. 2004; Zhang et coll. 2004) tandis que d'autres études indiquent l'existence de sites de haute et basse affinité pour l'IMI (Wiesner et Kayser 2000; Lind et coll. 1998) chez ces deux espèces de pucerons. Ces variations pourraient être liées à la présence de différents sous-types de nAChRs présentant différentes affinités pour les insecticides, comme cela a été suggéré lors de l'étude électrophysiologique des neurones du lobe antennaire de l'abeille (Nauen et coll. 2001a). De plus, étant donné que les études sur les pucerons sont menées sur des mélanges d'individus de différentes générations, la variation dans la capacité de liaison de l'IMI pourrait être en lien avec la présence de différents sous-types de nAChRs en fonction des stades de développement et de leurs proportions dans l'échantillon étudié. D'autre part, certaines caractéristiques techniques peuvent influencer les tests de liaison. En effet, la température à laquelle les membranes sont incubées, l'utilisation de préparations de membrane congelées ou non, l'utilisation ou non de détergent lors de l'extraction, peuvent entraîner la perte de site de liaison pour les insecticides, en particulier le TMX (Wellmann et coll. 2004; Zhang et coll. 2000). Enfin, la méthode d'analyse des données peut également influencer l'interprétation des résultats. Ainsi lors d'une étude de la liaison de l'IMI tritié chez *M. persicae* et *A. craccivora* les mêmes données ont été interprétées comme correspondant à la présence d'un ou deux sites en fonction du logiciel d'analyse (KELL Radlig program de Biosoft ou Ligand program Elsevier-Biosoft) (Zhang et coll. 2000).

3.4) Nature des sous-unités impliquées dans la liaison des néonicotinoïdes

Comme indiqué précédemment, du fait des difficultés rencontrées pour exprimer les sous-unités d'insectes dans des systèmes d'expression, l'influence des différentes sous-unités dans la liaison des insecticides a, jusqu'à présent, été évaluée *via* des récepteurs hybrides co-exprimant des sous-unités α d'insectes avec des sous-unités β de Vertébrés. En utilisant cette stratégie, des études ont montré que l' [^3H]-IMI présente une forte affinité pour des nAChRs hybrides impliquant les sous-unités $\text{D}\alpha 1$, $\text{D}\alpha 2$ ou $\text{D}\alpha 3$ de *D. melanogaster* ou les sous-unités $\text{Mp}\alpha 2$ ou $\text{Mp}\alpha 3$ de *M. persicae* lors de leur coexpression avec la sous-unité $\beta 2$ du rat (Huang et coll. 1999; Lansdell et Millar 2000a; Tomizawa et coll. 2005). La coexpression de la sous-unité $\text{D}\alpha 2$ de *D. melanogaster* avec la sous-unité $\beta 2$ du poulet permet la formation de site de liaison fonctionnel pour la CLT et le DTF (Ihara et coll. 2004). De plus, les nAChRs hybrides contenant la sous-unité $\text{D}\alpha 1$ sont plus sensibles aux néonicotinoïdes (IMI, NIT, ACE, THI, DTF, CLT) que ceux contenant la sous-unité $\text{D}\alpha 2$ (Dederer et coll. 2011). De la même façon, chez la cicadelle *N. lugens* et la mouche *L. crupida*, on observe une plus grande affinité de l'IMI pour les sous-unités $\text{Nl}\alpha 1$ et $\text{Lc}\alpha 1$ que pour les sous-unités $\text{Nl}\alpha 2$ et $\text{Lc}\alpha 2$ lors de leur co-expression avec une sous-unité $\beta 2$ de Vertébrés (Liu et coll. 2009; Dederer et coll. 2013). Il pourrait donc s'agir d'une caractéristique commune aux nAChRs d'insectes. Ainsi, la nature de la sous-unité α impliquée dans la formation du site de liaison influence la liaison des insecticides. Il semble que la liaison des insecticides dépende également de la nature de la sous-unité β impliquée dans la formation du site de liaison (Lansdell et Millar 2000a). En effet, les nAChRs hybrides impliquant les sous-unités $\text{D}\alpha 1$, $\text{D}\alpha 2$ ou $\text{D}\alpha 3$ de *D. melanogaster* sont insensibles à l'IMI lors de leur co-expression avec la sous-unité $\beta 4$ de rat contrairement à ce qui est observé avec la sous-unité $\beta 2$ de rat (Lansdell et Millar 2000a). Il est donc important de noter que même si l'utilisation des nAChRs hybrides permet d'obtenir des informations importantes sur les propriétés de liaison des différentes sous-unités α , l'interprétation des résultats reste limitée dans la mesure où la présence d'une sous-unité β d'insecte pourrait modifier les propriétés des sites de liaison.

Des expériences de co-immunoprécipitation sur des nAChRs natifs chez *N. lugens* ont permis de démontrer l'implication des sous-unités $\text{Nl}\alpha 3$, $\text{Nl}\alpha 8$ et $\text{Nl}\beta 1$ dans des sites de

liaison de haute affinité pour l'IMI tandis que les sous-unités $N\alpha 1$, $N\alpha 2$ et $N\beta 1$ participeraient à la formation d'un site de basse affinité (Li et coll. 2010). Par ailleurs, l'étude de nAChRs hybrides exprimant des sous-unités de *D. melanogaster* modifiées par mutagenèse dirigée a permis de mettre en évidence des acides aminés clés impliqués dans la liaison de l'IMI. Ainsi, les résidus P219 de la boucle C de la sous-unité, R77 et V79 de la boucle D de la sous-unité, ainsi que les résidus Y131, R131 et N133 de la boucle E et W191 et K192 participeraient à la liaison de l'IMI (Shimomura et coll. 2002, 2004, 2006; Yao et coll. 2008). De plus, une insertion au niveau de la boucle F est observée pour les sous-unités $D\alpha 1-4$ et $D\beta 2$ et serait importante pour la liaison de l'IMI (Shimomura et coll. 2004). La même insertion a été observée pour les sous-unités orthologues chez l'abeille ($Am\alpha 1-4$ et $Am\alpha 8$), suggérant que ces sous-unités pourraient également participer à la formation de sites de liaison pour de l'IMI chez cette espèce (Jones et coll. 2006).

3.5). Modulation du mode d'action des insecticides néonicotinoïdes par les voies de régulation intracellulaire

A ce jour, le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes sur les nAChRs des insectes a surtout été envisagé du point de vue de la molécule et de ses métabolites ainsi qu'au niveau des types de récepteurs présents et des mutations associées qui pouvaient affecter la liaison des ligands. Des données récentes ont montré que le mode d'action des néonicotinoïdes vis-à-vis des nAChRs pouvait être dépendant des voies de régulation intracellulaire dépendantes du calcium.

Les potentiels postsynaptiques excitateurs obtenus après stimulation du nerf cercal, sous application de TMX au niveau de la synapse entre le nerf cercal afférent et l'interneurone géant, était diminués ou abolis lorsque le Ca^{2+} extracellulaire était remplacé par le Mg^{2+} (Thany 2011). Ce rôle du calcium sur l'effet des insecticides néonicotinoïdes a été confirmé par des données obtenues sur les DUM neurones. L'application de CLT sur les DUM neurones entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation du Ca^{2+} est proportionnelle à la concentration d'insecticide appliquée (Calas-List et Coll. 2013). Plus encore, l'effet du Ca^{2+} semble impliquer des voies de régulation beaucoup plus complexe. En

effet, une augmentation de la concentration en AMPc entraîne une augmentation de l'amplitude du courant induit par la CLT (Calas-List et coll. 2012) et une modification de la courbe courant-potentiel qui laisse penser que l'AMPc affecterait l'affinité de la CLT pour les nAChRs présents au niveau des DUM neurones. Des données similaires ont été obtenues avec l'ACE. L'inhibition des flux de Ca^{2+} à travers les canaux calciques TRP augmente fortement la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride, cette modification de sensibilité impliquerait un rôle essentiel de l'AMPc puisqu'une augmentation de la concentration en AMPc provoque une diminution de l'activité des canaux calciques TRP (Bodereau-Dubois et coll. 2012). Ainsi, la concentration en AMPc régule l'activité des canaux calciques TRP ce qui module l'influx de Ca^{2+} et donc la sensibilité des nAChR2 à l'ACE (Bodereau-Dubois et coll. 2012). Ces données montrent très clairement que pour un même récepteur, la sensibilité ou l'insensibilité de celui-ci vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes peut être modifiée par une modulation des voies de régulation intracellulaire dépendante du Ca^{2+} .

4) Mécanismes de résistance aux néonicotinoïdes.

Le contrôle efficace de ravageurs de culture tels que *B. tabaci*, *M. persicae* et *N. lugens* par les organophosphorés, les carbamates et pyréthriinoïdes s'est détérioré du fait de l'apparition de résistances (Denholm et coll. 1998). Par exemple, chez *M. persicae*, une surexpression de carboxyestérases (E4 ou FE4) est responsable de résistance aux organophosphorés, tandis que des mutations de l'acétylcholinestérase (MACE) et du canal sodium dépendant du potentiel (kdr) induisent une résistance aux carbamates et pyréthriinoïdes respectivement (Devonshire et coll. 1998). Cependant, l'utilisation de nouvelles classes de molécules, telles que les néonicotinoïdes, qui ne sont pas affectées par ces mécanismes de résistance (Elbert et coll. 1998), a permis de restaurer un contrôle efficace des populations de ravageurs résistants (Palumbo et coll. 2001). Néanmoins, l'utilisation massive des néonicotinoïdes a conduit à l'apparition de résistances vis-à-vis de ces insecticides (Arthropod Pesticide Resistance Database, consultation Juin 2014 <http://www.pesticideresistance.org>). On distingue en réalité deux grands mécanismes de résistance aux néonicotinoïdes:

1) La **résistance métabolique** liée à une augmentation de la détoxification des insecticides:

La résistance métabolique implique les cytochromes P450 qui sont des hémoprotéines intervenant dans des réactions d'oxydoréduction d'un grand nombre de molécules. La modification des molécules xénobiotiques telles que les insecticides par les cytochromes P450 entraîne leur dégradation et/ou leur élimination, diminuant ou annihilant l'activité neurotoxique de ces composés. Ce mécanisme de détoxification semble être largement impliqué dans la résistance des insectes vis-à-vis des néonicotinoïdes. En effet, le premier cas de résistance vis-à-vis de l'IMI identifié chez *B. tabaci* au début des années 90 (Cahill et coll. 1996), a été corrélé à une augmentation de la détoxification reflétée par la surexpression deux gènes codant pour les cytochromes P450 CYP6CM1 et CYP4C64 (Nauen et coll. 2002; Yang et coll. 2013). De la même façon, la souche 5191A de *M. persicae*, résistante à l'IMI, présente une sur-expression du gène codant pour le cytochrome P450 CYP6CY3 (Puinean et coll. 2010 a et b).

2) La **résistance par modification structurale du site de liaison** des insecticides au sein des nAChRs. Les mécanismes conduisant à la modification du site de liaison sont les suivants :

- mutation de résidus clés favorisant la liaison aux insecticides. L'analyse des variations de séquences au sein des transcrits de sous-unités provenant de populations sensibles et résistantes vis-à-vis de l'IMI a permis l'identification de mutations ponctuelles qui se sont avérées être à l'origine de la résistance. Ainsi, la mutation R81T de la sous-unité Mpβ1 confère la résistance à une souche de puceron du pêcher *M. persicae* identifiée dans le sud de la France et le nord de l'Espagne (Slater et coll. 2012; Bass et coll. 2011). De même, chez la cicadelle brune *N. lugens*, la mutation Y151S identifiée au niveau des sous-unités Nlα1 et Nlα3 est impliquée dans la résistance à l'IMI (Liu et coll. 2005). Le rôle de cette mutation ponctuelle a été évalué par électrophysiologie à l'aide des nAChRs hybrides exprimés dans l'ovocyte de xénope. Ainsi, l'effet de l'IMI est fortement diminué en présence de nAChRs impliquant les sous-unités mutées Nlα1^{Y151S} et Nlα3^{Y151S} tandis que l'ACh provoque des réponses similaires quels que soient les récepteurs hybrides exprimés (Liu et coll. 2006; Yixi et coll. 2009). D'autre part, des mutations au niveau des sous-unités Dα1 ou Dβ2 peuvent conférer une résistance au NIT chez *D. melanogaster* (Perry et coll. 2008) tandis que la mutation G275E au niveau de la sous-unité TPα6 est responsable de la résistance au spinosad⁶ chez une souche du thrips du palmier *T. palmi* (Bao et coll. 2014). Ainsi, les mutations ponctuelles à l'origine d'une résistance aux néonicotinoïdes peuvent toucher à la fois des sous-unités α et β, soulignant l'importance des composantes principale et secondaire du site de liaison dans l'action des insecticides.

- modification post-transcriptionnelle. L'altération des mécanismes d'épissage alternatif de la sous-unité α6 conduit à une résistance pour le spinosad chez la teigne des choux *P. xylostella*. En effet, une mutation au niveau de la zone d'épissage de l'intron 9 de Pα6 provoque une rétention d'intron qui conduit à la production de protéines tronquées entre le TM3 et le TM4 (Baxter et coll. 2010). Chez la mouche orientale des fruits *B. dorsalis*,

⁶ Le spinosad est un insecticide de la famille des spinosynes qui ciblent les nAChRs. Il correspond à un mélange des spinosines A et D dérivés de la bactérie du sol *Saccharopolyspora spinosa* (Millar et Denholm 2007)

c'est une mutation au niveau de l'intron 2 qui est responsable de la production de transcrits tronqués de la sous-unité B α 6 associées à la résistance au spinosad (Hsu et coll. 2012).

- modification du niveau d'expression des sous-unités. Chez la mouche *M. domestica*, une diminution de 60% du niveau d'expression de la sous-unité M α 2 est associée à la résistance de l'insecte pour l'IMI. Aucune mutation n'a été identifiée au niveau de cette sous-unité et les mécanismes responsables de cette sur-expression restent encore à élucider (Markussen et Kristensen 2010).

Il apparaît difficile de définir un mécanisme de résistance commun à une molécule insecticide. Pour exemple, même si la résistance au spinosad implique la modification de la sous-unité α 6 chez *D. melanogaster* (Perry et coll. 2007), *P. xylostella* (Baxter et coll. 2010), *B. dorsalis* (Hsu et coll. 2012) et *T. palmi* (Bao et coll. 2014), ce n'est pas le cas chez le thrips californien *F. occidentalis* (Hou et coll. 2014). De manière générale, la résistance métabolique est également impliquée dans les cas de résistance par modification des nAChRs, comme c'est le cas pour la souche mutante R81T de *M. persicae* (Bass et coll. 2011). De plus, les souches identifiées comme résistante pour un insecticide, peuvent présenter une résistance croisée pour d'autres néonicotinoïdes. Ainsi, la souche de *L. decemlineata* résistante à l'IMI présente une résistance croisée pour le DTF, la CLT, l'ACE, le THI et le TMX (Mota-Sanchez et coll. 2006). De même, le puceron *M. persicae* résistant à l'IMI apparaît également résistant vis-à-vis du TMX, du THI et de l'ACE (Bass et coll. 2011; Slater et coll. 2012). Chez *N. lugens*, les mutations Nl α 1^{Y151S} et Nl α 3^{Y151S} précédemment décrites et responsables de la résistance à l'IMI, entraînent également une diminution de la réponse des nAChRs pour cinq autres néonicotinoïdes, l'ACE, le NIT, le THI, la CLT et le TMX (Yixi et coll. 2009) mais ont par contre une incidence plus faible sur la réponse des récepteurs au DTF (Liu et coll. 2006; Yixi et coll. 2009). Ces cas de résistance multiple rendent difficile le contournement de la résistance identifiée pour une molécule par l'utilisation d'autres néonicotinoïdes.

DEUXIEME PARTIE:

PRESENTATION DES MODELES

BIOLOGIQUES

Chapitre 1. Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*: un modèle de ravageurs.

1) Cycle de vie particulier du puceron du pois.

Le puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum*) est un petit insecte (2,5 à 4,4 mm de long) de l'ordre des homoptères, de la famille des aphididés, qui parasite de nombreuses plantes cultivées ou sauvages de la famille des légumineuses, dont le pois, le haricot, le trèfle et la luzerne. Tout comme les autres pucerons, le puceron du pois est un insecte de type piqueur-suceur qui se nourrit exclusivement de la sève élaborée présente dans le phloème. Il possède des pièces buccales modifiées en tube droit, le rostre, capable de perforer la cuticule des plantes pour atteindre les vaisseaux conducteurs (Figure 14).



Figure 14. Puceron du pois sur féverole. Les pucerons possèdent un rostre droit capable de traverser la cuticule des plantes pour atteindre les vaisseaux conducteur de la sève élaborée.

Le puceron du pois a un cycle de vie complexe et a évolué vers une plasticité phénotypique de plus en plus importante (Moran 1992; Simon et coll. 2002). Ainsi, au printemps et en été, les femelles généralement aptères se reproduisent par parthénogenèse conduisant à la formation de clones. Si la densité de population devient trop élevée par

rapport aux ressources disponibles, des individus ailés apparaissent afin de coloniser une autre plante. Les embryons issus de la parthénogenèse se développent au sein des larves, parfois même avant la naissance de celle-ci. Ce mélange des générations favorise un temps de reproduction court (10 jours), permettant aux colonies de pucerons d'exploiter rapidement de nouvelles ressources (Simon et coll. 2002). La diminution de la longueur des jours en automne conduit à l'apparition d'individus ailés mâles et femelles, qui produiront des œufs par reproduction sexuée (Cortes et coll. 2008). En février, les œufs donnent naissance à des femelles fondatrices parthénogénétiques et le cycle de reproduction se poursuit. Les populations de pucerons se développant dans les régions sans saison hivernale marquée présentent une reproduction asexuée continue (LeTrionnaire et coll. 2008) (Figure 15).

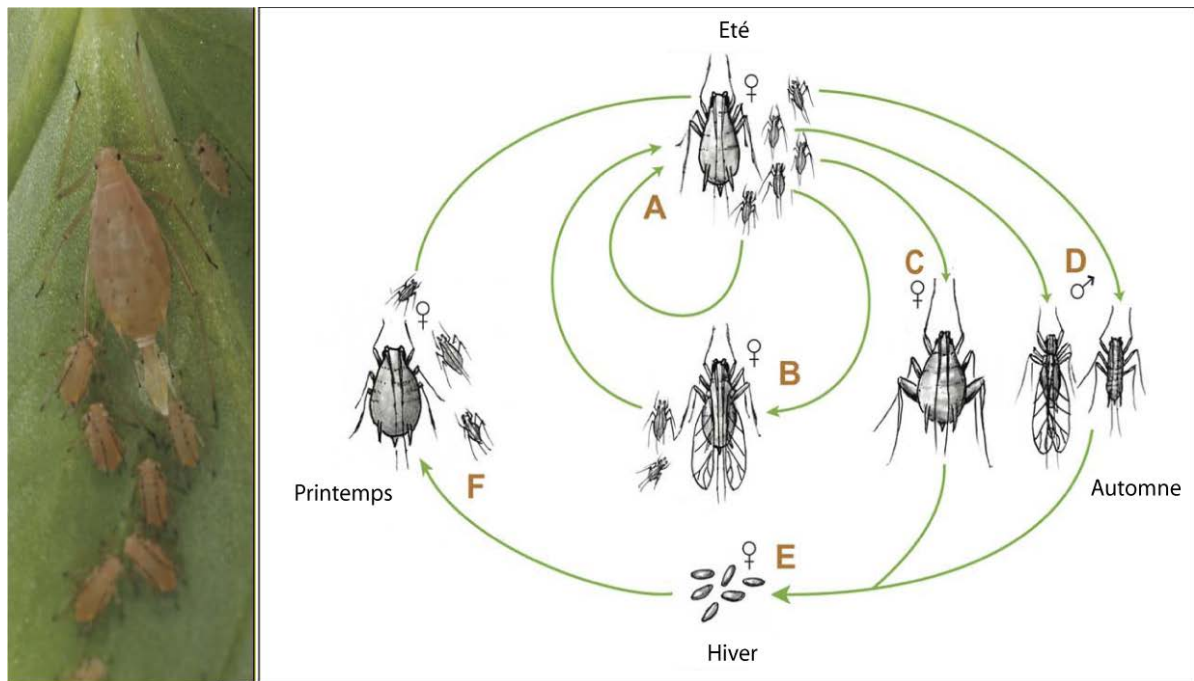


Figure 15. Cycle de vie du puceron du pois. Pendant le printemps et en été, les femelles asexuées donnent naissance à des clones (voir photo). Ces larves subissent des mues pour devenir des adultes asexuées femelles aptères (A) ou ailés (B). Après plusieurs cycles de reproduction asexuée, la diminution de la longueur des jours en automne conduit à l'apparition d'individus sexués femelles aptères (C) et mâles (D), qui peuvent être ailés ou non selon le génotype (D). Après accouplement, la femelle ovipare pond des œufs (E) qui donneront des femelles aptères et asexuées au printemps suivant (F) (Modifié d'après Consortium T.I.A.G. 2010).

2) Conditions d'élevage.

Les pucerons sont élevés dans une enceinte climatique à 22°C avec un cycle de 16h jour / 8h nuit, afin de maintenir les individus dans la phase parthénogénétique de leur cycle de développement. Les pucerons adultes sont placés sur des féveroles et confinés dans un sachet de cellulose. Un maximum de 6 à 10 adultes est respecté pour chaque plante afin d'éviter le stress lié à une surpopulation, qui pourrait entraîner l'apparition d'individus ailés. Les femelles adultes sont récupérées après la ponte des premières larves et congelées en vue des expériences. Les larves sont alors transférées sur de nouvelles plantes (à raison de 3 à 10 individus par plante) et sont maintenues jusqu'au stade adulte. Chaque stade de développement (stades larvaires L1 à L4 puis adulte) est déterminé suite à l'observation des segments antennaires et de l'extrémité de l'abdomen.

3) Intérêt du puceron comme modèle d'étude.

Le puceron du pois est le sujet de nombreuses études et sa biologie est bien décrite dans la littérature. En effet, il représente un modèle d'étude de la symbiose entre les pucerons et leurs bactéries intracellulaires obligatoires et facultatives (Degnan et coll. 2009 et 2010), mais également un modèle d'étude du cycle de développement (LeTrionnaire et coll. 2008) et de la spécialisation pour les plantes hôtes (Jaquiery et coll. 2012). En outre, le puceron du pois parasite les cultures de légumineuses et comme les autres espèces de puceron, il est responsable de la transmission de virus phytopathogène (Brault et coll. 2010)., notamment le virus de la jaunisse nécrosante des fèves (Faba bean necrotic yellow virus, FBNYV) (Franz et coll. 1998). De plus, *A. pisum* est phylogénétiquement très proche de ravageurs de culture importants, tel que le puceron du pêcher *M. persicae* (Von Dohlen et coll. 2006). Ainsi, le séquençage récent du génome entier du puceron du pois (retenu comme espèce modèle pour les homoptères) et sa publication en février 2010 font du puceron *A. pisum* un modèle d'étude génétique particulièrement intéressant (Consortium T.I.A.G. 2010).

Chapitre 2. La blatte *Periplaneta americana*: un modèle pour les études électrophysiologiques.

1) Présentation de la blatte.

La blatte américaine *Periplaneta americana* (figure 16) est un insecte de la famille des *Blattidae* (Ordre des *Blattaria*). L'adulte mesure de 29 à 53 mm. C'est une espèce cosmopolite, présente dans les milieux chauds et humides. Les individus mâles se différencient des femelles par la présence de deux stylets entre les cerques situés à l'extrémité de l'abdomen et par des ailes plus longues que l'abdomen. La blatte est paurométabole (sans stade immobile entre la larve et l'adulte qui vivent dans le même milieu) et passe par trois stades de développement: l'œuf, la nymphe (aptère) et l'adulte. Les femelles déposent une oothèque contenant des œufs. Les blattes immatures émergent après 6 à 8 semaines et subissent 7 mues avant d'atteindre le stade adulte au bout de 6 à 12 mois.

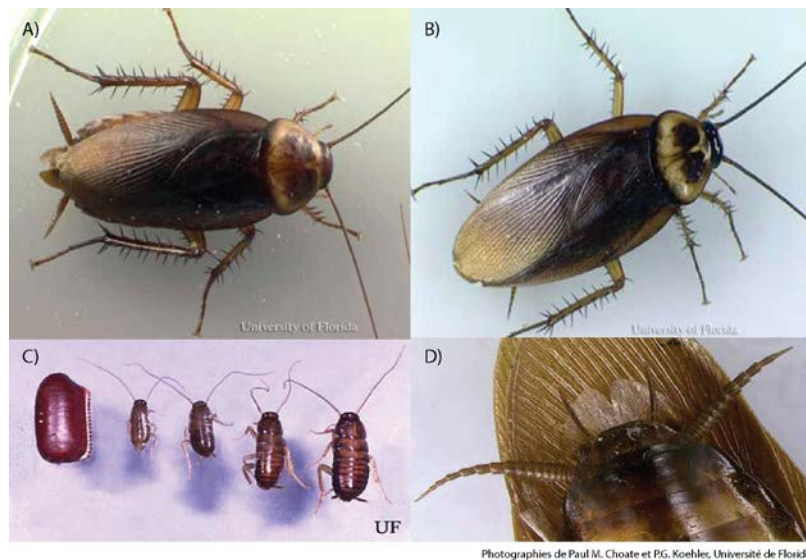


Figure 16. La blatte *Periplaneta americana*. A) individu femelle adulte. B) individu mâle adulte. C) de gauche à droite : oothèque et premier, deuxième, troisième et quatrième stade nymphales. D) Vue ventrale de l'extrémité de l'abdomen d'un individu mâle avec les deux stylets caractéristiques entre les cerques.

2) Conditions d'élevage.

Les blattes sont élevées au laboratoire dans une pièce dont la température est maintenue à 29°C sous une photopériode 12 heures jour/ 12 heures nuit, dans un environnement dépourvu d'insecticide. Elles sont nourries trois fois par semaine et ont de l'eau *ad libitum*. Les expériences présentées dans ce manuscrit portent uniquement sur des individus mâles adultes afin, d'une part de préserver l'élevage et d'autre part de garder une continuité avec les études menées précédemment au sein du laboratoire.

3) Le système nerveux de la blatte.

Le système nerveux de la blatte est formé d'un cerveau et d'une chaîne nerveuse ventrale (Figure 17 A). La chaîne nerveuse est constituée d'un ganglion sous-œsophagien, de trois ganglions thoraciques et de six ganglions abdominaux, reliés entre eux par deux connectifs. Le cerveau est divisé en trois régions: le protocérébron, le deutocérébron et le tritocérébron. A la loupe binoculaire, on peut facilement distinguer la présence des lobes optiques, des lobes antennaires, des corps pédonculés et du ganglion sous-œsophagien (figure 17B). Comme chez d'autres insectes, les corps pédonculés occupent la majeure partie du protocérébron et reçoivent les informations olfactives en provenance du lobe antennaire et des informations gustatives venant du ganglion sous-œsophagien. Les corps pédonculés constituent donc un centre d'intégration des stimuli sensoriels impliquant notamment l'acétylcholine en tant que neurotransmetteur majoritaire, ainsi que les récepteurs de type nicotinique. L'expression de ces derniers au sein des corps pédonculés a été montrée par immunomarquage et hybridation *in situ* et leur activation a été confirmée par imagerie calcique (Cayre et coll. 1999; Thany et coll. 2003 et 2005).

Parmi les ganglions de la chaîne nerveuse, le dernier ganglion abdominal (TGA) résulte de la fusion de plusieurs ganglions primitifs et contient les DUM (Dorsal Unpaired Median) neurones qui y sont plus nombreux (Sinakevitch et coll. 1995) (figure 17 C). Les

DUM neurones, dont le diamètre est 4 à 6 fois plus important que celui des autres neurones (45 à 60 μm de diamètre) (Grolleau et Lapied 2000), présentent une activité électrique spontanée de type « pacemaker » qui peut être modulée par l'activation de récepteurs canaux extrasynaptiques tels que les récepteurs ionotropes GABAergiques et nicotiniques (Lapied et coll. 1990). Il constitue ainsi un modèle particulièrement intéressant pour l'analyse électrophysiologique des courants générés spontanément ou lors de l'application d'agonistes, tels que les insecticides, sur les récepteurs canaux (Stankiewicz et coll. 2012).

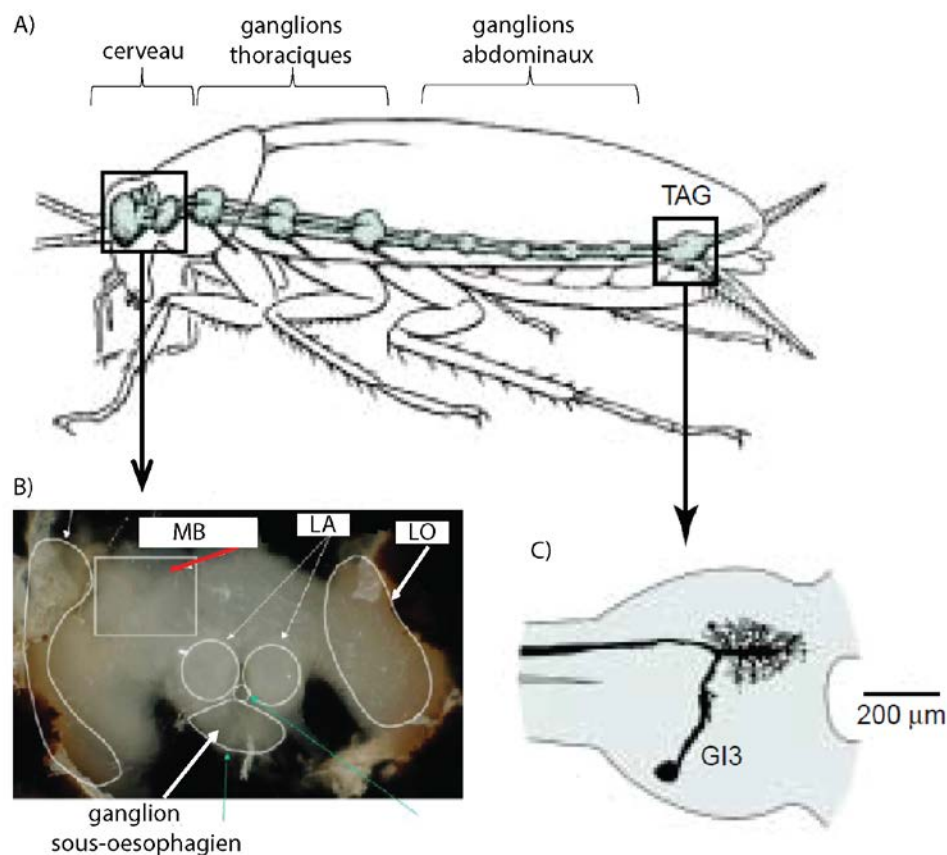


Figure 17. Le système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana*. A) représentation du système nerveux constitué du cerveau et des ganglions thoraciques et abdominaux. B) vue détaillée du cerveau avec les corps pédonculés (MB), les lobes antennaires (LA), les lobes optiques (LO) et le ganglion sous-oesophagien. C) dernier ganglion abdominal (Modifié d'après Matsuda et coll. 2001).

TROISIEME PARTIE:

RESULTATS ET DISCUSSION

AVANT PROPOS

Les résultats présentés dans cette partie portent sur les données obtenues chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* et la blatte *Periplaneta americana*. Ils sont présentés sous forme d'articles publiés dans des revues à comité de lecture et de résultats non publiés. Les résultats sont structurés en deux parties:

La première partie concerne l'interaction entre les insecticides néonicotinoïdes et les récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes en utilisant des approches de toxicologie, de liaison par affinité et de biologie moléculaire. L'objectif de cette première partie de la thèse a été de caractériser les sous-unités de nAChR présentes chez le puceron *A. pisum* et la blatte *P. americana* et d'étudier leur profil d'expression dans le système nerveux de ces deux insectes. Sur le modèle du puceron *A. pisum*, nous avons ensuite étudié la toxicité de trois types d'insecticides néonicotinoïdes, l'imidaclopride (IMI), la clothianidine (CLT) et le thiamethoxame (TMX). L'objectif majeur était d'étudier les profils d'expression des sous-unités des nAChRs avant et après exposition aux néonicotinoïdes et d'identifier les sites de liaison à ces néonicotinoïdes chez le puceron *A. pisum*. Une étude supplémentaire avec l'ACE a été menée sur deux souches différentes de *M. persicae*, en comparaison avec le puceron *A. pisum*.

La seconde partie de ce travail a consisté à étudier le rôle de la CaMKII sur la sensibilité des récepteurs nicotiniques vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes. En effet, des données obtenues préalablement au laboratoire montraient que la composition en sous-unités du récepteur n'était pas le seul facteur qui pouvait influencer la sensibilité et la résistance des insectes vis-à-vis des néonicotinoïdes. Nous avons ainsi démontré que dans les neurones DUM (possèdent des nAChRs insensibles à l'IMI), l'inhibition de PaCaMKII-E qui est préférentiellement exprimés dans les DUM neurones entraine une modulation de la sensibilité des récepteurs vis-à-vis des néonicotinoïdes.

Les publications étant toutes en anglais, nous avons, pour chaque article, présenté un résumé synthétique du contexte dans lequel s'est fait l'étude.

Chapitre 1. Caractérisation pharmacologique des récepteurs nicotiniques d'insectes en tant que cible des insecticides néonicotinoïdes.

1) Etude de la corrélation entre l'efficacité de molécules insecticides et leurs capacités de liaison à différents sous-types de nAChRs.

Ces résultats font l'objet de la **publication n°1**.

« Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. »

Emiliane Taillebois, Abdelhamid Beloula, Sophie Quinchard, Stéphanie Jaubert-Possamai, Antoine Daguin, Denis Servent, Denis Tagu, Steeve H. Thany and Hélène Tricoire-Leignel

Plos One (2014) 9(5): e96669

Résumé de la publication

1.1) Mise en évidence de différents sous-types pharmacologiques présentant différentes affinités pour les insecticides néonicotinoïdes.

La première partie de cette étude concerne la détermination des sous-types pharmacologiques de nAChRs présents chez le puceron du pois *A. pisum*. Pour cela, des tests de liaison ont été réalisés sur des préparations de membranes de pucerons adultes aptères et parthénogénétiques. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser l' α -Bgt et l'IMI comme ligands de référence. En effet, l' α -Bgt est classiquement utilisée dans la caractérisation pharmacologique des nAChRs et l'IMI est le premier insecticide néonicotinoïde mis sur le marché servant de référence dans de nombreuses études pharmacologiques et toxicologiques chez les insectes.

Les expériences de saturation avec l' [125 I]- α -Bgt et l' [3 H]-IMI ont permis de mettre en évidence la présence de sites de liaison de haute et de basse affinité pour ces deux ligands. Les valeurs de Bmax déterminées montrent que seulement 8% des sites sensibles à l' α -Bgt et 10% des sites sensibles à l' [3 H]-IMI sont des sites de haute affinité. Ces résultats suggèrent la présence des sites de haute et basse affinité sur différents sous-types de récepteurs plutôt que la présence de plusieurs sites avec des affinités différentes sur un même sous-type de récepteurs. De plus, la comparaison des valeurs de Bmax lors des expériences de saturation montre que les sous-types de récepteurs sensibles à l' α -Bgt sont majoritaires comparés à ceux qui présentent une sensibilité à l'IMI. L'ensemble de ces résultats démontrent ainsi la présence d'au moins quatre sous-types de récepteurs nicotiniques chez le puceron du pois.

Des expériences complémentaires de compétition ont été réalisées avec trois insecticides néonicotinoïdes afin de déterminer leur capacité de liaison sur les nAChRs sensibles à l' α -Bgt ou à l'IMI. Dans les deux cas, nous avons étudié la liaison des insecticides sur les sites de basse affinité, qui sont majoritaires. En plus de l'IMI, nous avons choisi deux autres insecticides, la CLT et le TMX. Les expériences de compétition avec l' [125 I]- α -Bgt montre que le TMX et la CLT présentent une bonne affinité (K_i de 1,53 et 0,18 nM respectivement) contrairement à l'IMI (K_i = 14,6 nM). Les expériences en compétition avec l' [3 H]-IMI mettent en évidence une bonne affinité de la CLT (K_i = 127 nM) tandis que le TMX présente une très faible affinité (K_i = 1047 nM). Ainsi, chaque sous-type de nAChRs présente des affinités différentes en fonction de la molécule insecticide considérée. Ces résultats sont en accord avec des données précédemment obtenues qui montrent la liaison de l'IMI à des sites insensibles à l' α -Bgt et la liaison de la CLT à des sites sensibles à l'IMI chez *M. persicae* et *A. craccivora* (Wiesner et Kayser 2000; Kayser et coll. 2004; Zhang et coll. 2000). Au contraire, une étude menée chez la mouche *D. melanogaster* indique que la CLT ne se lie pas aux récepteurs sensibles à l' α -Bgt (Zhang et coll. 2004). Les sous-types pharmacologiques de nAChRs pourraient donc présenter des affinités pour les molécules insecticides variables en fonction de l'espèce considérée.

1.2) Toxicité de trois néonicotinoïdes (IMI, TMX, CLT) chez le puceron du pois.

Dans la suite de l'étude, nous avons donc étudié l'efficacité de ces molécules afin de déterminer si la différence dans les propriétés de liaison se reflète au niveau de la toxicité *in vivo*. La toxicité des insecticides *in vivo* a été évaluée sur des larves de pucerons à l'aide d'un système de nutrition artificiel. Après 24h d'exposition, le TMX est 13 fois plus toxique que la CLT et 3,5 fois plus toxique que l'IMI. Après 48h d'exposition, le TMX et l'IMI présentent une toxicité similaire et sont 3,5 fois plus toxique que la CLT. La toxicité des néonicotinoïdes varie en fonction de la molécule insecticide considérée. Des résultats similaires sont observés chez le puceron *A. gossypii* pour lequel l'IMI apparaît plus toxique que le TMX et la CLT (Shi et coll. 2011). Cependant, chez le puceron *M. persicae*, la CLT s'avère plus toxique que l'IMI (Foster et coll. 2008). Ces variations de sensibilité aux insecticides pourraient être liées à l'utilisation de protocoles d'intoxication différents et/ou à des différences de sensibilité en fonction des espèces considérées.

1.3) Adéquation entre les données pharmacologiques et toxicologiques.

En considérant l'ensemble de ces résultats, Il est intéressant de noter que le TMX présente une toxicité *in vivo* supérieure à celle de la CLT. Or les données de liaison montrent que le TMX se lie préférentiellement aux sous-types de nAChRs sensibles à l' α -Bgt tandis que la CLT se lie à la fois aux sous-types de récepteurs sensibles à l' α -Bgt et aux sous-types de récepteurs sensibles à l'IMI. Les nAChRs semblent donc présenter plus de sites de liaison pour la CLT que pour le TMX, ce qui semblerait théoriquement présager d'une plus grande toxicité de la CLT contrairement à ce qui est observé. Une des hypothèses est que la forte toxicité du TMX serait liée à sa double action : directe et après métabolisation en CLT. En effet, des mesures par HPLC ont démontré la métabolisation du TMX en CLT chez des larves intoxiquées, ce qui a déjà été démontré chez d'autres espèces d'insectes (Nauen et coll. 2003; Benzidane et coll. 2010). Ainsi, le TMX semble avoir un mode d'action particulier qui fait notamment intervenir son métabolite, la CLT.

1.4) Variation de l'expression des sous-unités de nAChRs au cours du développement et après exposition aux insecticides.

Etant donné que plusieurs sous-types de nAChRs ont été mis en évidence lors des tests de liaison par affinité, nous avons mis en place des expériences de PCR quantitative afin de déterminer le niveau d'expression des gènes codant pour les différentes sous-unités de nAChRs qui pourraient former ces récepteurs. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une variation de l'expression des sous-unités en fonction du stade de développement des pucerons. Ainsi, le niveau d'expression des sous-unités Apisum α 1, Apisum α 2, Apisum α 6, Apisum α 8 et Apisum β 2 ne présente pas de variation significative au cours des premiers stades de développement avant de diminuer fortement au stade adulte. Au contraire, le niveau d'expression de la sous-unité Apisum α 3 augmente au cours du développement tandis qu'on observe une stabilité de l'expression des gènes codant pour les sous-unités Apisum α 7, Apisum α 10 et Apisum β 1. Les sous-unités Apisum α 4 et Apisum α 9 sont soumises à des variations d'expression plus importantes avec un niveau d'expression significativement plus faible au quatrième stade larvaire.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence de forte variation du niveau d'expression des sous-unités chez des larves ayant survécue après 48h d'exposition aux insecticides. Ainsi, on observe une très nette augmentation du niveau d'expression des sous-unités Apisum α 10 et Apisum β 1 tandis que celui de la sous-unité Apisum β 2 diminue, quelque soit l'insecticide testé. En outre, chez l'abeille *Apis cerana cerana*, une modification du niveau d'expression des sous-unités Acc β 1 et Acc β 2 est également observée après exposition des individus à l'IMI ou l'ACE (Yu et coll. 2011). Il semblerait donc que chaque sous-unité β soit différemment impliquée dans la réponse aux insecticides néonicotinoïdes et que ce mécanisme pourrait être général chez les insectes. D'autre part on observe également des variations d'expression des sous-unités qui sont spécifiques d'un insecticide donné. Pour exemple, l'expression des sous-unités Apisum α 1 et Apisum α 3 augmente uniquement après traitement à l'IMI tandis qu'une diminution de l'expression de la sous-unité Apisum α 7 ou Apisum α 4 est caractéristique d'une exposition au TMX ou à la CLT respectivement. Ainsi, certaines sous-unités pourraient être impliquées spécifiquement dans l'action de chaque molécule insecticide.

Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*

Emiliane Taillebois¹, Abdelhamid Beloula¹, Sophie Quincharde¹, Stéphanie Jaubert-Possamai², Antoine Daguin³, Denis Servent⁴, Denis Tagu², Steeve H. Thany^{1*}, Hélène Tricoire-Leignel^{1,5}

1 Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647 USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, Université d'Angers, Angers, France, **2** Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1349, Le Rheu, France, **3** Groupement Interprofessionnel de Recherche sur les Produits Agropharmaceutiques (GIRPA), Angers, France, **4** Institut de Biologie et Technologie (iBTecS), Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Gif-sur-Yvette, France

Abstract

Neonicotinoid insecticides act on nicotinic acetylcholine receptor and are particularly effective against sucking pests. They are widely used in crops protection to fight against aphids, which cause severe damage. In the present study we evaluated the susceptibility of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* to the commonly used neonicotinoid insecticides imidacloprid (IMI), thiamethoxam (TMX) and clothianidin (CLT). Binding studies on aphid membrane preparations revealed the existence of high and low-affinity binding sites for [³H]-IMI (K_d of 0.16±0.04 nM and 41.7±5.9 nM) and for the nicotinic antagonist [¹²⁵I]-α-bungarotoxin (K_d of 0.008±0.002 nM and 1.135±0.213 nM). Competitive binding experiments demonstrated that TMX displayed a higher affinity than IMI for [¹²⁵I]-α-bungarotoxin binding sites while CLT affinity was similar for both [¹²⁵I]-α-bungarotoxin and [³H]-IMI binding sites. Interestingly, toxicological studies revealed that at 48 h, IMI (LC₅₀=0.038 µg/ml) and TMX (LC₅₀=0.034 µg/ml) were more toxic than CLT (LC₅₀=0.118 µg/ml). The effect of TMX could be associated to its metabolite CLT as demonstrated by HPLC/MS analysis. In addition, we found that aphid larvae treated either with IMI, TMX or CLT showed a strong variation of nAChR subunit expression. Using semi-quantitative PCR experiments, we detected for all insecticides an increase of Apisumα10 and Apisumβ1 expressions levels, whereas Apisumβ2 expression decreased. Moreover, some other receptor subunits seemed to be differently regulated according to the insecticide used. Finally, we also demonstrated that nAChR subunit expression differed during pea aphid development. Altogether these results highlight species specificity that should be taken into account in pest management strategies.

Citation: Taillebois E, Beloula A, Quincharde S, Jaubert-Possamai S, Daguin A, et al. (2014) Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*. PLoS ONE 9(5): e96669. doi:10.1371/journal.pone.0096669

Editor: Guy Smagghe, Ghent University, Belgium

Received: November 6, 2013; **Accepted:** April 10, 2014; **Published:** May 6, 2014

Copyright: © 2014 Taillebois et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a specific grant from the French Institute for Agricultural Research (INRA), the Department 'Santé des Plantes et Environnement (SPE)': USC RCIM/UMR BIO3P. E. Taillebois acknowledges the French 'Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur' for financial support in the framework of Ph.D. grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: steeve.thany@univ-angers.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Neonicotinoid insecticides include several compounds such as imidacloprid (IMI), clothianidin (CLT) and thiamethoxam (TMX). They are efficient agonists of insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) which are pentameric receptors formed by identical (homomeric) or different (heteromeric) subunits [1,2,3]. In the context of a stronger legislation on insecticide use to limit environmental and health concerns, approaches to describe and understand the cellular and molecular mechanisms involved in insecticide resistance are needed. Insects represent a very diverse group of animals and most Orders diverged approximately 300 million years ago [4]. As a consequence, adaptive mechanisms that confer insecticide resistance can vary from one order/species to another. Among insect pests that cause damage to agriculture, aphids (Hemiptera) have a particular biology: they feed from phloem sap (not by chewing plant tissues),

and thus transmit plant viruses very efficiently [5]. Their pest status is also attributable to their peculiar reproductive mode [5]. Asexual reproduction of aphids by parthenogenesis (during spring and summer) leads to extremely rapid population growth [6]. Several insecticides, such as neonicotinoids, are used as seed treatment to limit the impact of sucking-pest like aphids, *Sitobion avenae*, *Aphis craccivora* and *Myzus persicae* [7,8].

Bioassay studies have revealed that neonicotinoid susceptibility varies between insect species [8,9,10]. In Hemiptera, IMI showed susceptibility differences with LC₉₅ values between 0.32 and 40 mg.L⁻¹ [9]. Moreover, studies performed with the cotton aphid *Aphis gossypii* demonstrated that one IMI resistant-strain was still susceptible toward TMX and CLT suggesting no cross resistance [10] whereas a cross resistance was found in *Myzus persicae*, with resistance factors of 11, 18 and 100 for IMI, TMX and CLT, respectively [8]. This discrepancy suggested that some

aphid species could carry particular resistance mechanisms. Similar differences could be found using competitive binding studies. In *Aphis craccivora* it was demonstrated that TMX was a non-competitive inhibitor for [³H]-IMI suggesting that it binds to a different site or in a different mode than IMI while in *Myzus persicae*, it was found that the resistant strain with the R81T mutation on the M   1 subunit developed cross-resistance against IMI and TMX demonstrating that they interact with the same site [3]. In addition, saturation studies suggest that IMI binds to high- and low-affinity binding sites in the aphids *M. persicae* and *A. craccivora* [11,12]. Similar high and low affinity binding sites were also identified in *M. persicae* for the nicotinic antagonist,   -Bungarotoxin (  -Bgt) [13]. Altogether these data demonstrate that aphid species can carry different sensitivities against neonicotinoid insecticides.

In this study, we evaluated the binding properties and toxicological effects of IMI, TMX and CLT on the pea aphid and showed that IMI and TMX bind two different nAChR populations, both binding CLT, although the toxicity of CLT is lower than toxicities of IMI and TMX. In addition, using the full sequenced genome of *A. pisum* [14], we demonstrated that the eleven *A. pisum* nAChR subunits previously identified [15] are differentially regulated during aphid development and after neonicotinoid intoxication.

Materials and Methods

Insects

The pea aphid (*A. pisum*) sequenced strain LSR1 (corresponding to the reference genome) was generously provided by INRA-Rennes IGEPP. Unwinged parthenogenetic females were reared on faba bean (*Vicia fabae*) plants in a 16L: 8D photoperiod at constant temperature of 22  C in a climate chamber. Under these conditions, aphids reproduce by viviparous parthenogenesis, as clonal female: new born larvae become adults after four molts. Adults and larvae at each of the 4 stages were collected. Larval stages were determined by identifying the number of antennal segments.

Insecticides

IMI, TMX and CLT were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Insecticides were dissolved in DMSO to give final concentrations of 50 mg.ml⁻¹. For binding experiments, insecticides were dissolved in the corresponding buffer (PBS buffer or Tris-HCl buffer for [¹²⁵I]-  Bgt and [³H]-IMI experiments respectively). For intoxication experiments, insecticides were dissolved in artificial diet at a final concentration of 0.2% DMSO for 100  g/ml and 2% DMSO for 1000   g/ml. These concentrations of DMSO were used as controls in insecticidal assays.

Binding assays

Membrane preparations were isolated from frozen aphids according to the Wiesner and Kayser protocol [12]. Whole aphids were homogenized with a pestle motor in 4  C dissociation medium at pH 7.0. The dissociation medium contained: 20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (dissolved in acetone), and 2   g each of pepstatin, chymostatin, and leupeptin (dissolved in methanol, DMSO, and water, respectively). After homogenization, samples were centrifuged 10 min at 1000 g and supernatant was collected and ultracentrifuged 30 min at 4  C and 43000 g. The precipitate was washed with cold dissociation medium and then ultracentrifuged. The final pellet was resuspended in 3 ml of dissociation medium. Total protein was

quantified by spectrofluorometry at 750 nm according to the Lowry colorimetric method (DC protein assay, Biorad, France) with a range of BSA as a standard. Membrane preparations were conserved at -80  C until use.

  Bgt binding experiments were performed using 40   g of aphid total membrane protein in a total volume of 300   l of PBS Buffer (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, pH = 7.2) + 0.1% of bovine serum albumin and [¹²⁵I]-  Bgt (2200 Ci/mmol, PerkinElmer, USA) as radiolabeled ligand for total binding measurement. For non-specific binding determination, 1   M of cobratoxin was added prior to membrane incubation. In saturation assays, the concentration of [¹²⁵I]-  Bgt varied from 18 nM to 0.9   M to obtain a complete saturation binding curve. Competitive assays were performed with IMI, TMX and CLT. For this purpose, membranes were incubated with various concentrations of unlabeled competitor and [¹²⁵I]-  Bgt at 0.08 nM for CLT and TMX and 0.6 nM for IMI, respectively. Incubations were performed at room temperature during 4 hours and terminated by rapid vacuum filtration using GF/C Glass microfiber filters presoaked in polyethyleneimine 0.5%. Filters were rapidly washed (< 20 s) twice with 5 ml of cold PBS Buffer at 0.01 M and transferred in tubes for immediate counting on a   -counter.

