



**HAL**  
open science

# Effet de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un lépidoptère de ravageur des cultures, *Agrotis ipsilon*

Kaouther Rabhi

► **To cite this version:**

Kaouther Rabhi. Effet de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un lépidoptère de ravageur des cultures, *Agrotis ipsilon*. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2015. Français. NNT: 2015ANGE0074 . tel-02289108

**HAL Id: tel-02289108**

**<https://theses.hal.science/tel-02289108v1>**

Submitted on 16 Sep 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.

# Thèse de Doctorat

**Kaouther K Rabhi**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *VENAM*

Discipline : *Biologie section 69*

Spécialité : *Biologie des Organismes*

Unité de recherche : *Unité de recherche : Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques  
Membranaires UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207*

Soutenue le *6 Novembre 2015*

Thèse N° : *79280*

## **Effet de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un lépidoptère ravageur des cultures, *Agrotis ipsilon***

### **JURY**

Rapporteurs :	<b>Catherine ARMENGAUD</b> , Maître de Conférences, CRCA, Université Paul Sabatier, Toulouse <b>Geraldine WRIGHT</b> , Professeur, Institute of Neuroscience, Newcastle University, Grand Bretagne
Examineurs :	<b>Anne-Marie CORTESERO</b> , Professeur, IGEPP, Université de Rennes 1 <b>Michel RENOU</b> , Directeur de Recherches INRA, iEES Paris, INRA Versailles <b>Valérie RAYMOND</b> , Professeur, RCIM, Université d'Angers,
Directeur de Thèse :	<b>Sylvia ANTON</b> , Directeur de Recherches INRA, RCIM, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	<b>Christophe GADENNE</b> , Directeur de Recherches INRA, RCIM, Université d'Angers
Co-encadrant de Thèse :	<b>Hélène TRICOIRE-LEIGNEL</b> Maitre de conférences, RCIM, Université d'Angers

# Remerciements

First I would like to thank the Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires laboratory UPRES EA 2647/USC INRA1330 SFR 149 QUASAV for hosting me during my thesis.

I wish to express my profound gratitude to my supervisors, **Sylvia Anton**, **Christophe Gadenne** and **Hélène Tricoire-Leignel** for their keen interest, scholastic guidance, precious suggestions, encouragement, patience, friendly attitude and constructive criticisms from the beginning to the end of the research work.

I also take the opportunity to express my deepest and sincere gratitude to **Claudia Groh** and **Cédric Alaux** who guided me and gave me many valuable suggestions in the thesis committee.

I am very grateful to all members of my jury, **Valérie Raymond**, **Michel Renou** and **Anne-Marie Cortesero**, for accepting to evaluate my research work. It is a pleasure for me to have you as my jury members.

I would especially like to thank **Geraldine Wright** and **Catherine Armengaud** for their interest in my work and the time spent to write their reports for the doctoral school.

*Thank you all.*

*Au terme de ce travail, j'aurais pu clôturer avec des remerciements classiques, décrivant les personnes qui m'ont entourée et soutenue avec beaucoup d'adjectifs : disponibles, aimables, serviables et bien d'autres, mais ces 3 années m'ont appris (ou parfois confirmé) une chose importante : ce n'est qu'en se distinguant qu'on peut faire la différence et marquer les choses, et parce que beaucoup de personnes et d'événements ont marqué ce passage de ma vie j'ai préféré chambouler les habitudes... Finalement, personne ne sort de la thèse tel qu'il l'a commencée.*

*En effet, la thèse nuit gravement à la santé... Une phrase que beaucoup de doctorants se répètent, parfois même avant de l'être et on le sait déjà mais on se lance quand même dans cette aventure..., un tunnel semblant sans fin avec ses différentes étapes, des hauts et des bas..., on entend plus parler des bas que des hauts. Mais peut-être est-ce le propre de la nature humaine de se plaindre. Fidèle à ma réputation, je m'égare et je m'éparpille, comme dirait Christophe : Soit un peu concentrée Kaouther ! Bref.*

*L'aventure pour moi a commencé il y a 3 ans maintenant, pas plus pas moins. Nous sommes au mois d'août et c'est en ce mois que j'ai reçu ce fameux mail de la part de mon ami Kader... Je cherchais alors très activement un sujet de thèse et un laboratoire d'accueil, et ce sujet m'a d'abord intéressée, intriguée, mais j'ai hésité... Je ne maîtrisais pas l'électrophysiologie, et mes cours de neurobiologie dataient d'il y a quelques années ; mais il était temps de se lancer et je me suis fait confiance. J'ai donc envoyé ma candidature, et j'ai obtenu d'être sélectionnée pour les auditions.*

*Le 13 septembre sera la date de la première rencontre avec ceux qui seront par la suite mes directeurs de thèse, Sylvia, qui m'accueille souriante à la gare, et Christophe qui me dépose par la suite pour rattraper mon train de retour, Hélène je ne l'ai vue que peu, prise par ses cours. Mais cette brève rencontre m'a permis d'apercevoir l'ambiance dans laquelle j'allais évoluer. Une ambiance de travail chaleureuse, avec beaucoup de respect, et aussi de la compréhension. Une ambiance dans laquelle s'entremêlent l'humain et la rigueur. J'ai appris à connaître mes directeurs, et j'ai bien conscience que tous mes remerciements ne sauraient être à la hauteur de ce qu'ils ont pu m'offrir durant cette thèse. Sylvia, grâce à ton calme tu as su m'amener là où il le fallait quand il le fallait, tes apports scientifiques, ton sourire face à mon manque de connaissance en neurophysiologie ou encore ta patience face à une kaouther capable de faire de l'électrophy en textotant, laisseront en moi gravée l'image de cette directrice zen. Mais je pense que ma visite de la maison des horloges sera l'élément le plus marquant vécu en ta compagnie, mille fois merci. Christophe, j'aurais aimé pouvoir t'écrire ces quelques mots en arabe, ça sera un objectif non atteint de la thèse et j'en suis triste mais qui sait...tu m'écriras peut être des mails en cette langue que tu aimerais apprendre d'ici quelques mois ou années. Je suis consciente que pour toi ce n'étais pas toujours facile, une dernière doctorante très « ... ». Ce texte sera accessible au public donc je laisserai peut être ce mot en pointillés, dans tous les cas, grâce à toi j'ai appris la rigueur sous un autre angle, le sérieux selon une autre vision et surtout l'observation. En dépit de nos façons de travailler à l'origine complètement différentes, tu as su me diriger sans me brusquer en maintenant la balance entre l'application au travail et amusant au repos, l'analytique et le poétique...le capitaine qui guide son navire...merci pour tout. Joviale et conviviale telle est Hélène, assurément la pédagogie est une qualité naturelle chez elle. Tu as su me transmettre les bonnes pratiques, m'épauler dans mes actions en adoptant toujours les bonnes réactions (rime), merci de m'avoir permis de faire partie de la « BM team », mais aussi de m'avoir fait découvrir des lieux inconnus... Te rappelleras-tu que c'est avec toi que j'ai été la première fois à « ... », Merci.*

*Ces quelques phrases ne sont qu'un avant-goût des moments partagés durant ma thèse. Je suis passée par différentes étapes, pas celles décrites dans les bandes dessinées avec la phase d'excitation et la phase de déception par exemple. La réalité offre souvent des situations plus intéressantes ou cocasses que l'imaginaire. Pour moi, c'était plutôt la phase bureau des pipelettes, bureau des amies et puis... bureau de ministre. J'ai commencé ma thèse un 5 novembre, avec l'installation dans mon bureau avec des doctorants aimables d'emblée, Antoine, Céline et Emiliane. Première journée, consacrée essentiellement aux documents administratifs, mais contrariée par une chute dans les escaliers ; « boum » !; le bruit qu'a entendu Fabienne de son bureau... Refusant d'aller chez le médecin, je me fais « gronder » par Emiliane, sans doute la manifestation d'un instinct maternel, mais aussi de mon caractère « têtu »...*

*Puis se sont enchaînées les journées, à chacune sa part de découvertes, d'échanges scientifiques – mais pas seulement - dans le bureau, Emiliane nous faisant découvrir les joies du monitorat, Antoine sa passion pour la photo et des échanges de « vie » avec Céline... Des moments fort sympathiques aboutissant au tournage de notre premier chef-d'œuvre, un bel hommage à la collaboration.*

*Le début de la deuxième étape de ma thèse est marqué par un échange de bureau. Arrivent dans mon bureau alors Yassine et Mathilde, le premier très discret au bureau mais qui se révélera bon programmeur et analyste par la suite. Et Mathilde, tout aussi discrète et observatrice. Mais ce n'est qu'en côtoyant les gens qu'on apprend à les connaître : c'est ainsi que commencent une amitié, des échanges d'idées, des partages de connaissance, de la découverte de la gastronomie ..., la plus marquante étant sûrement la découverte du japonais ..., visites des châteaux de la Loire, weekend détente et malgré ceux-là des projets repoussés par manque de temps. Sûrement une des plus belles rencontres faites durant cette thèse. Quelquefois, même souvent, une autre personne se joignait à nous, qui partagera dans ma troisième étape ce grand bureau de ministre qui sera le mien.*

*Lydie, une aide technique de qui on pourrait dire, comme pour la chanson populaire, « ça s'en va et ça revient », des contrats et encore des contrats pour l'avoir parmi nous, mais toujours une joie de la voir le matin, très matinale mais avec plein d'énergie, un échange d'une vision mature de la vie, un partage d'idées et aussi des objectifs en commun, LSDP nous sommes devenues, LSDP nous resterons (je l'espère en tout cas). Il y a eu aussi ce petit couple tant différent, gentil et philosophe, des heures de discussion sur le travail mais aussi de débat sur l'évolution, l'existence d'un DIEU, la guerre dans le monde ; avec Delphine et Olivier, appuyés par Fabienne, c'était des discussions infinies, qui m'ont manqué par la suite.*

*Je souhaite vous remercier tous pour votre aide durant ma thèse, pour m'avoir appris ou ré-appris les techniques, rappelé les principes de base qui étaient souvent dans un coin éloigné de mon cerveau. Mais il m'a semblé que le côté relation humaine était tout aussi important : après tout, des collègues collaborent forcément mais ne partagent pas toujours ce que nous avons tous vécu dans ces couloirs dont le silence est souvent rompu.*

*Ainsi, dans ces remerciements que je vous adresse, tous les enseignements que vous m'avez dispensés sont indissociables de la dimension humaine.*

*J'en arrive à la troisième étape, notre déménagement à l'INRA, un lieu isolé, avec Fabienne au début, où je me retrouve seule par la suite dans un grand bureau, puis il y a eu Lydie 'le retour' ; lieu très différent de nos*

moments université mais toujours aussi riches. Nous faisons la connaissance de l'équipe Arch-E, en tout cas une partie, des voisins de bureau serviables et patients, c'était une période ponctuée par beaucoup d'échanges avec les plus jeunes Nancy et Adrien, en partageant notre passion commune « le chocolat », Merci à toute l'équipe.

J'aurai un mot, amplement justifié pour les stagiaires. Durant ces trois ans, ils furent légions, les stagiaires. Du reste, il y en a souvent dans les laboratoires. Mais je considère ceux et celles que j'ai eu le plaisir de rencontrer comme des personnes d'exception. Rares sont les personnes telles que Kali, pleine d'énergie et l'incarnation de l'américaine bosseuse, venue apprendre le français et nous apprendre l'anglais. Ce qui aboutira à un franglais qui nous est propre. Sans oublier Julie L, Julie E, Anouk, Lucille, Manon et Amel, à chacune son caractère, chacune apportant quelque chose, mais qui ont toutes fait avancer mon travail, merci à toutes.

