



HAL
open science

Caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniqnes neuronaux d'insectes et étude de la modulation de leurs profils pharmacologiques par les insecticides néonicotinoïdes

Alison Cartereau

► **To cite this version:**

Alison Cartereau. Caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniqnes neuronaux d'insectes et étude de la modulation de leurs profils pharmacologiques par les insecticides néonicotinoïdes. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2018. Français. NNT : 2018ORLE2031 . tel-02102664

HAL Id: tel-02102664

<https://theses.hal.science/tel-02102664>

Submitted on 17 Apr 2019

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.

**ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES
ET CHIMIE DU VIVANT**

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

THÈSE présentée par :
Alison Cartereau

soutenue le : **26 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie

**Caractérisation des sous-types de
récepteurs nicotiques neuronaux
d'insectes et étude de la modulation de
leurs profils pharmacologiques par les
insecticides néonicotinoïdes**

THÈSE dirigée par :

Steeve Thany

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Pierre Charnet

Directeur de recherche, CNRS de Montpellier

Jean-René Martin

Directeur de recherche, CNRS de Gif-sur-Yvette

JURY:

Pierre Charnet

Directeur de recherche, CNRS de Montpellier

Claude Collet

Chargé de recherche, INRA PACA, Avignon

Jean-René Martin

Directeur de recherche, CNRS de Gif-sur-Yvette

Stéphane Mortaud

Professeur, CNRS d'Orléans

Steeve Thany

Professeur, Université d'Orléans

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier, mon directeur de thèse, **Steeve-Hervé Thany**, pour son implication, sa patience et sa disponibilité tout au long de ces trois années de thèse. Merci de m'avoir impliquée dans de nombreux projets, de m'avoir fait confiance, confiance qu'il m'a renouvelée en me permettant encore aujourd'hui de travailler sur ces projets. Merci.

Je remercie les membres de mon jury de thèse **Pierre Charnet**, directeur de recherche du CNRS de Montpellier et **Jean-René Martin**, directeur de recherche du CNRS de Gif-sur-Yvette qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci à **Claude Collet**, Chargé de recherche à l'INRA PACA, d'Avignon et **Stéphane Mortaud**, professeur au CNRS d'Orléans. Je tiens également à remercier le Ministère de l'Education Nationale et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour avoir financé ce projet.

Merci à toute l'équipe entomologie et biologiques intégrés :

Carine Martin, « nhjjmaman biomol », te remercier de façon concise va être compliqué. Tu fais partie intégrante de cette thèse. Merci d'avoir été là, de m'avoir transmis tes connaissances, m'avoir supporté les jours où j'étais ronchon, d'avoir rigoler à mes blagues pourries. Ta bonne humeur, ta joie de vivre et ton petit caractère font de toi une personne indispensable à l'équipe. **Jean-Noël Houchat**, tu es arrivé pour cette dernière année et tu complètes parfaitement cette équipe, en plus d'être aujourd'hui devenu un ami. Merci de m'avoir supporté et de me supporter encore.

Xavier Pineau, mon bouclier contre les abeilles ! Tu m'as appris beaucoup de choses, et je suis sûr que c'est grâce à toi que Pépito est toujours en vie.

Mathilde Baude, pour ta gentillesse au quotidien. Merci aussi de m'avoir emmené cet été dans les champs récupérer le pollen de maïs, cette pause terrain était la bienvenue durant cette période de rédaction.

Stéphanie Bankhead, **Aurélien Salle**, **Daniel Augin**, qui ont toujours été présent pour répondre à mes questions.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire de biologie des ligneux et des grandes cultures :

La team du matin :

Merci aux membres de l'équipe Epigénétique/écophysiologie **Stéphane Maury, Régis Fichot, Mamadou Dia Sow, Alain Delaunay, Isabelle Lejean**. Commencer la journée avec vous autour d'un café est essentiel pour passer une bonne journée.

Laurent Leguay, pour ta gentillesse et ta disponibilité, tu as toujours su répondre à toutes mes questions.

Laure, Mamadou, Jean-Noël, Anaïs, Manhattan, les doctorants avec qui j'ai partagé l'open space pendant 3 ans. J'ai pris beaucoup de plaisir à partager ces moments avec vous. Je vous souhaite à tous une bonne continuation, je suis sûr que vous vous en sortirez très bien.

La team du midi :

Françoise Cheford pour avoir toujours été disponible pour moi, et surtout la semaine avant l'impression de cette thèse. Merci de l'avoir relue et corrigé les fautes de Français qui traînaient.

François Hericourt pour le partage de ta culture cinématographique, des heures de divertissement m'attendent grace à toi. Merci également pour les heures que tu as passé à m'expliquer la biomol, je partais de loin. **Domenico Morabito** ta lecture de l'horoscope ainsi que tes blagues m'ont été d'une grande aide pour ces 3 ans de thèses, **Sabine Carpin** pour ta bonne humeur et ta joie de vivre très contagieuse. **Frédéric Lamblin**, le second gêmeaux de ce laboratoire, merci pour toute l'aide que tu nous apportes lorsque l'on galère aux mots fléchés.

Cécile Barbarroux, Sylvain Bourgerie, Christiane Depieurreux, Muriel Feinard-Duranceau, Florie Miard, toujours là pour discuter le midi et partager leur bonne humeur.

Richard Bouceffa pour ta disponibilité. La pâte à fixe n'est pas la solution à tous les problèmes techniques, mais toi si.

Je remercie également mes amis, pour m'avoir encouragé et soutenue :

Les fouinettes, Sab, Caro, Maucris merci pour ces Skype quotidiens qui m'ont permis de rire, et de me changer les idées surtout sur la fin.

Anne-Laure Legac, tu as été plus qu'une collègue de bureau, merci pour les footings, les soirées, le vin blanc, pour avoir cuisiné le crabe quand je n'avais pas le courage d'ébouillanter ce pauvre animal, mais qu'est-ce que c'était bon...

Enfin je remercie ma famille pour m'avoir encouragé et soutenue même si le monde des sciences reste pour vous très vagues. Et bien sûr merci à **Toi**, tu te reconnaitras, pour avoir toujours été là, cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, j'espère n'avoir pas été trop insupportable.

Remerciement	1
Liste des abréviations	5
Préambule	9
Introduction Générale	11
A. Les récepteurs à l’acétylcholine de type nicotinique chez les vertébrés	12
1. Généralité sur les canaux ligands dépendants (LGIC)	12
2. La découverte des récepteurs à l’acétylcholine de type nicotinique	12
3. Structure et fonctionnement des nAChR	16
3.1. Structure des sous-unités formant les nAChR	16
3.2. Pore ionique	16
3.3. Sites de liaison des ligands	18
3.4. Dynamique structurale des nAChR	22
4. Sous-unités qui composent le récepteur et modulation des nAChR	24
4.1. Présentation des sous-unités composant les nAChR chez les vertébrés	24
4.2. Etude pharmacologique des nAChR des vertébrés	24
4.3. Modulation allostérique des nAChR neuronaux	27
B. Les récepteurs de type nicotinique chez les insectes	30
1. Diversité des sous-unités composant les nAChR	30
2. Étude pharmacologique des récepteurs d’insectes	33
2.1. Etude pharmacologique par des approches d’électrophysiologie	33
2.2. Caractérisation des sites de liaison des nAChR d’insectes par des tests de liaison par affinité	36
2.3. Influence de la composition en sous-unité sur les propriétés pharmacologiques	37
C. Les produits phytosanitaires	40
1. Historique	40
2. Les produits phytosanitaires : définition et utilisation	42
3. Les insecticides et leurs modes d’actions	44
3.1. Les insecticides néonicotinoïdes	44
3.2. Mode d’action des néonicotinoïdes	46
4. Site de liaison des néonicotinoïdes	46
5. Les résistances aux insecticides	50
5.1. Résistance métabolique	50
5.2. Rôle des nAChR des insectes dans la résistance aux insecticides	52
D. Problématique de l’équipe d’accueil et objectif de thèse	55

<i>Chapitre I : Caractérisation pharmacologique du récepteur homomérique $\alpha 7$ chez la blatte <i>Periplaneta americana</i></i>	57
A. Présentation synthétique de l'article :	58
B. Publication n° 1 : Cartereau et <i>al.</i>, 2018 (Soumis)	58
<i>Chapitre II : Modulation des courants cholinergiques par les insecticides néonicotinoïdes sur le récepteur $\alpha 7$ de rat.</i>	91
A. Présentation synthétique de l'article :	92
B. Publication n°2 : Cartereau et <i>al.</i>, 2017	93
<i>Chapitre III : Modulation de l'effet du dinotéfurane par la perméthrine</i>	107
<i>Modulation de l'effet du dinotéfurane par la perméthrine</i>	108
A. Présentation synthétique de l'article :	108
B. Publication n°3 : Cartereau et <i>al.</i>, 2018	109
<i>Chapitre IV : Etudes des récepteurs nicotiniques de la blatte <i>Periplaneta americana</i> en système hétérologue à partir d'extraits de membrane.</i>	119
A. Introduction :	120
B. Matériel et méthode :	122
1. La blatte <i>Periplaneta americana</i>	122
1.1. Préparation des membranes	123
1.2. Quantification des protéines : test de Bradford	123
1.3. Expression en système hétérologue : injection dans les ovocytes de xénope	125
1.4. Mesure d'électrophysiologie	125
C. Résultats préliminaires	127
D. Discussion	131
<i>Discussion et perspectives</i>	132
<i>Références bibliographiques</i>	138
<i>Liste des tableaux et figures</i>	172
<i>Annexe</i>	176

Liste des abréviations

4BP-TQS :	4-(4-Bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8 sulfonamide
- A -	
α :	Alpha
α- Bgt :	Alpha-bungarotoxine
A-867744 :	4-[5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-(1-oxopropyl)-1H-pyrrol-1-yl] benzenesulfonamide
Ac-AChBP :	<i>Aplysia californica</i> -acetylcholine binding protein
ACE :	Acétamipride
ACh :	Acétycholine
AChBP :	Acetylcholine binding protein
Ag :	<i>Anopheles gambiae</i>
ALS :	Alpha like subunit
Am :	<i>Apis mellifera</i>
AMPA :	Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazoleproponique
Ap :	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
Asp :	Acide aspartique
- B -	
β :	Beta
Bm :	<i>Bombyx mori</i>
Bt-AChBP :	<i>Bulinus truncatus</i> -acetylcholine binding protein
- C -	
Ca²⁺ :	Ion calcium
CLO :	Clothianidine
Cys :	Cystéine
CysLGIC :	Les récepteurs à boucle cystéine
- D -	
δ :	Delta
D :	Acide aspartique
DDD :	dichlorodiphényldichloroéthane
DDT :	dichlorodiphényltrichloroéthane
DHE :	dihydroxy-β-érythoïdine
Dm :	<i>Drosophila melanogaster</i>
d-TC :	d-tubocurarine
DUM :	Dorsal unpaired median
- E -	
E :	Acide glutamique
EPI :	Epibatidine
- F -	
F :	Phénylalanine

- G -	G :	Glycine
	GABA :	Acide γ -aminobutyrique
- H -	HEK :	Human embryonic kidney
- I -	IMI :	Imidaclopride
- K -	K⁺ :	Ion potassium
- L -	L :	Leucine
	LGIC :	Ligand gated ion channel
	Ls-AChBP :	<i>Lymnaea stagnalis</i> -acetylcholine binding protein
- M -	MLA :	Méthyllycaconitine
- N -	N :	Asparagine
	Na⁺ :	Ion sodium
	nAChD :	Desensitized nicotinic acetylcholine receptor
	nAChN :	Non desensitized nicotinic acetylcholine receptor
	nAChR :	Nicotinic acetylcholine receptor
	nAChR1 :	Nicotinic acetylcholine receptor de type 1
	nAChR2 :	Nicotinic acetylcholine receptor de type 2
	NAM :	Negative allosteric modulator
	Nic :	Nicotine
	NMDA :	N-methyl-D-aspartate
	Nv :	<i>Nasonia vitripennis</i>
- P -	P :	Proline
	PAM :	Positive allosteric modulator
	Pa :	<i>Periplaneta americana</i>
	PBO :	Pipéronyl butoxyde
	PERM :	Perméthrine
	PPSE :	Potentiels postsynaptiques excitateurs
	PNU-120596 :	N-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea
- Q -	Q :	Glutamine
- S -	S :	Sérine
	SAM :	Silent allosteric modulator
	SOS :	Solution oocyte saline

- T -	T :	Thréonine
	Tc :	<i>Tribolium castaneum</i>
	THC :	Thiaclopride
	TM :	Trans-membranaire
	TMX :	Thiaméthoxame
	TQS :	3a,4,5,9b-Tetrahydro-4-(1-naphthalenyl)-3H-cyclopentan[c]quinoline-8-sulfonamide
	Trp :	Tryptophane
	TRP :	Transient receptor potential
	Tyr :	Tyrosine
- U -	UIPP	Union des Industries et de la Protection des Plantes
- V -	V :	Valine
- Y -	Y :	Tyrosine

Préambule

Les produits phytosanitaires représentent un enjeu important en agriculture et dans la lutte anti-vectorielle. En effet, l'agro-industrie est très dépendante des produits phytosanitaires pour garantir les rendements agricoles, en luttant notamment contre les insectes ravageurs de cultures et vecteurs de maladies chez les animaux et l'Homme. Les polémiques actuelles sur l'usage des produits phytosanitaires et le retrait de certains produits par l'Union Européenne et la France au nom du principe de précaution posent plusieurs problèmes. Comment continuer à maintenir les rendements agricoles, tout en préservant la biodiversité ? ... Ces polémiques sont liées, d'une part, au fait que le mode d'action des pesticides chez les insectes est très mal connu et d'autre part, aux connaissances de plus en plus approfondies qui révèlent une toxicologie non spécifique pollinisateurs/ravageurs. En effet, bien que de nombreuses études toxicologiques mettent en évidence l'effet neurotoxique des insecticides, très peu d'études s'intéressent aux mécanismes moléculaires des insecticides chez les insectes. Les récepteurs à l'acétylcholine (ACh) de type nicotinique (nAChR) sont l'une des principales cibles des insecticides, notamment les insecticides néonicotinoïdes et plus récemment la nouvelle famille des sulfoximines, dont le plus connu est le sulfoxaflor. Cependant, ces molécules sont décrites comme agissant spécifiquement sur les nAChR des insectes, notamment comme agonistes.

Malheureusement, la composition en sous-unités des nAChR natifs des insectes n'est pas très bien connue et très peu étudiée à ce jour. La plupart des données sont issues de récepteurs hybrides utilisant des combinaisons de sous-unités α d'insectes et β de mammifères. Une question majeure posée par ces modèles est celle de leur capacité à rendre compte du fonctionnement réel des récepteurs natifs des insectes et donc du mode d'action réel des insecticides néonicotinoïdes.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons tenté de répondre à ces différentes questions en exprimant pour la première fois un récepteur fonctionnel d'insecte dans un système hétérologue afin d'étudier le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes. Particulièrement, nous nous sommes intéressés au récepteur homomérique de type $\alpha 7$ chez la blatte. Nous avons également comparé les propriétés fonctionnelles de ce récepteur avec celle du récepteur $\alpha 7$ de mammifère. Parallèlement à ce travail, nous avons continué à étudier l'effet des insecticides néonicotinoïdes sur les récepteurs nicotiniques neuronaux exprimés aux niveaux synaptique et extrasynaptique sur les neurones de blatte.

Introduction Générale

A. Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique chez les vertébrés

1. Généralité sur les canaux ligands dépendants (LGIC)

Les canaux ioniques ligands dépendants (LGIC : « ligand gated ion channel ») appartiennent à la famille des canaux ioniques activés par la fixation d'un ligand endogène. Les LGIC sont des protéines transmembranaires qui permettent le passage des ions au travers de la membrane : ils sont qualifiés de récepteurs ionotropes.

Les LGIC se divisent en 4 familles (Connolly et Wafford, 2004) (**Figure 1**) :

- Les récepteurs à boucle cystéine (cysLGIC) : récepteurs perméables aux cations et aux anions, ils possèdent un pont disulfure. Il existe 4 grandes familles de récepteurs cysLGIC : les nAChR, les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA), les récepteurs à la glycine et les récepteurs à la sérotonine de type 5-HT.
- Les récepteurs au glutamate parmi lesquels les récepteurs NMDA (Acide N-méthyl-D-aspartique), les récepteurs AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) et les récepteurs au kainate.
- Les canaux TRP (transient receptor potential) sont des canaux non-sélectifs aux cations (Beckers *et al.*, 2017)
- Les canaux ATP dépendants dont l'ouverture est provoquée par une augmentation de la concentration intracellulaire en ATP, parmi lesquels se trouvent les canaux potassiques ATP-dépendants.

Ces récepteurs se distinguent par le nombre de segments transmembranaires et le nombre de sous-unités qui forment le récepteur (Le Novère, 2001 ; Le Novère et Changeux 1999, 2001). Chaque groupe forme une superfamille constituée de sous-unités homologues.

2. La découverte des récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique

L'histoire des nAChR remonte au début du 20^{ième} siècle avec les travaux de John Newport Langley. Il a montré que la contraction tonique du muscle gastrocnémien de grenouille (muscle squelettique dorsal de la patte) était induite par la nicotine (NIC) et que cette contraction était inhibée par le curare (Langley, 1907). Quelques années plus tard, Dale et ses collaborateurs purifient l'ACh, à partir des rates de cheval et de bœuf, et la définissent comme un neurotransmetteur endogène. Dans leurs études, ils comparent l'action de la muscarine et de

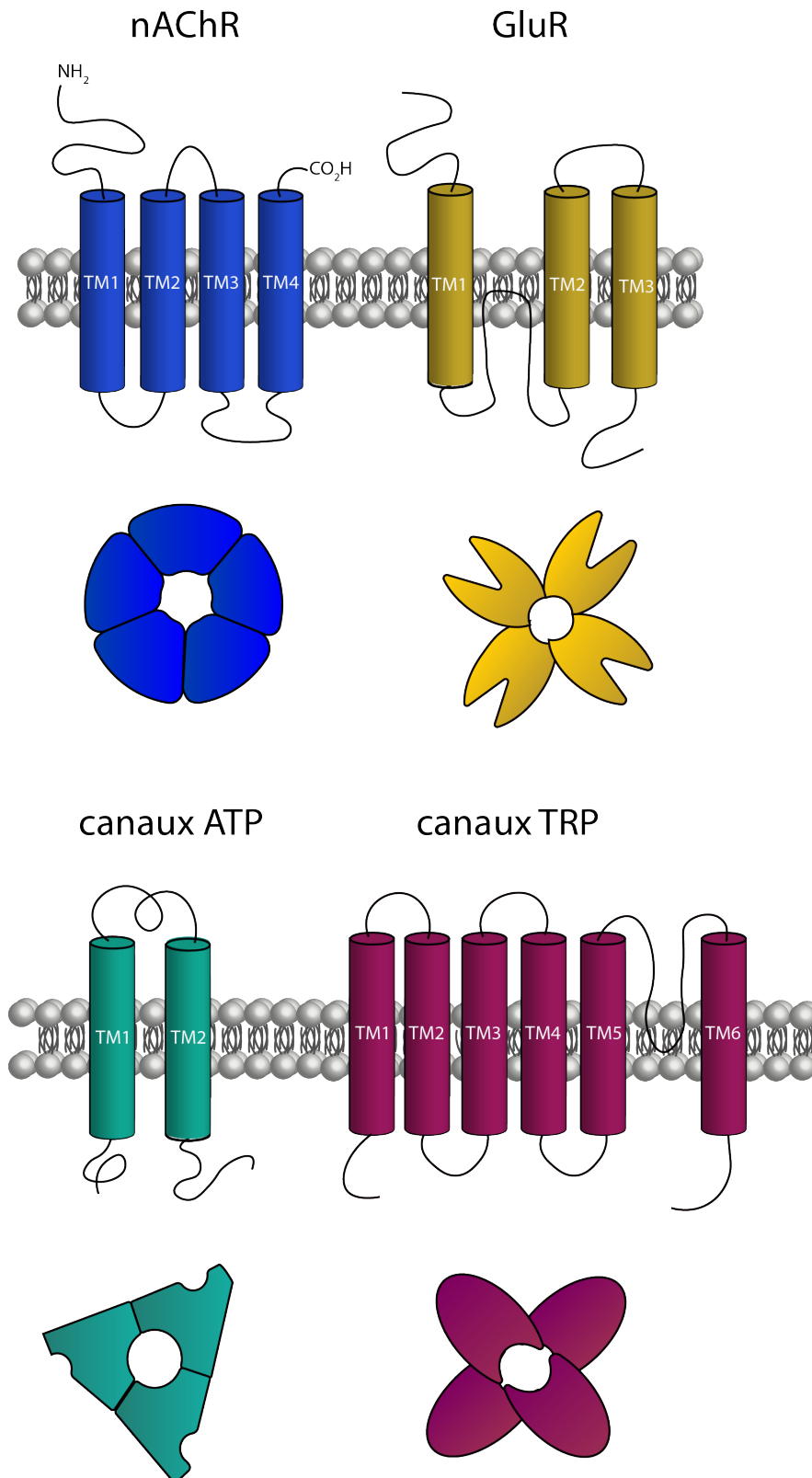
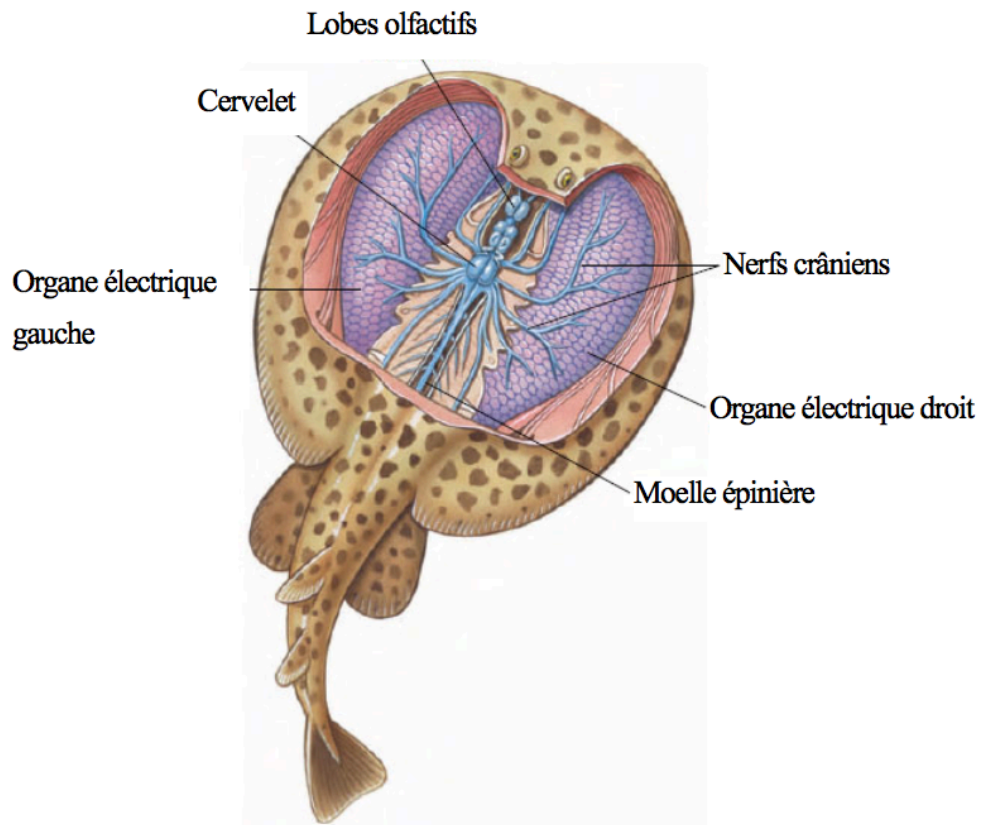


Figure 1 : Représentation des quatre groupes de récepteurs appartenant à la famille des LGIC. Les récepteurs à boucle cystéine sont représentés par les nAChRs. Ces 4 superfamilles se distinguent par le nombre de segments transmembranaires et par le nombre de sous-unités qui compose le récepteur (Modifié d'après Changeux et Edelstein, 1998).

la NIC, et mettent en évidence deux familles de récepteurs pharmacologiquement différentes (Dale, 1914 ; Dale & Dudley, 1929). Ces deux familles sont aujourd'hui connues sous le nom de récepteur cholinergique de type muscarinique (mAChR) et de récepteur cholinergique de type nicotinique (nAChR). Par la suite, les études réalisées sur l'organe électrique de la torpille (poisson électrique *Torpedo*) qui est une source riche et accessible en nAChR (**Figure 2**) ont permis des avancées supplémentaires. La torpille est connue pour sa capacité à produire d'importantes décharges électriques grâce à un organe composé de milliards de terminaisons nerveuses libérant de fortes quantités d'ACh. À partir des années 70, le récepteur est identifié *in vitro* grâce à une toxine de serpent, l' α -bungarotoxine (α -Bgt) (Lee *et al.*, 1966). L' α -Bgt inhibe *in vivo* et *in vitro* la réponse de l'électroplaque lorsque celle-ci est isolée et mise en contact avec de la carbamylcholine (agoniste des nAChR) (Changeux *et al.*, 1970). En 1984, le récepteur de la torpille, composé des sous-unités α , β , γ et δ , fut le premier récepteur à être cloné et caractérisé dans un système d'expression hétérologue utilisant l'ovocyte de xénope (Mishina *et al.*, 1984). Il a aussi servi de modèle pour l'étude de la structure, de la fonction et de la régulation des canaux dépendants d'un ligand chez les vertébrés et les invertébrés (Osborne, 1996 ; Mongan *et al.*, 1998 ; Swope *et al.*, 1999).

A



B

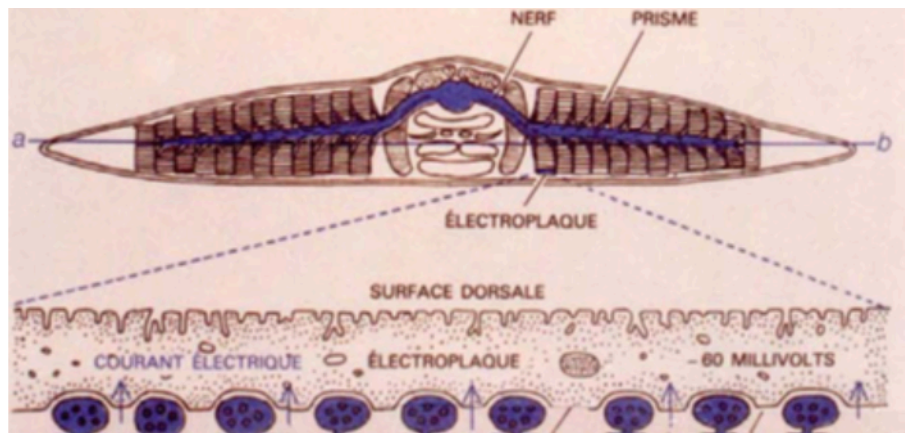


Figure 2 : Présentation de la torpille, *Torpedo* (A) Coupe dorsal d'une torpille permettant d'observer les organes électriques. (B) Coupe transversale représentant l'empilement des électroplaques qui composent l'organe électrique.

3. Structure et fonctionnement des nAChR

3.1. Structure des sous-unités formant les nAChR

La connaissance sur la structure des nAChR provient des études réalisées sur l'organe électrique de la torpille (Karlin, 2002). L'observation à haute résolution (4 Å) et par microscopie électronique ont mis en évidence une structure pentamérique de 80 Å de diamètre et 160 Å de longueur (**Figure 3**) (Unwin, 2005). Le récepteur est composé de 5 sous-unités formant un pore étroit à travers la membrane. Il se divise en trois domaines : un domaine N-terminal extracellulaire (70 Å), composé de feuillet β , un domaine transmembranaire (30 Å) composé d'hélices α et un domaine intracellulaire constitué également d'hélices α . Le pore du canal permettant le passage des ions fait environ 20Å de diamètre dans la partie extracellulaire (**Figure 3**) (Arias, 1997 ; Unwin, 2005 ; Albuquerque *et al.*, 2009). Les sous-unités composant le récepteur sont divisées en deux catégories : les sous-unités α et les sous-unités non α . Les sous-unités de type α sont caractérisées par la présence de deux cystéines adjacentes en position 192 et 193 chez la torpille (Albuquerque *et al.*, 2009 ; Millar, 2009). Chaque sous-unité possède un profil d'hydrophobicité et des caractéristiques semblables, c'est à dire :

- Un domaine hydrophile amino terminal (N-terminal) extracellulaire
- Quatre hélices transmembranaires hydrophobes (TM1 à TM4)
- Une large boucle intracellulaire entre les segments TM3 et TM4 (100-150 acides aminés) (Kukhtina *et al.*, 2006)
- Un petit domaine hydrophile carboxy-terminal (C-terminal) extracellulaire (**Figure 4**)

Un récepteur composé de 5 sous-unités identiques est dit homomérique et hétéromérique lorsqu'il est formé de sous-unités différentes.

3.2. Pore ionique

La composition des acides aminés formant les sous-unités a été déterminée en premier lieu à partir du récepteur musculaire $\alpha_2\beta\gamma\delta$, de la torpille *Torpedo californica*. Ainsi, les sous-unités possèdent différents acides aminés qui forment des anneaux, chargés ou non chargés (Noda *et al.*, 1982, 1983) (**Figure 5**). Les anneaux chargés négativement, présent au niveau du TM2, permettent la sélectivité ionique du canal alors que les anneaux non chargés seraient

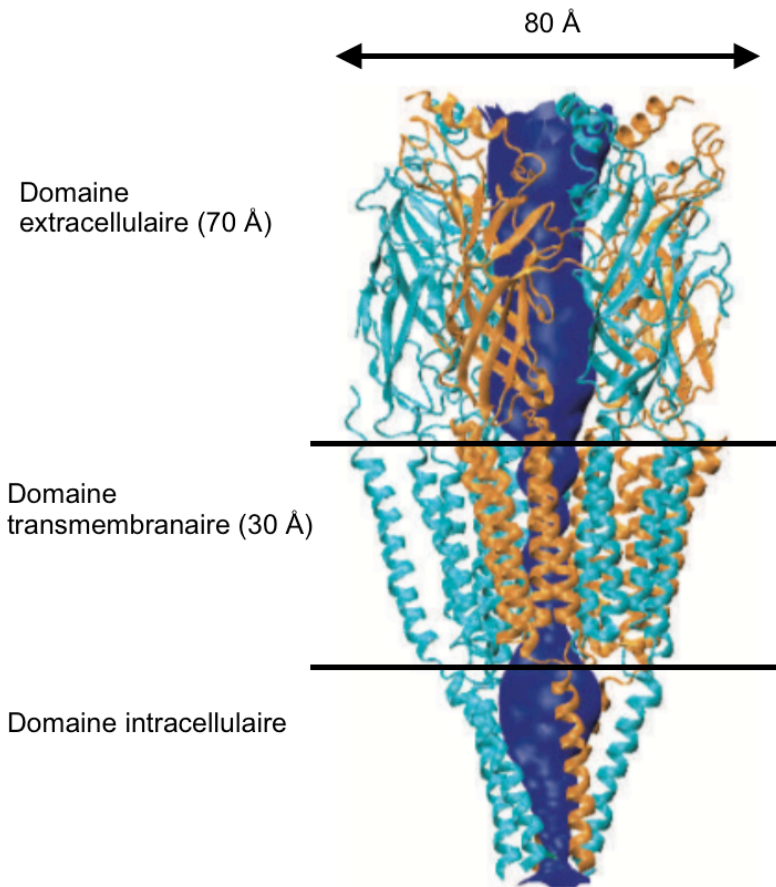


Figure 3 : Représentation structural du récepteur à l'ACh de l'organe électrique de la torpille. Les sous-unités α sont représentées en orange et les sous-unités non α sont représentées en bleu pâle. Le pore du canal est représenté en bleu foncé (Modifié d'après Sine et Engel, 2006)

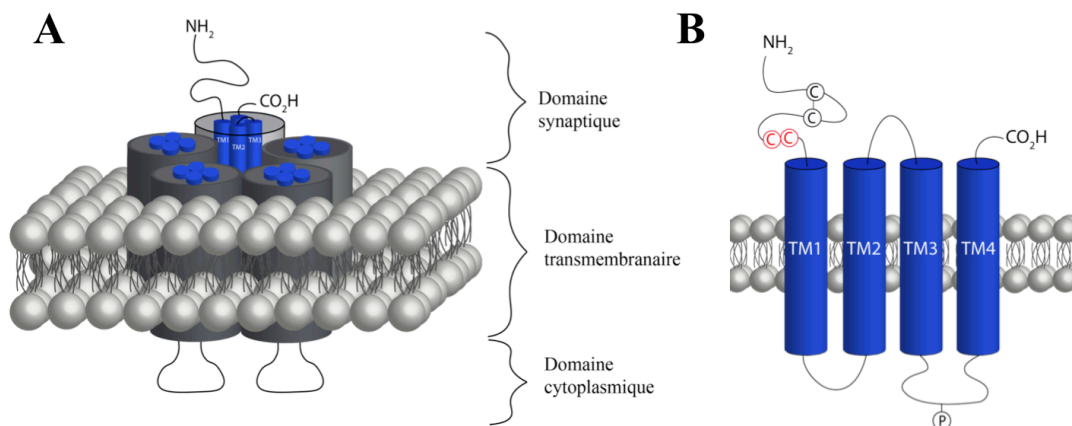


Figure 4 : Structure des sous-unités formant les nAChR (A) Schéma de l'organisation d'un récepteur à l'ACh au travers de la membrane. (B) Représentation des 4 domaines transmembranaires qui composent une sous-unité du récepteur. Dans la partie N-terminale se trouve le pont disulfure caractéristique des LGIC (©©) et les deux cystéines adjacentes (©) caractéristique des sous-unités α .

impliqués dans l'ouverture et la fermeture du canal (Arias, 1997 ; Karlin, 2002). Les anneaux non chargés sont composés de la valine (V), la leucine (L), la serine (T) et de la thréonine (S). Ils sont situés dans les domaines extracellulaire et intracellulaire (Imoto *et al.*, 1988 ; Arias, 1997) (**Figure 5**).

Le pore du canal est formé par les segments TM2 de chaque sous-unité et la partie supérieure des segments TM1. Plus spécifiquement, il est formé par l'hélice α du segment TM2 mais également par l'extrémité de l'hélice α du segment TM1. Il forme une barrière hydrophobe, imperméable aux ions quand le récepteur est à l'état fermé. Les segments TM3 et TM4 seraient à l'extérieur, au contact de la partie lipidique de la membrane. Kracun et ses collaborateurs ont étudié l'implication de la boucle TM3-TM4 dans l'expression et le fonctionnement du récepteur, grâce à l'utilisation de récepteurs chimères, formés du domaine extracellulaire des sous-unités $\alpha 7$ de rat et des domaines intra-membranaires et intracellulaires des sous-unités 5-HT_{3A} de souris. Ils ont montré que cette boucle intracellulaire contribue aux interactions protéines-protéines impliquées dans l'assemblage et la stabilité du récepteur (Kracun *et al.*, 2009).

3.3. Sites de liaison des ligands

Les expériences de mutagenèse dirigée, couplées à des tests de liaison par affinité, ont démontré que le site de fixation des agonistes et antagonistes compétitifs des récepteurs nicotiniques se situe à l'interface de deux sous-unités adjacentes (Karlin *et al.*, 1986 ; Blount et Merlie, 1990 ; Changeux *et al.*, 1992). Ce site identique à celui de l'ACh, est appelé site orthostérique. Il est composé d'une partie principale formée par les boucles A, B et C d'une sous-unité α et d'une partie secondaire formée par les boucles D, E et F d'une sous-unité α ou non α , suivant que le récepteur est homomérique ou hétéromérique. La composition en sous-unités du récepteur va donc déterminer le nombre de sites de liaison, par exemple le récepteur neuronal $\alpha 4\beta 2$ de mammifère aura 2 sites de liaisons, alors que le récepteur $\alpha 7$ aura 5 sites de liaison (Gotti *et al.*, 2007 ; Taly *et al.*, 2009) (**Figure 6**). Lorsqu'un ligand tel que la NIC se lie au récepteur, il se fixe dans une poche formée à l'interface entre la sous-unité α et la sous-unité adjacente (Albuquerque *et al.*, 2009). Cette interface peut être divisée en deux parties, une partie dite « positive », composée des deux cystéines adjacentes de la sous-unité α , et une partie dite « négative », composée d'au minimum trois acides aminés d'une seconde sous-unité α ou non α (Albuquerque *et al.*, 2009). Chez la torpille, il a été montré l'importance des résidus α Tyr 93,

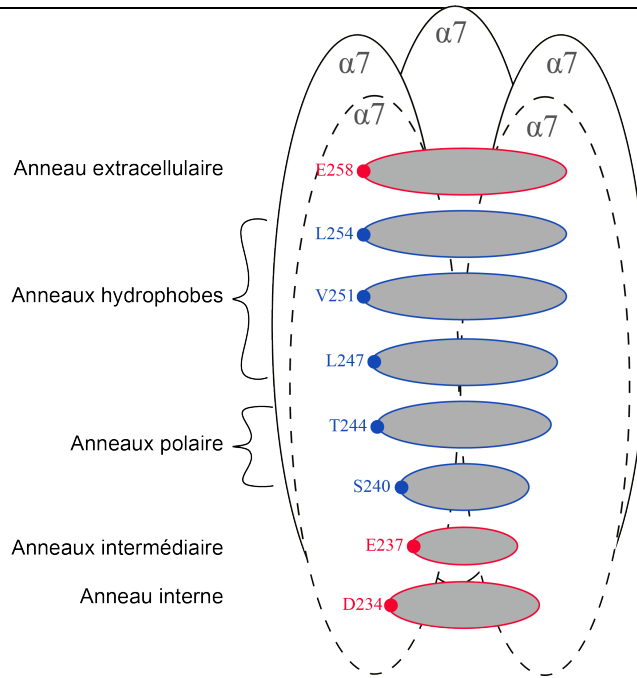


Figure 5 : Représentation de l'organisation structurale du récepteur $\alpha 7$ de poulet. Les résidus en rouges sont les acides aminés formant les anneaux chargés **négativement**, les anneaux chargés **positivement** sont symbolisés en bleu. Les différents acides aminés représentés sont : l'acide glutamique (E), la leucine (L), la valine (V), la thréonine (T), la sérine (S) et l'acide aspartique (D). Le numéro indiqué après l'acide aminé correspond à la position du résidu au niveau du segment transmembranaire TM1-TM2 (modifié d'après Corringier *et al.*, 2000, Itier et Bertrand, 2001)

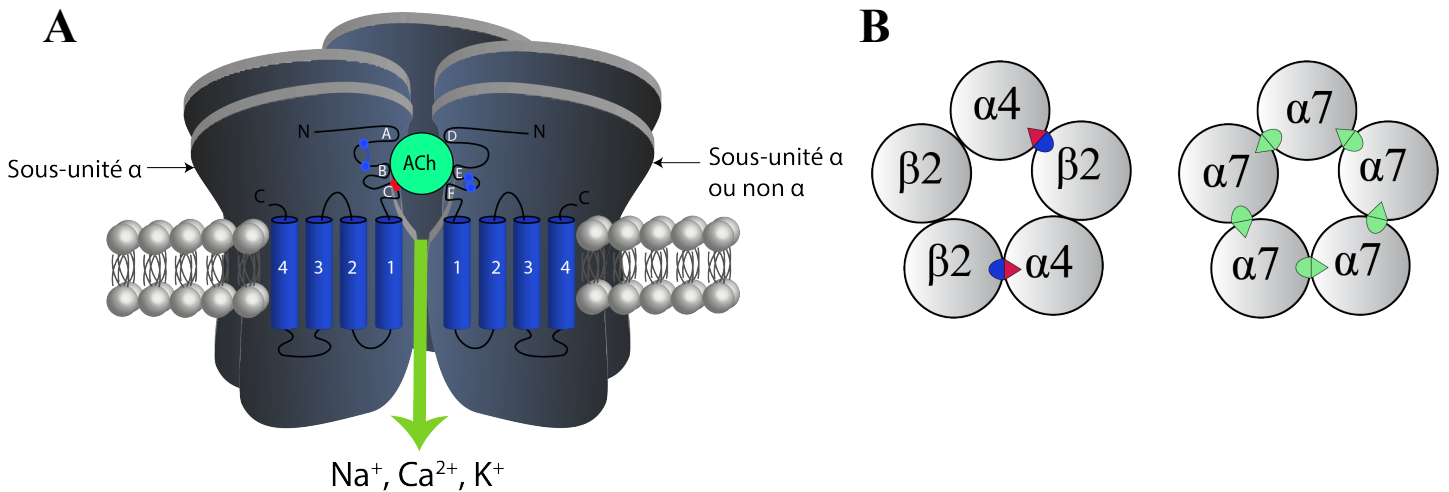


Figure 6 : Sites de liaison des ligands. (A) Représentation du site de liaison de l'ACh (en vert) au récepteur. Le site est formé par les boucles A, B, C de la sous-unités α (caractérisé par les deux cystéines adjacentes) et les boucles D, E et F de la sous-unité α ou non α . (B) Nombre de site de liaison de l'ACh sur le récepteur $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ de mammifère. Le triangle représente la sous-unité principale et le demi-cercle la sous-unité secondaire (modifié d'après Taly *et al.*, 2009).

α Tyr 149, α Tyr 190 et α Tyr 198 dans la liaison du ligand à la partie « positive » du site de liaison (Celie *et al.*, 2004 ; Sine et Engel, 2006). Ces résidus sont conservés chez toutes les sous-unités α des vertébrés à l'exception de la sous-unité $\alpha 5$ où la Tyr 190 est remplacée par une Asp 190 (Karlin, 2002). Sur la partie « négative », les résidus requis pour la liaison sont L112, M114 et Trp53. En général, les résidus hydrophobes de la partie « positive » déterminent l'affinité du ligand alors que les résidus de la partie « négative » déterminent la sélectivité du ligand (Albuquerque *et al.*, 2009).

Plus récemment, l'étude des sites de liaison a pu progresser grâce à la résolution atomique qui a permis l'isolation et la cristallisation d'une protéine qui se lie à l'ACh, l'acétylcholine binding protein (AChBP). L'AChBP est une protéine découverte pour la première fois chez la limnée d'eau douce *Lymnaea stagnalis* (Ls-AChBP) (Smit *et al.*, 2001). Cette protéine, sécrétée par les cellules gliales des mollusques, est impliquée dans la modulation de la transmission synaptique au niveau des synapses cholinergiques (Brejc *et al.*, 2001). Elle a également été identifiée chez l'escargot de mer *Aplysia californica* (Ac-AChBP) (Hansen *et al.*, 2004), l'escargot d'eau douce *Bulinus truncatus* (Bt-AChBP) (Celie *et al.*, 2005), le ver marin *Capitella teleta* (Billen *et al.*, 2012), l'escargot planorbe *Biomphalaria glabrata* (Saur *et al.*, 2012) et l'araignée *Cupiennius salei* (Torkkeli *et al.*, 2015). Le domaine de liaison formé par l'AChBP est proche du site de liaison des nAChR et forme un homopentamère (Shahsavari *et al.*, 2016). Il partage une identité de séquence de 20-24% avec des sous-unités de nAChR telles que la sous-unité $\alpha 4$, $\alpha 1$ et $\beta 2$ d'humain (Brejc *et al.*, 2001). Parmi les AChBPs, les Ls-AChBP et les Ac-AChBP sont utilisées comme modèles pour étudier les interactions des récepteurs nicotiques avec leurs ligands. Ainsi, on a pu montrer que le site de liaison principal de l'ACh est formé par les résidus aromatiques provenant des boucles A (Tyr), B (Trp), C (deux Tyr) et D (Trp) (Brejc *et al.*, 2001). Chez les Ls-AChBP, ces résidus correspondent aux acides aminés Tyr89, Trp143, Tyr185, Tyr192 et Trp53 qui forment une « boîte aromatique » permettant de caractériser les interactions ligands-protéines. Cependant, en fonction du modèle considéré, les acides aminés impliqués dans la liaison peuvent varier (Brejc *et al.*, 2001, Olsen *et al.*, 2014) (**Figure 7**). Pour de nombreux agonistes et antagonistes les sites de liaison ont été identifiés, c'est le cas de la NIC (Celie *et al.*, 2004) (**Figure 7**), la carbamylcholine (Celie *et al.*, 2004), la clothianidine (CLO) (Ihara *et al.*, 2008), l'imidaclopride (IMI) (Ihara *et al.*, 2008, Hibbs *et al.*, 2009), le thiaclopride (THC) (Ihara *et al.*, 2014) et la méthyllycaconitine (MLA) (Hansen *et al.*, 2005).

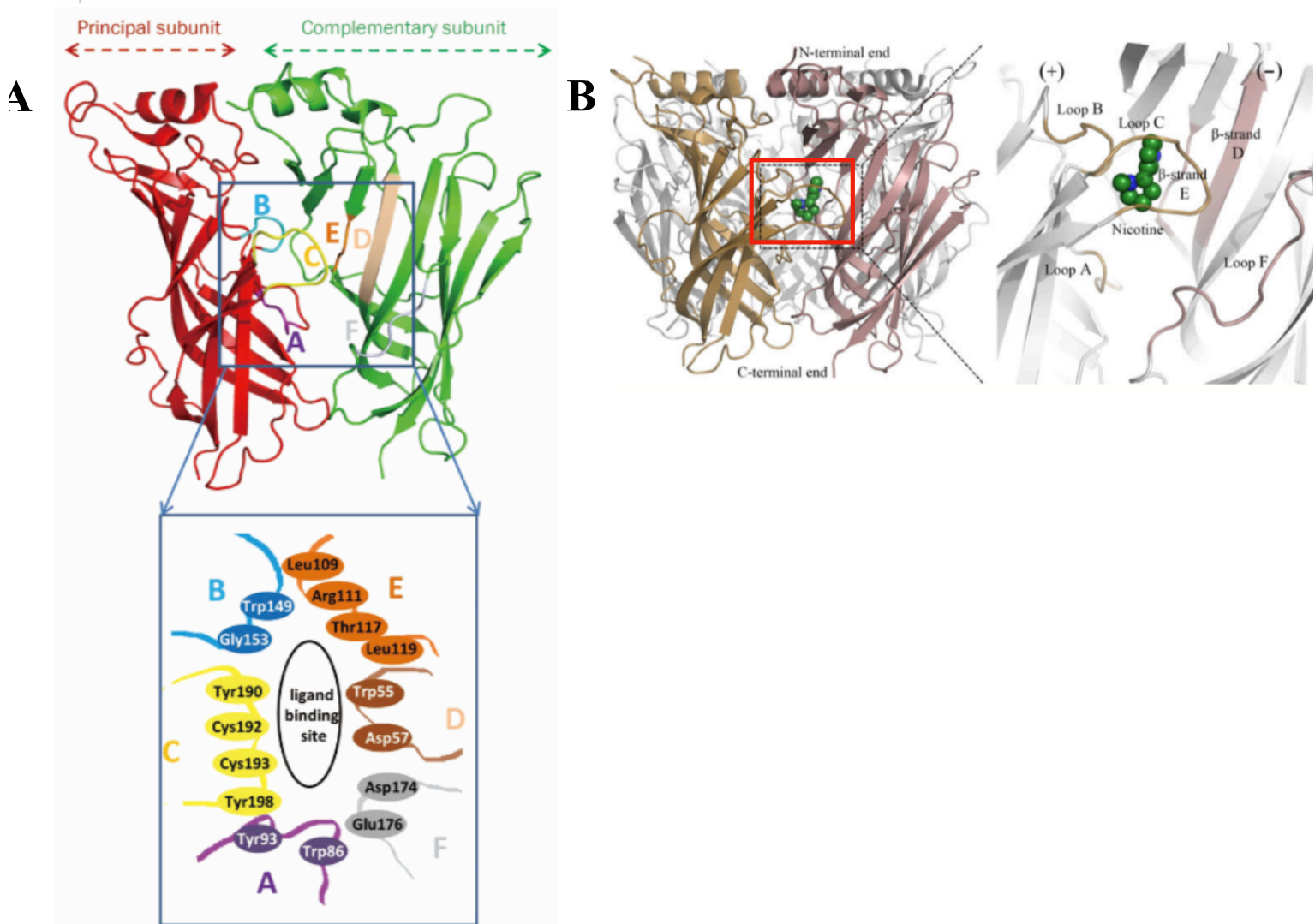


Figure 7 : Les différentes structure impliquées dans les sites de liaison. (A) Vue rapprochée d'un site de liaison d'une AChBP montrant les acides aminés dans les boucles qui participent à la formation du site. Les boucles A, B et C sont fournies par la sous-unité principale et les boucles D, E et F par la sous-unité complémentaire. (B) Structure pentamérique d'une Ls-AChBPs. La NIC est représentée dans la représentation par des sphères vertes. Le site de liaison de la NIC est composé des boucles A, B, C et F ainsi que des brins β de la boucle D et E (modifié d'après Shamsavar *et al.*, 2016 et Wu *et al.*, 2015).

3.4. Dynamique structurale des nAChR

La liaison d'un ligand sur le récepteur entraîne un changement conformationnel (fermé-ouvert-désensibilisé) permettant ainsi le passage des ions à travers la membrane. La résolution atomique et l'étude de la dynamique moléculaire du récepteur de la torpille et des AChBPs ont permis d'observer l'activité dynamique du récepteur lors de la fixation d'un ligand. A l'état de repos le récepteur est en conformation « fermé ». Ainsi, lorsqu'un agoniste se lie au site de liaison, la boucle C du récepteur vient plafonner l'entrée de la cavité du site de liaison, piégeant alors l'agoniste (Sine *et al.*, 2006). Ce mouvement de la boucle C provoque des modifications conformationnelles des brins β ainsi que des segments TM2 et TM3, aboutissant à l'ouverture du pore : conformation ouverte (Brejc *et al.*, 2001 ; Chakrapani *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2015). L'application prolongée des agonistes aboutit à un état désensibilisé du récepteur durant lequel il n'est plus conducteur (Gay *et al.*, 2007). L'observation en microscopie électronique du récepteur de la torpille, avec et sans liaison de l'ACh, révèle une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre de 15° des hélices présentes dans le segment TM2 (Unwin, 1995 et Unwin *et al.*, 2002). Chez le récepteur hybride 5-HT₃R-AChBP, il a été montré l'importance des brins β ainsi que des boucles présentes dans une sous-unité composant le récepteur. En effet, les brins β ainsi que les boucles sont impliqués dans la propagation de la dynamique structurale (**Figure 8**).

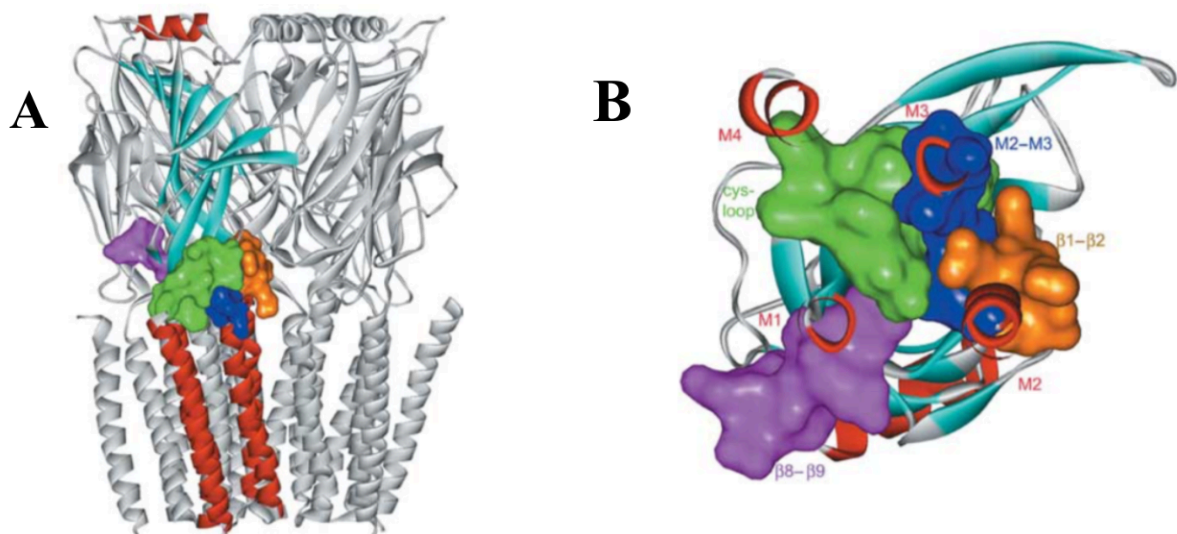


Figure 8 : Modèle structural d'une sous-unité composant le répéteur chimère 5-HT₃R-AChBP. Les hélices α sont en rouge et les feuillets β en cyan. Les régions impliquées dans la propagation de la dynamique structurale sont colorées : boucle L2 (orange), L7 ou boucle cystéine (vert), L9 (magenta) et M2-M3 (bleu). (B) Vue rapprochée de la zone de couplage entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire (modifié d'après Bouzat *et al.*, 2004).

4. Sous-unités qui composent le récepteur et modulation des nAChR

4.1. Présentation des sous-unités composant les nAChR chez les vertébrés

Actuellement, chez les vertébrés, 17 sous-unités ont été caractérisées ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ et ϵ) dont 5 au niveau musculaire ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ et ϵ) et 12 au niveau neuronal ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) (**Figure 9**). Le nAChR musculaire est un récepteur hétéromérique constitué de 2 sous-unités α et d'une sous-unité β , δ et γ (Albuquerque *et al.*, 2009). Elles sont disposées dans l'ordre $\alpha\gamma\alpha\beta\delta$ (**Figure 10**) (Karlin, 2002). La composition du récepteur musculaire est différente en fonction du stade de développement. Par exemple la sous-unité γ qui est présente dans le muscle foetal de veau est remplacée par la sous-unité ϵ chez l'adulte, formant ainsi le récepteur ($\alpha 1$) $\beta 1\gamma\epsilon$ (Reynolds et Karlin, 1978 ; Mishina *et al.*, 1986;).

Le second groupe de nAChR présent chez les vertébrés rassemble les récepteurs neuronaux. Ils forment un ensemble de récepteurs diversifiés avec des compositions distinctes (Millar, 2009). En effet, à la différence des autres sous-unités, les sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$ sont capables de former un récepteur fonctionnel homomérique (Couturier *et al.*, 1990 ; Elgoyhen *et al.*, 1994) bien que les sous-unités $\alpha 7$ et $\alpha 9$ peuvent également s'assembler avec d'autres sous-unités et former un récepteur hétéromérique (Elgoyhen *et al.*, 2001 ; Azam *et al.*, 2003).

Ces sous-unités permettent de produire un nombre important de récepteurs qui sont présents dans différentes structures, comme le système nerveux, la peau, le pancréas, le poumon... Les propriétés des différents sous-types de nAChR leur confèrent diverses fonctions dans la régulation des processus physiologiques (Albuquerque *et al.*, 2009). Par exemple, le récepteur $\alpha 4\beta 2$ serait impliqué dans l'épilepsie autosomique dominante au niveau du lobe frontal. En effet, la mutation de la sérine en position 284 en une leucine dans le gène codant pour la sous-unité $\alpha 4$ entraîne une désensibilisation rapide du récepteur et une modification de la perméabilité aux ions Na^+ . Cette modification des propriétés électrophysiologiques du récepteur serait en partie responsable de l'épilepsie (Matsushima *et al.*, 2002).

4.2. Etude pharmacologique des nAChR des vertébrés

Les récepteurs nicotiques peuvent être pharmacologiquement classés en deux groupes : les récepteurs sensibles à l' α -Bgt et les récepteurs insensibles à l' α -Bgt. Couturier et ses collaborateurs ont montré que les récepteurs sensibles à l' α -Bgt étaient des récepteurs

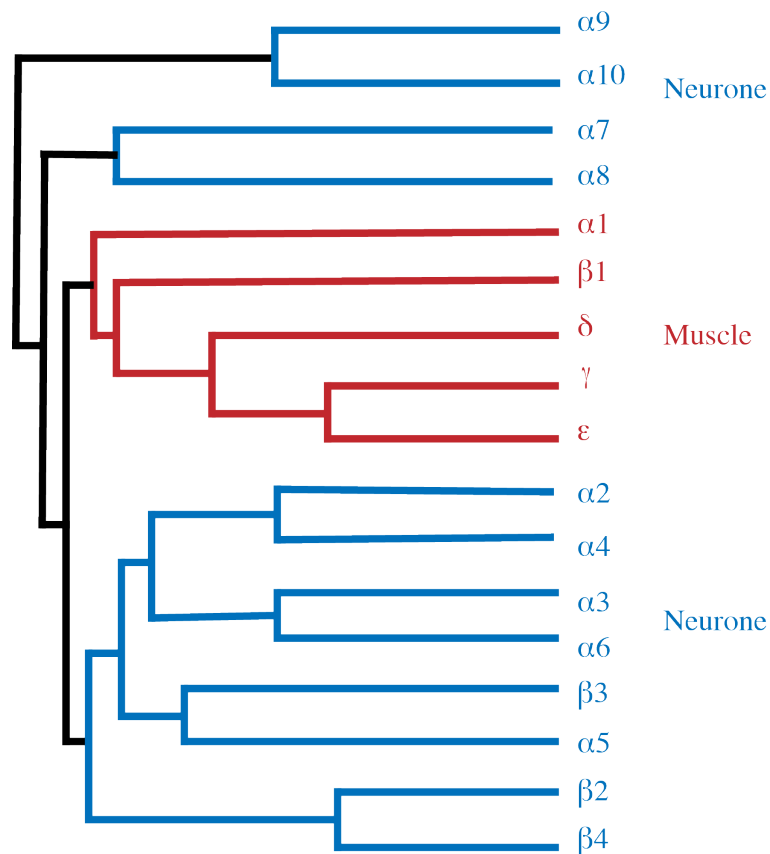


Figure 9 : Relation phylogénétique entre les différentes sous-unités de vertébrés. Les sous-unités peuvent former des récepteurs neuronaux (en bleu) ou des récepteurs de type musculaire (en rouge) (modifié d'après Le Novère *et al.*, 2002)

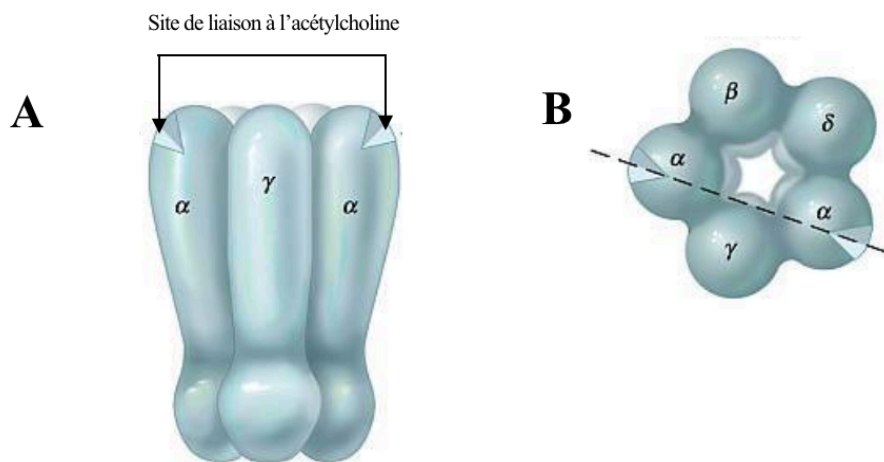


Figure 10 : Les sites de liaisons à l'ACh sur le récepteur musculaire. (A) Représentation d'un récepteur à l'ACh de type musculaire. (B) Vue du dessus.

homomériques, tels que les récepteurs neuronaux formés par les sous-unités $\alpha 7$ et $\alpha 8$, ainsi que le récepteur $\alpha 9$, spécifiquement identifié dans la cochlée (Couturier *et al.*, 1990 ; Elgoyhen *et al.*, 1994). Néanmoins, le récepteur musculaire $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ identifié dans la fibre musculaire embryonnaire ainsi que le récepteur hétéromérique $\alpha 9\alpha 10$, identifié dans les cellules de cochlée, sont également sensibles à l' α -Bgt (Elgoyhen *et al.*, 2001 ; Le Norvère *et al.*, 2002). Bien que les récepteurs $\alpha 9$ et $\alpha 9\alpha 10$ soient tous les deux sensibles à l' α -Bgt, ils possèdent des propriétés pharmacologiques distinctes. Le récepteur $\alpha 9\alpha 10$ est 100 à 1000 fois plus sensible à l'ACh que le récepteur $\alpha 9$ (Sgard *et al.*, 2002). De plus, le calcium extracellulaire inhibe le récepteur homomérique $\alpha 9$ et potentialise le récepteur hétéromérique $\alpha 9\alpha 10$ (Katz *et al.*, 2000 ; Elgoyhen *et al.*, 2001). Finalement, bien que l' α -Bgt ait permis la caractérisation des récepteurs homomériques, il s'avère que des récepteurs hétéromériques peuvent être bloqués par cette toxine.