IMI binding experiments were performed using 200   g of aphid total membrane protein in a final volume of 300   l of Tris-HCl Buffer (10 mM, pH = 7.4) and [³H]-IMI (ARC, 40 Ci/mmol) as radiotracer for total binding measurement. For non-specific binding determination, 0.3 mM of unlabeled IMI was added prior to membrane incubation. In saturation assays, the concentration of [³H]-IMI varied from 500 nM to 0.5   M to obtain a complete binding curve. Competitive assays were achieved for CLT, TMX, IMI and   Bgt using 25 nM of [³H]-IMI. Incubations were performed at room temperature during 4 hours and terminated by rapid vacuum filtration using GF/C Glass microfiber filters presoaked in 0.5% polyethyleneimine. Filters were rapidly washed (< 20s) with cold Tris-HCl Buffer and dried for 1 hour before incubation in 5 ml of scintillation liquid (PerkinElmer, USA) and counting.

Insecticidal assays

The susceptibility of *A. pisum* to IMI, TMX and CLT was determined using an artificial diet bioassay according to Sadeghi *et al.* [16]. In brief, adults were put on a feeding apparatus (day D-1) containing 200   l of artificial diet. Then, the first-instar nymphs were transferred (day D0) to freshly prepared diet with insecticide added (treatment series) or DMSO added (control series). For each insecticide, eight concentrations ranging from 0.001 to 1000   g.ml⁻¹ were tested. The mortality was scored after 24 h (day D+1) and 48 h (day D+2). Aphids that were unable to walk were considered dead [8] and were removed. Corrected mortality percentages were calculated using Henderson Tilton's formula after 24 h (day D+1) and 48 h (day D+2) of insecticide exposure.

HPLC-MS/MS analysis

For tissue extraction, 2.4 g of TMX (at LC₅₀) treated aphid larvae were extracted with an acidified (0.2% acetic acid) water-methanol mixture (50/50) in a 50 ml centrifuge tube. Sample extracts were then filtered and purified on Oasis HLB Cartridges (200 mg) (Waters SAS, France). Elution was performed using 6 ml of acetonitrile. The obtained acetonitrile extract after the elution of the Oasis cartridges was reduced to dryness and the residue was re-dissolved in 1 ml methanol-water mixture (10/90). 40   l of each sample was analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

HPLC–MS/MS was performed with an Ultimate 3000 rapid separation liquid chromatography system (Dionex, USA) coupled to an API 4000 Qtrap MS/MS from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Separation was performed on a Phenomenex (Torrance, CA, USA) C18 column at 35  C with a gradient of water/methanol/acetic acid at a flow rate of 0.2 mL.min^{–1} and 5 mM ammonium acetate. MS/MS detection was performed in the multi-reaction-monitoring (MRM) mode using an ESI interface in the positive ion mode. The ionization voltage was 5500V, and the nebulizer and curtain gases were at 50 psi and 25 psi, respectively. The drying gas to assist the solvent evaporation in the source (600  C) was at 40 psi.

Optimisation of MRM transitions, collision energies and cone voltage were performed by direct injection of standard solutions. The optimized parameters for the detection of the two compounds (TMX and CLT) are listed in Table 1. With these parameters, calibration curves were linear over the concentration range of 0.9 to 20   g.L^{–1} with a correlation coefficient (r) greater than 0.99.

Expression of nAChR subunits during developmental stages

Total RNAs were extracted from *A. pisum* adults, at different larval stages (Stage L1 to L4), using RNA Easy mini Plant Kit (Qiagen, Courtaboeuf France). To avoid genomic DNA (gDNA) contamination, total RNAs were treated using DNase I kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to manufacturer recommendations. RNAs were retro-transcribed using random hexamers with RevertAid kit (Thermoscientific, Waltham, USA), dissolved in RNase-free water and conserved at –20  C. DNase treatment was validated by PCR using primers set amplifying intron-containing sequence. Primer sets (Table 2) were designed using Primer3 software based on the *A. pisum* genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Because Dale et al. identified potential alternatively spliced isoforms for Apisum  4 (exon 4) Apisum  6 (exon 6) and Apisum  7 (exon 6 and 7), primers were designed out of these exons, using genome information [14]. Amplification specificity of each primer set was also verified by cloning and sequencing the amplification products (data not shown). Amplification efficiencies were between 88 and 109%, allowing validation of each primer set for qPCR experiments. Because none of the endogenous reference genes had stable expression during developmental stages, external reference gene, *luciferase*, was used for normalization, as previously described [17,18]. Thus, 10 pg/1000 ng of luciferase RNA (Promega, Fitchburg, Wisconsin USA) were added after RNA extraction [17,18].

qPCR experiments were optimized according to MIQE Guideline recommendations [19] using ABI Prism 7700 instrument and 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Experiments were performed in triplicate using 100 ng of total RNA and 150 nM primers in a final volume of 25   L. Product specificity was further assessed by electrophoresis on a 2% agarose gel with a 50 bp ladder and by dissociation curves giving rise to a single peak at the specific melting temperature [20]. Relative expression ratio (R) was calculated according to the Pfaffl formula [21], using primer efficiency (E) and CP value variation between control and sample (  CP) for each nAChR subunit. Ratio were normalized to reference genes and expressed in percentage: $R = \frac{(E_{subunit})^{\Delta CP_{subunit(control\ sample)}}}{(E_{reference})^{\Delta CP_{reference(control\ sample)}}}$. Luciferase was used as reference gene and quantification was relative to the first larval stage (L1).

Table 1. Multireaction monitoring conditions used for the HPLC–MS/MS analysis.

Compound	Ion	Transition	Declustering potential (DP)	Collision energy (CE)	Collision cell exit potential (CEP)	Dwell time (s)	HPLC retention time (tr)(min)
clothianidin	[M+H] ⁺	250>169	46	19	8	250	4.19
clothianidin	[M+H] ⁺	250>132	46	21	10	250	
thiamethoxam	[M+H] ⁺	292>211	56	17	10	250	3.84
thiamethoxam	[M+H] ⁺	292>181	56	33	8	250	

doi:10.1371/journal.pone.0096669.t001

Table 2. Primers used to amplify nicotinic acetylcholine receptors subunits in quantitative PCR experiments.

gene	forward primer		reverse primer		Size (bp)
	name	nucleotidic sequence	name	nucleotidic sequence	
α 1	qpA1S1	CGGTCAITGTCGGTCAGTTG	qpA1R1	TGGCATCGGCACCTCCAT	60
α 2	qpA2S2	GGTCGTACCATCATCATC	qpA2R2	CCACGACGGTATCTTGTC	68
α 3	qpA3S1	GCGAGATTCACGGTCCAATAA	qpA3R1	GGCCATTTGGTTTGTTCG	60
α 4	qpA4S1	GAGTATGGTGGCGTCAATG	qpA4R1	GATATCCGGCCGCAAT	60
α 6	qpA6S1	TGGAGAGACCTGTATCCAACGA	qpA6R1	TGCTGTAGCGTGATGCCAAA	64
α 7	qpA7S1	CATGTATAATAGCGCTGACGAAGGT	qpA7R1	CTGTTGACCAACCGTTGGTT	63
α 8	qpA8S1	GAGGCACATCGACCAATCG	qpA8R1	CGCTTAGATCAATGCCAATC	59
α 9	qpA9S1	GTGCAACCCGTGACGTACAG	qpA9R1	TGCGTGTACATCGCCAATA	65
α 10	qpA10S1	GCACATGGTTCATAGCGAACTG	qpA10R1	GGTGTTCATATTCGCTCGATT	66
β 1	qpB11S1	CGCCGTCCAAACACAAGAT	qpB11R1	CTTGCGTTGGGATGATGCA	62
β 2	qpB2S1	CCGTGAAGAGGAAATACCG	qpB2R1	GAACACGACGACTATCGCTG	65
rpl7	qpRPL7F	GCGCGCCGAGGCTTAT	qpRPL7R	CCGGATTCTTGCAATTTCTTG	81
actin	qpactinF	AGCTCTATTCCAACCTCTCTCT	qpactinR	TGTATGTAGTCTCGTGATACCG	62

doi:10.1371/journal.pone.0096669.t002

Expression of nAChR subunits after neonicotinoid intoxication

To study subunit expression levels after insecticide exposure, relative qPCR was performed on first larval stage L1 exposed during 48 h with each neonicotinoid at LC₅₀ or with DMSO (control condition). Total RNAs were extracted from intoxicated or control first larval stage (L1) using RNA Easy mini plant Kit and the same primers as described above. The results were normalized using the geometric mean of two reference genes, *actin* and *rpl7* and validated using Normfinder software [22,23,24]. Expression levels were relative to control condition.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Data from binding experiments and insecticidal assays were analyzed by nonlinear regression analysis. A T-test ($P < 0.05$; t-test with Welch's correction) was used for insecticidal assays and to compare Ki values. One-Way ANOVA ($p < 0.05$) was used for qPCR experiments and binding assays.

Results

Binding properties of IMI, TMX and CLT on *A.pisum* native nAChRs

Saturation binding experiments were carried out with both [¹²⁵I]- α -Bgt and [³H]-IMI on adult aphid membranes. Results are means of four experiments and the saturation binding parameters are summarized in Table 3. A saturation curve was first determined for [¹²⁵I]- α -Bgt (Figure 1A and 1B) and revealed the presence of two binding sites: a high affinity ($K_d = 0.008 \pm 0.002$ nM and $B_{max} = 12.86 \pm 5.92$ fmol/mg protein) and a low-affinity binding site ($K_d = 1.135 \pm 0.213$ nM and $B_{max} = 135.9 \pm 6.0$ fmol/mg protein). The saturation data obtained for [³H]-IMI (Figure 2A and 2B) were also consistent with the presence of a high affinity ($K_d = 0.16 \pm 0.04$ nM and $B_{max} = 0.051 \pm 0.003$ fmol/mg protein) and a low-affinity binding site ($K_d = 41.7 \pm 5.9$ nM and $B_{max} = 0.434 \pm 0.037$ fmol/mg protein). For both [³H]-IMI and [¹²⁵I]- α -

Bgt saturations curves, the presence of two binding sites was supported by the slope change in the Scatchard representation (Figure 1B and 2B). In addition, we noticed that high affinity binding sites only represented $8.6 \pm 3.8\%$ and $10.4 \pm 5.2\%$ of total [¹²⁵I]- α -Bgt and [³H]-IMI binding sites, respectively (Table 3). The difference between Bmax values for high- and low-affinity binding sites, for both [¹²⁵I]- α -Bgt and [³H]-IMI, is consistent with the presence of these two binding sites on different nAChR populations in the aphid membrane preparation. In addition, the comparison of Bmax values highlighted a larger proportion of [¹²⁵I]- α -Bgt binding sites compared to [³H]-IMI (Table 3). Thus in the pea aphid *A. pisum*, α -Bgt-sensitive nAChRs seem to represent a large majority of nAChR populations.

In a second set of experiments, we studied the binding properties of IMI, TMX and CLT to the different nAChRs. Results are means of four experiments and the competition binding parameters are summarized in Table 3. For both radiotracers ([³H]-IMI and [¹²⁵I]- α -Bgt), we studied the low affinity binding sites, which represent the majority of nAChR subtypes. Inhibition curves with IMI showed the presence of 20% of [¹²⁵I]- α -Bgt residual binding in excess of IMI, suggesting that some of the α -Bgt binding sites were insensitive to IMI (Figure 3A). On the contrary, inhibition was complete using TMX (Figure 3B) and CLT (Figure 3C). Indeed, the inhibition constant (Ki) for α -Bgt with a K_d value of 0.16 nM showed a better binding affinity for CLT and TMX ($K_i = 0.18 \pm 0.05$ μ M and 1.53 ± 0.65 μ M, respectively) compared to IMI ($K_i = 14.61 \pm 1.13$ μ M; One-Way ANOVA, $p < 0.05$, table 3). With [³H]-IMI, no specific binding inhibition was found using α -Bgt, indicating that low-affinity [³H]-IMI binding sites were insensitive to α -Bgt (Figure 4A). Among the tested insecticides, homologous competition (Figure 4B) showed that IMI presents a K_i value of 38.14 ± 6.88 nM which is consistent with the K_d value determined in the saturation experiment (41.7 nM, table 3). Interestingly, high concentrations of TMX and CLT were not able to completely displace [³H]-IMI from its binding sites, with maximal inhibition of 35% for TMX (Figure 4C) and 75% for CLT (Figure 4D). The apparent Ki values calculated from these binding curves were 1.05 ± 0.07 μ M for TMX and 127 ± 42.5 nM for CLT (Table 3). The residual

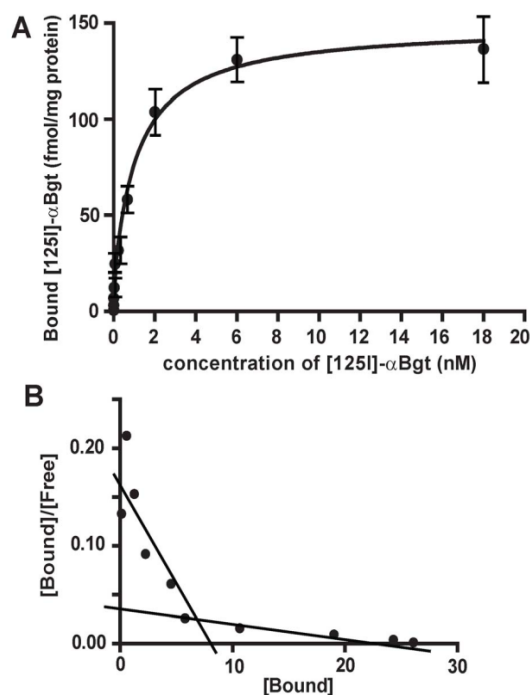


Figure 1. $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ specific binding on pea aphid. Saturation curves (A) and Scatchard plots (B) for $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$ ($\alpha\text{-Bgt}$) specific binding. Membranes were extracted from whole parthenogenetic adults of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* LSR1. Results are means of four experiments. Error bars represent the SEM. doi:10.1371/journal.pone.0096669.g001

binding could be explained by the inability of TMX and CLT to interact with all the nAChR subtypes recognized by IMI, or by an interaction of these ligands that were not strictly competitive with IMI.

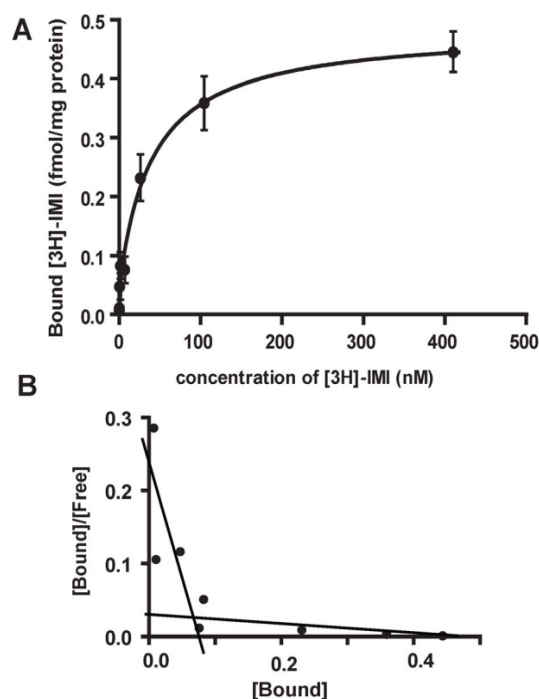


Figure 2. $[^3\text{H}]\text{-imidacloprid}$ specific binding on pea aphid. Saturation curves (A) and Scatchard plots (B) for $[^3\text{H}]\text{-imidacloprid}$ specific binding. Membranes were extracted from whole parthenogenetic adults of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* LSR1. Results are means of four experiments. Error bars represent the SEM. doi:10.1371/journal.pone.0096669.g002

Toxicological effects of neonicotinoids on first-instar aphid larvae

The toxicological effects of neonicotinoids upon *A. pisum* larvae have been previously studied [16]. Using the same method, we found that the three neonicotinoids TMX, CLT, and IMI have

Table 3. $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ ($[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$) and $[^3\text{H}]\text{-imidacloprid}$ ($[^3\text{H}]\text{-IMI}$) binding parameters determined on aphid membranes.

Saturation binding						
	$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$			$[^3\text{H}]\text{-IMI}$		
	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg)	% of high affinity	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg)	% of high affinity
High affinity	0.008 ± 0.002	12.86 ± 5.92	8.6 ± 3.8	0.16 ± 0.04	0.051 ± 0.003	10.4 ± 5.2
Low affinity	1.135 ± 0.213	135.9 ± 6.0		41.7 ± 5.9	0.434 ± 0.037	
Competition binding						
	$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$			$[^3\text{H}]\text{-IMI}$		
	assay level (nM)	IC50 (μM)	Ki (nM)	assay level (nM)	IC50 (μM)	Ki (nM)
Imidacloprid	0.6	22.33 ± 1.73	14.6 ± 1.13^a	25	0.061 ± 0.011	38.14 ± 6.88^c
Thiamethoxam	0.08	1.636 ± 0.701	1.53 ± 0.65^a	25	1.675 ± 0.101	1047.2 ± 63.1^d
Clothianidin	0.08	0.194 ± 0.052	0.18 ± 0.05^b	25	0.203 ± 0.068	126.9 ± 42.5^c
$\alpha\text{-Bgt}$	-	-	-	25	n.d.	n.d.

Ki values were calculated according to Cheng and Prusoff formula considering Kd of low affinity binding sites. n.d.: not determined. IC50: half maximal inhibitory concentration. Results are mean of four experiments and are represented \pm SD. Ki values that are significantly different using One-Way ANOVA ($p < 0.05$) are noted with different letters. doi:10.1371/journal.pone.0096669.t003

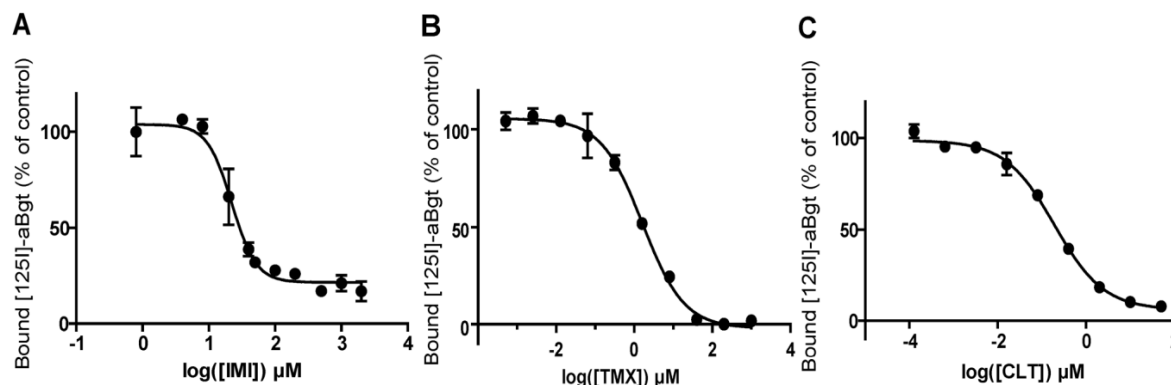


Figure 3. Neonicotinoids inhibition of $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ specific binding. Inhibition curves were determined on membranes of whole parthenogenetic adults of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* for three neonicotinoids: A) imidacloprid (IMI), B) thiamethoxam (TMX) and C) clothianidin (CLT). Results are means of four experiments. Error bars represent the SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0096669.g003

different toxicities against *A. pisum*. All results are presented in table 4 as means of 6 to 8 experiments. We found that TMX was the most toxic ($\text{LC}_{50} = 0.259 \mu\text{g/ml}$) and CLT was the least toxic ($\text{LC}_{50} = 3.458 \mu\text{g/ml}$) after 24 h of exposure. The toxicity of IMI was intermediate with an LC_{50} of $0.913 \mu\text{g/ml}$. The LC_{50} values were significantly lower after 48 h of exposure. Interestingly IMI and TMX showed similar effect ($\text{LC}_{50} = 0.038$ and $0.034 \mu\text{g/ml}$, respectively) whereas CLT remained the least toxic ($\text{LC}_{50} = 0.118 \mu\text{g/ml}$). We suggest that the potency of TMX could be associated to its double action: directly and after metabolization to CLT as previously proposed [25]. Indeed HPLC/MS analysis showed that TMX was metabolized to CLT (Figure 5). In TMX-treated aphids (using TMX at $\text{LC}_{50} = 0.034 \mu\text{g/ml}$) we obtained

final concentrations of $1.34 \mu\text{g/kg}$ of TMX and $1.76 \mu\text{g/kg}$ of CLT, after 48 h of exposure.

Is the expression of aphid nAChR subunits influenced by developmental stage or by exposure to neonicotinoids?

Recently, using the full genome of *A. pisum*, Dale et al. highlighted the presence of 11 genes encoding putative nAChR subunits [15]. We confirmed the expression of these 11 genes in the pea aphid and studied the expression profile of these subunits according to the developmental stage and neonicotinoid exposure. First, qPCR experiments on the different developmental stages demonstrated that the expression of Apisum $\alpha 1$, Apisum $\alpha 2$, Apisum $\alpha 6$, Apisum $\alpha 8$ and Apisum $\beta 2$ was stable at the beginning

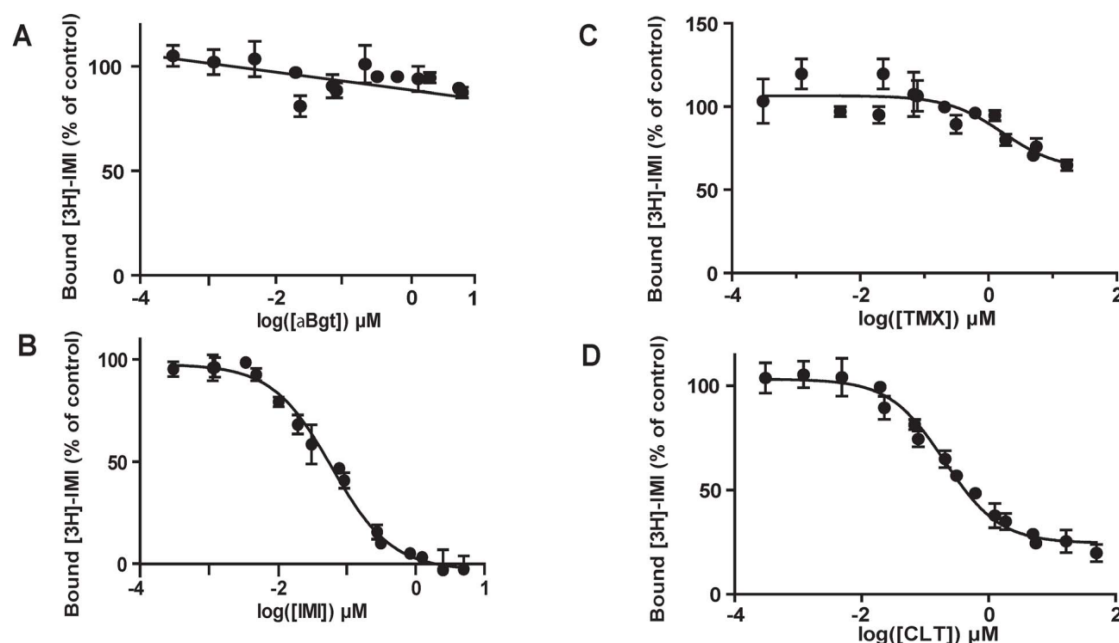


Figure 4. Neonicotinoid inhibition of $[^3\text{H}]\text{-imidacloprid}$ specific binding. Inhibition curves were determined on membranes of whole parthenogenetic adults of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* for (A) $\alpha\text{-Bungarotoxin}$ ($\alpha\text{-Bgt}$) and three neonicotinoids: (B) imidacloprid (IMI), (C) thiamethoxam (TMX) and (D) clothianidin (CLT). Results are means of four experiments. Error bars represent the SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0096669.g004

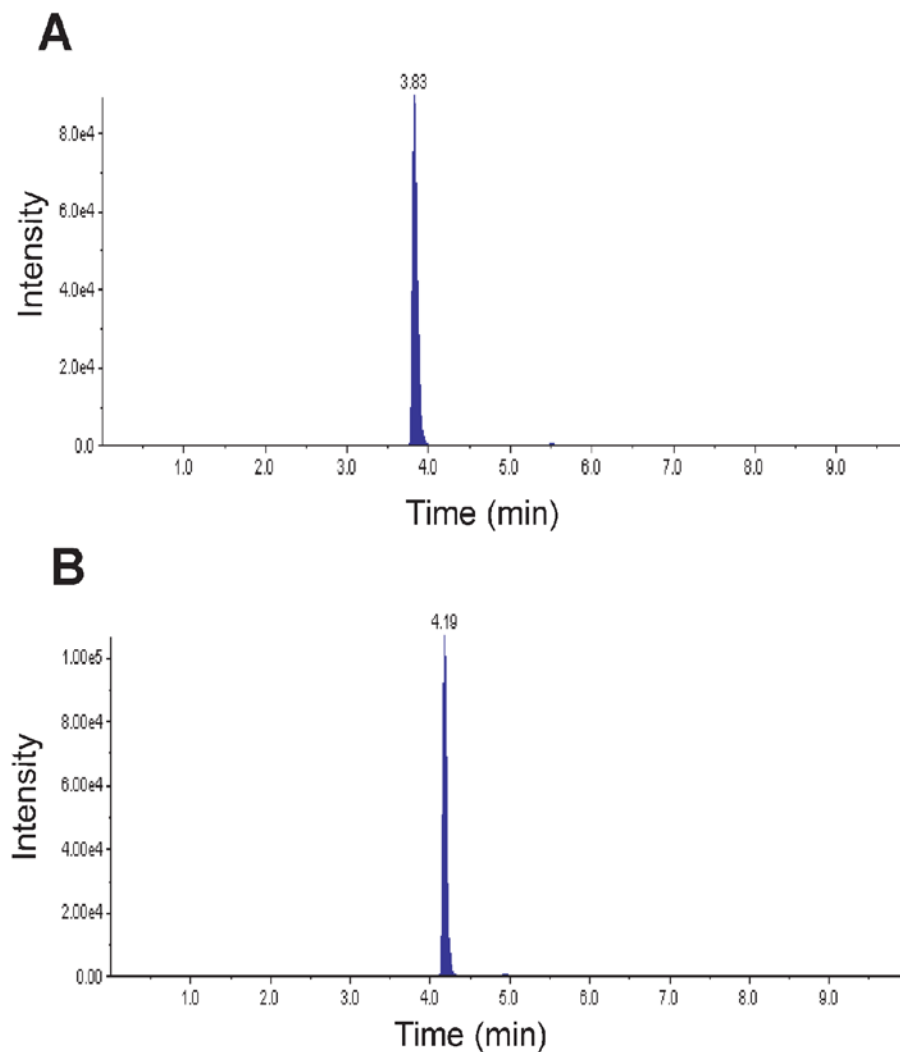


Figure 5. MRM chromatograms. Chromatograms of thiamethoxam (A) and its metabolite clothianidin (B) in 13,400 pea aphid larvae exposed to thiamethoxam at LC₅₀ for 48 h. Intensity represents the peak area of the detected signal.
doi:10.1371/journal.pone.0096669.g005

of aphid development and then was significantly reduced during adulthood (One Way Anova, $p < 0.05$, $n = 3$ experiments in triplicate, figure 6). On the contrary Apisum $\alpha 3$ expression

increased with developmental stages although Apisum $\alpha 7$, Apisum $\alpha 10$ and Apisum $\beta 1$ transcript levels remained stable. The expression level of Apisum $\alpha 4$ and Apisum $\alpha 9$ subunits showed

Table 4. Neonicotinoid toxicity in the pea aphid on first-instar larvae for 24 h and 48 h of insecticide exposure using an artificial diet system.

	24 h		48 h		n
	LC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	CI 95%	LC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	CI 95%	
Imidacloprid	0.913 ^a	0.266 – 3.133	0.038 ^d	0.023 – 0.064	2381
Thiamethoxam	0.259 ^b	0.039 – 1.718	0.034 ^d	0.012 – 0.101	2613
Clothianidin	3.458 ^c	0.834 – 14.34	0.118 ^e	0.009 – 1.62	3016

n = number of insects tested; CI = confidence interval; LC₅₀ = Lethal concentration leading to 50% mortality. Results were corrected using Henderson-Tilton's formula. Values followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$; t-test with Welch's correction). Toxicity curves were determined with 8 concentrations and 6 to 8 replicates were made for each concentration.

doi:10.1371/journal.pone.0096669.t004

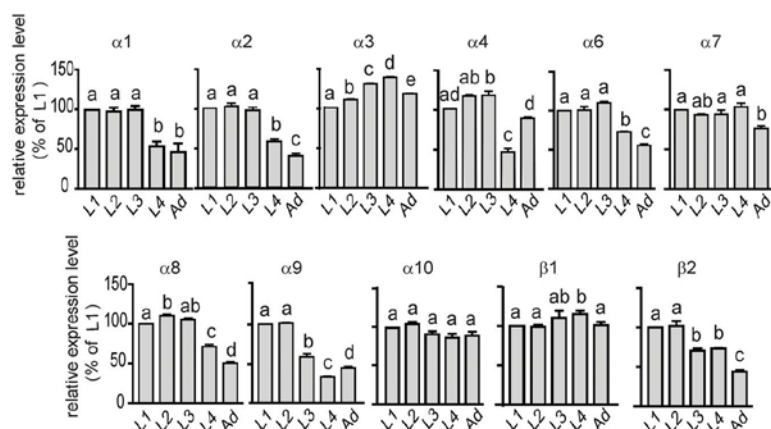


Figure 6. Expression level of nAChR mRNA subunits according to developmental stages of the pea aphid. Quantitative experiments were performed on whole individuals in triplicate. Results are mean of three independent experiments. Relative expression ratio were calculated relative to first-instar nymphs and normalized with external reference gene *luciferase*. Statistical analysis (One-Way ANOVA) was carried out using GraphPad Prism 5 software. For each subunit, expression ratio statistically different according to larval stage are designated by different letters. doi:10.1371/journal.pone.0096669.g006

greater variability, with a lower expression level at the fourth larval stage. Thus, *A. pisum* subunits expression was regulated during developmental stages, suggesting that different nAChR subtypes could be expressed.

Second, qPCR experiments were performed on surviving aphid larvae exposed to IMI, TMX and CLT after 48 h exposure. For this purpose, aphid larvae were intoxicated at the LC₅₀ determined in insecticidal assays. We found that IMI induced a strong variation of nAChR subunits expression compared to control condition, with the exception of Apisumα4, Apisumα6, Apisumα7 and Apisumα9 (Figure 7, n = 4 to 7 experiments in triplicate). We also observed a significant increase of Apisumα10 (+218±40%), Apisumβ1 (+240±40%), Apisumα1 (+120±27%), Apisumα2 (+104±17%) and Apisumα3 (+61±10%), respectively. On the contrary, a decrease was found with Apisumα8 (−34±4%) and Apisumβ2 (−40±4%), respectively (Figure 7A). Aphid larvae treated with TMX showed a significant decrease of Apisumα2 (−23±5%), Apisumα7 (−46±13%), Apisumβ2 (−29±4%) and an increase for Apisumα10 (+90±31%) and Apisumβ1 (+39±13%; figure 7B). Exposure to CLT led to a significant diminution of Apisumα4 (−49±4%), Apisumα8 (−73±4%) and Apisumβ2 (−48±3%) whereas we found a significant increase of Apisumα10 (+56±12%; figure 7C). These data confirmed that the expression of aphid nAChR subunits was differentially modified after exposure to various neonicotinoids.

Discussion

The pea aphid presents several pharmacological binding sites with different affinity for neonicotinoids

In the present studies, saturation binding experiments demonstrated that [³H]-IMI and [¹²⁵I]-α-Bgt labeled high- and low-affinity nAChR binding sites in *A. pisum*. Binding properties of α-Bgt were not well documented in insects but two binding sites have also been found in the aphid *M. persicae* [13]. Interestingly, two specific [³H]-IMI binding sites were likewise reported in the aphids *M. persicae* and *A. craccivora* [11,12]. In the pea aphid, the large difference between B_{max} values for high and low affinity binding sites for both [³H]-IMI and [¹²⁵I]-α-Bgt was in accordance with the presence of these sites on distinct nAChR subtypes and not at various subunit interfaces on the same receptor. In addition,

competitive data showed that [³H]-IMI low affinity binding site was insensitive to α-Bgt. We proposed that IMI could bind to α-Bgt-insensitive nAChR subtypes, which was consistent with data obtained in *M. persicae* and *A. craccivora* [12]. Moreover, in the pea aphid, it seemed that the majority of binding sites was sensitive to α-Bgt, as previously demonstrated in *D. melanogaster* and *M. persicae* [11,12,13]. Competitive experiments also revealed that CLT bound to both [¹²⁵I]-α-Bgt and [³H]-IMI binding sites. CLT was known to interact well with IMI-binding sites in the aphids *M. persicae* and *A. craccivora* [3,26]. Interestingly, only one study referred to competitive experiments between CLT and labeled α-Bgt. Zhang et al. demonstrated a weak inhibitor potency of CLT to [³H]-α-Bgt binding sites in *D. melanogaster* [27]. The apparent discrepancy between these results and ours could be attributed to species specificity. Furthermore, TMX, which was metabolized to CLT, showed a weak binding capacity for [³H]-IMI binding sites and a better binding potency for [¹²⁵I]-α-Bgt binding sites in *A. pisum*. These results are consistent with previous studies describing a lack of TMX competition with [³H]-IMI in other aphid species such as *M. persicae* and *A. craccivora* [3,12]. Unfortunately, there was no data on TMX competitive binding to α-Bgt sites, despite that [³H]-TMX could bind directly in *M. persicae* and *A. craccivora* [28]. We propose that TMX binds to α-Bgt-binding sites in the pea aphid and that this mechanism could be present in other aphid species.

The neonicotinoids IMI, TMX and CLT have different toxicological effects on *A. pisum*

Acute toxicological assays demonstrated that TMX and IMI were more toxic than CLT. Similar data have been found with *A. gossypii* in which IMI was more toxic than both TMX and CLT [10]. Interestingly, in *M. persicae* CLT was found to be a more potent insecticide than IMI [8]. This discrepancy could be linked to variation in the intoxication method and/or susceptibility of aphid species. In other studies, the neonicotinoid susceptibility was evaluated using topical application and a dipping method for *M. persicae* and *A. gossypii*, respectively [8,10]. By contrast, we used an artificial diet protocol previously described by Sadeghi et al. [16]. The LC₅₀ at 48 h for IMI corresponded to the LC₅₀ at 72 h in Sadeghi's study which indicated that the pea aphid strains could be differentially sensitive to neonicotinoids. Moreover, because

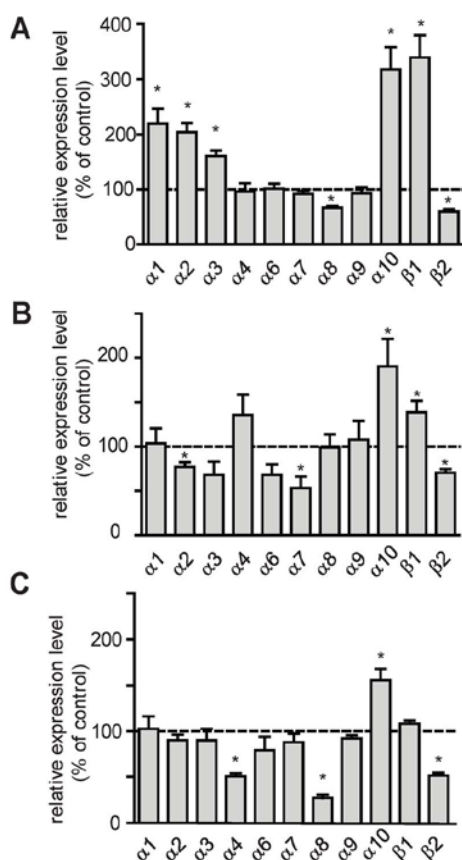


Figure 7. Expression levels of nAChR mRNA subunits after neonicotinoid exposure. Experiments were assessed on whole surviving larvae exposed to neonicotinoids at LC₅₀ for 48h. Aphids were intoxicated with imidacloprid (A) thiamethoxam (B) or clothianidin (C). Each qPCR experiment was performed in triplicate and results are represented as the mean of four to seven independent experiments after normalization with actin and ribosomal *rpl7* gene. Error bars represent the SEM. Results are expressed in % of the expression level in control conditions (no insecticide, corresponding to 100%). Statistical analysis (t-test, $\alpha=0.05$) was carried out using Graphpad Prism 5 software.
doi:10.1371/journal.pone.0096669.g007

part of TMX was metabolized to CLT, we propose that the unusually high toxicity of TMX in *A. pisum* compared to other aphid species, was associated to its metabolite CLT [8,10]. This hypothesis has been previously demonstrated using the moth *Spodoptera frugiperda* and the cockroach *Periplaneta americana*. Indeed, in *S. frugiperda* and *P. americana*, TMX was metabolized 24 h after treatment [25,29]. Nevertheless, in the present study, the proportion of metabolized TMX was different than previous studies [25,29]. Thus, the high insecticidal effect of TMX on the pea aphid could be due to its double action, by acting on nAChRs sensitive to α -Bgt and IMI.

Dale et al identified 11 putative genes encoding nAChR subunits in the pea aphid genome among which three were divergent (Apisum 2, Apisum 9 and Apisum 10) and did not belong to conserved subunit groups between insects species [15]. Using qPCR experiments on surviving larvae, we demonstrated that IMI, TMX and CLT significantly influenced nAChR subunit expression. For all neonicotinoids tested, we found that Apisum 10 was highly expressed after treatment. This subunit is an

uncommon nAChR subunit lacking one cysteine in the Cys-loop and could be involved in distinct functional properties [15]. Previous studies performed with electric ray *Torpedo* demonstrated that α subunit lacking one cysteine in the Cys-loop could co-assemble to form functional receptors that are expressed at the membrane [30]. In *Torpedo* the lack of one cysteine also led to the loss of α -Bgt binding sites [30]. As neonicotinoids bind to α -Bgt binding sites in the pea aphid, we propose that increased expression of Apisum 10 subunit could likewise lead to increased expression of nAChR subtypes that are less sensitive to neonicotinoids. After neonicotinoid exposure, we also observed that Apisum 1 and Apisum 2 were over-expressed after TMX and IMI exposure and Apisum 2 under-expressed after treatment with the three insecticides. Thus, in the pea aphid we proposed that both Apisum 1 and Apisum 2 could be differently involved in the regulation of neonicotinoid sensitivity. Indeed, studies performed on the brown planthopper *Nilaparvata lugens* and the aphid *M. persicae* showed that  1 was part of the IMI binding sites. Mutation of arginine to threonine at position 81 in this subunit induced an increase of resistance against neonicotinoids [31,32,33]. Moreover, recent studies demonstrated that nAChR subunit expression level was associated to neonicotinoid sensitivity [34,35]. For example, a decrease in Acc 1 and Acc 2 subunit expression in the Asiatic honey bee *Apis cerana* was described after IMI exposure [35]. Our results also demonstrated that neonicotinoid toxicity was associated with specific nAChR subunit regulation. For example, Apisum 10 and Apisum 2 were always up- or down-regulated, following treatment with any of the three insecticides. On the contrary, we found that Apisum 7 and Apisum 4 were decreased only after exposure to TMX and CLT and the expression of Apisum 1 and Apisum 3 was increased after IMI exposure. These results suggest that some subunits could be involved in specific insecticide action. Thus, we suggest that high and low affinity binding sites could involve several nAChR subtypes.

Conclusions

Previous studies conclude that nAChR subunits influence the pharmacological properties of nicotinic receptors and thus could modify the neonicotinoid sensitivity [36]. Our results demonstrated that pea aphid nAChR subunits were differentially expressed, first between developmental stages, as previously demonstrated in *Drosophila* and *Apis cerana cerana* [35,37,38], and also according to the neonicotinoid exposure. Neonicotinoid sensitivity could then be dependent on either physiological status and/or environmental conditions in the pea aphid. Moreover, using toxicological and binding studies, we highlighted differences in neonicotinoid sensitivity in the pea aphid as compared to other aphid species and strains [8,10,16]. Thus, the insecticide strategies against aphid pests should be optimized for each particular species. In the pea aphid, the role of divergent subunits Apisum 9, Apisum 10 and Apisum 2 could be of particular interest to further understand the neonicotinoid mode of action.

Acknowledgments

Sylvie Tanguy, Sylvie Hudaverdian and Jo l Bonhomme (IGEPP INRA Rennes) are greatly acknowledged for their help in setting up aphid rearing. We thank Morgane Reynaud and Elodie Marcon (CEA Saclay) for their contribution in preliminary test for binding assays. We also acknowledge Benedicte Dubuc and Cyril Lecorre (UFR Sciences Angers) for horse bean cultivation. Finally we greatly thank Sylvia Anton and Kali Esancy for their critical comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ET HTL SHT DT DS SJP.
Performed the experiments: ET AB AD SQ. Analyzed the data: ET HTL
SHT DS. Wrote the paper: ET HTL SHT.

References

- Tomizawa M, Casida JE (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48: 339–364.
- Tomizawa M, Casida JE (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 247 p+.
- Kayser H, Lee C, Decock A, Baur M, Haettenschwiler J, et al. (2004) Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: I. A structure-activity study of the mode of [3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag Sci* 60: 945–958.
- Engel MS, Grimaldi DA (2004) New light shed on the oldest insect. *Nature* 427: 627–630.
- Dedryver CA, Le Ralec A, Fabre F (2010) The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* 333: 539–553.
- Le Trioumaire G, Hardie J, Jaubert-Possamai S, Simon JC, Tagu D (2008) Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biol Cell* 100: 441–451.
- Miao J, Du ZB, Wu YQ, Gong ZJ, Jiang YL, et al. (2013) Sub-lethal effects of four neonicotinoid seed treatments on the demography and feeding behaviour of the wheat aphid *Sitobion avenae*. *Pest Manag Sci* 69: 1111–1114.
- Foster SP, Cox D, Oliphant L, Mitchinson S, Denholm I (2008) Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci* 64: 1111–1114.
- Jeschke P, Nauen R (2008) Neonicotinoids from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci* 64: 1084–1098.
- Shi XB, Jiang LL, Wang HY, Qiao K, Wang D, et al. (2011) Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pest Management Science* 67: 1528–1533.
- Lind RJ, Clough MS, Reynolds SE, Earley FGP (1998) [H-3]imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62: 3–14.
- Wiesner P, Kayser H (2000) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 221–230.
- Lind RJ, Clough MS, Earley FGP, Wonnacott S, Reynolds SE (1999) Characterisation of multiple alpha-bungarotoxin binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 979–988.
- Consortium TIAG (2010) Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLOS BIOLOGY* 8.
- Dale RP, Jones AK, Tamborinduguy C, Davies TG, Amey JS, et al. (2010) Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 141–153.
- Sadeghi A, Van Damme EJ, Smagghe G (2009) Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *J Insect Sci* 9: 1–8.
- Smith RD, Brown B, Ikonomi P, Schechter AN (2003) Exogenous reference RNA for normalization of real-time quantitative PCR. *Biotechniques* 34: 88–91.
- Johnson DR, Lee PK, Holmes VF, Alvarez-Cohen L (2005) An internal reference technique for accurately quantifying specific mRNAs by real-time PCR with application to the tceA reductive dehalogenase gene. *Appl Environ Microbiol* 71: 3866–3871.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 243: 154–160.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (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: 5245–5250.
- McCulloch RS, Ashwell MS, O'Nan AT, Mente PL (2012) Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. *J Anim Sci Biotechnol* 3: 36.
- Zhou ZJ, Zhang JF, Xia P, Wang JY, Chen S, et al. (2014) Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time polymerase chain reaction in human cartilage endplate of the lumbar spine. *PLoS One* 9: e88892.
- Benzidane Y, Touinsi S, Motte E, Jadas-Hecart A, Communal PY, et al. (2010) Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Management Science* 66: 1351–1359.
- Zhang AG, Kayser H, Maiefisch P, Casida JE (2000) Insect nicotinic acetylcholine receptor: Conserved neonicotinoid specificity of [H-3]imidacloprid binding site. *Journal of Neurochemistry* 75: 1294–1303.
- Zhang NJ, Tomizawa M, Casida JE (2004) *Drosophila* nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and alpha-bungarotoxin binding to distinct sites. *Neuroscience Letters* 371: 56–59.
- Wellmann H, Gomes M, Lee C, Kayser H (2004) Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: II. An unusual high affinity site for [H-3]thiamethoxam in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Management Science* 60: 959–970.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Salgado VL, Kaussmann M (2003) Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76: 55–69.
- Sumikawa K, Gehl VM (1992) Assembly of Mutant Subunits of the Nicotinic Acetylcholine-Receptor Lacking the Conserved Disulfide Loop Structure. *Journal of Biological Chemistry* 267: 6286–6290.
- Li J, Shao Y, Ding ZP, Bao HB, Liu ZW, et al. (2010) Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 17–22.
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, et al. (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *Bmc Neuroscience* 12.
- Slater R, Paul VL, Andrews M, Garbay M, Camblin P (2012) Identifying the presence of neonicotinoid-resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest Manag Sci* 68: 634–638.
- Markussen MDK, Kristensen M (2010) Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit Md alpha 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Management Science* 66: 1257–1262.
- Yu XL, Wang M, Kang MJ, Liu L, Guo XQ, et al. (2011) Molecular Cloning and Characterization of Two Nicotinic Acetylcholine Receptor Beta Subunit Genes from *Apis Cerana* Cerana. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 77: 163–178.
- Lansdell SJ, Millar NS (2000) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39: 671–679.
- Grauso M, Reenan RA, Culetto E, Sattelle DB (2002) Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, D alpha 5, D alpha 6 and D alpha 7 in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics* 160: 1519–1533.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG (2007) The nicotinic acetylcholine receptor subunit Md alpha 6 from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect Molecular Biology* 16: 325–334.

2) Etude du mode d'action de deux dérivés fluorescent du thiamethoxam chez *A. pisum* et *P. americana*.

Ces résultats font l'objet de la **publication n°2**.

« Synthesis and biological activity of fluorescent neonicotinoid insecticide thiamethoxam. »

Emiliane Taillebois, Paul Langlois, Thomas Cunha, Denis Séraphin and Steeve H. Thany
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2014)

Résumé de la publication

Deux dérivés fluorescents (nommés 3 et 4) du TMX ont été synthétisés sur la base d'études précédentes indiquant les groupements chimiques indispensables à l'activité insecticide.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la toxicité des ces dérivés chez le puceron *A. pisum* en utilisant un système de nutrition artificiel. Le dérivé 3 apparaît 1,2 et 16,5 fois plus toxique que le dérivé 4 après 24h et 48h d'intoxication respectivement. De plus, l'imagerie confocale a permis de vérifier la présence des deux dérivés dans le tractus digestif et les trachées chez les pucerons intoxiqués. Les dérivés 3 et 4 sont donc bien ingérés par les pucerons, attestant que la différence de sensibilité n'est pas liée à une différence dans le comportement nutritif des insectes.

Dans un second temps, l'action des dérivés du TMX au niveau des nAChRs post-synaptiques a été déterminée par des expériences de mannitol-gap. Les résultats montrent que les deux dérivés induisent bien une dépolarisation dose-dépendante et réversible au niveau du sixième ganglion abdominal de la blatte *P. americana*. De plus, l'utilisation d'antagonistes muscarinique et nicotinique a permis de confirmer que les dérivés 3 et 4 agissent comme agoniste des récepteurs nicotiques bien que leur action soit inférieure à celle du TMX non fluorescent. En outre, il est intéressant de noter que le composé 4 est plus efficace que le 3 au niveau synaptique tandis que le composé 3 est plus toxique *in vivo*. Ces deux dérivés fluorescents du TMX pourraient donc être utilisés dans de futures études afin d'identifier le mode d'action du TMX au niveau du SNC des insectes.

ARTICLE IN PRESS

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Synthesis and biological activity of fluorescent neonicotinoid insecticide thiamethoxam

Emiliane Taillebois^a, Paul Langlois^a, Thomas Cunha^b, Denis Seraphin^b, Steeve H. Thany^{a,*}
^a Laboratoire R cepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/JUSC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, Universit  d'Angers, UFR sciences, 2 Bd. Lavoisier, 49045 Angers, France

^b Laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS), UPRES EA 921/SFR 4207 QUASAV, UFR Sciences Pharmaceutiques, 16 Bd. Daviers, 49045 Angers Cedex 01, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 March 2014
Revised 13 May 2014
Accepted 15 May 2014
Available online xxxx

Keywords:
Neonicotinoid
Insecticide
Thiamethoxam
Insect
Nicotinic receptor

ABSTRACT

Here, we describe the synthesis of two new fluorescent derivatives of thiamethoxam and compared their toxicity on aphid *Acyrtosiphon pisum* and their mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors expressed on the sixth abdominal ganglion. The compound **3** with two 2-chlorothiazole moieties was found to be more toxic using toxicological bioassays 24 h and 48 h after exposure while compound **4** appeared more active using cockroach ganglionic depolarization. Interestingly, thiamethoxam appeared more effective than component **3** and **4**, respectively. Our results demonstrated that component **3** and **4** act as agonists of insect nicotinic acetylcholine receptors.

  2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Neonicotinoid insecticides are major class of compounds used for systemic control of plant-sucking insects, replacing the organophosphates, carbamates, pyrethroids and other classes of compounds.¹ Their physico-chemical properties render them useful for a wide range of application techniques such as foliar, seed treatment, soil drench and stern application. The term of neonicotinoid was originally proposed for imidacloprid (IMI) which was introduced into the market in 1991 and became one of the most important insect control chemicals.^{2,3} The mode of action of neonicotinoids has been studied and continuous to be characterized extensively. They act as agonists of insect synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs).^{1,4,5} Other neonicotinoids are commercialized since the introduction of IMI, such as thiamethoxam (TMX)⁶ (Fig. 1). TMX is a second-generation of neonicotinoid synthesized in 1991 which was considered as a pro-drug.⁷ However, there are aspects of the thiamethoxam–insect interaction that remain unclear. Continuing our interest in the investigation of neonicotinoid insecticides mode of action, we report the synthesis and biological activities of fluorescent TMX derivatives on aphid and cockroach synaptic transmission. The

main purpose of the present work is to synthesize TMX compounds which could be used to identify the mode of action of TMX on insect central nervous system.