La thèse, c'est aussi le dépaysement, l'occasion unique de faire le tour du monde avant même d'avoir gagné à l'Euromillion. La traversée de l'Atlantique vers les farouches terres de l'Ouest, la découverte de la gastronomie allemande... Tant de souvenirs qui me reviennent et qui auraient pu n'être que simples mirages sans la présence de Luzia. Elle qui fut un peu mon agence de voyage à elle seule, elle a su braver les courants contraires de la fac pour me permettre d'aller toujours plus loin. Et lorsqu'il devenait impossible d'embarquer pour le grand large, il restait toujours Cyril le pirate pour nous parler de ses aventures GN.

Les quelques pages dédiées aux remerciements ne sont jamais suffisantes pour exprimer la gratitude éprouvée d'avoir vécu ces trois années avec vous, mais je me dois de vous parler aussi de comment j'ai survécu, parce que oui il faut survivre à une thèse, et pour ça deux moyens essentiels, garder un bon entourage et une activité extra-scientifique.

Mon entourage, ma famille en premier lieu, mon papa philosophe et posé et ma maman aimante et conciliante, un appel par jour, au début de la thèse, et puis deux par semaine la deuxième année et bien plus espacés par la suite mais toujours avec le cœur lourd avant d'appeler et léger en raccrochant. Etre la fierté de ses parents n'a pas d'égal, et j'ai la chance d'avoir une famille telle que la mienne.

Après mes parents, mes frères, un contact quotidien en racontant notre vie, se résumant parfois en un émoticône, Nabil le renard, Abdel le chat roux et Ismail le chat blanc. La famille est la base, et une richesse que l'on porte en soi.

Aussi mes personnes présentes tous les jours. Une moyenne de 800 sms par mois, qui a beaucoup chuté avec la découverte de FB, rendant les statistiques mensuelles difficiles à dresser, un échange permanent, une présence virtuelle mais réelle, des encouragements, de l'incompréhension face à mes sauts d'humeur (je peux te le dire maintenant, c'est normal chez un doctorant). Et puis plein d'autres choses, merci Farid pour ton soutien, avec Nissa vous avez été les deux personnes à subir le plus les effets sublétaux de la thèse sur ma vie, peut-être Nissa un peu plus, vivre en colocation était la meilleurs décision qu'on ait pris, tu as été ma deuxième petite famille, merci.

N'étant pas très sportive de base, pas que je n'aime pas, mais c'est que je ne suis pas assez organisée pour avoir une activité régulière, alors pour me changer les idées de la thèse j'avais une autre occupation, un bébé, oui j'exagère mais après tout je l'ai vue naître donc je suis en droit de l'appeler comme ça, ECAF, une association qui m'a permis de rencontrer des gens formidables, et de nouer une amitié avec des personnes de confiance. Seule à me battre contre les garçons, j'ai partagé avec Amine la tête de l'association pendant un

*moment...seule fille mais que faire, une seule solution appeler du renfort? Je l'ai refusé longtemps, j'ai toujours dit aux « gars » qu'une fille dans notre équipe serait une source de conflit, et puis j'ai rencontré Houria, Anissa et enfin Nawel, des filles qui m'ont fait changer d'avis sans me faire regretter ensuite, elles ont beaucoup apporté à notre projet, et aussi à ma vie. Elles ont été là pour m'accueillir, me soutenir, me changer les idées ou même juste me dire bonjour, bonne journée, au revoir. Il en faut des personnes comme ça dans la vie d'un thésard pour qu'il puisse tenir.*

*Ceci est un long discours mais j'ai sûrement omis de mentionner des situations, des personnes, ou des qualités, mais je pense que j'aurais pu tout résumer en une phrase « si je suis aujourd'hui à cette étape, c'est grâce à vous tous » alors si vous avez été là un jour pour moi (ou même une petite heure) et que j'ai omis de vous citer pardonnez-moi, oublier est humain.*

*Un papillon de nuit est lié à une croyance dans notre culture : lorsqu'il rentre chez vous, il vous apporte de bonnes nouvelles, du bonheur. Agrotis est rentré dans ma vie, et je me dis aujourd'hui avec beaucoup de recul qu'il était sûrement la clé d'un bonheur à venir.*

*Alors, oui la thèse nuit gravement à la santé ... mais seulement si on n'est pas bien entourée, dirigée. A la vérité, elle donne bien plus en échange de ce qu'elle pourrait nous prendre. A commencer par les personnes remarquables... Merci.*





# Table des Matières

<b>Liste des abréviations</b>	<b>9</b>
<b>Partie 1 : Introduction</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre 1 La lutte chimique contre les insectes ravageurs</b>	<b>13</b>
1 Insecticides neurotoxiques	15
1.1 Cibles nerveuses hors récepteurs nicotiniques	16
1.2 Cibles réceptrices à l'acétylcholine de type nicotinique	17
- Récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique	17
2 Toxicité des insecticides neurotoxiques	21
2.1 Notions de toxicologie	21
2.2 Effet toxique sur les organismes non cibles	22
2.3 Effet positif sur les organismes cibles : l'hormèse	23
<b>Chapitre 2 L'olfaction, outil de communication chez les insectes</b>	<b>25</b>
1 Les signaux olfactifs et le comportement associé à l'olfaction	25
2 Le système olfactif des insectes	28
2.1 Système périphérique	29
2.2 Système central	31
2.2.1 Les glomérules du AL	31
2.2.2 Les neurones du AL	32
- Les neurones récepteurs olfactifs (ORN)	32
- Les neurones locaux (LN)	33
- Les neurones de projection (PN)	33
- Les neurones centrifuges	34
3 La plasticité de l'olfaction	34
<b>Chapitre 3 <i>Agrotis ipsilon</i>, un insecte « plastique »</b>	<b>37</b>
1 Plantes hôtes et dégâts	37
2 Lutte contre <i>A.ipsilon</i>	37
3 Biologie d' <i>A.ipsilon</i>	38
4 Communication phéromonale et reproduction	39
5 Plasticité comportementale et neuronale	40
5.1 Plasticité olfactive âge-dépendante	40
5.2 Plasticité olfactive dépendant de l'accouplement	42
5.3 Plasticité dépendant de l'expérience	43
<b>Objectifs de la thèse</b>	<b>45</b>
<b>Approches méthodologiques</b>	<b>47</b>
1 Etude toxicologique	47
2 Approche comportementale	47
3 Approche électrophysiologique	50
4 Approches moléculaires	52
<b>Partie 2: Résultats</b>	<b>55</b>

Avant-propos	57
Article 1: Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect	59
Article 2: Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect	79
Article 3: An insecticide further enhances experience-dependent increased behavioural responses to sex pheromone in a male moth	101
Article 4: Effects of low doses of the neonicotinoid clothianidin, which modulate pheromone responses in the pest insect, <i>Agrotis ipsilon</i> , on the expression of its nicotinic acetylcholine receptors	125
<b>Partie 3: Discussion et Perspectives</b>	<b>147</b>
- Un large spectre de doses de clothianidine testées	149
- Effet biphasique de la clothianidine et hormèse	150
- Clothianidine et plasticité olfactive	152
- Clothianidine et mécanismes de la modulation olfactive	153
<b>Conclusions</b>	<b>157</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>159</b>

# Liste des abréviations

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholine estérase

AL : Antennal lobe / Lobe antennaire

DL : Dose létale

DMSO : Diméthylsulfoxyde

GABA : Acide  $\gamma$ -amino butyrique

JH : Juvenile hormone / Hormone juvénile

LN: Local neuron / Neurone local

MGC: Macrogglomerular complex / Complexe macroglomérulaire

nAChR : Récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level / Dose sans effet toxique observable

OBP : Odorant binding protein / Protéine de liaison aux odeurs

OR : Olfactory receptor / Récepteur olfactif

ORN : Olfactory receptor neuron / Neurone récepteur olfactif

PCR : Polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne

PN: Projection neuron / Neurone de projection

qPCR : Quantitative PCR / PCR quantitative

RT-PCR : Reverse transcription PCR / PCR avec transcription inverse



# **Partie 1**

## **Introduction**

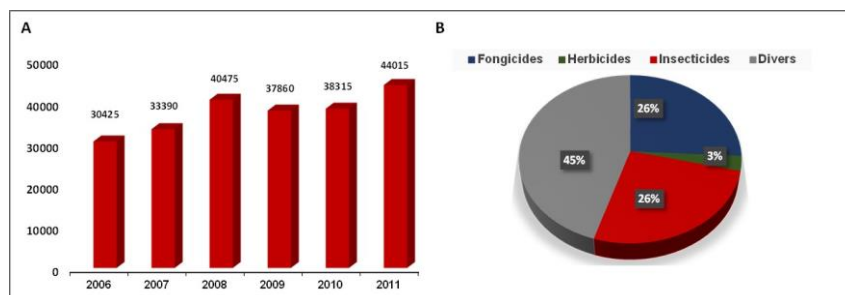


## Chapitre I : La lutte chimique contre les insectes ravageurs

Dans un contexte où les populations mondiales croissent de plus en plus, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de maintenir une agriculture économiquement performante tout en protégeant les cultures de plantes. Il existe à l'heure actuelle deux types de protection mis en place pour faire face aux innombrables nuisances associées à la présence de ravageurs de culture. La première, intitulée lutte biologique, repose sur l'utilisation de substances naturelles produites par les insectes eux-mêmes ou les plantes, de prédateurs, de bactéries ou virus introduits pour réduire les populations de bioagresseurs ou de substances naturelles, utilisés pour attirer et tuer ou éloigner les ravageurs des cultures susceptibles. La deuxième est la lutte chimique qui implique l'utilisation de pesticides, molécules de synthèse issues de l'industrie chimique.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la lutte chimique, dont les premières utilisations incluant des produits chimiques tels que le soufre et l'arsenic, ont été décrites aux alentours de 1000 ans avant JC (Philogène et coll. 2008). Cependant, il a fallu attendre le développement de la chimie organique pendant les années 1930 pour voir apparaître les premiers pesticides organiques. En 1940 Müller met en évidence les propriétés insecticides du dichlorodiphényltrichloroéthane : le DDT. Ce produit connaît son apogée pendant la deuxième guerre mondiale grâce à son efficacité contre les insectes vecteurs des maladies telles que la malaria et le typhus. Ce succès a constitué le début de l'ère des insecticides de synthèse qui a vu apparaître plusieurs générations de ces pesticides.

