# RECEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX D'INSECTES ET INSECTICIDES : CARACTERISATION DE FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE L'EFFICACITE DES NEONICOTINOÏDES

Béatrice Bodereau

▶ **To cite this version:**

Béatrice Bodereau. RECEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX D'INSECTES ET INSECTICIDES : CARACTERISATION DE FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE L'EFFICACITE DES NEONICOTINOÏDES. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-00679695

**HAL Id: tel-00679695**

**https://theses.hal.science/tel-00679695**

Submitted on 16 Mar 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université angers

**Année : 2011**
**N° d'ordre : 1108**

# RECEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX D'INSECTES ET INSECTICIDES : CARACTERISATION DE FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE L'EFFICACITE DES NEONICOTINOÏDES

**THESE DE DOCTORAT**
Spécialité : Biologie des Organismes
**ECOLE DOCTORALE VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER**

**Présentée et soutenue publiquement**
**le : 13 juillet 2011**
**à : ANGERS**
**par : Béatrice Bodereau-Dubois**

**Devant le jury ci-dessous :**

| | |
|---|---|
| **Dr Philippe Lucas**, Chargé de Recherche INRA, Versailles | **Rapporteur** |
| **Dr Valérie Raymond-Delpech,** Maître de conférences de l'Université Paul Sabatier, Toulouse | **Rapportrice** |
| **Pr Maria Stankiewicz,** Professeur de l'Université Nicholas Copernic, Torun | **Examinatrice** |
| **Pr Bruno Lapied,** Professeur de l'Université d'Angers | **Examinateur** |

**Directeur de Thèse : Pr Bruno Lapied,** Professeur de l'Université d'Angers

Laboratoire Récepteurs Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647 / USC INRA 2023,
IFR 149 QUASAV, Faculté des Sciences, Université d'Angers,
2 Boulevard Lavoisier, 49 045 Angers Cedex, France

**ED 495**

# RESUME

L'utilisation des produits phytosanitaires est indispensable pour augmenter la qualité des productions agricoles. Cependant les directives européennes et nationales préconisent une réduction de 50 % de leur utilisation pour préserver l'environnement et limiter les effets secondaires sur les organismes non-cibles. Dans cette optique, et pour optimiser l'efficacité de ces produits tout en diminuant leur dose d'utilisation, il est nécessaire de caractériser les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation de l'effet insecticide de ces composés sur leurs cibles membranaires. Parmi les insecticides les plus utilisés en agriculture, les néonicotinoïdes occupent une place importante sur le marché. Ils ont pour cible les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) du système nerveux central des insectes. Chez la blatte *Periplaneta americana*, des cellules neurosecrétrices identifiées, les neurones DUM, expriment deux sous-types de nAChRs, (nAChR1 et nAChR2). Alors que nAChR1 est sensible à l'imidaclopride (IMI), néonicotinoïde de première génération, cet insecticide ne présente aucun effet sur nAChR2. Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mode d'action de ces insecticides sur des nAChRs insensibles, l'objectif de ce travail de recherche a été de caractériser du point de vue électro-pharmacologique les facteurs cellulaires et moléculaires qui influencent l'efficacité d'un insecticide néonicotinoïde de seconde génération, l'acétamipride (ACT) qui présente des caractéristiques chimiques différentes de l'IMI.

Grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp, dans des conditions de potentiel imposé, il a été possible de démontrer que l'effet de l'ACT sur nAChR2 dépend du potentiel de membrane. Une dépolarisation de la membrane augmente légèrement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT alors qu'une hyperpolarisation produit un effet inverse significatif. Dans les deux cas, l'implication du calcium intracellulaire a été démontrée. Pour des potentiels plus positifs que le potentiel de membrane (i.e., -50 mV), l'inhibition de l'influx calcique via l'activation des canaux calciques à haut seuil d'activation (High Voltage-Activated) par le chlorure de cadmium et l'ω-conotoxine GVIA augmente la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Des effets similaires sont obtenus pour des potentiels de membrane plus hyperpolarisés lorsque la perméabilité calcique est inhibée par le LOE 908, un inhibiteur des canaux TRPγ. Dans ce dernier cas, l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques (e.g., forskoline, W7) a permis de révéler que la voie de signalisation intracellulaire AMPcyclique/adenylate cyclase est impliquée dans la modulation de l'efficacité de l'ACT sur nAChR2. Enfin, des mesures de la résistance membranaire, réalisées en parallèle dans des conditions de courant imposé, indiquent que l'état conformationnel des nAChR2 joue également un rôle important dans la modulation de l'efficacité de l'ACT. L'ensemble de ces résultats qui ont permis d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation de l'efficacité d'un néonicotinoide, l'ACT ouvrent des perspectives très intéressantes pour optimiser l'efficacité d'un traitement insecticide.

**Mots clés :** insecte, insecticides, néonicotinoïdes, acétamipride, neurones DUM, patch-clamp, récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique, TRPγ.

# ABSTRACT

Plant protection products are essential to increase crops quality. However, European and national directives advocate a reduction of their use from 50% with the aim to protect the environment and to limit effect on non-targeted organisms. In this perspective, in order to optimize the efficacy of these products while reducing their dose of use, it is necessary to characterize cellular and intracellular factors which are involved in the modulation of insecticide effect on their membrane target. Among the insecticides most use in crop protection, neonicotinoids rank as one of the most important class in the market. They act on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) from insect central nervous system. From the cockroach *Periplaneta americana*, neurosecretory cells, identified as Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons, express two subtypes of nAChRs (nAChR1 and nAChR2). Whereas nAChR1 is sensitive to imidacloprid (IMI), a first generation of neonicotinoid, this insecticide has no effect on nAChR2. In order to acquire a better understanding of the mode of action of these insecticides on insensitive nAChRs, the aim of this work was to characterize, from an electro-pharmacological point of view, the cellular and molecular factors which influence the efficacy of a second generation neonicotinoid, acetamiprid (ACT) which present a different chemical structure from IMI.

Using the patch-clamp technique, under voltage-clamp mode, it was demonstrated that the effect of ACT on nAChR2 is dependent on transmembrane potential. A membrane depolarization slightly increases nAChR2 sensitivity to ACT whereas a hypepolarisation induces an opposite effect. In these two cases, an involvement of intracellular calcium was demonstrated. For potential more positive than the membrane potential (i.e. -50 mV), the inhibition of calcium influx via high-voltage activated (HVA) channels by cadmium chloride and ω-conotoxine GVIA increases the nAChR2 sensitivity to ACT. Similar effects are obtained for membrane potential more hyperpolarized when calcium permeability is inhibited by LOE 908, a specific inhibitor of TRPγ channels. In this case, the use of specific pharmacological tools (forskoline, W7) allowed to reveal the implication of the signaling pathway of cyclicAMP/adenylyl cyclase in the modulation of ACT efficacy on nAChR2. Finally, measurements of membrane resistance, realized at the same time in current-clamp mode, indicate that the conformational state of nAChR2 has an important role in the modulation of nAChR2 sensitivity to ACT. All of results which allowed to identify new cellular and molecular factors involved in the modulation of nAChR2 sensitivity to the neonicotinoid, ACT, open new interesting perspectives in order to optimize the efficacy of insecticide treatment.



**Key-words:** insect, insecticides, neonicotinoids, acetamiprid, DUM neurons, patch-clamp, nicotinic acetylcholine receptors, TRPγ.

# REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au sein du laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires.

Je remercie :

Le Professeur Bruno Lapied pour m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire et pour m'avoir encadrée et encouragée tout au long de ces années.

Le Docteur Philippe Lucas, le Docteur Valérie Raymond-Delpech et le Professeur Maria Stankiewicz pour me faire l'honneur de juger mon travail et accepter d'être membre de mon jury.

Les enseignants avec qui j'ai collaboré et collègues du laboratoire qui m'ont soutenue. Je tiens notamment à remercier Hélène Tricoire-Leignel pour avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique pendant mes années de monitorat.

Sophie Quinchard, Olivier Laurec, Luzia Bossé et Manuel Ferrer pour leur convivialité et leur soutien.

Docteur Céline Lavialle-Defaix, Docteur Bénédicte Moignot, Docteur Aly Mohammed, Docteur Sylvie Morel et le Docteur Zeineb Es-Salah-Lamoureux pour leurs encouragements et leur convivialité.

Céline Bourdin et Rolande N'Dong Na qui entrent dans la dernière ligne droite de leur thèse. Je leur adresse mes encouragements.

La Région Pays de la Loire et le Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur Centre pour le soutient financier. Je remercie les moniteurs avec qui j'ai partagé cette expérience de monitorat.

Mes amis, Lilie, Loulou, les M&M's, Nico, Ombeline, Marie-Astrid, Till et Vaness pour leurs encouragements incessant et leur humour déjanté.

Les Pauls et les black beauties pour ces moments de détente et d'évasion qui m'ont permis de prendre du recul.

Ma famille, Ange, Steph, Eliott, Emma, Arnaud, Jérôme, Lindsay, Max, Vaness et sans oublier mes parents pour leur bienveillance, leur joie de vivre et leurs encouragements.

Guillaume pour son dévouement, son humour, pour m'avoir supportée et soutenue tout au long de ces années. Tu as été mon plus grand soutien. Je te dédie ce manuscrit.

# TABLE DES MATIERES

**INTRODUCTION ..... 4**

**1ERE PARTIE : OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES ..... 6**

**Chapitre I - Généralités sur les produits phytosanitaires ..... 6**
A. L'utilité des produits phytosanitaires ..... 6
B. Les stratégies environnementales nationales et européennes ..... 8
1. Loi de programmation relative au grenelle de l'environnement, le plan Ecophyto 2018 ..... 8
2. Politique européenne ..... 9
C. Le marché des produits phytosanitaires et la place des insecticides néonicotinoïdes ..... 10

**Chapitre II - Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique des insectes : cible des néonicotinoïdes ..... 12**
A. Rôle physiologique ..... 13
1. Les nAChRs synaptiques ..... 13
2. Les nAChRs extra-synaptiques ..... 15
B. Les nAChRs extra-synaptiques de la blatte *Periplaneta americana* ..... 17
1. Les récepteurs sensibles à l'α-bungarotoxine ..... 17
a- Les récepteurs de l'acétylcholine de type « mixte » ..... 17
b- Les récepteurs nAChD et nAChN ..... 17
2. Les récepteurs insensibles à l'α-bungarotoxine ..... 18
a- Le récepteur nAChR1 ..... 18
b- nAChR2, un récepteur atypique ..... 21
C. Structure des nAChRs neuronaux des insectes ..... 22
1. Les sous-unités des nAChRs ..... 22
2. Le site de liaison à l'acétylcholine et des nicotinoïdes ..... 23
3. Le site de liaison des néonicotinoïdes ..... 26

**Chapitre III - Les insecticides néonicotinoïdes : généralités et optimisation de leur utilisation ..... 30**
A. Généralités ..... 30
B. Les facteurs du succès fulgurant des néonicotinoïdes ..... 32
C. Effets indésirables des néonicotinoïdes ..... 34
1. Polémique autour du dépeuplement des colonies d'abeilles ..... 34
2. Impact des néonicotinoïdes sur les autres organismes invertébrés non cibles ..... 35
3. Effets secondaires des néonicotinoïdes sur les mammifères ..... 36
D. Les résistances aux insecticides néonicotinoïdes ..... 37
1. Facteurs qui influencent l'efficacité des néonicotinoïdes ..... 37
a- Composition en sous-unités ..... 37
b- Modification des nAChRs ..... 38
2. Les résistances métaboliques aux insecticides néonicotinoïdes ..... 38
E. La mise en place de nouvelles stratégies dans l'utilisation des insecticides : quelles perspectives pour les néonicotinoïdes ? ..... 39
1. Nécessité de nouvelles stratégies ..... 39
2. Association organisme/insecticide ..... 40
3. Association insecticide/substance synergisante ..... 41
4. Association insecticide/insecticide ou répulsif ..... 42
F. L'acétamipride, un néonicotinoïde d'intérêt ..... 42

**2EME PARTIE : MODELE BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES ..... 44**

**Avant-propos ..... 44**

**Chapitre I : Les neurones « Dorsal Unpaired Median » du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* ..... 45**
A. Généralités ..... 45

## TABLE DES MATIERES


B. Critères morphologiques des neurones DUM ..... 46
C. Critères électrophysiologiques des neurones DUM efférents du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* ..... 47
D. Les récepteurs ionotropes exprimés au niveau des neurones DUM ..... 48

**Chapitre II : Techniques expérimentales ..... 49**
A. Technique de culture à court terme ..... 49
1. Matériel biologique ..... 49
2. Prélèvements des derniers ganglions abdominaux ..... 49
3. Digestion enzymatique ..... 49
4. Dissociation mécanique ..... 50
B. Technique électrophysiologique du patch-clamp ..... 51
1. Principe de la technique ..... 51
2. Dispositif d'enregistrement ..... 52
C. Composition et application des solutions ..... 54
D. La technique d'éjection pneumatique ..... 55
E. Analyse des résultats ..... 57

**3EME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX ..... 58**

**Avant-propos ..... 58**

**Chapitre I : Recherche des meilleures conditions pour étudier l'effet de l'acétamipride sur nAChR2 exprimé par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* ..... 59**
A. Position du problème ..... 59
B. Résultats ..... 59

**Chapitre II : Mode d'action de l'acétamipride sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* ..... 63**
A. Position du problème ..... 63
B. Résultats ..... 63

**Chapitre III : Identification des facteurs qui modulent la réponse de nAChR2 à l'acétamipride ..... 68**
A. Position du problème ..... 68
B. nAChR1 module la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride ..... 68
C. Le potentiel de membrane et la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride ..... 69
D. Influence du calcium intracellulaire sur la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride ..... 72

**Chapitre IV : Implication des voies de régulation intracellulaire dans la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride ..... 80**
A. Position du problème ..... 80
B. Résultats ..... 80

**Chapitre V : Facteurs limitant l'utilisation de l'acétamipride ..... 86**
A. Position du problème ..... 86
B. Efficacité de l'acétamipride sur nAChR2 en présence de GABA ..... 86

**4EME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... 89**

**Chapitre I : Discussion ..... 89**
A. Les facteurs qui influencent la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride ..... 89
B. Impact du poteltiel de membrane et du calcium intracellulaire sur l'état d'ouverture de nAChR2 : implication dans la sensibilité à l'acétamipride ..... 89
C. Conséquences pour l'optimisation de l'utilisation des néonicotinoïdes ..... 92

**Chapitre II : Perspectives ..... 94**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 96**

## TABLE DES MATIERES

**ANNEXES** ..... **125**

PUBLICATION N°1 ..... 126

PUBLICATION N°2 ..... 178

**ABREVIATIONS** ..... **186**

**LISTE DES FIGURES** ..... **188**

**LISTE DES TABLEAUX** ..... **190**

# INTRODUCTION

Les produits phytosanitaires jouent un rôle important dans l'agriculture. En protégeant les cultures contre les bio-agresseurs (maladies, mauvaises herbes, insectes ravageurs…), ils permettent d'accroître, de stabiliser les rendements et d'assurer une qualité de production. Ils sont à l'heure actuelle le seul outil d'optimisation qui soit efficace. Ils sont devenus un enjeu économique et sanitaire important. Cependant, leur utilisation intensive peut avoir des répercussions négatives sur l'environnement, sur les organismes non-cibles et notamment sur la santé humaine. En raison des effets potentiellement néfastes des produits phytosanitaires, l'agriculture doit évoluer vers une meilleure prise en compte des exigences environnementales. Par conséquent, elle doit aller vers une utilisation à bon escient des produits phytosanitaires qui ne doivent pas devenir des facteurs de risques pour la santé publique. C'est dans cette optique que la France a mis en œuvre le plan Ecophyto 2018 consécutivement au Grenelle de l'environnement. L'objectif est de réduire de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2018. Les insecticides représentent près d'un quart du marché des produits phytosanitaires (UIPP) ; ils sont donc également assujetis à la réduction de près de 50% préconisée par les politiques environementales.

Les néonicotinoïdes sont devenus la classe d'insecticide la plus vendue au monde, utilisée pour lutter contre les insectes piqueurs-suceurs, certains coléoptères et lépidoptères (Elbert et al., 2008). Le premier néonicotinoïde commercialisé, l'imidaclopride, présente la particularité d'être plus sélectif vis-à-vis des insectes que des mammifères (Tomizawa et Casida, 2003). Cependant, son utilisation a été sujette à polémique suite aux effets néfastes qu'il engendre au niveau des organismes non-cibles (Maxim et van der Sluijs 2007). L'acétamipride, néonicotinoïde de seconde génération, possède une structure chimique différente de l'imidaclopride de par ses pharmacophores (Takahashi et al., 1992). Contrairement à l'imidaclopride, l'acétamipride présente peu d'effets sur les organismes non-cibles. Pour ces raisons, les travaux de recherche présentés dans ce mémoire sont axés sur cette molécule.

L'objectif de cette thèse est de déterminer les facteurs cellulaires qui influencent l'efficacité de l'acétamipride dans le but d'optimiser son utilisation, par une meilleure compréhension de son mode d'action. Ce travail se compose de trois parties :

(1) L'étude du mode d'action de l'acétamipride sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs) d'un modèle cellulaire, les neurones « dorsal unpaired median » (DUM) de la blatte *Periplaneta americana*.

(2) L'identification des mécanismes intracellulaires qui influencent la sensibilité des nAChRs à l'acétamipride.

(3) L'optimisation de l'utilisation de l'acétamipride.

Par conséquent, le manuscrit s'organise comme suit :

La **première partie** de ce mémoire regroupe les données bibliographiques concernant les insecticides néonicotinoïdes et leur cible, les nAChRs d'insecte. Au cours du premier chapitre, les aspects économiques et réglementaires des produits phytosanitaires seront abordés tout en positionnant les néonicotinoïdes dans ce contexte. Le deuxième chapitre sera consacré aux nAChRs par la description de leur rôle physiologique chez l'insecte, la description des nAChRs du modèle utilisé et les facteurs qui influencent leur sensibilité pour les néonicotinoïdes. Le dernier chapitre de cette partie traitera des insecticides néonicotinoïdes. Après un bref historique de cette classe d'insecticide, les polémiques et les effets de ces molécules sur les organismes non-cibles seront abordés. Les résistances développées par les insectes et les méthodes mises en place pour les contrecarrer seront présentées.

La **deuxième partie** du mémoire sera consacrée au modèle biologique et aux techniques expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail de recherche.

La **troisième partie** présentera les principaux résultats obtenus.

Enfin, la **quatrième partie** sera consacrée à la présentation d'une conclusion générale avec les principales perspectives qui découlent des résultats.

# 1ère partie : OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES

## Chapitre I - Généralités sur les produits phytosanitaires

L'agriculture est née de la sédentarisation de l'homme. A ses débuts, l'agriculture n'est pas une réponse à une pénurie, mais elle correspond à une adaptation à un mode de vie (Jacques Cauvin 1994). Par la suite l'agriculture est devenue une stratégie de subsistance. Elle a dû se moderniser et évoluer pour essayer de subvenir au mieux aux besoins de l'humanité. L'utilisation des produits phytosanitaires est issue de cette modernisation.

### A. L'utilité des produits phytosanitaires

L'accroissement de la population mondiale est le principal facteur à l'origine de l'augmentation des besoins alimentaires. La population mondiale devrait atteindre plus de 9 milliards d'individus en 2050, ce qui représente une augmentation de 50% de la demande pour l'alimentation humaine et animale. Il faut à cela ajouter l'avènement des biocarburants qui augmentent la demande en produits végétaux (Figure 1)[1].

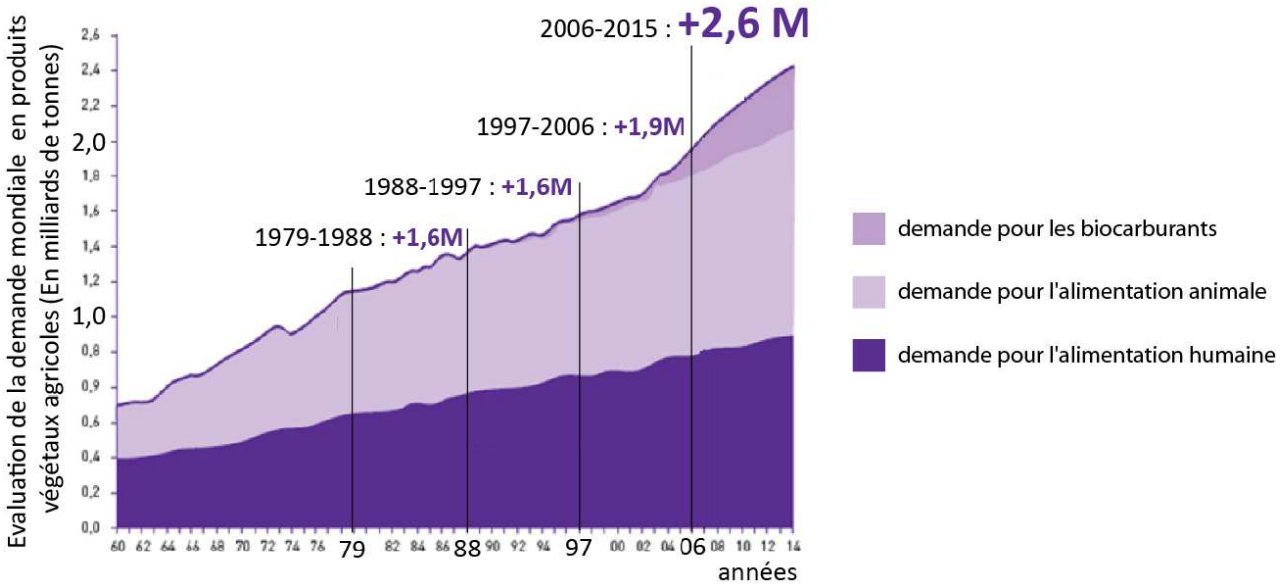



***Figure 1 :*** *Evolution et prévision de la demande mondiale en production végétale agricole de 1968 à 2015 (en milliards de tonnes).*

[1] Source FAO et brochure UIPP « L'utilité des produits phytosanitaires », Mai 2008.

Pour répondre à ces exigences, il est indispensable d'obtenir une production optimale. La protection des cultures contre les maladies, les mauvaises herbes, les insectes ravageurs et tout autres bio-agresseurs est donc devenue indispensable. Une des solutions permettant d'optimiser les rendements est l'utilisation des produits phytosanitaires. En France, par exemple, la perte potentielle de blé sans traitement par des produits phytosanitaires synthétiques est estimée à environ 45-50%[1] (Figure 2). Parmi ces 45% de pertes, 24% sont provoqués par les maladies, 14% sont dus aux dégâts directs des insectes et 7% sont issus de la concurrence avec les mauvaises herbes[2]. Trois grandes catégories de produits phytosanitaires sont utilisés pour protéger les cultures : les herbicides, les fongicides et les insecticides. Les seules luttes possibles contre les phytopathogènes, notamment contre les virus (virus de la mosaïque, virus de la jaunisse nanissante…) reste la lutte directe contre les principaux vecteurs de ces maladies, les insectes (pucerons, cicadelles, aleurodes, ….). Les insecticides permettent donc non seulement de lutter contre les dégâts directs des insectes mais également de lutter contre les phytopathogènes qu'ils véhiculent.

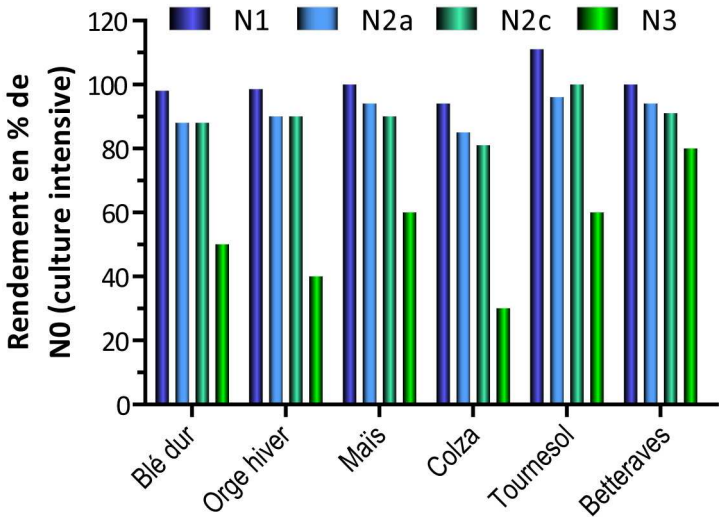



***Figure 2 :*** *Estimation des rendements mondiaux moyens avec ou sans produits phytosanitaires de synthèse.*
*N0 = Agriculture intensive, pas de limite au recours des pesticides*
*N1 = Protection raisonnée, limitation au recours des pesticides par le raisonnement des traitements en fonction des seuils d'intervention*
*N2 = Protection intégrée, a : N1 + mise en œuvre de méthodes prophylactiques et alternatives à l'échelle (annuelle) de l'itinéraire technique d'une culture de la rotation ; c : + mise en œuvre de méthodes prophylactiques et alternatives à l'échelle (pluriannuelle) de la succession de cultures*
*N3 = Agriculture biologique, suppression de l'usage des pesticides de synthèse*
*Source : Synthèse du rapport d'étude « Ecophyto R&D, quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? », janvier 2010*

[1] Source : Synthèse du rapport de l'étude « Ecophyto R&D, quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? », Janvier 2010.
[2] Source : brochure UIPP « L'utilité des produits phytosanitaires », Mai 2008.

## B. Les stratégies environnementales nationales et européennes

### 1. *Loi de programmation relative au grenelle de l'environnement, le plan Ecophyto 2018*

Suite aux polémiques dues aux problèmes engendrés par l'utilisation de manière intensive des produits phytosanitaires, la France a défini un schéma stratégique qui vise à réduire les effets secondaires induits par ces produits. Dans un premier temps, la France a instauré le « Plan Phyto 2000 » dont le principal objectif était de réduire la pollution environnementale par les produits phytosanitaires. Par la suite, le ministère de l'Agriculture et de la Pêche a mis en place de 2006 à 2009 le « Plan Interministériel de Réduction des Risques liés aux Pesticides » (PIRRP). L'objectif principal de ce plan était de réduire de 50% les quantités vendues des substances actives les plus dangereuses[1]. Le Grenelle de l'environnement en 2007 a permis l'émergence d'un consensus sur la nécessité d'une politique plus forte et plus ambitieuse dans la protection de l'environnement et notamment dans la réduction de l'usage des produits phytosanitaires.

Le Grenelle de l'environnement a abouti à l'adoption de lois permettant de concrétiser ces engagements pris par le gouvernement. Concernant le volet de l'agriculture, la loi de programmation dont fait partie le « Plan Ecophyto 2018 » a été adoptée en 2008. L'objectif clairement affiché de ce plan est de réduire de 50% l'usage de tous les produits phytosanitaires si possible d'ici 2018[2]. Ce plan environnemental comporte 8 axes principaux :

- **axe 1** : « Evaluer les progrès en matière de diminution de l'usage des pesticides »
- **axe 2** : « Recenser et généraliser les systèmes agricoles et les moyens connus permettant de réduire l'utilisation des pesticides en mobilisant l'ensemble des partenaires de recherche, du développement et du transfert »
- **axe 3 :** « Innover dans la conception et la mise au point des itinéraires techniques et des systèmes de cultures économes en pesticides »
- **axe 4 :** « Former à la réduction et à la sécurisation de l'utilisation des pesticides »

[1] Source : Observatoire des Résidus de Pesticides www.observatoire-pesticides.gouv.fr
[2] Source : www.legrenelle-environnement.fr

- **axe 5 :** « Renforcer les réseaux de surveillance des bio-agresseurs et sur les effets non intentionnels de l'utilisation des pesticides »
- **axe 6 :** « Prendre en compte les spécificités des DOM »
- **axe 7 :** « Réduire et sécuriser l'usage des produits phyto-pharmaceutiques en zone non agricole »
- **axe 8 : «** Organiser le suivi national du plan et sa déclinaison territoriale et communiquer sur la réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques »

Les axes principaux 2 à 4 illustrent une stratégie qui prône essentiellement des nouveaux modes de culture et la diffusion de ces informations. Le rapport de l'étude « Ecophyto R&D » révèle cependant que l'objectif de réduire de 50% l'usage des produits phytosanitaires est quasiment impossible sans avoir des pertes conséquentes de rendement. Il apparaît nécessaire d'élaborer de nouvelles alternatives pour optimiser l'utilisation des produits phytosanitaires dans le but de réduire leur usage avec le minimum de perte de rendement.

### *2. Politique européenne*

Les premiers textes de lois mis en place par l'Union Européenne furent la Directive n°91/414/CEE et ses annexes. Le but de ces directives est d'harmoniser les règles concernant la mise sur le marché des produits phytosanitaires au sein des pays de l'Union Européenne. Cette directive a permis l'établissement d'une liste de substances actives autorisées (Annexe I de la directive n°91/414/CEE) ainsi que la mise en place d'une procédure pour la mise sur le marché de préparations utilisées en protection des plantes (Annexe II et Annexe III de la directive n°91/414/CEE)[1]. Suite aux lacunes que présente cette directive, elle sera abrogée à partir du 14 juin 2011 et remplacée par le règlement (CE) n°11007/2009. Ce nouveau règlement a pour but d'être encore plus strict concernant l'innocuité des produits phytosanitaires sur la santé humaine, animale et environnementale. Cependant, il se veut également de préserver la compétitivité de l'agriculture de l'Union européenne[2].

[1] Source : Commission européenne http://ec.europa.eu
[2] Source : http://eur-lex.europa.eu

## C. Le marché des produits phytosanitaires et la place des insecticides néonicotinoïdes

Le marché mondial des produits phytosanitaires représente environ 40.5 milliards de dollars. Avec une consommation de 78 600 tonnes en 2008, la France est le premier consommateur européen de produits phytosanitaires et occupe la 4ème place au niveau mondial. Les herbicides représentent 46.9% du marché mondial des produits phytosanitaires, contre 25.9% pour les fongicides et 24.1% pour les insecticides (Figure 3)[1].

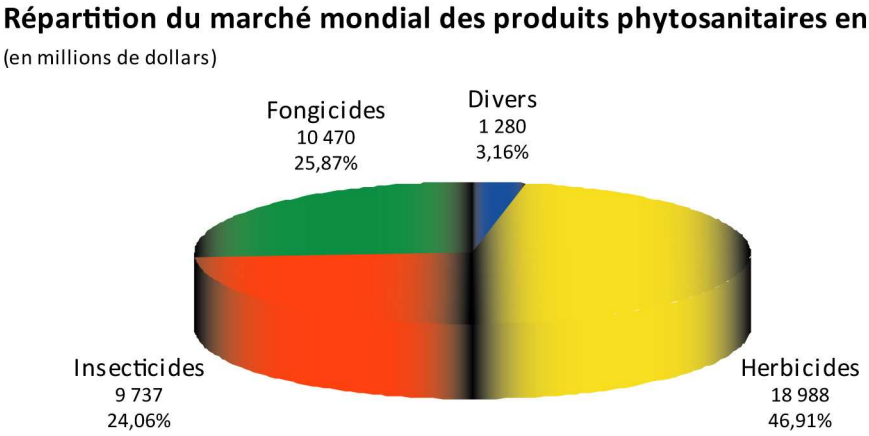



***Figure 3 :*** *Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2008.*

Le marché des insecticides représente environ 10.5 milliards de dollars. Il est dominé par les néonicotinoïdes à hauteur de 23.1% de part de marché suivi par les pyréthrinoïdes (15.1%), les organophosphorés (13.3%) et les carbamates (10.6%) (Figure 4).

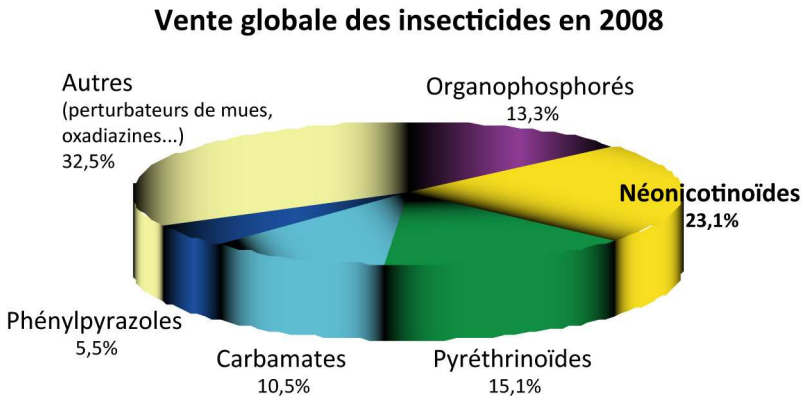



***Figure 4 :*** *Répartition du marché mondial des insecticides en 2008.*
*Modifié d'après Jeschke et al., 2011.*

[1] Source : UIPP - Rapport d'activité 2008-2009 UIPP (Phillips Mc Dougall Agriservices)

La majorité des insecticides utilisés possèdent un effet neurotoxique sur l'insecte (Casida 2009). Les pyréthrinoïdes ciblent les canaux sodiques du système nerveux des insectes alors que les organophosphorés et les carbamates inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase. Dans le cas des néonicotinoïdes, ils agissent comme des agonistes des récepteurs cholinergiques de type nicotinique, spécifique des insectes vis-à-vis des mammifères (Tomizawa et Casida 2003). La cible des néonicotinoïdes, les récepteurs cholinergiques de type nicotinique des insectes est développée dans le chapitre suivant.

# Chapitre II - Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique des insectes : cible des néonicotinoïdes

L'acétylcholine (ACh) est le plus important neurotransmetteur excitateur au sein du système nerveux central des insectes. Il joue un rôle primordial dans la transmission synaptique neuronale des insectes (Gerschenfeld 1973 ; Callec et Sattelle 1973 ; Gundelfinger et Hess 1992 ; Thany et al., 2007). Trois types de récepteurs à l'acétylcholine ont été identifiés :

- les récepteurs à l'acétylcholine de type **muscarinique**. Il s'agit de récepteurs métabotropes, donc couplés à une protéine G. Les types M1 et M3 sont couplés à la cascade PLC-IP3. Le type M2 est lié à des canaux potassiques et à l'inhibition de l'adénylate cyclase. Ils sont impliqués dans la régulation de la libération de l'ACh au niveau des éléments pré-synaptiques (Hue et al., 1989 ; Le Corronc et al., 1991 ; Lapied et al., 1992 ; Trimmer et Weeks 1991 ; Trimmer 1994, 1995) et dans la modulation des seconds messagers intracellulaires en ce qui concerne les récepteurs muscariniques extrasynaptiques (Trimmer et Qazi, 1996).

- les récepteurs à l'acétylcholine de type **« mixte »**. Il s'agit de récepteurs qui présentent une pharmacologie à la fois muscarinique et nicotinique. Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique et la modulation de la neurosécrétion (Lapied et al., 1990 ; Benson 1992 ; David et Pitman 1993).

- les récepteurs à l'acétylcholine de type **nicotinique** (nAChRs). Il s'agit de récepteurs canaux que l'on peut classer entre autre selon leur sensibilité à l'α-bungarotoxine (α-bgt), une toxine issue du venin du serpent *Bungarus multicinctus*. On distingue deux catégories de nAChRs chez les insectes, les nAChRs synaptiques et les nAChRs extra-synaptiques (Hue et Callec 1990 ; Lapied et al., 1990 ; Thany et al., 2007).

Dans un premier temps, le rôle physiologique des nAChRs chez l'insecte sera abordé, et notamment les différents types de nAChRs extrasynaptiques présents chez la blatte *Peripleneta americana*, notre modèle biologique. Nous terminerons par la structure des nAChRs et leur site de liaison à l'ACh et aux néonicotinoïdes.

## A. Rôle physiologique

### 1. *Les nAChRs synaptiques*

Les nAChRs d'insecte sont impliqués dans la transmission synaptique rapide (Figure 5).

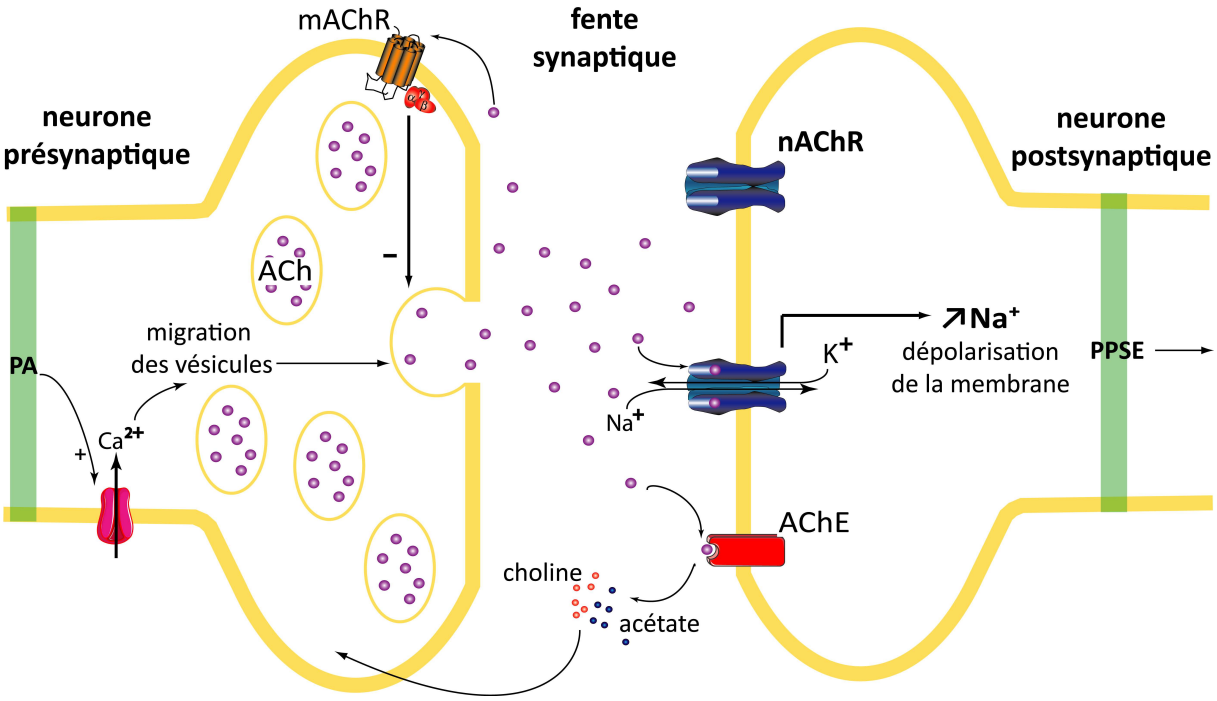



***Figure 5 :*** *Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones. L'activation de l'élément pré-synaptique se caractérise par un potentiel d'action (PA) qui, en se propageant au niveau du bouton synaptique permet l'activation de canaux calciques voltage-dépendant et la migration de vésicules d'acétylcholine (ACh) vers la fente synaptique. La libération de l'ACh par le neurone pré-synaptique active les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) post-synaptiques. L'activation de ces nAChRs entraîne un flux sortant d'ions $K^+$ et un flux entrant d'ions $Na^+$ majoritaire. Cette entrée d'ions sodium crée une dépolarisation de la membrane et génère ainsi un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), permettant de transmettre l'information nerveuse au neurone post-synaptique. L'ACh peut également se fixer sur des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique (mAChRs) qui régulent la libération de l'ACh. Au niveau de la fente synaptique, l'ACh est dégradée en choline et acétate par l'acétylcholinestérase (AChE). La choline est recapturée par l'élément pré-synaptique pour synthétiser de nouvelles molécules d'ACh.*

Peu de modèles permettent d'étudier la transmission synaptique entre deux neurones chez les insectes. Grâce à la mise au point de la technique de «l'oil-gap » il a été possible d'étudier les synapses excitatrices entre les nerfs cercaux (nerf XI) et les interneurones géants du dernier ganglion abdominal (DGA) de la blatte adulte *Periplaneta americana* (Callec et Sattelle 1973 ; Sattelle et al., 1976 ; Hue et Callec 1990). Dans cette structure (Figure 6), la libération de l'ACh suite à la stimulation du nerf XI, ou l'application d'ACh dans la solution physiologique entraînent des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) dans lesquels sont impliqués des nAChRs post-synaptiques. Ces récepteurs possèdent une conductance majoritairement sodique et potassique et sont sensibles à l'α-bgt (Hue et Callec 1990).

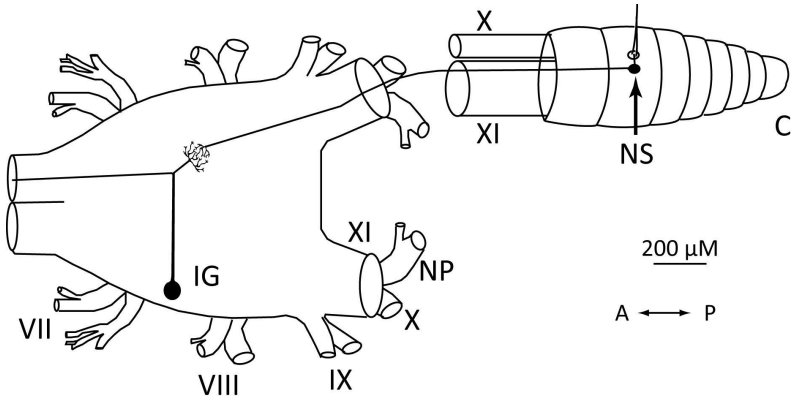



***Figure 6 :*** *Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones au niveau du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana et structure anatomique de ce ganglion.*
*A : antérieur ; C : cerque ; IG : interneurone géant ; NP : nerf phallique ; NS : neurone sensitif ; P : postérieur ; VII, VIII, IX : nerfs segmentaires ; X, XI : nerf cercaux X et XI.*
*Modifié d'après Bodereau et al., 2008.*

Des structures similaires ont été identifiées dans le DGA des larves de blatte *Periplaneta americana* par la même technique (Blagburn et Sattelle 1987). Au niveau du ganglion abdominal A5 isolé de larves du sphinx du tabac *Manduca sexta*, la stimulation du nerf ventral et l'application d'agonistes cholinergiques par la solution physiologique a permis de mettre en évidence l'implication de nAChRs au niveau de la synapse entre un interneurone et le motoneurone innervant le muscle principal de rétraction abdominale (Trimmer et Weeks 1989). Au niveau du ganglion thoracique du criquet *Locusta migratoria,* la stimulation de l'interneurone A4I1 et l'application d'ACh ainsi que d'agonistes nicotiniques par éjection pneumatique démontrent que les potentiels d'action observés au niveau de l'élément post-synaptique sont issus de l'activation de nAChRs (Gauglitz et Pflüger 2001).

Sur une préparation *in vitro* de cerveau d'abeille *Apis mellifera*, la stimulation du lobe antennaire induit une dépolarisation au niveau de l'élément post-synaptique, dans les corps pédonculés des calyces. Cette dépolarisation est bloquée par l'application de curare ou d'α-bgt dans le milieu extracellulaire. Ces expériences électrophysiologiques mettent en évidence des nAChRs impliqués dans la transmission synaptique entre le lobe antennaire et les corps pédonculés de l'abeille *Apis mellifera* (Oleskevich 1999). Grâce à des tests sur l'extension du proboscis et l'apprentissage, il a été possible de montrer l'implication de ces nAChRs synaptiques dans les mécanismes de mémorisation, d'apprentissage et de l'olfaction chez l'abeille. L'injection d'antagonistes nicotiniques au niveau du cerveau de l'abeille tels que l'α-bgt ou la métyllylcaconitine qui diminuent le réflexe d'extension du proboscis et l'efficacité de l'apprentissage, démontre l'implication de nAChRs dans ces processus (Dacher

et al., 2005 ; Gauthier et al., 2006 ; Dacher et Gauthier 2008). Au niveau des cultures de neurones issus du cerveau de larves de drosophile, *Drosophila melanogaster*, des synapses se mettent en place dès une semaine de culture. Les neurones établissant ces synapses présentent spontanément des courants synaptiques entrants et sortants. L'inhibition des courants spontanés par l'application en solution extracellulaire de curare et d'α-bgt, permet d'identifier ces courants entrants synaptiques comme étant issus de l'activation de nAChRs (Su et O'Dowd 2003 ; Hu et al., 2010). Les nAChRs présents au niveau des cellules de Kenyon des corps pédonculés de la drosophile *Drosophila melanogaster* sont également impliqués dans la régulation de la plasticité neuronale (Gu et O'Dowd 2006 ; Campusano et al., 2007).

*2. Les nAChRs extra-synaptiques*

Des études électrophysiologiques ont montré l'existence de nAChRs au niveau des corps cellulaires de différents neurones d'insecte maintenus en culture et dépourvus de contact synaptique. Le Tableau 1 présente une liste non exhaustive des neurones d'insecte où ces nAChRs ont été caractérisés. Les nAChRs présents au niveau des corps cellulaires des neurones ne sont pas impliqués dans la transmission synaptique de l'information nerveuse. Malgré l'absence de synapse, ces nAChRs peuvent être exposés à l'ACh par sécrétion autocrine. En effet, au niveau des neurones géants issu de larves de drosophile *Drosophila melanogaster*, il a été démontré que la sécrétion d'ACh est plus importante au niveau du soma du neurone qu'au niveau du neurite et du bouton synaptique (Yao et al., 2000).

Les corps cellulaires des neurones d'insecte sont considérés comme étant inexcitables à l'exception des neurones DUM ou VM (pour Ventral median) (Hewes 1999 ; Braunig et Plüger 2001). Les neurones présents au niveau des corps pédonculés et des lobes antennaires sont impliqués dans la mémorisation, l'apprentissage et l'olfaction chez l'abeille *Apis mellifera* mais également dans la régulation de la plasticité neuronale chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Dacher et al., 2005 ; Gauthier et al., 2006 ; Gu et O'Dowd 2006 ; Campusano et al., 2007 ; Dacher et Gauthier 2008). Concernant les nAChRs des neurones inexcitables, leur rôle physiologique est ambigü mais il a pu être démontré que leur activation permet d'augmenter la concentration en calcium intracellulaire chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Oertner et al., 1999 ; Wegener et al., 2004 ; Jepson et al., 2006 ; Campusano et al., 2007) ou en monoxyde d'azote (NO) chez le sphinx du tabac *Manduca sexta* (Zayas et al., 2002). Au niveau des neurones excitables tel que les cellules

neurosécrétrices comme les neurones DUM, les nAChRs permettent d'augmenter l'excitabilité de la cellule (Lapied et al., 1990 ; Tribut et al., 1994). En modulant l'activité somatique, les nAChRs extra-synaptiques pourraient être impliqués dans la mobilisation et la maturation des produits de neurosécrétion par implication de seconds messagers intracellulaires.

***Tableau 1 :*** *Liste non exhaustive des différents types de neurones d'insecte où la présence de nAChRs a été caractérisée électrophysiologiquement.*

| Type cellulaire | Insectes | Références |
|---|---|---|
| Neurones de larves | mouche, *Musca domestica* | Albert et Lingle 1993 |
| | drosophile, *Drosophila melanogaster* | Albert et Lingle 1993<br>Wegener et al., 2004<br>Brown et al., 2006<br>Jepson et al., 2006<br>Campusano et al., 2007 |
| | noctuelle, *Heliothis virescens* | Nauen et al., 2001b<br>Nauen et al., 2003 |
| Neurones du lobe antennaire | abeille, *Apis mellifera* | Barabara et al., 2008<br>Nauen et al., 2001a |
| Cellules de Kenyon des corps pédonculés | abeille, *Apis mellifera* | Goldberg et al., 1999<br>Deglise et al., 2002<br>Wüstenberg et Grünewald 2004 |
| | criquet, *Acheta domesticus* | Cayre et al., 1999 |
| Neurones des ganglions thoraciques (non définis) | phasme, *Carausius morosus* | Oliveira et al., 2010 |
| | criquet, *Locusta migratoria* | Benson 1992<br>Van den Beukel et al., 1998<br>Oertner et al., 1999<br>Jackson et al., 2002 |
| | criquet, *Schistocerca gregaria* | Albert et Lingle 1993 |
| | blatte, *Periplaneta americana* | Salgado et Saar 2004<br>Tan et al., 2007 |
| Neurones des ganglions abdominaux (non définis) | sphinx du tabac, *Manduca sexta* | Zayas et al., 2002<br>Fickbohm et Trimmer 2003 |
| | blatte, *Periplaneta americana* | Ihara et al., 2006<br>Ihara et al., 2007a |
| Interneurones | blatte, *Periplaneta americana* | Buckingham et al., 1994 |
| Motoneurones | sphinx du tabac, *Manduca sexta* | Trimmer et Weeks 1989<br>Eastham et al., 1998 |
| Motoneurones Df (fast depressor) | blatte, *Periplaneta americana* | Sattelle et David 1983<br>David et Sattelle 1984<br>David et Pitman 1993<br>Buckingham et al., 1994 |
| DUM neurones | blatte, *Periplaneta americana* | Lapied et al., 1990<br>Tribut et al., 1994<br>Grolleau et al., 1996<br>Courjaret et Lapied 2001<br>Courjaret et al., 2003<br>Thany et al., 2008 |

## B. Les nAChRs extra-synaptiques de la blatte *Periplaneta americana*

### *1. Les récepteurs sensibles à l'α-bungarotoxine*

#### a- Les récepteurs de l'acétylcholine de type « mixte »

Les neurones DUM et les motoneurones Df issus respectivement du DGA et de ganglions thoraciques expriment des récepteurs de l'acétylcholine présentant une pharmacologie à la fois nicotinique et muscarinique, les récepteurs « mixtes » (Lapied et al., 1990 ; David et Pitman 1993). Toutefois, les récepteurs « mixtes » exprimés par ces deux types cellulaires ne présentent pas le même profil pharmacologique face à l'α-bgt. En effet, alors que les récepteurs « mixtes » des motoneurones Df sont insensibles à l'α-bgt (David et Pitman 1993), les récepteurs « mixtes » exprimés par les neurones DUM sont sensibles à cette toxine (Lapied et al., 1990). Ces récepteurs « mixtes » ont pu être identifiés au niveau des neurones DUM lors de la caractérisation des deux types de réponses pharmacologiquement distinctes induites par la nicotine (une dépolarisation rapide et une dépolarisation lente). Le premier type de réponse correspondant à la dépolarisation rapide représente l'activation des nAChRs. Le deuxième type de réponse correspondant à la dépolarisation lente représente l'activation des récepteurs de type « mixte ». Ces récepteurs sont à la fois sensibles à des antagonistes nicotiniques comme l'α-bgt et aux antagonistes muscariniques tel que la pirenzépine. (Lapied et al., 1990). L'activation de ce type de récepteur induit une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Grolleau et al., 1996). Ces récepteurs interviendraient dans le contrôle des processus de neurosécrétion et dans l'homéostasie calcique des neurones. Ils sont sensibles aux insecticides néonicotinoïdes suivants, l'IMI, la clothianidine et le thiaméthoxame (Buckingham et al., 1997 ; Thany 2009 ; Thany 2011).

#### b- Les récepteurs nAChD et nAChN

Au niveau des neurones (non identifiés) issus des ganglions thoraciques de la blatte *Periplaneta americana*, il a pu être mis en évidence deux types de nAChRs sensibles à l'α-bgt. Un récepteur qui se désensibilise rapidement, nommé nAChD, et un récepteur qui ne se désensibilise pas, nAChRN. Ces deux récepteurs présentent une pharmacologie différente. nAChRD est inhibé par des néonicotinoïdes, l'IMI et la clothianidine sans affecter la réponse de nAChN à ces insecticides. nAChN est quant à lui inhibé par la méthyllylcaconitine (MLA) (Salgado et Saar 2004).

### 2. *Les récepteurs insensibles à l'α-bungarotoxine*

Au niveau des neurones DUM, deux sous-types de nAChRs insensibles à l'α-bgt ont été caractérisés. La dépolarisation rapide de la réponse induite par la nicotine correspond à l'activation de ces deux types de nAChRS. Il a pu être établi que cette réponse possède deux composantes, une issue de l'inhibition d'une conductance potassique et une issue de l'activation d'une conductance cationique impliquant des ions $Na^+$ et $K^+$ (Tribut, 1994). La courbe I/V se traduit alors par un aspect biphasique, suggérant l'implication de deux sous-types différents, nAChR1 et nAChR2 (Figure 7).

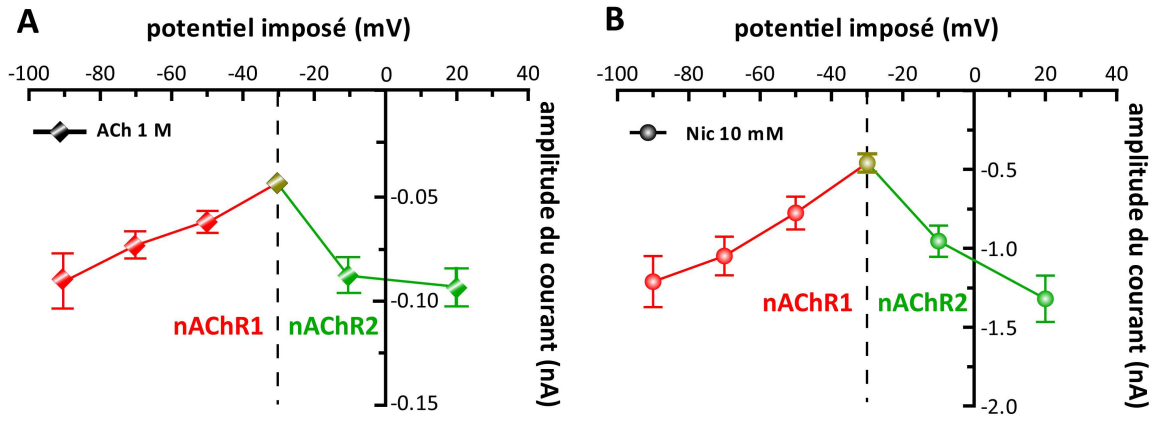



***Figure 7 :*** *Courbe I/V induite par (A) l'acétylcholine (ACh 1M) et (B) la nicotine (Nic, 10 mM). De -90 mV à -30 mV, l'amplitude du courant induit par l'ACh et la nicotine diminue. Cette première phase correspond à l'activation majoritairement de nAChR1. De -30 mV à +30 mV, l'amplitude du courant par l'ACh et la nicotine augmente. Cette deuxième phase correspond à l'activation majoritairement de nAChR2. Modifié d'après Courjaret et Lapied 2001.*

L'amplitude du courant diminue de -90 mV à -30 mV puis augmente de -30 mV à +30 mV. La première composante de -90 mV à -30 mV correspond à l'activation majoritairement de nAChR1. La deuxième composante de -30 mV à +30 mV correspond à l'activation majoritairement de nAChR2. Les propriétés de ces deux récepteurs ont été en partie caractérisées du point de vue pharmacologique, électrophysiologique et au niveau de leur régulation intracellulaire qui leur sont propres (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et al., 2003 ; Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008).

#### a- Le récepteur nAChR1

L'activation de nAChR1 correspond à la première partie de courbe I/V de la nicotine et de l'ACh. Il s'agit d'un nAChR d'insecte classique. Au repos, ce récepteur est fermé et l'application d'agonistes entraîne son ouverture augmentant ainsi la conductance ionique majoritairement sodique. Il a été démontré que ce récepteur est sensible à un antagoniste

nicotinique qui est la d-tubocurarine (d-TC). C'est un récepteur sensible à l'IMI et à la clothianidine (Tableau 2) (Courjaret et Lapied 2001 ; Thany 2009).

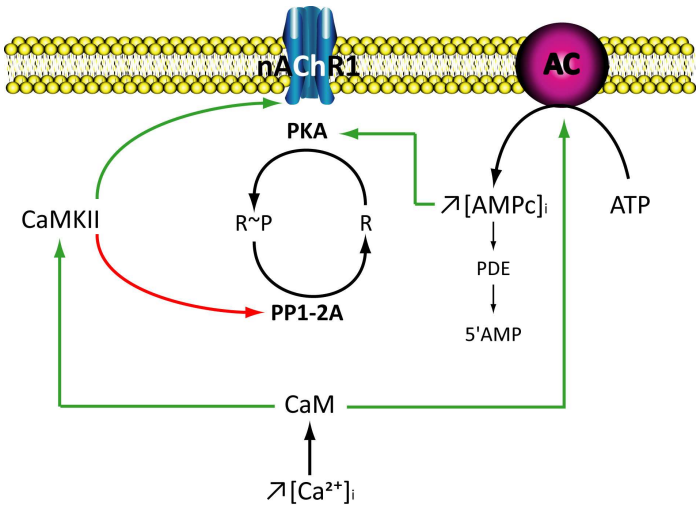



***Figure 8 :*** *Schéma résumant la régulation intracellulaire de nAChR1 qui implique la CaMKII et la PKA. AC : adénylate cylcase. → : activation, → : inhibition. Modifié d'après Courjaret et Lapied 2001*

La réponse de nAChR1 est modulée par une voie de régulation intracellulaire qui fait intervenir une PKA via l'AMPc, la CaMKII et la phosphatase PP1-2A (Figure 8). Pour obtenir une réponse maximale, il est nécessaire que le récepteur soit phosphorylé par la PKA (Courjaret et al., 2001 ; Courjaret 2003).