Previous work pointed out that the replacement of the oxygen atom of the oxadiazine heterocycle of TMX by nitrogen was not detrimental to the insecticidal activity.^{8–10} Indeed, essential parts of the neonicotinoid pharmacophore of TMX are the *N*-nitroguandine and the 2-chlorothiazole moieties. A large substituent, that is, 1-arylacetyl, to the 5-position of the hexahydrotriazine core of aza-analogs of TMX was reported as highly favourable to the activity.⁹ Therefore, the fluorescent aza analogs of TMX **3** and **4** were prepared by linking a dansylamide to a 1,3,5-hexahydrotriazine bearing a 2-*N*-nitroimine and a chloro-5-thiazolylmethyl appendages. The route for the synthesis of the probes **3** and **4** begun with the dansylation of 1,4-diaminopropane, leading to the primary amine **1**.¹¹ The classical three components Mannich reaction then

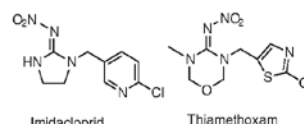


Figure 1. Chemical structures of imidacloprid and thiamethoxam.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 241735213; fax: +33 (0) 241735215.
E-mail address: steeve.thany@univ-angers.fr (S.H. Thany).

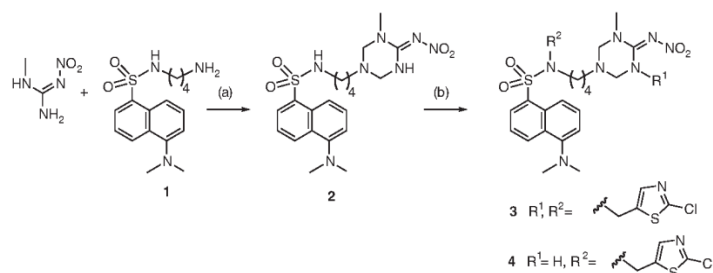


Figure 2. Chemical structures of TMX, probes 3 and 4.

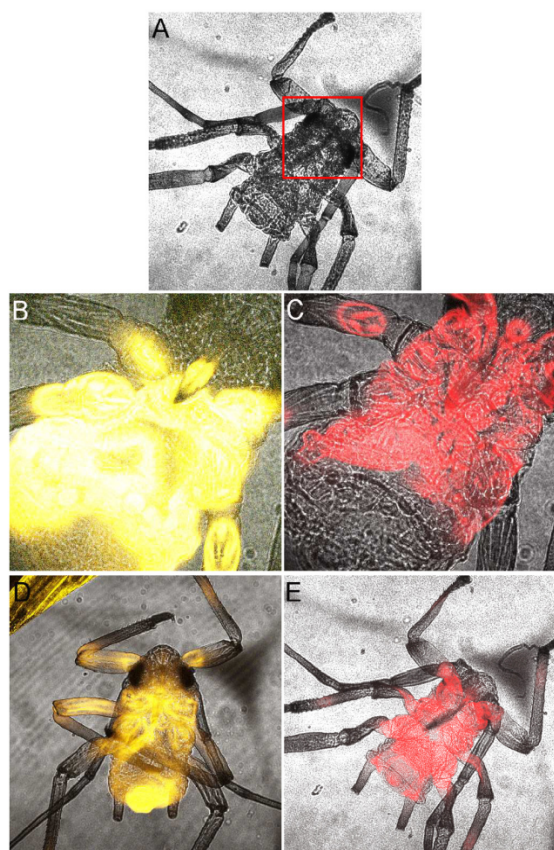


Figure 3. Fluorescence recorded on pea aphid *A. pisum* larvae. (A) Illustrates fluorescence recorded at 24 h after exposure for probes 3 (B) and 4 (C), respectively. (D) and (E) represent fluorescence for probes 3 and 4 at 48 h after exposure, respectively.

afforded the fluorescent 1,3,5-hexahydrotriazine 2. The chloro-substituted aromatic ring was then introduced in the last step, by the alkylation of 2 with 2-chloro-5-chloromethylthiazole under basic condition (K₂CO₃). However, under these conditions, alkylation takes first place on the sulfamide nitrogen. Therefore, with an excess of alkylating agent, a mixture of the mono and bis chlorothiazole, respectively, 4 and 3 was obtained as the targeted fluorescent probes (Fig. 2).

The susceptibility of *Acyrtosiphon pisum* to probes 3 and 4 was determined using artificial diet bioassay.^{12–14} The two probes, 3 and 4 appeared in all tractus and trachea demonstrating that they were fed by *A. pisum* larvae (Fig. 3). We also found that they were highly toxic 48 h after larval exposure but 100% mortality was found for probe 3 with an LC₅₀ of 2.24 ± 0.13 µg/ml compared to 4, 36.99 ± 1.50 µg/ml (Fig. 4). The presence of two 2-chlorothiazole moieties could facilitate the effects of compound 3 on toxicological bioassays. Indeed, 3 appeared also more toxic than 4 at 24 h after exposure. The LC₅₀ values were 82.27 ± 5.64 µg/ml and 98.61 ± 1.67 µg/ml, respectively, and only the R¹ moieties were different between 3 and 4.

In a second step of experiments, the effect of both probes 3 and 4 on ganglionic depolarization was performed to study their effects on postsynaptic nAChRs.^{15–19} Thus, each compound was dissolved in saline solutions containing DMSO (0.01% in final solution).²⁰ Bath application of 3 and 4 induced a reversed and dose-dependent depolarization of the sixth abdominal ganglion. The EC₅₀ values were 36.7 ± 0.1 µM, 39.8 ± 0.4 µM and 58.5 ± 0.5 µM for compounds 3, 4 and TMX, respectively (Fig. 5A). The dose–response curves demonstrated that component 3 and 4 were less effective than TMX to induce a maximum depolarization of the sixth abdominal ganglion. In addition, as previously demonstrated with TMX,²¹ we found also that bath application of 3 and 4 did not block the amplitude of the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked by electrical stimulation of the ipsilateral cercal nerve XI, when the depolarization reached a peak (Fig. 5B). It was noted that compared to TMX and compound 3, the EPSPs induced by bath application of 4 was reduced to 50%, 20 min after wash-out. In order to confirm that 3 and 4 effects were associated to nicotinic receptors, all compounds were tested with muscarinic and nicotinic antagonists, atropine (Atr) and mecamylamine (Mec), respectively. The amplitudes of 3- (13.11 ± 1.1 mV, N = 6) and 4-evoked (22 ± 1.3 mV) depolarizations were not affected by 50 µM Atr (10.5 ± 1.6 mV and 17.6 ± 2.83, N = 6, Fig. 6) but they were reduced by 5 µM Mec. Thus, under bath application of 3, data were reduced from 13.11 ± 1.1 mV to 5.2 ± 1.6 mV (Fig. 6A) and with 4, from 22 ± 1.3 mV to 9.8 ± 2.8 mV (Fig. 6B). These results were consistent with those observed in our previous studies and they confirmed that these fluorescent TMX derivatives acted as agonists of insect nAChRs.²¹

In conclusion, we have successfully developed two fluorescent derivatives of TMX and studied their biological activity. Emission spectra showed all derivatives had a broad and slightly green-shift emission. Toxicity against pea aphid *Acyrtosiphon pisum* supports their use as neonicotinoid insecticides to study TMX effect against pest insects. In addition, mannitol-gap experiments demonstrated that at synaptic level, compound 4 is more efficacious than

ARTICLE IN PRESS

E. Taillebois et al./Bioorg. Med. Chem. Lett. xxx (2014) xxx–xxx

3

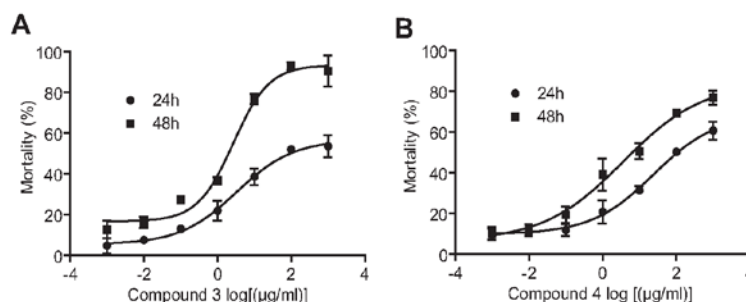


Figure 4. Insecticidal assay on pea aphid *Acyrthosiphon pisum* using artificial diet. The mortality was assayed 24 h and 48 h after treatment. (A) and (B) represent probes 3 and 4, respectively. Henderson Tilton's formula was used to calculate the mortality percentage for each treatment.

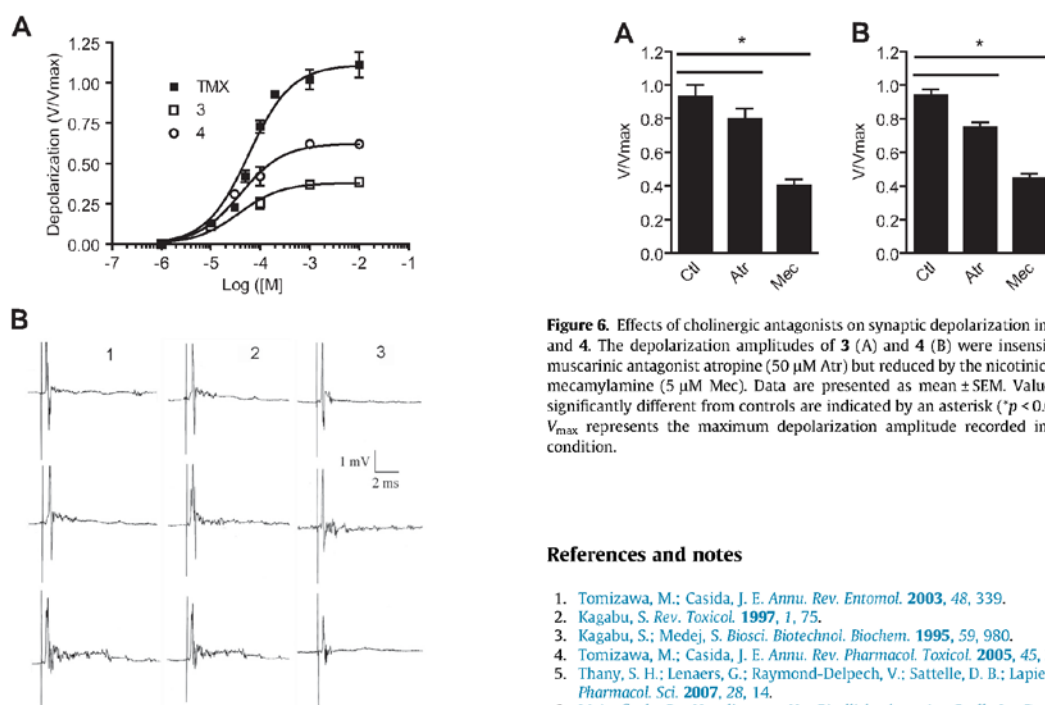


Figure 5. Effect of TMX and its derivatives on synaptic depolarization. (A) Semi-logarithmic dose response-curve for TMX and probes 3 and 4. V_{max} is the maximum TMX-induced depolarization at 1 mM (see Ref. 21). Data are mean \pm SEM and are pooled from 10 preparations. (B) Stimulation of the ipsilateral nerve XI evoked a compound EPSPs recorded under bath application of TMX (1), probes 3 (2) and 4 (3). Upper trace is before application, middle trace is during bath application and lower trace after bath application of the component.

compound 3 despite that they act as agonists of postsynaptic nAChRs expressed on the sixth abdominal ganglion.

Acknowledgments

This work is supported by a Grant from the French Institute for Agricultural Research (INRA), the Department 'Sant   des Plantes et Environnement (SPE)'. E. Taillebois is granted by the French 'Minist  re de l'Enseignement Sup  rieur et de la Recherche'. We are grateful to Dr. Olivier List for its help on confocal imaging.

References and notes

- Tomizawa, M.; Casida, J. E. *Annu. Rev. Entomol.* **2003**, *48*, 339.
- Kagabu, S. *Rev. Toxicol.* **1997**, *1*, 75.
- Kagabu, S.; Medej, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 980.
- Tomizawa, M.; Casida, J. E. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 247.
- Thany, S. H.; Lenaers, G.; Raymond-Delpech, V.; Sattelle, D. B.; Lapied, B. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 14.
- Maiefisch, P.; Huerlimann, H.; Rindlisbacher, A.; Gsell, L.; Dettwiler, H.; Haettenschwiler, J.; Sieger, E.; Walti, M. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 165.
- Nauen, R.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Salgado, V. L.; Kaussmann, M. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2003**, *76*, 55.
- Zhang, A.; Kayser, H.; Maiefisch, P.; Casida, J. E. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1294.
- Sun, C.; Zhu, J.; Wang, H.; Jin, J.; Xing, J.; Yang, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 11.
- Sun, C. W.; Wang, H. F.; Zhu, J.; Yang, D. R.; Jin, J.; Xing, J. H. *Heterocycl. Chem.* **2011**, *48*, 829.
- Ohba, Y.; Kanao, Y.; Takatsuji, M.; Ito, M.; Yabuta, N.; Nojima, H.; Kita, Y. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3754.
- Sadeghi, A.; Van Damme, E. J.; Smagghe, G. *J. Insect. Sci.* **2009**, *9*, 1.
- Taillebois, E.; Beloula, A.; Quinchard, S.; Jaubert-Possamai, S.; Daguin, A.; Servent, D.; Tagu, D.; Thany, S. H.; Tricoire-Leignel, H. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96669.
- Toxicological bioassays*: The first-instar nymphs were transferred to freshly prepared diet with insecticide or DMSO (control condition). For each compound, eight concentrations ranging from 0.001 to 1000 μ g ml⁻¹ were tested. The mortality was scored 24 h and 48 h after exposure, using Henderson Tilton's formula. In the same time, 24 h and 48 h after exposure, we evaluated fluorescence using confocal imaging.
- Callec, J. J.; Boistel, J. C. *R. Seances Soc. Biol. Fil.* **1966**, *160*, 2418.
- Callec, J. J. In: *Insect Neurobiology*, 1974, 119.
- Callec, J. J.; Sattelle, D. B. *J. Exp. Biol.* **1973**, *59*, 725.
- Buckingham, S.; Lapied, B.; Corronc, H.; Sattelle, F. *J. Exp. Biol.* **1997**, *200*, 2685.

Please cite this article in press as: Taillebois, E.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.052>

ARTICLE IN PRESS

4

E. Taillebois et al./Bioorg. Med. Chem. Lett. xxx (2014) xxx–xxx

19. Thany, S. H. *NeuroToxicology* **2009**, *1045*, 30.
20. *Mannitol gap experiment*: Compounds **3**, **4** and TMX were applied during 3 min in the same condition as previously published, with a micropump fast perfusion (Harvard Apparatus) that produced a constant solution exchange (500 µL/min). All muscarinic and nicotinic antagonists were bath-applied for at least 20 min before a single application of each compound. Recordings were made at room temperature (20 °C).
21. Thany, S. H. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 587.

3) Détermination de la toxicité de l'acétamipride (ACE) chez le puceron *A. pisum* et deux souches différentes de *M. persicae*.

Ce travail fait l'objet d'une publication soumise au Journal Bioorganic and Medicinal Chemistry (publication n°3 en annexe)

3.1) Contexte de l'étude

La comparaison de la toxicité des néonicotinoïdes IMI, TMX et CLT déterminée dans la publication n°1 avec les données de la littérature a mis en évidence des spécificités qui pourraient être liées soit au mode d'intoxication soit à des différences de sensibilité entre les espèces. Du fait de l'utilisation de multiple protocole d'intoxication dans les différentes études publiées, il est difficile de discriminer la part de variation liée au protocole de celle liée à une différence de sensibilité entre espèces.

Le puceron du pêcher, *M. persicae*, est un ravageur de culture important. Les néonicotinoïdes sont largement utilisés dans la protection des cultures contre ce ravageur mais des résistances ont été observées depuis quelques années. Ainsi la souche FRC de *M. persicae* a été identifiée dans le sud de la France et le nord de l'Espagne en 2009 (Slater et coll. 2012). Il s'agit de la première souche présentant une résistance en champ aux néonicotinoïdes liée à une modification des nAChRs. Cette souche présente une mutation R81T au niveau de la sous-unité Mp β 1, qui entraîne la perte du site de liaison de haute affinité pour l'IMI (Bass et coll. 2011). De plus, des études toxicologiques ont montrées que cette souche FRC présente une résistance croisée pour trois autres néonicotinoïdes: le TMX, l'ACE et le THI.

L'objectif de cette étude est de déterminer la toxicité de l'ACE, sur trois souches de pucerons en utilisant le même protocole d'intoxication. En plus du puceron du pois *A. pisum*, nous avons choisi deux souches de puceron du pêcher *M. persicae*: la souche sensible de référence 4106A et une souche résistante nommée 1300145, qui présente une mutation R81T au niveau de la sous-unité Mp β 1.

3.2) Comparaison de la toxicité de l'acétamipride chez *A. pisum* et *M. persicae*

La sensibilité des trois souches de pucerons à l'ACE a été déterminée à l'aide d'un système de nutrition artificiel comme décrit précédemment. Ainsi, les deux souches de pucerons sensibles, *A. pisum* et *M. persicae* 4106A, présentent un profil de toxicité similaire. On atteint 100 % de mortalité après 48h d'exposition mais on observe un plateau à 33 % et 70 % de mortalité au niveau de la courbe à 24h d'exposition pour *A. pisum* et *M. persicae* 4106A respectivement (figure 18A et B). La comparaison des valeurs de CL₅₀ (concentration induisant 50 % de mortalité) montre que la souche 4106A est plus sensible à l'ACE que *A. pisum* (figure 18C). Chez la souche résistante 1300145, on observe une diminution de la sensibilité à l'ACE comparée à la souche sensible 4106A. En effet, on note un décalage des courbes de toxicité vers des concentrations plus élevées pour la souche 1300145 ainsi qu'une diminution de la mortalité maximale observée (figure 18B). Après 24h d'intoxication, la mortalité maximale observée est de 70 % et 33 % pour les souches 4106A et 1300145 respectivement. Après 48h d'intoxication, la mortalité maximale est de 100 % pour la souche 4106A et de seulement 70 % pour la souche 1300145. La comparaison des valeurs de CL₅₀ montre que la souche 1300145 est 95 fois plus résistante à l'ACE que la souche 4106A (figure 18C). Ce facteur de résistance (RF) est comparable à celui déterminé pour la souche FRC (RF = 82) avec un autre mode d'intoxication (Slater et coll. 2012). Il est intéressant de noter que la mortalité maximale observée à 24h chez la souche résistante de *M. persicae* est équivalente à celle observée chez le puceron du pois. Les deux espèces de pucerons testées, *A. pisum* et *M. persicae*, présentent donc des différences de sensibilité à l'ACE, le puceron du pêcher étant plus sensible que le puceron du pois.

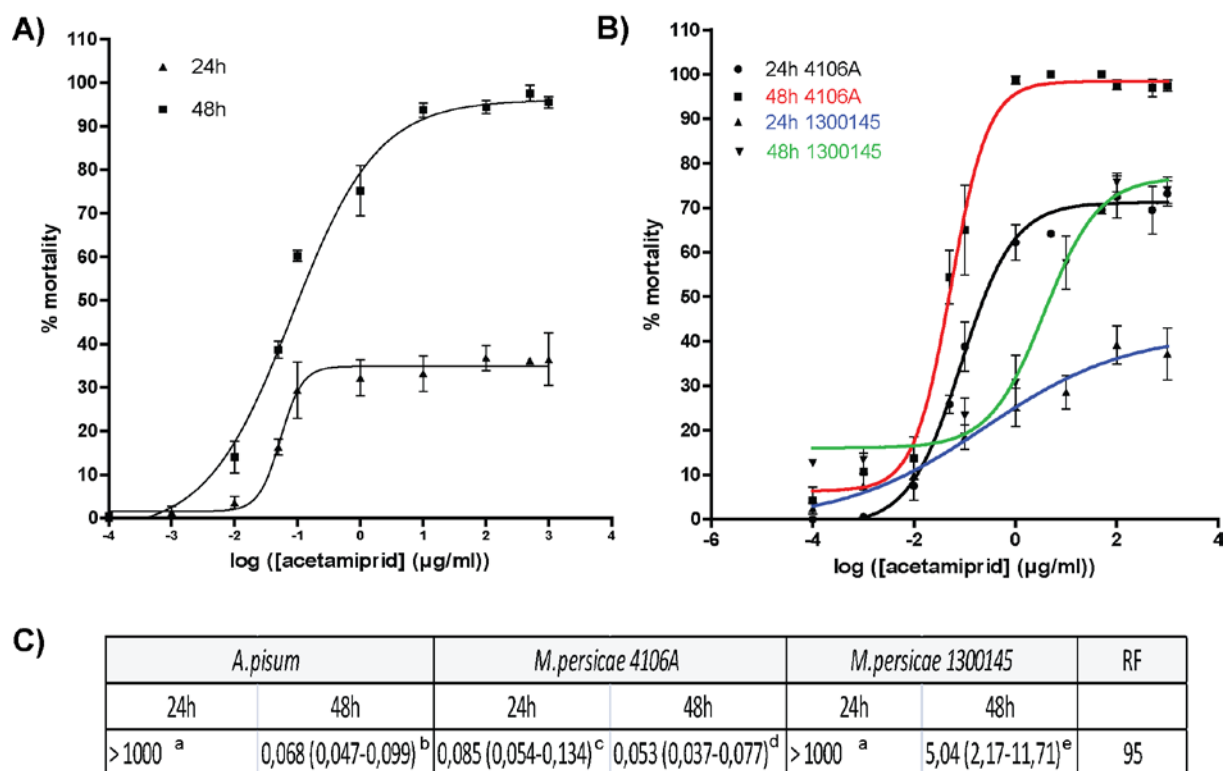


Figure 18. Détermination de la sensibilité à l'acétamidride de trois souches de puceron. Les courbes de toxicité à 24h et 48h d'exposition ont été déterminées pour le puceron du pois *A. pisum* (A) et pour deux souches de puceron du pêcher *M. persicae* (4106A, sensible et 1300145, résistante avec une mutation R81T de la sous-unité Mpβ1). Les valeurs de CL₅₀ (en µg/ml avec IC95%) sont résumées dans le tableau C. Les valeurs statistiquement différentes (test-t, p<0.005) sont indiquées par des lettres différentes.

Chapitre 2. Caractérisation moléculaire des sous-unités de récepteurs nicotiques chez la blatte *P. americana* et le puceron *A. pisum*.

Les récepteurs nicotiques d'insectes sont composés de cinq sous-unités, dont la nature influence les propriétés des récepteurs (Lansdell et coll. 2000 b). Avant de pouvoir identifier la composition des sous-types de nAChRs chez une espèce d'insecte donnée, il est indispensable de caractériser la diversité, la structure et le niveau d'expression des sous-unités exprimées chez cette espèce. L'objectif de ce chapitre est de caractériser les différentes sous-unités exprimées chez deux espèces d'insectes d'intérêt, le puceron du pois en tant que ravageur de culture et la blatte en tant que modèle d'étude des récepteurs natifs par électrophysiologie. Le génome du puceron du pois ayant été récemment séquencé, une étude exhaustive des sous-unités potentiellement exprimées est envisageable. Bien que le génome de la blatte ne soit pas disponible, de nombreuses séquences de sous-unités de nAChRs ont été identifiées au laboratoire (Tricoire-Leignel et coll. en préparation).

1) Diversité des sous-unités de nAChRs chez la blatte *P. americana* et le puceron *A. pisum*.

1.1) Identification des sous-unités de nAChRs exprimées chez la blatte et le puceron.

Au total 8 sous-unités (Pam α 1-4, Pam α 6-8 et Pam β 1) ont été identifiées au niveau de la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana*. L'alignement de ces séquences protéiques est présenté sur la figure 19. Chez le puceron du pois *A. pisum* 11 gènes codant potentiellement pour des sous-unités de nAChRs ont été identifiés dans le génome (Dale et coll. 2010). Parmi celles-ci, neuf sont des sous-unités α (Apisum α 1-4 et 6-10) et deux sont des sous-unités β (Apisum β 1-2). A partir des données génomiques présentes dans les bases de données (www.ncbi/genbank; mise à jour au 06/06/2014) ainsi que des séquences protéiques et

nucléotidiques publiées ou non (Dale et coll. 2010; Liu et coll. 2013; AphidBase <http://w3.rennes.inra.fr/AphidBase/>), la séquence codante de chaque sous-unité a été reconstruite. L'alignement des séquences protéiques est présenté dans la figure 20.

Liu et son équipe ont récemment cloné les séquences de sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois (Liu et coll. 2013) mais les séquences ne sont pas encore disponibles dans les bases de données et seules les séquences protéiques sont présentées dans la publication. Lors de la comparaison des séquences protéiques publiées par l'équipe de Liu et celles à notre disposition, nous avons noté quelques différences:

- Sur la sous-unité Apisum α 4, les 123 premiers acides aminés de la séquence clonée par Liu et coll. sont absents de la séquence nucléotidique disponible. Il n'a pas été possible de retrouver la portion de séquence correspondante dans le génome du puceron. Ainsi, la séquence nucléotidique de la sous-unité Apisum α 4 dont nous disposons reste partielle avec une absence de la portion du domaine N-terminal codant notamment pour les boucles D et A.

- Pour la sous-unité Apisum α 2, 9 acides aminés supplémentaires sont présents en amont de la séquence protéique disponible dans les bases de données par rapport à celle publiée par Liu et coll. Ces 9 résidus sont codés par les 45 nucléotides présents en amont de l'exon 1. On a ainsi pu reconstituer la séquence nucléotidique complète de la sous-unité Apisum α 2 avec le peptide signal.

- Enfin, pour la sous-unité Apisum α 10, la comparaison des séquences disponibles à celle publiée par Liu et coll., montre une différence au niveau de la portion de séquence codée par l'exon 7. Il pourrait donc s'agir d'isoformes différentes résultant d'un épissage alternatif. L'exon alternatif putatif n'a pu être retrouvé dans le génome du fait de l'absence de la séquence nucléotidique correspondante.

L'analyse de la séquence protéique des différentes sous-unités chez la blatte et le puceron montre la présence des domaines fonctionnelles caractéristiques des sous-unités de nAChRs avec 6 boucles (notées A à F) et les deux cystéines formant la « cys-loop » au niveau

du domaine N-terminal ainsi que 4 domaines transmembranaires dont la position a été déterminée à l'aide du logiciel TMHMM 2.0 (Möller et coll. 2001). On observe une insertion d'environ 8 acides aminés au niveau de la boucle F pour les sous-unités Apisum α 1 à 4 et Apisum α 8 du puceron et Pam α 1 à 4 et Pam α 8 de la blatte. Une insertion similaire a notamment été identifiée pour les sous-unités orthologues chez l'abeille et pourrait être impliquée dans la liaison de l'IMI (Jones et coll. 2006; Shimomura et coll. 2004). La sous-unité Pam α 7 présente une insertion de 2 acides aminés au niveau du TM3. Chez le puceron, les sous-unités divergentes Apisum α 9 et Apisum α 10, pour lesquelles la deuxième cystéine est remplacée par une glycine, ne possèdent pas la « cys-loop » caractéristique (Dale et coll. 2010; Liu et coll; 2013). De plus, la boucle entre les TM3 et TM4 est particulièrement courte pour les sous-unités Apisum α 9, Apisum α 10 et Apisum β 2 contrairement à ce qui est observé pour les autres sous-unités. La présence d'une boucle intracellulaire courte a déjà été décrite pour les sous-unités divergentes chez d'autres espèces d'insectes et pourrait influencer la régulation des récepteurs (Jones et Sattelle 2010; Castelan et coll. 2007). On note une absence du motif GEK en amont du TM2 pour les sous-unités Apisum α 9 et Apisum α 10 et sont remplacés par un motif TEK au niveau de la sous-unité Apisum β 2. L'absence de ce motif caractéristique concerne également les sous-unités divergentes chez *B. mori* (Shao et coll. 2007) et *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010) et pourrait influencer la sélectivité cationique des récepteurs (Jensen et coll. 2005). L'ensemble de ces résultats montre que la présence des sous-unités divergentes chez *A. pisum* pourrait fortement influencer les propriétés des nAChRs.

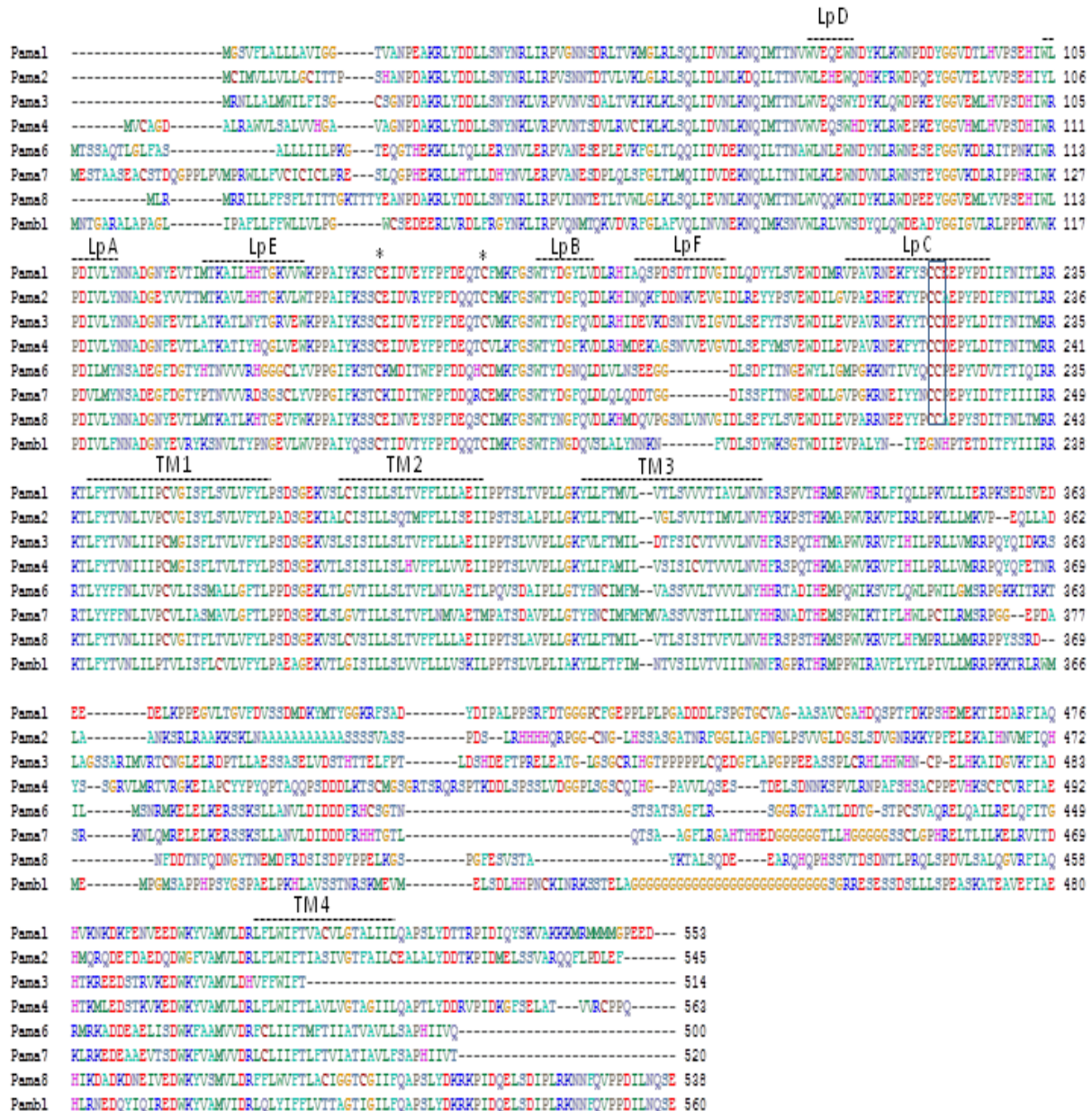




Figure 20. Alignement des séquences protéiques des sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*. Les boucles (notées LP A-F) et les domaines transmembranaires (notés TM 1-4) sont indiqués. Le doublet de cystéines séparées de 13 acides aminés est marqué par des astérisques et les deux cystéines adjacentes de la « cysteine loop » (caractéristiques des sous-unités α) sont encadrées.

1.2). Structure des gènes codant les sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois.

L'analyse bioinformatique des séquences a permis de déterminer la structure exon/intron des gènes codant pour les différentes sous-unités de nAChRs (tableau VIII). La structure générale des gènes des différentes sous-unités apparaît globalement conservée chez *A. pisum* avec un découpage entre 8 et 12 exons (de 9 à 599 pb) séparés par des introns de taille très variables (entre 60 et 224610 pb). Ce découpage, qui est cohérent avec ce qui est observé chez d'autres espèces d'insecte, varie par exemple entre 5 et 12 exons chez *A. mellifera* et 7 à 12 exons chez *D. melanogaster* (Jones et coll. 2006).

Par ailleurs, la structure exonique des gènes de sous-unités orthologues entre différentes espèces d'insectes, n'est pas systématiquement conservée comme démontré pour la drosophile et le moustique (Jones et coll. 2005 et 2006). Ainsi, le gène codant la sous-unité $\alpha 6$ possède une structure exon-intron conservée chez ces deux espèces contrairement à ce qui est observé pour le gène codant la sous-unité $\beta 1$ (Jones et coll. 2005 et 2006). Les gènes codant les sous-unités Apisum $\alpha 6$ et Apisum $\beta 1$ du puceron du pois ont une structure également différente.

D'autre part, la taille importante de certains introns laisse supposer la présence de mécanismes d'épissage alternatif importants induisant ainsi une augmentation de la diversité des sous-unités. En effet, la taille des introns et des exons peut refléter les contraintes imposées par les processus de reconnaissance de l'épissage (Keren et coll. 2010). Chez *D. melanogaster*, la plupart des introns encadrant des exons concernés par l'épissage alternatif sont de grande taille tandis que les exons épissés de façon constitutive sont encadrés par des exons de petite taille (Keren et coll. 2010). De plus, il semble que la taille des introns situés en amont a une influence plus importante que ceux situés en aval, sur la sélection des exons (Fox-Walsh et coll. 2005). Chez le puceron du pois, la structure du gène codant pour la sous-unité Apisum $\alpha 6$ montre des introns de taille importante notamment en amont des exons 2 et 11 (172060 et 224610 pb respectivement). Ce gène pourrait donc être sujet à de nombreux mécanismes d'épissage alternatif, ce qui semble probable au vue du grand nombre d'isoformes épissées et tronquées de cette sous-unité observée chez d'autres

espèces d'insectes (Shao et coll. 2007; Jin et coll. 2007; Jones et coll. 2005; Jones et coll. 2006; Grauso et coll. 2002; Jones et coll. 2010). La position des domaines fonctionnels sur les exons étant variable, excepté pour le domaine transmembranaire TM4 (Jones et coll. 2006), les mécanismes d'épissage pourraient avoir des conséquences différentes sur la fonctionnalité des sous-unités selon les espèces et les sous-unités considérées.

Tableau VIII Organisation des gènes codant les sous-unités de récepteurs nicotiniques chez le puceron du pois *A. pisum*. La taille

en pb des différents exons et introns est reportée pour chaque gène. * portion de séquence nucléaire non retrouvée sur le contig

gènes	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3	Intron 3	Exon 4	Intron 4	Exon 5	Intron 5	Exon 6	Intron 6	Exon 7	Intron 7	Exon 8	Intron 8	Exon 9	Intron 9	Exon 10	Intron 10	Exon 11	Intron 11	Exon 12
Apisum $\alpha 1$	73	7053	206	2624	46	60	109	1741	181	1174	463	1215	599	577	186								
Apisum $\alpha 2$	303	3752	45	60	110	133	181	4716	462	2236	163	5527	314	1061	195								
Apisum $\alpha 3$	56	8064	139	11052	45	1353	110	83	183	19578	114	1219	171	99	135	83	147	79	112	76	198	108	201
Apisum $\alpha 4$	342*	?	180	9801	113	3837	171	15247	135	15612	147	2627	171	2354	223	1890	158	6515	37				
Apisum $\alpha 6$	64	172060	141	5055	45	12507	108	4377	183	1026	75	8587	192	1342	85	11523	111	411	163	224610	306		
Apisum $\alpha 7$	45	46213	141	2658	45	4659	108	2254	183	606	75	4171	198	2496	87	9439	108	6065	567				
Apisum $\alpha 8$	64	1334	145	80	156	2562	178	128	159	1747	127	902	177	96	150	185	111	239	102	12625	230		
Apisum $\alpha 9$	72	961	147	379	45	176	108	143	208	74	170	307	154	164	156	190	159						
Apisum $\alpha 10$	81	791	149	82	45	789	110	82	218	653	169	1004	157	1201	156	130	156						
Apisum $\beta 1$	9	5626	219	935	47	7150	108	297	91	11767	174	3165	350	5816	394	2916	162						
Apisum $\beta 2$	78	4746	150	947	45	933	108	1117	216	508	180	1842	153	1347	168	1333	162						

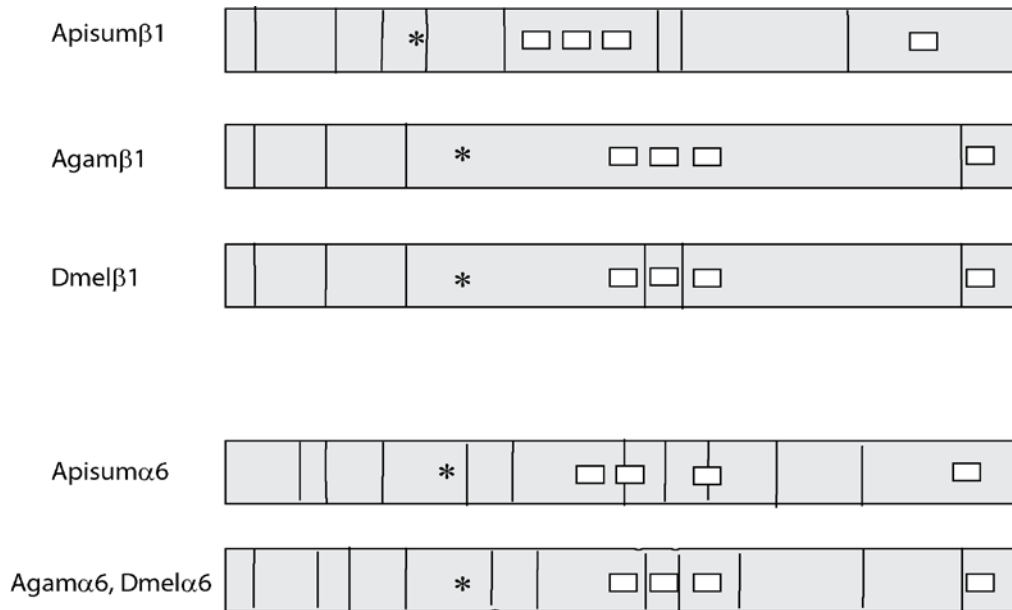


Figure 21. Structure en exons des gènes codant pour les sous-unités Apisumα6 et Apisumβ1 chez *Acyrtosiphon pisum*. Les rectangles blancs correspondent aux domaines transmembranaires et l'étoile noire à la « cys-loop ». Pour comparaison, la structure des gènes codant ces sous-unités chez *Anopheles gambiae* et *Drosophila melanogaster* est représentée (Modifié d'après Jones et coll. 2006).

L'analyse de la structure des gènes codant pour les sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois a également permis de mettre en évidence deux groupes de gènes qui sont proches et forment des clusters sur le génome. Ainsi, chez *A. pisum*, les gènes codant pour les sous-unités Apisumα1 et Apisumα2 ne sont séparés que par 123 pb sur le génome (figure 22). Un cluster de gènes similaire est observé pour les sous-unités Amelaα1 et Amelaα2 chez *A. mellifera* (Jones et coll. 2006) ainsi que pour les sous-unités Nvitaα1 et Nvitaα2 chez *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010) tandis qu'un regroupement de trois gènes Agamaα1/ Agamaα2/ Agamaα8 et Dα1/Dα2/Dβ2 est observé chez *A. gambiae* (Jones et coll. 2005) et *D. melanogaster* (Chamaon et coll. 2002) respectivement. De plus, chez *D. melanogaster*, les sous-unités Dα1, Dα2 et Dβ2 sont co-exprimées, suggérant ainsi que la présence des gènes dans un cluster faciliterait le co-assemblage des sous-unités (Chamaon et coll. 2000). Ainsi, chez *A. pisum*, la présence des gènes codant les sous-unités Apisumα1 et Apisumα2 dans un cluster excluant le gène codant la sous-unité Apisumα8, pourrait refléter une modification

de la composition des récepteurs exprimés chez le puceron par rapport à ceux de la drosophile ou du moustique, comme cela a été suggéré chez *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010). D'autre part, les gènes codant pour les trois sous-unités divergentes (i.e spécifiques du puceron du pois) Apisum α 9, Apisum α 10 et Apisum β 2 sont identifiés sur un même contig (figure 22). Un cluster de ce type est observé pour les gènes codant pour des sous-unités divergentes chez *N. vitripennis* et concerne trois couples de sous-unités divergentes: Nvita11/Nvita12, Nit β 2/Nvit β 3 et Nvit β 4/Nvita9 (Jones et coll. 2010). Les auteurs proposent que la faible distance qui sépare ces gènes reflète un évènement récent de duplication d'un gène commun qui a conduit à la différenciation de deux gènes codant des sous-unités distinctes chez *N. vitripennis* (Jones et coll. 2010). Ainsi, la duplication de gène pourrait expliquer la présence de ces 3 sous-unités divergentes chez le puceron du pois et participer ainsi de manière générale à l'augmentation de la diversité des gènes codant pour des sous-unités de nAChRs divergentes chez certaines espèces d'insectes.

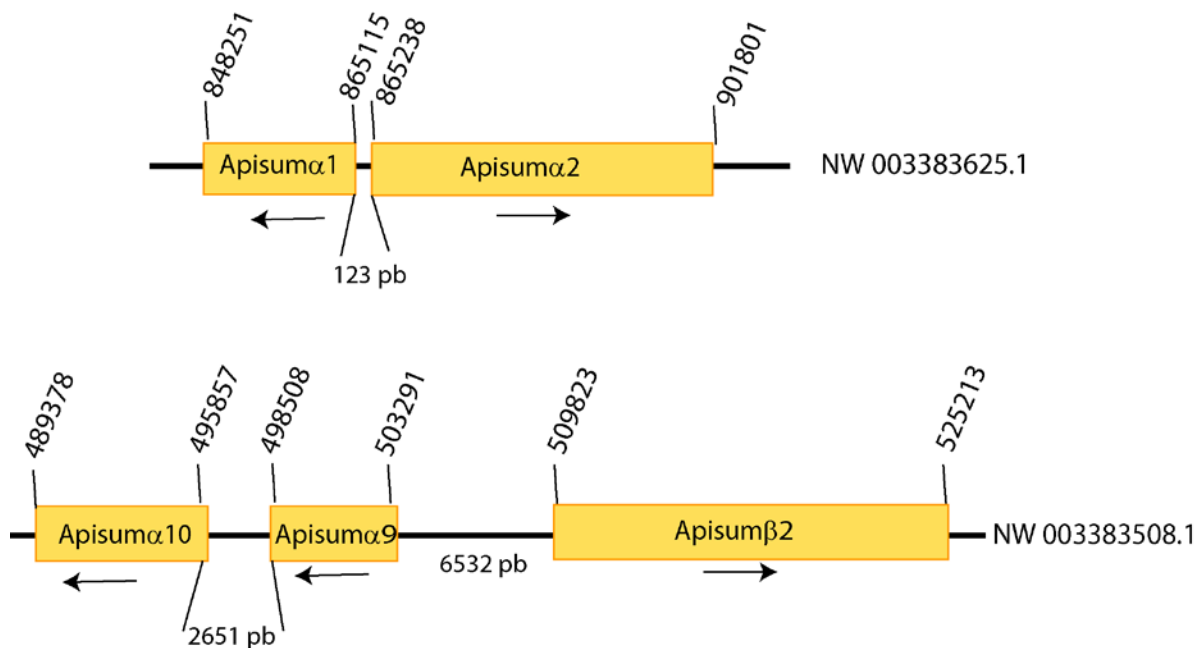


Figure 22. Regroupement de gènes codant pour des sous-unités de nAChRs dans des clusters chez le puceron du pois. Les gènes codant pour les différentes sous-unités sont représentés par des rectangles oranges et les bornes de leur emplacement sur le contig référencé NW sont indiquées ; le sens de lecture est représenté par une flèche et la distance entre deux gènes est notée en paire de base (pb). La position des gènes sur les chromosomes reste indéterminée.

2) Etude de l'expression des sous-unités de nAChRs chez la blatte et le puceron.

2.1) Des sous-unités différenciellement exprimées chez l'adulte.

La quantification des transcrits chez le puceron *A. pisum* montre que les sous-unités Apisum α 3, Apisum α 7 et Apisum α 10 et Apisum β 2 sont majoritairement exprimées au niveau des têtes, avec une très forte expression de Apisum β 2 (figure 23). En parallèle, les mesures des niveaux de transcrits dans les corps pédonculés de la blatte *P. americana* mettent en évidence une expression majoritaire des sous-unités Pam α 7, Pam α 8, Pam α 1 et surtout de la sous-unité Pam β 1 (figure 24). Ainsi, chez ces deux espèces, on observe une forte expression des sous-unités orthologues de D α 7 et D α 3 ainsi qu'une expression largement majoritaire des sous-unités β , Pam β 1 et Apisum β 2. On peut donc supposer que ces sous-unités seront préférentiellement impliquées dans la formation des nAChRs chez la blatte et le puceron. En effet, chez *N. lugens*, l'immunoprécipitation de la sous-unité NI β 1 entraîne la perte de l'ensemble des sites de liaison pour l'IMI suggérant que cette sous-unité est impliquée dans la formation de l'ensemble des nAChRs sensibles à cet insecticide (Li et coll. 2010).

Par ailleurs, la forte expression des sous-unités Pam α 1, Pam α 8 et Pam β 1 chez la blatte et des sous-unités Apisum α 10 et Apisum β 2 chez le puceron, est caractéristique et pourrait être corrélée à l'expression de récepteurs dont la composition est propre à chaque espèce. De plus, chez l'abeille, les sous-unités Amel α 2, Amel α 8 et Amel β 1 sont exprimées dans les cellules de Kenyon des corps pédonculés (Thany et coll. 2003; Thany et coll. 2005; Dupuis et coll. 2011) tandis que la présence supplémentaire de la sous-unité Amel α 7 est observée dans les lobes antennaires. Il a été suggéré que cette variation du profil d'expression des sous-unités pourrait être responsable des différences de profils pharmacologiques observées entre ces deux structures cérébrales chez l'abeille (Dupuis et coll. 2011). Ainsi, chez le puceron et la blatte, les profils d'expression observés pourraient refléter la présence de sous-types de nAChRs caractéristiques présentant des propriétés pharmacologiques distinctes.

Le niveau d'expression des sous-unités au niveau des KC des corps pédonclés pourrait avoir une implication fonctionnelle importante. En effet, les lobes antennaires et les corps pédonculés sont des structures cérébrales importantes pour l'apprentissage olfactif, qui implique différents sous-types de nAChRs (Lozano et coll. 1996; Gauthier et coll. 2006; Dupuis et coll. 2012). De plus, chez l'abeille, la diminution du niveau d'expression de la sous-unité Amela α 8 par ARN interférence perturbe la restitution de la mémoire lors de l'apprentissage olfactif (Louis et coll. 2012). Ainsi, la sous-unité Pama α 8 qui est fortement exprimée dans les KC, pourrait être impliquée dans ces processus d'apprentissage chez la blatte. Les données disponibles dans la littérature montrent également une expression majoritaire de la sous-unité Mda α 2 de *M. domestica* (Gao et coll. 2007a) et Da α 2 de *D. melanogaster* (Jonas et coll. 1994) au niveau du SNC ainsi que la présence de la sous-unité Amela α 2 au niveau des cellules de Kenyon chez *A. mellifera* (Thany et coll. 2005; Dupuis et coll. 2011). Ceci suggère une implication des sous-unités orthologues de Da α 2 dans les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage. Bien que la présence des sous-unités Pama α 2 et Apisuma α 2 ait été vérifiée dans le SNC de la blatte et du puceron, le faible niveau d'expression de ces sous-unités ne permet pas de conclure quant à leur rôle dans les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage chez ces deux espèces.

Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de déterminer le niveau d'expression des gènes codant les sous-unités de nAChRs sur des pucerons adultes entiers (figure 24). Ainsi, au niveau des pucerons entiers, on observe une expression majoritaire des sous-unités Apisuma α 7, Apisuma α 3 et surtout Apisuma β 2. Curieusement, la sous-unité Apisuma α 10 n'est que faiblement exprimée dans les pucerons entiers tandis que son niveau d'expression est élevé au niveau des têtes de pucerons. Par ailleurs, la sous-unité Apisuma α 7 apparait plus exprimée que la sous-unité Apisuma α 3 alors que le contraire est observé au niveau des têtes de pucerons. Ces variations dans le profil d'expression pourraient être liées à la présence de larves dans l'abdomen des pucerons adultes (Simon et coll. 2002; LeTrionnaire et coll. 2008) et ainsi refléter une modification de l'expression des sous-unités en fonction du stade de développement, comme indiqué dans la **publication n°1**. Cette observation est étayée par le fait que chez *D. melanogaster*, l'expression de la sous-unité Da α 6 est plus importante chez l'embryon que chez la larve et l'adulte (Grauso et coll. 2002).