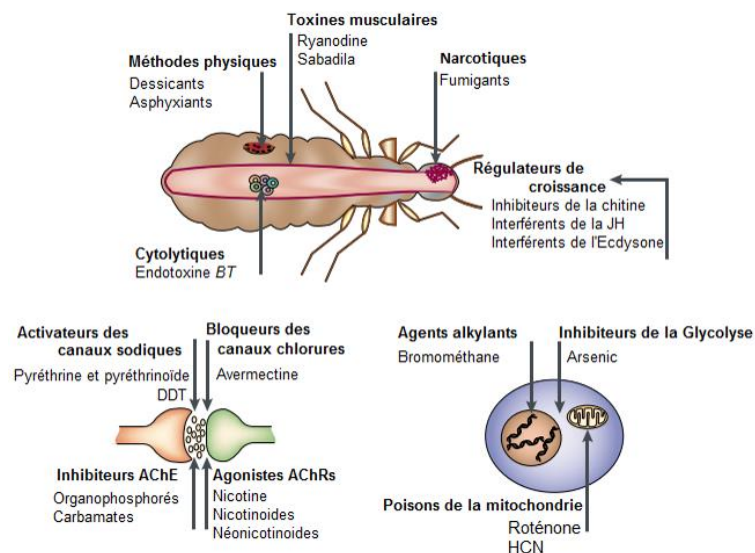
Améliorant considérablement les rendements agricoles, les insecticides synthétiques représentent actuellement plus de 25% du marché mondial des produits phytosanitaires (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Marché mondial des produits phytosanitaires. **(A)** Evolution du marché mondial des produits phytosanitaires depuis 2006 (en million d'euros). **(B)** Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2010 (d'après le rapport d'activité UIPP 2011/2012).

Cependant, le revers de la médaille ne s'est pas fait attendre. L'utilisation massive de ces produits a provoqué le développement de résistances chez certains insectes, mais également l'apparition de risques toxicologiques et de contamination environnementale induisant des effets négatifs sur l'écosystème. Cette prise de conscience est soulevée après la publication en 1962 du livre "Silent Spring", « le printemps silencieux », de Rachel Carson, qui dénonce les effets nocifs des produits chimiques sur des organismes non cibles comme les oiseaux. L'autorisation de mise sur le marché de ces molécules a en effet été accordée sans vérification exhaustive de l'innocuité des traitements vis-à-vis des organismes non cibles. Bien que le mode d'action de ces produits chimiques soit correctement décrit chez les insectes, peu de données sont disponibles quant aux modes d'actions de ces molécules chez les organismes non cibles.

Au cours de ces dernières années, sont apparues de nombreuses familles d'insecticides, qui peuvent être classées en fonction de leurs modes d'action et du stade de développement des insectes visés (œufs / larves / adultes). Ces molécules peuvent perturber le métabolisme de l'oxygène, la mue de l'insecte ou le processus de maturation, et le fonctionnement du système nerveux. Dans ce dernier cas qui représente le mode d'action de la majorité des insecticides, les molécules de synthèse sont des substances neurotoxiques (**Figure 2**).



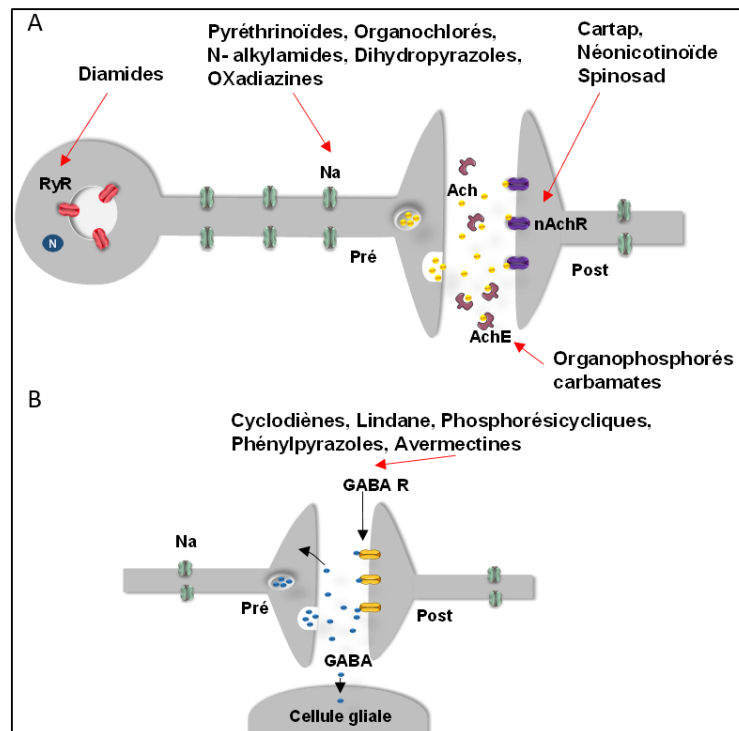
**Figure 2 :** Sites d'action des insecticides. Les principaux sites d'action sont schématisés. Les produits les plus communs affectent le système nerveux des insectes. (d'après Schneider 2000).



Chez les insectes, le système nerveux est subdivisé en deux parties: le système nerveux périphérique et le système nerveux central. L'activité nerveuse implique la propagation d'un influx électrique le long des axones des neurones ainsi que la transmission de cet influx à une autre cellule nerveuse via la synapse. Cette zone de communication entre deux neurones nécessite des neurotransmetteurs qui sont libérés par le neurone présynaptique lors d'une stimulation électrique, et qui vont se fixer aux récepteurs spécifiques situés sur la membrane du neurone post-synaptique, entraînant des variations électriques, et permettant ainsi la transmission de l'influx nerveux. Les insecticides neurotoxiques perturbent alors la transmission de cet influx nerveux en agissant directement soit sur la cible des neurotransmetteurs au niveau synaptique, soit sur les canaux voltage-dépendant permettant la propagation de l'influx nerveux le long des axones.

## 1 Insecticides neurotoxiques

Les insecticides neurotoxiques représentent la classe d'insecticides la plus importante correspondant à plus de 75% du marché mondial (Casida 2009). Cette prépondérance est liée à son efficacité élevée. En effet, ces substances ont l'avantage d'opérer dans un délai très bref qui permet de stopper rapidement la destruction des cultures. De plus ils agissent à faible dose sur des sites pour lesquels une petite perturbation peut se révéler mortelle (Casida et Quistad 2004). Ces insecticides renferment plusieurs familles, agissant 1) sur les canaux ioniques dépendants du potentiel (cible axonale), touchant ainsi la genèse de l'activité nerveuse, 2) sur les systèmes enzymatiques synaptiques et sur les récepteurs ionotropes, altérant la transmission synaptique (cibles synaptiques) (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Cibles neuronales des insecticides neurotoxiques. (A) Les pyréthrinoides, les oxadiazines et les dihydropyrazoles ont pour cibles les canaux sodiques activés par le potentiel. Les néonicotinoïdes se fixent sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine tandis que (B) les phénylpyrazoles se fixent sur les récepteurs au GABA (modifié d'après Raymond-Delpech et coll. 2005).

## 1.1 Cibles nerveuses hors récepteurs nicotiniques

Ce groupe peut être subdivisé en deux sous-groupes en fonction de leur site d'action qui est axonal ou synaptique.

Les insecticides ayant une cible axonale perturbent l'ouverture des canaux voltage-dépendants de type sodique (NaV), ce dernier jouant un rôle essentiel dans la propagation des potentiels d'action le long des axones. L'ouverture et la fermeture des canaux sodiques sont dépendantes des changements du potentiel membranaire. Ainsi, la dépolarisation de la membrane entraîne l'ouverture rapide du canal qui se referme lors de la repolarisation. Cinq familles de molécules agissent sur ce type de canal : les pyréthrinoides, les organochlorés, les pyrazoles, les alkylamides et la dernière génération des oxadiazines (Raymond-Delpech et coll. 2005 ; Casida et Durkin 2013 ; Du et coll. 2013). Ces insecticides se fixent préférentiellement sur le canal sodium ouvert. Cette liaison ralentit la fermeture du canal conservant ainsi le passage d'ions  $\text{Na}^+$  à travers la membrane (Davies et coll. 2007). Cette étape engendre la mise en place d'un état stable hyperexcité de la cellule qui produit à terme un effet paralysant chez l'insecte.

Parmi les insecticides ayant une cible synaptique, sont classées les molécules agissant sur la dégradation enzymatique, notamment sur les acétylcholinestérases. L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) qui permet de stopper la transmission synaptique et réguler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique (**Figure 3**). Cette hydrolyse induit la libération de la choline ainsi qu'un intermédiaire « acétyle-enzyme ». La deuxième étape de cette dégradation permet la libération d'acétate et la régénération de l'AChE (Soreq et Seidman 2001). Les insecticides de la famille des organophosphates et carbamates perturbent le fonctionnement de cette enzyme par la phosphorylation ou carbamylation, l'empêchant d'hydrolyser l'ACh. Ainsi, l'inhibition de cette hydrolyse provoque l'augmentation d'ACh, induisant une hyperactivité des neurones post-synaptiques, ce qui aboutit à terme à la mort de l'insecte. Les carbamates présentent un effet réversible car le complexe carbamate-AChE n'est pas stable dans le temps (Manahan 2002). Les organophosphorés pour leur part, présentent une action stable et irréversible, qui empêche la régénération de l'AChE.

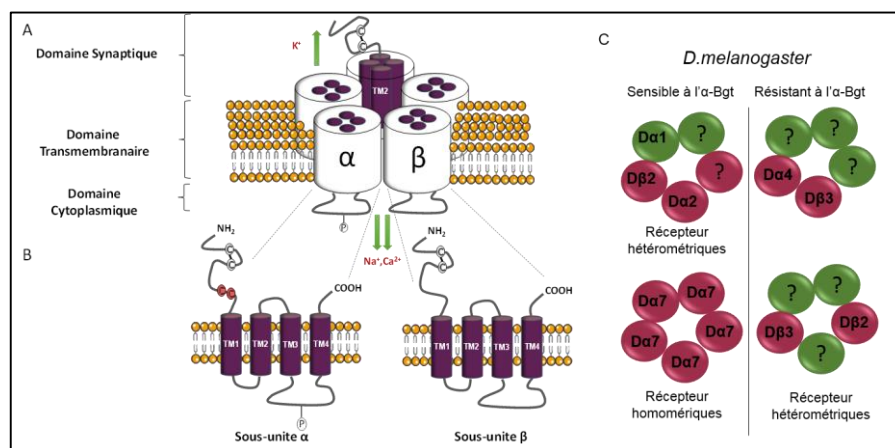
Dans les cibles synaptiques des insecticides nous retrouvons également deux récepteurs cibles des neurotransmetteurs : le récepteur Glutamate et le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Les insecticides ciblant ce récepteur ont d'abord été décrits comme ligands d'autres récepteurs et canaux: les récepteurs ionotropes au GABA et les canaux chlore dépendant du potentiel. Pour sa part, le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur chez les insectes et les mammifères. Il joue un rôle important dans la régulation de l'activité neuronale : la fixation du GABA sur son récepteur ionotrope provoque une entrée des ions Cl<sup>-</sup> (hyperpolarisation membranaire), ce qui se traduit par une inhibition de la transmission synaptique de l'influx nerveux. Les insecticides, comme les cyclodiènes et les phénylpyrazoles (dont le fipronil) sont des antagonistes des récepteurs ionotropes au GABA : ils bloquent le récepteur GABA, ce qui provoque l'excitation prolongée des neurones et entraîne à terme la mort de l'insecte (Casida et Durkin 2013).

## 1.2 Cibles réceptrices à l'acétylcholine de type nicotinique

- Récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique

Les récepteurs à l'ACh de type nicotiques (nAChR) sont des récepteurs post-synaptiques majoritaires dans le système nerveux central des insectes (Thany et coll. 2007). Les nAChRs sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la fixation de l'ACh, entraînant ainsi un influx de Na<sup>+</sup> extracellulaire et un efflux de K<sup>+</sup> intracellulaire, à l'origine de la neurotransmission.