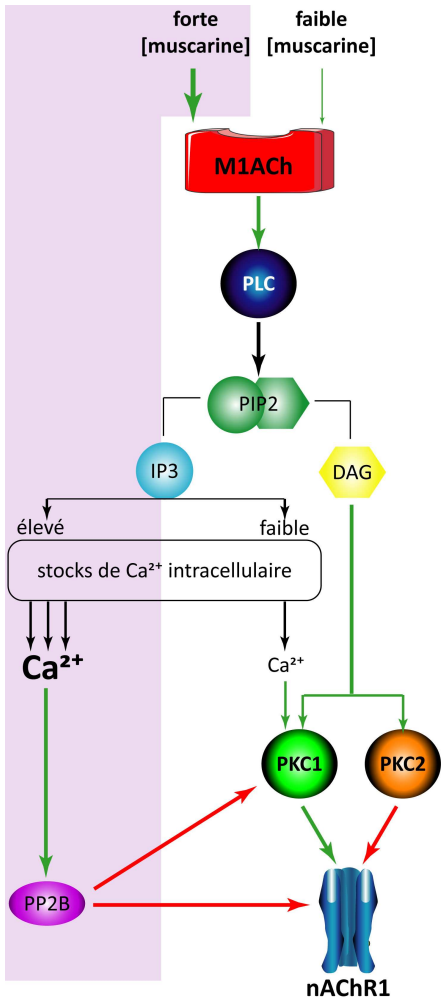
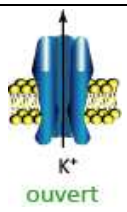
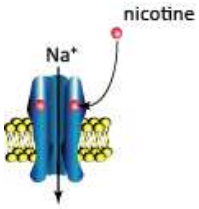
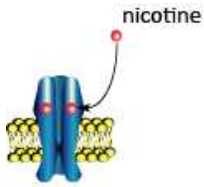



***Figure 9 :*** *Schéma récapitulatif de la régulation de nAChR1 par l'activation d'un récepteur muscarinique de type M1 (M1ACh).*
*L'application d'une faible concentration en muscarine, permet l'activation d'une PKC1 via le calcium intracellulaire. L'activation de cette PKC1 permet d'augmenter la réponse de nAChR1. L'application d'une forte concentration en muscarine inhibe nAChR1 par une PKC2. Cette forte concentration de muscarine permet également une inhibition directe de nAChR1 par une PP2B et indirecte via l'inhibition de la PKC1 (voie en mauve). Modifié d'après Courjaret et al., 2003*
*PLC : phospholipase C, PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, DAG : diacylglycérol, IP3 : inositol triphosphate. → : activation, → : inhibition*

Suite à l'activation d'un récepteur muscarinique de type M1 lors de l'application d'une faible concentration de muscarine, la fonction de nAChR1 est augmentée par l'activation d'une PKC1, qui nécessite la présence de calcium et apparentée aux PKC « classiques » des vertébrés. Lors de l'application d'une forte concentration de muscarine, la fonction de nAChR1 est diminuée par l'activation d'une PKC2, apparentée aux « nouvelles » PKC et insensible aux variations de la concentration calcium intracellulaire. Une forte concentration de muscarine induit également une inhibition de nAChR1 directement par une PP2B et indirectement via l'inhibition de la PKC1 (Figure 9) (Courjaret et al., 2003 ; Courjaret 2003).

***Tableau 2 :*** *Récapitulatif des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques de nAChR1 et de nAChR2.*

| | **nAChR1** | **nAChR2** |
|---|---|---|
| **Conductance** | majoritairement $Na^+$ | majoritairement $K^+$ |
| **Etat conformationnel :**<br>*- au repos* | <br>**fermé** |  <br>$K^+$<br>ouvert |
| *- après application de nicotine ou d'acétylcholine* |  <br>nicotine<br>$Na^+$<br>ouvert |  <br>nicotine<br>**fermé** |
| **Résistance membranaire**<br>*après application de nicotine* | diminution | augmentation |
| **Courant ionique visualisé** | courant entrant | courant entrant résultant de l'inhibition du récepteur |
| **Bloqueurs de canaux** | | |
| *CsCl* | - | + |
| *4-AP* | - | + |
| **Antagonistes nicotiniques** | | |
| *α-bungarotoxine* | - | + |
| *d-tubocurarine* | + | - |
| *mécamylamine* | - | + |
| *α-conotoxine* | - | + |
| **Sensibilité aux insecticides** | | |
| *imidaclopride* | + | - |
| *clothianidine* | + | + |
| **Régulation intracellulaire** | • PKA via l'AMPc, la CAMKII et la PP1-2A<br>• PKC1 et PKC2 via l'activation du récepteur muscarinique M1 | • implication du calcium intracellulaire<br>• GMPc |

- : insensible ; + : sensible.

*D'après Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et al., 2003 ; Thany et al., 2008 ; Thany 2009.*

b- nAChR2, un récepteur atypique

L'activation de nAChR2 correspond à la deuxième composante de la courbe IV de la nicotine et de l'ACh. Il s'agit d'un récepteur « atypique », ouvert au repos avec une conductance potassique (Tableau 2). Ce type de récepteur n'a été identifié que chez la blatte *Periplaneta americana* et non chez les vertébrés. Cependant, l'ouverture d'un récepteur ionotropique en absence d'agoniste a déjà été observée dans la famille des récepteurs « cys-loop » chez les mammifères. En effet, Pan et ses collaborateurs (1997) ont trouvé une mutation au niveau domaine M2 du récepteur GABA p1 qui induit l'activation d'un courant spontané en absence de ligand. Concernant nAChR2, l'application d'agoniste entraîne sa fermeture et donc une diminution de sa conductance potassique. Un courant qui reflète l'inhibition du courant sortant potassique spontané est alors visualisé (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret 2003). Cette conductance spontanée de ce récepteur permet d'expliquer sa sensibilité à l'antagoniste nicotinique, la mécamylamine. La mécamylamine agit au cœur du ionophore des nAChRs, plus particulièrement au niveau du domaine transmembranaire M2 lorsque le récepteur est ouvert (Arias 1997). L'application de mécamylamine dans le milieu extracellulaire permet de diminuer la réponse du récepteur nAChR2 à la nicotine (Courjaret et Lapied 2001). Par contre, la mécamylamine ne permet pas d'inhiber la réponse induite par la nicotine lorsque cette dernière est préalablement appliquée (Courjaret 2003).

nAChR2 a la particularité d'être insensible à l'IMI alors que l'animal n'a jamais été mis en contact avec l'insecticide (Courjaret et Lapied 2001). Cependant, lorsque nAChR2 est fermé suite à l'application de nicotine, l'IMI est capable d'induire la réouverture du récepteur. L'ouverture spontanée de nAChR2 au repos est donc impliquée dans l'absence d'effet de l'IMI sur ce récepteur (Courjaret 2003). Malgré cette insensibilité face à l'IMI, la clothianidine est capable d'agir sur nAChR2 (Thany 2009). Concernant la régulation intracellulaire de ce récepteur, il a été mis en évidence que le calcium intracellulaire et l'implication de voies de signalisation faisant intervenir du GMPc module la réponse de nAChR2 (Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008). Cependant, la régulation intracellulaire de ce récepteur reste encore à être explorée.

## C. Structure des nAChRs neuronaux des insectes

A l'heure actuelle aucune étude ne décrit précisément la structure des nAChRs neuronaux des insectes. Le postulat généralement admis est basé sur les observations des nAChRs des vertébrés suite à la comparaison avec les séquences codantes des nAChRs d'insecte. Les nAChRs font partie de la famille des récepteurs ionotropes « cys-loop » (pont disulfure entre deux cystéines) incluant les récepteurs : à l'acide γ-aminobutyrique (GABA), à la glycine, à la sérotonine (de type 5-$HT_3$) et au glutamate (Cully et al., 1996 ; Le Novère et Changeux 2001 ; Raymond et Sattelle 2002). Il s'agit de récepteurs pentamériques composés de cinq protéines (sous-unités) transmembranaires assemblées en rosette formant un canal ionique à travers la membrane (Le Novère et Changeux 2001 ; Unwin 2003, 2005).

### *1. Les sous-unités des nAChRs*

Chaque sous-unité fait environ 50 kDa. Elles sont composées des éléments suivants (Figure 10) (Le Novère et Changeux 2001 ; Thany et al., 2007) :

- une partie N terminale extracellulaire où se situe la « cys-loop »
- 4 domaines transmembranaires de M1 à M4 avec le domaine M2 qui participe à la formation du pore du canal.
- une boucle intracellulaire très variable entre les domaines M3 et M4. Elle pourrait être impliquée dans la régulation des nAChRs par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation.
- une terminaison carboxy-terminale extracellulaire

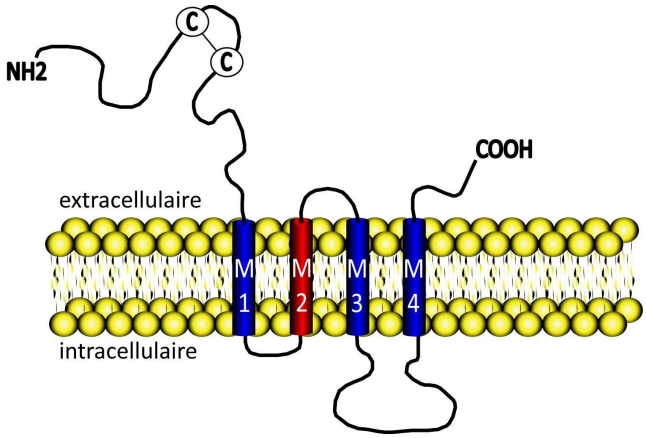



***Figure 10 :*** *Structure secondaire d'une sous-unité de nAChRs. Chaque sous-unité est constituée de 4 domaines transmembranaires de M1 à M4, avec le domaine M2 qui forme le pore du canal.*
*Modifié d'après Thany et al., 2007*

On distingue deux types de sous-unités, les sous-unités α et les sous-unités β. Les sous-unités α comportent deux cystéines adjacentes au niveau N-terminal qui sont impliquées dans le site de liaison à l'ACh. Les sous-unités où ces deux cystéines sont manquantes sont appelées β (Thany et al., 2007). Les nAChRs peuvent être (Figure 11) :

- homomériques, c'est-à-dire composés de 5 sous-unités identiques (à l'exception des sous-unités β), ces récepteurs sont généralement sensibles à l'α-bgt
- hétéromériques, c'est-à-dire composés de 5 sous-unités différentes. Ces récepteurs peuvent être sensibles ou insensibles à l'α-bgt.

Ces dernières années, notamment grâce au séquençage des génomes, de nombreuses sous-unités de nAChRs ont été clonées chez plusieurs espèces d'insecte telles que la drosophile *Drosophila melanogaster*, la mouche, *Musca domestica*, le criquet *Locusta migratoria*, l'abeille *Apis mellifera*, le puceron *Myzus persicae*, ou encore la cicadelle brune du riz *Nilaparvata lugens* (Sgard et al., 1998 ; Hermsen et al., 1998 ; Huang et al., 1999 ; Chamaon et al., 2000, 2002 ; Thany et al., 2003, 2005 ; Liu et al., 2005 ; Jones et al., 2005a, 2005b, 2006, 2007). Certaines de ces études révèlent que l'expression des sous-unités de nAChRs est souvent localisée dans des régions spécifiques du système nerveux et est dépendante du stade de développement de l'insecte.

### *2. Le site de liaison à l'acétylcholine et des nicotinoïdes*

Le site de liaison de l'acétylcholine est situé à l'interface de deux sous-unités adjacentes (Figure 11). La composante principale est formée par la sous-unité α et la composante secondaire est formée par une sous-unité α ou β.

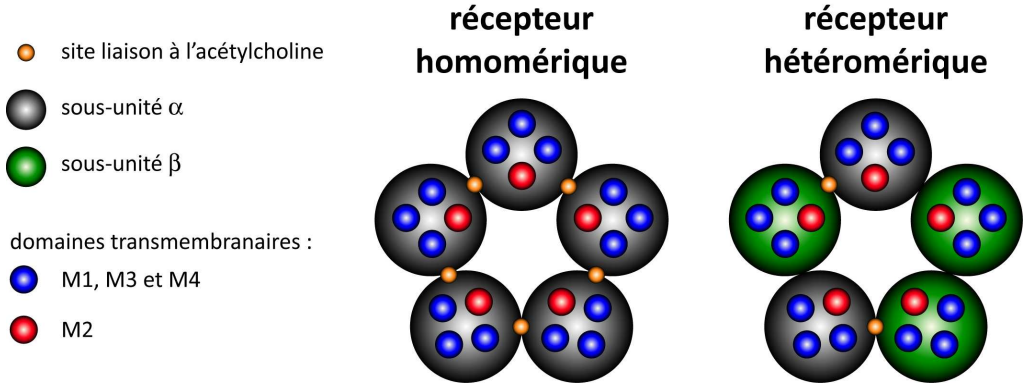



***Figure 11 :*** *Assemblage des sous-unités de nAChRs en forme de rosette et agencement des sites de liaisons à l'acétylcholine. La composante principale du site de liaison est formée par une sous-unité α. La composante secondaire est formée par une sous-unité α dans le cas de récepteur homomérique (à gauche) ou par une sous-unité β dans le cas des récepteurs hétéromériques (à droite).*

Au niveau des récepteurs composés uniquement de sous-unités α, 5 sites de liaisons sont potentiellement formés contre 2 seulement (du fait de l'encombrement stérique) au niveau des récepteurs hétéromériques composés de sous-unités α et β (Arias 1997 ; Corringer et al., 2000). La composante principale formée par la sous-unité α est constituée des boucles A, B et C qui sont majoritairement impliquées dans le site de liaison. La composante secondaire est constituée des boucles D, E et F (Figure 12) (Karlin 2002 ; Matsuda et al., 2005 ; Thany et al., 2007).

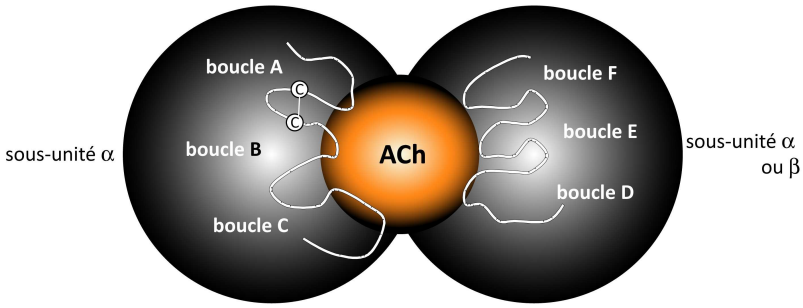



***Figure 12 :*** *Site de liaison de l'acétylcholine. La composante principale du site de liaison est formée par une sous-unité α, elle est constituée des boucles A, B et C. La composante secondaire est formée par une sous-unité α ou β, elle est constituée des boucles D, E et F. Modifié d'après Thany et al., 2007*

Actuellement, aucune étude n'est parvenue à cristalliser avec une bonne résolution les nAChRs d'insectes. Cependant, les résidus des boucles qui jouent un rôle important dans la liaison avec l'ACh ou les nicotinoïdes tel que la nicotine ou l'épibatidine (EPI) ont quand même été identifiés grâce à la structure cristallisée d'une protéine homo-pentamérique qui lie l'ACh (AChBP). Cette protéine est sécrétée par des cellules gliales des mollusques aquatiques, la limnée d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et l'aplysie marine *Aplysia californica*, les AChBP associées à ces espèces sont respectivement nommées *Ls*-AChBP et *Ac*-AChBP. Cette protéine est soluble et présente une grande homologie avec le domaine extracellulaire des nAChRs (Rucktooa et al., 2009). Elle semble donc être une bonne alternative pour déterminer les résidus impliqués dans les sites de liaisons des différents ligands des nAChRs.

Il existe différents types de liaisons (autre que les liaisons covalentes) :

- la liaison **ionique** : liaison non directionnelle qui résulte de l'interaction électrostatique entre des ions de charges opposées.

- la liaison **hydrogène** : liaison où l'hydrogène d'un groupement établit une interaction électrostatique avec un autre atome (il est attiré par l'atome), il assure ainsi la liaison entre deux molécules.

- la liaison de **van der Walls** : dans une liaison covalente, deux atomes portent en alternance une paire d'électron de façon transitoire, ce qui crée une charge positive et une charge négative. Un atome d'une autre molécule sera faiblement attiré par cette charge transitoire. La force de cette liaison décroît avec la distance entre les molécules. Il s'agit de la liaison la plus faible.

- la liaison **C-Halogène** : liaison entre un carbone C et un halogène Cl, Br, F ou I.

- la liaison **σ** : recouvrement axial entre deux orbites s ou p (ou les deux). La rotation est libre et il s'agit de la liaison la plus forte.

- la liaison **π** : recouvrement latéral entre deux orbites p.

Ainsi, il a pu être démontré que l'ACh, l'EPI et la nicotine forment une liaison cation-π entre leur ammonium quaternaire et l'oxygène de la chaîne du tryptophane (Trp 147) de la boucle B (Zhong et al., 1998 ; Cashin et al., 2005). Une autre étude a montré que la nicotine forme une liaison hydrogène avec la chaîne principale de la leucine (Leu 102) et de la méthionine (Met 114) de la boucle E par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Celie et al., 2004) (Figure 13).

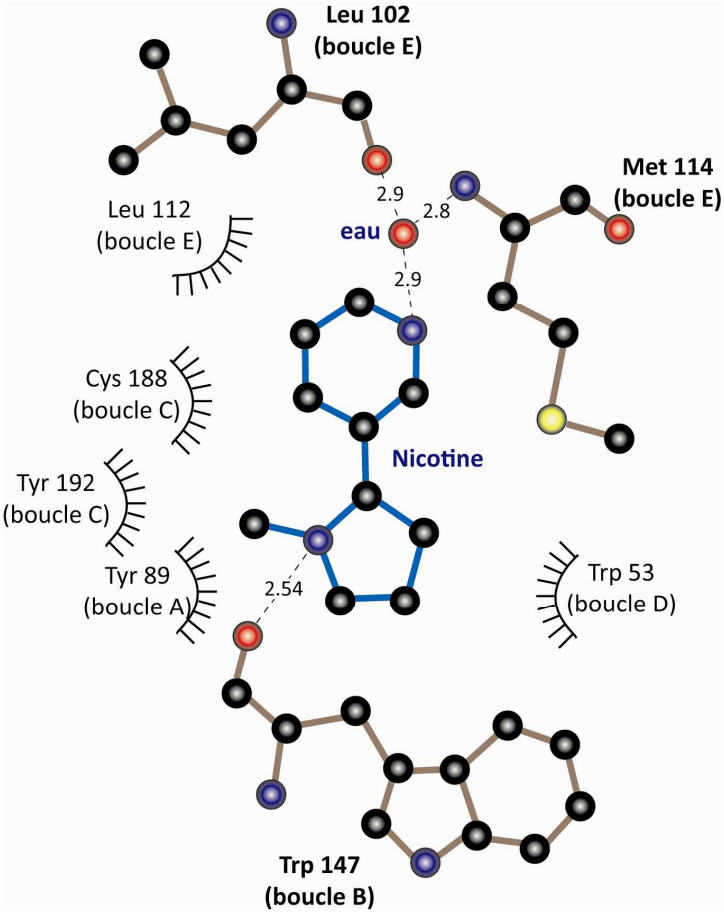



***Figure 13 :*** *Liaison entre la nicotine et Ls-AChBP.*
*L'ammonium quaternaire du cycle pyridine de la nicotine forme une liaison π avec l'oxygène du tryptophane de la boucle B. La nicotine est liée par liaison hydrogène à la chaîne principale de la leucine et de la méthionine de la boucle E via une molécule d'eau. La distance qui sépare les éléments de chaque liaison est exprimée en Å.*
*Modifié d'après Celie et al., 2004*

### 3. *Le site de liaison des néonicotinoïdes*

La classe des néonicotinoïdes est composée de 8 membres principaux en incluant la nithiazine (IMI, acétamipride, nitenpyrame, thiaméthoxame, thiaclopride, clothianidine, dinotefuran). Cependant, ces 8 néonicotinoïdes partagent-ils le même site de fixation au niveau des nAChRs d'insecte ? Il a été possible de répondre à cette question grâce à des études de compétition qui utilisent des néonicotinoïdes radiomarqués. Chez les deux espèces de pucerons, le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* et le puceron noir de la luzerne *Aphis craccivora*, il a été possible d'établir que l'acétamipride (ACT), le nitenpyrame, le thiaclopride, la clothianidine et la nithiazine partagent le même site de fixation que l'IMI, alors que le thiaméthoxame et les analogues N-méthyl de l'IMI et de la clothianidine possèdent un site de fixation différent (Kayser et al., 2004). Cependant, le site de fixation des néonicotinoïdes n'est pas toujours conservé entre les espèces. En effet, alors que chez la drosophile *Drosophila melanogaster,* l'IMI, l'ACT et le dinotefuran partagent le même site de fixation, le dinotefuran a un site différent de celui de l'IMI et l'ACT chez la cicadelle pisseuse *Homalodisca coagulata* (Honda et al., 2006b).

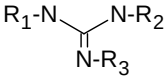
Quels éléments du site de liaison au niveau des nAChRs leur confèrent une sélectivité pour les néonicotinoïdes ? La première méthode pour déterminer les éléments qui influencent la liaison des néonicotinoïdes sur les nAChRs a été d'exprimer des sous-unités mutées dans un système d'expression hétérologue. Or, l'expression des nAChRs d'insectes s'avère être délicate que ce soit dans les lignées cellulaires d'insecte (sf9 ou s2) ou les ovocytes de xénope *Xenopus laevis*. Pour obtenir plus facilement des nAChRs fonctionnels, il est indispensable de coupler les sous-unités α des insectes avec des sous-unités β de mammifères (généralement β2 de rat ou de poulet) (Millar 2009). Par l'expression de la sous-unité α SAD de la drosophile *Drosophila melanogaster* dans des ovocytes de xénope, il a pu être établi que la boucle C et l'intervalle entre la boucle B et C jouent un rôle majeur dans l'affinité pour les néonicotinoïdes. La mutation P242E au niveau de la boucle C de la sous-unité SAD induit une diminution de l'efficacité et de la sensibilité pour l'IMI. Il en est de même lorsque l'intervalle entre les boucles B et C est changé par son équivalent chez les mammifères (Shimomura et al, 2004). En co-exprimant la sous-unité α2 de la drosophile avec la sous unité α4 du poulet, il a pu être établi que la mutation E219P située au niveau de la boucle B de l'α4 du poulet permet d'augmenter l'efficacité et la sensibilité pour l'IMI sans affecter l'effet de l'ACh (Shimomura et al., 2005). On peut donc conclure de ces études qu'au

niveau de la composante principale, les boucles B et C ainsi que l'intervalle qui les sépare jouent un rôle important dans la liaison des néonicotinoïdes au nAChRs et dans leur sélectivité pour ces insecticides. Concernant la composante secondaire, Matsuda et ses collaborateurs en 2000 ont pu observer une diminution de la sensibilité pour l'IMI en effectuant les mutations G189E et G189D (situé dans la boucle D) de la sous-unité α7 du poulet. La boucle D interagirait avec la partie nitro (-$NO_2$) des néonicotinoïdes (Matsuda et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus, toujours avec la même sous-unité avec la mutation Q79E dans la boucle D (Shimomura et al., 2002). La sensibilité pour l'IMI est par contre augmentée lorsque les mutations T77R, T77K, E79R et E79V sont réalisées au niveau de la sous-unité β2 du rat (toujours dans la boucle D). Ces mutations permettent de se rapprocher des éléments présents dans les sous-unités des insectes (Shimomura et al., 2006). L'efficacité de l'IMI est également augmentée lorsque les boucles D, E et F de la sous-unité β2 du rat sont remplacées par les boucles respectives de la sous-unité *Nl*β1 (la sous-unité β1 de la cicadelle brune du riz, *Nilaparvata lugens*) (Yao et al., 2008). Par conséquent, les acides aminés contenus dans les boucles D, E et F qui forment la composante secondaire du site de liaison de l'ACh jouent des rôles importants dans la liaison et dans la sélectivité des nAChRs d'insecte aux néonicotinoïdes.

Comme pour l'ACh et les nicotinoïdes, les liaisons des néonicotinoïdes établies avec les nAChRs ont pu être identifiées grâce à la cristallisation de ces composés avec *Ls*-AChBP ou *Ac*-AChBP et la modélisation par ordinateur. Entre les deux types d'AChBP, *Ac*-AChBP est plus affine pour les néonicotinoïdes et plus appropriée pour étudier les nAChRs de vertébré et d'insecte alors que *Ls*-AChBP est plus adaptée pour étudier uniquement les nAChRs de vertébré. Les résidus basiques présents au niveau du site de liaison de l'ACh ont la possibilité d'établir des liaisons hydrogènes en contact avec les groupements -$NO_2$ et –NCN des néonicotinoïdes. La formation de ce complexe renforcerait alors le déficit en électron des hydrogènes du groupement imidazolidine au niveau $CH_2$-$CH_2$, ainsi que la nature π-électron de la paire de nitrogènes du même groupement. Cette déficience en électron permet de prédire une interaction avec des acides aminés riches en électrons. La liaison des néonicotinoïdes avec les AChBP se décompose alors en trois étapes: (1) le premier contact, (2) le changement des propriétés électrostatiques et (3) l'attraction pour des résidus riches en électrons (Ihara et al., 2007b ; Matsuda et al., 2009). Les liaisons établies entre les

néonicotinoïdes et les boucles B, C, D et E des AChBP qui ont été cristallisées sont répertoriées dans le tableau 3 et illustrées dans la Figure 14.

***Tableau 3 :*** *Récapitulatif des liaisons entre les néonicotinoïdes et les AChBP.*

| Eléments des néonicotinoïdes | Eléments des AChBP | Type de liaison |
|---|---|---|
| groupement guanidine  | C=O Trp147 (boucle B)<br>Leu102, Met114 (boucle E) | Liaison π-π<br>Liaison hydrogène via une molécule d'$H_2O$ |
| atome Cl | Ile106 (boucle E) | Liaison de van der Waals |
| groupement nitro (-$NO_2$)<br>*spécifique à l'IMI*<br>*spécifique à la clothianidine* | Tyr188 (boucle C)<br>Gln55 (boucle D – *Ls*-AChBP)<br>Gln57 (boucle D – *Ac*-AChBP)<br>changement de la Gln55/57 en Arg | Liaison hydrogène<br>Liaison hydrogène<br>Liaison hydrogène |
| groupement cyané (-NCN) | Ser189 (boucle C) | Liaison hydrogène |

*D'après Tomizawa et al., 2003 ; Wang et al., 2007 ; Ihara et al., 2007, 2008 ; Matsuda et al., 2008 ; Talley et al., 2008 ; Ohno et al., 2009a,b,c ; Tomizawa et Casida 2009.*

Concernant la boucle F des nAChRs, elle jouerait un rôle indirect sur la sélectivité des nAChRs pour les néonicotinoïdes. La Gln163 et Tyr164 de la boucle F pourraient établir des liaisons hydrogène avec la Ser 186 de la boucle C. Dans ce cas, cette dernière n'effectuerait pas de liaison hydrogène avec le groupe nitro (-$NO_2$) de l'IMI et il en résulterait une répulsion électrostatique (Ihara et al., 2008 ; Matsuda et al., 2008).

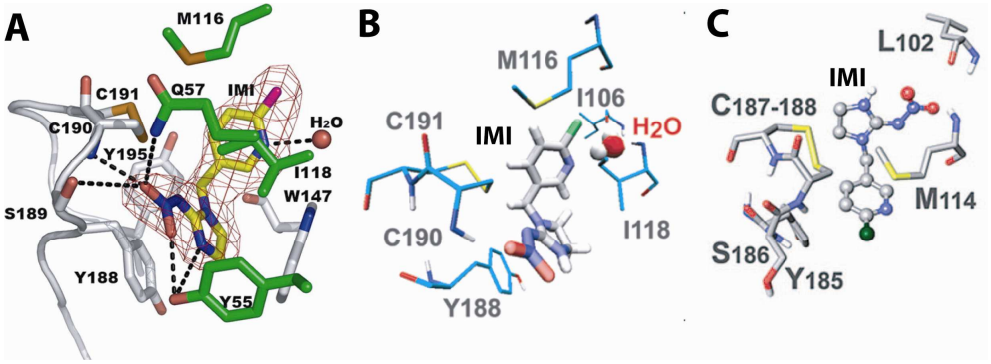



***Figure 14 :*** *Site de liaison des néonicotinoïdes. A, liaison entre l'imidaclopride (IMI) et le Trp147 (W147) de la boucle B, la Ser189 (S189) de la boucle C, et la Tyr55 (Y55) de la boucle D sur l'Ac-AChBP. B, liaison entre l'atome Cl de l'IMI et l'Ile106 (I106) de la boucle E sur l'Ac-AChBP. C, liaison entre l'IMI en position inversée et la Leu102 (L102) et la Met114 (M114) de la boucle sur l'Ls-AChBP.*
*D'après Talley et al., 2008 (A), ) Ohno et al., 2009 (B) et Tomizawa et Casida 2009 (C).*

Les éléments impliqués dans la liaison des nAChRs avec les néonicotinoïdes permettraient également de comprendre les différences d'effets observés entre les néonicotinoïdes sur un même type de nAChR. Les éléments structuraux des nAChRs qui

influencent leur sensibilité à ces insecticides seront développés au cours du chapitre suivant consacré aux insecticides néonicotinoïdes.

# Chapitre III - Les insecticides néonicotinoïdes : généralités et optimisation de leur utilisation

## A. Généralités

Au début des années 70, le centre de recherche biologique de la compagnie Shell Development a synthétisé 6 hétérocycles saturés nitrométhylène qui, de part leur structure proche de celle de la nicotine, sont capables d'agir comme des agonistes des nAChRs. Parmi ces 6 molécules, une présentait un faible effet insecticide contre les mouches *Musca domestica* et contre les pucerons *Acyrtosiphum pisum*. Cette molécule, le SD 031588 fut améliorée pour aboutir à la nithiazine (Figure 15), molécule considérée comme étant le premier néonicotinoïde synthétisé possédant un pouvoir insecticide suffisamment important contre les aphides. Cependant, la nithiazine a pour inconvénient majeur d'être photosensible, et par conséquent d'être inutilisable pour un usage agricole (Jeschke et al., 2008).

**nicotine** **nithiazine**

***Figure 15 :*** *Structures chimiques de la nicotine et de la nithiazine, le premier néonicotinoïde synthétisé.*

A partir des années 80, le travail initié avec la nithiazine a été poursuivi. Plus de 2 000 composés ont été synthétisés. Parmi eux, seul l'IMI émerge. L'IMI présente une efficacité biologique 125 fois supérieure comparée à la nithiazine contre la cicadelle *Nephotettix cincticeps* et présente un potentiel insecticide 10 000 fois plus élevé que la nicotine (Jeschke et al., 2008). L'IMI a pu être introduit sur le marché des produits phytosanitaires en 1991 par la société Bayer sous la formulation GAUCHO® pour l'enrobage des semences. L'IMI est également utilisé en traitement des parties aériennes des plantes sous la formulation CONFIDOR®. L'IMI est l'un des rares insecticides à être utilisé en enrobage des semences grâce à ses propriétés systémiques. En effet, dans ce cas, l'IMI va être diffusé dans toutes les parties de la plante (Laurent et Rathahao 2003), assurant ainsi une protection longue durée contre les insectes. Par la suite, 6 autres néonicotinoïdes ont pu être développés et

commercialisés pour lutter contre les insectes piqueurs suceurs (et contre les phytopathogènes qu'ils véhiculent), certains coléoptères comme les taupins *Agriotes sp*. et contre certains lépidoptères tel que la mineuse des feuilles *Stigmella malella* (Figure 16) (Elbert et al., 2008). L'acétamipride (ACT) et le nitenpyrame sont apparus sur le marché en 1995 respectivement sous les formulations SUPRÊME® et CAPSTAR ® en traitement des parties aériennes des plantes. Alors que l'ACT est essentiellement utilisé en culture fruitière pour lutter contre les pucerons, le nitenpyrame est plutôt utilisé en usage vétérinaire contre les puces sous formes de comprimés oraux. En 1998, est apparu sur le marché mondial le thiaméthoxame sous la formulation CRUISER® pour l'enrobage des semences. Il n'a été autorisé en France qu'en janvier 2008[1], suscitant des polémiques**.** En 2000, le thiaclopride est commercialisé sous la formulation CALYPSO® en application foliaire et en traitement du sol sous la formulation EXEMPTOR® pour lutter contre divers aphides et coléoptères.

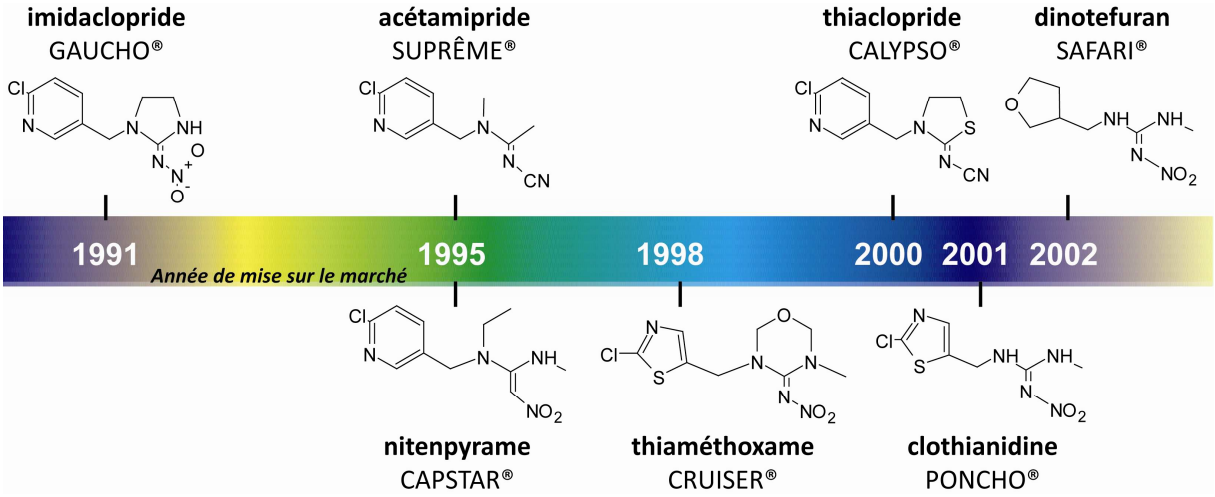


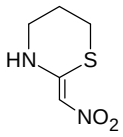
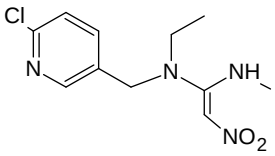
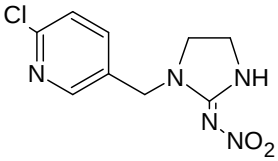
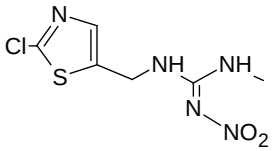
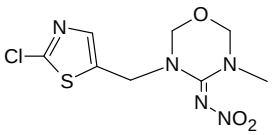
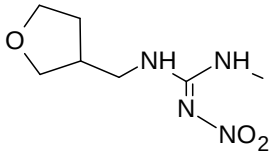
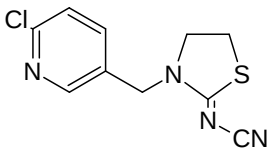
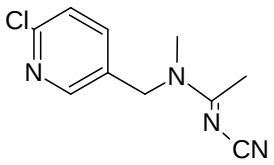

***Figure 16 :*** *Structures chimiques, dates de mise sur le marché et formulations commerciales des principaux néonicotinoïdes. Modifié d'après Elbert et al., 2008.*

En 2001, la clothianidine (qui n'est autre qu'un produit de dégradation du thiaméthoxame, Nauen et al., 2003) a fait son entrée sur le marché mondial des produits phytosanitaires sous la formulation d'enrobage des semences PONCHO®. En dernier, en 2002 le dinotefuran est apparu sur le marché sous la formulation SAFARI®, utilisé pour protéger les plantes d'ornementation contre les pucerons (Figure 16) (Elbert et al., 2008 ; Jeschke et al., 2008). Ces deux derniers néonicotinoïdes ne sont toujours pas autorisés pour un usage agricole en France[1].

[1] http://e-phy.agriculture.gouv.fr

Les néonicotinoïdes peuvent être classés selon leur structure chimique. Cette dernière influence leur activité biologique, leurs propriétés de photostabilité, de métabolisation par les plantes et les insectes et leur toxicité. Ils sont classés en 2 et 3 groupes en fonction du type de pharmacophore qu'ils possèdent ; ce classement est illustré dans le tableau 4.

***Tableau 4 :*** *Classification des insecticides néonicotinoïdes en fonction de leur pharmacophore.*

| **pharmacophores [-N-C(E)=X-Y]** | **composés à cycle de 5 et 6 éléments** | **composés à chaîne ouverte** |
|---|---|---|
| **nitroenamines/nitrométhylènes [-N-C(E)=CH-$NO_2$]** | nithiazine  | nitenpyrame  |
| | imidaclopride  | clothianidine  |
| **N-nitroguanidines/N-nitro-imines [-N-C(E)=N-$NO_2$]** | thiaméthoxame  | dinotefuran  |
| **N-cyano-amidines/N-cyano-imines [-N-C(E)=N-CN]** | thiaclopride  | acétamipride  |

*Modifié d'après Jeschke et al., 2008.*

### B. Les facteurs du succès fulgurant des néonicotinoïdes

Depuis leur commercialisation au début des années 90, les néonicotinoïdes ont acquis une part importante du marché des insecticides. Avec un chiffre d'affaire dépassant le milliard de dollars en 2005, ils sont devenus la 1ère classe d'insecticides la plus vendue dans

le monde, avec une part de marché supérieure à 23%. Ils ont largement conquis la part de marché concernant les enrobages de semences. Avant leur commercialisation, ce segment du marché des insecticides était de 155 millions de dollars, essentiellement dominée par les carbamates, moins efficaces que les néonicotinoïdes pour ce mode d'application. De part leur activité systémique, les néonicotinoïdes offrent une protection prolongée et efficace contre les ravageurs, du stade de semence au stade adulte de la plante. Ainsi, les néonicotinoïdes ont pu surpasser les carbamates à hauteur de 77% (contre 9% pour les carbamates) dans ce secteur de l'enrobage des semences qui s'est développé à 535 millions de dollars en 2005 (Elbert et al., 2008 ; Jeschke et al., 2011).

Les néonicotinoïdes sont les seuls insecticides possédant les 3 modes d'applications efficaces pouvant en partie expliquer leur succès. Ces 3 modes sont les suivants[1] :

- traitements des parties aériennes des plantes : IMI, ACT, thiaclopride, thiaméthoxame, dinotefuran
- traitements du sol : IMI, clothianidine
- enrobage des semences : IMI, thiaméthoxame, clothianidine

Les néonicotinoïdes présentent la particularité d'être parmi les insecticides les moins persistants dans le sol. Cette rémanence dans l'environnement peut-être évaluée via le temps de demi-vie des produits phytosanitaires, $t_{1/2}$. Cette période est la durée nécessaire pour que la moitié de la concentration d'un produit dans le sol soit dégradée. Alors que ce $t_{1/2}$ est de plusieurs années pour les insecticides organochlorés tel que le DDT (5,5 ans), elle n'est que de 2 à 3 mois pour les pyréthrinoïdes et les néonicotinoïdes (Gupta et al. 2007 ; Hatcher et al., 2008). Non seulement d'être peu persistants, les néonicotinoïdes sont efficaces à de faibles doses. Alors que pour être efficaces, le DDT devait être appliqué à raison de 2 000 g par hectare, et 500 g par hectare pour des organophosphorés comme le chlorpyrifos, seulement 50 à 200 g par hectare de pyréthrinoïdes et 70 à 100 g de néonicotinoïdes[1] par hectare suffisent (Calvet et al., 2005 ; Regnault-Roger et al., 2005).

Le facteur le plus important de leur succès est la sélectivité des néonicotinoïdes pour les insectes vis-à-vis des mammifères. Après les pyréthrinoïdes, les néonicotinoïdes sont les insecticides qui présentent le facteur de sélectivité mammifères/insectes le plus fort (Tableau 5) (Tomizawa et Casida, 2005). Ce facteur de sélectivité est calculé en établissant le

[1] http://e-phy.agriculture.gouv.fr

rapport entre la dose létale 50 des mammifères et la dose létale 50 des insectes pour un insecticide donné. Plus le facteur de sélectivité est important, plus l'insecticide concerné est sélectif des insectes par rapport aux mammifères. Cette sélectivité pour les insectes confère aux néonicotinoïdes un haut niveau de « sûreté » d'utilisation comparé aux autres classes d'insecticides, ce qui avec leur efficacité à faible dose, est en grande partie à l'origine de leur succès (Elbert et al., 2008). Les pyréthrinoïdes présentent également ces mêmes caractéristiques, cependant seuls les néonciotinoïdes ont une action systémique offrant une protection totale de longue durée du stade de semence au stade adulte de la plante.

***Tableau 5 :*** *Sélectivité de différentes classes d'insecticides pour les insectes vis-à-vis des mammifères.*

| Classe d'insecticides | cible | $DL_{50}$ (mg/kg) | | Facteur de sélectivité |
|---|---|---|---|---|
| | | insectes | rat | |
| pyréthrinoïdes | Canaux $Na^+$ | 0.45 | 2 000 | 4 500 |
| néonicotinoïdes | nAChRs | 2 | 912 | 456 |
| organochlorés | Canaux $Na^+$ | 2.6 | 230 | 91 |
| organophosphorés | AChE | 2 | 67 | 33 |
| carbamates | AChE | 2.8 | 45 | 16 |

*nAChRs = récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique ; AChE = acétylcholinestérase ; $DL_{50}$ = dose létale 50*
*Le facteur de sélectivité est déterminé de la manière suivante : facteur de sélectivité = $DL_{50}$ rat / $DL_{50}$ insectes.*
*Modifié d'après Tomizawa et Casida 2005.*

## C. Effets indésirables des néonicotinoïdes

### *1. Polémique autour du dépeuplement des colonies d'abeilles*

De part son action systémique, la formulation de l'IMI pour l'enrobage des semences, le GAUCHO® peut exposer les organismes non cibles à la substance active par la contamination du pollen et du nectar des fleurs des cultures traitées (Laurent et Rathahao 2003). Du fait de son rôle d'insecte pollinisateur, l'abeille est considérée comme un insecte utile et tient une place importante aussi bien au niveau écologique qu'agronomique. Simultanément aux premières utilisations du GAUCHO® en traitement des semences de tournesol en 1994, un taux anormal de mortalité et de non retour aux ruches par désorientation des abeilles ont été observés en France. Les apiculteurs ont alors mis en cause le GAUCHO® dans le dépeuplement des colonies d'abeilles et ont demandé à Bayer de les informer des possibles effets toxiques de la substance active sur ces insectes utiles. Il s'en est suivi des études dirigées par des experts de Bayer, le Ministère de l'Agriculture, et des chercheurs indépendants sur l'éventuelle toxicité de l'IMI sur les abeilles (Maxim et van der Sluijs 2007). Suite à cette polémique, le ministre de l'agriculture de l'époque, Hervé Gaymard a décidé de retirer l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'IMI pour son usage en

enrobage des semences du maïs, du tournesol et du colza en 2004[1]. A l'heure actuelle, l'IMI est toujours utilisé en enrobage des semences de céréales, des betteraves et en traitement des parties aériennes[2]. La polémique concernant l'usage des néonicotinoïdes a été de nouveau soulevée en janvier 2008 lorsque le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche a accordé l'AMM du thiaméthoxame sous la formulation CRUISER® pour un usage en enrobage des semences de maïs[2].

Concernant les effets possibles de l'IMI sur les abeilles, il a pu être mis en évidence qu'il avait des effets néfastes sur cet organisme non cible. L'IMI est capable d'induire un effet anorexigène (Nauen et al., 2001a), de diminuer les performances d'apprentissage (El Hassani et al., 2007), les capacités à incuber les œufs et les larves (Decourtye et al., 2004a,b) et de perturber le comportement dans la recherche de nourriture chez *Apis mellifera* (Yang et al., 2008). Les mêmes types de symptômes ont été observés également chez un autre insecte pollinisateur, le bourdon *Bombus terrestis* avec l'IMI, le thiaméthoxame et le thiaclopride (Mommaerts et al., 2009).

### 2. *Impact des néonicotinoïdes sur les autres organismes invertébrés non cibles*

Les néonicotinoïdes peuvent également avoir des effets néfastes sur les ennemis naturels des insectes ravageurs. Ils peuvent induire une augmentation de la mortalité des prédateurs suite à la consommation de proies traitées et non par contact avec l'insecticide comme cela a pu être observé pour les coccinelles *Harmonia axyridis* et *Hippodomia undecimnotata* (Vincent et al., 2000 ; Papachristos et Milonas 2008 ; Moser et Obrycki 2009). Ils peuvent également affecter négativement la reproduction des prédateurs. Ce phénomène a déjà été démontré chez *Neoseilus californicus* et *Phytoseiulus macropilis* (prédateurs de *Tetranychus urticae*(Acari)) suite à l'exposition d'IMI, d'ACT et de thiaméthoxame (Poletti et al., 2007), ou encore chez la coccinelle *Hippodomia candecimnotata* suite à l'exposition à l'IMI (Papachristos et Milonas 2008) à des concentrations inférieures aux doses létales des proies. Les néonicotinoïdes peuvent diminuer les capacités des prédateurs à attaquer leurs proies, comme c'est le cas avec *Neoseilus californicus* et *Phytoseiulus macropilis* (Poletti et al., 2007), ou la capacité des parasites à infester leur hôte, comme par exemple *Anagrus*

[1] Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la pêche
[2] http://e-phy.agriculture.gouv.fr

*nilaparvatae*, un parasite des œufs de la cicadelle brune du riz *Nilaparvata lugens* (Liu et al., 2010).

Les néonicotinoïdes ont également un impact sur les animaux aquatiques et les invertébrés terrestres à des doses sub-létales. Le thiaméthoxame (500 à 700 µg/L d'eau) induit une augmentation de l'agressivité chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Barbee et Stout 2009). Cette augmentation de l'agressivité a pour effet d'augmenter de 80% le taux de mortalité des écrevisses suite aux agressions et au cannibalisme. Les néonicotinoïdes peuvent induire une diminution du comportement locomoteur et péristaltique, perturber la croissance des invertébrés comme l'oligochète aquatique *Lumbriculus variegatus* (Sardo et Soares 2010) ou encore diminuer leur reproduction (Gomez-Eyles et al., 2008 ; Mommaerts et al., 2009). Il a également pu être démontré que l'IMI avait un effet anorexigène chez le ver de vase (larve de *Chironomus tentans*), l'amphipode d'eau douce *Hyallela azteca*, l'oligochète aquatique *Lumbriculus variegatus*, le ver de terre *Dentrobaena octaedra*, le nématode *Caenorhabditis elegans* ou encore le ver du fumier *Eisemia fetida* (Stoughton et al., 2008 ; Kreutzweiser et al., 2008 ; Gomez-Eyles et al., 2008 ; Sardo et Soares 2010).

### *3. Effets secondaires des néonicotinoïdes sur les mammifères*

Bien que les néonicotinoïdes soient plus sélectifs des insectes que des mammifères, l'exposition de ces derniers à des concentrations sub-létales n'est pas sans conséquences. Chez la souris, l'application d'IMI est capable d'induire un dépolarisation membranaire des cellules astrocytaires du noyau cochléaire pour des concentrations de 10 µM (Bal et al., 2010). Les nAChRs du système nerveux central des mammifères peuvent donc être une cible des néonicotinoïdes. Toujours chez la souris, l'exposition à des concentrations allant jusqu'à 3 000 ppm de thiaméthoxame pendant 50 jours induit des tumeurs du foie (Green et al., 2005a,b). Chez le rat, l'exposition au thiaméthoxame (de 50 à 100 mg/kg) entraîne une diminution de l'activité de l'AChE, ainsi qu'une diminution de la capture de choline nécessaire pour la synthèse d'acétylcholine (Rodrigues et al., 2009). Cette étude soulève également la possibilité d'une augmentation de la libération de la sérotonine ce qui permettrait d'expliquer l'effet anxiogène observés chez les rats. Concernant l'IMI, l'exposition des rats à une concentration de 26 mg/kg pendant 2H (dose létale = 424 à 475 mg/kg, en intraveineuse) induit une augmentation du taux de monoxyde d'azote et d'interleukine dans le plasma, le cerveau et le foie (Duzguner et Erdogan 2010). Les effets

induits par les néonicotinoïdes sur le rat et la souris étant différents, il est difficile de pouvoir extrapoler des éventuels effets de ces insecticides chez l'homme. Kocaman et Topaktas en 2007 ont pu montrer qu'à une concentration de 25 à 40 µg/mL de sang, l'ACT possède des effets génotoxique et cytotoxique sur les lymphocytes périphériques humains *in vitro*. Cette étude laisse donc supposer que l'utilisation des néonicotinoïdes à de fortes doses ou de manière récurrente n'est pas sans conséquence sur la santé humaine.

## D. Les résistances aux insecticides néonicotinoïdes

### *1. Facteurs qui influencent l'efficacité des néonicotinoïdes*

#### *α-* Composition en sous-unités

L'expression des différentes sous-unités clonées dans les systèmes hétérologues a permis de mettre en évidence que la composition en sous-unités des nAChRs influence l'efficacité des néonicotinoïdes. L'expression des sous-unités *Mp*α1 à *Mp*α4 avec la sous-unité β2 de rat révèle que seules les combinaisons *Mp*α2/rβ2 et *Mp*α3/rβ2 sont sensibles à l'IMI (Huang et al., 1999). Les combinaisons de sous-unités α SAD, ALS et Dα3 de drosophile avec la sous-unité β2 de rat présentent des affinités différentes à l'IMI. Le couple Dα3/rβ2 présente l'affinité la plus forte par rapport aux deux autres combinaisons. Or, ces récepteurs ne diffèrent que par leur sous-unité α. On peut donc affirmer que la composition en sous-unité α influence l'affinité des nAChRs pour l'IMI (Landsell et Millar 2000). La composition en sous-unités influence également la sensibilité et l'amplitude du courant maximal induit par l'IMI et le nitenpyrame. Alors que SAD/rβ2 est sensible à la fois à l'IMI et au nitenpyrame, ALS/rβ2 est sensible uniquement au nitenpyrame mais avec une amplitude de courant maximal 3 fois plus faible que SAD/rβ2 (Ihara et al., 2003). Les mêmes résultats ont été obtenus concernant l'IMI avec l'expression de *Nl*α1 et *Nl*α2 de la cicadelle brune du riz *Nilaparvata lugens* et leur co-expression avec la sous-unité β2 de rat. *Nl*α1/rβ2 est plus sensible à l'IMI que *Nl*α2/rβ2 mais avec une amplitude de courant maximal plus faible. La co-expression *Nl*α1/ *Nl*α2/rβ2 permet d'obtenir un récepteur avec une sensibilité à l'IMI et une amplitude de courant maximale intermédiaire entre *Nl*α1/rβ2 et *Nl*α2/rβ2 (Liu et al., 2009). Alors que l'expression de *Nl*α3/rβ2 ne permet pas d'obtenir un récepteur fonctionnel, la co-expression de *Nl*α3/ *Nl*α8/rβ2 influence la sensibilité pour l'IMI et l'amplitude du courant qu'il induit par rapport au récepteur *Nl*α8/rβ2. Cette co-expression *Nl*α3/ *Nl*α8 permet d'accroître la sensibilité et l'amplitude du courant maximal induit par l'IMI. (Yixi et al., 2009).

b- Modification des nAChRs

Potentiellement, toute modification située au niveau des éléments intervenant dans le site de liaison des néonicotinoïdes avec les nAChRs est une source de résistance. Les modifications des nAChRs peuvent être soit pré-transcriptionnelles, c'est le cas des mutations, soit post-transcriptionnelles, c'est le cas de l'édition de l'ARN. Il a déjà été démontré que les nAChRs des insectes pouvaient subir une modification post-transcriptionnelle. L'édition de l'ARN d'un A en I a était identifié au niveau des sous-unités *D*α5, *D*α6 et *D*α7 de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Grauso et al., 2002 ; Jin et al., 2007). La substitution d'un A en I dans la sous-unité *Nl*β1 de la cicadelle *Nilaparvata lugens* induit un changement en position 133 de l'asparagine en aspartate. Ce changement d'acide aminé a pour conséquence de diminuer la sensibilité du récepteur pour l'IMI sans affecter la potentialité de l'ACh (Yao et al., 2009). Concernant les modifications pré-transciptionnelles, la mutation Y151S dans la boucle B des sous-unités α1 et α3 de la cicadelle *Nilaparvata lugens* est corrélée avec la résistance de cet insecte aux néonicotinoïdes. Cette mutation induit une diminution de l'efficacité des néonicotinoïdes et une diminution de la sensibilité des récepteurs pour ces insecticides (Liu et al, 2005, 2006 ; Yixi et al., 2009).

La modification des nAChRs peut également s'effectuer par des mécanismes transitoires. La voie de régulation intracellulaire qui implique la PKA et des phosphatases sensibles à l'acide okadaïque induit une modification de l'état de phosphorylation de nAChR1 exprimé par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. Cette modification est capable de diminuer l'efficacité de l'IMI sur ce récepteur (Courjaret et Lapied 2001). Ces mécanismes de régulation permettent à l'insecte de diminuer rapidement l'efficacité des néonicotinoïdes de façon transitoire. Le rôle de la régulation intracellulaire sur l'efficacité des insecticides a également été démontré pour les canaux sodiques au niveau des neurones DUM de *Periplaneta americana*. La régulation de INa2 par la CaMKII permet d'augmenter de 3 000 fois la sensibilité de ce canal pour le DCJW, un insecticide de la famille des oxadiazines (Lavialle-Defaix et al., 2010). L'influence de la régulation intracellulaire sur l'efficacité des insecticides néonicotinoïdes reste une piste à explorer.

*2. Les résistances métaboliques aux insecticides néonicotinoïdes*

Peu de résistances aux néonicotinoïdes ont été développées et observées pour un faible nombre d'insectes ravageurs. De nombreux mécanismes peuvent être à l'origine de

ces résistances, qui la plupart du temps sont des « résistances croisées » à toutes les molécules de cette classe d'insecticides (Nauen et Denholm 2005 ; Mota-Sanchez et al., 2008). Le mécanisme le mieux décrit est l'augmentation de la détoxification des néonicotinoïdes par l'insecte (Nauen et Denholm 2005 ; Mota-Sanchez et al., 2006, 2008). Lorsque l'insecticide pénètre dans le corps de l'insecte, ce dernier a la possibilité de l'éliminer de son organisme via des systèmes enzymatiques de détoxification qui peuvent impliquer des cytochromes P450 (Rauch et Nauen, 2003 ; Honda et al., 2006a), des estérases ou des glutathion-S-transférase. Chez l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci*, l'augmentation de la métabolisation des néonicotinoïdes est corrélée avec la sur-expression des gènes codant pour des cytochrome P450, notamment le gène CYP6CM1 (Karunker et al., 2009). Cette sur-expression du gène CYP6CM1 est directement liée aux résistances exprimées par différentes souches d'aleurodes (Figure 17) (Karunker et al., 2008).