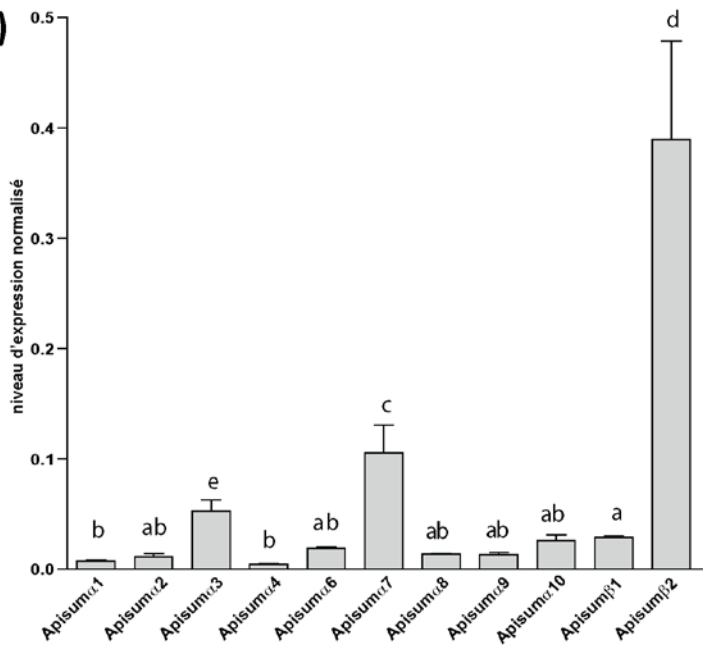
A)

gène	pente	R2	efficacité
$\alpha 1$	-3,317	0,966	2,0
$\alpha 2$	-3,589	0,995	1,9
$\alpha 3$	-3,393	0,984	2,0
$\alpha 4$	-3,494	0,992	1,9
$\alpha 6$	-3,266	0,991	2,0
$\alpha 7$	-3,286	0,976	2,0
$\alpha 8$	-3,511	0,989	1,9
$\alpha 9$	-3,785	0,992	1,8
$\alpha 10$	-2,924	0,985	2,2
$\beta 1$	-3,198	0,98	2,1
$\beta 2$	-2,867	0,987	2,2
actine	-4,254	0,987	1,7
rpl7	-3,631	0,994	1,9

B)

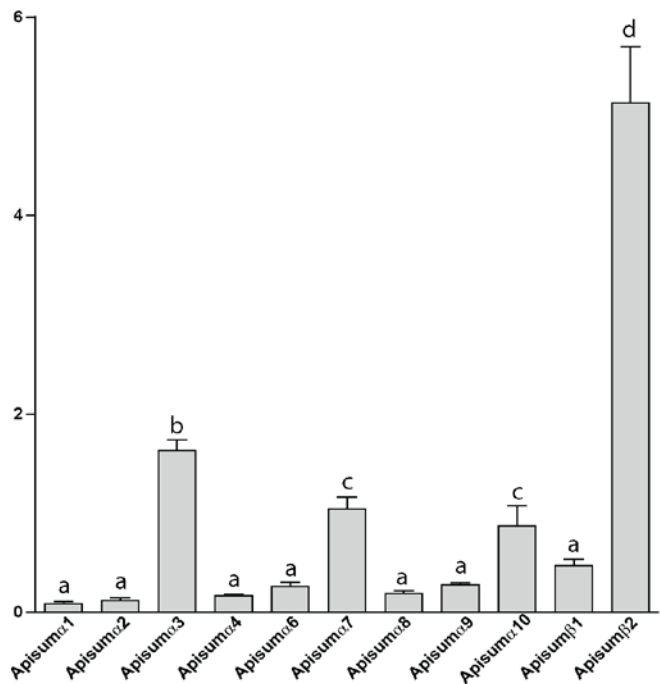
gène	a	b	R2	CV %
$\alpha 1$	-2,795	33,49	0,992	2,4
$\alpha 2$	-3,491	37,93	0,993	4,8
$\alpha 3$	-2,614	35,73	0,992	3,6
$\alpha 4$	-3,064	35,95	0,997	2,7
$\alpha 6$	-2,819	36,12	0,994	1,1
$\alpha 7$	-3,131	37,93	0,993	0,9
$\alpha 8$	-3,076	36,71	0,991	1,6
$\alpha 9$	-3,649	39,64	0,997	6
$\alpha 10$	-2,866	36,25	0,993	3,1
$\beta 1$	-3,305	36,78	0,993	5,2
$\beta 2$	-3,461	42,5	0,997	4,7
actine	-2,677	34,31	0,991	1,1
rpl7	-3,795	40,39	0,998	1,0

C)



gène	CV % intra	CV % inter
$\alpha 1$	1,60	3,20
$\alpha 2$	1,41	2,44
$\alpha 3$	0,79	1,56
$\alpha 4$	1,22	2,07
$\alpha 6$	1,22	1,97
$\alpha 7$	1,53	3,06
$\alpha 8$	1,32	1,03
$\alpha 9$	1,33	1,41
$\alpha 10$	1,13	2,26
$\beta 1$	1,77	1,85
$\beta 2$	0,73	2,25
actine	0,77	0,51
rpl7	2,07	0,92

D)



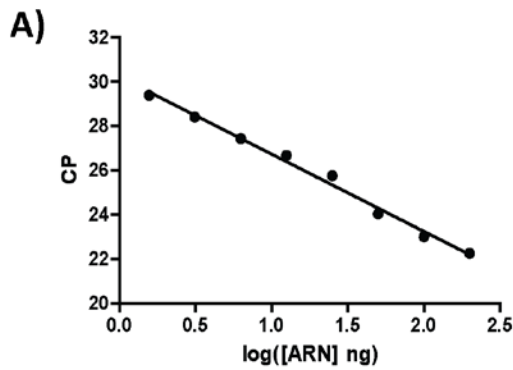
gène	CV % intra	CV % inter
$\alpha 1$	1,97	3,59
$\alpha 2$	1,75	2,90
$\alpha 3$	0,91	3,37
$\alpha 4$	1,21	4,81
$\alpha 6$	3,11	2,04
$\alpha 7$	1,99	3,54
$\alpha 8$	1,52	3,50
$\alpha 9$	0,73	2,12
$\alpha 10$	0,46	3,18
$\beta 1$	1,28	5,28
$\beta 2$	2,21	2,09
actine	0,50	1,33
rpl7	0,94	2,07

Figure 23. Détermination du niveau d'expression des sous-unités de récepteurs nicotiques (nAChRs) chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* par PCR quantitative absolue.

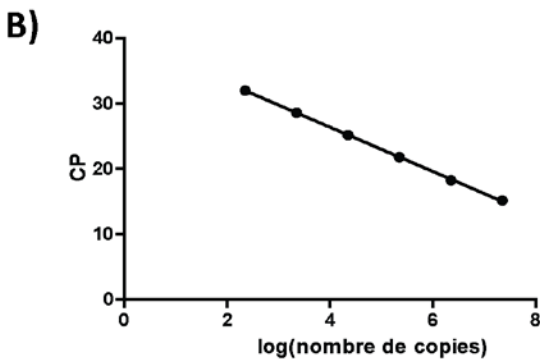
A) Efficacité d'amplification des couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative. Les CP (crossing point) sont déterminés pour une gamme de concentration d'ARN ; l'efficacité d'amplification E est calculée à partir de la pente k de la droite de régression selon la formule $E=10^{(-1/k)}$. Avec R^2 le coefficient de corrélation de la droite de régression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de deux à trois expériences réalisées en triplicat.

B) Gamme standard déterminée pour chaque gène étudié. Avec R^2 , coefficient de corrélation et CV, coefficient de variation. Les CP sont déterminés pour une gamme de concentration de plasmide contenant une portion de séquence du gène étudié. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois à quatre expériences indépendantes réalisées en triplicat. On connaît ainsi le nombre de copies du gène d'intérêt pour chaque concentration (Lee et coll. 2006b). La représentation des CP en fonction du nombre de copies du gène (droite de régression $y=ax+b$) constitue la gamme standard utilisée pour convertir les CP en nombre de copies du gène lors de la quantification dans les échantillons.

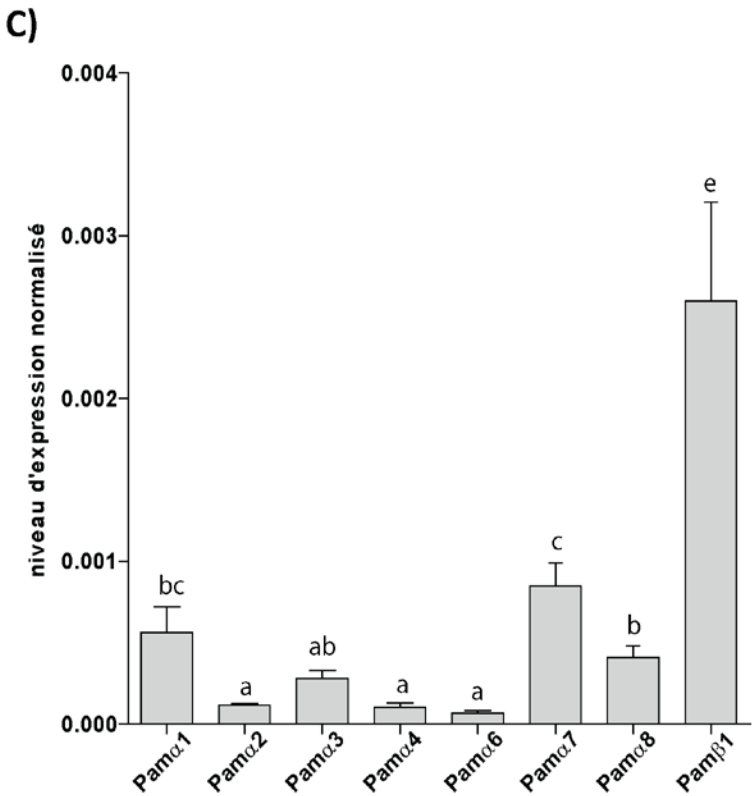
C et D) Quantification du niveau d'expression des gènes codant pour les sous-unités de nAChRs sur des pucerons entiers (C) et au niveau des têtes (D) d'adultes aptères et parthénogénétiques. Le protocole de PCR quantitative est le même que celui décrit dans la publication n°1 mais l'interprétation des CP est faite à l'aide des gammes de plasmides (cf point B) afin de réaliser une quantification absolue de l'expression des gènes (Lee et coll. 2006a). Chaque expérience est réalisée en triplicat et les résultats présentés correspondent à la moyenne de quatre à six expériences indépendantes. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau d'expression des gènes de référence (actine et rpl7). Les analyses statistiques (One Way ANOVA) ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 ; les niveaux d'expression statistiquement différents sont représentés par différentes lettres. Les coefficients de variation (CV) entre les triplicats techniques (intra) et les répétitions biologiques (inter) sont regroupés dans un tableau.



gène	pente	R2	efficacité
$\alpha 1$	-3,482	0,991	1,94
$\alpha 2$	-3,479	0,991	1,94
$\alpha 3$	-3,589	0,987	1,90
$\alpha 4$	-3,114	0,955	2,09
$\alpha 6$	-3,331	0,981	2,00
$\alpha 7$	-3,097	0,997	2,10
$\alpha 8$	-3,281	0,996	2,02
$\beta 1$	-3,628	0,981	1,89
actine	-3,172	0,988	2,07
ATPSase	-3,054	0,978	2,13



sU	a	b	R2	CV %
$\alpha 1$	-3,387	39,89	0,999	1,47
$\alpha 2$	-3,451	39,14	0,997	2,08
$\alpha 3$	-3,322	40,65	0,998	0,86
$\alpha 4$	-3,164	37,75	0,994	2,00
$\alpha 6$	-2,992	33,84	0,979	1,78
$\alpha 7$	-3,352	38,76	0,998	1,12
$\alpha 8$	-3,137	35,57	0,998	2,74
$\beta 1$	-2,949	38,35	0,991	0,64
actine	-3,257	43,75	0,990	0,50
ATPSase	-3,175	35,65	0,997	1,03



gène	CV % intra	CV % inter
$\alpha 1$	2,17	3,38
$\alpha 2$	1,98	3,02
$\alpha 3$	2,51	2,64
$\alpha 4$	2,61	1,60
$\alpha 6$	2,79	3,27
$\alpha 7$	1,42	2,17
$\alpha 8$	1,74	1,93
$\beta 1$	3,20	2,91
actine	1,61	2,45
ATPSase	1,49	0,91

Figure 24. Détermination du niveau d'expression des sous-unités de récepteurs nicotiniques (nAChRs) dans les corps pédonculés de la blatte *Periplaneta americana* par PCR quantitative absolue.

A) Efficacité d'amplification des couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative. Un exemple de courbe obtenue pour la sous-unité Pam α 1 est présenté ainsi qu'un tableau récapitulatif pour l'ensemble des gènes étudiés. Les CP (crossing point) sont déterminés pour une gamme de concentration d'ARN ; l'efficacité d'amplification E est calculée à partir de la pente k de la droite de régression selon la formule $E=10^{(-1/k)}$. Avec R² le coefficient de corrélation de la droite de régression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de deux à trois expériences réalisées en triplicat.

B) Gamme standard déterminée pour chaque gène étudié. Un exemple de courbe obtenue pour la sous-unité Pam α 1 est présenté ainsi qu'un tableau récapitulatif pour l'ensemble des gènes étudiés (R², coefficient de corrélation et CV, coefficient de variation). Les CP sont déterminés pour une gamme de concentration de plasmide contenant une portion de séquence du gène étudié. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois à quatre expériences indépendantes réalisées en triplicate. On connaît ainsi le nombre de copies du gène d'intérêt pour chaque concentration (Lee et coll. 2006b). La représentation des CP en fonction du nombre de copies du gène (droite de régression $y=ax+b$) constitue la gamme standard utilisée pour convertir les CP en nombre de copies du gène lors de la quantification dans les échantillons.

C) Quantification du niveau d'expression des gènes codant pour les sous-unités de nAChRs. Le protocole de PCR quantitative est le même que celui décrit dans la publication n°1 mais l'interprétation des CP est faite à l'aide des gammes de plasmides (cf point B) afin de réaliser une quantification absolue de l'expression des gènes (Lee et coll. 2006a). Chaque expérience est réalisée en triplicat et les résultats présentés correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau d'expression des gènes de référence (actine et ATPsynthase). Les analyses statistiques (One Way ANOVA) ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 ; les niveaux d'expression statistiquement différents sont représentés par différentes lettres. Les coefficients de variation (CV) entre les triplicats techniques (intra) et les répétitions biologiques (inter) sont regroupés dans un tableau.

2.2) Présence d'isoformes épissées de la sous-unité $\alpha 4$.

L'analyse des transcrits de la sous-unité $\alpha 4$ a mis en évidence la présence de variants alternatifs pour la sous-unité $\alpha 4$ chez la blatte *P. americana* et le puceron *A. pisum*. Les séquences obtenues chez la blatte et le puceron ont été comparées avec celle d'autres espèces d'insectes, notamment un autre puceron *M. persicae* et de la mouche *D. melanogaster* qui est considérée comme l'espèce de référence pour l'annotation des sous-unités de nAChRs chez les insectes. Ainsi, l'analyse des séquences a mis en évidence la présence de trois variants chez le puceron et de deux variants chez la blatte, selon un mécanisme d'épissage qui apparaît conservé entre les différentes espèces d'insectes (figure 25). En effet, chez *P. americana* et *A. pisum*, on observe un épissage alternatif mutuellement exclusif des exons 4 et 4', qui sont séparés de 2321 pb sur le génome de *A. pisum*. De plus, le puceron semble posséder un isoforme supplémentaire, qui est dépourvu de l'exon 4 (figure 25). Cet épissage alternatif concerne les boucles E et B impliquées dans la liaison de l'acétylcholine et des agonistes des nAChRs ainsi que le motif des deux cystéines séparées par 13 acides aminés. D'autre part, l'omission de l'exon 4 entraîne un décalage du cadre de lecture conduisant à la synthèse d'isoformes tronqués. La présence de ces différents isoformes pourrait avoir des conséquences importantes sur les propriétés des nAChRs. Par ailleurs, il est intéressant de noter que d'autres mécanismes d'épissage alternatif potentiels ont été identifiés par Dale lors de l'analyse du génome (Dale et coll. 2010), suggérant l'expression d'isoformes supplémentaires de sous-unités de nAChRs qui n'ont pas encore été identifiées.

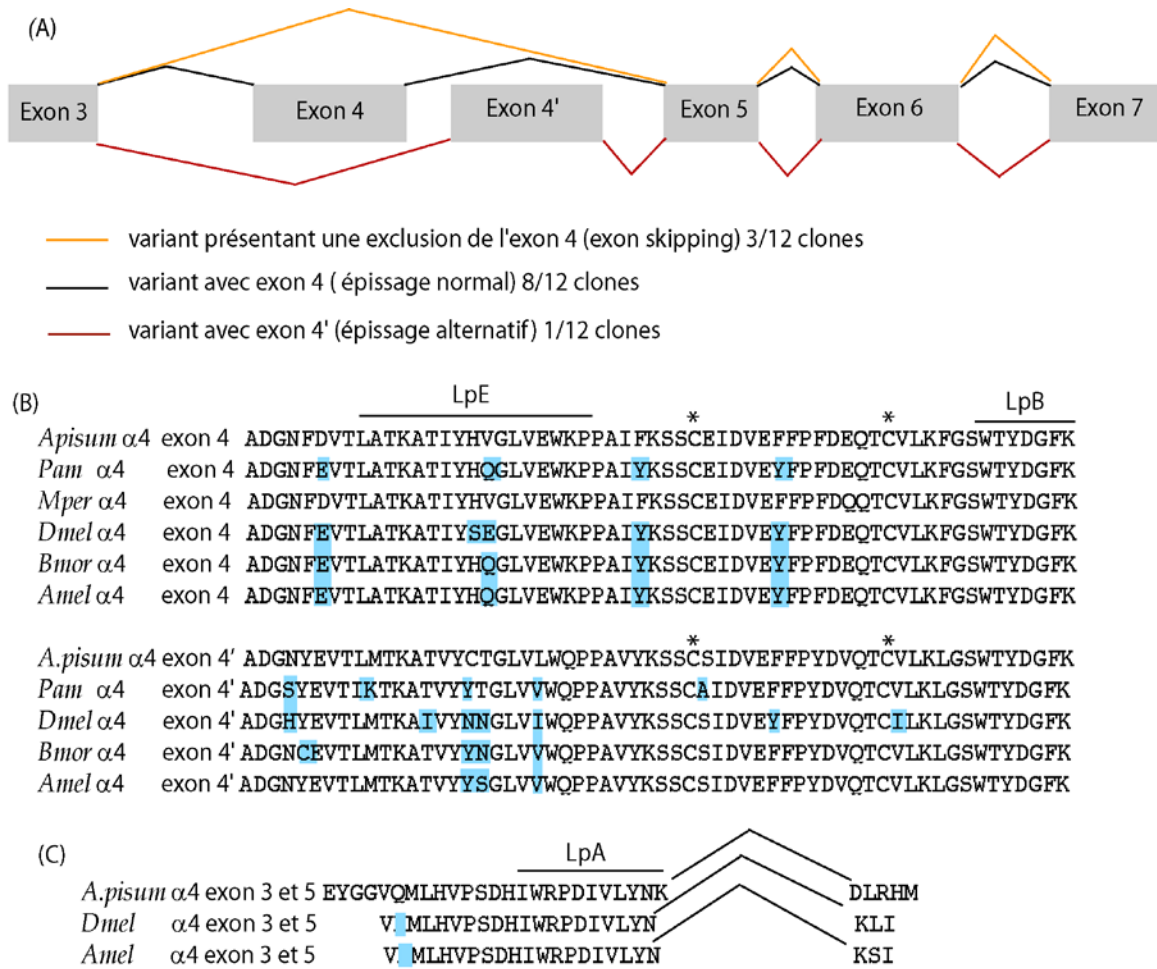


Figure 25. Épissage alternatif de l'exon 4 de la sous-unité α4 chez la blatte *P. americana* et le puceron du pois *A. pisum*. (A) trois types de transcrits résultant d'épissage alternatif entre les exons 3 et 7 pour la sous-unité α4 de *A. pisum*. La fréquence d'observation de chaque profil d'épissage est indiquée par rapport aux 12 clones séquencés. (B) comparaison des exons 4 alternatifs chez *A. pisum*, *P. americana*, *M. persicae*, *B. mori*, *D. melanogaster* et *A. mellifera*. Les boucles E (LpE) et B (LpB) impliquée dans la liaison des ligands sont indiquées ainsi que les deux cystéines caractéristiques (*). Les acides aminés qui diffèrent de la séquence de *A. pisum* sont indiqués en bleu. (C) Conservation des transcrits tronqués de la sous-unité α4 entre *A. pisum*, *D. melanogaster* et *A. mellifera*. Numéro d'accension : *Myzus persicae* : CAI54101, CAB52299 ; *Drosophila melanogaster* : CAB77445 ; *Bombyx mori* : ABV45514 ; *Apis mellifera* : AAY87893, AAY87892.

Chapitre 3. Caractérisation de la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante de type II (CaMKII) et de son rôle dans la régulation de la sensibilité des nAChRs vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes chez la blatte.

1) Contexte de l'étude.

Les mécanismes de régulation des nAChRs ont été particulièrement étudiés au niveau des DUM neurones de la blatte *P. americana*. Ainsi l'existence de mécanismes de régulation complexes impliquant les voies intracellulaires dépendantes du calcium, en lien avec l'AMPc et la formation du complexe calcium/calmoduline, ont été mis en évidence (Courjaret et Lapied 2001; Courjaret et coll. 2003). Il a été suggéré que l'activation de la voie de l'AMPc pourrait moduler la sensibilité des nAChRs aux insecticides néonicotinoïdes (Bodereau-Dubois et coll. 2012; Calas-List et coll. 2013). En effet, il a été démontré que l'augmentation progressive de la concentration en AMPc entraînait une augmentation de la sensibilité à la CLT pour les récepteurs nicotiniques exprimés dans les DUM neurones (Calas-List et coll. 2013). En outre, l'effet de l'AMPc était dépendant de la concentration en CLT (Calas-List et coll. 2013). De même, la CLT agit comme un agoniste du récepteur nAChR2, insensible à l'IMI (Courjaret et Lapied, 2001; Thany 2009) et la régulation de la concentration en AMPc module la sensibilité de nAChR2 à la CLT. Cependant, malgré une suspicion de l'implication de la protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline de type II (CaMKII), son rôle n'a jamais été clairement étudié, compte tenu du nombre d'isoformes identifiées chez les insectes, notamment chez la drosophile *D. melanogaster* (Griffith et Greenspan 1993; Ohsako et coll. 1993). Au cours de ce travail, nous avons tenté de caractériser les différentes isoformes de la CaMKII présentes dans le système nerveux de la blatte *P. americana* et d'étudier leur rôle dans la sensibilité aux néonicotinoïdes.

2) Identification de différentes isoformes de la CaMKII chez la blatte *Periplaneta americana*.

Ces résultats font l'objet de la **publication n°4**.

« Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II in the cockroach *Periplaneta americana* : identification of five isoforms and their tissues distribution. »

Emiliane Taillbois, Emilie Heuland, Céline M. Bourdin, Audrey Griveau, Sophie Quinchard, Hélène Tricoire-Leignel, Christian Legros and Steeve H. Thany.

Archives of Insect Biochemistry and Physiology (2013). Vol 83, No 3, 138_150

Résumé de la publication

Nous avons identifié cinq isoformes de la CaMKII dans le système nerveux de la blatte *P. americana*, ce qui est en accord avec la présence de différentes isoformes chez *D. melanogaster* (Ohsako et coll. 1993; GuptaRoy et coll. 2000). L'analyse des séquences montre que les différentes isoformes de la CaMKII de *P. americana* se distinguent notamment par la présence ou non de deux inserts de 21 acides aminés (nommés insert 1 et insert 2) au début du domaine d'association et sont homologues aux isoformes décrits dans la littérature chez *D. melanogaster* (Griffith et Greenspan 1993; Ohsako et coll. 1993; Takamatsu et coll. 1994; GuptaRoy et coll. 1996; GuptaRoy et coll. 2000). Ainsi, les isoformes de la CaMKII de la blatte sont nommées PaCaMKII-A à E en fonction de leur homologie de séquences en acides aminés (entre 82 et 90%) avec les isoformes de la drosophile. L'ensemble de ces données suggère que des mécanismes d'épissage similaires à ceux observés chez la drosophile pourraient être mis en jeu chez la blatte.

De plus, l'analyse du profil d'expression des différentes isoformes chez la blatte montre que les isoformes PaCaMKII-A et PaCaMKII-D sont exprimées dans tous les tissus tandis que certaines comme PaCaMKII-B et PaCaMKII-C sont préférentiellement exprimées dans la chaîne nerveuse et les muscles. Les expériences de RT-PCR sur cellule unique ont démontrées l'expression spécifique de l'isoforme PaCaMKII-E dans les DUM neurones. Il

semblerait donc que l'épissage alternatif des transcrits de PaCaMKII permette de contrôler le profil d'expression des isoformes dans les différents tissus. Une expression tissu-spécifique a également été observée chez l'abeille dans les cellules de Kenyon (Kamikouchi et coll. 2000 ; Pasch et coll. 2011) et la présence de la CaMKII uniquement dans les cellules de Kenyon non-compactes suggère un rôle spécifique dans ces cellules (Pasch et coll. 2011). De la même manière, l'expression spécifique de certains isoformes de PaCaMKII, en particulier PaCaMKII-E, pourrait être en lien avec un rôle spécifique de ces isoformes chez *P. americana*.

Article

Ca²⁺/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II IN THE COCKROACH *Periplaneta americana*: IDENTIFICATION OF FIVE ISOFORMS AND THEIR TISSUES DISTRIBUTION

Emiliane Taillebois, Emilie Heuland,
Céline M. Bourdin, Audrey Griveau,
Sophie Quinchar, and Helene Tricoire-Leignel
*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM)
UPRES EA 2647/USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences,
Université d'Angers, Angers, France*

Christian Legros
*Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée UMR
CNRS 6214-INSERM 1083, UFR de Sciences Médicales, Université
d'Angers, Angers, France*

Sreeve H. Thany
*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM)
UPRES EA 2647/USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences,
Université d'Angers, Angers, France*

*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is a key kinase that transduces Ca²⁺ signals into downstream effects acting on a range of cellular processes in nervous system and muscular tissues. In insects, different CaMKII isoforms have been reported in *Drosophila melanogaster*, *Apis florae*, *Bombus terrestris*, and *Bombus impatiens* but little is known on the organization and tissue-specific expression of these isoforms with the exception of *Drosophila*. The present study reports the cloning of five CaMKII splice variants issued from a single gene and their*

Correspondence to: Steeve H. Thany, Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UFR Sciences, Université d'Angers, UPRES EA 2647/USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, 2 Bd. Lavoisier, 49045 Angers, France. E-mail: steeve.thany@univ-angers.fr

ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, Vol. 83, No. 3, 138–150 (2013)

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2013 Wiley Periodicals, Inc. DOI: 10.1002/arch.21102

tissue-specific expression in the cockroach *Periplaneta americana*. Each CaMKII isoform shared 82–90% identity with *Drosophila* CaMKII isoforms and accordingly were named PaCaMKII-A, PaCaMKII-B, PaCaMKII-C, PaCaMKII-D, and PaCaMKII-E. PaCaMKII-A and PaCaMKII-D isoforms are ubiquitously expressed in all tissues, but some such as PaCaMKII-B and PaCaMKII-C are preferentially expressed in the nerve cord and muscle. In addition, using single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), we found a tissue-specific expression of PaCaMKII-E in the dorsal unpaired median neurons. Alternative splicing of PaCaMKII transcripts is likely a common mechanism in insects to control the pattern of isoform expression in the different tissues.   2013 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: CaMKII; insect; cockroach; nervous system; alternative splicing

INTRODUCTION

Calcium (Ca^{2+})/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CaMKII) is an essential signaling kinase involved in neuronal plasticity in insects (Burkert and Duch, 2006; Mehren and Griffith, 2006; Ohnishi et al., 2011; Kadas et al., 2012). As its name indicates, CaMKII is a calcium-dependent protein, which mediates the effects of Ca^{2+} as a second messenger by phosphorylating a wide variety of substrate proteins (Lu et al., 2003). During CaMKII activation, binding of Ca^{2+} /CaM to the regulatory domain of CaMKII disrupts the interaction between the autoinhibitory sequences and the N-terminal catalytic domain allowing substrate phosphorylation (Griffith, 2004, 2008). This mechanism maintains CaMKII in an active conformation for a prolonged period of time, even after the return of Ca^{2+} concentration to basal level in the cytoplasm. Its fundamental function in insects has been well documented in several species. For example, in *Drosophila*, it was demonstrated that increasing the level of constitutively active CaMKII decreased the initial courtship and enhanced the rate of suppression of courtship in response to a mated female. This effect could be mediated by cholinergic neurons that enhance training-dependent suppression (Mehren and Griffith, 2004, 2006). In honeybee, it was demonstrated that a single CaMKII gene is strongly expressed in the mushroom bodies (Kamikouchi et al., 2000; Pasch et al., 2011), specifically in the noncompact cells, suggesting a cell-specific expression. Recently, in *Bombyx mori*, it was found that species-specific sex pheromones released by female moths to attract conspecific male moths is regulated by a neurohormone called Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN). PBAN signaling involves phosphorylation of a PAT (perilipin, adipophilin and tail-interacting protein of 47 kDa) family protein named *B. mori* lipid storage droplet protein 1 (BmLsd1). BmLsd1 activation is dependent on phosphorylation by CaMKII (Ohnishi et al., 2011). In the cockroach *Periplaneta americana*, we have suggested that CaMKII was critical for the modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and nicotinic acetylcholine receptor functions (Alix et al., 2002; Thany et al., 2007). For example, the specific inhibitors of CaM and CaMKII, W7 and KN-62, respectively, reduced GABA currents (Alix et al., 2002). In other studies, we found that activation of the transient receptor potential ion channel (TRP- ) channel increased intracellular calcium concentration, potentiating CaMKII activity through the Ca^{2+} /CaM complex (Courjaret and Lapied, 2001; Murillo et al., 2011). Thus, CaMKII phosphorylation of nicotinic or GABA receptors might lead to depression

or potentiation of receptor responses. Moreover, we suggested that this CaMKII activity differently changes insecticide effects on insect nicotinic receptors, highlighting the implication of Ca^{2+} -dependent pathways in monitoring insecticide actions (Bodereau-Dubois et al., 2012).

In order to characterize the function of CaMKII in the cockroach nervous system, one of the first challenges is to identify the expression of CaMKII. In insects, CaMKII was first cloned from *D. melanogaster* (DmCaMKII; Ohsako et al., 1993), *Blattella germanica* (Inagaki et al., 1998), honeybee *Apis mellifera* (Kamikouchi et al., 2000), and *Manduca sexta* (Burkert and Duch, 2006; Lohr et al., 2007). For several insect species, only one isoform was found, whereas in *Drosophila*, up to nine closely related isoforms were identified, although all are encoded by alternative splicing of a single gene (Griffith and Greenspan, 1993; Ohsako et al., 1993). Their differences consist in a peptide region between the calmodulin-binding domain and the association domain (Griffith and Greenspan, 1993; Ohsako et al., 1993), which is encoded by three independent alternate exons termed as inserts 1, 2, and 3. It was demonstrated that this variable domain influences the interaction between the CaM and the catalytic domains (GuptaRoy et al., 2000). To date, nothing is known on the number of CaMKII isoforms in the cockroach *P. americana* and their potential localization and function in nervous tissues. Thus, in the present study, we cloned, sequenced, and characterized the tissue-distribution pattern of the cockroach *P. americana* CaMKII isoforms, and further discuss their potential function.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed using adult male cockroaches *P. americana* reared at room temperature 29  C on 12 h light:12 h dark cycle. The colony was maintained on caniroc soup (Gamm vert, Les Ponts-de-C  , France) and water ad lib.

Total mRNA Extraction from Cockroach Nerve Cord

The ventral nerve cord was dissected from adult male cockroaches previously anesthetized by chilling to 4  C. Nerve cord preparation included thoracic and abdominal ganglia, together with the connective tissues. Total RNA was isolated using the TRIzol   Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and retrotranscribed as already described using Oligo(dT)₂₀ and reverse-transcribed with the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Moignot et al., 2009).

Cloning of Full-Length cDNA Sequences

The overall strategies for the amplification of CaMKII cDNA sequences are described below. Since the genome of *P. americana* was not available, degenerate primer sets (Table 1) designed from conserved regions of *D. melanogaster* and *B. germanica* nucleotide sequences were used with the Advantage   2PCR kit (Clontech, France; Inagaki et al., 1998) to amplify fragments of expected 402 and 1,044 bp, respectively. PCR was performed in a total volume of 25   l containing 1   l of RT products, 0.4   M of each primer, 0.2 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP), and 1.5 mM MgCl_2 , using BlueTaq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 35 cycles at 95  C for 30 sec, 60  C for 50 min, 72  C for 30 sec, and a final elongation of 72  C for 5 min. Negative controls in which reactions

Table 1. Primers Used to Amplify and Clone CaMKII Isoform cDNAs in Cockroach *P. americana*

CaMKII	
CK-R1	CAGGTGTGACTGGTTCC
CK-R3	CAGCAGCACCACCTTTGGAGGACG
CK-R4	GTGCACAGGCAAGAGACTGTGG
CK-R6	CAGCAGTCTGAGGAGACGCG
CKE-R1	CTTCACGTTCCGCCACAAATAG
CK-S1	GGAGTTGTTTCATAGAGATC
CK-S3	GCAGCACCACCTTTGGAGGACG
CK-S5	GCAGTCTGAGGAGACGCGTG
CKE-S1	ATGGCTGCACCAGCAGCT
Cam-1S	GTTGTGAAGTAAATATTGTAGTTATCGG
Cam-2R	CAAGTAAGACAATGCCTCAGAGCTC
GeneRacer™ primers	
GR1	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GR2	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
GR3	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
GR4	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG

without template cDNA were conducted. PCR products were analyzed on 2% agarose gel electrophoresis and purified using NucleoSpin Extract II® (Macherey–Nagel, Germany), and then cloned into pCR® 4-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced (GATC Biotech, Konstanz, Germany).

After the identification of partial cDNA sequences encoding CaMKII-related protein, the sequence was extended toward 5' and 3' directions by rapid amplification of cDNA ends methods (GeneRacer™ kit, Invitrogen) using nested and specific primers designed from the partial CaMKII cDNA sequences (Table 1). Finally, to amplify the full-length cDNAs encoding CaMKII, two primers Cam-1S and Cam-2R were designed from the untranslated regions surrounding the 5' and 3' open reading frame (ORF) sequence.

Dorsal Unpaired Median Neuron Isolation

Experiments were conducted on dorsal unpaired median (DUM) neuron cell bodies isolated from the midline part of the terminal abdominal ganglia (TAG). The TAG carefully dissected under a binocular microscope, was removed in the extracellular solution (200 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4) and was incubated for 30 min at 29°C in the same saline solution supplemented with collagenase (type IA, 2 mg/ml, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ). The ganglia were then rinsed twice and transferred back in the saline solution supplemented with fetal calf serum (5% by volume), 50 UI/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (GIBCO-BRL, Eragny, France). They were mechanically dissociated by gentle triturations using fire-polished Pasteur pipettes. The isolated DUM neurons were allowed to settle and adhere to the poly-D-lysine hydrobromide (Molecular weight, 70,000–150,000; Sigma Chemicals, France), coating the bottom of Lab-tek™ II chamber slides (Thermo Scientific, France) and incubated overnight at 29°C, before performing single-cell RT-PCR experiments.

Single-Cell RT-PCR

Under an inverted microscope equipped with a micromanipulator, we used a glass micropipette to pick up an individual DUM neuron that was expelled into a DNase/

RNAse-free PCR tube and immediately frozen at -80°C . To each sample containing a single DUM neuron, we added $0.5\ \mu\text{l}$ of DNase I (Invitrogen, France) and $2\ \mu\text{l}$ of 20 mM Tris buffer. Tubes were incubated at 37°C for 15 min and at 85°C for 5 min. The reverse transcription was performed in a final volume of $15\ \mu\text{l}$ containing 10 mM dNTP, $50\ \mu\text{M}$ Oligo(dT)₂₀ primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 5 mM MgCl_2 , 13.3 mM dithiothreitol (DTT), 2.5 units recombinant ribonuclease inhibitor (RNase OUT), and 13.5 units SuperScript III reverse transcriptase. Reactions were performed for 2 min, then stopped by heating at 85°C for 5 min, and treated with $0.5\ \mu\text{l}$ RNase H at 37°C for 20 min.

The amplification of CaMKII was realized in two steps, a first-round multiplex PCR, to amplify several transcripts using the primers CKE-S1 and CKE-R1, and a second round of amplification using the nested primer pairs, CK-S3 and CK-R6. PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

Optimization of PCR Sensitivity

PCR conditions were optimized using actin gene as control (Moignot et al., 2009) and modified according to the nested primers used. Final PCR products were subcloned into pCR4-TOPO[®] (Invitrogen) and sequenced by Millegen Biotechnology Company (Toulouse, France).

Bioinformatic Analysis

Periplaneta americana CamKII were compared with other insect CamKII sequences using GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sequence alignments were made with BioEdit software using Clustal W, and were used to determine the percentage of homology using sequence identity matrix application on protein sequences. The exon/intron structure of *Drosophila* CamKII gene was based on data available on FlyBase (<http://flybase.org/> updated on October 2012). Phylogenetic tree was made on nucleotidic sequences with Mega5.10 software using neighbor-joining statistical method with Bootstrap test at 1,000 replications and p-distance as substitution model.

RESULTS

Identification of CaMKII Isoforms in the Cockroach Nervous System

To amplify the complete 1,600 nt ORF of CaMKII cDNAs (Fig. 1A), we designed specific primers using cDNAs of the nerve cord of *P. americana*. Several clones were sequenced in both strands, displaying cDNA inserts encoding five isoform proteins of different sizes: 486, 507, 526, and 528 amino acids. Blast analysis allowed us to identify three domains, a catalytic domain of protein kinase family protein, regulatory, and association domain (Fig. 1B), all highly homologous to insect CaMKII enzymes (Tobimatsu and Fujisawa, 1989; Bai et al., 1991; Griffith and Greenspan, 1993; Ohsako et al., 1993; Bayer et al., 1999). The association domain of the five splice forms of *P. americana* contains either a variable region R (GuptaRoy et al., 1996) with one or two distinct 21 amino acids inserts (named inserts 1 and 2, respectively), or none of them. Three splice variants of *P. americana* CaMKII also differed from each other by the insertion of a Lysine-Serine-Glycine (KSG) tripeptide located at the N-terminal extremity of the association domain instead of a single S (Fig. 1C). We also found an additional Glu codon and Ala codon at the 3' and 5' ends of the insert regions, confirming possible additional variation. Consequently, according

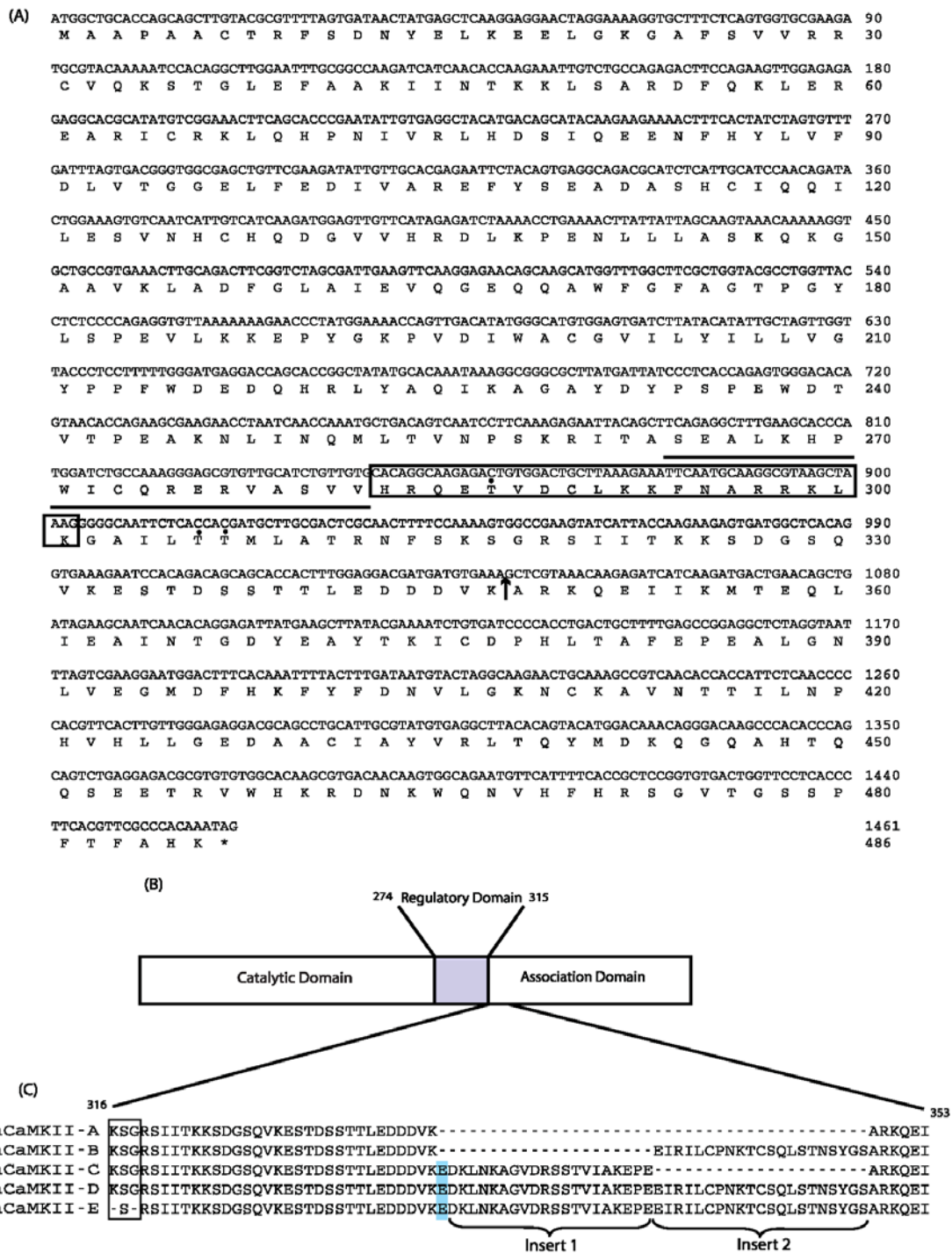


Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of CaMKII isoforms of the cockroach *P. americana*. (A) Nucleotide and deduced amino acid residues corresponding to the 486 amino acids of PaCaMKII-A. The arrow represents the position at which additional nucleotides are inserted at position between nucleotides 1,041 (amino acid 347) and 1,042 (amino acid 348). The asterisk marks the translation-termination codon. The autoinhibition region in the regulatory domain is boxed and the CaM-binding region is indicated by the upper border. The main autophosphorylation sites Thr287, 306, and Ser315 are indicated by black dots. (B) Organization of CaMKII with the three domains (catalytic, regulatory, and association domains). The variable region in which deletion and insertion occurred is located at the beginning of the association domain. (C) Amino acid sequences of the variable regions containing inserts 1 and 2 and KSG motif.

to the Flybase nomenclature, the five isoenzymes were named PaCaMKII-A (KSG and no insert in region R, accession number ADX05541.1), PaCaMKII-B (KSG and insert 2 in region R, accession and insert 2 in region R, accession number ADX05542.1), PaCaMKII-C (KSG + insert 1 in region R, accession number ADX05543.1), PaCaMKII-D (KSG + insert 1 and 2 in region R, accession number ADX05544.1), and PaCaMKII-E (KSG + insert 1 and 2, in region R, accession number KC733178).

Comparison of *P. americana* PaCaMKII with *Drosophila* DmCaMKII Isoforms

Nine CaMKII isoforms have been cloned and characterized in *D. melanogaster* (GuptaRoy et al., 1996; GuptaRoy and Griffith, 1996). Based on bioinformatics analysis, we found that a small number of CaMKII sequences of other insect species were available in databases, indicating that splicing events have been poorly documented for CaMKII. Studies performed in *D. melanogaster* demonstrated a similar alternative splicing leading to several CaMKII isoforms differing by the size of the variable region R (Table 2). Thus, we defined the nomenclature of PaCaMKII isoforms according to DmCaMKII nomenclature (Table 3). Amino acid sequences comparison between PaCaMKII and DmCaMKII isoforms showed a high level of homology ranging between 82.7 and 89.8% (data not shown). Phylogenetic analysis with several CaMKII isoforms available in the database showed that PaCaMKII-A, PaCaMKII-B, PaCaMKII-C, and PaCaMKII-D isoforms formed a cluster that was distinct from PaCaMKII-E. In addition, all PaCaMKII isoforms were distinct from DmCaMKII isoforms and belonged to a specific cluster (Fig. 2).

Expression Pattern of CaMKII in Diverse Tissues

We identified the expression of PaCaMKII in different cockroach tissues by RT-PCR with primers amplifying a fragment of some 1,000 nucleotides that cover a large part of the ORF. Several bands were systematically observed indicating that the expression of CaMKII isoforms is multiple in all tissues (Fig. 3): nerve cord, head, muscles, gut, and accessory glands (Fig. 3A). We then designed specific primers encompassing the inserts 1 and 2 to characterize the expression of PaCaMKII-B and PaCaMKII-C (see Table 1). The amplification of a 365-bp fragment indicated the presence of isoforms with a single insert, 1 or 2 (PaCaMKII-B or PaCaMKII-C). Interestingly, we found that these two isoforms were expressed in the nerve cord and muscles, but that they were not detectable in the other tissues (Fig. 3A), suggesting that only PaCaMKII-A and PaCaMKII-D are strongly expressed in all tissues. We further studied the expression of PaCaMKII isoforms in DUM neurons localized in the sixth abdominal ganglion, as it is known that PaCaMKII is involved in DUM neuron physiology. Single-cell RT-PCR allowed to amplify a single band sequence corresponded only to PaCaMKII-E isoform (Fig. 3B), suggesting that other variants are not expressed in DUM neurons.

DISCUSSION

This article describes the molecular analysis of five splice forms of CaMKII in the nerve cord of the cockroach *P. americana*. PaCaMKII shares structural features with previous insect CaMKII isoforms, which have been cloned in full length from *D. melanogaster* (Ohsako et al., 1993) and partially from *B. germanica* (Inagaki et al., 1998). Our findings indicate that five isoforms of 486, 507 (two isoforms), 526 and 528 amino acids are expressed in

Expression of CaMKII Isoforms in the Cockroach

 Table 2. *Drosophila melanogaster* CaMKII Isoforms and Associated Nomenclature

CaMKII isoforms	Accession number (protein)	CDS size (aa)	Exons encoding 5' UTR	Exons encoding 3' UTR	Standard nomenclature of variable region	Variable region structure	Exons encoding variable region	References
DmCamKII-A	NP_726633	490	CamKII:24 (36 bp)	CamKII:1 (1,255 bp)	R3A	A	CamKII:7	GuptaRoy et al. (2000, 1996)
DmCamKII-C	NP_524635.3		CamKII:25 (206 bp)	CamKII:1 (1,255 bp)				Hoskins et al. (2007)
DmCamKII-H	NP_001162831.1		CamKII:22 (624 bp)	CamKII:2 (123 bp)				Ohsako et al. (1993)
DmCamKII-B	NP_726634	509	CamKII:23 (72 bp)	CamKII:1 (1,255 bp)	R4A	E + insert 1 + A	CamKII:11 + CamKII:7	Hoskins et al. (2007)
DmCamKII-E	NP_726636.2		CamKII:25 (206 bp)	CamKII:1 (1,261 bp)				Ohsako et al. (1993)
DmCamKII-D	NP_726635.2	530	CamKII:25 (206 bp)	CamKII:1 (1,261 bp)	R6E	E + insert 1 + insert 2	CamKII:11 + CamKII:9	Hoskins et al. (2007)
DmCamKII-I	NP_001162832		CamKII:24 (26 bp) CamKII:21 (66 bp)	CamKII:1 (1,261 bp)				Ohsako et al. (1993)
DmCamKII-G	NP_001014696.1	516	CamKII:25 (206 bp)	CamKII:1 (1,261 bp)	R7	E + insert 1 + insert 3 + A	CamKII:11 + CamKII:8	Hoskins et al. (2007)
DmCamKII-J	NP_001162833.1	531	CamKII:24 (26 bp)	CamKII:2 (123 bp)	R5	E + insert 1 + insert 2 + A	CamKII:11 + CamKII:9 + CamKII:7	Ohsako et al. (1993) GuptaRoy et al. (2000, 1996)
								Hoskins et al. (2007)

Variable regions are indicated. CDS : Coding DNA sequence. UTR : Untranslated region.