A l'heure actuelle, aucune étude ne décrit précisément la structure tridimensionnelle des nAChRs neuronaux des insectes. Elle est déduite des données de cristallographie obtenues chez les vertébrés (Unwin 2005) : ces récepteurs pentamériques issus de la superfamille des récepteurs "cys loop", sont constitués de 5 protéines, appelées sous-unités, qui forment une rosette au centre de laquelle se trouve le pore du canal. La transposition de cette forme chez les invertébrés se base également sur le fait que l'organisation des séquences codant pour les sous-unités de nAChRs d'insectes est identique à celles identifiées chez les vertébrés (Dupuis et coll. 2012). Ainsi chaque sous-unité du récepteur possède un domaine extracellulaire N-terminal qui contient six régions distinctes, boucles A à F impliquées dans le site de liaison au neurotransmetteur suivies de quatre domaines transmembranaires (TM1-TM4), le domaine TM2 formant le canal, et d'un domaine C-terminal extracellulaire (**Figure 4**). Chez les insectes, deux types de sous-unités ont été identifiés, les sous-unités  $\alpha$  caractérisées par la présence de deux cystéines adjacentes qui sont nécessaires à la liaison de l'ACh ainsi que les sous-unités  $\beta$  qui ne présentent pas ce doublet de cystéines (Lukas et coll. 1999 ; Tassonyi et coll. 2002).



**Figure 4 :** Structure du récepteur nicotinique à l'acétylcholine. **(A)** récepteur pentamérique formant un pore sélectif aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  à travers la membrane plasmique. **(B)** chaque sous-unité est composée de 4 domaines transmembranaires (TM1-TM4). La boucle intracellulaire entre le domaine TM3 et TM4 présente un site potentiel de phosphorylation (**modifié d'après Thany et coll. 2007**). **(C)** Sous-types de récepteurs nicotiniques chez la drosophile (**modifié d'après Millar et Lansdell 2010**).

Le séquençage des génomes d'insectes tels que la drosophile *Drosophila melanogaster*, la mouche *Musca domestica*, l'abeille *Apis mellifera*, le papillon du mûrier *Bombyx mori* et encore le puceron du pêcher *Myzus persicae* (Adams et Sekelsky 2002 ; Scott et coll. 2014 ; Jones et coll. 2006 ; Shao et coll. 2007 ; Mita et coll. 2004), a permis l'identification de 10 à 12 sous-unités de nAChRs par espèce. A ce grand nombre de sous-unités selon l'espèce, s'ajoute le phénomène d'épissage alternatif comme c'est le cas des sous-unités  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  chez *D. melanogaster* (Jones et coll. 2006), augmentant ainsi la diversité des sous-unités de

nAChRs présentes chez les insectes. L'étude d'homologie de séquences en acides aminés permet de classer les sous-unités de nAChRs d'insecte en sept groupes conservés qui présentent une homologie de séquence supérieure à 60% entre les différentes espèces d'insecte. Cependant, l'analyse des génomes met en évidence l'existence de sous-unités divergentes présentant des très faibles homologies, inférieures à 29% avec les autres sous-unités d'insectes (Jones et coll. 2007; Jones et Sattelle 2010). La présence d'une boucle de petite taille située entre les segments TM3-TM4 suggère que la divergence de ces sous-unités peut influencer la régulation des nAChRs qu'elles constituent en modifiant les mécanismes de phosphorylation (Jones et Sattelle 2010; Castelan et coll. 2007). Ces sous-unités divergentes sont donc particulièrement intéressantes car elles pourraient conférer des caractéristiques fonctionnelles particulières aux nAChRs (Dale et coll. 2010; Jones et Sattelle 2010).

En effet, selon l'assemblage des différentes sous-unités, les récepteurs peuvent être hétéro- ou homo-pentamères (**Figure 4**). Les récepteurs homo-pentamères qui sont constitués exclusivement de sous-unités  $\alpha$ , présentent cinq sites de liaisons pour l'ACh alors que les récepteurs hétéro-pentamères constitués de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  présentent un nombre de sites de liaison proportionnel au nombre de sous-unités  $\alpha$  (Arias 1997).

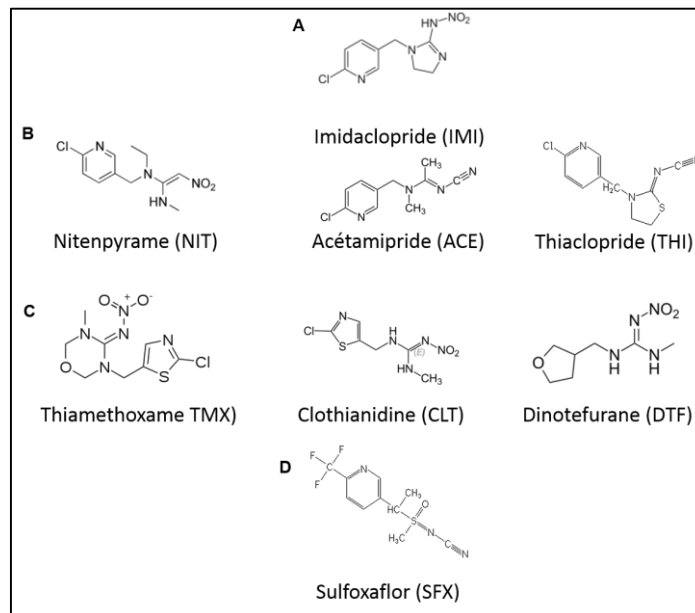
Les propriétés pharmacologiques des nAChRs permettent de les classer en deux sous-types en fonction de leur sensibilité à l' $\alpha$ -bungarotoxine (toxine qui provient d'un serpent, *Bungarus multicinctus*). Les deux sous-types de récepteurs montrent une sensibilité identique à l'ACh, mais différente pour les ligands agonistes ou antagonistes vis-à-vis des ligands de synthèse (Dupuis et coll. 2012). Ces informations découlent des analyses pharmacologiques effectuées sur des nAChRs exprimés dans les ovocytes de xénope et/ou dans des lignées cellulaires d'insectes (cellules S2, cellules Sf9). Jusqu'à présent, l'expression de nAChRs à partir de sous-unités uniquement d'origine insecte ne permettait pas d'obtenir des récepteurs fonctionnels. Les études pharmacologiques antérieures se sont donc basées sur l'expression des récepteurs hybrides contenant des sous-unités à la fois d'origines insecte et mammifère, ou sur l'expression de récepteurs chimériques contenant le domaine N-terminal de la sous-unité d'intérêt couplé avec les domaines transmembranaires et C-terminal du récepteur à la sérotonine (5-HT<sub>3</sub>) (Millar 2009). Ces études ont néanmoins permis d'apporter des informations sur les sites de liaisons d'agonistes des nAChRs parmi lesquels sont consignés les insecticides néonicotinoïdes. L'expression de récepteurs hybrides drosophile-poulet D $\alpha$ 2-Gg $\beta$ 2 et D $\alpha$ 1-Gg $\beta$ 2 dans les ovocytes de xénope met en évidence l'activation du récepteur D $\alpha$ 2-Gg $\beta$ 2 par des analogues de néonicotinoïdes alors que ces analogues sont inefficaces sur le récepteur D $\alpha$ 1-Gg $\beta$ 2 (Thany et coll. 2007). Ces résultats montrent que les sous-unités  $\alpha$ , chez l'insecte, contribuent à la sélectivité du récepteur aux néonicotinoïdes. De plus, les

récepteurs hybrides drosophile-rat  $D\alpha 3-Rn\beta 2$  et  $D\alpha 3-Rn\beta 4$  montrent une différence d'affinité pour l'imidaclopride qui est supérieure dans le cas du récepteur hybride  $D\alpha 3-Rn\beta 2$  (Vo et coll. 2010), ce qui implique également les sous-unités  $\beta$  dans la sensibilité aux néonicotinoïdes. Par ailleurs, d'autres études effectuées sur cellules uniques ont permis de mettre en évidence chez l'abeille un récepteur fonctionnel présentant un assemblage de sous-unités différent : les sous-unités  $Amel\alpha 2$ ,  $Amel\alpha 8$  et  $Amel\beta$  seraient observées dans les cellules de Kenyon des corps pédonculés, alors que ces mêmes sous-unités assemblées avec  $Amel\alpha 7$  composeraient les nAChRs des lobes antennaires (AL) (Dupuis et coll. 2011). Ces résultats suggèrent que les différentes zones du cerveau peuvent exprimer des récepteurs différents et par conséquent avec des sensibilités différentes. Des études récentes mettent également en évidence des propriétés distinctes des récepteurs nicotiques en fonction des stades de développement chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*. Cette divergence serait due à des variations d'expression des sous-unités : en effet, les résultats montrent que le niveau d'expression des sous-unités  $Apisum\alpha 1$ ,  $Apisum\alpha 2$ ,  $Apisum\alpha 6$ ,  $Apisum\alpha 8$  et  $Apisum\beta 2$  présente une forte diminution au stade adulte (Taillebois et coll. 2014). L'expression de ces sous-unités peut être modifiée d'une façon différentielle sous l'influence de doses sublétales d'insecticides néonicotinoïdes (Taillebois et coll. 2014).

Ces insecticides miment l'action de l'ACh mais ne sont pas dégradés par l'AChE, ce qui provoque dans un premier temps une dépolarisation permanente de la membrane et donc une hyperexcitation des neurones puis, dans un deuxième temps, une paralysie et la mort de l'insecte suite à la fermeture des nAChRs par désensibilisation (Desneux et coll. 2007).

Cette classe d'insecticides développée depuis les années 1970 comprend huit molécules correspondant à quatre générations de composés chimiques (**Figure 5**) parmi lesquels se trouve l'imidaclopride, introduite sur le marché des produits phytosanitaires au début des années 1990, qui est devenu l'un des insecticides les plus employés dans le monde (Matsuda et coll. 2001 ; Nauen et coll. 2001a ; Laurent et Rathahao 2003 ; Decourtye et Devillers 2010). L'imidaclopride est intégrée dans plusieurs formulations commerciales, dont certaines permettent l'enrobage de semences (GAUCHO®). Ce type de formulation qui est compatible avec les propriétés physico-chimiques des molécules de type systémique, garantit le succès de cet insecticide et plus largement de tous les insecticides néonicotinoïdes, car ils protègent la totalité de la plante dès le stade plantule le plus vulnérable. Ainsi, sont commercialisés en enrobage de semences depuis 1995 et 2001 les molécules insecticides acétamipride (SUPREME®), thiametoxam (CRUISER®), et clothianidine (PONCHO®) (Yamada et coll. 1999 ; Jeschke et coll. 2001 ; Jeschke et Uneme 2003 ; Nauen et coll. 2003). Une des propriétés qui distingue les néonicotinoïdes d'autres

insecticides est sa solubilité dans l'eau (0,3-0,34 g/l) et sa persistance dans le sol, avec une durée de demi-vie moyenne de 545 jours (Tomizawa et Casida 2005 ; Goulson 2013).



**Figure 5 :** Structure chimique des huit insecticides néonicotinoïdes commercialisés. **(A)** Première génération **(B)** Deuxième génération **(C)** Troisième génération **(D)** Quatrième génération.

## 2 Toxicité des insecticides neurotoxiques

### 2.1 Notions de toxicologie

L'évaluation des risques associés à des molécules sur les organismes cibles ou non cibles repose sur deux formes principales de toxicité : la toxicité chronique et la toxicité aiguë, qui permettent d'étudier la relation dose/effet, le mécanisme d'action toxique, la réversibilité des effets ou encore l'existence d'un seuil pour les effets toxiques.