De manière générale, les récepteurs insensibles à l' α -Bgt sont des récepteurs de type hétéromérique composés des sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 6$ et $\beta 2$ - $\beta 4$ et qui possèdent une forte affinité pour la NIC (Gotti *et al.*, 2009 ; Changeux, 2010). Dans les récepteurs hétéromériques, les sous-unités qui ne participent pas directement à la formation du site de liaison sont appelées sous-unités accessoires. Actuellement, seules les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 3$ sont capables d'occuper la position accessoire dans les récepteurs fonctionnels et de modifier les propriétés pharmacologiques et biophysiques, ainsi que la sensibilité aux modulateurs allostériques du récepteur (Kuryatov *et al.*, 2008). Par exemple, les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 3$ sont capables de s'assembler avec les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ qui forment le récepteur nicotinique $\alpha 4\beta 2$, pour constituer le récepteur $\alpha 4\beta 2\beta 3$ ou $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ bien que la présence de ce dernier n'ait jamais été identifiée dans le cerveau. Les deux récepteurs ont un meilleur taux d'expression dans les cellules HEK (human embryonic kidney) humaines et le récepteur $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ est plus sensible à la galanthamine. Cette sensibilité semble être associée à la présence de la sous-unité $\alpha 5$ (Kuryatov *et al.*, 2008). La stœchiométrie peut également moduler les propriétés pharmacologiques du récepteur. Ainsi, les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ peuvent exister sous deux configurations stœchiométriques, le récepteur $(\alpha 4)_2(\beta 2)_2$ et le récepteur $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$. Ce dernier, est moins sensible à l'ACh et plus perméable au calcium (Zwart et Vijverberg, 1998 ; Nelson *et al.*, 2003 ; Moroni *et al.*, 2006).

4.3. Modulation allostérique des nAChR neuronaux

Le terme « modulateur allostérique » décrit tout ligand qui altère les propriétés fonctionnelles du récepteur nicotinique en interagissant avec un site distinct, nommé site allostérique, du site conventionnel de liaison à l'ACh (Chatzidaki et Millar, 2015). Les modulateurs allostériques peuvent être classés en quatre groupes, en fonction de leur site de liaison et de leur effet modulateur :

Les modulateurs allostériques positifs (« Positive allosteric modulators », PAM) permettent d'augmenter l'amplitude du courant en présence d'un agoniste orthostérique. Un PAM augmente l'efficacité de l'agoniste en réduisant la barrière énergétique entre les états « ouvert » et « fermé » ou en augmentant la barrière énergétique entre les états « ouvert » et « désensibilisé ». Différentes molécules comme l'ivermectine peuvent agir comme PAM, en se liant à un site transmembranaire inter-sous-unités et en bloquant la transition du canal de l'état « ouvert » vers l'état « fermé » (Cecchini et Changeux, 2015). Les PAMs sont classés en 2 catégories :

- Les PAM de type I : ils permettent d'augmenter l'amplitude du courant mais n'influencent pas la désensibilisation du récepteur. (Chatzidaki *et al.*, 2015).
- Les PAM de type II : ils amplifient la réponse obtenue par l'agoniste et réduisent la vitesse de désensibilisation (Grønlien *et al.*, 2007 ; Chatzidaki *et al.*, 2015)

De nombreux travaux concernant les modulateurs allostériques ont été réalisés sur les récepteurs $\alpha 7$ d'humain, de rat et de poussin (**Tableau 1**). La plupart des PAMs ont un faible effet sur la désensibilisation et une faible sélectivité pour le récepteur $\alpha 7$. Cependant, certaines molécules comme le N-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea (PNU-120596), le 3a,4,5,9b-Tetrahydro-4-(1-naphthalenyl)-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-sulfonamide (TQS) et le 4-[5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-(1-oxopropyl)-1H-pyrrol-1-yl]benzenesulfonamide (A-867744) présentent une forte sélectivité pour ce récepteur et provoquent une forte désensibilisation du récepteur en présence d'un agoniste orthostérique (Hurst *et al.*, 2005 ; Grønlien *et al.*, 2007 ; Faghieh *et al.*, 2009 ; Malysz *et al.*, 2009 ; Chatzidaki *et al.*, 2015). De même, quelques ligands allostériques, comme le 4-(4-bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-sulfonamide (4BP-TQS), sont capables d'induire

l'activation des récepteurs en absence de l'ACh (Grønlien *et al.*, 2010; Gill *et al.*, 2011) en se liant à un site transmembranaire allostérique (Gill *et al.*, 2011).

Les modulateurs allostériques négatifs (« Negative allosteric modulators », NAM) réduisent la durée moyenne du temps d'ouverture du canal sans modifier la liaison de l'agoniste au récepteur (Arias *et al.*, 1998a, 1998b). Les NAM sont souvent qualifiés d'« antagonistes non compétitifs », en effet ces termes sont utilisés de façon interchangeable (Chatzidaki *et al.*, 2015). Il existe deux catégories d'antagonistes en fonction du site de liaison de la molécule sur le récepteur. Les antagonistes qui se fixent de manière compétitive au site de liaison à l'ACh sont dits compétitifs. Les antagonistes qui se lient à un site autre que celui de l'ACh sont quant à eux des antagonistes non compétitifs. Comme pour les PAM, de nombreux NAM ont été identifiés et classés en deux catégories :

- Les antagonistes qui se lient au canal et bloquent le flux des ions
- Les antagonistes qui modulent les propriétés du récepteur comme la désensibilisation et le retour à l'équilibre (Chatzidaki et Millar, 2015).

Les modulateurs allostériques silencieux (« Silent allosteric modulator », SAM) agissent sur un site allostérique, mais n'exercent aucun effet modulateur sur les réponses induites par un ligand (Schann *et al.*, 2010 ; Noblin *et al.*, 2012 ; Burford *et al.*, 2013). Les SAM ne potentialisent pas ou n'inhibent pas les réponses par les agonistes, mais ils peuvent influencer la modulation allostérique en bloquant l'effet d'autres composés allostériques. Pour cela, ils se lient à un site allostérique et bloquent la liaison des PAM et des NAM (Gill-Thind *et al.*, 2015).

Il faut noter que de nombreux composés sont capables d'agir comme des modulateurs allostériques. En effet des études récentes ont montré que des changements mineurs dans la structure chimique d'une molécule, tels que la substitution d'un méthyle, pouvaient déterminer sa capacité à agir sur les nAChR comme PAM, NAM ou SAM (Gill-Thind *et al.*, 2015) (**Tableau 1**).

Molécule	Modulation	Récepteur	Référence
PNU-120596	PAM type II	$\alpha 7$ (humain)	(Hurst <i>et al.</i> , 2005)
5-hydroxyindole	PAM type I	$\alpha 7$ (humain)	(Zwart <i>et al.</i> , 2002)
Ivermectine	PAM	$\alpha 7$ (poussin et humain)	(Krause <i>et al.</i> , 1998)
CCMI (compound 6)	PAM type I	$\alpha 7$ (humain)	(Ng <i>et al.</i> , 2007)
TQS	PAM type II	$\alpha 7$ (humain)	(Gronlien <i>et al.</i> , 2007)
Génistéine	PAM type I	$\alpha 7$	(Gronlien <i>et al.</i> , 2007)
A-867744	PAM type II	$\alpha 7$ (huamin, rat)	(Malysz <i>et al.</i> , 2009) (Faghieh <i>et al.</i> , 2009)
NS-1738	PAM type I	$\alpha 7$ (humain)	(Timmermann <i>et al.</i> , 2007)
LY-2087101 LY- 2087133 LY-1078733 ([2-(4-fluoro-phenylamino)-4-methyl-thiazol-5-yl]-thiophen-3-yl-methanone)	PAM type I	$\alpha 7$ (humain) $\alpha 4\beta 4$ (humain) $\alpha 2\beta 4$ (humain) $\alpha 4\beta 2$ (humain)	(Broad <i>et al.</i> , 2006)
17b-estradiol (stéroïdes)	PAM ¹	$\alpha 4\beta 2$ (humain) $\alpha 4\beta 4$ (humain)	(Curtis <i>et al.</i> , 2002 ; Jin <i>et Steinbach</i> , 2011)
Galantamine	PAM ¹	$\alpha 4\beta 2$ (humain) $\alpha 6\beta 4$ (humain) $\alpha 3\beta 4$ (humain)	(Samochocki, 2003)
Levamisole	PAM ¹	$\alpha 3\beta 4$ (humain) $\alpha 3\beta 2$ (humain)	(Levandoski <i>et al.</i> , 2003)
Morantel	PAM ¹	$\alpha 3\beta 4$ (rat) $\alpha 3\beta 2$ (rat)	(Wu <i>et al.</i> , 2008)
Mecamylamine	NAM	$\alpha 3\beta 4$ (humain) $\alpha 3\beta 2$ (humain) $\alpha 4\beta 2$ (humain) $\alpha 7$ (humain)	(Papke <i>et al.</i> , 2001)
Menthol	NAM	$\alpha 4\beta 2$ (humain) $\alpha 7$ (humain) $\alpha 3\beta 4$ (humain)	(Hans <i>et al.</i> , 2012) (Ashoor <i>et al.</i> , 2013) (Ton <i>et al.</i> , 2015)
Clozapine	NAM	$\alpha 7$ (poulet)	(Singhal <i>et al.</i> , 2007)
Zinc	NAM	$\alpha 7$ (poulet)	(Palma <i>et al.</i> , 1998)
progesterone	NAM	$\alpha 4$ (rat) $\alpha 3\beta 4$ (humain)	(Arias, 1998) (Valera <i>et al.</i> , 1992; Pereira <i>et al.</i> , 2002)
2,3,5,6MP-TQS 2,4,6MP-TQS	SAM	$\alpha 7$ (humain)	(Gill-Thind <i>et al.</i> , 2015)

¹: le type de PAM n'est pas spécifié

Tableau 1 : Liste non exhaustive des molécules agissant comme modulateurs allostériques.

B. Les récepteurs de type nicotinique chez les insectes

1. Diversité des sous-unités composant les nAChR

A l'inverse des mammifères, les insectes possèdent des nAChR exclusivement au niveau du système nerveux central (Vo *et al.*, 2010). En effet, leur transmission synaptique à la jonction neuromusculaire est glutaminergique (Usherwood *et al.*, 1994 ; Millar, 1999 ; Vo *et al.*, 2010). Grâce aux données de séquence des différentes sous-unités des récepteurs nicotiniques de vertébrés, différents gènes orthologues ont pu être identifiés chez les insectes.

Les premières études réalisées sur la mouche *Drosophila melanogaster* ont permis d'identifier la première sous-unité α d'insecte, nommée alpha like subunit (ALS), ensuite diverses sous-unités ont été identifiées. Actuellement, 10 sous-unités sont connues, 7 de type α (Dm α 1- Dm α 7) et 3 de type non α (Dm β 1-Dm β 3) (Bossy *et al.*, 1988 ; Sattelle *et al.*, 2005). Les sous-unités des nAChR ont été identifiées chez certains insectes comme les pucerons *Acyrtosiphon pisum* (Dale *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2013) et *Myzus persicae* (Sgard *et al.*, 1998), le moustique *Anopheles gambiae* (Jones *et al.*, 2005), l'abeille domestique *Apis mellifera* (Jones *et al.*, 2006), les papillons *Bombyx mori* (Shao *et al.*, 2007) et *Manduca sexta* (Eastham *et al.*, 1998), et la blatte *Periplaneta americana* (Taillebois et Thany, 2016) (**Tableau 2**). L'analyse phylogénétique indique que toutes les sous-unités orthologues à la sous-unité Dm β 2 sont des sous-unités α , cela suggère un changement fonctionnel du rôle de cette sous-unité chez la drosophile (Jones *et al.*, 2007). D'autres différences phylogénétiques ont été observées entre les différentes espèces. Par exemple, le ver de farine *Tribolium castaneum* possède deux sous-unités au sein du groupe des β 2, la sous-unité Tc α 11 et Tc α 8 alors que leur nomenclature devrait les classer comme des α (Jones et Sattelle, 2007). De même, le puceron *A. pisum* ne possède pas la sous-unité α 5. Cette dernière existe chez d'autres insectes et est décrite comme faisant partie du cluster des α 7 (Dale *et al.*, 2010). Cependant, la sous-unité Apa7 du puceron *A. pisum* présente des duplications en tandem inhabituelles, des exons 6 et 7, qui suggèrent l'existence de phénomènes d'épissage alternatif (Dale *et al.*, 2010). Par conséquent, il a été proposé que les événements de duplication sur la sous-unité Apa7 pourraient représenter les premières étapes de la diversification menant à la génération d'un gène identifié comme α 5 chez les insectes (Dale *et al.*, 2010) (**Figure 11, Tableau 2**).

Le nombre de gènes codant des sous-unités de nAChR est plus petit chez les insectes que

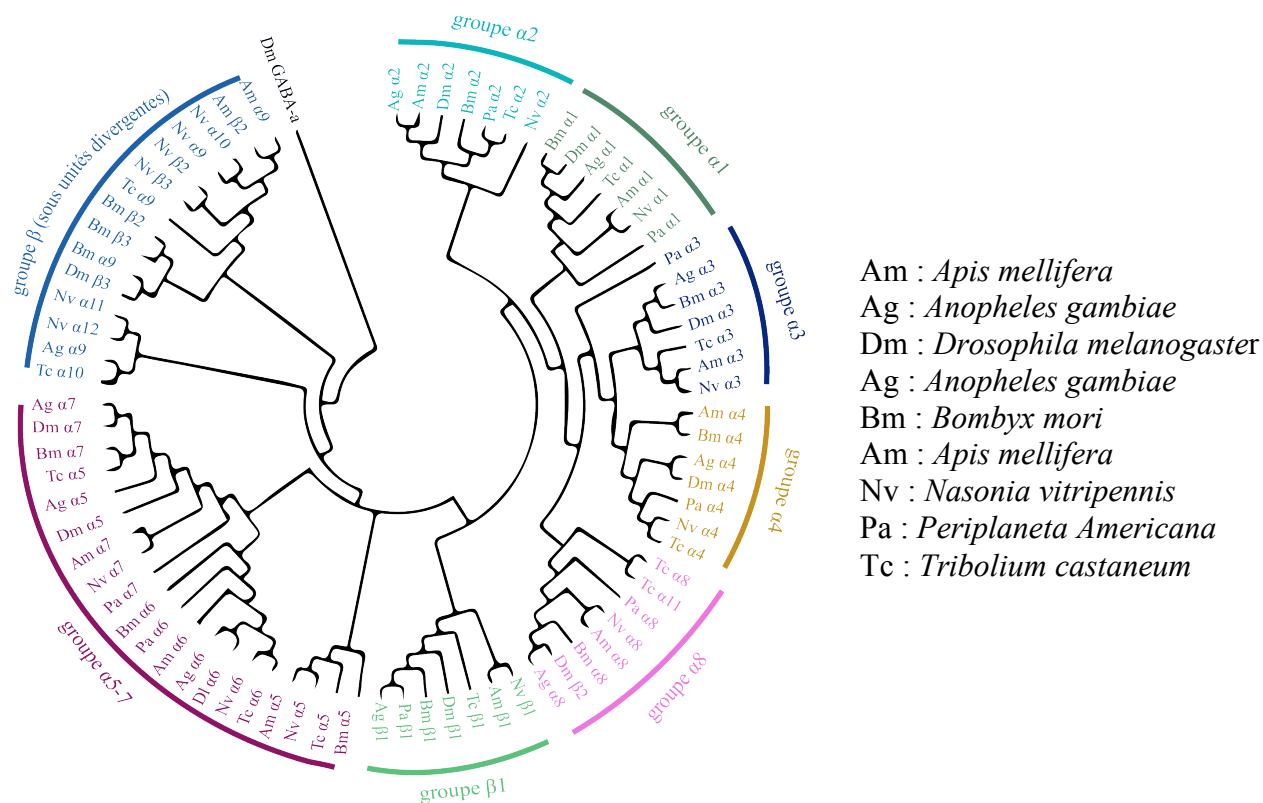


Figure 11 : Arbre phylogénétique des sous-unités de récepteurs nicotiques chez différentes espèces d'insectes (modifié d'après Taillebois et Thany 2016).

Espèce	Groupe $\alpha 1$	Groupe $\alpha 2$	Groupe $\alpha 3$	Groupe $\alpha 4$	Groupe $\alpha 5-7$	Groupe $\beta 1$	Groupe $\alpha 8$	Sous unité divergentes	Ref
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apa1	Apa2	Apa3	Apa4	Apa6 Apa7	Ap β 1	Apa8	Apa9 Apa10 Ap β 2	Dale <i>et al.</i> , 2010
<i>Anopheles gambiae</i>	Ag α 1	Ag α 2	Ag α 3	Ag α 4	Ag α 5 Ag α 6 Ag α 7	Ag β 1	Ag α 8	Ag α 9	Jones <i>et al.</i> , 2005 Holt <i>et al.</i> , 2002
<i>Apis mellifera</i>	Ama1	Ama2	Ama3	Ama4	Ama6 Ama7	Am β 1	Ama8	Am β 2 Ama9	Jones <i>et al.</i> , 2006
<i>Bombyx mori</i>	Bma1	Bma2	Bma3	Bma4	Bma5 Bma6 Bma7	Bm β 1	Bma8	Bma9 Bm β 2 Bm β 3	Xia <i>et al.</i> , 2004 Shao <i>et al.</i> , 2007
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dma1	Dma2	Dma3	Dma4	Dma5 Dma6 Dma7	Dm β 1	Dm β 2	Dm β 3	Adam <i>et al.</i> , 2000 Sattelle <i>et al.</i> , 2005
<i>Locusta migratoria</i>	Lma1	Lma2	Lma3	Lma4	Lma5 Lma6 Lma7	Lm β 1	Lma8	Lma9 Lm β 2	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Nasonia vitripennis</i>	Nva1	Nva2	Nva3	Nva4	Nva5 Nva6 Nva7	Nv β 1	Nva8	Nva9 Nva10 Nva11 Nva12 Nv β 2 Nv β 3 Nv β 4	Werren <i>et al.</i> , 2010 Jones <i>et al.</i> , 2010
<i>Periplaneta americana</i>	Paa1	Paa2	Paa3	Paa4	Paa7 Paa8	Pa β 1	Paa8		Taillebois et Thany 2016
<i>Tribolium castaneum</i>	Tca1	Tca2	Tca3	Tca4	Tca5 Tca6 Tca7	Tc β 1	Tca8 Tca11	Tca9 Tca10	Jones et Sattelle 2007

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des sous-unités identifiées pour chaque espèce d'insecte (modifié d'après Dupuis *et al.*, 2012).

chez les mammifères, cependant, l'existence de phénomènes d'épissage alternatif des exons confère probablement une grande diversité de récepteurs nicotiques chez les insectes (Lansdell *et al.*, 2000 ; Jones *et al.*, 2007).

Les sous-unités de nAChR d'insectes sont classées en fonction de leur homologie de séquence (**Figure 11**) (Jones *et al.*, 2007). L'étude des séquences des nAChR d'insectes a permis d'identifier six groupes monophylétiques qui semblent diverger d'un ancêtre commun distinct de celui des vertébrés. Il s'agit des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 8$ et $\beta 1$. A l'inverse, les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$ sont très proches phylogénétiquement et partagent un ancêtre commun avec les $\alpha 7$ et $\alpha 8$ des vertébrés (Thany *et al.*, 2007). Parmi les sous-unités d'insectes, les sous-unités Dm $\beta 1$, Am $\beta 1$ et Ag $\beta 1$ sont les plus conservées, avec une homologie de 80 %. Cependant des sous-unités dites divergentes, avec moins de 20% d'homologie, ont également été identifiées chez de nombreuses espèces d'insectes telles que *D. melanogaster* (Dm $\beta 3$) (Lansdell et Millar, 2002), *A. gambiae* (Aga9) (Jones *et al.*, 2005), *A. mellifera* (Am $\alpha 9$ et Am $\beta 2$) (Jones *et al.*, 2006), *A. pisum* (Apa9, Apa10 et Ap $\beta 2$) (Jones *et al.*, 2006), *T. castaneum* (Tca9 et Tca10) (**Figure 11, Tableau 2**). La guêpe *Nasonia vitripennis* est celle qui possède le nombre le plus important de sous-unités divergentes (Nva9-12 et Nv $\beta 2$ -4) (Jones *et al.*, 2010). Bien que le rôle des sous-unités divergentes soit méconnu, elles sont caractérisées par une boucle intracellulaire entre les segments TM3 et TM4 de taille inférieure à celle des autres sous-unités (Jones *et al.*, 2010). Les sous-unités divergentes Tca9 et Nva11 présentent la même modification d'acides aminés au niveau de la boucle C. Le motif YxCC, très conservé et présent chez les sous-unités α des autres insectes et des mammifères, est remplacé par le motif FxCC dans les sous-unités Tca9 et Nva11. La présence de ces deux sous-unités dans le récepteur peut modifier les propriétés de liaison du récepteur nicotinique (Jones *et al.*, 2007). En effet il a été montré que la mutation de la tyrosine (Y) en la phénylalanine (F) dans le récepteur $\alpha 7$ de mammifère aboutit à une diminution de l'affinité pour l'ACh (Galzi *et al.*, 1991). En plus de cette substitution, la sous-unité Tca9 présente une délétion du motif GEK qui se situe en amont du segment TM2. Ce motif est impliqué dans la perméabilité et la sélectivité ionique (Jensen *et al.*, 2005). L'absence de ce motif et en particulier de l'acide glutamique (E) peut provoquer une faible perméabilité du récepteur au calcium. L'étude du récepteur $\alpha 7$ de poulet a montré que cette délétion altérerait la perméabilité au calcium mais n'affectait pas le transport du sodium et du potassium (Bertrand *et al.*, 1993).

2. Étude pharmacologique des récepteurs d'insectes

2.1. Etude pharmacologique par des approches d'électrophysiologie

Les études électrophysiologiques permettant la caractérisation des récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes sont en générales réalisées sur des neurones isolés de la blatte *P. americana* (Thany, 2009 ; Salgado, 2016 ; Sun *et al.*, 2017) ou de l'abeille *A. mellifera* (Goldberg *et al.*, 1999 ; Déglise *et al.*, 2002 ; Dupuis *et al.*, 2011). Comme pour les vertébrés, les nAChR d'insectes peuvent être classés en deux catégories selon leur sensibilité pour l' α -Bgt. Parmi les récepteurs sensibles à l' α -Bgt, deux sous-types ont pu être isolés sur les neurones situés sur les ganglions thoraciques de la blatte *P. americana*. Le premier sous-type est appelé nAChRD pour « Desensitized nicotinic acetylcholine receptor ». Le sous-type nAChD se désensibilise en présence continue d'agonistes et possède une forte liaison pour les agonistes à l'état « désensibilisé ». A l'inverse, le sous-type nAChN (pour « non desensitized nicotinic acetylcholine receptor ») ne se désensibilise pas, il est continuellement activé par les agonistes. De plus, contrairement aux nAChRDs, les récepteurs nAChRNs ont une affinité beaucoup plus élevée pour l' α -Bgt et la méthyllycaconitine (MLA). La différence pharmacologique des deux récepteurs a également été observée ultérieurement lors de l'application d'autres composés tels que des antagonistes non compétitifs ou bien des néonicotinoïdes (Salgado, 2016). Par exemple, il est courant d'utiliser l'IMI pour bloquer le sous-type nAChD. L'étude des IC₅₀ (concentration qui inhibe 50% des récepteurs) révèle que les nAChD sont nettement plus sensibles aux insecticides néonicotinoïdes (Salgado, 2016).

L'étude des récepteurs sensibles à l' α -Bgt a été réalisée sur les cellules de Kenyon des corps pédonculés de l'abeille *A. mellifera*. Goldberg et ses collaborateurs ont montré que 80% du courant nicotinique était bloqué irréversiblement par l' α -Bgt (Goldberg *et al.*, 1999). Par la suite l'application de différents agonistes et antagonistes a permis d'affiner l'étude des caractéristiques pharmacologiques des nAChR d'*A. mellifera*. Ainsi, il a été montré que les cellules de Kenyon d'*A. mellifera* aux stades adultes, étaient sensibles à de fortes concentrations d'antagonistes telles que la dihydroxy- β -érythroïdine (DHE), la MLA et l' α -Bgt. Cependant, l'inhibition des courants nicotiniques générés par ces molécules est dose-dépendante et en partie réversible, à l'exception de l' α -Bgt qui induit une inhibition totale et irréversible (Dupuis *et al.*, 2011). Les études électrophysiologiques sur des neurones issus d'abeille au stade pupa

met en évidence un profil pharmacologique différent. La NIC agit sur les cellules de Kenyon d'abeilles au stade pupe comme agoniste partiel alors qu'elle est un agoniste plein pour les cellules au stade adulte. De plus, la DHE et la MLA, qui ont une inhibition réversible, sont de très bons antagonistes des récepteurs nicotiniques exprimés sur ces neurones. En effet, ils présentent une efficacité de $5 \cdot 10^6$ fois (DHE) et $2 \cdot 10^3$ fois (MLA) supérieure (Wüstenberg et Grünwald, 2004 ; Dupuis *et al.*, 2011). Des études électrophysiologiques ont également été réalisées sur des neurones isolés issus des lobes antennaires de l'abeille *A. mellifera*. Dans ce cas, la NIC agit comme agoniste partiel, et les antagonistes MLA, DHE et α -Bgt inhibent complètement la réponse induite par l'ACh. Cependant, comme au niveau des cellules de Kenyon, l'inhibition est réversible (Barbara *et al.*, 2008).

Les études réalisées chez l'abeille révèlent l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs avec des propriétés différentes en fonction de leur localisation et du stade de développement de l'insecte. En effet, contrairement à d'autres insectes, comme la blatte *P. americana*, la présence de nAChR résistants à l' α -Bgt n'est pas clairement montrée (Gauthier *et al.*, 2006). Ainsi, chez la blatte, deux types de récepteurs insensibles à l' α -Bgt ont été caractérisés au niveau des neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) du sixième ganglion abdominal (Ganglion terminal de la chaîne nerveuse). Ils se différencient par leur perméabilité ionique et leur sensibilité à différents antagonistes nicotiniques. En faisant varier le potentiel imposé et les antagonistes appliqués, il est possible d'identifier les deux sous-types de récepteur. En effet, l'application de NIC au niveau des neurones DUM induit une courbe courant-potentiel en cloche : de -100 mV à -50 mV, la première phase de cette courbe correspond au sous-type nAChR1 qui est bloqué par la d-tubocurarine et de -50 mV à +20 mV, la deuxième phase correspond au sous-type nAChR2 qui est bloqué par la mecamlamine et à l' α -conotoxine ImI (Courjaret et Lapied, 2001) (**Figure 12**).

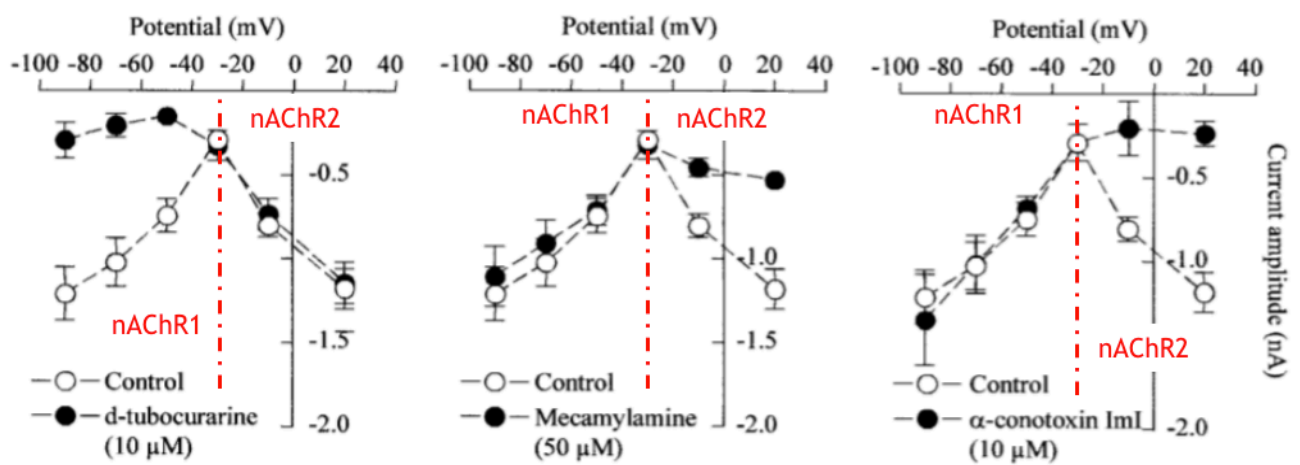


Figure 12 : Courbe I/V induit par l'application de NIC 10mM (\circ). Le potentiel imposé varie de -90 mV à -30 mV. Une distinction des deux sous types est réalisée lorsque le potentiel est de -50mV. (A) l'application de d-tubocurarine (\bullet) induit une diminution du courant nicotinique entre -90mV et -50mV. Les nAChR1 sont donc inhibés par ce composé. (B) L'application de MCA (\bullet) n'affecte pas les nAChR1 mais inhibe les nAChR2. (C) Comme pour la mécamylamine, α -conotoxine ImI (\bullet) induit une diminution du courant des récepteurs nAChR2 (modifié d'après Courjaret et Lapied, 2001).

2.2. Caractérisation des sites de liaison des nAChR d'insectes par des tests de liaison par affinité

Les études de liaison par affinité ont permis d'identifier le nombre de sites de liaison potentiels entre les récepteurs nicotiniques natifs d'insectes et leurs ligands. Particulièrement, l'utilisation de [¹²⁵I]- α -Bgt a permis de mettre en évidence des sites de liaison à l' α -Bgt. Chez les pucerons *Myzus persicae* et *Acyrtosiphon pisum* deux sites de liaison à l' α -Bgt ont été identifiés (Lind, 1999 ; Taillebois *et al.*, 2014) alors qu'un seul site est présent chez *Manduca sexta*, *Apis mellifera* et *Locusta migratoria* (Eastham *et al.*, 1998 ; Tomizawa *et al.*, 2005). Le nombre de sites de liaison ainsi que l'affinité de ces sites pour l' α -Bgt diffèrent donc selon les espèces. Des études du même type ont été réalisées en utilisant des sondes tritiées de différents néonicotinoïdes, comme l'IMI ([³H]-IMI). De même, les études ont montré que les hyménoptères, tels que *M. persicae* et *N. lugens* possèdent deux sites de liaisons à l'IMI alors que les diptères et les lépidoptères tels que *M. domestica* et *M. sexta* possèdent seulement un site de liaison (Kayser *et al.*, 2016 ; Lind 1998 ; Jones *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2000). Ainsi un site de haute affinité et un site de basse affinité pour l'IMI ont été identifiés chez *L. migratoria*, *N. lugens*, *A. pisum* (Li *et al.*, 2010 ; Taillebois *et al.*, 2014 ; Bao *et al.*, 2017).

Chez la drosophile *D. melanogaster*, l'utilisation en compétition d'IMI et d' α -Bgt radiomarqués, a montré qu'ils se fixaient sur des sites distincts (Zhang *et al.*, 2004). Une absence de compétition entre ces deux molécules a également été observée chez *M. persicae*, *Aphis craccivora* et *A. pisum* (Wiesner et Kayser, 2000). Cependant, la présence de nAChR sensibles à l' α -Bgt et à l'IMI semble être spécifique du puceron *A. pisum* suggérant la présence de sites de liaison à très haute affinité supplémentaire pour l' α -Bgt (Taillebois *et al.*, 2018, Annexe). Fait intéressant, l'étude réalisée chez *P. americana* montre que les néonicotinoïdes acétamipride (ACE), CLO et thiaméthoxame (TMX) ont une haute affinité pour les sites de liaison à l' α -Bgt (Orr *et al.*, 1997). La CLO et le TMX semblent se lier à la fois aux sites de liaison à faible et à haute affinité pour l' α -Bgt. Les insecticides néonicotinoïdes sont donc capables de se lier aux sites de liaison sensibles à l' α -Bgt (Taillebois *et al.*, 2018).

2.3. Influence de la composition en sous-unité sur les propriétés pharmacologiques

La technique de double micro-électrode en potentiel imposé est fréquemment utilisée afin d'étudier l'influence des sous-unités sur les propriétés pharmacologiques des récepteurs. Bien que cette technique soit très efficace pour l'étude des récepteurs de mammifère, peu de récepteurs nicotiniques fonctionnels ont été obtenus chez les insectes. En effet, l'expression de nAChR d'insecte dans des systèmes d'expression hétérologue est très limitée (Millar, 1999, 2009). La première expression d'un récepteur fonctionnel à partir d'une sous-unité d'insecte a été réalisée chez *L. migratoria*. Les courants obtenus avec la NIC sont de faibles amplitudes, entre 5- 40 nA (Marshall *et al.*, 1990). Par la suite, Sgard et ses collaborateurs ont également exprimé un récepteur fonctionnel à partir des sous-unités Mpa1 et Mpa2 de *M. persicae* (Sgard *et al.*, 1998). Comme pour *L. migratoria* les réponses obtenues pour la NIC étaient de faible amplitude, 40 nA pour le récepteur Mpa1 et 10 nA pour le récepteur Mpa2 (Sgard *et al.*, 1998). Afin de surmonter ce problème d'expression, les sous-unités α d'insectes sont généralement couplées à des sous-unités β de mammifères, formant un récepteur chimère. Ce couplage sous-unité α d'insectes et sous-unité β de mammifères a permis d'étudier certaines combinaisons de récepteurs chez les insectes et leurs propriétés pharmacologiques.

L'expression en système hétérologue de la sous-unité D α 2 de drosophile avec la sous-unité β 2 de rat montre une sensibilité à l'IMI 37 fois plus importante que le récepteur α 4 β 2 de rat (Matsuda *et al.*, 1998), suggérant que cette sous-unité s'assemble certainement avec une autre sous-unité pour former un récepteur hétéromérique fonctionnel chez la drosophile. D'autres récepteurs chimériques ont également été mis en évidence chez la drosophile, comme D α 1 β 2 et D α 3 β 2 qui sont sensibles à l' α -Bgt alors que le récepteur D α 2 β 2 est insensible (Bertrand *et al.*, 1994 ; Lansdell *et al.*, 2000) (**Figure 13**). Il faut noter que des tests d'immunoprécipitation et de chromatographie par affinité pour l' α -Bgt avaient permis d'identifier trois combinaisons potentielles de sous-unités pouvant constituer un récepteur sensible à l' α -Bgt. Ainsi les récepteurs constitués des sous-unités D α 3D β 1, D β 2D β 1 et D α 1D α 2D α 3 seraient sensibles à l' α -Bgt (Chamaon *et al.*, 2000, 2002 ; Schulz *et al.*, 2000). De même, l'expression de la sous-unité D β 3 avec d'autres sous-unités α ou β de drosophile permet la formation de nAChR fonctionnels et insensibles à l' α -Bgt (Lansdell *et al.*, 2002). Chez d'autres insectes comme *C. felis*, *S. gregaria* et *L. cuprina* la sous-unité α 1 confère une sensibilité à l' α -Bgt alors que la sous-unité α 2 attribue une insensibilité au récepteur à l' α -Bgt (Dederer *et al.*, 2011, 2013). Il semblerait donc que les sous-unités α confèrent des propriétés

pharmacologiques bien distinctes. Cependant l'expression de la sous-unité $D\alpha 4$ avec une sous-unité $\beta 2$ permet la formation d'un récepteur sensible à l'épibatidine (EPI) alors que le récepteur composé de la sous-unité $Mp\alpha 4$ y est insensible (Huang *et al.*, 1999, Lansdell *et al.*, 2000). L'influence de la composition en sous-unités sur les propriétés pharmacologiques a également été observée chez le puceron *Myzus Persicae*. La co-expression des sous-unités $Mp\alpha 1$, $Mp\alpha 2$ et $Mp\alpha 3$ avec une $\beta 2$ de mammifère indique que l'IMI agit de manière identique sur les récepteurs formés des sous-unités $Mp\alpha 2$ et $Mp\alpha 3$ alors que le récepteur $Mp\alpha 1\beta 2$ est insensible (Huang *et al.*, 1999).

Des études ont également été réalisées sur des récepteurs natifs de la blatte *Periplaneta americana*, grâce à la technique d'ARN interférent (ARNi). L'objectif était d'identifier la composition en sous-unités des deux sous-types de récepteurs insensibles à l' α -Bgt identifiés sur les neurones DUM, nAChR1 et nAChR2. Sun et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de l'expression des sous-unités $Pam\alpha 3$, $Pam\alpha 8$, $Pam\beta 1$, de la blatte *P. americana*, entraîne une diminution des courants induits par l'IMI et la NIC (Sun *et al.*, 2017). Etant donné que l'IMI n'active que le sous-type nAChR1, ils ont conclu que $Pam\alpha 3$, $Pam\alpha 8$ et $Pam\beta 1$ étaient impliqués dans la composition de nAChR1. En effet, les ARNi dirigés contre $Pam\alpha 1$, $Pam\alpha 2$ et $Pam\beta 1$ induisaient une diminution significative des courant induits par la NIC sur le sous-type nAChR2. Ces résultats confirment que nAChR1 et nAChR2 sont deux populations distinctes avec des propriétés pharmacologiques différentes (Sun *et al.*, 2017). Fait intéressant, chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens*, l'étude des récepteurs natifs a montré que les sous-unités $Nl\alpha 3$, $Nl\alpha 8$ et $Nl\beta 1$ formaient un récepteur distinct de celui formé par les sous-unités $Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$ et $Nl\beta 1$ (Li *et al.*, 2010). Cependant chez *N. lugens* le récepteur composé des sous-unités $Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$ et $Nl\beta 1$ peut être activé par l'IMI qui est un agoniste des récepteurs recombinants formés des sous-unités $Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$ et $r\beta 2$ (sous-unité $\beta 2$ du rat) exprimés dans des ovocytes de xénope. Des études complémentaires montrent que les nAChR composés des sous-unités $Nl\alpha 3$, $Nl\alpha 8$ et $Nl\beta 1$ possèdent des sites de haute affinité pour l'IMI (Liu *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2017).

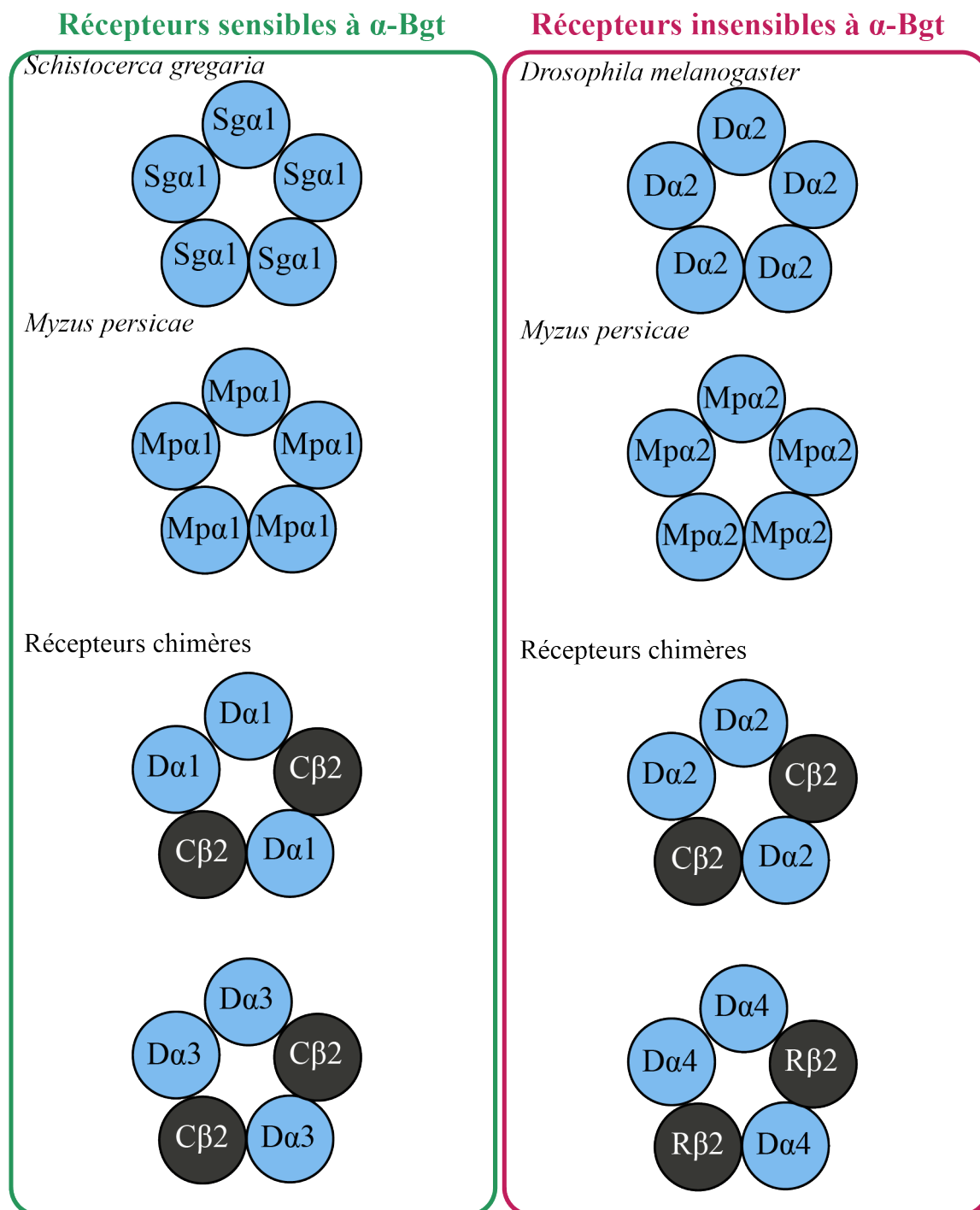


Figure 13 : Exemple de récepteurs exprimés en système hétérologue. Les sous-unités $\alpha 1$ forment des récepteurs homomériques sensibles à l' α -Bgt chez *Schistocerca gregaria* et *Myzus persicae*. A l'inverse les sous-unités $\alpha 2$ forment des récepteurs homomériques insensibles à l' α -Bgt pour *Drosophila melanogaster* et *Myzus persicae*. Les récepteurs hétéromériques sont formés de sous-unités α de drosophile et de sous-unités $\beta 2$ de vertébrés : poulet (C) et rat (R). En fonction de la sous-unité α leur sensibilité à l' α -Bgt varie (modifié d'après Dupuis *et al.*, 2012).

C. Les produits phytosanitaires

1. Historique

L'utilisation des pesticides remonte à la Grèce antique (1 000 ans av J-C), où le soufre et l'arsenic étaient utilisés comme insecticides. Puis durant le moyen-âge, les plantes du genre *Aconit* étaient utilisées comme pesticides en raison de leur toxicité contre les rongeurs. Au 19^{ème} siècle, le développement de la chimie minérale permet la création de nombreux pesticides à base de sel de cuivre (ex : la bouillie bordelaise). Ces pesticides sont alors utilisés comme fongicides pour protéger la vigne et la pomme de terre (**Figure 14**). Au début du 20^{ème} siècle, le sel de mercure ainsi que la nicotine issus du tabac sont utilisés pour le traitement des semences. A partir des années 1930, c'est le début de l'utilisation des pesticides de synthèse issus du développement de la chimie organique et de la recherche sur les armes chimiques durant la 1^{ère} guerre mondiale. Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) est synthétisé par Zeidler en 1874 mais c'est en 1939 que Muller en établit les propriétés insecticides. Il est commercialisé en 1943 ouvrant ainsi la voie à la famille des organochlorés. Le DDT et le DDD (dichlorodiphényldichloroéthane) sont utilisés pour lutter contre les moustiques vecteurs du paludisme et de la malaria. La prise de conscience sur l'utilisation massive des pesticides aura lieu dans les années 60 grâce au livre « le printemps silencieux ». Le DDT qui a prouvé son efficacité sera finalement interdit en France en 1973.

Les recherches réalisées pendant la Seconde Guerre mondiale sur les gaz de combat ont généré la famille des organophosphorés (malathion, parathion, diazinon...). Cependant, ces produits se sont révélés toxiques et beaucoup ont été retirés du marché. Dans les années 70-80, une nouvelle famille d'insecticides apparaît, les pyréthriinoïdes. Ils domineront le marché des insecticides pendant de nombreuses années grâce à leur efficacité avant d'être remplacés par les néonicotinoïdes (**Figure 14**).

Evolution des produits

	INSECTICIDES	FONGICIDES	HERBICIDES
— Avant 1900	Nicotine	Soufre Sels de cuivre	Sulfate de cuivre Sulfate de fer
— 1900-1920	Sels d'arsenic		Acide sulfurique
— 1920-1940			Colorants nitrés
— 1940-1950	Organo-chlorés Organo-phosphorés		Phytohormones
— 1950-1960	Carbamates	Dithiocarbamates Phtalimides	Triazine Carbamate
— 1960-1970		Benzimidazoles Carbamate	Dipyridyles
— 1970-1980	Pyréthroïdes	Triazoles	Amino-phosphonates
— 1980-1990			Sulfonyl urée
— 1990-2000	Néonicotinoïdes Phénylpyrazoles	Phénylpyrroles	

Figure 14 : Evolution des produits phytosanitaires au cours du temps.

2. Les produits phytosanitaires : définition et utilisation

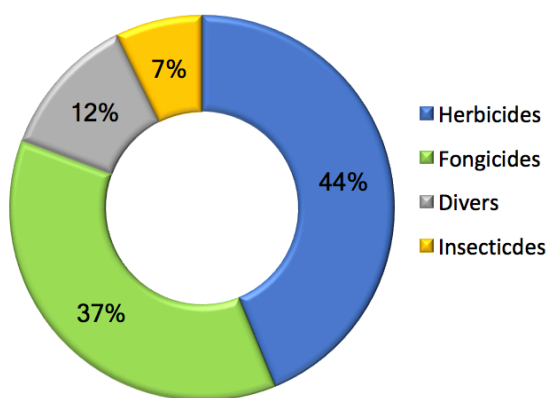
Selon la directive européenne 91/414/CEE, les produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques sont définis comme étant :

« Les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci-après ;*
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ;*
- assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;*
- détruire les végétaux indésirables ;*
- détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux »*

En Europe, en 2017, la majorité des produits phytosanitaires sont utilisés pour la protection des céréales telles que le blé et l'orge (**Figure 15 et 16**). En France, les principales familles de pesticides utilisées pour la protection des cultures sont les fongicides, les herbicides et les insecticides. Parmi ces catégories, les herbicides et les fongicides représentent respectivement 44% et 37% des produits utilisés (**Figure 15 et 16**). Au niveau mondial le chiffre d'affaire des produits phytosanitaires est de l'ordre de 49,9 milliards de dollars (Union des Industries et de la Protection des Plantes (UIPP), rapport 2017). Depuis 1999 la quantité de pesticides vendus en tonnes a diminué de moitié passant de 120 000 tonnes à 60 000 tonnes (**Figure 16**).

Les Solutions de Protection des Cultures en France (2,17 Mrd €)



Répartition du CA en Europe par type de culture en 2016

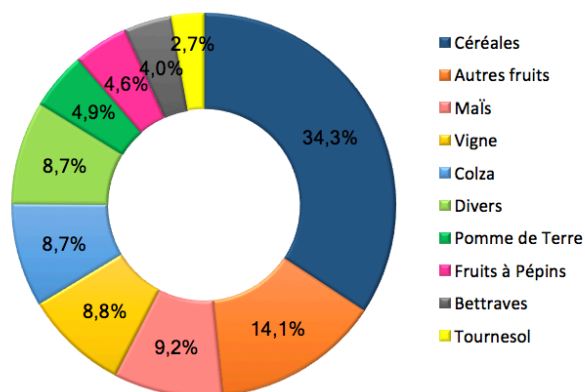


Figure 15 : Diagramme des pesticides utilisés en France et répartition du chiffre d’affaire de chaque type de culture en Europe (A) Présentation des différentes solutions utilisées pour la protection des cultures en 2016. Le chiffre d’affaire des produits phytosanitaires présent ici est de 2,17 milliard de d’euros. (B) Répartition du chiffre d’affaire en Europe par type de culture sur l’année 2016 (rapport d’activité de l’Union des Industries et de la Protection des Plantes (UIPP), 2017).

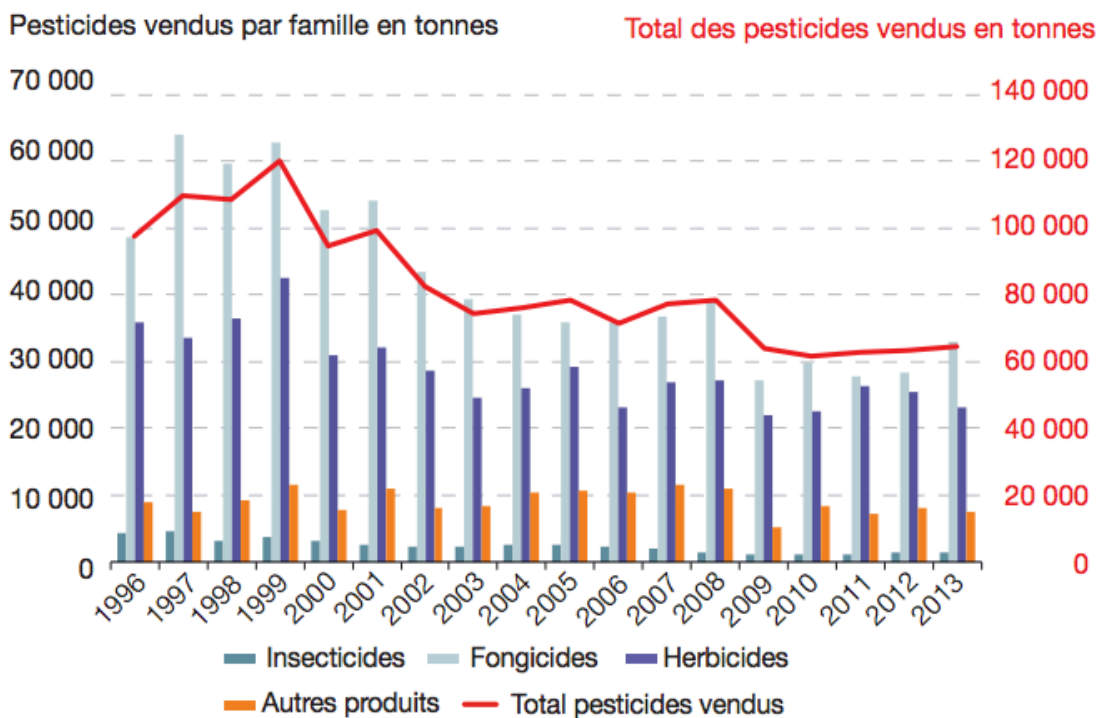


Figure 16 : Evolution des quantités de pesticides vendus en France de 1996 à 2013 (UIPP. Traitements : SOeS, 2016).

3. Les insecticides et leurs modes d'actions

3.1. Les insecticides néonicotinoïdes.

Les insecticides néonicotinoïdes sont des dérivés de la nithiazine, insecticide très efficace mais photo-instable qui va très vite être remplacé. Son groupement nitrométhylène va être remplacé par un groupe nitroimine avec l'ajout d'un groupement 1-chloro-3-pyridyl. Ces modifications ont permis d'obtenir une nouvelle molécule, l'IMI (Shinzo Kagabu et Matsuno, 1997). L'IMI a eu un succès commercial car elle était particulièrement efficace sur les insectes piqueurs-suceurs (Matsuda *et al.*, 2001 ; 2005). Quelques années plus tard, de nombreuses molécules chimiques apparaissent par modification de la pyridine (CLO, dinotéfurane (DIN)), de l'imidazolidine (ACE, nitenpyram, CLO, THC, DIN, TMX) et du groupe nitro (ACE et THC) (Shinzo Kagabu et Matsuno, 1997 ; Matsuda *et al.*, 2001 ; Casida et Durkin, 2013 ; Jeschke *et al.*, 2013) (**Figure 17**). La présence d'un groupement nitro ou cyano contribue directement à leur sélectivité (Matsuda *et al.*, 2001 ; Tomizawa et Casida, 2003 ; 2005). En effet l'IMI, la CLO et le TMX contiennent un groupement nitro, généralement plus toxique que le groupement cyano, contenu dans l'ACE et le THC (Pisa *et al.*, 2014). Le succès des néonicotinoïdes a été suivi par l'émergence de plusieurs autres classes d'insecticides agissant sur les nAChR telles que les spinosynes (spinosade) (Salgado et Sparks, 2005), les sulfoximines (sulfoxaflor) (Sparks, 2013 ; Sparks *et al.*, 2013), les butenolides (flupyradifurone) (Jeschke *et al.*, 2013) et les insecticides méso-ioniques (triflumézopyrim) (Cordova *et al.*, 2016 ; Holyoke *et al.*, 2015).

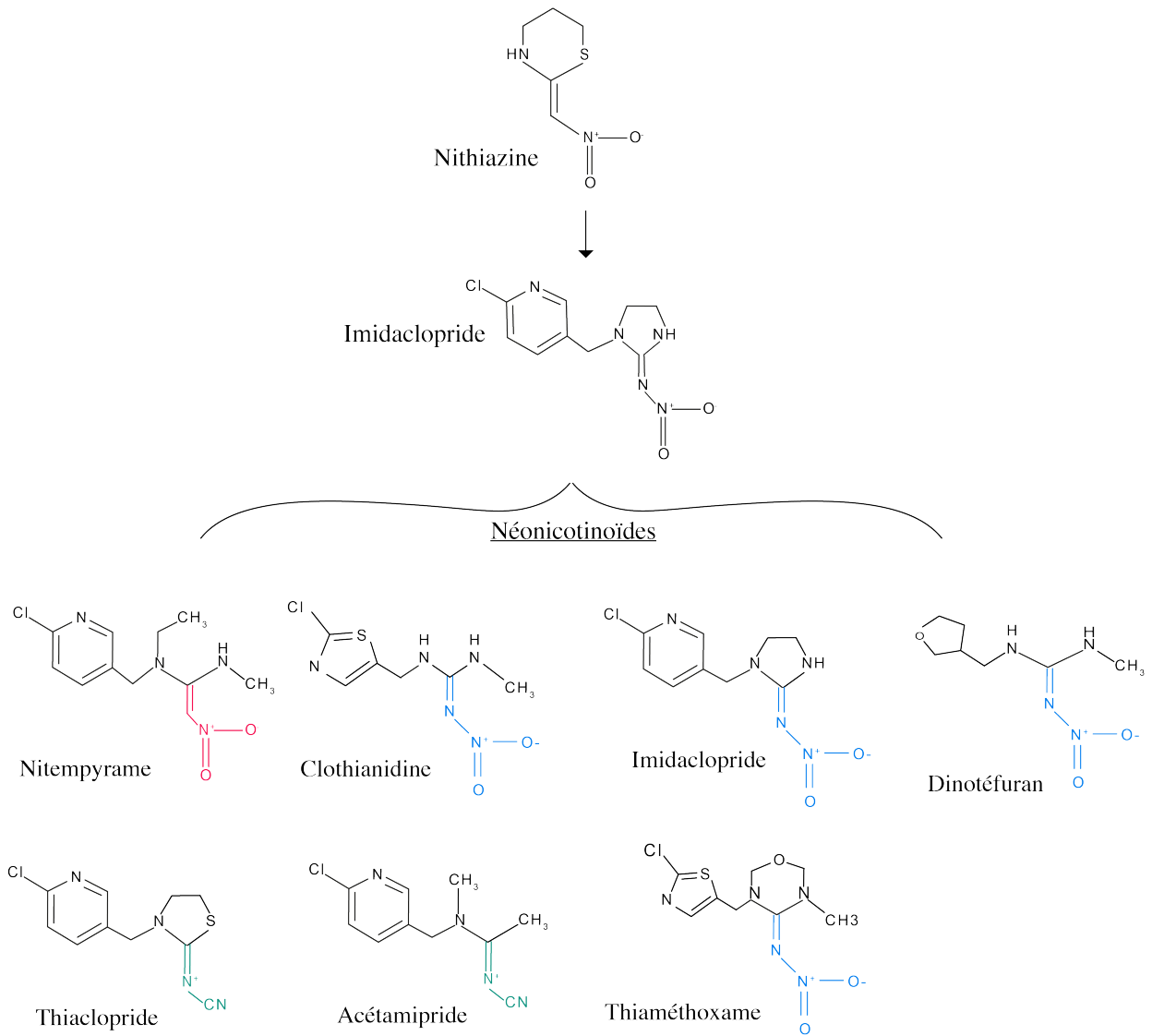


Figure 17 : Représentation moléculaire de la nithiazine et de ses dérivés, les néonicotinoïdes. Ils sont classés en 3 groupes : les nitrométhylènes ($C=CHNO_2$), les nitroguanidines ($C=NNO_2$) et les cyanalidines ($C=NCN$) (modifié d'après Matsuda *et al.*, 2001 ; Tomizawa *et al.*, 2005).