Table 3. Description of Five Splice Variants of CaMKII in the Cockroach *P. americana*

CaMKII isoform	Accession number (protein)	CDS size (aa)	Standard nomenclature of variable region	Beginning of association domain	Variable region structure
PaCaMKII-A	ADX05541.1	486	R3	KSG	None
PaCaMKII-B	ADX05542.1	507	R1	KSG	Insert 2
PaCaMKII-C	ADX05543.1	507	R4	KSG	E + insert 1
PaCaMKII-D	ADX05544.1	528	R6E	KSG	E + insert 1 + insert 2
PaCaMKII-E	KC733178	526	R6E'	S	E + insert 1 + insert 2

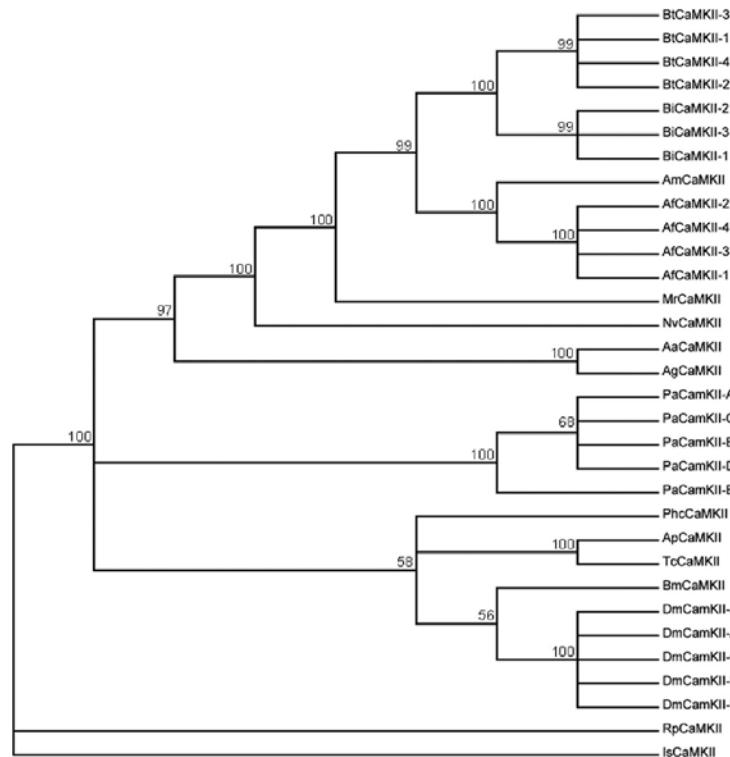


Figure 2. Phylogenetic tree of CaMKII isoforms in several insect species. Bootstrap consensus tree was built on Mega 5.10 software using neighbor-joining statistical method (Bootstrap with 1,000 replications and *P*-distance substitution model) and was rooted with *Ixodes scapularis* sequence. The accession numbers of the insect CaMKII nucleotide sequences are as follows: for *P. americana* PaCaMKII-A (HQ176454.1), PaCaMKII-B (HQ176455.1), PaCaMKII-C (HQ176456.1), PaCaMKII-D (HQ176457.1), and PaCaMKII-E (KC733178); for *Drosophila melanogaster* DmCaMKII-A (NM_166810.5), DmCaMKII-B (NM_166811.2), DmCaMKII-D (NM_166812.3), DmCaMKII-G (NM_001014696.2), and DmCaMKII-J (NM_001169362.2); for *Bombus terrestris* BtCaMKII-1 (XM_003395003.1), BtCaMKII-2 (XM_003395004.1), BtCaMKII-3 (XM_003395005.1), and BtCaMKII-4 (XM_003395006.1); for *Bombus impatiens* BiCaMKII-1 (XM_003492214.1), for *B. terrestris* BtCaMKII-2 (XM_003492215.1) and BtCaMKII-3 (XM_003492216.1); for *Apis mellifera* AmCaMKII (NM_001134950.1); for *Apis florea* AfCaMKII-1 (XM_003689647.1), AfCaMKII-2 (XM_003689648.1), AfCaMKII-3 (XM_003689649.1), and AfCaMKII-4 (XM_003689650.1); for *Megachile rotundata* MrCaMKII (XM_003703869.1); for *Nasonia vitripennis* NvCaMKII (XM_001606116.2); for *Aedes aegypti* AaCaMKII (XM_001663963.1); for *Anopheles gambiae* AgCaMKII (XM_311134.4); for *Pediculus humanus corporis* PhcCaMKII (XM_002431527.1); for *Acyrtosiphon pisum* ApCaMKII (XM_001945444.2); for *Tribolium castaneum* TcCaMKII (XM_961795.1); for *Bombyx mori* BmCaMKII (AB563704.1); for *Rhipicephalus pulchellus* RpCaMKII (GACK01007294.1); for *I. scapularis* IsCaMKII (XM_002408971.1).

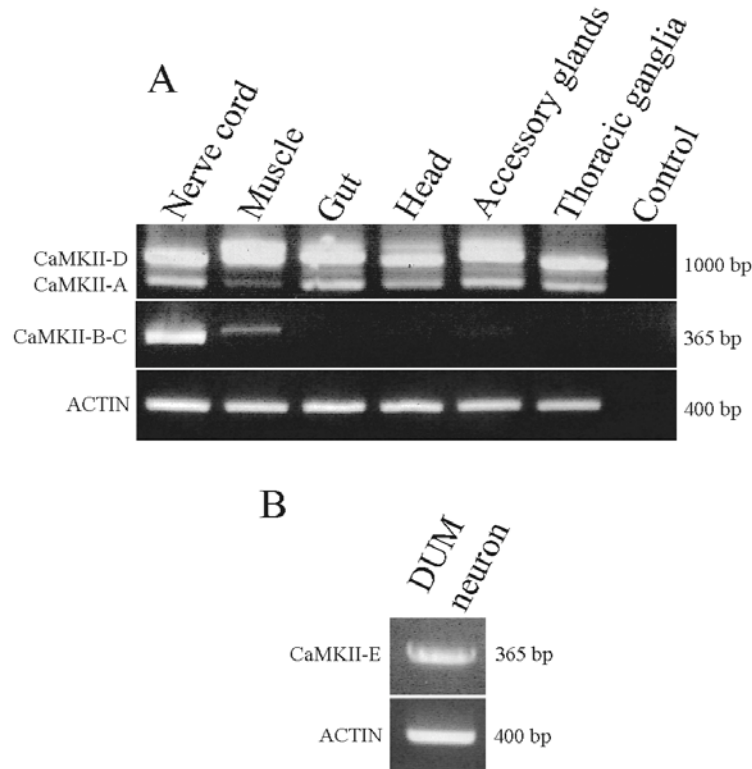


Figure 3. CaMKII isoforms expression in *P. americana*. (A) RT-PCR analysis of splice variants in different tissues. Equal amount of cDNA template (1 µg) were used to amplify full-length ORF of CaMKII cDNAs under the same RT-PCR conditions. (B) Identification of PaCaMKII isoforms expressed in the nerve cord and muscle. RT-PCR amplifications were carried out using primers encompassing variable region R, allowing the identification of PaCaMKII-B, PaCaMKII-C, and PaCaMKII-D isoforms. (C) Identification of PaCaMKII isoforms in DUM neuron. The detection and identification of PaCaMKII-E isoform in DUM neuron was performed by single-cell RT-PCR. In all conditions, actin (GenBank accession number AY116670) was used as quantitative and positive control for RT-PCR experiments. Negative controls of RT-PCR experiments were performed with extracellular solution in which all tissues were dissected (see Materials and Methods).

the nervous system of *P. americana*. Their sequences are identical to one other, except for the presence of two peptides of 21 amino acids inserted between amino acids 347 and 348, which resulted from alternative splicing. These results are consistent with previous studies from *D. melanogaster* in which several isoforms encoding CaMKII have been also found (Ohsako et al., 1993; GuptaRoy et al., 2000). Indeed, at least nine DmCaMKII isoforms ranging from 489 to 531 amino acids have been identified, which are generated from the same gene and alternative splicing of exons 11, 12, and 13, and additional variations at the 5' and 3' ends of these inserted exons (Griffith and Greenspan, 1993; Ohsako et al., 1993; Takamatsu et al., 1994; GuptaRoy et al., 1996; GuptaRoy et al., 2000). All of these DmCaMKII differ from each other by the association domain in which insertions or deletions of peptides with variable amino acids size occurred by alternative splicing and the existence of multiple acceptor sites at the 3' and 5' ends of the inserted exons (GuptaRoy et al., 2000). Interestingly, we found that the insertions in the variable region R of PaCaMKII are homologous to *Drosophila* inserts 1 and 2 (GuptaRoy et al., 2000), suggesting that similar alternative splicing events occur to generate the *P. americana* isoforms. In insect species, for which genome data are available, *CaMKII* gene is present in a single copy. Consequently, and in accordance with previous studies, we suggested that

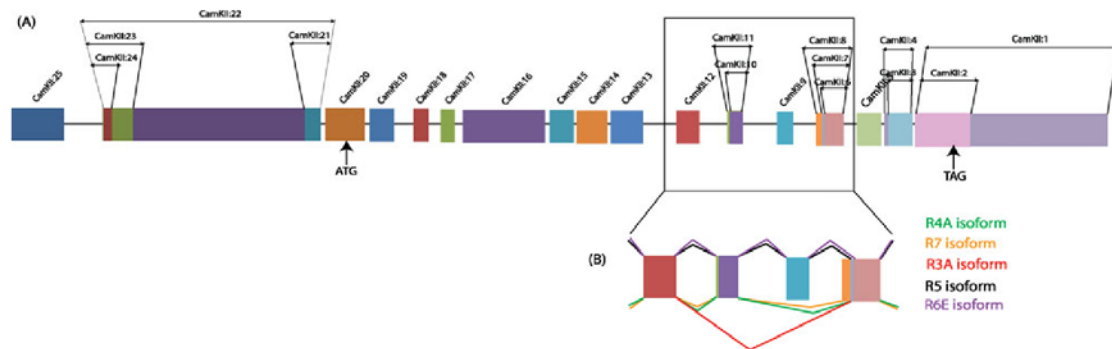


Figure 4. Hypothetical organization of PaCaMKII gene based on similarities to *Drosophila melanogaster* information. (A) Exons are represented by boxes and are named according to Flybase nomenclature. The start codon (ATG) and stop codon (TAG) are also indicated. (B) Variable region in five splice variants of DmCaMKII. Alternative splicing of exons in the variable region is represented according to Flybase and bioinformatic analysis using the *Drosophila* genome sequence available.

a *CaMKII* single-copy gene could encode the five isoforms in *P. americana*. According to *Drosophila* data available and the present results, we have summarized the *CaMKII* gene structure in Figure 4. Thus, different mechanisms led to CaMKII expression between insects and mammals, because in mammals, CaMKII diversity was generated by multiple genes encoding for distinct α , β , γ , and δ forms and alternative splicing of these genes (Heist and Schulman, 1998; Bayer et al., 1999; Gangopadhyay et al., 2003; Kiriyaama et al., 2003; Yamauchi, 2005).

In the present study, we also demonstrated that cockroach CaMKII were expressed in both nonexcitable and excitable tissues. Our data suggested that PaCaMKII-A and PaCaMKII-D were expressed in all tissues whereas PaCaMKII-B and PaCaMKII-C were expressed in the nerve cord and the muscles. Particularly, single-cell RT-PCR results are consistent with the existence of PaCaMKII-E in DUM neurons. This kind of tissue-specific expression was previously identified in honeybee Kenyon cells (Kamikouchi et al., 2000; Pasch et al., 2011), mainly in the noncompact Kenyon cells. This expression suggested a specific role in these cells because it was absent in the inner and outer compact Kenyon cells (Pasch et al., 2011), but it remains to be elucidated whether different CaMKII isoforms exist in honeybee. In final, we have identified several CaMKII isoforms in the cockroach nervous system and confirmed that they could be identified in other insects with a tissue-specific expression. It was proposed that one possible reason for having multiple isoforms of this kinase could be to facilitate differential phosphorylation of substrates, reflecting differences in the affinity of each isoform (GuptaRoy et al., 2000). This differential expression could result in a strategy for controlling multiple disparate processes with a single enzyme. The functional role of each isoform has not been studied in the present study. In particular, the functional role of PaCaMKII-E isoform in DUM neuron should be identified. Our future goal will be to characterize the function of each of these isoforms in the cockroach nervous system using shRNA specific to each inserted domain. In addition, regarding the number of isoforms in *D. melanogaster*, we could suspect that other isoforms might exist in cockroach and be identified by alternative strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

E. Taillebois acknowledges the French “Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur” for financial support in the framework of Ph.D. grant.

LITERATURE CITED

- Alix P, Grolleau F, Hue B. 2002. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase regulates GABA-activated Cl^- current in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol* 87(6):2972–2982.
- Bai D, Lummis SCR, Leicht W, Breer H, Sattelle DB. 1991. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pest Sci* 33:197–204.
- Bayer KU, Lohler J, Schulman H, Harbers K. 1999. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 70(1):147–154.
- Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal PY, Thany SH, Lapied B. 2012. Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J Pharmacol Exp Ther* 341(2):326–339.
- Burkert P, Duch C. 2006. Developmental changes of CaMKII localization, activity and function during postembryonic CNS remodelling in *Manduca sexta*. *Eur J Neurosci* 23(2):335–349.
- Cho KO, Wall JB, Pugh PC, Ito M, Mueller SA, Kennedy M. 1991. The α subunit of type II Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase is highly conserved in *Drosophila*. *Neuron* 7:439–450.
- Courjaret R, Lapied B. 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* 60(1):80–91.
- Gangopadhyay SS, Barber AL, Gallant C, Grabarek Z, Smith JL, Morgan KG. 2003. Differential functional properties of calmodulin-dependent protein kinase II gamma variants isolated from smooth muscle. *Biochem J* 372(Pt 2):347–357.
- Griffith LC. 2004. Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J Neurosci* 24(39):8394–8398.
- Griffith LC. 2008. CaMKII: new tricks for an old dog. *Cell* 133(3):397–399.
- Griffith LC, Greenspan RJ. 1993. The diversity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in *Drosophila* is generated by alternative splicing of a single gene. *J Neurochem* 61(4):1534–1537.
- GuptaRoy B, Beckingham K, Griffith LC. 1996. Functional diversity of alternatively spliced isoforms of *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. A role for the variable domain in activation. *J Biol Chem* 271(33):19846–19851.
- GuptaRoy B, Griffith LC. 1996. Functional heterogeneity of alternatively spliced isoforms of *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 66(3):1282–1288.
- GuptaRoy B, Marwaha N, Pla M, Wang Z, Nelson HB, Beckingham K, Griffith LC. 2000. Alternative splicing of *Drosophila* calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates substrate specificity and activation. *Brain Res Mol Brain Res* 80(1):26–34.
- Heist EK, Schulman H. 1998. The role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases within the nucleus. *Cell Calcium* 23(2-3):103–114.
- Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan KH, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P, Karpen GH, Celniker SE. 2007. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 316(5831):1625–1628.
- Inagaki S, Kaku K, Dunlap DY, Matsumura F. 1998. Sequences of cDNAs encoding calmodulin, and partial structures of calmodulin kinase, and a calcium channel of kdr-resistant and -susceptible German cockroaches, *Blattella germanica*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 120(2):225–233.

- Kadas D, Tzortzopoulos A, Skoulakis EM, Consoulas C. 2012. Constitutive activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II during development impairs central cholinergic transmission in a circuit underlying escape behavior in *Drosophila*. *J Neurosci* 32(1):170–182.
- Kamikouchi A, Takeuchi H, Sawata M, Natori S, Kubo T. 2000. Concentrated expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. *J Comp Neurol* 417(4):501–510.
- Kiriyama K, Nishiwaki H, Nakagawa Y, Nishimura K. 2003. Insecticidal activity and nicotinic acetylcholine receptor binding of dinotefuran and its analogues in the housefly, *Musca domestica*. *Pest Manag Sci* 59(10):1093–1100.
- Lohr C, Bergstein S, Hirnet D. 2007. Developmental distribution of CaM kinase II in the antennal lobe of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res* 327(1):189–197.
- Lu CS, Hodge JJ, Mehren J, Sun XX, Griffith LC. 2003. Regulation of the Ca^{2+} /CaM-responsive pool of CaMKII by scaffold-dependent autophosphorylation. *Neuron* 40(6):1185–1197.
- Mehren JE, Griffith LC. 2004. Calcium-independent calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the adult *Drosophila* CNS enhances the training of pheromonal cues. *J Neurosci* 24(47):10584–10593.
- Mehren JE, Griffith LC. 2006. Cholinergic neurons mediate CaMKII-dependent enhancement of courtship suppression. *Learn Mem* 13(6):686–689.
- Moignot B, Lemaire C, Quinchard S, Lapied B, Legros C. 2009. The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: evidence for an early duplication of the para-like gene. *Insect Biochem Mol Biol* 39(11):814–823.
- Murillo L, Hamon A, Es-Salah-Lamoureux Z, Itier V, Quinchard S, Lapied B. 2011. Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology* 32(6):828–835.
- Ohnishi A, Hull JJ, Kaji M, Hashimoto K, Lee JM, Tsuneizumi K, Suzuki T, Dohmae N, Matsumoto S. 2011. Hormone signaling linked to silkworm sex pheromone biosynthesis involves Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of the insect PAT family protein *Bombyx mori* lipid storage droplet protein-1 (BmLsd1). *J Biol Chem* 286(27):24101–24112.
- Ohsako S, Nishida Y, Ryo H, Yamauchi T. 1993. Molecular characterization and expression of the *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II gene. Identification of four forms of the enzyme generated from a single gene by alternative splicing. *J Biol Chem* 268(3):2052–2062.
- Pasch E, Muenz TS, Rossler W. 2011. CaMKII is differentially localized in synaptic regions of kenyon cells within the mushroom bodies of the honeybee brain. *J Comp Neurol* 519(18):3700–3712.
- Takamatsu Y, Ohsako S, Nishida Y, Yamauchi T. 1994. Identification of an alternative form of the *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II that is maternally derived. *Biochim Biophys Acta* 1220(2):188–192.
- Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B. 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28(1):14–22.
- Tobimatsu T, Fujisawa H. 1989. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 264(30):17907–17912.
- Yamauchi T. 2005. Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II—discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* 28(8):1342–1354.

3) Influence de l'isoforme E de la CaMKII sur les courants nicotiques dans les DUM (Dorsal Unpaired Median) neurones de la blatte.

Ces résultats font l'objet de la **publication n°5**.

« Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. »

Olivier List, Delphine Calas-List, Emiliane Taillebois, Marjorie Juchaux, Emilie Heuland and Steeve H. Thany. Journal of Neurochemistry (2014) 10 1111/jnc 12752

Résumé de la publication

Les données précédentes nous ont permis de montrer que seule l'isoforme PaCaMKII-E est exprimée dans les DUM neurones. Des oligonucléotides antisens dirigés contre cette isoforme ont montré que 24h après incubation des cellules, les courants induits par la nicotine étaient réduits. L'effet de l'inhibition de PaCaMKII-E altère aussi bien les récepteurs sensibles et insensibles à l' α -Bgt. De même, l'inhibition de la PaCaMKII-E affecte l'amplitude des courants induits par la clothianidine. Ces résultats montrent très clairement que la PaCaMKII-E serait impliquée dans la modulation des courants induits par la nicotine et la clothianidine via les récepteurs sensibles et insensibles à l' α -Bgt.

Nous avons également montré que l'inhibition de PaCaMKII-E induit une diminution de l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire consécutive à l'application de la clothianidine, suggérant que l'élévation de la concentration en Ca^{2+} observée dans les études précédentes se faisait au moins en partie via une activation de la voie de la CaMKII.

Dans tous les cas, ces résultats préliminaires montrent clairement que les voies de régulation intracellulaire impliquant le calcium et la CaMKII sont impliquées dans la modulation de l'effet des insecticides néonicotinoïdes.

ORIGINAL
ARTICLE

Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents

Olivier List,* Delphine Calas-List,* Emiliane Taillebois,* Marjorie Juchaux,† Emilie Heuland* and Steeve H. Thany*

*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/USC INRA 1330/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, Angers, France

†Université d'Angers, SFR QUASAV-IMAC, Beaucouzé, France

Abstract

Cellular responses to Ca^{2+} require intermediary proteins such as calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), which transduces the signal into downstream effects. We recently demonstrated that the cockroach genome encodes five different CaMKII isoforms, and only PaCaMKII-E isoform is specifically expressed in the dorsal unpaired median neurosecretory cells. In the present study, using antisense oligonucleotides, we demonstrated that PaCaMKII-E isoform inhibition reduced nicotine-induced currents through α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Specifically, PaCaMKII-E isoform is sufficient to repress nicotinic current amplitudes as a result of its depression by antisense oligonucleotides. Similar results were found using the neonicotinoid insecticide clothianidin, which acted as a full agonist of dorsal unpaired median neuron nicotinic

acetylcholine receptors. Clothianidin current amplitudes are strongly reduced under bath application of PaCaMKII-E antisense oligonucleotides but no significant results are found with α -bungarotoxin co-applied, demonstrating that CaMKII-E isoform affects nicotine currents through α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive receptor subtypes whereas clothianidin currents are reduced via α -bungarotoxin-insensitive receptors. In addition, we found that intracellular calcium increase induced by nicotine and clothianidin were reduced by PaCaMKII-E antisense oligonucleotides, demonstrating that intracellular calcium increase induced by nicotine and clothianidin are affected by PaCaMKII-E inhibition.

Keywords: calcium, CaMKII, clothianidin, nicotine, nicotinic receptors.

J. Neurochem. (2014) 10.1111/jnc.12752

Calcium pathways play a major function in the modulation of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) function. Increases in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) are detected by multiple calcium-sensing proteins such as calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). CaMKII is found in a variety of organisms and tissue types, including insect neurons (Kamikouchi *et al.* 2000; Takamatsu *et al.* 2003; Lohr *et al.* 2007; Taillebois *et al.* 2013). In the cockroach efferent dorsal unpaired median (DUM) neurons, it was proposed that CaMKII modulated nAChRs function (Thany *et al.* 2007). As all our results suggest that CaMKII is linked to nicotine (Nic) and clothianidin (CLO) effects and DUM neuron nAChRs function, the direct link between CaMKII and nicotine-induced currents remains unclear, as several isoforms exist in the cockroach CNS (Taillebois *et al.* 2013).

In the cockroach CNS, we recently identified and cloned five CaMKII isoforms (named PaCaMKII-A to E) encoded by only one gene (Taillebois *et al.* 2013). They differed by splicing mechanism leading to the expression of several

Received March 8, 2014; revised manuscript received April 8, 2014; accepted April 25, 2014.

Address correspondence and reprint requests to Steeve H. Thany, Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/USC INRA 1330/SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 Bd. Lavoisier, 49045 Angers, France. E-mail: steeve.thany@univ-angers.fr

Abbreviations used: AON, antisense oligonucleotides; CaMKII, calcium-calmodulin-dependent protein kinase II; CLO, clothianidin; DUM, dorsal unpaired median; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; Nic, nicotine; PBS, phosphate-buffered saline; SON, sense oligonucleotides.

isoforms (Taillebois *et al.* 2013). Their tissue distribution demonstrated that PaCaMKII-A and PaCaMKII-D were ubiquitously expressed where only PaCaMKII-B and PaCaMKII-C were preferentially expressed in the nerve cord and muscles. Single-cell RT-PCR demonstrated that only PaCaMKII-E isoform was expressed in the DUM neurons (Taillebois *et al.* 2013). In the present study, using antisense strategy, we demonstrate that the inhibition of PaCaMKII-E isoform results in a strong reduction of Nic-induced current amplitudes. Similar effects are found using the neonicotinoid CLO, which acts as an agonist of DUM neuron nAChRs (Thany 2009; Bodereau-Dubois *et al.* 2012). These results show for the first time that a specific CaMKII isoform plays a role in the modulation of nAChR function in insect neurosecretory cells.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed using adult male cockroaches *Periplaneta americana* reared at 29  C under a 12:12 h light/dark cycle.

DUM neuron dissociation

Experiments were conducted on DUM neuron cell bodies isolated from the midline portion of the terminal abdominal ganglia (TAG) following enzymatic treatment and mechanical dissociation previously described (Lapied *et al.* 1989; Calas-List *et al.* 2012, 2013).

Immunocytochemistry

Isolated DUM neurons were first fixed in 2% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min. Then, they were washed in PBS for 3   5 min. To block non-specific binding, DUM neurons were pre-incubated with 10% normal goat serum and 0.5% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Primary antibodies [mouse anti-CaMKII, 1 : 400 (Millipore, clone 6G9)] were diluted in 1% normal serum and 0.5% bovine serum albumin in PBS. Antibodies were applied for 2 h. After washing three times for 5 min in PBS, the fluorescent-labelled secondary antibodies (goat anti-mouse Alexa-488 antibodies; 1 : 1500, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were incubated for 1 h in the dark. Neurons were then rinsed in PBS and mounted on glass slides in Fluoroshield. All steps of labelling were performed at 20  C. Note that the anti-CaMKII antibody raised against the α -subunit of rat CaMKII cross-reacted in *Bombyx mori* (Shanavas *et al.* 1998) and *Manduca sexta* (Burkert and Duch 2006). Images were acquired with a Nikon A1S1 confocal laser scanning microscope, and were analysed using Image-J software (NIH, Bethesda, MA, USA). Alexa 488 was excited with a blue argon laser (488 nm) and detected between 510 and 530 nm.

Single cell RT-PCR

Under an inverted microscope equipped with a micromanipulator, we used a glass micropipette to pick up individual DUM neurons. The cell contents were collected by aspiration into a patch pipette, which was connected to the recording patch clamp electrode. The collected cell was expelled into a DNase/RNase free PCR tube

and immediately frozen at -80  C. The subsequent reverse transcription was carried out as previously described by Taillebois *et al.* (2013).

qPCR experiments

Total RNA was extracted from 30 isolated DUM neurons using RNA Easy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), treated with DNase I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and retrotranscribed with Superscript II first strand synthesis system (Invitrogen) using oligo (dT) primers. Specific primers were based on the PaCaMKII-E sequence previously cloned (Taillebois *et al.* 2013). Amplification efficiency of each primer couple was determined using a standard curve ranging from 1.6 to 200 ng/ μ L (Pfaffl 2001; Bustin *et al.* 2009). Efficiencies obtained were between 1.9 and 2.1, which allowed their use for qPCR experiments. qPCR experiments were performed on ABI Prism   7700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), in a final volume of 18 μ L using 9 μ L of 2X SYBR  Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 ng of total cDNA and 0.75 μ M of each primer. Cycling conditions were 2 min at 50  C and 10 min at 95  C, amplification and quantification program repeated 40 times (15 sec at 95  C and 1 min at 60  C) using the dissociation protocol (60  C to 95  C by 1  C increments followed by a 30-s hold and fluorescent measurement). The relative expression ratio (R) was calculated according to the Pfaffl formula (Pfaffl 2001). Untreated DUM neurons were used as control and quantification was determined after sense (SON) or antisense oligonucleotides (AON) treatment.

Inhibition of CaMKII-E expression

AON and SON were synthesized to be complementary to the coding sequences of PaCaMKII-E isoform (Taillebois *et al.* 2013). The antisense strategy was previously described and optimized to avoid possible non-specific effects of oligonucleotide exposure (Churn *et al.* 2000; Francescato *et al.* 2010). AON or SON (2 μ L) was added directly to the culture media containing DUM neurons for 24 h. The final concentration of each oligonucleotide was 500 μ M. They were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

Electrophysiological recordings

Signals were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Axon instruments, Foster City, CA, USA), connected to a computer with pClamp software control (pClamp 10.0, Axon Instruments), according to our previous studies (Calas-List *et al.* 2012, 2013). For each curve, I/I_{max} were normalized according to the I_{max} recorded in the same experimental condition.

Calcium imaging

Calcium imaging experiments were performed using isolated fura-2 loaded DUM neurons as previously demonstrated (Calas-List *et al.* 2013). We used an inverted Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon, Tokyo, JAPAN) equipped with a Lambda DG4 wavelength switcher (Sutter instrument, Novato, CA, USA). Images were collected with an Orca-R2 CCD camera (Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan) and recorded with Imaging Workbench software (Version 6, Indec BioSystems, Santa Clara, CA, USA). Calcium transients were analyzed as peak delta R/R₀. Experiments were carried out at 20  C. All drugs were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

For statistical analysis, one-way Anova and Bonferroni *post hoc* test were employed, using Prism program (GraphPAD software, San Diego, CA, USA). Each current was normalized according to the I_{max} recorded in the same condition.

Results

PaCaMKII-E inhibition modifies nicotine-induced currents through activation of α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes

We previously demonstrated that the CaMKII-E isoform was only expressed in DUM neurons (Taillebois *et al.* 2013),

suggesting that it plays a crucial function in these cells. Pressure application of 1 mM Nic induced a response with two easily distinguishable phases (Fig. 1a) and 0.5 μ M α -Bgt blocked the fast part of the bi phasic curve. Because Nic-induced currents were recorded 24 h after cell dissociation, we then estimated the level of PaCaMKII-E expression 24 h after cell dissociation. Single cell RT-PCR analysis confirmed the specific expression of PaCaMKII-E isoform on isolated DUM neurons (Fig. 1b) and PaCaMKII-E immunofluorescence signal was preferentially found into the cytosol (Fig. 1c). According to these results, we assume that 24 h after cell dissociation, CaMKII-E is expressed in DUM neurons. To inhibit CaMKII-E expression, several AON

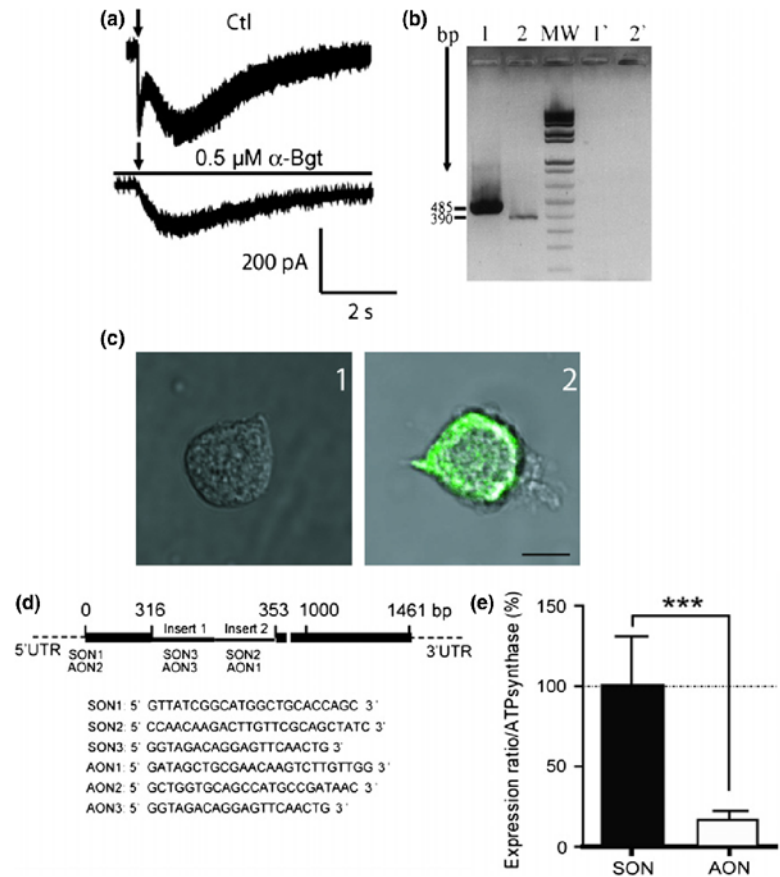


Fig. 1 PaCaMKII-E expression on dorsal unpaired median (DUM) neurons. (a) Nic-induced currents recorded on DUM neurons. Pulse application of 1 mM Nic induced a biphasic current curve. The fast compound of the bi phasic current curve is abolished by bath application of 0.5 μ M α -Bgt. (b) Figure illustrates 2% agarose gel electrophoresis of both PaCaMKII-E (1) and actin (2), single cell RT-PCR 24 h after patch clamp recording. Similar RT-PCR amplification was performed in saline solution (control condition) and no PaCaMKII-E isoform (1') and actin (2') expressions were found. A total of 485 bp covers the specific variable regions containing inserts 1 and 2, and KSG motif (Taillebois *et al.* 2013). MW: molecular weight. (c) PaCaMKII-E isoform was detected using a monoclonal antibody aimed at the α -subunit of rat calcium-

calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (goat anti-IgG mouse-Alexa 488) which was shown to detect CaMKII in *Manduca sexta* (Burkert and Duch 2006) (C1) control condition and (C2) using anti-IgG mouse-Alexa 488. Scale bar indicates 25 μ m. (d) SON and antisense oligonucleotides (AON) used to perform antisense strategy. (e) Quantitative PCR analysis was performed on isolated DUM neurons to verify the decrease in PaCaMKII-E isoform expression 24 h after AON and SON incubation. ATP synthetase is used as reference gene. Similar results were found with two other reference genes, actin and G6PD (data not shown). The bar at 100% represents control condition (DUM neurons without SON and AON). Statistical analysis was performed on Graph-Pad Prism5 software using *t*-test (** $p < 0.001$).

were synthesized against the 5' UTR and the inserts 1 and 2 (Fig. 1d). qPCR experiments showed that PaCaMKII-E expression level was 6-fold lower after AON treatment when compared with SON treatment (Fig. 1e). These data confirmed a strong decrease in PaCaMKII-E expression 24 h after AON treatment.

Under these conditions, we found that AON directed against PaCaMKII-E isoform strongly decreased nicotine-induced current amplitudes. Data were -0.244 ± 0.001 nA and -0.055 ± 0.001 nA, in control condition and after bath application of AON, respectively ($p < 0.001$, $n = 9$, Fig. 2a). The fast and slow components of the current curve were diminished to 70% and 80%, respectively. No significant difference was found between control and SON. Because it was demonstrated that 'mixed nicotinic-muscarinic' currents were sensitive to α -Bgt, the effect of AON was tested under bath application of $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt. Thus, we found that AON reduced Nic-induced current amplitudes to 50% ($p < 0.05$, $n = 10$, Fig. 2b). We therefore proposed that PaCaMKII-E isoform affected Nic currents through activation of α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes.

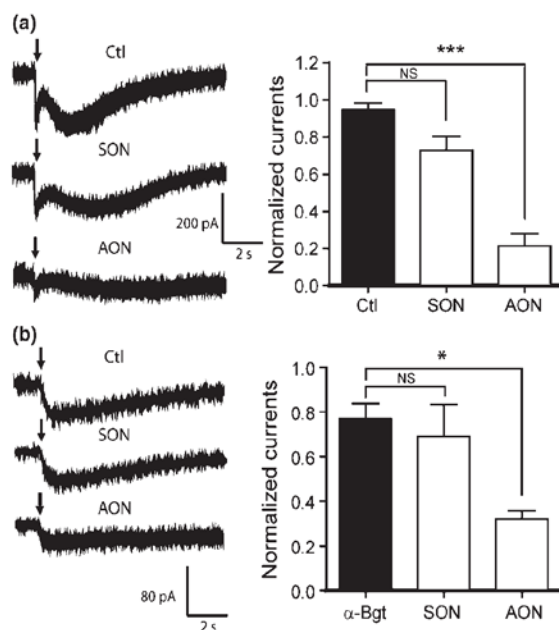


Fig. 2 Effect of antisense oligonucleotides (AON) on nicotine-induced currents. (a) Currents and histograms illustrating the decrease in Nic-induced current amplitudes after bath application of AON. A strong decrease in Nic current amplitudes is found 24 h after bath application of AON. Histograms represent the slow peak (later peak). (b) Similar results in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt which blocks α -Bgt-sensitive and the 'mixed' nicotine-muscarinic receptors (Lapied *et al.* 1990). Only one component of the Nic current curves is found. PaCaMKII-E AON also affects nicotine current amplitudes. Arrows indicate pulse application of Nic. Currents are normalized to the maximum Nic current amplitude recorded in the same condition. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 10$.

PaCaMKII-E influences clothianidin-induced currents through α -Bgt-sensitive receptors

We examined whether CaMKII-E inhibition was involved in the effect of CLO-induced currents. CLO is a neonicotinoid insecticide which acts as a full agonist of DUM neuron nAChRs (Thany 2009; Calas-List *et al.* 2013). Because we demonstrated that nicotine currents were modulated by PaCaMKII-E isoform AON, we hypothesized that similar results could be obtained with different nAChR agonists. As shown in Fig. 3, bath application of PaCaMKII-E AON strongly reduced CLO-induced current amplitudes (Fig. 3a). Currents were reduced from -1.37 ± 0.09 nA to -0.13 ± 0.05 nA ($p < 0.001$, $n = 10$, Fig. 3a). No significant results were found using SON. Data were -1.34 ± 0.34 nA ($p > 0.05$, $n = 8$). When we blocked α -Bgt-sensitive receptors using $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt (Courjaret and

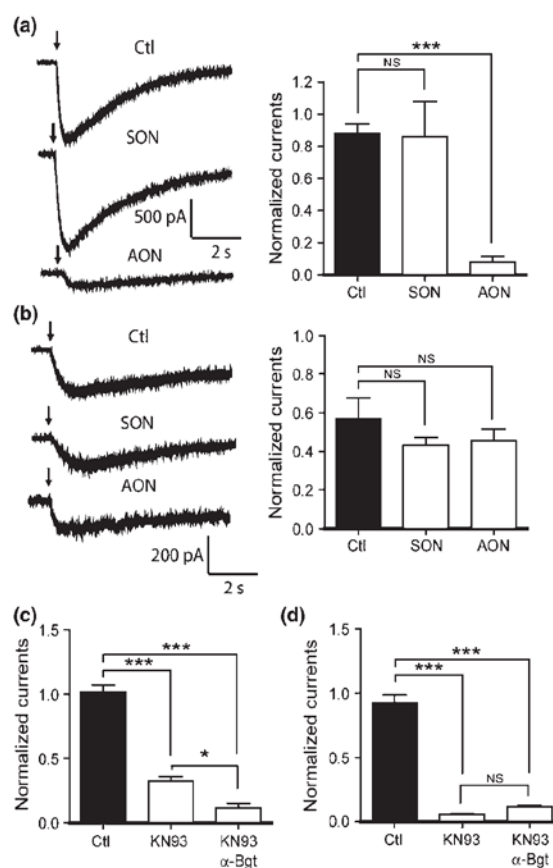


Fig. 3 Antisense oligonucleotides (AON) decrease clothianidin (CLO)-induced current amplitudes. (a) A strong decrease in CLO-induced current amplitudes is found 24 h after bath application of AON. (b) No significant effect is found when α -Bgt-sensitive receptors are blocked with $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt. AON did not affect the current amplitudes induced by pressure application of 1 mM CLO. Arrows indicate pulse application of CLO. (c and d) effect of KN93 on Nic (c) and CLO-induced (d) current amplitudes. All currents are normalized to the maximum current obtained in the same condition. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 8$.

Lapied 2001; Courjaret *et al.* 2003), PaCaMKII-E inhibition did not affect α -Bgt-insensitive nAChR subtypes (Fig. 3b). Current amplitudes were -0.35 ± 0.07 nA in control condition, -0.26 ± 0.02 nA and -0.27 ± 0.04 nA after bath application of SON and AON, respectively ($p > 0.05$, $n = 14$, Fig. 3b). These data demonstrated that PaCaMKII-E inhibition strongly reduced CLO-induced currents through activation of α -Bgt-sensitive nAChR subtypes, but not α -Bgt-insensitive nAChR subtypes. These data were consistent with the finding that PaCaMKII-E inhibition differently modulated Nic and CLO effects on DUM neuron nAChRs.

We confirmed this finding by showing that bath application of KN93, another inhibitor of CaMKII, was also able to differently reduce both Nic and CLO-induced currents. Using the same condition, we found that Nic current amplitudes were reduced to 66 ± 0.1 pA and 31 ± 0.1 with KN93 and co-application of both KN93 and α -Bgt, respectively ($p < 0.001$, $n = 13$, Fig. 3c). However, despite that KN93 strongly reduced CLO-induced current amplitudes to 86 ± 0.01 , α -Bgt co-applied did not affect CLO current amplitudes. Data were 174 ± 0.01 pA ($p < 0.001$, $n = 13$, Fig. 3d), demonstrating that no additional effects were found with co-application of $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt. These results suggest that CLO currents are mostly because of PaCaMKII-E action through α -Bgt-sensitive receptors that interact directly or indirectly with PaCaMKII-E.

PaCaMKII-E isoform inhibition is associated with a decrease in intracellular calcium concentration

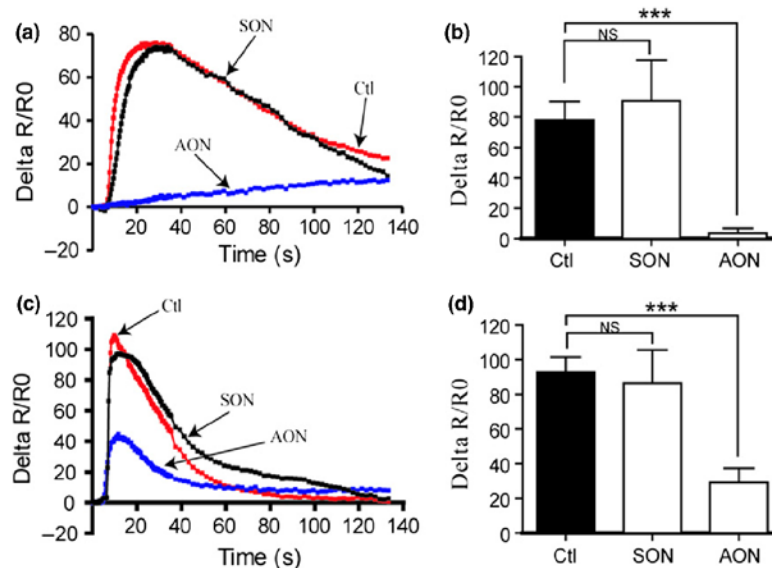
The decrease in Nic and CLO current amplitudes observed after PaCaMKII-E inhibition could be associated with a decrease in intracellular calcium concentration. Indeed, using DUM neurons, we previously demonstrated that Ca^{2+} inhibition decreased nicotine-induced currents and that

CLO-induced currents were associated with an increase in Ca^{2+} concentration (Thany *et al.* 2008; Calas-List *et al.* 2013). Thus, pulse application of 1 mM CLO strongly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Calas-List *et al.* 2013). We therefore determined the change of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after AON treatment and following Nic and CLO applications. Data presented in Fig. 4 illustrate that inhibition of PaCaMKII-E isoform caused a significant decrease in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise following agonists application. More specifically, pulse application of 1 mM Nic did not induce any increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 10 s after pulse application (Fig. 4a and b). Nevertheless, we noted a slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after 140 s recording, under AON treatment (Fig. 4a). In all cases, PaCaMKII-E AON strongly affected $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by 1 mM Nic (Fig. 4b). Pulse application of 1 mM CLO partially increased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise 10 s after CLO application, when compared with control condition (Fig. 4c and d).

Discussion

Studies performed in *Drosophila melanogaster* demonstrated that CaMKII expression in mushroom bodies is associated with courtship behaviour and cholinergic neurons enhance training-dependent suppression of courtship behaviour (Mehren and Griffith 2006). Moreover, it was proposed that in cholinergic giant fibre circuitry, which involved D α 7 nAChR subunit (Fayyazuddin *et al.* 2006), driving constitutively active CaMKII postsynaptically during synapse formation, and stabilization induced different defects in synaptic transmission (Kadas *et al.* 2012). We have previously proposed that PaCaMKII could regulate Nic and CLO currents through activation of nAChR subtypes. Thus, application of nAChR ligands resulted in an increase in intracellular Ca^{2+} concentration (Courjaret and Lapied 2001;

Fig. 4 Effect of SON and antisense oligonucleotides (AON) on intracellular calcium variation. Pulse application of 100 ms of 1 mM Nic induces an increase in fura-2-fluorescence ratio in dorsal unpaired median (DUM) neurons in control condition and under bath application of SON, but not with AON (a and b). Pulse application of 1 mM clothianidin (CLO) induce an increase in $[\text{Ca}]_i$ in control and SON conditions whereas no increase is observed with AON (c and d). Data are mean \pm SEM ($n = 10$). *** $p < 0.001$, significantly different from controls, based on one-way ANOVA with Scheffe's test.



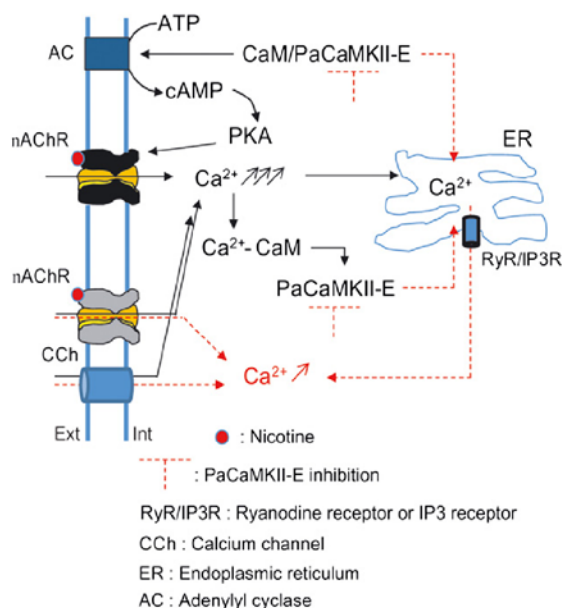


Fig. 5 Calcium pathways and PaCaMKII-E involvement. In red, potential pathways involved in Nic or CLO residual currents and low Ca^{2+} increase.

Courjaret *et al.* 2003; Thany *et al.* 2007; Calas-List *et al.* 2013). Unfortunately, all these data are not attributed to the expression of specific CaMKII isoform although several isoforms are identified in *Drosophila* (Griffith and Greenspan 1993).

Using single-cell RT-PCR and qPCR analysis, we demonstrated that immunochemical expression of a specific CaMKII in DUM neurons was associated with the specific expression of PaCaMKII-E isoform, no other CaMKII isoforms were identified in DUM neurons from the previous studies and in our condition. We also argued that this expression was associated with a specific function in the DUM neurons. Indeed, in previous studies, GuptaRoy *et al.* (2000) suggested that one possible reason for having multiple isoforms of kinase could be to facilitate differential phosphorylation of substrates, reflecting differences in the affinity of each isoform. Consistent with this finding, we observed that Nic and CLO currents are differently modulated by PaCaMKII-E inhibition. First, PaCaMKII-E affected Nic currents via α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes and second, CLO currents were affected by PaCaMKII-E only through α -Bgt-sensitive nAChR subtypes. This hypothesis was confirmed for the Nic response in mammalian cells where an increase in CaMKII protein level was demonstrated after chronic Nic infusion (Jackson *et al.* 2009). The nicotinic antagonist dihydro- β -erythroidine which blocked α -Bgt-insensitive receptors, induced CaMKII activity in the nucleus accumbens, whereas methyllicaconitine, which blocked α -Bgt-sensitive receptors, did not produce any effect on CaMKII activity (Jackson and Imad

Damaj 2013). In addition, because CLO elicits a response that is partially reduced by α -Bgt but is not affected by AON (Fig. 3), and AON alters α -Bgt-reduced currents elicited by Nic (Fig. 2), we also suspect that other nAChR subtypes (Nic and CLO sensitive) could be responsible for the different responses.

In the cockroach, Ca^{2+} plays a fundamental role in DUM neurons, i.e.: maintaining pacemaker activity and hormone secretion (Heine and Wicher 1998). Nic increases DUM neurons $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 5) and regulates pacemaker activity. The Nic effect was strongly reduced under $[0 Ca^{2+}]_i$ condition (Thany *et al.* 2008) and Ca^{2+} increase stimulated by Nic was reduced by α -Bgt (Grolleau *et al.* 1996). Thus, together with our previous studies (Thany *et al.* 2008; Calas-List *et al.* 2013), we propose that the decline in $[Ca^{2+}]_i$ response is secondary to the reduced nAChR responses induced by Nic and CLO. Nic and CLO effects are mediated through direct action of PaCaMKII-E altering currents (Thany *et al.* 2008; Calas-List *et al.* 2013). Finally, our data demonstrate that in DUM neurons, Ca^{2+} pathways component such as CaMKII are involved in the insect responses of nAChR ligands including neonicotinoid insecticides. Nevertheless, despite the fact that we demonstrate a direct link between nAChR responses and PaCaMKII-E, several fundamental questions will have to be explored in the future, such as, if PaCaMKII-E alters receptor numbers, single channel conductance and stability on the membrane over the 24 h period.

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

E. Taillebois is supported by a French 'Minist  re de l'Enseignement Sup  rieur et de la Recherche' fellowship. We are grateful for financial support from the French National Institute for Agricultural Research (INRA-SPE grant) and the Region Pays de la Loire (Paris Scientifique grant). We thank Prof. Jeffrey R. Bloomquist (University of Florida) and Prof. Neil Millar (University College London) for helpful comments. The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Bodereau-Dubois B., List O., Calas-List D., Marques O., Communal P. Y., Thany S. H. and Lapied B. (2012) Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 326–339.
- Burkert P. and Duch C. (2006) Developmental changes of CaMKII localization, activity and function during postembryonic CNS remodelling in *Manduca sexta*. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 335–349.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622.

- Calas-List D., List O. and Thany S. H. (2012) Nornicotine application on cockroach dorsal unpaired median neurons induces two distinct ionic currents: Implications of different nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci. Lett.* **518**, 64–68.
- Calas-List D., List O., Quinchard S. and Thany S. H. (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of alpha-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *NeuroToxicology* **37**, 127–133.
- Chum S. B., Sombati S., Jakoi E. R., Severt L. and DeLorenzo R. J. (2000) Inhibition of calcium/calmodulin kinase II alpha subunit expression results in epileptiform activity in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 5604–5609.
- Courjaret R. and Lapi d B. (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol. Pharmacol.* **60**, 80–91.
- Courjaret R., Grolleau F. and Lapi d B. (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2023–2034.
- Fayyazuddin A., Zaheer M. A., Hiesinger P. R. and Bellen H. J. (2006) The nicotinic acetylcholine receptor Dalpha7 is required for an escape behavior in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **4**, e63.
- Francescato L., Rothschild S. C., Myers A. L. and Tombes R. M. (2010) The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer's vesicle is required for left-right asymmetry. *Development* **137**, 2753–2762.
- Griffith L. C. and Greenspan R. J. (1993) The diversity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in *Drosophila* is generated by alternative splicing of a single gene. *J. Neurochem.* **61**, 1534–1537.
- Grolleau F., Lapi d B., Buckingham S. D., Mason W. T. and Sattelle D. B. (1996) Nicotine increases [Ca²⁺]_i and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with 'mixed' nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neurosci. Lett.* **220**, 142–146.
- GuptaRoy B., Marwaha N., Pla M., Wang Z., Nelson H. B., Beckingham K. and Griffith L. C. (2000) Alternative splicing of *Drosophila* calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates substrate specificity and activation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **80**, 26–34.
- Heine M. and Wicher D. (1998) Ca²⁺ resting current and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in insect neurosecretory neurons. *NeuroReport* **9**, 3309–3314.
- Jackson K. J. and Imad Damaj M. (2013) Beta2-containing nicotinic acetylcholine receptors mediate calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II and synapsin I protein levels in the nucleus accumbens after nicotine withdrawal in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **701**, 1–6.
- Jackson K. J., Walters C. L. and Damaj M. I. (2009) Beta 2 subunit-containing nicotinic receptors mediate acute nicotine-induced activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent pathways in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 541–549.
- Kadas D., Tzortzopoulos A., Skoulakis E. M. and Consoulas C. (2012) Constitutive activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II during development impairs central cholinergic transmission in a circuit underlying escape behavior in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **32**, 170–182.
- Kamikouchi A., Takeuchi H., Sawata M., Natori S. and Kubo T. (2000) Concentrated expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. *J. Comp. Neurol.* **417**, 501–510.
- Lapi d B., Malecot C. O. and Pelhate M. (1989) Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **144**, 535–549.
- Lapi d B., Le Corr n H. and Hue B. (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res.* **533**, 132–136.
- Lohr C., Bergstein S. and Himet D. (2007) Developmental distribution of CaM kinase II in the antennal lobe of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* **327**, 189–197.
- Mehren J. E. and Griffith L. C. (2006) Cholinergic neurons mediate CaMKII-dependent enhancement of courtship suppression. *Learn. Mem.* **13**, 686–689.
- Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Shanavas A., Dutta-Gupta A. and Murthy C. R. (1998) Identification, characterization, immunocytochemical localization, and developmental changes in the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the CNS of *Bombyx mori* during postembryonic development. *J. Neurochem.* **70**, 1644–1651.
- Taillebois E., Heuland E., Bourdin C. M., Griveau A., Quinchard S., Tricoire-Leignel H., Legros C. and Thany S. H. (2013) Ca(2)(+)/calmodulin-dependent protein kinase II in the cockroach *Periplaneta americana*: identification of five isoforms and their tissues distribution. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **83**, 138–150.
- Takamatsu Y., Kishimoto Y. and Ohsako S. (2003) Immunohistochemical study of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the *Drosophila* brain using a specific monoclonal antibody. *Brain Res.* **974**, 99–116.
- Thany S. H. (2009) Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *NeuroToxicology* **30**, 1045–1052.
- Thany S. H., Lenaers G., Raymond-Delpech V., Sattelle D. B. and Lapi d B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 14–22.
- Thany S. H., Courjaret R. and Lapi d B. (2008) Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci. Lett.* **438**, 317–321.