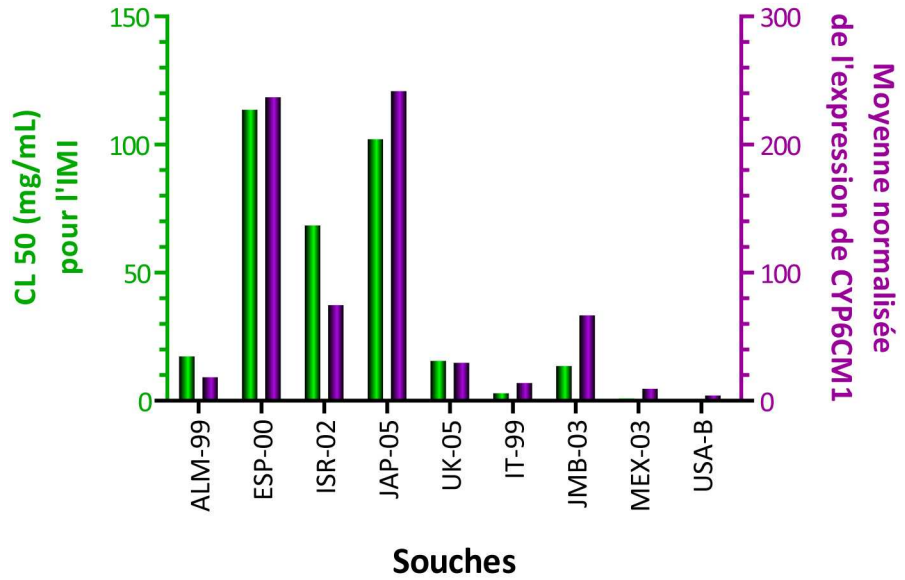



***Figure 17 :*** *Corrélation entre la résistance de souches de l'aleurode du tabac Bemisia tabaci à l'imidaclopride (IMI) et l'expression du gène CYP6CM1 codant pour un cytochrome P450.* Les souches d'aleurode les plus insensibles à l'imidaclopride (ESP-00, ISR-02, JAP-05) possèdent les taux d'expression du gène CYP6CM1 les plus élevés. *$CL_{50}$ = concentration létale 50*. Abréviations des souches d'aleurodes selon le pays et l'année de collecte (pays-année) : ALM-99 (Espagne-1999), ESP-00 (Espagne-2000), ISR-02 (Israël-2002), IT-99 (Italie-1999), JAP-05 (Japon-2005), JMB-03 (Brésil-2003), MEX-03 (Méxique-2003), UK-05 (Grande-Bretagne-2005), USA-B (Etats-Unis, 1994). *Modifié d'après Karunker et al., 2008*

## E. La mise en place de nouvelles stratégies dans l'utilisation des insecticides : quelles perspectives pour les néonicotinoïdes ?

### *1. Nécessité de nouvelles stratégies*

En protégeant les cultures contre les bio-agresseurs (maladies, mauvaises herbes, insectes ravageurs…), les pesticides ont permit d'accroître et de stabiliser les rendements ainsi que d'assurer une qualité des productions agricoles. Ils ne sont pas un facteur direct

d'augmentation de la production mais ils permettent de limiter les pertes. Depuis une dizaine d'années, l'agriculture doit évoluer vers une meilleure prise en compte des exigences environnementales et par conséquent elle doit aller vers une utilisation à bon escient des produits phytosanitaires. Ces produits doivent être utiles à l'optimisation des rendements des cultures, ils ne doivent pas être des facteurs de risques sanitaires.

*2. Association organisme/insecticide*

Une des stratégies mise en place pour lutter contre les insectes ravageurs a été de coupler les insecticides avec des ennemies naturels de ces insectes, c'est-à-dire des prédateurs (coccinelles,…), pathogènes (virus,…) ou parasites (nématodes,…). Depuis plusieurs années l'utilisation des ennemies et/ou parasites naturels s'est développée comme moyen de lutte biologique telle que l'utilisation des coccinelles contre les pucerons ou des virus contre les carpocapses (Arthurs et al., 2005 ; Pervez et Omkar, 2005). Certaines études se sont intéressées à l'impact que pouvait avoir l'utilisation des insecticides sur le pouvoir de prédation, le pouvoir pathogène ou de parasitisme de ces ennemis naturels. Dans certains cas, l'association des moyens de lutte biologique avec une utilisation raisonnée des insecticides peut conduire à un effet synergique ; le nombre d'insectes ravageurs tués en associant les ennemis naturels de ces insectes et des insecticides est supérieur à l'ensemble des insectes tués en utilisant ces deux facteurs seuls.

L'association de *Metarhizium anisoplae,* entomopathogènes spécifique des taupins *Agriotes lineatus et A. obscurus* (un des ravageurs le plus préoccupant et redoutable des semences de céréales et des pommes de terre), avec du spinosad (classe d'insecticide d'origine fongique, antagoniste des récepteurs nicotiniques) permet d'augmenter le pouvoir pathogène du champignon et d'obtenir un effet synergique (Ericsson et al., 2007). Concernant l'association de virus avec des insecticides, aucune stratégie n'a encore été mise en place. Cependant, une étude sur l'association de virus recombinant permettant de sur-exprimer des protéines kinases/phosphatases qui permettrait d'augmenter la sensibilité des organismes visés aux insecticides est en cours (Lapied et al., 2009).

Pour les insecticides néonicotinoïdes, comme pour les insecticides diamides (une classe d'insecticides récemment découverte), leur association avec des nématodes *Heterorhabditis bacteriophora* et *Heterorhabditis newzealandica,* parasites spécifiques des scarabées *Anomala orientalis, Popillia japonica* et *Cyclocephala borealis* permet d'obtenir un

taux de mortalité supérieur à l'ensemble des mortalités obtenus en utilisant les insecticides seuls ou les nématodes seuls (Figure 18) (Koppenhöfer et al., 2002 ; Koppenhöfer and Fuzy 2008a, 2008b ; Morales-Rodriguez and Peck 2009).

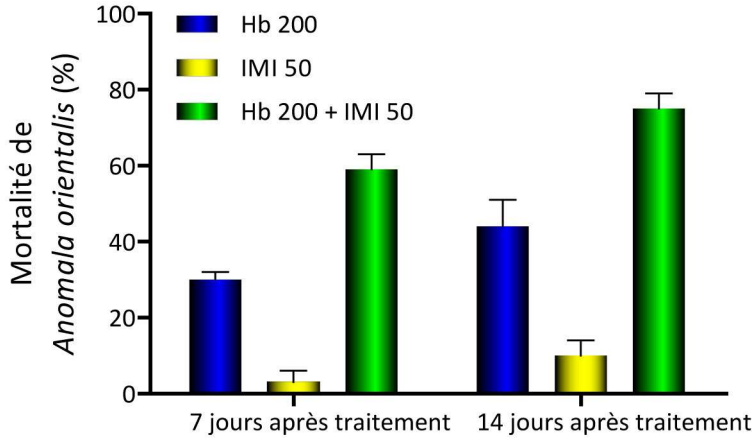



***Figure 18 :*** *Effet synergique de l'association d'un nématode Heterorhabiditis bacteriophera (Hb) et de l'imidaclopride (IMI) sur la mortalité des scarabées Popillia japonica et Cyclocephala borealis.*
*Hb 200 = 200 juvéniles Heterorhabiditis bacteriophera par larve de 3ème stade.*
*IMI 50 = imidaclopride appliqué à une concentration de 50g par hectare*
*Modifié d'après Koppenhöfer et Fuzy 2008b.*

Les auteurs ont montré que la diminution de l'activité de fuite et de défense des larves de scarabées suite à l'application des insecticides permet d'obtenir une augmentation de la possibilité d'attache et de pénétration des nématodes dans le système digestif de l'insecte.

### *3. Association insecticide/substance synergisante*

Lorsque l'insecticide pénètre dans l'organisme de l'insecte, ce dernier a la possibilité de le dégrader grâce à des systèmes enzymatiques de détoxification qui impliquent des cytochromes P450, des estérases et/ou des glutathion-S-transférase. Une des origines de résistances des insectes à plusieurs classes d'insecticides est l'augmentation du taux de ces enzymes (Haubruge et Amichot 1998). Le pypéronyl butoxide (PBO) est un inhibiteur des estérases et des cytochromes P450 mono-oxygénases (Khot et al., 2008 ; Bingham et al., 2007, 2008 ). L'utilisation seule du PBO n'a pas d'effet insecticide (Bynum et al., 1997 ; Devine et al., 1998). Cependant, il a été montré que l'application du PBO avant l'application de certains insecticides tel que l'α-cyperméthrine (pyréthrinoïde) et le pirimicarb (carbamate) permet d'augmenter l'efficacité de ces derniers pour lutter contre l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci* (Bingham et al., 2007, 2008). Les résistances aux néonicotinoïdes dues à l'augmentation de leur détoxification par les insectes ravageurs via des cytochromes P450 peuvent donc être contrecarrées par une association avec du PBO. Chez l'aleurode du tabac

*Bemisia tabaci*, la résistance de certaines souches à l'IMI et à l'ACT a pu être résolue. En appliquant du PBO 5 heures avant l'application de l'insecticide, les doses nécessaires pour lutter contre l'aleurode sont fortement diminuées (Figure 19) (Bingham et al., 2008).

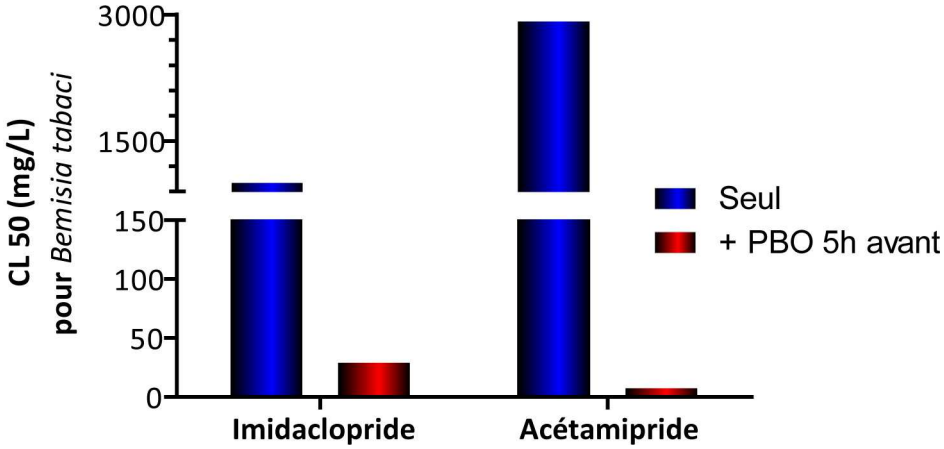



***Figure 19 :*** *Concentration létale (CL) 50 pour l'aleurode du tabac Bemisia tabaci après application d'imidaclopride (IMI) et d'acétamipride (ACT) seul ou après traitement au PBO 5 heures avant.*
*Modifié d'après Bingham et al., 2008*

### *4. Association insecticide/insecticide*

Parmi les alternatives pour diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires, la stratégie d'associer deux insecticides avait déjà été évoquée et observée dès la fin des années 80. Un effet synergique a été observé en associant des pyréthrinoïdes et des organophosphorés contre des insectes ravageurs de culture tel que la cicadelle *Nephotettix cincticeps* et la noctuelle *Spodoptera littoralis* (Ascher et al., 1986). Cet effet a également été observé comme étant efficace contre les acariens *Tetranychus urticae Koch* et *Oligonychus pratensis* (Bynum et al., 1997), la noctuelle *Helicoverpa armigera* (Martin et al., 2003), et le thrips *Frankliniella occidentalis* (Bielza et al., 2007). L'association de pyréthrinoïde et de carbamate présente également un effet synergique efficace contre le moustique *Culex quinquefasciatus* (Corbel et al., 2003). A l'heure actuelle, les associations de néonicotinoïdes avec des pyréthrinoïdes sont déjà utilisées pour lutter contre les résistances croisées (Elbert et al., 2008). Cependant aucun effet synergique, ni même additif a été observé pour ces combinaisons d'insecticides (Bradshaw et al., 2008 ; Peck et al., 2008).

## F. L'acétamipride, un néonicotinoïde d'intérêt

L'ACT fut synthétisé en 1989 (Tomizawa et Casida 2005) et mis sur le marché en 1995 pour un usage en application foliaire (Elbert et al., 2008 ; figure 16 p31). L'ACT présente une

structure chimique différente de l'imidaclopride, le premier néonicotinoïde commercialisé. En effet, l'ACT est un composé à chaîne ouverte avec un pharmacophore cyano-amidine alors que l'IMI est un composé à cycle de 5 éléments avec un pharmacophore nitro-méthylène (Jeschke et al., 2008 ; tableau 4 p32). Ces différences de structure entre les néonicotinoïdes modulent l'action agoniste de ces molécules (Tan et al., 2007).

L'ACT est l'un des néonicotinoïdes qui présentent le moins d'effets sur les organismes non-cibles. L'ACT affecte négativement la reproduction des prédateurs de nuisibles tels que *Neoseilus californicus* et *Phytoseiulus macropilis* (Poletti et al., 2007). L'ACT présente également des effets génotoxiques et cytotoxiques sur les lymphocytes humains *in vitro* à une concentration de 25 à 40 µM/mL de sang (Kocaman et Topaktas 2007). Malgré ces effets néfastes, l'ACT est l'un des néonicotinoïdes les moins nocifs pour l'abeille contrairement à l'IMI. En effet, cette molécule n'affecte ni l'apprentissage ni le processus de mémorisation chez l'abeille *Apis mellifera* (Aliouane et al., 2009). Peu de résistances à l'ACT ont été développées, elles sont généralement moins importantes que pour les autres néonicotinoïdes (Foster et al., 2003 ; Ninsin 2004 ; Mota-Sanchez et al., 2006). Ces résistances sont majoritairement des résistances métaboliques qui peuvent être contournées en associant l'ACT avec du PBO (Bingham et al., 2008 ; figure 19 p42).

L'optimisation de l'utilisation des insecticides passe par une diminution des risques qu'ils représentent pour les organismes non-cibles. L'ACT étant un néonicotinoïde avec peu d'effets sur les organismes non-cibles (comparé aux autres composés de sa classe), il est un bon candidat pour une optimisation de l'utilisation des néonicotinoïdes.

# 2ème partie : MODELE BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

## Avant-propos

L'optimisation de l'utilisation des néonicotinoïdes demande une meilleure compréhension de leur mode d'action et des mécanismes cellulaires qui influencent leur efficacité ; il s'agit de l'objectif de ce travail de thèse. Les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* ont la particularié d'exprimer deux sous-types de nAChRs, nAChR1 et nAChR2, respectivement sensible et insensible à l'IMI. L'ACT est une néonicotinoïde de seconde génération qui présente au niveau structural des pharmacophores différents de ceux de l'IMI et contrairement à ce dernier, il présente peu d'effets sur les organismes non-cibles. Pour ces raisons, cette étude s'est focalisée sur ce néonicotinoïde pour optimiser son utilisation. Au cours de ce travail, un possible effet de l'ACT sur les deux sous-types de nAChRs exprimés par les neurones DUM contrairement à l'IMI a été étudié et les facteurs qui influencent l'efficacité des néonicotinoïdes sur ces nAChRs ont été recherchés. Les neurones DUM présentent deux avantages pour mener à bien cette étude :

- la plupart des cibles neuronales des insecticides (récepteurs et canaux ioniques membranaires) sont exprimés et connus au niveau des neurones DUM (Buckingham et al., 1997 ; Raymond et al., 2000 ; Lapied et al., 2001 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Le Corronc et al., 2002 ; Thany et al., 2008, 2009 ; Gautier et al., 2008 ; Wang et al., 2010 ; Lavialle-Defaix et al., 2010 ; Murillo et al., 2011).
- les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces cibles sont pour la plupart connues (Alix et al., 2002 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et al., 2003 ; Lavialle-Defaix et al., 2010 ; Murillo et al., 2011)

# Chapitre I : Les neurones « Dorsal Unpaired Median » du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*

## A. Généralités

Le système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana* est constitué d'une chaîne nerveuse ganglionnaire ventrale. Les ganglions sont subdivisés en 4 catégories selon leur position dans la chaîne nerveuse. On distingue ainsi les ganglions cérébroïdes (ou cerveau), les ganglions sous-œsophagiens, les ganglions thoraciques et les ganglions abdominaux (Figure 20).

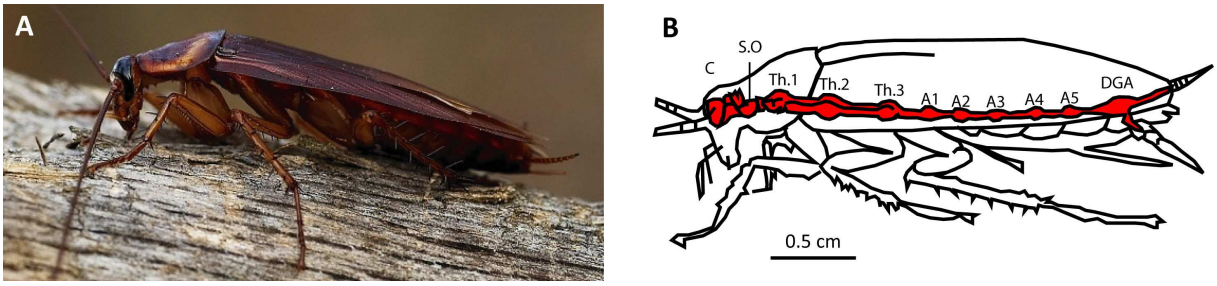



***Figure 20 :*** *A, Photographie d'une blatte mâle Periplaneta americana (photo de Zbyněk Šrédl). B, En rouge, représentation du système nerveux central de la blatte Periplaneta americana. C : cerveau ; S.O : ganglion sous-œsophagien ; Th.1 à Th3 : ganglions thoraciques ; A1 à A5 : ganglions abdominaux ; DGA : dernier ganglion abdominal.*

A l'exception des ganglions cérébroïdes, tous les ganglions de la chaîne nerveuse présentent des neurones situés au niveau de leur ligne médiane et qui ont la particularité de ne pas avoir d'homologue, ils sont nommés impairs (Bräunig et Plüger 2001).

Ces neurones impairs se situent :

- soit au niveau ventral du ganglion, ils sont alors nommés les neurones « Ventral Unpaired Median » (VUM) ;
- soit au niveau dorsal du ganglion, ils sont alors nommés les neurones « Dorsal Unpaired Median » (DUM ; Figure 21).

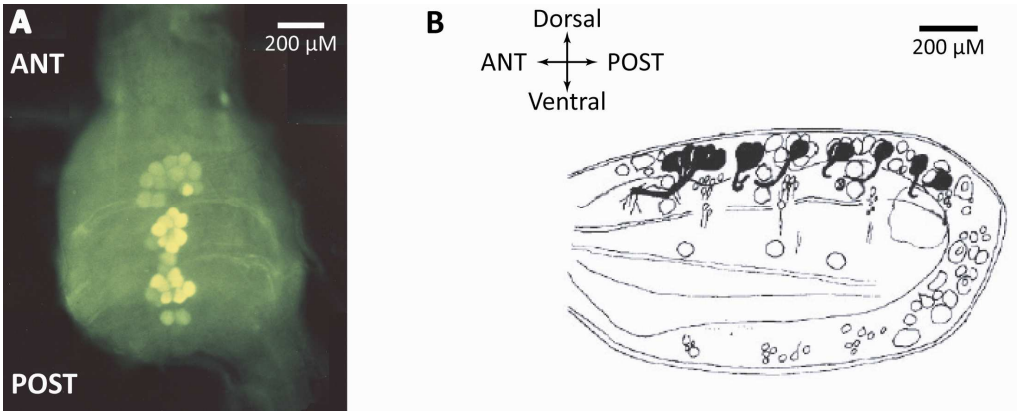



***Figure 21 :*** *A, Localisation des corps cellulaires des neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine. ANT : antérieur ; POST : postérieur. (Modifié d'après Sinakevitch 1995). B, Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana précisant la localisation des corps cellulaires des neurones DUM (en noir) à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (Modifié d'après Sinakevitch et al., 1996).*

### B. Critères morphologiques des neurones DUM

Les neurones DUM ont été notamment bien caractérisés chez les orthoptères (Bräunig et Plüger 2001). Ils sont absents des ganglions cérébroïdes et sous-œsophagiens des orthoptères mais ils sont nombreux au sein du dernier ganglion abdominal qui résulte de la fusion des ganglions primitifs de A7 à A11 (Sinakevitch 1995). Ils sont issus des cellules embryonnaires appelées « unpaired median neuroblast » (MNB). De ces cellules souches, 3 grands types de neurones DUM vont se différencier (Bräunig et Plüger 2001) :

- les neurones **DUM efférents**. Ces neurones présentent un large soma (30 à 60 µM) piriforme d'où émerge un neurite primaire. Il s'agit de cellules neurosécrétrices qui synthétisent et libèrent de l'octopamine. Cette amine biogène est considérée comme étant un neuromodulateur, un neurotransmetteur et une neurohormone (Roeder 1999 ; Bräunig et Plüger 2001)
- les neurones **DUM intersegmentaires**. Ces neurones présentent un soma de plus petite taille (10 à 20 µM) et une arborisation en « H » reliant les ganglions entre eux par des connectifs. Il s'agit également de cellules neurosécrétrices mais qui dans leur cas synthétisent et libèrent de l'acide-γ-aminobutyrique (GABA).
- Les **interneurones DUM locaux**. Ces neurones présentent également un soma de plus petite taille (10 à 20 µM). Leur arborisation neuritique se propage uniquement au sein du ganglion. Il s'agit également de cellules neurosécrétrices GABAergiques.

Le rôle physiologique des neurones DUM est fonction du type de neurone DUM et de leur localisation au sein de la chaîne nerveuse. Ainsi, les neurones DUM intersegmentaires permettent la propagation de l'information nerveuse entre les ganglions alors que les interneurones DUM locaux intègrent le signal au sein d'un même ganglion. Concernant les DUM efférents octopaminergiques, ils vont principalement innerver les muscles squelettiques et viscéraux (Bräunig et Plüger 2001). Les DUM octopaminergiques sont également impliqués dans la modulation des organes sensoriels (Ramirez et Orchard 1990). Le marquage par chlorure de cobalt montre que chez la blatte mâle *Periplaneta americana*, les neurones DUM du dernier ganglion abdominal ont pour cibles le cœur, la glande sexuelle et la glande conglobée (Sinakevitch, 1995 ; Sinakevitch et al., 1994 ; 1996).

### C. Critères électrophysiologiques des neurones DUM efférents du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*

Les neurones DUM efférents du dernier ganglion abdominal ont un potentiel de membrane compris entre -45 et -60 mV. Ils génèrent des potentiels d'action de grande amplitude (110 mV) à une fréquence régulière sans excitation afférente (Lapied et al., 1989, Figure 22).

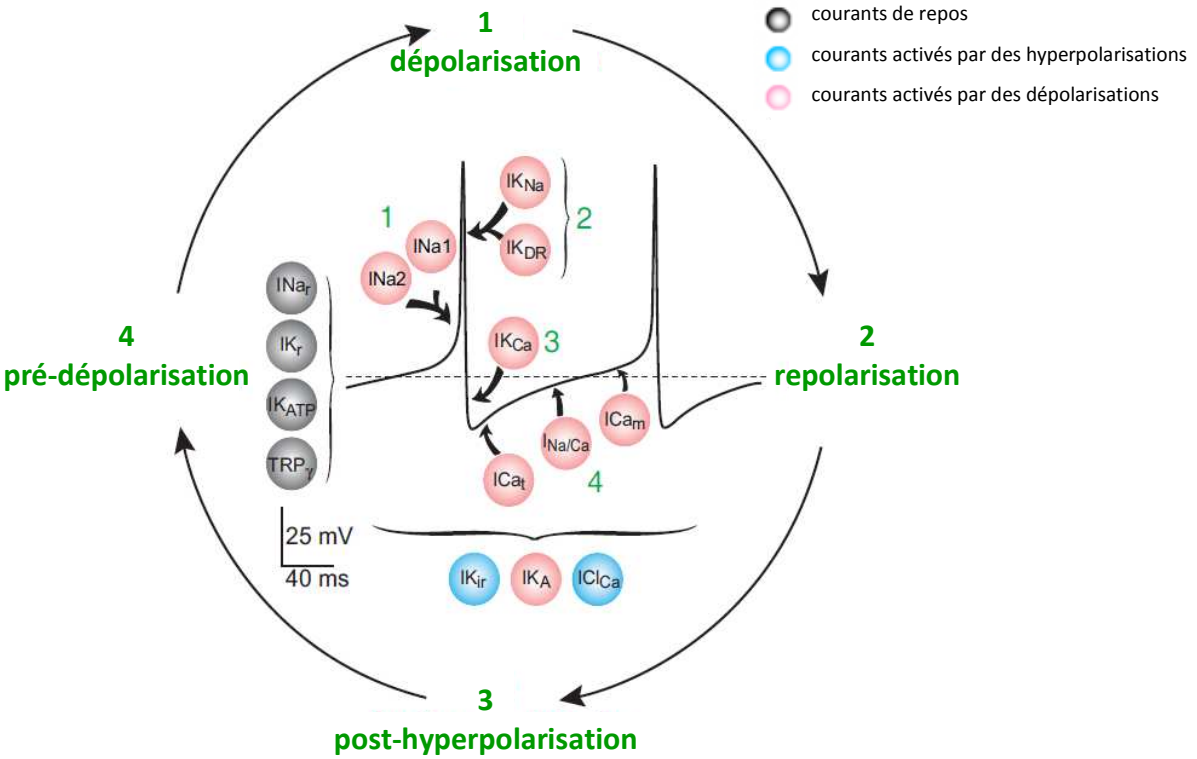



***Figure 22 :*** *Courants ioniques impliqués dans l'activité électrique spontanée des neurones DUM de la blatte Periplaneta americana. Modifié d'après Grolleau et Lapied 2000 ; Dugravot et al., 2003 ; Defaix et Lapied 2005 ; Lavialle-Defaix et al., 2006.*

Cette activité spontanée, dite « pacemaker » est une propriété intrinsèque au corps cellulaire. Elle est déclenchée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel. Cette activité spontanée est modulée par des canaux ioniques générant des courants dits de repos (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et al., 2001 ; Defaix et Lapied 2005 ; Lavialle-Defaix et al., 2006). Les caractéristiques de ces différents canaux ont largement été décrites ainsi que les mécanismes de régulation de ces différents courants ioniques (Figure 22) (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et al., 2001 ; Dugravot et al., 2003 ; Defaix et Lapied 2005 ; Lavialle-Defaix et al., 2006).

### D. Les récepteurs ionotropes exprimés au niveau des neurones DUM

Les neurones DUM expriment des récepteurs ionotropes activés par :

- un neurotransmetteur excitateur, l'ACh. Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique exprimés par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* sont décrits de la page 17 à 21.

- des neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le GABA et le glutamate.

Des récepteurs au glutamate perméables aux ions chlorures ont été pharmacologiquement caractérisés au niveau des neurones DUM thoraciques du criquet *Locusta migratoria* (Janssen et al., 2007). Deux types de récepteurs au glutamate sont exprimés au niveau de neurone DUM de la blatte *Periplaneta americana*. L'activation de ces récepteurs induit une hyperpolarisation membranaire (Raymond et al., 2000). Ces récepteurs sont la cible d'un insecticide phénylpyrazole, le fipronil.

Le fipronil agit également au niveau des récepteurs au GABA (GABAR). Il s'agit de récepteurs perméables aux ions chlorures. L'activation des GABAR au niveau des neurones DUM induit une hyperpolarisation que ce soit sur des neurones *in situ* chez la blatte *Periplaneta americana* (Le Corronc et al., 2002) ou sur des neurones isolés du criquet *Locusta migratoria* ( Janssen et al., 2010) ou de la blatte *Periplaneta americana* (Alix et al., 2002). Au niveau des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* deux types de GABAR ont été caractérisés présentant une sensibilité différentes pour le fipronil (Le Corronc et al., 2002 ; Murillo et al., 2011).

# Chapitre II : Techniques expérimentales

## A. Technique de culture à court terme

### 1. *Matériel biologique*

Les neurones DUM sont isolés du dernier ganglion abdominal de blattes mâles *Periplaneta americana*. Les blattes sont issues de l'élevage du laboratoire. Elles sont élevées à température constante de 29°C avec une photopériode alternant 12H de luminosité et 12H d'obscurité. Du fait qu'il soit moins recouvert de tissus adipeux, le système nerveux des blattes mâles est plus facilement isolable que celui des femelles. De plus, la plupart des connaissances anatomiques, fonctionnelles et électrophysiologiques proviennent d'expérimentations effectuées sur des blattes adultes mâles (Hue et Callec, 1990).

### 2. *Prélèvements des derniers ganglions abdominaux*

Le protocole de dissociation a été élaboré au sein du laboratoire (Lapied et al., 1989) ; il est réalisé en conditions stériles. Pour faciliter la dissection des blattes, les animaux sont anesthésiés pendant 10 minutes à une température de 5°C. Après avoir sectionné la tête, les pattes et les ailes, la blatte est fixée face dorsale sur un support en polystyrène recouvert d'aluminium désinfecté à l'alcool. La chaîne nerveuse de la blatte étant située sur la face ventrale, la dissection est effectuée de ce côté permettant ainsi d'éviter toute contamination par le tube digestif de l'animal lors du prélèvement. Sous loupe binoculaire (x6.4), une fenêtre est incisée dans la cuticule au dessus du dernier ganglion abdominal. Les organes sont aussitôt recouverts de LP1 afin d'éviter que la préparation ne se dessèche. La glande conglobée et les glandes accessoires sont retirées. Les trachées, les nerfs périphériques et les nerfs cercaux sont sectionnés. Six ganglions sont ainsi prélevés et déposés dans une boîte de Pétri remplie avec du LP1 (Tableau 6). Sous loupe binoculaire (x16), à l'aide d'aiguilles montées, les ganglions sont ensuite nettoyés des restes trachéens, des nerfs périphériques et connectifs (Figure 23).

### 3. *Digestion enzymatique*

Une fois les ganglions prélevés et nettoyés, ils sont transférés dans un tube à hémolyse stérile contenant 300 UI/ mL de collagénase de type IA (LP2, Tableau 6). La digestion enzymatique est effectuée dans une étuve à une température constante de 29 °C

en atmosphère humide pendant 30 minutes. Les ganglions sont ensuite rincés dans deux boîtes contenant du LP1 (Figure 23 ; Tableau 6).

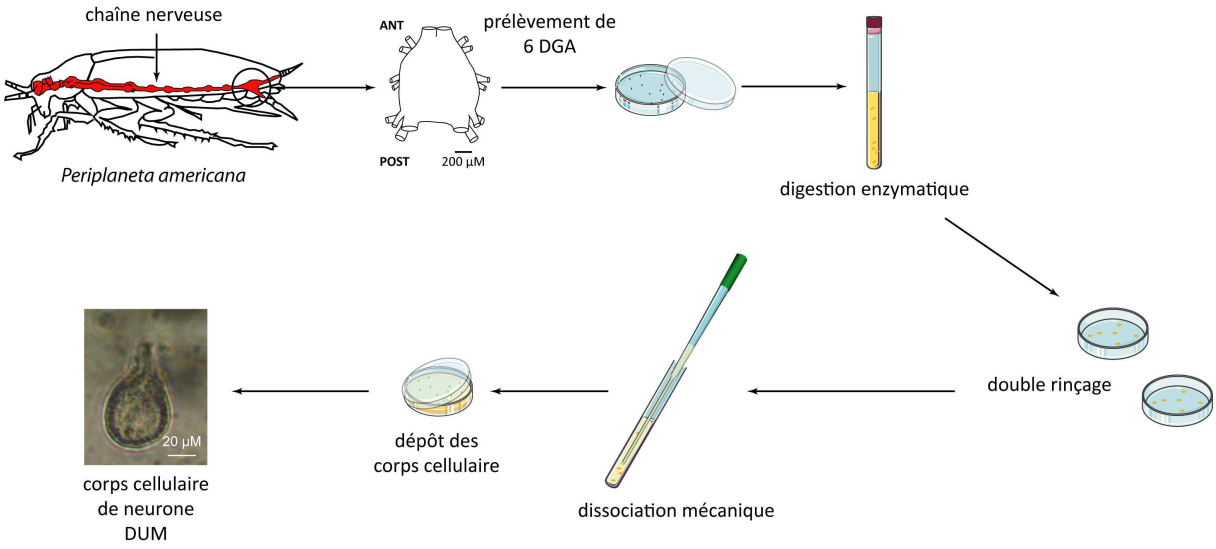



***Figure 23 :*** *Protocole de dissociation et de mise en culture à court terme des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana. DGA : dernier ganglion abdominal ; ANT : antérieur ; POST : postérieur*

### *4. Dissociation mécanique*

Les ganglions sont transférés dans un tube contenant le milieu de survie enrichi en sérum de veau fœtal (LP3, Tableau 6). La dissociation mécanique est effectuée par aspirations et refoulements successifs au travers de pipettes pasteur dont le diamètre a été progressivement réduit à la flamme. Le milieu de survie contenant les neurones dissociés est ensuite déposé dans des boîtes de Pétri ayant préalablement été traitées à la poly-D-lysine (100µg/mL). La poly-D-lysine permet l'adhésion des neurones sur le fond de la boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite placée pendant 24H dans une étuve à 29°C en atmosphère humide avant toute expérimentation (Figure 23).

***Tableau 6 :*** *Composition des liquides physiologiques utilisés au cours de la dissociation et la mise en culture des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana.*

| | **LP** | **LP1** | **LP2** | **LP3** |
|---|---|---|---|---|
| **NaCl** (mM) | 200 | 200 | 200 | 200 |
| **KCl** (mM) | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| **CaCl2** (mM) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| **MgCl2** (mM) | 4 | 4 | 4 | 4 |
| **sucrose** (mM) | 50 | 50 | 50 | 50 |
| **HEPES** (mM) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| **pénicilline** (UI/mL)<br>**streptomycine** (µg/mL) | 0<br>0 | 100<br>100 | 0<br>0 | 50<br>50 |
| **collagénase** (UI/mL) | 0 | 0 | 300 | 0 |
| **sérum de veau fœtal** (%) | 0 | 0 | 0 | 5 |
| **pH** ajusté avec NaOH | 7.4 | 7.4 | 7.4 | 7.4 |

## B. Technique électrophysiologique du patch-clamp

### 1. *Principe de la technique*

La technique électrophysiologique du patch-clamp a été mise au point à la fin des années 1970 par Sakmann et Neher (Neher et al., 1978) puis améliorée par Hamill et ses collaborateurs (Hamill et al., 1981). Cette technique permet de travailler à l'échelle élémentaire ou à l'échelle de la cellule entière sur les courants ioniques en isolant électriquement une portion de membrane cellulaire.

La pipette de patch possède un diamètre inférieur au micromètre. Elle est approchée progressivement à proximité de la membrane de la cellule. Une légère pression positive est maintenue afin d'éviter toute contamination de la pointe de la pipette par des débris cellulaires ou par le milieu extracellulaire.

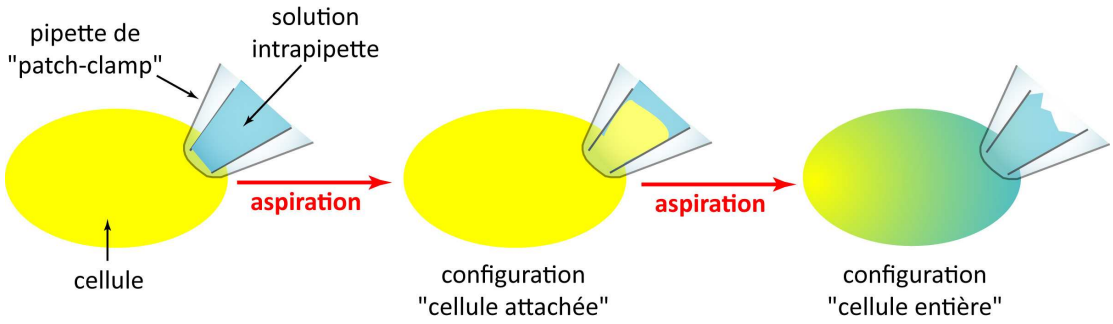



***Figure 24 :*** *Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière » en patch-clamp.*

Lorsque la pipette est suffisamment proche de la cellule, une légère pression négative est appliquée afin d'assurer l'isolement électrique de la portion de membrane. Cette légère pression négative permet de créer un scellement hermétique entre la pipette de patch-clamp et la cellule. Ce scellement crée une zone de forte résistance appelée résistance de scellement ou « gigaseal », sa valeur dépassant le giga-ohms ($10^9\Omega$). Cette configuration est appelée « cellule attachée » (Figure 24). Une pression négative supplémentaire est alors appliquée afin d'entraîner une rupture nette de la membrane se situant sous la pointe de la pipette de patch-clamp. Cette rupture de la membrane permet alors d'obtenir une continuité physique et électrique entre la pipette et le cytoplasme de la cellule. Cette configuration est appelée « cellule-entière » (Figure 24).

La configuration « cellule-entière » présente comme avantage pour l'expérimentateur de pouvoir contrôler non seulement le milieu extracellulaire mais également le milieu intracellulaire. Il peut alors appliquer des agents pharmacologiques dans

le milieu extracellulaire ou dans le milieu intrapipette (si ces derniers sont non perméables). Cette configuration « cellule entière » permet de soit enregistrer la variation de potentiel en mode « courant imposé » soit en mode « potentiel imposé » d'enregistrer l'activité de l'ensemble des canaux présents à la surface de la membrane. Le courant global, aussi appelé courant macroscopique fait intervenir tous les canaux/récepteurs ouverts à un temps t pour un potentiel V donné de tel sort que :

$$I = N \cdot Po_{(t,V)} \cdot i$$

où I = courant macroscopique, N = nombre de canaux/récepteurs, $Po_{(t,V)}$ = probabilité d'ouverture à un instant t et à un potentiel V, i = courant élémentaire.

Cependant, l'inconvénient majeur de la configuration « cellule entière » est la dilution des composants intracellulaires (processus de « wash-out ») tels que les seconds messagers par la solution intrapipette. Cette dilution des composants intracellulaires peut entraîner une diminution progressive du courant au cours du temps (phénomène de « run-down »). Ce phénomène de « run-down » peut être réduit par l'enrichissement de la solution intrapipette par des composés tels que l'ATP ou l'AMPc.

*2. Dispositif d'enregistrement*

La technique de patch-clamp en configuration « cellule entière » est adaptée sur les corps cellulaires des neurones DUM efférents isolés du dernier ganglion abdominal par Lapied (1991). Après 24H d'incubation, les boîtes de culture contenant les neurones DUM isolés sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, Rungis, France) positionné sur une table antivibratoire intégrée dans une cage de Faraday. Les neurones DUM efférents sont identifiés grâce à deux critères :

- des critères morphologiques. Sont sélectionnées uniquement les cellules présentant un corps cellulaire piriforme d'un diamètre compris entre 30 et 60 µM (Sinakevitch, 1996).
- des critères électrophysiologiques. Les neurones DUM efférents présentent une activité électrique spontanée (Grolleau et Lapied, 2000) qu'il est aisé de vérifier en mode « courant imposé ».

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicatés (GC 150 T-10, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) au moyen d'une étireuse horizontale P-97 (Sutter Instruments, Novato, Etats-Unis). Elles sont fixées sur un

porte-électrode à la partie mobile de l'amplificateur opérationnel (tête de l'amplificateur). L'ensemble pipette + tête de l'amplificateur est déplacé à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique tridimensionnel (Burleigh TS-5000-150, Burleigh Instruments, New-York, Etats-Unis) permettant un déplacement minutieux de l'électrode de patch-clamp. L'électrode est connectée à un amplificateur (Axopatch 200A, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis). Les signaux électriques sont filtrés à l'aide d'un filtre passe-bas d'une fréquence de 5 kHz.

Le dispositif comporte un amplificateur opérationnel (AOP) fonctionnant en convertisseur courant-tension. L'AOP maintient une tension nulle à ses bornes à travers la boucle de contre-réaction. Le courant ionique converti en courant électrique (I) passe intégralement dans la résistance de contre-réaction (RCR) (Figure 25).

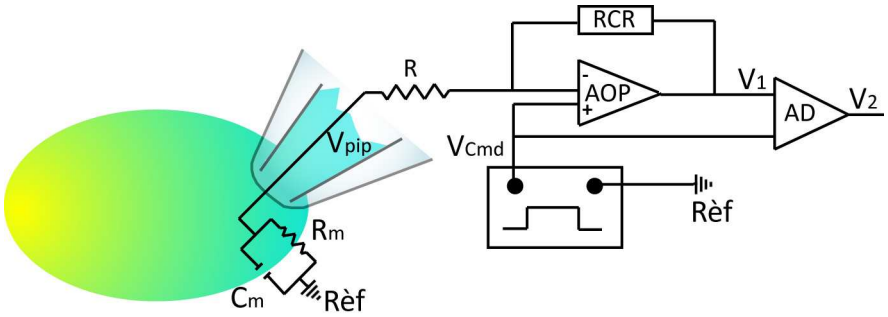



***Figure 25 :*** *Schéma simplifié du principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ». AD : amplificateur différentiel ; AOP : amplificateur opérationnel ; Cm : capacité membranaire ; R : résistance ; Rèf : potentiel de référence ; RCR : résistance de contre-réaction ; $R_m$ : résistance membranaire ; $V_{cmd}$ : potentiel de commande ; V1 : potentiel à la sortie de l'AOP ; V2 : potentiel à la sortie de l'AD.*

En condition de potentiel imposé, l'AOP force le potentiel de pipette ($V_{pip}$) à suivre le potentiel imposé par l'expérimentateur ($V_{cmd}$). Un amplificateur différentiel (AD) compare constamment le potentiel à sa sortie ($V_2$) et $V_{cmd}$ selon la formule :

$$V_2 = V_{cmd} - V_1$$

Si $V_2$ est différent de 0, l'amplificateur calcul le courant nécessaire pour maintenir $V_{cmd}$. Le potentiel mesuré à la sortie de l'AD est donc l'image du courant ionique enregistré par l'électrode. La relation suivante peut alors être établie :

$$V_2 = RCR \times I$$

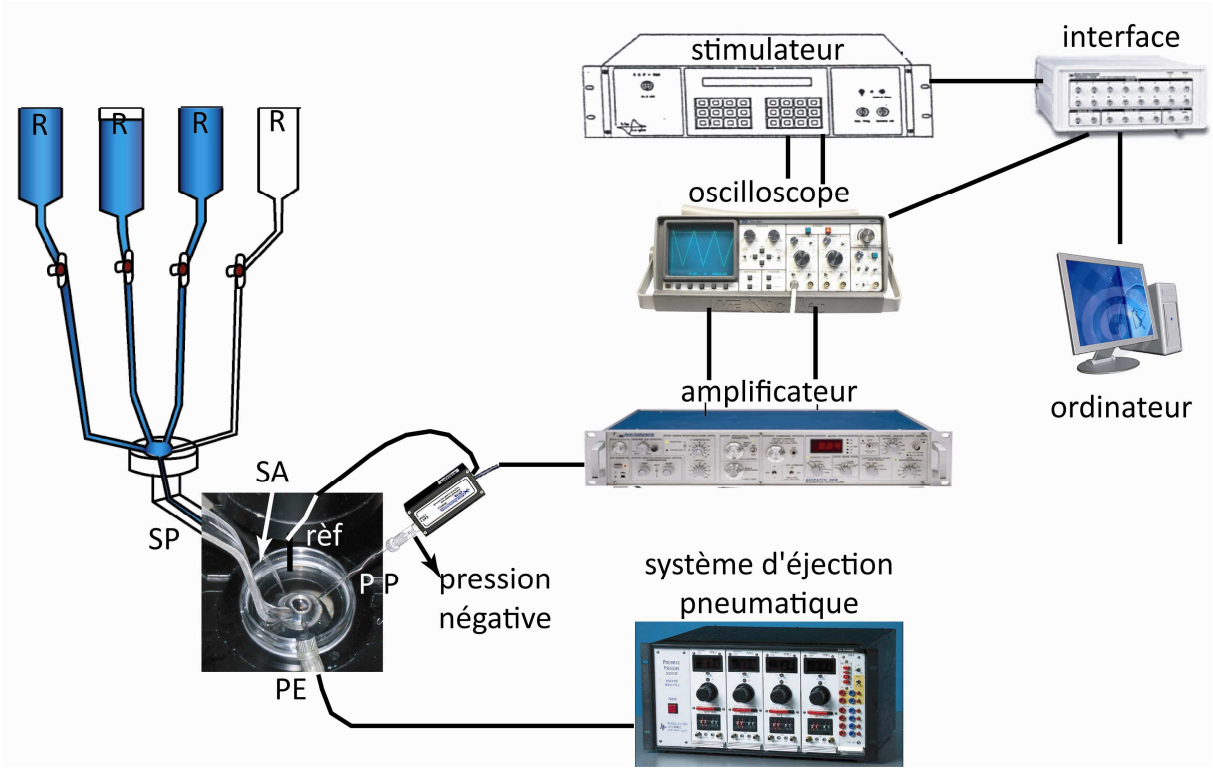



***Figure 26 :*** *Représentation schématique de l'installation de patch-clamp. Les réservoirs (R) sont connectés sur le système de perfusion. Un système d'aspiration (SA) permet de maintenir le renouvellement rapide et le maintient constant d'un niveau de liquide extracellulaire. La pipette de patch-clamp (PP) est fixée sur un porte-pipette relié à un amplificateur. Cet amplificateur mesure la différence de potentiel entre la pipette de patch-clamp et l'électrode de référence (rèf). Pour visualiser les variations de courant ou de potentiel ainsi que le choc envoyé par le stimulateur, l'amplificateur est relié à un oscilloscope. Il est également relié au système d'acquisition pCLAMP via une interface pour enregistrer les tracés.*

Un stimulateur (SMP-310, Biologic, Claix, France) permet d'appliquer des stimulations électriques à la préparation. Les réponses physiologiques sont visualisées sur un oscilloscope (Nicolet 3091, Nicolet Instrument Corporation, Madison, Etats-Unis). Les enregistrements sont effectués sur un ordinateur PC connecté à une interface Digidata 1322A (Axon instruments, Foster City, Etats-Unis), à l'aide du logiciel pClamp (versions 10.0, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis) (Figure 26). L'amplitude des courants ioniques et l'activité électrique sont mesurées et analysées à l'aide du logiciel Clampfit (version 10.0, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis). Les données numériques sont analysées sous le logiciel Prism (version 5.0, GraphPad Software Inc., Etats-Unis).

### C. Composition et application des solutions

Les solutions extracellulaires et intrapipettes ont été optimisées de façon à pouvoir étudier la réponse des récepteurs cholinergiques de type nicotinique insensibles à l'α-bgt (Tableau 7) (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret 2003). Les solutions extracellulaires sont

appliquées sur la cellule à l'aide d'un système de perfusion gravimétrique multi-canaux (Figure 26). Ce système est fixé sur un micromanipulateur (Prior, Cambridge, UK) permettant de le positionner à 100 µM du corps cellulaire du neurone. Ce système couplé à un système d'aspiration assure le renouvellement rapide du milieu extracellulaire ainsi qu'un volume constant, ce qui donne la possibilité de tester différentes substances pharmacologiques. Les insecticides et les agonistes des nAChRs sont appliqués par un système d'éjection pneumatique (Miniframe PPS-2, Medical system Corporation, New York, USA).

***Tableau 7 :*** *Composition des liquides physiologiques utilisés au cours des expériences de patch-clamp.*

| | **solution extracellulaire** | **solution intrapipette** |
|---|---|---|
| **NaCl** (mM) | 200 | 10 |
| **K-D-gluconate** (mM) | 0 | 160 |
| **KF** (mM) | 0 | 10 |
| **KCl** (mM) | 3.1 | 0 |
| **CaCl2** (mM) | 5 | 1 |
| **MgCl2** (mM) | 4 | 0.5 |
| **HEPES** (mM) | 10 | 20 |
| **EGTA** (mM) | 0 | 10 |
| **ATP-Mg** (mM) | 0 | 3 |
| **AMPc** (mM) | 0 | 0.1 |
| **pH** | 7.4<br>ajusté avec NaOH | 7.4<br>ajusté avec KOH |

### D. La technique d'éjection pneumatique

Le système d'éjection pneumatique permet de contrôler à la fois la pression d'éjection (15 psig) et sa durée. La pipette d'éjection d'une résistance de 2MΩ est placée à 50 µM du corps cellulaire du neurone (Figure 27). L'application des agonistes par éjection permet d'effectuer des applications brèves de la solution à tester ce qui limite la désensibilisation des nAChRs.

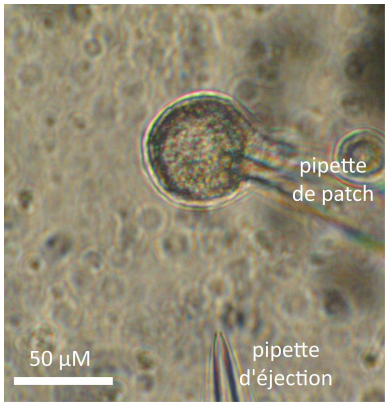



***Figure 27 :*** *Photographie d'un neurone DUM en présence du dispositif d'éjection.*

Il existe une relation directe entre la durée d'éjection sur le corps cellulaire et la dose d'agoniste appliquée. La concentration logarithmique de l'agoniste est proportionnelle à la durée d'application (Di Angelantonio et Nistri 2001), comme il a déjà été observé précédemment sur la même préparation (Lapied et al., 1990 ; Lapied 1991 ; Courjaret et al., 2001 ; Alix et al., 2002 ; Thany 2009). Il est alors possible d'établir une courbe dose-réponse en établissant la relation entre l'amplitude de la réponse en fonction de la durée d'éjection de l'agoniste, comme il a pu être déjà établi sur la même préparation avec l'ACh (Figure 28, Lapied 1991). Cette méthode permet d'obtenir un coefficient de Hill de 1.45, qui est cohérent avec la fixation de 2 molécules de ligand sur le récepteur (Lapied 1991). Cette technique est donc utilisable pour établir des courbes dose-réponse.

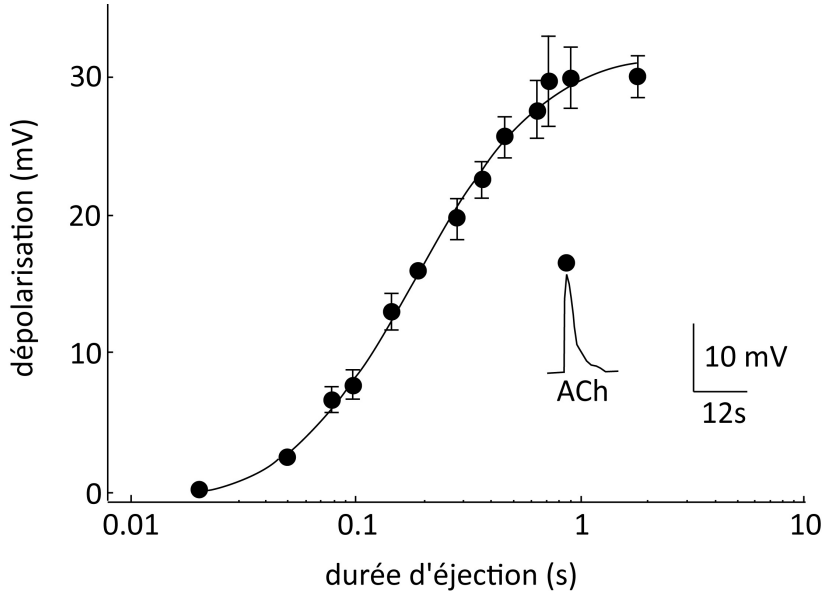



***Figure 28 :*** *Dépolarisation induite par l'ACh dépendante de sa durée d'éjection. Modifié d'après Lapied 1991.*

Pour les courbes dose-réponse obtenus lors des travaux de recherche présentés dans ce mémoire, chaque point de la courbe correspond aux amplitudes mesurées sur une même cellule pour différents temps d'application des agonistes. Pour l'ACT, l'application répétée à un intervalle régulier de 2 minutes (pour des durées d'éjection allant jusqu'à 2s) n'entraîne pas de désensibilisation des récepteurs. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude maximale obtenue pour chaque cellule. L'application répétée de l'IMI induit une diminution de la réponse (Buckingham et al., 1997 ; Courjaret et Lapied, 2001). Par conséquent, chaque point de la courbe dose-réponse a été établi à partir de cellules différentes. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la valeur maximale obtenue pour l'ACT. Les résultats sont exprimés en ± S.E.M.

### E. Analyse des résultats

L'équation de Hill permet de décrire la réponse d'un récepteur en fonction de la concentration d'agoniste appliquée. Cette équation prend en compte le nombre de molécule se liant au récepteur et le degré de coopérativité lors de la fixation de l'agoniste. Les courbes dose-réponse monophasiques ont donc été établies à l'aide d'une équation de Hill:

$$I = I_{max}/[1+(ED_{50}/x)^{nH}]$$

où, I = réponse, $I_{max}$= réponse maximale, $ED_{50}$= temps d'éjection pour obtenir la moitié de la réponse maximale, x = temps d'éjection de l'agoniste, nH = coefficient de Hill.

Les deux sous-types de nAChRs étudiés ne présentent pas obligatoirement les mêmes caractéristiques de réponse face à l'application d'agoniste. Par conséquent, pour prendre en compte ces paramètres, les courbes dose-réponses (biphasiques) obtenues en présence des deux sous-types de nAChRs ont été établies à l'aide d'une double équation de Hill :

$$I = [\ I_{max_1}/[1+(ED_{50_1}/x)^{nH1}]] + [\ I_{max_2}/[1+(ED_{50_2}/x)^{nH2}]]$$

où, I = réponse, $I_{max_1}$= réponse maximale pour le premier type de récepteur, $I_{max_2}$= réponse maximale pour le deuxième type de récepteur, $ED_{50_1}$= temps d'éjection pour obtenir la moitié de la réponse maximale du premier type de récepteur, $ED_{50_2}$= temps d'éjection pour obtenir la moitié de la réponse maximale du deuxième type de récepteur, x = temps d'éjection de l'agoniste, nH1 = coefficient de Hill du premier type de récepteur, nH2 = coefficient de Hill du deuxième type de récepteur.

Les différences entre les moyennes des multiples conditions expérimentales ont été statistiquement testées à l'aide d'un test t de Student (apparié ou non), ou d'un test ANOVA grâce au logiciel Prism (GraphPad software, San Diego, Etats-Unis).

# 3ème partie : RESULTATS EXPERIMENTAUX

## Avant-propos

Actuellement, un usage à bon escient et une optimisation des insecticides sont devenus indispensable. L'optimisation de l'utilisation des insecticides néonicotinoïdes nécessite une meilleure compréhension de leur mode d'action et de déterminer les facteurs qui sont impliqués dans la modulation de la sensibilité des nAChRs à ces molécules.

Précédemment, il a été démontré que l'IMI est capable d'agir différemment en fonction du type de récepteur (Landsell et Millar 2000 ; Salgado et Saar 2004). Les neurones DUM expriment deux sous-types de nAChRs, nAChR1 et nAChR2, qui se différencient par leurs propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques et par leur régulation intracellulaire (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret et al., 2003 ; Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008). Alors que les deux récepteurs sont sensibles à la clothianidine (Thany 2009), seul nAChR2 est insensible à l'IMI, bien que l'animal n'ait jamais été mis en contact avec la molécule (Coujaret et Lapied 2001). Il a également pu être démontré que la régulation intracellulaire de nAChR1 par la PKA permet d'augmenter l'efficacité de l'IMI (Courjaret et Lapied 2001).

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de déterminer le mode d'action d'un néonicotinoïde de seconde génération, l'ACT, qui présente au niveau de sa structure chimique des pharmacophores différents de ceux de l'IMI et la clothianidine. Le mode d'action de cet insecticide sur les deux sous-types de nAChRs a été comparé avec celui de l'IMI et la nicotine. nAChR2 a la particularité d'être insensible à l'IMI. Pour étudier l'efficacité de l'ACT sur nAChR2, les meilleures conditions de travail sur ce sous-type de nAChR ont été préalablement recherchées. Dans un deuxième temps, les facteurs qui influencent la sensibilité des nAChRs exprimés par les neurones DUM, et plus particulièrement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT ont été mis en évidence. L'implication du calcium intracellulaire et de possible voies de signalisation intracellulaire ont été plus particulièrement explorées. Enfin, les résultats obtenus ont été exploités pour essayer d'optimiser l'utilisation de cette molécule.

# Chapitre I : Recherche des meilleures conditions pour étudier l'effet de l'acétamipride sur nAChR2 exprimé par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*

## A. Position du problème

Les neurones DUM expriment deux sous-types de nAChRs insensibles à l'α-bgt, nAChR1 et nAChR2. Les caractéristiques électrophysiologiques de ces deux sous-types de récepteurs ont été mises en évidence précédemment (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008). nAChR2 est un récepteur qui présente une conductance potassique spontanée. L'activation de ce récepteur par des agonistes entraîne une inhibition de cette conductance potassique. Un courant est alors observé, qui reflète l'inhibition du flux sortant d'ions potassium. Ce courant observé suite à l'application d'agoniste peut être attribué à l'activation de nAChR2, grâce à un test de résistance membranaire (Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008). En effet, la conductance est inversement proportionnelle à la résistance. L'activation de nAChR2 par des agonistes induit une diminution de sa conductance spontanée, par conséquent, elle se traduira par une augmentation de la résistance membranaire. Plus la conductance inhibée est grande, plus l'augmentation de la résistance membranaire est importante.