3.2. Mode d'action des néonicotinoïdes

Dès le début des années 90, les études réalisées sur le récepteur de criquet *Scyllisrocerca greguria* ont établi que les insecticides nitrométhylènes étaient capables d'agir sur les récepteurs nicotiniques d'insectes (Leech *et al.*, 1991). En effet Leech et ses collaborateurs ont montré que les nitrométhylènes activaient le récepteur homomérique $\alpha 1$ du criquet *Schistocerca gregaria* exprimé en ovocyte de xénope. Ils ont également montré, grâce à la technique de patch-clamp, que ces insecticides pouvaient agir *in vivo* sur les récepteurs de la mouche *Musca domestica* (Leech *et al.*, 1991). L'étude en patch-clamp de l'application des nitrométhylènes sur les neurones de la blatte *Periplaneta americana*, a permis l'obtention de courants entrants, confirmant l'effet agoniste de ces insecticides sur les nAChR (Cheung *et al.*, 1992). Par la suite il a été montré que les néonicotinoïdes pouvaient agir sur les nAChR d'insectes comme des agonistes partiels ou totaux (Tan *et al.*, 2007). Pour certains composés, des effets super-agonistes et antagonistes ont également été décrits (Ihara *et al.*, 2003, 2004 ; Brown *et al.*, 2006 ; Ihara *et al.*, 2006) (**Tableau 3**). C'est le cas de l'IMI qui peut présenter une action agoniste ou bloquer les réponses induites par l'ACh sur certains nAChR « natifs » (Salgado et Saar, 2004) ou les réponses induites sur le récepteur recombinant $D\alpha 1 \beta 2$ de la drosophile (Ihara *et al.*, 2003). En outre, l'IMI est capable d'amplifier la réponse induite par l'ACh sur le récepteur $\alpha 4 \beta 2$ de poulet (Ihara *et al.*, 2003, Toshima *et al.*, 2008).

4. Site de liaison des néonicotinoïdes

Le site de liaison des néonicotinoïdes étant le même que celui de l'ACh, les six boucles sont susceptibles de posséder des déterminants structuraux nécessaires à la sélectivité des néonicotinoïdes (Ihara *et al.*, 2015). Afin d'identifier les résidus impliqués dans les interactions électrostatiques avec l'ACh et les néonicotinoïdes, des expériences de mutagenèse dirigée et de modélisation moléculaire ont été réalisées sur la boucle D. Ces études ont montré que les mutations G189D et G189E, sur le récepteur homomérique $\alpha 7$ de poulet, provoquaient une diminution de la sensibilité du récepteur aux insecticides néonicotinoïdes, en augmentant la négativité de la boucle D, l'aspartate (D) et l'acide glutamique (E) étant des résidus chargés négativement. A l'inverse, les mutations G189N et G189Q rendent les récepteurs plus sensibles au desnitro-IMI, une molécule dérivée de l'IMI qui est dépourvue du groupe nitro.

Néonicotinoïdes	Action	nAChRs natifs/recombinants	Ref
Imidaclopride	Agoniste partiel	Cellules PC12 Neurone de drosophile Neurone de blatte $D\alpha 2\beta 2$ $\alpha 7$ de poulet	(Nagata, 1996) (Brown <i>et al.</i> , 2006) (Salgado et Saar, 2004 ; Ihara <i>et al.</i> , 2006) (Matsuda <i>et al.</i> , 1998 ; Ihara <i>et al.</i> , 2003) (Ihara <i>et al.</i> , 2003)
	Antagoniste	Neurone de blatte $D\alpha 1\beta 2$	(Ihara <i>et al.</i> , 2003) (Ihara <i>et al.</i> , 2003)
	Modulateur allostérique	$\alpha 4\beta 2$ de poulet	(Toshima <i>et al.</i> , 2008)
Acétamipride	Agoniste partiel	Neurone de blatte	(Tan <i>et al.</i> , 2007)
Clothianidine	Agoniste partiel	Neurone de blatte	(Ihara <i>et al.</i> , 2006)
	Super agoniste/agoniste totale	Neurone de blatte Neurone de drosophile $D\alpha 2\beta 2$	(Tan <i>et al.</i> , 2007) (Brown <i>et al.</i> , 2006) (Ihara <i>et al.</i> , 2004)
P-CH-CTD	Super agoniste	Neurone de drosophile $D\alpha 2\beta 2$	(Brown <i>et al.</i> , 2006) (Ihara <i>et al.</i> , 2004)
Dinotefuran	Agoniste partiel	Neurone de blatte	(Tan <i>et al.</i> , 2007)
	Super agoniste	$D\alpha 2\beta 2$	(Kagabu <i>et al.</i> , 2002)
Nitanoyrame	Agoniste total	Neurone de blatte	(Tan <i>et al.</i> , 2007)
	Agoniste partiel	$D\alpha 1\beta 2$ $D\alpha 2\beta 2$ $\alpha 7$	(Ihara <i>et al.</i> , 2003) (Ihara <i>et al.</i> , 2003) (Ihara <i>et al.</i> , 2003)
Thiaclopride	Antagoniste	$\alpha 4\beta 2$ de poulet	(Toshima <i>et al.</i> , 2008)
CH-IMI	Agoniste total	$D\alpha 2\beta 2$ $\alpha 7$	(Ihara <i>et al.</i> , 2003) (Ihara <i>et al.</i> , 2003)
	Agoniste partiel	$D\alpha 1\beta 2$	(Ihara <i>et al.</i> , 2003)
Alkilène-tethered bis-néonicotinoïdes	Antagoniste	Neurone de blatte	(Ihara <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 3 : Liste non exhaustive des néonicotinoïdes et de leurs effets en fonction des récepteurs étudiés.

Cela suppose que la diminution de la sensibilité du récepteur est due à la répulsion électrostatique entre le groupe nitro des néonicotinoïdes et les résidus acides, D et E qui ont muté (Matsuda *et al.*, 2000). D'autres études réalisées sur le récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet ont confirmé l'importance de la boucle D dans les interactions des néonicotinoïdes avec le récepteur. Toshima et ses collaborateurs ont réalisé, sur ce récepteur, des substitutions de résidus, à la fois sur la sous-unité $\alpha 4$ et sur la sous-unité $\beta 2$, affectant les acides aminés E219 (boucle C), T77 et E79 (boucle D) (**Figure 18**). Ces acides aminés sur les nAChR de poulet sont substitués par des résidus équivalents chez la drosophile. Leurs résultats montrent que les mutations T77R et E79V de la sous-unité $\beta 2$ rendent le récepteur sensible à l'IMI. Cette sensibilité est augmentée par la mutation E219P de la sous-unité $\alpha 4$. Parmi toutes les combinaisons testées, le récepteur $\alpha 4(E219P)\beta 2(T77N; E79R)$ est le plus sensible à l'IMI. Cela révèle que les boucles C et D peuvent être importantes pour améliorer les interactions du récepteur avec les néonicotinoïdes (Toshima *et al.*, 2009). De la même manière, les mutations Q79R et Q79K dans la boucle D du récepteur homomérique $\alpha 7$ de poulet entraînent une augmentation des amplitudes de courant enregistré lors de l'application de l'IMI et du nitenpyram (Shimomura *et al.*, 2002).

D'autres expériences de mutagenèse dirigée, couplées à l'expression de récepteurs hybrides en ovocyte de xénope ont permis de confirmer l'implication de certaines sous-unités d'insectes dans les interactions avec les néonicotinoïdes. Ainsi le remplacement de la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet par la sous-unité $D\alpha 2$ de la drosophile a permis de démontrer que le récepteur hybride $D\alpha 2\beta 2$ formé, est plus sensible à l'IMI que le récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet, suggérant que la sous-unité $D\alpha 2$ possède des caractéristiques structurales favorisant les interactions avec l'IMI. En effet la présence de certains résidus basiques observés uniquement dans la boucle D des sous-unités alpha des insectes pourrait jouer un rôle-clé dans les interactions sélectives entre nAChR d'insectes et insecticides néonicotinoïdes (Matsuda *et al.*, 1998, Shimomura *et al.*, 2006). Il a également été mis en évidence le rôle de la boucle C et de la région se situant entre les boucles B et C sur la sous-unité $D\alpha 2$ de la drosophile. En effet la mutation P242E de la boucle C du récepteur hybride $D\alpha 2\beta 2$ réduit la sensibilité du récepteur à l'IMI. Cette diminution est accentuée si certains résidus se situant entre la boucle B et C sont supprimés (Shimomura *et al.*, 2004, 2005). Un résultat similaire a également été obtenu avec la substitution de la sous-unité $\alpha 4$ du poulet par la sous-unité $D\alpha 1$ de la drosophile (Ihara *et al.*, 2003b).

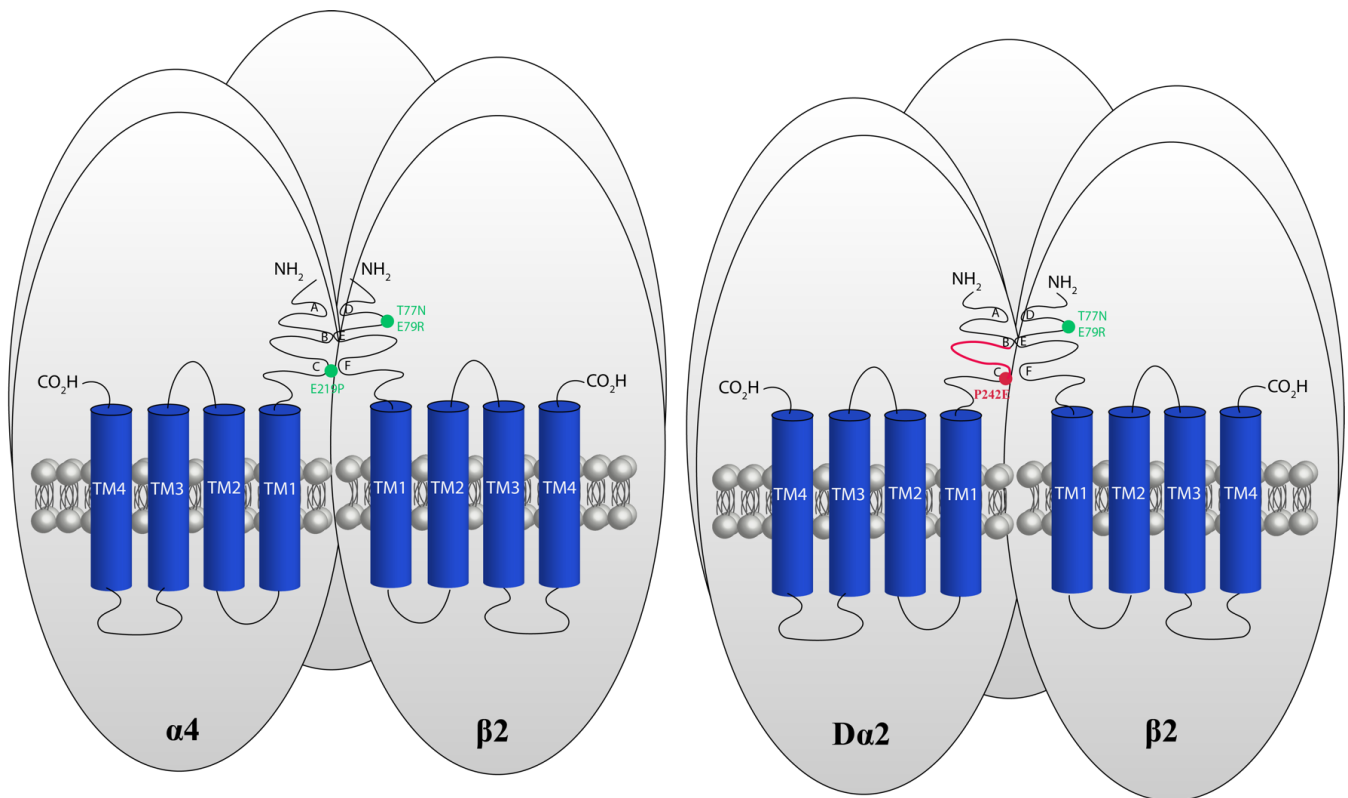


Figure 18 : La présence de mutation modifie la sensibilité du récepteur aux néonicotinoïdes. (A) Récepteur de mammifère $\alpha 4\beta 2$ dont les résidus E129, T77 et E79 ont été remplacés par des résidus de drosophile, P, N et R, respectivement. Cela induit une plus grande sensibilité aux néonicotinoïdes. (B) Récepteur chimère avec une sous-unité $D\alpha 2$ et une sous-unité $\beta 2$ de poulet. La sous-unité $D\alpha 2$ est moins sensible aux néonicotinoïdes en présence de la mutation P242E.

Pour conclure les résidus présents dans les boucles C et D induisent une sensibilité plus élevée des récepteurs d'insectes aux néonicotinoïdes. De manière générale, la présence de résidus acides diminue l'effet des néonicotinoïdes alors que la présence de résidus basiques augmente la sensibilité à ces molécules.

5. Les résistances aux insecticides

En 1955, pour la première fois un phénomène de résistance aux organophosphorés est identifié chez le puceron *M. persicae* (Anton, 1955), puis cette résistance a été observée sur d'autres classes d'insecticides comme les carbamates, les pyréthriinoïdes, les cyclodiènes et les néonicotinoïdes (**Figure 19**). Différents types de résistance sont actuellement recensés en fonction des insecticides.

5.1. Résistance métabolique

La résistance métabolique est l'un des mécanismes de résistance les plus importants. Les enzymes de détoxification chez les insectes peuvent bloquer ou hydrolyser l'insecticide avant qu'il n'atteigne le site cible. Plusieurs mécanismes ont pu être identifiés (**Figure 19**). Par exemple, l'augmentation de l'activité des carboxylestérases réduit l'efficacité des organophosphorés, des carbamates et des pyréthriinoïdes (Field *et al.*, 1988). En effet, les insecticides tels que les carbamates et les pyréthriinoïdes possèdent des liaisons esters susceptibles d'être dégradées par des enzymes de type carboxylestérases. Chez *Myzus persicae* la surproduction des carboxylestérases (E4/FE4) par amplification du gène est responsable de la dégradation des carbamates et des pyréthriinoïdes et confère une résistance à ces insecticides (Bass *et al.*, 2014 ; Lan *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2007).

La modification de l'acétylcholinestérase (AChE) est également un mécanisme de défense contre les insecticides à base de carbamates et d'organophosphorés (Moore *et al.*, 1994 ; Andrews *et al.*, 2004). En effet ces insecticides se fixent sur l'AChE et empêchent la dégradation de l'ACh, induisant une hyperexcitation. Les mutations observées au niveau de l'AChE empêchent son inactivation par les insecticides. En effet, chez *Aphis gossypii* deux mutations ont été identifiées au niveau du gène *ace1* qui code pour l'AChE : la mutation A302S et la mutation S431F, cette dernière ayant également été trouvée chez le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Andrews *et al.*, 2004).

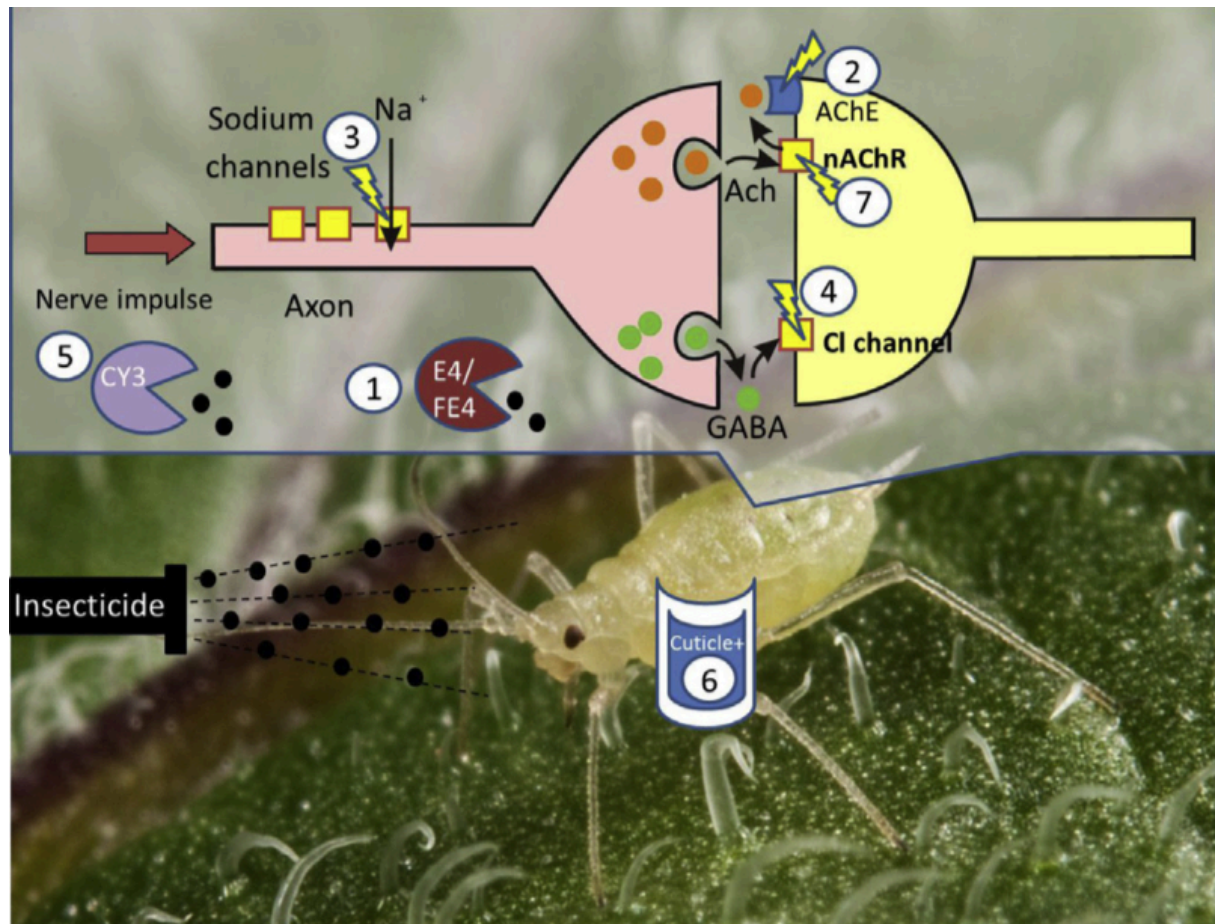


Figure 19 : Représentation schématique des 7 mécanismes de résistance observés chez le puceron *M. persicae*. La majorité des mécanismes sont impliqués dans les mutations de cibles des insecticides au niveau du système nerveux. (1) La surexpression des estérases E4/FE4 confère une résistance aux organosphosphorés. (2) La mutation (S431F) de l'ACh estérase confère une résistance aux diméthyle carbamates. (3) La mutation (L1014F, M918T, M918L) du canal sodique voltage-dépendant confère une résistance aux pyréthroïdes. (4) La mutation (A302G) du canal chlorure contrôlé par le GABA confère une résistance aux cyclodiènes. (5) La surexpression du cytochrome P450 CYP6CY3 confère une résistance à la NIC et une résistance aux néonicotinoïdes. (6) La cuticule permet de réduire la pénétration aux néonicotinoïdes. (7) La mutation (R81T) du récepteur nAChR confère une résistance aux néonicotinoïdes (modifié d'après Bass *et al.*, 2014).

Au début des années 90, les néonicotinoïdes tels que l'IMI, le TMX, la CLO et l'acétamipride (ACE) ne sont pas affectés par ces mécanismes de résistance et vont devenir les principaux moyens de lutte contre les nuisibles tels que *M. persicae* (Nauen et Denholm, 2005). Après deux décennies d'utilisation croissante, des souches de *M. persicae* présentant une résistance aux néonicotinoïdes vont être identifiées en Europe, aux États-Unis et au Japon (Nauen et Denholm, 2005 ; Margaritopoulos *et al.*, 2007 ; Foster *et al.*, 2008). Des études de bioessais utilisant des inhibiteurs enzymatiques du cytochrome P450 suggèrent que la détoxification induite par le cytochrome P450 joue un rôle primordial dans la résistance (Philippou *et al.*, 2009 ; Puinean *et al.*, 2010). En effet, chez *M. persicae nicotianae* une surexpression du gène codant pour le cytochrome P450 CYP6CY3 a été observée. Cette espèce de puceron, spécifiquement adaptée au tabac, montre une sensibilité réduite à la NIC et une résistance importante aux néonicotinoïdes. L'expression fonctionnelle de CYP6CY3 dans une lignée cellulaire d'insecte a révélé qu'elle est capable de métaboliser la NIC en métabolites moins toxiques et de détoxifier les néonicotinoïdes tels que l'IMI et la CLO (Bass *et al.*, 2013). L'analyse de populations d'insectes résistants aux néonicotinoïdes suggère que la surexpression de CYP6CY3 n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le phénotype résistant. En effet, l'utilisation de pipéronyl butoxyde (PBO), inhibiteur enzymatique du cytochrome P450, n'a pas pu complètement rétablir la sensibilité aux insecticides (Philippou *et al.*, 2009 ; Puinean *et al.*, 2010). Une analyse microarray a montré une surexpression de plusieurs gènes codant pour des protéines cuticulaires (Puinean *et al.*, 2010 ; Bass *et al.*, 2011).

5.2. Rôle des nAChR des insectes dans la résistance aux insecticides

L'IMI est l'insecticide le plus utilisé contre la cicadelle brune, *Nilaparvata lugens*. Cependant à la fin des années 90 des résistances sont apparues en Chine (Liu et Han, 2006). Pour évaluer ce phénomène, Lui et Han ont collecté des cicadelles brunes élevées sous IMI à différentes générations. Après 37 générations, ils ont obtenu une souche 250 fois plus résistante à l'IMI (Liu et Han, 2006). Des travaux menés en parallèle ont montré que la substitution de la tyrosine par une sérine en position 151 (Y151S) dans les sous-unités N1 α 1 et N1 α 3 entraîne une résistance à l'IMI (Liu *et al.*, 2005) (**Figure 21**). Par la suite, il a été montré que la sous-unité N1 β 1 est importante pour la fixation de l'IMI et que les récepteurs formés des sous-unités N1 α 1, N1 α 2 et N1 β 1 formaient un site de basse affinité tandis que les récepteurs formés des sous-unités N1 α 3, N1 α 8 et N1 β 1 formaient un site de haute affinité (Li *et al.*, 2010b). L'hypothèse est que la sensibilité élevée des nAChR d'insectes aux

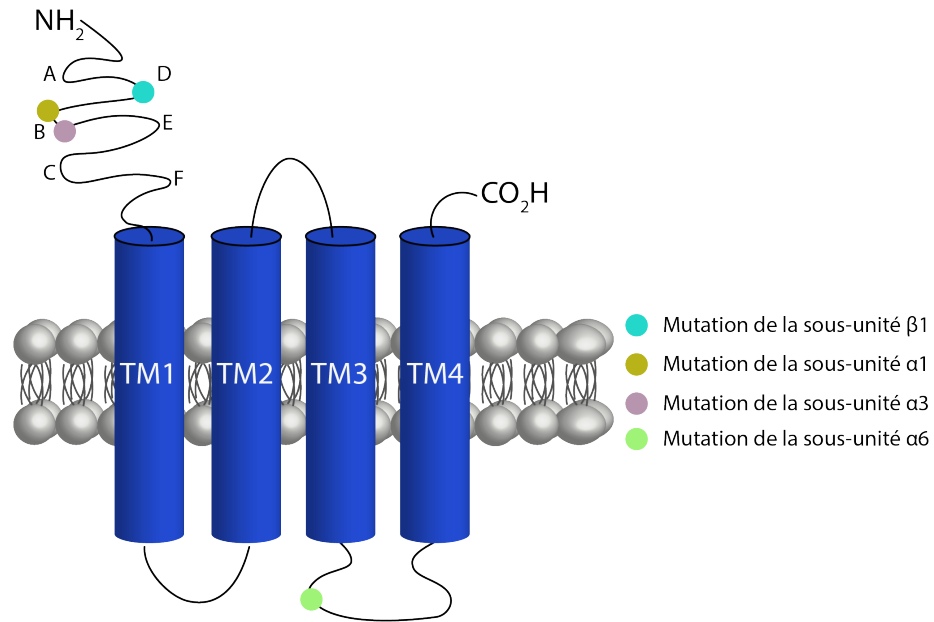


Figure 20 : Mutation des récepteurs à ACh de type nicotinique engendrant des résistances vis-à-vis des néonicotinoïdes.

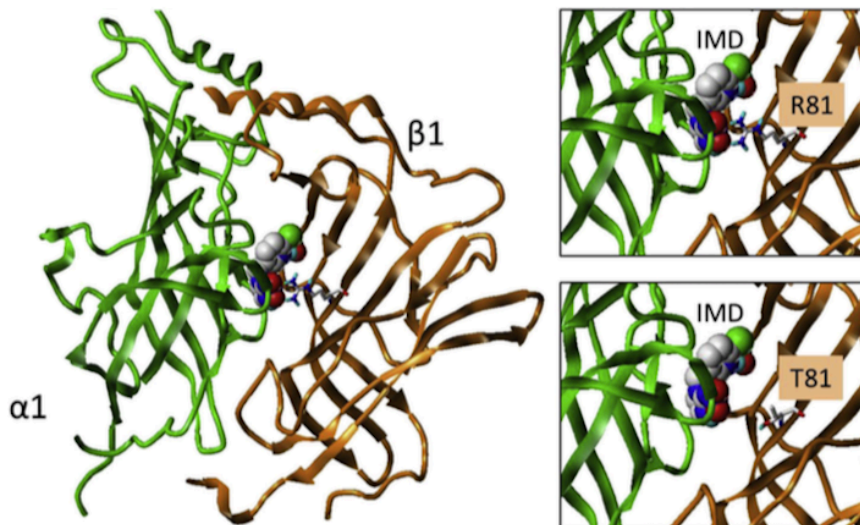


Figure 21 : Mutation R81T de la sous-unité β1. Le modèle est construit avec une AChBP de *Lymnea stagnalis*. Cette mutation induit une résistance chez le puceron *Myzuxs persicae* (modifié d'après Bass *et al.*, 2014).

néonicotinoïdes est due aux interactions entre le pharmacophore électronégatif (groupe nitro ou cyano) de ces insecticides, les résidus conservés dans la boucle C et ceux chargés positivement dans la boucle D (par exemple R81) des sous-unités β (Tomizawa et Casida, 2003, 2005 ; Shimomura *et al.*, 2006) (**Figure 20 et 21**). Chez *M. Persicae*, la comparaison des séquences entre les individus résistants et sensibles a révélé la présence d'une mutation dans la boucle D de la sous-unité $\beta 1$. Cette mutation, engendrant une résistance, est due à la substitution ponctuelle de l'arginine par la thréonine (R81T) (Bass *et al.*, 2011, 2014). Les sous-unités $\beta 1$ d'insectes sont hautement conservées et possèdent toutes une arginine chargée positivement en position 81. En revanche, les sous-unités β des vertébrés ont rarement un acide aminé chargé positivement à cette position, le résidu le plus commun étant une thréonine (Bass *et al.*, 2011). La substitution de la thréonine par l'arginine dans la sous-unité $\beta 2$ de poulet à la position 77 (correspond à la position 81 chez la sous-unité $\beta 1$ de *M. persicae*) augmente l'affinité du récepteur recombinant $D\alpha 2\beta 2$ à l'IMI (Shimomura *et al.*, 2006). Une étude plus récente a montré que la mutation R81T des nAChR pouvait également affecter la fixation des sulfoxamines et des butenolides (Cutler *et al.*, 2012) (**Figure 20**).

Chez la drosophile *Drosophila melanogaster* et la teigne *Plutella Xylostella*, des phénomènes d'épissage alternatif concernant les introns 8 ou 9 ont été identifiés. En effet, chez la teigne *P. Xylostella*, la présence de l'intron 9 a été observée chez les souches résistantes au spinosad. La présence de cet intron conduit à une forme tronquée de la sous-unité $\alpha 6$. Plus encore, 3 formes différentes d'épissage expliquent la résistance de cet insecte vis-à-vis de cette molécule : i) en plus de la présence de l'intron 9, 40 paires de bases sont ajoutées en aval de l'intron avant le codon stop, ii) un épissage de l'exon 9, et iii) un épissage des exons 8b et 9 (Baxter *et al.*, 2010). Ainsi, la présence d'une mutation ponctuelle dans la sous-unité du nAChR n'explique pas à elle seule la résistance des insectes vis-à-vis des insecticides, les phénomènes d'épissage alternatif mettant en évidence un degré de complexité supplémentaire (**Figure 21**).

D. Problématique de l'équipe d'accueil et objectif de thèse

Ce projet de thèse a été réalisé au sein du LBLGC (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) et plus particulièrement au sein de l'équipe d'Entomologie et de Biologie Intégrée (EBI). L'objectif de l'équipe est d'étudier les interactions plantes-insectes et les mécanismes d'adaptation des insectes à leur environnement. Une partie du projet scientifique de l'équipe porte sur l'étude des mécanismes d'adaptation des insectes vis-à-vis des composés synthétisés par la plante ou utilisés pour la protéger, tels que les pesticides. Parmi les pesticides, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux insecticides néonicotinoïdes dont les cibles majeures sont les nAChR. Ces récepteurs neuronaux, présents dans la majorité des organismes, sont impliqués dans les fonctions cognitives. A l'inverse des mammifères chez qui les profils pharmacologiques et la composition en sous-unités des récepteurs natifs sont très bien décrits, la composition en sous-unités des nAChR d'insectes est moins bien caractérisée. Généralement, les récepteurs sont étudiés grâce à des techniques d'électrophysiologie telles que le patch-clamp ou l'expression en ovocyte de xénope des sous-unités α d'insectes avec des sous-unités β de mammifères. Dans les deux cas, soit nous n'avons aucune connaissance sur la composition en sous-unités des récepteurs natifs, soit les profils pharmacologiques décrits ne reflètent pas les propriétés des récepteurs natifs.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse. Le premier objectif était de permettre la première caractérisation d'un récepteur nicotinique natif d'insecte en ovocyte de xénope et d'étudier ses propriétés pharmacologiques, notamment le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes. Le deuxième était d'étudier en parallèle les propriétés pharmacologiques des récepteurs natifs chez la blatte. Le premier chapitre de cette thèse porte sur l'expression en ovocytes de xénope du récepteur homomérique natif $\alpha 7$ de la blatte *Periplaneta americana*. Nous avons étudié l'effet de l'ACE et de la NIC sur ce récepteur et comparé l'effet des insecticides néonicotinoïdes. Le second chapitre porte sur l'effet et la modulation des insecticides néonicotinoïdes sur le récepteur homomérique $\alpha 7$ du rat. Ces deux chapitres permettent de comparer la pharmacologie de ces récepteurs vis à vis de la NIC, de l'ACh et des insecticides néonicotinoïdes, car ces deux sous-unités font partie du même cluster. Dans le troisième chapitre nous avons étudié l'effet de la combinaison de deux insecticides, la perméthrine et le DIN, sur les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques de la blatte. Le quatrième et dernier chapitre portera sur la transplantation en ovocytes de xénope de protéines

issues de la blatte *Periplaneta americana*. Cette technique innovante nous a permis d'obtenir des données préliminaires sur la caractérisation pharmacologique des récepteurs natifs.

A la fin de ce manuscrit vous trouverez une revue que nous avons récemment publiée portant sur l'interaction entre les insecticides néonicotinoïdes et les nAChR d'insecte.

Chapitre I

Caractérisation pharmacologique du récepteur homomérique $\alpha 7$ chez la blatte *Periplaneta americana*

A. Présentation synthétique de l'article :

Contexte : les nAChR des insectes sont la cible des insecticides tels que les néonicotinoïdes (Millar et Denholm 2007 ; Jones *et al.*, 2007). Cela a pu être observé grâce à la technique du patch clamp qui a permis d'étudier l'effet des néonicotinoïdes sur les neurones en culture (Benzidane *et al.*, 2017). Cependant les gènes cibles des insecticides sont non indentifiés. Il est donc important d'exprimer les gènes en système hétérologue et de voir si leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques correspondent à un des types de récepteurs décrits sur les neurones en culture. Malheureusement l'expression de ces récepteurs en système hétérologue est difficile et il a été possible d'obtenir un récepteur fonctionnel seulement pour quelques sous-unités sans l'utilisation de sous-unités de mammifère (Lansdelle *et al.*, 2012 ; Watson *et al.*, 2010).

Objectifs : l'objectif de ce travail était d'étudier l'effet et la modulation des insecticides néonicotinoïdes sur les nAChR de la blatte *Periplaneta americana* exprimés en ovocyte de xénope. Cette étude nécessitait préalablement de mettre au point l'expression fonctionnelle du récepteur en ovocyte de xénope.

Conclusion : nous avons pour la première fois exprimée en ovocytes de xénope un récepteur homomérique $\alpha 7$ d'insecte sans l'utilisation de protéines accessoires ou bien de sous-unités de mammifère. De plus, nos résultats révèlent un récepteur atypique qui est insensible à l' α -Bgt et qui ne s'active pas en présence de néonicotinoïdes. Cependant, les pré- et co-applications de ces insecticides montrent un effet de modulation sur la réponse induite par la NIC. Cela suppose que les néonicotinoïdes pourraient agir comme modulateurs des nAChR d'insectes.

B. Publication n° 1 : Cartereau *et al.*, 2018 (Soumis)

An atypical cockroach homomeric $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor insensitive to neonicotinoid insecticides showing a modulation of nicotine-induced current amplitudes

Alison Cartereau¹, Balaji Selvam^{2,#}, Carine Martin¹, Jérôme Graton², Jean-Yves Le Questel², Steeve H. Thany^{1*}

¹Université d'Orléans, LBLGC, UPRES EA 1207-USC INRA 1328, 1 rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans, France. ²CEISAM UMR CNRS 6230, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière - BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France.

* Correspondence to: Prof. Steeve H. Thany (steeve.thany@univ-orleans.fr)

Tel : +33 2 38417058

[#]Current address: University of Illinois at Urbana-Champaign, 600 S Mathews Ave Roger Adams Laboratory, Urbana, IL 61801, USA

Author contributions

S.H. Thany and J-Y Le Questel designed the experiments; A. Cartereau, C. Martin and B. Selvam performed the experiments; A. Cartereau, J. Graton, J-Y Le Questel and S.H. Thany analyzed the data and wrote the manuscript.

Abstract

Cockroach neurons are currently used to study the agonist potencies of neonicotinoid insecticides against insect native nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). As with other insecticides, understanding the nAChR subtypes involved in the neonicotinoid interaction is of major interest to study resistance mechanisms and insect susceptibility. Here, electrophysiological experiments have been conducted to express for the first time a cockroach homomeric $\alpha 7$ nAChR and to study the pharmacological properties of neonicotinoid insecticides. Our results demonstrated that nicotine induced an inward current with a mean I_{max} value of $-0.86 \pm 0.04 \mu A$ whereas ACh is a poor activator with only $-26 \pm 09 nA$. Nicotine-induced currents are not blocked by 100 nM and 500 nM α -bungarotoxin or methyllicaconitine as demonstrated with vertebrate $\alpha 7$ homomeric receptor, except for 10 μM methyllicaconitine which reduces nicotine currents. A comparison of the agonist potencies with neonicotinoids reveals that imidacloprid, clothianidin and acetamiprid are unable to activate cockroach $\alpha 7$ nAChR whereas thiacloprid induces an inward current. Interestingly, the four neonicotinoids could be divided in two subgroups: clothianidin and thiacloprid, behaving as are negative modulators and imidacloprid and acetamiprid acting as positive modulators. In parallel, the results of complementary molecular docking investigations provide atomic details on the binding interactions of two representatives of these neonicotinoids: imidacloprid and thiacloprid, on a 3D homology model of cockroach $\alpha 7$ nAChR. On the whole, the results give new important functional and structural informations on the pharmacological properties of relevant neonicotinoids to cockroach homomeric $\alpha 7$ nAChR.

Keywords:

Insect; acetylcholine; nicotinic receptors; $\alpha 7$ subunit; neonicotinoids; electrophysiology

Introduction

Insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are of particular interest because they are the main target of neonicotinoid insecticides which are important in agriculture and veterinary medicine to control insect pests and prevent transmission of insect borne diseases^{1, 2, 3}. In general, the pharmacological properties of insect native nAChRs are studied using electrophysiological approaches with isolated neurons expressing nAChR subtypes^{4, 5, 6}. Cockroach neurons from thoracic ganglia and dorsal unpaired median (DUM) neurons are used to characterize the pharmacological properties of insect native nAChR subtypes and the mode of action of neonicotinoid insecticides^{7, 8, 9, 10, 11, 12}. Thus, we demonstrated that cockroach expressed synaptic and extrasynaptic nAChR subtypes which were differently sensitive to neonicotinoid insecticides such as clothianidin (CLT), imidacloprid (IMI) and acetamiprid (ACE)¹³. Using cockroach thoracic ganglia, two α -bungarotoxin(α -Bgt)-sensitive nAChR subtypes were characterized as desensitizing (nAChD), selectively inhibited with IMI, and non-desensitizing (nAChN), selectively inhibited with methyllicaconitine (MLA)^{4, 8}. Moreover, nAChD receptors are potently inhibited by neonicotinoid insecticides while nAChN are activated by neonicotinoids⁸. α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes were also found in the DUM neurons. Two α -Bgt-insensitive receptors were identified as nAChR1, sensitive to imidacloprid and selectively blocked by d-tubocurarine (d-TC), and nAChR2 inhibited by mecamlamine (MEC)^{9, 10, 11, 14}. Unfortunately, the subunit combination of these receptors is unknown, although detailed informations are available concerning the pharmacological properties of native nAChR subtypes.

In the aim to characterize the nAChR subunit involved in the pharmacological properties of cockroach native nAChR subtypes, eight nAChR subunits (seven α and one β subunits) were cloned in the cockroach *Periplaneta americana*¹⁵ while around ten subunits were found in other insect species^{16, 17, 18, 19}. The genes encoding for cockroach subunits were named according to the drosophila orthologs and they had a close relationships with insect species for which the genome was available²⁰. In particular, a phylogenetic analysis demonstrated that the monophyletic group including drosophila D α 5, D α 6 and D α 7, is close to mammalian $\alpha 7$ subunits^{15, 5}. This group is of specific interest because mammalian $\alpha 7$ subunits form homomeric receptors which are currently used to study the pharmacology and functional properties of nAChR subtypes^{21, 22}. Binding investigations using nicotinic agonists showed that $\alpha 7$ nAChR mediates inward currents sensitive to nAChR antagonists such as α -Bgt or MLA when applied coincidentally with agonist or pre-exposed to antagonists before agonist application^{23, 24, 25}. We

propose that members of this group could form homomeric receptors when they are expressed in heterologous systems. Indeed, despite that there has been only limited success in expressing insect nAChRs subunits in heterologous systems, a direct expression of the drosophila D $\alpha 7$ subunit in *Xenopus laevis* oocytes, formed a functional receptor when it was co-expressed with the chaperone resistant to inhibitors of acetylcholinesterase (RIC-3)²⁶. However, no specific α -Bgt binding was detected when it was expressed with RIC-3²⁶, suggesting that compared to mammalian $\alpha 7$ receptors it could be insensitive to α -Bgt. Thus, the pharmacological properties of the $\alpha 7$ monophyletic group seemed to be complex because the drosophila D $\alpha 5$ formed homomeric receptors with RIC-3 which was described as sensitive to α -Bgt^{27,26}.

In the present study, we report the expression of a cockroach homomeric $\alpha 7$ nAChR subtype in the *Xenopus* oocytes. We show that neonicotinoid insecticides act preferentially as modulators of the $\alpha 7$ receptor. The docking of two relevant representatives of neonicotinoids, IMI and thiacloprid (THC) provides a complementary description, at the atomic level, on the orientation and interactions of the two insecticides in the $\alpha 7$ nAChR binding pocket. are very similar. The relative contributions of the various amino acid residues composing the binding site according to the nature of the neonicotinoid are presented and discussed.

Materials

ACh, nicotine, CLT, ACE, IMI, and THC were purchased from Sigma Chemical Co.(St Quentin, France). α -Bgt were purchased from Bioscience company.

Methods

Preparation of cDNA

Cockroach $\alpha 7$ (GenBank accession number: JX466891) and chicken $\beta 2$ (GenBank accession number: NM204813) subunits were cloned into the pGem vector.

Oocyte injection

Xenopus laevis oocytes were purchased from the University of Rennes, France (CRB Xenope) and kept in standard oocyte saline solution (SOS) of the following composition: in mM, 100 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ and 5 HEPES, pH 7.5. Stages V and VI oocytes were harvested and defolliculated after treatment with 2 mg/ml collagenase IA (Sigma, France) in Ca²⁺-free SOS solution, supplemented with 0,8 mg/ml trypsin inhibitor. Defolliculated oocytes were injected in nucleus with 2 ng of $\alpha 7$ cDNA cloned in pSGEM^{28, 29}. Injected oocytes were maintained at 18°C in SOS solution supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), gentamycin (50 mg/ml) and sodium pyruvate (2.5 mM).

Voltage-Clamp Recordings

Currents were recorded 4 days after injection, using two microelectrodes filled with 3 M KCl. The oocyte membrane potential was held at -80 mV³⁰, and perfused continuously with recording buffer at room temperature (20–22°C). To suppress any possible endogenous muscarinic response, saline solution containing 0.5 μ M atropine was employed^{31, 32}. The dose response curves were estimated using increasing concentration of the compounds on the same oocyte. Oocytes were challenged with a test compound during 5 min intervals to minimize receptor desensitization²⁸. To evaluate neonicotinoids modulation on nicotine responses, they were tested without and after 5 min pretreatment. To assess the pharmacological profile of these receptors, experiments were conducted with different antagonist and positive allosteric modulator. Experimental data were digitized with a Digidata-1322A A/D converter and later analyzed with pCLAMP (Molecular Devices, Union City, CA, USA). All compound solutions were prepared with the recording buffer.

Homology Modeling

The amino acid sequences of the cockroach *Periplaneta americana* $\alpha 7$ subunits were extracted from the Uniprot server (www.expasy.org)³³. The nearest homology of the target sequences were characterized using the BLAST program³⁴. The crystal structure of the acetylcholine binding protein (*Ac*-AChBP) extracted from *Aplysia californica* (*Ac*) (PDB ID: 3C79)³⁵ was selected as a template to build the three-dimensional (3D) model of cockroach nAChRs. Indeed, *Ac*-AChBP is recognized as the surrogate of the ligand binding domain of the extracellular domain of insect nAChRs³⁵. The crystal structures of the *Ac*-AChBP-neonicotinoid complexes (PDB ID: 3C79 and PDB ID: 3C84 for IMI and THI ligands, respectively) were downloaded from the Protein Data Bank (www.pdb.org)³⁶. The pairwise sequence alignments were performed to align the target and the template sequence. The 3D homology models were built using the Prime v3.6 (Schrödinger Release 2014-1: Prime, version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) module of the Schrodinger suite 2014-1 (Schrödinger Release 2014-1: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). The rotamers of the conserved amino acid residues are preserved in the homology model in a way that the final 3D model does not significantly deviate from the template structure. The stereochemical quality of the model was verified using MolProbity³⁷.

Docking

The chemical structures of the neonicotinoids, IMI and THC have been converted to 3D at pH 7.0 ± 0.2 using the LigPrep v3.0 (Schrödinger Release 2014-1: LigPrep, version 2.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) module of the Schrodinger suite 2014-1 (Schrödinger Release 2014-1: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). The confgen (Schrödinger Release 2014-1: ConfGen, version 2.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) program was then used to retrieve the lowest energy conformer of each insecticide for docking. The docking was carried out using the Glide v6.3³⁸ program of the Schrodinger suite 2014-1 (Schrödinger Release 2014-1: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). The active site were defined by all residues located in a sphere of 6 Å centered on the ligand. The same residues were selected for receptor grid generation. The extra-precision (XP)³⁹ mode of the docking algorithm was employed to dock IMI and THC ligands. It is worth reminding that nAChRs are organized as pentamers; that is, there are five identical ligand binding sites and the ligand binds between the cleft of the two subunits. The ligands were therefore docked in all the five interfaces of the $\alpha 7$

cockroach nAChR model. The docking results were validated by comparing the predicted ligand binding modes to the crystallographic Ac-AChBP-neonicotinoid structures

Statistical analysis

Data were shown as mean \pm SEM and analyzed using Prism 7 (GraphPad Software, la Jolla, CA, USA). Responses to experimental neonicotinoid applications were determined relative to the preceding nicotine control responses in the same experimental conditions. Note that for all compounds, experiments were also performed on non-injected oocytes to avoid native responses (data not shown). The dose response curves were derived from the fitted curve following the equation: $Y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + 10^{(\log(EC_{50}) - X)H})$ where Y is the normalized response, I_{max} and I_{min} are the maximum and minimum responses, H is the Hill coefficient, EC_{50} is the concentration giving half the maximum response and X is the logarithm of the compound concentration. For the experiments 12 female frogs were used, thus the number 'n' for each experimental condition represents around 80 oocytes per batch.

Results

A functional expression of cockroach homomeric $\alpha 7$ receptor

The functional expression of cockroach $\alpha 7$ homomeric receptor was first studied using direct expression of $\alpha 7$ subunit in the *Xenopus laevis* oocytes. ACh and nicotine induced inward currents but nicotine activated $\alpha 7$ receptors in a dose-dependent manner and the responses with nicotine were $88 \pm 2\%$ greater than the maximum responses evoked by ACh (Figure 1 A and B). For the next experiments, we decided to select 10 mM nicotine as test concentration, in consistency with the conditions used for cockroach DUM neurons expressing nAChR subtypes^{9, 10} and because currents induced by ACh were too low to conduct a robust analysis. At 10 mM, nicotine and ACh-induced currents were -236 ± 7 nA and -26 ± 9 nA, respectively. Co-expression of cockroach $\alpha 7$ subunit with a rat $\beta 2$ subunit with the aim to obtain a hybrid $\alpha 7\beta 2$ nAChR produced a functional receptor. However, the co-expression with a rat $\beta 2$ subunit did not enhance or change the response induced by nicotine. We propose that the chicken $\beta 2$ subunit is not necessary for the functional expression of the receptor and that $\alpha 7$ subunit forms a functional homomeric receptor alone (Figure 1C and D). In order to study the effects of nicotine on channel inactivation or desensitization, we measured nicotine currents after successive applications. No decrease of nicotine currents were found and similar nicotine-evoked current amplitudes were detected 10 min after successive applications (Figure 2A). As shown in figure 2B the net charge did not decrease as a function of the agonist concentration applied, suggesting that the cockroach $\alpha 7$ nAChR did not desensitize rapidly in response to high concentrations of nicotine.

In previous studies, it was demonstrated that cockroach DUM neurons express α -Bgt-sensitive receptors which were blocked by $0.5 \mu\text{M}$ α -Bgt^{9, 10}. We anticipate that nicotine currents recorded through cockroach $\alpha 7$ receptor could be reduced or blocked by $0.1 \mu\text{M}$ α -Bgt as shown with vertebrate $\alpha 7$ ^{40, 41} or $0.5 \mu\text{M}$ as used on cockroach DUM neurons^{9, 10, 42}. As illustrated in figure 3A, α -Bgt did not block or reduce nicotine-evoked currents at the tested concentrations, suggesting that cockroach $\alpha 7$ receptor was insensitive to α -Bgt. Interestingly, similar lack of decrease was also found with MLA, which is a potent specific nicotinic antagonist of vertebrate neuronal $\alpha 7$ nAChRs⁴³. At 500 nM, MLA was not able to block nicotine-induced currents but, it was interesting to note that $10 \mu\text{M}$ MLA reduced 41% of the nicotine evoked currents (Figure 3B and C). In the basis of these results, we suggested that cockroach $\alpha 7$ could be sensitive to MEC and d-TC which blocked heteromeric nAChRs. No blocking or reduction of nicotine currents was observed with $5 \mu\text{M}$ MEC or $10 \mu\text{M}$ d-TC, which

block nAChR1 and nAChR2 receptor subtypes, respectively (Figure 3D and E). We suggest therefore on the basis of these data that cockroach $\alpha 7$ homomeric receptor is not involved in the pharmacological profiles of these receptors which was in accordance with previous studies demonstrating the involvement of other nAChR subunits⁴⁴.

Effect of neonicotinoid insecticides on nicotine-induced currents

We previously demonstrated that neonicotinoid insecticides, which were not able to activate the rat $\alpha 7$ homomeric receptor modulated nicotine-induced current amplitudes⁴⁵. We have employed in this work the same method to study the modulatory effect of neonicotinoids on nicotine-induced current amplitudes through cockroach $\alpha 7$ homomeric nAChRs. We found that CLT, ACE and IMI did not induce inward currents, suggesting that these compounds were unable to activate cockroach $\alpha 7$ nAChRs. However, THC activated cockroach $\alpha 7$ receptors, the currents generated representing 20% of the nicotine-induced responses, demonstrating that it is a poor activator of cockroach $\alpha 7$ homomeric receptors (Figure 4). We then studied the effect of the co-application or pretreatment of 10 μ M neonicotinoids with 10 mM nicotine. Co-application of 10 μ M CLT with 10 mM nicotine significantly reduced Nicotine-evoked current amplitudes to $36 \pm 5\%$ ($p < 0.05$, $n = 10$, fig. 5A and B) whereas pretreatment with the same concentrations reduced current amplitudes to $24 \pm 3\%$ ($p < 0.05$, $n = 10$, fig. 5A). Similar decrease of nicotine-induced currents was obtained with 10 μ M THC which significantly reduced nicotine-evoked current amplitudes to $54 \pm 2\%$ after co-application and to 28% after pretreatment ($p < 0.05$, $n = 6$, Fig 5C and D). But, in all case, decrease induced by CLT and THC did not completely block nicotine-evoked current amplitudes (Figure 5B and D). Co-application of IMI significantly increased nicotine-evoked current amplitudes to $30 \pm 3\%$ and to $40 \pm 4\%$ after 5 min pretreatment ($p < 0.05$, $n = 12$ Figure 6A and B). Under the same conditions, ACE significantly increased nicotine-evoked current amplitudes to $30 \pm 7\%$ when co-applied with 10 mM nicotine and of $34 \pm 5\%$ after 5 min pretreatment ($p < 0.05$, $n = 6$ Fig C and D). Our results suggest that these neonicotinoids can be divided in two subgroups corresponding to their potential effect on nicotine-induced current amplitudes.

Investigating the binding of imidacloprid and thiacloprid to cockroach $\alpha 7$ homomeric subtype

The pairwise sequence alignments of the extracellular domain of the cockroach $\alpha 7$ nAChR subunits against the template crystal structure (PDB ID: 3C79)⁴⁶ show 28.4% identity and 36.7% similarity, respectively (Fig. 7). The sequence identity value is revealed to be below the 30% “threshold” for high accuracy template-based 3D modeling. However, despite this relatively low level of sequence identity, accurate alignment can be obtained in this case as reflected by the relatively high sequence similarity value. Based on the sequence alignments, the 3D models of cockroach $\alpha 7$ nAChR homo-pentamers were built using the Prime module of the Schrodinger suite 2014-1³⁸ (Fig. 8 and 9). The generated models were energy minimized using the OPLS-2005 force field⁴⁷. The quality of the 3D model in terms of geometry was assessed using the MolProbity program³⁷. Both the final models showed 99.6% residues (except proline and glycine residues) possessing their ϕ, ψ torsional angles in the most energetically favored regions of the Ramachandran plot⁴⁸. The protein backbone root mean square deviations (RMSD) of the final cockroach $\alpha 7$ receptor model is of 0.38Å, using the template structure (3C79) as the reference, and no deviation was observed in the important loops within the binding site.

In order to determine at the atomic level the binding interactions of neonicotinoids to the homology models of the cockroach $\alpha 7$ receptor built, we carried out docking studies with relevant neonicotinoids (Figure 8A). We have selected IMI and THC for this investigation, since their behavior is notably different from an electrophysiological point of view. The same trends were observed in all five interfaces and only the results obtained for one of the subunit (CD) was discussed here. The geometric and docking parameters are reported in Table 1. Figure 8B and 8C show respectively the 2D interaction diagrams of IMI and THC bound to cockroach $\alpha 7$ nAChR whereas figure 9 shows complementary 3D views of the predicted binding modes of the two neonicotinoids. The docking scores and glide energies of the top ranked poses show very similar trends for both IMI and THC insecticides. Indeed, the slight preference for IMI visible from the two parameters (of about 2.5 and 3 kcal mol⁻¹ for docking score and glide energy, respectively) must not be used to draw conclusions and has to be considered cautiously. Nevertheless, such studies allow delineating the key interactions established between the IMI and THC insecticides and their target. Thus, the pyridine ring of the two neonicotinoids forms π - π interactions with Trp189 of cockroach $\alpha 7$ nAChR. In addition, and in agreement with the trends observed in crystallographic structures of neonicotinoids-AChBP complexes,^{35, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55} the pyridine ring is consistently involved in water mediated HB interactions with main chain groups of amino acid residues, corresponding in the case of the cockroach $\alpha 7$

nAChR to Asn147 (CO) and Val159 (NH) (Figure 9). Comparable trends are obtained for the ending groups of the push-pull fragment of the two ligands since no specific contact is predicted between this moiety of the two insecticides and the receptor residues. In fact, in concordance with experimental data, the stability of the two ligands inside the binding pocket appears to be realized through CH... π and π ... π interactions, involving positively polarized CH groups of the five membered saturated ring of the ligands and aromatic aminoacid residues of the $\alpha 7$ cockroach nAChR such as Trp189 and Tyr231 (see Table 1). It is also worth noting that short contacts are established between the ligand and one sulfur atom of Cys233. These trends are consistent with the key role played by a Trp and a dicysteine residues in the binding of neonicotinoids insecticides to insect nAChR models.

Discussion

We first compared the expression of $\alpha 7$ subunit alone and with chicken $\beta 2$ and found that $\alpha 7$ subunit is able to form functional homomeric receptors in the *Xenopus laevis* oocytes without $\beta 2$ subunit. This observation is encouraging because to date no functional expression of an insect homomeric $\alpha 7$ receptor was demonstrated in *Xenopus laevis* oocytes without the use of molecular chaperone or vertebrate β subunits. While our results show that we need to use higher nicotine concentration to activate cockroach $\alpha 7$ receptors, this concentration is not surprising because it was previously used to activate nAChRs expressed on the cockroach DUM neurons^{9,10}. We found that the range of current amplitudes obtained is close to those found with nicotine using DUM neurons and that nicotine-evoked currents are robust and repetitive and that I_{\max} is higher to data found in previous studies with D $\alpha 7$ receptor²⁶. Our investigations suggest that cockroach $\alpha 7$ receptor is insensitive to α -Bgt at the tested concentrations, demonstrating that it has different pharmacological properties compared to rat $\alpha 7$ receptors. Indeed, insect $\alpha 7$ subunits show close sequence similarity to one other and form a monophyletic group with mammalian $\alpha 7$ nAChR subunits and includes *Drosophila melanogaster* D $\alpha 5$ and D $\alpha 6$ ^{5,27}. This close similarity with vertebrate $\alpha 7$ subunits leads to the assumption that insect homomeric $\alpha 7$ nAChRs could be blocked by α -Bgt. Here, we show a lack of α -Bgt effect on nicotine-evoked currents. This result was not surprising because it was also demonstrated a lack of specific α -Bgt binding sites on drosophila S2 cells expressing full-length D $\alpha 6$ or D $\alpha 7$ subunits. The only exception was the use of chimeric D $\alpha 6/5HT_{3A}$ and D $\alpha 7/5HT_{3A}$ receptors or recombinant D $\alpha 6$ and D $\alpha 7$ receptors expressed with RIC-3^{26,27}. We hypothesize that cockroach $\alpha 7$ nAChRs may have different pharmacological profile compared to mammalian $\alpha 7$ homomeric nAChRs. Indeed, cockroach $\alpha 7$ receptor was also insensitive to MLA blocking at the same concentrations. Moreover, because mecamylamine and d-TC, nAChR antagonists have no effect on nicotine-induced currents, we hypothesize that cockroach $\alpha 7$ subtype was not associated to the pharmacological properties of both α -Bgt-insensitive nAChR1 and nAChR2^{9,10}. Our observation is in accordance with the previous data suggesting that nAChR1 includes cockroach P $\alpha 3$, P $\alpha 8$ and P $\beta 1$ subunits while nAChR2 is composed to P $\alpha 1$, P $\alpha 2$ and P $\alpha \beta 1$ subunits⁴⁴.