QUATRIEME PARTIE:

CONCLUSIONS GENERALES ET

PERSPECTIVES

1) Conclusions générales

1.1) Hypothèses sur la composition des différents sous-types de récepteurs nicotiniques

Lors des tests de liaison par affinité, nous avons démontré la présence d'au moins quatre sous-types de nAChRs distincts chez le puceron *A. pisum* caractérisés notamment par leur sensibilité ou non à l' α -Bgt, et qui présentent des affinités différentes pour les molécules insecticides testées. Etant donné que la nature des sous-unités est connue pour influencer les propriétés pharmacologiques des nAChRs (Lansdell et Millar 2000 b), ces différents sous-types de nAChRs pourraient correspondre à des assemblages de sous-unités différents, qui restent encore à déterminer. Cependant, les données obtenues lors de la caractérisation des sous-unités permettent d'avancer des hypothèses sur les différents assemblages de sous-unités qui pourraient former des nAChRs fonctionnels.

Influence du niveau d'expression

Dans un premier temps, nous avons montré que les 8 sous-unités (Pam α 1-4, Pam α 6-8 et Pam β 1) clonées chez *P. americana* sont exprimées dans les corps pédonculés et que les 11 sous-unités identifiées dans le génome de *A. pisum* sont présentes dans les têtes de puceron. Cependant, les expériences de PCR quantitative ont démontré une expression différentielle de ces sous-unités. Ainsi, nous avons mis en évidence une expression majoritaire des sous-unités Apisum α 3, Apisum α 7, Apisum α 10 et Apisum β 2 chez le puceron *A. pisum* et des sous-unités Pam α 1, Pam α 3, Pam α 7, Pam α 8 et Pam β 1 chez la blatte *P. americana*.

Certaines de ces sous-unités sont connues pour former des récepteurs homomériques ou hétéromériques chez d'autres espèces d'insectes. Ainsi, la sous-unité Da7 de *D. melanogaster* est capable de former des récepteurs homomériques sensibles à l' α -Bgt

lors de son expression dans des ovocytes de xénope (Lansdell et coll. 2012) tout comme la sous-unité $S\alpha 1$ de *S. gregaria* (Marshall et coll. 1990; Amar et coll. 1995). Chez *N. lugens*, la sous-unité $NI\beta 1$ est impliquée dans la formation de l'ensemble des nAChRs sensibles à l'IMI et est co-assemblée avec les sous-unités $NI\alpha 3$ et $NI\alpha 8$ pour former des nAChRs fonctionnels sensibles à l'IMI (Li et coll. 2010) et la sous-unité $Mp\alpha 3$ du puceron *M. persicae* est capable de former des récepteurs fonctionnels sensibles à l'IMI lorsqu'elle est co-exprimée avec une sous-unité $\beta 2$ de rat (Huang et coll. 1999). Enfin, chez l'abeille, il a été suggéré que les sous-unités $Amel\alpha 2$, $Amel\alpha 8$, $Amel\beta 1$ et $Amel\alpha 7$ pourrait former des récepteurs homomériques et/ou hétéromériques. En effet, l'ACh induit un seul type de courant au niveau des cellules de Kenyon exprimant uniquement les sous-unités $Amel\alpha 2$, $Amel\alpha 8$ et $Amel\beta 1$ (Dupuis et coll. 2011) alors que dans les lobes antennaires, deux profils de courants sont observés en corrélation avec une expression supplémentaire de la sous-unité $Amel\alpha 7$ (Dupuis et coll. 2011; Barbara et coll. 2008).

Ainsi, les sous-unités $Apisum\alpha 7$ de *A. pisum* ainsi que les sous-unités $Pam\alpha 7$ et $Pam\alpha 1$ de *P. americana* pourraient former des récepteurs homomériques sensibles à l' α -Bgt. De plus, on peut supposer la présence de récepteurs hétéromériques associant les sous-unités $Pam\alpha 3$, $Pam\alpha 8$ et $Pam\beta 1$ chez *P. americana*. La sous-unité $Apisum\alpha 3$ pourrait également former des nAChRs fonctionnels hétéromériques en association, par exemple, avec la sous-unité $Apisum\beta 2$ qui est largement prédominante chez *A. pisum*. Etant donné que les sous-unités $NI\alpha 3$ et $NI\alpha 8$ forment un site de haute affinité pour l'IMI chez *N. lugens* (Li et coll. 2010), ces nAChRs hétéromériques pourraient présenter des sites de liaison de haute affinité pour l'IMI.

Influence de l'organisation génomique des sous-unités

L'analyse des gènes codant pour les sous-unités de nAChRs chez le puceron *A. pisum* a mis en évidence la présence de clusters de gènes qui pourrait faciliter la co-expression et l'assemblage des sous-unités. En effet, chez la drosophile les trois sous-unités $D\alpha 1$, $D\alpha 2$ et $D\beta 2$ peuvent se co-assembler et former un cluster de gènes (Sawruk et coll. 1990b ; Chamaon et coll. 2000 et 2002). De plus, chez les Vertébrés les gènes codant les sous-unités de nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$, qui sont proches sur le génome (Boulter et coll. 1990), et ces sous-

unités forment des récepteurs présents au niveau des neurones selon deux assemblages différents, $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ (Couturier et coll. 1990; Conroy et Berg 1995). Ces deux exemples montrent que des sous-unités identifiées dans des clusters communs sont capables de s'assembler pour former des récepteurs fonctionnels. Ainsi, chez le puceron *A. pisum*, les sous-unités $\text{Apisum}\alpha 1$ et $\text{Apisum}\alpha 2$ qui sont proches dans le génome pourraient former un sous-type de nAChRs. De même, les sous-unités $\text{Apisum}\alpha 9$, $\text{Apisum}\alpha 10$ et $\text{Apisum}\beta 2$, présentes dans un cluster, pourraient s'assembler pour constituer une ou plusieurs populations de récepteurs différents.

Influence du stade de développement

Il est important de noter que chez le puceron *A. pisum*, l'expression des sous-unités varie en fonction des stades de développement et que les nAChRs présents aux différents stades pourraient donc être différents au niveau de la nature et/ou de la stœchiométrie des sous-unités formant les récepteurs. Une telle régulation développementale de l'expression de sous-unités de nAChRs a déjà été démontrée par hybridation *in situ* chez l'abeille *A. mellifera*, où les sous-unités $\text{Amel}\alpha 8$, $\text{Amel}\alpha 5$ et $\text{Amel}\alpha 7$ sont exprimées dans différentes régions cérébrales en fonction des stades de développement. Pour exemple, $\text{Amel}\alpha 7$ est exprimée au niveau des lobes dorsaux, des cellules de Kenyon externes et en périphérie au stade pupa et présente une localisation supplémentaire au niveau des cellules situées entre la lamina et la medulla au stade adulte (Thany et coll. 2003 et 2005). La sous-unité $\text{Amel}\alpha 2$ présente un profil d'expression similaire chez la larve et l'adulte (Thany et coll. 2005). Au contraire, chez *A. pisum*, nous avons montré une variation du niveau d'expression des sous-unités $\text{Apisum}\alpha 2$ et $\text{Apisum}\alpha 8$ tandis que l'expression de $\text{Apisum}\alpha 7$ apparaît stable au cours du développement. L'ensemble de ces données amène différentes hypothèses: (1) la régulation développementale de l'expression des sous-unités est différente en fonction des espèces d'insectes, suggérant ainsi la présence d'assemblages de sous-unités spécifiques. (2) les variations globales du niveau d'expression des transcrits peuvent masquer des variations de localisation des sous-unités au cours du développement et inversement. Ainsi, la stabilité de l'expression de $\text{Apisum}\alpha 7$ pourrait être associée à une variation de sa localisation tandis que les variations du niveau d'expression de $\text{Apisum}\alpha 2$ pourraient être en lien avec une localisation conservée de cette sous-unité en fonction des stades.

De plus, la sous-unité Apisum α 7 est exprimée de façon stable au cours du développement chez *A. pisum*, suggérant un rôle important des nAChRs impliquant cette sous-unité, comme démontré chez la drosophile (Fayyazuddin et coll. 2006). Les sous-unités Apisum α 1 et Apisum α 2 présentent des variations d'expression similaires au cours du développement chez *A. pisum*, supposant leur implication dans la formation d'un même sous-type de nAChRs comme démontré chez *N. lugens* (Li et coll. 2010). Les sous-unités Apisum α 1 et Apisum α 2 sont toutes deux affectées de la même façon après intoxication des larves avec l'IMI et pourraient ainsi être impliquées dans un même sous-type de récepteur. Etant donné que les sous-unités Nl α 1 et Nl α 2 forme un site de basse affinité pour l'IMI chez *N. lugens* (Li et coll. 2010), les nAChRs formés par les sous-unités Apisum α 1 et Apisum α 2 pourraient constituer des récepteurs de basse affinité pour l'IMI.

1.2) Le thiamethoxame : un insecticide au mode d'action particulier.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la liaison du TMX sur des sites sensibles à l' α -Bgt et sa métabolisation partielle en CLT chez le puceron du pois. Dans la littérature, le TMX est souvent considéré comme un pro-insecticide dont l'effet serait uniquement lié à son métabolite, la CLT (Nauen et coll. 2003; Benzidane et coll. 2010). En effet, contrairement à la CLT, le TMX ne se lie pas aux sites sensibles à l'imidaclopride (IMI), comme démontré lors des tests de compétition en présence d'IMI marqué (Wellmann et coll. 2004; Kayser et coll. 2004; Wiesner et Kayser 2000; Zhang et coll. 2000; Tomizawa et coll. 2005). Or la comparaison des valeurs de Bmax obtenues lors des tests de liaison en saturation avec l' α -Bgt radiomarké ou l'IMI radiomarké chez le puceron du pois, montre que les sites sensibles à l' α -Bgt sont majoritaires comparés aux sites sensibles à l'IMI. Ce qui est également le cas chez *D. melanogaster* et *M. persicae* (Lind et coll. 1998 et 1999; Wiesner et Kayser 2000). Pourtant, cette étude est à notre connaissance la première ayant mis en compétition le TMX et l' α -Bgt marqué. La majorité des études concernant la liaison des insecticides néonicotinoïdes est en effet réalisées avec l'IMI comme ligand radiomarké de référence. Il semblerait donc que l'absence de liaison directe du TMX sur les nAChRs

précédemment décrite dans la littérature pour plusieurs espèces d'insectes, pourrait être liée au fait que les tests de liaison en compétition n'aient pas été réalisés sur la bonne population de nAChRs. Le TMX aurait donc une double action : directe par l'intermédiaire de nAChRs sensibles à l' α Bgt et indirecte par l'intermédiaire des nAChRs sensibles à l'IMI après métabolisation en CLT. Ainsi, ce mode d'action du TMX, décrit chez le puceron du pois dans notre étude, pourrait être identique chez d'autres espèces insectes.

1.3) Conséquences de la modification de l'expression des sous-unités après exposition aux néonicotinoïdes

La variation du niveau d'expression des sous-unités observée chez le puceron après intoxication suggère que la composition des nAChRs exprimés peut être modifiée et donc que les affinités des sites de liaison nouvellement produits vis-à-vis des insecticides peuvent varier. La modification des sites de liaison peut avoir deux origines : i) la nature des sous-unités impliquées dans un site de liaison ii) la stoechiométrie des sous-unités formant un site de liaison donné au sein d'un récepteur. Dans le premier cas, la diminution du niveau d'expression d'une sous-unité spécifique peut entraîner la diminution du nombre de sites sensibles à un insecticide et provoquer une diminution de sensibilité, voire une résistance. C'est le cas de la sous-unité $Md\alpha 2$, chez *M. domestica*, dont la diminution du niveau d'expression est impliquée dans l'apparition d'une résistance à l'IMI. (Markussen et Kristensen 2010). Dans le deuxième cas, les sites de liaison sont identiques mais c'est leur nombre qui change au sein d'un récepteur, provoquant une pharmacologie différente. En effet, chez les Vertébrés, une même combinaison de sous-unités ($\alpha 3\beta 4$) peut être présente sous différentes stoechiométries $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ ou $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$, chacune possédant des propriétés pharmacologiques distinctes. Les récepteurs $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ sont trois fois plus sensibles à l'ACh tandis que les récepteurs $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ sont plus sensibles au diméthylphenylpiperazinium (Krashia et coll. 2010). De plus, chez les Vertébrés, une exposition à la nicotine modifie la stoechiométrie des récepteurs $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 4\beta 2$ en augmentant la proportion des nAChRs de

type $(\alpha)_2(\beta)_3$, ces derniers étant plus sensibles à la NIC que les nAChRs $(\alpha)_3(\beta)_2$ (Mazzo et coll. 2013; Srinivasan et coll. 2011).

En ce qui concerne l'étude chez le puceron du pois, l'augmentation de sous-unités divergentes pourraient également participer à une modification de la sensibilité des récepteurs vis-à-vis des insecticides. Ainsi, la sous-unité Apisum α 10 voit son expression augmenter après 48h d'exposition à chaque néonicotinoïde (IMI, TMX, CLT). Cette sous-unité ne présente pas de « cys-loop » caractéristique nécessaire à la fois à la construction de sites de liaison fonctionnels et à l'assemblage des sous-unités (Green et Wanamaker 1997; Dale et coll. 2010). En effet, des expériences de mutagenèse dirigée menées sur des nAChRs de Vertébrés, montrent que le remplacement d'une des cystéines de la « cys-loop » au niveau d'une sous-unité α entraîne la perte du site de liaison de l' α -Bgt tout en conservant les propriétés de liaison pour l'acétylcholine (Sumikawa et Gehle 1992). Or, les sites de liaison sensibles à l' α -Bgt sont ciblés par le TMX et la CLT chez le puceron, comme démontré lors des tests de liaison. L'augmentation de l'expression de la sous-unité Apisum α 10 chez l'insecte pourrait donc impliquer la formation de nAChRs moins sensibles aux insecticides tout en conservant leur affinité pour l'acétylcholine.

D'autre part, l'augmentation du niveau d'expression de Apisum α 10 pourrait influencer l'assemblage des nAChRs. En effet, des expériences de mutagenèse dirigée montrent que la mutation d'une des cystéines de la « cys-loop » au niveau de la sous-unité β de Torpedo entraîne une séquestration des récepteurs au niveau intracellulaire (Sumikawa et Gehle 1992). Chez les Vertébrés, la sous-unité α 5 joue le rôle de protéine accessoire dans l'assemblage des sous unités α 4 et β 2 (Chatterjee et coll. 2013). Ainsi, la sous-unité Apisum α 10 pourrait jouer le rôle de protéine chaperonne pour l'assemblage des autres sous-unités.

1.4) Facteurs influençant la toxicité *in vivo* des néonicotinoïdes.

Dans notre étude, nous avons démontré que la CLT présente une forte affinité pour les nAChRs du puceron mais s'avère être l'insecticide le moins toxique *in vivo*. Au contraire, l'étude de nAChRs hybrides $\text{D}\alpha 2/\beta 2$ de Vertébrés, montre une corrélation entre l'affinité de l'IMI et sa toxicité *in vivo* (Nishiwaki et coll. 2003). Il semblerait donc que la toxicité des insecticides ne soit pas toujours directement corrélée à l'affinité des molécules pour les nAChRs. Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer cette disparité des résultats:

1) L'efficacité des insecticides conditionnerait leur toxicité. La toxicité *in vivo* serait corrélée non pas à l'affinité des nAChRs pour les néonicotinoïdes mais à l'amplitude du courant induit par la liaison des insecticides. En effet, une étude menée sur les neurones thoraciques de la blatte *P. americana*, montre une absence de relation directe entre l'affinité de 6 néonicotinoïdes (IMI, THI, CLT, ACE, DTF, NIT) mais une corrélation positive entre l'efficacité et l'activité insecticide (Tan et coll. 2007). Ceci est cohérent dans la mesure où un insecticide de plus grande efficacité agoniste provoquera l'ouverture de plus de récepteurs et donc une dépolarisation de la membrane plus importante qu'un agoniste de plus faible efficacité (Tan et coll. 2007).

2) La métabolisation des insecticides influencera la toxicité des molécules *in vivo*. Nous avons démontré la métabolisation du TMX en CLT chez le puceron du pois, ce qui expliquerait la plus forte toxicité du TMX. Ainsi, les processus de métabolisation pourraient conduire à la formation de métabolites plus ou moins toxiques.

3) Des voies de régulation intracellulaire pourraient moduler la réponse des nAChRs aux insecticides. Nous avons mis en évidence que des voies de régulation intracellulaire impliquant le calcium et la CaMKII sont impliquées dans la modulation de l'effet de la CLT. Des mécanismes de régulation similaires pourraient être mis en jeu chez le puceron et modifier l'affinité des nAChRs pour les insecticides suite à l'activation des récepteurs par phosphorylation. En effet, une modification de l'affinité des nAChRs pour les ligands en lien avec la présence de différents états conformationnels a déjà été suggérée chez *D. melanogaster* et *A. mellifera* (Nauen et coll. 2001 a et b).

La relation entre l'action des néonicotinoïdes sur les nAChRs et leurs effets toxiques *in vivo* est complexe et les mécanismes impliqués pourraient varier en fonction des espèces considérées (Salgado et Saar 2004). Ainsi, la présence d'une ou plusieurs des sous-unités divergentes du puceron au sein de récepteurs exprimés, pourrait fortement influencer les propriétés pharmacologiques des nAChRs et conférer une spécificité de réponse aux agonistes, tels que les néonicotinoïdes. Ainsi, la présence de ces récepteurs spécifiques du puceron *A. pisum* pourrait être responsable de la différence de toxicité de l'ACE observée par rapport au puceron *M. persicae* et de la spécificité de l'ordre de toxicité des néonicotinoïdes chez *A. pisum* par rapport aux données de la littérature concernant d'autres espèces de pucerons.

1.5) Impact sur l'utilisation des néonicotinoïdes dans la gestion des insectes ravageurs de culture.

Les phénomènes de résistance des pucerons aux insecticides sont nombreux et bien décrits. Ainsi, le puceron du pêcher *M. persicae* présente des souches résistantes vis-à-vis notamment des néonicotinoïdes qui font intervenir à la fois des mécanismes de résistance métabolique, des mutations de sous-unités de nAChRs et une diminution de la pénétration cuticulaire des insecticides (Puinean et coll. 2010a et b; Bass et coll. 2011; Slater et coll. 2012). A l'heure actuelle, aucun mécanisme de résistance aux néonicotinoïdes n'a été décrit chez le puceron du pois *A. pisum*. Cependant, le puceron du pois, comme d'autres espèces de puceron tel que *M. persicae*, possède un cycle de développement atypique (alternance de reproduction asexuée sur plusieurs générations et de reproduction sexuée) (Simon et coll. 2002) et présente ainsi une grande plasticité phénotypique, puisque qu'un génotype donné peut produire alternativement différents phénotypes (ailé ou aptère, sexué ou parthénogénétique) (Simon et coll. 2010). Les pucerons du pois sont également capables d'adapter leur comportement en fonction des conditions environnementales notamment par régulation neuro-endocrine (Le Trionnaire et coll. 2008). Cette grande capacité d'acclimatation du puceron du pois est vérifiée lors de la modification du profil d'expression des sous-unités de nAChRs après exposition aux néonicotinoïdes et montre le potentiel de

résistance que cela sous-entend, dans la mesure où la modification du niveau d'expression de certaines sous-unités peut être en partie responsable de phénomène de résistance (Markussen et Kristensen 2010). Compte-tenu du fait que de nombreuses études montrent la présence de résidus d'insecticides néonicotinoïdes dans les cultures (Krupke et coll. 2012), une pré-exposition environnementale des pucerons aux insecticides pourrait ainsi atténuer la sensibilité de ces ravageurs aux néonicotinoïdes. De plus, nous avons mis en évidence des variations du niveau d'expression des sous-unités au cours du développement du puceron du pois, suggérant une modification de la composition des nAChRs et donc potentiellement de leur sensibilité aux insecticides. Ainsi, l'utilisation des insecticides pour lutter contre une infestation de pucerons devra également tenir compte des stades présents et de leurs proportions dans la population de ravageurs ciblée.

Notre étude montre également que des mécanismes de régulation intracellulaire des nAChRs peuvent influencer la sensibilité aux insecticides car chez la blatte *P. americana*, PaCaMKII-E module la réponse des nAChRs des DUM neurones à la CLT. Les voies de signalisation calciques intracellulaires, notamment celles impliquant l'AMPc, seraient de bonnes cibles pour optimiser l'action des insecticides néonicotinoïdes (Calas-List et coll. 2012). De plus, la présence d'une diversité de sous-types de nAChRs présentant des propriétés pharmacologiques distinctes, notamment vis-à-vis des néonicotinoïdes, pourrait permettre de mettre en place des stratégies de lutte par utilisation combinée de plusieurs insecticides qui agirait sur des sites de liaison différents. En effet, chez la mouche *F. occidentalis*, le TMX présente une action synergique avec le spinosad chez des souches résistante au spinosad (Guillen et Bielza 2012).

D'autre part, la présence de sous-unités divergentes fortement exprimées (Apisum α 10 et Apisum β 2) chez le puceron du pois suppose la présence de récepteurs présentant des sites de liaison spécifiques de ce ravageur. De tels nAChRs seraient une cible privilégiée pour la conception de molécules insecticides spécifiques du puceron et qui épargneraient les espèces d'intérêt agronomiques telles que les abeilles (Tomizawa et Casida 2011 ; Tomizawa et coll. 2011). Des sites de liaison spécifiques ont ainsi été mis en évidence chez l'araignée *P. pseudoannulata*, qui est un prédateur naturel de nombreux ravageurs de cultures tel que le puceron *M. persicae*. En effet, la présence d'acides aminés spécifiques au niveau des boucles D, E et F de la sous-unité Pp β 1 est responsable de la plus faible sensibilité

de *P. pseudoannulata* pour l'IMI par rapport à *M. persicae* (Song et coll. 2009). Ainsi, une lutte chimique plus ciblée permettrait également la mise en place d'une lutte raisonnée en combinaison avec l'utilisation de prédateurs naturels des insectes ravageurs (Gentz et coll. 2010).

Ce travail de thèse met en évidence la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'interaction des insecticides néonicotinoïdes avec les nAChRs chez les insectes. Chaque molécule insecticide va se lier à des sous-types de récepteurs spécifiques qui correspondent à des assemblages de sous-unités différents, qui restent encore à déterminer. L'effet toxique des néonicotinoïdes met également en jeu des mécanismes de métabolisation des insecticides et de régulation intracellulaires de la réponse des nAChRs. De plus, la sensibilité des ravageurs aux insecticides dépend de la molécule, de l'espèce, du stade de développement considéré et pourrait être modifiée par une pré-exposition environnementale aux insecticides. L'ensemble de ces paramètres devrait être pris en compte afin d'optimiser l'utilisation des insecticides et permettre de lutter plus efficacement et plus spécifiquement contre les ravageurs de culture.

2) Perspectives de recherche

2.1) Etudier les propriétés électrophysiologiques des récepteurs nicotiniques recombinants du puceron du pois.

La composition des nAChRs d'insectes reste encore à élucider, principalement du fait des difficultés rencontrées pour exprimer uniquement des sous-unités d'insectes dans des systèmes d'expression hétérologues (Millar 2009). Dans une étude récente, la co-expression de la protéine accessoire de nématode CeRIC-3 avec les sous-unités D α 5 et D α 7 de la drosophile a conduit à l'expression fonctionnelle de nAChRs homomériques et hétéromériques (Lansdell et coll. 2012). Au contraire, aucun nAChR fonctionnel contenant la sous-unité D α 6 n'a pu être exprimé, suggérant la nécessité de facteurs supplémentaires

pour permettre à cette sous-unité de former un récepteur fonctionnel. En effet, toutes les combinaisons possibles ont été testées avec les 10 sous-unités identifiées dans le génome de la drosophile, suggérant que le défaut d'expression ne serait pas lié à l'absence d'une sous-unité. De plus, les résultats de l'expression des sous-unités sont très variables et dépendent du système d'expression choisi (ovocyte de xénope ou lignées cellulaire S2 d'insectes), démontrant ainsi l'importance du contexte cellulaire pour l'expression des nAChRs d'insectes (Lansdell et coll. 2012). Des travaux antérieurs ont en effet mis en évidence trois protéines accessoires, UNC-50, UNC-74 et CeRIC-3, qui sont indispensables à l'expression des nAChRs sensibles au Lévamisol chez *C. elegans* et *H. contortus* (Boulin et coll. 2008 ; Boulin et coll. 2011). La co-expression de sous-unités de nAChRs de puceron avec les protéines accessoires UNC-50, UNC-74 et CeRIC-3 permettrait d'identifier les combinaisons de sous-unités conduisant à la formation de récepteurs fonctionnels et d'étudier l'influence des différentes sous-unités sur la réponse des nAChRs aux insecticides. Nous pourrions ainsi vérifier dans un premier temps si les assemblages de sous-unités proposées à l'issue de la caractérisation moléculaire des nAChRs conduisent bien à la formation de nAChRs fonctionnels ou non. Plus particulièrement, l'étude de l'influence des sous-unités divergentes (Apisum α 9, Apisum α 10 et Apisum β 2) pourrait permettre l'identification de site de liaison spécifique du puceron. De telles informations pourraient être utilisées afin de concevoir des insecticide plus spécifiques pour les ravageurs tout en limitant leur impact sur des espèces non cibles telles que les abeilles.

2.2) Etudier les propriétés électrophysiologiques des récepteurs natifs maintenus dans leur contexte membranaire.

Notre étude montre que l'affinité des nAChRs pour les insecticides n'est pas en corrélation directe avec la toxicité observée *in vivo*. Une des hypothèses envisagées est que l'effet agoniste des molécules est le facteur prédominant pour expliquer la toxicité des insecticides. Afin de vérifier cette hypothèse, il est nécessaire de déterminer les propriétés électrophysiologiques des nAChRs natifs chez le puceron. L'injection de préparations de membranes dans des systèmes d'expression hétérologues a été utilisée avec succès afin

d'étudier les propriétés électrophysiologiques des nAChRs natifs chez les Vertébrés (Bourne et coll. 2010; Araoz et coll. 2011; Eusebi et coll. 2009). A notre connaissance, cette technique expérimentale n'a jamais été utilisée dans l'étude des nAChRs chez les insectes. Une des perspectives envisagée est donc d'injecter des préparations de membranes contenant les nAChRs natifs du puceron dans des ovocytes de xénope afin d'étudier l'effet des insecticides néonicotinoïdes. Cette étude permettra notamment de déterminer le caractère agoniste ou super-agoniste de ces insecticides. A plus long terme, l'utilisation d'anticorps spécifiques d'une sous-unité permettra d'éliminer les nAChRs contenant cette sous-unité dans les préparations de membrane par immunoprécipitation. Ainsi la comparaison des données électrophysiologiques obtenues avec et sans immunoprécipitation des membranes, permettront de rendre compte de l'importance de la sous-unité étudiée (du moins des récepteurs qui la contiennent) sur la réponse aux insecticides néonicotinoïdes.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1. Structure tridimensionnelle des récepteurs nicotiniques de la torpille.....	25
Figure 2 : Structure des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs).....	27
Figure 3. Représentation schématique du site de liaison de l'acétylcholine à l'interface entre deux sous-unités.....	30
Figure 4. Structure cristallisée de l'AChBP de <i>Lymnaea stagnalis</i> , homologue du domaine extracellulaire des récepteurs nicotiniques.....	33
Figure 5. Mécanisme d'ouverture du canal ionique des récepteurs nicotiniques de la torpille.....	35
Figure 6. Arbre phylogénétique des sous-unités de récepteurs nicotiniques chez différentes espèces d'insectes.....	40
Figure 7. Principaux mécanismes d'épissage alternatif.....	42
Figure 8. Représentation schématique de l'épissage alternatif des sous-unités de nAChRs chez <i>D.melanogaster</i>	46
Figure 9. Recodage de l'information génétique par édition A-to-I des ARNs.....	48
Figure 10. Sous-types de récepteurs nicotiniques chez la drosophile.....	59
Figure 11. Structure chimique des huit insecticides néonicotinoïdes commercialisés.....	63
Figure 12. Evolution de l'utilisation des différentes classes d'insecticides entre 1997 et 2010.....	64

Figure 13. Effet agoniste de deux néonicotinoïdes chez la drosophile.....	67
Figure 14. Puceron du pois sur féverole.....	82
Figure 15. Cycle de vie du puceron du pois.....	83
Figure 16. La blatte <i>Periplaneta americana</i>	85
Figure 17. Le système nerveux central de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	87
Figure 18. Détermination de la sensibilité à l'acétamipride de trois souches de puceron....	114
Figure 19. Alignement des séquences nucléiques et protéiques des sous-unités de nAChRs chez la blatte <i>Periplaneta americana</i>	119
Figure 20. Alignement des séquences protéiques des sous-unités de nAChRs chez le puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i>	120
Figure 21. Strucutre en exons des gènes codant pour les sous-unités Apisum α 6 et Apisum β 1 chez <i>Acyrtosiphon pisum</i>	124
Figure 22. Regroupement de gènes codant pour des sous-unités de nAChRs dans des clusters chez le puceron du pois.....	125
Figure 23. Détermination du niveau d'expression des sous-unités de récepteurs nicotiniques (nAChRs) chez le puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> par PCR quantitative absolue.	129

Figure 24. Détermination du niveau d'expression des sous-unités de récepteurs nicotiniques (nAChRs) dans les corps pédonculés de la blatte <i>Periplaneta americana</i> par PCR quantitative absolue.....	131
---	-----

Figure 25. Epissage alternatif de l'exon 4 de la sous-unité $\alpha 4$ chez la blatte <i>P.americana</i> et le puceron du pois <i>A.pisum</i>	134
--	-----

Liste des tableaux

Tableau I. Bilan des sous-unités de nAChRs identifiées chez les insectes dont le génome est séquencé.....	38
---	----

Tableau II. Bilan (non exhaustif) des isoformes épissées de sous-unités de nAChRs identifiées chez les insectes dont le génome est séquencé.....	44
--	----

Tableau III. Mécanismes d'édition des ARNm identifiés au niveau des sous-unités de nAChRs d'insectes.....	49
---	----

Tableau IV. Récapitulatif non exhaustif des sites de liaison de l' α -bungarotoxine (α -Bgt) identifiés par des tests de saturation pour différentes espèces d'insectes.....	56
---	----

Tableau V. Protection par brevet des insecticides néonicotinoïdes.....	64
--	----

Tableau VI. Récapitulatif non exhaustif des sites de liaison de l'imidaclopride identifiés par des tests de saturation pour différentes espèces d'insectes.....	70
---	----

Tableau VII. Récapitulatif non exhaustif de la liaison des insecticides néonicotinoïdes sur les sites sensibles à l' $[^3\text{H}]$ -imidaclopride chez différentes espèces d'insectes.....	71
---	----

Tableau VIII. Organisation des gènes codant les sous-unités de récepteurs nicotiniques chez le puceron du pois <i>A.pisum</i>	123
---	-----

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, M.D. & Celniker, S.E. & Holt, R.A. & Evans, C.A. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185-2195.
- Agrawal, R. & Stormo, G.D. (2005) Editing efficiency of a *Drosophila* gene correlates with a distant splice site selection. *Rna*, **11**, 563-566.
- Akayama, A. & Minamida, I. (1999) Discovery of a new systemic insecticide, nitenpyram and its insecticidal properties. . In Yamamoto, I., Casida, J.E. (eds) *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer, Berlin, Germany, pp. 127-148.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M. & Rogers, S.W. (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, **89**, 73-120.
- Alves, D.S., Castello-Banyuls, J., Faura, C.C. & Ballesta, J.J. (2011) An extracellular RRR motif flanking the M1 transmembrane domain governs the biogenesis of homomeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS letters*, **585**, 1169-1174.
- Amar, M., Thomas, P., Wonnacott, S. & Lunt, G.G. (1995) A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitising homo-oligomeric nicotinic acetylcholine receptor when expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience letters*, **199**, 107-110.
- Araoz, R., Servent, D., Molgo, J., Iorga, B.I., Fruchart-Gaillard, C., Benoit, E., Gu, Z., Stivala, C. & Zakarian, A. (2011) Total synthesis of pinnatoxins A and G and revision of the mode of action of pinnatoxin A. *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 10499-10511.
- Babcock, J.M., Gerwick, C.B., Huang, J.X., Loso, M.R., Nakamura, G., Nolting, S.P., Rogers, R.B., Sparks, T.C., Thomas, J., Watson, G.B. & Zhu, Y. (2011) Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Manag Sci*, **67**, 328-334.
- Bao, W.X., Narai, Y., Nakano, A., Kaneda, T., Murai, T. & Sonoda, S. (2014) Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in alpha6 subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. *Pestic Biochem Physiol*, **112**, 51-55.
- Barbara, G.S., Grunewald, B., Paute, S., Gauthier, M. & Raymond-Delpech, V. (2008) Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invertebrate neuroscience: IN*, **8**, 19-29.
- Barbara, G.S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M. & Grunewald, B. (2005) Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, **191**, 823-836.
- Bass, C., Puinean, A.M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., Paul, V.L., Crossthwaite, A.J., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Lind, R., Williamson, M.S. & Slater, R. (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *Bmc Neuroscience*, **12**, 51.

- Baxter, S.W., Chen, M., Dawson, A., Zhao, J.Z., Vogel, H., Shelton, A.M., Heckel, D.G. & Jiggins, C.D. (2010) Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 6 Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Plos Genet*, **6**.
- Benzidane, Y., Touinsi, S., Motte, E., Jadas-Hecart, A., Communal, P.Y., Leduc, L. & Thany, S.H. (2010) Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Manag Sci*, **66**, 1351-1359.
- Bertrand, D., Ballivet, M., Gomez, M., Bertrand, S., Phannavong, B. & Gundelfinger, E.D. (1994) Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate beta 2 subunit and *Drosophila* alpha subunits. *The European journal of neuroscience*, **6**, 869-875.
- Blacquiére, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A. & Mommaerts, V. (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, **21**, 973-992.
- Blount, P. & Merlie, J.P. (1989) Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, **3**, 349-357.
- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.Y., Thany, S.H. & Lapied, B. (2012) Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides. *J Pharmacol Exp Ther*, **341**, 326-339.
- Boulin, T., Fauvin, A., Charvet, C.L., Cortet, J., Cabaret, J., Bessereau, J.L. & Neveu, C. (2011) Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *British journal of pharmacology*, **164**, 1421-1432.
- Boulin, T., Gielen, M., Richmond, J.E., Williams, D.C., Paoletti, P. & Bessereau, J.L. (2008) Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18590-18595.
- Boulter, J., O'Shea-Greenfield, A., Duvoisin, R.M., Connolly, J.G., Wada, E., Jensen, A., Gardner, P.D., Ballivet, M., Deneris, E.S., McKinnon, D. & et al. (1990) Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 4472-4482.
- Bourne, Y., Radic, Z., Araoz, R., Talley, T.T., Benoit, E., Servent, D., Taylor, P., Molgo, J. & Marchot, P. (2010) Structural determinants in phytochemicals and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 6076-6081.
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J. & Julius, D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**, 519-523.

- Bratt, E. & Ohman, M. (2003) Coordination of editing and splicing of glutamate receptor pre-mRNA. *Rna*, **9**, 309-318.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S. (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. *Cr Biol*, **333**, 524-538.
- Breer, H. (1981) Properties of putative nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in the central nervous system of *Locusta migratoria*. *Neurochemistry international*, **3**, 43-52.
- Breer, H. & Benke, D. (1986) Messenger RNA from insect nervous tissue induces expression of neuronal acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Brain research*, **387**, 111-117.
- Brejci, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B. & Sixma, T.K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, **411**, 269-276.
- Brown, L.A., Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K. & Sattelle, D.B. (2006) Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, **99**, 608-615.
- Buckingham, S.D., Lapied, B., LeCorronc, H., Grolleau, F. & Sattelle, D.B. (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol*, **200**, 2685-2692.
- Buxton, S.K., Charvet, C.L., Neveu, C., Cabaret, J., Cortet, J., Peineau, N., Abongwa, M., Courtot, E., Robertson, A.P. & Martin, R.J. (2014) Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine- and derquantel-sensitive nAChRs. *PLoS pathogens*, **10**, e1003870.
- Cahill, M., Gorman, K., Day, S., Denholm, I., Elbert, A. & Nauen, R. (1996) Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomology Research*, **86**, 343-349.
- Calas-List, D., List, O., Quinchard, S. & Thany, S.H. (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of alpha-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology*, **37**, 127-133.
- Calas-List, D., List, O. & Thany, S.H. (2012) Nornicotine application on cockroach dorsal unpaired median neurons induces two distinct ionic currents: Implications of different nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience letters*, **518**, 64-68.
- Casida, J.E. & Durkin, K.A. (2013) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu Rev Entomol*, **58**, 99-117.
- Castelan, F., Mulet, J., Aldea, M., Sala, S., Sala, F. & Criado, M. (2007) Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants. *Journal of neurochemistry*, **100**, 406-415.

- Cayre, M., Buckingham, S.D., Yagodin, S. & Sattelle, D.B. (1999) Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine. *Journal of neurophysiology*, **81**, 1-14.
- Chamaon, K., Schulz, R., Smalla, K.H., Seidel, B. & Gundelfinger, E.D. (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila melanogaster*: the alpha-subunit dalpha3 and the beta-type subunit ARD co-assemble within the same receptor complex. *FEBS letters*, **482**, 189-192.
- Chamaon, K., Smalla, K.H., Thomas, U. & Gundelfinger, E.D. (2002) Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex. *Journal of neurochemistry*, **80**, 149-157.
- Changeux, J.P., Kasai, M. & Lee, C.Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **67**, 1241-1247.
- Chatterjee, S., Santos, N., Holgate, J., Haass-Koffler, C.L., Hopf, F.W., Kharazia, V., Lester, H., Bonci, A. & Bartlett, S.E. (2013) The alpha5 subunit regulates the expression and function of alpha4*-containing neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the ventral-tegmental area. *PLoS one*, **8**, e68300.
- Chao, S.L., Dennehy, T.J. & Casida, J.E. (1997) Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) binding site for imidacloprid and related insecticides: a putative nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of economic entomology*, **90**, 879-882.
- Chen, D., Dang, H. & Patrick, J.W. (1998) Contributions of N-linked glycosylation to the expression of a functional alpha7-nicotinic receptor in *Xenopus* oocytes. *Journal of neurochemistry*, **70**, 349-357.
- Clements, J.D. (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci*, **19**, 163-171.
- Cohen, J.B., Weber, M., Huchet, M. & Changeux, J.P. (1972) Purification from *Torpedo marmorata* electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. *FEBS letters*, **26**, 43-47.
- Connolly, C.N. & Wafford, K.A. (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochemical Society transactions*, **32**, 529-534.
- Conroy, W.G. & Berg, D.K. (1995) Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 4424-4431.
- Consortium, T.H.G.S. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Rev Genet*, **443**, 931-949.
- Consortium, T.I.A.G. (2010) Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLOS BIOLOGY*, **8**.

- Conti-Fine, B.M., Navaneetham, D., Lei, S. & Maus, A.D. (2000) Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *European journal of pharmacology*, **393**, 279-294.
- Cordero-Erausquin, M., Marubio, L.M., Klink, R. & Changeux, J.P. (2000) Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends in pharmacological sciences*, **21**, 211-217.
- Corringer, P.J., Le Novère, N. & Changeux, J.P. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **40**, 431-458.
- Cortes, T., Tagu, D., Simon, J.C., Moya, A. & Martinez-Torres, D. (2008) Sex versus parthenogenesis: a transcriptomic approach of photoperiod response in the model aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Gene*, **408**, 146-156.
- Courjaret, R., Grolleau, F. & Lapied, B. (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *The European journal of neuroscience*, **17**, 2023-2034.
- Courjaret, R. & Lapied, B. (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Molecular pharmacology*, **60**, 80-91.
- Couturier, S., Erkman, L., Valera, S., Rungger, D., Bertrand, S., Boulter, J., Ballivet, M. & Bertrand, D. (1990) Alpha 5, alpha 3, and non-alpha 3. Three clustered avian genes encoding neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related subunits. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 17560-17567.
- Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A.J., Maienfisch, P., Hall, R.G., Earley, F.G., Pitterna, T., Pal, S., Paul, V.L., Goodchild, J., Blacker, M., Hagmann, L. & Crossthwaite, A.J. (2013) Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci*, **69**, 607-619.
- Dale, H.H. (1914) The action of certain esters of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther*, **6**, 147-190.
- Dale, R.P., Jones, A.K., Tamborindéguy, C., Davies, T.G., Amey, J.S., Williamson, S., Wolstenholme, A., Field, L.M., Williamson, M.S., Walsh, T.K. & Sattelle, D.B. (2010) Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol*, **19 Suppl 2**, 141-153.
- David, J.A. & Pitman, R.M. (1993) The pharmacology of α -bungarotoxin-resistant acetylcholine receptors on an identified cockroach motoneurone. *J Comp Physiol A*, **172**, 359-368.
- Dederer, H., Berger, M., Meyer, T., Werr, M. & Ilg, T. (2013) Structure-activity relationships of acetylcholine derivatives with *Lucilia cuprina* nicotinic acetylcholine receptor alpha1 and alpha2 subunits in chicken beta2 subunit hybrid receptors in comparison with chicken nicotinic acetylcholine receptor alpha4/beta2. *Insect Mol Biol*, **22**, 183-198.

- Dederer, H., Werr, M. & Ilg, T. (2011) Differential sensitivity of *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor alpha1 and alpha2 subunits in recombinant hybrid receptors to nicotinoids and neonicotinoid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, **41**, 51-61.
- Deglise, P., Grunewald, B. & Gauthier, M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience letters*, **321**, 13-16.
- Degnan, P.H., Leonardo, T.E., Cass, B.N., Hurwitz, B., Stern, D., Gibbs, R.A., Richards, S. & Moran, N.A. (2010) Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of aphids. *Environmental microbiology*, **12**, 2060-2069.
- Degnan, P.H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R.A. & Moran, N.A. (2009) *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 9063-9068.
- Delbro, D.S. (2012) Expression of the non-neuronal cholinergic system in rat beta-cells. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, **167**, 75-77.
- Dellisanti, C.D., Yao, Y., Stroud, J.C., Wang, Z.Z. & Chen, L. (2007) Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nature neuroscience*, **10**, 953-962.
- Denholm, I., Cahill, T.M., Dennehy, T.J. & Horowitz, A.R. (1998) Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplified by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**, 1757-1767.
- Devonshire, A.L., Field, L.M., Foster, S.P., Moores, G.D., Williamson, M. & Blackman, R.L. (1998) The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **353**, 1667-1684.
- D'Hoedt, D. & Bertrand, D. (2009) Nicotinic acetylcholine receptors: an overview on drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets*, **13**, 395-411.
- Diehr, H.J., Gallenkamp, B., Jelic, K., Lantzs, R. & Shiokawa, K. (1991) Synthesis and chemical-physical properties of the insecticide imidacloprid (NTN 33893). *Pflanzenschutz -Nachr. Bayer*, **44**, 107-112.
- Dupuis, J., Louis, T., Gauthier, M. & Raymond, V. (2012) Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **36**, 1553-1564.
- Dupuis, J.P., Gauthier, M. & Raymond-Delpech, V. (2011) Expression patterns of nicotinic subunits alpha2, alpha7, alpha8, and beta1 affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles. *Journal of neurophysiology*, **106**, 1604-1613.

- Eastham, H.M., Lind, R.J., Eastlake, J.L., Clarke, B.S., Towner, P., Reynolds, S.E., Wolstenholme, A.J. & Wonnacott, S. (1998) Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*. *European Journal of Neuroscience*, **10**, 879-889.
- Edelstein, S.J. & Changeux, J.P. (1996) Allosteric proteins after thirty years: the binding and state functions of the neuronal alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Experientia*, **52**, 1083-1090.
- Edelstein, S.J., Schaad, O., Henry, E., Bertrand, D. & Changeux, J.P. (1996) A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. *Biological cybernetics*, **75**, 361-379.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. & Nauen, R. (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci*, **64**, 1099-1105.
- Elbert, A., Nauen, R. & Leicht, W. (1998) Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide: Biological activity and agricultural importance. In Ishaaya, I., Degheele, D. (eds) *Insecticides with novel modes of action*. Springer-Verlag, New-York.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F. & Boulter, J. (2001) alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3501-3506.
- Eusebi, F., Palma, E., Amici, M. & Miledi, R. (2009) Microtransplantation of ligand-gated receptor-channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: a potent tool for expanding functional information. *Progress in neurobiology*, **88**, 32-40.
- Fayyazuddin, A., Zaheer, M.A., Hiesinger, P.R. & Bellen, H.J. (2006) The nicotinic acetylcholine receptor Dalpha7 is required for an escape behavior in *Drosophila*. *PLoS Biol*, **4**, e63.
- Feldberg, W. (1940) The action of bee venom, cobra venom and lysolecithin on the adrenal medulla. *The Journal of physiology*, **99**, 104-118.
- Field, L.M., Devonshire, A.L. & Forde, B.G. (1988) Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *The Biochemical journal*, **251**, 309-312.
- Flomen, R., Knight, J., Sham, P., Kerwin, R. & Makoff, A. (2004) Evidence that RNA editing modulates splice site selection in the 5-HT_{2C} receptor gene. *Nucleic acids research*, **32**, 2113-2122.
- Foster, S.P., Cox, D., Oliphant, L., Mitchinson, S. & Denholm, I. (2008) Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci*, **64**, 1111-1114.
- Fox-Walsh, K.L., Dou, Y., Lam, B.J., Hung, S.P., Baldi, P.F. & Hertel, K.J. (2005) The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 16176-16181.

- Franz, A., Makkouk, K.M. & Vetten, H.J. (1998) Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *J Phytopathol*, **146**, 347-355.
- Frey, K.A. & Albin, R.L. (2001) Receptor binding techniques. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, **Chapter 1**, Unit1 4.
- Fucile, S. (2004) Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell calcium*, **35**, 1-8.
- Fuentes-Contreras, E., Figueroa, C.C., Silva, A.X., Bacigalupe, L.D., Briones, L.M., Foster, S.P. & Unruh, T.R. (2013) Survey of resistance to four insecticides and their associated mechanisms in different genotypes of the green peach aphid (Hemiptera: Aphididae) from Chile. *Journal of economic entomology*, **106**, 400-407.
- Galzi, J.L., Bertrand, D., Devillers-Thiery, A., Revah, F., Bertrand, S. & Changeux, J.P. (1991) Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS letters*, **294**, 198-202.
- Galzi, J.L., Revah, F., Black, D., Goeldner, M., Hirth, C. & Changeux, J.P. (1990) Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 10430-10437.
- Gao, J.R., Deacutis, J.M. & Scott, J.G. (2007a) Characterization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene Md alpha 2 from the house fly, *Musca domestica*. *Arch Insect Biochem*, **64**, 30-42.
- Gao, J.R., Deacutis, J.M. & Scott, J.G. (2007b) The nicotinic acetylcholine receptor subunit Mdalpha6 from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect Mol Biol*, **16**, 325-334.
- Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrugge, C., Deglise, P., Kljucovic, P., Armengaud, C. & Grunewald, B. (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiology of learning and memory*, **86**, 164-174.
- Gehle, V.M., Walcott, E.C., Nishizaki, T. & Sumikawa, K. (1997) N-glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain research. Molecular brain research*, **45**, 219-229.
- Gentz, M.C., Murdoch, G. & King, G.F. (2010) Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control*, **52**, 208-215.
- Goldberg, F., Grunewald, B., Rosenboom, H. & Menzel, R. (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kkenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of physiology*, **514 (Pt 3)**, 759-768.