L'objectif de ce travail de thèse est de mesurer la capacité de l'ACT à agir sur nAChR2 en fonction de son état d'ouverture corrélée à la mesure de la résistance membranaire, en fonction de facteurs cellulaires et moléculaires tel que le calcium intracellulaire et le potentiel de membrane. La première partie de ce travail a donc consisté à rechercher les meilleures conditions pour étudier le mode d'action de l'ACT sur nAChR2.

## B. Résultats

nAChR1 est principalement activé pour des potentiels de membrane compris entre -90 mV et -30 mV. nAChR2 est activé majoritairement pour des potentiels de membrane compris entre -30 mV et + 30 mV. Ces caractéristiques électrophysiologiques se traduisent par une courbe I/V biphasique (Figure 29 A, Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany et al., 2008). L'IMI agit différemment de la nicotine sur ces deux sous-types de récepteurs. Alors que

nAChR1 est sensible à cet insecticide, nAChR2 y est insensible. Cette insensibilité est visible par une courbe I/V monophasique (Figure 29 B) (Courjaret et Lapied 2001).

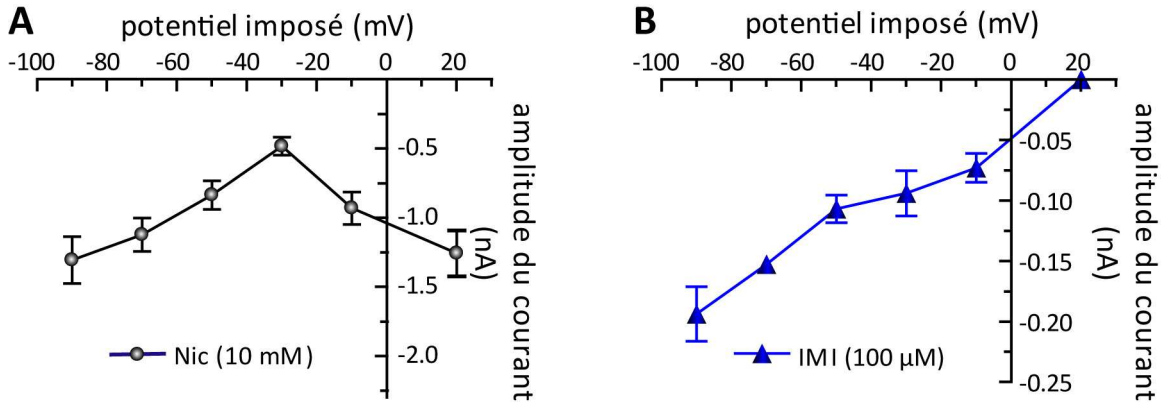



***Figure 29:*** *Effet de la nicotine (Nic) et de l'imidaclopride (IMI) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bgt (0.5 µM).*
*A, Amplitude du courant induit par la nicotine (Nic 10 mM, n=5) en fonction du potentiel de membrane à l'état stable. A noter, l'aspect biphasique de la courbe qui indique l'existence de deux types de nAChRs, nAChR1 et nAChR2. nAChR1 est majoritairement activé de -90 mV à -30 mV et nAChR2 est majoritairement activé de -30 mV à + 30 mV. B, Amplitude du courant induit par et l'IMI (100 µM, n=4) en fonction du potentiel de membrane à l'état stable (d'après Courjaret et Lapied 2001). A noter que l'aspect biphasique est absent, ce qui suggère que l'IMI n'agit que sur nAChR1. La nicotine et l'IMI sont appliqués par éjection pneumatique (15 psig, 100 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Un autre néonicotinoïde, la clothianidine est quant à elle capable d'induire une réponse de nAChR1 et de nAChR2 (Thany 2009). Ces résultats confirment que les néonicotinoïdes sont capables d'agir différemment en fonction des types de récepteurs (Landsell et Millar 2000) et du type de néonicotinoïde (Tan et al., 2007).

La d-TC est un inhibiteur spécifique de nAChR1. En mode potentiel imposé, en présence de d-TC à une concentration de 50 µM, l'amplitude du courant observé induit par la nicotine est augmentée (Figure 30 A). Au potentiel imposé de -70 mV, lorsque l'activation de nAChR1 par la nicotine est inhibée, l'amplitude du courant subit une augmentation de -1.16 ± 0.12 nA à -3.36 ± 0.30 nA (test t non apparié, $p < 0.001$), soit une amplitude 3 fois supérieure aux conditions contrôles (Figure 30). Le chlorure de césium est un bloqueur des canaux potassiques qui permet de bloquer nAChR2 sans affecter la réponse de nAChR1 (Courjaret et Lapied 2001). L'application du chlorure de césium par la solution intrapipette à une concentration de 10 mM permet de diminuer l'amplitude du courant induit par la nicotine en présence de d-TC (50 µM) de -3.36 ± 0.30 nA à -0.38 ± 0.10 nA (test t non apparié, $p < 0.001$) (Figure 30 B). Un test de résistance membranaire permet de confirmer que nAChR2 est fonctionnel pour des potentiels inférieurs à -30 mV.

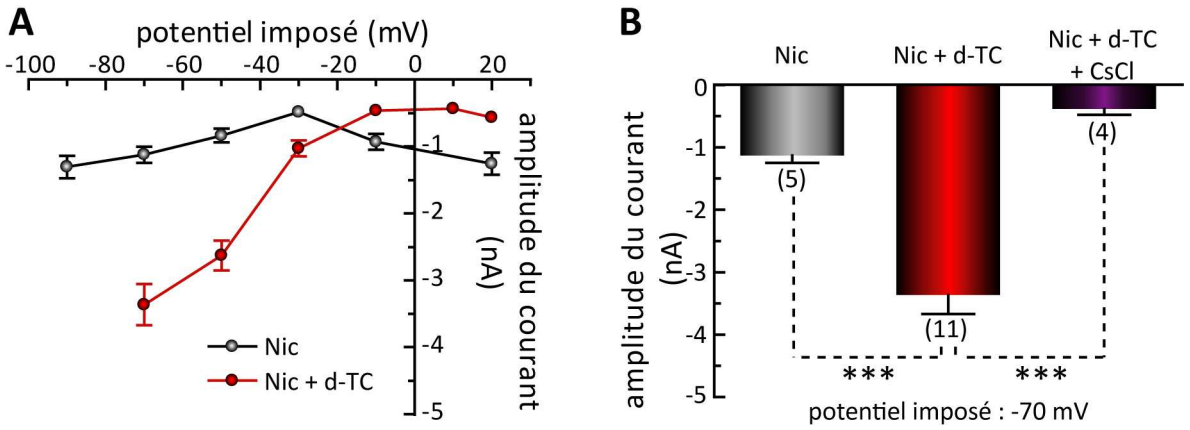



***Figure 30 :*** *Effet de la nicotine (Nic) sur les nAChRs insensibles à l'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM).*
*A, Courbes I-V pour la nicotine (Nic, 10 mM) en présence (n=5) ou non de d-TC (50 µM) (n=11) en plus de l'α-bgt (0.5 µM) dans le milieu extracellulaire. B, Au potentiel imposé de -70 mV, l'amplitude du courant induit par la nicotine est augmentée par 3 fois en présence de d-TC, un inhibiteur spécifique de nAChR1. L'application de chlorure de césium (CsCl) permet de confirmer que le courant observé est issu de l'inhibition de la conductance potassique spontanée de nAChR2. Le nombre de cellules testées est indiqué entre parenthèses. La Nic est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 100 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. *** : p < 0.001.*

En mode courant imposé, l'application d'un courant hyperpolarisant d'une durée de 350 ms permet de mesurer une différence de potentiel directement proportionnelle à la résistance membranaire. Suite à l'application de nicotine à une concentration de 100 µM dans le milieu extracellulaire, une augmentation à 137.8 ± 6.2 % de la résistance membranaire est observée au potentiel membranaire de -70 mV (Figure 31, test t apparié, $p < 0.01$).

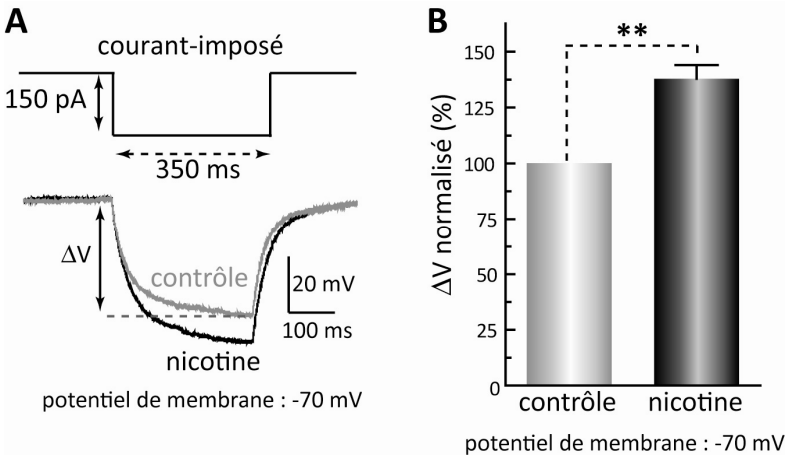



***Figure 31:*** *Test de résistance membranaire avant et après application de nicotine en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*A, Illustration d'un test de résistance membranaire avant et après application de nicotine (100 µM) en présence de d-TC (50 µM), d'α-bgt (0.5 µM) et de la TTX (0.1 µM) pour inhiber la formation de potentiel d'action. L'application de la nicotine induit une augmentation du ΔV en réponse à un courant hyperpolarisant de 350 ms. B, Pour un potentiel de membrane avoisinant -70 mV, l'application de la nicotine (100 µM) induit une augmentation de la résistance membranaire. L'expérience a été répétée 4 fois sur des cellules indépendantes. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ** : p < 0.01.*

En présence de d-TC, l'IMI voit l'amplitude de son courant fortement diminuée en présence de cet inhibiteur de nAChR1. L'amplitude du courant induit par l'IMI est réduit de -0.15 ± 0.01 nA à -0.02 ± 0.01 nA (test t non apparié, n=5, $p < 0.001$) (Figure 32). Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'IMI agit préférentiellement sur nAChR1 mais également qu'il est possible de travailler sur nAChR2 en présence de 50 µM de d-TC.

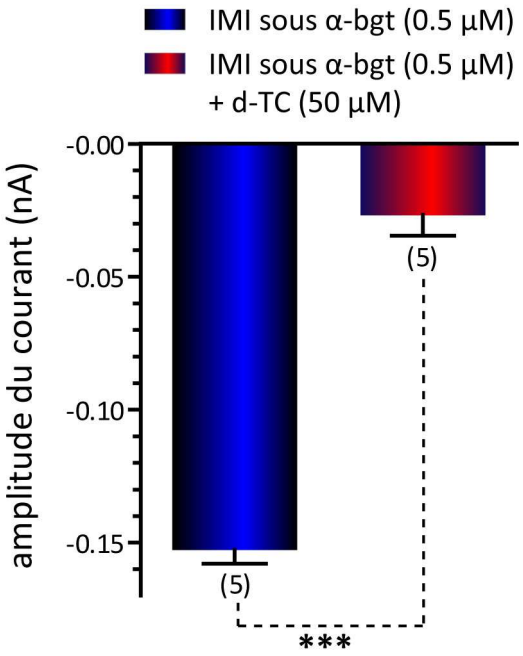



***Figure 32 :*** *Au potentiel imposé de -70 mV, amplitude du courant induit par l'imidaclopride (IMI, 100 µM) en présence d'α-bgt (0.5 µM) et en présence ou non de d-TC (50 µM).*
*Le nombre de cellule est indiqué entre parenthèses. L'IMI (100 µM) est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 100 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. *** p < 0.001.*

**Récapitulatif :**

- L'application de **d-TC 50 µM** permet de travailler sur **nAChR2**
- **nAChR2 est fonctionnel pour des potentiels inférieurs à -30 mV** en l'absence d'activation de nAChR1

# Chapitre II : Mode d'action de l'acétamipride sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*

## A. Position du problème

Les neurones DUM expriment deux sous-types de nAChRs insensibles à l'α-bgt, nAChR1 et nAChR2. Les caractéristiques électrophysiologiques de ces deux sous-types de récepteurs ont été mises en évidence précédemment (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret 2003 ; Thany et al., 2008). Ils sont respectivement sensible et insensible à l'IMI. Après avoir caractérisé les meilleures conditions pour étudier l'action d'agoniste sur nAChR2, la suite de ce travail de thèse a donc consisté à étudier le mode d'action d'un néonicotinoïde de seconde génération, l'ACT. L'effet de l'ACT sur les deux sous-types de récepteurs, et plus particulièrement sur nAChR2 a été étudié, comparativement à l'IMI et à la nicotine.

## B. Résultats

En établissant la relation entre l'amplitude du courant induit par l'ACT en fonction du potentiel imposé, on peut observer une courbe biphasique (Figure 33) semblable à celles observées pour la nicotine et l'ACh (Courjaret et Lapied 2001). Cet aspect biphasique de la courbe I-V signifie que l'ACT est capable d'agir sur nAChR1 et nAChR2, comme la clothianidine (Thany 2009) et contrairement à l'IMI (Courjaret et Lapied 2001).

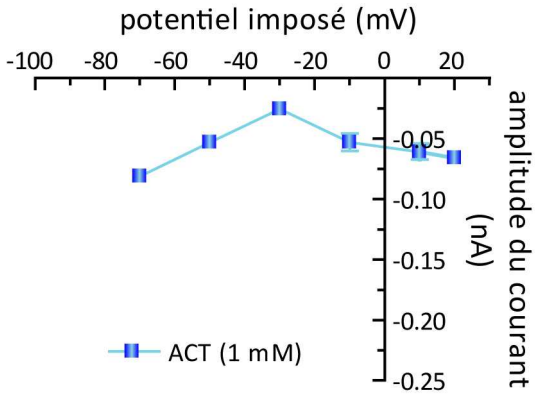



***Figure 33 :*** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bgt (0.5 µM). Amplitude du courant induit par l'ACT (1 mM, n=4) en fonction du potentiel de membrane à l'état stable. A noter l'aspect biphasique de la courbe de manière semblable à la courbe I-V de la nicotine. Ces résultats suggèrent que l'ACT agit sur les deux types de nAChRs. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Le logarithme de la concentration en agoniste est proportionnel à la durée d'éjection (Di Angelantonio et Nistri 2001), comme il a déjà été prouvé sur les neurones DUM (Lapied et al., 1990 ; Courjaret et Lapied 2001, Alix et al., 2002 ; Thany 2009). Il est donc possible d'apprécier qualitativement la sensibilité des nAChRs pour les agonistes en établissant la relation entre l'amplitude du courant induit par les agonistes et leur durée d'éjection ; ce qui permet d'obtenir une courbe dose-réponse. L'action des agonistes sur les deux types de récepteurs est non seulement visible au niveau de la courbe I-V mais également au niveau de la courbe dose-réponse. Ainsi, l'IMI qui n'agit que sur nAChR1 présente une courbe dose-réponse monophasique (Figure 34). La courbe dose-réponse pour les courants induits par l'ACT possède quant à elle un aspect biphasique. Cet aspect confirme l'action de l'ACT sur nAChR1 et nAChR2 (Figure 34 A).

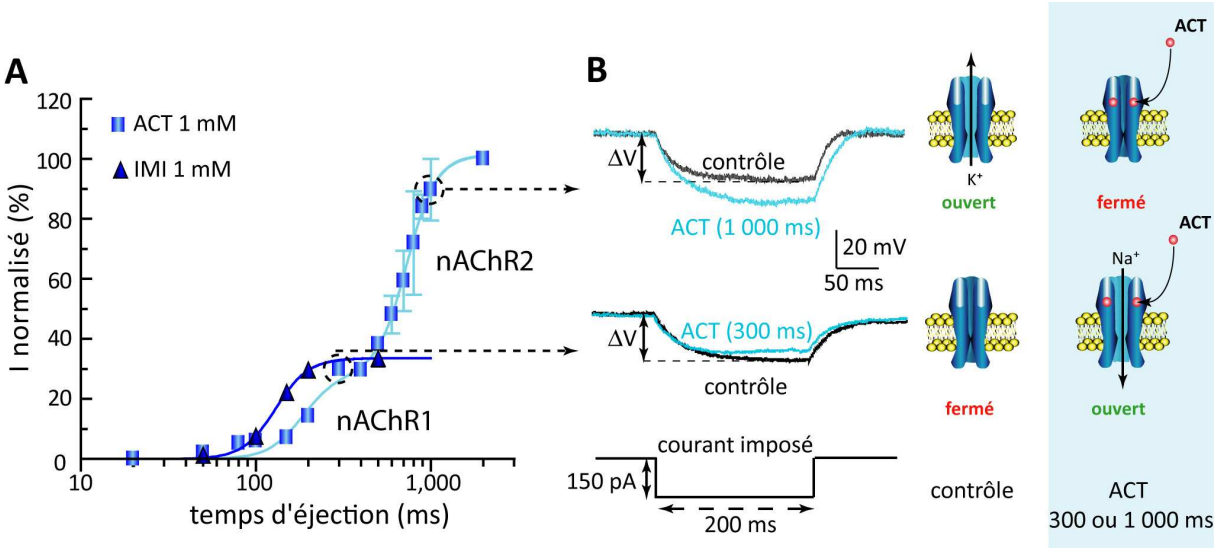



***Figure 34 :*** *Effet de l'acétamipride (ACT) et de l'imidaclopride (IMI) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bungarotoxine (0.5 µM).*
*A, Courbe dose-réponse pour l'IMI (1mM, n=4) et l'ACT (1 mM, n=4) au potentiel de membrane à l'état stable de -50 mV. Pour l'IMI, chaque point de la courbe correspond à une seule mesure par cellule. Pour chaque point, les mesures ont été répétées 4 fois. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude moyenne maximale du courant induit par l'ACT. La courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. Pour l'ACT, les points de la courbe correspondent aux amplitudes de courant mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. La courbe est tracée à l'aide d'une double équation de Hill. L'ACT et l'MI sont appliqués par éjection pneumatique (15 psig), au potentiel imposé de -50 mV. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. B, Test de résistance membranaire avant et après application d'ACT par éjection pneumatique à une durée de 300 ms ou de 1 000 ms. A un potentiel de membrane aux alentours de -50 mV, l'éjection d'ACT pendant 300 ms induit une diminution du ΔV en réponse à l'injection d'un courant hyperpolarisant. Au contraire, l'éjection de l'ACT pendant 1 000 ms induit une augmentation du ΔV. Ces tests de résistance membranaire illustrent l'augmentation de la conductance de nAChR1 et l'inhibition de conductance de nAChR2 (schémas d'illustration à droite). Les tests de résistance membranaire sont effectués en présence de TTX (0.1 µM) dans le but d'inhiber la genèse des potentiels d'action et ainsi faciliter la lecture des résultats.*

L'établissement de cette courbe dose-réponse ne permet pas à elle seule de déterminer à quel récepteur correspond chaque partie de la courbe. Il est possible d'établir la relation entre l'activation de nAChR1 et nAChR2 avec la première ou la deuxième partie de la courbe grâce à des tests de résistance membranaire. En mode courant imposé, l'application d'un courant hyperpolarisant d'une durée de 200 ms permet d'obtenir une différence du potentiel de membrane qui est directement proportionnel à la résistance membranaire. Ainsi, suite à l'application d'ACT, si cette différence de potentiel diminue par rapport aux conditions contrôles (avant application d'ACT), il est alors possible d'affirmer que la résistance membranaire diminue et vice-versa. Or, l'activation de nAChR1 entraîne une augmentation d'une conductance sodique. La conductance étant inversement proportionnelle à la résistance, l'activation de nAChR1 se traduira par une diminution de la résistance membranaire. L'activation de nAChR2 quant à elle induit une diminution d'une conductance potassique. L'activation de nAChR2 se traduira alors par une augmentation de la résistance membranaire. Les tests de résistances membranaires ont été effectués pour chacune des deux parties de la courbe dose-réponse obtenue pour l'ACT. Lors de l'application d'ACT pendant 300 ms (durée correspondant à la première partie de la courbe), on observe une diminution de la résistance membranaire alors que pour une durée de 1 000 ms (durée correspondant à la deuxième partie de la courbe) une augmentation de la résistance membranaire est observée (Figure 34 B). D'après ces résultats, il est possible d'affirmer que la première partie de la courbe dose-réponse correspond à l'activation majoritairement de nAChR1 et la deuxième partie de la courbe correspond à l'activation majoritairement de nAChR2. En comparant la sensibilité des nAChRs pour l'ACT et l'IMI, on peut s'apercevoir que nAChR1 est plus sensible à l'ACT que nAChR2. Alors que la durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude maximale ($ED_{50}$) est de 185.7 ± 26.8 ms pour nAChR1, elle est de 729.1 ± 38.9 ms pour nAChR2. On constate également une différence significative lorsque la sensibilité de nAChR1 pour l'IMI et pour l'ACT sont comparées (Figure 34). nAChR1 est significativement plus sensible pour l'IMI (129.9 ± 5.1 ms, n=4) que pour l'ACT (185.7 ± 26.8 ms, n=4, test t non apparié, $p < 0.001$).

En mode courant imposé, l'application d'ACT (1 mM, 200 ms) induit une dépolarisation membranaire de 32.8 ± 0.2 mV (n=3). En présence de d-TC, cette dépolarisation est toujours présente mais significativement réduite à 18.1 ± 0.5 mV (test t non apparié, $p < 0.001$) confirmant l'action de l'ACT sur nAChR2 (Figure 35).

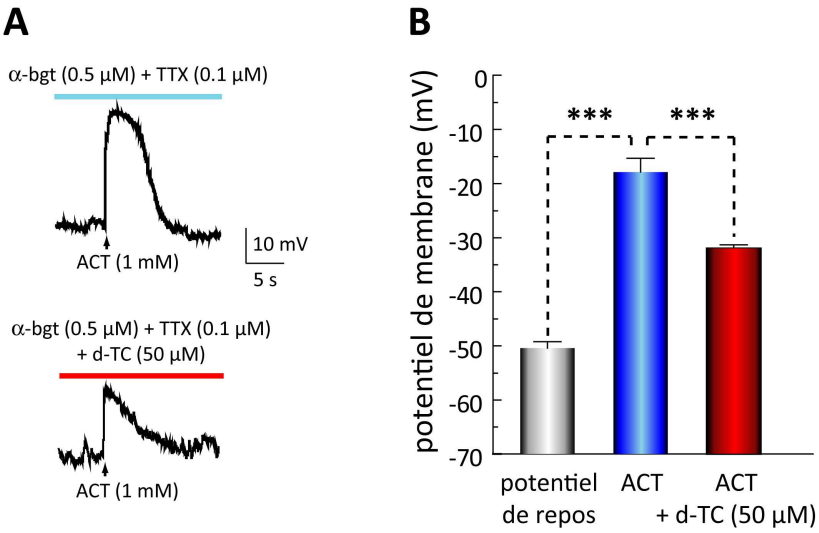



***Figure 35 :*** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en présence d'α-bungarotoxine (0.5 µM) et en présence ou non de d-TC (50 µM).*
*A, Illustration de la dépolarisation induite par l'ACT (1 mM,) en présence ou non de d-TC (50 µM) en plus de l'α-bgt (0.5 µM) et de la TTX (0.1 µM) pour inhiber la formation de potentiel d'action. B, la dépolarisation induite par l'ACT est réduite en présence de d-TC, un inhibiteur spécifique de nAChR1. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). Pour chaque condition, l'expérience est répétée 3 fois. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. *** : p < 0.001.*

Comme pour la nicotine, lorsque l'activation de nAChR1 est inhibée par la d-TC (50 µM), l'amplitude du courant observé induit par l'ACT est accrue (Figure 36 A). Pour un potentiel imposé de -70 mV, l'amplitude du courant induit par l'ACT est significativement augmentée de -0.08 ± 0.01 nA à -0.48 ± 0.07 nA, ce qui correspond à une amplitude 6 fois supérieure (test t non apparié, p < 0.001) (Figure 36 B).

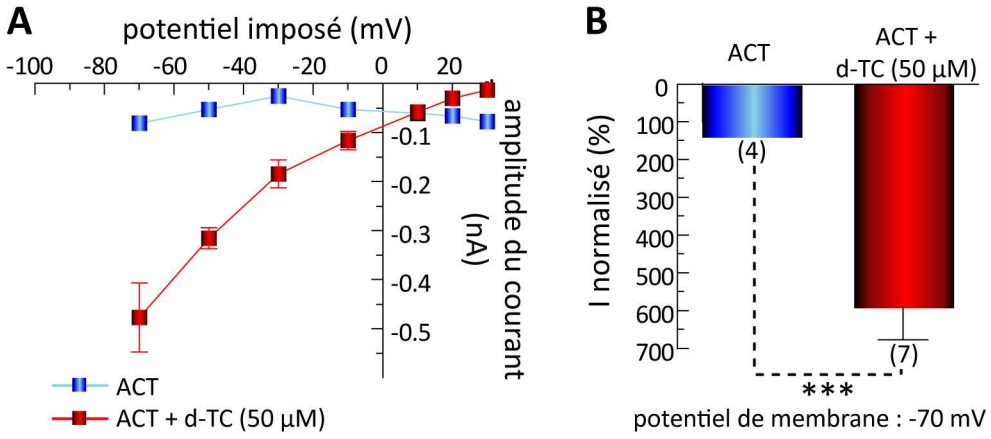



***Figure 36 :*** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs insensibles à l'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM).*
*A, Courbes I-V pour l'ACT (1 mM) en présence ou non de d-TC (50 µM). B, Au potentiel imposé de -70 mV, l'amplitude du courant induit par l'ACT est augmentée par 6 fois en présence de d-TC. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. *** : p < 0.001.*

Un test de résistance membranaire a été réalisé au potentiel membranaire de-70 mV. En présence de d-TC, suite à l'application de l'ACT à une concentration de 100 µM dans le milieu extracellulaire, une augmentation du ΔV en réponse à un courant hyperpolarisant de 350 ms est observée. Cette augmentation à 145.5 ± 14.9 % confirme que la dépolarisation et les courants observés induits par l'ACT en présence de d-TC sont essentiellement dus à l'inhibition de la conductance potassique spontanée de nAChR2 (test t apparié, n=4, $p < 0.01$) (Figure 37).

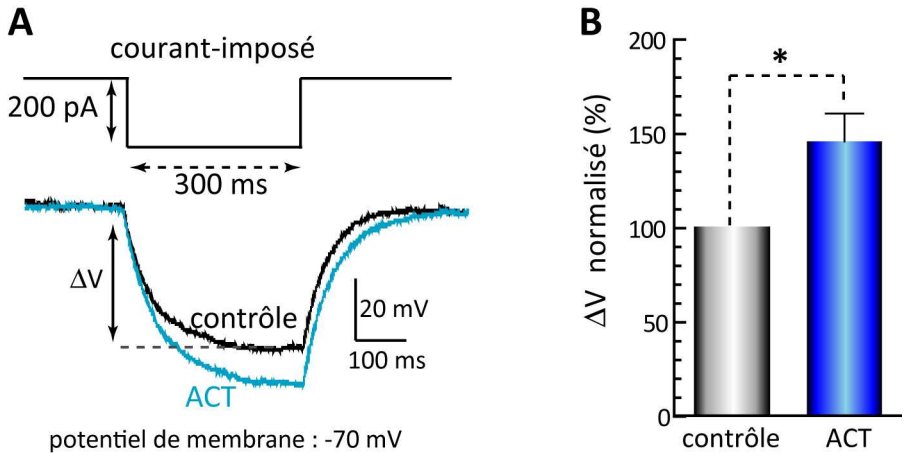



***Figure 37 :*** *Test de résistance membranaire avant et après application d'acétamipride (ACT) en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*A, Illustration d'un test de résistance membranaire avant et après application d'ACT (100 µM) en présence de d-TC (50 µM), d'α-bgt (0.5 µM) et de la TTX (0.1 µM) pour inhiber la formation de potentiel d'action. L'application de l'ACT induit une augmentation du ΔV en réponse à un courant hyperpolarisant de 300 ms. B, Pour un potentiel de membrane avoisinant -70 mV, l'application d'ACT (100 µM) induit une augmentation de la résistance membranaire. L'expérience a été répétée 4 fois sur des cellules indépendantes. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. * : p < 0.05.*

**Récapitulatif :**

- L'ACT agit comme une agoniste de **nAChR1 et nAChR2**
- nAChR1 est plus sensible que nAChR2 à l'ACT
- nAChR1 est plus sensible à l'IMI qu'à l'ACT

# Chapitre III : Identification des facteurs qui modulent la réponse de nAChR2 à l'acétamipride

## A. Position du problème

Alors que nAChR1 est sensible aux trois insecticides néonicotinoïdes qui ont pu être testés (IMI, ACT et clothianidine), le récepteur nAChR2 a la particularité d'être insensible à l'IMI mais sensible à la clothianidine et l'ACT (Courjaret et Lapied 2001 ; Thany 2009 ; cette étude). Est-il possible de moduler transitoirement cette sensibilité aux insecticides néonicotinoïdes ? Peu d'études ont mis en évidence l'implication de mécanismes transitoires dans la modulation de l'effet des néonicotinoïdes sur leur cible. Pour nAChR1, il a pu être démontré que sa réponse est modulée par une voie de régulation intracellulaire qui fait intervenir une PKA via l'AMPc, la CaMKII et la phosphatase PP1-2A. La phosphorylation de nAChR1 par la PKA permet d'augmenter le courant induit par l'IMI (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret 2003). Concernant nAChR2, il a été mis en évidence que le calcium intracellulaire module la réponse de nAChR2 à la nicotine. En effet la diminution du calcium intracellulaire induit une diminution de l'amplitude du courant (Thany et al., 2008). Cependant, l'implication potentielle du calcium intracellulaire dans la réponse des nAChRs aux néonicotinoïdes n'a pas encore été étudiée. La deuxième partie des travaux présentés dans ce mémoire a consisté à identifier les facteurs qui permettent une modulation transitoire de la réponse des nAChRs aux néonicotinoïdes, et entre autre l'implication du calcium intracellulaire. L'étude s'est plus particulièrement focalisée sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.

## B. nAChR1 module la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride

Il a été précedemment observé que l'inhibition de nAChR1 par la d-TC à une concentration de 50 µM entraîne une augmentation de l'amplitude du courant induit par l'ACT. Une modification de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est également observée. En présence de d-TC, l'$ED_{50}$ de nAChR2 pour l'ACT est diminuée de 729.1 ± 38.9 ms à 124.9 ± 4.5 ms (test t non apparié, n=4, $p < 0.001$) (Figure 38). L'inhibition de nAChR1 permet donc d'augmenter la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT sans que l'amplitude maximale du courant ne soit affectée.

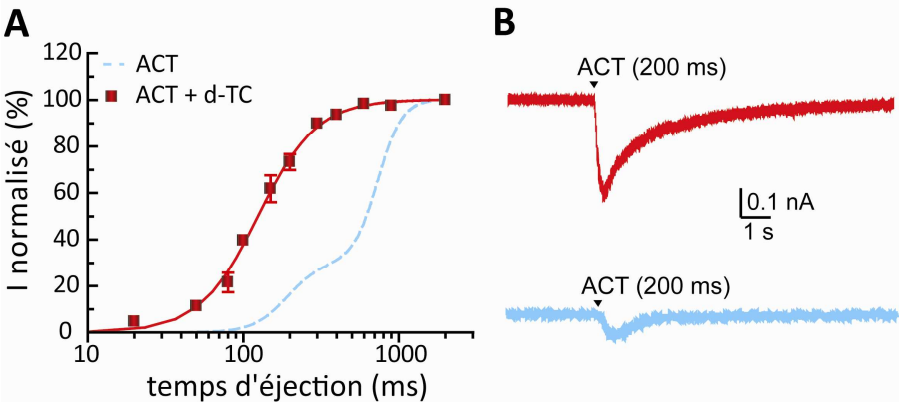



**Figure 38 :** Courbe dose-réponse pour l'acétamipride (ACT) après l'application d'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM), au potentiel imposé de -50 mV.
A, Les points de la courbe correspondent aux amplitudes de courants mesurées sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. La courbe en absence d'α-bgt (courbe discontinue bleue, n=4) est tracée à l'aide d'une double équation de Hill. La courbe en présence d'α-bgt (courbe continue rouge, n=4) est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. B, Illustration des courants induits par l'ACT après application d'α-bgt (0.5 µM) en absence (tracé bleu) ou en présence de d-TC (50 µM, tracé rouge) pour une durée d'éjection de 200 ms.

A l'évidence, il existe une interaction entre nAChR1 et nAChR2. L'activation de nAChR1 semble « museler » la réponse de nAChR2. Deux hypothèses sont alors émises pour expliquer cette interaction entre nAChR1 et nAChR2. Les facteurs liés à l'activation de nAChR1 qui pourraient expliquer la diminution de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT sont :

- la dépolarisation
- une possible augmentation du calcium intracellulaire

Ces deux pistes ont été explorées pour essayer d'expliquer comment nAChR1 peut influencer la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.

### C. Le potentiel de membrane et la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride

Pour déterminer si la dépolarisation induite par l'activation de nAChR1 peut expliquer la diminution de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT, des courbes dose-réponse ont été établies à 2 autres potentiels imposés. Le potentiel physiologique des neurones DUM est approximativement de -50 mV. Pour simuler une dépolarisation, une courbe dose-réponse a été établie au potentiel imposé de -30 mV. Le potentiel imposé de -70 mV représente une hyperpolarisation. La sensibilité de nAChR2 pour l'ACT dans ces conditions a été comparée aux conditions contrôles, c'est-à-dire à la courbe dose-réponse obtenue en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel imposé de -50 mV.

***Tableau 8 :*** *Effet du potentiel de membrane sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride (1 mM).*

| | **-30 mV (dépolarisation)** | **-50 mV (contrôle)** | **-70 mV (hyperpolarisation)** |
|---|---|---|---|
| **$ED_{50}$**(ms) | 87.4 ± 6.6 | 124.9 ± 4.5 | 567.0 ± 57.9 |
| **$I_{200}$** (nA) | -0.18 ± 0.04 | -0.31 ± 0.02 | -0.48 ± 0.07 |

*$ED_{50}$ = durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude du courant maximal ; $I_{200}$ = courant induit par l'ACT pour une durée d'éjection de 200 ms. Les expériences ont été effectuées en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) et répétées 4 fois.*

Pour un potentiel imposé de -30 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est légèrement augmentée avec une $ED_{50}$ qui diminue de 124.9 ± 4.5 ms à 87.4 ± 6.6 ms (Tableau 8, Figure 39). Néanmoins cette augmentation de la sensibilité de nAChR2 n'est pas différente des conditions contrôles (test t non apparié, n=4, $p > 0.5$). Par contre, l'amplitude du courant induit par l'ACT pour un temps d'éjection de 200 ms est significativement diminuée de -0.31 ± 0.02 nA à -0.18 ± 0.04 nA (test t non apparié, n=4, $p < 0.001$) (Tableau 8). Pour un potentiel imposé de -70 mV, la sensibilité de nAChR2 est diminuée. L'$ED_{50}$ est augmentée de 124.9 ± 4.5 ms à 567.0 ± 57.9 ms (Tableau 8, Figure 39). Cette augmentation est statistiquement significative (test t non apparié, n=4, $p < 0.001$). L'amplitude du courant induit par l'ACT pour un temps d'éjection de 200 ms est significativement augmentée de -0.31 ± 0.02 nA à -0.48 ± 0.07 nA (test t non apparié, n=4, $p < 0.001$).

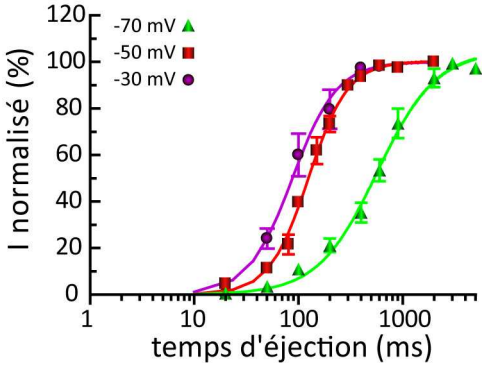



***Figure 39 :*** *Effet du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les courbes dose-réponse sont établies à 3 potentiels ; -50 mV (en rouge, n=4) qui correspond au potentiel physiologique, -30 mV (en violet, n=4) qui correspond à une dépolarisation et -70 mV (en vert, n=4) qui correspond à une hyperpolarisation. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Le potentiel de membrane induit deux effets au niveau de la réponse de nAChR2. L'hyperpolarisation entraîne une diminution de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT couplée à une augmentation de l'amplitude maximale du courant. La dépolarisation entraîne un

changement de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT couplé à une diminution de l'amplitude du courant. Ces modifications de l'amplitude maximale du courant induit par l'ACT, couplés au changement de sensibilité du récepteur suggèrent une modification de la conductance de nAChR2. Le ΔV suite à l'application d'un courant hyperpolarisant de 200 ms a été mesuré avant et après application d'ACT (d'une durée correspondant aux $ED_{50}$) dans les trois conditions différentes pour vérifier cette hypothèse (Figure 40). Pour le potentiel imposé de -30 mV, l'application d'ACT (1 mM) pendant 90 ms en présence de d-TC induit une augmentation à 103.5 ± 0.3 % de la résistance membranaire. Cette augmentation n'est pas statistiquement différente de l'augmentation à 106.5 ± 0.4 % de la résistance membranaire à -50 mV suite à l'application d'ACT pendant 120 ms. Au potentiel imposé de -70 mV, la résistance membranaire avant application d'ACT est diminué de 102 MΩ (à -50 mV, n=3) à 87 MΩ (n=2). L'application d'ACT pendant 570 ms permet d'augmenter à 129.1 ± 2.7 % la résistance membranaire. Cette augmentation de la résistance membranaire est significativement plus importante qu'aux potentiels imposés de -30 mV et -50 mV (Figure 40, test ANOVA à un facteur, comparaison multiple de Bonferroni).

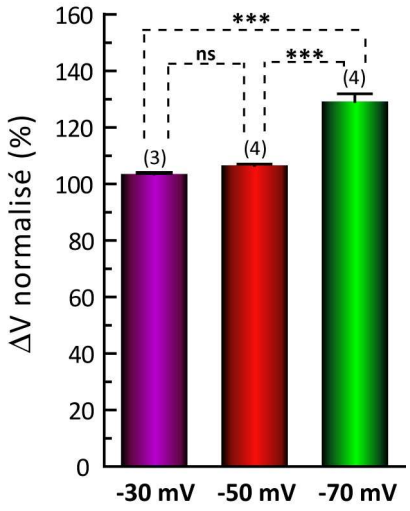



***Figure 40 :*** *Test de résistance membranaire après application d'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les tests de résistances membranaires ont été effectués aux 3 potentiels – 30 mV, -50 mV et -70 mV pour des temps d'éjection d'ACT (1 mM) qui avoisinent les $ED_{50}$ moyennes respectives (90 ms pour -30 mV ; 120 ms pour -50 mV et 570 ms pour -70 mV). Le nombre de cellules est indiqué entre parenthèses. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; *** : p < 0.001.*

Ces résultats nous indiquent qu'en fonction du potentiel, la conductance potassique de nAChR2 est plus ou moins réduite par l'ACT. Ce qui implique qu'avant l'application d'ACT, en fonction du potentiel, la conductance de nAChR2 est plus ou moins grande. L'hyperpolarisation permet d'augmenter la conductance de nAChR2. Cela signifierait que

nAChR2 serait dans un état plus ouvert à -70 mV qu'aux potentiels de membrane de -50 mV et -30 mV (Figure 41). Cette hypothèse expliquerait alors qu'au potentiel de -70 mV, comparé au potentiel physiologique, l'amplitude maximale du courant observé induit par l'ACT soit augmentée ainsi que la résistance membranaire. En résumé, dans un état où nAChR2 serait plus ouvert, le récepteur serait moins sensible à l'ACT que dans un état plus fermé.

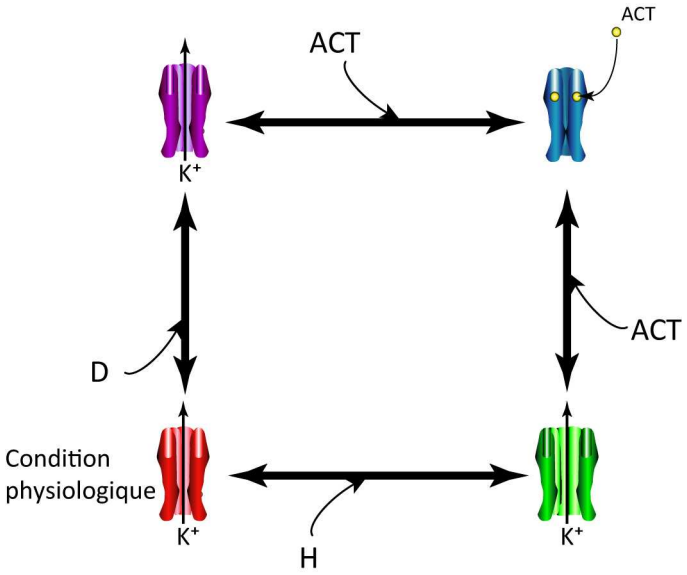



***Figure 41:*** *Schéma hypothétique de l'influence du potentiel de membrane sur nAChR2.*
*Avant application d'ACT, l'hyperpolarisation de la membrane (-70 mV, en vert) permettrait à nAChR2 d'être dans un état plus ouvert qu'à -50 mV (en rouge). L'application d'ACT se traduirait alors par une augmentation de l'amplitude du courant observé et une plus forte augmentation de la résistance membranaire, comparées à la réponse au potentiel physiologique de -50 mV. Dans ces conditions, nAChR2 serait moins sensible à l'ACT. Lors d'une dépolarisation membranaire (-30 mV, en violet), nAChR2 se retrouverait dans un état plus fermé permettant au récepteur d'être plus sensible à l'ACT. Dans ces conditions, l'application d'ACT se traduirait par une amplitude du courant observé et une augmentation de la résistance membranaire plus faible. D : dépolarisation ; H : hyperpolarisation.*

Cependant, ces résultats ne tiennent pas compte du possible effet du calcium intracellulaire. En fonction du potentiel de membrane, différentes sources de calcium peuvent intervenir au niveau des neurones DUM (Grolleau et Lapied 2000 ; Wicher et al., 2004, 2006). La possible augmentation du calcium intracellulaire est le deuxième facteur de l'interaction entre nAChR1 et nAChR2 que nous avons voulu explorer. L'implication du calcium intracellulaire dans la modulation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT a donc été examinée par la suite.

### D. Influence du calcium intracellulaire sur la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride

Pour tester l'implication du calcium dans la réponse de nAChR2 à l'ACT, dans un premier temps le calcium intracellulaire a été diminué. Pour cela, la composition de la

solution intrapipette a été modifiée. L'EGTA a été remplacé par un autre chélateur de calcium plus puissant, le BAPTA (10 mM) et le chlorure de calcium a été supprimé. La concentration en calcium libre passe alors de 6.83 nM à 0.12 pM. Dans ces conditions, l'aspect de la courbe I-V n'est pas fortement modifié ; par contre, le courant observé est significativement diminué (Figure 42 A). Au potentiel imposé de -70 mV, l'amplitude du courant passe de -0.48 ± 0.07 nA à -0.17 ± 0.01 nA (Figure 42 B ; test t non apparié, $p < 0.01$).

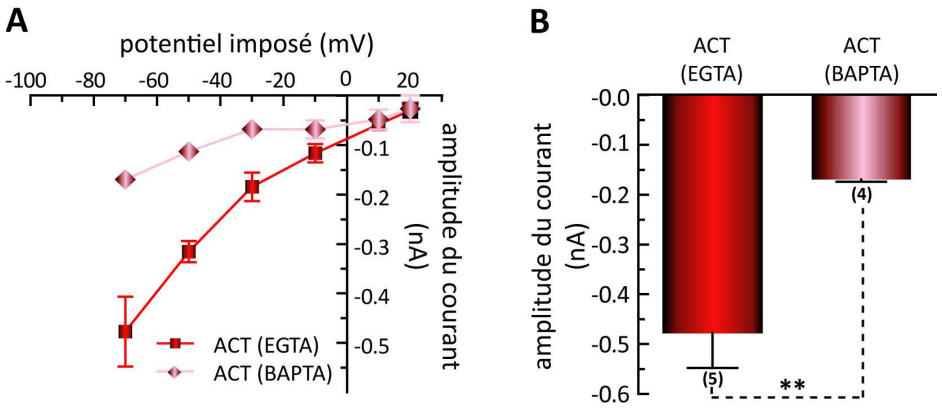



***Figure 42 :*** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), et en présence soit de l'EGTA soit du BAPTA en solution intrapipette.*
*A, Courbes I-V pour l'ACT (1 mM) en présence d'EGTA (n=5) ou de BAPTA (n=4). B, Au potentiel imposé de -70 mV, l'amplitude du courant induit par l'ACT est diminuée en présence de BAPTA. Le nombre de cellule est indiqué entre parenthèses. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ** : p < 0.01.*

De plus, la suppression de l'EGTA de la solution intrapipette sans substitution, ce qui induit une augmentation de la concentration en calcium dans la solution intrapipette, entraîne une diminution de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT de 124.9 ± 4.5 ms à 304.4 ± 44.7 ms au potentiel de -50 mV (Figure 43, test non apparié, $p < 0.05$).

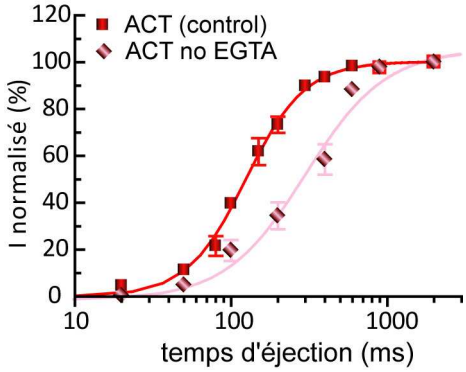



***Figure 43 :*** *Effet de l'absence d'EGTA sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*La courbe dose-réponse a été établie au potentiel de -50 mV sur 4 cellules indépendantes. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Cette suppression de l'EGTA induit également une diminution de l'amplitude des courants observés de -0.48 ± 0.07 nA à -0.23 ± 0.01 nA pour des éjections d'ACT d'une durée de 200 ms (test non apparié, $p < 0.01$)

***Tableau 9 :*** *Effet du chlorure de cadmium en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride (1 mM).*

| | **-30 mV (dépolarisation)** | | **-50 mV (potentiel physiologique)** | | **-70 mV (hyperpolarisation)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***contrôle*** | ***$CdCl_2$*** | ***contrôle*** | ***$CdCl_2$*** | ***contrôle*** | ***$CdCl_2$*** |
| **$ED_{50}$**(ms) | 87.4 ± 6.6 | 40.4 ± 2.5 | 124.9 ± 4.5 | 80.4 ± 6.6 | 567.0 ± 57.9 | 109.0 ± 5.2 |
| **$I_{200}$** (nA) | -0.18 ± 0.04 | -0.10 ± 0.01 | -0.31 ± 0.02 | -0.17 ± 0.03 | -0.48 ± 0.07 | -0.22 ± 0.04 |

*$ED_{50}$ = durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude du courant maximal ; $I_{200}$ = courant induit par l'ACT pour une durée d'éjection de 200 ms. Les expériences ont été effectuées en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) et répétées 4 fois.*

Il est possible d'inhiber les canaux calciques à l'origine d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Un des bloqueurs de canaux calciques au spectre le plus large est le chlorure de cadmium. L'effet du chlorure de cadmium sur la sensibilité a donc été testé aux 3 potentiels -30 mV, -50 mV et -70 mV (Tableau 9, Figure 44). L'application extracellulaire du $CdCl_2$ augmente la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT et/ou diminue l'amplitude de l'inhibition de la conductance potassique spontanée (Figure 44). Pour un potentiel imposé de -30 mV, l'amplitude du courant observé n'est pas affectée par le $CdCl_2$ mais la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée de 87.4 ± 6.6 ms à 40.4 ± 2.5 ms (Tableau 9, test t non apparié, $p < 0.01$).

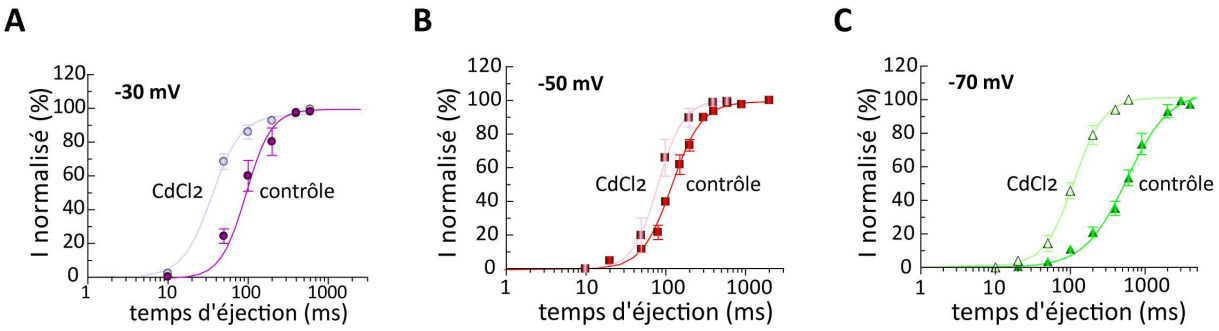



***Figure 44 :*** *Effet du chlorure de cadmium et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les courbes dose-réponse ont été établies aux potentiels de -30 mV (A), -50 mV (B) et -70 mV (C) en présence ou non de chlorure de cadmium (0.5 mM), sur 4 cellules indépendantes. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Pour un potentiel imposé de -50 mV, l'amplitude du courant observé est réduite de -0.31 ± 0.02 nA à -0.17 ± 0.03, pour une éjection d'ACT d'une durée de 200 ms (Tableau 9, test t non

apparié, $p < 0.001$). La sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée en présence de $CdCl_2$. L'$ED_{50}$ est diminuée de 124.9 ± 4.5 ms à 80.4 ± 6.6 ms mais cette diminution n'est pas statistiquement significative (Tableau 9, test t non apparié, $p > 0.05$). Pour un potentiel imposé de -70 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT et l'amplitude de l'inhibition de la conductance potassique spontanée sont diminuées. L'amplitude du courant observé est diminuée de -0.48 ± 0.07 nA à -0.22 ± 0.04 nA pour une éjection d'ACT d'une durée de 200 ms (Tableau 9, test t non apparié, $p < 0.05$), et l'$ED_{50}$ est réduite de 567.0 ± 57.9 ms à 109.0 ± 5.2 ms (Tableau 9, test t non apparié, $p < 0.001$).

Le calcium semble jouer un rôle dans la sensibilité de nAChR2. Même si la différence n'est pas statistiquement significative au potentiel imposé de -50 mV, l'inhibition des canaux calciques par le chlorure de cadmium permet d'augmenter la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT, quelque soit le potentiel. Cette différence non significative à -50 mV suggère qu'il n'y que peu ou pas d'entrée de calcium à ce potentiel. Par contre, la différence de sensibilité de nAChR2 est beaucoup plus prononcée pour -30 mV et -70 mV, ce qui implique qu'il existe une entrée de calcium à ces potentiels qui soit assez importante pour modifier la sensibilité de nAChR2. Au niveau des résultats obtenus en $CdCl_2$, on constate que l'amplitude des courants observés induits par l'ACT est fortement diminuée ; ce qui suggère encore une modification de la conductance de nAChR2. Un test de résistance membranaire a donc été effectué à chaque potentiel en présence de $CdCl_2$. Un courant hyperpolarisant a été appliqué en mode courant-imposé en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de $CdCl_2$ (0.5 mM) et de TTX (0.1 µM). La différence de potentiel a été mesurée avant et après application d'ACT pendant une durée correspondant aux $ED_{50}$ respectives : 90 ms pour -30 mV ; 120 ms pour -50 mV et 570 ms pour -70 mV. Ce ΔV a ensuite été comparé à celui obtenu sans $CdCl_2$. Pour les trois potentiels, l'augmentation de la résistance membranaire par l'application d'ACT est moins importante en présence de $CdCl_2$ (Figure 45, test t non apparié pour chaque potentiel ; -50 mV : $p < 0.05$, n=4 ; -70 mV : $p < 0.001$, n=4). Ces résultats nous indiquent que le calcium permet d'augmenter l'inhibition de la conductance potassique spontanée de nAChR2 par l'ACT. Cela signifierait qu'en présence de calcium, nAChR2 serait dans un état plus ouvert. Cette hypothèse expliquerait alors que l'amplitude du courant observé induit par l'ACT soit moins importante sous $CdCl_2$.

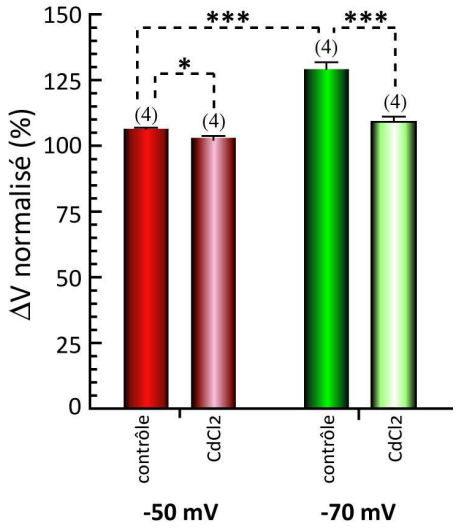



***Figure 45 :*** *Test de résistance membranaire après application d'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de TTX (0.1 µM) et en présence ou non de $CdCl_2$ (0.5 mM).*
*Les tests de résistances membranaires ont été effectués aux potentiels de -50 mV et -70 mV pour des temps d'éjection d'ACT (1 mM) qui avoisinent les $ED_{50}$ moyennes respectives. Pour les conditions contrôles (sans $CdCl_2$) : 120 ms pour -50 mV et 570 ms pour -70 mV. En présence de $CdCl_2$ : 80 ms pour -50 mV et 110 ms pour -70 mV. Le nombre de cellules est indiqué entre parenthèses. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. * : p < 0.05 ; *** : p < 0.001.*

Au niveau des neurones DUM, la dépolarisation conduit à l'activation de canaux calciques de type HVA (pour High-Voltage Activated), il s'en suit une augmentation du calcium intracellulaire (Grolleau et al., 2006). L'application extracellulaire d'ω-conotoxine GVIA (ω-CgTx, 0.1 µM), un inhibiteur connu des canaux HVA (Grolleau et Lapied 2000), entraîne une augmentation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT au potentiel imposé de -30 mV de manière semblable au $CdCl_2$ (Figure 46).

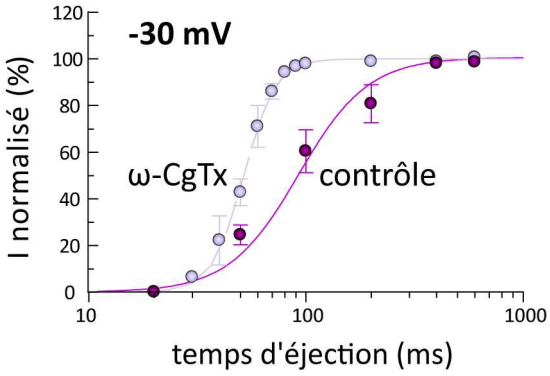



***Figure 46 :*** *Effet de l'ω-CgTx sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel imposé de -30 mV.*
*Les courbes dose-réponse ont été établies au potentiel de -30 mV en présence ou non l'ω-CgTx (0.1 µM), sur au moins 4 cellules indépendantes. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

L'inhibition des canaux calciques de type HVA diminue l'$ED_{50}$ de nAChR2 pour l'ACT de 87.4 ± 6.6 ms à 48.9 ± 0.9 ms (Figure 46, Tableau 10, test t non apparié, $p < 0.05$, n=4). Ces résultats indiquent que les canaux calciques de type HVA sont à l'origine d'une entrée de calcium au potentiel imposé de -30 mV qui diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.