To get a better understanding of the pharmacological properties of cockroach $\alpha 7$ receptors, we studied the effect of neonicotinoid insecticides because they are described as activators of cockroach nAChRs^{13,56}. We found that none of the tested neonicotinoids was able

to strongly activate cockroach $\alpha 7$ receptors at an extent giving strong recorded inward currents, except for THC, suggesting that some neonicotinoids could activate the cockroach $\alpha 7$ receptors. Moreover, our data are compatible with a modulatory effect of neonicotinoid insecticides on nicotine-induced currents. CLT and THC decrease nicotine-evoked current amplitudes whereas IMI and ACE increase all currents in co-application and under pretreatment. These data are consistent with our previous studies showing a modulatory effect of neonicotinoid insecticides on the rat $\alpha 7$ receptor but pretreatment with cCLT and ACE increased ACh-induced current amplitudes⁴⁵. Thus, we hypothesize that cockroach $\alpha 7$ homomeric receptor is differently modulated by neonicotinoid insecticides compared to mammalian $\alpha 7$ receptors. The complementary docking results are consistent with the structural data available so far for the interactions of IMI and THC with cockroach $\alpha 7$ homomeric receptor models. Nevertheless, the trends pointed out at the microscopic scale contrast with the electrophysiological results. Further modeling studies considering other putative neonicotinoid binding sites (e.g. allosteric) are needed. Indeed, the present results point out that the tendencies obtained at the agonist site alone cannot rationalize the observed experimental data. From an electrophysiological point of view, the results obtained might originate from the poor agonist activity of IMI on cockroach nAChRs or that the native $\alpha 7$ homomeric receptors is insensitive to these compounds. The first hypothesis is true because IMI is a poor activator of cockroach nAChRs and CLT and ACE are known as full activators⁵⁶. Thus, it seems possible that cockroach $\alpha 7$ receptors is insensitive to these compounds. Our challenge in the next years will be to identify specific compounds activating cockroach $\alpha 7$ homomeric receptors. These compounds will be of particular interest as specific activators of insect $\alpha 7$ receptors. We hypothesize that cockroach $\alpha 7$ could be used as an insect model of homomeric receptors to study the pharmacological properties of native nAChRs on heterologous systems.

In final, the present data reinforce our findings that functional expression of a robust insect $\alpha 7$ homomeric receptor is possible as demonstrated with the mammalian $\alpha 7$ subunits. During the present study, we found that the functional expression concerned 50% of the injected oocytes. It is clear that the next challenge will be to improve the functional expression as found with vertebrate $\alpha 7$ for which we found more than 80% of successful expression.

Legend to the figures and table

Figure 1

Effect of nicotine (Nic) and acetylcholine (ACh) on cockroach $\alpha 7$ nAChRs expressed in *Xenopus laevis* oocytes. (A) Typical example of nicotine- and acetylcholine-induced currents. Currents are recorded at 10 mM nicotine or acetylcholine, respectively. (B) Dose-response curve are represented for nicotine and acetylcholine. Data are normalized to 10 mM nicotine and are means \pm SEM of 10 independent experiments. (C) Nicotine (10 mM) evoked currents recorded after the expression of cockroach $\alpha 7$ subunit alone or with rat $\beta 2$ subunit. In each case, black bars indicate application of 10 mM nicotine. (D) Dose-response curve of nicotine-induced currents through $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs.

Figure 2

Nicotine activation of cockroach $\alpha 7$ nAChRs. (A) Successive applications of 10 mM nicotine recorded after 5 min interval. Black bars indicate 5 s application of 10 mM nicotine. (B) The concentration-response relationship for the peak currents and net charge responses evoked by nicotine. Each point represents the mean \pm SEM.

Figure 3

Effects of the nAChR antagonists on nicotine (10 mM) evoked currents. (A) Pretreatment with 0.5 μ M α -Bgt, (B) 0.5 μ M MLA, (C) 10 μ M MLA, (D) 5 μ M mecamylamine (MEC) and (E) 10 μ M d-TC. Bars indicate application of the compounds.

Figure 4

Effect of neonicotinoid insecticides on cockroach $\alpha 7$ nAChRs expressed in *Xenopus laevis* oocytes. As shown no currents were found with ACE (10 mM), IMI (10 mM) and CLO (10 mM) but 1 mM THC induced an inward current.

Figure 5

Modulatory effect of CLT and THC on nicotine-induced currents. (A) modulatory effect of 10 μ M CLT when (a and b) co-applied with 10 mM nicotine and (c and d) after pretreatment. (B) Inhibition response-curve under co-application with CLT. (C) Similar effect was found when cells were pretreated with 10 μ M THC. (a and b) co-application with 10 μ M THC and 10 mM

nicotine. (c and d) Pretreatment with 10 μ M THC and 10 mM nicotine. (D) Inhibition-response curve under co-application of THC with 10 mM nicotine. Histograms summarized data obtained with 10 μ M of each neonicotinoid and represent $n = 10$ independent experiments. * $p < 0.05$

Figure 6

Modulatory effect of IMI and ACE on nicotine evoked currents. (A and B) represents the effects of 10 μ M IMI during co-application (A) and after pretreatment (B). (C and D) represents similar effects during co-application of 10 mM nicotine with 10 μ M ACE (C) or 5 min pretreatment.

Figure 7

Sequence alignment of *Ac*-AChBP and $\alpha 7$ cockroach (CK) nAChR used to generate the homology model.

Figure 8

Chemical structures of imidacloprid (IMI) and thiacloprid (THC) neonicotinoids. 2D interaction diagram of the ligand-receptor interactions established within the CD interface of the $\alpha 7$ cockroach nAChR for (B) IMI and (C) THC.

Figure 9

Predicted binding modes of IMI (A and B) and THI (C and D) in cockroach $\alpha 7$ nAChR viewed according to two orientations: with the pyridinic ring (left: A and C) with the push-pull fragment (right: B and D) in the plane of the figure, respectively.

Table 1

Selected interatomic distances, docking scores and glide energies (kcal mol^{-1}) of IMI and THI binding in $\alpha 7$ cockroach nAChR (CD subunits interface).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Région Centre Val de Loire ‘SCREENROBOT project’, from the Région Pays de la Loire ‘ECRIN project’, and a Ph.D grant for A. Cartereau from the Région Centre Val de Loire. Authors would like to thank Pierre-Jean Corringer for its comments on the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Casida JE. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem Res Toxicol* **22**, 609-619 (2009).
2. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* **59**, 2897-2908 (2011).
3. Jeschke P, Nauen R, Beck ME. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 9464-9485 (2013).
4. Salgado VL. Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Neurotoxicology* **56**, 188-195 (2016).
5. Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 14-22 (2007).
6. Barbara GS, Grunewald B, Paute S, Gauthier M, Raymond-Delpech V. Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invert Neurosci* **8**, 19-29 (2008).
7. Salgado VL. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pest Biochem Physiol* **60**, 91-102 (1998).
8. Salgado VL, Saar R. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J Insect Physiol* **50**, 867-879 (2004).
9. Courjaret R, Lapied B. 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 (2001).

10. Courjaret R, Grolleau F, Lapied B. 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 (2003).
11. Thany SH, Courjaret R, Lapied B. Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci Lett* **438**, 317-321 (2008).
12. Calas-List D, List O, Thany SH. Normicotine application on cockroach dorsal unpaired median neurons induces two distinct ionic currents: Implications of different nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci Lett* **518**, 64-68 (2012).
13. Thany SH. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *NeuroToxicology* **30**, 1045-1052 (2009).
14. Bodereau-Dubois B, *et al.* Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J Pharmacol Exp Ther* **341**, 326-339 (2012).
15. Taillebois E, Thany SH. The Differential Effect of Low-Dose Mixtures of Four Pesticides on the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insects* **7**, (2016).
16. Thany SH, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* **12**, 255-262 (2003).
17. Dale RP, *et al.* Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol* **19 Suppl 2**, 141-153 (2010).
18. Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* **16**, 1422-1430 (2006).

19. Taillebois E, *et al.* Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* **9**, e96669 (2014).
20. Taillebois E, Thany SH. Characterization of nicotine acetylcholine receptor subunits in the cockroach *periplaneta americana* mushroom bodies reveals a strong expression of beta1 subunit: involvement in nicotine-induced currents. *Arch Insect Biochem Physiol* **93**, 40-54 (2016).
21. Gill JK, Chatzidaki A, Ursu D, Sher E, Millar NS. Contrasting properties of alpha7-selective orthosteric and allosteric agonists examined on native nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* **8**, e55047 (2013).
22. Delbart F, *et al.* An allosteric binding site of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor revealed in a humanized acetylcholine-binding protein. *J Biol Chem* **293**, 2534-2545 (2018).
23. Zhao L, *et al.* Functional properties of homomeric, human alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in the SH-EP1 human epithelial cell line. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 1132-1141 (2003).
24. Virginio C, Giacometti A, Aldeghe L, Rimland JM, Terstappen GC. Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur J Pharmacol* **445**, 153-161 (2002).
25. Cuevas J, Roth AL, Berg DK. Two distinct classes of functional 7-containing nicotinic receptor on rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol* **525 Pt 3**, 735-746 (2000).
26. Lansdell SJ, Collins T, Goodchild J, Millar NS. The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits Dalpha5 and Dalpha7 form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neurosci* **13**, 73 (2012).
27. Lansdell SJ, Millar NS. 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**, 479-489 (2004).

28. Ihara M, *et al.* Diverse actions of neonicotinoids on chicken alpha7, alpha4beta2 and Drosophila-chicken SADbeta2 and ALSbeta2 hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* **45**, 133-144 (2003).

29. Couturier S, *et al.* A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* **5**, 847-856 (1990).

30. Taylor-Wells J, Hawkins J, Colombo C, Bermudez I, Jones AK. Cloning and functional expression of intracellular loop variants of the honey bee (*Apis mellifera*) RDL GABA receptor. *Neurotoxicology* **60**, 207-213 (2017).

31. Matsuda K, Buckingham SD, Freeman JC, Squire MD, Baylis HA, Sattelle DB. Effects of the alpha subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* **123**, 518-524 (1998).

32. Matsuda K, *et al.* Role of loop D of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. *Br J Pharmacol* **130**, 981-986 (2000).

33. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788 (2003).

34. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410 (1990).

35. Tomizawa M, Casida JE. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Acc Chem Res* **42**, 260-269 (2009).

36. Berman HM, *et al.* The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 899-907 (2002).
37. Chen VB, *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21 (2010).
38. Friesner RA, *et al.* Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* **47**, 1739-1749 (2004).
39. Friesner RA, *et al.* Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* **49**, 6177-6196 (2006).
40. Bertrand D, Bertrand S, Ballivet M. Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor. *Neurosci Lett* **146**, 87-90 (1992).
41. Cuevas J, Berg DK. Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J Neurosci* **18**, 10335-10344 (1998).
42. Nauen RE-K, U. Salgado, V. L. Kaussmann, M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Physiol* **76**, 55-69 (2003).
43. Davies AR, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Wonnacott S. Characterisation of the binding of [3 H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **38**, 679-690 (1999).
44. Sun H, Liu Y, Li J, Cang X, Bao H, Liu Z. The potential subunits involved in two subtypes of alpha-Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochem Mol Biol* **81**, 32-40 (2017).
45. Cartereau A, Martin C, Thany SH. Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol*, (2017).

46. Talley TT, *et al.* Atomic interactions of neonicotinoid agonists with AChBP: molecular recognition of the distinctive electronegative pharmacophore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7606-7611 (2008).
47. Jorgensen WLMDST-R, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc* **118**, 11225-11236 (1996).
48. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**, 95-99 (1963).
49. Ulens C, *et al.* Use of acetylcholine binding protein in the search for novel $\alpha 7$ nicotinic receptor ligands. In silico docking, pharmacological screening, and X-ray analysis. *J Med Chem* **52**, 2372-2383 (2009).
50. Rucktooa P, Smit AB, Sixma TK. Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochem Pharmacol* **78**, 777-787 (2009).
51. Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**, 907-914 (2004).
52. Sixma TK, Smit AB. Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 311-334 (2003).
53. Hansen SB, Sulzenbacher G, Huxford T, Marchot P, Taylor P, Bourne Y. Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* **24**, 3635-3646 (2005).
54. Ihara M, *et al.* Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invert Neurosci* **8**, 71-81 (2008).

55. Celie PH, *et al.* Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**, 26457-26466 (2005).

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

Table 1

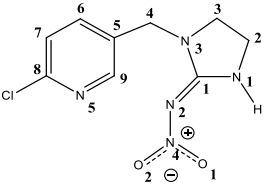
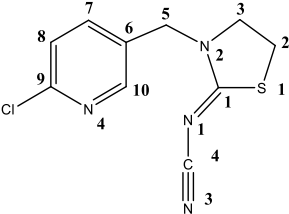
Neonicotinoid	Interaction	Interaction			
		distance (Å)	DS ^a	GE ^b	RMSD ^c
 <p>IMI</p>	N5...H(O) (W248)	2.01			
	W248 O...HN(Val159 C) ^{MC}	2.13			
	W248(O)H...OC(Asn147 C) ^{MC}	2.11			
	Ctr ₁ ^d ...Ctr(5) (Trp 189 D) ^{SC}	5.24			
	C9H... Ctr(5) (Trp 189 D) ^{SC}	3.01			
	C4H...S (Cys 233 D) ^{SC}	2.64	-7.2	-75.1	
	Ctr ₂ ^e ...Ctr(6) (Trp 189 D) ^{SC}	4.10			
	C3H... Ctr(6) (Trp 189 D) ^{SC}	2.34			
	Ctr ₂ ^e ...Ctr(6) (Tyr 231 D) ^{SC}	3.80			
	C3H... Ctr(6) (Tyr 231 D) ^{SC}	2.79			
O2...H(N) (Lys 97 D) ^{SC}	4.29				
 <p>THI</p>	N4...H(O) (W248)	1.99			
	W248 O...HN(Val159 C) ^{MC}	2.13			
	W248(O)H...OC(Asn147 C) ^{MC}	2.11			
	Ctr ₁ ^d ...Ctr(5) (Trp 189 D) ^{SC}	5.18			
	C10H... Ctr(5) (Trp 189 D) ^{SC}	3.00			
	C5H...S (Cys 233 D) ^{SC}	2.67	-4.6	-71.7	
	Ctr ₂ ^e ...Ctr(6) (Trp 189 D) ^{SC}	4.12			
	C2H... Ctr(6) (Trp 189 D) ^{SC}	2.93			
	C3H... Ctr(6) (Trp 189 D) ^{SC}	2.88			
	Ctr ₂ ^e ...Ctr(6) (Tyr 231 D) ^{SC}	3.89			
C3H... Ctr(6) (Tyr 231 D) ^{SC}	2.36				

Figure 1

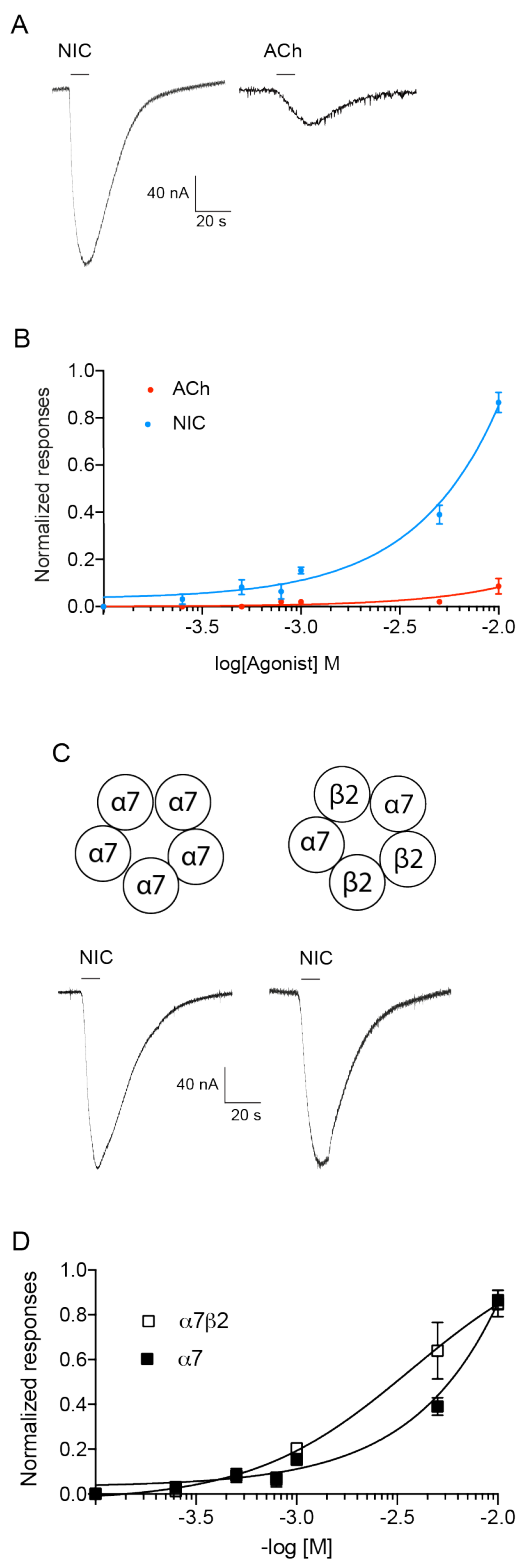


Figure 2

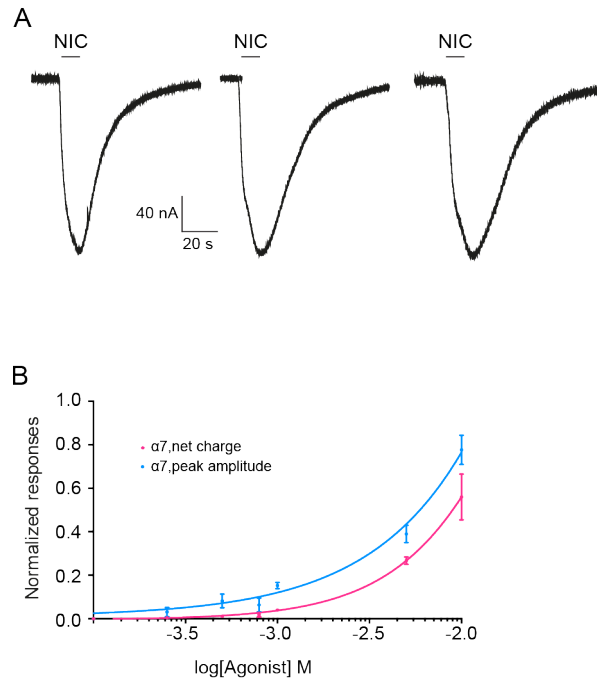


Figure 3

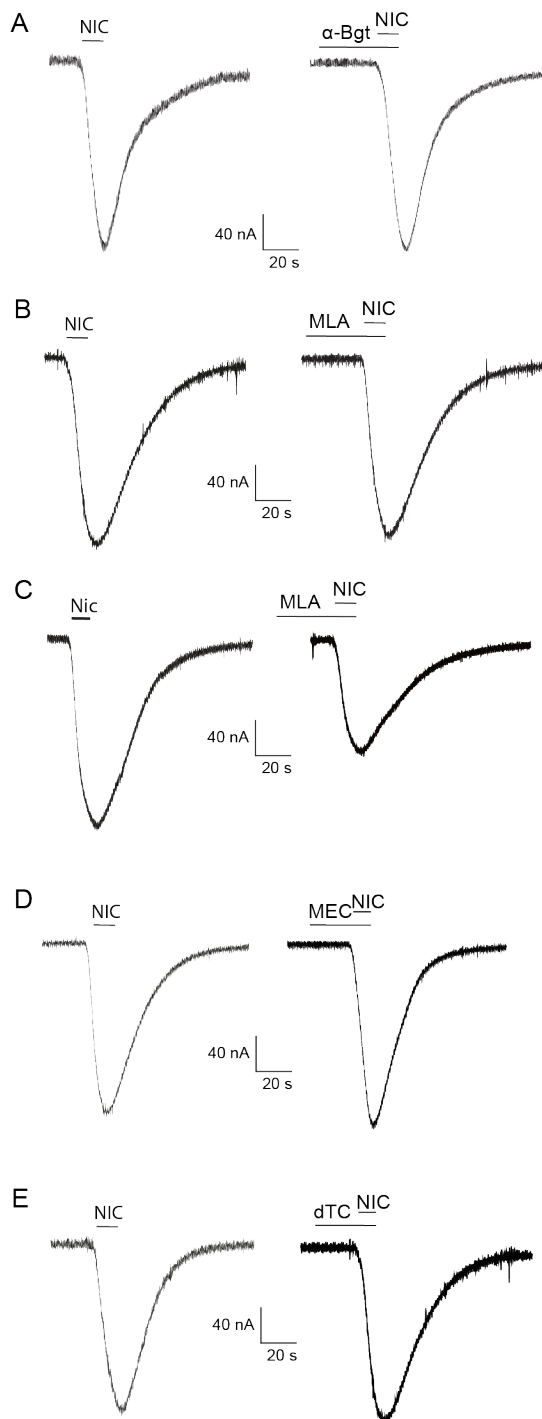


Figure 4

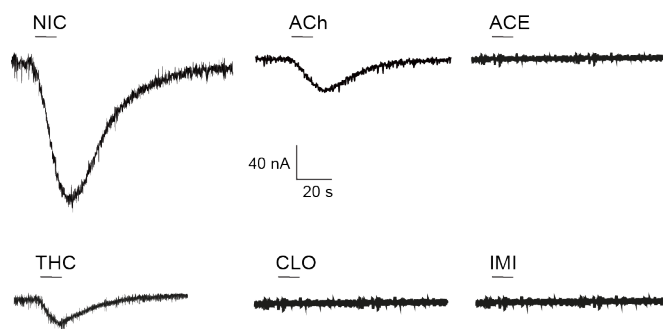


Figure 5

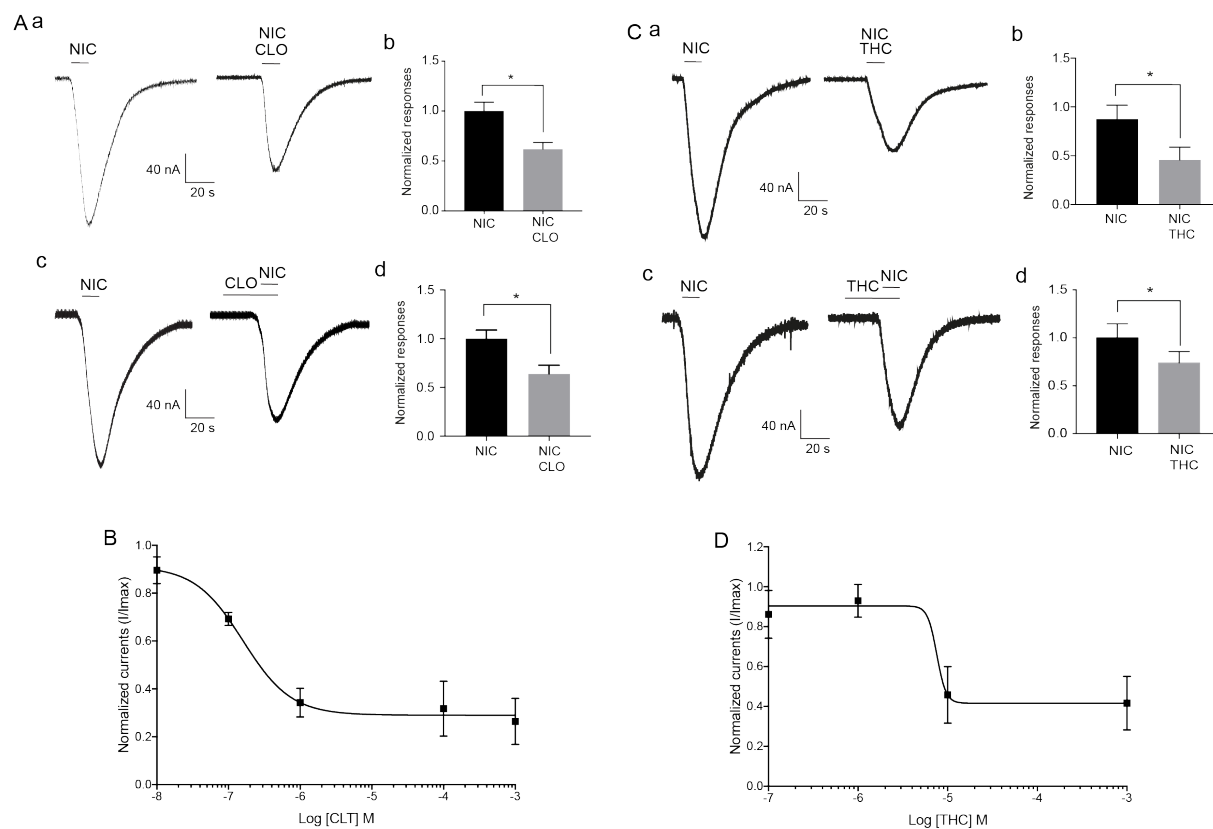


Figure 6

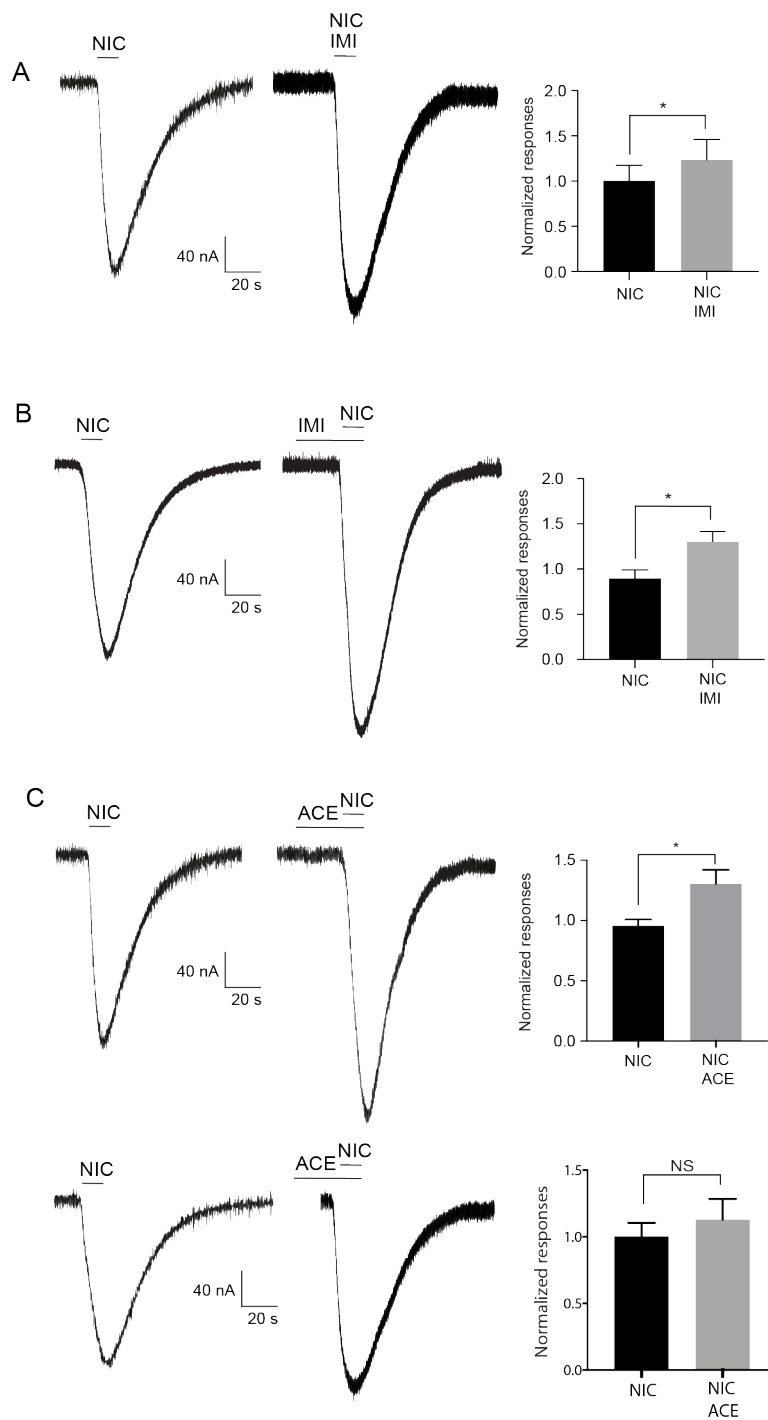


Figure 7

Ac-AChBP	1	AHSQANLMRLKSDLFNRSF--MYEGPTKDDPLTIVTLGFTLQDIVKADSSSTNEVDLVYIEQ	58
Paa7	1	SLOGPHEKRLILHTLLDHYNVLEREVANESDPLQLSFGLLMQIIDVDEKNQLLITNIWLK	60
		: . : ** *::: * ..*** ::*:** :*...*...: : : :	
Ac-AChBP	59	QRWKLNSLMWDPNEYGNITDFRTSAADIWTPDITAVSSTRP-VQVLSIQIAVVTHDGSSVM	117
Paa7	61	LEWNDVNIIRWNSTEYGGVKDLRIPPHRIWKPDVLMYNSADEGFDGTYPTNVVVRDSGSCS	120
		.*: .* *: .***.:.*: * **.*: *.*: .: * .** .** :	
Ac-AChBP	118	FIPAQRLSFMC DPTG-VDSEEGATCAVKFGSWVYSGFEIDLKTDID-QVDLSSYYASSKY	175
Paa7	121	YVPPGIEFKSTCKIDITWFPFDDQRCEMKFGSWIYDGFQLDLQLQDDTGGDISSEFITNGEW	180
		::* :. *. :. * :*****.***::*: : * *::*: :...:	
Ac-AChBP	176	EILSATQTRQVQHYS CCPEPYIDVNLVVKFRERRA	210
Paa7	181	DLIGVPGKRNEIYYNCCPEPYIDITFIIIRRTL	215
		::*.. .* : :*.*****:..: :*.*	

Figure 8

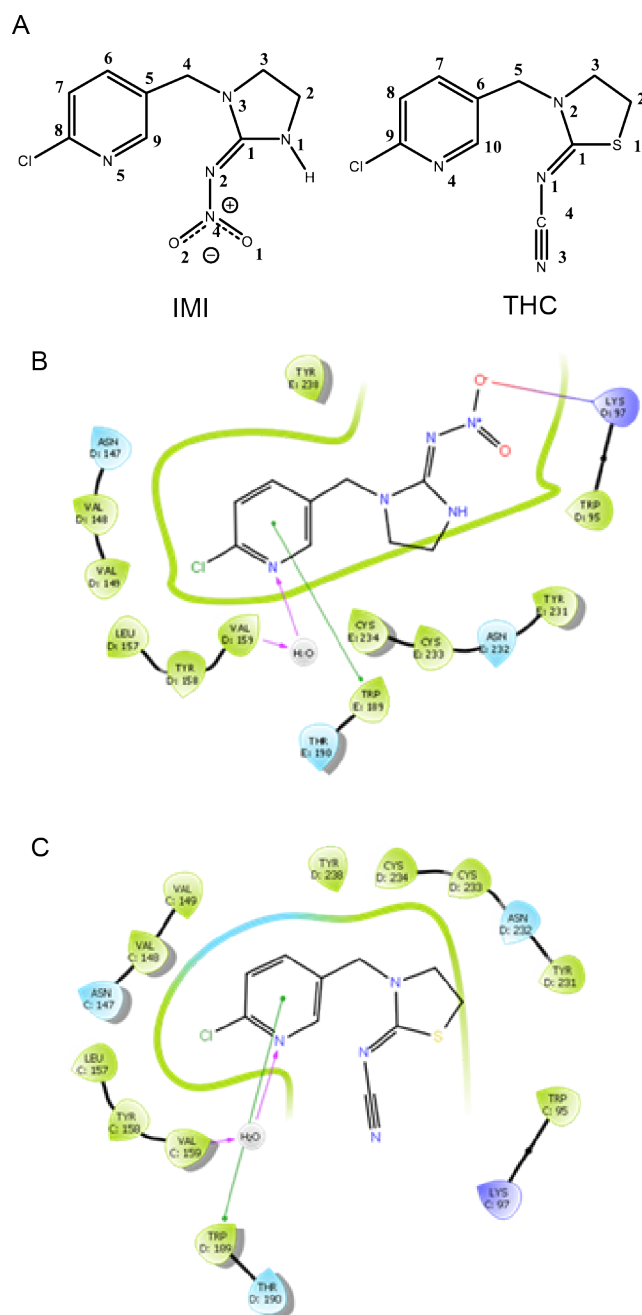
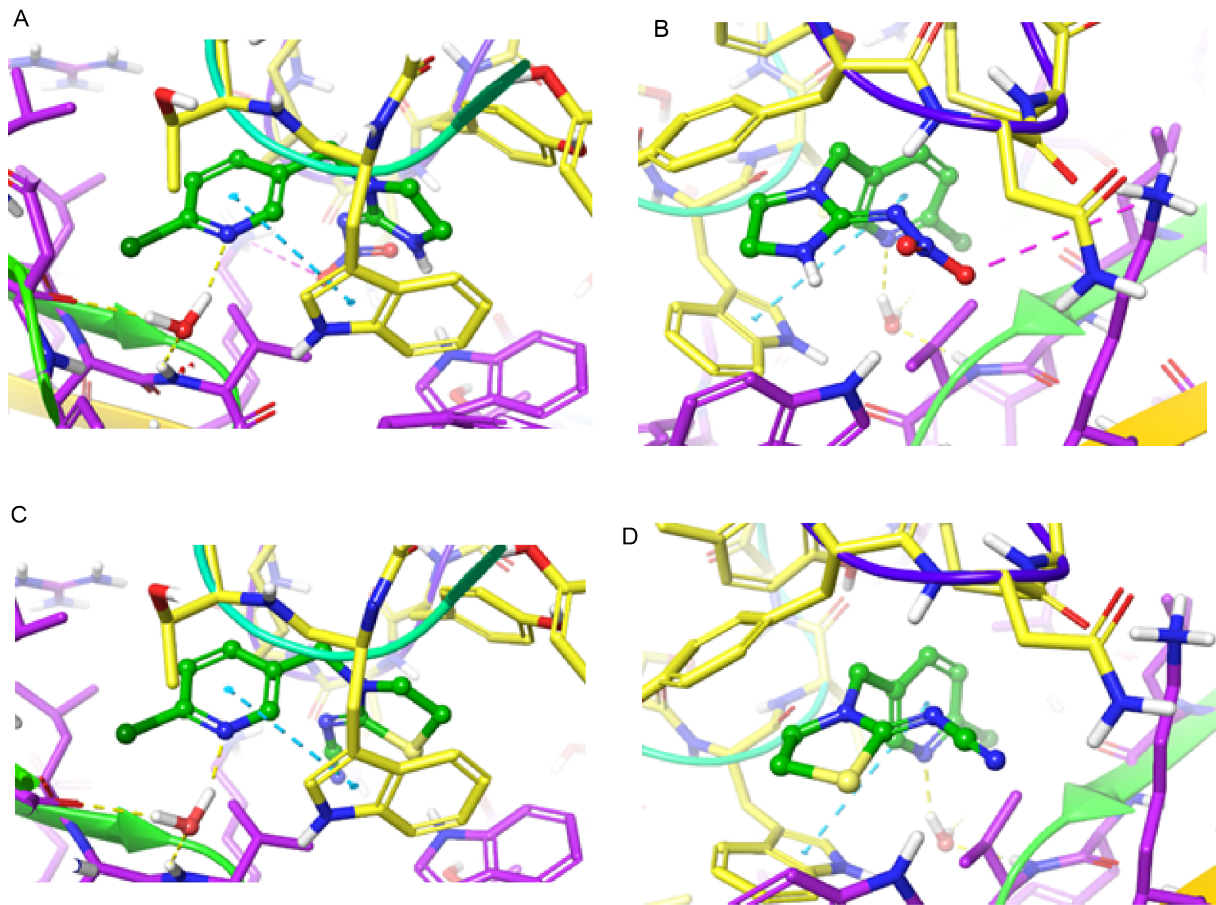


Figure 9



Chapitre II

Modulation des courants cholinergiques par les insecticides néonicotinoïdes sur le récepteur $\alpha 7$ de rat

A. Présentation synthétique de l'article :

Contexte : le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes sur les récepteurs nicotiniques neuronaux des mammifères est sujet à des polémiques. Ils sont soupçonnés d'être impliqués dans la survenue de maladie neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Paterson et Nordberg, 2000). Cependant des études précédentes ont montré qu'ils ont une forte affinité pour les récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes par comparaison à ceux des mammifères (Casida, 2018). Ces résultats ont fortement contribué à considérer que les insecticides néonicotinoïdes avaient peu ou pas d'effet chez les mammifères.

Objectifs : nous avons fait l'hypothèse que les insecticides néonicotinoïdes, bien qu'étant de faibles agonistes des récepteurs nicotiniques neuronaux de mammifères, pouvaient néanmoins moduler l'effet de l'ACh sur ces récepteurs. Au cours de ce travail, nous avons étudié la modulation exercée par trois néonicotinoïdes, la CLO, l'ACE et le TMX sur le récepteur homomérique $\alpha 7$ du rat. Ce récepteur présente un double intérêt, il est utilisé pour décrire les propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiniques neuronaux des mammifères et il nous a permis de comparer les données issues du récepteur homomérique $\alpha 7$ de la blatte (travaux suivant).

Conclusion : nous avons montré que la CLO et l'ACE étaient de faibles activateurs du récepteur homomérique $\alpha 7$ des mammifères alors que le TMX n'était pas capable d'induire des courants. Cependant, l'étude de la modulation a montré que les 3 molécules étaient capables de moduler la réponse induite par l'ACh lorsqu'un pré-traitement était appliqué. Les modulations qui en résultent sont différentes en fonction des molécules appliquées ; l'ACE et la CLO permettent de doubler la réponse induite par l'ACh alors que le TMX induit une diminution de la réponse. Nous émettons alors l'hypothèse que ces néonicotinoïdes sont capables d'agir comme des modulateurs allostériques des nAChRs de mammifères. Cependant, comme montré précédemment, en utilisant la combinaison de plusieurs pesticides (Yi *et al.*, 2012, Taillebois et Thany, 2016), nos résultats pourraient être dus à des effets additifs, synergiques ou antagonistes des trois néonicotinoïdes avec l'ACh, sur le récepteur $\alpha 7$. Pour conclure nos

résultats révèlent l'existence d'une interaction complexe entre les néonicotinoïdes et le récepteur $\alpha 7$ de rat.

B. Publication n°2 : Cartereau et *al.*, 2017

RESEARCH PAPER THEMED ISSUE

Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors

Correspondence Professor Steeve H. Thany, Université d'Orléans, LBLGC, UPRES EA 1207-USC INRA 1328, 1 rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans, France. E-mail: steeve.thany@univ-orleans.fr

Received 19 February 2017; **Revised** 11 August 2017; **Accepted** 17 August 2017

Alison Cartereau, Carine Martin and Steeve H Thany 

LBLGC, UPRES EA 1207-USC INRA 1328, Université d'Orléans, Orléans, France

BACKGROUND AND PURPOSE

Neonicotinoid insecticides are described as poor agonists of mammalian nicotinic ACh receptors. In this paper, we show that their effects on mammalian nicotinic receptors differ between compounds.

EXPERIMENTAL APPROACH

Two-electrode voltage-clamp electrophysiology was used to characterize the pharmacology of three neonicotinoid insecticides on nicotinic $\alpha 7$ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Single and combined application of clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam were tested.

RESULTS

Two neonicotinoid insecticides, clothianidin and acetamiprid, were partial agonists of mammalian neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors, whereas another neonicotinoid insecticide, thiamethoxam, which is converted to clothianidin in insect and plant tissues, had no effect. Pretreatment with clothianidin and acetamiprid (10 μ M) ACh significantly enhanced the subsequent currents evoked by ACh (100 μ M) whereas pretreatment with thiamethoxam (10 μ M) reduced ACh-induced current amplitudes. A combination of the three neonicotinoids decreased the ACh-evoked currents.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The present findings suggest that neonicotinoid insecticides differ markedly in their direct effects on mammalian $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors and can also modulate ACh-induced currents. Furthermore, our data indicate a previously unknown modulation of mammalian $\alpha 7$ nicotinic receptors by a combination of clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam.

Abbreviations

nAChR, nicotinic ACh receptor; SOS, standard oocyte saline



Introduction

Neuronal **nicotinic ACh receptors** (nAChRs) are ligand-gated ion channels that are located at pre- and postsynaptic sites within the central and peripheral nervous system (Wonnacott, 1997; Rousseau *et al.*, 2005). These pentameric receptors are generated from different sets of subunits, and the various subunit combinations differ in their pharmacological and kinetic properties and also in their cellular and subcellular localization in the brain (Gotti *et al.*, 2006; Gotti *et al.*, 2009). The $\alpha 7$ homo-oligomer is one of the main types of nAChRs in the brain, widely distributed and characterized by a fast activation, a low affinity and a high calcium permeability (Millar and Gotti, 2009; Taly *et al.*, 2009). Several reports indicate that **$\alpha 7$ nAChRs** are implicated in the pathophysiology of neurodegenerative diseases (Paterson and Nordberg, 2000). The involvement of the $\alpha 7$ nAChRs in neurodegenerative diseases is in part due to their high expression in brain regions that are involved in cognitive processes (Levin *et al.*, 2006). Thus, $\alpha 7$ nAChRs and **β -amyloid** are co-localized in cortical regions of patients with Alzheimer's disease (Wang *et al.*, 2000a,b, 2003; Pym *et al.*, 2005, 2007).

Because of the neuronal importance of $\alpha 7$ nAChRs, they are currently used as tools to identify and characterize the mode of action of diverse compounds that can act as agonists, antagonists and modulators of neuronal nAChRs (Davies *et al.*, 1999; Collins and Millar, 2010; Gill *et al.*, 2013; Echeverria *et al.*, 2016). For example, **ivermectin**, a macrocyclic lactone, used commercially as an antiparasitic agent in both human and veterinary medicine, was not able, by itself, to activate currents but acted as a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs (Krause *et al.*, 1998; Burkhart, 2000; Collins and Millar, 2010). Indeed, ivermectin displayed no agonist activity on rat $\alpha 7$ nAChRs expressed in *Xenopus* oocytes but caused a potentiation of **ACh**-induced responses after pretreatment (Krause *et al.*, 1998; Sattelle *et al.*, 2009). These data added to our understanding of the observed diversity of ivermectin actions on vertebrate and invertebrate ligand-gated ion channels.

Among the large number and variety of compounds binding to vertebrate and invertebrate nAChRs, neonicotinoid insecticides are of special interest. Indeed, in 2011, the market share of neonicotinoids in the total global market for insecticides was 28.5% (US \$12.75 million) (Jeschke *et al.*, 2013). They have no cross-resistance to conventional, longer established insecticide classes and are replacing the older and environmentally less benign classes, such as pyrethroids, organophosphates, carbamates and several other classes of insecticides used in agriculture. Neonicotinoid insecticides act as agonists of insect neuronal nAChRs with much higher affinity than that of **nicotine** and ACh. They are considered more toxic to insects (Tomizawa and Casida, 2005; Tomizawa and Casida, 2003) because of their chemical structures, their binding site interactions at the corresponding insect nAChRs and their hydrophobicity, which improves the penetrability of insect integument, enhancing insecticidal efficacy (Tomizawa and Casida, 2009; Tomizawa *et al.*, 2011). Indeed, binding studies reveal that imidacloprid and the parent compounds bound with very low affinities to the rat brain membranes and neuronal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Kagabu *et al.*, 2000; Lansdell and Millar, 2000). Moreover, currents elicited

by ACh are differently potentiated by clothianidin and imidacloprid suggesting that the effects of neonicotinoids on ACh-induced currents could be dependent on the chemical structure of neonicotinoids (Toshima *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

In the present study, we investigated the mode of action of three different neonicotinoids, clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam on rat $\alpha 7$ neuronal nAChRs. These three compounds are members of a group of seven major commercial neonicotinoid insecticides used worldwide, the others being imidacloprid, thiacloprid, dinotefuran and nitenpyram (Jeschke *et al.*, 2013). In addition, we wanted to investigate whether clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam in low concentrations, impaired ACh-induced currents in mammalian $\alpha 7$ receptors. We demonstrated that clothianidin and acetamiprid were partial agonists of $\alpha 7$ nAChRs whereas thiamethoxam had no agonist effect. Also, the three compounds were able to modulate ACh-evoked currents in different ways.

Methods

Preparation of cRNA

Rat neuronal $\alpha 7$ nAChR (GenBank accession number: S53987) and human RIC3 (GenBank accession number: AY326435) clones were obtained from Prof. Roger Papke (University of Florida) and Prof. Millet Treinin (University of Jerusalem). Each cDNA was cloned into the pGem vector. Recombinant plasmid containing rat $\alpha 7$ nAChR and RIC3 were linearized with SmaI (New England Biolabs, Ipswich, USA) or NheI (Promega, Madison, USA) respectively. Capped RNAs were transcribed *in vitro* using T7 mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Austin, USA). After linearization and purification of cloned cDNAs, RNA transcripts of $\alpha 7$ and RIC3 were injected in the oocytes for electrophysiological recordings. *Xenopus laevis* oocytes were obtained from the CRB Xenope, University of Rennes, France. The CRB Xenope is a French national platform dedicated to *Xenopus* breeding for experimental research. Experiments were conducted during 2 years, and at least 10 female frogs (between 10 and 12 frogs) were used for the studies. Thus, the number of batches (frogs) '*n*' for each experimental group or condition is indicated and, except where indicated, a minimum of 120 oocytes per batch were recorded for each experimental condition.

Oocyte injection

Oocytes were kept in standard oocyte saline (SOS) of the following composition: in mM, 100 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ and 5 HEPES, pH 7.5. Stages V and VI oocytes were defolliculated manually using fine forceps, after treatment with 2 mg·mL⁻¹ collagenase IA (Sigma, France) in Ca²⁺-free SOS solution, supplemented with 0.8 mg·mL⁻¹ trypsin inhibitor. Defolliculated oocytes were injected in the vegetal pole with approximately 50 nL (3–6 ng per oocytes) (Papke *et al.*, 2004) capped RNA and maintained at 19°C in sterile SOS solution supplemented with penicillin (100 U·mL⁻¹), streptomycin (100 mg·mL⁻¹), gentamycin (50 mg·mL⁻¹) and

sodium pyruvate (2.5 mM). This medium was replaced at 24 h intervals.

Voltage-clamp recordings

Two-electrode voltage clamp electrophysiology was conducted using DAGAN TEV-200A amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, USA). Membrane currents were recorded between 4 and 7 days after injection (Papke *et al.*, 2004), using two microelectrodes filled with 3 M KCl and had a resistance ranging between 0.2 and 5 M Ω . The oocyte membrane potential was held at -60 mV and perfused continuously with recording buffer at room temperature (20–22°C). To obtain dose–response relations, the neurotransmitters were applied during 5 s, at 5–10 min intervals. To evaluate synergic effects, the neonicotinoids were applied during 4–5 min before the co-application with ACh. Experimental data were digitized with a Digidata-1322A A/D converter and later analysed with pCLAMP (Molecular Devices, Union City, CA, USA). All agonist preparations were prepared with recording buffer. The EC₅₀ values were determined using nonlinear regression on normalized data (1 mM ACh as maximal response) using GraphPad Prism software.

Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). All data were collected and analysed without knowledge of the treatments (blinded). Data were shown as mean \pm SD and analysed using Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Responses to experimental neonicotinoid applications were determined relative to the preceding ACh control responses in the same experimental conditions, in order to normalize the data, compensating for the varying levels of channel expression among the oocytes (Papke *et al.*, 2004). The dose–response curves were derived from the fitted curve following the equation: $Y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + 10^{(\log(EC_{50} - X)^H)})$ where Y is the normalized response, I_{max} and I_{min} are the maximum and minimum responses, H is the Hill coefficient, EC₅₀ is the concentration giving half the maximum response and X is the logarithm of the compound concentration. In the experiments in which neonicotinoids were used in combination, we used ‘effect-based strategy’ method, in particular, the Bliss independence model (see Zhao *et al.*, 2014; Fouquier and Guedj, 2015). For each condition, the combination index (CI), which was the standard measure of combination effect, was determined. $CI = (E_A + E_B - E_{AEB}) / E_{AB}$, where E_A and E_B represent two drugs A and B, with respective effects E_A and E_B, and of combined effect E_{AB}. Thus, CI values >1 indicates antagonism, CI values <1 synergism and CI values = 1, an additive effect (Zhao *et al.*, 2014; Fouquier and Guedj, 2015). Differences between group means were tested for significance by the Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks followed by a modified Student’s *t*-test (Bonferroni *post hoc* test) in the case of single and multiple comparisons respectively. $P < 0.05$ was the accepted minimum level of significance.

Materials

ACh, nicotine, clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam were purchased from Sigma (St Quentin, France).

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Southan *et al.*, 2016), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16 (Alexander *et al.*, 2015).

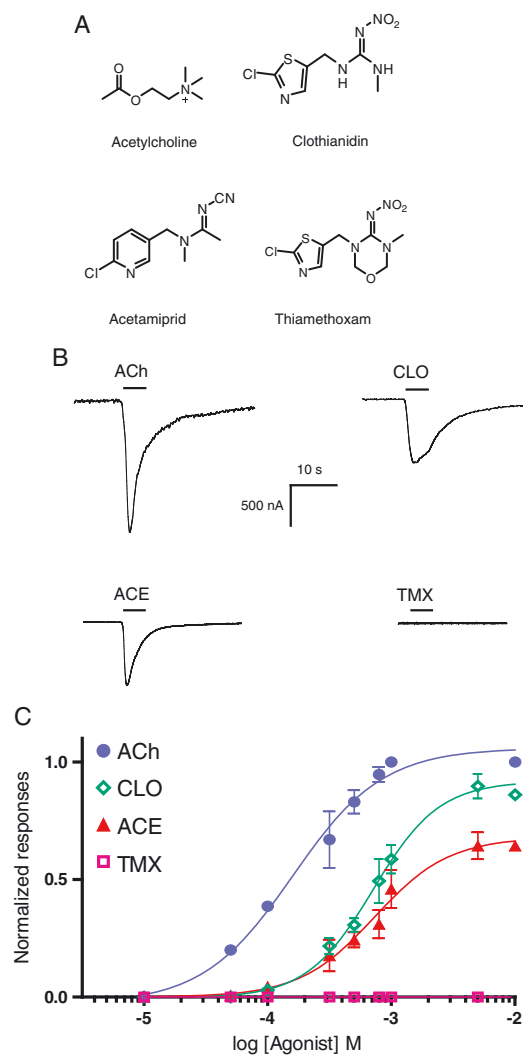


Figure 1

Effects of ACh, clothianidin (CLO), acetamiprid (ACE) and thiamethoxam (TMX) on rat $\alpha 7$ neuronal nAChRs. (A) Chemical structure of ACh and the neonicotinoid insecticides studied (clothianidin, acetamiprid, thiamethoxam). (B) Currents induced by bath application of 1 mM ACh, clothianidin and acetamiprid. As shown, 1 mM thiamethoxam induced no current, at any concentration. Each bar indicates when the compound is added. (C) Dose–response curves recorded for control (ACh) and for clothianidin, acetamiprid or thiamethoxam. Responses are normalized to the responses induced by 1 mM ACh and fitted to the Hill equation (see Methods section). Each point plotted in the concentration–response curves represents mean \pm SEM of oocytes from 12 different frogs. For each experimental condition, 180 oocytes per batch were recorded.



Results

Clothianidin and acetamiprid act as partial agonists of $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors and increase ACh-induced currents

For better understanding of the mode of action of the three neonicotinoid insecticides (Figure 1A), they were first applied to *Xenopus* oocytes expressing rat neuronal $\alpha 7$ homomeric nAChRs. Bath application of 1 mM clothianidin and acetamiprid induced inward currents, which desensitized rapidly upon prolonged application of the neonicotinoids (10 s application). At 1 mM concentration, the maximum currents were -0.46 ± 0.08 for acetamiprid and -0.57 ± 0.09 μ A for clothianidin. The mean current amplitudes were 1.71 ($P < 0.05$, $n = 12$; Figure 1B) and 1.95 ($P < 0.05$, $n = 12$; Figure 1B) fold lower than for ACh. The amplitudes of the clothianidin and acetamiprid-elicited currents were concentration-dependent with EC_{50} values (in mM) of 0.16 ± 0.06 (ACh), 0.74 ± 0.07 (clothianidin) and 0.73 ± 0.06 (acetamiprid). Interestingly, thiamethoxam, which is metabolized to clothianidin only in insects and plants (Nauen *et al.*, 2003; Benzidane *et al.*, 2010), had no agonist effect (Figure 1B, C). Clothianidin and acetamiprid appeared as activators of $\alpha 7$ nAChRs (Figure 1B, C). The dose–response curves were fitted with the Hill equation and the data are shown in Table 1. Thus, despite the close similarity of these three compounds, they differed in their action on rat neuronal $\alpha 7$ nAChRs.

In the second set of experiments, we studied the modulatory effect of low concentrations of the three neonicotinoid insecticides on ACh-induced currents in oocytes expressing $\alpha 7$ nAChRs. Coapplication (without pretreatment) of clothianidin or acetamiprid (both 10 μ M) with 100 μ M ACh (which is close to its EC_{50}) did not change ACh-evoked current amplitudes (Figure 2A, B). However, pretreatment of the oocytes for 4 min, with the same concentration of clothianidin or acetamiprid (10 μ M) before coapplication (10 s) of 100 μ M ACh significantly increased ACh-induced current amplitudes (Figure 2C, D), almost two-fold. In contrast, no significant effect was found when the oocytes were pretreated with a low concentration of ACh (10 μ M) before the coapplication of clothianidin or acetamiprid at the higher concentration (100 μ M) (Figure 3A, B). To confirm that

Table 1

I_{max} , pEC_{50} and Hill coefficient values for ACh, clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam on rat neuronal $\alpha 7$ nAChRs

	I_{max} (μ A)	pEC_{50}	Hill
ACh	1.0	3.80 ± 0.08	1.192 ± 0.21
Clothianidin	0.57 ± 0.06	3.13 ± 0.05	1.559 ± 0.35
Acetamiprid	0.46 ± 0.09	3.13 ± 0.08	1.435 ± 0.45
Thiamethoxam	0	ND	ND

The values shown (means \pm SEM) were determined from the concentration–response curves, generated from oocytes from 12 different frogs. The maximum currents (I_{max}) are shown as the ratio of the maximum response to that for 1 mM ACh (set to unity). ND: not determined.

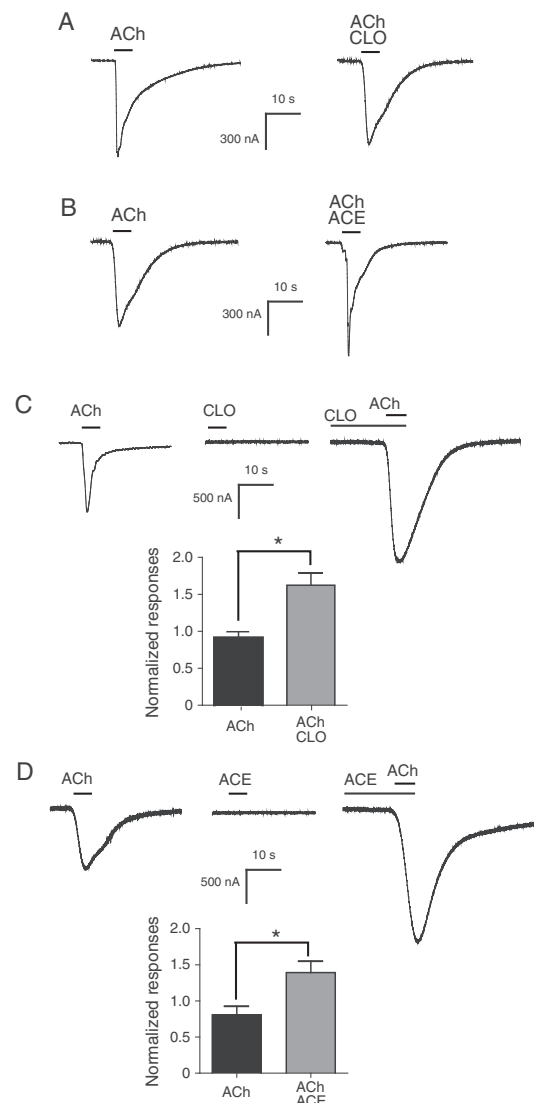


Figure 2

Clothianidin and acetamiprid enhance ACh-induced current amplitudes of the rat $\alpha 7$ neuronal nAChR. (A and B) coapplication without pretreatment. In the left, currents induced by 100 μ M ACh. In the right, coapplication of 10 μ M clothianidin (CLO) or acetamiprid (ACE) with 100 μ M ACh induces neither a significant increase nor decrease of ACh-evoked currents. (C and D) Pretreatment with 10 μ M clothianidin and acetamiprid. In the left, currents induced by 100 μ M ACh. In the middle, effects of 10 μ M clothianidin and 10 μ M acetamiprid. Clothianidin and acetamiprid alone did not induce currents but, used as a preapplication, strongly increased the subsequent response to ACh (on the right). Each bar in the current indicates when the compound is added. Histograms under the currents illustrate the increase of ACh-induced current amplitudes after pretreatment with 10 μ M clothianidin (C) and acetamiprid (D). Each histogram represents mean \pm SEM of oocytes from 12 frogs. For each experimental condition, 120 oocytes per batch were recorded. * $P < 0.05$, significantly different as indicated.