- Govind, A.P., Vezina, P. & Green, W.N. (2009) Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochemical pharmacology*, **78**, 756-765.
- Grauso, M., Reenan, R.A., Culetto, E. & Sattelle, D.B. (2002) Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, D alpha 5, D alpha 6 and D alpha 7 in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, **160**, 1519-1533.
- Green, W.N. & Wanamaker, C.P. (1997) The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 20945-20953.
- Griffith, L.C. & Greenspan, R.J. (1993) The diversity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in *Drosophila* is generated by alternative splicing of a single gene. *Journal of neurochemistry*, **61**, 1534-1537.
- Grolleau, F. & Lapied, B. (2000) Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol*, **203**, 1633-1648.
- Grutter, T. & Changeux, J.P. (2001) Nicotinic receptors in wonderland. *Trends in biochemical sciences*, **26**, 459-463.
- Guillen, J. & Bielza, P. (2013) Thiamethoxam acts as a target-site synergist of spinosad in resistant strains of *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manag Sci*, **69**, 188-194.
- GuptaRoy, B., Beckingham, K. & Griffith, L.C. (1996) Functional diversity of alternatively spliced isoforms of *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. A role for the variable domain in activation. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 19846-19851.
- GuptaRoy, B., Marwaha, N., Pla, M., Wang, Z., Nelson, H.B., Beckingham, K. & Griffith, L.C. (2000) Alternative splicing of *Drosophila* calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates substrate specificity and activation. *Brain research. Molecular brain research*, **80**, 26-34.
- Guzman, G.R., Santiago, J., Ricardo, A., Marti-Arbona, R., Rojas, L.V. & Lasalde-Dominicci, J.A. (2003) Tryptophan scanning mutagenesis in the alphaM3 transmembrane domain of the *Torpedo californica* acetylcholine receptor: functional and structural implications. *Biochemistry*, **42**, 12243-12250.
- Heeschen, C., Weis, M., Aicher, A., Dimmeler, S. & Cooke, J.P. (2002) A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of clinical investigation*, **110**, 527-536.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, **336**, 348-350.

- Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R. & Seeburg, P.H. (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*, **406**, 78-81.
- Holt, R.A. & Subramanian, G.M. & Halpern, A. & Sutton, G.G. et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, **298**, 129-149.
- Hoopengardner, B., Bhalla, T., Staber, C. & Reenan, R. (2003) Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science*, **301**, 832-836.
- Hou, W., Liu, Q., Tian, L., Wu, Q., Zhang, Y., Xie, W., Wang, S., Miguel, K.S., Funderburk, J. & Scott, J.G. (2014) The alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunit of *Frankliniella occidentalis* is not involved in resistance to spinosad. *Pestic Biochem Physiol*, **111**, 60-67.
- Hsu, J.C., Feng, H.T., Wu, W.J., Geib, S.M., Mao, C.H. & Vontas, J. (2012) Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene Bdelta6 are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol*, **42**, 806-815.
- Huang, Y., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Windass, J.D., Lansdell, S.J. & Millar, N.S. (1999) Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Journal of neurochemistry*, **73**, 380-389.
- Huang, Y., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Windass, J.D., Lansdell, S.J. & Millar, N.S. (2000) Cloning, heterologous expression and co-assembly of Mpbeta1, a nicotinic acetylcholine receptor subunit from the aphid *Myzus persicae*. *Neuroscience letters*, **284**, 116-120.
- Ihara, M., Brown, L.A., Ishida, C., Okuda, H., Sattelle, D.B. & Matsuda, K. (2006) Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *Journal of Pesticide Science*, **31**, 35-40.
- Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V. & Sattelle, D.B. (2003) Diverse actions of neonicotinoids on chicken alpha7, alpha4beta2 and *Drosophila*-chicken SADbeta2 and ALSbeta2 hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology*, **45**, 133-144.
- Ihara, M., Matsuda, K., Shimomura, M., Sattelle, D.B. & Komai, K. (2004) Super agonist actions of clothianidin and related compounds on the SAD beta 2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **68**, 761-763.
- Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K. & Numa, S. (1988) Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*, **335**, 645-648.

- Imoto, K., Methfessel, C., Sakmann, B., Mishina, M., Mori, Y., Konno, T., Fukuda, K., Kurasaki, M., Bujo, H., Fujita, Y. & et al. (1986) Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature*, **324**, 670-674.
- Jaquiere, J., Stoeckel, S., Nouhaud, P., Mieuze, L., Maheo, F., Legeai, F., Bernard, N., Bonvoisin, A., Vitalis, R. & Simon, J.C. (2012) Genome scans reveal candidate regions involved in the adaptation to host plant in the pea aphid complex. *Molecular ecology*, **21**, 5251-5264.
- Jensen, M.L., Schousboe, A. & Ahring, P.K. (2005) Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of neurochemistry*, **92**, 217-225.
- Jeschke, P., Moriya, K., Lantzs, R., Seifert, H., Lindner, W., Jelich, K., Gohoert, A., Beck, M.E. & Etzel, W. (2001) Thiacloprid (Bay YRC 2894) - a new member of the chloronicotiny insecticide (CNI) family. *Pflanzenschutz -Nachr. Bayer*, **54**, 147-160.
- Jeschke, P., Nauen, R. & Beck, M.E. (2013) Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie*, **52**, 9464-9485.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. & Elbert, A. (2011) Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem*, **59**, 2897-2908.
- Jeschke, P. & Uneme, H. (2003) Chlothianidin (TI-435) - the third member of the chloronicotiny insecticides (CNI) family. *Pflanzenschutz -Nachr. Bayer*, **56**, 5-25.
- Jin, Y.F., Tian, N., Cao, J., Liang, J., Yang, Z.L. & Lv, J.N. (2007) RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *Bmc Evol Biol*, **7**.
- Jonas, P.E., Phannavong, B., Schuster, R., Schroder, C. & Gundelfinger, E.D. (1994) Expression of the ligand-binding nicotinic acetylcholine receptor subunit D alpha 2 in the Drosophila central nervous system. *Journal of neurobiology*, **25**, 1494-1508.
- Jones, A.K., Bera, A.N., Lees, K. & Sattelle, D.B. (2010) The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity*, **104**, 247-259.
- Jones, A.K., Brown, L.A. & Sattelle, D.B. (2007) Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invertebrate neuroscience : IN*, **7**, 67-73.
- Jones, A.K., Grauso, M. & Sattelle, D.B. (2005) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics*, **85**, 176-187.
- Jones, A.K., Rayes, D., Al-Diwani, A., Maynard, T.P., Jones, R., Hernando, G., Buckingham, S.D., Bouzat, C. & Sattelle, D.B. (2011) A Cys-loop mutation in the *Caenorhabditis elegans* nicotinic receptor subunit UNC-63 impairs but does not abolish channel function. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 2550-2558.

- Jones, A.K., Raymond-Delpech, V., Thany, S.H., Gauthier, M. & Sattelle, D.B. (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome research*, **16**, 1422-1430.
- Jones, A.K. & Sattelle, D.B. (2004) Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **26**, 39-49.
- Jones, A.K. & Sattelle, D.B. (2007) The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Bmc Genomics*, **8**, 327.
- Jones, A.K. & Sattelle, D.B. (2010) Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Advances in experimental medicine and biology*, **683**, 25-43.
- Kagabu, S. (1997) Chloronicotinyl insecticides - discovery, application, and future perspective. *Revue of Toxicology*, **1**, 75-129.
- Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M. & Tzartos, S.J. (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *The FEBS journal*, **274**, 3799-3845.
- Kamikouchi, A., Takeuchi, H., Sawata, M., Natori, S. & Kubo, T. (2000) Concentrated expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. *The Journal of comparative neurology*, **417**, 501-510.
- Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S. & Karlin, A. (1984) Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *The Journal of biological chemistry*, **259**, 11662-11665.
- Karlin, A. (1967) On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *Journal of theoretical biology*, **16**, 306-320.
- Karlin, A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 102-114.
- Kayser, H., Lee, C., Decock, A., Baur, M., Haettenschwiler, J. & Maienfisch, P. (2004) Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: I. A structure-activity study of the mode of [3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag Sci*, **60**, 945-958.
- Keegan, L.P., Brindle, J., Gallo, A., Leroy, A., Reenan, R.A. & O'Connell, M.A. (2005) Tuning of RNA editing by ADAR is required in *Drosophila*. *The EMBO journal*, **24**, 2183-2193.
- Kenn, M. & MacDermot, J. (1993) Analysis of receptors by radioligand binding. In Wharton, J., Polak, J.M. (eds) *Receptor autoradiography, principles and practice*. Oxford University Press.

- Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet*, **11**, 345-355.
- Kondrashov, F.A. & Koonin, E.V. (2001) Origin of alternative splicing by tandem exon duplication. *Human molecular genetics*, **10**, 2661-2669.
- Krashia, P., Moroni, M., Broadbent, S., Hofmann, G., Kracun, S., Beato, M., Groot-Kormelink, P.J. & Sivilotti, L.G. (2010) Human alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in Xenopus oocytes or mammalian HEK293 cells. *PloS one*, **5**, e13611.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G. & Given, K. (2012) Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PloS one*, **7**.
- Kuo, Y.P., Xu, L., Eaton, J.B., Zhao, L., Wu, J. & Lukas, R.J. (2005) Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**, 455-466.
- Kurosaki, T., Fukuda, K., Konno, T., Mori, Y., Tanaka, K., Mishina, M. & Numa, S. (1987) Functional properties of nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in various combinations. *FEBS letters*, **214**, 253-258.
- Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Kawashima, K. & Grando, S.A. (2007) The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, **39**, 125-135.
- Langley, J.N. (1907) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *The Journal of physiology*, **36**, 347-384.
- Lansdell, S.J., Collins, T., Goodchild, J. & Millar, N.S. (2012) The Drosophila nicotinic acetylcholine receptor subunits Dalpha5 and Dalpha7 form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neurosci*, **13**, 73.
- Lansdell, S.J. & Millar, N.S. (2000a) Cloning and heterologous expression of D alpha 4, a Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology*, **39**, 2604-2614.
- Lansdell, S.J. & Millar, N.S. (2000b) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology*, **39**, 671-679.
- Lansdell, S.J. & Millar, N.S. (2002) Dbeta3, an atypical nicotinic acetylcholine receptor subunit from Drosophila : molecular cloning, heterologous expression and coassembly. *Journal of neurochemistry*, **80**, 1009-1018.
- Lapied, B., Le Corrionc, H. & Hue, B. (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain research*, **533**, 132-136.

- Laurencikiene, J., Kallman, A.M., Fong, N., Bentley, D.L. & Ohman, M. (2006) RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO reports*, **7**, 303-307.
- Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A. & Manino, A. (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, **64**, 107-113.
- Le Novère, N. & Changeux, J. (2001) LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic acids research*, **29**, 294-295.
- Le Novère, N., Corringer, P.J. & Changeux, J.P. (2002a) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of neurobiology*, **53**, 447-456.
- Le Novère, N., Grutter, T. & Changeux, J.P. (2002b) Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 3210-3215.
- Le Trionnaire, G., Hardie, J., Jaubert-Possamai, S., Simon, J.C. & Tagu, D. (2008) Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, **100**, 441-451.
- Lee, C.Y. & Chang, C.C. (1966) Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. *Memorias do Instituto Butantan*, **33**, 555-572.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G. & Hwang, S. (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. *Journal of biotechnology*, **123**, 273-280.
- Lee, C.L., Ow, D.S. & Oh, S.K. (2006) Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *Journal of microbiological methods*, **65**, 258-267.
- Leonard, G.C. & Julius, J.M. (2000) Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag Sci*, **56**, 651-676.
- Li, J., Shao, Y., Ding, Z.P., Bao, H.B., Liu, Z.W., Han, Z.J. & Millar, N.S. (2010) Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochem Molec*, **40**, 17-22.
- Li, X.W. & Wang, H. (2006) Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. *Life sciences*, **78**, 1863-1870.
- Lind, R.J., Clough, M.S., Earley, F.G.P., Wonnacott, S. & Reynolds, S.E. (1999) Characterisation of multiple alpha-bungarotoxin binding sites in the aphid Myzus persicae (Hemiptera : Aphididae). *Insect Biochem Molec*, **29**, 979-988.

- Lind, R.J., Clough, M.S., Reynolds, S.E. & Earley, F.G.P. (1998) [H-3]imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae). *Pestic Biochem Phys*, **62**, 3-14.
- Lindstrom, J. (2001) Nicotinic acetylcholine receptors. *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers, Londres, pp. 1-8.
- Liu, M., Latli, B. & Casida, J.E. (1995) Imidacloprid binding site in *Musca* nicotinic acetylcholine receptor: interactions with physostigmine and a variety of nicotinic antagonists with chloropyridyl and chlorothiazolyl substituents. *Pestic Biochem Phys*, **52**, 170-181.
- Liu, Y., Lin, K., Liu, F., Gui, F. & Wang, G. (2013) Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Integrative Agriculture*, **12**, 2083-2091.
- Liu, Z., Han, Z., Zhang, Y., Song, F., Yao, X., Liu, S., Gu, J. & Millar, N.S. (2009) Heteromeric co-assembly of two insect nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits: influence on sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Journal of neurochemistry*, **108**, 498-506.
- Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Denholm, I., Han, Z. & Millar, N.S. (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8420-8425.
- Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Han, Z., Denholm, I. & Millar, N.S. (2006) A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *Journal of neurochemistry*, **99**, 1273-1281.
- Louis, T., Musso, P.Y., de Oliveira, S.B., Garreau, L., Giurfa, M., Raymond, V. & Gauthier, M. (2012) Amelalpha8 subunit knockdown in the mushroom body vertical lobes impairs olfactory retrieval in the honeybee, *Apis mellifera*. *The European journal of neuroscience*, **36**, 3438-3450.
- Lozano, V.C., Bonnard, E., Gauthier, M. & Richard, D. (1996) Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. *Behavioural brain research*, **81**, 215-222.
- Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novère, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., Dani, J.A., Grady, S.R., Kellar, K.J., Lindstrom, J.M., Marks, M.J., Quik, M., Taylor, P.W. & Wonnacott, S. (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*, **51**, 397-401.
- Lustig, L.R. (2006) Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, **288**, 424-434.

- Maas, S., Patt, S., Schrey, M. & Rich, A. (2001) Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14687-14692.
- Maienfisch, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., Sieger, E. & Walti, M. (2001) The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci*, **57**, 165-176.
- Markussen, M.D.K. & Kristensen, M. (2010) Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit Md alpha 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manag Sci*, **66**, 1257-1262.
- Marshall, J., Buckingham, S.D., Shingai, R., Lunt, G.G., Goosey, M.W., Darlison, M.G., Sattelle, D.B. & Barnard, E.A. (1990) Sequence and functional expression of a single alpha subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO journal*, **9**, 4391-4398.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M. & Sattelle, D.B. (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **22**, 573-580.
- Matsuda, K., Shimomura, M., Kondo, Y., Ihara, M., Hashigami, K., Yoshida, N., Raymond, V., Mongan, N.P., Freeman, J.C., Komai, K. & Sattelle, D.B. (2000) Role of loop D of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. *British journal of pharmacology*, **130**, 981-986.
- Mazzaferro, S., Benallegue, N., Carbone, A., Gasparri, F., Vijayan, R., Biggin, P.C., Moroni, M. & Bermudez, I. (2011) Additional acetylcholine (ACh) binding site at alpha4/alpha4 interface of (alpha4beta2)2alpha4 nicotinic receptor influences agonist sensitivity. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 31043-31054.
- Mazzo, F., Pistillo, F., Grazioso, G., Clementi, F., Borgese, N., Gotti, C. & Colombo, S.F. (2013) Nicotine-modulated subunit stoichiometry affects stability and trafficking of alpha3beta4 nicotinic receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**, 12316-12328.
- Middleton, R.E. & Cohen, J.B. (1991) Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry*, **30**, 6987-6997.
- Millar, N.S. (2009) A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, **78**, 766-776.
- Millar, N.S. & Denholm, I. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate neuroscience : IN*, **7**, 53-66.
- Millar, N.S. & Lansdell, S.J. (2010) Characterisation of insect nicotinic acetylcholine receptors by heterologous expression. *Advances in experimental medicine and biology*, **683**, 65-73.

- Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. & et al. (1984) Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature*, **307**, 604-608.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C. & Sakmann, B. (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, **321**, 406-411.
- Mishina, M., Tobimatsu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T. & et al. (1985) Location of functional regions of acetylcholine receptor alpha-subunit by site-directed mutagenesis. *Nature*, **313**, 364-369.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. & Unwin, N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *Journal of molecular biology*, **288**, 765-786.
- Moller, S., Croning, M.D. & Apweiler, R. (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, **17**, 646-653.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *Journal of molecular biology*, **12**, 88-118.
- Moran, N.A. (1992) The evolution of aphid life cycles. *Annual Review of Entomology*, **37**, 321-348.
- Mori, K., Okumoto T Fau - Kawahara, N., Kawahara N Fau - Ozoe, Y. & Ozoe, Y. (2001) Interaction of dinotefuran and its analogues with nicotinic acetylcholine receptors of cockroach nerve cords. *Pest Manag Sci*, **58**, 190-196.
- Morse, D.P., Aruscavage, P.J. & Bass, B.L. (2002) RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 7906-7911.
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J. & Moyer, D.D. (2006) Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag Sci*, **62**, 30-37.
- Nachmansohn, D. (1959) Role of acetylcholine in axonal conduction and neuromuscular transmission. *American journal of physical medicine*, **38**, 190-206.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L. & Kaussmann, M. (2003) Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Phys*, **76**, 55-69.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U. & Schmuck, R. (2001a) Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci*, **57**, 577-586.

- Nauen, R., Stumpf, N. & Elbert, A. (2002) Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci*, **58**, 868-875.
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C.P. & Kraus, W. (2001b) Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag Sci*, **57**, 253-261.
- Nelson, M.E., Kuryatov, A., Choi, C.H., Zhou, Y. & Lindstrom, J. (2003) Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, **63**, 332-341.
- Nishiwaki, H., Nakagawa, Y., Kuwamura, M., Sato, K., Akamatsu, M., Matsuda, K., Komai, K. & Miyagawa, H. (2003) Correlations of the electrophysiological activity of neonicotinoids with their binding and insecticidal activities. *Pest Manag Sci*, **59**, 1023-1030.
- Nishizaki, T. (2003) N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Brain research. Molecular brain research*, **114**, 172-176.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S. (1982) Primary structure of α -subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*, **299**, 793-797.
- Ohsako, S., Nishida, Y., Ryo, H. & Yamauchi, T. (1993) Molecular characterization and expression of the *Drosophila* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II gene. Identification of four forms of the enzyme generated from a single gene by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 2052-2062.
- Orr, N., Schaffner, A.J. & Watson, G.B. (1997) Pharmacological characterization of an epibatidine binding site in the nerve cord of *Periplaneta americana*. *Pestic Biochem Phys*, **58**, 183-192.
- Ortells, M.O. & Lunt, G.G. (1995) Evolutionary History of the Ligand-Gated Ion-Channel Superfamily of Receptors. *Trends Neurosci*, **18**, 121-127.
- Palladino, M.J., Keegan, L.P., O'Connell, M.A. & Reenan, R.A. (2000) A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell*, **102**, 437-449.
- Palumbo, J.C., Horowitz, A.R. & Prabhaker, N. (2001) Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, **20**, 739-765.
- Pasch, E., Muenz, T.S. & Rossler, W. (2011) CaMKII is differentially localized in synaptic regions of Kenyon cells within the mushroom bodies of the honeybee brain. *The Journal of comparative neurology*, **519**, 3700-3712.
- Perry, T., Heckel, D.G., McKenzie, J.A. & Batterham, P. (2008) Mutations in D $\alpha 1$ or D $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Molec*, **38**, 520-528.

- Perry, T., McKenzie, J.A. & Batterham, P. (2007) A $\alpha 6$ knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol*, **37**, 184-188.
- Puinean, A.M., Denholm, I., Millar, N.S., Nauen, R. & Williamson, M.S. (2010a) Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic Biochem Phys*, **97**, 129-132.
- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S. & Bass, C. (2010b) Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. *Plos Genet*, **6**.
- Ren, X.Q., Cheng, S.B., Treuil, M.W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K.H., Lindstrom, J.M. & Anand, R. (2005) Structural determinants of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 6676-6686.
- Reynolds, J.A. & Karlin, A. (1978) Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry*, **17**, 2035-2038.
- Rinkevich, F.D. & Scott, J.G. (2009) Transcriptional diversity and allelic variation in nicotinic acetylcholine receptor subunits of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*, **18**, 233-242.
- Rueter, S.M., Dawson, T.R. & Emeson, R.B. (1999) Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*, **399**, 75-80.
- Rush, R., Kuryatov, A., Nelson, M.E. & Lindstrom, J. (2002) First and second transmembrane segments of $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$, and $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor subunits influence the efficacy and potency of nicotine. *Molecular pharmacology*, **61**, 1416-1422.
- Salgado, V.L. & Saar, R. (2004) Desensitizing and non-desensitizing subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J Insect Physiol*, **50**, 867-879.
- Saragoza, P.A., Modir, J.G., Goel, N., French, K.L., Li, L., Nowak, M.W. & Stitzel, J.A. (2003) Identification of an alternatively processed nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit RNA in mouse brain. *Brain research. Molecular brain research*, **117**, 15-26.
- Sattelle, D.B., Jones, A.K., Sattelle, B.M., Matsuda, K., Reenan, R. & Biggin, P.C. (2005) Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **27**, 366-376.
- Sawruk, E., Schloss, P., Betz, H. & Schmitt, B. (1990a) Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated α -subunit. *The EMBO journal*, **9**, 2671-2677.

- Sawruk, E., Udri, C., Betz, H. & Schmitt, B. (1990b) SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares its genomic localization with two alpha-subunits. *FEBS letters*, **273**, 177-181.
- Schloss, P., Hermans-Borgmeyer, I., Betz, H. & Gundelfinger, E.D. (1988) Neuronal acetylcholine receptors in *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding complex. *The EMBO journal*, **7**, 2889-2894.
- Schulz, R., Bertrand, S., Chamaon, K., Smalla, K.H., Gundelfinger, E.D. & Bertrand, D. (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*: two different types of alpha subunits coassemble within the same receptor complex. *Journal of neurochemistry*, **74**, 2537-2546.
- Schulz, R., Sawruk, E., Mulhardt, C., Bertrand, S., Baumann, A., Phannavong, B., Betz, H., Bertrand, D., Gundelfinger, E.D. & Schmitt, B. (1998) D alpha3, a new functional alpha subunit of nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*. *Journal of neurochemistry*, **71**, 853-862.
- Seeburg, P.H. (2002) A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. *Neuron*, **35**, 17-20.
- Sgard, F., Fraser, S.P., Katkowska, M.J., Djamgoz, M.B., Dunbar, S.J. & Windass, J.D. (1998) Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits from the insect pest *Myzus persicae*. *Journal of neurochemistry*, **71**, 903-912.
- Shao, Y.M., Dong, K. & Zhang, C.X. (2007) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bmc Genomics*, **8**.
- Shi, X.B., Jiang, L.L., Wang, H.Y., Qiao, K., Wang, D. & Wang, K.Y. (2011) Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pest Manag Sci*, **67**, 1528-1533.
- Shimomura, M., Okuda, H., Matsuda, K., Komai, K., Akamatsu, M. & Sattelle, D.B. (2002) Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands. *British journal of pharmacology*, **137**, 162-169.
- Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D.B. & Matsuda, K. (2006) Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. *Molecular pharmacology*, **70**, 1255-1263.
- Shimomura, M., Yokota, M., Matsuda, K., Sattelle, D.B. & Komai, K. (2004) Roles of loop C and the loop B-C interval of the nicotinic receptor alpha subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects. *Neuroscience letters*, **363**, 195-198.
- Simon, J.C., Rispe, C. & Sunnucks, P. (2002) Ecology and evolution of sex in aphids. . *Trends Ecol. Evol.*, **17**, 34-39.
- Sinakevitch, I.I., Geffard, M., Pelhate, M. & Lapied, B. (1995) Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol*, **198**, 1539-1544.

- Sine, S.M. (1993) Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 9436-9440.
- Sine, S.M. (2002) The nicotinic receptor ligand binding domain. *Journal of neurobiology*, **53**, 431-446.
- Sine, S.M. & Engel, A.G. (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, **440**, 448-455.
- Sine, S.M., Kreienkamp, H.J., Bren, N., Maeda, R. & Taylor, P. (1995) Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. *Neuron*, **15**, 205-211.
- Slater, R., Paul, V.L., Andrews, M., Garbay, M. & Camblin, P. (2012) Identifying the presence of neonicotinoid-resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest Manag Sci*, **68**, 634-638.
- Smit, A.B., Celie, P.H., Kasheverov, I.E., Mordvintsev, D.Y., van Nierop, P., Bertrand, D., Tsetlin, V. & Sixma, T.K. (2006) Acetylcholine-binding proteins: functional and structural homologs of nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **30**, 9-10.
- Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van der Schors, R.C., van Elk, R., Sorgedraeger, B., Brejc, K., Sixma, T.K. & Geraerts, W.P. (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, **411**, 261-268.
- Soloway, S.B. (1976) Naturally occurring insecticides. *Environmental health perspectives*, **14**, 109-117.
- Song, F., You, Z., Yao, X., Cheng, J., Liu, Z. & Lin, K. (2009) Specific loops D, E and F of nicotinic acetylcholine receptor beta1 subunit may confer imidacloprid selectivity between *Myzus persicae* and its predatory enemy *Pardosa pseudoannulata*. *Insect Biochem Molec*, **39**, 833-841.
- Srinivasan, R., Pantoja, R., Moss, F.J., Mackey, E.D., Son, C.D., Miwa, J. & Lester, H.A. (2011) Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *The Journal of general physiology*, **137**, 59-79.
- Stankiewicz, M., Dabrowski, M. & de Lima, M.E. (2012) Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of toxicology*, **2012**, 143740.
- Sumikawa, K. & Gehle, V.M. (1992) Assembly of Mutant Subunits of the Nicotinic Acetylcholine-Receptor Lacking the Conserved Disulfide Loop Structure. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 6286-6290.
- Takamatsu, Y., Ohsako, S., Nishida, Y. & Yamauchi, T. (1994) Identification of an alternative form of the *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II that is maternally derived. *Biochimica et biophysica acta*, **1220**, 188-192.

- Tamamizu, S., Lee, Y., Hung, B., McNamee, M.G. & Lasalde-Dominicci, J.A. (1999) Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the M4 transmembrane domain. *The Journal of membrane biology*, **170**, 157-164.
- Tan, J., Galligan, J.J. & Hollingworth, R.M. (2007) Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology*, **28**, 829-842.
- Tassonyi, E., Charpantier, E., Muller, D., Dumont, L. & Bertrand, D. (2002) The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain research bulletin*, **57**, 133-150.
- Thany, S.H. (2009) Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology*, **30**, 1045-1052.
- Thany, S.H. (2010) Electrophysiological studies and pharmacological properties of insect native nicotinic acetylcholine receptors. *Advances in experimental medicine and biology*, **683**, 53-63.
- Thany, S.H. (2011) Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology*, **60**, 587-592.
- Thany, S.H., Crozatier, M., Raymond-Delpech, V., Gauthier, M. & Lenaers, G. (2005) Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene*, **344**, 125-132.
- Thany, S.H., Courjaret, R. & Lapied, B. (2008) Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neuroscience letters*, **438**, 317-321.
- Thany, S.H., Lenaers, G., Crozatier, M., Armengaud, C. & Gauthier, M. (2003) Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, **12**, 255-262.
- Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B. & Lapied, B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, **28**, 14-22.
- Tomaselli, G.F., McLaughlin, J.T., Jurman, M.E., Hawrot, E. & Yellen, G. (1991) Mutations affecting agonist sensitivity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophysical journal*, **60**, 721-727.
- Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **45**, 247-268.
- Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2009) Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Accounts of chemical research*, **42**, 260-269.
- Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2011) Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *J Agric Food Chem*, **59**, 2883-2886.

- Tomizawa, M., Kagabu, S. & Casida, J.E. (2011) Receptor structure-guided neonicotinoid design. *J Agric Food Chem*, **59**, 2918-2922.
- Tomizawa, M., Millar, N.S. & Casida, J.E. (2005) Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochem Mol Biol*, **35**, 1347-1355.
- Tomizawa, M., Otsuka, H., Miyamoto, T., Eldefrawi, M.E. & Yamamoto, I. (1995) Pharmacological characteristics of insect nicotinic acetylcholine receptor with its ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids. *J. Pesticide Sci.*, **20**, 57-64.
- Tonkin, L.A., Saccomanno, L., Morse, D.P., Brodigan, T., Krause, M. & Bass, B.L. (2002) RNA editing by ADARs is important for normal behavior in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, **21**, 6025-6035.
- Tribolium Genome Sequencing, C. & Richards, S. & Gibbs, R.A. & Weinstock, G.M. et al. (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, **452**, 949-955.
- Ulenz, C., Hogg, R.C., Celie, P.H., Bertrand, D., Tsetlin, V., Smit, A.B. & Sixma, T.K. (2006) Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3615-3620.
- Unwin, N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *Journal of molecular biology*, **229**, 1101-1124.
- Unwin, N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, **373**, 37-43.
- Unwin, N. (1998) The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *Journal of structural biology*, **121**, 181-190.
- Unwin, N. (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS letters*, **555**, 91-95.
- Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of molecular biology*, **346**, 967-989.
- Unwin, N. & Fujiyoshi, Y. (2012) Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *Journal of molecular biology*, **422**, 617-634.
- von Dohlen, C.D., Rowe, C.A. & Heie, O.E. (2006) A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, **38**, 316-329.
- Wakita, T., Kinoshita, K., Yamada, E., Yasui, N., Kawahara, N., Naoi, A., Nakaya, M., Ebihara, K., Matsuno, H. & Kodaka, K. (2003) The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Manag Sci*, **59**, 1016-1022.

- Wang, D., Chiara, D.C., Xie, Y. & Cohen, J.B. (2000) Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with 4-benzoylbenzoylcholine, a novel photoaffinity competitive antagonist. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 28666-28674.
- Wang, X., Fang, X., Yang, P., Jiang, X., Jiang, F., Zhao, D., et al. (2014) The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nature communications*, **5**, 2957.
- Wang, Z.Z., Hardy, S.F. & Hall, Z.W. (1996) Assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. The first transmembrane domains of truncated alpha and delta subunits are required for heterodimer formation in vivo. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 27575-27584.
- Watson, G.B., Loso, M.R., Babcock, J.M., Hasler, J.M., Letherer, T.J., Young, C.D., Zhu, Y., Casida, J.E. & Sparks, T.C. (2011) Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochem Mol Biol*, **41**, 432-439.
- Wessler, I. & Kirkpatrick, C.J. (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, **154**, 1558-1571.
- Wellmann, H., Gomes, M., Lee, C. & Kayser, H. (2004) Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: II. An unusual high affinity site for [H-3]thiamethoxam in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag Sci*, **60**, 959-970.
- Werren, J.H. & Richards, S. & Desjardins, C.A. & Niehuis, O. & Gadau, J. & Colbourne, et al. (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, **327**, 343-348.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L. & Goulson, D. (2012) Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science*, **336**, 351-352.
- Wiesner, P. & Kayser, H. (2000) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action. *J Biochem Mol Toxicol*, **14**, 221-230.
- Wollmuth, L.P. & Sobolevsky, A.I. (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci*, **27**, 321-328.
- Wu, P., Ma, D., Pierzchala, M., Wu, J., Yang, L.C., Mai, X., Chang, X. & Schmidt-Glenewinkel, T. (2005) The *Drosophila* acetylcholine receptor subunit D alpha5 is part of an alpha-bungarotoxin binding acetylcholine receptor. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 20987-20994.
- Wustenberg, D.G. & Grunewald, B. (2004) Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, **190**, 807-821.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., et al. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, **306**, 1937-1940.

- Xie, Y. & Cohen, J.B. (2001) Contributions of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor gamma Trp-55 and delta Trp-57 to agonist and competitive antagonist function. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 2417-2426.
- Yamada, T., Takahashi, H. & Hatano, R. (1999) A novel insecticide, acetamiprid. In Yamamoto, I., Casida, J.E. (eds) *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* pp. 149-176.
- Yamamoto, I. (1965) Nicotinoids as insecticides. *Advances in pest control research*, **6**, 231-260.
- Yamamoto, I., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Walcott, E.C. & Sumikawa, K. (1998) Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Arch Insect Biochem Physiol*, **37**, 24-32.
- Yang, X., Xie, W., Wang, S.L., Wu, Q.J., Pan, H.P., Li, R.M., Yang, N.N., Liu, B.M., Xu, B.Y., Zhou, X. & Zhang, Y.J. (2013) Two cytochrome P450 genes are involved in imidacloprid resistance in field populations of the whitefly, *Bemisia tabaci*, in China. *Pestic Biochem Physiol*, **107**, 343-350.
- Yao, X., Song, F., Chen, F., Zhang, Y., Gu, J., Liu, S. & Liu, Z. (2008) Amino acids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor beta subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 834-840.
- Yao, X.M., Song, F., Zhang, Y.X., Shao, Y., Li, J. & Liu, Z.W. (2009) Nicotinic acetylcholine receptor beta 1 subunit from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: A-to-I RNA editing and its possible roles in neonicotinoid sensitivity. *Insect Biochem Molec*, **39**, 348-354.
- Yixi, Z., Liu, Z., Han, Z., Song, F., Yao, X., Shao, Y., Li, J. & Millar, N.S. (2009) Functional co-expression of two insect nicotinic receptor subunits (Nlalpha3 and Nlalpha8) reveals the effects of a resistance-associated mutation (Nlalpha3) on neonicotinoid insecticides. *Journal of neurochemistry*, **110**, 1855-1862.
- Yu, X.L., Wang, M., Kang, M.J., Liu, L., Guo, X.Q. & Xu, B.H. (2011) Molecular Cloning and Characterization of Two Nicotinic Acetylcholine Receptor Beta Subunit Genes from *Apis Cerana*. *Arch Insect Biochem*, **77**, 163-178.
- Zhang, A.G., Kayser, H., Maienfisch, P. & Casida, J.E. (2000) Insect nicotinic acetylcholine receptor: Conserved neonicotinoid specificity of [H-3]imidacloprid binding site. *Journal of neurochemistry*, **75**, 1294-1303.
- Zhang, N.J., Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2004) *Drosophila* nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and alpha-bungarotoxin binding to distinct sites. *Neuroscience letters*, **371**, 56-59.
- Zhu, Y.M., Loso, M.R., Watson, G.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B., Huang, J.X., Gerwick, B.C., Babcock, J.M., Kelley, D., Hegde, V.B., Nugent, B.M., Renga, J.M., Denholm, I., Gorman, K., DeBoer, G.J., Hasler, J., Meade, T. & Thomas, J.D. (2011) Discovery and Characterization of Sulfoxaflor, a Novel Insecticide Targeting Sap-Feeding Pests. *J Agr Food Chem*, **59**, 2950-2957.

- Zia, S., Ndoeye, A., Lee, T.X., Webber, R.J. & Grando, S.A. (2000) Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther*, **293**, 973-981.
- Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K. & Tzartos, S.J. (2009) Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB life*, **61**, 407-423.

ANNEXE

Publication n°3

**Molecular features and toxicological properties of four common pesticides,
acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil against aphids,
Acyrtosiphon pisum and *Myzus persicae***

Emiliane Taillebois,^[a] Zakaria Alamiddine,^[b] Adèle Laurent,^[b] Christine Brazier,^[c] Jérôme Graton,^[b] Jacques Lebreton,^[b] Monique Mathé-Allainmat,^[b] Steeve H. Thany,^{*,[a, d]} and Jean-Yves Le Questel^{*,[c]}

^[a]*Université d'Angers, Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647, USC INRA 2023, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex.*

^[b]*Université de Nantes, CEISAM UMR 6230, UFR des Sciences et des Techniques, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, Nantes F-44000, France.*

^[c]*ANSES-Laboratoire de Lyon, Unité Résistance aux produits phytosanitaires. 31 Avenue Tony Garnier. 69364 Lyon Cedex 07.*

^[d]*Université d'Orléans, Laboratoire Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207. Rue de Chartres, BP 6759. 45067 Orléans Cedex, France*

*Corresponding authors :

Jean-Yves Le Questel : jean-yves.le-questel@univ-nantes.fr

Steeve H. Thany : steeve.thany@univ-angers.fr

Abstract.

Structural features and selected physicochemical properties of four common pesticides: acetamiprid (neonicotinoid), chlorpyrifos (organophosphate insecticide), deltamethrin (pyrethroid) have been investigated by Density Functional Theory quantum chemical calculations. The high flexible character of these insecticides is revealed by the numerous and different energetic minima obtained and located within a 20 kJ/mol range in the gas phase. In line with this trend, a redistribution of the energetic minima is observed in water, which influence has been modelled by a continuum solvation model. Molecular electrostatic potential calculations provide a ranking of the potential interaction sites of the four insecticides. In addition, comparative toxicological assays against aphids reveal the same toxicity order for the two susceptible strain *Myzus persicae* 4106A and *Acyrtosiphon pisum* LSR1: acetamiprid > fipronil > deltamethrin > chlorpyrifos. In the resistant strain, *M. persicae* 1300145, the toxicity order is modified: acetamiprid > fipronil > chlorpyrifos > deltamethrin. Interestingly, the strain 1300145 which is known to be resistant to neonicotinoids, is also less sensitive to deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil.

Keywords: Insecticides; quantum chemistry calculations; conformational features; Molecular electrostatic potential; toxicological effect; aphid; *Myzus Persicae*; *Acyrtosiphon pisum*.

1. Introduction

The development of resistant insect strains together with the significant toxicity of insecticides lead to the need for novel and selective representative of these pesticides acting on sensitive nerve targets. Thus, in the case of neonicotinoids, adverse effects on beneficial insect species such as honey bees¹ have conducted to the withdrawal of three of them (imidacloprid, clothianidine and thiamethoxam) of the European market in 2013. On the other hand, the widespread use of organophosphate insecticides have resulted in the observance of significant amounts of these compounds in ground and surface waters and on fresh and processed fruits and vegetables,² despite these compounds are extremely toxic. In the same vein, pyrethroids are among the most extensively used insecticides. Despite their high selectivity to insects, human poisoning due to their exposure has been the subject of comprehensive studies.^{3,4} Finally, despite the promises due to the original mode of action of fipronil, its high toxicity to many aquatic organisms has in particular been demonstrated.⁵

In this framework, several studies investigating the effect of the exposure of natural systems to the combinations of several insecticides have appeared in the literature.⁶⁻⁸ A full understanding of the mode of action of insecticides and the discovery of more efficient, selective and non-toxic representative of these compounds require a detailed characterization of their molecular properties (structural, physicochemical).⁹ In this context, quantum chemical studies, structural bioinformatics and molecular modelling methodologies (docking, 3D-QSAR, molecular dynamics) have appeared as promising and complementary tools. The first allow quantifying accurately relevant properties of insecticides,¹⁰⁻¹³ the second the building of the protein targets through homology modelling and the last provide detailed (static or dynamic) pictures of the insecticides-receptor interactions.¹⁴⁻¹⁶

In this paper, we investigate, through Density Functional Theory calculations, the structural features and some physicochemical properties of four common pesticides belonging to different chemical classes, namely acetamiprid (ACE, neonicotinoid), chlorpyrifos (CHL, organophosphate) and deltamethrin (DEL, pyrethroid).(Figure 1). Conformational analyses of the four insecticides allow determining their main energetic minima. The influence of water on these properties has been

modelled through a continuum model. These theoretical investigations have been completed by comparative toxicological assays on two aphid species, *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. We used two sensitive *A. pisum* and *M. persicae* strains and one neonicotinoid-insensitive *M. persicae* strain. Toxicological studies demonstrated that they are differently sensitive against *A. pisum* and *M. persicae* 4106A and 1300145 strains but they are all less sensitive against *M. persicae* 1300145 strain which is resistant to neonicotinoids. The conformational analyses highlight the high flexibility of the four compounds, from 4 up to 14 low energy conformers being found on a 20 kJ/mol range, depending of the insecticide considered. The effect of water surroundings confirms these trends, since the relative populations of the various energetic minima are significantly modified when it is taken into account through a polarized continuum model. The calculation of molecular electrostatic potential based descriptors allows discriminating the main sites of interaction among the various heteroatoms of the various compounds. Furthermore, the halogen-bond donating potential of these insecticides through their chlorine or bromine atoms is pointed out. On the whole, the present study provides new relevant informations on the physicochemical properties and *in vivo* toxicity of the four insecticides against *A. pisum* and *M. persicae*.

2. Material and Methods

2.1 Quantum chemistry calculations

Theoretical calculations were performed using the Gaussian 09¹⁷ program.

Conformational study. Density Functional Theory (DFT) methods constitute, in the field of quantum chemistry, very attractive approaches owing to their excellent performance-to-cost ratio. For the present work, we selected in most of the cases the M06-2X functional^{18, 19} associated to the 6-311G(d) atomic basis set, to perform our conformational investigations. Indeed, M06-2X has been proven to surpass other functionals for energy-barrier prediction and non-bonded interactions in the gas phase. The experimental structure of the four insecticides taken from the Cambridge Structural Database²⁰ has been used as starting geometry and fully optimized at the M06-2X/6-311G(d) level. Their identified degrees of freedom have been explored on the full angular range with a step of 30° at the M06-2X/6-311G(d) level. Only in the case of deltamethrin, which is characterized by significantly more degrees of freedom, relaxed scans running simultaneously over two dihedral angles with a step of 60° have been preliminary carried out at the B3LYP/6-31G(d) level to save computational time. The geometries of the minima revealed from these explorations have then been fully optimized at the M06-2X/6-311G(d) level. For all compounds, the harmonic frequencies were computed analytically in order to characterize the stationary points and confirm the nature of minimum (all-positive normal-mode frequencies). The relative population of each conformer was finally evaluated from the Gibbs energies considering a Boltzmann distribution according to relation (1):

$$p_i = \frac{e^{-\Delta G_i / RT}}{\sum_{i=1}^n e^{-\Delta G_i / RT}} \quad (1)$$

In order to include the effect of the surroundings, single point calculations using the geometries obtained in the isolated state have been carried out with a continuum description of the water

solvent by means of the SMD model (SMD).²¹ The Boltzmann populations based on the new energetic parameters obtained in these conditions have been recomputed according to relation (1).

Molecular electrostatic potential calculations. The pioneering works of Murray and Politzer,²²⁻²⁵ pointed out the interest of molecular electrostatic potential descriptors for the prediction and analyses of the interaction sites of organic molecules. Since that, it has been consistently demonstrated that non-covalent molecular interaction properties, in particular hydrogen-bond properties, and electrostatic potential based descriptors are well correlated, owing to the main electrostatic character of the hydrogen-bond interaction.^{10, 26-29} In the present work, we have analyzed both the absolute minimum values of the electrostatic potential, V_{\min} , located on each hydrogen-bond acceptor site, and the maximum values computed on the molecular surface ($V_{s,\max}$) to investigate these properties. Indeed, many studies have recommended the use of V_{\min} instead of the electrostatic potential computed on the molecular surface ($V_{s,\min}$) for investigations dedicated to hydrogen bond basicity properties²⁹⁻³⁴ but, in the present study, the consideration of the values computed on the molecular surfaces allow to discuss the halogen-bond donating potential of the four insecticides. The calculation of these various molecular electrostatic potential based descriptors has been carried out using the HS95 program.^{35, 36}

2.2 Toxicological effect against *A. pisum* and *M. persicae*

Insects. The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, strain LSR1 was generously provided by INRA-Rennes IGEPP. The peach aphid, *Myzus persicae*, strain 4106A sensitive to neonicotinoids and 1300145 strain, resistant to neonicotinoids with R81T mutation in Mp β 1 subunit, were first provided by Dr. Diana Cox (Rothamsted) to ANSES-Lyon. Unwinged parthenogenetics females were reared on

fabia bean (*Vicia fabae*) and cabbage (*Brassica rapa*) plants for *A. pisum* and *M. persicae* respectively, in a 16L : 8D photoperiod at constant temperature of 22°C in a climate chamber. Under these conditions, aphids reproduce by viviparous parthenogenesis, as clonal female : new born larvae become adults after four molts.

Insecticides. ACE, CHL, DEL and FIP were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Insecticides were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) to give a final concentration of 50mg.ml⁻¹. For intoxication experiments, insecticides were dissolved in artificial die tat a final concentration of 0.2% DMSO for 100µg/ml and 2% DMSO for 1000µg/ml. These concentrations of DMSO were used as controls in insecticidal assays.

Insecticidal assays. The susceptibility of *A. pisum* and *M. persicae* to ACE, CHL, DEL and FIP was determined using artificial diet bioassays as described in Taillebois et al. (Taillebois et al., 2014). First-instar nymphs were put on artificial diet system with insecticide added (treatment series) or DMSO added (control series). For each insecticide, eight to eleven concentrations ranging from 0.0001 to 1000 µg/ml were tested. Corrected mortality percentages were calculated using Henderson Tilton's formula after 24h and 48h of insecticide exposure. The LC₅₀ (letal concentration 50%) was graphically determined for each insecticide and strain. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) with non linear regression analysis and t-test (p<0.05 ; t-test with Welch's correction).

3. Results and Discussion

3.1 Quantum chemistry calculations.

In this part of the manuscript, the conformational features of the four insecticides obtained through the DFT calculations are presented and analyzed in the light of the experimental data available. A qualitative discussion on their respective hydrogen-bond and halogen-bond properties from theoretical descriptors based on molecular electrostatic potential calculations is then carried out.

3.1.1 Conformational analysis

Acetamiprid (ACE). We have already investigated in details the structural features of this neonicotinoid at the DFT level with the MPWB1K functional.¹⁰ Since the recent meta-hybrid M06-2X functional is now recommended for applications involving kinetic properties and non-covalent interactions,¹⁸ we have re-examined the structural properties of ACE at this level of theory and completed the previous results by theoretical data obtained taking into account the influence of water. In the case of ACE (Figure 1), three dihedral angles have been identified as degrees of freedom: D1(C10-C6-C5-N2); D2(C6-C5-N2-C2) and D3(C5-N2-C2-N1). Each of them has been explored successively, leading to a total of sixteen energetic minima which were reduced to ten after full geometry optimizations. The high flexible character of ACE is reflected through the distribution of these conformers within a narrow energetic range of 6 kJ/mol. The dihedral angles of these final structures are reported in Table 1. In fact, it can be seen from Table 1 that the ten conformers can be assembled in two series that are symmetry related owing to the presence of the C5 prochiral atom of the methylene group (for example, ACE-1, with respective values of D1, D2 and D3 of -109, -100 and 5 is symmetry related to ACE-1' with 109, 100 and -5). Indeed, these structures, which have the same

physicochemical properties, can be interconverted by rotation around the corresponding single bonds. For these reasons, we don't have considered ten but five conformers in Table 2, which gathers the Boltzmann populations computed in the isolated state and in the water SMD model for the various minima, the degeneracy of each conformer being taken into account in the relative populations (for example, the ACE-I minimum accounts for a total of 62.8 % instead of being characterized by two equivalent, symmetry related structures with respective populations of 31.4 % each). The corresponding structures are shown on Figure 2.

Table 2 shows that the ACE-1 main minimum accounting for about 63% of the total population in the gas phase, has a conformation very similar to the experimental crystal structure (respective values of D1, D2 and D3 of +117, +102 and -5°).³⁷ However, the conformational features of ACE are strongly dependent of the chemical surroundings since in water, the conformational preferences are more distributed among the five conformers, ACE-5 becoming the most populated (about 45%). The superimposition (considering seven atomic pairs defined by the pyridinic ring and the prochiral methylene carbon atom) of these five conformations on the crystalline structure observed in the CSD is shown in Figure 3, illustrating the wide angular range covered by the various possible energetic minima.

These trends reinforce the ones pointed out at the MPWB1K/6-31+G(d,p) level and confirm the flexible character of ACE. They also suggest the need of the consideration of surrounding effects for an accurate description of the behavior of neonicotinoid ligands.

Chlorpyrifos (CHL). To our knowledge, no theoretical study devoted to the investigation of the molecular properties of this organophosphate with quantum chemistry methods is available in the literature. Nevertheless, QSAR studies involving quantum chemistry descriptors have been published for organophosphate binding to chymotrypsine and trypsin, the case of CHL being considered, but

this study was limited to the semiempirical level.³⁸ Four dihedral angles of chlorpyrifos (CHL, Figure 1) have been explored starting from the crystal structure (CPYRIF)³⁹ optimized at the M06-2X/6-311(d) level. These dihedral angles, describing the rotation around the C2-O7, O7-P8, P8-O10 and P8-O13 single bonds (see Figure 1 for the numbering of the atoms) correspond to the followings: D1(N1-C2-O7-P8); D2(C2-O7-P8-S9); D3(S9-P8-O13-C13) and D4(S9-P8-O10-C11). The potential energy profiles obtained by the relaxed scans carried out around each dihedral angle led to two or three minima. These data have been used to build 24 conformers corresponding to the various possible combinations. The following geometry optimizations have finally led to a set of 16 minima located on a 20 kJ/mol range on a free energy scale. In fact, owing to the prochirality of the phosphorus atom, several minima among those turned out to be equivalent, the final number of different conformations being of ten. The structural features of these resulting 10 conformers are collected in Table 3 together with the ones of the experimental structure observed in the crystalline state.

The relative population of these various conformations computed from the Gibbs energies according to a Boltzmann distribution in the gas phase and water are gathered in Table 4. In fact, from these calculations it turns out that the four first conformers represent around 99% of the total population in the gas phase, the absolute minimum, corresponding to the optimized experimental geometry observed in the CSD, being characterized by a population of about 80%. These minima are showed on Figure 4, their superimposition (considering seven atomic pairs defined by the pyridinic ring and the O7 oxygen atom) on the CPYRIF CSD crystal structure being shown Figure 5. These Figures illustrate in particular the preference of orientation of the thiophosphate group, since in the experimental structure and in three of the four minima, the PS bond is oriented similarly. Table 4 shows that after **CHL-1**, among the three remaining conformations (**CHL-2** to **CHL-4**) the two first are clearly preferred in the gas phase, accounting for about 17% of the total population.

The effect of water is significant since the distribution of the populations (Table 4) is quite different. Thus, if the optimized experimental structure is still the main conformer in water, with a

population of 54%, the **CHL-3** conformer becomes important (28%), the remaining two, **CHL-2** and **CHL-4**, representing 8.8 and 8.6% of the total population.