La toxicité chronique comme son nom l'indique, correspond aux effets liés à une exposition prolongée à la substance chimique, suivant des doses équivalentes qui sont administrées sur le long terme. Les effets de cette intoxication peuvent apparaître durant l'exposition ou bien après cette dernière. La toxicité aiguë quant à elle, correspond à la capacité de la substance chimique à engendrer des effets nocifs immédiats suite à une exposition unique. Dans l'étude de la toxicité d'un insecticide, la toxicité aiguë est évaluée pour différentes doses/concentrations de l'insecticide, et les effets correspondant généralement à la mortalité sont observés 24, 48h et 72h après traitement. L'établissement d'une courbe dose/réponse permettra par la suite de déterminer deux paramètres importants en toxicologie : la dose létale 50 (DL50) ou la Concentration létale 50 (CL50), et la Dose sans effet (DSE, ou en

anglais : NOAEL, Non Observable Adverse Effect Level). Le premier paramètre (DL50/LD50, CL50/LC50) correspond à la dose ou la concentration de produit administrée par ingestion ou voie cutanée, entraînant la mort de 50% de la population testée. Exprimé en mg/animal ou en mg/L pour la CL50, plus ce chiffre est faible, plus le produit est toxique. Le deuxième paramètre (DSE/NOAEL), déduit de la courbe de mortalité, est la dose ou concentration en dessous de laquelle n'apparaissent pas d'effets. Ces paramètres peuvent varier selon le sexe, le stade de développement de l'animal et/ou de sa pré-exposition à différentes substances environnementales (Dorato et Engelhardt 2005).

La majorité des insecticides utilisés actuellement étant des insecticides ciblant le système nerveux, l'observation des effets toxiques de ces insecticides chez les insectes consiste à détecter les signes de neurotoxicité, correspondant à un changement de la structure ou une altération d'une ou plusieurs fonctions du système nerveux (Philbert et coll. 2000). Ainsi la série de troubles qui surviennent successivement dans le temps suite à une intoxication est directement reliée à l'action de la molécule sur sa cible.

Etant donné que les insecticides sont des molécules chimiques de synthèse, leur utilisation massive entraîne également une toxicité environnementale qui peut être évaluée par la durée de demi-vie des molécules et leur accumulation dans le sol, rivières et nappes phréatiques. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence la persistance des molécules insecticides (organophosphorés, néonicotinoïdes,...) dans l'environnement (Wauchope et coll. 1992 ; Howard et coll. 1991 ; Byrne et Toscano 2006 ; Starner et Goh 2012).

## 2.2 Effet toxique sur les organismes non cibles

Bien que les insecticides présentent un intérêt indéniable quant à leur efficacité sur les ravageurs de culture, leur rémanence dans l'environnement engendre une toxicité non négligeable sur des organismes non cibles. Le degré d'impact de ces molécules dépendra de leur mode d'action, du type d'intoxication (orale, cutanée ; ponctuelle/chronique) et pour une part de la proximité phylogénétique des organismes atteints (insectes>invertébrés>vertébrés).

De par leur action systémique, les insecticides néonicotinoïdes sont présents dans toutes les parties de la plante incluant le pollen et le nectar des fleurs (Laurent et Rathahao 2003). Ainsi les pollinisateurs tels que les hyménoptères sont régulièrement en contact avec ces pesticides et la littérature portant sur les effets délétères de ces molécules chez cet ordre d'insectes est nombreuse (Desneux et coll. 2007). Les apiculteurs relayés par les groupements professionnels ont alerté les autorités suite à l'observation d'un taux élevé de mortalité et de désorientation des abeilles au sein des ruches situées à proximité des



cultures protégées par des insecticides de type néonicotinoïde en enrobage de semences. Ainsi des études successives ont mis en évidence la toxicité de cette classe d'insecticide capable d'induire un effet anorexigène (Nauen et coll. 2001), de diminuer les performances d'apprentissage (El Hassani et coll. 2007), la capacité à incuber les œufs et les larves (Decourtye et coll. 2004) et de perturber le comportement dans la recherche de nourriture (Yang et coll. 2008) chez l'abeille *A. mellifera*. Des études plus récentes ont montré également que les insecticides néonicotinoïdes peuvent présenter un effet négatif sur le comportement de butinage et de mémoire chez cet insecte (Henry et coll. 2012 ; Blacquiere et coll. 2012). Des effets analogues ont été identifiés chez d'autres insectes pollinisateurs tels que le bourdon *Bombus terrestris* (Mommaerts et coll. 2009). Ce type d'effet a également été observé sur les insectes auxiliaires de culture, prédateurs d'insectes, tels que les coccinelles *Harmonia axyridis* (Vincent et coll. 2000).

Les insecticides peuvent également présenter des effets sur les vertébrés des écosystèmes terrestres et aquatiques. En tant qu'insectivores et/ou granivores les oiseaux se trouvent également en première ligne en tant qu'organisme non cible. En effet un rapport de l'EBCC 2008 (European Bird Census Council) déclare que les populations d'oiseaux dans les zones agricoles ont chuté de 48%, mettant en cause l'expansion et l'intensification de l'usage des insecticides dans ces zones. L'empoisonnement des oiseaux résulte en effet de l'ingestion des insectes et des graines contaminées (Prosser et Hart 2005). Le contact avec les insecticides neurotoxiques conduit chez certaines espèces de poissons et de chauves-souris à une diminution de l'immunité, augmentant ainsi les risques d'exposition aux pathogènes et d'infection (Mason et coll. 2013). Même pour la santé humaine, des corrélations avec les cancers et d'autres problèmes de santé ont été rapportées suite à l'exposition aux insecticides (Alavanji et coll. 2004).

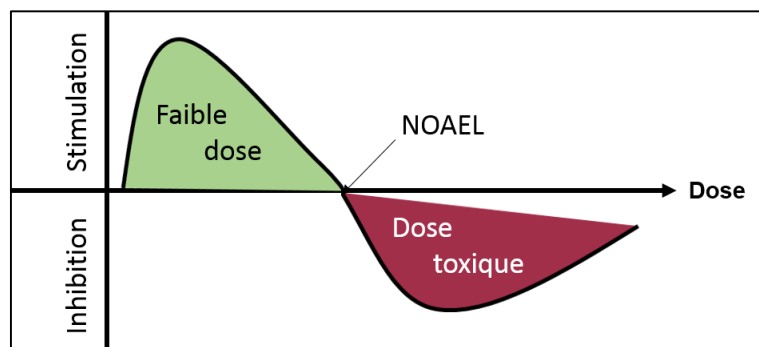
### 2.3 Effet positif sur les organismes cibles : l'hormèse

Plusieurs études ont rapporté l'existence d'effets inattendus suite à une intoxication à de faibles doses d'insecticides (Hoffman 2009). Il a été montré par exemple que chez les lépidoptères *Trichoplusia ni* et *Grapholita molesta*, le contact avec des doses inférieures à la DL50 du Chlordimeform induisait un déplacement du seuil de détection des phéromones sexuelles (Linn et Roelofs 1984, 1985). Chez le parasitoïde *Leptopilina heterotoma*, les réponses des femelles aux kairomones émises par leurs hôtes augmentent après un traitement avec la DL20 d'un organophosphoré ou d'un pyréthrianoïde (Delpuech et coll. 2005). Dans une autre étude similaire il a été montré que l'intoxication avec un insecticide organophosphoré, à la dose sublétales DL0,1, induisait une augmentation de la réponse à la phéromone sexuelle à long terme chez les mâles de *Trichogramma brassicae* (Delpuech et

et coll. 2001). Par ailleurs, des effets des faibles doses sur les traits de vie tels que la fécondité et longévité ont été également rapportés. Chez le puceron vert *M. persicae*, l'intoxication avec l'imidaclopride à différentes doses inférieures à la DL0 induit une augmentation de 20 à 30% de la fécondité mais aussi une augmentation de la longévité et de la taille de la descendance (Ayyanath et coll. 2013 ; Cutler et coll. 2009).

L'observation de ces effets « positifs » à faible dose est relié à un phénomène appelé hormèse : il se caractérise par une action biphasique, comportant une inhibition d'un caractère lorsque le produit est utilisé à forte dose et une stimulation de ce caractère lorsque ce même produit est utilisé à faibles doses (Calabrese et Baldwin 2003) (**Figure 6**). Cette réponse hormétique est généralement observée à des doses d'insecticide inférieures à la NOAEL de l'insecticide, mais peut également se produire à des doses sublétales supérieures à la NOAEL (Hoffmann 2009).

L'étude de l'hormèse chez les insectes est importante d'un point de vue fondamental, car il permet la compréhension des mécanismes mis en place en réponse à un stress donné, mais son étude présente également un intérêt dans la lutte contre les nuisibles. En effet, des ravageurs secondaires peuvent se retrouver en contact avec des doses rémanentes dans le sol et les plantes traités, et par conséquent avec des doses sublétales, pouvant induire des effets positifs sur leurs traits de vie. Ainsi, ce phénomène est reconnu comme l'une des potentielles causes sous-jacentes des résurgences et infestations par ces ravageurs secondaires (Hoffman 2009).



**Figure 6** : Représentation schématique de l'effet d'hormèse (d'après Calabrese et Baldwin 2003).

## Chapitre II : L'olfaction, outil de communication chez les insectes

L'olfaction représente un élément fondamental dans l'interaction entre l'individu et son environnement, mais également entre les individus de la même espèce. Parmi les informations sensorielles, l'olfaction joue un rôle essentiel pour la plupart des insectes dans différents contextes, comme la recherche de nourriture et de l'hôte/plante hôte ainsi que dans la communication inter- et intraspécifique, comme par exemple la recherche du partenaire sexuel ou l'inhibition de la reproduction chez certains insectes sociaux.

### 1 Les signaux olfactifs et le comportement associé à l'olfaction

Dans un environnement naturel, les insectes sont entourés d'un ensemble de stimuli olfactifs complexes, composés de signaux de différentes origines. La réponse comportementale à ce mélange dépendra de la capacité à détecter et analyser les différents éléments du stimulus et de la reconnaissance de signaux pertinents. En effet, les insectes reçoivent constamment différents signaux olfactifs, correspondant à des molécules appelées sémiochimiques. Ces stimuli se différencient selon leur nature, leur effet et la nature du bénéficiaire. On retrouve deux catégories distinctes : les phéromones et les substances allélochimiques.

Les substances allélochimiques possèdent une action interspécifique, et peuvent être regroupées en trois groupes : les allomones, les kairomones et les synomones. Les allomones ne sont bénéfiques qu'à l'organisme qui les émet contrairement aux synomones qui ont un effet positif pour l'organisme émetteur et receveur. Les kairomones pour leur part sont des messages chimiques qui informent le receveur de la présence d'un signal, procurant un avantage uniquement à l'organisme qui les reçoit (Brown et coll. 1970). Ces composés volatiles organiques jouent un rôle important dans les interactions interspécifiques. Ils sont, pour la plus grande majorité, issus des voies de biosynthèse des plantes (les terpènes, les composés aromatiques ainsi que les dérivés des acides gras) (Dudareva et coll. 2004). Ils interviennent dans la détection de diverses informations, notamment la recherche de nourriture. En effet, les plantes, principales ressources alimentaires des pollinisateurs et des phytophages, émettent dans l'environnement divers composés organiques volatiles. Ces volatiles représentent une grande importance dans les interactions plantes/insectes, en assurant la reproduction des plantes à fleurs via la

pollinisation (Penuelas et Liusia 2004), mais sont aussi utilisés pour détecter les plantes à consommer ou à éviter (Zhang et coll. 1999). Ce sont également des signaux détectés par les femelles dont les larves sont phytophages, à la recherche d'un site de ponte. Les larves des insectes phytophages induisent souvent l'émission de composés organiques volatiles spécifiques provoquée par le dommage mécanique, qui permettent aux femelles de distinguer entre une plante hôte saine et une plante déjà endommagée, afin d'assurer le développement optimal de leur descendance (Renwick et Chew 1994 ; Dicke 2009). Les prédateurs ou parasitoïdes des phytophages utilisent également ces signaux induits pour détecter leur proie (Dicke 2009).