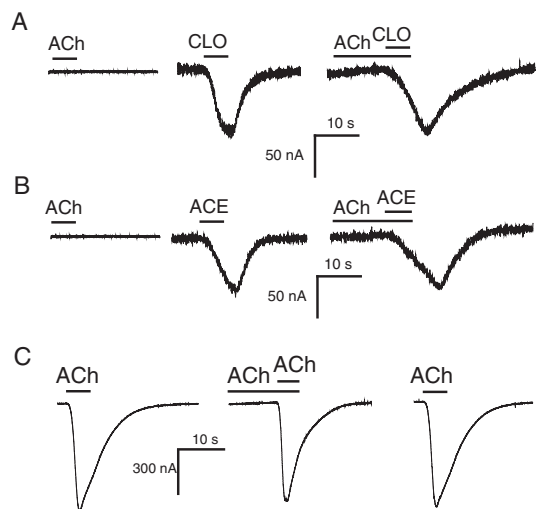


Figure 3

Responses evoked by 100 μM clothianidin or acetamiprid when oocytes are pretreated with 10 μM ACh. (A and B) Cells are pretreated with 10 μM ACh. In the left, application of 10 μM ACh did not induce any currents. In the middle, responses evoked by 100 μM clothianidin (CLO; upper traces) and 100 μM acetamiprid (ACE; lower traces). In the right, oocytes are pretreated with 10 μM ACh. Exposure to 10 μM ACh alone did not induce currents nor did it affect the clothianidin- or acetamiprid-evoked currents. (C) To confirm that 10 μM ACh does not desensitize the rat $\alpha 7$ neuronal nAChR, we measured ACh-evoked currents after 4 min pretreatment with 10 μM ACh. In this condition, pretreatment with 10 μM ACh has no effect on the responses evoked by 100 μM ACh. Each bar indicates when the compound is added.

pretreatment with 10 μM ACh did not induce desensitization of the receptors or any modulatory effect of the neonicotinoids, we measured responses to 100 μM ACh after pretreatment with 10 μM ACh, and found no effect of this pretreatment on the current induced by the higher concentration of ACh (Figure 3C). We then generated concentration–response curves to ACh after pretreatment of the oocytes with clothianidin or acetamiprid (10 μM). As shown in Figure 4A, the concentration–response curves were left-shifted when compared to the curve obtained with ACh pretreatment. The resulting EC_{50} values were 0.47 ± 0.09 and 0.89 ± 0.2 mM for the binary combinations ACh/clothianidin and ACh/acetamiprid respectively. The reproducibility of the currents over time was also measured using repeated applications (10 s application at 5 min intervals) of the compounds on the same oocyte. These responses were stable and reproducible, and the potentiation of the ACh-induced current was maintained, for either neonicotinoid compound, for at least 30 min (Figure 4B).

Thiamethoxam, a poor agonist of nAChRs, inhibits ACh- and nicotine-induced current amplitudes

Based on the previous set of results, thiamethoxam was not able to activate $\alpha 7$ nAChRs. Nevertheless, a low

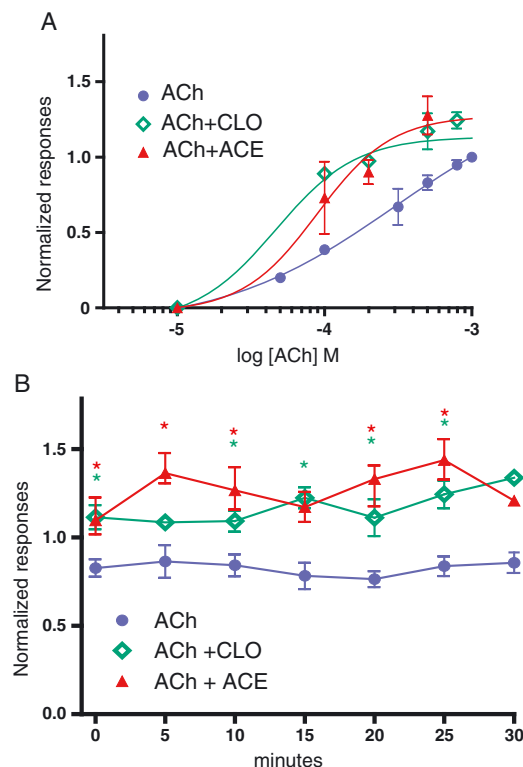


Figure 4

Dose–response and time course effects of 100 μM clothianidin and acetamiprid coapplied with 100 μM ACh on oocytes expressing $\alpha 7$ nAChRs. (A) Dose–response relationships of 100 μM ACh alone and coapplied with 10 μM clothianidin (CLO) and 10 μM acetamiprid (ACE). Each point represents mean \pm SEM of the mean ($n = 12$). (B) Time course of ACh of 100 μM ACh (control condition) with 10 μM clothianidin and 10 μM acetamiprid. ACh, clothianidin and acetamiprid are coapplied for 5 s in bath solution, every 5 min. Each point represents mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. In each experimental condition, 120 oocytes per batch were recorded. Currents are normalized with 100 μM ACh using the same oocyte. * $P < 0.05$, significantly different as indicated.

concentration of thiamethoxam (10 μM) decreased the ACh-induced current amplitudes when it was coapplied with 100 μM ACh (Figure 5A). A similar decrease was observed when the oocytes were pretreated with 10 μM thiamethoxam before coapplication of 100 μM ACh (Figure 5B). In the next set of experiments, thiamethoxam was used as a pretreatment in order to compare its effects with those of clothianidin and acetamiprid. Thus, using the single effective dose of ACh (100 μM) and pretreatment with 10 μM thiamethoxam, the ACh-activated current was significantly reduced by $33 \pm 4\%$ ($n = 10$; Figure 5C), compared with currents induced by 100 μM ACh alone. Note that when oocytes were pretreated with 10 μM ACh, there was no effect on the response to 100 μM ACh (Figure 5C). As shown in Figure 5D, the concentration–response curve to ACh was right-shifted by pretreatment with thiamethoxam (10 μM) (Figure 5D) and the effects of different pretreatment concentrations of thiamethoxam (Figure 5E) revealed only a partial inhibition



A Cartereau et al.

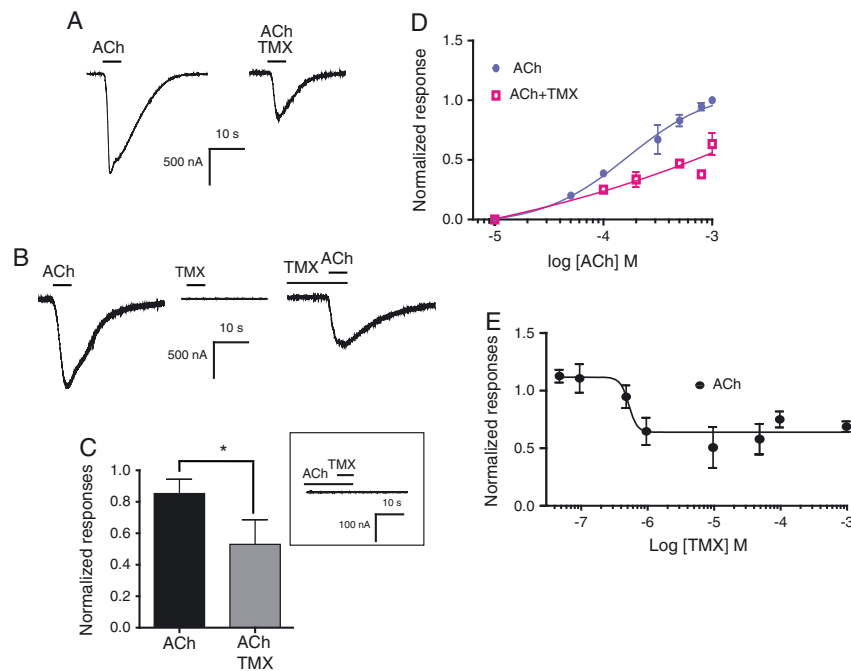


Figure 5

Modulatory effect of 10 μ M thiamethoxam on ACh-induced currents. (A) Coapplication without pretreatment. Coapplication of 10 μ M thiamethoxam (TMX) with 100 μ M ACh significantly reduces ACh-induced current amplitudes. (B) Pretreatment with 10 μ M thiamethoxam (4–5 min pretreatment). In the left, current represents response recorded in control condition (100 μ M ACh). In the middle, 10 μ M thiamethoxam neither induces currents. In the right, 10 μ M thiamethoxam strongly decreases ACh-induced current amplitude. Each bar indicates when the compound is added. (C) Histograms illustrating the decrease of ACh-induced current amplitudes after pretreatment with 10 μ M thiamethoxam. Data are mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. * $P < 0.05$, significantly different as indicated. Inset, oocytes are pretreated with 10 μ M ACh and coapplied with 100 μ M thiamethoxam. No effect was found. (D) Dose–response relationship of ACh coapplied with 10 μ M thiamethoxam. Each point represents mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. (E) Inhibitory curve illustrating the effect of thiamethoxam on ACh responses. Data are plotted as mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. In each experimental condition, we used 120 oocytes per batch.

of the ACh-induced currents, through the $\alpha 7$ nAChRs (Figure 5E). Interestingly, under the same conditions, we demonstrated that 10 μ M thiamethoxam completely blocked currents induced after coapplication of 100 μ M nicotine (Figure 6A), but pretreatment with 10 μ M nicotine had no effect on the response to the high concentration (100 μ M) of thiamethoxam (Figure 6B). These data showed that thiamethoxam decreased ACh-induced and nicotine-induced current amplitudes, implying an antagonist, rather than agonist, activity of thiamethoxam on rat $\alpha 7$ nAChRs. Moreover, these results were in agreement with the finding that all neonicotinoids showed low binding affinity for mammalian nAChRs but were able to modulate ACh-induced currents.

Combined applications of clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam differently modulate ACh-induced current amplitudes

The development of insect resistance against pesticides and whole-field applications has led to the use of mixtures of insecticides (Willmott *et al.*, 2013). As a result, Wang *et al.*, (2017) proposed that the reported negative effect of pesticides could derive from the combination of pesticides. We therefore next investigated the modulatory effect of the three

neonicotinoids when used in combination, at the same concentration (10 μ M). Combined application of thiamethoxam with clothianidin decreased the peak amplitude of ACh-induced current by about 50% ($n = 12$; Figure 7A). Further, combined application of thiamethoxam with acetamiprid strongly reduced ACh currents, inducing about 70% inhibition of the peak ACh current amplitude ($n = 12$; Figure 7B). Interestingly, we found that the combination of clothianidin and acetamiprid also significantly reduced ACh currents to $47 \pm 20\%$ ($n = 12$; Figure 7C). This finding was unexpected because these neonicotinoids, used separately, had shown agonist effects, as shown above (Figure 1B, C). We therefore tested the concentration-dependence of this finding, measuring the response to 100 μ M ACh in the presence of 10 μ M clothianidin and increasing the concentration of acetamiprid. As shown in Figure 7D, pretreatment with 10 μ M clothianidin and increasing acetamiprid concentrations antagonized the currents induced by 100 μ M ACh. A similar reduction of ACh-induced currents was found using a combination of the three neonicotinoids, thiamethoxam, clothianidin and acetamiprid, all at 10 μ M, ($n = 10$; Figure 8). Calculations using the CI equation (Zhao *et al.*, 2014; Fouquier and Guedj, 2015) suggested that all neonicotinoid mixtures were antagonistic. The CIs were 2.1, 1.9, 1.2 and

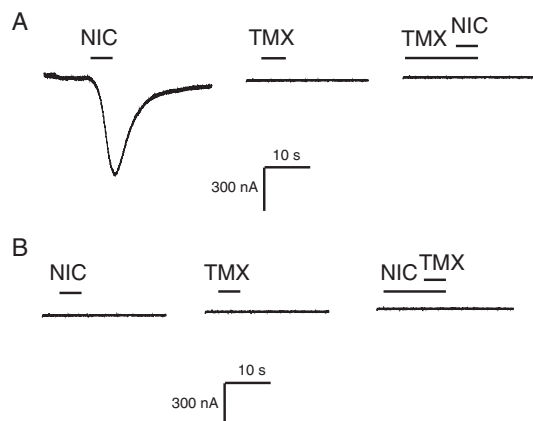


Figure 6

Effect of thiamethoxam on nicotine-induced currents. (A) In the left, current induced by 100 μ M nicotine. In the middle, 10 μ M did not induce current. In the right, inward currents induced by 100 μ M nicotine are completely blocked when oocytes are pretreated with 10 μ M thiamethoxam. (B) 10 μ M nicotine (left) or thiamethoxam (middle) did not induce currents. Pretreatment of oocytes with 10 μ M nicotine did not enhance thiamethoxam-induced currents (right). Each bar indicates when the compound is added.

2.4 for the combinations acetamiprid/clothianidin, thiamethoxam /clothianidin, thiamethoxam/acetamiprid and thiamethoxam /acetamiprid /clothianidin respectively.

Although the inhibition observed in the combinations containing thiamethoxam could be explained by the antagonist activity of thiamethoxam, we cannot exclude the possibility that acetamiprid and clothianidin, in a complex mechanism, could act as negative modulators of the $\alpha 7$ nAChRs. Because all combinations of the three neonicotinoids were antagonistic, whereas each neonicotinoid used singly had clearly differing effects, we analysed further the currents induced by combined application of the higher concentrations of the neonicotinoids, after pretreatment with 10 μ M ACh. As shown in Figure 9, currents induced by the combined application of thiamethoxam with acetamiprid (both 100 μ M) were strongly enhanced after the pretreatment with ACh ($n = 10$; Figure 9A). Current amplitudes were similarly increased when 100 μ M thiamethoxam was combined with 100 μ M clothianidin ($n = 10$; Figure 9B), and by the combination of all three neonicotinoids ($n = 10$; Figure 9C). Note that pretreatment with 10 μ M ACh did not change current amplitudes induced by the combined application of 100 μ M clothianidin and acetamiprid (Figure 9D), suggesting that thiamethoxam could change the interactions between ACh and neonicotinoid insecticides.

Discussion

Clothianidin and acetamiprid act as partial agonists of $\alpha 7$ nAChRs

Neonicotinoid insecticides are considered as agonists of neuronal nAChRs acting selectively on insect nAChR subtypes (Tomizawa and Casida, 2003; Casida and Quistad, 2004). This

assumption is based in part in the study of the commercially used neonicotinoid, imidacloprid. This neonicotinoid did not activate the mammalian $\alpha 4\beta 2$ nAChR subtype expressed in *Xenopus* oocytes at doses up to 100 μ M, but induced a weak activation of the $\alpha 7$ nAChRs (Yamamoto *et al.*, 1998). But responses to imidacloprid were further enhanced in the presence of the E219P mutation in loop C of the $\alpha 4$ subunit (Toshima *et al.*, 2009). In this study, we have demonstrated that clothianidin and acetamiprid were partial agonists of mammalian neuronal $\alpha 7$ nAChRs while thiamethoxam exhibited no agonist activity. Our data are in agreement with studies from Li *et al.* (2011), demonstrating that clothianidin is a weak agonist of $\alpha 4\beta 2$ receptors with peak current amplitudes of 1–4% of the responses to 1 mM ACh. Interestingly, we found that clothianidin and acetamiprid strongly enhanced ACh-induced current amplitudes after pretreatment. The effects of clothianidin and acetamiprid were similar to those of ivermectin, a semisynthetic analogue of the natural compound avermectin. Ivermectin acts as a positive allosteric modulator of mammalian $\alpha 7$ nAChRs (Krause *et al.*, 1998; Chatzidaki and Millar, 2015), increasing ACh-induced currents when it is used as a pretreatment (Krause *et al.*, 1998). In addition, we found that thiamethoxam transiently inhibited ACh-induced currents, as previously demonstrated with imidacloprid on human $\alpha 4\beta 2$ receptors (Li *et al.*, 2011). Moreover, we demonstrated that thiamethoxam completely blocked nicotine-induced current amplitudes demonstrating that it acted as an antagonist of $\alpha 7$ nAChRs. Other studies, using imidacloprid, clothianidin and thiacloprid, have already shown that imidacloprid and clothianidin potentiated ACh responses, but thiacloprid attenuated the ACh-evoked responses in a concentration-dependent manner when coapplied with ACh (Toshima *et al.*, 2008). These effects were explained by an equilibrium two-site receptor occupation model in which sequential occupation of the two agonist binding sites by two different agonists greatly enhanced the probability of opening the nAChR channel. If the potentiation induced by clothianidin and acetamiprid could be explained by a similar mechanism, such an explanation would not apply to the effects of combinations of neonicotinoids which include thiamethoxam. Nevertheless, the agonist effect of the second-generation neonicotinoids such as clothianidin and acetamiprid correlates well with the proposition that these compounds have effects which differ from those of imidacloprid.

Mixtures of neonicotinoids differ in their modulation of ACh-induced current amplitudes

Eco-toxicological risk assessments and monitoring of agricultural use of pesticides demonstrate that insecticides are rarely present alone. Indeed, complex mixtures of insecticides could be found in the environment due to adverse weather events, such as storm water run-off or to spray drift during application. Thus, individuals would be exposed to mixtures of environmental pesticides rather than to one pesticide. In addition, low concentrations of pesticide mixtures can cause significant damage, similar to higher concentrations of individual pesticides (Sultana Shaik *et al.*, 2016). Here, we found that clothianidin, acetamiprid and thiamethoxam, at the same low concentration (10 μ M), differently modulated



A Cartereau et al.

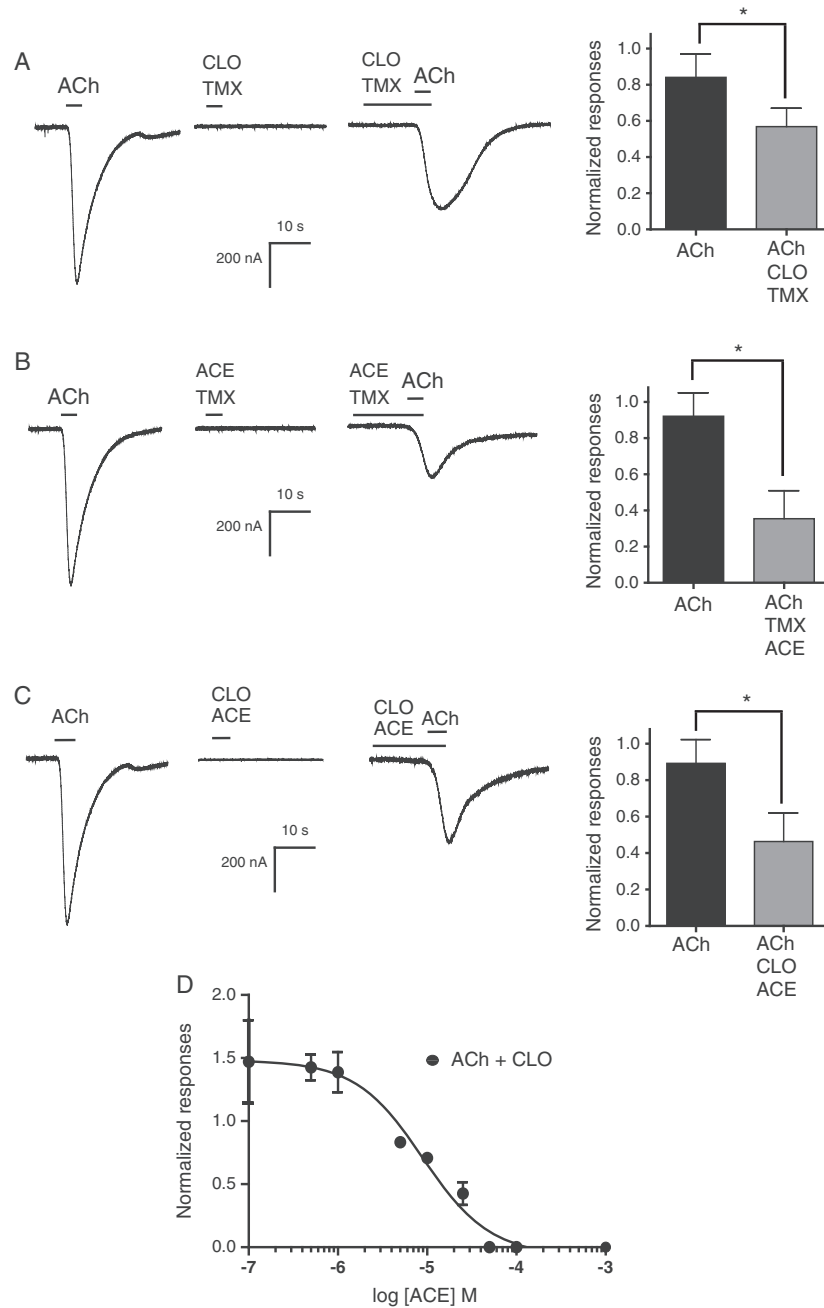


Figure 7

Decrease of ACh-induced currents after combined application of neonicotinoids. In each condition, in the left, current induced by 100 μ M ACh; in the middle, combination of two neonicotinoids tested at 10 μ M concentration; and in the right, pretreatment with mixture of neonicotinoids. Pretreatment with 10 μ M clothianidin (CLO) (A) and 10 μ M acetamiprid (ACE) (A) with 10 μ M thiamethoxam (TMX) significantly reduces currents induced by 100 μ M ACh. Similar reduction is found with combined application of 10 μ M clothianidin with 10 μ M acetamiprid (C). Histograms on the right of the recording currents show the decrease of ACh-induced current amplitudes after pretreatment. In each histogram, data are mean \pm SEM of oocytes from 12 frogs. * $P < 0.05$, significantly different as indicated. (D) Concentration–inhibition relationship illustrating the inhibition of ACh currents (100 μ M ACh) induced by pretreatment with 10 μ M clothianidin with different acetamiprid concentrations. Data are plotted as mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. In each experimental condition, we used 120 oocytes per batch.

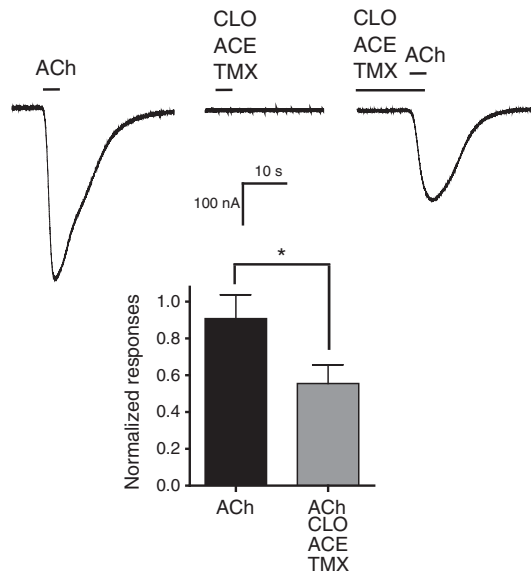


Figure 8

Effect of the combination of the three neonicotinoids on ACh-induced currents. Each neonicotinoid (clothianidin, CLO; acetamiprid, ACE; thiamethoxam, TMX), is used at 10 μ M and ACh at 100 μ M. ACh-induced currents are reduced after pretreatment. Bars in the Figure indicate when compound is added. Current are normalized with 100 μ M ACh using the same oocyte. Histograms showing the decrease of ACh-induced current amplitudes. Each histogram represents mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. For each experimental condition, we used 120 oocytes per batch. * $P < 0.05$, significantly different as indicated.

ACh-induced current amplitudes. All combinations using binary or the combination of the three neonicotinoids reduced ACh-induced current amplitudes, suggesting that when the three neonicotinoids were used in combination, they reduced ACh-evoked currents. Note that a strong modulatory effect was found using the combination of acetamiprid with thiamethoxam. We proposed that these compounds synergize the effect of ACh. Moreover, we suggested that synergism leading to the reduction of ACh currents could be due to the presence of thiamethoxam. In the case of binary combination between clothianidin and acetamiprid, the reduction was associated with clothianidin rather than acetamiprid, because clothianidin was known to be a metabolite of thiamethoxam. Future studies will reveal to what extent our findings could affect cholinergic neurotransmission *in vivo*.

Agonist effect of clothianidin and acetamiprid associated with their chemical structure

Clothianidin and thiamethoxam possess a heterocyclic aromatic moieties coupled to a cyclic or an acyclic N-nitroimine moiety, whereas acetamiprid possess an N-cyanoimine moiety. It appears that the chemical structures of clothianidin and acetamiprid give rise to the possibility to bind as full agonists of insect neuronal nAChRs (Tan *et al.*, 2007; Thany, 2009) and partial agonists of mammalian

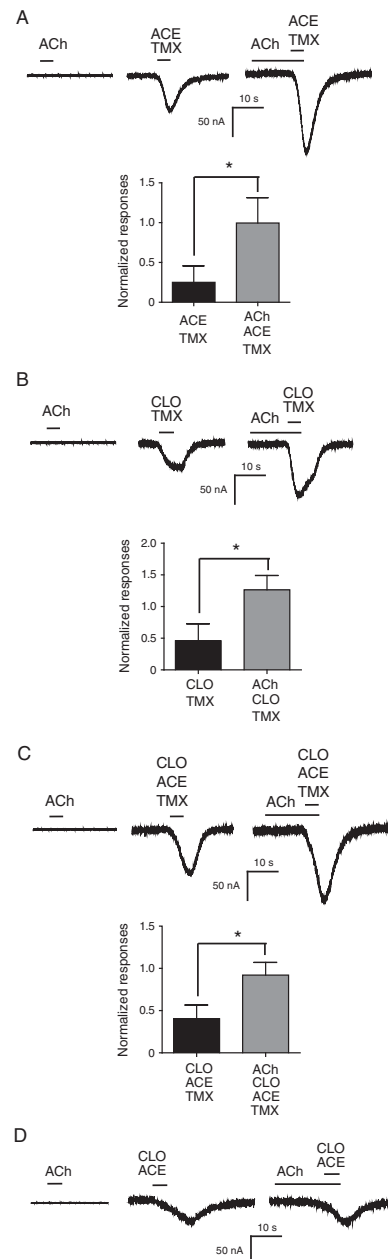


Figure 9

Effect of ACh on neonicotinoid-induced currents. In the present condition, oocytes are pretreated with 10 μ M ACh before coapplication with 100 μ M neonicotinoids. Pretreatment with 10 μ M ACh significantly increases acetamiprid (ACE)/ thiamethoxam (TMX) (A), clothianidin (CLO)/ thiamethoxam (B) and clothianidin/ acetamiprid/ thiamethoxam -induced current amplitudes (C). Each histogram under the recording currents represents mean \pm SEM of oocytes from 10 frogs. In each experimental condition, we used 180 oocytes per batch. * $P < 0.05$, significantly different as indicated; NS, not significant. (D) Pretreatment with 10 μ M ACh has no effect on current amplitude after combined application of both 100 μ M clothianidin and ACE. Each bar in the Figure indicates when the compound is added.



A Cartereau et al.

neuronal nAChRs (Li *et al.*, 2011), compared with thiamethoxam. Thiamethoxam is a second-generation commercial neonicotinoid that belongs to the thianicotinyl sub-class (Maienfisch *et al.*, 2001). As demonstrated in the present study and several other publications, clothianidin and thiamethoxam did not have a similar mode of action on insect nAChR subtypes, even though thiamethoxam is metabolized to clothianidin (Nauen *et al.*, 2003; Ford and Casida, 2006; Benzidane *et al.*, 2010). Thus, although the effects of thiamethoxam are still a matter of debate, our results would support the hypothesis that it can act on mammalian nAChRs as an antagonist, which would be in agreement with previous studies demonstrating that it was able to induce its own toxic effect (Wellmann *et al.*, 2004). Moreover, we found that thiamethoxam partly blocked ACh-induced currents and completely blocked nicotine currents. Based on our studies and considering the chemical structure of thiamethoxam, this selective action could be explained by the nature of the $\alpha/\alpha 7$ interfaces in the nAChR where the α subunits provide five potential binding sites for agonists (Papke, 2014; Dani, 2015) but with low affinity for nicotine (Schapira *et al.*, 2002; Dani, 2015). Therefore, it is reasonable to propose that thiamethoxam would be a more potent antagonist of nicotine-induced currents, than those induced by ACh.

Working hypothesis: is it possible to suggest that neonicotinoid insecticides could act as allosteric modulators of neuronal nAChRs?

Neonicotinoids negatively affect pollinating insects, in several ways, because they are present in the nectar and pollen of plants after application (Bonmatin *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2012; Rondeau *et al.*, 2014; Sanchez-Bayo, 2014; Simmons and Angelini, 2017). Due to their potential toxicity to honey bees, imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin were extensively examined by the European Commission, in terms of the effects of the currently authorized uses of these substances as seed treatment and granules (see regulation no. 485/2013). Electrophysiological studies demonstrated that their toxic effects on bees were associated with their agonist activity on insect neuronal nAChRs (Matsuda *et al.*, 2001; Thany *et al.*, 2007). However, the actions of neonicotinoids on mammalian nAChRs remain the subject of much debate worldwide, in terms of their possible adverse effects on human health (Marfo *et al.*, 2015; Sheets *et al.*, 2016; Seltenrich, 2017). One relevant finding is that they are poor agonists of mammalian nAChRs (Tomizawa and Casida, 2003). Although the main focus of the present study was not allosteric mechanisms, our results have led us to suggest that neonicotinoids could act as allosteric modulators of mammalian neuronal nAChRs. From our data, clothianidin and acetamiprid could be positive allosteric modulators and thiamethoxam could be a negative allosteric modulator. Our hypothesis would be supported by the finding that clothianidin or acetamiprid enhanced ACh-evoked currents after pretreatment. However, as previously demonstrated using the combination of several pesticides (Yi *et al.*, 2012; Taillebois and Thany, 2016), our results could be due to additive, synergistic or antagonist effects of the three neonicotinoids with ACh, on the $\alpha 7$ nAChRs. Our data also

suggest that the three neonicotinoid insecticides have complex effects on mammalian neuronal nAChRs. Thus, in the light of previous data, it seems reasonable to suggest that these neonicotinoids each differ in their ability to alter the functional properties and binding of ACh to $\alpha 7$ nAChRs. Nevertheless, for all three compounds studied here, our data suggest that there is a strong interaction between the neonicotinoids and ACh on rat $\alpha 7$ neuronal nAChRs, which leads to a modulation of ACh-induced currents.

Acknowledgements

A.C. received a PhD grant from the Region Centre Val de Loire. We gratefully acknowledge Roger Papke, Clare Stokes (University of Florida) and Millet Treinin (Hebrew University of Jerusalem) for the provision of $\alpha 7$ cDNA and RIC3.

Author contributions

S.H.T. designed the experiments; A.C. and C.M. performed the experiments; A.C. and S.H.T. analysed the data and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This **Declaration** acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

References

- Alexander SPH, Peters JA, Kelly E, Marrion N, Benson HE, Faccenda E *et al.* (2015). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 172: 5870–5903.
- Benzidane Y, Touinsi S, Motte E, Jadas-Hecart A, Communal PY, Leduc L *et al.* (2010). Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Manag Sci* 66: 1351–1359.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER (2003). A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal Chem* 75: 2027–2033.
- Burkhart CN (2000). Ivermectin: an assessment of its pharmacology, microbiology and safety. *Vet Hum Toxicol* 42: 30–35.
- Casida JE, Quistad GB (2004). Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *J Pestic Sci* 29: 81–86.



- Chatzidakis A, Millar NS (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 97: 408–417.
- Collins T, Millar NS (2010). Nicotinic acetylcholine receptor transmembrane mutations convert ivermectin from a positive to a negative allosteric modulator. *Mol Pharmacol* 78: 198–204.
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA *et al.* (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 172: 3461–3471.
- Dani JA (2015). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *Int Rev Neurobiol* 124: 3–19.
- Davies AR, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Wonnacott S (1999). Characterisation of the binding of [³H] methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 38: 679–690.
- Echeverria V, Yarkov A, Aliev G (2016). Positive modulators of the alpha7 nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 144: 142–157.
- Ford KA, Casida JE (2006). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res Toxicol* 19: 1549–1556.
- Fouquier J, Guedj M (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect* 3: e00149.
- Gill JK, Chatzidakis A, Ursu D, Sher E, Millar NS (2013). Contrasting properties of alpha7-selective orthosteric and allosteric agonists examined on native nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 8: e55047.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I *et al.* (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78: 703–711.
- Gotti C, Zoli M, Clementi F (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27: 482–491.
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P *et al.* (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348–350.
- Jeschke P, Nauen R, Beck ME (2013). Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie* 52: 9464–9485.
- Kagabu S, Maienfisch P, Zhang A, Granda-Minones J, Haettenschwiler J, Kayser H *et al.* (2000). 5-Azidoimidacloprid and an acyclic analogue as candidate photoaffinity probes for mammalian and insect nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 43: 5003–5009.
- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer PJ, Galzi JL, Changeux JP *et al.* (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 53: 283–294.
- Lansdell SJ, Millar NS (2000). The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39: 671–679.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 523–539.
- Li P, Ann J, Akk G (2011). Activation and modulation of human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *J Neurosci Res* 89: 1295–1301.
- Maienfisch P, Huerlimann H, Rindlisbacher A, Gsell L, Dettwiler H, Haettenschwiler J *et al.* (2001). The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci* 57: 165–176.
- Marfo JT, Fujioka K, Ikenaka Y, Nakayama SM, Mizukawa H, Aoyama Y *et al.* (2015). Relationship between urinary N-desmethyl-acetamiprid and typical symptoms including neurological findings: a prevalence case-control study. *PLoS One* 10: e0142172.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 573–580.
- Millar NS, Gotti C (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237–246.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Salgado VL, Kausmann M (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Physiol* 76: 55–69.
- Papke RL (2014). Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 89: 1–11.
- Papke RL, Porter Papke JK, Rose GM (2004). Activity of alpha7-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT3 receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 1849–1853.
- Paterson D, Nordberg A (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61: 75–111.
- Pym L, Kemp M, Raymond-Delpech V, Buckingham S, Boyd CA, Sattelle D (2005). Subtype-specific actions of beta-amyloid peptides on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors (alpha7, alpha4beta2, alpha3beta4) expressed in *Xenopus laevis oocytes*. *Br J Pharmacol* 146: 964–971.
- Pym LJ, Buckingham SD, Tsetlin V, Boyd CA, Sattelle DB (2007). The Abeta1-42M35C mutated amyloid peptide Abeta1-42 and the 25-35 fragment fail to mimic the subtype-specificity of actions on recombinant human nicotinic acetylcholine receptors (alpha7, alpha4beta2, alpha3beta4). *Neurosci Lett* 427: 28–33.
- Rondeau G, Sanchez-Bayo F, Tennekes HA, Decourtye A, Ramirez-Romero R, Desneux N (2014). Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci Rep* 4: 5566.
- Rousseau SJ, Jones IW, Pullar IA, Wonnacott S (2005). Presynaptic alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate [³H]d-aspartate release from rat frontal cortex in vitro. *Neuropharmacology* 49: 59–72.
- Sanchez-Bayo F (2014). Environmental science. The trouble with neonicotinoids. *Science* 346: 806–807.
- Sattelle DB, Buckingham SD, Akamatsu M, Matsuda K, Pienaar IS, Jones AK *et al.* (2009). Comparative pharmacology and computational modelling yield insights into allosteric modulation of human alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 78: 836–843.
- Schapira M, Abagyan R, Totrov M (2002). Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine. *BMC Struct Biol* 2: 1.
- Seltenrich N (2017). Catching up with popular pesticides: more human health studies are needed on neonicotinoids. *Environ Health Perspect* 125: A41–A42.
- Sheets LP, Li AA, Minnema DJ, Collier RH, Creek MR, Peffer RC (2016). A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 46: 153–190.



A Cartereau et al.

- Simmons WR, Angelini DR (2017). Chronic exposure to a neonicotinoid increases expression of antimicrobial peptide genes in the bumblebee *Bombus impatiens*. *Sci Rep* 7: 44773.
- Southan C, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Alexander SPH *et al.* (2016). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucl Acids Res* 44: D1054–D1068.
- Sultana Shaik A, Shaik AP, Jamil K, Alsaed AH (2016). Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pesticide mixtures on lymphocytes. *Toxicol Mech Methods* 26: 588–594.
- Taillebois E, Thany SH (2016). The differential effect of low-dose mixtures of four pesticides on the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insects* 7: 1–7.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature reviews. Drug discovery* 8: 733–750.
- Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM (2007). Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* 28: 829–842.
- Thany SH (2009). Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 30: 1045–1052.
- Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B (2007). Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 14–22.
- Tomizawa M, Casida JE (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48: 339–364.
- Tomizawa M, Casida JE (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 247–268.
- Tomizawa M, Casida JE (2009). Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Acc Chem Res* 42: 260–269.
- Tomizawa M, Durkin KA, Ohno I, Nagura K, Manabe M, Kumazawa S *et al.* (2011). N-haloacetylmino neonicotinoids: potency and molecular recognition at the insect nicotinic receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 3583–3586.
- Toshima K, Ihara M, Kanaoka S, Tarumoto K, Yamada A, Sattelle DB *et al.* (2008). Potentiating and blocking actions of neonicotinoids on the response to acetylcholine of the neuronal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Pestic Sci* 33: 146–151.
- Toshima K, Kanaoka S, Yamada A, Tarumoto K, Akamatsu M, Sattelle DB *et al.* (2009). Combined roles of loops C and D in the interactions of a neonicotinoid insecticide imidacloprid with the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* 56: 264–272.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000a). β -Amyloid(1–42) binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275: 5626–5632.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000b). Amyloid peptide A β (1–42) binds selectively and with picomolar affinity to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75: 1155–1161.
- Wang HY, Li W, Benedetti NJ, Lee DH (2003). $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors mediate β -amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 31547–31553.
- Wang Y, Yang G, Dai D, Xu Z, Cai L, Wang Q *et al.* (2017). Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environ Sci Pollut Res Int* 24: 4528–4536.
- Wellmann H, Gomes M, Lee C, Kayser H (2004). Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: II. An unusual high affinity site for [3 H]thiamethoxam in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Management Science* 60: 959–970.
- Willmott AL, Cloyd RA, Zhu KY (2013). Efficacy of pesticide mixtures against the western flower thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) under laboratory and greenhouse conditions. *J Econ Entomol* 106: 247–256.
- Wonnacott S (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92–98.
- Yamamoto I, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Walcott EC, Sumikawa K (1998). Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Arch Insect Biochem Physiol* 37: 24–32.
- Yi F, Zou C, Hu Q, Hu M (2012). The joint action of destruxins and botanical insecticides (rotenone, azadirachtin and paeonolium) against the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Molecules* 17: 7533–7542.
- Zhao W, Sachsenmeier K, Zhang L, Sult E, Hollingsworth RE, Yang H (2014). A new bliss independence model to analyze drug combination data. *J Biomol Screen* 19: 817–821.

Chapitre III

Modulation de l'effet du dinotéfurane par la perméthrine

A. Présentation synthétique de l'article :

Contexte : nous avons précédemment montré que les insecticides néonicotinoïdes étaient capables de moduler les nAChR d'insectes mais également de mammifères (Cartereau et *al.*, 2017). Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'effet d'un autre type d'insecticides, les pyréthriinoïdes. A l'inverse des néonicotinoïdes, qui agissent sur les nAChR, les pyréthriinoïdes agissent sur les canaux sodiques voltage-dépendants des neurones en augmentant leur sensibilité à la dépolarisation et en prolongeant leur ouverture (Soderlund et *al.*, 2002). Dans une étude récente, il a été montré que l'utilisation d'un mélange contenant de la CLO (néonicotinoïdes) et de la delthaméthrine (pyréthriinoïdes) induisait une mortalité élevée chez les moustiques *Anopheles gambiae*, vecteurs du paludisme, et permettait ainsi de garder le contrôle sur les populations résistantes aux pyréthriinoïdes (Ngufor et *al.*, 2017). Il a également été montré que les insecticides néonicotinoïdes DIN, CLO et TMX augmentaient la dépolarisation ganglionnaire et bloquaient les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) induits par la stimulation électrique du nerf XI (Thany, 2009, 2011). Ici nous nous sommes aussi intéressés à l'effet en combinaison de deux molécules insecticides, le DIN et la perméthrine (PERM), sur la transmission synaptique cholinergique ainsi que sur des neurones isolés issus des cellules de Kenyon et du sixième ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*.

Objectifs : le but de ce travail était d'étudier le mode d'action combiné des pyréthriinoïdes et des néonicotinoïdes sur la transmission synaptique cholinergique ainsi que sur des neurones isolés exprimant des sous-types de nAChR de blatte. Ce travail a été intégré à une étude sur l'effet du Vectra 3D, un antiparasitaire contre les acariens ectoparasites.

Conclusion : la combinaison des deux insecticides à faible concentration permet d'augmenter la dépolarisation ganglionnaire et d'inhiber l'activité du potentiel d'action ainsi que le PPSE du nerf XI. Nous supposons que l'effet observé sur l'activité pré-synaptique est lié à la PERM et l'effet post-synaptique au DIN. Sur les neurones isolés, l'effet de la combinaison est plus complexe. En effet, l'application du mélange augmente l'amplitude de la réponse, mais l'effet agoniste est inhibé par un prétraitement au DIN et à la PERM. Nous supposons que cet effet

serait associé à l'augmentation de l'activité des canaux sodiques des neurones isolés. Nous montrons également qu'une faible concentration de PERM est capable d'augmenter l'effet du DIN.

B. Publication n°3 : Cartereau et *al.*, 2018



Contents lists available at ScienceDirect

Neurotoxicology

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

Full Length Article

Permethrin enhances the agonist activity of dinotefuran on insect cholinergic synaptic transmission and isolated neurons



Alison Cartereau^{a,1}, Jean-Noël Houchat^{a,1}, Safa Mannai^a, Marie Varloud^b, Hamadi Karembé^b, Jérôme Graton^c, Jean-Yves Le Questel^c, Steeve H. Thany^{a,*}

^a Université d'Orléans, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) USC INRA 1328, 1 rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans, France

^b Ceva Santé Animale, Libourne, 10 avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France

^c Université de Nantes, CEISAM, UMR CNRS 6230, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Insect
Pyrethroid
Neonicotinoid
Insecticide
Combination

ABSTRACT

Insect resistance mechanisms against pesticides lead to the development and the search of new pesticide combinations in order to delay the resistance. The combination of neonicotinoids with pyrethroids was currently proposed but the mode of action of these compounds at synaptic and extrasynaptic levels needs to be further explored. In the present study, we evaluated the effect of the combination of two insecticides, permethrin and dinotefuran, on cockroach cholinergic synaptic transmission and on isolated cell bodies. We first found that combination of 5 μM permethrin and dinotefuran enhances depolarization of the sixth abdominal ganglion compared to dinotefuran alone, without an inhibition of the spontaneous activity. However, a pretreatment with 1 μM dinotefuran or permethrin before bath application of the mixture inhibits the ganglionic depolarization. Compared to permethrin, 1 μM dinotefuran induces a persistent enhancement of spontaneous activity. Interestingly, at extrasynaptic level, using dorsal unpaired median neurons and Kenyon cells, we found that combination of both 1 μM dinotefuran and permethrin resulted in an increase of the mixture-induced current amplitudes. Pretreatment with 1 μM dinotefuran strongly decreases the currents whereas permethrin induces a time-dependent inhibition. These data demonstrate that the combination of dinotefuran and permethrin enhances the effect of dinotefuran.

1. Introduction

The resistance of insects to insecticides represents a serious threat for programs aimed at controlling and preventing their effects. Considering this problem, there is a renewed interest in improving the efficacy of the existing insecticides by combining those with different modes of action to enhance insecticidal activity and to delay the development of resistance (Darriet and Chandre, 2012; Guillen and Bielza, 2012; Taillebois and Thany, 2016). In this framework, several combinations used pyrethroid and neonicotinoid insecticides to achieve effective control of resistant insect populations. Indeed, they remain the most important and widely used classes of synthetic insecticides for both agricultural applications and vector controls of animal and human diseases (Jeschke et al., 2011). Neonicotinoids act as agonists of insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (Jeschke et al., 2013; Thany, 2009; Tomizawa and Casida, 2003, 2005), they stimulate synaptic transmission increasing excitatory activity (Buckingham et al., 1997). Pyrethroids exert their effects by interacting with the voltage-

gated sodium channel, increasing its sensitivity to depolarization and prolonging its opening by inhibiting the inactivation and deactivation processes, thereby stabilizing the open state of the channel (Soderlund et al., 2002). Thus, it was proposed that the combination of spinosad with thiamethoxam and clothianidin, increased toxicity in spinosad-resistant thrips strain. The effect of the combination was associated to a possible interaction at the nAChRs (Guillen and Bielza, 2012). Moreover, it was demonstrated that the mixture containing permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen had anti-feeding and insecticidal efficacy against *Triatoma infestans*, a vector of *Trypanosoma cruzi* (Tahir et al., 2017), *Ctenocephalides felis* (Varloud and Fourie, 2015; Varloud et al., 2015) and *canis* (Lienard et al., 2013) fleas that may transmit tapeworm and bartonellosis. Similar efficacy of pyrethroid-neonicotinoid mixture was found with the *Anopheles gambiae*. The mixture containing clothianidin and deltamethrin induced high overall hut mortality and exiting rates, providing prolonged control of malaria transmitted by pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* populations (Ngufor et al., 2017).

The physiological effect of pesticides was studied using the

* Corresponding author at: LBLGC USC INRA 1328, Université d'Orléans, Bât Physique-Chimie, 1^{er} étage, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France.

E-mail address: steeve.thany@univ-orleans.fr (S.H. Thany).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.06.003>

Received 1 February 2018; Received in revised form 10 May 2018; Accepted 5 June 2018

Available online 08 June 2018

0161-813X/ © 2018 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

cholinergic synapse between the cockroach afferent giant interneuron and the cercal nerve XI, localized in the sixth abdominal ganglion (A6), well recognized and used as a model to study the pharmacology of several compounds (Blagburn and Sattelle, 1987; Harrow et al., 1980; Hill and Blagburn, 2001; Hue et al., 2007; Hue and Callec, 1990; Sattelle et al., 1983). It was demonstrated that neonicotinoid insecticides dinotefuran, clothianidin and thiamethoxam increased ganglionic depolarization and blocked the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked by electrical stimulation of the nerve XI (Thany, 2009, 2011) whereas co-exposure of permethrin and propoxur, a carbamate insecticide which blocked acetylcholinesterase activity, decreased EPSP amplitudes (Corbel et al., 2006). The mechanism leading to the toxicity was explained by a general physiological perturbation involving an increase in acetylcholine concentration at the synaptic level (Corbel et al., 2006). However, despite that most of the afferent excitatory fibers are carried in cercal nerve XI and the cholinergic nature of the excitatory transmitter (Flattum and Shankland, 1971; Pitman, 1985; Sattelle et al., 1983), few studies investigated the physiological mechanisms leading to the toxic effect of the combination of pyrethroids and neonicotinoids at synaptic and extrasynaptic levels.

In the present study, we investigated the mechanism of action of the mixture composed of a pyrethroid, permethrin and a neonicotinoid, dinotefuran on cockroach cholinergic synaptic transmission and isolated neurons expressing nAChR subtypes. More precisely, we used dorsal unpaired median (DUM) neurons which are neurosecretory cells generating endogenous spontaneous action potentials (Grolleau and Lapiéd, 2000) and mushroom body Kenyon cells involved in learning and memory processes (Farris et al., 2004). We found that the mixture increases ganglionic depolarization and ionic currents, suggesting that permethrin enhances the excitatory activity and the agonist effect of dinotefuran.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of the sixth abdominal ganglion and the nerve XI

Adult male cockroaches *Periplaneta americana* were dissected and opened along the longitudinal dorsal-median line as illustrated in Callec et al. (Callec, 1974; Callec and Boistel, 1966; Callec and Sattelle, 1973). A fine pair of forceps was used carefully to remove the alimentary canal and overlying muscle and tracheae. The abdominal nerve cord, one circus and the corresponding cercal nerve XI were isolated and immediately flooded with saline solution (in mM) : NaCl, 208; KCl, 3.1; CaCl₂, 5.4; NaHCO₃, 2; Sucrose, 26; pH adjusted to 7.4 with NaOH (Buckingham et al., 1997; Thany, 2009). The preparation was then removed and transferred to the recording chamber and continuously superfused with a saline plus mannitol (87 g/l) solution. The disposition of the preparation within the chamber facilitated electrical stimulation of the cercal nerve and allowed to preserve the EPSPs, the action potentials and the postsynaptic polarization (Callec and Sattelle, 1973). EPSPs were evoked using electrical stimulation of cercal nerve XI (Buckingham et al., 1997; Thany, 2009).

2.2. Electrophysiological recordings

2.2.1. Mannitol-gap recordings

Synaptic experiments were performed on the cercal nerve giant interneuron synapses located within the cockroach A6, using the mannitol-gap method pioneered by Callec (Callec and Sattelle, 1973; Callec et al., 1980). Electrical events were recorded using extracellular electrodes. A non-electrolyte medium (mannitol) was interposed between the recording sites (Callec et al., 1980). The main advantages of this method were to preserve the recordings of the unitary or evoked EPSPs and the postsynaptic polarization. Consequently, monitoring the variations of excitatory postsynaptic potential amplitudes and/or polarization induced by drug application enables dose-response curves to

be recorded. Moreover, this set-up allows long-term experiments to be performed and test solutions can be readily applied without any of the technical problems associated with intracellular recording (Callec et al., 1980).

The A6 was carefully desheathed to facilitate penetration of bath-applied drugs. The recording electrodes were connected to the input of high-impedance amplifier, whose outputs were passed to a numeric oscilloscope (PCSGU250, Velleman instruments, France) and a computer connected with Minidigidata 1B (Axon instruments, USA). Variation of postsynaptic polarization was monitored on a chart recorder and the EPSPs were evoked by electrical stimulations of the ipsilateral cercal nerve XI using a dual pulse stimulator (Campden 915, USA). The mixture was applied during 3 min under the same conditions as previously published (Buckingham et al., 1997; Thany, 2009), with a micropump fast perfusion (Harvard Apparatus) that produced a constant solution exchange (500 µL/min). For pretreatment, all compounds were bath-applied for at least 10 min before a single application of the mixture. Recordings were made at room temperature.

2.2.2. Patch clamp recordings

Permethrin and dinotefuran-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). Currents induced 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. Experiments were carried out at room temperature (20–22 °C).

2.3. Compounds

All compounds were provided by Ceva Santé Animale (France).

2.4. Statistical analysis

For statistical analysis, a nonparametric Mann-Whitney test was employed, using Prism program (GraphPAD Software, San Diego, CA). Dose-response curve was fitted to the following equation :

$$y = \max / (1 + 10^{-(\log EC_{50})H})$$

where max is the maximum response obtained, EC₅₀ is the concentration giving half the maximum response and H is the Hill slope. Data are presented as the mean ± S.E.M using different concentrations of the mixture on the same ganglion. Statistical analysis was expressed as nonsignificant (NS) for $p > 0.05$ and significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of the permethrin and dinotefuran mixture on the sixth abdominal ganglion

In a previous study, we demonstrated that 1 mM dinotefuran applied in the sixth abdominal ganglion of the cercal afferent/giant interneuron synapses induced a strong depolarization of postsynaptic interneurons (Le Questel et al., 2011). Using the same experimental

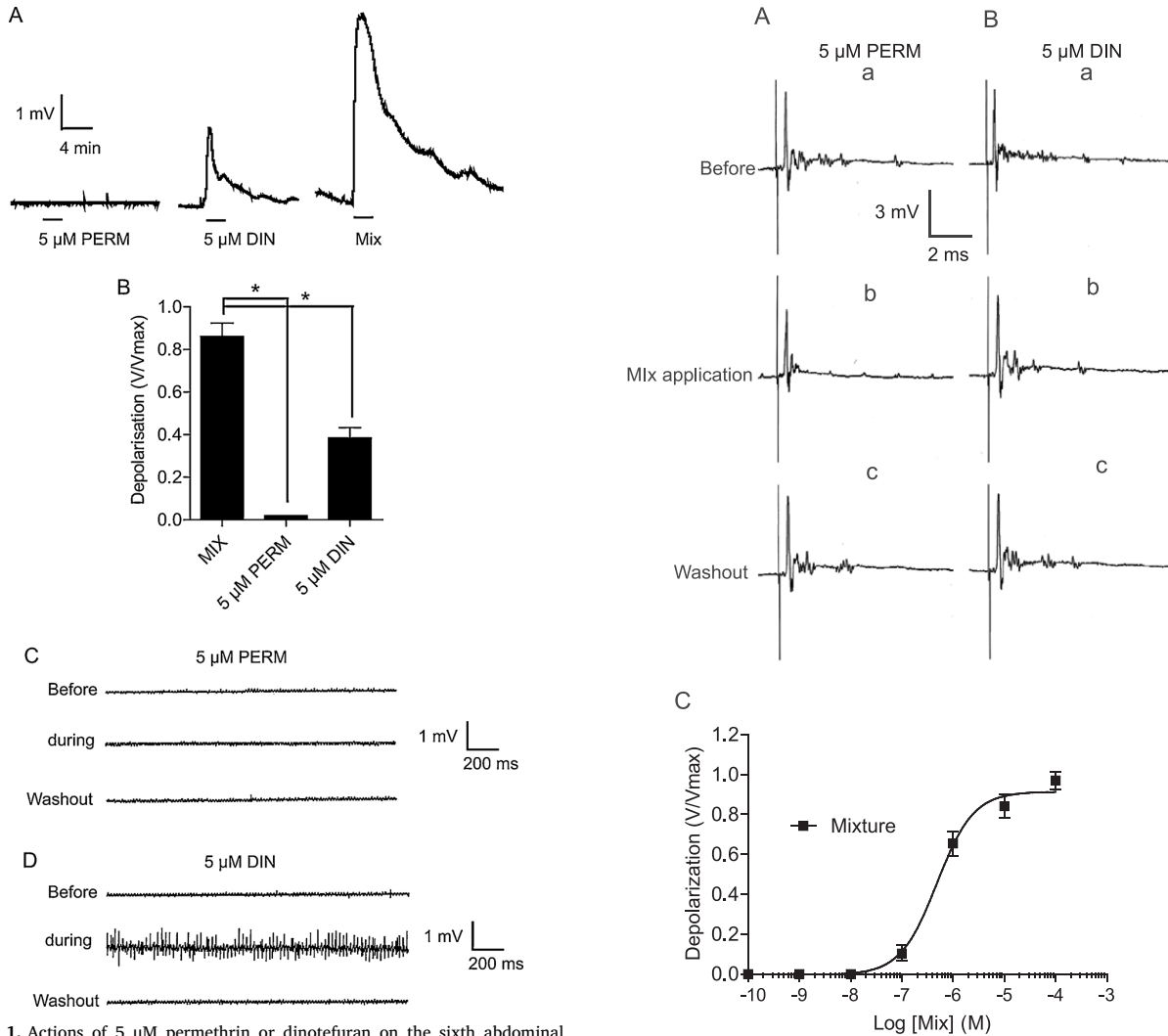
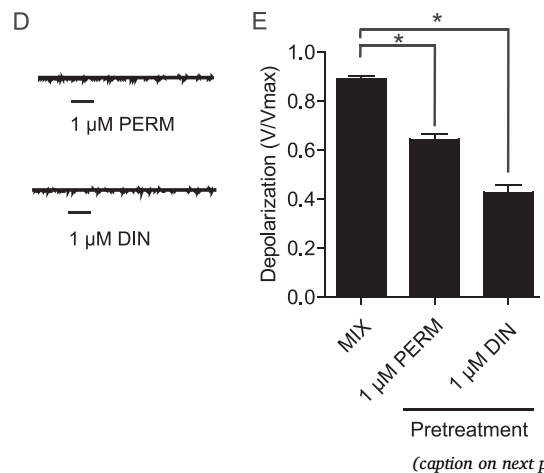


Fig. 1. Actions of 5 μM permethrin or dinotéfurane on the sixth abdominal ganglion. (A) Example of 5 μM permethrin (PERM), 5 μM dinotéfurane (DIN) and the mixture effects on the cercal afferent giant interneurons. The bars indicate 3 min bath application of the compound. Note that, 5 μM dinotéfurane induces a ganglionic depolarization compared to permethrin. (B) Histogram showing the effect of 5 μM permethrin or dinotéfurane and the mixture on ganglionic depolarization. Data are mean ± S.E.M. Each bar represents n = 12 experiments. * p < 0.05. (C and D) Spontaneous background activity (Unitary excitatory postsynaptic potential) recorded during the rising phase of depolarization under 5 μM permethrin (C) or 5 μM dinotéfurane (D). In each case, upper trace represents before application of the compound, middle the effect during 3 min bath application and the lower trace during washout. Note that no background activity was observed during bath application of 5 μM permethrin.

conditions, we were interested to study the effects of the mixture of dinotéfurane and permethrin at low concentration. First, we compared dinotéfurane and permethrin effects at low concentration and found that permethrin at 5 μM had no effect on ganglionic depolarization compared to dinotéfurane. The mixture containing both 5 μM permethrin and dinotéfurane increased significantly the ganglionic depolarization compared to the effect of 5 μM dinotéfurane alone. The amplitude of the mixture evoked depolarization was 6.1 ± 0.5 mV whereas we found 2.6 ± 0.2 mV for dinotéfurane alone (p < 0.05, n = 12, Fig. 1A and B). This result suggested that permethrin could enhance the agonist effect of dinotéfurane in the cockroach sixth abdominal ganglion. However, 5 μM permethrin completely blocked spontaneous background activity



(caption on next page)

Fig. 2. Effect of 5 μM permethrin or dinotefuran on excitatory postsynaptic potential recorded after electrical stimulation of the nerve XI. (A) Effect of 5 μM permethrin (PERM). (Aa) Before bath application of 5 μM permethrin. (Ab) During bath application of 5 μM permethrin, stimulation of the nerve XI evoked excitatory postsynaptic potential. The decrease was not significantly different compared to control condition (See Table 1). (Ac) Recording of excitatory postsynaptic potential during washout. (B) Effect of 5 μM dinotefuran on excitatory postsynaptic potential. (Ba) recording before bath application of 5 μM dinotefuran. (Bb) Recording under 3 min application of the compound. (Bc) The effect was reversed after 20 min washout. (C) Dose-response curve recorded using successive applications of the mixture using the same ganglion. Responses are normalized to the maximum response and fitted to the Hill equation describes in materials and methods section. (D) Effect of 1 μM permethrin (PERM) or 1 μM dinotefuran (DIN) on ganglionic depolarization. Note that at this concentration permethrin and dinotefuran did not induce ganglionic depolarization. (E) Pretreatment of the sixth abdominal ganglion with 1 μM permethrin (PERM) or 1 μM dinotefuran (DIN). In each case, data are mean \pm S.E.M of 12 experiments. * $p < 0.05$.

Table 1

Effect of 5 μM permethrin or dinotefuran on excitatory postsynaptic potential recorded after electrical stimulation of the nerve XI. In each experimental condition (Permethrin or dinotefuran), identical letters indicate no significant difference ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm S.E.M.