***Tableau 10 :*** *Effet de l'ω-conotoxine GVIA et du LOE 908 sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride (1 mM).*

| | **-30 mV (dépolarisation)** | | | **-70 mV (hyperpolarisation)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***contrôle*** | ***$CdCl_2$*** | ***ω-CgTx*** | ***contrôle*** | ***$CdCl_2$*** | ***LOE 908*** |
| **$ED_{50}$**(ms) | 87.4 ± 6.6 | 40.4 ± 2.5 | 48.9 ± 0.9 | 567.0 ± 57.9 | 109.0 ± 5.2 | 204.8 ± 27 |
| **$I_{200}$** (nA) | -0.18 ± 0.04 | -0.10 ± 0.01 | -0.11 ± 0.03 | -0.48 ± 0.07 | -0.22 ± 0.04 | -0.14 ± 0.02 |

*$ED_{50}$ = durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude du courant maximal ; $I_{200}$ = courant induit par l'ACT pour une durée d'éjection de 200 ms. Les expériences ont été effectuées en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) et répétées 4 fois.*

Pour des potentiels membranaires plus négatifs que -50 mV, au niveau des neurones DUM, une entrée de calcium non-capacitive se produit au travers des canaux de type TRPγ (Wicher et al., 2006). Les TRPγ sont des canaux perméables au calcium, activés lors de potentiels hyperpolarisant et qui permettent le maintien de l'activité spontané des neurones DUM (Wicher et al., 2004, 2006). Au potentiel imposé de -70 mV, l'application extracellulaire du LOE 908 (40 µM), un inhibiteur spécifique de ces canaux, entraîne une diminution de l'amplitude du courant induit par l'ACT (1 mM , 200 ms) de -0.48 ± 0.07 nA à -0.14 ± 0.02 nA. Dans ces conditions, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée de 567.0 ± 57.9 ms à 204.8 ± 27 ms (Figure 47, Tableau 10, test t non apparié, $p < 0.001$, n=4). Au potentiel imposé de -70 mV l'entrée de calcium, qui diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT, s'effectue au travers des canaux TRPγ.

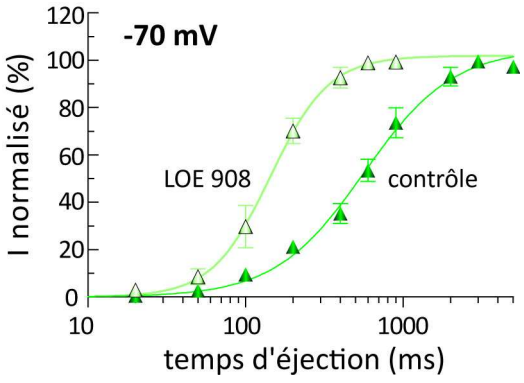



***Figure 47 :*** *Effet du LOE 908 sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel imposé de -70 mV.*
*Les courbes dose-réponse ont été établies au potentiel de -70 mV en présence ou non de LOE 908 (40 µM), sur 4 cellules indépendantes. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Ces résultats nous indiquent qu'en fonction du potentiel, la source de calcium est différente. Au potentiel de -30 mV, l'entrée de calcium se fait via les canaux calciques de type HVA alors qu'au potentiel de -70 mV, cette entrée de calcium s'effectue par les canaux TRPγ. En fonction du calcium intracellulaire, la conductance potassique de nAChR2 est plus ou moins réduite par l'ACT. Ce qui implique qu'avant l'application d'ACT, la conductance de nAChR2 est plus ou moins grande. Le calcium permet d'augmenter la conductance de nAChR2. Cela signifierait qu'en présence de calcium, nAChR2 serait dans un état plus ouvert. Par conséquent, le récepteur serait moins sensible à l'ACT que dans un état plus fermé. Cette hypothèse expliquerait alors la diminution de l'amplitude du courant induit par l'ACT et la réduction de l'augmentation de la résistance membranaire en présence de bloqueur spécifiques ou non de canaux calciques. L'effet du calcium sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT pourrait expliquer l'effet de l'hyperpolarisation sur la réponse de nAChR2 à l'ACT et le très faible effet de la dépolarisation. Le schéma hypothétique sur l'effet du potentiel de membrane (Figure 41, page 70) peut alors être complété donnant le schéma de la Figure 48 ci-dessous.

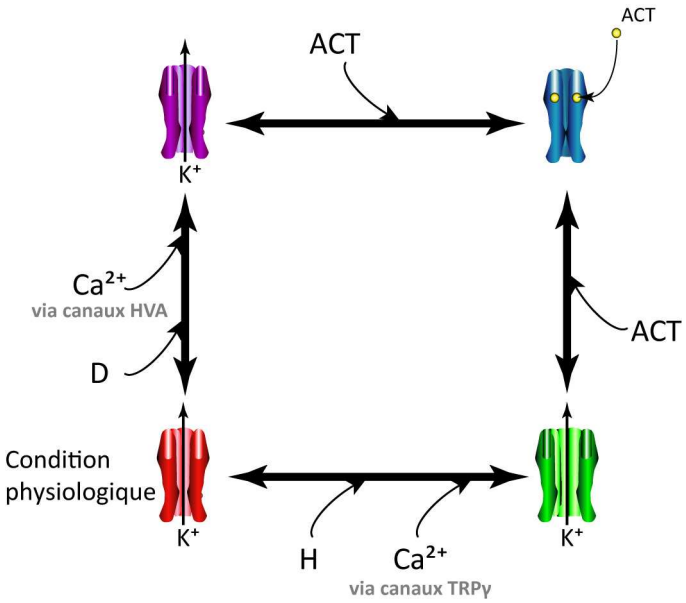



***Figure 48 :*** *Schéma hypothétique de l'influence du potentiel de membrane et du calcium sur nAChR2.*
*Avant application d'ACT, l'hyperpolarisation de la membrane (-70 mV, en vert) active les canaux calciques de type TRPγ. L'entrée de calcium qui en découle permettrait à nAChR2 d'être dans un état plus ouvert qu'à -50 mV (en rouge). L'application d'ACT se traduirait alors par une augmentation de l'amplitude du courant observé et une plus forte augmentation de la résistance membranaire, comparé au potentiel physiologique. Dans ces conditions, nAChR2 serait moins sensible à l'ACT. Lors d'une dépolarisation membranaire (-30 mV, en violet), les canaux calciques de type HVA seraient activés. Alors que la dépolarisation permettrait à nAChR2 d'être dans un état plus fermé, le calcium produit l'effet inverse. Il en résulterait que le récepteur ne serait pas significativement plus sensible à l'ACT. Les différents états de nAChR2 à -30 mV, -50 mV et -70 mV présente des affinités différentes pour l'ACT qui sont notées respectivement A1, A2 et A3. Ces affinités sont classées de la manière suivante : A1 ≥ A2 > A3. D : dépolarisation ; H : hyperpolarisation.*

**Récapitulatif :**

Plusieurs facteurs influencent la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT :

- **l'activation de nAChR1**, qui diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.
- **le potentiel de membrane**. Une dépolarisation induit une augmentation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT alors qu'une hyperpolarisation diminue cette sensibilité.
- **le calcium intracellulaire**. Il diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. L'entrée s'effectue via les **canaux calciques de type HVA** au potentiel de -30 mV, et via les canaux **TRPγ** au potentiel de -70 mV. L'entrée de calcium pourrait en partie expliquer l'effet du potentiel de membrane.

La modulation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT s'effectue par la modulation de l'état d'ouverture du récepteur. Lorsque nAChR2 est dans un état **plus ouvert**, il est **moins sensible** à l'ACT. Au contraire, lorsque nAChR2 est dans un état **plus fermé**, il est **plus sensible** à l'ACT.

# Chapitre IV : Implication des voies de signalisation intracellulaire dans la sensibilité de nAChR2 pour l'acétamipride

## A. Position du problème

L'implication de voie de régulation intracellulaire dans la modulation de l'effet des insecticides sur les nAChRs a été peu étudiée. Il a pu être démontré que la régulation intracellulaire de nAChR1 qui fait intervenir une PKA via l'AMPc, la CaMKII et la phosphatase PP1-2A influence l'efficacité de l'IMI. La phosphorylation de nAChR1 par la PKA permet d'augmenter l'amplitude du courant induit par l'IMI (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret 2003). Concernant nAChR2, seule l'implication du calcium a été mise en évidence. La diminution du calcium intracellulaire induit une diminution de l'amplitude du courant observé suite à l'application de nicotine (Thany et al., 2008). Précédemment nous avons pu démontrer que le calcium intracellulaire joue un rôle important dans la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT, notamment en permettant au récepteur d'être dans un état plus ouvert avant application de l'ACT. La possible implication de voie intracellulaire qui fait intervenir le calcium dans la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est examinée.

## B. Résultats

Le calcium peut se coupler avec la calmoduline (CaM) pour former le complexe calcium-CaM. La formation de ce complexe est stimulée par l'augmentation du calcium intracellulaire et peut être inhibée par du W-7 (Courjaret et Lapied 2001). L'implication de ce complexe dans la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT a donc été étudié aux 3 potentiels imposés -30 mV, -50 mV et -70 mV en présence de W-7 (0.5 mM) dans le milieu intracellulaire et les enregistrements débutent 15 minutes après établissement de la configuration « cellule entière ». Pour un potentiel imposé de -30 mV, l'application de W-7 entraîne une augmentation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT (Figure 49 A). L'$ED_{50}$ est diminuée de 87.4 ± 6.6 ms à 47.2 ± 1.2 ms (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p < 0.05$) et l'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée de -0.18 ± 0.04 nA à -0.07 ± 0.01 nA (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p > 0.05$). Pour un potentiel imposé de -50 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est diminuée mais de manière non

significative (Figure 49 B). L'$ED_{50}$ est augmentée de 124.9 ± 4.5 ms à 183.5 ± 16.7 ms (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p < 0.05$) et l'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée de -0.31 ± 0.02 nA à -0.04 ± 0.01 nA (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p < 0.001$).

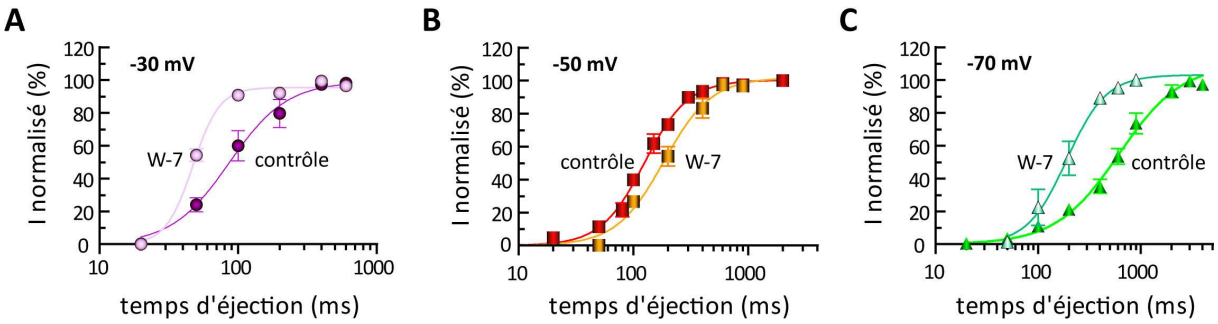



***Figure 49 :*** *Effet du W-7 et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les courbes dose-réponse ont été établies aux potentiels de -30 mV (A), -50 mV (B) et -70 mV (C) en présence ou non de W-7 (0.5 mM) dans la solution intrapipette. Pour chaque courbe, les expériences sont répétées au moins 4 fois. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Pour un potentiel imposé de -70 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée (Figure 49 C). L'$ED_{50}$ est diminuée de 567.0 ± 57.9 ms à 193.0 ± 20.0 ms (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p < 0.01$) et l'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée de -0.48 ± 0.07 nA à -0.09 ± 0.03 nA (Tableau 11, test t non apparié, n=4, $p < 0.01$).

***Tableau 11 :*** *Effet du W-7 en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride (1 mM).*

| | **-30 mV (dépolarisation)** | | **-50 mV (potentiel physiologique)** | | **-70 mV (hyperpolarisation)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***contrôle*** | ***W-7*** | ***contrôle*** | ***W-7*** | ***contrôle*** | ***W-7*** |
| **$ED_{50}$**(ms) | 87.4 ± 6.6 | 47.2 ± 1.2 | 124.9 ± 4.5 | 183.5 ± 16.7 | 567.0 ± 57.9 | 193.0 ± 20.0 |
| **$I_{200}$** (nA) | -0.18 ± 0.04 | -0.07 ± 0.01 | -0.31 ± 0.02 | -0.04 ± 0.01 | -0.48 ± 0.07 | -0.09 ± 0.03 |

*Le W-7 (0.5 mM) est appliqué via la solution intrapipette. $ED_{50}$ = durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude du courant maximal ; $I_{200}$ = courant induit par l'ACT pour une durée d'éjection de 200 ms. Les expériences ont été effectuées en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) et répétées 4 fois.*

Un test de résistance membranaire a été réalisé avant (lorsque la configuration « cellule entière » a été établie) et après application du W-7. Au potentiel de membrane de -70 mV, un courant hyperpolarisant de 200 ms est injecté en présence d'α-bgt (0.5 µM) de TTX (0.1 µM) et de d-TC (50 µM). Après application de W-7, la résistance membranaire

augmente de 95 ± 15 MΩ à 187 ± 8 MΩ (Figure 50 A, test t apparié, n=4, $p < 0.01$). De plus l'augmentation de la résistance membranaire suite à l'application d'ACT est diminuée de 129.1 ± 2.7 % à 102.1 ± 8.0 % en présence de W-7 (Figure 50 B, test t non apparié, n=4, $p < 0.05$). Ces résultats suggèrent que l'inhibition du complexe calcium-CaM par le W-7 augmente la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en diminuant la conductance potassique spontanée de nAChR2 avant application d'ACT.

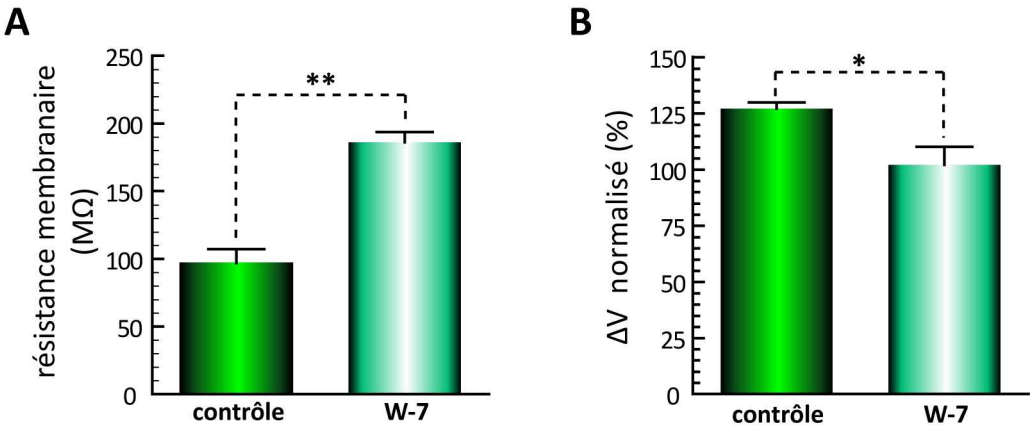



***Figure 50 :*** *Test de résistance membranaire en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de TTX (0.1 µM) et en présence ou non de W-7 (0.5 mM).*
*A, Tests de résistance membranaire avant et après application de W-7 (0.5 mM) sans application d'ACT, effectués sur 4 cellules indépendantes. B, Tests de résistance membranaire après éjection d'ACT d'une durée qui correspond aux $ED_{50}$ respectives : 570 ms pour le contrôle (n=4) et de 190 ms pour le W-7 (n=4). Les tests de résistances membranaires ont été effectués au potentiel de -70 mV en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM) et de TTX (0.1 µM). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01.*

Le complexe $Ca^{2+}$-CaM est capable de réguler des activités enzymatiques tel que l'adénylate cyclase comme il a déjà été prouvé au niveau des neurones DUM (Roeder 1999 ; Courjaret et Lapied 2001). L'application extracellulaire de forskoline (1 µM) permet d'activer l'adénylate cyclase membranaire des neurones DUM. Au potentiel imposé de -30 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT diminue non significativement, l'$ED_{50}$ augmente de 87.4 ± 6.6 ms à 148.0 ± 19.0 ms (Figure 51 A, Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p > 0.05$). L'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée non significativement de -0.18 ± 0.04 nA à -0.08 ± 0.01 nA (Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p > 0.05$).

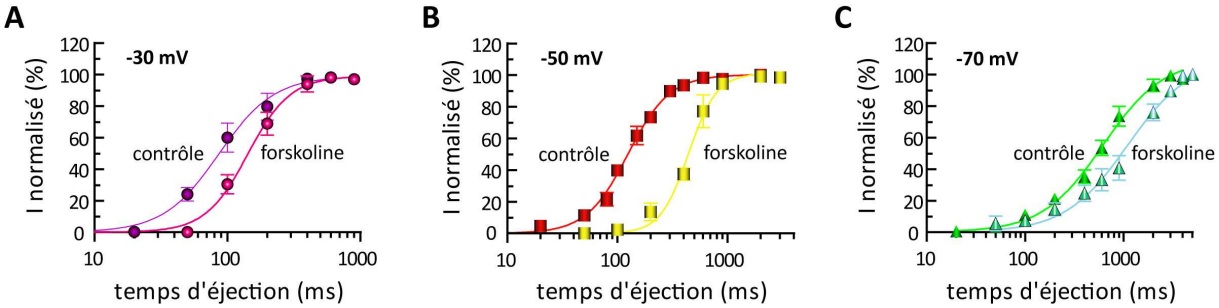



***Figure 51 :*** *Effet de la forskoline et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les courbes dose-réponse ont été établies aux potentiels de -30 mV (A), -50 mV (B) et -70 mV (B) en présence ou non de forskoline (1 µM) dans le milieu extracellulaire. Pour chaque courbe, les expériences sont répétées au moins 4 fois. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

Au potentiel imposé de -50 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT diminue significativement, l'$ED_{50}$ augmente de 127.9 ± 4.5 ms à 442.6 ± 24.0 ms (Figure 51 B, Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p < 0.001$). L'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée de -0.31 ± 0.02 nA à -0.02 ± 0.01 nA (Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p < 0.001$). Au potentiel imposé de -70 mV, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT diminue significativement, l'$ED_{50}$ augmente de 567.0 ± 57.9 ms à 1001 ± 199 ms (Figure 51 C, Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p < 0.05$). L'amplitude du courant observé suite à l'application d'ACT (200 ms) est diminuée de -0.48 ± 0.07 nA à -0.10 ± 0.02 nA (Tableau 12, test t non apparié, n=4, $p < 0.01$).

***Tableau 12 :*** *Effet de la forskoline en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride (1 mM).*

| | **-30 mV (dépolarisation)** | | **-50 mV (potentiel physiologique)** | | **-70 mV (hyperpolarisation)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***contrôle*** | ***forskoline*** | ***contrôle*** | ***forskoline*** | ***contrôle*** | ***forskoline*** |
| **$ED_{50}$**(ms) | 87.4 ± 6.6 | 148.0 ± 19.0 | 124.9 ± 4.5 | 442.6 ± 24.0 | 567.0 ± 57.9 | 1 001 ± 199 |
| **$I_{200}$** (nA) | -0.18 ± 0.04 | -0.08 ± 0.01 | -0.31 ± 0.02 | -0.02 ± 0.01 | -0.48 ± 0.07 | -0.10 ± 0.02 |

*La forskoline (1 µM) est appliquée par la solution extracellulaire. $ED_{50}$ = durée d'éjection nécessaire pour obtenir la moitié de l'amplitude du courant maximal ; $I_{200}$ = courant induit par l'ACT pour une durée d'éjection de 200 ms. Les expériences ont été effectuées en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) et répétées 4 fois.*

Pour confirmer que le complexe CaM agit sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT via l'activation de l'adénylate cyclase, la forskoline est appliquée après application du W-7. Cependant, c'est uniquement au potentiel de -70 mV que le W-7 et la forskoline ont tous les deux un effet significatif sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Nous avons donc testé au potentiel imposé de -70 mV, l'effet de la forskoline (1 µM) après une application du W-7 (0.5

mM). L'effet du W-7 sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est aboli par l'application de la forskoline (Figure 52). L'$ED_{50}$ de nAChR2 pour l'ACT retourne à des valeurs semblables aux valeurs contrôles, 643 ± 63 ms et les courants observés ne sont que légèrement diminués de -0.18 ± 0.04 nA à -0.13 ± 0.07 nA pour une éjection d'ACT d'une durée de 200 ms (test t non appariés, n=4, $p < 0.01$). Ces résultats confirment que le complexe CaM agit sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT via l'activation de l'adénylate cyclase.

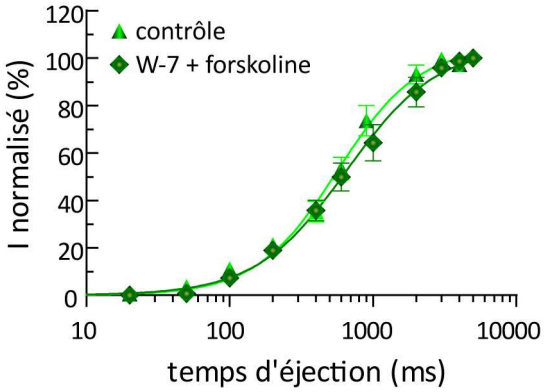



***Figure 52 :*** *Effet de la forskoline après application de W-7 sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).*
*Les courbes dose-réponse ont été établies au potentiel de -70 mV en présence ou non de forskoline (1 µM) dans le milieu extracellulaire et de W-7 (0.5 mM) dans le milieu intracellulaire. Pour chaque courbe, les expériences sont répétées au moins 4 fois. Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

L'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline (1 µM) induit une faible accumulation d'AMPc. L'effet d'une accumulation d'AMPc plus conséquente a été étudié en augmentant la concentration de l'AMPc de 0.1 mM à 0.3 mM dans la solution intrapipette. De manière surprenante, la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée (Figure 53 A, page suivante). L'$ED_{50}$ est significativement réduite de 567 ± 58 ms à 55 ± 2 ms (test t non apparié, n=4, $p < 0.001$). L'amplitude des courants observé après l'éjection d'ACT d'une durée de 200 ms est également diminué significativement de -0.48 ± 0.07 nA à -0.10 ± 0.02 nA (test t non apparié, n=4, $p < 0.01$). Néanmoins, au niveau des neurones DUM, l'augmentation de la concentration de l'AMPc intracellulaire inhibe les canaux TRPγ (Wicher et al., 2006). Par conséquent pour tester l'effet direct de l'AMPc sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT, l'augmentation de la concentration en AMPc de la solution intrapipette est testée en présence de LOE 908 (40 µM) pour inhiber les canaux TRPγ. Lorsque les canaux TRPγ sont inhibés par le LOE 908, aucun effet de l'AMPc n'est observé sur la sensibilité de

nAChR2 pour l'ACT, ni même sur l'amplitude des courants observé (Figure 53 B, test t non apparié, n=3, $p > 0.05$). Ces résultats indiquent que l'AMPc n'agit pas directement sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. L'AMPc agit sur nAChR2 via la régulation des canaux TRPγ.

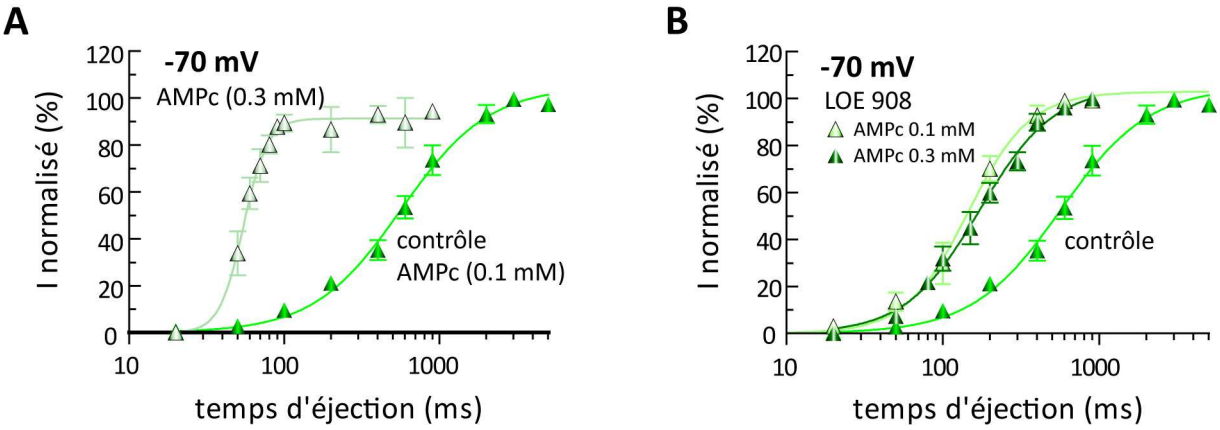



***Figure 53 :*** *Effet de l'AMPc sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.*
*A, Les courbes dose-réponse ont été établies en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel de -70 mV en présence d'AMPc 0.1 mM (n=5) ou 0.3 mM (n=4) dans la solution intrapipette. B, Effet de l'AMPc sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT lorsque les TRPγ sont inhibés. Les courbes dose-réponse ont été établies en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM) et de LOE 908 (40 µM), au potentiel de -70 mV, en présence d'AMPc 0.1 mM (n=4) ou 0.3 mM (n=3) dans la solution intrapipette. Les courbes dose-réponse sous LOE 908 sont comparées à la courbe contrôle (sans LOE 908 et avec l'AMPc 0.1 mM, n=5). Les points des courbes correspondent aux amplitudes des courants mesurés sur une même cellule. Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude du courant maximal observé pour chaque cellule. Chaque courbe est tracée à l'aide d'une équation de Hill. L'ACT est appliqué par éjection pneumatique (15 psig). Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.*

**Récapitulatif :**

L'augmentation du calcium intracellulaire diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Le calcium intracellulaire se couple avec la calmoduline pour former le complexe calcium-CaM. Ce complexe entraîne l'activation de l'adénylate cyclase et par conséquent une faible augmentation de l'AMPc. **L'AMPc module indirectement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT via la régulation des canaux TRPγ** :

- la faible augmentation de l'AMPc n'induit pas de modification de l'activité des canaux TRPγ, une entrée de calcium s'effectue et donc la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est diminuée,
- la forte augmentation de l'AMPc inhibe les canaux TRPγ, l'entrée de calcium ne s'effectue plus et par conséquent la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT est augmentée.

# Chapitre V : Facteurs limitant l'utilisation de l'acétamipride

## A. Position du problème

Précédemment, certains facteurs qui influencent la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT ont été identifiés. L'hyperpolarisation, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et l'activation de nAChR1 sont trois facteurs qui diminuent la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. L'impact de l'activation de nAChR1 a été brièvement exploré. En appliquant dans le milieu extracellulaire de l'IMI, qui a la particularité d'agir uniquement sur nAChR1, plus aucun effet de l'ACT est observé (observation personnelle). L'impact de l'hyperpolarisation sur l'efficacité de l'ACT a été examiné de manière plus approfondie.

## B. Efficacité de l'acétamipride sur nAChR2 en présence de GABA

Au niveau des neurones DUM, deux neurotransmetteurs induisent une hyperpolarisation : le glutamate et l'acide γ-aminobutyrique (GABA) (Dubreil et al., 1994 ; Raymond et al., 2000 ; Le Corronc et al., 2002). Concernant les neurones DUM isolés, il est plus difficile d'observer une hyperpolarisation suite à l'application de GABA (Dubreil 1996). En effet, au niveau des corps cellulaires des neurones DUM isolés, si la solution extracellulaire reste inchangée, pour des potentiels plus positifs que -70 mV, un courant sortant $Cl^-$ est observé (Alix et al., 2002). Par conséquent, l'application de GABA ne peut induire qu'une dépolarisation. Pour induire une hyperpolarisation au niveau des neurones DUM isolés, il est nécessaire de modifier le potentiel d'inversion des ions $Cl^-$ en changeant la composition du milieu extracellulaire mais sans modifier le potentiel d'inversion des autres ions. Ainsi, nous avons légèrement modifié la composition de la solution extracellulaire. Les 200 mM de NaCl ont été remplacé par 42.17 mM de NaCl + 157.83 mM de Na gluconate ; ainsi le potentiel d'inversion des ions $Cl^-$ est amené à -40 mV alors que ceux de $Na^+$ et $K^+$ restent inchangés. Dans un premier temps, nous avons testé que l'amplitude de la dépolarisation suite à l'action par l'ACT sur nAChR2 reste inchangée. L'ACT est appliqué à une concentration de 1 mM pendant une durée de 200 ms (15 psig) en présence d'α-bgt (0.5 µM), de TTX (0.1 µM) et de d-TC (50 µM) dans la solution extracellulaire modifiée. Dans ces conditions, l'amplitude de la dépolarisation est non significativement réduite de 18.1 ± 0.5 mV à 14.1 ± 1.1 mV (Figure 54, test t non apparié, $p > 0.05$, n=4).

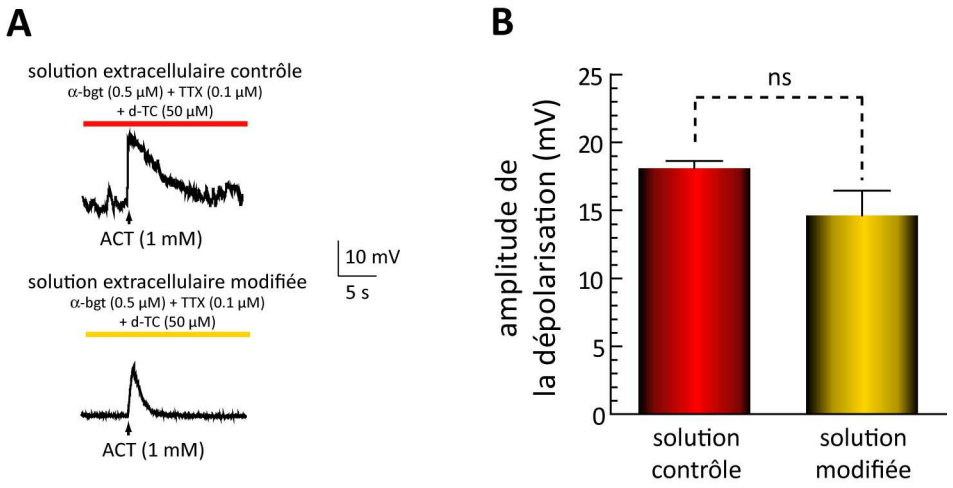



***Figure 54 :*** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en fonction de la solution extracellulaire..*
*A, Illustration de la dépolarisation induite par l'ACT (1 mM,) en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM) et de TTX (0.1 µM) en fonction de la solution extracellulaire : contrôle ou modifiée pour amener le potentiel d'inversion des ions $Cl^-$ à -40 mV. B, la dépolarisation induite par l'ACT n'est pas significativement réduite lorsque le potentiel d'inversion des ions $Cl^-$ est amené à -40 mV. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). Pour chaque condition, l'expérience est répétée 4 fois. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ns : non significatif.*

Sur les mêmes cellules, l'application de GABA (10 µM) par cette solution extracellulaire induit une hyperpolarisation de 14.93 ± 1.0 mV (n=4). La dépolarisation induite par l'ACT est alors diminuée à 7.73 ± 0.86 mV (Figure 55 A, test t apparié, $p < 0.01$, n=4). La co-application de GABA induit donc une diminution de l'efficacité de l'ACT de 45.21 ± 6.12 % (Figure 55 B, test t apparié, $p < 0.01$, n=4).

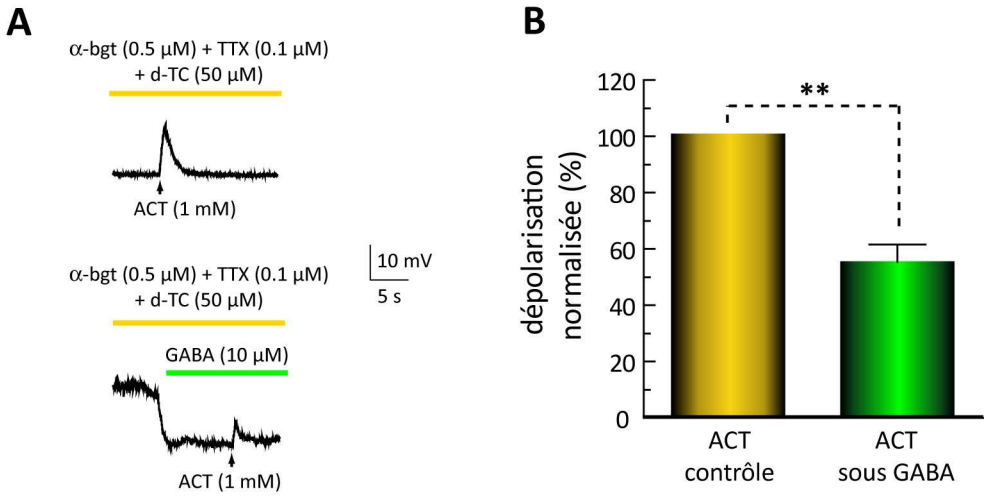



***Figure 55 :*** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en présence ou non de GABA (10 µM) dans le milieu extracellulaire.*
*A, Illustration de la dépolarisation induite par l'ACT (1 mM,) en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de TTX (0.1 µM) et en présence ou non de GABA (10 µM) dans la solution extracellulaire. B, la dépolarisation induite par l'ACT est significativement réduite en présence de GABA (10 µM) dans la solution extracellulaire. L'ACT est appliquée par éjection pneumatique (15 psig, 200 ms). L'expérience est répétée 4 fois. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ** : p < 0.01.*

**Récapitulatif :**

- L'association de l'**IMI** avec **ACT** entraîne une **diminution de la sensibilité** pour l'ACT
- En présence de **GABA**, l'efficacité de l'**ACT** sur nAChR2 est **diminuée**.

# 4ème partie : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## Chapitre I : Discussion

### A. Les facteurs qui influencent la sensibilité de nAChR2 à l'acétamipride

Jusqu'à présent, il est admis que l'efficacité des néonicotinoïdes est dépendante de (1) la composition en sous-unités des nAChRs (Huang et al., 1999 ; Landsell et Millar, 2000 ; Ihara et al., 2003 ; Liu et al., 2009) ; (2) les modifications pré ou post-transcirptionnelles telles que les mutations (Liu et al., 2005, 2006 ; Yixi et al., 2009) ou l'édition d'ARN (Yao et al., 2009). Récemment, il a été établi que les mécanismes cellulaires, moléculaires et la régulation intracellulaire des récepteurs et canaux ioniques membranaires affectent également la sensibilité aux insecticides (Es-Salah et al., 2008; Lapied et al., 2009; Lavialle-Defaix et al., 2010 ; Murillo et al., 2011), dont celle des nAChRs aux néonicotinoïdes (Courjaret et Lapied, 2001). Cependant aucune étude n'a démontré l'implication de l'état conformationnel du récepteur dans la sensibilité aux néonicotinoïdes. Il avait été précédemment suggéré pour nAChR2 que son état conformationnel d'ouverture spontanée pouvait expliquer son insensibilité à l'IMI qui agit uniquement sur des nAChRs à l'état fermé (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret 2003). Les travaux présentés dans ce mémoire permettent de démontrer que l'efficacité d'un néonicotinoïde, l'ACT est dépendante de l'état conformationnel de nAChR2. Cet état conformationnel de nAChR2 est modulé par le potentiel de membrane et le calcium intracellulaire. La mise en évidence de tels facteurs dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes est à prendre en considération pour la mise en place de stratégies visant à optimiser l'utilisation de ces insecticides.

### B. Impact du potentiel de membrane et du calcium intracellulaire sur l'état d'ouverture de nAChR2 : implication dans la sensibilité à l'acétamipride

Au cours de ces travaux de recherche, il a pu être observé que le potentiel de membrane est capable d'impacter la sensibilité de nAChR2 en agissant sur l'état d'ouverture du récepteur. Grâce aux tests de résistance membranaire suite à l'application d'ACT, il a pu être établi que la dépolarisation et l'hyperpolarisation entraînent un changement conformationnel de nAChR2. Suite à une dépolarisation membranaire, le récepteur serait

dans un état conformationnel « plus fermé » facilitant la liaison de l'ACT. La conductance spontanée du récepteur en est alors réduite. Par conséquent le courant observé (reflètant l'inhibition du flux sortant d'ions potassium) en présence d'ACT est diminué et l'augmentation de la résistance membranaire qui y est liée est moins importante. Cet état conformationnel « plus fermé » facilite la fixation de l'ACT et augmente ainsi la sensibilité de nAChR2 à cet insecticide. L'hyperpolarisation produit l'effet inverse. Le récepteur serait dans un état conformationnel « plus ouvert ». La conductance potassique spontanée s'en retrouve augmentée. Par conséquent, l'amplitude du courant observé est augmentée et l'augmentation de la résistance membranaire suite à l'application d'ACT est plus importante. Cet état conformationnel « plus ouvert » rend plus difficile la fixation de l'ACT et diminue ainsi la sensibilité du récepteur à l'insecticide.

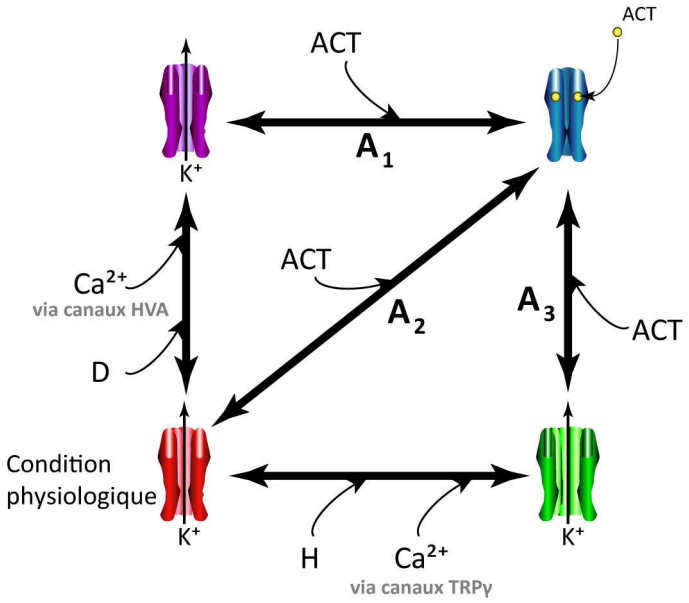



***Figure 56 :*** *Schéma récapitulatif de l'influence du potentiel de membrane et du calcium sur nAChR2.*
*Lors d'une hyperpolarisation, (en vert) les canaux calciques de type TRPγ sont activés, il en découle une entrée de calcium. Le calcium permettrait à nAChR2 d'être dans un état plus ouvert qu'à -50 mV (condition physiologique, en rouge). L'application d'ACT se traduirait alors par une augmentation de l'amplitude du courant observé et une diminution de la sensibilité à l'ACT. Lors d'une dépolarisation (en violet), la participation des canaux calciques de type HVA est augmentée. Alors que la dépolarisation permettrait à nAChR2 d'être dans un état plus fermé, le calcium produit l'effet inverse. Il en résulterait que le récepteur ne serait pas significativement plus sensible à l'ACT. Les différents états de nAChR2 à -30 mV, -50 mV et -70 mV présente des affinités différentes pour l'ACT qui sont notées respectivement A1, A2 et A3. Ces affinités sont classées de la manière suivante : A1 ≥ A2 > A3. D : dépolarisation ; H : hyperpolarisation.*

Il a été possible d'observer une intéraction entre nAChR1 et nAChR2. En l'absence d'activation de nAChR1, la sensibilité de nAChR2 à l'ACT est augmentée. Le potentiel de membrane à lui seul ne permet pas d'expliquer comment nAChR1 agit sur la sensibilité de

nAChR2. La piste du calcium intracellulaire, intimement liée au potentiel de membrane, a été explorée. L'influence du calcium a déjà été observée sur la réponse des nAChRs aux agonistes (Liu et Berg, 1999 ; Voitenko et al., 2000) et en particulier sur l'amplitude du courant de nAChR2 (Thany et al., 2008). Cette étude démontre que le calcium influence non seulement l'amplitude du courant en réponse à l'ACT mais également la sensibilité de nAChR2. En fonction du potentiel de membrane, différentes sources de calcium interviennent. Lors d'une dépolarisation, l'implication des canaux calciques de type HVA est augmentée (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et al., 2001 ; Grolleau et al., 2006). Ce flux calcique diminue légèrement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Cet effet va à l'inverse de l'effet de la dépolarisation sur l'état conformationnel et la sensibilité de nAChR2. Il en résulte cependant de manière générale une légère augmentation de la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT (Figure 56). Dans le cas d'une hyperpolarisation, les canaux TRPγ, impliqués dans le maintient de l'activité spontanée des neurones DUM, sont activés. Cette entrée de calcium via les canaux TRPγ a pour conséquence de diminuer la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT via un changement de conformation de nAChR2. Le récepteur serait dans un état « plus ouvert » qui rend plus difficile la fixation de l'ACT et diminue ainsi sa sensibilité à l'insecticide (Figure 56).

La voie de signalisation intracellulaire impliquant l'augmentation du calcium intracellulaire via les TRPγ, et l'adénylate cyclase dépendante du complexe calcium/CaM a un impact indirect sur la sensibilité de nAChR2 à l'ACT. A partir des résultats des travaux présentés dans ce mémoire, la cascade d'évènement suivante peut être proposée pour expliquer l'action indirecte de cette voie de signalisation sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Suite à l'hyperpolarisation, les canaux TRPγ sont activés. Comme il a déjà été décrit au niveau des neurones DUM (Courjaret et Lapied, 2001), l'influx de calcium qui en découle intéragit avec la CaM pour former le complexe calcium/CaM, qui active l'adénylate cyclase. L'augmentation de l'AMPc via cette adénylate cyclase dépendante du complexe calcium/CaM, diminue l'activité des canaux TRPγ (Wicher et al., 2006), ce qui conduit à une diminution de l'influx calcique. Lors de l'augmentation du calcium intracellulaire, nAChR2 se serait trouvé dans un état conformationnel plus ouvert, rendant plus difficile la fixation de l'ACT. En conséquence à la diminution de l'influx calcique via la diminution d'activité des TRPγ, nAChR2 change de conformation pour être dans un état d'ouverture plus fermé, facilitant la fixation de l'ACT et augmentant ainsi sa sensibilité pour cet insecticide.

La manière dont le calcium module la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT reste à être élucidée. On ne peut pas exclure que le calcium joue un rôle sur cette sensibilité via une autre voie de régulation. La possible modulation allostérique de nAChR2 par le calcium reste une piste à examiner, comme il a déjà été montré pour les nAChRs de vertébrés (Galzi et al., 1996 ; Changeux et al., 1998 ; Paterson et Nordberg, 2000 ; Dajas-Bailador et al., 2004). L'entrée de calcium au travers des canaux HVA suite à une dépolarisation explique mal la diminution de la sensibilité de nAChR2 par nAChR1. Il a pu être démontré que l'activation de nAChRs extra-synaptiques permet d'augmenter la concentration en calcium intracellulaire chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Oertner et al., 1999 ; Wegener et al., 2004 ; Jepson et al., 2006 ; Campusano et al., 2007). Pour l'instant, il n'est pas connu de perméabilité directe au calcium de nAChR1. Il est clair que l'entrée de calcium par nAChR1 n'est pas considérable (Grolleau et Lapied, 1996), mais elle reste une piste à explorer.

### C. Conséquences pour l'optimisation de l'utilisation des néonicotinoïdes

Les résultats démontrent que le potentiel de membrane et le calcium intracellulaire (par l'activation des canaux HVA ou TRPγ) affectent indirectement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT via un changement de conformation du récepteur. Ces concepts illustrés au cours de ce mémoire doivent être pris en considération pour la mise en place de stratégies d'optimisation de l'utilisation des insecticides néonicotinoïdes. La combinaison des néonicotinoïdes avec d'autres insecticides, les pyréthrinoïdes est déjà utilisée (Elbert et al., 2008) pour éviter les résistances croisées. Cependant aucun effet synergique n'a été observé (Bradshaw et al., 2008 ; Peck et al., 2008). Nous avons pu démontrer également que l'association de deux néonicotinoïdes tel que l'IMI et l'ACT n'induit ni effet synergique ni effet additif. Cette absence d'effet peut être expliquée par le fait qu'une partie des néonicotinoïdes partagent le même site de liaison (Kayser et al., 2004 ; Honda et al., 2006). Il est également possible d'expliquer cette absence d'effet additif ou synergique par l'activation de nAChR1 qui diminue la sensibilité de nAChR2 soit par une dépolarisation (Buckingham et al., 1997) soit par un influx de calcium induit par l'IMI (Jepson et al., 2006).

L'augmentation du calcium intracellulaire est un des éléments important à prendre en compte dans l'optimisation de l'usage de l'ACT. Or, lors d'un état de stress, l'insecte sécrète de l'octopamine (Roeder, 1999). Cette augmentation d'octopamine induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Bischof et Enan, 2004 ; Enan et

al., 2005). Par conséquent, d'après nos résultats, un insecte stressé serait moins sensible aux néonicotinoïdes. L'optimisation des insecticides passe également par une diminution de leur toxicité pour les organismes non-cibles. Les néonicotinoïdes ont la particularité d'être plus sélectif des nAChRs d'insecte que des nAChRs de mammifère (Tomizawa et Casida, 2003). Cependant, nous avons démontré que l'état conformationnel des nAChRs influence leur sensibilité aux néonicotinoïdes. Or le calcium possède une effet allostérique sur les nAChRs de vertébrés (Galzi et al., 1996 ; Changeux et al., 1998 ; Paterson et Nordberg, 2000 ; Dajas-Bailador et al., 2004). Un impact du changement de conformation des nAChRs de mammifères sur leur sensibilité aux néonicotinoïdes n'est pas à exclure. Dans ce cas là, la toxicité de ces insecticides sur les mammifères serait à reconsidérer.

# Chapitre II : Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'implication de phénomènes physiologiques dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. L'influx de calcium, par l'activation de canaux TRPγ suite à une hyperpolarisation, diminue la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Ces conditions physiologiques peuvent être atteintes suite à la libération de neurotransmitteurs inhibiteurs tel que le GABA (Raymond et al., 2000 ; Alix et al., 2002 ; Janssen et al., 2010). En effet, nous avons pu observer qu'en présence de GABA, l'efficacité de l'ACT est diminuée. Ces résultats laissent suggérer que l'association des néonicotinoïdes avec des insecticides bloquant l'action de ce neurotransmetteur, les phénylpyrazoles tels que le fipronil, pourrait être une bonne stratégie d'optimisation. Un effet synergique pourrait être attendu. L'étude s'est focalisée sur l'ACT qui présente des pharmacophores différents de l'IMI et de la chlotianidine. Elle pourrait s'étendre à des néonicotinoïdes présentant des pharmacophores différents de ces trois molécules, tels que le thiaméthoxame, le dinotefuran ou le thiaclopride.

L'augmentation du calcium intracellulaire est un phénomène physiologique qui peut être obtenu suite au stress de l'insecte et la sécrétion d'octopamine (Roeder, 1999). Il pourrait être envisagé de reconstituer les conditions de stress de l'insecte pour étudier l'impact d'un tel phénomène biologique sur l'efficacité des insecticides et également confirmer la diminution de l'efficacité des néonicotinoïdes dans ces conditions.

La régulation intracellulaire de nAChR2 n'a été qu'approchée au cours des travaux présentés dans ce mémoire. La régulation intracellulaire de ce récepteur reste donc à être explorée, bien qu'il ait déjà été mis en évidence le rôle du GTP et du GMPc dans cette régulation (Courjaret 2003). S'il s'avère que cette régulation peut être impliquée dans la sensibilité du récepteur ou l'efficacité des néonicotinoïdes. L'association des néonicotinoïdes avec des virus recombinant qui permettent de sur-exprimer les protéines impliquées dans cette régulation pourrait être envisagée pour augmenter la sensibilité des insectes à ces molécules, comme il a été suggéré précédemment (Lapied et al., 2009). L'influence du calcium sur l'état conformationnel du récepteur et son possible effet allostérique sur le récepteur restent à être déterminés de manière plus précise.

Concernant les nAChR1 et nAChR2, leur composition respective en sous-unités reste à être identifiée. Plusieurs sous-unités ont déjà été clonées au sein du laboratoire au niveau du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*. L'extinction de ces sous-unités au niveau des neurones DUM a déjà été tentée au cours de mes travaux de thèse par l'utilisation d'oligonucléotides antisens, mais sans succès. L'utilisation de techniques différentes pour éteindre l'expression de ces sous-unités telles que l'utilisation d'ARN interférent est à envisager. Cette technique a déjà été mise au point au niveau de la cicadelle brune du riz *Nilaparvata lugens* (Liu et al., 2010). Une analyse bioinformatique permettrait d'identifier les résidus impliqués dans la liaison des néonicotinoïdes et par conséquent d'identifier les différences structurales entre les 2 sous-types de récepteur, comme il a déjà pu être effectué concernant les nAChRs d'abeille (Rocher et Marchand-Geneste, 2008). La mise en évidence de ces différences pourrait expliquer que nAChR1 soit sensible à l'IMI et l'ACT et que nAChR2 soit sensible à l'ACT mais insensible à l'IMI. Lorsque ces différences seront identifiées, il serait alors possible d'effectuer du « design » moléculaire pour créer des molécules qui soient actives sur les deux types de récepteurs ou spécifiques de nAChR2 pour espérer obtenir une efficacité plus importante.

# BIBLIOGRAPHIE

**Albert, J.L., et Lingle, C.J.** (1993). Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured Drosophila and other insect neurones. *Journal of Physiology* 463, 605-630.

**Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., et Gauthier, M.** (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemestry* 28, 113-122.

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

**Arias, H.** (1997). Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Research Reviews* 25, 133–191.

**Arthurs, S.P., Lacey, L.A. et Friyys, R. Jr.** (2005). Optimizing use of codling moth granulovirus: effects application rate and spraying frequency on control of codling moth larvae in Pacific Northwest apple orchards. *Journal of Economic Entomology* 98, 1459–1468.

**Ascher, K.R.S., Eliyahu, M., Ishaaya, I., Zur, M. et Ben-moshe, E.** (1986). Synergism of pyrethroid — organophosphorus insecticide mixtures in insects and their toxicity againstspodoptera littoralis larvae. *Phytoparasitica* 14 (2), 101–110.

**Bal, R., Erdogan, S., Theophilidis, G., Baydas, G., et Naziroglu, M.** (2010). Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *Neurotoxicology* 31, 113-120.

**Barbara, G.S., Grunewald, B., Paute, S., Gauthier, M., et Raymond-Delpech, V.** (2008). Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invertebrates Neuroscience* 8, 19-29.

**Barbee, G.C., et Stout, M.J.** (2009). Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (Procambarus clarkii) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Management Science* 65, 1250-1256.

**Benson, J.A., Schurmann, F., Kaufmann, L., Gsell, L., et Piek, T.** (1992). Inhibition of dipteran larval neuromuscular synaptic transmission by analogues of philanthotoxin-4.3.3: a structure-activity study. *Comparative Biochemestry Physiology C* 102, 267-272.

**Benson, J.A.** (1992). Electrophysiological pharmacology of the nicotinic and muscarinic cholinergic responses of isolated neuronal somata from locust thoracic ganglia. *Journal of experimental Biology* 170, 203-233.

**Bielza, P., Espinosa, P.J., Quinto, V., Abellan, J., et Contreras, J.** (2007). Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on Frankliniella occidentalis (Pergande). *Pest Management Science* 63, 84-89.

**Bingham, G., Gunning, R.V., Gorman, K., Field, L.M., et Moores, G.D.** (2007). Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and alpha-cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest Management Science* 63, 276-281.

**Bingham, G., Gunning, R.V., Delogu, G., Borzatta, V., Field, L.M., et Moores, G.D.** (2008). Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. *Pest Management Science* 64, 81-85.

**Bischof, L.J., et Enan, E.E.** (2004). Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from Periplaneta americana. *Insect Biochemestry and Molecular Biology* 34, 511-521.

**Blagburn, J., et Sattelle, B.M.** (1987). Presynaptic Depolarization Mediates Presynaptic Inhibition at a Synapse Between An Identified Mechanosensory Neurone and Giant Interneurone 3 in the First Instar Cockroach, Periplaneta Americana. *Journal of Experimental Biology* 161, 215-225.

**Bodereau, B., Tricoire-Leignel, H., Lapied, B., et Thany, S.H.** (2008). Toxines et identification des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes. In: Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales*, Rencontres en toxinologie, 2008, Ed. de la SFET, 55-61*.

**Bradshaw, J.D., Rice, M.E., et Hill, J.H.** (2008). Evaluation of management strategies for bean leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and Bean pod mottle virus (Comoviridae) in soybean. *Journal of Economic Entomology* 101, 1211-1227.

**Braunig, P., et Pfluger, H.J.** (2001). The Unpaired Median Neurons of Insects. *Advance in Insect Physiology* 28, 185-266.

**Brown, L.A., Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., et Sattelle, D.B.** (2006). Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemestry* 99, 608-615.

**Buckingham, S.D., Hue, B., et Sattelle, D.B.** (1994). Actions of bicuculline on cell body and neuropilar membranes of identified insect neurones. *Journal of Experimental Biology* 186, 235-244.

**Buckingham, S., Lapied, B., Corronc, H., et Sattelle, F.** (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of Experimental Biology* 200, 2685-2692.

**Butault, J.P., Dedryrer, C.A., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Maynard, J.M., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., Sanini, I., et Volay, T.** (2010). Ecophyto R&D. "Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? " Synthèse du rapport d'étude*, France.*

**Bynum, E.D.J., Archer, T.L., et Plapp, F.W.J.** (1997). Comparison of Banks Grass Mite and Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae): Responses to Insecticides Alone and in Synergistic Combinations. *Journal of Economic Entomology* 90, 1125-1130.

**Callec, J.J., et Sattelle, D.B.** (1973). A simple technique for monitoring the synaptic actions of pharmacological agents. *Journal of Experimental Biology* 59, 725-738.

**Calvet, R., Barrusio, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.-P., et Coquet, Y.** (2005). Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales *Paris*.

**Campusano, J.M., Su, H., Jiang, S.A., Sicaeros, B., et O'Dowd, D.K.** (2007). nAChR-mediated calcium responses and plasticity in Drosophila Kenyon cells. *Developmental Neurobiology* 67, 1520-1532.

**Cashin, A.L., Petersson, E.J., Lester, H.A., et Dougherty, D.A.** (2005). Using physical chemistry to differentiate nicotinic from cholinergic agonists at the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of the American Chemestry Society* 127, 350-356.

**Casida, J.E.** (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology* 22, 609-619.

**Cauvin, J.** (1994). Naissance des divinités, naissance de l'agriculture : la révolution des symboles au néolitique. *CNRS, Paris*.

**Cayre, M., Buckingham, S.D., Yagodin, S., et 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.

**Celie, P.H., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., et Sixma, T.K.** (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41, 907-914.

**Chamaon, K., Schulz, R., Smalla, K.H., Seidel, B., et 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., et 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 Neurochemestry* 80, 149-157.

**Changeux, J.P., Bertrand, D., Corringer, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M., et Zoli, M.** (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Research Review* 26, 198-216.

**Commission Européenne** (2010). http://ec.europa.eu ; http://eur-lex.europa.eu.

**Corringer, P.J., Le Novere, N., et Changeux, J.P.** (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 431-458.

**Corbel, V., Chandre, F., Darriet, F., Lardeux, F., et Hougard, J.M.** (2003). Synergism between permethrin and propoxur against Culex quinquefasciatus mosquito larvae. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 158-164.

**Courjaret, R., et Lapied, B.** (2001). Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Molecular Pharmacology* 60, 80-91.

**Courjaret, R.** (2003). Caractérisation des mécanismes de régulation intracellulaires des récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique résistants à l'α-bungarotoxine exprimés sur les Dorsal Unpaired Median (DUM) neurones de la blatte Periplaneta americana., *Université d'Angers*

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

**Cully, D.F., Paress, P.S., Liu, K.K., Schaeffer, J.M., et Arena, J.P.** (1996a). Identification of a Drosophila melanogaster glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *Journal of Biological Chemestry* 271, 20187-20191.

**Cully, D.F., Wilkinson, H., Vassilatis, D.K., Etter, A., et Arena, J.P.** (1996b). Molecular biology and physiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology* 113 (suppl), 191-200.

**Dacher, M., Lagarrigue, A., et Gauthier, M.** (2005). Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130, 37-50.

**Dacher, M., et Gauthier, M.** (2008). Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee. *Physiology and Behaviour* 95, 200-207.

**Dajas-Bailador, F., et Wonnacott, S.** (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 317-324.

**David, J.A., et Sattelle, B.M.** (1984). Actions of Cholinergic Pharmacological Agents on the Cell Body Membrane of the Fast Coxal Depressor Motoneurone of the Cockroach (Periplaneta Americana) *Journal of Experimental Biology* 108, 119-136.