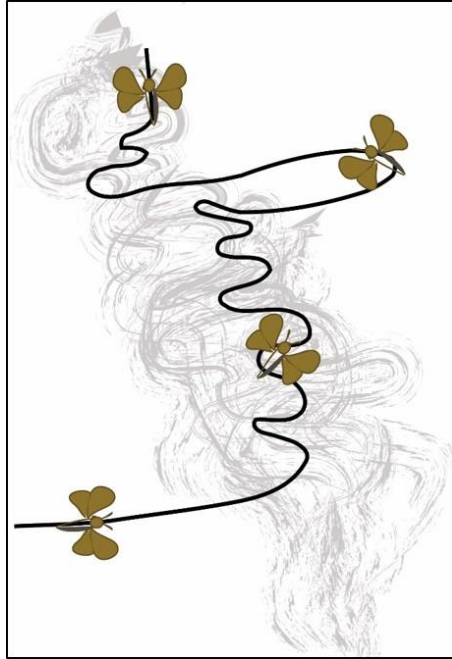
La communication intraspécifique quant à elle, repose principalement sur les molécules appelées phéromones. Ce sont des substances secrétées par un individu d'une espèce susceptibles de modifier la physiologie et/ou le comportement d'autres individus de la même espèce (Karlson et Lüscher 1959). En 1891, l'entomologiste français Jean-Henri Fabre décrit pour la première fois une attraction des mâles du grand paon de nuit (*Saturnia pyri*) vers une femelle de la même espèce, lorsque celle-ci est cloîtrée sous une cloche en toile. Il conclut alors à l' « existence d'effluves subtiles, ou même d'une odeur émise par la femelle » mais ne put préciser davantage son observation. En 1959, le terme « phéromone » proposé par Karlson et Lüscher fait son apparition dans la littérature scientifique. C'est le bombykol, phéromone sexuelle du bombyx du mûrier (*B. mori*) et les phéromones de l'abeille, *A. mellifera*, qui furent les premières isolées : le bombykol en 1959 (Butenandt et coll. 1959), et la phéromone de la reine d'abeille en 1960 par deux équipes simultanément (Barbier et Lederer 1960 ; Callow et Johnston 1960).

Les phéromones sont classées selon la réaction qu'elles provoquent chez les individus. On distingue les phéromones modificatrices, comme par exemple celles produites par la reine chez les abeilles, qui lui permet d'empêcher l'élevage d'une nouvelle reine dans la ruche (Leoncini et coll. 2004) et les phéromones incitatrices agissant directement sur le comportement d'un organisme, tels que les phéromones sexuelles.

Bien que généralement émises par les femelles, les mâles de certaines espèces peuvent produire une phéromone sexuelle, sécrétée par des glandes spécialisées situées le plus souvent dans la tête ou l'abdomen de l'insecte. Plus de mille substances chimiques ont été identifiées comme intervenant dans la communication sexuelle (Roelofs 1995). Elles sont le plus souvent constituées d'un mélange de composés odorants. Pour une espèce donnée, ce mélange est extrêmement spécifique. Cette spécificité résulte de la nature des composés chimiques de la phéromone ainsi que de leur proportion dans ce mélange. Des espèces sympatriques produisent souvent des composés phéromonaux qui inhibent l'attraction des

autres espèces quand on les rajoute à leur phéromone conspécifique (Quero et Baker 1999). L'émission de la phéromone sexuelle a lieu lors d'une période critique du nyctémère qui est spécifique de l'espèce. Cette période d'émission correspond rigoureusement à la période de réponse comportementale maximale de l'autre sexe de la même espèce (Rafaeli 2005).

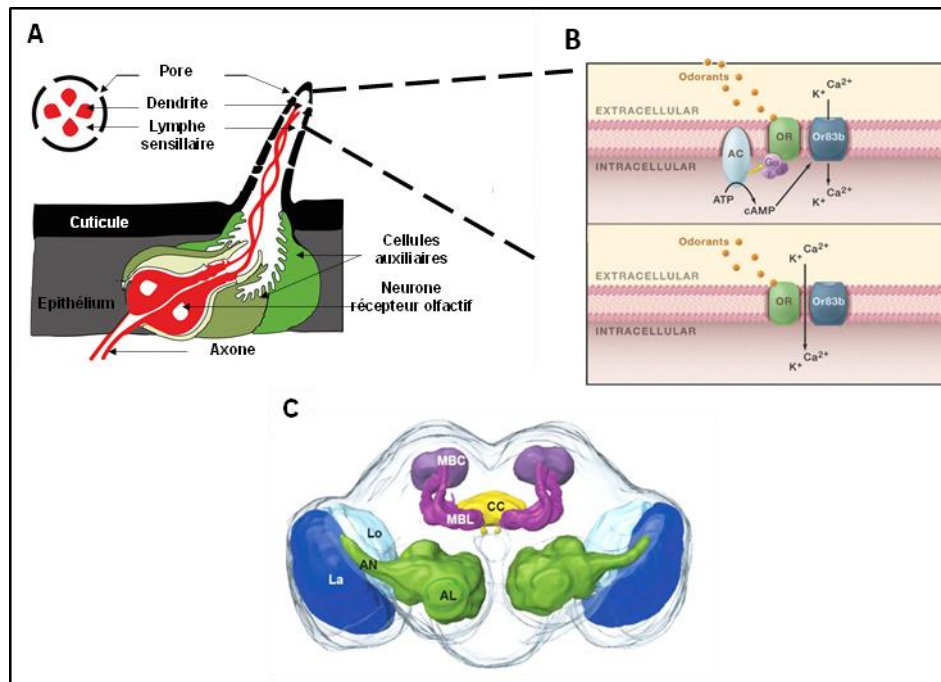
Chez les lépidoptères, les femelles émettent une phéromone sexuelle volatile qui attire à plusieurs centaines de mètres les mâles de la même espèce. Véhiculée par l'air turbulent, l'odeur forme un nuage (« plume » en anglais) discontinu avec des « paquets » de phéromone dont la densité diminue avec la distance depuis la source (David et coll. 1982 ; Murlis et coll. 2000). La détection de la phéromone d'une femelle conspécifique induit le comportement d'orientation chez le mâle. Les premières études de laboratoire sur le comportement de l'orientation vers la phéromone chez les lépidoptères ont été réalisées par Shorey en 1964 et reprises par Kennedy en 1983 et Baker et coll. en 1985. Lorsque le mâle perçoit une odeur phéromonale qu'il reconnaît comme conspécifique, il effectue un comportement en plusieurs étapes. La première phase est une activation alaire accompagnée par des mouvements de nettoyage des antennes, aidant à la perception de l'odeur (Böröczky et coll. 2013). Par la suite le mâle effectue un vol face au flux d'air pour y localiser parfaitement la source d'émission de la phéromone. Le mâle remonte ce flux d'air en effectuant un vol orienté qui comprend des zigzags de plus en plus précis au fur et à mesure qu'il s'approche de la femelle, ce qui correspond à l'augmentation de la fréquence de rencontre avec des paquets de phéromone (Kennedy 1983 ; Baker et coll. 1985). Dans les conditions naturelles, le mâle peut perdre le signal phéromonal, et doit donc adapter la direction de son vol en fonction du vent et en augmentant l'amplitude des zigzags (casting) (Baker et Haynes 1987) (**Figure 7**).



**Figure 7** : Représentation schématique du vol orienté d'un lépidoptère mâle vers une source de phéromone (d'après Lofthouse-Quesada, 2012).

## 2 Le système olfactif des insectes

La communication phéromonale et la détection des odeurs supposent l'existence d'organes dédiés à cette fonction. Chez les insectes, le système olfactif est particulièrement performant. L'information olfactive des insectes est traitée au niveau d'un système à deux étages : périphérique et central (**Figure 8**).



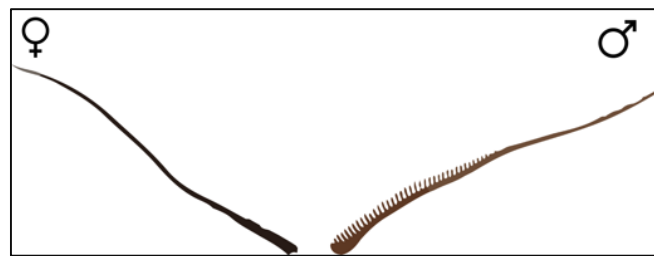
**Figure 8 :** Représentation du système olfactif périphérique (A,B) et central (C). **(A)** Schéma d'une sensille trichoïde olfactive **(B)** Modèle de transduction olfactive chez les insectes. Le schéma montre les deux voies possibles : la première impliquant des second messagers et la deuxième dans laquelle le ligand ouvre les canaux ioniques directement. **(C)** Reconstruction 3D d'un cerveau d'*A. ipsilon*. La : lamina, Lo : lobula, AN : antennal nerve, AL : antennal lobe, MBL : mushroom body lobe, MBC : mushroom body calyx, CC : central complex (modifié d'après Gräter et coll. 2006 ; Ha et Smith 2006 ; Deisig et coll. 2014).

## 2.1 Système périphérique

Chez les insectes, les molécules odorantes sont détectées au niveau des antennes. D'un point de vue morphologique, il existe deux types d'antennes : les antennes segmentées et les antennes flagellaires (Schneider 1964). Ces dernières sont largement plus répandues et leur morphologie peut varier au sein même de l'espèce selon le sexe. Chez les lépidoptères nocturnes, les femelles possèdent des antennes plus filiformes que celles des mâles. Ce dimorphisme sexuel est relié à la détection de la phéromone, en permettant au mâle d'accroître sa surface d'échange antennaire avec l'environnement (Kaissling et coll. 1987 ; Steinbrecht 1970) (**Figure 9**). Les antennes hébergent des neurones récepteurs olfactifs (olfactory receptor neurons : ORN) responsables de la détection des molécules odorantes. Ils sont situés dans des soies cuticulaires, appelées sensilles (Keil 1999). Les sensilles olfactives se distinguent des autres sensilles par la présence de nombreux pores disséminés à leur surface au travers de leur paroi (Keil 1999) (**Figure 8A**). Les sensilles contenant des ORNs sensibles aux composés phéromonaux chez les lépidoptères sont généralement des sensilles trichoïdes (Keil 1999).

La spécificité des ORNs varie en fonction des molécules détectées. Les ORNs sensibles aux phéromones sont par exemple hautement spécifiques et ne répondent qu'à un seul ou

quelques molécules très similaires (Todd et Baker 1999). Par contre parmi les ORNs répondant aux odeurs des plantes, la spécificité est plus variable, avec certains neurones répondant à quelques composés chimiquement proches, et d'autres qui répondent à des composés très variés (Andersson et coll. 2009). L'identité du stimulus est représentée par le type d'ORN pour les neurones spécifiques et par le pattern de la réponse en termes d'inhibition ou excitation pour les neurones moins spécifiques (Rouyar et coll. 2015). La dose d'un stimulus est encodée par la fréquence des potentiels d'action émis, suivant une courbe sigmoïde (Todd et Baker 1999).