	5 μM Permethrin	5 μM dinotefuran
Control	4.6 \pm 0.8 mV ^a	4.7 \pm 0.5 mV ^b
During application	4.2 \pm 0.5 mV ^a	5.0 \pm 0.6 mV ^b
Washout	5.1 \pm 0.3 mV ^a	4.6 \pm 0.4 mV ^b

(unitary excitatory post synaptic potentials) whereas dinotefuran increased spontaneous activity (Fig. 1C and D). Furthermore, at this concentration, permethrin and dinotefuran had no effect on the EPSPs evoked by electrical stimulation of the nerve XI recorded at the maximum ganglionic depolarization (Fig. 2A and B). The corresponding data are reported in Table 1. Successive applications of the mixture using the same ganglion resulted in dose-dependent depolarization of postsynaptic interneurons (Fig. 2C). Because these compounds acted on different receptors which differently affected cholinergic synaptic transmission, we suggested that pretreatment with low dose permethrin could modulate the agonist effect of the mixture consistent with an inhibitory action on presynaptic sodium channels resulting to a decrease of the ganglionic depolarization. Thus, because cockroach synapses expressed a high affinity binding site for dinotefuran (Miyagi et al., 2006), we suggested that the mixture could interact competitively with dinotefuran binding sites, resulting to a reduction of the ganglionic depolarization. When synapses were pretreated with 1 μM permethrin or dinotefuran, the mixture-induced depolarization was 30% less with 1 μM permethrin ($p < 0.05$, $n = 12$, Fig. 2D and E) and 58% less with 1 μM dinotefuran, compared to the effect of the mixture alone ($p < 0.05$, $n = 12$, Fig. 2D and E). Note that 1 μM permethrin or dinotefuran did not induce a ganglionic depolarization (Fig. 2D). These data confirmed that pretreatment with permethrin or dinotefuran reduced the mixture-induced ganglionic depolarization. Moreover, we also found that bath application of the mixture induced an increase of the spontaneous background activity (Fig. 3A). But, pretreatment with 1 μM permethrin had no significant difference. The frequency of action potentials was not significantly different compared to the effect with the mixture alone (Fig. 3B). Interestingly, the frequency of action potentials increased strongly when the synapse was pretreated with 1 μM dinotefuran (Comparing before and during mixture application, the percent of spike was increased to 47% under pretreatment with 1 μM dinotefuran) and the effect was persistent during the time-scale before and after mixture application (Fig. 3C). The increase represented $31.6 \pm 1.8\%$ of the total background activity under pretreatment with 1 μM dinotefuran (Fig. 3D).

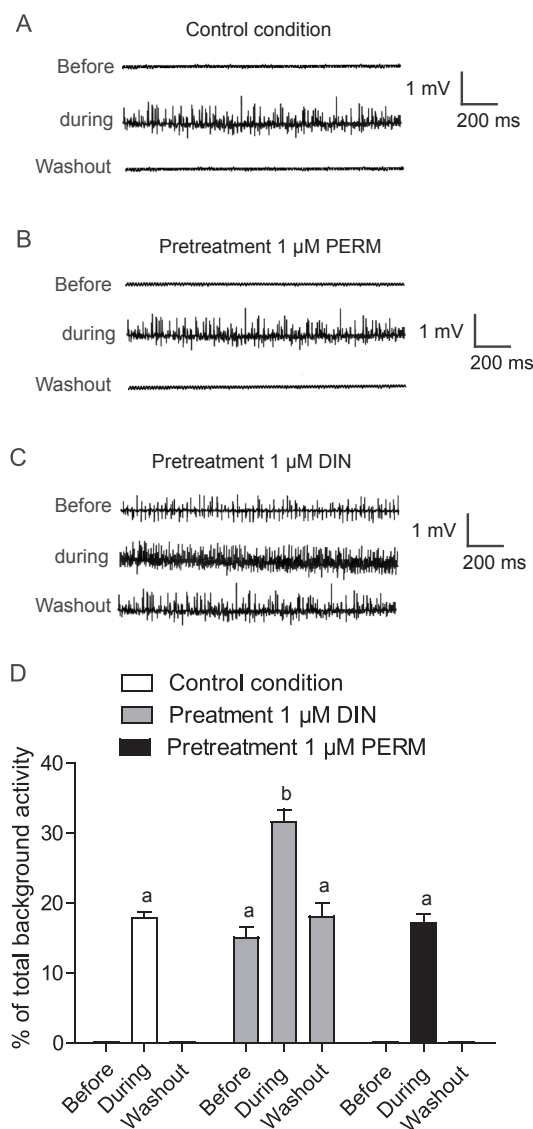


Fig. 3. Effect of the mixture containing 5 μM dinotefuran and 5 μM permethrin on background spontaneous activity after pretreatment with 1 μM dinotefuran or permethrin. (A) Effect of the mixture on excitatory background activity recorded at the maximum ganglionic depolarization. (Aa) Before the application of the mixture (upper trace) no spontaneous background activity was observed. Middle trace: spontaneous background activity during bath application of the mixture. Lower trace: the background activity stopped when the depolarization ceased. (B) Pretreatment with 1 μM permethrin. Upper trace: before application of the mixture, no background activity was found. Middle trace: Under pretreatment of 1 μM permethrin (PERM). Application of the mixture induced a background activity which ceased during washout (lower trace). (C) The terminal abdominal ganglion was pretreated with 1 μM dinotefuran. Upper trace: background activity was observed before application of the mixture, during pretreatment. Middle trace: during application of the mixture, we found a strong increase of background activity. Lower trace: background activity was persistent during washout. (D) Histograms of the percentage of total excitatory background activity. A different letter in the histogram indicates a significant difference ($p < 0.05$). Data are mean \pm S.E.M of at least $n = 12$ experiments in each condition.

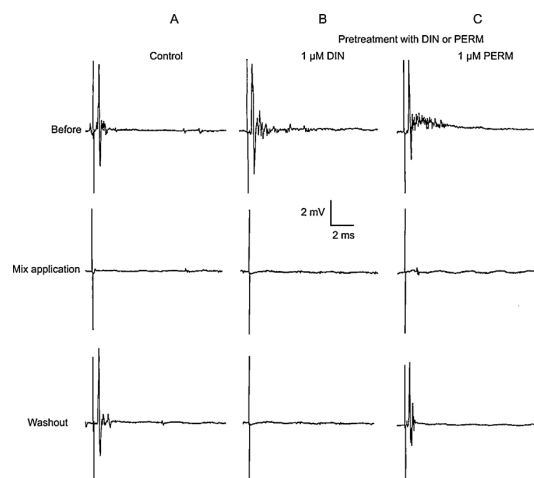


Fig. 4. Effects of the mixture on excitatory postsynaptic potentials obtained after electrical stimulation of the nerve XI after pretreatment of the sixth abdominal ganglion with 1 μ M dinotéfuran or perméthrin. (A) The effect of the mixture was first recorded using saline solution (Control condition). Application of the mixture completely blocks the EPSP recorded after electrical stimulation of the nerve XI. No effect was found before application of the mixture and during washout. (B) Before pretreatment with 1 μ M dinotéfuran, we obtained excitatory postsynaptic potentials after electrical stimulation of the nerve XI (upper trace), during application of the mixture excitatory postsynaptic potentials are blocked (middle trace). The effect is not reversible 10 min after washout (lower trace). (C) Similar method is used with 1 μ M perméthrin pretreatment. We found the same blocking of the excitatory postsynaptic potential during application of the mixture (middle trace) but compared with pretreatment with 1 μ M dinotéfuran, the effect is reversible (lower trace).

Table 2

Effect of the mixture on excitatory postsynaptic potential recorded under pretreatment with 1 μ M perméthrin (PERM) or dinotéfuran (DIN). Data are mean \pm S.E.M. of $n = 12$ experiments in each condition. Identical letters indicate no significant difference.

	Control	Pretreatment 1 μ M PERM	Pretreatment 1 μ M DIN
Before	4.8 \pm 0.6 mV ^a	5.1 \pm 0.5 mV ^a	5.2 \pm 0.4 mV ^a
Mixture application	0	0 mV	0
Washout	5.3 \pm 0.3 mV ^a	0 mV	4.9 \pm 0.8 mV ^a

We then evaluated the effect of the mixture on EPSPs evoked after electrical stimulation of cercal nerve XI at the maximum ganglionic depolarization. When the ganglion was superfused with standard saline solution (Control condition) for 3 min, an evoked EPSP was recorded after electrical stimulation of the cercal nerve XI. The mean amplitude was 4.8 \pm 0.6 mV. When the ganglion was superfused with the mixture, the EPSP was completely blocked. If the ganglion was washed with standard saline solution for 10 min, the EPSP returned to normal values of 5.3 \pm 0.3 mV. No significant difference was found compared to the EPSP recorded before application of the mixture ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 4A). Fig. 4B and C show recordings under pretreatment with 1 μ M dinotéfuran or perméthrin. Pretreatment with 1 μ M dinotéfuran induced a blocking of EPSP which was not reversible 10 min after washout whereas the effect with 1 μ M perméthrin was reversible under the same conditions (Fig. 4B and C). The quantitative study of this blocking effect of dinotéfuran and perméthrin is reported in Table 2.

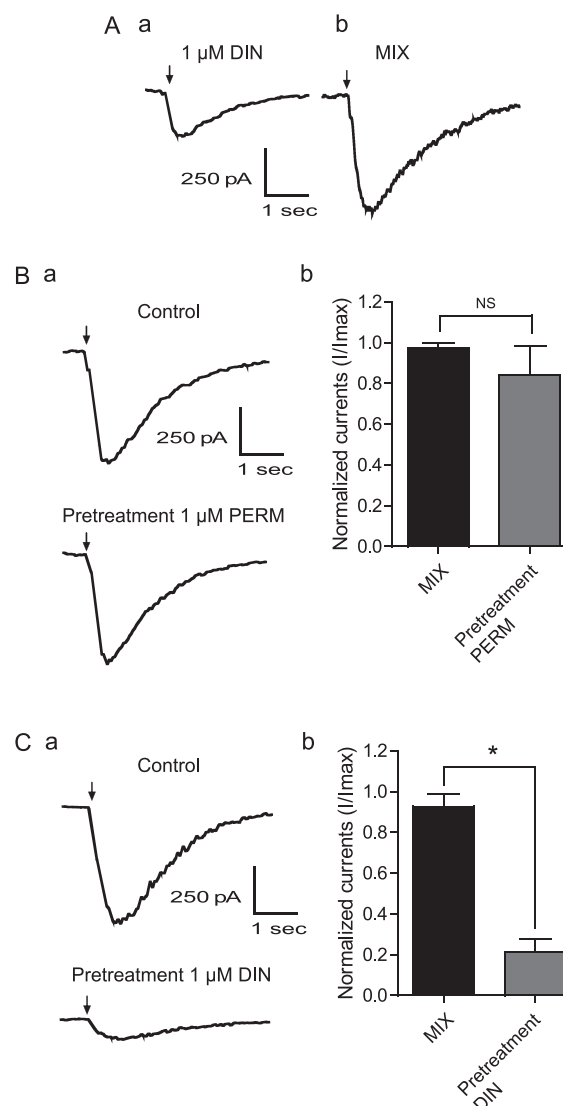


Fig. 5. Currents recorded on nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach DUM neurons. (A) Example of currents induced by 1 μ M dinotéfuran (Aa) or the mixture (Ab) of both 1 μ M perméthrin and dinotéfuran. (B) Effects of 5 min pretreatment with 1 μ M perméthrin (PERM). (Ba) Typical example of the mixture-induced currents under control condition and after 5 min pretreatment with 1 μ M perméthrin. (Bb) Histograms summarize the effect of the pretreatment on the mixture-induced current amplitudes. No significant difference was found. In each case, $n = 12$ cells. NS: no significant ($p > 0.05$). (C) Pretreatment of the cells with 1 μ M dinotéfuran (DIN). (Ca) Currents recorded after application of the mixture. Note that pretreatment with 1 μ M perméthrin induces a strong decrease of the mixture-induced current amplitudes. (Cb) Histograms represent the decrease of current amplitudes after pretreatment with 1 μ M dinotéfuran. In each case, histograms are represented as mean \pm S.E.M. of $n = 12$ cells. * $p < 0.05$. MIX: mixture; PERM: perméthrin and DIN: dinotéfuran. Arrows indicate 300 ms pulse duration of the mixture. Currents are recorded at -50 mV holding potential.

3.2. Effects of the mixture on isolated cell bodies expressing nicotinic receptor

We have demonstrated that the perméthrin and dinotéfuran mixture induced an increase of ganglionic depolarization and inhibited EPSPs evoked by electrical stimulation of the nerve XI at the maximum

ganglionic depolarization. The effect of the mixture was significantly higher to the one of dinotefuran alone, suggesting that permethrin could enhance dinotefuran effect. We hypothesized that this effect was not specific to the synapses between cercal afferent and giant interneurons and could be observed on isolated neurons such as DUM neurons, isolated from the same sixth abdominal ganglion. Thus, we used a mixture of both 1 μ M dinotefuran and permethrin. Under the same conditions, as expected, permethrin enhanced the agonist effect of dinotefuran. We found that application of the mixture strongly induced an inward current of -0.58 ± 0.03 nA compared to currents induced by 1 μ M dinotefuran (-0.21 ± 0.01 nA, $p < 0.05$, $n = 18$ cells, Fig. 5A). We then evaluated the effect of cells pretreatment during 5 min with 1 μ M permethrin or dinotefuran. No significant change of the mixture-induced current amplitudes was observed when cockroach DUM neurons were pretreated during a short term delay with 1 μ M permethrin ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 5B). Nevertheless, we found a strong decrease of the mixture-induced currents after 5 min pretreatment with 1 μ M dinotefuran. Indeed, 1 μ M dinotefuran significantly reduced the currents induced by the mixture to -0.12 ± 0.02 nA ($p < 0.05$, $n = 12$, Fig. 5C). These data seemed to suggest that dinotefuran may interact with the mixture on cockroach nAChRs expressed on DUM neurons. Thus, in both cases, the effect of the mixture and dinotefuran were sensitive to nicotinic acetylcholine receptor antagonist mecamylamine (Data not shown). Moreover, when cells were treated for a long period with 1 μ M permethrin, the current amplitudes decreased strongly and no effect on current amplitudes was observed if 1 μ M dinotefuran was applied during the decrease (Fig. 6A). Using the same method, we found that the decrease of the mixture-induced currents could be reversed after bath application with 1 μ M permethrin (Fig. 6B). These data suggested that dinotefuran had a direct and rapid effect on current amplitudes. Interestingly, similar effect was not found with cockroach Kenyon cells. Indeed, despite the fact that the mixture induced an increase of current amplitudes (The mean current amplitude was -208.7 ± 0.3 pA for the mixture and -82 ± 0.07 pA for dinotefuran at -50 mV holding potential, Fig. 7A and B), pretreatment with 1 μ M permethrin or dinotefuran revealed that 1 μ M permethrin had no effect on current amplitudes (Fig. 8A and B). 1 μ M dinotefuran reduced to 82% the mixture-induced current amplitudes ($p < 0.05$, $n = 12$, Fig. 8C and D). In all cases, we found that the kinetics of the mixture evoked currents were affected after pretreatment with both 1 μ M permethrin or dinotefuran.

4. Discussion

4.1. Effects of the mixture containing pyrethroids and neonicotinoids

In the present study, the cockroach cholinergic synaptic transmission was used to evaluate the effect of the permethrin and dinotefuran combination at low concentration. First, we found that the combination of low concentration permethrin and dinotefuran increased ganglionic depolarization, inhibited the spontaneous background activity and the EPSPs. The effect of the mixture at synaptic level could be explained by an action of permethrin on sodium channels. At the presynaptic level, permethrin bound to sodium channels and counteracted the excitatory effect of dinotefuran resulting to an inhibition of the background activity. Indeed, the effect of permethrin on background activity was consistent with previous data demonstrating that low permethrin concentration inhibited spontaneous activity of cockroach presynaptic cercal mechanoreceptors (Corbel et al., 2006) and cholinergic minisynaptic current in projection neurons of the drosophila dorsal antennal lobe glomeruli (Yan et al., 2011). This hypothesis could explain the finding that pretreatment with dinotefuran resulted to an enhancement of the spontaneous activity whereas permethrin inhibited the activity. Our point of view is consistent with the previous observation that permethrin blocked cholinergic transmission at the cercal-afferent giant-interneuron synapses (Hue and Mony, 1987). Moreover, we

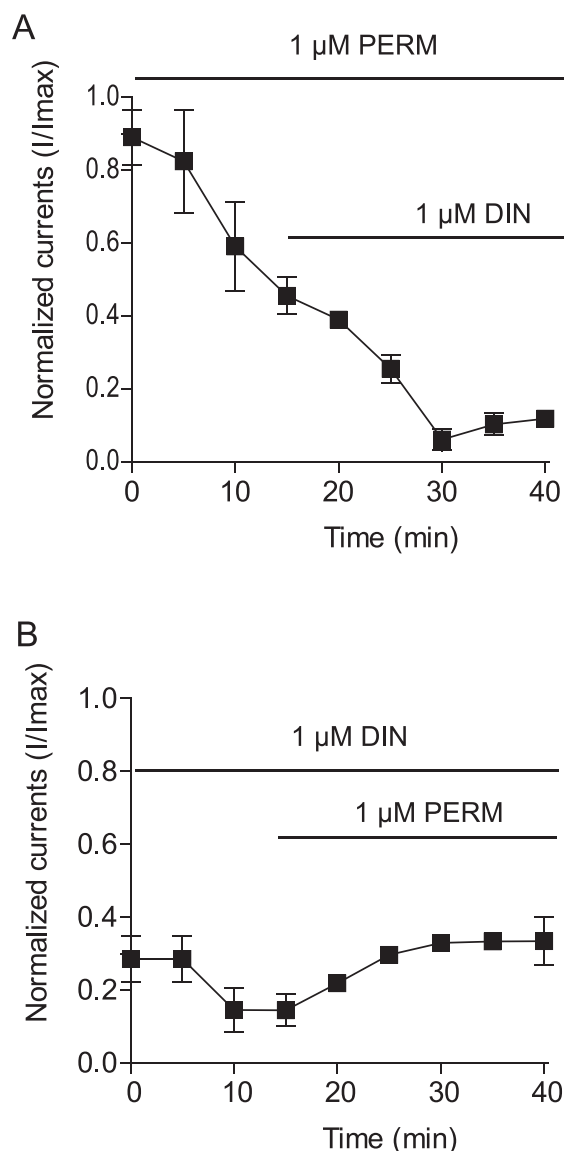


Fig. 6. Time-dependent effect of the mixture during bath application of 1 μ M permethrin or dinotefuran. (A) Mixture was continuously bathed with 1 μ M permethrin, resulting to a decrease of mixture-induced currents. The current amplitude continuously decreases despite application of 1 μ M dinotefuran (DIN). (B) The effect of the mixture under application of 1 μ M dinotefuran (DIN) was reversed if we apply 1 μ M permethrin. Data are mean \pm S.E.M. Each point represents $n = 12$ cells.

hypothesized that the mixture effect resulted to both presynaptic activity of permethrin and postsynaptic activity of dinotefuran. For instance, pretreatment with permethrin could increase the depolarizing effect of permethrin, reducing the sensitivity of sodium channels and resulting to a decrease or an inhibition of background activity whereas pretreatment with dinotefuran will strongly increase the effect of the mixture on postsynaptic nAChRs.

The mode of action of the mixture on isolated cell bodies appears more complex. Combination of both compounds enhanced the mixture-induced current amplitudes compared to dinotefuran alone. The agonist effect induced by the mixture was reduced after pretreatment with dinotefuran whereas permethrin had a time-dependent effect. We

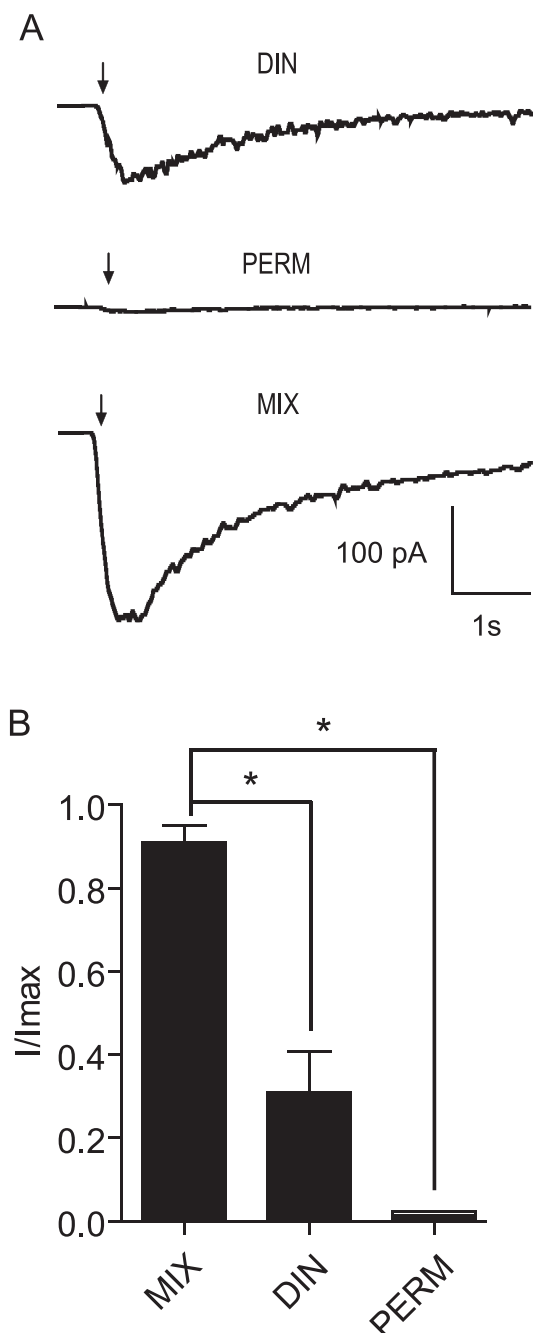


Fig. 7. Effect of dinotefuran, permethrin and the mixture on cockroach nAChRs expressed on Kenyon cells. (A) Currents induced by 1 μ M dinotefuran (DIN), 1 μ M permethrin (PERM) and the mixture (MIX) of 1 μ M permethrin and 1 μ M dinotefuran. Arrows indicate 300 ms pulse (15 psig) duration. (B) Histograms illustrating the effects of the mixture and of each compound on cockroach Kenyon cells. In each case, data are mean \pm S.E.M. of 12 cells. * $p < 0.05$.

suggested that the effect of the mixture could be associated to a decrease of sodium channel activity. In particular, permethrin may activate sodium channels leading to a membrane depolarization and an increase of sodium ions in the cell. This increase is counterbalanced by a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and Ca^{2+} entry through nAChRs activated by dinotefuran. The combined action of permethrin and dinotefuran and

intracellular Ca^{2+} flux increases the mixture-induced current amplitudes. Indeed, we recently demonstrated that neonicotinoid insecticide effect, such as clothianidin is associated with an increase of intracellular calcium (List et al., 2014). Low Ca^{2+} increase leads to a low clothianidin-induced current amplitude whereas increasing intracellular Ca^{2+} induces higher currents (List et al., 2014). We suspect that joint activity of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and nAChRs could enhance intracellular Ca^{2+} concentration. Secondly, pretreatment with permethrin induces a failure in depolarizing the membrane, leading to a decrease of Na^+ influx, consequently no Ca^{2+} entry (or strong Ca^{2+} entry) which results to a decrease of the mixture-induced current amplitudes. This mechanism could explain the finding that permethrin effect is time-dependent compared to dinotefuran which had a rapid effect.

4.2. Synergism between pyrethroids and neonicotinoids insecticides as a strategy against insect pest

The development of resistance to pyrethroids and neonicotinoids lead to the use of pesticide combinations for the control of arthropod pests and vector-borne diseases. In particular, it is expected that the combination will shift the evolution of resistance, reducing the concentration used and increasing the potential of each compound. This strategy may limit environmental effect of pesticides. Moreover, it could help to increase the specificity of some mixtures against insect pests avoiding or limiting negative effects against useful insects. This is an important area for future studies and successful management of pest populations. In this context, combinations between pyrethroids and neonicotinoids were investigated with the challenge to identify the best combination (Taillebois and Thany, 2016; Yu et al., 2016). For example, the neonicotinoid, dinotefuran and pyrethroid, permethrin used in this study, were previously applied to commercialize the VECTRA 3D, an ectoparasiticide combining three active ingredients (dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen) against *Stegomyia albopicta* mosquitoes (Tahir et al., 2017). VECTRA 3D revealed a significant anti-feeding and insecticidal efficacy against *S. albopicta*. According to the data reported in the present study, we propose that permethrin concentration in the mixture helps to increase the agonist effect of dinotefuran. The efficacy of the mixture is associated with the finding that in addition to their effect on sodium channels and nAChRs, permethrin and dinotefuran have a shift in their mode of action. Our future investigations will be to test other combinations of pyrethroids. We previously demonstrated that the mixture of deltamethrin and acetamiprid increased the toxicity of each compound against the pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* (Taillebois and Thany, 2016). We hypothesize that type I and type II pyrethroids could have different effects because it was proposed that they have different toxicity (Breckenridge et al., 2009).

In conclusion, we designed this study to evaluate the mode of action of pyrethroids and neonicotinoids at synaptic and extrasynaptic levels. We demonstrated that low permethrin concentration was able to increase dinotefuran effect. Our results and previous data give us first insight into the molecular mechanisms of these compounds at low doses which is of great interest for safe applications of pesticides.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest. This paper adheres to the principles for scientific rigor and transparency.

Acknowledgements

A. Cartereau and J-N Houchat received a Ph.D grant from the Région Centre Val de Loire and the University of Orleans. This work was supported in part by a fellowship from the Région Centre Val de Loire and CEVA Santé Animale (France). Authors would like to thanks Chouik Hamza for its help on mannitol-gap recordings.

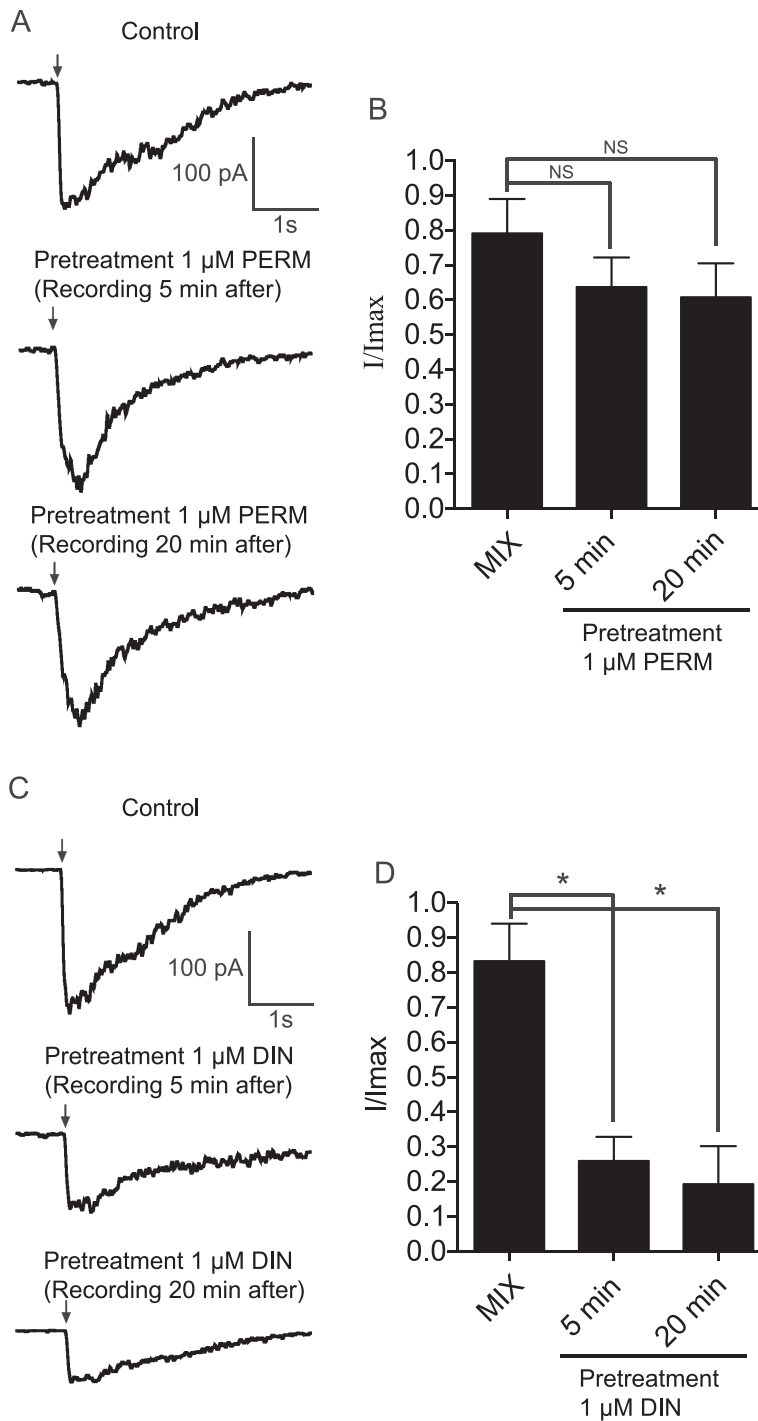


Fig. 8. Pretreatment of Kenyon cells with 1 μ M permethrin (PERM) or 1 μ M dinotefuran (DIN). (A) The mixture-induced currents recorded at -50 mV holding potential in control condition (Control) and 5 min and 20 min during pretreatment with 1 μ M permethrin (PERM). (B) Histograms summarize the data obtained under bath application of 1 μ M permethrin. Each histogram represents mean \pm S.E.M. of $n = 12$ cells. No significant difference (NS) was found at 5 min and 20 min. (C) The mixture-induced currents are also recorded under pretreatment with 1 μ M dinotefuran (DIN). After 5 min pretreatment with 1 μ M dinotefuran we found a reduction of the current amplitudes. The current amplitudes are also reduced 20 min later during pretreatment. (D) Histograms summarize the data obtained in each condition. Data are mean \pm S.E.M. of 12 cells. * $p < 0.05$. Arrows indicate 300 ms pulse duration of the mixture.

References

Blagburn, J.M., Sattelle, D.B., 1987. Nicotinic acetylcholine receptors on a cholinergic nerve terminal in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol. A* 161 (2), 215–225.
 Breckenridge, C.B., Holden, L., Sturgess, N., Weiner, M., Sheets, L., Sargent, D., Soderlund, D.M., Choi, J.S., Symington, S., Clark, J.M., Burr, S., Ray, D., 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neuro Toxicol.* 30 (Suppl 1), S17–31.
 Buckingham, S., Lapiéd, B., Corronc, H., Sattelle, F., 1997. Imidacloprid actions on insect

neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200 (Pt 21), 2685–2692.
 Callec, J.J., 1974. In: Treherne, J.E. (Ed.), *Synaptic Transmission in the Central Nervous System of Insects*. American Elsevier ed., North-holland.
 Callec, J.J., Boistel, J., 1966. Phenomena of excitation and inhibition at the level of the last abdominal ganglion of the cockroach, *periplaneta americana* L. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* 160 (12), 2418–2424.
 Callec, J.J., Sattelle, D.B., 1973. A simple technique for monitoring the synaptic actions of pharmacological agents. *J. Exp. Biol.* 59 (3), 725–738.
 Callec, J.J., Sattelle, D.B., Hue, B., Pelhate, M., 1980. Central synaptic actions of pharmacological agents in insects : oil-gap and mannitol-gap studies. In: Sherwood, M. (Ed.), *Neurotox 79*. Plenum Press, New York, pp. 93–100.

- Corbel, V., Stankiewicz, M., Bonnet, J., Grolleau, F., Hougard, J.M., Lapied, B., 2006. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *NeuroToxicol.* 27 (4), 508–519.
- Darriet, F., Chandre, F., 2012. Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest Manage. Sci.*
- Farris, S.M., Abrams, A.I., Strausfeld, N.J., 2004. Development and morphology of class II Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 474 (3), 325–339.
- Flattum, R.F., Shankland, D.L., 1971. Acetylcholine receptors and the diphasic action of nicotine in the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Comp. Gen. Pharmacol.* 2 (6), 159–167.
- Grolleau, F., Lapied, B., 2000. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.* 203 (Pt 11), 1633–1648.
- Guillen, J., Bielza, P., 2012. Thiamethoxam acts as a target-site synergist of spinosad in resistant strains of *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manage. Sci.*
- Harrow, I.D., Hue, B., Gepner, J.I., Hall, L.M., Sattelle, D.B., 1980. An alpha-bungarotoxin sensitive acetylcholine receptor in the central nervous system of the cockroach, *Periplaneta Americana*. In: Sherwood, M. (Ed.), *Neurotox* 79. Plenum Press, New York, pp. 137–144.
- Hill, E.S., Blagburn, J.M., 2001. Presynaptic effects of biogenic amines modulating synaptic transmission between identified sensory neurons and giant interneurons in the first instar cockroach. *J. Comp. Physiol. A* 187 (8), 633–645.
- Hue, B., Callec, J.J., 1990. Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In: Huber, L., Masler, E.P., Rao, B.R. (Eds.), *Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Researches*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 149–167.
- Hue, B., Mony, L., 1987. Actions of deltamethrin and tralomethrin on cholinergic synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 86 (2), 349–352.
- Hue, B., Buckingham, S.D., Buckingham, D., Sattelle, D.B., 2007. Actions of snake neurotoxins on an insect nicotinic cholinergic synapse. *Invert Neurosci.* 7 (3), 173–178.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59 (7), 2897–2908.
- Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M.E., 2013. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angew. Chem.* 52 (36), 9464–9485.
- Le Questel, J.Y., Graton, J., Ceron-Carrasco, J.P., Jacquemin, D., Planchat, A., Thany, S.H., 2011. New insights on the molecular features and electrophysiological properties of dinotefuran, imidacloprid and acetamiprid neonicotinoid insecticides. *Bioorg. Med. Chem.* 19 (24), 7623–7634.
- Lienard, E., Bouhsira, E., Jacquiet, P., Warin, S., Kaltsatos, V., Franc, M., 2013. Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*. *Parasitol. Res.* 112 (11), 3799–3805.
- List, O., Calas-List, D., Taillebois, E., Juchaux, M., Heuland, E., Thany, S.H., 2014. Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J. Neurochem.*
- Miyagi, S., Komaki, I., Ozoe, Y., 2006. Identification of a high-affinity binding site for dinotefuran in the nerve cord of the American cockroach. *Pest Manage. Sci.* 62 (4), 293–298.
- Ngufor, C., Fongnikin, A., Rowland, M., N'Guessan, R., 2017. Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* sl in Southern Benin. *PLoS One* 12 (12), e0189575.
- Pitman, R.M., 1985. *Comprehensive insect physiology pharmacology*. In: Kerkut, G.L.I.G. (Ed.), *Nervous System*. Pergamon Press, Oxford, pp. 5–54.
- Sattelle, D.B., Harrow, I.D., Hue, B., Pelhate, M., Gepner, J.I., Hall, L.M., 1983. α -bungarotoxin blocks excitatory synaptic transmission between cercal sensory neurones and giant interneuron 2 of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 107, 473–489.
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171 (1), 3–59.
- Tahir, D., Davoust, B., Varloud, M., Berenger, J.M., Raoult, D., Almeras, L., Parola, P., 2017. Assessment of the anti-feeding and insecticidal effects of the combination of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen (Vectra(R) 3D) against *Triatoma infestans* on rats. *Med. Vet. Entomol.* 31 (2), 132–139.
- Taillebois, E., Thany, S.H., 2016. The differential effect of Low-dose mixtures of Four pesticides on the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insects* 7 (4).
- Thany, S.H., 2009. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *NeuroToxicol.* 30 (6), 1045–1052.
- Thany, S.H., 2011. Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology* 60 (4), 587–592.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Varloud, M., Fourie, J.J., 2015. Onset of efficacy and residual speed of kill over one month of a topical dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen combination (Vectra (R) 3D) against the adult cat flea (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs. *Vet. Parasitol.* 211 (1–2), 89–92.
- Varloud, M., Fourie, J.J., Blagburn, B.L., Deflandre, A., 2015. Expellency, anti-feeding and speed of kill of a dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen spot-on (Vectra(R)3D) in dogs weekly challenged with adult fleas (*Ctenocephalides felis*) for 1 month-comparison to a spinosad tablet (Comfortis(R)). *Parasitol. Res.* 114 (7), 2649–2657.
- Yan, Y., Yang, Y., You, J., Yang, G., Xu, Y., Huang, N., Wang, X., Ran, D., Yuan, X., Jin, Y., Fan, Y., Lei, J., Li, W., Gu, H., 2011. Permethrin modulates cholinergic mini-synaptic currents by partially blocking the calcium channel. *Toxicol. Lett.* 201 (3), 258–263.
- Yu, R.X., Wang, Y.H., Hu, X.Q., Wu, S.G., Cai, L.M., Zhao, X.P., 2016. Individual and joint Acute Toxicities of selected insecticides against *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Econ. Entomol.* 109 (1), 327–333.

Chapitre IV

Etudes des récepteurs nicotiques de la blatte *Periplaneta americana* en système hétérologue à partir d'extraits de membrane

A. Introduction :

Dans la continuité de nos travaux sur la caractérisation des nAChR chez la blatte *P. americana*, nous avons souhaité développer en parallèle la technique de double micro-électrode à partir d'extraits de membranes issues du système nerveux de la blatte. Cette technique avait été préalablement mise au point par Miledi et ses collaborateurs (Miledi *et al.*, 2002). Le but de leur étude était de voir si l'ovocyte de xénope pouvait exprimer des récepteurs fonctionnels d'un autre organisme sans injecter les acides nucléiques correspondant. Ils ont montré qu'en quelques heures, les membranes injectées sont capables de fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte, permettant ainsi la caractérisation fonctionnelle des récepteurs. Cette méthode présente un avantage important car elle permet d'étudier les récepteurs fonctionnels dans leur environnement lipidique (Miledi *et al.*, 2004). Miledi et ses collaborateurs ont ainsi montré que les récepteurs à l'ACh et les canaux chlores (Cl), obtenus à partir d'électroplaques de torpille, pouvaient être transplantés dans les membranes d'ovocytes (Marsal *et al.*, 1995, Morales *et al.*, 1995). Par la suite, cette technique de « microtransplantation » a été réalisée chez plusieurs mammifères, notamment avec des tissus humains (Miledi *et al.*, 2002) et des lignées cellulaires de rat (Palma *et al.*, 2003). Récemment Crespin et ses collaborateurs ont adapté cette technique pour étudier les récepteurs du puceron, *Acyrtosiphon pisum*. Grâce à un marquage utilisant l' α -Bgt fluorescente, ils ont pu confirmer la présence de récepteurs α -Bgt-sensibles au sein des préparations membranaires (Crespin *et al.*, 2015). Cependant, même si la membrane environnante est d'origine et que les modifications post-traductionnelles ont eu lieu, les récepteurs : somatique, synaptique, sont sans doute mélangés à des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique.

Nous avons adapté cette méthode sur des extraits de membranes issues de la blatte *P. americana* afin d'étudier les propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiques neuronaux. Les résultats préliminaires présentés ici montrent que la transplantation fonctionnelle de nAChR natifs à partir d'extraits de membranes issues de la blatte *P. americana* est possible en ovocyte de xénope. A partir de ces données, nous avons pu étudier le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes et la modulation des courants nicotiques.

B. Matériel et méthode :

1. La blatte *Periplaneta americana*

La blatte *P. americana* est un insecte appartenant la famille des *Blattidae* (**Figure 22**). Les individus utilisés pour cette étude proviennent de l'élevage du laboratoire. Ils sont élevés à 29°C avec une photopériode de 12 heures jours et 12 heures nuits. Afin de maintenir l'élevage et d'être en accord avec les études menées antérieurement sur les neurones issus du sixième ganglion abdominal, seuls les mâles ont été utilisés (Taillebois et Thany 2016 ; Salgado *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2017). Le système nerveux central de la blatte est constitué d'une chaîne nerveuse se trouvant en position ventrale et médiane (Niven *et al.*, 2008). Cette chaîne est composée de ganglions qui peuvent être classés en 4 types selon leurs positions anatomiques : les ganglions cérébroïdes, sous-œsophagiens, thoraciques et abdominaux (A1 à A6 ou dernier ganglion abdominal) (**Figure 22**). Les 80 chaînes nerveuses nécessaires à l'étude ont été disséquées et congelées dans l'azote liquide afin que les protéines ne soient pas dégradées.

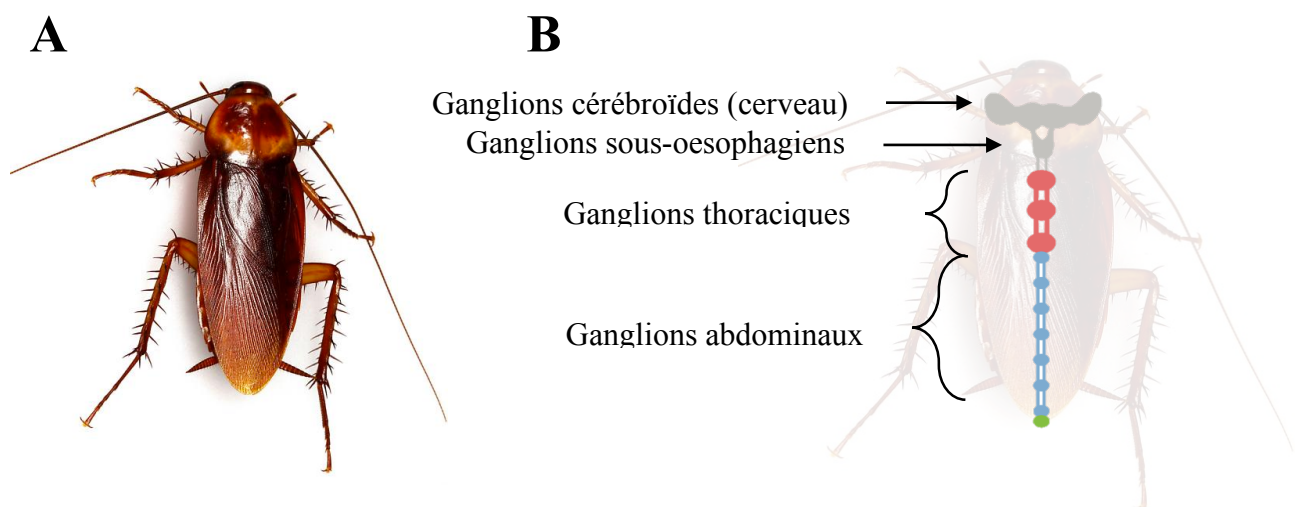


Figure 22 : La blatte *P. americana* est un insecte de la famille des *Blattidae* (A) Présentation d'une blatte *Periplaneta americana* vue du dessus. (B) Le système nerveux et les différents ganglions qui le compose : cérébroïdes et sous-œsophagien (en gris), thoraciques (en rose), abdominaux (en bleu) et le dernier ganglion où l'on trouve les DUM neurones (en vert) (modifié d'après Nivens *et al.*, 2008).

1.1. Préparation des membranes

La première étape consiste à broyer les chaînes nerveuses dans du tampon d'extraction (TE) : 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM EDTA, inhibiteur de protéase (Crespin *et al.*, 2015). Pour cela, les chaînes nerveuses sont réparties dans deux tubes avec un volume équivalent. Elles sont ensuite broyées dans du TE grâce à un agros-pellet (Argos Technologies, Cat. No. A0001), pendant 1 min puis laissées au repos pendant 2 min afin d'éviter le réchauffement des protéines, causé par le broyage. Cette étape de broyage est réalisée 3 fois de suite et est suivie d'une centrifugation de 1 500 rpm à 4°C pendant 1 min. Les étapes de broyage et de centrifugation sont réalisées deux fois dans les mêmes conditions. Le surnageant obtenu est centrifugé dans une ultracentrifugeuse à 15 000 rpm pendant 70 min (Beckman rotor Ti 41). A l'issue de cette centrifugation, un gradient de sucrose est réalisé. Cela permet d'augmenter la densité des protéines membranaires incluant les nAChR (Crespin *et al.*, 2015). Le surnageant est éliminé et le culot re-suspendu dans du sucrose 20%. La solution obtenue est déposée délicatement sur une solution de sucrose 50% puis le tube est mis à centrifuger pendant 2h45 à 30 000 rpm. La fraction membranaire se situe à l'interface des deux solutions de sucrose. Une fois les protéines récupérées elles sont de nouveau centrifugées avec du TE puis du tampon glycine (5 mM) afin d'éliminer le sucrose potentiellement présent. Les protéines sont finalement diluées dans un tampon glycine et stockées à -80°C (Miledi *et al.*, 2004 ; Eusebi *et al.*, 2009) (**Figure 23**).

1.2. Quantification des protéines : test de Bradford

La concentration en protéines membranaires obtenues à l'issue de l'extraction est déterminée grâce à un test de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-rad). Le principe est de comparer des valeurs colorimétriques, basées sur un changement d'absorbance des échantillons, avec ceux d'une gamme étalon préalablement réalisée. Les protéines membranaires sont mises en présence de bleu de Coomassie, qui change de couleur après la liaison avec les acides aminés présents dans les protéines, révélant ainsi la concentration protéique. La préparation membranaire de tissu de blatte a donné une quantité protéique de 1,2 mg/mL.

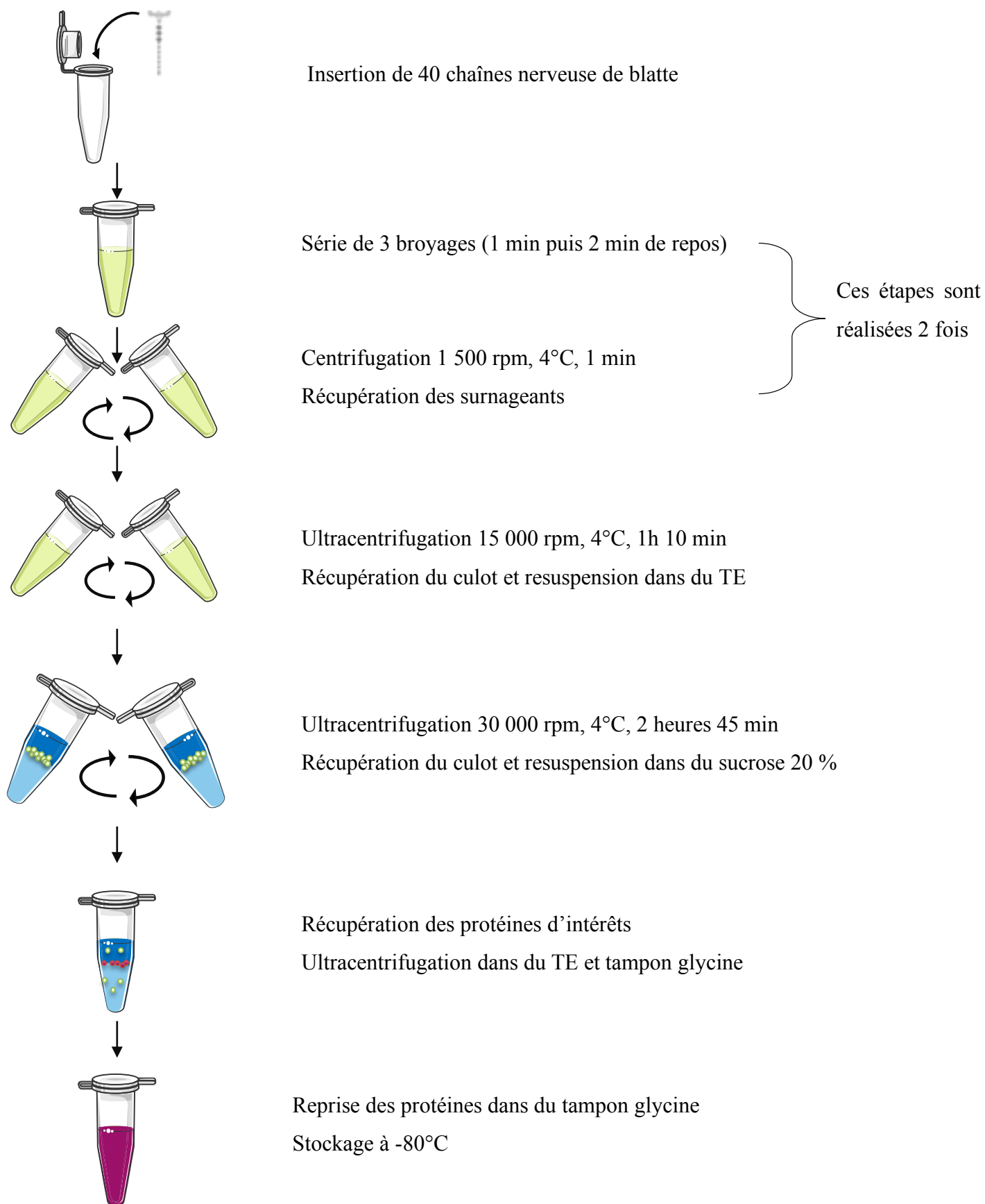


Figure 23 : Schéma des différentes étapes pour réaliser l'extraction de récepteur natif de la blatte, *Periplaneta americana*.

1.3. Expression en système hétérologue : injection dans les ovocytes de xénope

Les ovocytes de stade V et VI sont issus de femelle *Xenopus laevis* provenant du CRB Xenope de Rennes. Après réception, les ovocytes sont maintenus à 4°C dans une solution saline (solution ovocytes saline, SOS) contenant : 100 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1,8 mM de CaCl₂, 5 mM HEPES, ajustée à pH 7,5 et supplémentée avec de la pénicilline (100 U.mL⁻¹), de la streptomycine (100 mg.mL⁻¹), de la gentamycine (50 mg.mL⁻¹) et du pyruvate de sodium (2,5 mM). Avant injection, les ovocytes sont défollicularisés manuellement à l'aide d'une solution enzymatique préparée à partir de SOS sans calcium, qui contient 2 mg.mL⁻¹ de collagénase IA (Sigma, France) et 0,8 mg.mL⁻¹ d'inhibiteur de trypsine (Cartereau et al., 2017). Les protéines membranaires sont injectées (\approx 1 mg.mL⁻¹) au niveau du pôle végétatif de l'ovocyte (Eusebi *et al.*, 2009) à l'aide d'un nano-injecteur (Nanoject II, Drummond Scientific Company). Les ovocytes sont ensuite mis à incuber pendant 24h à 18°C.

1.4. Mesure d'électrophysiologie

L'étude fonctionnelle des récepteurs est réalisée grâce à la technique de double micro-électrode en potentiel imposé (amplificateur DAGAN TEV-200A). Le principe est de mesurer l'activité du récepteur grâce à deux micro-électrodes remplies de KCl 3M et dont la résistance est comprise entre 0,2 et 5 M Ω . Les ovocytes sont placés dans une chambre d'enregistrement et soumis à un potentiel de -60mV. Le système d'application des solutions est un système de perfusion par gravité qui diffuse en permanence du SOS. Pour obtenir les courbes doses-réponses, nous avons appliqué les molécules durant 10 sec avec un rinçage de 5 à 10 min entre chaque enregistrement. Pour évaluer la modulation induite par les insecticides néonicotinoïdes sur les courants de NIC ou d'ACh, les composés sont co-appliqués directement avec l'ACh et la NIC pendant 10 sec. Les données expérimentales sont numérisées grâce à une interface Digidata1322A (Molecular Devices, Union City, CA, USA) puis analysées avec le logiciel Clampfit (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Tous les composés testés sont dilués dans le SOS. Les valeurs d'EC₅₀ ont été déterminées grâce au logiciel GraphPad Prism (CEO, San Diego, Californie).

Résultats préliminaires

Après avoir établi la présence de protéines dans la préparation membranaire, nous avons testé le protocole de microtransplantation. Un volume de 50,6 nl de préparation membranaire a été injecté dans les ovocytes de xénope pour une concentration finale en protéines de 60,7 ng/ovocyte. Les membranes, qui portent les nAChR natifs, sont supposées former de petites vésicules liées entre elles, fusionnées à la membrane de l'ovocyte (Limon *et al.*, 2008).

Pour voir si les récepteurs présents dans les membranes de la blatte sont fonctionnels nous avons testé l'effet de l'ACh et de la NIC. Les réponses obtenues sont de $-236,33 \pm 57,88$ nA et $-173,6 \pm 38,99$ nA, pour l'ACh et la NIC, respectivement (**Figure 24**). Ces résultats valident l'expression fonctionnelle des récepteurs natifs en ovocyte. Nous avons également étudié l'effet des néonicotinoïdes sur ces récepteurs (10 s d'application) (**Figure 25**). Les amplitudes induites par la CLO et le TMX sont concentrations-dépendantes avec des EC_{50} de 0,13 mM pour la CLO, 0,68 mM pour l'ACE et 0,04 mM pour le TMX (**Figure 25**).

Nous avons ensuite étudié la modulation induite par les insecticides néonicotinoïdes sur les courants activés suite à l'application de l'ACh ou de la NIC 1 mM. Nous avons utilisé des faibles concentrations de néonicotinoïdes (10 μ M). Les résultats préliminaires montrent que la co-application de 1mM ACh en présence de 10 μ M TMX ou d'ACE entraîne une diminution de la réponse induite par l'ACh. Cette diminution de l'amplitude du courant de $44,39 \pm 4,55$ % pour le TMX et de $40,8 \pm 8,6$ % pour l'ACE. La CLO ne semble avoir aucun effet sur l'amplitude du courant induit par l'ACh (**Figure 26**). Ces résultats suggèrent que les néonicotinoïdes ont des effets différents. Ils sont capables de moduler la réponse induite par l'ACh et la NIC. En revanche, les résultats obtenus révèlent une légère augmentation non significative de l'amplitude du courant lorsque la NIC est co-appliquée avec la CLO et l'ACE (**Figure 27**). De même, le TMX ne module pas la réponse induite par la NIC. Ces résultats montrent que malgré leur structure chimique commune, les trois insecticides néonicotinoïdes n'agissent pas de la même manière sur les courants d'ACh et de NIC.

Nous avons également étudié l'effet inverse, c'est à dire l'effet de la NIC et de l'ACh (10 μ M) sur la réponse induite par les néonicotinoïdes (1mM). Les résultats montrent que ni l'ACh, ni la NIC ne sont capables de moduler l'amplitude des courants induits par les néonicotinoïdes (**Figure 28**).

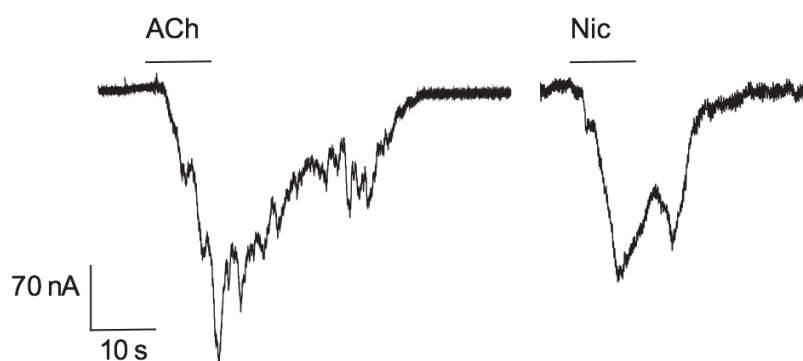


Figure 24 : Courants induits par l'application (10 s) de l'ACh et de la Nic à 1mM sur les récepteurs natifs de la blatte *P. americana* exprimés en ovocyte de xenope.

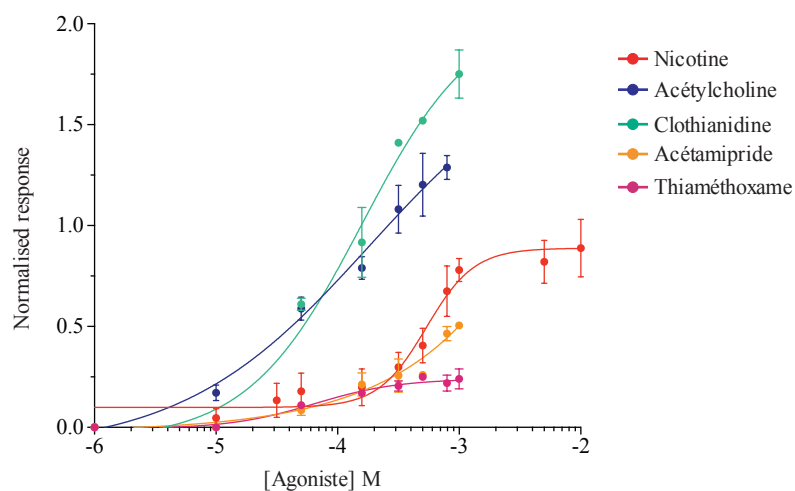


Figure 25 : Courbe dose réponse obtenue pour l'ACh, la NIC, le TMX, la CLO et l'ACE. La CLO (●) agit comme un super agoniste alors que l'ACE (●) et le TMX (●) agissent comme des agonistes partiels.

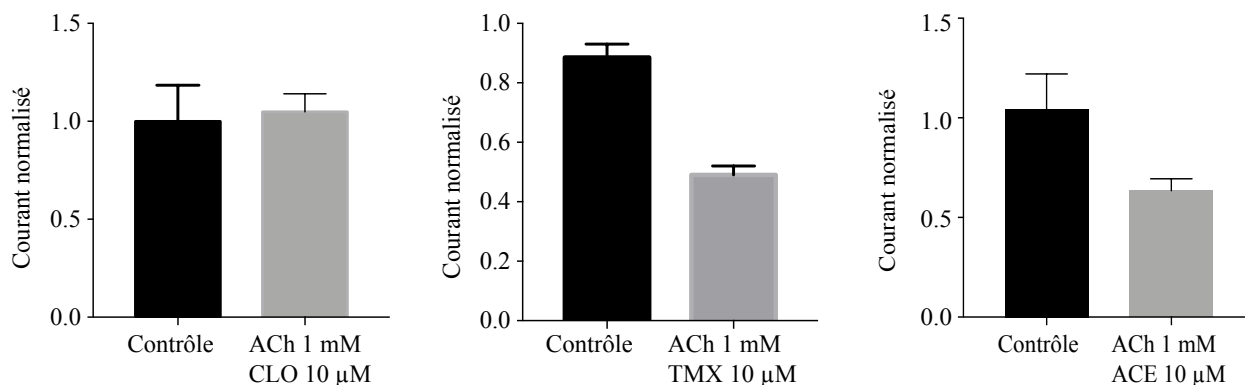


Figure 26 : Effet des néonicotinoïdes à faible concentration sur la réponse induite par l'ACh. Le contrôle correspond à l'application de l'ACh 1mM pendant 10 s. L'amplitudes des courants est normalisée par rapport au I moyen de l'ACh obtenue dans chaque condition. (Les données présentées sont préliminaires et le manque de réplicats ne permet pas de faire des tests statistiques).