Deltamethrin (DEL). Starting from the optimized geometry of the crystalline structure of deltamethrin (CSD refcode: PXBVCP10),⁴⁰ a first series of simultaneous double scans was carried out with steps of 60° around six torsional angles. The dihedral angles are defined according to the following (see Figure 1 for the numbering of deltamethrin) D1: C1-C2-C3-C4; D2: C3-C4-C8-O10; D3: C4-C8-O10-C11; D4: C8-O10-C11-C14; D5: O10-C11-C14-C15; D6: C14-C15-O20-C21 and D7: C16-O20-C21-C22. The first double scans were realized around the following dihedral angles (Scan1: D1-D2, Scan2: D2-D4, Scan3: D4-D5, Scan4: D6-D7). Considering the higher probability to find the ester group with the two substituents in an *anti*-conformation,⁴¹ the D3 torsional angle was not scanned. These relaxed scans were carried out at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. The dihedral angles leading to the most stable conformations on these four potential energy surfaces were then selected to generate 128 conformations. They have then been optimized at the M06-2X/6-311G(d) level of theory in the gas phase, leading to 45 final conformations, ranging over around 20 kJ mol⁻¹ on the free energy scale. The dihedral angles of the 14 conformers having a relative population higher than 0.9% in the gas phase are collected in Table 5. The numerous degrees of freedom of deltamethrin lead to conformers spanning an important angular range. However, in the gas phase, the first three conformers (**DEL-1** to **DEL-3**) account for nearly 50% of the total population, the next four ones (**DEL-4** to **DEL-7**) having populations between 5 and 9%. The structures of the four main gas phase conformers are illustrated on Figure 6, their superimposition (considering five atomic pairs defined by the cyclopropyl ring, the ester carbon and the vinyl carbon) being shown in Figure 7. The strong dependence of the DEL conformation with its surroundings, in line with its flexible character, is illustrated in Table 6. Indeed, from the gas phase to water, the population distribution is significantly modified, four conformers being more stabilized than the gas phase absolute minimum. Thus, the

geometry of deltamethrin optimized from the crystalline structure corresponds to the third secondary minimum in the gas phase and represents a population of 9%, whereas it is only the tenth secondary minimum in water with a population of 3%. It is also worth noticing that the last populated conformer (0.9%) in the gas phase becomes significantly populated (13.3%) in water. Docking studies of pyrethroid (including deltamethrin) and DDT to the housefly (*M. domestica*) Na channel have shown that deltamethrin has an extended conformation in the receptor binding site, allowing binding contacts to key residues along the length of the binding pocket.⁴² These results are in agreement with the flexible character of deltamethrin and the strong influence of surroundings effects on its molecular structure. The results obtained in the present study should allow a better understanding of the conformational preferences observed in the receptor environment.

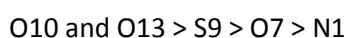
3.1.2 Molecular electrostatic potential based descriptors

The V_{\min} values computed for ACE and reported in Table 7 show that the best hydrogen-bond acceptor site of this neonicotinoid is the nitrile nitrogen (N3). The variation of these properties according to the conformation can be significant (from 2 to 8 kJ/mol for N3 and from 8 to 28 kJ/mol for N4) but the nitrile nitrogen is always preferred with respect to the pyridine nitrogen, the difference between the two sites being of about 60 kJ/mol. This result is in agreement with the importance of electron delocalization characteristic of the push-pull fragment of neonicotinoids that we have pointed out in a recent study and the expected increase of electron density (and consequently of hydrogen-bond basicity) of the pulling group.¹⁰ This preference of the nitrile nitrogen with respect to the pyridinic nitrogen is also in line with the decrease of electron density of the Nsp² atom induced by the electronwithdrawing effect of the chlorine atom.

The examination of the $V_{s,\max}$ values computed on the chlorine atom allows pointing out the halogen-bond donating potential of this site along the so called σ -hole. This behavior has indeed

been suggested by recent theoretical studies in the case of neonicotinoids^{11, 43} and reviewed in protein-halocarbon complexes through careful surveys of PDB crystallographic data.^{44, 45}

The results obtained in the case of CHL are gathered in Table 8. The examination of the results obtained for the two first conformers (**CHL-1** and **CHL-2**) first show that the best hydrogen-bond acceptor sites are the ether oxygen atoms (O10 and O13). It clearly appears from these data that O7 behaves differently, being characterized in most of the conformations by a significantly lower value (from 60 to 90 kJ/mol). This trend is consistent with the fact that this oxygen is linked to the aromatic ring, its lone pairs being partially conjugated with the π orbitals of the ring, and therefore less available for non-covalent interactions. The O10 and O13 oxygen atoms are then followed by the sulphur atom, which appears a significant hydrogen-bond acceptor site, the difference of the $V_{s,min}$ values computed on the sulphur atom compared to O10 and O13 ranging from 40 to 50 kJ/mol. The least hydrogen-bond acceptor is therefore the Nsp^2 pyridine nitrogen. This position is in agreement with the previous results obtained for acetamiprid, the three chlorine atoms on the pyridine ring inducing a pronounced decrease of electron density on the Nsp^2 nitrogen. This lowering amounts from 190 to 210 kJ/mol depending on the conformation considered, and leads as a consequence to a decrease of hydrogen-bond basicity. The order of hydrogen-bond basicity obtained through this analysis is therefore:



The two other conformers do not follow this sequence. Thus, for **CHL-3**, the position between S9 and O7 is reversed, O13 showing a value about 20 kJ/mol weaker than the one computed for O10, for which the O7 oxygen atom shows a value (-82.4 kJ/mol) greater than the one computed for S9 (-104.6 kJ/mol) and comparable to the one of O10 (-115.5 kJ/mol), the corresponding value for O13 being unexpectedly lower (-82 kJ/mol). This behavior might be explained by the fact that in this conformation, the lone pairs of O7 and O13 are in close proximity, the distance between the absolute minima being of 1.55 Å, the resulting repulsive effect inducing this rearrangement of the

electron distribution. Such effect illustrates the dependence of these properties on the molecular conformation. The same analysis realised on the basis of the V_{\min} values leads to the same conclusions. Lastly, the $V_{s,\max}$ values throws light on the halogen-bond donating potential of the chlorine atoms carried by the pyridinic ring. Compared to the values computed for acetamiprid, the ones calculated for the chlorine atoms carried by C5 and C6 carbon atoms are significantly greater (from 25 to 50 kJ/mol). We attribute this increase to the spatial proximity between the two chlorine atoms, the resulting electron redistribution inducing an increase of the halogen-bond potential of these halogens along the σ -hole. The value computed for the third chlorine atom, carried by the C3 atom, is close (around 60 kJ/mol) to the one computed for the chlorine atom of acetamiprid (varying from 54 to 80 kJ/mol) and confirms therefore this interpretation.

Table 9 shows the results obtained for deltamethrin. Consistently with the results obtained for acetamiprid, the nitrile nitrogen is, whatever the considered geometries, the site showing the most negative $V_{s,\min}$ value, this value being not very dependent on the conformation. It is worth noticing that it appears however much weaker than the corresponding value for the nitrile nitrogen of acetamiprid, (difference of about 55 to 70 kJ/mol depending on the conformations considered), an evolution highlighting the difference between an aliphatic nitrile, such as in deltamethrin, and a push-pull nitrile, such as in acetamiprid, and the increase of electron density due to electron delocalization in the latter. Similarly, the aromatic oxygen ether shows the less negative $V_{s,\min}$ value just slightly dependent of the conformation. On the contrary, the carbonyl group shows very different $V_{s,\min}$ values upon the considered geometry, which can be almost as negative as the nitrile site in a few conformations or less negative than the oxygen ether in a few others. Hence, the main site of interaction towards an electrophilic moiety seems to be the nitrile group, followed by the carbonyl group and the oxygen ether group. On the other hand, the $V_{s,\max}$ values throw light on the halogen-bond donating potential of the ligand through its bromine atoms. It is worth noticing that the values computed for two bromine atoms are greater to the ones computed for the chlorine atoms of acetamiprid and chlorpyrifos (the one carried by the C3 carbon atom). This order is in

agreement with the better halogen-bond donating power of bromine compared to chlorine.⁴⁶ However, this is not true if this comparison is made with respect to the chlorine atoms carried by the C5 and C6 atoms of chlorpyrifos, which show significantly greater values (of about 30 kJ/mol). This behavior reflects the effect of the position of substitution on the physicochemical properties of the halogen atoms. Indeed, if the two halogen atoms are in geminal position, as in deltamethrin, they “deactivate” each other, still keeping a significant but weak halogen-bond donor potential, whereas a substitution on two adjacent carbon atoms as in chlorpyrifos leads finally to an increase of their halogen-bond donor power. Finally, the examination of the $V_{s,max}$ values for the two bromine atoms shows significant differences, the bromine atom in Z position towards the cyclopropyl ring appearing to have quasi systematically the highest value suggesting a strongest halogen-bond ability towards an electron-rich moiety.

4 Toxicological effects against the first-instar aphid larvae

A. pisum LSR1. The effects of three neonicotinoids, imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin were recently studied against *A. pisum* larvae (Taillebois et al., 2014). Using the same method, we found that the four insecticides ACE, CHL, DEL and FIP have different toxicities against *A. pisum* larvae. Results are presented in figure 8 as the mean of six to eight experiments. Toxicological profiles are classical sigmoidal curves ranging between 0 and 100% of mortality except for ACE. Indeed, the maximal mortality observed with ACE at 24 h was about 33% between 10 and 1000 µg/ml. LC_{50} values were used to compare insecticide toxicities (Table 10). After 24 h of exposure, we found that FIP was the more toxic ($LC_{50} = 6.529$ µg/ml) and ACE was the less toxic ($LC_{50} > 1000$ µg/ml). The toxicities of CHL and DEL were intermediate ($LC_{50} = 199$ and 59.17 µg/ml respectively).

The LC_{50} values were significantly lower after 48 h of exposure. Interestingly, ACE was the most toxic ($LC_{50} = 0.068 \mu\text{g/ml}$) and CHL the less toxic ($LC_{50} = 88.36 \mu\text{g/ml}$) whereas DEL and FIP toxicities were intermediate ($LC_{50} = 15.26$ and $0.197 \mu\text{g/ml}$ respectively).

M. persicae. Insecticidal toxicity was evaluated with two *M. persicae* 4106A and 1300145 strains. Results are presented in figure 9 as the mean of six to eight experiments. Using *M. persicae* 4106A strain, we found that, at 24 h ACE was the most toxic ($LC_{50} = 0.085 \mu\text{g/ml}$, Table 11) and CHL the less toxic ($LC_{50} = 46.05 \mu\text{g/ml}$). Toxicities of FIP and DEL were 17.01 and 17.86, respectively. Nevertheless, the LC_{50} values were significantly lower at 48 h only for ACE ($LC_{50} = 0.053 \mu\text{g/ml}$) and FIP ($LC_{50} = 1.31 \mu\text{g/ml}$). For the resistant strain 1300145, we found that FIP was the most toxic ($LC_{50} = 91.42 \mu\text{g/ml}$) and ACE the less toxic ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$), at 24 h. The toxicities of CHL and DEL were intermediate with LC_{50} of 241.9 and 794 $\mu\text{g/ml}$ respectively. At 48 h, LC_{50} values were significantly lower for ACE ($LC_{50} = 5.035 \mu\text{g/ml}$) and FIP ($LC_{50} = 11.57 \mu\text{g/ml}$). Thus, ACE was the most toxic and DEL the less toxic ($LC_{50} = 11.57 \mu\text{g/ml}$) whereas toxicities of FIP and CHL ($LC_{50} = 181.4 \mu\text{g/ml}$) were lower. Resistance factors (RF) were calculated at 48 h and demonstrated a significant resistance of *M. persicae* 1300145 strain for ACE (RF = 95) and DEL (RF = 35) and less resistance to CHL (RF = 6) and FIP (RF = 9) compared to sensitive *M. persicae* 4106 strain..

5 Conclusions

New structural and toxicological data on four important insecticides (ACE, CHL and DEL) belonging to different chemical classes (respectively neonicotinoid, organophosphate and pyrethroid) have been obtained. These compounds are highly flexible, the key conformers being located in a narrow energetic range of about 8 kJ/mol. Acetamiprid and chlorpyrifos present respectively five and four low energy conformers, located in a 6 kJ/mol energetic range. Deltamethrin, characterized by an important number of degrees of freedom appears, as expected, as the most flexible, with fourteen minima not separated by more than 8 kJ/mol. Molecular electrostatic potential calculations provided a qualitative ranking of the molecular interaction potential of the fragments constituting the four insecticides. The nitrile nitrogen of acetamiprid and deltamethrin are the sites showing the greater electron density, a feature that explains their hydrogen-bond propensity. The nitrile nitrogen appears as the best interaction site of the two compounds owing to its incorporation in a push-pull fragment.

Interestingly, using both aphid *A. pisum* and *M. Persicae*, we demonstrated that part of the chemical analyses performed in the present study is in accordance with toxicological observations. In comparison to chemical analyses, we also highlight a difference in insecticide toxicities using both the same method and strains. For *A. pisum* LSR1 and *M. persicae* 4106A strains, we find the same toxicity order: ACE > FIP > DEL > CHL after 48 h of exposure. LC₅₀ values demonstrate that 4106A strain is more sensitive to ACE, CHL and DEL, excepted for FIP which is more active against *A. pisum* LSR1 strain. The insecticides toxicity order is different for the resistant *M. Persicae* 1300145 strain: ACE > FIP > CHL > DEL but LC₅₀ values showed that this strain is less sensitive to all tested pesticides. Although there is no simple relationship between the measured chemical activity and toxicity of the four pesticides against aphids *A. pisum* and *M. Persicae*, ACE appears more active against all strains. This effect could be due to the specific chemical structure of neonicotinoids. The present data give

critical information for further lead optimization efforts to investigate the effects of pesticides against insect pests.

Acknowledgements.

Authors acknowledge the Région des Pays de la Loire for financial support in the framework of the ECRIN “Paris Scientifiques” Grant. Sylvie Tanguy, Sylvie Hudaverdian and Joël Bonhomme (IGEPP INRA Rennes) are greatly acknowledged for their help in setting up *A. pisum* rearing. We are grateful to Guillaume Pregnon and Paul Langlois for their help on toxicological experiments.

Legends to the figures and tables

Figure 1. Chemical structures and numbering of acetamiprid (**ACE**), chlorpyrifos (**CHL**), deltamethrin (**DEL**) and fipronil (**FIP**).

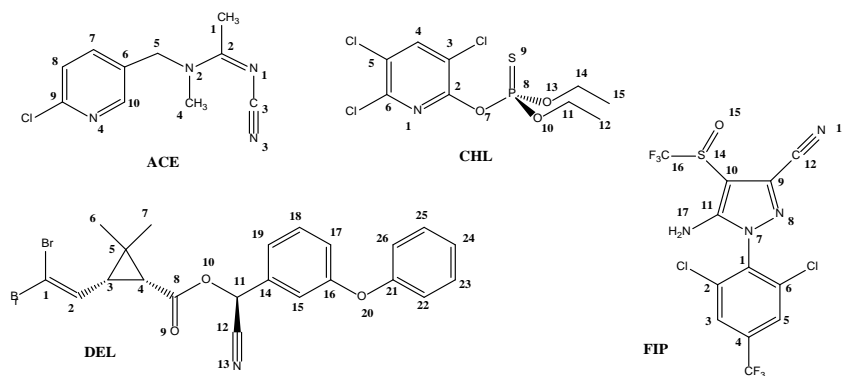


Figure 2. Structures of the main minima of acetamiprid (ACE-1 to ACE-5) obtained in the gas phase.

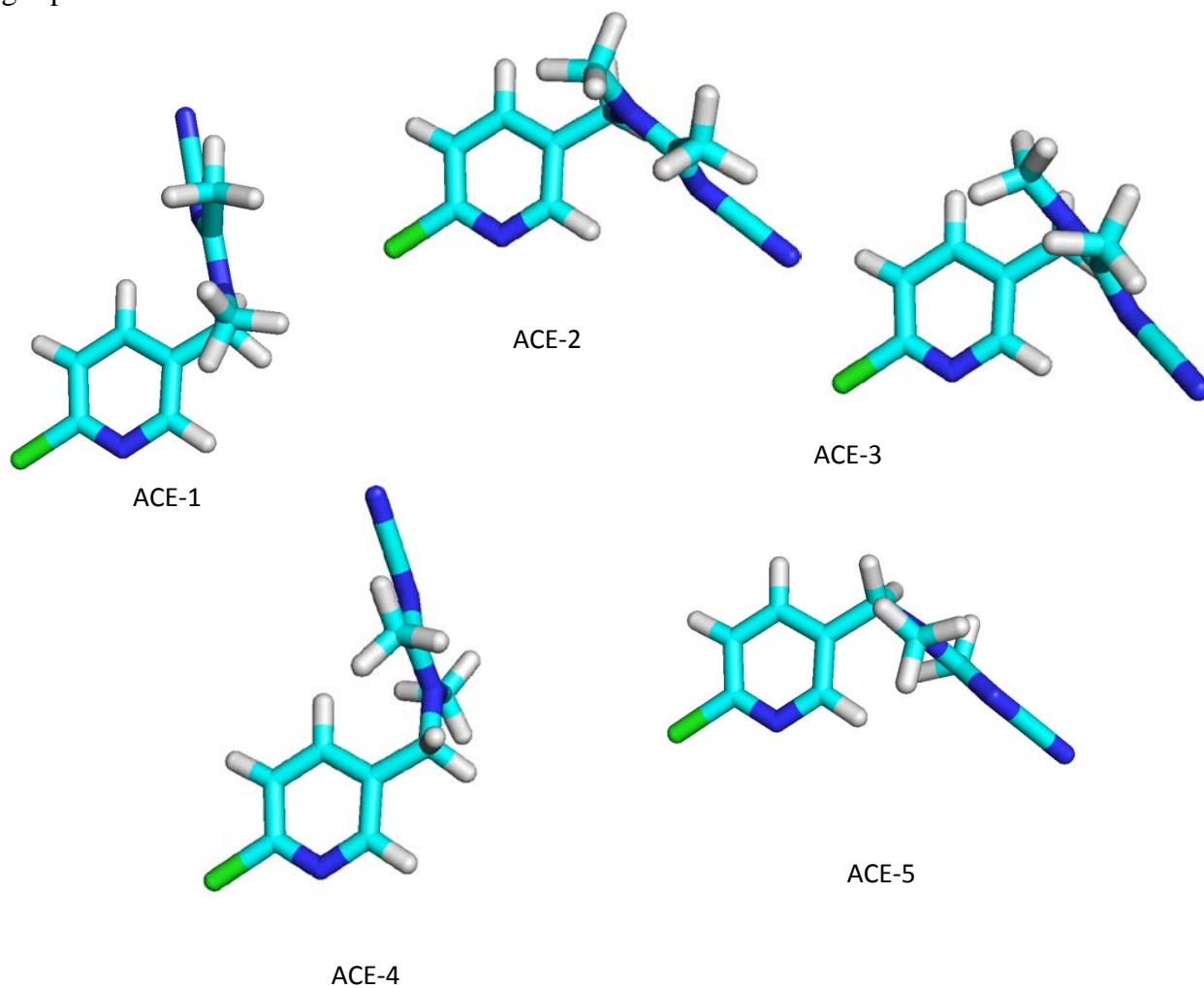


Figure 3. Overlays of the five minima of acetamiprid (considering seven atomic pairs, see text) on the HANBAA CSD crystal structure, showing the different orientations of the nitrile fragment.

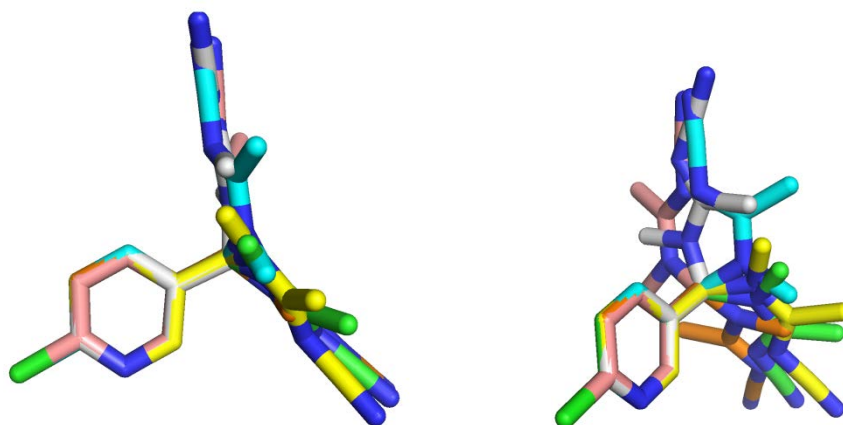
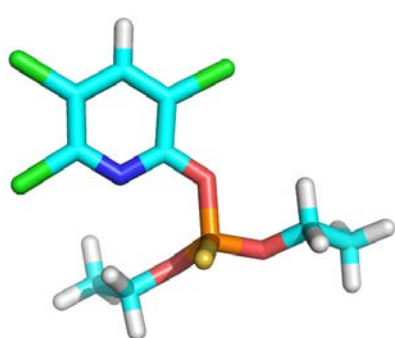
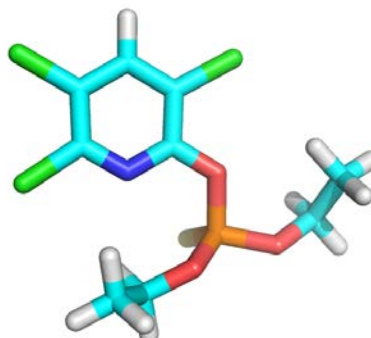


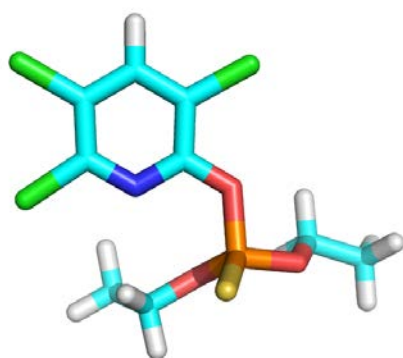
Figure 4. Structures of the main minima of chlorpyrifos (CHL-1 to CHL-4) obtained in the gas phase.



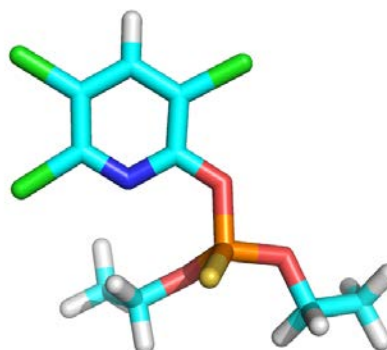
CHL-1



CHL-2



CHL-3



CHL-4

Figure 5. Overlays of the four minima of chlorpyrifos (considering seven atomic pairs, see text) on the CPYRIF CSD crystal structure, showing the different orientations of the thiophosphate group.

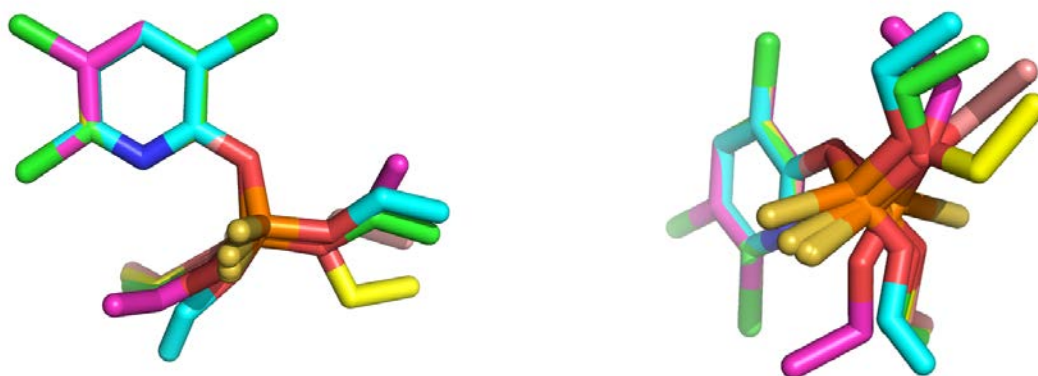


Figure 6. Structures of the main minima of deltamethrine (DEL-1 to DEL-4) obtained in the gas phase.

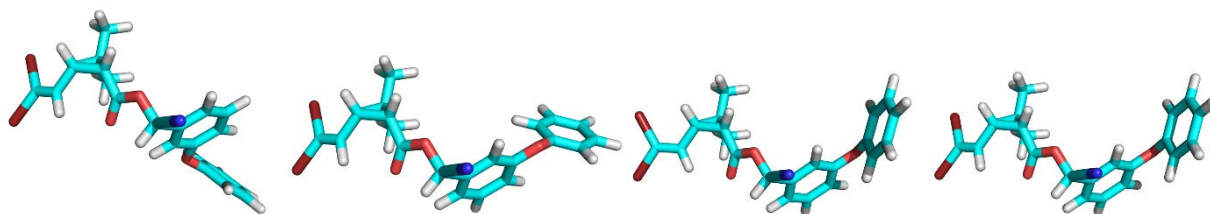


Figure 7. Overlays of the four minima of deltamethrin (considering five atomic pairs, see text), showing the different orientations of the diphenyl ether group.

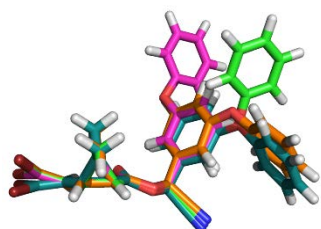


Figure 8. Toxicity of acetamiprid (ACE), deltamethrin (DEL), chlorpyrifos (CHL) and fipronil (FIP) on pea aphid *A.pisum* larvae. Toxicity curves after 24 h and 48 h of exposure were determined for A) ACE B) DEL C) CHL D) FIP. Results were corrected using Henderson-Tilton's formula.

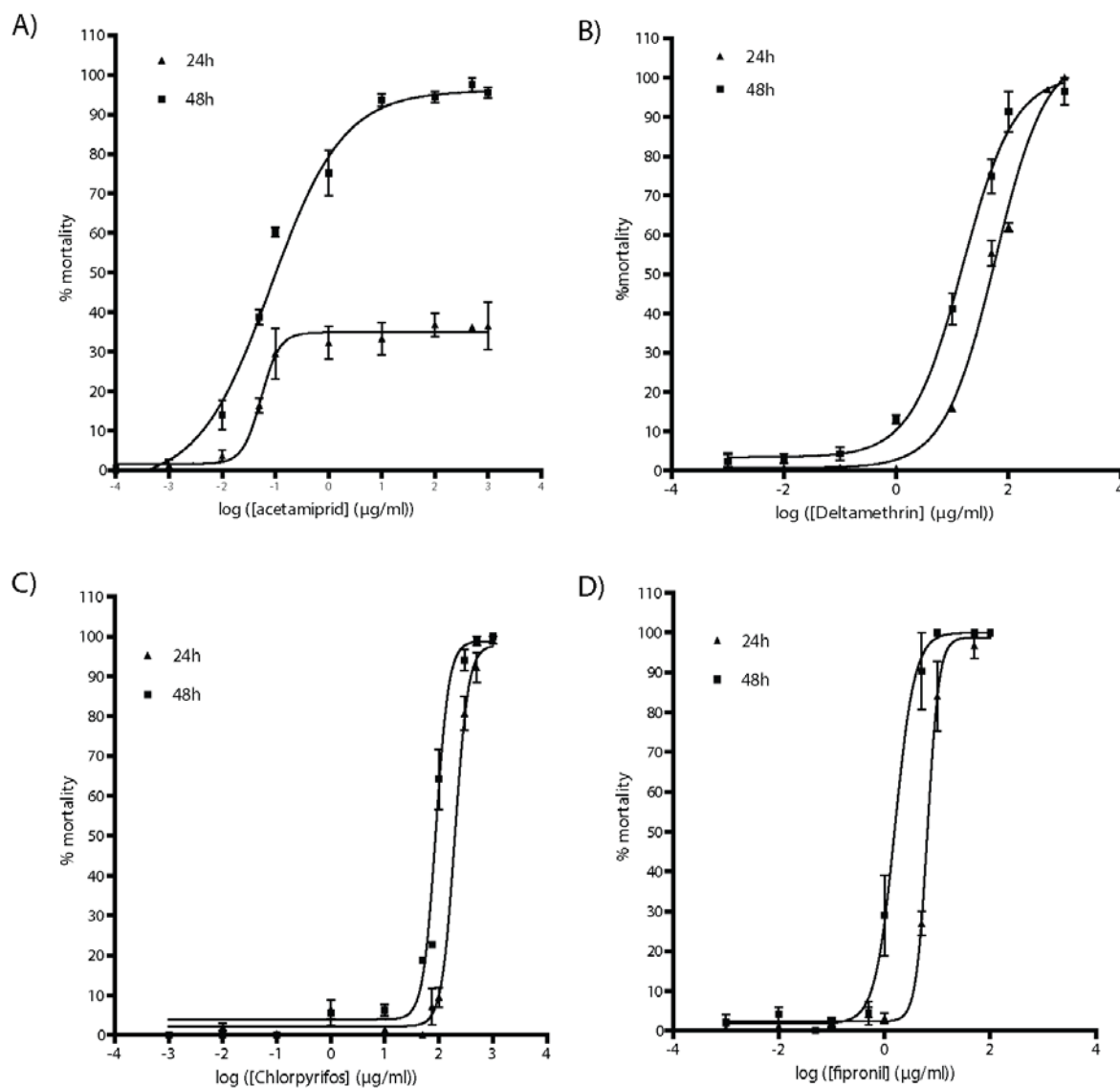
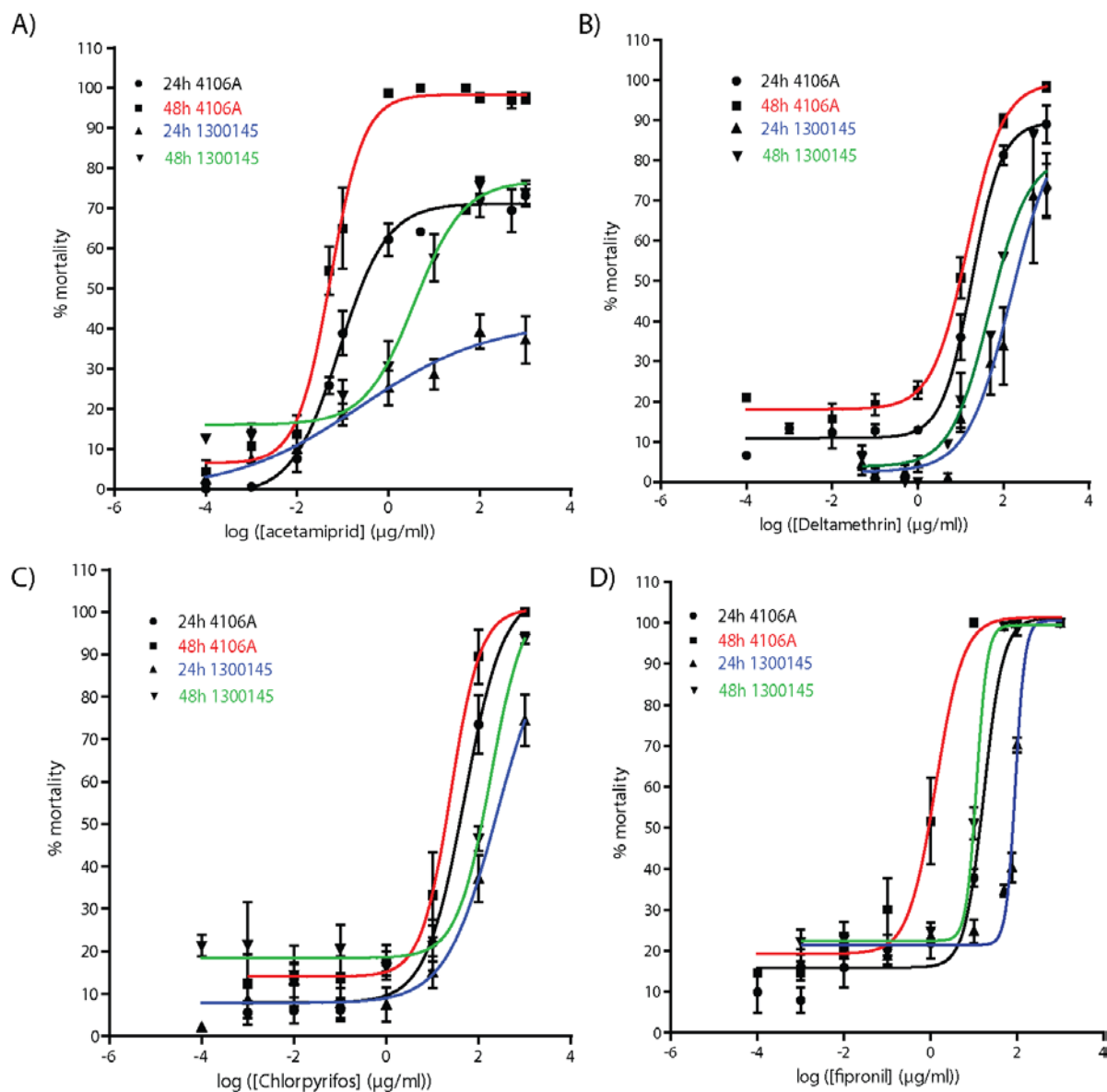


Figure 9. Toxicity of acetamiprid (ACE), deltamethrin (DEL), chlorpyrifos (CHL) and fipronil (FIP) on peach aphid *M. persicae* larvae from susceptible (4106A) and resistant (1300145) strains. Toxicity curves after 24 h and 48 h of exposure were determined for A) ACE B) DEL C) CHL D) FIP. Results were corrected using Henderson-Tilton's formula.



References

1. Sanchez-Bayo, F.; Goka, K. *PloS one* **2014**, *9*, e94482.
2. Sharma, D.; Nagpal, A.; Pakade, Y. B.; Katnoria, J. K. *Talanta* **2010**, *82*, 1077.
3. Bradberry, S. M.; Cage, S. A.; Proudfoot, A. T.; Vale, J. A. *Toxicological reviews* **2005**, *24*, 93.
4. Soderlund, D. M. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 165.
5. Gunasekara, A. S.; Truong, T.; Goh, K. S.; Spurlock, F.; Tjeerdema, R. S. *Journal of Pesticide Science* **2007**, *32*, 189.
6. Hua, J.; Relyea, R. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2014**, *189*, 18.
7. Chen, C.; Wang, Y. H.; Zhao, X. P.; Wang, Q.; Qian, Y. Z. *Ecotoxicology* **2014**, *23*, 221.
8. Chen, C.; Wang, Y. H.; Zhao, X. P.; Wang, Q.; Qian, Y. Z. *Chemosphere* **2014**, *100*, 111.
9. Jeschke, P.; Nauen, R.; Schindler, M.; Elbert, A. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2897.
10. Le Questel, J.-Y.; Graton, J.; Ceron-Carrasco, J. P.; Jacquemin, D.; Planchat, A.; Thany, S. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7623.
11. Ceron-Carrasco, J. P.; Jacquemin, D.; Graton, J.; Thany, S.; Le Questel, J.-Y. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3944.
12. Kagabu, S.; Akagi, T. *Journal of Pesticide Science* **1997**, *22*, 84.
13. Wang, Y. L.; Cheng, J. G.; Qian, X. H.; Li, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2624.
14. Tomizawa, M.; Kagabu, S.; Casida, J. E. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2918.
15. Tomizawa, M.; Casida, J. E. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 260.
16. Matsuda, K.; Kanaoka, S.; Akamatsu, M.; Sattelle, D. B. *Mol. Pharmacol. FIELD Full Journal Title:Molecular Pharmacology* **2009**, *76*, 1.
17. Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.;

Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.

18. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theoretical Chemistry Accounts* **2008**, *120*, 215.
19. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 157.
20. Allen, F. H. *Acta Cryst.* **2002**, *B58*, 380.
21. Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378.
22. Murray, J. S.; Politzer, P. *J. Chem. Res., Synop.* **1992**, *3*, 110.
23. Hagelin, H.; Murray, J. S.; Brinck, T.; Berthelot, M.; Politzer, P. *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 483.
24. Murray, J. S.; Politzer, P. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6715.
25. Murray, J. S.; Brinck, T.; Grice, M. E.; Politzer, P. *THEOCHEM* **1992**, *88*, 29.
26. Locati, A.; Berthelot, M.; Evain, M.; Lebreton, J.; Le Questel, J.-Y.; Mathe-Allainmat, M.; Planchat, A.; Renault, E.; Graton, J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6397.
27. Besseau, F.; Graton, J.; Michel, B. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10656.
28. Arnaud, V.; Berthelot, M.; Felpin, F.-X.; Lebreton, J.; Le Questel, J.-Y.; Graton, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4939.
29. Atkinson, A. P.; Baguet, E.; Galland, N.; Le Questel, J.-Y.; Planchat, A.; Graton, J. *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 11637.
30. Murray, J. S.; Ranganathan, S.; Politzer, P. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3734.
31. Murray, J. S.; Peralta-Inga, Z.; Politzer, P.; Ekanayake, K.; Lebreton, P. *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, *83*, 245.
32. Kenny, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 199.
33. Kenny, P. W. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1234.

34. Devereux, M.; Popelier, P. L. A.; McLay, I. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1595.
35. Brinck, T. J. *Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3408.
36. Brinck, T. *Theor. Comput. Chem.* **1998**, *5*, 51.
37. Chopra, D.; Mohan, T. P.; Rao, K. S.; Row, T. N. G. *Acta Cryst.* **2004**, *E60*, O2374.
38. Ruark, C. D.; Hack, C. E.; Robinson, P. J.; Gearhart, J. M. *J. Toxicol. Env. Health Part A* **2011**, *74*, 1.
39. Baughman, R. G.; Jorgensen, S. K.; Jacobson, R. A. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 576.
40. Owen, J. D. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1975**, 1865.
41. Lommerse, J. P. M.; Price, S. L.; Taylor, R. J. *Comput. Chem.* **1997**, *18*, 757.
42. Usherwood, P. N. R.; Davies, T. G. E.; Mellor, I. R.; O'Reilly, A. O.; Peng, F.; Vais, H.; Khambay, B. P. S.; Field, L. M.; Williamson, M. S. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5485.
43. Duan, H.; Zhang, W.; Zhao, J.; Liang, D.; Yang, X.; Jin, S. *Journal of Molecular Modeling* **2012**, *18*, 3867.
44. Parisini, E.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2267.
45. Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J.; Plancher, J.-M.; Hartmann, G.; Banner, D. W.; Haap, W.; Diederich, F. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 314.
46. Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363.

Table 1. Dihedral angles (°) of the ten most stable conformations of Acetamiprid (ACE) found in the gas phase by the conformational analyses at the M06-2X/6-311G(d) level.

Conformer	D1	D2	D3
HANBAA ^a	+117	+102	-4
ACE-1	-109	-100	+5
ACE-1'	+109	+100	-5
ACE-2	-64	-105	-6
ACE-2'	+64	+105	+6
ACE-3	+83	-93	-5
ACE-3'	-83	+93	+5
ACE-4	-159	-89	+167
ACE-4'	+159	+89	-167
ACE-5	+14	-91	+173
ACE-5'	-14	+91	-173

^a Reference of the crystalline structure deposited in the Cambridge Structural database.

Table 2. Relative Gibbs energy values and populations of the most stable conformations of Acetamiprid (ACE) in the gas phase and in the water SMD continuum model.

Conformer	Gas-phase		Water solvated	
	ΔG° ^a	p_i (%)	ΔG° ^a	p_i (%)
ACE-1	0.00	62.8	3.56	10.8
ACE-2	3.73	14.0	6.84	2.8
ACE-3	4.72	9.4	2.87	14.2
ACE-4	5.20	7.7	1.26	27.2
ACE-5	5.78	6.1	0.00	45.2

^a kJ mol⁻¹

Table 3. Dihedral angles (°) of the ten most stable conformations of Chlorpyrifos (CHL) found in the gas phase by the conformational analyses at the M06-2X/6-311G(d) level.

Conformer	D1 (°)	D2(°)	D3(°)	D4(°)
CPYRIF^a	-36.8	-52.2	5.8	-47.6
CHL-1	-20.3	-63.3	16.3	-54.9
CHL-2	21.2	62.5	57.2	-15.9
CHL-3	-13.2	-67.4	19.7	55.3
CHL-4	-11.3	-67.5	15.7	-179.6
CHL-5	-67.4	-52.3	171	-50.3
CHL-6	-78.8	176.2	-56.7	-51.9
CHL-7	80.9	178.2	55.8	-17.6
CHL-8	83	167.7	40.5	37.7
CHL-9	-30.6	-161.6	37	39.8
CHL-10	-8	-178.1	-62.7	19.7

^a Reference of the crystalline structure deposited in the Cambridge Structural database.

Table 4. Relative Gibbs energy values and populations of the most stable conformations of chlorpyrifos in the gas phase and in the water SMD continuum model.

Conformer	Gas phase		Water	
	ΔG^\bullet ^a	P_i (%)	ΔG^\bullet ^a	P_i (%)
CHL-1	0.00	79.8	0.00	54.4
CHL-2	2.86	8.4	1.80	8.8
CHL-3	4.65	8.1	0.63	28.1
CHL-4	5.71	2.7	1.85	8.6

^a kJ mol⁻¹

Table 5. Dihedral angles (°) of the ten most stable conformations of deltamethrin (DEL) found in the gas phase by the conformational analyses at the M06-2X/6-311G(d) level.

Conformer	D1	D2	D4	D5	D6	D7
PXBVCP10^a	-89.6	40.3	104.7	-106.8	-135.8	19.3
DEL-1	-83.2	20.4	83.3	74.6	24.2	51.2
DEL-2	-114.5	27.3	83.7	74.3	24.2	50.7
DEL-3	-83.9	21.8	85.5	78.4	-157.3	54.9
DEL-4	-84.3	22.2	86.0	-98.2	-154.6	52.4
DEL-5	-84.1	27.0	160.3	-51.3	-153.4	51.2
DEL-6	-83.8	21.3	84.5	76.8	-151.7	48.9
DEL-7	-83.9	27.0	161.4	70.7	-153.7	51.7
DEL-8	-101.2	37.6	-63.2	-30.7	16.0	79.5
DEL-9	-83.2	26.8	159.9	132.0	-157.0	56.2
DEL-10	-79.4	-3.3	85.4	-90.1	23.2	72.2
DEL-11	-83.7	18.2	95.7	-29.4	-43.1	-34.0
DEL-12	-82.2	16.4	101.1	-47.4	51.0	35.1
DEL-13	-121.0	30.4	-67.5	-68.0	-152.6	50.5
DEL-14	139.0	-143.2	155.9	42.3	-17.2	99.8

^a Reference of the crystalline structure deposited in the Cambridge Structural database.

Table 6. Relative Gibbs energy values and populations of the 14 most stable conformations of deltamethrin in the gas phase and in the water SMD continuum model.

Conformer	Gas phase		Water solvated	
	ΔG° ^a	p_i (%)	ΔG° ^a	p_i (%)
DEL-1	0.0	19.1	0.0	6.1
DEL-2	0.8	14.1	1.5	3.4
DEL-3	0.9	13.5	0.4	5.2
DEL-4	1.9	8.9	2.0	2.7
DEL-5	2.4	7.1	-0.5	7.6
DEL-6	2.5	6.9	1.8	2.9
DEL-7	3.3	5.1	-3.0	20.5
DEL-8	3.7	4.4	-2.2	14.9
DEL-9	4.1	3.6	0.6	4.8
DEL-10	4.2	3.4	3.8	1.3
DEL-11	4.9	2.6	2.3	2.4
DEL-12	5.0	2.5	3.5	1.5
DEL-13	6.9	1.2	1.3	3.6
DEL-14	7.5	0.9	-1.9	13.3

^a kJ mol⁻¹**Table 7.** Molecular electrostatic potential values^a (V_{\min} , $V_{s,\max}$) located on the nitrogen, and halogen sites of acetamiprid for the five main conformers.

Conformer	V_{\min}		$V_{s,\max}$
	N3	N4	Cl
ACE-1	-265.7	-205.0	54.4
ACE-2	-272.8	-216.7	73.2
ACE-3	-270.7	-218.8	74.1
ACE-4	-264.8	-191.2	79.9
ACE-5	-273.6	-197.9	77.0

^a kJ mol⁻¹

Table 8. Molecular electrostatic potential values^a (V_{\min} , $V_{s,\max}$) located on the nitrogen, oxygen, sulfur and halogen sites of chlorpyrifos for the five main conformers.

Conformer	V_{\min}				
	N1	O7	O10	O13	S9
CHL-1	-63.2	-82.4	-146.4	-143.1	-107.1
CHL-2	-62.8	-69.0	-147.3	-143.5	-110.5
CHL-3	-83.3	-124.3	-150.2	-128.9	-105.9
CHL-4	-85.8	-89.1	-156.1	-95.8	-107.1

Conformer	$V_{s,\max}$	
	Cl (5, 6)	Cl (3)
CHL-1	104.6	59.8
CHL-2	104.6	60.7
CHL-3	100.4	59.8
CHL-4	100.8	61.1

^a kJ mol⁻¹**Table 9.** Molecular electrostatic potential values^a (V_{\min} , $V_{s,\max}$) located on the cyano, ester, ether and bromine moieties of deltamethrin for the 14 most stable conformations.

Conformer	V_{\min}			$V_{s,\max}$	
	C≡N	C=O	O	Br(E)	Br(Z)
DEL-1	-196.3	-125.2	-123.2	69.6	77.1
DEL-2	-195.6	-108.4	-121.9	68.2	74.0
DEL-3	-201.5	-122.6	-127.9	70.1	78.9
DEL-4	-198.1	-128.0	-127.2	67.2	76.0
DEL-5	-198.4	-142.2	-116.8	61.6	73.2
DEL-6	-201.1	-122.0	-127.7	70.7	78.8
DEL-7	-209.8	-144.5	-125.9	60.6	73.1
DEL-8	-206.1	-166.9	-127.7	73.0	84.0
DEL-9	-201.9	-142.1	-129.4	62.0	75.2
DEL-10	-196.4	-124.6	-129.8	84.6	85.1
DEL-11	-193.9	-121.2	-118.3	72.0	80.1
DEL-12	-190.1	-125.9	-119.0	67.7	78.9
DEL-13	-203.8	-143.4	-122.0	61.4	69.5
DEL-14	-219.1	-184.5	-124.7	78.3	74.5

^a kJ mol⁻¹

Table 10. LC₅₀ values determined after toxic effect of pesticides against *A. pisum*. LC₅₀: lethal concentration leading to 50% mortality \pm IC95%. Values followed by different letters are significant ($p < 0.05$; t-test with Welch's correction).

	<i>A. pisum</i>	
	24 h	48 h
acetamiprid	> 1000 ^a	0.068 (0.047-0.099) ^e
deltamethrin	59.17 (38.26-91.52) ^b	15.26 (11.23-20.75) ^f
chlorpyrifos	199 (177.3-223.3) ^c	88.36 (81.28-96.04) ^g
fipronil	6.529 (6.019-7.084) ^d	0.197 (1.257-1.970) ^h

Table 11. LC₅₀ values determined after toxic effect of pesticides against *M. persicae*. LC₅₀: lethal concentration leading to 50% mortality \pm IC95%. Values followed by different letters are significant ($p < 0.05$; t-test with Welch's correction).

	<i>M. persicae</i> 4106A		<i>M. persicae</i> 1300145		RF
	24 h	48 h	24 h	48 h	
acetamiprid	0.085 (0.054-0.134) ^a	0.053 (0.037-0.077) ^b	> 1000 ^f	5.04 (2.17-11.71) ^g	95
deltamethrin	17.86 (11.74-27.15) ^c	10.78 (7.63-15.23) ^c	794 (487-901) ^h	380 (1.46-1206) ^h	35
chlorpyrifos	46.05 (27.62-76.78) ^d	30.54 (14.51-64.27) ^d	241.9 (14.53-402.9) ⁱ	181.4 (28.30-1162) ⁱ	6
fipronil	17.01 (8.78-32.95) ^c	1.31 (0.83-2.06) ^e	91.42 (84.36-99.08) ^j	11.57 (7.19-18.61) ^c	9

Thèse de Doctorat

Emiliane TAILLEBOIS

Caractérisation moléculaire et pharmacologique des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs) chez les insectes

Molecular and pharmacological characterization of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in insects

Résumé

Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR) sont impliqués dans de nombreuses fonctions chez les insectes et sont la cible majeure des insecticides néonicotinoïdes. Nous avons démontré que les néonicotinoïdes, comme l'imidaclopride, le thiaméthoxame et la clothianidine présentent des toxicités variables et se lient à des sous-types de nAChRs différents, sensibles ou non à l' α -bungarotoxine, chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. La caractérisation des 11 sous-unités exprimées chez ce puceron montre une expression majoritaire d'Apisma3, Apisma7, Apisma10 et Apismβ2. De plus, l'expression des sous-unités qui est modulée au cours des stades de développement, est également modifiée après exposition aux insecticides, suggérant une sensibilité différente des récepteurs vis-à-vis des néonicotinoïdes. Une expression différentielle des sous-unités de nAChRs et des mécanismes d'épissage identiques ont également été observés dans le cerveau de la blatte *Periplaneta americana*. Des données supplémentaires suggèrent que la sensibilité des nAChRs vis-à-vis des néonicotinoïdes pourrait être modulée par des voies de régulation intracellulaires impliquant la protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II (CaMKII). Nous avons identifié cinq isoformes (PaCaMKII-A à E) et montre une expression spécifique de PaCaMKII-E dans les DUM (dorsal unpaired median) neurones de la blatte. L'inhibition de PaCaMKII-E entraîne une diminution des courants induits par un néonicotinoïde de seconde génération, la clothianidine. L'ensemble de ces résultats met en évidence la complexité des mécanismes impliqués dans l'interaction des nAChRs avec les insecticides.

Mots clés

récepteurs nicotiniques ; sous-unités de nAChRs ; puceron du pois ; néonicotinoïdes ; blatte américaine.

Abstract

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are involved in several functions in insects and are the main target of neonicotinoid insecticides. We demonstrated that neonicotinoids, such as imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin display different toxicity and bind different nAChRs subtypes, sensitive or not to α -bungarotoxin, in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Characterization of the 11 subunits expressed in this aphid highlights a major expression of Apisma7, Apisma10 and Apismβ2. Moreover, subunits expression, which depend on developmental stages, is also modified after insecticides exposure, suggesting different sensitivity of receptors to neonicotinoids. Such nAChR subunits expression pattern and similar splicing mechanisms were also observed in the cockroach *Periplaneta americana*. Additional results suggest that nAChRs sensitivity to neonicotinoids could be modulated by intracellular regulation pathways involving the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). We identified five isoforms (PaCaMKII-A to E) and showed specific expression of PaCaMKII-E in cockroach DUM (dorsal unpaired median) neurons. PaCaMKII inhibition leads to a decrease of clothianidin-induced currents. All together, these results highlight the complexity of the mechanisms underlying nAChRs interaction with insecticides.

Key Words

nicotinic receptors ; nAChR subunits ; pea aphid ; neonicotinoids ; american cockroach