**Figure 9 :** Illustration du dimorphisme sexuel des antennes chez le papillon de nuit *A. ipsilon*.

Généralement lipophiles, les molécules odorantes peuvent pénétrer dans la sensille par les pores puis circuler dans la lymphe sensillaire par l'intermédiaire de protéines spécifiques : les protéines liant les odorants (odorant-binding Proteins, OBP). Les OBPs assurant le transport des phéromones sont appelées « pheromone binding protein » (PBP), qui sont exprimées dans des sensilles distinctes de celles exprimant les protéines qui lient d'autres molécules, les « general odorant binding proteins (GOBP) (Vogt et Riddiford 1981 ; Steinbrecht et coll. 1992 ; Laue et coll. 1994). Arrivées près des neurones olfactifs, les molécules odorantes, libérées par les OBPs, se lient aux récepteurs localisés dans les membranes des dendrites : les récepteurs olfactifs (OR) associés à un co-récepteur (ORco).

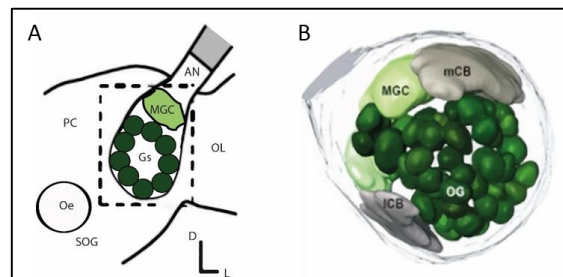
La drosophile est l'insecte chez lequel les récepteurs olfactifs sont les mieux connus. Les récepteurs sont constitués d'un complexe hétéromérique composé d'une sous-unité ubiquitaire de type Or83b (correspondant à ORco) et une autre sous-unité spécifique, les deux avec sept domaines transmembranaires (Vosshall et coll. 1999). La sous-unité spécifique est responsable de la détection soit des odeurs généralistes, soit des phéromones et chaque ORN exprime un seul type de récepteur (Vosshall et coll. 1999). Le fonctionnement de ces complexes protéiques reste controversé : certaines études suggèrent qu'ils formeraient des canaux ioniques activés par un ligand (Sato et coll. 2008 ; Smart et coll. 2008 ; Touhara et Vosshall 2009) alors que d'autres études suggèrent que la détection



des odeurs peut aussi passer par l'activation de protéines G (Ha et Smith 2008 ; Wicher et coll. 2008 ; Kaupp 2010) (**Figure 8B**). Après liaison au récepteur olfactif, la membrane de la dendrite de l'ORN est dépolarisée et un potentiel gradué est formé. Ensuite ce potentiel récepteur est transformé en potentiel d'action, qui se propage le long de l'axone jusqu'à son arrivée dans le centre olfactif primaire du cerveau, le lobe antennaire (Antennal Lobe : AL) (Todd et Baker 1999) (**Figure 8C**).

## 2.2 Système central

Les ORNs se projettent vers les ALs, zone du deutocérébron qui est par son anatomie et sa fonction analogue au bulbe olfactif des vertébrés. Le AL est constitué de structures morpho-fonctionnelles d'intégration de l'information olfactive, appelées les glomérules (**Figure 10**). Les ALs sont ensuite reliés à des centres supérieurs olfactifs, tels que les corps pédonculés et le protocérébron latéral (Galizia et Roessler 2010). L'information olfactive intégrée déclenche, via des neurones descendants et des neurones moteurs, un comportement adapté. Ce chapitre sera focalisé sur la description de la structure et du fonctionnement du AL.



**Figure 10** : Structure du lobe antennaire. **(A)** Représentation schématique du lobe antennaire. **(B)** Reconstruction 3D d'un AL d'*A. ipsilon*. Oe: oesophagus, PC: protocerebrum, SOG: suboesophageal ganglion, MGC: macroglomerular complex, OL: optic lobe, AN: antennal nerve, l/mCB: lateral/medial cell body cluster, OG: ordinary glomeruli (**d'après Deisig et coll. 2014**).

### 2.2.1 Les glomérules du AL

Les glomérules sont des structures sphériques dans lesquelles ont lieu les contacts synaptiques entre les axones des ORNs et les dendrites des neurones centraux qui assurent l'intégration des signaux olfactifs (Shepherd et Koch 1990). Le nombre de glomérules, constant pour chaque espèce, varie par contre d'une espèce à l'autre (Rospars 1988). Chez l'abeille par exemple, chaque AL est constitué de 160 glomérules ; chez la drosophile il y en

a une cinquantaine, ou encore 66 glomérules chez le papillon de nuit *A. ipsilon* et plus de 1000 chez les criquets migrateurs (Anton et Homberg 1999 ; Greiner et coll. 2004).

Chaque glomérule ne reçoit que les informations olfactives en provenance d'un même type d'ORN exprimant le même récepteur olfactif (Gao et coll. 2000). Par conséquent, une activation d'ORNs spécifiques correspond à une carte d'activation caractéristique des glomérules des AL, mise en évidence par imagerie calcique *in vivo* (Galizia et Menzel 2001). Des doses croissantes d'une odeur élicitent une activation croissante des mêmes glomérules, ainsi qu'une activation d'autres glomérules, probablement due à des liaisons moins spécifiques de composés à certains récepteurs olfactifs supplémentaires à fortes doses (Galizia et Menzel 2001).

Chez les lépidoptères, on observe sur cette structure le même dimorphisme sexuel observé auparavant sur l'antenne. En effet, les glomérules sont organisés en deux zones distinctes, une première zone, dédiée au traitement des odeurs générales, présente chez les femelles et les mâles, appelés les glomérules ordinaires, et une deuxième zone présente uniquement chez les mâles, spécifique au traitement de l'information phéromonale et appelée le complexe macroglomérulaire (MGC) (**Figure 10**). C'est dans ce complexe que se projettent les ORNs antennaires sensibles aux différents composants de la phéromone sexuelle. Ainsi le nombre de glomérules dans le MGC varie d'un à sept en fonction du nombre de composés phéromonaux de l'espèce (Hansson et Anton 2000).

### 2.2.2 Les neurones du AL

Quatre types de neurones sont présents au niveau des glomérules. Les ORNs provenant des antennes, les neurones locaux (LN) qui connectent les glomérules entre eux, les neurones de projection (PN) qui transmettent l'information olfactive aux centres supérieurs du protocérébron et les neurones centrifuges provenant des centres supérieurs et modulant l'activité des autres types de neurones. Les corps cellulaires des LNs et PNs sont situés dans différents clusters autour du AL (Anton et Homberg 1999).

- **Les neurones récepteurs olfactifs (ORN)**

Réorganisés à l'entrée du AL, les axones des ORNs constituent la majeure partie du nerf antennaire et forment des fascicules, chaque fascicule regroupant les axones des ORNs qui expriment le même récepteur olfactif et se projettent dans un seul glomérule (Gao et coll. 2000). Ces neurones synthétisent l'ACh, principal neurotransmetteur impliqué dans leur fonctionnement (Homberg et Müller 1999 ; Schachtner et coll. 2005).

- **Les neurones locaux (LN)**

Trois types morphologiques de LN peuvent être distingués : les multiglomérulaires se ramifiant dans les glomérules de façon homogène, les multiglomérulaires présentant des ramifications hétérogènes et les oligoglomérulaires qui ne se ramifient que dans quelques glomérules. Ce sont principalement des neurones, utilisant le GABA comme neurotransmetteur inhibiteur principal (Hoskins et coll. 1986 ; Distler 1990 ; Seki et Kanzaki 2008 ; Wilson et Laurent 2005), bien qu'il ait été récemment montré que chez *D. melanogaster* ces neurones peuvent libérer également de l'ACh (Shang et coll. 2007), voire aussi des amines biogènes et une multitude de neuropeptides (Schachtner et coll. 2005). L'inhibition présynaptique des ORNs par les LNs peut moduler la transmission du message olfactif vers les PNs et ainsi limiter à forte doses la saturation des neurones postsynaptiques permettant la conservation de la capacité de codage d'une gamme étendue de concentrations d'odeurs (Olsen et Wilson 2008 ; Root et coll. 2008). Les LNs portent des récepteurs à l'ACh et reçoivent principalement de l'input synaptique des ORNs, mais également des PNs (Distler et Boeckh 1997a, b ; Sun et coll. 1997).

- **Les neurones de projection (PN)**

L'arborisation dendritique des PNs est souvent restreinte à un seul glomérule (papillon, abeille...), mais lorsque l'insecte présente un grand nombre de glomérules de petite taille, les PNs peuvent se ramifier dans plusieurs glomérules, ce qui est le cas par exemple chez le criquet migrateur (Anton et Hansson 1996). Les axones des PNs quittent le AL en se regroupant par tractus, (tractus antenno-protocérébraux). Un tractus présent chez tous les insectes se projette dorsalement, d'abord dans les calices des corps pédonculés (mushroom bodies : MBs) pour se terminer dans le protocérébron latéral, alors que d'autres tractus ne sont présents que chez certaines familles d'insectes et ne projettent que dans le protocérébron latéral ou après également dans les corps pédonculés (Galizia et Rössler 2010). La spécificité périphérique est retrouvée à ce niveau organisationnel également, puisque les PNs originaires du MGC se projettent dans des zones du protocérébron différentes de celles dans lesquelles s'établissent les terminaisons des PNs répondant aux odeurs de plantes (Anton et Homberg 1999). Les PNs sont majoritairement cholinergiques et donc excitateurs, bien que des PNs GABAergiques inhibiteurs aient été observés chez les abeilles (Schäfer et Bicker 1986). Le fait qu'un grand nombre d'ORNs convergent sur chaque glomérule et que relativement peu de PNs y sortent, entraîne une sensibilité supérieure de la plupart des PNs à celle des ORNs (Rospars et coll. 2014). Les PNs portent des récepteurs ACh et GABA et reçoivent principalement de l'input synaptique des ORNs et LNs (Distler et Boeckh 1997a, b ; Sun et coll. 1997).

- **Les neurones centrifuges**

Présents en petit nombre, les neurones centrifuges sont des neurones généralement neuromodulateurs. Ils ont leurs arborisations dendritiques dans des régions situées hors du AL et leurs axones dans le AL et d'autres régions du cerveau. Ils utilisent des amines biogènes ou des neuropeptides comme neurotransmetteurs. Leur implication dans la plasticité olfactive a été montrée par exemple dans l'apprentissage associatif chez l'abeille (Hammer et Menzel 1998).

### 3 Plasticité de l'olfaction

Les insectes ont développé des stratégies efficaces pour s'adapter à des changements continus de leur environnement. Le traitement de l'information chimique est très modulable et les facteurs internes (ex. hormonaux) et externes (ex. expérience) peuvent altérer le comportement en réponse à un même signal odorant. En effet, au cours de sa vie adulte, l'insecte passe par des phases pendant lesquelles l'intensité d'attraction pour un même stimulus varie. Selon les phases, une odeur de plante ou une phéromone peut être attractive ou non pour l'insecte. Différentes formes de plasticité ont été mises en évidence à différents niveaux du système olfactif, essentiellement chez les papillons de nuit, la drosophile et l'abeille, ainsi que chez les insectes hématophages.