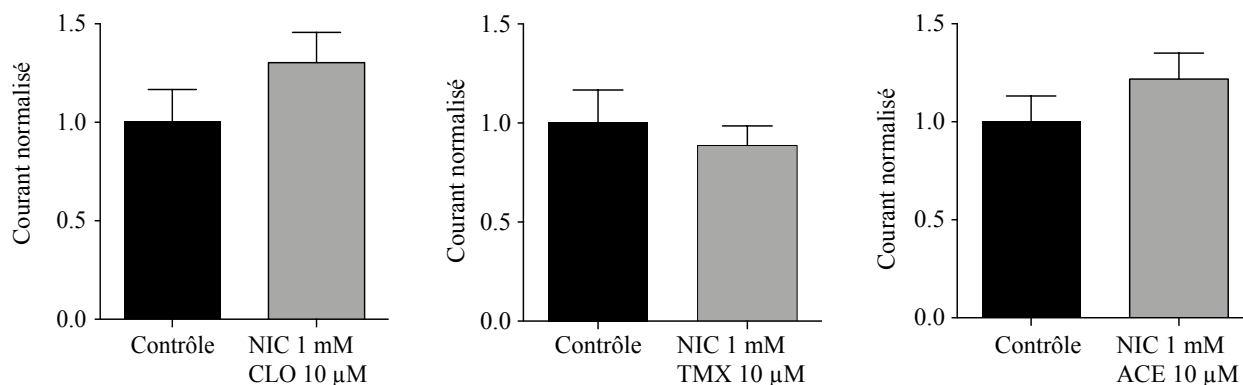


Figure 27 : Effet des néonicotinoïdes à faible concentration sur la réponse induite par la NIC. Le contrôle correspond à l'application de NIC 1mM pendant 10 s. L'amplitudes des courants est normalisé par rapport à l'amplitude moyenne de la NIC obtenue dans chaque condition. (Les données présentées sont préliminaires et le manque de réplicats ne permet pas de faire des tests statistiques).

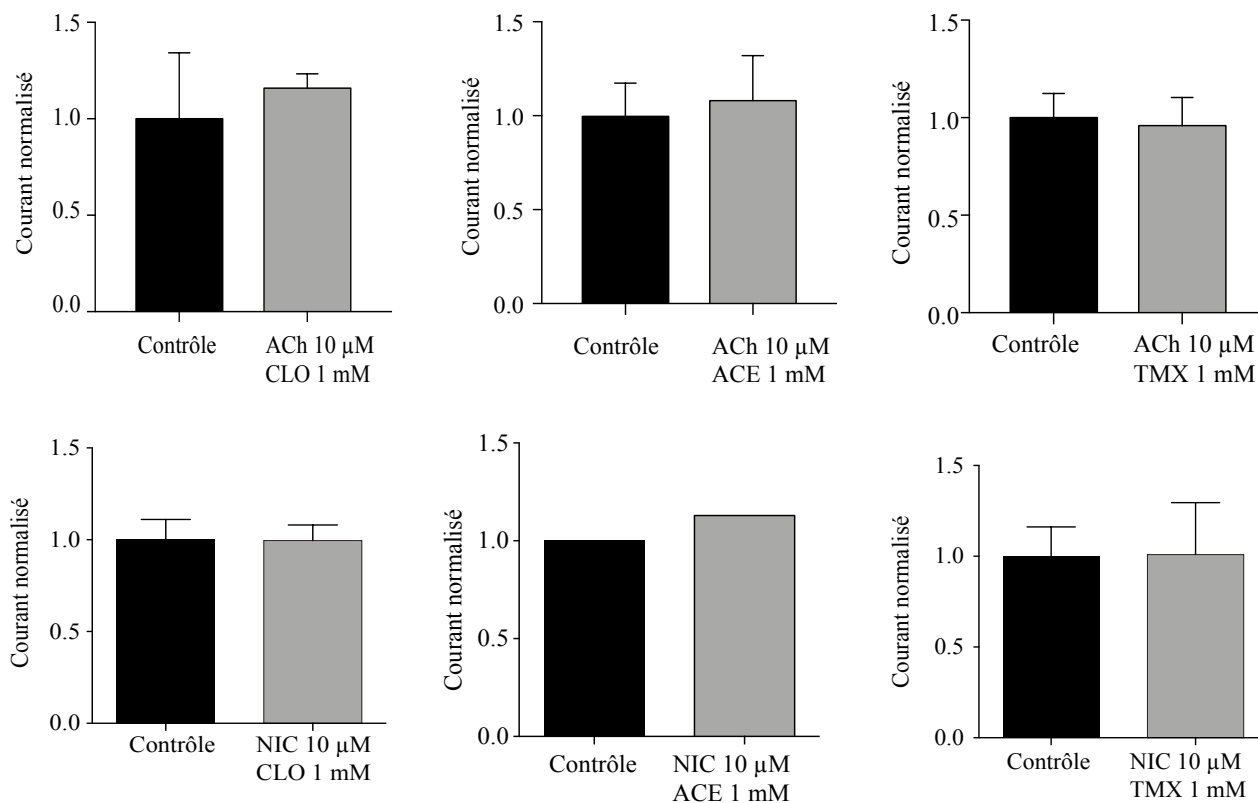


Figure 28 : Etude de la modulation de l'ACh et de la NIC sur les réponses induites par les néonicotinoïdes. Le contrôle correspond à l'application des néonicotinoïdes 1mM pendant 10s. L'ACh et la NIC (10μM) sont co-appliqués pendant 10s. (Les données présentées sont préliminaires et le manque de réplicats ne permet pas de faire des tests statistiques).

C. Discussion

Nous avons montré que les récepteurs natifs de la blatte *Periplaneta americana* peuvent être exprimés en ovocyte de xénope comme cela avait été réalisé sur le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Crespin *et al.*, 2015). Les réponses à l'ACh et à la NIC (1mM) obtenues chez le puceron étaient de l'ordre de -5 à -10 nA alors que chez la blatte nous avons obtenu des réponses moyennes de l'ordre de 10 à 20 fois plus importantes, pour des quantités protéiques injectées nettement plus faibles de l'ordre de 60 ng/ovocyte pour la blatte et 762 ng/ ovocyte pour le puceron (Crespin *et al.*, 2015). Il est possible qu'une concentration trop importante en protéines réduise la fusion de la membrane lipidique, contenant les récepteurs, avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Dans tous les cas, les concentrations injectées permettent d'augmenter l'amplitude des courants.

Dans cette étude nous montrons que les trois néonicotinoïdes sont capables d'activer les nAChR exprimés sur les extraits de membranes. Nous avons également observé que les trois néonicotinoïdes sont capables de moduler les réponses induites par l'ACh et la NIC de façon distinctes. Le TMX provoque une diminution de la réponse induite par l'ACh. Une diminution similaire a été observée chez le récepteur $\alpha 7$ de rat (Cartereau *et al.*, 2017). De même, l'IMI est capable d'inhiber la réponse induite par l'ACh sur le récepteur $\alpha 4\beta 2$ d'humain (Li *et al.*, 2011). L'ACE cause également une inhibition de la réponse induite par l'ACh, mais lors de sa co-application avec la NIC, l'effet est différent et l'ACE induit une augmentation de la réponse. Cette augmentation a également été observée avec le récepteur $\alpha 7$ de rat (Cartereau *et al.*, 2017). D'autres études ont montré que la CLO et l'IMI pouvaient amplifier les réponses à l'ACh, mais que le THC atténuait les réponses induites par l'ACh (Toshima *et al.*, 2008).

Discussion et perspectives

Aujourd'hui, les conséquences de l'utilisation intensive des insecticides sur l'environnement et sur la santé sont une question d'intérêt public. Les polémiques actuelles sur l'utilisation des insecticides néonicotinoïdes viennent, d'une part, du manque d'informations sur le mode d'action réel de ces molécules sur les récepteurs nicotiniques natifs des insectes et des mammifères et d'autre part, sur leur effet toxique vis-à-vis des pollinisateurs. En effet, la majeure partie des travaux se sont surtout focalisés sur des données toxicologiques. La connaissance du mode d'action de ces composés sur les récepteurs nicotiniques neuronaux est donc cruciale pour mieux comprendre leurs effets neurotoxiques et envisager des alternatives visant à réduire leur utilisation ou réduire leur toxicité. L'étape majeure demeure la connaissance des caractéristiques moléculaires et cellulaires des récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes. En effet, en dehors des études réalisées chez la drosophile (Lansdelle *et al.*, 2012 ; Watson *et al.*, 2010), le plus souvent sur des récepteurs chimères (Bertrand *et al.*, 1994, Ihara *et al.*, 2003, Ihara *et al.*, 2014, Kagabu *et al.*, 2002), nous avons peu ou pas de connaissances sur la composition en sous-unités des récepteurs nicotiniques natifs d'insectes. Ces récepteurs sont la cible majeure des insecticides néonicotinoïdes et de la nouvelle famille d'insecticides, les sulfoximines, appelés à remplacer les insecticides néonicotinoïdes. Les travaux que nous avons réalisés ont permis d'acquérir des données originales. Tout d'abord, nous avons pour la première fois exprimé un récepteur homomérique fonctionnel d'insecte dans un système hétérologue. Des tentatives d'expression de récepteurs fonctionnels homomériques d'arthropodes avaient précédemment été réalisées mais sans succès probant (Watson *et al.*, 2010, Lansdell *et al.*, 2012). Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour améliorer les conditions d'expression du récepteur $\alpha 7$ de blatte, nous avons pu montrer que ce récepteur n'était pas sensible à tous les insecticides néonicotinoïdes. Particulièrement, la plupart des insecticides comme l'IMI et la CLO sont incapables de l'activer. En revanche, les réponses induites par la NIC sont modulées par ces composés, ce qui suggère qu'ils peuvent agir comme des modulateurs de ce récepteur plutôt que des activateurs. Des résultats similaires ont été obtenus sur le récepteur $\alpha 7$ de mammifères (Cartereau *et al.*, 2017). A l'inverse du récepteur $\alpha 7$ de blatte, les néonicotinoïdes testés, à l'exception du TMX, sont des agonistes partiels du récepteur $\alpha 7$ de rat. Il est possible que cette différence soit due à la faible sensibilité du récepteur $\alpha 7$ de blatte. En effet, les sous-unités $\alpha 7$ d'insectes et de mammifères forment un groupe monophyétique différent des autres sous-unités alpha (Thany *et al.*, 2007). Nous nous attendions à ce que le récepteur $\alpha 7$ de blatte présente les mêmes propriétés pharmacologiques que le récepteur $\alpha 7$ de rat. Cette différence d'affinité vis-à-vis des insecticides néonicotinoïdes

montre que ces deux récepteurs ont évolué différemment entre insectes et mammifères. En effet, la comparaison des séquences des sous-unités $\alpha 7$ de blatte et de rat révèle un pourcentage d'identité de seulement 45 % (**Figure 29**).

Bien que nous ayons pu avoir une expression fonctionnelle du récepteur, nous avons dû appliquer de fortes concentrations de NIC comme cela avait été le cas lors d'études précédentes sur les récepteurs nicotiques exprimés au niveau des neurones DUM (Courjaret et Lapied, 2001). Cela peut être discuté et nécessite certainement une amélioration du protocole d'expression pour réduire les concentrations des molécules à tester. Dans le but d'augmenter l'expression et/ou la sensibilité du récepteur, il serait intéressant d'utiliser des protéines chaperonnes. La protéine RIC-3 (resistant to inhibitors of cholinesterase) est l'une des protéines les plus utilisées. Le gène codant pour RIC-3 (*ric-3*) a été identifié en 1995 comme l'un des gènes de *Caenorhabditis elegans* qui, lorsqu'il est muté, confère une résistance aux inhibiteurs de l'AChE (Nguyen *et al.*, 1995). Des études d'expression hétérologue réalisées en ovocyte de xénope ont montré que la co-expression de RIC-3 entraîne une amélioration d'expression des récepteurs nAChR tels que le récepteur $\alpha 7$ de rat (Halevi *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont également été obtenus lors de l'expression du récepteur hétéromérique $D\alpha 5D\alpha 6$ de drosophile (Watson *et al.*, 2010). Sans la présence de la protéine RIC-3 aucun courant n'a pu être enregistré (Watson *et al.*, 2010). En 2012, Lansdell et ses collaborateurs ont exprimé pour la première fois deux récepteurs homomériques de drosophile en ovocyte de xénope, le premier était composé de la sous-unité $D\alpha 5$ et le second de la sous-unité $D\alpha 7$. La présence de la protéine RIC-3 était nécessaire pour obtenir l'expression de récepteurs homomériques (Lansdell *et al.*, 2010). RIC-3 pourrait donc nous permettre d'améliorer considérablement l'expression en système hétérologue des récepteurs $\alpha 7$ de *P. americana*. Récemment, une autre protéine chaperonne a prouvé son efficacité sur lignée cellulaire. La protéine NACHO est naturellement présente dans le réticulum endoplasmique de la souris et assure la médiation de l'assemblage des nAChR homomériques et hétéromériques. Les souris présentant une délétion de cette protéine ont des déficits comportementaux compatibles avec la perte globale de nAChR dans le cerveau (Matta *et al.*, 2017, Gu *et al.*, 2016). Cette protéine n'a jamais été testée en ovocyte de xénope mais son utilisation sur lignée cellulaire HEK transfectée du récepteur $\alpha 7$ révèle une meilleure réponse à l'ACh (Gu *et al.*, 2016). La comparaison des résultats obtenus avec RIC-3 et NACHO révèle une meilleure expression lorsque NACHO est utilisée. D'autre part, lorsque NACHO et RIC-3 sont toutes deux co-transfectées, elles augmentent de manière synergique les

courants induits par l'ACh du récepteur $\alpha 7$, suggérant qu'elles utilisent des mécanismes distincts (Gu *et al.*, 2016). L'amélioration de l'expression fonctionnelle de récepteur $\alpha 7$ de blatte est donc un enjeu fondamental pour mieux comprendre le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes

Les résultats obtenus lors de l'application des néonicotinoïdes diffèrent en fonction du récepteur étudié. En effet sur le récepteur $\alpha 7$ de blatte, la pré-application de la CLO entraîne une diminution de la réponse induite par la NIC alors que sur le récepteur $\alpha 7$ de rat les résultats montrent une augmentation de l'amplitude du courant induit par l'ACh (Chapitre 1 & 2). Une différence de modulation induite par la CLO a également été observée entre le récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet (Toshima *et al.*, 2008) et le récepteur $\alpha 4\beta 2$ d'humain (Li *et al.*, 2011). Dans le premier cas la CLO induit une augmentation de la réponse induite par l'ACh, alors que sur le récepteur d'humain, il a été observé une diminution de la réponse (Toshima *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2011). Li et ses collaborateurs ont également montré l'importance de la stoechiométrie du récepteur sur les propriétés pharmacologiques. En effet, la CLO inhibe fortement le récepteur $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, mais augmente la réponse induite par l'ACh sur le récepteur $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$. Le nombre de sous-unités α présentes permet d'augmenter la sensibilité du récepteur à la CLO (Li *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données confirment l'hypothèse que les propriétés fonctionnelles des récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes et des mammifères peuvent varier au sein de la même espèce et d'une espèce à l'autre pour le même récepteur.

Nous avons indiqué plus haut l'importance des récepteurs $\alpha 7$ du fait que ce sont des récepteurs homomériques avec des propriétés pharmacologiques différentes en comparaison aux récepteurs hétéromériques. Au cours de ce travail, nous avons observé que le récepteur $\alpha 7$ de blatte n'était pas bloqué par l' α -Bgt, particulièrement pour les doses utilisées (500 nM). Cette absence d'effet de l' α -Bgt confirme le caractère atypique de ce récepteur. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle des résidus particuliers pourraient modifier la sensibilité de ce récepteur vis à vis de l' α -Bgt et peut-être expliquer l'effet vis à vis des insecticides néonicotinoïdes. Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'utiliser la technique de mutagenèse dirigée. En effet, Shimomura et ses collaborateurs ont identifié 3 régions comportant des résidus affectant la sensibilité du récepteur aux néonicotinoïdes : le résidu X

dans le motif YXCC de la boucle C (Shimomura *et al.*, 2004), la région en amont de la boucle B (Shimomura *et al.*, 2005) et les résidus basiques dans la boucle D (Shimomura *et al.*, 2002, 2003, 2006) (**Figure 29**). Des données obtenues avec Ls-AChBP, ont montré l'importance de la tyrosine en position 185 (Y185). Cette tyrosine permet la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement guanidine de l'IMI et de la CLO avec le récepteur (Ihrara *et al.*, 2008) (**Figure 29**). De même, sur le récepteur $\alpha 7$ de poulet, la mutation de la glycine (G) située à la position 189 en acide glutamique (E) ou acide aspartique (D) induit une résistance vis à vis de deux néonicotinoïdes, l'IMI et le nitenpyram, suggérant que la glycine est importante pour la liaison de ces insecticides néonicotinoïdes (Matsuda *et al.*, 2000). Nous pouvons observer la présence de la tyrosine (Y185 chez *Lymnaea stagnalis*), au sein de la boucle C de la sous-unité $\alpha 7$ de la blatte *Periplaneta americana*, cependant l'alignement de séquences montre une absence de glycine et la présence d'une sérine (**Figure 29**).

Une autre technique, particulièrement intéressante, est la technique CRISPR/Cas 9 qui permet d'induire des mutations et d'étudier l'impact sur la résistance aux néonicotinoïdes. L'application de cette technique a notamment permis de générer des drosophiles dont la sous-unité $D\alpha 6$ possédait la mutation G275E, et d'étudier son implication sur la résistance vis à vis du spinosad (famille des spinosynes). Cette substitution permet d'augmenter la résistance de la drosophile au spinosad (Zimmer *et al.*, 2016).

Pour conclure, ce travail de thèse a permis une avancée sur l'étude de la caractérisation des propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiques neuronaux des insectes mais également sur l'étude du mode d'action des insecticides néonicotinoïdes. Plusieurs données préliminaires n'ont pas été présentées dans ce manuscrit, notamment la caractérisation pharmacologique du récepteur $\alpha 6\alpha 7$ ou du récepteur composé de la sous-unité $\alpha 6$ de blatte et $\beta 2$ de poulet. Ces données nécessitent des études complémentaires.

Références bibliographiques

A

Adams, M.D. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.

Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 89, 73–120.

Andrews, M.C., Callaghan, A., Field, L.M., Williamson, M.S., and Moores, G.D. (2004). Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology* 13, 555–561.

Anthon, E.W. (1955). Evidence for green peach aphid resistance to organophosphorous insecticides. *Journal of Economic Entomology* 48, 56-57.

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

Arias, H.R. (1998a). Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376, 173–220.

Arias, H.R.N. (1998b). Noncompetitive inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by endogenous molecules. *Journal of Neuroscience Research* 52: 369–379.

Ashoor, A., Nordman, J.C., Veltri, D., Yang, K.-H.S., Kury, Al, L., Shuba, Y., Mohamed Mahgoub, M., Howarth, F. C., Sadek, B., Sheh, A., Kabbani, N. and Oz, M. (2013). Menthol Binding and Inhibition of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Plos One* 8: e67674–12.

Azam, L., Winzer-Serhan, U., and Leslie, F.M. (2003). Co-expression of $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119, 965–977.

B

Bao, H., Liu, Y., Zhang, Y., and Liu, Z. (2017). Two distinctive $\hat{\beta}^2$ subunits are separately involved in two binding sites of imidacloprid with different affinities in *Locusta migratoria manilensis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 140, 36–41.

Barbara, G.S., Grünewald, B., Paute, S., Gauthier, M., and Raymond-Delpech, V. (2008). Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invertebrate Neuroscience*: in 8, 19–29.

Bass, C., Lansdell, S.J., Millar, N.S., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L.M. and Williamson M.S. (2006). Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 86–96.

Bass, C., Puinean, A.M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., Paul, V.L., Crossthwaite, A.J, Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Lind, R., Williamson, M.S., and Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience* 12, 51.

Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Ralf, N., Slater, R. and Williamson, M.S (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 51, 41–51.

Bass, C., Zimmer, C.T., Riveron, J.M., Wilding, C.S., Wondji, C.S., Kausmann, M., Field, L.M., Williamson, M.S. and Ralf, N. (2013). Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 19460–19465.

Baxter, S.W., Chen, M., Dawson, A., Zhao, J.-Z., Vogel, H., Shelton, A.M., David G. Heckel, D.G. and Jiggins, C.D. (2010). Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine

Receptor $\alpha 6$ Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet* 6: e1000802–10.

Beckers, A.B., Weerts, Z.Z.R.M., Helyes, Z., Masclee, A.A.M., and Keszthelyi, D. (2017). Review article: transient receptor potential channels as possible therapeutic targets in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1444–15.

Bertrand, D., and Gopalakrishnan, M. (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* 74, 1155–1163.

Bertrand, D., Ballivet, M., Gomez, M., Bertrand, S., Phannavong, B., and Gundelfinger, E.D. (1994). Physiological Properties of Neuronal Nicotinic Receptors Reconstituted from the Vertebrate $\beta 2$ Subunit and *Drosophila* α Subunits. *European Journal of Neuroscience* 6, 869–875.

Bertrand, D., Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Bertrand, S., and Changeux, J.P. (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 6971–6975.

Billen, B., Spurny, R., Brams, M., van Elk, R., Valera-Kummer, S., Yakel, J.L., Thomas Voetse, T., Bertrand, D., Smit, A.B., and Ulensa, C. (2012). Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 9173–9178.

Blount, P., and Merlie, J.P. (1990). Mutational analysis of muscle nicotinic acetylcholine receptor subunit assembly. *The Journal of Cell Biology* 111, 2613–2622.

Bossy B., Ballivet M., and Spierer P. (1988). Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. 1–8.

Bouzat, C., Gumilar, F., Spitzmaul, G., Wang, H.-L., Rayes, D., Hansen, S.B., Taylor, P. and Sine S.M. (2004). Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* 430, 896–900.

Brejč, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A.B. and Sixma, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269–276.

Broad, L.M., Zwart, R., Pearson, K.H., Lee, M., Wallace, L., McPhie, G.I., Emkey, R., Hollinshead, S.P., Dell, C.P., Baker, S.R. and Sher, E. (2006). Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318, 1108–1117.

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

Burford, N.T., Clark, M.J., Wehrman, T.S., Gerritz, S.W., Banks, M., O’Connell, J., Traynor, J.R and Alta, A. (2013). Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the μ -opioid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 10830–10835.

C

Cartereau, A., Martin, C., and Thany, S.H. (2017). Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology* 172, 5870–12.

Casida, J.E. (2018). Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology* 63, 125–144.

Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* 58, 99–117.

Cecchini, M., and Changeux, J.-P. (2015). The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology* 96, 137–149.

Celie, P.H.N., Klaassen, R.V., van Rossum-Fikkert, S.E., van Elk, R., van Nierop, P., Smit, A.B. and Sixma, T.K. (2005). Crystal Structure of Acetylcholine-binding Protein from *Bulinus truncatus* Reveals the Conserved Structural Scaffold and Sites of Variation in Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26457–26466.

Celie, P.H.N., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., and Sixma, T.K. (2004). Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* 41, 907–914.

Chakrapani, S., Bailey, T.D., and Auerbach, A. (2004). Gating Dynamics of the Acetylcholine Receptor Extracellular Domain. *J Gen Physiol* 123, 341–356.

Chamaon, K., Schulz, R., Smalla, K.-H., Seidel, B., and Gundelfinger, E.D. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila melanogaster*: the α -subunit $D\alpha 3$ and the β -type subunit ARD co-assemble within the same receptor complex. *FEBS Letters* 482, 189–192.

Chamaon, K., Smalla, K.-H., Thomas, U., and Gundelfinger, E.D. (2002). Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex. *Journal of Neurochemistry* 80, 149–157.

Changeux, J.-P. (2010). Allosteric Receptors: From Electric Organ to Cognition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50, 1–38.

Changeux, J.-P., and Edelstein, S.J. (1998). Allosteric Receptors after 30 Years. *Neuron* 21, 959–980.

Changeux, J.-P., Galzi, J.-L., Devillers-Thiéry, A., and Bertrand, D. (1992). The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Quart. Rev. Biophys.* 25, 395–432.

Changeux, J.P., Kasai, M., and Lee, C.Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 67, 1241–1247.

Chatzidaki, A., and Millar, N.S. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* 97, 408–417.

Chatzidaki, A., Fouillet, A., Li, J., Dage, J., Millar, N.S., Sher, E. and Ursu, D. (2015). Pharmacological Characterisation of Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in Human iPSC-Derived Neurons. *Plos One* 10: e0125116–18.

Cheung, H., Clarke, B.S., and Beadle, D.J. (1992). A patch—clamp study of the action of a nitromethylene heterocycle insecticide on cockroach neurones growing in vitro. *Pest Management Science* 34, 187–193.

Connolly, C.N., and Wafford, K.A. (2004). Molecular structure in ligand-gated ion channel function (*Biochemical Soc Transactions*).

Cordova, D., Benner, E.A., Schroeder, M.E., Holyoke, C.W., Zhang, W., Pahutski, T.F., Leighty, R.M., Vincent, D.R. and Hamm, J.C (2016). Mode of action of triflumezopyrim, A novel mesoionic insecticide which inhibits the nicotinic acetylcholine receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 74, 32–41.

Corringer, P.-J., Le Novère, N., and Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 431–458.

Courjaret, R., and Lapied, B. (2001). Complex Intracellular Messenger Pathways Regulate One Type of Neuronal α -Bungarotoxin-Resistant Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in Insect Neurosecretory Cells (Dorsal Unpaired Median Neurons). *Molecular Pharmacology* 60, 80–91.

Courjaret, R., and Lapied, B. (2001). Complex Intracellular Messenger Pathways Regulate One Type of Neuronal α -Bungarotoxin-Resistant Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in Insect Neurosecretory Cells (Dorsal Unpaired Median Neurons). 60, 80–91.

Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.M., Hernandez, M.C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Thomas Barkas, T. and Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine

receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5, 847–856.

Crespin, L., Legros, C., List, O., Tricoire-Leignel, H., and Mattei, C. (2015). Injection of insect membrane in *Xenopus* oocyte, An original method for the pharmacological characterization of neonicotinoid insecticides. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 77, 10–16.

Curtis, L., Buisson, B., Bertrand, S., and Bertrand, D. (2002). Potentiation of Human $\alpha 4\beta 2$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor by Estradiol. *Molecular Pharmacology* 61, 127–135.

Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A.J., Maienfisch, P., Hall, R.G., Earley, F.G., Pitterna, T., Pal, S., Paul, V.L., Goodchild, J., Blacker, M., Hagmann, L. and Crossthwaite, A.J. (2012). Investigating the mode of action of sulfoxaflor, a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Management Science* 69, 607–619.

D

Dale, H.H. (1914). The action of certain esters of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther*, 6, 147-190.

Dale, H.H., and Dudley, H.W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *The Journal of Physiology* 68, 97–123.

Dale, R.P., Jones, A.K., Tamborindeguy, C., Davies, T.G.E., Amey, J.S., Williamson, S., Wolstenholme, A., Field, L. M., Williamson, M. S., Walsh, T. K. and Sattelle, D. B. (2010). Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome, Ion channel genes in the pea aphid. *Insect Molecular Biology* 19, 141–153.

Dederer, H., Berger, M., Meyer, T., Werr, M., and Ilg, T. (2013). Structure-activity relationships of acetylcholine derivatives with *Lucilia cuprin* nicotinic acetylcholine receptor

$\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in chicken $\beta 2$ subunit hybrid receptors in comparison with chicken nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4/\beta 2$. *Insect Molecular Biology* 22, 183–198.

Dederer, H., Werr, M., and Ilg, T. (2011). Differential sensitivity of *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in recombinant hybrid receptors to nicotinoids and neonicotinoid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 51–61.

Déglise, P., Grünewald, B., and Gauthier, M. (2002). The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters* 324, 86.

Desneux, N., Decourtye, A., and Delpuech, J.-M. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81–106.

Dupuis, J.P., Gauthier, M., and Raymond-Delpech, V. (2011). Expression patterns of nicotinic subunits $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, and $\beta 1$ affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles. *Journal of Neurophysiology* 106, 1604–1613.

Dupuis, J., Louis, T., Gauthier, M., and Raymond, V. (2012). Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: From genes to behavioral functions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36, 1553–1564.

E

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

Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., and Vetter, D.E. (1994). $\alpha 9$, an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715.

Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., and Boulter, J. (2001). α 10: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. (National Acad Sciences), pp 3501–3506.

Eusebi, F., Palma, E., Amici, M., and Miledi, R. (2009). Microtransplantation of ligand-gated receptor-channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: A potent tool for expanding functional information. *Progress in Neurobiology* 88, 32–40.

F

Faghih, R., Gopalakrishnan, S.M., Grønlien, J.H., Malysz, J., Briggs, C.A., Wetterstrand, C., Ween, H., Curtis, M.P., Sarris, K.A., Gfesser, G.A., El-Kouhen, R., Robb, H.M., Radek, R.J., Marsh, K.C., Bunnelle, W.H. and Gopalakrishnan M. (2009). Discovery of 4-(5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1 H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744) as a Novel Positive Allosteric Modulator of the α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 3377–3384.

Field, L.M., Devonshire, A.L., and Forde, B.G. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochemical Journal* 251, 309–312.

Foster, S.P., Cox, D., Oliphant, L., Mitchinson, S., and Denholm, I. (2008). Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* 64, 1111–1114.

G

Galzi, J.-L., Bertrand, D., Devillers-Thiéry, A., Revah, F., Bertrand, S., and Changeux, J.-P. (1991). Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the α 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters* 294, 198–202.

Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrügge, C., Déglise, P., Kljucovic, P., Armengaud, C. and Grünewald, B. (2006). Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* 86, 164–174.

Gill, J.K., Savolainen, M., Young, G.T., Zwart, R., Sher, E., and Millar, N.S. (2011). Agonist activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5867–5872.

Gill-Thind, J.K., Dhankher, P., D'Oyley, J.M., Sheppard, T.D., and Millar, N.S. (2015). Structurally similar allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors exhibit five distinct pharmacological effects. *J. Biol. Chem.* 290, 3552–3562.

Goldberg, F., Grünewald, B., Rosenboom, H., and Menzel, R. (1999). Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Physiology* 514, 759–768.

Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Milena Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L. and Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* 78, 703–711.

Gotti, C., Moretti, M., Gaimarri, A., Zanardi, A., Clementi, F., and Zoli, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* 74, 1102–1111.

Grønlien, J.H., Håkerud, M., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Briggs, C.A., Gopalakrishnan, M. and Malysz, J. (2007). Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *72*, 715–724.

Grønlien, J.H., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Cassar, S., Li, J., Briggs, C.A., Murali Gopalakrishnan, M. and Malysz, J. (2010). Importance of M2–M3 loop in governing

properties of genistein at the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inferred from $\alpha 7/5$ -HT3A chimera. *European Journal of Pharmacology* 647, 37–47.

Grutter, T., and Changeux, J.-P. (2001). Nicotinic receptors in wonderland. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 459–463.

Gu, S., Matta, J.A., Lord, B., Harrington, A.W., Sutton, S.W., Davini, W.B. and Brett, D.S. (2016). Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* 89, 948–955.

H

Halevi, S., McKay, J., Palfreyman, M., Yassin, L., Eshel, M., Jorgensen, E. And Treinin, M. (2002). The *C. elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal* 21, 1012–1020.

Hans, M., Wilhelm, M., and Swandulla, D. (2012). Menthol Suppresses Nicotinic Acetylcholine Receptor Functioning in Sensory Neurons via Allosteric Modulation. *Chemical Senses* 37, 463–469.

Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., and Bourne, Y. (2005). Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *The EMBO Journal* 24, 3635–3646.

Hansen, S.B., Talley, T.T., Radić, Z., and Taylor, P. (2004). Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 24197–24202.

Hibbs, R.E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T.T., Conrod, S., Kem, W.R., Palmer Taylor, P., Marchot, P. and Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO Journal* 28, 3040–3051.

Holyoke, C.W., Jr, Zhang, W., Pahutski, T.F., Jr., Lahm, G.P., Tong, M.-H.T., Cordova, D., Schroeder, M.E., Benner, E.A., Rauh, J.J., Dietrich, R.B., Leighty, R.M., Daly, R.F., Smith, R.M., Vincent, D.R. and Christianson, L.A. (2015). Triflumezopyrim, Discovery and Optimization of a Mesoionic Insecticide for Rice. In *Discovery and Synthesis of Crop Protection Products*, (Washington, DC, American Chemical Society), pp 365–378.

Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.C., Wides, R., Salzberg, S.L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.H., Rusch, D.B., Lai, Z., Kraft, C.L., et al., (2002). The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129–149.

Huang, Y., Williamson, M.S., Devonshire, A.L., Windass, J.D., Lansdell, S.J., and Millar, N.S. (1999). Molecular Characterization and Imidacloprid Selectivity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from the Peach-Potato Aphid *Myzus persicae*. *Journal of Neurochemistry* 73, 380–389.

Hurst, R.S., Hajós, M., Raggenbass, M., Wall, T.M., Higdon, N.R., Lawson, J.A., Rutherford-Root, K.L., Berkenpas, M.B., Hoffmann, W.E., Piotrowski, D.W., Groppi, V.E., Allaman, G., Ogier, R., Bertrand, S., Bertrand, D. and Arneric, S.P (2005). A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, 4396–4405.

I

Ihara, M., Brown, L.A., Ishida, C., Okuda, H., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2006). Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *Journal of Pesticide Science* 31, 35–40.

Ihara, M., Hirata, K., Ishida, C., KAGABU, S., and Matsuda, K. (2007). 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., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V. & Sattelle, D.B. (2003) Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila*–chicken SAD $\beta 2$ and ALS $\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. 45, 133–144.

Ihara, M., Matsuda, K., Shimomura, M., Sattelle, D.B., and Komai, K. (2004). Super Agonist Actions of Clothianidin and Related Compounds on the SAD $\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 761–763.

Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D.B. & Matsuda, K. (2014). Studies on an Acetylcholine Binding Protein Identify a Basic Residue in Loop G on the 1 Strand as a New Structural Determinant of Neonicotinoid Actions. 86, 736–746.

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

Ihara, M., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2015). Probing new components (loop G and the α – α interface) of neonicotinoid binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121, 47–52.

Ihara, M., Shimazu, N., Utsunomiya, M., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2014). A single amino acid polymorphism in the *Drosophila melanogaster* D $\alpha 1$ (ALS) subunit enhances neonicotinoid efficacy at D $\alpha 1$ –chicken $\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78, 547–552.

Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K. & Numa, S. (1988). Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335, 645–648.

Itier, V., and Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Letters* 504, 118–125.

J

Jensen, M.L., Schousboe, A., and Ahring, P.K. (2005). Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of Neurochemistry* 92, 217–225.

Jeschke, P., Nauen, R., and Beck, M.E. (2013). Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists: A Milestone for Modern Crop Protection. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 9464–9485.

Jin, X., and Steinbach, J.H. (2011). A Portable Site: A Binding Element for 17 β -Estradiol Can Be Placed on Any Subunit of a Nicotinic $\alpha 2$ Receptor. *J. Neurosci.* 31, 5045–5054.

Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 8, 327–16.

Jones, A.K., Bera, A.N., Lees, K., and Sattelle, D.B. (2010). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity* 104, 247–259.

Jones, A.K., Brown, L.A., and Sattelle, D.B. (2007). Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invertebrate Neuroscience*, in 7, 67–73.

Jones, A.K., Grauso, M., and Sattelle, D.B. (2005). 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., and Sattelle, D.B. (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research* 16, 1422–1430.

K

Kagabu, S., Matsuda, K. & Komai, K. (2002) Preparation of Dinotefuran Related Compounds and Agonistic Action on SAD β 2 Hybrid Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *Journal of Pesticide Science* 27, 374–377.

Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S. & Karlin, A. (1984). Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *Journal of Biological Chemistry* 259, 11662–11665.

Karlin, A. (2002). Ion channel structure emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 102–114.

Karlin, A., Cox, R.N., Diapola, M., Holtzman, E., Kao, P.N., Lobel, P., Wang, L.I. & Yodh, N. (1986). Functional Domains of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 463, 53–69.

Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C.V., Vetter, D.E., Heinemann, S.F., and Belén Elgoyhen, A. (2000). High calcium permeability and calcium block of the α 9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Research* 141, 117–128.

Kayser, H., Lehmann, K., Gomes, M., Schleicher, W., Dotzauer, K., Moron, M. & Maienfisch, P. (2016). Binding of imidacloprid, thiamethoxam and N-desmethylthiamethoxam to nicotinic receptors of *Myzus persicae*: pharmacological profiling using neonicotinoids, natural agonists and antagonists. *Pest Management Science* 72, n/a–n/a.

Kracun, S., Harkness, P.C., Gibb, A.J., and Millar, N.S. (2009). Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *British Journal of Pharmacology* 153, 1474–1484.

Krause, R.M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P.J., Galzi, J.L., Changeux, J.P. & Bertrand, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. 53, 283–294.

Kukhtina, V., Kottwitz, D., Strauss, H., Heise, B., Chebotareva, N., Tsetlin, V. & Hucho, F. (2006). Intracellular domain of nicotinic acetylcholine receptor: the importance of being unfolded. *Journal of Neurochemistry* 97, 63–67.

Kuryatov, A., Onksen, J., and Lindstrom, J. (2008). Roles of accessory subunits in $\alpha 4\beta 2$ (*) nicotinic receptors. *Molecular Pharmacology* 74, 132–143.

L

Lan, W.-S., Cong, J., Jiang, H., Jiang, S.-R., and Qiao, C.-L. (2005). Expression and Characterization of Carboxylesterase E4 Gene from Peach–Potato Aphid (*Myzus persicae*) for Degradation of Carbaryl and Malathion. *Biotechnol Lett* 27, 1141–1146.

Langley, J.N. (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of ‘receptive’ substances. *The Journal of Physiology* 36, 347–384.

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

Lansdell, S.J., and Millar, N.S. (2002). D $\beta 3$, an atypical nicotinic acetylcholine receptor subunit from *Drosophila*: molecular cloning, heterologous expression and coassembly. *Journal of Neurochemistry* 80, 1009–1018.

Lansdell, S.J., Collins, T., Goodchild, J., and Millar, N.S. (2012). The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits $D\alpha 5$ and $D\alpha 7$ form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neuroscience* 13, 73.

Lansdell, S.J., Millar, N., (2000). Cloning and heterologous expression of $D\alpha 4$, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* 39, 2604-2614

Le Novère, N. (2001). LGICdb, the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res.* 29, 294–295.

Le Novère, N., and Changeux, J.P. (2001). The Ligand Gated Ion Channel database, an example of a sequence database in neuroscience. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 356, 1121–1130.

Le Novère, N., Corringer, P.-J., and Changeux, J.-P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of Neurobiology* 53, 447–456.

Le Novère, N., Corringer, P.-J., and 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. *Biophysical Journal* 76, 2329–2345.

Lee, C.Y., do Instituto Butantan, C.C.M. (1966). Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission.

Leech, C.A., Jewess, P., Marshall, J., and Sattelle, D.B. (1991). Nitromethylene actions on in situ and expressed insect nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Letters* 290, 90–94.

Lester, H. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.* 27, 329–336.

Levandoski, M.M., Piket, B., and Chang, J. (2003). The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology* 471, 9–20.

Li, P., Ann, J., and Akk, G. (2011). Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *Journal of Neuroscience Research* 89, 1295–1301.

Li, J., Shao, Y., Ding, Z., Bao, H., Liu, Z., Han, Z. & Millar, N.S. (2010). Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect biochemistry and molecular biology* 40, 17–22.

Li, X., Schuler, M.A., and Berenbaum, M.R. (2007). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231–253.

Limon, A., Reyes-Ruiz, J.M., and Miledi, R. (2008). Microtransplantation of neurotransmitter receptors from postmortem autistic brains to *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10973–10977.

Lind, R. (1999). Characterisation of multiple α -bungarotoxin binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 979–988.

Lind, R.E.A. (1998). *Pesticides biochemistry and physiology*, Vol.62 Issue 01. 1–12.

Liu, Y.-P., Lin, K.-J., Liu, Y., Gui, F.-R., and Wang, G.-R. (2013). Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Integrative Agriculture* 12, 2083–2091.

Liu, Z., and Han, Z. (2006). Fitness costs of laboratory-selected imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Pest Management Science* 62, 279–282.

Liu, Z., Han, Z., Zhang, Y., Song, F., Yao, X., Liu, S., et al. (2009). Heteromeric co-assembly of two insect nicotinic acetylcholine receptor α subunits: influence on sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Journal of Neurochemistry* 108, 498–506.

Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Denholm, I., Han, Z., and 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* 102, 8420–8425.

M

Malysz, J., Grønlien, J.H., Anderson, D.J., Håkerud, M., Thorin-Hagene, K., Ween, H., Wetterstrand, C., Briggs, C.A., Faghieh, R., Bunnelle, W.H. & Gopalakrishnan, M. (2009). In Vitro Pharmacological Characterization of a Novel Allosteric Modulator of $\alpha 7$ Neuronal Acetylcholine Receptor, 4-(5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl) benzenesulfonamide (A-867744), Exhibiting Unique Pharmacological Profile. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330, 257–267.

Margaritopoulos, J.T., Skouras, P.J., Nikolaidou, P., Manolikaki, J., Maritsa, K., Tsamandani, K., Kanavaki, O.M., Bacandritsos, N., Zarpas, K.D. & Tsitsipis, J.A. (2007). Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Hemiptera, Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Management Science* 63, 821–829.

Marsal, J., Tigyí, G., and Miledi, R. (1995). Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 5224–5228.

Marshall, J., Buckingham, S.D., Shingai, R., Lunt, G.G., Goosey, M.W., Darlison, M.G., Sattelle, D.B. & Barnard, E.A. (1990). Sequence and functional expression of a single α subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO Journal* 9, 4391–4398.

Matsuda, K., Buckingham, S.D., Freeman, J.C., Squire, M.D., Baylis, H.A., and Sattelle, D.B. (1998). Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology* 123, 518–524.

Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., and Sattelle, D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 573–580.

Matsuda, K., Shimomura, M., Ihara, M., Akamatsu, M., and 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 Biochemistry* 69, 1442–1452.

Matsuda, K., Shimomura, M., Kondo, Y., Ihara, M., Hashigami, K., Yoshida, N., Raymond, V., Mongan, N.P., Freeman, J.C., Komai, K. & Sattelle, D.B. (2000). Role of loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. *British Journal of Pharmacology* 130, 981–986.

Matsushima, N., Hirose, S., Iwata, H., Fukuma, G., Yonetani, M., Nagayama, C., Hamanaka, W., Matsunaka, Y., Ito, M., Kaneko, S., Mitsudome, A. & Sugiyama, H. (2002). Mutation (Ser284Leu) of neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit associated with frontal lobe epilepsy causes faster desensitization of the rat receptor expressed in oocytes. *Epilepsy Research* 48, 181–186.

Matta, J.A., Gu, S., Davini, W.B., Lord, B., Siuda, E.R., Harrington, A.W. & Brecht, D.S. (2017). NACHO Mediates Nicotinic Acetylcholine Receptor Function throughout the Brain. *CellReports* 19, 688–696.

Miledi, R., Duenas, Z., Martinez-Torres, A., Kawas, C.H. & Eusebi, F. (2004). From The Cover: Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 1760–1763.

Miledi, R., Eusebi, F., Martínez-Torres, A., Palma, E., and Trettel, F. (2002). Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13238–13242.

Millar, N.S. (1999). Heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian and *Drosophila* cell lines: the importance of the host cell environment. *Biochemical Society Transactions* 27, A143–A143.

Millar, N.S. (2009). A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* 78, 766–776.

Millar, N.S., and Denholm, I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 7, 53–66.

Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. & Numa, S. (1984). Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* 307, 604–608

Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C. & Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406–411.

Mongan N.P., Baylis H.A., Adock C., Smith G.R., Sansom M.S.P. and Sattelle D.B. (1998) An extensive and diverse gene family of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits in *Caenorhabditis elegans*. *Receptors Channels* 6: 213-223.

Moores, G.D., Devine, G.J., and Devonshire, A.L. (1994). Insecticide-Insensitive Acetylcholinesterase Can Enhance Esterase-Based Resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 49, 114–120.

Morales, A., Aleu, J., Ivorra, I., Ferragut, J.A., Gonzalez-Ros, J.M., and Miledi, R. (1995). Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from Torpedo into the *Xenopus* oocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8468–8472.

Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B.K., and Bermudez, I. (2006). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Molecular Pharmacology* 70, 755–768.

N

Nagata, K., Aistrup, G.L., Song, J.-H., and Narahashi, T. (1996). Subconductance-state currents generated by imidacloprid at the nicotinic acetylcholine receptor in PC 12 cells. *NeuroReport* 7: 1025–1028.

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

Nelson, M.E., Kuryatov, A., Choi, C.H., Zhou, Y., and Lindstrom, J. (2003). Alternate Stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology* 63, 332–341.

Ng, H.J., Whittemore, E.R., Tran, M.B., Hogenkamp, D.J., Broide, R.S., Johnstone, T.B., Zheng, L., Stevens, K.E. & Gee, K.W. (2007). Nootropic $\alpha 7$ nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8059–8064.

Ngufor, C., Fongnikin, A., Rowland, M., and N'Guessan, R. (2017). Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* sl in Southern Benin. *Plos One* 12, e0189575–14.

Nguyen, M., Alfonso, A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1995). *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* 140, 527–535.

Niven, J.E., Graham, C.M., and Burrows, M. (2008). Diversity and Evolution of the Insect Ventral Nerve Cord. *Annual Review of Entomology* 53, 253–271.

Noblin, D.J., Bertekap, R.L., Jr., Burford, N.T., Hendricson, A., Zhang, L., Knox, R., Banks, M., O’Connell, J. & Alt, A. (2012). Development of a High-Throughput Calcium Flux Assay for Identification of All Ligand Types Including Positive, Negative, and Silent Allosteric Modulators for G Protein-Coupled Receptors. *ASSAY and Drug Development Technologies* 10, 457–467.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S. (1982). Primary structures of β - and δ -subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301, 251–255.

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., et al. (1983). Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302, 528–532.

O

Olsen, J.A., Balle, T., Gajhede, M., Ahring, P.K., and Kastrop, J.S. (2014). Molecular Recognition of the Neurotransmitter Acetylcholine by an Acetylcholine Binding Protein Reveals Determinants of Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Plos One* 9, e91232–8.

Orr, N., Shaffner, A.J., and Watson, G.B. (1997). Pharmacological Characterization of an Epibatidine Binding Site in the Nerve Cord of *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58, 183–192.

Osborne, R.H. (1996). Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 69, 117–142.

P

Palma, E., Maggi, L., Miledi, R., and Eusebi, F. (1998). Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10246–10250.

Palma, E., Trettel, F., Fucile, S., Renzi, M., Miledi, R., and Eusebi, F. (2003). Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: A method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2896–2900.

Papke, R.L., Sanderg, P.R., and shytle, R.D. (2001). Analysis of Mecamylamine Stereoisomers on Human Nicotinic Receptor Subtypes. 1–11.

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

Pereira, E.F.R., Hilmas, C., Santos, M.D., Alkondon, M., Maelicke, A., and Albuquerque, E.X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology* 53, 479–500.

Philippou, D., Field, L., and Moores, G. (2009). Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of *Myzus persicae*(Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece. *Pest Management Science* 18, n/a–n/a.

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settle, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H. & Wiemers, M. (2014) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 68–102.

Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S. & Bass, C. (2010). Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae* D. L. Stern (Ed). PLoS Genetics 6, e1000999–11.

R

Reynolds, J.A., and Karlin, A. (1978). Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. Biochemistry 17, 2035–2038.

S

Salgado, V.L. (2016). Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. NeuroToxicology 56, 188–195.

Salgado, V.L., and 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.

Salgado, V.L., and Sparks, T.C. (2005). The Spinosyns: Chemistry, Biochemistry, Mode of Action, and Resistance (Elsevier).

Samochocki, M. (2003). Galantamine Is an Allosterically Potentiating Ligand of Neuronal Nicotinic but Not of Muscarinic Acetylcholine Receptors. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 305, 1024–1036.

Sattelle, D.B., Jones, A.K., Sattelle, B.M., Matsuda, K., Reenan, R., and Biggin, P.C. (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. Bioessays 27, 366–376.

Saur, M., Moeller, V., Kapetanopoulos, K., Braukmann, S., Gebauer, W., Tenzer, S. & Markl, J. (2012). Acetylcholine-Binding Protein in the Hemolymph of the Planorbid Snail *Biomphalaria glabrata* Is a Pentagonal Dodecahedron (60 Subunits) E. A. Permyakov (Ed). PLOS ONE 7, e43685–14.

Schann, S., Mayer, S., Franchet, C., Frauli, M., Steinberg, E., Thomas, M., Baron, L. & Neuville, P. (2010). Chemical Switch of a Metabotropic Glutamate Receptor 2 Silent Allosteric Modulator into Dual Metabotropic Glutamate Receptor 2/3 Negative/Positive Allosteric Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 8775–8779.

Schulz, R., Bertrand, S., Chamaon, K., Smalla, K.-H., Gundelfinger, E.D., and Bertrand, D. (2000). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry* 74, 2537–2546.

Sgard, F., Charpantier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D. & Besnard, F. (2002). A Novel Human Nicotinic Receptor Subunit, $\alpha 10$, That Confers Functionality to the $\alpha 9$ -Subunit. 61, 150–159.

Sgard, F., Fraser, S.P., Katkowska, M.J., Djamgoz, M.B.A., Dunbar, S.J., and Windass, J.D. (1998). Cloning and Functional Characterisation of Two Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor α Subunits from the Insect Pest *Myzus persicae*. *Journal of Neurochemistry* 71, 903–912.

Shahsavari, A., Gajhede, M., Kastrup, J.S., and Balle, T. (2016). Structural Studies of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Using Acetylcholine-Binding Protein as a Structural Surrogate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 118, 399–407.

Shao, Y.-M., Dong, K., and Zhang, C.-X. (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 8, 324–10.

Shimomura, M., Okuda, H., and Matsuda, K. (2002). Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands. *British Journal of Pharmacology* 137, 162–169.

Shimomura, M., Satoh, H., Yokota, M., Ihara, M., Matsuda, K., and Sattelle, D.B. (2005). Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the N-terminus of the *Drosophila* $\text{D}\alpha 2$ subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity. *Neuroscience Letters* 385, 168–172.

Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2006). Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. *Molecular Pharmacology* 70, 1255–1263.

Shimomura, M., Yokota, M., Matsuda, K., Sattelle, D.B., and Komai, K. (2004). Roles of loop C and the loop B–C interval of the nicotinic receptor α subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects. *Neuroscience Letters* 363, 195–198.

Shimomura, M., Yokota, M., Okumura, M., Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D.B. & Komai, K. (2003). Combinatorial mutations in loops D and F strongly influence responses of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to imidacloprid. *Brain Research* 991, 71–77.

Shinzo Kagabu, A., and Matsuno, H. (1997). Chloronicotiny Insecticides. 8. Crystal and Molecular Structures of Imidacloprid and Analogous Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 276–281.

Sine, S.M., and Engel, A.G. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440, 448–455.

Singhal, S.K., Zhang, L., Morales, M., and Oz, M. (2007). Antipsychotic clozapine inhibits the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 52, 387–394.

Smit, A.B., Syed, N.I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K.S., Lodder, H., van der Schors, R.C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T.K. & Geraerts, W.P.M. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411, 261–268.

Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T. & Weiner, M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171, 3–59.

Sparks, T.C. (2013). Insecticide discovery, An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 8–17.

Sparks, T.C., Watson, G.B., Loso, M.R., Geng, C., Babcock, J.M., and Thomas, J.D. (2013). Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 1–7.

Sun, H., Liu, Y., Li, J., Cang, X., Bao, H., and Liu, Z. (2017). The potential subunits involved in two subtypes of α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 81, 32–40.

Swope, S.L., Moss S.J, Raymond L.A., Haganir R.L. (1999) Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*,33:49-78.

T

Taillebois, E., and Thany, S.H. (2016). Characterization of nicotine acetylcholine receptor subunits in the cockroach *Periplaneta americana* mushroom bodies reveals a strong expression of $\beta 1$ subunit: involvement in nicotine-induced currents. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 93, 40–54.

Taillebois, E., Beloula, A., Quinchard, S., Jaubert-Possamai, S., Daguin, A., Servent, D., Tagu, D., Thany, S.H. & Tricoire-Leignel, H. (2014). Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum* G. Smagghe (Ed). *PLOS ONE* 9, e96669.

Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A.K., and Thany, S.H. (2018). Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1–0.

Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., and Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug ...* 8, 733–750.

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

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

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

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

Timmermann, D.B., Grønlien, J.H., Kohlhaas, K.L., Nielsen, E.Ø., Dam, E., Jørgensen, T.D., Ahring, P.K., Peters, D., Holst, D., Christensen, J.K., Chrsitensen, J.K., Malysz, J., Briggs, C.A., Gopalakrishnan, M. & Olsen, G.M. (2007). An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 323, 294–307.

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

Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268.

Tomizawa, M., Millar, N.S., and Casida, J.E. (2005). Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1347–1355.

Ton, H.T., Smart, A.E., Aguilar, B.L., Olson, T.T., Kellar, K.J., and Ahern, G.P. (2015). Menthol Enhances the Desensitization of Human $\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology* 88, 256–264.

Torkkeli, P.H., Liu, H., and French, A.S. (2015). Transcriptome Analysis of the Central and Peripheral Nervous Systems of the Spider *Cupiennius salei* Reveals Multiple Putative Cys-Loop Ligand Gated Ion Channel Subunits and an Acetylcholine Binding Protein. *Plos One* 10, e0138068–26.

Toshima, K., Ihara, M., Kanaoka, S., Tarumoto, K., Yamada, A., Sattelle, D.B. & Matsuda, K. (2008). Potentiating and blocking actions of neonicotinoids on the response to acetylcholine of the neuronal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Pesticide Science* 33, 146–151.

Toshima, K., Kanaoka, S., Yamada, A., Tarumoto, K., Akamatsu, M., Sattelle, D.B. & Matsuda, K. (2009). Combined roles of loops C and D in the interactions of a neonicotinoid insecticide imidacloprid with the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *56*, 264–272.

U

Unwin, N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373, 37–43.

Unwin, N. (2005). Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 346, 967–989.

Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J., and Fujiyoshi, Y. (2002). Activation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Involves a Switch in Conformation of the α Subunits. *Journal of Molecular Biology* 319, 1165–1176.

Usherwood, P.N.R. (1994). Insect Glutamate Receptors. In *Advances in Insect Physiology* Volume 24, (Elsevier), pp 309–341.

V

Valera, S., Ballivet, M., and Bertrand, D. (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9949–9953.

Vo, D.T., Hsu, W.H., Abu-basha, E.A., and Martin, R.J. (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 101, no–no.

W

Watson, G.B., Chouinard, S.W., Cook, K.R., Geng, C., Gifford, J.M., Gustafson, G.D., Hasler, J.M., Larrinua, I.M., Letherer, T.J., Mitchell, J.C., Pak, W.L., Salgado, V.L., Sparks, T.C. & Stilwell, G.E. (2010). A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect biochemistry and molecular biology* 40, 376–384.

Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., Niehuis, O., Gadau, J., Colbourne, J.K., Nasonia Genome Working Group, Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., Niehuis, O., Gadau, J., Colbourne, J.K., Beukeboom, L.W., Desplan, C. et al., (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science* 327, 343–348.

Wiesner, P., and Kayser, H. (2000). Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: Relation to thiamethoxam action. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14, 221–230.

Wu, T.Y., Smith, C.M., Sine, S.M., and Levandoski, M.M. (2008). Morantel Allosterically Enhances Channel Gating of Neuronal Nicotinic Acetylcholine $\alpha 3 \beta 2$ Receptors. *Molecular Pharmacology* 74, 466–475.

Wu, Z.-S., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H.E. (2015). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Nature Publishing Group* 36, 895–907.

Wüstenberg, D.G., and Gr newald, B. (2004). Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology. a, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 190, 807–821.

X

Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., et al. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306, 1937-1940.

Y

Yi, F., Zou, C., Hu, Q., and Hu, M. (2012). The Joint Action of Destruxins and Botanical Insecticides (Rotenone, Azadirachtin and Paeonolum) Against the Cotton Aphid, *Aphis*

gossypii Glover. *Molecules* 17, 7533–7542.

Z

Zhang, A., Kaiser, H., Maienfisch, P., and Casida, J.E. (2000). Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor: Conserved Neonicotinoid Specificity of [3H]Imidacloprid Binding Site. *Journal of Neurochemistry* 75, 1294–1303.

Zhang, N., Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2004). Drosophila nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and α -bungarotoxin binding to distinct sites. *Neuroscience Letters* 371, 56–59.

Zimmer, C.T., Garrood, W.T., Puinean, A.M., Eckel-Zimmer, M., Williamson, M.S., Davies, T.G.E. & Bass, C. (2016). A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology* 73, 62–69.

Zwart, R., and Vijverberg, H.P.M. (1998). Four Pharmacologically Distinct Subtypes of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *Molecular Pharmacology* 54, 1124–1131.

Zwart, R., De Filippi, G., Broad, L.M., McPhie, G.I., Pearson, K.H., Baldwinson, T. & Sher, E. (2002). 5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology* 43, 374–384.