**David, J.A., et Pitman, R.M.** (1993). The pharmacology of α-bungarotoxin-resistant acetylcholine receptors on identified cockroach motoneurone *Journal of comparative Physiology (A)* 172, 359-368.

**Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devilliers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., et Pham-Delegue, M.H.** (2004a). Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (Apis mellifera L.). *Pesticide biochemestry and physiology* 78, 83-92.

**Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., et Pham-Delegue, M.H.** (2004b). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 410-419.

**Defaix, A., et Lapied, B.** (2005). Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invertebrate Neuroscience* 5, 135-146.

**Deglise, P., Grunewald, B., et Gauthier, M.** (2002). The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters* 321, 13-16.

**Devine, G.J., Ishaaya, I., Horowitz, A.R., et Denholm, I.** (1998). Effects of piperonyl butoxide on Bemisia tabaci Genn. (Homoptera: Aleyrodidae): mortality, development, parasitism and predation in Israeli cotton fields. *Crop Protection* 17, 717-726.

**Di Angelantonio, S., et Nistri, A.** (2001). Calibration of agonist concentrations applied by pressure pulses or via rapid solution exchanger. *Journal of Neuroscience Methods* 110, 155-161.

**Dubreil, V., Sinakevitch, I.G., Hue, B., et Geffard, M.** (1994). Neuritic GABAergic synapses in insect neurosecretory cells. *Neuroscience Research* 19, 235-240.

**Dubreil, V.** (1996). Contribution à l'étude electrophysiologique et pharmacologique des systèmes GABAergiques régulateurs de l'activité des neurones "DUM" du dernier ganglion abdominal de la blatte, Periplaneta Americana *Université d'Angers*

**Dugravot, S., Grolleau, F., Macherel, D., Rochetaing, A., Hue, B., Stankiewicz, M., Huignard, J., et Lapied, B.** (2003). Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels. *Journal of Neurophysiology* 90, 259-270.

**Duzguner, V., et Erdogan, S.** (2010). Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pesticide biochemestry and physiology* 97, 13-18.

**Eastham, H.M., Lind, R.J., Eastlake, J.L., Clarke, B.S., Towner, P., Reynolds, S.E., Wolstenholme, A.J., et Wonnacott, S.** (1998). Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect Manduca sexta. *European Journal of Neuroscience* 10, 879-889.

**El Hassani, A.K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., et Armengaud, C.** (2007). Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (Apis mellifera). *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 47, 169-180.

**Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., et Nauen, R.** (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science* 64, 1099-1105.

**Enan, E.E.** (2005). Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect Biochemestry and Physiology* 59, 161-171.

**Ericsson, J.D., Kabaluk, J.T., Goettel, M.S., et Myers, J.H.** (2007). Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen Metarhizium anisopliae against the exotic wireworms Agriotes lineatus and Agriotes obscurus (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology* 100, 31-38.

**Es-Salah, Z., Lapied, B., Le Goff, G., et Hamon, A.** (2008). RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. *Neuroreport* 19, 939-943.

**Fickbohm, D., et Trimmer, B.A.** (2003). Antisense inhibition of neuronal nicotinic receptors in the tobacco-feeding insect, Manduca sexta. *Archives of Insect Biochemestry and Physiology* 53, 172-185.

**Foster, S.P., Denholm, I., et Thompson, R.** (2003). Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* 59, 166-173.

**Galzi, J.L., Bertrand, S., Corringer, P.J., Changeux, J.P., et Bertrand, D.** (1996). Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO Journal* 15, 5824-5832.

**Gauglitz, S., et Pfluger, H.J.** (2001). Cholinergic transmission via central synapses in the locust nervous system. *Journal of Comparative Physiology [A]* 187, 825-836.

**Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrugge, C., Deglise, P., Kljucevic, P., Armengaud, C., et 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.

**Gautier, H., Auger, J., Legros, C., et Lapied, B.** (2008). Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324, 149-159.

**Gerschenfeld, H.M.** (1973). Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological review* 53 (1), 1-119.

**Goldberg, F., Grunewald, B., Rosenboom, H., et Menzel, R.** (1999). Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kkenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee Aapis mellifera. *Journal of Physiology* 514 ( Pt 3), 759-768.

**Gomez-Eyles, J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M.E., et Spurgeon, D.J.** (2008). Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on Caenorhabditis elegans and Eisenia fetida. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (1), 71-79.

**Grauso, M., Reenan, R.A., Culetto, E., et Sattelle, D.B.** (2002). Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, Dalpha5, Dalpha6 and Dalpha7, 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, T., Toghill, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., et Noakes, J.** (2005a). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicological Sciences* 86, 36-47.

**Green, T., Toghill, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., Peffer, R., Noakes, J., et Robinson, M.** (2005b). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicological Sciences* 86, 48-55.

**Grolleau, F., Lapied, B., Buckingham, S.D., Mason, W.T., et 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. *Neuroscience Letters* 220, 142-146.

**Grolleau, F., et Lapied, B.** (2000). Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *Journal of Experimental Biology* 203, 1633-1648.

**Grolleau, F., Stankiewicz, M., Kielbasiewicz, E., Martin-Eauclaire, M.F., Lavialle, C., De Vente, J., et Lapied, B.** (2006). Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca2+ entry is the final step involved in the neurotoxic effect of Tityus serrulatus scorpion beta-toxin. *European Journal Neurosciences* 23, 1465-1478.

**Gu, H., et O'Dowd, D.K.** (2006). Cholinergic synaptic transmission in adult Drosophila Kenyon cells in situ. *Journal of Neuroscience* 26, 265-272.

**Gundelfinger, E.D., et Hess, N.** (1992). Nicotinic acetylcholine receptors of the central nervous system of Drosophila. *Biochimica et Biophysica Acta* 1137, 299-308.

**Gupta, S., et Gajbhiye, V.T.** (2007). Persistence of acetamiprid in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 349-352.

**Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., et Sigworth, F.J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archives* 391, 85-100.

**Hatcher, J.M., Pennell, K.D., et Miller, G.W.** (2008). Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends in Pharmacology Sciences* 29, 322-329.

**Haubruge, E., et Amichot, M.** (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 3, 161-174.

**Hermsen, B., Stetzer, E., Thees, R., Heiermann, R., Schrattenholz, A., Ebbinghaus, U., Kretschmer, A., Methfessel, C., Reinhardt, S., et Maelicke, A.** (1998). Neuronal nicotinic receptors in the locust Locusta migratoria. Cloning and expression. *Journal of Biological Chemestry* 273, 18394-18404.

**Hewes, R.S.** (1999). Voltage-dependent ionic currents in the ventromedial eclosion hormone neurons of Manduca sexta. *Journal of Experimental Biology*202, 2371-2383.

**Honda, H., Tomizawa, M., et Casida, J.E.** (2006a). Neo-nicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and -aldehyde oxidase systems. *Toxicology Letters* 161, 108-114.

**Honda, H., Tomizawa, M., et Casida, J.E.** (2006b). Insect nicotinic acetylcholine receptors: neonicotinoid binding site specificity is usually but not always conserved with varied substituents and species. *Journal of Agricultural and Food Chemestry* 54, 3365-3371.

**Hu, A., Zhang, W., et Wang, Z.** (2010). Functional feedback from mushroom bodies to antennal lobes in the Drosophila olfactory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10262-10267.

**Huang, Y., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Windass, J.D., Lansdell, S.J., et Millar, N.S.** (1999). Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid Myzus persicae. *Journal of Neurochemestry* 73, 380-389.

**Hue, B., Lapied, B., et Malécot, C.** (1989). Do presynaptic muscarinic receptors regulate acetylcholine release in the central nervous system on the cockroach Periplaneta americana? *Journal of experimental biology* 142, 447-451.

**Hue, B., et Callec, J.J.** (1990). Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In: Cockroaches as models for neurobiology: application in biomedical research,In I. Huber, E.P. Masler, A. Asidi, and B.R. Rao, *Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 149-168*.

**Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V., et Sattelle, D.B.** (2003). Diverse actions of neonicotinoids on chicken α7, α4β2 and Drosophila-chicken SADβ2 and ALSβ2 hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus laevis oocytes *Neuropharmacology* 45 (1), 133-144.

**Ihara, M., Brown, L.A., Ishida, C., Okuda, H., Sattelle, B.M., et 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 Pestiide Science* 31, 35-40.

**Ihara, M., Hirata, K., Ishida, C., Kagabu, S., et Matsuda, K.** (2007a). Blocking actions of alkylene-tethered bis-neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by terminal abdominal ganglion neurons of Periplaneta americana. *Neuroscience Letters* 425, 137-140.

**Ihara, M., Shimomura, M., Ishida, C., Nishiwaki, H., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., et Matsuda, K.** (2007b). A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks. *Invertebrate Neuroscience* 7, 47-51.

**Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Hirata, K., Nishiwaki, H., Morimoto, T., Akamatsu, M., Ashikawa, Y., Kuroda, S., Mega, R., Kuramitsu, S., Sattelle, D.B., et Matsuda, K.** (2008). Crystal structures of Lymnaea stagnalis AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invertebrate Neuroscience* 8, 71-81.

**Jackson, C., Bermudez, I., et Beadle, D.J.** (2002). Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors in isolated Locusta migratoria neurones. *Microscopy Research and Technique* 56, 249-255.

**Janssen, D., Derst, C., Buckinx, R., Van den Eynden, J., Rigo, J.M., et Van Kerkhove, E.** (2007). Dorsal unpaired median neurons of locusta migratoria express ivermectin- and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels. *Journal of Neurophysiology* 97, 2642-2650.

**Janssen, D., Derst, C., Rigo, J.M., et Van Kerkhove, E.** (2010). Cys-loop ligand-gated chloride channels in dorsal unpaired median neurons of Locusta migratoria. *Journal of Neurophysiology* 103, 2587-2598.

**Jepson, J.E., Brown, L.A., et Sattelle, D.B.** (2006). The actions of the neonicotinoid imidacloprid on cholinergic neurons of Drosophila melanogaster. *Invertebrate Neuroscience* 6, 33-40.

**Jeschke, P. et Nauen, R.** (2008). Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science* 64, 1084-1098.

**Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., et Elbert, A.** (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids (dagger). *Journal and Agricultural and Food Chemestry* 59 (7), 2897-2908.

**Jin, Y., Tian, N., Cao, J., Liang, J., Yang, Z., et Lv, J.** (2007). RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evolutionary Biology* 7, 98-110.

**Jones, A.K., Buckingham, S.D., et Sattelle, D.B.** (2005a). Chemistry-to-gene screens in Caenorhabditis elegans. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 321-330.

**Jones, A.K., Grauso, M., et Sattelle, D.B.** (2005b). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, Anopheles gambiae. *Genomics* 85, 176-187.

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

**Jones, A.K., et Sattelle, D.B.** (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, Tribolium castaneum. *BMC Genomics* 8, 327-343.

**Karlin, A.** (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 102-114.

**Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., denholm, I., et Morin, S.** (2008). Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemestry and Molecular Biology* 38, 634-644.

**Karunker, I., Morou, E., Nikou, D., Nauen, R., Sertchook, R., Stevenson, B.J., Paine, M.J., Morin, S., et Vontas, J.** (2009). Structural model and functional characterization of the

Bemisia tabaci CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemestry and Molecular Biology* 39, 697-706.

**Kayser, H., Lee, C., Decock, A., Baur, M., Haettenschwiler, J., et 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 Management Science* 60, 945-958.

**Khot, A.C., Bingham, G., Field, L.M., et Moores, G.D.** (2008). A novel assay reveals the blockade of esterases by piperonyl butoxide. *Pest Management Science* 64, 1139-1142.

**Koppenhofer, S., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Fuzy, E.M. et Kaya, K.H.** (2002). Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. *Entomologica experimentalis et applicata* 106, 7-18.

**Koppenhofer, A.M., et Fuzy, E.M.** (2008a). Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on Heterorhabditis bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological control* 45, 93-102.

**Koppenhofer, A.M., et Fuzy, E.M.** (2008b). Early timing and new combinations to increase the efficacy of neonicotinoid-entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae) combinations against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Pest Management Science* 64 (7), 725-735.

**Kreutzweiser, D.P., Good, K.P., Chartrand, D.T., Scarr, T.A., et Thompson, D.G.** (2008). Toxicity of the systemic insecticide, imidacloprid, to forest stream insects and microbial communities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 211-214.

**Lansdell, S.J., et Millar, N.S.** (2000). The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39, 671-679.

**Lapied, B., Malécot, C.O., et 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. *Journal of Experimental Biology* 144, 535-549.

**Lapied, B., Le Corronc, H., et Hue, B.** (1990). Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Research* 533, 132-136.

**Lapied, B.** (1991). Etudes de l'activité électrique et de la pharmacologie des récepteurs cholinergiques des Dorsal Unpaired Median neurones du 6ème ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana. *Université d'Angers*

**Lapied, B., Tribut, F., et Hue, B.** (1992). Effects of McN-A-343 on insect neurosecretory cells: evidence for muscarinic-like receptor subtypes. *Neuroscience Letters* 139, 165-168.

**Lapied, B., Pennetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P., et Corbel, V.** (2009). Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends in Biotechnology* 27, 190-198.

**Laurent, F.M., et Rathahao, E.** (2003). Distribution of [(14)C]imidacloprid in sunflowers (Helianthus annuus L.) following seed treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemestry* 51, 8005-8010.

**Lavialle-Defaix, C., Gautier, H., Defaix, A., Lapied, B., et Grolleau, F.** (2006). Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *Journal of Neurophysiology* 96, 2437-2450.

**Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C., et Lapied, B.** (2010). How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333, 264-272.

**Le Corronc, H., Lapied, B., et Hue, B.** (1991). M2-like presynaptic receptors modulate acetylcholine release in the cockroach (Periplaneta americana) central nervous system *Journal of Insect Physiology* 37 (9), 647-652.

**Le Corronc, H., Alix, P., et Hue, B.** (2002). Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxin. *Journal of Insect Physiology* 48, 419-431.

**Le Novere, N., et Changeux, J.P.** (2001). LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Research* 29, 294-295.

**Liu, F., Bao, S.W., Song, Y., Lu, H.Y., et Xu, J.X.** (2010). Effects of imidacloprid on the orientation behavior and parasitizing capacity of Anagrus nilaparvatae, an egg parasitoid of Nilaparvata lugens. *Biological control* 55 (4), 473-483.

**Liu, Q., et Berg, D.K.** (1999). Actin filaments and the opposing actions of CaM kinase II and calcineurin in regulating alpha7-containing nicotinic receptors on chick ciliary ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 10280-10288.

**Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Denholm, I., Han, Z., et 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., et Millar, N.S.** (2006). A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *Journal of Neurochemestry* 99, 1273-1281.

**Liu, Z., Han, Z., Zhang, Y., Song, F., Yao, X., Liu, S., Gu, J., et Millar, N.S.** (2009). Heteromeric co-assembly of two insect nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits: influence on sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Journal of Neurochemestry* 108, 498-506.

**Liu, S., Ding, Z., Zhang, C., Yang, B., et Liu, Z.** (2010). Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, Nilaparvata lugens. *Insect Biochemestry and Molecular Biology* 40, 666-671.

**Martin, T., Ochou, O.G., Vaissayre, M., et Fournier, D.** (2003). Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Journal of Economic Entomology* 96, 468-474.

**Matsuda, K., Shimomura, M., Kondo, Y., Ihara, M., Hashigami, K., Yoshida, N., Raymond, V., Mongan, N.P., Freeman, J.C., Komai, K., et 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.

**Matsuda, K., Shimomura, M., Ihara, M., Akamatsu, M., et Sattelle, D.B.** (2005). Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Bioscience Biotechnology and Biochemestry* 69, 1442-1452.

**Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., et Sattelle, D.B.** (2009). Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Molecular Pharmacology* 76, 1-10.

**Maxim, L., et van der Sluijs, J.P.** (2007). Uncertainty: cause or effect of stakeholders' debates? Analysis of a case study: the risk for honeybees of the insecticide Gaucho. *Science of Total Environment* 376, 1-17.

**MEDD**. (2010). www.legrenelle-environnement.fr.

**Millar, N.S.** (2009). A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* 78 (7), 766-76.

**Ministère de l'alimentation** (2010). http://e-phy.agriculture.gouv.fr.

**Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G., et Smagghe, G.** (2009). Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19, 207-215.

**Morales-Rodriguez, A., et Peck, D.C.** (2009). Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs Amphimallon majale and Popillia japonica. *Biological control.* 51 (1), 169-180.

**Moser, S.E., et Obrycki, J.J.** (2009). Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of coccinellid larvae related to zoophytophagy. *Biological control* 51 (3), 487-492.

**Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Grafius, E.J., et Moyer, D.D.** (2006). Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* 62, 30-37.

**Mota-Sanchez, D., Wise, J.C., Poppen, R.V., Gut, L.J., et Hollingworth, R.M.** (2008). Resistance of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. *Pest Management Science* 64, 881-890.

**Murillo, L., Hamon, A., Es-Salah-Lamoureux, Z., Itier, V., Quinchard, S. et Lapied, B.,** (2011) Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells, *Neurotoxicology*, doi:10.1016/j.neuro.2011.05.015

**Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., et Schmuck, R.** (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science* 57, 577-586.

**Nauen, R., Sorge, D., Sterner, A., et Borovsky, D. (2001).** TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of Heliothis virescens. *Arch Insect Biochem Physiol* 47, 169-180.

**Nauen, R., Ebbinghauss-Kintscher, U., Salgado, V., et Kaussmann, M.** (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide biochemestry and physiology* 76, 55-69.

**Nauen, R., et Denholm, I.** (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemestry and Physiology* 58, 200-215.

**Neher, E., Sakmann, B., et Steinbach, J.H.** (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Archives* 375, 219-228.

**Ninsin, K.D.** (2004). Selection for resistance to acetamiprid and various other insecticides in the diamondback moth, Plutella xylostella (L.) (Lep., Plutellidae). *Journal of Applied Entomology* 128, 445-451.

**Oertner, T.G., Single, S., et Borst, A.** (1999). Separation of voltage- and ligand-gated calcium influx in locust neurons by optical imaging. *Neuroscience Letters* 274, 95-98.

**Ohno, I., Tomizawa, M., Durkin, K.A., Casida, J.E., et Kagabu, S.** (2009a). Bis-neonicotinoid insecticides: Observed and predicted binding interactions with the nicotinic receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemestry Letters* 19, 3449-3452.

**Ohno, I., Tomizawa, M., Durkin, K.A., Casida, J.E., et Kagabu, S.** (2009b). Neonicotinoid substituents forming a water bridge at the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemestry* 57, 2436-2440.

**Ohno, I., Tomizawa, M., Durkin, K.A., Naruse, Y., Casida, J.E., et Kagabu, S.** (2009c). Molecular features of neonicotinoid pharmacophore variants interacting with the insect nicotinic receptor. *Chemical Research in Toxicology* 22, 476-482.

**Oleskevich, S.** (1999). Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies in vitro. *Journal of Neurophysiology* 82, 1091-1096.

**Oliveira, E.E., Pippow, A., Salgado, V.L., Buschges, A., Schmidt, J., et Kloppenburg, P.** (2010). Cholinergic currents in leg motoneurons of Carausius morosus. *Journal of Neurophysiology* 103, 2770-2782.

**ORP**. (2010). www.observatoire-pesticides.gouv.fr.

**Pan, Z.H., Zhang, D., Zhang, X., et Lipton, S.A.** (1997). Agonist-induced closure of constitutively open gamma-aminobutyric acid channels with mutated M2 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6490-6495.

**Papachristos, D.P., et Milonas, P.G.** (2008). Adverse effects of soil applied insecticides on the predatory coccinellid Hippodamia undecimnotata (Coleoptera: Coccinellidae) *Biological control* 47 (1), 77-81.

**Paterson, D., et Nordberg, A.** (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology* 61, 75-111.

**Peck, D.C., Olmstead, D., et Morales, A.** (2008). Application timing and efficacy of alternatives for the insecticidal control of Tipula paludosa Meigen (Diptera: Tipulidae), a new invasive pest of turf in the northeastern United States. *Pest Management Science* 64, 989-1000.

**Pervez, A., et Omkar,** (2005). Functional responses of coccinellid predators: an illustration of a logistic approach. *Journal of Insect Science* 5,5-11.

**Poletti, M., Maia, A., et Omoto, C.** (2007). Toxicity of neonicotinoid insecticides to Neoseiulus californicus and Phytoseiulus macropilis (Acari: Phytoseiidae) and their impact on

functionnal response to Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). *Biological control* 40, 20-36.

**Ramirez, J., et Orchard, I.** (1990). Octopaminergic modulation of the forewing stretch receptor in the locust Locusta migratoria. *Journal of Experimental Biology* 149, 255-279.

**Rauch, N., et Nauen, R.** (2003). Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). *Archives of Insect Biochemestry and Physiology* 54, 165-176.

**Raymond, V., Sattelle, D.B., et Lapied, B.** (2000). Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport* 11, 2695-2701.

**Raymond, V., et Sattelle, D.B.** (2002). Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 427-436.

**Regnault-Roger, C., Fabres, G., et Philogène, B.J.R.** (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement *Londres ; Paris ; New York [N.Y.]* .

**Rocher, A., et Marchand-Geneste, N.** (2008). Homology modelling of the Apis mellifera nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and docking of imidacloprid and fipronil insecticides and their metabolites. *SAR and QSAR in Environmental Research* 19, 245-261.

**Rodrigues, K.J., Santana, M.B., Do Nascimento, J.L., Picanco-Diniz, D.L., Maues, L.A., Santos, S.N., Ferreira, V.M., Alfonso, M., Duran, R., et Faro, L.R.** (2009). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 101-107.

**Roeder, T.** (1999). Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology* 59, 533-561.

**Rucktooa, P., Smit, A.B., et Sixma, T.K.** (2009). Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochemical Pharmacology* 78, 777-787.

**Salgado, V.L., et Saar, R.** (2004). Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Journal of Insect Physiology* 50, 867-879.

**Sardo, A.M., et Soares, A.M.** (2010) Assessment of the effects of the pesticide imidacloprid on the behaviour of the aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 648-656.

**Sattelle, D.B., McClay, A.S., Dowson, R.J. and Callec, J.J.** (1976). Pharmacology of an insect ganglion: actions of carbamylcholine and acetylcholine. *Journal of Experimental Biology* 64, 13-23.

**Sattelle, D.B., et David, J.A.** (1983). Voltage-dependent block by histrionicotoxin of the acetylcholine-induced current in an insect motoneurone cell body. *Neuroscience Letters* 43, 37-41.

**Sgard, F., Fraser, S.P., Katkowska, M.J., Djamgoz, M.B., Dunbar, S.J., et Windass, J.D.** (1998). Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits from the insect pest Myzus persicae. *Journal of Neurochemestry* 71, 903-912.

**Shimomura, M., Okuda, H., Matsuda, K., Komai, K., Akamatsu, M., et 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., Matsuda, K., Sattelle, D.B., et 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.

**Shimomura, M., Satoh, H., Yokota, M., Ihara, M., Matsuda, K., et Sattelle, D.B.** (2005). Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the

N-terminus of the Drosophila Dalpha2 subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity. *Neuroscience Letters* 385, 168-172.

**Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., et 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.

**Sinakevitch, I., Geffard, M., Pelhate, M., et Lapied, B.** (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the accessory gland of the male cockroach Periplaneta americana. *Cell Tissue Research* 276, 15-21.

**Sinakevitch, I.** (1995). Détermination de la nature chimique du produit synthétisé et libéré par les dorsal unpaired median (DUM) neurones et étude du rôle physiologique de ces cellules neurosécrétrices du 6ème ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana, *Université d'Angers*

**Sinakevitch, I.I., Geffard, M., Pelhate, M., et Lapied, B.** (1995). Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach Periplaneta americana. *Joournal of Experimental Biology* 198, 1539-1544.

**Sinakevitch, I.G., Geffard, M., Pelhate, M., et Lapied, B.** (1996). Anatomy and targets of Dorsal Unpaired Median neurones in the Terminal Abdominal Ganglion of the male cockroach Periplaneta americana L. *Journal of Comparative Neurology* 367, 147-163.

**Stoughton, S.J., Liber, K., Culp, J., et Cessna, A.** (2008). Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates Chironomus tentans and Hyalella azteca under constant- and pulse-exposure conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 662-673.

**Su, H., et O'Dowd, D.K.** (2003). Fast synaptic currents in Drosophila mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *Journal of Neurosciences* 23, 9246-9253.

**Takahashi, H., Mitsui, J., Takakusa, N., Matsuda, M., Yoneda, H., et Suzuki J.** (1992) NI-25, a new type of systemic and broad spectrum insecticide. *Proceedings British Crop Protection Conference – Pests and Diseases, BCPC*, pp. 89–96, Farnham, Surrey, UK

**Talley, T.T., Harel, M., Hibbs, R.E., Radic, Z., Tomizawa, M., Casida, J.E., et Taylor, P.** (2008). Atomic interactions of neonicotinoid agonists with AChBP: molecular recognition of the distinctive electronegative pharmacophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7606-7611.

**Tan, J., Galligan, J.J., et Hollingworth, R.M.** (2007). Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* 28, 829-842.

**Thany, S.H., Lenaers, G., Crozatier, M., Armengaud, C., et Gauthier, M.** (2003). Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, Apis mellifera. *Insect Molecular Biology* 12, 255-262.

**Thany, S.H., Crozatier, M., Raymond-Delpech, V., Gauthier, M., et 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., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., et Lapied, B.** (2007). Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 14-22.

**Thany, S.H., Courjaret, R., et 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.** (2009). Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicoly* 30, 1045-1052.

**Thany, S.H.** (2011). Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, act as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology* 60, 587-592

**Tomizawa, M., et Casida, J.E.** (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology* 48, 339-364.

**Tomizawa, M., et Casida, J.E.** (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247-268.

**Tomizawa, M., et Casida, J.E.** (2009). Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Accounts of Chemical Research* 42, 260-269.

**Tribut, F.** (1994). Effets de l'axotomie sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des récepteurs cholinergiques des cellules neurosécrétrices : les "Dorsal Unpaired Median" (DUM) neurones du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana., *Université d'Angers*

**Tribut, F., Duval, A., et Lapied, B.** (1994). Two distinct receptors are activated by arecoline on cockroach sixth abdominal ganglion DUM neurones. *Journal of Experimental Biology* 186, 325-331.

**Trimmer, B.A., et Weeks, J.C.** (1989). Effects of Nicotinic and Muscarinic Agents on an Identified Motoneurone and its Direct Afferent Inputs in Larval Manduca Sexta *Journal of Experimental Biology* 144.

**Trimmer, B.A., et Weeks, J.C.** (1991). Activity-dependent induction of facilitation, depression, and post-tetanic potentiation at an insect central synapse. *Journal of Comparative Physiology [A]* 168, 27-43.

**Trimmer, B.A.** (1994). Characterization of a muscarinic current that regulates excitability of an identified insect motoneuron. *Journal of Neurophysiology* 72 (4), 1862-1873.

**Trimmer, B.A.** (1995). Current excitement from insect muscarinic receptors. *Trends in Neurosciences* 18 (2), 104-111.

**Trimmer, B.A., et Qazi, S.** (1996). Modulation of second messenger in the nervous system of larval Manduca sexta by muscarinic receptors. *Journal of Neurochemestry* 66(5), 1903-1913.

**UIPP**. (2008). L'utilité des produits phytopharmaceutiques. : www.uipp.org.

**UIPP**. (2010). Rapport d'activité 2008-2009: www.uipp.org.

**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 4A resolution. *Journal of Molecular Biology* 346, 967-989.

**van den Beukel, I., van Kleef, R.G., Zwart, R., et Oortgiesen, M.** (1998). Physostigmine and acetylcholine differentially activate nicotinic receptor subpopulations in Locusta migratoria neurons. *Brain Research* 789, 263-273.

**Vincent, C., Ferran, A., Guige L., Gambier, J., et Brun, J.** (2000). Effects of imidacloprid on Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) larval biology and locomotory behavior *Eur. J. Entomol.* 97, 501–506.

**Voitenko, S.V., Bobryshev, A.Y., et Skok, V.I.** (2000). Intracellular regulation of neuronal nicotinic cholinoreceptors. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 30, 19-25.

**Wang, Y., Cheng, J., Qian, X., et Li, Z.** (2007). Actions between neonicotinoids and key residues of insect nAChR based on an ab initio quantum chemistry study: hydrogen bonding and cooperative pi-pi interaction. *Bioorganic and Medicinal Chemestry* 15, 2624-2630.

**Wang, R.L., Yi, S., et Liang, S.P.** (2010). Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels. *Journal of Zhejiang University Science B* 11, 451-457.

**Wegener, C., Hamasaka, Y., et Nassel, D.R.** (2004). Acetylcholine increases intracellular Ca2+ via nicotinic receptors in cultured PDF-containing clock neurons of Drosophila. *Journal of Neurophysiology* 91, 912-923.

**Wicher, D., Walther, C., et Wicher, C.** (2001). Non-synaptic ion channels in insects--basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Progress in Neurobiology* 64, 431-525.

**Wicher, D., Messutat, S., Lavialle, C., et Lapied, B.** (2004). A new regulation of non-capacitative calcium entry in insect pacemaker neurosecretory neurons. Involvement of arachidonic acid, no-guanylyl cyclase/cGMP, and cAMP. *Journal of Biological Chemestry* 279, 50410-50419.

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

**Wustenberg, D.G., et Grunewald, B.** (2004). Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, Apis mellifera. *Journal of Comparative Physiology A* 190, 807-821.

**Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., et Chang, L.H.** (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 101, 1743-1748.

**Yao, W.D., Rusch, J., Poo, M.Met Wu, C.F.** (2000). Spontaneaous acetylcholine secretion developing growth cones of Drosophila central neurons in culture: effect of cAMP-pathway mutations. *Journal of Neuroscience 20 (7), 2626-2637*

**Yao, X., Song, F., Chen, F., Zhang, Y., Gu, J., Liu, S., et Liu, Z.** (2008). Amino acids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor beta subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochemestry and Molecular Biology* 38 (9), 834-840

**Yixi, Z., Liu, Z., Han, Z., Song, F., Yao, X., Shao, Y., Li, J., et 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 Neurochemestry* 110, 1855-1862.

**Zayas, R.M., Qazi, S., Morton, D.B., et Trimmer, B.A.** (2002). Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *Journal of Neurochemestry* 83, 421-431.

**Zhong, W., Gallivan, J.P., Zhang, Y., Li, L., Lester, H.A., et Dougherty, D.A.** (1998). From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12088-12093.

# ANNEXES – PUBLICATIONS

## PUBLICATION N°1

**Article soumis dans :**

***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***

# Transmembrane potential polarization, calcium influx and nAChR conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nAChR subtype to the neonicotinoid acetamiprid.

# Transmembrane potential polarization, calcium influx and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nAChR to the neonicotinoid acetamiprid.

Béatrice Bodereau-Dubois, Steeve H. Thany and Bruno Lapied

*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, SFR 149 QUASAV, Université d'Angers, Faculté des Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49 045 Angers Cedex, France (BBD, SHT and BL).*

**Running Title:** Cellular factors modulate nAChR2 sensitivity to acetamiprid

**Corresponding Author:** Professor Bruno Lapied

Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, SFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49 045 Angers Cedex, France

**Phone Number:** +33 241 73 54 38

**Fax Number:** +33 241 73 52 15

**e-mail:** bruno.lapied@univ-angers.fr

**Number of text pages: 32**

**Number of tables: 2**

**Number of figures: 11**

**Number of references: 49**

**Number of words in the Abstract:** 219

**Number of words in the Introduction:** 744

**Number of words in the Discussion:** 1348

**Abbreviations :** α-bgt, α-bungarotoxine; ω-CgTx, ω-conotoxin GVIA from *conus geographus*; ACT, acetamiprid; d-TC, d-tubocurarine; DUM, dorsal unpaired median; $ED_{50}$,; pressure ejection duration that produces 50% activation of the maximal agonist-induced current; GABA, γ-aminobutyric acid; HVA, High Voltage-Activated; IMI, imidacloprid; LOE 908, (R,S)-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-isoquinoline-1-yl)-2-phenyl-N,N-di--acetamide; Nic, nicotine; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PP1/2A, protein phosphatase 1/2A; TRP, transient receptor potential; TTX, tetrodotoxin; W7, *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride.

**Recommended section:** Neuropharmacology

## Abstract

Neonicotinoid insecticides act selectively on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Recent studies revealed that their efficiency was altered by phosphorylation/dephosphorylation process and intracellular signalling pathway involved in the regulation of nAChRs. Using whole-cell patch-clamp electrophysiology adapted on dissociated cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons, we demonstrated that intracellular factors involved in the regulation of nAChR function, modulated neonicotinoids sensitivity. DUM neurons were known to express α-bungarotoxin-insensitive nAChR subtypes, nAChR1 and nAChR2. Whereas nAChR1 was sensitive to imidacloprid, nAChR2 was insensitive to this insecticide. Here, we demonstrated that acetamiprid, another type of neonicotinoid insecticide, acted as agonist on nAChR2 subtype. Furthermore, we revealed that both steady-state depolarization and hyperpolarization affected nAChR2 sensitivity to acetamiprid, respectively. The measurement of the input membrane resistance indicated that change in the acetamiprid-induced agonist activity was related to the receptor conformational state. Using $CdCl_2$, ω-conotoxin GVIA and LOE 908, we reported that inhibition of calcium influx through HVA calcium channels and TRPγ activated by both depolarization and hyperpolarization, respectively, increased nAChR2 sensitivity to acetamiprid. Finally, using W7, forskolin and cAMP, we demonstrated that adenylyl cyclase sensitive to the calcium/calmodulin complex regulated internal cAMP concentration, which in turns modulated TRPγ function and nAChR2 sensitivity to acetamiprid. These findings, bringing new insights on the signalling pathway modulating neonicotinoid efficiency, open novel strategies for optimizing insect pest control.

**Keywords:** neonicotinoids, insect nAChRs, DUM neurons, calcium-dependent regulation

## Introduction

Neonicotinoids are an important class of insecticides used worldwide for eliminating and controlling sucking and biting insect pests (aphids, thrips, whiteflies...) (Tomizawa and Casida 2005; Jeschke and Nauen, 2008). The first commercialized member of this class of insecticides was imidacloprid (IMI), used in foliar application (CONFIDOR®) and in seed treatment (GAUCHO®). Additional neonicotinoids of second generation such as acetamiprid (ACT, SUPREME®; Takahashi et al., 1992) have been commercialized since the discovery of IMI (Jeschke and Nauen, 2008). Based on their chemical structure similar to that of nicotine (Nic; Fig. 1A), previous electrophysiological studies have reported that neonicotinoids have agonist actions on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) including partial and full agonist activities (Buckingham et al., 1997; Matsuda et al., 2005; Tan et al., 2007). Because it has been shown that neonicotinoids are more selective for insect nAChRs than vertebrate nAChRs (Tomizawa and Casida, 2003) these properties made their use safer (Elbert et al., 2008). Despite this specific activity, two major problems may threaten the future of neonicotinoids: i) the development of resistance in pests associated to neonicotinod specific metabolites (Gorman et al., 2007) and ii) an alteration of neonicotinoid efficacy by cellular and molecular factors involved in the regulation of nAChRs targeted by these class of insecticides (Courjaret and Lapied 2001).

The emergence of insect resistance to neonicotinoids have been observed for few insect species (Nauen and Denholm, 2005; Alyokhin et al., 2007; Gorman et al., 2007; Mota-Sanchez et al., 2008). The first well described resistance mechanism is an increase of neonicotinoids detoxification (Honda et al., 2006; Casida, 2011). In the whitefly, *Bemisia tabaci*, an increase of neonicotinoids metabolization is correlated with over-expression of cytochrome P-450 monooxygenases CYP6CM1 (Karunker et al., 2009). Over-expression of these genes decreases insecticide efficacy by facilitating its elimination from the organism. Another mechanism involves the nAChR subtypes. It is demonstrated that the subunit composition of nAChR subtype determine the pharmacological profile and the neonicotinoid

sensitivity (Lansdell and Millar, 2000; Yixi et al., 2009; Li et al., 2010). In addition, the point mutation Y151S in loop B of α1 and α3 nAChR subunits of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens,* is also correlated with insect resistance to neonicotinoids. This mutation induces a decrease of nAChRs sensitivity to neonicotinoid insecticides (Liu et al., 2005; Yixi et al., 2009). Finally, modification of nAChRs has been identified in β1 subunit from *Nilaparvata lugens.* The Adenosine-to-Inosine RNA editing in β1 nAChR subunits, which leads to transform the amino acid asparagin to aspartate in loop E, decreases IMI sensitivity without any effect on ACh potency (Yao et al., 2009).

Recent data indicate that neonicotinoid actions are also dependent on different molecular and cellular factors including i) the phosphorylation/dephosphorylation process involving PKA and protein phosphatase PP1/2A known to decrease IMI efficiency on insect nAChR subtypes and ii) the conformational state of nAChR (Courjaret and Lapied, 2001). In this last case, previous findings have reported in insect neurosecretory cells identified as Dorsal Unpaired Median (DUM) that distinct nAChR subtypes (named nAChR1 and nAChR2; see Fig. 1B) present different sensitivity to the neonicotinoid insecticide IMI. Whereas nAChR1 is sensitive to IMI, nAChR2 is insensitive to this insecticide although the insect has never been exposed to such molecule (Courjaret and Lapied, 2001). Furthermore, it seems that the uncommon conformational state of nAChR2 (i.e., open at resting state and closed upon cholinergic agonist application) (Fig. 1B; Courjaret and Lapied 2001; Courjaret et al., 2003; Thany et al., 2008) could be responsible for the different neonicotinoid sensitivity observed between these two nAChR subtypes. These data clearly demonstrate that the neonicotinoid mode of action on insect nAChRs is more complex than expected.

Because insecticide efficacy is closely related to their both chemical structure and conformational state of nAChR, we performed electropharmacological studies on IMI-insensitive nAChR2 using another type of neonicotinoid, ACT (Takahashi et al., 1992), which differs structurally from IMI. Indeed, the use of ACT which is characterized by having a N-cyano-amidine pharmacophore whereas the chemical structure of IMI is coupled with a N-nitroguanidine pharmacophore (Elbert et al., 2008) allows us to bring new insights on

molecular and cellular factors involved in the modulation of neonicotinoid efficacy. In this study, we have revealed that i) ACT exerts an agonist activity on IMI-insensitive nAChR2 and ii) different cellular factors such as membrane polarization and calcium influx through TRP$\gamma$ and High Voltage-Activated calcium channels may decrease or increase the sensitivity of insect nAChR2 to ACT through the modification of the receptor conformational state.

## Materials and methods

**Cell preparation.** Experiments were carried out on DUM neuron somata isolated from the midline of the terminal abdominal ganglion (TAG) of the nerve chord of adult male cockroaches (*Periplaneta americana)*. Cockroaches were obtained from our laboratory stock colonies maintained at 29°C on 12h light/dark cycle. Animals were immobilized ventral side up on a dissection dishes. The ventral cuticle and the accessory gland were removed to allow access to the TAG which was carefully dissected under a binocular microscope and placed in normal cockroach saline containing (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 $CaCl_2$, 4 $MgCl_2$, 10 HEPES, 50 sucrose and pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of adult DUM neuron somata was performed under sterile conditions using enzymatic digestion by collagenase (Type IA, 300 IU/ mL; Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, USA) at 29°C during 35 minutes. Then, a mechanical dissociation through fire-polished Pasteur pipettes was used in order to isolate DUM neurons from the TAG (Lapied et al., 1989). DUM neuron somata were maintained at 29°C for 24 h before electrophysiological experiments were carried out.

**Electrophysiological recordings.** ACT-, IMI- and Nic-induced currents were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under voltage-clamp mode. Membrane potential and input membrane resistance were recorded under current-clamp mode. Ejection pipettes and patch-clamp electrodes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC150T-10; Clark Electromedical Instruments Harvard Apparatus, UK) using a P-97 model puller (Sutter Instruments, USA). Patch pipettes had resistances ranging from 1 to 1.2 MΩ when filled with internal pipette solution (see composition below). The liquid junction potential between extracellular and intracellular solutions was always corrected before the formation of a gigaohm seal (> 1 GΩ). Signals were recorded with an Axopatch 200A (Axon instruments, USA). Ionic currents induced by Nic and neonicotinoids were displayed on a computer with software control pClamp (version 10.0, Axon Instruments,

USA) connected to a digitizer (DIGIDATA 1322, Axon Instruments, USA). DUM neuron somata were voltage-clamp at a steady-state holding potential of -50 mV (except when otherwise stated). Experiments were carried out at room temperature.

**Curves fitting and data analysis.** We performed data analysis, including fitting procedures, using the software Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Data are presented as the mean ± S.E.M.. Information regarding which pairs of means were significantly different and which were not was given by using a Student's *t* test for multiple comparisons. In this case, statistical analysis was expressed as nonsignificant (ns) for $p > 0.05$ and significant for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The equation used to fit the monophasic sigmoid curve was:

$$I = I_{max}/[1+(ED_{50}/x)^{nH}] \quad (1)$$

where, I is the percentage of agonist-induced inward current, Imax is the maximal current value, $ED_{50}$ is the pressure ejection duration that produces 50% activation of the maximal agonist-induced current, x is the pressure ejection duration of agonist and nH is the Hill coefficient. The biphasic dose-response curves were fitted using a "double" Hill equation:

$$I = [\ I_{max_1}/[1+(ED_{50_1}/x)^{nH1}]] + [\ I_{max_2}/[1+(ED_{50_2}/x)^{nH2}]] \qquad (2)$$

where, I is the percentage of agonist-induced inward current, $I_{max_1}$ is the maximal current value for the first receptor subtype, $I_{max_2}$ is the maximal response for the second receptor subtype, $ED_{50_1}$ is the pressure ejection duration that produces 50% activation of the maximal agonist-induced current for the first receptor subtype, $ED_{50_2}$ is the pressure ejection duration that produces 50% activation of the maximal agonist-induced current for the second receptor subtype, x is the pressure ejection duration, nH1 is the Hill coefficient for the first receptor subtype and nH2 is the Hill coefficient for the second receptor subtype.

**Solutions and drugs application.** Bath solution superfusing the cells contained (in mM): 200 NaCl; 3.1 KCl; 5 CaCl2; 4 MgCl2; 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Patch pipettes were filled with solution containing (in mM): 160 K+/D-Gluconate; 10 KF; 10 NaCl; 1 $MgCl_2$; 0.5 $CaCl_2$; 3 ATP; 0.1 cAMP; 10 EGTA; 20 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with KOH. ACT (1mM), Nic (10 mM) and IMI (0.1mM and 1mM) were applied by pneumatic pressure ejection (15 psig) (Lapied et al., 1990; Courjaret and Lapied, 2001; Alix et al., 2002) with a pneumatic pressure system (Miniframe, Medical System Corporation, USA) to minimize receptor desensitization resulting from bath application of agonists. The pressure ejection was made through a glass micropipette (with a resistance of 1.8 mΩ when filled with agonists) positioned in extracellular solution within 50 µm from the isolated neuron cell body. In these conditions, there was a linear relationship between the applied volume and the pulse duration parameters (McCaman et al., 1977). Thus, the logarithmic concentration of cholinergic agonists at any point of the cell body will be proportional to the pulse duration of the cholinergic agonist applications (at constant pressure), as previously reported on the same preparation (Lapied et al., 1990). The steady-states recordings were made 5 minutes after establishment of the whole-cell configuration and repeated application of ACT, IMI and Nic. Isolated neuron somata were continuously bathed with saline (see composition above) using a gravity perfusion system positioned within 100 µm from the cell body. Repeated application of Nic and ACT were made with an interval of 2 minutes. IMI and ACT stock solution (100 mM) were prepared in dimetyl sulfoxide (DMSO). Final dilution never contained more than 0.1% DMSO. This concentration of solvent was found to be without any effect on electrophysiological properties of DUM neurons. Pharmacological agents such as α-bungarotoxin (α-bgt, 0.5 µM), d-tubocurarine (d-TC, 50 µM), tetrodotoxin (TTX, 0.1 µM), cadmium chloride ($CdCl_2$, 0.5 mM), ω-conotoxin GVIA from *Conus geographus* (ω-CgTx, 0.1 µM) and LOE 908 (40 µM) were added to external solution. W7 (0.5 mM), BAPTA (10 mM) and cesium chloride (CsCl, 10mM) were added in the internal pipette solution immediately

before use. All compounds were purchased from Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich, France) except LOE 908 which was purchased from Tocris (Tocris Bioscience, UK).

## Results

**Comparative effects of Nicotine, imidacloprid and acetamiprid on α-bungarotoxin-insensitive nAChRs expressed in DUM neurons.**

As previously demonstrated, DUM neuron expressed both α-bungarotoxin (α-bgt)-insensitive and "mixed" nAChRs, which were blocked by extracellular application of 0.5 µM α-bgt (Lapied et al., 1990; Courjaret and Lapied, 2001; Fig. 1B). In this condition, pressure ejection application of Nic (10 mM, 100 ms) onto DUM neuron somata evoked a transient inward current (Fig. 2A). As already reported (Courjaret and Lapied 2001; Courjaret et al., 2003; Thany et al., 2008), when the peak amplitude of the inward currents were plotted against the steady-state holding potentials, a biphasic aspect was observed (Fig. 2B). The peak amplitude decreased linearly between -90 mV and -30 mV and then increased between -30 mV and +30 mV. This unusual biphasic aspect indicated that Nic acted on two different subtypes of α-bgt-insensitive nAChRs named nAChR1 and nAChR2 (Fig. 1B; Courjaret and Lapied 2001; Courjaret et al., 2003: Thany et al., 2008). Interestingly, after pressure application of IMI (0.1 mM, 100 ms), we never observed a biphasic current-voltage curve (Fig.2C; Courjaret and Lapied 2001) whereas ACT (1 mM, 200 ms) induced similar effect to that of Nic (Fig. 2D). These last results indicated that, i) like Nic, ACT was able to act on both nAChR1 and nAChR2 and ii) confirmed that nAChR2 was insensitive to IMI (Courjaret and Lapied, 2001).

**Acetamiprid acts as an agonist on both DUM neuron nAChR1 and imidacloprid-insensitive nAChR2 subtypes**

As indicated (see Materials and Methods section), pressure ejection application of ACT was made through a glass pipette positioned in solution within 50 µm from the isolated neuron cell body. In this situation, the logarithmic concentration of agonists, at any point of the cell body, will be proportional to the pulse duration of the cholinergic agonist applications (at constant pressure), as previously reported (Lapied et al., 1990; Courjaret and Lapied

2001; Di Angelantonio and Nistri, 2001; Alix et al., 2002). Pressure ejection application of 1 mM ACT onto isolated DUM neuron somata produced a dose-dependent inward current (Fig. 3A,B). When mean values of the peak inward current amplitude were plotted against the logarithm of the non-cumulative pressure ejection duration, a biphasic dose-response curve was obtained (Fig. 3A). According to the "double" Hill equation (see equation n°2 in Materials and Methods section), an apparent maximum was obtained at around 200-400 ms ejection duration of ACT but it was only a plateau between the two parts of the curve. For pressure ejection duration higher than 500 ms, the ACT-induced current further increased before reaching maximum amplitude around 2s. For comparison, pressure application of 1 mM IMI induced only a monophasic dose-response curve slightly shifted to the left along the logarithm of the pressure ejection duration axis ($ED_{50}$ for IMI of 130 ± 5 ms and $ED_{50}$ for the first component of 186 ± 27 ms for ACT; n=4), which was well correlated with the first component of the biphasic curve observed with ACT (Fig. 3A). The sigmoid curve corresponded to the best fit according to the Hill equation (see equation n°1). Based on these findings and because we previously reported that IMI exerted only an agonist activity on nAChR1 (Courjaret and Lapied 2001; this study), the biphasic aspect of the dose-response curve observed with ACT might be explained by an agonist action on both nAChR1 and IMI-insensitive nAChR2 (Fig. 3C). To substantiate this hypothesis, we measured the input membrane resistance, reflecting the selective conformational state of nAChR1 and nAChR2, at two different pressure ejection durations of ACT (i.e., 300 ms and 1000 ms; Fig. 3D). Under current-clamp condition (membrane potential of -50 mV), a decrease in DUM neuron input membrane resistance in response to a hyperpolarization current pulse was observed after pressure application of ACT during 300 ms (Fig. 3D, middle trace). By contrast, the input membrane resistance was increased when ACT was pressure applied during 1000 ms (Fig. 3D, upper trace). These results indicated that the first component of the dose-response curve for ACT corresponded to the activation of nAChR1 whereas the second one resulted in an inhibition of nAChR2-mediated spontaneous potassium conductance.

Furthermore, it was possible to show that nAChR1 was more sensitive to ACT ($ED_{50}$ of 186 ± 27 ms; n=4) than nAChR2 ($ED_{50}$ of 729 ± 39 ms; n=4).

**High concentration of d-tubocurarine allows to study in isolation the effects of cholinergic agonists and acetamiprid on imidacloprid-insensitive nAChR2**

We previously indicated that relatively low concentration of d-tubocurarine (d-TC, 10 µM) induced an incomplete inhibition of nAChR1 without any effect on the second component of the biphasic current-voltage relationship corresponding to nAChR2 activation (Courjaret and Lapied 2001; Thany et al., 2008). To completely block nAChR1, Nic was applied in the presence of higher concentration of d-TC (50 µM). Thus, Nic produced an unexpected important increase of the inward current amplitude between -30 mV and -70 mV currents (from -1.13 ± 0.12 nA to -3.36 ± 0.30 nA, holding potential of -70 mV; n=5 $p < 0.001$) and reduced the current between -30 mV and +20 mV, compared to the Nic-induced inward current amplitude recorded without d-TC (Fig. 4A,C). It should be indicated that the inward current amplitude measured after nAChR2 activation resulted, in fact, from an inhibition of an outward spontaneous potassium conductance (Courjaret and Lapied 2001; Courjaret et al., 2003; Thany et al., 2008), which is closely dependent on the input membrane resistance reflecting conformational state transition of the receptor switching from open to close state in the presence of agonist. Consequently, an increase in Nic-induced current amplitude indicated that nAChR2 was more open before pressure application of Nic. By contrast, a decrease in the current amplitude suggests that nAChR2 is in a less open conformational state before application of the cholinergic agonist. Based on these results and to ensure that only ionic current flowing through nAChR2 was recorded with 50 µM d-TC bath applied, the input membrane resistance was measured under current-clamp condition, at a membrane potential of -70 mV, in control and after bath application of Nic (100 µM). As illustrated in Fig. 4Ba,b, an increase in DUM neuron input membrane resistance (by 37.8 ± 6.2 %; n = 4; $p < 0.01$) in response to a hyperpolarizing current pulse (150 pA in amplitude and 350ms in duration) was observed after bath application of 100 µM Nic. In accordance with previous

electrophysiological data (Courjaret and Lapied 2001; Thany et al., 2008), we suggested that this increase in the input membrane resistance was due to the loss of the spontaneous potassium conductance. Because nAChR2 was known to be selectively blocked by application of cesium chloride (Courjaret and Lapied 2001), we performed experiments in the presence of this potassium channel blocker. Indeed, under 50 µM d-TC treatment, the increased current amplitude was almost completely reduced (from -3.36 ± 0.30 nA to -0.38 ± 0.10 nA; n=4; $p < 0.001$) with 10 mM cesium chloride intracellularly applied (Fig. 4C). Finally, pressure ejection of IMI did not produce any effect on DUM neurons pretreated with 50 µM d-TC (not shown). Furthermore, as illustrated in Fig. 5Aa, pressure application of ACT onto isolated DUM neuron somata pretreated with 50 µM d-TC and 0.1 µM TTX to inhibit spontaneous sodium-dependent action potentials, produced a transient depolarization with an amplitude less important than that of produced by ACT without d-TC (18.1 ± 0.5 mV and 32.8 ± 0.2 mV, respectively; $p < 0.001$; n=4; Fig. 5Ab). This effect was consistent with an increase in input membrane resistance measured in response to a 350 ms-hyperpolarization current pulse, in the presence of 50 µM d-TC (Fig. 5B). Finally, like Nic, the current-voltage relationship established with 50 µM d-TC revealed that ACT produced an important increase of the peak inward current amplitude for potentials more negative than -10 mV (from -0.08 ± 0.01 nA in control condition to -0.48 ± 0.07 nA for a steady-state holding potential of -70 mV; n=5; $p < 0.001$; Fig. 5C). Taken together, these results confirmed that 50 µM d-TC allowed to study the effect of agonists on IMI-insensitive nAChR2 without any influence of nAChR1. Consequently, all the following experiments were performed in the presence of 50 µM d-TC

**Variation of the membrane potential affects the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid**

To express more quantitatively the sensitivity of nAChR2 to ACT, isolated DUM neuron somata were exposed to various pressure ejection duration of ACT in the presence of 50 µM d-TC (Fig. 6A; holding potential of -50 mV). Mean values for percentage peak current amplitudes were plotted against the logarithm of the non-cumulative pressure ejection duration of ACT. In these conditions, a monophasic dose-response curve was observed,

shifted significantly to the left (the $ED_{50}$ decreased from 729 ± 39 ms to 125 ± 5 ms; n=4; $p < 0.001$) with no significant change in the maximum effect (Fig. 6A). These results suggested that nAChR1 activation resulting in a large membrane depolarization influenced the sensitivity of nAChR2 to ACT. In order to study the voltage-dependence of the sensitivity of nAChR2 to ACT, the data for ACT obtained at -50 mV were compared with the dose-dependent action of ACT at both depolarized (-30 mV) and hyperpolarized (-70 mV) steady-state holding potentials. The dose-response curve established at -30 mV was slightly shifted to the left with an $ED_{50}$ lower than that for -50 mV (Fig. 6B, Table 1). By contrast, the sensitivity of nAChR2 to ACT was strongly decreased for a holding potential of -70 mV with a dose-response curve shifted significantly to the right on the logarithm of pressure ejection duration axis (Fig. 6B; Table 1; n=5; $p < 0.001$). Another interesting point indicated by these data concerned the evolution of the ACT-induced current amplitude measured at -30 mV and -70 mV, compared to -50 mV (Table 1). According to the specific biophysical property of nAChR2 explained above, both decrease and increase in ACT-induced current amplitude measured at -30 mV and -70 mV (-0.18 ± 0.03 nA and -0.48 ± 0.07 nA, respectively; n=4; 200 ms in duration) compared to that of measured at -50 mV (-0.31 ± 0.02 nA; n=4) indicated that nAChR2 conformational state depended on the membrane potential. In other words; nAChR2 seemed to be less open at -30 mV than at -70 mV under resting condition. This was confirmed by measuring, under current-clamp condition, the DUM neuron input membrane resistance in response to a 200 ms-hyperpolarization current pulse before and after application of ACT (200 ms in duration). As illustrated in Fig. 6C, the increase in DUM neuron membrane input resistance observed after ACT application was more important when the steady-state holding potential was hyperpolarized from -50 mV (resting control condition) to -70 mV (n=4; $p < 0.001$). These results indicated that the increased ACT-induced current amplitude observed at more hyperpolarized potential correlated well with the high value of the input membrane resistance observed in the presence of ACT. This suggests that nAChR2, before agonist application, was in a more open conformational state at steady-state

hyperpolarized membrane potential, which thereby decreased the sensitivity of nAChR2 to ACT.

**Calcium influx through HVA calcium channels and TRPγ modulates the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid**

We previously indicated that i) variation of DUM neuron membrane potential is often associated with change in intracellular calcium concentration and ii) change in intracellular calcium concentration modulates nAChR2 functional properties (Grolleau and Lapied 2000; Wicher et al., 2001; Thany et al., 2008). If relatively high calcium was introduced into the DUM neuron somata by adding 0.5 mM calcium without EGTA in the patch pipette, the dose-response curve established at -50 mV was shifted to the right yielding the estimated $ED_{50}$ from 125 ± 5 ms (control condition) to 304 ± 45 ms (not shown). By contrast, as illustrated in Fig. 7A-C, the semi-logarithmic dose-response curves constructed, in the presence of 0.5 mM $CdCl_2$, at more depolarized (i.e., -30 mV, Fig. 7A) and hyperpolarized (i.e., -70 mV, Fig. 7C) steady-state holding potentials than in control (-50 mV, Fig. 7B) were all shifted to the left with a same maximum reached. The corresponding $ED_{50}$ values together with the ACT-induced current amplitudes measured in each experimental condition were summarized in Table 2. As expected from the results presented in Fig. 6B,C, the decrease in ACT-induced current amplitudes observed at -50 mV and -70 mV, for instance, correlated well with the decrease in DUM neuron input membrane resistance in response to a 200 ms-hyperpolarization current pulse before and after application of ACT (200 ms in duration) and 0.5 mM $CdCl_2$ (Fig. 7D; $p < 0.01$ for -50 mV and $p < 0.001$ for -70 mV, n=4, Fig. 7D). These results suggested that inhibiting calcium influx into DUM neuron somata allowed to maintain nAChR2 in a less open conformational state, which thereby renders nAChR2 more sensitive to ACT.