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Représentation des quatre groupes de récepteurs appartenant à la famille des LGIC.....11

Figure 2 : Présentation de la torpille, *Torpedo*.13

Figure 3 : Représentation structural du récepteur à l’ACh de l’organe électrique de la torpille.....15

Figure 4 : Structure des sous-unités formant les nAChR.15

Figure 5 : Représentation de l’organisation structurale du récepteur $\alpha 7$ de poulet.17

Figure 6 : Sites de liaison des ligands.....17

Figure 7 : Les différentes structure impliquées dans les sites de liaison.19

Figure 8 : Modèle structural d’une sous-unité composant le répéteur chimère 5-HT₃R-AChBP.....21

Figure 9 : Relation phylogénétique entre les différentes sous-unités de vertébrés.....23

Figure 10 : Les sites de liaisons à l’ACh sur le récepteur musculaire.....23

Figure 11 : Arbre phylogénétique des sous-unités de récepteurs nicotiniques chez différentes espèces d’insectes.....29

Figure 12 : Courbe I/V induit par l’application de NIC 10mM.....33

Figure 13 : Exemple de récepteurs exprimés en système hétérologue.37

Figure 14 : Evolution des produits phytosanitaires au cours du temps.39

Figure 15 : Diagramme des pesticides utilisés en France et répartition du chiffre d'affaire de chaque type de culture en Europe.	41
Figure 16 : Evolution des quantités de pesticides vendus en France de 1996 à 2013 (UIPP. Traitements : SOeS, 2016).	41
Figure 17 : Représentation moléculaire de la nithiazine et de ses dérivés, les néonicotinoïdes.....	43
Figure 18 : La présence de mutation modifie la sensibilité du récepteur au néonicotinoïdes....	47
Figure 19 : Représentation schématique des 7 mécanismes de résistance observé chez le pucerons <i>M. persicae</i>	49
Figure 20 : Mutation des récepteurs à ACh de type nicotinique engendrant des résistances vis-à-vis des néonicotinoïdes.....	51
Figure 21 : Mutation R81T de la sous-unité $\beta 1$	51
Figure 22 : La blatte <i>P. americana</i> est un insecte de la famille des <i>Blattidae</i>	119
Figure 23 : Schéma des différentes étapes pour réaliser l'extractions de récepteur natif de la blatte, <i>Periplaneta americana</i>	121
Figure 24 : Courants induits par l'application (10 s) de l'ACh et de la Nic à 1mM sur les récepteurs natifs de la blatte <i>P. americana</i> , exprimés en ovocyte de xenope.	125
Figure 25 : Courbe dose réponse obtenue pour l'ACh, la NIC, le TMX, la CLO et l'ACE.....	125
Figure 26 : Effet des néonicotinoïdes à faible concentration sur la réponse induite par l'ACh.....	126
Figure 27 : Effet des néonicotinoïdes a faible concentration sur la réponse induite par la NIC.....	126

Figure 28 : Etude de la modulation de l'ACh et de la NIC sur les réponses induites par les néonicotinoïdes.....127

Figure 29 : Alignement de séquence des sous-unités $\alpha 7$ d'humain, *Homo sapiens*, de rat, *Rattus norvegicus*, de drosophile *Drosophila melanogaster* et de blatte, *Periplaneta americana*.....134

Tableau 1 : Liste non exhaustive des molécules agissant comme modulateurs allostériques....27

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des sous-unités identifiées pour chaque espèce d'insecte....29

Tableau 3 : Liste non-exhaustive des néonicotinoïdes et de leurs effets en fonction des récepteurs étudiés.....43

Annexe



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

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

Review

Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies

Emiliane Taillebois^a, Alison Cartereau^b, Andrew K. Jones^c, Steeve H. Thany^{b,*}^a Université François Rabelais de Tours, Laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer, INSERM 1069, 37032 Tours, France^b Université d'Orléans, LBLGC USC INRA 1328, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France^c Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Health and Life Sciences, Oxford Brookes University, Oxford OX3 0BP, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Insect
Nicotinic receptors
Neonicotinoid insecticides
Binding studies

ABSTRACT

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are the main target of neonicotinoid insecticides, which are widely used in crop protection against insect pests. Electrophysiological and molecular approaches have demonstrated the presence of several nAChR subtypes with different affinities for neonicotinoid insecticides. However, the precise mode of action of neonicotinoids on insect nAChRs remains to be elucidated. Radioligand binding studies with [³H]-α-bungarotoxin and [³H]-imidacloprid have proved instructive in understanding ligand binding interactions between insect nAChRs and neonicotinoid insecticides. The precise binding site interactions have been established using membranes from whole body and specific tissues. In this review, we discuss findings concerning the number of nAChR binding sites against neonicotinoid insecticides from radioligand binding studies on native tissues. We summarize the data available in the literature and compare the binding properties of the most commonly used neonicotinoid insecticides in several insect species. Finally, we demonstrate that neonicotinoid-nAChR binding sites are also linked to biological samples used and insect species.

1. Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are involved in rapid neurotransmission in both insect and mammalian nervous systems and play major roles in learning and memory [1–3]. Because of these central roles, they are the main target of neonicotinoid insecticides which are used as a chemical method worldwide to control insect pest [4]. However, this has led to the evolution of resistance resulting in a reduction in effectiveness [5–8], environmental concerns linked to the accumulation of these compounds and potential effects on non-target insects such as pollinators [9–12]. Currently, binding studies are used to monitor and analyze the mode of action of neonicotinoid insecticides on insect native nAChRs in order to understand the levels of resistance. Binding studies, as well as the use of electrophysiology, have proven instructive in identifying different nAChR subtypes as well as providing insights into their pharmacological properties. For instance, studies using the patch clamp method demonstrated that imidacloprid (IMI), the forerunner of neonicotinoid insecticides, is a partial agonist of insect nAChRs [13–16] while clothianidin (CLT) and acetamiprid (ACE) appear to be full agonists [17]. Moreover, as it is the case with vertebrates, it is possible to identify insect α-bungarotoxin (α-Bgt)-sensitive and -insensitive nAChR subtypes through binding studies [16,18–20]. α-Bgt

is a snake toxin commonly used in vertebrates to characterize homomeric nAChRs such as α7 receptors [21–23] even though several studies have demonstrated that it can bind to heteromeric α9α10 and homomeric α8 receptors [24,25]. In insect species, CLT binds to both α-Bgt-sensitive and -insensitive receptors expressed in the cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons whereas, IMI and ACE may bind to α-Bgt-insensitive receptors with the finding that ACE could acts as an agonist of both DUM neuron nAChR1 and imidacloprid-insensitive nAChR2 subtypes [26–30]. Using electrophysiology on cockroach thoracic ganglia, it was found that IMI inhibited a desensitized α-Bgt-sensitive receptor called nAChD, not usually detected in binding assays with radiolabeled α-Bgt [18,31]. Despite this discrepancy between electrophysiology and binding assays, both approaches have demonstrated the presence of several nAChR subtypes with different pharmacological profiles.

It is likely that the variation in pharmacological properties is due to the presence of several different nAChR subunits. Analysis of genome sequences have revealed that insect nAChR gene families commonly consisting of 10 to 12 nAChR subunit genes as demonstrated by the pest species *Tribolium castaneum* [32], *Nilaparvata lugens* [33], *Myzus persicae* [34], and *Acyrtosiphon pisum* [35]. nAChRs consist of five subunits arranged around a central ion channel with the combination of subunits

* Corresponding author.

E-mail address: steeve.thany@univ-orleans.fr (S.H. Thany).<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>Received 24 December 2017; Received in revised form 14 April 2018; Accepted 17 April 2018
0048-3575/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

determining the functional and pharmacological properties of the receptor. As with their vertebrate counterparts, the insect subunits have been classified into homomeric and heteromeric receptors. For instance, heterologous expression studies have demonstrated that *Drosophila melanogaster* $\alpha 5$ and $\alpha 7$ subunits can form functional homomeric nAChRs [36] which bind α -Bgt [36,37]. Thus, homomeric receptors possess five ligand binding sites for acetylcholine (ACh) while heteromeric receptors consisting of α and β subunits can present three binding sites for ACh at the interface between two different subunits. The implication that both highly conserved subunits as well as divergent subunits [38] form neonicotinoid binding sites could lead to common or species specific pharmacological properties. Whilst co-immunoprecipitation studies have highlighted potential associations of several subunits [39,40] the subunit combination of insect nAChRs remains to be elucidated.

Ligand-binding interactions between neonicotinoid insecticides and insect nAChRs were studied using different insect tissues ranging from the brain tissue to the whole body. Two binding experiments are currently used: saturation and competition experiments [41]. In saturation experiments, the binding of an increasing series of radioligand concentrations is measured at equilibrium and analyzed to determine the binding constant (affinity constant K or dissociation constant K_d) and the concentration of specific binding sites for the radioligand (R_T); the experimental estimation of R_T is usually designated B_{max} [41]. 3H does not alter the chemical structure of the radioligand and has a longer half-life compared to ^{125}I , which has a higher specific activity and is particularly useful if the density of receptors is low [42]. In competition experiments the binding of one or more fixed concentrations of a radioligand is measured at equilibrium in the presence of increasing concentrations of a non-labeled compound. The data are analyzed to determine the binding constant of the non-labeled compound and the cooperativity between the non-labeled compound and the radioligand for binding to the radioligand-sensitive receptors. The equilibrium inhibition constant K_i is calculated from such experiments using the Cheng-Prusoff transformation [41]. According to the biological samples used, these binding experiments can lead to different interpretations of the results. In the present review, we summarize our current knowledge on the binding experiments to characterize neonicotinoid binding sites on insect neuronal nAChRs.

1.1. Localization of nicotinic acetylcholine receptors by labeled α -Bgt

Electrophysiological studies on insect neurons have demonstrated that they can exhibit nicotinic receptors which are blocked by α -Bgt [19,43–45]. Thus, as for vertebrates, it was suggested that α -Bgt binding sites preferentially reflect the expression of homomeric $\alpha 5$ or $\alpha 7$ receptors [36,37]. Saturation experiments using either [3H]- α -Bgt and [^{125}I]- α -Bgt highlighted the presence of several α -Bgt binding sites

in membrane preparations of different insect species (Table 1). For example, saturable binding consistent with the presence of both high and low affinity binding sites for [^{125}I]- α -Bgt was found in the aphid *M. persicae* [46]. As shown in Table 1, dissociation constants and maximal binding capacities were consistent with multiple receptor subtypes. The aphid *A. pisum* possessed very high affinity binding sites (with a K_d value < 0.1 nM) [37], notably higher than those of *M. persicae*, suggesting that differences exist within hemiptera both in the numbers and affinities of binding sites. For comparison, only one specific binding site was found in *Manduca sexta* [47], *Apis mellifera* [48], and *Locusta migratoria* [49] membrane preparations from nervous tissues. The ambiguity of assigning several binding sites is further apparent with *D. melanogaster*. In one study, a single binding site was found [50] whilst an additional binding site with very high affinity was found in another study [51], both using adult heads. The discrepancy seems to be associated with the use of ^{125}I or 3H isotopes suggesting that only [^{125}I]- α -Bgt is suitable to highlight the very high affinity binding sites. The biological samples used can also influence the quantification of binding sites. In *M. sexta* [47] and *D. melanogaster* [51], B_{max} values showed a higher number of binding sites in adults compared to embryonic or larval stages. This finding was not surprising since it was proposed that the expression profile of insect nAChR subunits may vary according to developmental stages as shown in *D. melanogaster* [52,53], *Apis cerana cerana* [54], *A. pisum* [35], *Cydia pomonella* [55], or *Chilo suppressalis* [56]. These results highlight the presence of α -Bgt binding site in diverse insect species suggesting the expression of functional α -Bgt-sensitive receptors as a common feature in insects.

1.2. α -Bgt as a probe to determine neonicotinoid binding sites

Saturation experiments conducted on *D. melanogaster* heads showed B_{max} up to 1400 fmol/mg using [3H]- α -Bgt [50] whereas values obtained with [3H]-IMI were much lower with B_{max} between 126 and 980 fmol/mg [50,57]. These findings suggest that most of the nAChR binding sites were α -Bgt-sensitive. The high density of these binding sites suggests that labeled α -Bgt could be of particular interest to study the binding properties of other nAChR ligands such as neonicotinoid insecticides, as shown in competitive experiments on native insect nAChRs (Table 2). Differential results were found with commonly used neonicotinoid insecticides IMI, CLT and thiamethoxam (TMX) in competition binding assays. Binding studies on *D. melanogaster* head membranes revealed that [3H]-IMI and [3H]- α -Bgt bind to distinct binding sites. In *D. melanogaster*, binding assays revealed that the binding capacity of [3H]-IMI is not disturbed when [3H]- α -Bgt is added simultaneously, demonstrating the presence of distinct binding sites for IMI and α -Bgt [50,58]. These results support the idea of weak competition of IMI for binding sites labeled with [3H]- α -Bgt, as K_i values were high in *D. melanogaster* [50]. Also, there was a lack of competition

Table 1
Identification of α -bungarotoxin (α -Bgt) binding sites by saturation experiments using labeled α -Bgt in different insect species.

Species	Biological samples	High affinity binding site		Low affinity binding site		Reference
		K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg)	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg)	
<i>A. pisum</i>	Whole body/adults	0.008 ± 0.002	12.86 ± 5.92	1.135 ± 0.213	135.9 ± 6.0	[37]
<i>M. persicae</i>	Whole body/mixed generation	1.2 ± 0.2	167 ± 6	33.7 ± 1.5	640 ± 180	[46]
<i>M. sexta</i>	Brain/adults			6.5	815	[47]
	Whole body/first instar larvae			7.6 ± 0.2	119 ± 19	
<i>A. mellifera</i>	Heads ^a			7.45 ± 0.89	451 ± 21.9	[48]
<i>D. melanogaster</i>	Embryo	0.4 ± 0.26	5 ± 3.9	7.4 ± 4.4	68 ± 18	[51]
	Heads	0.15 ± 0.07	240 ± 93	4.3 ± 1.7	1080 ± 97	
	Heads ^a			2.7 ± 0.3	1400 ± 100	[50]
<i>L. migratoria</i>	Male and female adults/nerve chain	1.0 ± 0.2	910 ± 100			[49]

K_d , dissociation constant, reflects the nAChRs' affinity for α -Bgt. B_{max} corresponds to the maximal binding and reflects the binding site density in the membrane preparation. The nature of the biological tissues used in the experiments are also reported.

^a study using [3H]- α -bungarotoxin as radioligand. All other binding assays were conducted with [^{125}I]- α -bungarotoxin.

Table 2
Binding properties of neonicotinoid insecticides determined by competitive experiments with labeled α -bungarotoxin (α -Bgt).

Species	Biological samples	Competitive ligand						Reference
		CLT		IMI		TMX		
		IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ki (nM)	
<i>D. melanogaster</i>	Adults/heads ^a	2900 ± 40		430 ± 80				[50]
<i>M. persicae</i>	Mixed generation/whole body			800 ± 280				[46]
<i>A. pisum</i>	Adults/whole body	0.194 ± 0.052	0.18 ± 0.05	22.33 ± 1.73	14.6 ± 1.13	1.636 ± 0.701	1.53 ± 0.65	[37]
<i>M. sexta</i>	Adults/brain			1700 ± 500				[47]
<i>A. mellifera</i>	Adults/heads ^a			1500				[48]
<i>P. americana</i>	Nerve cord	66.1 (46.1–94.7)		114 (82–160)		58.2 (40.1–84.5)		[59]

IC₅₀ corresponds to the concentration of non-labeled probe needed to inhibit 50% of the specific binding of the labeled probe; Ki is the inhibition constant calculated according to Cheng and Prusoff formula; values are indicated ± S.E.M and with a confidence interval of 95% between brackets.

^a Study using [³H]- α -bungarotoxin as radioligand. All other binding assays were conducted with [¹²⁵I]- α -bungarotoxin.

between α -Bgt and [³H]-IMI in the aphids *M. persicae*, *Aphis craccivora*, and *A. pisum* [35,49]. Interestingly, in the cockroach *Periplaneta americana*, it was shown that ACE, CLT, and TMX presented higher affinity for α -Bgt-binding sites than nitenpyram (NIT) and IMI, whereas dinotefuran (DTF) was a weak competitor with Ki in micromolar range [59,60]. A more recent work on *A. pisum* showed that IMI was a partial inhibitor of [¹²⁵I]- α -Bgt whereas CLT and TMX were able to completely inhibit the binding of labeled- α -Bgt [35]. These results suggest the presence of several nAChR subtypes that are sensitive to α -Bgt and could differently bind neonicotinoid insecticides. The presence of α -Bgt-sensitive nAChRs that are also sensitive to IMI seems to be specific to *A. pisum* and could correspond to the additional very high affinity binding sites for α -Bgt. On the contrary, CLT and TMX seem to be able to bind to both low and high α -Bgt-sensitive binding sites. Altogether, these results demonstrated that i) neonicotinoid insecticides could bind to α -Bgt-sensitive binding sites, which represents the majority of nAChRs binding sites, and ii) that all neonicotinoid insecticides do not share the same binding properties. Thus, it is important to complement these results with further binding assays using others radioligands because α -Bgt-insensitive nAChR subtypes are also present in insect nervous system.

1.3. High and low affinity nicotinic acetylcholine receptor binding sites with imidacloprid

IMI acts as a partial agonist at insect neuronal nAChRs [13–16]. Saturable binding of [³H]-IMI to insect membranes reveals the presence of different [³H]-IMI binding sites according to insect species [59,60]. The data illustrated in Table 3 suggest dipteran and lepidopteran species have a single IMI-binding site and hemipterans possess two IMI-binding sites, except for *Bemisia argentifolii* which exhibits only one [61]. Indeed, saturable binding of [³H]-IMI to *D. melanogaster* head membranes revealed the presence of a single IMI-binding site [50,62–64]. Similar binding was found with membranes from housefly *Musca domestica* [61,65]. In lepidopterans such as *M. sexta*, only one IMI-binding site was determined [64]. However, in the orthopteran *Locusta migratoria* and in hemipteran species such as *Nilaparvata lugens*, high and low affinity binding sites were identified [49,66]. Moreover, in *N. lugens*, *Nephotettix cincticeps*, and *A. pisum*, a very high affinity binding site for IMI with a Kd value < 0.1 nM was described [35,39,67]. The interpretation of one or more IMI-binding site is more ambiguous in the aphids *M. persicae* and *A. craccivora* (Table 3). In *M. persicae*, some studies showed the presence of only one IMI-binding site [39,65,68], whereas a supplemental high affinity binding site was identified in other studies [49,64,68]. *A. craccivora* seems to possess one binding site [65,68,69], but an additional high affinity binding site was also described [49]. These apparent discrepancies could be due to the variability of biological material as mixed generations were used (Table 3). Considering the different Kd values obtained in several

studies, we propose that at least three nAChR subtypes with very high (Kd < 0.1 nM), high (Kd between 0.1 and 5 nM), or low (Kd > 5 nM) affinity for IMI are present in *M. persicae* and that they could be differently expressed according to developmental stages. Altogether, these saturation experiments demonstrated that IMI sensitive binding sites could have distinct pharmacological properties.

1.4. [³H]-IMI as reference probe to characterize neonicotinoid binding sites

As demonstrated with α -Bgt, competition experiments with labeled IMI-binding sites revealed several Ki values depending on the species, tissue and neonicotinoids used for the competition (Table 4). Thus, using membranes from the whole body of the aphids *M. persicae* and *A. craccivora* it was found that CLT, ACE, and NIT were powerful competitor with Ki values in nanomolar range [39,65,70]. Similar Ki values were obtained for ACE and NIT in *D. melanogaster*, *A. mellifera*, and *L. migratoria* [49,65,71] and for CLT in *A. pisum* [35]. Interestingly, THI presented an affinity for [³H]-IMI-sensitive-binding sites higher than those of IMI itself in *A. mellifera*, *A. craccivora*, *M. persicae* and *M. domestica* and *L. migratoria* [49,71,72]. THI seems to be one of the most potent neonicotinoids in a wide range of insect species and could be very effective in controlling insect pests but its potency to bind nAChRs in an insect pollinator will probably limit its use in the field. Such a high affinity for [³H]-IMI-sensitive-binding sites was shown for CLT in *M. domestica* and *D. melanogaster* [63] suggesting that CLT would be particularly effective against dipterans. Altogether, these results demonstrate that CLT, ACE, NIT and THI are highly competitive with IMI (Ki in nanomolar range) suggesting interaction with similar binding sites on nAChRs, as proposed in previous studies on aphids [39,70].

On the contrary, TMX was a very weak displacer with micromolar affinity for [³H]-IMI-sensitive-binding sites in several insect species (Table 4) as shown in *L. migratoria* [49] and the aphids *M. persicae*, *A. craccivora* and *A. pisum* [35,39,70]. These results suggest that TMX is a non-competitive inhibitor and it was proposed that TMX is able to bind to different sites and/or in a different manner than IMI [70]. In *M. persicae*, IMI was shown to be an effective competitor of [³H]-TMX whereas TMX is a weak competitor of [³H]-IMI. These results suggest that TMX could bind only to one sub-population of IMI binding sites, with high affinity for IMI [66]. In *A. pisum*, it was demonstrated that TMX showed a weak binding capacity for [³H]-IMI binding sites and a better potency for [¹²⁵I]- α -Bgt binding sites [35]. These results demonstrate that TMX and α -Bgt share common binding sites, which could be correlated with the presence of extra very high affinity binding sites for α -Bgt in *A. pisum*. Similar results were obtained on cockroach nerve cord, where TMX inhibited [³H]- α -Bgt binding with nanomolar Ki value, which correlates with its insecticidal activity [57]. These results suggest that TMX could act in two ways: (1) by direct binding to α -Bgt binding sites and (2) through its metabolite CLT as proposed in previous works [37,73,74]. In *M. persicae*, sulfoxaflor (SFX) revealed

Table 3
Identification of imidacloprid (IMI) binding sites by saturation experiments using labeled IMI in different insect species.

Species	Order	Biological material	High affinity binding site		Low affinity binding site		Reference
			Kd (nM)	Bmax (fmol/mg)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg)	
<i>N. lugens</i>	Hemiptera	3-Days old female/whole body	0.0035 ± 0.0006	4.1 ± 0.6	1.5 ± 0.2	18.3 ± 2.3	[39]
			< 0.01		1.5	16.7 ± 1	[33]
<i>N. cincticeps</i>	Hemiptera	Mixed population	0.0043	33	1.23	179	[57]
<i>L. migratoria</i>	Orthoptera	Adults male and female/nerve chain	0.2 ± 0.05	153 ± 28	8.9 ± 5.7	336 ± 61	[49]
			0.16 ± 0.03	109.3 ± 15.5	10.3 ± 2.1	244.3 ± 40.3	[67]
<i>M. persicae</i>	Hemiptera	Mainly adults aphids	0.083	100 ± 55	7.1 ± 3.5	1537 ± 128	[70]
		Mixed generation/whole body			1.7	298 ± 48	[71]
			0.6 ± 0.2	205 ± 78	7.2 ± 2.7	716 ± 57	[49]
		Developmental stage n.p./whole body			1.9 ± 0.9	257 ± 45	[65]
		Mixed generation (age and sex)			1.7 ± 0.4	915 ± 116	[68]
		Mixed generation/aptere/whole body	0.14 ± 0.01	284 ± 16	3.7 ± 0.7	1504 ± 74	[69]
<i>A. craccivora</i>	Hemiptera	Mixed generation/whole body	0.8 ± 0.2	226 ± 70	12.58 ± 1.83	486 ± 78	[57]
			0.5/1.4 (a)	52/90 (a)	21 ± 8.6	911 ± 32	[49]
		Developmental stage n.p./whole body			6.1 ± 1.7	1332 ± 180	[68]
		Mixed generation (age and sex)			12.5 ± 2.2	1210 ± 114	[69]
<i>A. pisum</i>	Hemiptera	Aptere parthenogenetics adults/whole body	0.16 ± 0.04	0.051 ± 0.003	41.7 ± 5.87	0.434 ± 0.037	[37]
<i>B. argentifolii</i>	Hemiptera	Adults/whole body			2	101	[61]
<i>M. sexta</i>	Lepidoptera	Adults/brain			1.30	150	[57]
<i>H. virescens</i>	Lepidoptera	Heads			1.51	134	[57]
<i>P. americana</i>	Blattodea	Heads			3.14	2140	[57]
<i>C. felis</i>	Siphonaptera	Whole body			4.82	369	[57]
<i>D. melanogaster</i>	Diptera	Head			2.4 ±	560 ± 4	[90]
					2.2 ± 0.7	1344 ± 251	[65]
					5.7 ± 0.1	980 ± 50	[50]
					1.42	126	[57]
<i>M. domestica</i>	Diptera	Head			2	850	[90]
					5.4/5.4 (a)	457/398 (a)	[65]
					1.2 ± 0.5	853 ± 15	[66]
<i>L. sericata</i>	Diptera	Adults/heads			1.75	539	[57]

n.p. = not precised (a) results of 2 independents experiments.

Kd, dissociation constant, reflects the nAChRs' affinity for IMI. The Bmax value corresponds to the maximal binding and reflects the binding site density in the membrane preparation. The nature of the biological tissues used in the experiments are also reported.

similar binding properties to TMX. In fact, SFX is a weak competitor of [³H]-IMI whereas IMI is very potent in inhibiting [³H]-SFX binding [70,71,75]. We propose that, as previously described for TMX, SFX is able to bind to high affinity binding sites for IMI. Moreover, a recent study highlighted that even if high affinity binding sites for SFX were present at very low density, the displacement of [³H]-SFX correlated with high *in vivo* toxicity in sap-feeding pest [76]. Thus the characterization of high affinity binding sites for other neonicotinoids could also be toxicologically relevant and future studies should not only consider IMI binding sites to predict insecticides potency. DTF was revealed to be a weak competitor of [³H]-IMI and [³H]-TMX in *M. persicae* [70] but was able to compete with [³H]-IMI in *M. domestica* [77,78]. In *P. americana*, the presence of high-affinity binding sites for [³H]-DTF [79,80] was detected and DTF was able to compete with [³H]-α-Bgt [57]. Thus, DTF seems to bind different nAChR populations according to species.

Altogether, these results highlight the presence of specific pharmacological nAChR subtypes according to species, the need to carefully interpret competition experiments and the relevance of using probes other than [³H]-IMI to study neonicotinoid binding properties.

1.5. How to increase the quality and highlight binding interaction between insect nAChRs and ligands

We have demonstrated above that the use of mixed generations (adults and different larval stages) and even mixed aptere/winged and male/female samples, could explain the variability observed in binding data. Thus, the choice of homogenate biological material is essential to ensure reproducible and comparable studies. Our point of view seems to be shared by other researchers such as Kayser et al. who decided to adapt their harvest method to collect mainly adult aphids by attracting

them to light [70]. In *L. migratoria*, the selection of homogenate sample using adult nerve chain allowed the acquisition of very reproducible results in IMI saturation experiments in two different studies [49,67] (Table 3). A brief summary of all data reveals that comparing findings from brain tissue, the whole body, and the nervous system is likely misleading (Table 3). For example, if we use membrane preparations from the brain, we expect that a large number of nAChRs are expressed because ACh is the principal neurotransmitter in this organ [3]. This statement is reinforced by the IMI saturation data obtained in *Drosophila*, with Bmax values ranging from 560 to 1344 fmol/mg in membrane preparations from heads whereas the Bmax is only at 126 fmol/mg when using whole adults (Table 3). We suppose that binding experiments conducted with the whole body could be less sensitive if the nAChR populations are present at low density. Additionally, the results of saturation experiments showed particularly high discrepancy in aphid species *M. persicae* and *A. craccivora* (Table 3). We propose that the use of “adult heads preparation” could help to improve experimental reproducibility as parthenogenetic whole individuals also carry different larval stages which could express different nAChR pharmacological subtypes.

We can expand our analysis to experimental design. Saturation experiments were performed by incubating membrane preparations with varying concentrations of [³H]-α-Bgt or [¹²⁵I]-α-Bgt which could lead to misinterpretation as these two radioligands show different abilities to highlight low density binding sites. Moreover, several studies highlighted the relevance of using radioligands other than IMI in competitive assays [70,71,75] and to carefully interpret results. Thus to avoid misinterpretation, one should keep in mind that competitive experiments only give access to neonicotinoid binding capacity on the particular nAChR subtype labeled with the radioligand. This is particularly important as other neonicotinoid binding sites, even at low density,

Table 4
Binding properties of neonicotinoid insecticides determined by competitive experiments with labeled imidacloprid (IMD).

Species	Biological material	Competitive ligand										Reference	
		CLT		IMI		TMX		ACE		α-Bgt			
		IC50 (nM)	Ki (mM)	IC50 (nM)	Ki (mM)	IC50 (nM)	Ki (mM)	IC50 (nM)	Ki (mM)	IC50 (nM)	Ki (mM)		
<i>D. melanogaster</i>	Heads	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4	3.0 ± 0.3								[61]
	Heads	2.2 ± 0.2		2.3 ± 0.4				8.3 ± 2.6					[65]
	Adults/nerve chain	1.8 ± 0.2		2.6 ± 1.4		28,000 ± 6000		2.9 ± 0.2		2000			[65]
	Whole adults		20.6 ± 4.3	1.5 ± 0.2	3.1 ± 0.9			12.0 ± 2.4					[70]
<i>M. persicae</i>	Whole body	7.2 ± 0.8		2.3 ± 0.3		3180 ± 2840		8.4 ± 1.3					[68]
	Whole body/mixed generation	9.2 ± 3		3.1 ± 0.8		4800 ± 320		10 ± 3					[65]
				3.1 ± 0.9		2800		6.3 ± 2.4		n.d.			[49]
<i>A. cracchiora</i>	Whole body/mixed generation		24.2 ± 2.3		5.1 ± 0.7			19.2 ± 5.7					[75]
			2.7		0.55								[71]
		25.2 ± 6.2		8.6 ± 1.5		2300 ± 1100		11.9 ± 3.6					[68]
<i>A. pisum</i>	Adults/whole body/aptere	2.3 ± 0.2		2.3 ± 0.1									[65]
			126.9 ± 42.5	0.061 ± 0.011	38.14 ± 6.88		270 ± 70		4.8 ± 2.9		n.d.		[49]
	Heads	0.203 ± 0.068		2.9 (1.8–4.6)		1.675 ± 0.101		2.1 (1.1–3.7)		n.d.			[37]
<i>D. melanogaster</i>	Heads			NIT		DTF							[65]
	Adults/nerve chain	THI		IC50 (nM)		IC50 (nM)		SEFX					[49]
	Whole adults/mixed generation	7.5 ± 2.0		11 ± 2				IC50 (nM)					[70]
		0.7 ± 0.1		6.8		2200		210 ± 48					[68]
<i>M. persicae</i>	Whole adults/mixed generation		2.3 ± 0.5		93.0 ± 20								[65]
		3.4 ± 0.5		2.0 ± 0.5		10.8 ± 4.9							[49]
		0.19 ± 0.06		21 ± 5									[71]
<i>A. cracchiora</i>	Whole adults/mixed generation		5.4 ± 1.4		7.3 ± 2.8		2223 ± 712		265 ± 49				[75]
			0.17		3.5		336		32				[68]
<i>A. mellifera</i>	Whole adults/mixed generation		3.3 ± 0.85		35.3 ± 5.0								[49]
	Heads	0.06 ± 0.04		21.7									[72]
		0.75 (0.47–1.3)		2.3 (1.3–4.5)									[72]

IC₅₀ corresponds to the concentration of non-labeled probe needed to inhibit 50% of the specific binding of the labeled probe; Ki is the inhibition constant calculated according to Cheng and Prusoff formula; values are indicated ± S.E.M. or with a confidence interval of 95% between brackets.

could also be toxicologically relevant as demonstrated for DTF [76]. In this review, we also report that the overall majority of recent studies used IMI or other neonicotinoids as radiolabeled probes whereas the first one were conducted with labeled α -Bgt. We suggest that additional competitive experiments with labeled α -Bgt could help to better understand comparative binding and toxicity capacity between insecticides. This would be particularly interesting for neonicotinoids that have binding sites distinct from IMI as demonstrated for DTF [57]. In this review, we only report saturation and competitive experiments. One challenge for future studies could be to develop kinetic experiments. In these experiments, the binding of radioligand is measured at incrementing series of time points and analyzed to estimate association (k_{ON}) and dissociation (k_{OFF}) rate constant [41]. This would enable better characterize of the mode of action of neonicotinoids, particularly at low concentrations. Recently, a study conducted on hybrid nAChRs consisting of *N. lugens* α and rat β subunits showed the specific action of IPPA08 (a cis-configuration neonicotinoid compound) as a positive allosteric modulator for IMI binding when present at low concentrations however, at high concentrations, IPPA08 was able to act as agonist of nAChRs [81].

2. Conclusion and future challenges

To date, the subunit combination of insect pest native receptors remains unknown. Previous studies suggest that it can be due to a lack of accessory proteins for the functional expression of native receptors in *Xenopus oocytes* [36,82,83]. To overcome the lack of expression, and identify subunit and/or receptor subtypes associated with the pharmacological properties of neonicotinoid insecticides, binding studies with labeled neonicotinoids on insect pest are currently used. However, data reported in several studies demonstrate some discrepancies and suggest new challenges to highlight binding specificity and how it affects species-specificity. Indeed, most of the binding assays were conducted using labeled IMI because it is the first commercialized neonicotinoid worldwide, but the data obtained using [3 H]-IMI could lead to different interpretations, according to the study. This could be due to the fact that the effects of [3 H]-IMI does not reflect those of all neonicotinoids. For example, TMX binds to different sites [70]. This may be linked to their chemical structures where IMI possesses an electro-negative terminal group not present in TMX [84]. The choice to use brain or whole body impacts the sensitivity of the binding assay in terms of Bmax values. We propose that the binding of IMI with insect nAChR subtypes should be compared according to the specific tissue used. Moreover, saturation and competition binding experiments showed significant differences in the number of binding sites, the displacing potencies and the mode of binding interference according to the neonicotinoid used. It was hypothesized that nAChRs possess a variety of binding pockets depending on the combination of receptor subunits, receptor subtype, and functional state [70]. According to this hypothesis, understanding the specific ligand binding interaction of each neonicotinoid according to tissue type should be applied to exploring and comparing the mode of action of the recently discovered sulfoximine and flupyrimin insecticides, which also interact with nAChR subtypes [76,85]. Sulfoxaflor (SFX), a sulfoximine derivative, has been shown to act as an agonist of insect nAChR subtypes, in particular, SFX interacts weakly with the IMI binding site prepared from membrane homogenate of whole green peach aphid *M. persicae*. It was proposed that the binding site for [3 H]-SFX is less abundant than nAChR binding sites identified by other ligands [76]. This could be due to the finding that SFX does not contain the amine nitrogen present in all previously commercialized neonicotinoids but has a methyl group at the bridge between the heterocycle [75]. These structural differences could lead to specific interactions with nAChRs. In addition, it is possible that SFX-sensitive receptors, which are probably less expressed than other receptors, will result in an overall low affinity for SFX. We propose that nAChRs binding to SFX in *M. persicae* could involve additional receptor

subtypes compared to IMI. Our proposal is supported by the finding that the binding of several ligands using *M. persicae* is ambiguous because some studies showed the presence of only one IMI-binding site [39,65,68,70], whereas an additional high affinity binding site was identified in other studies depending on the tissue used. Moreover, methyllicaconitine (MLA), a nAChR antagonist which is able to block α -Bgt-sensitive receptors, and epibatidine, a nAChR agonist, displaced [3 H]-SFX with high affinity [76]. Considering that MLA binds to α -Bgt-sensitive nAChRs, it could be reasonable to suggest that SFX may be displaced by α -Bgt.

In the present review, we show that binding experiments conducted with [3 H]- α -Bgt and [125 I]- α -Bgt demonstrated the existence of several low and high affinity α -Bgt binding sites. Comparing the competition between α -Bgt and neonicotinoid has led to the suggestion that IMI preferentially acts on α -Bgt-insensitive receptors and that other neonicotinoids such as CLT and ACE act on both α -Bgt-sensitive and -insensitive receptors. Interestingly, one specific α -Bgt binding site is found in some insects such as *A. mellifera* using membrane preparation from the nervous system [48]. The presence of a unique binding site in bees is inconsistent with the expression of several nAChR subunits differently expressed in the brain structures involved in learning and memory processes [86–88]. In particular α -Bgt-sensitive receptors seem to be involved in long term memory whereas mecamylamine-sensitive receptors were involved in short-term memory [89]. One challenge for binding studies will be to use other labeled compounds such as mecamylamine and methyllicaconitine which seems to bind to α -Bgt-sensitive receptors. This point of view is of particular interest if binding studies are conducted on pollinating insects such as *A. mellifera* for which several pharmacological and behavioral studies have demonstrated the functional importance of nAChRs [88,89]. Moreover, the expression of nAChR subunits is different according to developmental stages which may affect binding studies. Indeed, we demonstrated previously that the expression of nAChR subunits varies between the brain of pupae and adult honeybee. For example, Amel α 5 (Apisc α 7–1) expression was found in the outer compact Kenyon cells of the mushroom bodies of the pupae and additional expression was found in the noncompact Kenyon cells and optical lobes in adults [86]. The diversity of nAChRs could also be greater than what can be seen in binding experiments. For example, in the cockroach *P. americana*, electrophysiological studies combined with RNAi experiments on dorsal unpaired median neurons demonstrated the presence of at least three nAChR subtypes that are sensitive to IMI and have different subunit composition [20], whereas binding experiments only showed one binding site for IMI [57].

In conclusion, we highlight the complexity and diversity of neonicotinoid binding sites, which reflect the diversity of nAChRs subtypes in insects. nAChRs are of particular interest as they are targets of highly effective insecticides such as neonicotinoids and the recently characterized sulfoximine compounds. Ongoing efforts in identifying native receptors will prove instructive in characterizing the mode of action of these compounds and future approaches combining binding experiments with RNAi and/or immunodepletion will likely enhance our understanding of the pharmacological properties of native nAChRs.

Acknowledgements

This work was supported by a fellowship from the Région Centre Val de Loire, 'SCREENROBOT project: Appel à projet d'initiative académique'. A. Cartereau received a Ph.D fellowship from the Region Centre Val de Loire. Authors would like to thank all reviewers for their comments and help on the manuscript.

References

- [1] E.D. Levin, B.B. Simon, Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals, *Psychopharmacology* 138 (1998) 217–230.

- [2] G. Bicker, Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee, *Microsc. Res. Tech.* 45 (1999) 174–183.
- [3] H. Breer, Properties of putative nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in the central nervous system of *Locusta migratoria*, *Neurochem. Int.* 3 (1981) 43–52.
- [4] L.A. Brown, M. Ihara, S.D. Buckingham, K. Matsuda, D.B. Sattelle, Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 99 (2006) 608–615.
- [5] K. Charaabi, S. Boukhris-Bouhachem, M. Makni, I. Denholm, Occurrence of target-site resistance to neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae* in Tunisia, and its status on different host plants: resistance to neonicotinoids in *Myzus persicae*, *Pest Manag. Sci.* (2018), <http://dx.doi.org/10.1002/ps.4833> (In press).
- [6] A.S. Huseh, T.M. Chappell, A. Chitturi, A.L. Jacobson, G.G. Kennedy, Insecticide resistance signals negative consequences of widespread neonicotinoid use on multiple field crops in the U.S. Cotton Belt, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 2314–2322.
- [7] C. Chen, X. Shi, N. Desneux, P. Han, X. Gao, Detection of insecticide resistance in *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang (Diptera: Sciaridae) in China, *Ecotoxicology* 26 (2017) 868–875.
- [8] C.C. Voudouris, M.S. Williamson, P.J. Skouras, A.N. Kati, A.J. Sahinoglu, J.T. Margaritopoulos, Evolution of imidacloprid resistance in *Myzus persicae* in Greece and susceptibility data for spirotetramat: M. persicae susceptibility to two insecticides, *Pest Manag. Sci.* 73 (2017) 1804–1812.
- [9] A. Brandt, K. Grikscheit, R. Siede, R. Grosse, M.D. Meixner, R. Büchler, Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids Thiacloprid and Clothianidin, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [10] S. Tosi, J.C. Nieh, F. Sgolastra, R. Cabbri, P. Medrzycki, Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284 (2017) 20171711.
- [11] S.C. Wood, I.V. Kozii, R.V. Kozii, T. Epp, E. Simko, Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees, *PLoS One* 13 (2018) e0190517.
- [12] P.R. Whitehorn, C. Wallace, M. Vallejo-Marin, Neonicotinoid pesticide limits improvement in buzz pollination by bumblebees, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [13] S.H. Thany, G. Lenaers, V. Raymond-Delpech, D.B. Sattelle, B. Lapiéd, Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 14–22.
- [14] N. Simon-Delso, V. Amaral-Rogers, L.P. Belzunces, J.M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D.W. Gibbons, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D.P. Kreuzweiser, C.H. Krupke, M. Liess, E. Long, M. McField, P. Mineau, E.A.D. Mitchell, C.A. Morrissey, D.A. Noome, L. Pisa, J. Settele, J.D. Stark, A. Tapparo, H. Van Dyck, J. Van Praagh, J.P. Van der Sluijs, P.R. Whitehorn, M. Wiemers, Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 5–34.
- [15] T.C. Marrs, R.L. Maynard, Neurotransmission systems as targets for toxicants: a review, *Cell Biol. Toxicol.* 29 (2013) 381–396.
- [16] P. Déglise, B. Grünwald, M. Gauthier, The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells, *Neurosci. Lett.* 321 (2002) 13–16.
- [17] J. Tan, J.J. Galligan, R.M. Hollingworth, Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons, *Neurotoxicology* 28 (2007) 829–842.
- [18] V.L. Salgado, R. Saar, Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons, *J. Insect Physiol.* 50 (2004) 867–879.
- [19] G.S. Barbara, B. Grünwald, S. Paute, M. Gauthier, V. Raymond-Delpech, Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains, *Invertebr. Neurosci.* 8 (2008) 19–29.
- [20] H. Sun, Y. Liu, J. Li, X. Kang, H. Bao, Z. Liu, The potential subunits involved in two subtypes of α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 81 (2017) 32–40.
- [21] R.A. El-Hajj, S.B. McKay, D.B. McKay, Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors, *Life Sci.* 81 (2007) 1317–1322.
- [22] M. García-Guzmán, F. Sala, S. Sala, A. Campos-Caro, W. Stühmer, L.M. Gutiérrez, M. Criado, alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit, *Eur. J. Neurosci.* 7 (1995) 647–655.
- [23] P. Séguéla, J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J.A. Dani, J.W. Patrick, Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium, *J. Neurosci.* 13 (1993) 596–604.
- [24] A.B. Elgoyhen, D.E. Vetter, E. Katz, C.V. Rothlin, S.F. Heinemann, J. Boulter, alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3501–3506.
- [25] F. Sgard, E. Charpantier, S. Bertrand, N. Walker, D. Caput, D. Graham, D. Bertrand, F. Besnard, A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 150–159.
- [26] R. Courjaret, F. Grolleau, B. Lapiéd, 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 (2003) 2023–2034.
- [27] R. Courjaret, B. Lapiéd, 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 (2001) 80–91.
- [28] O. List, D. Calas-List, E. Taillebois, M. Juchaux, E. Heuland, S.H. Thany, Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents, *J. Neurochem.* 130 (2014) 507–513.
- [29] D. Calas-List, O. List, S. Quinchard, S.H. Thany, Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors, *Neurotoxicology* 37 (2013) 127–133.
- [30] B. Bodereau-Dubois, O. List, D. Calas-List, O. Marques, P.-Y. Communal, S.H. Thany, B. Lapiéd, Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the Imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341 (2012) 326–339.
- [31] V.L. Salgado, Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons, *Neurotoxicology* 56 (2016) 188–195.
- [32] A.K. Jones, D.B. Sattelle, The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, *BMC Genomics* 8 (2007) 327.
- [33] Z. Liu, M.S. Williamson, S.J. Lansdell, I. Denholm, Z. Han, N.S. Millar, A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 8420–8425.
- [34] Y. Huang, M.S. Williamson, A.L. Devonshire, J.D. Windass, S.J. Lansdell, N.S. Millar, Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*, *J. Neurochem.* 73 (1999) 380–389.
- [35] R.P. Dale, A.K. Jones, C. Tamborindeguy, T.G.E. Davies, J.S. Amey, S. Williamson, A. Wolstenholme, L.M. Field, M.S. Williamson, T.K. Walsh, D.B. Sattelle, Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome, *Insect Mol. Biol.* 19 (Suppl. 2) (2010) 141–153.
- [36] S.J. Lansdell, T. Collins, J. Goodchild, N.S. Millar, The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits Da5 and Da7 form functional homomeric and heteromeric ion channels, *BMC Neurosci.* 13 (2012) 73.
- [37] E. Taillebois, A. Beloula, S. Quinchard, S. Jaubert-Possamai, A. Daguin, D. Servent, D. Tagu, S.H. Thany, H. Tricoire-Leignel, Neonicotinoid binding, toxicity and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*, *PLoS One* 9 (2014) e96669.
- [38] A.K. Jones, D.B. Sattelle, Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits, *Adv. Exp. Med. Biol.* 683 (2010) 25–43.
- [39] J. Li, Y. Shao, Z. Ding, H. Bao, Z. Liu, Z. Han, N.S. Millar, Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40 (2010) 17–22.
- [40] K. Chamaon, K.-H. Smalla, U. Thomas, E.D. Gundelfinger, Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex, *J. Neurochem.* 80 (2002) 149–157.
- [41] E.C. Hulme, M.A. Trevelthick, Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation, *Br. J. Pharmacol.* 161 (2010) 1219–1237.
- [42] D.B. Bylund, M.L. Toews, Radioligand binding methods: practical guide and tips, *Am. J. Phys.* 265 (1993) 1421–429.
- [43] F. Goldberg, B. Grünwald, H. Rosenboom, R. Menzel, Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*, *J. Physiol.* 514 (Pt 3) (1999) 759–768.
- [44] D.G. Wüstenberg, B. Grünwald, 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 (2004) 807–821.
- [45] S.H. Thany, Electrophysiological studies and pharmacological properties of insect native nicotinic acetylcholine receptors, *Adv. Exp. Med. Biol.* 683 (2010) 53–63.
- [46] R. Lind, Characterisation of multiple α -bungarotoxin binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29 (1999) 979–988.
- [47] H.M. Eastham, R.J. Lind, J.L. Eastlake, B.S. Clarke, P. Towner, S.E. Reynolds, A.J. Wolstenholme, S. Wonnacott, Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 879–889.
- [48] M. Tomizawa, H. Otsuka, T. Miyamoto, M.E. Eldefrawi, I. Yamamoto, Pharmacological characteristics of insect nicotinic Acetylcholine receptor with its ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids, *J. Pestic. Sci.* 20 (1995) 57–64.
- [49] P. Wiesner, H. Kayser, Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14 (2000) 221–230.
- [50] N. Zhang, M. Tomizawa, J.E. Casida, *Drosophila* nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and alpha-bungarotoxin binding to distinct sites, *Neurosci. Lett.* 371 (2004) 56–59.
- [51] P. Schloss, I. Hermans-Borgmeyer, H. Betz, E.D. Gundelfinger, Neuronal acetylcholine receptors in *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding complex, *EMBO J.* 7 (1988) 2889–2894.
- [52] M. Grauso, R.A. Reenan, E. Culetto, D.B. Sattelle, 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 (2002) 1519–1533.
- [53] J.-R. Gao, J.M. Deacutus, J.G. Scott, The nicotinic acetylcholine receptor subunits Mdelta5 and Mdelta3 on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance, *Insect Mol. Biol.* 16 (2007) 691–701.
- [54] X. Yu, M. Wang, M. Kang, L. Liu, X. Guo, B. Xu, Molecular cloning and characterization of two nicotinic acetylcholine receptor β subunit genes from *Apis cerana cerana*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 77 (2011) 163–178.
- [55] J.A. Martin, S.F. Garczynski, Putative nicotinic acetylcholine receptor subunits express differentially through the life cycle of codling moth, *Cydia pomonella*

- (Lepidoptera: Tortricidae), *Insect Sci.* 23 (2016) 277–287.
- [56] G. Xu, S.-F. Wu, Z.-W. Teng, H.-W. Yao, Q. Fang, J. Huang, G.-Y. Ye, Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Insect Sci.* 24 (2017) 371–384.
- [57] R.J. Lind, M.S. Clough, S.E. Reynolds, F.G.P. Earley, [3H]Imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the *AphidMyzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Pestic. Biochem. Physiol.* 62 (1998) 3–14.
- [58] M. Tomizawa, N.S. Millar, J.E. Casida, Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (2005) 1347–1355.
- [59] N. Orr, A.J. Schaffner, G.B. Watson, Pharmacological characterization of an epibatidine binding site in the nerve cord of *Periplaneta americana*, *Pestic. Biochem. Physiol.* (1997) 183–192.
- [60] K. Mori, T. Okumoto, N. Kawahara, Y. Ozoe, Interaction of dinotefuran and its analogues with nicotinic acetylcholine receptors of cockroach nerve cords, *Pest Manag. Sci.* 58 (2002) 190–196.
- [61] S.L. Chao, T.J. Dennehy, J.E. Casida, Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) binding site for imidacloprid and related insecticides: a putative nicotinic acetylcholine receptor, *J. Econ. Entomol.* 90 (1997) 879–882.
- [62] M. Tomizawa, H. Otsuka, T. Miyamoto, M.E. Eldefrawi, I. Yamamoto, Pharmacological characteristics of insect nicotinic acetylcholine receptor with its ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids, *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2005) 1347–1355.
- [63] M. Tomizawa, J.E. Casida, Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 247–268.
- [64] K. Matsuda, S.D. Buckingham, D. Kleier, J.J. Rauh, M. Grauso, D.B. Sattelle, Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 573–580.
- [65] A. Zhang, H. Kayser, P. Maienfisch, J.E. Casida, Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [(3)H]imidacloprid binding site, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1294–1303.
- [66] M.-Y. Liu, J.E. Casida, High affinity binding of [3H]Imidacloprid in the insect acetylcholine receptor, *Pestic. Biochem. Physiol.* 46 (1993) 40.
- [67] H. Bao, Y. Liu, Y. Zhang, Z. Liu, Two distinctive β subunits are separately involved in two binding sites of imidacloprid with different affinities in *Locusta migratoria manilensis*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 140 (2017) 36–41.
- [68] H. Kayser, C. Lee, A. Decock, M. Baur, J. Haettenschwiler, P. Maienfisch, Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: I. A structure-activity study of the mode of [3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*, *Pest Manag. Sci.* 60 (2004) 945–958.
- [69] H. Wellmann, M. Gomes, C. Lee, H. Kayser, Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: II. An unusual high affinity site for [3H]thiamethoxam in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*, *Pest Manag. Sci.* 60 (2004) 959–970.
- [70] H. Kayser, K. Lehmann, M. Gomes, W. Schleicher, K. Dotzauer, M. Moron, P. Maienfisch, Binding of imidacloprid, thiamethoxam and N-desmethylthiamethoxam to nicotinic receptors of *Myzus persicae*: pharmacological profiling using neonicotinoids, natural agonists and antagonists, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 2166–2175.
- [71] P. Cutler, R. Slater, A.J.F. Edmunds, P. Maienfisch, R.G. Hall, F.G.P. Earley, T. Pitterna, S. Pal, V.-L. Paul, J. Goodchild, M. Blacker, L. Hagmann, A.J. Crossthwaite, Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid, *Pest Manag. Sci.* 69 (2013) 607–619.
- [72] R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, R. Schmuck, Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Pest Manag. Sci.* 57 (2001) 577–586.
- [73] Y. Benzidane, S. Touinsi, E. Motte, A. Jadas-Hécart, P.-Y. Communal, L. Leduc, S.H. Thany, Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin, *Pest Manag. Sci.* 66 (2010) 1351–1359.
- [74] R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, V.L. Salgado, M. Kaussmann, Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants, *Pestic. Biochem. Physiol.* 76 (2003) 55–69.
- [75] G.B. Watson, M.R. Loso, J.M. Babcock, J.M. Hasler, T.J. Letherer, C.D. Young, Y. Zhu, J.E. Casida, T.C. Sparks, Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (2011) 432–439.
- [76] G.B. Watson, M.B. Olson, K.W. Beavers, M.R. Loso, T.C. Sparks, Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor binding site for sulfoxaflor, a new sulfoximine insecticide for the control of sap-feeding insect pests, *Pestic. Biochem. Physiol.* 143 (2017) 90–94.
- [77] M. Liu, B. Latli, J.E. Casida, Imidacloprid binding site in *Musca* nicotinic acetylcholine receptor: interaction with physostigmine and a variety of nicotinic antagonists with chlorpyridyl and chlorothiazolyl substituents, *Pestic. Biochem. Physiol.* (1995) 170–181.
- [78] K. Kiriya, H. Nishiwaki, Y. Nakagawa, K. Nishimura, Insecticidal activity and nicotinic acetylcholine receptor binding of dinotefuran and its analogues in the housefly, *Musca domestica*, *Pest Manag. Sci.* 59 (2003) 1093–1100.
- [79] T. Wakita, K. Kinoshita, E. Yamada, N. Yasui, N. Kawahara, A. Naoi, M. Nakaya, K. Ebihara, H. Matsuno, K. Kodaka, The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid, *Pest Manag. Sci.* 59 (2003) 1016–1022.
- [80] S. Miyagi, I. Komaki, Y. Ozoe, Identification of a high-affinity binding site for dinotefuran in the nerve cord of the American cockroach, *Pest Manag. Sci.* 62 (2006) 293–298.
- [81] H. Bao, X. Shao, Y. Zhang, J. Cheng, Y. Wang, X. Xu, J. Fang, Z. Liu, Z. Li, IPPA08 allosterically enhances the action of imidacloprid on nicotinic acetylcholine receptors, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 79 (2016) 36–41.
- [82] N.S. Millar, A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 766–776.
- [83] N.S. Millar, S.J. Lansdell, Characterisation of insect nicotinic acetylcholine receptors by heterologous expression, *Adv. Exp. Med. Biol.* 683 (2010) 65–73.
- [84] B. Selvan, J. Graton, A.D. Laurent, Z. Alamiddine, M. Mathé-Allainmat, J. Lebreton, O. Coqueret, C. Olivier, S.H. Thany, J.-Y. Le Questel, Imidacloprid and thiacloprid neonicotinoids bind more favourably to cockroach than to honeybee $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor: insights from computational studies, *J. Mol. Graph. Model.* 55 (2015) 1–12.
- [85] Y. Onozaki, R. Horikoshi, I. Ohno, S. Kitsuda, K.A. Durkin, T. Suzuki, C. Asahara, N. Hiroki, R. Komabashiri, R. Shimizu, S. Furutani, M. Ihara, K. Matsuda, M. Mitomi, S. Kagabu, K. Uomoto, M. Tomizawa, Flupyrim: a novel insecticide acting at the nicotinic acetylcholine receptors, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 7865–7873.
- [86] S.H. Thany, M. Crozatier, V. Raymond-Delpech, M. Gauthier, G. Lenaers, Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain, *Gene* 344 (2005) 125–132.
- [87] S.H. Thany, G. Lenaers, M. Crozatier, C. Armengaud, M. Gauthier, Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*, *Insect Mol. Biol.* 12 (2003) 255–262.
- [88] J.P. Dupuis, M. Gauthier, V. Raymond-Delpech, Expression patterns of nicotinic subunits $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, and $\beta 1$ affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles, *J. Neurophysiol.* 106 (2011) 1604–1613.
- [89] M. Gauthier, M. Dacher, S. Thany, C. Niggebrugge, P. Deglise, P. Kljucevic, C. Armengaud, B. Grunewald, Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*), *Neurobiol. Learn. Mem.* 86 (2006) 164–174.
- [90] M. Tomizawa, B. Latli, J.E. Casida, Novel neonicotinoid-agarose affinity column for *Drosophila* and *Musca* nicotinic acetylcholine receptors, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1669–1676.

Caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiques neuronaux d'insectes et étude de la modulation de leurs profils pharmacologiques par les insecticides néonicotinoïdes

L'utilisation intensive des insecticides pour lutter contre les insectes ravageurs de culture et vecteurs de maladies, a conduit à des polémiques sur le mode d'action des insecticides. Ces polémiques sont liées au fait que le mode d'action des insecticides, notamment des néonicotinoïdes est mal connu. Ils agissent principalement sur les récepteurs à l'acétylcholine (ACh) de type nicotinique (nAChR) qui jouent un rôle fondamental dans la transmission synaptique cholinergique. Bien que ces récepteurs soient bien décrits chez les mammifères, très peu d'études ont évalué l'effet des néonicotinoïdes sur un récepteur natif d'insecte.

Au cours de cette thèse, nous avons pour la première fois exprimé en ovocytes de xénope un récepteur homomérique $\alpha 7$ de blatte et étudié ces propriétés pharmacologiques vis-à-vis des néonicotinoïdes, comparativement au récepteur $\alpha 7$ de rat. Nos résultats révèlent un récepteur atypique qui est insensible à l' α -bungarotoxine et qui n'est pas activé par les néonicotinoïdes. Ainsi, bien que les gènes codant pour les sous-unités $\alpha 7$ de blatte et de rat forment un groupe monophylétique distinct des autres sous-unités d'insectes et de mammifères, les récepteurs homomériques obtenus semblent avoir des propriétés pharmacologiques différentes. Parallèlement, nous avons étudié les propriétés pharmacologiques des nAChR natifs et notamment l'effet modulateur d'un pyréthrianoïde, la perméthrine, sur les courants induits par le dinotefurane. Ce travail a permis d'évaluer le mode d'action d'un antiparasitaire, le Vectra 3D. Enfin, nous avons également entrepris de développer la technique d'extraction membranaire afin de l'utiliser comme alternative pour étudier le mode d'action des insecticides.

Pour conclure, cette thèse a permis une avancée sur l'étude de la caractérisation des propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiques neuronaux des insectes et sur l'étude du mode d'action des insecticides néonicotinoïdes.

Mots clés : récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR), acétylcholine, néonicotinoïdes, *Periplaneta americana*

Subtypes characterization and pharmacological profiles modulation study of insect nicotinic receptors by neonicotinoid insecticides

The intensive use of insecticides against crop pests and vectors of human and animal leads to several polemics about their mode of action. All these controversies are related to the fact that the mode of action of insecticides in insects is poorly known, in particular neonicotinoids which act on nicotinic acetylcholine (ACh) receptors (nAChR).

During this PhD thesis, we characterized for the first time the pharmacological properties of a cockroach $\alpha 7$ homomeric receptor in a xenopus oocyte. Our results revealed that cockroach $\alpha 7$ is an atypical receptor that is insensitive to α -bungarotoxin and not activated by neonicotinoids. Cockroach and rat $\alpha 7$ receptors which are included in the same cluster have distinct pharmacological properties. We then studied the pharmacological properties of native receptors, in particular, the modulatory effect of permethrin on dinotefuran-induced currents. This work was included in the study of Vectra 3D. We also evaluated the use of insect central nervous system membrane extraction as a strategy to study the pharmacological properties of insect native nAChRs.

To conclude, this PhD contribute to the study of the pharmacological properties of insect nAChRs and the study of the mode of action of neonicotinoids insecticides.

Keywords: nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), acetylcholine, neonicotinoid insecticides, *Periplaneta americana*