Based on these results and because previous findings reported that calcium influx, in DUM neurons, might be accomplished by i) High Voltage-Activated (HVA) calcium channels known to be functional in a positive membrane potential range (Wicher et al., 2001; Grolleau

et al. 2006) and ii) TRPγ activated by hyperpolarization (Wicher et al., 2006), additional experiments were first performed with ω-conotoxin GVIA, one of the more potent N-type HVA calcium channel blockers in DUM neurons (Grolleau et al., 2006; Gautier et al., 2008). As shown in Fig. 8A, the semi-logarithmic curve established at a holding potential of -30 mV in the presence of 0.1 µM ω-conotoxin GVIA was shifted to the left yielding a lower $ED_{50}$ of 53 ± 1 ms than in control (84 ± 5 ms; n=5; $p < 0.05$). These results indicated that calcium influx through activation of HVA calcium channels decreased nAChR2 sensitivity to ACT at depolarized membrane potential. The involvement of TRPγ activation was confirmed by studying the effect of LOE-908 (40 µM), a specific blocker of TRPγ in DUM neurons (Wicher et al., 2004; Grolleau et al., 2006; Gautier et al., 2008). The data for LOE 908 were compared with the dose-dependent action of ACT tested alone (Fig. 8B), at a holding potential of -70 mV. The LOE 908 dose-response curve was shifted significantly to the left in a parallel manner. The estimated $ED_{50}$ (205 ± 27 ms; n=4) was more than 2-fold lower than the value estimated in control condition (567 ± 58 ms; n=5) and the current amplitude decreased from -0.48 ± 0.07 nA to -0.14 ± 0.02 nA for 200 ms-ejection time (n=4; $p < 0.05$). These last results demonstrate that activation of TRPγ decreased the sensitivity of nAChR2 to ACT and confirmed that calcium influx through HVA calcium channels and TRPγ modulated nAChR2 function.

We previously demonstrated that TRPγ activation contributes to the regulatory process of ion channels and membrane receptors via intracellular calcium-dependent pathways (Wicher et al., 2004; 2006; Grolleau et al., 2006; Gautier et al., 2008). Consequently, we then investigated the regulatory role of the calcium/CaM complex in the sensitivity of nAChR2 to ACT via the calcium entry through TRPγ activation. Experiments were carried out at a more hyperpolarized holding steady-state potential (i.e., -70 mV) than the resting potential (-50 mV) (Wicher et al., 2006). To investigate further the modulatory role of the calcium/CaM complex, the data obtained in control (i.e., -70 mV) were compared with the dose-dependent action of ACT recorded with the calmodulin inhibitor W7. The dose-response curve obtained with 0.5 mM W7, applied intracellularly, was shifted significantly to

the left (Fig. 9A). The estimated $ED_{50}$ (193 ± 20 ms; n=4) was about five-fold lower than for ACT applied alone ($p < 0.01$; n=4). In parallel, the input membrane resistance, reflecting the conductance property of nAChR2 was measured before (when whole-cell configuration was established) and after W7 application. As expected from voltage-clamp experiments, W7 produced a statistically significant increase of the input membrane resistance from 95 ± 15 MΩ to 187 ± 8 MΩ (n=4; $p < 0.01$) in response to a hyperpolarizing current pulse (200 ms in duration) measured under current-clamp condition (not illustrated). All together, these results suggested that the calcium/CaM complex was an important factor accounting for the increased sensitivity of nAChR2 to ACT via a modification of conformational spontaneous channel opening of nAChR2.

**Effect of intracellular cAMP concentration rise on nAChR2 sensitivity to acetamiprid**

In DUM neuron cell bodies, the calcium/CaM complex is an important signal that regulates adenylyl cyclase activity, which thereby influence the intracellular cAMP concentration (Courjaret and Lapied, 2001). We then examined the effect of forskolin on the nAChR2 sensitivity to ACT. Fig. 9B demonstrates that in the presence of 1 µM forskolin, the dose-response curve was slightly shifted to the right, indicating a small decrease of nAChR2 sensitivity to ACT ($p < 0.05$; n=4). Because the calcium/CaM complex plays a crucial role in the activation of adenylyl cyclase, we investigated the effect of forskolin with 0.5 mM W7 which blocked CaM. In this condition, the dose-response curve was not statistically different from the control (Fig. 9C). In other words, W7 counteracted the effect of forskolin (n=4; $p > 0.05$). These results suggest that the calcium/CaM complex modulated the efficacy of ACT on nAChR2 via the regulation of activation of adenylyl cyclase, which thereby regulated the level of cAMP accumulation. To substantiate this hypothesis, DUM neurons were perfused using a pipette solution containing a higher cAMP concentration (0.3 mM) than in control condition (0.1 mM). In this case, the $ED_{50}$ was 55 ± 2 ms, a value about 10-fold lower than control value, 567 ± 58 ms (n=4; $p < 0.001$). These results confirmed the involvement of cAMP in direct and/or indirect modulation of the sensitivity of nAChR2 to ACT. Finally, it has

been demonstrated that calcium influx via TRPγ activated at hyperpolarized membrane potential, is dependent on the level of intracellular cAMP since increasing cAMP concentration reduces TRPγ activity (Wicher et al., 2006). Interestingly, when DUM neurons were superfused with LOE 908, we never observed any effect of 0.3 mM cAMP, applied intracellularly, on nAChR2 sensitivity to ACT (Fig. 9D; n=4; $p > 0.05$). These results confirm that high cAMP level inhibited TRPγ activation, reducing calcium influx, which thereby increased the sensitivity of nAChR2 to ACT.

**Physiological significance of the modulation of the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid**

As reported in this study, membrane potential variations influence the sensitivity of nAChR2 to ACT *via* changes in intracellular calcium concentration. To demonstrate the physiological importance of such modulation, we performed additional experiments with GABA, known to mediate fast inhibitory transmission in the insect central nervous system by increasing the flow of chloride ions through ionotropic GABA receptors (Alix et al., 2002; Zhao et al., 2003; Dupuis et al., 2010; Janssen et al., 2010). Under current-clamp condition, pressure ejection application of ACT (1 mM; 200 ms) onto DUM neuron somata (membrane potential -50 mV) produced a transient membrane depolarization (14.1 ± 1.1 mV; n=4; Fig. 10A and B). When DUM neuron somata were superfused by the inhibitory neurotransmitter GABA (10 µM), a hyperpolarization of the membrane potential (14.9 ± 1.1 mV; Fig. 10A lower trace; n=4) was observed. In this condition, the depolarization amplitude observed with pressure application of ACT (200 ms) was strongly reduced (from 14.1 ± 1.1 mV to 7.7 ± 0.9 mV; Fig. 10B; n=4; $p < 0.05$).

## Discussion

It has previously been established that the sensitivity of insect nAChRs to neonicotinoid insecticides depends on i) nAChRs subtypes subunit composition (Landsell and Millar, 2000; Yixi et al., 2009; Li et al., 2010), ii) molecular modification of nAChRs by point mutation and post-transcriptional processes (Liu et al., 2005; Perry et al., 2008; Yixi et al., 2009; Yao et al., 2009); and iii) nAChRs regulation by intracellular transient mechanisms such as phosphorylation/dephosphorylation process (Courjaret and Lapied., 2001; Thany et al., 2007). In this study, we have demonstrated that the IMI-insensitive nAChR2, which differs from nAChR1 by uncommon functional properties (i.e., open at resting membrane potential and closed upon agonist application) is sensitive to another type of neonicotinoid, ACT. The sensitivity of nAChR2 to ACT depends on the receptor conformational state measured by the input membrane resistance, closely related to complex cellular mechanisms involving transmembrane potential polarization, calcium influx through HVA calcium channels and TRPγ and intracellular calcium-dependent signalling pathway.

### Transmembrane potential polarization variations together with receptor conformational state modulate the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid

We have reported in this study that transmembrane potential polarization affects the nAChR2 conformational state, which is confirmed by measuring the input membrane resistance. In fact, because nAChR2, open at resting state, mediates a permanent spontaneous outward potassium conductance (Courjaret and Lapied 2001; Thany et al., 2008), the inwardly directed current amplitude observed after cholinergic agonists and/or neonicotinoid insecticides correlate well with i) the switch from open to close state of nAChR2, ii) an increase in the input membrane resistance and iii) the consecutive inhibition of the spontaneous potassium conductance. These biophysical parameters seem to play crucial role in the modulation of nAChR2 sensitivity to ACT since both depolarization and hyperpolarization affect the nAChR2 sensitivity to ACT, respectively. In this context, the

proposed hypothetic two-state model of nAChR2 could be combined with a ternary complex model to generate a general qualitative model of the interaction between nAChR2 conformational state and binding of ACT (Fig. 11A). In this ternary complex model, nAChR2 exists in different interconvertible states (R1-R4) that could be an intrinsic property of the receptor itself. R1 represents free open state nAChR2 under physiological condition. R4, that binds ACT, will exhibit lower or higher sensitivity to the neonicotinoid according to the conformational state of R2 and R3, respectively. In other words, the interaction between nAChR2 and ACT will depend on its ability to be more or less open before application of ACT. When the membrane is hyperpolarized (H), the equilibrium may shift toward R2 (*i.e.*, more open state), thereby revealing a lower sensitivity of R4 to ACT (Fig. 11A-A2) and a resulting increased current amplitude. In contrast, when the membrane is depolarized (D), the equilibrium shifts toward R3 (*i.e.*, less open state; Fig. 11A-A3) exhibiting a slight higher sensitivity to ACT and generating a consecutive decreased current amplitude. These findings have direct physiological consequences on the sensitivity of nAChR2 to ACT since any means that will produce depolarization (e.g., ACh and Fig. 3A) or hyperpolarization (e.g., GABA, this study, Fig. 10) will affect neonicotinoid efficacy. Finally, in this hypothetic model, the interaction between ACT and nAChR2, which is driven by the transmembrane potential variation, is also driven by an additional parameter, $[Ca^{2+}]_i$, which influences the magnitude of nAChR2 sensitivity to ACT.

**Calcium influx through HVA calcium channels and TRPγ decreases the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid**

Change in intracellular calcium concentration is known to modulate nAChR-mediated response to agonists (Liu and Berg, 1999; Voitenko et al., 2000; Thany et al., 2008). In this study, we have reported that depolarization and hyperpolarization affect, in a different extend, intracellular calcium balance and nAChR2 sensitivity to ACT through activation of HVA calcium channels and TRPγ, respectively. Application of more positive membrane potential than resting condition (-50 mV) produces a limited displacement to the left of the

dose-response curve. In contrast, hyperpolarization results in a limitless rightward shift of the dose-response curve for ACT on nAChR2. Using calcium channel blockers such as ω-CgTx GVIA and LOE-908, we have revealed that N-type HVA calcium channels and TRPγ known to be activated at depolarized and hyperpolarized membrane potentials in DUM neurons, respectively (Wicher et al., 2004; Gautier et al., 2008) are the plasma membrane calcium channels generating extracellular calcium influx. It is interesting to note that the increase in sensitivity of nAChR2 to ACT observed for membrane potential more depolarized than -50 mV (i.e., physiological condition) is not as important as compared with the decrease in sensitivity of nAChR2 to this neonicotinoid observed for hyperpolarization. Although, calcium influx occurs through both HVA calcium channels and TRPγ. This apparent different sensitivity might be explained by the fact that at a steady-state membrane potential of -30 mV, more than 60 % of HVA calcium channels are inactivated (Grolleau et al., 2006), thus reducing the influence of calcium ions on nAChR2 sensitivity to ACT in this membrane potential range. In contrast, for hyperpolarization, calcium influx-induced decrease of the sensitivity of nAChR2 can be counteracted by LOE-908, known to block TRPγ in DUM neurons (Wicher et al., 2004). Because similar effects are obtained in the presence of high internal cAMP concentration (i.e., 0.3 mM), it is tempting to suggest that the cAMP-dependent signalling pathway involved in the regulation of TRPγ, as previously described in the same preparation (Wicher et al., 2004; Grolleau et al., 2006), plays a key role in the modulation of the sensitivity of nAChR2 to ACT. As illustrated in Fig. 11B, the molecular events involved in such modulation can be summarized according to the hypothetic scheme. Hyperpolarization induces activation of TRPγ and the elevation of intracellular calcium concentration results in the formation of the calcium/calmodulin complex (Fig. 11B-1). The consecutive increase in cAMP concentration via a calcium/calmodulin-sensitive adenylyl cyclase (Courjaret and Lapied 2001) modulates negatively the TRPγ, which in turns reduced calcium influx (Fig. 11B-2), as previously shown in the same preparation (Wicher et al., 2004; 2006), resulting in an increase of nAChR2 sensitivity to ACT. Although calcium allosteric modulation is a well known mechanism for modifying vertebrate pharmacological nAChR

activity (Galzi et al., 1996; Changeux et al., 1998; Paterson and Nordberg, 2000; Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004), this needs to be explored deeply in such context.

**Optimization of neonicotinoid insecticide efficiency**

Our results demonstrate that transmembrane potential polarization together with an increase of intracellular calcium concentration affect the sensitivity of nAChR2 to ACT via a modification of nAChR2 conformational state. These new insights brought in this study could be taken into account in pest control strategy in order to optimize neonicotinoid insecticides efficiency. Among novel strategies proposed, insecticide mixtures present the best practical advantage only if synergistic interactions may occur between different components used in combination. In this context, combined formulations of neonicotinoids with pyrethroids have been developed with the aim of broadening the insecticidal spectrum and to avoid cross resistance (Elbert et al., 2008). However, no synergist effect has been observed for such combinations including, for instance, neonicotinoids (e.g., thiamethoxam, clothianidin) and pyrethroid type II (e.g., cyhalothrin; Bradshaw et al., 2008; Peck et al., 2008). Based on our results reporting that membrane polarization combined with calcium influx activation plays a key role in reducing ACT efficacy, it is tempting to suggest that this absence of synergistic effect could be explained by the fact that pyrethroid type II causing a membrane depolarization accompanied by a suppression of the action potential (Du et al., 2009; Soderlund 2010) might affect neonicotinoid effects. Furthermore, another interesting finding is that physiological impact of hyperpolarization-induced activation of TRPγ can be achieved following the release of inhibitory neurotransmitters such as GABA acting through ionotropic receptors (Alix et al., 2002; Dupuis et al., 2010; Janssen et al., 2010). Therefore, these physiological mechanisms will lead to reduce ACT effect. Based on our results, combinations of neonicotinoids with phenylpyrazole insecticides such as fipronil, which blocks GABA and glutamate action on ionotropic receptors (Narahashi et al., 2007), might be a good strategy to counteract GABA-induced hyperpolarization and to produce a synergistic effect. The

expected results could be an increase of insecticide efficacy, while reducing the dose of each compounds used.

**Authorship contributions:**

*Participated in research design:* Bodereau-Dubois and Lapied

*Conducted experiments and performed data analysis:* Bodereau-Dubois

*Wrote or contributed to the writing of manuscript:* Bodereau-Dubois, Thany and Lapied

**References**


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

Alyokhin A, Dively G, Patterson M, Castaldo C, Rogers D, Mahoney M and Wollam J (2007) Resistance and cross-resistance to imidacloprid and thiamethoxam in the Colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata. *Pest Manag Sci* **63**:32-41.

Bradshaw JD, Rice ME and Hill JH (2008) Evaluation of management strategies for bean leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and Bean pod mottle virus (Comoviridae) in soybean. *J Econ Entomol* **101**:1211-1227.

Buckingham S, Lapied B, Corronc H and Sattelle F (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* **200**:2685-2692.

Casida JE (2011) Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J Agric Food Chem* **59**:2923-2931.

Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, Le Novere N, Marubio L, Picciotto M and Zoli M (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev* **26**:198-216.

Courjaret R and Lapied B (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* **60**:80-91.

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

Dajas-Bailador F and Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* **25**:317-324.

Di Angelantonio S and Nistri A (2001) Calibration of agonist concentrations applied by pressure pulses or via rapid solution exchanger. *Journal of Neuroscience Methods* **110**:155-161.

Du Y, Nomura Y, Luo N, Liu Z, Lee JE, Khambay B and Dong K (2009) Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* **234**:266-272.

Dupuis JP, Bazelot M, Barbara GS, Paute S, Gauthier M and Raymond-Delpech V (2010) Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *J Neurophysiol* **103**:458-468.

Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W and Nauen R (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* **64**:1099-1105.

Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP and Bertrand D (1996) Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* **15**:5824-5832.

Gautier H, Auger J, Legros C and Lapied B (2008) Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide. *J Pharmacol Exp Ther* **324**:149-159.

Gorman K, Devine G, Bennison J, Coussons P, Punchard N, and Denholm I (2007) Report of resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in Trialeurodes vaporariorum (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci* **63**: 555-558.

Grolleau F and 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.

Grolleau F, Stankiewicz M, Kielbasiewicz E, Martin-Eauclaire MF, Lavialle C, De Vente J and Lapied B (2006) Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca2+ entry is the final step involved in the neurotoxic effect of Tityus serrulatus scorpion beta-toxin. *Eur J Neurosci* **23**:1465-1478.

Honda H, Tomizawa M and Casida JE (2006) Neo-nicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and -aldehyde oxidase systems. *Toxicol Lett* **161**:108-114.

Janssen D, Derst C, Rigo JM and Van Kerkhove E (2010) Cys-loop ligand-gated chloride channels in dorsal unpaired median neurons of Locusta migratoria. *J Neurophysiol* **103**:2587-2598.

Jeschke P. and Nauen R. (2008) Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* **64**: 1084-1098.

Karunker I, Morou E, Nikou D, Nauen R, Sertchook R, Stevenson BJ, Paine MJ, Morin S and Vontas J (2009) Structural model and functional characterization of the Bemisia tabaci CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **39**:697-706.

Lansdell SJ and Millar NS (2000) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* **39**:671-679.

Lapied B, Malécot CO 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.

Lapied B, Le Corronc H and Hue B (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res* **533**:132-136.

Li J, Shao Y, Ding Z, Bao H, Liu Z, Han Z and Millar NS (2010) Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. Insect Biochem Mol Biol **40**:17-22.

Liu QS and Berg DK (1999) Extracellular calcium regulates responses of both alpha3- and alpha7-containing nicotinic receptors on chick ciliary ganglion neurons. *J Neurophysiol* **82:**1124-1132.

Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han Z and Millar NS (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in Nilaparvata lugens (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8420-8425.

Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M and Sattelle DB (2005) Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:1442-1452.

McCaman RE, McKenna DG and Ono JK (1977) A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes. *Brain Res* **136:**141-147.

Mota-Sanchez D, Wise JC, Poppen RV, Gut LJ and Hollingworth RM (2008) Resistance of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. *Pest Manag Sci* **64**:881-890.

Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K and Yeh JZ (2007) Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol* **26**:361-366.

Nauen R and Denholm I (2005) Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* **58**:200-215.

Paterson D and Nordberg A (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* **61**:75-111.

Peck DC, Olmstead D and Morales A (2008) Application timing and efficacy of alternatives for the insecticidal control of Tipula paludosa Meigen (Diptera: Tipulidae), a new invasive pest of turf in the northeastern United States. *Pest Manag Sci* **64**:989-1000.

Perry T, Heckel DG, McKenzie JA and Batterham P (2008) Mutations in Dalpha1 or Dbeta2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in Drosophila melanogaster. *Insect Biochem Mol Biol* **38**:520-528.

Soderlund DM (2010) State-Dependent Modification of Voltage-Gated Sodium Channels by Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* **97**:78-86.

Takahashi H, Mitsui J , Takakusa N., Matsuda M., Yoneda H., and Suzuki (1992) NI-25, a new type of systemic and broad spectrum insecticide. *Proc British Crop Prot Conf – Pests and Diseases, BCPC*, pp. 89–96, Farnham, Surrey, UK

Tan J, Galligan JJ and Hollingworth RM (2007) Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* **28**:829-842.

Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB and Lapied B (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**:14-22.

Thany SH, Courjaret R and Lapied B (2008) Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci Lett* **438**:317-321.

Tomizawa M and Casida JE (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 247-268.

Voitenko SV, Bobryshev AY and Skok VI (2000) Intracellular regulation of neuronal nicotinic cholinoreceptors. *Neurosci Behav Physiol* **30**:19-25.

Wicher D, Walther C and Wicher C (2001) Non-synaptic ion channels in insects--basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* **64**:431-525.

Wicher D, Messutat S, Lavialle C and Lapied B (2004) A new regulation of non-capacitative calcium entry in insect pacemaker neurosecretory neurons. Involvement of arachidonic acid, no-guanylyl cyclase/cGMP, and cAMP. *J Biol Chem* **279**:50410-50419.

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

Yao X, Song F, Zhang Y, Shao Y, Li J and Liu Z (2009) Nicotinic acetylcholine receptor beta1 subunit from the brown planthopper, Nilaparvata lugens: A-to-I RNA editing and its possible roles in neonicotinoid sensitivity. *Insect Biochem Mol Biol* **39**:348-354.

Yixi Z, Liu Z, Han Z, Song F, Yao X, Shao Y, Li J and Millar NS (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. *J Neurochem* **110**:1855-1862.

Zhao X, Salgado VL, Yeh JZ and Narahashi T (2003) Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:914-924.

## Footnotes

Béatrice Bodereau-Dubois is supported by a doctoral fellowship of Région Pays de La Loire.

## Figure legends

**Figure 1.** A, Structure of the nicotinic receptor agonist nicotine compared with imidacloprid and acetamiprid. B, Comparative electrophysiological and pharmacological properties of nAChR1 and nAChR2 expressed by the cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons (from Courjaret and Lapied 2001, Thany et al., 2008).

**Figure 2**. Effect of nicotine (Nic), imidacloprid (IMI) and acetamiprid (ACT) on isolated DUM neuron somata α-bungarotoxin-insensitive nAChR subtypes. Nic and the neonicotinoid insecticides are applied by pressure ejection from a patch pipette containing 10 mM Nic, 0.1 mM IMI and 1 mM ACT. A, Typical examples of steady-state recordings of the agonist- and neonicotinoid-induced currents obtained in whole-cell voltage-clamp mode at a holding potential of -50 mV. B-D Current-voltage relationships of Nic- (B; n=5), IMI- (C; n=4) and ACT-induced current amplitudes (D; n=4) plotted *versus* steady-state holding potentials. All experiments are performed using a bathing solution containing 0.5 µM α-bungarotoxin. Data are mean ±S.E.M..

**Figure 3.** Effects of acetamiprid (ACT) and imidacloprid (IMI) on DUM neuron nAChR subtypes. A, Superimposed semi-logarithmic dose-response curves for the IMI- (filled triangles; n=4) and ACT-induced currents (filled squares; n=4). B, Typical examples of the inward currents elicited by pressure ejection of ACT (1 mM) and IMI (1 mM) at a steady-state holding potential of -50 mV. C, Semi-logarithmic dose-response curve for the ACT-induced currents recorded at a steady-state holding potential of -50 mV (n=4). The biphasic aspect of the curve indicates that ACT acts as an agonist on both nAChR1 and nAChR2. D, Representative examples of membrane potentials recorded under current-clamp condition in response to a hyperpolarizing current pulse (150 pA in amplitude and 200 ms in duration) in control and after pressure ejection application of ACT (1 mM; 300 and 1000 ms in duration).

Note that ACT produces a decrease and an increase in DUM neuron input membrane resistance, which is correlated well with both first (nAChR1) and second (nAChR2) part of the biphasic curve, respectively. In all cases, the smooth line represents the best fit to the mean data according to the equations 1 and 2 (see Materials and Methods section). Data are mean ± S.E.M..

**Figure 4.** Effect of d-tubocurarine (d-TC) on Nic-induced current. A, Current-voltage relationships of the Nic-induced current amplitudes are plotted as a function of different steady-state holding potentials before (filled circle; n=5) and after application of 50 µM d-TC (open circle; n=11). Ba, Membrane potential recorded under current-clamp condition in responses to a hyperpolarizing current pulse (350 ms in duration, holding potential of -70 mV) in control and after bath application of nicotine (100 µM), in the presence of 50 µM d-TC. Bb, Comparative histogram illustrating the increase in DUM neuron input membrane resistance observed after bath application of 100 µM nicotine (n=4). C, Inhibitory effect of the intracellularly applied potassium channel blocker cesium chloride (CsCl; 10 mM) on the Nic-induced current amplitude recorded in the presence of 50 µM d-TC. The arrow indicates the steady-state holding potential at which experiments are performed. Data are mean ±S.E.M..** and *** indicate that the results are statistically different ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively).

**Figure 5.** Effect of acetamiprid (ACT) on DUM neuron nAChR2. Aa, Pressure ejection application of ACT (1 mM; 200 ms in duration) produces a membrane depolarization strongly reduced after pretreatment of DUM neuron somata by 50 µM d-TC, known to block nAChR1. Ab, Histogram illustrating the effect of ACT (1 mM; 200 ms in duration) on the membrane potential recorded before (black bar; n=5) and after 50 µM d-TC (white bar; n=11). Experiments are performed in the presence of 0.1 µM TTX to block DUM neuron spontaneous sodium-dependent action potentials; B, Comparative histogram showing the

effect of ACT (1 mM; 200 ms in duration) on both membrane potential and the input membrane resistance before (black bars; n=5) and after pretreatment with 50 µM d-TC (white bars; n=5). C, Superimposed current-voltage relationships of the ACT-induced current amplitudes plotted *versus* steady-state holding potentials before (filled squares; n=5) and in the presence of 50 µM d-TC (open squares; n=11). Data are mean ±S.E.M.

**Figure 6.** Effects of steady-state holding potentials on the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid (ACT). A, Semi-logarithmic dose-response curve for the ACT-induced currents recorded in the presence of 50 µM d-TC (n=4). For comparison, the dotted line represents the dose-response curve illustrated in Fig. 4. B, Comparative semi-logarithmic dose-response curves for the ACT-induced currents recorded in the presence of 50 µM d-TC at holding potentials of -30 mV (n=4), -50 mV (control; n=4) and -70 mV (n=4). For A and B, the smooth line represents the best fit to the mean data according to the Hill equation 1. C, Histogram showing the effect of hyperpolarization on the input membrane resistance (n=4; *** indicate that the results are statistically different $p < 0.001$). Data are mean ± S.E.M..

**Figure 7.** Effect of the calcium channel blocker cadmium chloride ($CdCl_2$) on the sensitivity of nAChR2 to acetamiprid (ACT). A-C, Comparative superimposed semi-logarithmic dose-response curves for the ACT-induced currents in control and in the presence of 50 µM d-TC and 0.5 mM $CdCl_2$ at holding potentials of -30 mV (n=4), -50 mV ( n=4) and -70 mV (n=4). The smooth line represents the best fit to the mean data according to the Hill equation 1. D, Histogram illustrating the DUM neuron input membrane resistances recorded under different experimental conditions (see text for details), as indicated below each bar (n=4). Data are mean ± S.E.M. ns, indicate that the difference is not statistically significant ($p > 0.05$); *** indicate that the results are statistically different ($p < 0.001$).

**Figure 8.** Inhibitors of high voltage-activated calcium channels and TRPγ, ω-conotoxin GVIA and LOE 908, respectively, increase nAChR2 sensitivity. A,B, Semi-logarithmic dose-

response curves for the ACT-induced currents established at a holding potential of -30 mV (A; n=5) and -70 mV (B; n=4) in control (filled symbols) and in the presence of ω-conotoxin (ω-CgTx, 0.1 µM; open symbols) and LOE 908 (40 µM; open symbols), respectively. The smooth line represents the best fit to the mean data according to the Hill equation 1. Data are mean ± S.E.M..

**Figure 9.** Effects of the adenylyl cyclase activator forskolin and the calmodulin and TRPγ inhibitors W7 and LOE 908, respectively, on the sensitivity of DUM neuron nAChR2 to ACT. A to D, Comparative semi-logarithmic dose-response curves illustrating the dose-dependent ACT-induced inward current recorded under different experimental conditions, as indicated on each graph. The maximum percentage of the peak inward current was plotted as the function of the logarithm of the pressure ejection duration of ACT. The smooth curves corresponded to the best fit to the mean data according to the Hill equation 1 (see Materials and Methods section). Data are mean values ± S.E.M..

**Figure 10,** Physiological implication of the GABA-induced hyperpolarization on the acetamiprid efficacy. A, effect of pressure ejection application of ACT (1 mM; 200 ms in duration on membrane potential recorded in control and after preteatment of the DUM neuron somata by the inhibitory neurotransmitter GABA (10 µM). Experiments are performed in the presence of 50 µM d-TC to block nAChR1 and 0.1 µM TTX to inhibit spontaneous sodium-dependent action potentials. B, Histogram illustrating the effect of the GABA-induced hyperpolarization on the depolarization produced by pressure ejection application of ACT (1 mM; 200 ms in duration). ** indicate that the results are statistically different (n=4; $p < 0.01$). Data are mean values ± S.E.M..

**Figure 11.** Hypothetic model of the interaction between nAChR2 and acetamiprid (ACT). A, The ternary complex model illustrating the interaction between ACT and nAChR2 (see text for details). R1-R4 represent the nAChR2 conformational states according to the different

experimental conditions. H and D correspond to hyperpolarization and depolarization of the membrane potential, respectively. A1, A2, A3 are the different interconvertible states between receptor conformational states. B, Hypothetic pattern of regulation of the sensitivity of DUM neuron nAChR2 to ACT at a steady-state holding potential of -70 mV. The scheme summarizes the essential components of molecular events that may regulate the sensitivity of nAChR2 to ACT (see text for details).

**Table 1.** Influence of the steady-state membrane potential on the sensitivity of nAChR2 to pressure ejection application of ACT.

| | **-30 mV** | **-50 mV** *(control)* | **-70 mV** |
|---|---|---|---|
| **$ED_{50}$** (ms) | 84 ± 5 | 125 ± 5 | 567 ± 58 |
| **I** (nA) | -0.18 ± 0.03 | -0.31 ± 0.02 | -0.48 ± 0.07 |

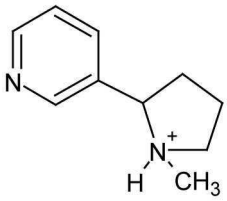
$ED_{50}$ was the Effective pressure ejection Duration of ACT needed to obtain half of the maximal response. The amplitude of the ACT-induced current (I) was measured for a pressure ejection duration of 200 ms. Number of experiments varied form 4 to 5 cells. Mean ± S.E.M..

**Table 2.** Effect of $CdCl_2$ on the sensitivity of nAChR2 to ACT recorded at different steady-state holding potentials

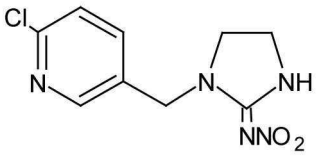
| | **-30 mV** | | **-50 mV** | | **-70 mV** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *control* | *+ $CdCl_2$* | *control* | *+ $CdCl_2$* | *control* | *+ $CdCl_2$* |
| **$ED_{50}$** (ms) | 84 ± 5 | 40 ± 3 | 125 ± 5 | 80 ± 7 | 567 ± 58 | 109 ± 5 |
| **I** (nA) | -0.18 ± 0.03 | -0.10 ± 0.01 | -0.31 ± 0.02 | -0.17 ± 0.03 | -0.48 ± 0.07 | -0.22 ± 0.04 |

$ED_{50}$ was the Effective pressure ejection Duration of ACT needed to obtain half of the maximal response. The amplitude of the ACT-induced current (I) was measured for a pressure ejection duration of 200 ms. Number of experiments varied form 4 to 5 cells. Mean ± S.E.M..

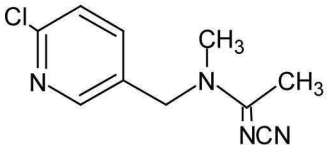
**A**




nicotine

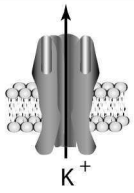
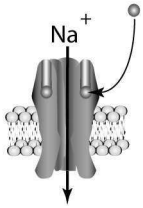
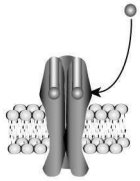



imidacloprid




acetamiprid

**B**

| | nAChR1 | nAChR2 |
|---|---|---|
| **resting** | closed |  open |
| **after nicotine application** | nicotine  open | nicotine  closed |
| **ionic species** | mainly $Na^+$ | mainly $K^+$ |
| **conductance** | activation | inhibition |
| **Input membrane resistance** | decrease | increase |
| **ionic current** | inward current | inward current resulting from an inhibition of outward current |
| **ion channel blockers** | | |
| *CsCl* | - | + |
| *4-AP* | - | + |
| **nicotinic antagonists** | | |
| *α-bungarotoxin* | - | - |
| *d-tubocurarine* | + | - |
| *mécamylamine* | - | + |
| **cholinergic agonist** | | |
| *acetylcholine* | + | + |
| *nicotine* | + | + |
| **insecticide sensitivity** | | |
| *imidacloprid* | + | - |
| *clothianidine* | + | + |

+ : sensitive ; - : resistant

**Fig. 1**

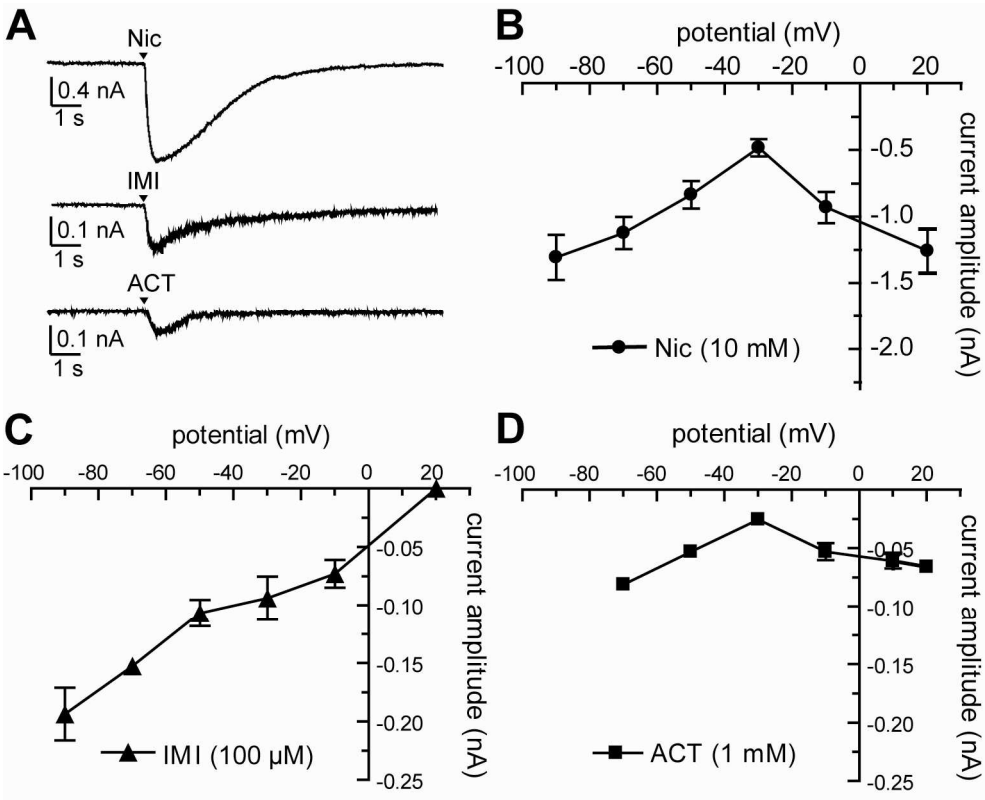

A
Nic
0.4 nA
1 s
IMI
0.1 nA
1 s
ACT
0.1 nA
1 s
B
potential (mV)
-100 -80 -60 -40 -20 0 20
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
current amplitude (nA)
Nic (10 mM)
C
potential (mV)
-100 -80 -60 -40 -20 0 20
-0.05
-0.10
-0.15
-0.20
-0.25
current amplitude (nA)
IMI (100 µM)
D
potential (mV)
-100 -80 -60 -40 -20 0 20
-0.05
-0.10
-0.15
-0.20
-0.25
current amplitude (nA)
ACT (1 mM)

Fig. 2

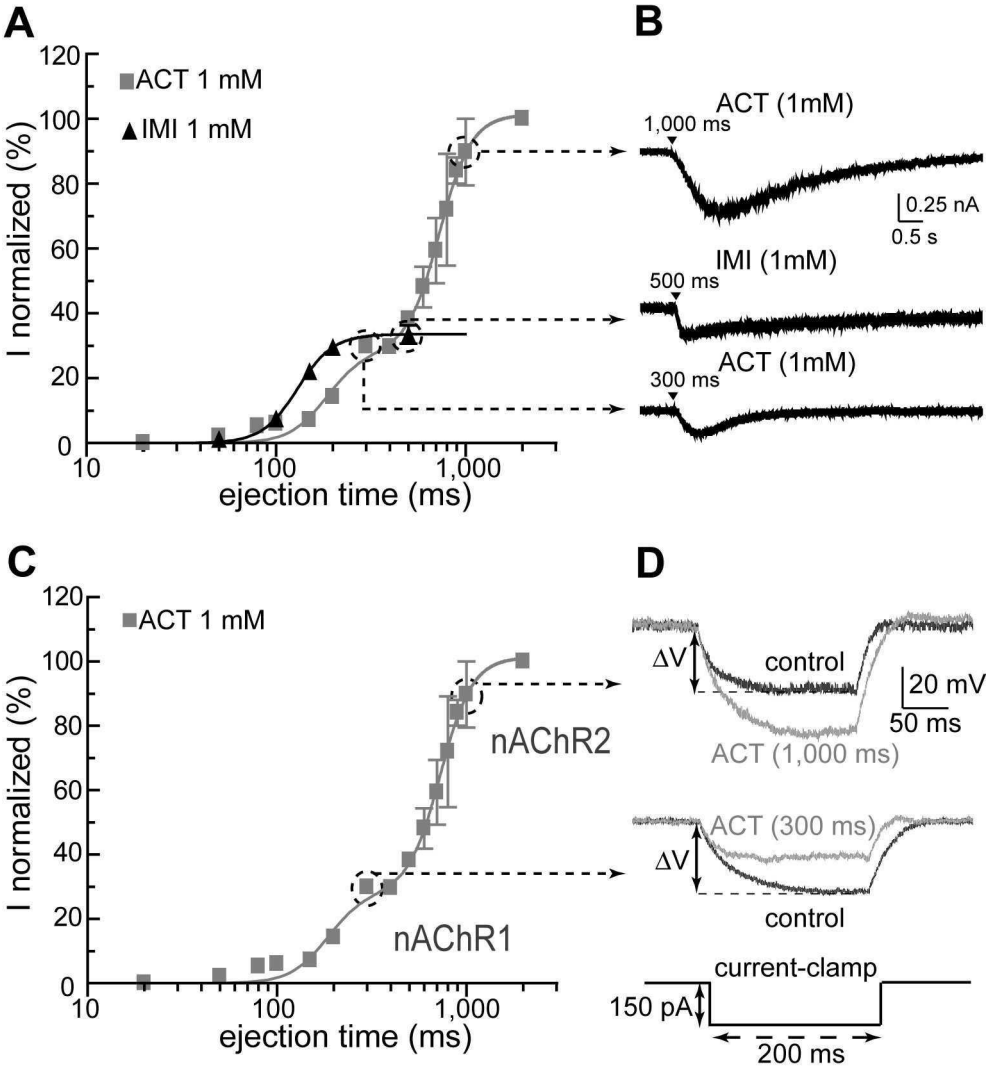

A
B
ACT 1 mM
IMI 1 mM
I normalized (%)
ejection time (ms)
ACT (1mM)
1,000 ms
0.25 nA
0.5 s
IMI (1mM)
500 ms
ACT (1mM)
300 ms
C
D
ACT 1 mM
nAChR2
nAChR1
ΔV
control
20 mV
50 ms
ACT (1,000 ms)
ACT (300 ms)
current-clamp
150 pA
200 ms

**Fig. 3**

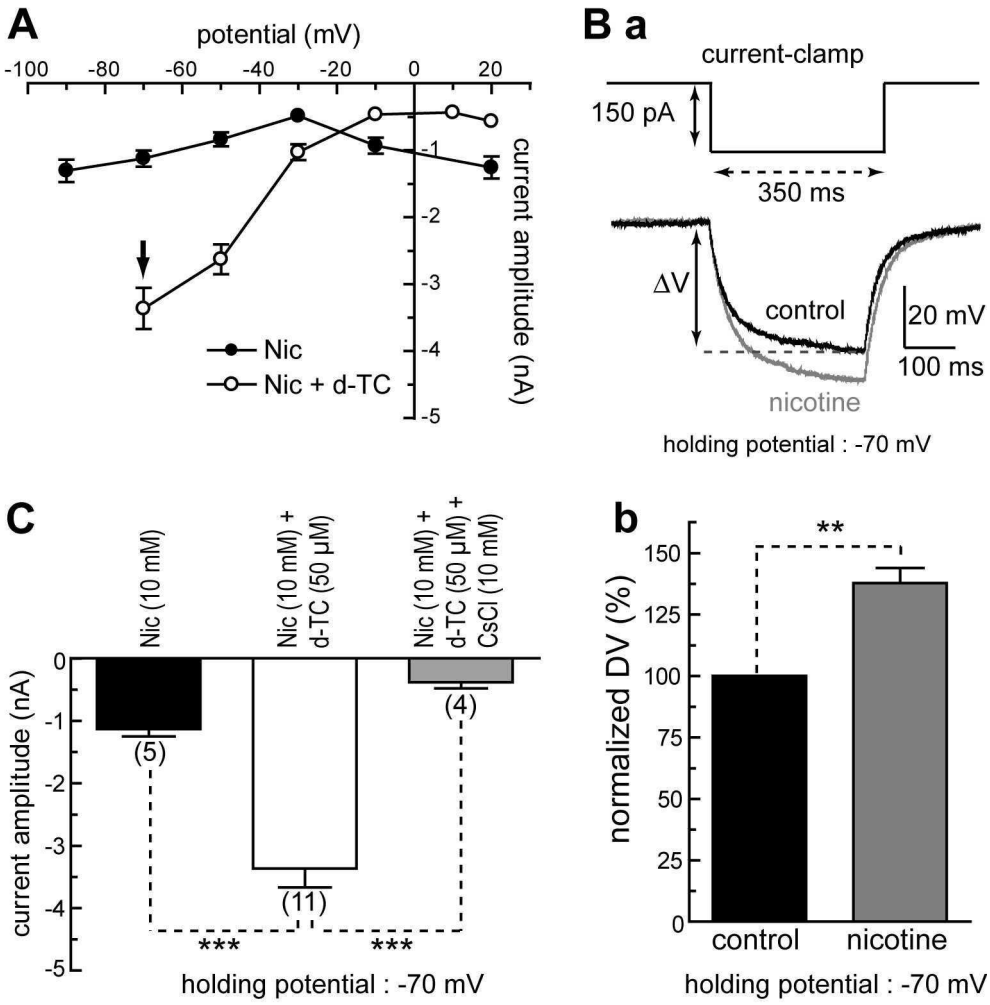

A
potential (mV)
-100
-80
-60
-40
-20
0
20
-1
-2
-3
-4
-5
current amplitude (nA)
Nic
Nic + d-TC
B a
current-clamp
150 pA
350 ms
ΔV
control
20 mV
100 ms
nicotine
holding potential : -70 mV
C
Nic (10 mM)
Nic (10 mM) + d-TC (50 µM)
Nic (10 mM) + d-TC (50 µM) + CsCl (10 mM)
current amplitude (nA)
0
-1
-2
-3
-4
-5
(5)
(11)
(4)
***
***
holding potential : -70 mV
b
**
normalized DV (%)
150
125
100
75
50
25
0
control
nicotine
holding potential : -70 mV

Fig. 4

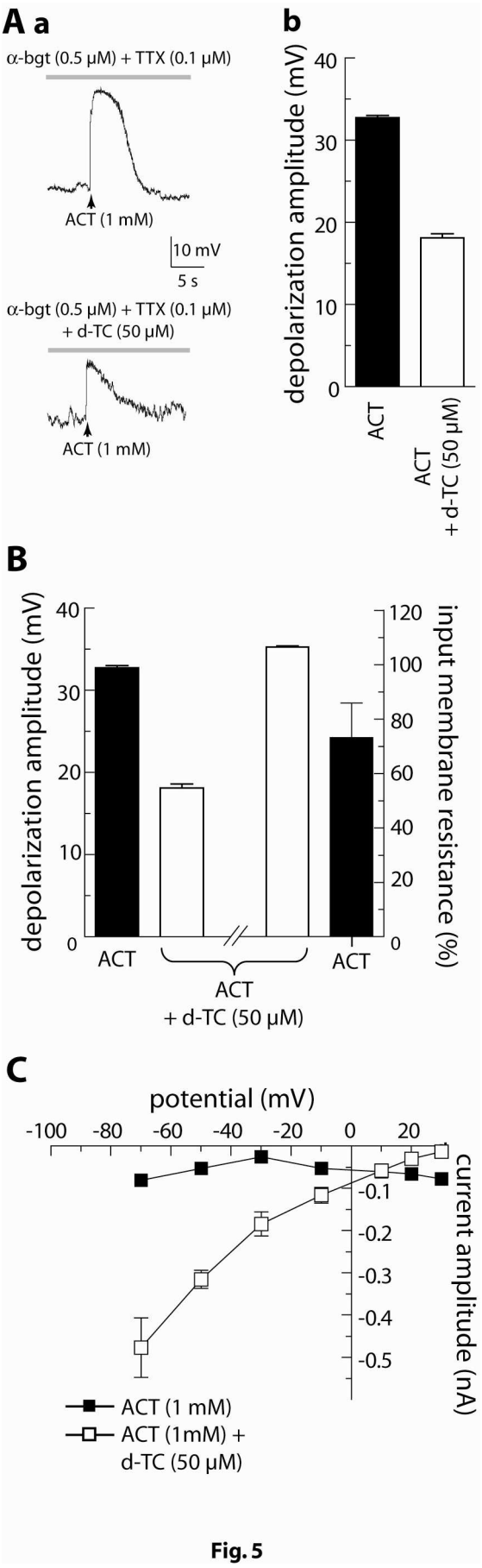

A a
α-bgt (0.5 μM) + TTX (0.1 μM)
ACT (1 mM)
10 mV
5 s
α-bgt (0.5 μM) + TTX (0.1 μM)
+ d-TC (50 μM)
ACT (1 mM)
b
depolarization amplitude (mV)
40
30
20
10
0
ACT
ACT
+ d-TC (50 μM)
B
depolarization amplitude (mV)
input membrane resistance (%)
40
30
20
10
0
120
100
80
60
40
20
0
ACT
ACT
+ d-TC (50 μM)
ACT
C
potential (mV)
-100
-80
-60
-40
-20
0
20
current amplitude (nA)
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
ACT (1 mM)
ACT (1mM) +
d-TC (50 μM)

**Fig. 5**

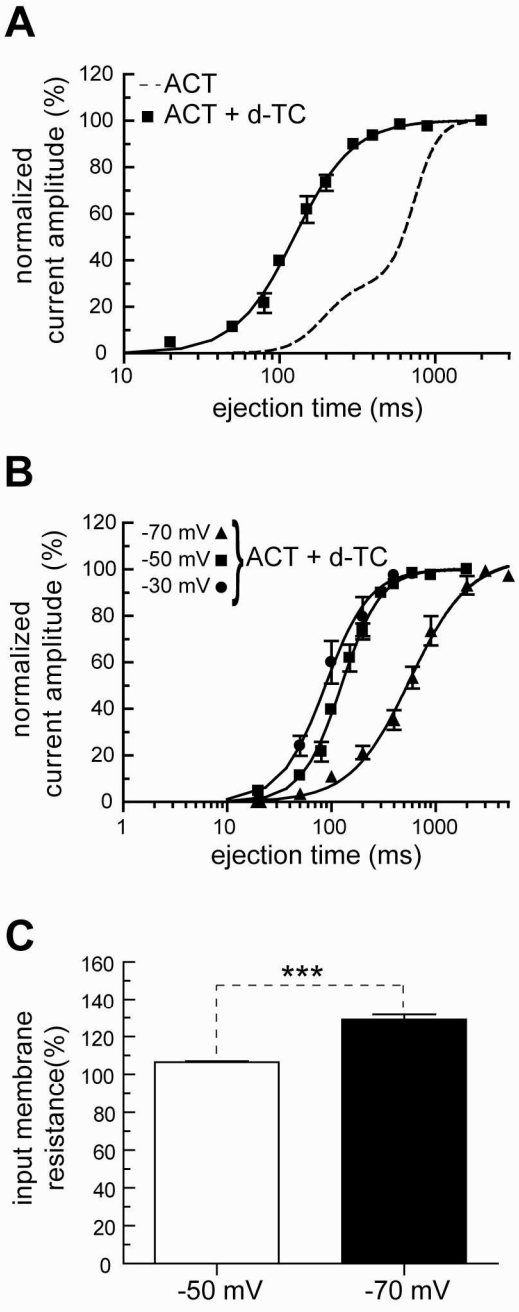

A
ACT
ACT + d-TC
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
B
-70 mV
-50 mV
-30 mV
ACT + d-TC
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
C
***
input membrane resistance(%)
-50 mV
-70 mV

**Fig. 6**

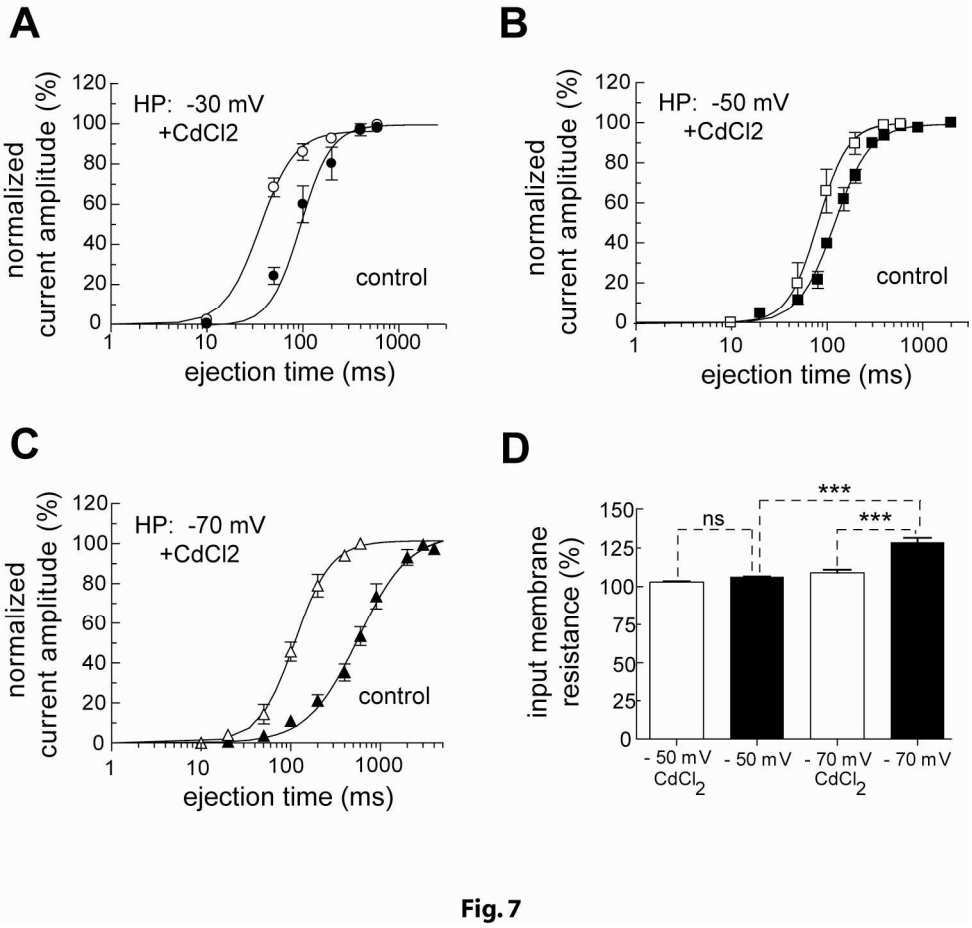

A
HP: -30 mV
+CdCl2
control
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
B
HP: -50 mV
+CdCl2
control
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
C
HP: -70 mV
+CdCl2
control
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
D
input membrane resistance (%)
ns
***
***
- 50 mV CdCl2
- 50 mV
- 70 mV CdCl2
- 70 mV

**Fig. 7**

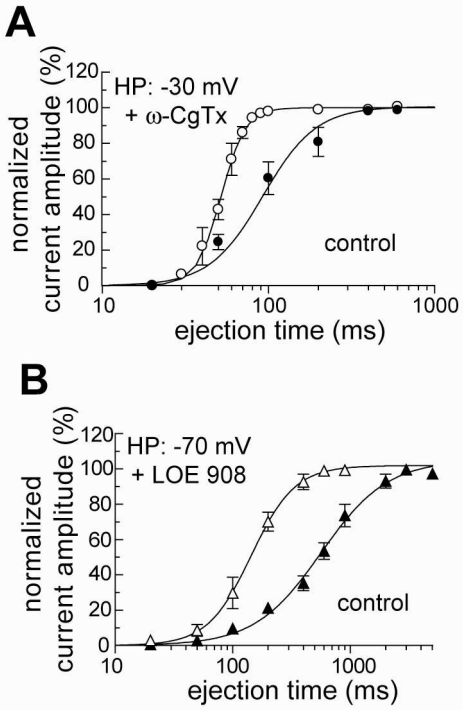

A
HP: -30 mV
+ ω-CgTx
control
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)
B
HP: -70 mV
+ LOE 908
control
normalized current amplitude (%)
ejection time (ms)

**Fig. 8**

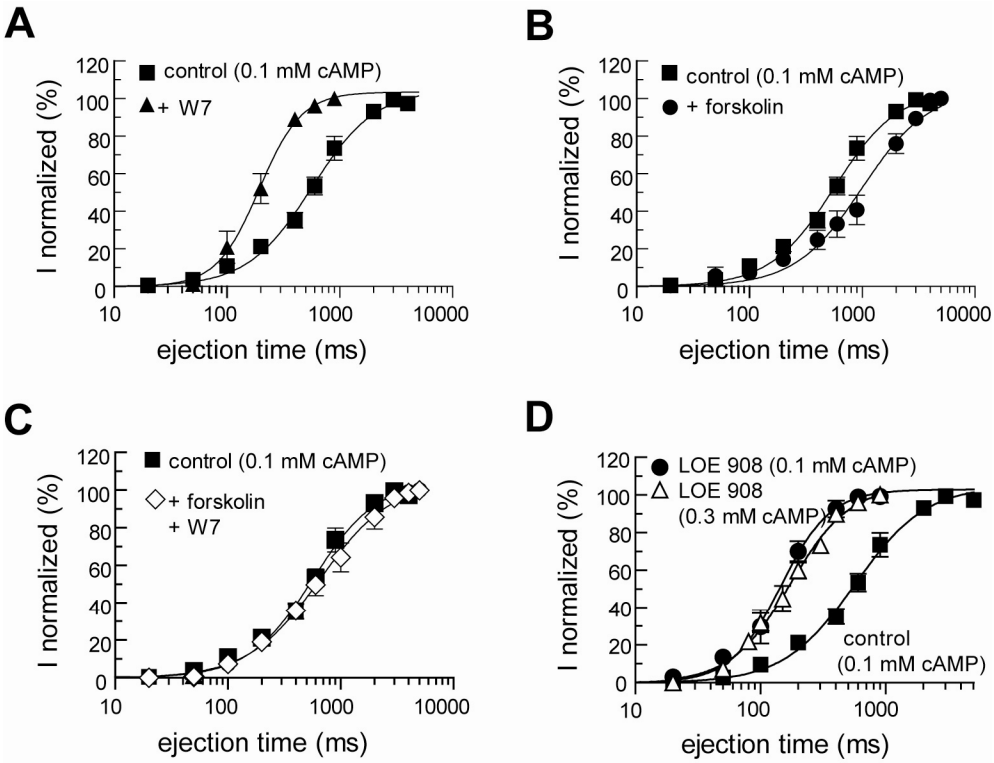

A
control (0.1 mM cAMP)
+ W7
I normalized (%)
ejection time (ms)
B
control (0.1 mM cAMP)
+ forskolin
I normalized (%)
ejection time (ms)
C
control (0.1 mM cAMP)
+ forskolin
+ W7
I normalized (%)
ejection time (ms)
D
LOE 908 (0.1 mM cAMP)
LOE 908
(0.3 mM cAMP)
control
(0.1 mM cAMP)
I normalized (%)
ejection time (ms)

**Fig. 9**

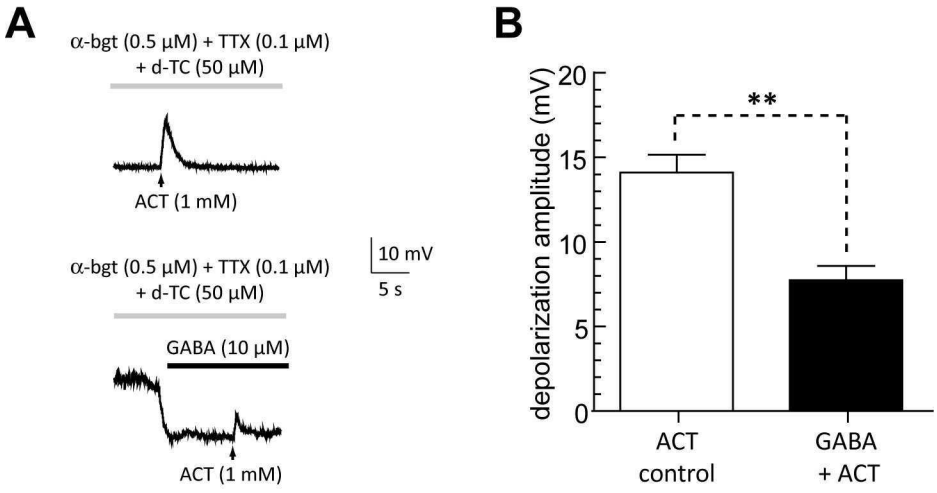

A
α-bgt (0.5 μM) + TTX (0.1 μM)
+ d-TC (50 μM)
ACT (1 mM)
10 mV
5 s
α-bgt (0.5 μM) + TTX (0.1 μM)
+ d-TC (50 μM)
GABA (10 μM)
ACT (1 mM)
B
depolarization amplitude (mV)
20
15
10
5
0
**
ACT
control
GABA
+ ACT

Fig. 10

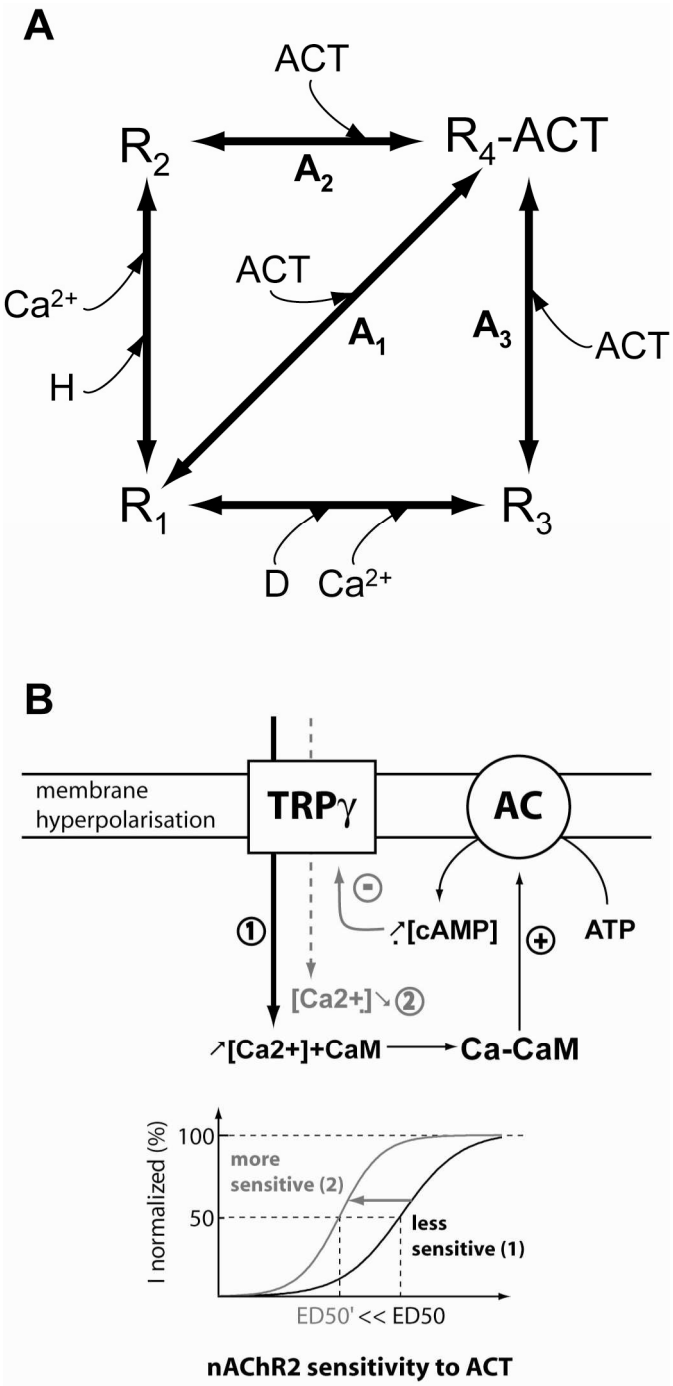

A
ACT
R2
R4-ACT
A2
ACT
Ca2+
A1
A3
ACT
H
R1
R3
D
Ca2+
B
membrane
hyperpolarisation
TRPγ
AC
[cAMP]
ATP
[Ca2+]
[Ca2+]+CaM
Ca-CaM
I normalized (%)
100
50
more
sensitive (2)
less
sensitive (1)
ED50' << ED50
nAChR2 sensitivity to ACT

Fig. 11

## PUBLICATION N°2

**Article publié dans l'ouvrage :**

***Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales***
**Rencontres en toxinologie, 2008**
**Editions de la SFET**

# Toxines et identification des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes

*Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales*
Rencontres en toxinologie, 2008
Editions de la SFET
Accès libre en ligne sur le site http://www.sfet.asso.fr, avec autorisation des auteurs


# *Toxines et identification des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes*

Béatrice BODEREAU, Hélène TRICOIRE-LEIGNEL, Bruno LAPIED, Steeve H. THANY*

*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/USC INRA IFR QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 49045 Angers, France.*

** Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)2 42 73 52 13 ; Fax : +33 (0)2 41 73 52 15 ;*
*Courriel : steeve.thany@univ-angers.fr*

## *Résumé*

*Les récepteurs neuronaux de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR) forment une famille de récepteurs multigéniques constitués de cinq sous-unités organisées autour d'un axe de pseudo-symétrie qui est le pore du canal. Ces récepteurs ont plusieurs fonctions spécifiques chez les insectes. Compte tenu de leur importance fondamentale au sein du système nerveux central, ils constituent une cible principale pour les insecticides néonicotinoïdes. Deux sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux ont été identifiés dans le système nerveux en fonction de leur sensibilité ou non à l'alpha-bungarotoxine ($\alpha$-Bgt). Des études récentes montrent que les récepteurs sensibles à l'$\alpha$-Bgt seraient, notamment, impliqués dans la neurotransmission rapide, la régulation de la plasticité cellulaire ainsi que dans les processus de mémorisation à long terme. Par ailleurs, des récepteurs insensibles à l'$\alpha$-Bgt mais sensibles à l'$\alpha$-conotoxine ImI ont été identifiés, suggérant des sites de liaison différents pour ces deux toxines sur les nAChR d'insectes. La comparaison des séquences des sous-unités des nAChR de mammifères et d'insectes confirme la présence de sites de liaison potentiels de différentes toxines sur les nAChR d'insectes. Les toxines animales demeurent ainsi des outils fondamentaux pour la caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux et aussi pour la mise en place de modèles d'étude des interactions ligand-récepteur. Cette revue a pour objectif de montrer le rôle des toxines dans l'étude des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des nAChR d'insectes.*

## *Toxins and identification of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insects*

*Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), a multigenic receptors' family, are constituted of five subunits organized around a pseudosymetric axis, the channel pore. These homomeric or heteromeric pentamers play crucial physiological functions in the insect central nervous system. They represent a major target for neonicotinoid insecticides. In the insect nervous system, two distinct alpha-bungarotoxin ($\alpha$-Bgt)-sensitive and –insensitive nAChRs have been identified. Recent studies have demonstrated that the $\alpha$-Bgt-sensitive nAChRs participate in fast neurotransmission, in the regulation of cellular plasticity, as well as in long term memory processes. Moreover, insect $\alpha$-Bgt-insensitive nAChRs subtypes but sensitive to $\alpha$-conotoxin ImI have also been identified, suggesting distinct toxin binding domains. In fact, subunit sequence comparison between mammals and insects confirms that potential toxin binding sites exist on insect nAChRs. Consequently, animal toxins remain fundamental tools to characterize neuronal nAChRs subtypes as well as to set ligand-receptor interaction models. The aim of this review is to explore the interest of toxins in the study of functional and pharmacological properties of insect nAChRs.*

***Keywords :*** *Insect, acetylcholine, nicotinic receptor, toxins.*

## Introduction

La transmission cholinergique au niveau de la jonction neuromusculaire a été le tout premier modèle d'étude de la transmission nerveuse. Au début des années 70, Changeux et ses collaborateurs ont identifié le récepteur *in vitro* grâce à une toxine purifiée à partir du venin d'un serpent « le Bungare »: l'$\alpha$-bungarotoxine ($\alpha$-Bgt) (Lee et Chang, 1966). L'$\alpha$-Bgt bloque la réponse *in vivo* de l'électroplaque à la carbamylcholine, un agoniste des récepteurs nicotiniques (Changeux *et al.*, 1970). Ces résultats ont permis de purifier et d'étudier la physico-chimie du récepteur nicotinique des Vertébrés et de faire du récepteur de l'organe électrique de la torpille, le prototype de la superfamille des récepteurs canaux chimio-dépendants (Changeux, 1991).

Les récepteurs nicotiniques sont constitués de protéines transmembranaires pentamériques, formant un canal ionique à travers la membrane plasmique dont l'ouverture est provoquée par la liaison à un ligand endogène, l'acétylcholine (ACh) ou par des substances exogènes comme la nicotine. La structure secondaire de chaque sous-unité révèle une organisation commune. Un large domaine amino-terminal ($NH_2$) extracellulaire porte les composants du site de liaison et la boucle glycosylée « Cys-loop », indispensable au maintien de la structure spatiale du récepteur (Karlin, 2002). Cette partie amino-terminale est suivie de trois segments transmembranaires (M1, M2 et M3), d'un large domaine intracellulaire très variable et enfin d'un quatrième segment transmembranaire (M4) suivi d'un domaine carboxy-terminal extracellulaire (COOH) (*Figure 1*).

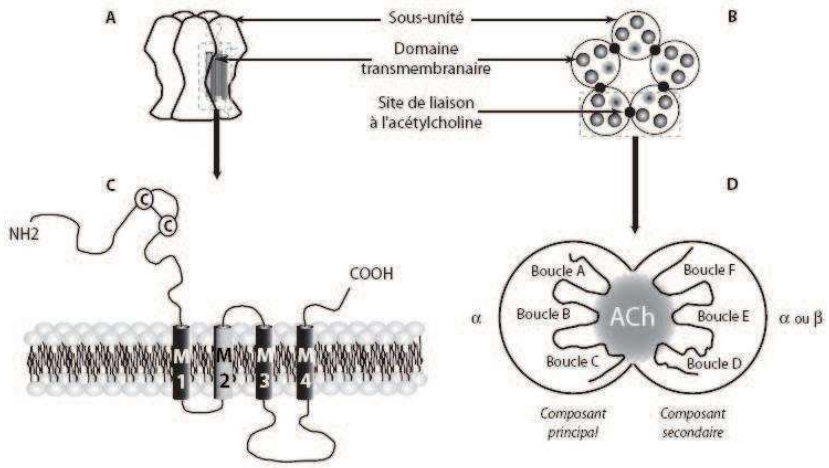



**Fig. 1.** Le récepteur nicotinique. Schéma d'organisation du récepteur de l'ACh de type nicotinique vu de profil (**A**) et de dessus (**B**). Les 5 sous-unités, qui composent le récepteur, sont organisées autour d'un axe pseudo-symétrique, le pore du canal. Chaque sous-unité est composée de 4 domaines transmembranaires de M1 à M4, avec M2 qui participe à la formation du canal (**C**). Les sous-unités qui possèdent deux cystéines adjacentes au niveau de la partie amino-terminale sont appelées des sous-unités α. Les autres sous-unités sont appelées des sous-unités β. Le site de liaison de l'ACh est formé de deux sous-unités : une sous-unité α et une sous-unité α ou β (**D**). La première porte le composant principal du site de liaison formé des boucles A, B et C ; la seconde porte le composant secondaire formé des boucles D, E et F.

***Fig. 1.*** *The nicotinic receptor. Scheme of nicotinic acetylcholine receptor organisation in sight of profile (**A**) and top (**B**). The 5 subunits which compose nicotinic receptor are organized around a pseudosymetric axis called the central pore. Each subunit consists of 4 transmembrane domains from M1 to M4, in which M2 participates in the channel formation (**C**). The subunits which present two neighboring cysteins are called α subunits and the others subunits are called β subunits. The acetylcholine binding site is composed of two subunits : an α subunit and an α or β subunit (**D**). The first one carries the main constituent formed by loops A, B and C. The second carries the secondary constituent formed by loops D, E and F.*

La structure secondaire des sous-unités comporte environ 9 hélices α et 17 feuillets β (Le Novère *et al.*, 1999). Ainsi, le segment amino-terminal extracellulaire est constitué majoritairement de feuillets β, entourés de deux hélices α. Les quatre segments transmembranaires présentent des structures secondaires irrégulières, faites d'alternance de feuillets β et d'hélices α. Le segment M1, par exemple, traverse la membrane sous la forme de feuillets β, alors que le segment M2 est constitué à 75% d'hélices α (Le Novère *et al.*, 1999). Les conséquences de cette organisation en hélices α et feuillets β sur l'affinité des toxines sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Généralement, les toxines de serpents qui exercent une action sur les récepteurs nicotiniques neuronaux au niveau de la jonction neuromusculaire sont divisées en deux catégories, les formes longues et les formes courtes (Tsetlin *et al.*, 2004). Les toxines de forme courte présentent une chaîne de 60-62 acides aminés avec 4 ponts disulfure alors que celles de forme longue possèdent 66-74 acides aminés et 5 ponts disulfure. Les études de liaison par affinité ont montré que des toxines comme l'α-Bgt ou l'α-cobratoxine se fixent sur un site de liaison situé à l'interface entre deux sous-unités (Mordvintsev *et al.*, 2005) mais surtout qu'elles sont sélectives de différents sous-types de récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR). Ainsi, à l'instar des nAChR de Vertébrés, les toxines constituent un outil pharmacologique fondamental pour la caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniques du système nerveux central (SNC) d'insectes.

## Rôles physiologiques des récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique

### Les récepteurs de type nicotinique synaptiques

La neurotransmission excitatrice rapide au sein du SNC d'insectes, implique majoritairement l'ACh qui agit principalement par l'intermédiaire de nAChR. Chez les insectes, aujourd'hui encore, peu de modèles permettent d'étudier avec précision le mode de fonctionnement d'une synapse identifiée entre deux neurones. C'est en partie grâce à la mise au point de la technique électro-physiologique dite de « oil-gap » sur des fibres nerveuses isolées (Hue et Callec, 1990) qu'il a été possible d'étudier la transmission chimique de l'influx nerveux entre les nerfs cercaux et les interneurones géants, en particulier du dernier ganglion abdominal (A6) de la blatte *Periplaneta americana* (*Figure 2A*). Au niveau de ces synapses, la libération d'ACh déclenche un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE, *Figure 2D*). Dans ce cas, l'activation des nAChR post-synaptiques, sensibles à l'α-Bgt, produit un courant ionique entrant qui implique les ions potassium et sodium. Des structures synaptiques similaires, qui permettent la transmission excitatrice, ont été identifiées également au niveau du SNC de la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster* (Su et O'Dowd, 2003), d'*Apis mellifera* (Oleskevich, 1999), mais aussi au niveau des ganglions thoraciques des criquets *Locusta migratoria* et *Schistocerca gregaria* et du papillon *Manduca sexta* (Trimmer et Weeks, 1989 ; Benson, 1992). Dans ce dernier cas, les nAChR impliqués sont insensibles à l'α-Bgt.

Les nAChR synaptiques sensibles à l'α-Bgt sont également connus pour être impliqués dans la régulation de la plasticité cellulaire (Gu *et al.*, 2006). En effet, l'activation de ces récepteurs synaptiques, situés sur les cellules de Kenyon de la drosophile, induirait une entrée de calcium dans la cellule, *via* ces récepteurs. Cet influx calcique serait suffisant pour produire des changements au cours d'un apprentissage associatif. Il est à noter que l'implication de ces nAChR sensibles à l'α-Bgt dans les processus de mémorisation et d'apprentissage a été confirmée par des travaux récents de Gauthier et collaborateurs qui ont montré

chez l'abeille que les nAChR sensibles à l'α-Bgt sont impliqués dans la mémoire à long terme alors que ceux insensibles à l'α-Bgt mais bloqués par la mécamylamine le sont dans la mémoire à moyen terme (Dacher *et al.*, 2005 ; Gauthier *et al.*, 2006).

Enfin, certaines structures nerveuses chez l'insecte expriment des nAChR au niveau pré-synaptique. Il s'agit, par exemple, du motoneurone FETi (pour « *Fast Extensor Tibia* ») à la jonction neuromusculaire du criquet *Locusta migratoria* et des neurones de type LFSHN (pour « *Lateral Filiform Sensory Hair Neuron* ») des juvéniles de la blatte *Periplaneta americana*. Ces nAChR dont le rôle physiologique n'a jamais été déterminé de façon précise, seraient impliqués dans la modulation de la libération d'ACh.

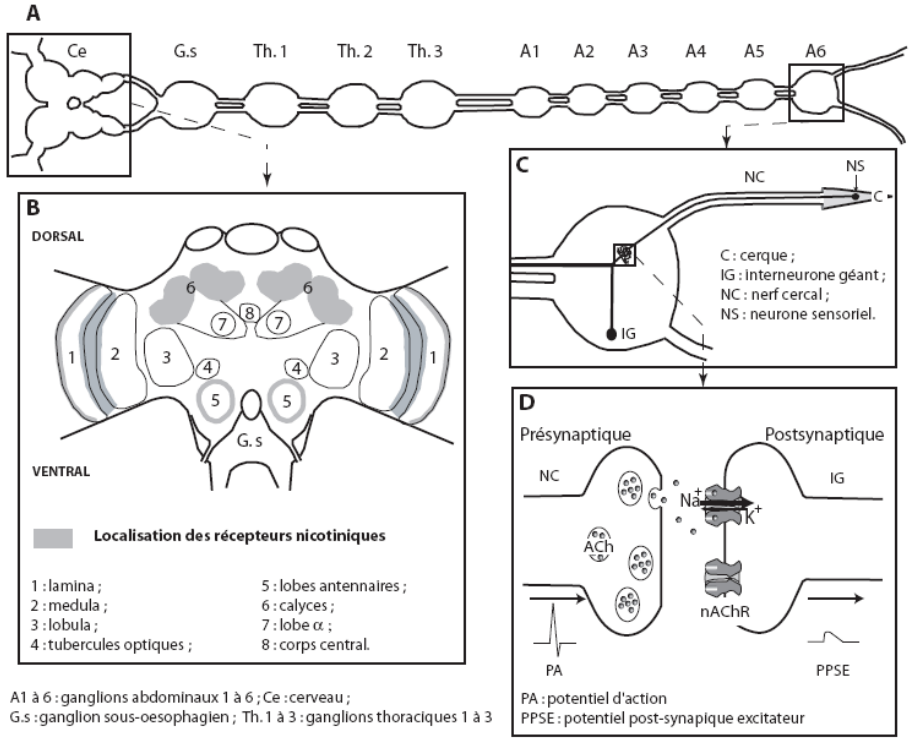



**Fig. 2.** Localisation des nAChRs dans le SNC des insectes. Le système cholinergique nicotinique est un système excitateur impliqué dans la communication neuronale chez les insectes. Il est présent au niveau du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale (**A**, **C**). Dans le cerveau, les nAChR ont été localisés dans différentes parties spécifiques. Dans le cas de l'abeille, ils se situent dans les couches externes de la lamina, entre la lamina et la medulla, dans la couche externe de la medulla, en périphérie des lobes antennaires et dans les corps pédonculés (**B**). Chez la blatte, ils sont également présents au niveau du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse (**C**). Dans ce ganglion, il existe une connexion synaptique entre les neurones sensoriels des cerques et les interneurones géants qui permettent le cheminement du message nerveux (**C**). Dans ce cas, les nAChR sont impliqués dans la transmission synaptique rapide. La libération d'ACh par le neurone sensoriel active les nAChR post-synaptiques de l'interneurone géant. Une fois activés, ceux-ci génèrent une dépolarisation de la membrane, *i.e.* un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), permettant la transmission du message nerveux (**D**).

***Fig. 2. Nicotinic receptors localization in the insect central nervous system.*** *The nicotinic cholinergic system is involved in the neuronal communication of insects. They are mainly localized in both brain and ganglia of the ventral nerve cord (**A**, **C**). In the brain, nAChRs are localized in various specific parts. In the case of the bee brain, nAChRs are situated in external layers of the lamina, in layers between the lamina and the medula, in external layer of the medula, in periphery of antennal lobes and in mushroom bodies (**B**). In the cockroach central nervous system, nAChRs are also present in the terminal abdominal ganglion of the ventral nerve cord (**C**). In this ganglion, they are involved in fast synaptic transmission between hair sensory neurons and giant interneurons (**C**). The release of ACh from the pre-synaptic endings activates post-synaptic nAChRs of giant interneurons, which thereby produces an excitatory post-synaptic potential (EPSP) (**D**).*

## Les récepteurs nicotiniques neuronaux extra-synaptiques

Les nAChR sont impliqués à la fois dans la transmission synaptique rapide (nAChR synaptiques) et dans la régulation de l'activité électrique somatique (nAChR extra-synaptiques). En effet, des études électro-pharmacologiques ont montré que les corps cellulaires de différents neurones d'insectes (pourtant dépourvus de contacts synaptiques) expriment des nAChR. Parmi ces corps cellulaires, les motoneurones (comme, par exemple, les motoneurones Df pour *fast Depressor*), les inter-neurones géants et les cellules neurosécrétrices octopaminergiques identifiées comme les neurones DUM (pour *Dorsal Unpaired Median*), sont maintenant connus pour exprimer des nAChR présentant des profils pharmacologiques distincts, résistants ou sensibles à l'α-Bgt et/ou à la kappa-bungarotoxine (κ-Bgt) (Benson, 1992 ; David et Pitman, 1993 ; Tribut *et al.*, 1994 ; Courjaret et Lapied, 2001). D'autres corps cellulaires, comme ceux des cellules de Kenyon localisés au niveau des corps pédonculés de l'abeille adulte (Goldberg *et al.*, 1999 ; Deglise *et al.*, 2002 ; Wüstenberg et Grünewald, 2004) ou au niveau de leurs lobes antennaires (Barbara *et al.*, 2008), expriment également des nAChR (*Figure 2B*). Dans le cas des corps cellulaires excitables comme les cellules neurosécrétrices, certains nAChR pourraient être impliqués dans la mobilisation et la maturation des produits de neurosécrétion *via* une modulation de

l'activité électrique somatique. La fonction des nAChR, dans le cas des neurones non excitables, est par contre souvent ambiguë. Cependant, dans certains cas (*e.g.* les neurones du papillon de nuit *Manduca sexta*), l'activation des nAChR permet l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Le couplage de ces nAChR à la production du GMPcyclique, *via* le calcium intracellulaire, met en évidence un nouveau rôle physiologique de ces récepteurs dans le contrôle de l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaire, telles que la production de monoxyde d'azote, ou de celle de systèmes enzymatiques (guanylate cyclase, adénylate cyclase…) impliqués dans la production de seconds messagers (GMPcyclique, AMPcyclique, IP3/diacétyl-glycérol).

De plus, grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes nicotiniques spécifiques dont les toxines, il a été possible de révéler qu'un seul et même neurone peut exprimer plusieurs sous-types de nAChR bien différenciés par des profils électro-pharmacologiques et des mécanismes de régulations intracellulaires spécifiques (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret *et al.*, 2003 ; Thany *et al.*, 2007). C'est le cas, en particulier, des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*, situés sur la ligne médio-dorsale du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse. Ces cellules neurosécrétrices expriment deux types de nAChR (nAChR1 et nAChR2) qui sont insensibles à l'α-Bgt. L'utilisation d'une toxine isolée du venin du cône *Conus imperialis*, l'α-conotoxine ImI (α-ImI), a permis de mieux discriminer ces deux types de nAChR puisque nAChR1 est insensible à l'α-ImI alors que nAChR2 est inhibé par cette toxine (Courjaret et Lapied, 2001).

Enfin, certains corps cellulaires des neurones d'insectes (Dictyoptères, Orthoptères), comme les motoneurones et les neurones DUM, présentent un type particulier de nAChR, sensibles à l'α-Bgt et appelés « mixte » du fait qu'ils sont sensibles à la fois aux agonistes et antagonistes de types nicotiniques et muscariniques (Lapied *et al.*, 1990 ; Benson, 1992 ; David et Pitman, 1993). L'activation de ces récepteurs sensibles à l'α-Bgt et perméables au calcium (Grolleau *et al.*, 1996), interviendrait dans (i) le contrôle des processus de neurosécrétion et (ii) l'homéostasie calcique des neurones.

## Diversité moléculaire des sous-unités de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes

### Identification et caractérisation des différentes sous-unités des nAChR d'insectes

Il faut souligner que si l'utilisation de toxines comme l'α-Bgt, la κ-Bgt ou l'α-ImI permet de déterminer l'existence de différents sous-types de nAChR neuronaux, l'identification de la composition en sous-unités des nAChR d'insectes reste difficile. Dans la continuité des travaux réalisés sur les récepteurs nicotiniques neuronaux des Vertébrés, des études de clonage ont permis d'identifier la première sous-unité α d'insecte, sur la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, appelée ARD ou AChR64B (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1986 ; Sawruk *et al.*, 1986), suivie de plusieurs autres (pour une revue, voir Thany *et al.*, 2007). Actuellement, plus d'une soixantaine de sous-unités sont identifiées et clonées chez le papillon de nuit *Manduca sexta* (Eastham *et al.*, 1998), le criquet pèlerin *Locusta migratoria* (Hermsen *et al.*, 1998), le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Sgard *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 1999), l'abeille *Apis mellifera* (Thany *et al.*, 2003, 2005 ; Jones *et al.*, 2006), le moustique *Anopheles gambiae* (Jones *et al.*, 2005), le ver de la farine *Tribolium castaneum* (Jones et Sattelle, 2007) et le ver à soie *Bombyx mori* (Shao *et al.*, 2007). Il faut également noter le séquençage récent des génomes de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), d'*Apis mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), d'*Anopheles gambiae* (Malaria mosquito *Anopheles Gambiae*, Genome Sequencing Consortium, 2002) et de *Tribolium castaneum* (*Tribolium* Genome Sequencing Consortium, 2008) qui permet d'envisager l'existence d'une dizaine de gènes codant pour ces sous-unités chez chaque insecte. Cependant, aucune étude n'a permis à ce jour de déterminer la composition en sous-unités d'un récepteur nicotinique d'insecte. Les travaux les plus pertinents utilisent soit des récepteurs hétéromériques co-exprimant des sous-unités α d'insectes avec des sous-unités β de Vertébrés (Lansdell et Millar, 2000 ; Liu *et al.*, 2005, 2008 ; Raymond-Delpech *et al.*, 2003), soit des récepteurs chimères (Lansdell et Millar, 2004). Dans ce dernier cas et pour la première fois, il a été possible de construire un récepteur fonctionnel à partir uniquement de sous-unités d'insectes et de montrer qu'un récepteur hétéromérique sensible à l'α-Bgt pouvait être envisagé (Lansdell et Millar, 2004), contrairement à l'idée préconçue selon laquelle les nAChR sensibles à cette toxine seraient homomériques. Ces résultats suggèrent une complexité dans la composition en sous-unités et également dans l'affinité des nAChR d'insectes pour la plupart des ligands et les toxines en particulier (Chamaon *et al.*, 2000, 2002; Lansdell et Millar, 2002).

### Sites de liaison fonctionnels

Les acides aminés impliqués dans l'interaction entre le récepteur et le ligand, au niveau des nAChR des Vertébrés, ont été largement décrits pour certaines α-conotoxines ainsi que pour l'α-Bgt et l'α-cobratoxine (α-CBX) (Dutertre et Lewis, 2004 ; Tsetlin et Hucho, 2004). Les résidus d'acide aspartique en position 5 (D5), de proline en position 6 (P6) et d'arginine en position 7 (R7) de l'α-ImI, par exemple, forment des interactions de type « Van der Waals » avec la tyrosine en position 193 (Y193) et le tryptophane en position 147 (W147) situés dans les feuillets β au-dessus de la boucle C du récepteur homomérique α7 (*Figure 3*) (Terlau et Olivera, 2004). Par contre, pour l'α-Bgt et l'α-CBX, le résidu Y193 associé à la phénylalanine en position 185 (F185) et à la tyrosine en position 186 (Y186) est également nécessaire à la fixation de ces deux toxines sur le récepteur α7 (Tsetlin et Hucho, 2004). Par ailleurs, il semble que de faibles variations de séquences, entre les toxines d'un même animal, modifient le sous-type de nAChR ciblé. Ainsi, selon la nature de l'acide aminé en position 10 des α-conotoxines PnIA (α-PnIA) et PnIB (α-PnIB), la liaison du ligand au récepteur s'effectue soit avec l'acide aminé Y193 du récepteur α7 (c'est le cas de l'α-PnIB), soit avec la proline en position 180 (P180) de la sous-unité α3 du récepteur α3β2 (c'est le cas de l'α-PnIA) (Dutertre et Lewis, 2004). Cependant, l'asparagine en position 11 (N11) de l'α-PnIA qui s'associe à l'isoleucine en position 186 (I186) de la sous-unité α3, semble également jouer un rôle important dans la caractérisation pharmacologique des récepteurs α7 et α3β2 (Dutertre et Lewis, 2004). De même, l'α-PIA, une toxine issue du cône *Conus purpuraceus*, est capable de discriminer les récepteurs hétéromériques α3β2 et α6β2 (Janes, 2005). Ainsi, les variations d'acides aminés au niveau des sites de liaison formés par les différentes sous-unités qui composent chaque sous-type de récepteurs permettent de prédire le type de toxine qui, potentiellement, pourra se lier à un sous-type donné de récepteurs.

Bien que la diversité des sous-unités de nAChR soit très importante chez les insectes, l'homologie de séquences de près de 50% indique une certaine

conservation de motifs spécifiques entre les sous-unités α3 et α7 des Vertébrés et leurs homologues chez les insectes.

Ainsi, les résidus Y186, Y193, W147 et P180 sont fortement conservés sur l'α7 et l'α3 de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Myzus persicae*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* et *Heliothis virescens*. Dans la mesure où ces acides aminés sont des signatures d'interaction entre une toxine et une sous-unité données, la liaison des toxines aux nAChR d'insectes pourrait permettre d'identifier les sous-unités concernées, lorsque les résidus impliqués sont présents. En effet, sur six acides aminés impliqués dans le site de liaison de l'α–PnIB sur l'α7 humain, quatre sont conservés, les deux autres étant substitués en un ou plusieurs acides aminés selon l'espèce d'insecte. Par contre, parmi les trois résidus du site de liaison de l'α–PnIA sur la sous-unité α3 humaine, deux sont substitués en K183R (substitution de même nature) et en I186K ou I186E selon les insectes.

Les sites de liaison des toxines de serpents α-BTX et α-CBX, impliquant trois résidus identiques, sont également conservés entre les sous-unités α7 humaines et d'insecte, excepté la phénylalanine en position 185 substituée en un autre acide aminé aromatique, la tyrosine.

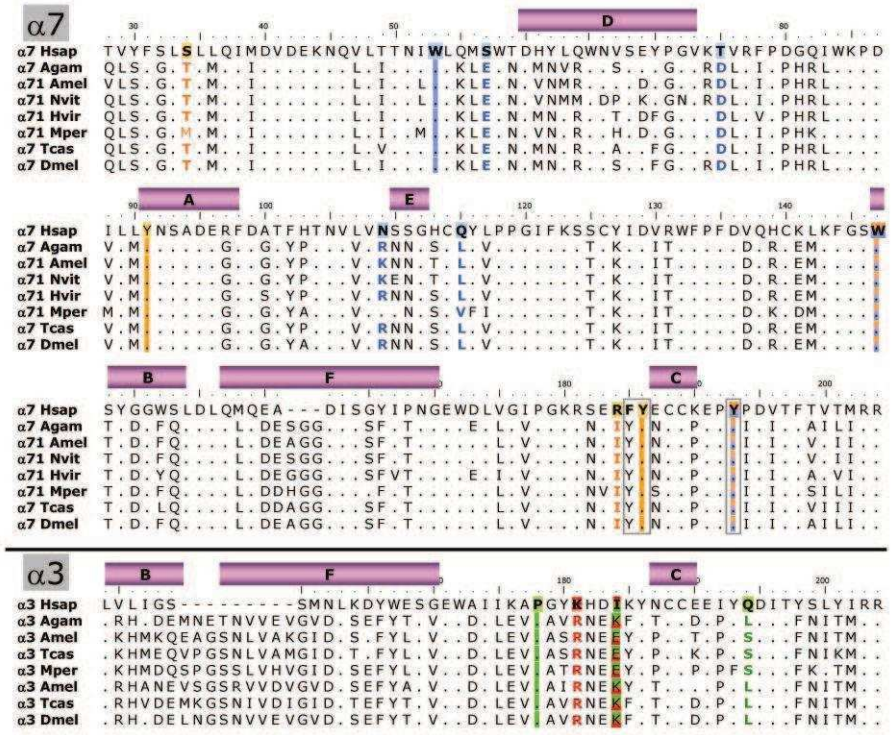



**Fig. 3.** Alignement des séquences protéiques partielles des domaines extracellulaires des sous-unités α3 et α7 de nAChR humains (**Hsap** : *Homo sapiens*) et de sept espèces d'insectes (**Agam** : *Anopheles gambiae*, **Amel** : *Apis mellifera*, **Nvit** : *Nasonia vitripennis*, **Hvir** : *Heliothis virescens*, **Mper** : *Myzus persicae*, **Tcas** : *Tribolium castaneum*, **Dmel** : *Drosophila melanogaster*). Les rectangles A, B, C, D, E et F indiquent la position des boucles impliquées dans les sites de liaison de l'ACh. Les résidus notés en gras, sur les séquences humaines, correspondent aux sites de liaison de différentes toxines (bleu : α-ImI, orange : α-PnIB, vert : α-PnIA, rouge : α-ImI, encadrés en gris : α-bgt et α-CBX). Certains résidus sont conservés d'une espèce à l'autre pour une toxine donnée, d'autres sont substitués, en un unique ou en plusieurs acides aminés, chez les insectes.

***Fig. 3.*** *Partial amino-acid sequence alignment of extra-cellular domains of nAChRs α3 and α7 subunits from human (**Hsap** :* Homo sapiens*) and seven insect species (**Agam** :* Anopheles gambiae*, **Amel** :* Apis mellifera*, **Nvit** :* Nasonia vitripennis*, **Hvir** :* Heliothis virescens*, **Mper** :* Myzus persicae*, **Tcas** :* Tribolium castaneum*, **Dmel** :* Drosophila melanogaster*). A, B, C, D, E and F boxes underline the loops position involved in ACh binding site. Bold residues on human sequences correspond to various toxins binding sites (blue : α-ImI, orange : α-PnIB, green : α-PnIA, red : α-MII, grey boxes : α-bgt and α-CBX). Some residues are well-conserved between species, while others are substituted for unique or several amino-acids in insects.*

## Perspectives

Comme dans le cas des Vertébrés, il est maintenant évident que le SNC des insectes exprime une grande diversité de nAChR qui se caractérisent par leurs propriétés biophysiques et leurs profils électrophysiologiques et pharmacologiques. Ces différents types de nAChR synaptiques et/ou extra-synaptiques, en fonction de leurs localisations tissulaires, ont également des rôles physiologiques spécifiques. Les nAChR d'insectes présentent en plus un intérêt particulier du point de vue phytosanitaire. En effet, ils sont connus pour être les cibles moléculaires d'une famille d'insecticides correspondant aux néonicotinoides (Tomizawa et Casida, 2003). Il apparaît donc clairement que l'identification des sous-unités composant les nAChR fonctionnels d'insectes est nécessaire à l'établissement de molécules insecticides spécifiques. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de toxines, en complément d'autres agents pharma-cologiques, peut nous permettre d'élucider, en partie, les conformations fonctionnelles des nAChR d'insectes.

***Remerciements.*** *Béatrice Bodereau est financée, pour sa thèse de Doctorat, par un contrat de recherche de la Région Pays de la Loire.*

## Références bibliographiques


Adams M.D. *et al*. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-95.

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. *Invert. Neurosci.* 8:19-29.

Benson J.A. (1992) Electrophysiological pharmacology of the nicotinic and muscarinic cholinergic responses of isolated neuronal somata from locust thoracic ganglia. *J. exp. Biol*. 170:203-33.

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 Lett.* 482:189-92.

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. *J. Neurochem.* 80:149-57.

Changeux J.P. (1990) The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:485-92.

Changeux J.P., Kasai M., Huchet M., Meunier J.C. (1970) Extraction a partir du tissu électrique de gymnote d'une protéine présentant plusieurs propriétés caractéristiques du récepteur physiologique de l'acétylcholine. *CR Acad. Sci. (Paris)* 370D:2864-7.

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.* 60:80-91.

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). *Eur. J. Neurosci.* 17:2023-34.

Dacher M., Lagarrigue A., Gauthier M. (2005) Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130:37-50.

David J.A., Pitman R.M. (1993) The pharmacology of alpha-bungarotoxin-resistant acetylcholine receptors on an identified cockroach motoneurone. *J. Comp. Physiol A*, 172:359-68.

Deglise P., Grunewald B., Gauthier M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 321:13-6.

Dutertre S., Lewis R.J. (2004) Computational approaches to understand alpha-conotoxin interactions at neuronal nicotinic receptors. *Eur. J. Biochem.* 271:2327-34.

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*. *Eur. J. Neurosci.* 10:879-89.

Gauthier M., Dacher M., Thany S.H., Niggebrugge C., Deglise P., Kljucevic P., Armengaud C., Grunewald B. (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 86:164-74.

Goldberg F., Grunewald B., Rosenboom H., Menzel R. (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Physiol.* 514:759-68.

Grolleau F., Lapied B., Buckingham S.D., Mason W.T., 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.* 220:142-6.

Gu H., O'Dowd D.K. (2006) Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells *in situ*. *J. Neurosci.* 26:265-72.

Hermans-Borgmeyer I., Zopf D., Ryseck R.P., Hovemann B., Betz H., Gundelfinger E.D. (1986) Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*. *Embo J.* 5:1503-8.

Hermsen B., Stetzer E., Thees R., Heiermann R., Schrattenholz A., Ebbinghaus U., Kretschmer A., Methfessel C., Reinhardt S., Maelicke A. (1998) Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression. *J. Biol. Chem.* 273:18394-404.

Honeybee Genome Sequencing Consortium: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* (2006). *Nature* 443:931-49.

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*. *J. Neurochem.* 73:380-9.

Hue B., Callec J.J. (1990) Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In: Huber I., Masler E.P., Asidi A., Rao B.R., editors. Cockroaches as models for neurobiology: application in biomedical research. *Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.*; p.149–68.

Janes R.W. (2005) Alpha-Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:280-92.

Jones A.K., Grauso M., Sattelle D.B. (2005) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85:176-87.

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 Res.* 16:1422-30.

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.

Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:102-14.

Lapied B., Le Corronc H., Hue B. (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res.* 533:132-6.

Lansdell S.J., Millar N.S. (2000) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39:671-9.

Lansdell S.J., Millar N.S. (2002) Dbeta3, an atypical nicotinic acetylcholine receptor subunit from *Drosophila*: molecular cloning, heterologous expression and coassembly. *J. Neurochem.* 80:1009-18.

Lansdell S.J., Millar N.S. (2004) Molecular characterization of Dalpha6 and Dalpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: formation of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *J. Neurochem.* 90:479-89.

Le Novere N., Corringer P.J., Changeux J.P. (1999) Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation. *Biophys. J.* 76:2329-45.

Lee C.Y., Chang C. (1966) Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan Sao Paulo* 33:555-72.

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). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8420-5.

Liu Z., Han Z., Liu S., Zhang Y., Song F., Yao X., Gu J. (2008) Amino acids outside of the loops that define the agonist binding site are important for ligand binding to insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem*. 106:224-30.

Malaria mosquito, *Anopheles Gambiae*, Genome Sequencing Consortium (2002). *Science* 298:129-49.

Mordvintsev D.Y., Polyak Y.L., Levtsova O.V., Tourleigh Y.V., Kasheverov I.E., Shaitan K.V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. (2005) A model for short alpha-neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: comparison with long-chain alpha-neurotoxins and alpha-conotoxins. *Comput. Biol. Chem.* 29:398-411.

Oleskevich S. (1999) Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 82:1091-6.

Raymond Delpech V., Ihara M., Coddou C., Matsuda K., Sattelle D.B. (2003) Action of nereistoxin on recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Invert. Neurosci.* 5:29-35.

Sawruk E., Hermans-Borgmeyer I., Betz H., Gundelfinger E.D. (1988) Characterization of an invertebrate nicotinic acetylcholine receptor gene: the ard gene of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 235:40-6.

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*. *J. Neurochem.* 71:903-12.

Shao Y.M., Dong K., Zhang C.X. (2007) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 8:324.

Su H., O'Dowd D.K. (2003) Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by $\alpha$-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J. Neurosci*. 23:9246-53.

Terlau H., Olivera B.M. (2004) *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84:41-68.

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.* 12:255-62.

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* 344:125-32.

Thany S.H., Lenaers G., Raymond-Delpech V., Sattelle D.B., Lapied B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sc.i* 28:14-22.

Tomizawa M., Casida J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48:339-64.

*Tribolium* Genome Sequencing Consortium (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452:949-55.

Tribut F., Duval A., Lapied B. (1994) Two distinct receptors are activated by arecoline on cockroach sixth abdominal ganglion DUM neurones. *J. exp. Biol*. 186:325-31.

Trimmer B.A., Weeks J.C. (1989). Effects of nicotinic and muscarinic agents on an identified motoneurone and its direct afferent inputs in larval *Manduca sexta*. *J. exp. Biol*. 144:303-37.

Tsetlin V.I., Hucho F. (2004) Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557:9-13.

Wustenberg D.G., Grunewald B. (2004) Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp. Physiol. A Neuroethol Sens. Neural Behav. Physiol.* 190:807-21.

# ABREVIATIONS

ACh : acétylcholine

AChBP : acetylcholine binding protein

AChE : acétylcholinestérase

ACT : acétamipride

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AOP : amplificateur opérationnel

BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

CaM : calmoduline

CaMKII : Protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline de type II

CL : concentration létale

Cm : capacité membranaire

DEET : diethyl-3-methylbenzamide

Df : fast depressor

DGA : dernier ganglion abdominal

d-TC : d-tubocurarine

DUM : dorsal unpaired median

$ED_{50}$ : durée d'éjection nécessaire pour obtenir 50% de l'amplitude maximale

EGTA : acide éthylèneglycol tétraacétique

EPI : épibatidine

GABA : acide γ-aminobutyrique

GABAR : récepteur gabaergique

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate

HVA : high-voltage activated

I : courant

$ICa_m$ : courant calcium maintenu à bas seuil d'activation

$ICa_t$ : courant calcium transitoire à bas seuil d'activation

$ICl_{Ca}$ : courant chlore dépendant du calcium intracellulaire

$IK_A$ : courant potassium transitoire de type A

$IK_{ATP}$ : courant potassium dépendant de l'ATP

$IK_{Ca}$ : courant potassium dépendant du calcium intracellulaire

$IK_{DR}$ : courant potassium à rectification sortante retardée

$IK_{ir}$ : courant potassium entrant activé pour des hyperpolarisations

$IK_{Na}$ : courant potassium dépendant du sodium intracellulaire

$IK_r$ : courant potassium de repos

INa1 : courant sodique de type 1

INa2 : courant sodique de type 2

$I_{Na/Ca}$ : courant calcico-sodique

$INa_r$ : courant sodique de repos

IMI : imidaclopride

LP : liquide physiologique

mAChR : récepteur cholinergique de type muscarinique

MLA : méthyllylcaconitine

MNB : unpaired median neuroblast

nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique

Nic : nicotine

NO : monoxyde d'azote

PA : potentiel d'action

PBO : pyréronyl butoxide

PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC : protéine kinase C

PP1/2A : protéine phosphatase de type 1 et 2A

PP2B : protéine phosphatase sensible au complexe calcium-CaM

PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

R : résistance

RCR : résistance de contre-réaction

TTX : tétrodotoxine

V : potentiel

VUM : ventral unpaired median

α-bgt : α-bungarotoxine

ω-CgTx : ω-conotoxine

# LISTE DES FIGURES

## 1ERE PARTIE : OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES


**Figure 1 :** *Evolution et prévision de la demande mondiale en production végétale agricole de 1968 à 2015* ... 6
**Figure 2 :** *Estimation des rendements mondiaux moyens avec ou sans produits phytosanitaires de synthèse.* 7
**Figure 3 :** *Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2008* ..... 10
**Figure 4 :** *Répartition du marché mondial des insecticides en 2008* ..... 10
**Figure 5 :** *Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones.* ..... 13
**Figure 6 :** *Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones au niveau du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana et structure anatomique de ce ganglion* .... 14
**Figure 7 :** *Courbe I/V induite par l'acétylcholine (ACh 1M) et la nicotine (Nic, 10 mM)* ..... 18
**Figure 8 :** *Schéma résumant la régulation intracellulaire de nAChR1 qui implique la CaMKII et la PKA*..... 19
**Figure 9 :** *Schéma récapitulatif de la régulation de nAChR1 par l'activation d'un récepteur muscarinique de type M1* ..... 19
**Figure 10 :** *Structure secondaire d'une sous-unité de nAChRs* ..... 22
**Figure 11 :** *Assemblage des sous-unités de nAChRs en forme de rosette et agencement des sites de liaisons à l'acétylcholine.* ..... 23
**Figure 12 :** *Site de liaison de l'acétylcholine* ..... 24
**Figure 13 :** *Liaison entre la nicotine et Ls-AChBP.* ..... 25
**Figure 14 :** *Site de liaison des néonicotinoïdes* ..... 28
**Figure 15 :** *Structures chimiques de la nicotine et de la nithiazine* ..... 30
**Figure 16 :** *Structures chimiques, dates de mise sur le marché et formulations commerciales des principaux néonicotinoïdes.* ..... 31
**Figure 17 :** *Corrélation entre la résistance de souches de l'aleurode du tabac Bemisia tabaci à l'imidaclopride (IMI) et l'expression du gène CYP6CM1 codant pour un cytochrome P450.* ..... 39
**Figure 18 :** *Effet synergique de l'association d'un nématode Heterorhabiditis bacteriophera (Hb) et de l'imidaclopride (IMI) sur la mortalité des scarabées Popillia japonica et Cyclocephala borealis* ..... 41
**Figure 19 :** *Concentration létale (CL) 50 pour l'aleurode du tabac Bemisia tabaci après application d'imidaclopride (IMI) et d'acétamipride (ACT) seul ou après traitement au PBO 5 heures avant.* ..... 42


## 2EME PARTIE : MODELE BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES


**Figure 20 :** *A, Photographie d'une blatte mâle Periplaneta americana. B, Représentation du système nerveux central de la blatte Periplaneta americana* ..... 45
**Figure 21 :** *A, Localisation des corps cellulaires des neurones DUM et B, Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominalde la blatte Periplaneta americana.* ..... 46
**Figure 22 :** *Courants ioniques impliqués dans l'activité électrique spontanée des neurones DUM de la blatte Periplaneta americana..* ..... 47
**Figure 23 :** *Protocole de dissociation et de mise en culture à court terme des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana.* ..... 50
**Figure 24 :** *Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière » en patch-clamp.* ..... 51
**Figure 25 :** *Schéma simplifié du principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ».* ..... 53
**Figure 26 :** *Représentation schématique de l'installation de patch-clamp* ..... 54
**Figure 27 :** *Photographie d'un neurone DUM en présence du dispositif d'éjection* ..... 55
**Figure 28 :** *Dépolarisation induite par l'ACh dépendante de sa durée d'éjection.* ..... 56

## 3EME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

**Figure 29 :** *Effet de la nicotine (Nic) et de l'imidaclopride (IMI) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bgt (0.5 µM).* ..... 60
**Figure 30 :** *Effet de la nicotine (Nic) sur les nAChRs insensibles à l'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM).* ..... 61
**Figure 31 :** *Test de résistance membranaire avant et après application de nicotine en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 61
**Figure 32 :** *Au potentiel imposé de -70 mV, amplitude du courant induit par l'imidaclopride (IMI, 100 µM) en présence d'α-bgt (0.5 µM) et en présence ou non de d-TC (50 µM).* ..... 62
**Figure 33 :** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bgt (0.5 µM)* ..... 63
**Figure 34 :** *Effet de l'acétamipride (ACT) et de l'imidaclopride (IMI) sur les nAChRs exprimés par les neurones DUM en présence d'α-bgt (0.5 µM)* ..... 64
**Figure 35 :** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en présence d'α-bgt (0.5 µM) et en présence ou non de d-TC (50 µM)* ..... 66
**Figure 36 :** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs insensibles à l'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM)* ..... 66
**Figure 37 :** *Test de résistance membranaire avant et après application d'acétamipride (ACT) en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 67
**Figure 38 :** *Courbe dose-réponse pour l'acétamipride (ACT) après l'application d'α-bgt (0.5 µM) en présence ou non de d-TC (50 µM), au potentiel imposé de -50 mV.* ..... 69
**Figure 39 :** *Effet du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM)* ..... 70
**Figure 40 :** *Test de résistance membranaire après application d'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 71
**Figure 41 :** *Schéma hypothétique de l'influence du potentiel de membrane sur nAChR2* ..... 72
**Figure 42 :** *Effet de l'acétamipride (ACT) sur les nAChRs en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), et en présence soit de l'EGTA soit du BAPTA en solution intrapipette* ..... 73
**Figure 43 :** *Effet de l'absence d'EGTA sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 73
**Figure 44 :** *Effet du chlorure de cadmium et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 74
**Figure 45 :** *Test de résistance membranaire après application d'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de TTX (0.1 µM) et en présence ou non de CdCl2 (0.5 mM)* ..... 76
**Figure 46 :** *Effet de l'ω-CgTx sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel imposé de -30 mV* ..... 76
**Figure 47 :** *Effet du LOE 908 sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM) au potentiel imposé de -70 mV.* ..... 77
**Figure 48 :** *Schéma hypothétique de l'influence du potentiel de membrane et du calcium sur nAChR2.* ..... 78
**Figure 49 :** *Effet du W-7 et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM)* ..... 81
**Figure 50 :** *Test de résistance membranaire en présence d'α-bgt (0.5 µM), de d-TC (50 µM), de TTX (0.1 µM) et en présence ou non de W-7 (0.5 mM).* ..... 82
**Figure 51 :** *Effet de la forskoline et du potentiel de membrane sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM).* ..... 83
**Figure 52 :** *Effet de la forskoline après application de W-7 sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT en présence d'α-bgt (0.5 µM) et de d-TC (50 µM)* ..... 84
**Figure 53 :** *Effet de l'AMPc sur la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT.* ..... 85
**Figure 54 :** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en fonction de la solution extracellulaire* ..... 87
**Figure 55 :** *Dépolarisation induite par l'acétamipride (ACT) en présence ou non de GABA (10 µM)* ..... 87

## 4EME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

**Figure 56 :** *Schéma récapitulatif de l'influence du potentiel de membrane et du calcium sur nAChR2.* ..... 90

# LISTE DES TABLEAUX

## 1ERE PARTIE : OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES

**Tableau 1 :** *Liste non exhaustive des différents types de neurones d'insecte où la présence de nAChRs a été caractérisée électrophysiologiquement*..... 16
**Tableau 2 :** *Récapitulatif des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques de nAChR1 et de nAChR2.* ..... 20
**Tableau 3 :** *Récapitulatif des liaisons entre les néonicotinoïdes et les AChBP* ..... 28
**Tableau 4 :** *Classification des insecticides néonicotinoïdes en fonction de leur pharmacophore* ..... 32
**Tableau 5 :** *Sélectivité de différentes classes d'insecticides pour les insectes vis-à-vis des mammifères.* ..... 34

## 2EME PARTIE : MODELE BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

**Tableau 6:** *Composition des liquides physiologiques utilisés au cours de la dissociation et la mise en culture des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana*..... 50
**Tableau 7:** *Composition des liquides physiologiques utilisés au cours des expériences de patch-clamp.* ..... 55

## 3EME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

**Tableau 8 :** *Effet du potentiel de membrane sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride.* ..... 70
**Tableau 9 :** *Effet du chlorure de cadmium en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride*..... 74
**Tableau 10 :** *Effet de l'ω-conotoxine GVIA et du LOE 908 sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride* ..... 77
**Tableau 11 :** *Effet du W-7 en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride* ..... 81
**Tableau 12 :** *Effet de la forskoline en fonction du potentiel sur la réponse de nAChR2 à l'acétamipride*..... 83

# RESUME

L'utilisation des produits phytosanitaires est indispensable pour augmenter la qualité des productions agricoles. Cependant les directives européennes et nationales préconisent une réduction de 50 % de leur utilisation pour préserver l'environnement et limiter les effets secondaires sur les organismes non-cibles. Dans cette optique, et pour optimiser l'efficacité de ces produits tout en diminuant leur dose d'utilisation, il est nécessaire de caractériser les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation de l'effet insecticide de ces composés sur leurs cibles membranaires. Parmi les insecticides les plus utilisés en agriculture, les néonicotinoïdes occupent une place importante sur le marché. Ils ont pour cible les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) du système nerveux central des insectes. Chez la blatte *Periplaneta americana*, des cellules neurosecrétrices identifiées, les neurones DUM, expriment deux sous-types de nAChRs, (nAChR1 et nAChR2). Alors que nAChR1 est sensible à l'imidaclopride (IMI), néonicotinoïde de première génération, cet insecticide ne présente aucun effet sur nAChR2. Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mode d'action de ces insecticides sur des nAChRs insensibles, l'objectif de ce travail de recherche a été de caractériser du point de vue électro-pharmacologique les facteurs cellulaires et moléculaires qui influencent l'efficacité d'un insecticide néonicotinoïde de seconde génération, l'acétamipride (ACT) qui présente des caractéristiques chimiques différentes de l'IMI.

Grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp, dans des conditions de potentiel imposé, il a été possible de démontrer que l'effet de l'ACT sur nAChR2 dépend du potentiel de membrane. Une dépolarisation de la membrane augmente légèrement la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT alors qu'une hyperpolarisation produit un effet inverse significatif. Dans les deux cas, l'implication du calcium intracellulaire a été démontrée. Pour des potentiels plus positifs que le potentiel de membrane (i.e., -50 mV), l'inhibition de l'influx calcique via l'activation des canaux calciques à haut seuil d'activation (High Voltage-Activated) par le chlorure de cadmium et l'ω-conotoxine GVIA augmente la sensibilité de nAChR2 pour l'ACT. Des effets similaires sont obtenus pour des potentiels de membrane plus hyperpolarisés lorsque la perméabilité calcique est inhibée par le LOE 908, un inhibiteur des canaux TRPγ. Dans ce dernier cas, l'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques (e.g., forskoline, W7) a permis de révéler que la voie de signalisation intracellulaire AMPcyclique/adenylate cyclase est impliquée dans la modulation de l'efficacité de l'ACT sur nAChR2. Enfin, des mesures de la résistance membranaire, réalisées en parallèle dans des conditions de courant imposé, indiquent que l'état conformationnel des nAChR2 joue également un rôle important dans la modulation de l'efficacité de l'ACT. L'ensemble de ces résultats qui ont permis d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la modulation de l'efficacité d'un néonicotinoide, l'ACT ouvrent des perspectives très intéressantes pour optimiser l'efficacité d'un traitement insecticide.

**Mots clés :** insecte, insecticides, néonicotinoïdes, acétamipride, neurones DUM, patch-clamp, récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique, TRPγ.