La forme la plus étudiée de la plasticité olfactive est l'apprentissage associatif, où un stimulus olfactif est présenté conjointement avec une récompense positive (nourriture) ou une sanction (choc électrique). Chez l'abeille et la drosophile, les mécanismes neuronaux et moléculaires sous-jacents de la modification du comportement en réponse aux stimuli olfactifs concernés ont été étudiés en détail. Les corps pédonculés ont été identifiés comme substrat principal de cette forme de plasticité, même si des modifications dans le AL ont également été observées (Menzel et Mueller 1996 ; Busto et coll. 2010). Une autre forme de plasticité liée à l'expérience, mais sans renforcement, a également été observée chez la noctuelle égyptienne du coton, *Spodoptera littoralis*: une brève pré-exposition à la phéromone, ou un autre stimulus sensoriel, sensibilise les mâles à la phéromone sexuelle émise par les femelles conspécifiques (Anderson et coll. 2003 ; Minoli et coll. 2012). Ce changement comportemental est lié à une augmentation de la sensibilité des neurones du AL à la phéromone sexuelle (Anderson et coll. 2007 ; Anton et coll. 2011 ; Minoli et coll. 2012).

D'autres formes de plasticité olfactive ont été montrées en fonction de l'état physiologique des insectes. La plasticité peut être liée à l'âge de l'adulte, par exemple chez certains insectes comme le criquet migrateur, chez lequel la réponse des adultes à la phéromone

d'agrégation diminue avec l'âge. Cette modulation dépend du taux de l'hormone juvénile (JH) et la sensibilité des neurones du AL à la phéromone diminue en fonction du taux de JH (Ignell et coll. 2001). L'inverse a été décrit chez les papillons de nuit. Les mâles de la noctuelle *Agrotis ipsilon* répondent plus à la phéromone sexuelle avec l'âge et une augmentation parallèle du taux de JH (Gadenne et coll. 1993). Dans ce cas, une augmentation de la sensibilité des neurones du MGC du AL répondant à la phéromone sexuelle a été décrite (Anton et Gadenne 1999). Des variations dans la réponse du AL aux odeurs de plantes en fonction de l'âge sont également observées chez l'abeille. L'activation des glomérules par une odeur donnée change en fonction de l'âge chez les jeunes abeilles nourrices (Wang et coll. 2005). Des modifications de comportement en réponse au stimulus olfactif ont également été décrites après l'accouplement. Chez *A. ipsilon*, l'absence de réponse à la phéromone sexuelle chez les mâles accouplés est liée à une diminution de la sensibilité des neurones du MGC, et non pas à un changement au niveau périphérique (Gadenne et coll. 2001 ; Anton et coll. 2007). Chez les mâles de *S. littoralis*, une inhibition des réponses à la phéromone et aux odeurs de plantes hôtes après l'accouplement a été observée. Par contre, dans ce cas, c'est le système olfactif périphérique qui baisse en sensibilité (Kromann et coll. 2014). Les mécanismes responsables des changements de sensibilité antennaire ou de neurones du AL chez les insectes restent encore mal connus bien que de nombreuses hypothèses soient proposées, impliquant notamment des neuromodulateurs comme les amines biogènes, les hormones telles que la JH ou l'ecdysone, et les neuropeptides et leurs récepteurs (Jarriault et coll. 2009a ; Barrozo et coll. 2010a ; Carlsson et coll. 2010 ; Duportets et coll. 2012, 2013 ; Abrieux et coll. 2014).



## Chapitre III : *Agrotis ipsilon*, un insecte « plastique »

La noctuelle baignée aussi appelée ver gris du maïs, *A. ipsilon* (Hufnagel, 1766) est un lépidoptère de la famille des Noctuidae. C'est une espèce cosmopolite, présente dans la plupart des régions du monde. Impressionnant par sa capacité de vol, qui peut atteindre jusqu'à mille kilomètres en quatre jours suivant l'intensité du vent (Showers et coll. 1989), ce papillon migrateur est largement répandu en France. Deux vagues de migration ont été décrites, une première vague au printemps où les noctuelles volent du Sud vers le Nord. La génération produite dans le Nord quant à elle, va retourner vers le Sud à l'automne suivant (Causse et coll. 1989). L'étude de sa répartition géographique à l'échelle de l'Europe a montré une grande stabilité de son polymorphisme enzymatique révélant ainsi l'existence d'une seule population de cette espèce (Buès et coll. 1994). Les caractéristiques de sa migration en Europe et Afrique du Nord ont pu être analysées par le biais des spectres polliniques récoltés sur les têtes et antennes (Loublier et coll. 1994).

### 1 Plantes hôtes et dégâts

La noctuelle baignée est une espèce très polyphage capable de se développer sur une multitude d'espèces de plantes selon la région colonisée, se rencontrant dans tous types de milieux ouverts : jardins, prairies, terrains de golf ou champs de culture tels que maïs, sorgho, coton, tabac, blé,... (voir Showers 1997). Avant de pondre, la femelle recherche des zones présentant les meilleures caractéristiques en qualité et en abondance de ressource pour accueillir sa progéniture. La larve creuse un trou vertical près de la plante de la grosseur d'un crayon (Cayrol 1972). Comme son nom anglais « black cutworm » l'indique, la chenille est capable de « couper » les plantes sous la surface des sols, causant des pertes directes, cependant d'autres types de dégâts peuvent être observés sur les feuilles (voir Showers 1997). *A. ipsilon* est un ravageur important, quand il est présent, sur les jeunes pousses de maïs (Showers 1997).

### 2 Lutte contre *A. ipsilon*

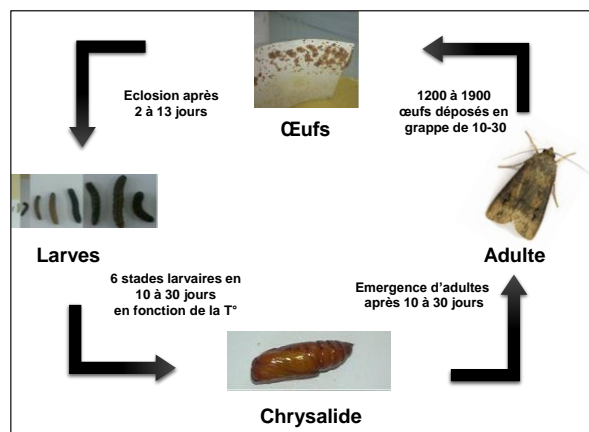
Les dégâts d'*A. ipsilon* sont directement liés au taux d'infestation larvaire dans les parcelles cultivées et sont difficiles à prévoir à cause de son statut de migrateur. Il est donc nécessaire de mettre en place des méthodes de veille et de lutte contre ce ravageur. La surveillance de la présence de cette espèce dans une zone donnée repose sur l'utilisation de

pièges à phéromones, essentiellement pendant les périodes de migration au printemps. Dès que les premiers individus sont observés, des applications d'insecticides sont préconisées pour prévenir les dégâts occasionnés par les premiers stades larvaires.

Deux méthodes de lutte sont décrites dans la littérature : l'utilisation de semences transformées et/ou le traitement chimique direct des graines. La première méthode consiste à utiliser des graines OGM exprimant un gène issu du *Bacillus thuringiensis* (Bt) et codant pour la toxine Cry1Fa2, qui présente des forts taux de toxicité contre *A. ipsilon*. Cependant cette méthode n'est pas suffisante en cas d'infestation importante par le ravageur. Des études effectuées au Canada ont permis de mettre en évidence une amélioration de cette efficacité en combinant l'utilisation de graines Bt avec l'utilisation d'un insecticide systémique, la clothianidine, de la famille des néonicotinoïdes (Kullik et coll. 2011). Dans son étude, Kullik et ses collègues indiquent que le traitement insecticide reste malgré ses effets contestés, le seul moyen actuel pour mettre fin à une invasion des larves d'*A. ipsilon*.

### 3 Biologie d'*A. ipsilon*

Les femelles d'*A. ipsilon* peuvent pondre entre 1200 et 1900 œufs, déposés en « grappes » de 10 à 30, les œufs présentant une forme sphérique aplatie aux pôles. Initialement de couleur blanc nacré après la ponte, les œufs deviennent plus foncés puis rosissent après quelques jours de développement (Cayrol 1972) (**Figure 11**).



**Figure 11** : Cycle de vie d'*A. ipsilon*.

Le développement de la chenille passe par six stades larvaires et dure 4 semaines à 25°C. Durant les derniers stades larvaires, le ver gris présente des tendances cannibales, les larves se mangeant entre elles. L'étape de chrysalide dure entre 12 et 20 jours. La différence des sexes peut être observée à ce stade, où les caractéristiques morphologiques de l'extrémité ventrale de l'abdomen des chrysalides permettent d'en déterminer le genre.



L'émergence des adultes a lieu essentiellement en début de phase obscure. Les papillons adultes ont une envergure moyenne de 4 à 5 cm, le mâle est généralement plus petit et plus clair que la femelle. Un dessin en forme de Y (Y se prononce « ipsilon » en allemand, d'où l'origine du nom) et une tache en forme de rein se trouvent sur l'aile et caractérisent l'espèce. L'espèce voisine, *Agrotis segetum*, appelée aussi ver gris du maïs, non migratrice, ne possède pas ce dessin en Y. Les ailes extérieures sont de couleur foncée, alors que les zones intérieures présentent une bande irrégulière de couleurs moins foncée. Le thorax a un aspect duveteux. La différence entre le mâle et la femelle peut se faire grâce à l'observation des antennes, qui sont filiformes chez la femelle, et pectinées chez le mâle.

## 4 Communication phéromonale et reproduction

Les adultes d'*A. ipsilon* présentent une activité nocturne. Comme pour la plupart des papillons de nuit, c'est la femelle qui produit la phéromone sexuelle, perçue par le mâle. La femelle sexuellement réceptive exprime un comportement d'appel par l'émission de sa phéromone sexuelle afin d'attirer le mâle à distance. L'émission de la phéromone par la femelle et la réception par le mâle ont lieu pendant la seconde moitié de la scotophase (Swier et coll. 1976). La phéromone est produite dans une glande phéromonale située à l'extrémité de l'abdomen. A l'émergence, la femelle est immature sexuellement et la production/libération de phéromone intervient quelques jours après, parallèlement avec le développement ovarien (Swier et coll. 1977 ; Gadenne 1993). La production de cette phéromone est contrôlée par un neuropeptide, le Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN), produit dans le ganglion sous-oesophagien (Raina et Klun 1984) et identifié chez *A. ipsilon* (Picimbon et coll. 1995 ; Duportets et coll. 1998a). La phéromone d'*A. ipsilon* est un mélange de cinq composés : (Z)-11-hexadecenyl acetate (Z11-16:OAc), (Z)-9-tetradecenyl acetate (Z9-14:OAc), (Z)-7-dodecenyl acetate (Z7-12:OAc), (Z)-8-dodecenyl acetate (Z8-12:OAc) and (Z)-5-decenyl acetate (Z5-10:OAc) (Hill et coll. 1979 ; Picimbon et coll. 1997 ; Gemeno et Haynes 1998). Les expériences de tunnel de vol ont montré qu'un ratio de 4 :1 :4 des composés Z7-12:OAc, Z9-14:OAc et Z11-16:OAc est nécessaire et suffisant pour induire une réponse comportementale chez le mâle (Causse et coll. 1988).

L'accouplement dure entre 1 h et 2 h (Vitecek et coll. 2013). Pendant l'accouplement, le mâle produit et transfère un spermatophore dans la femelle. Celle-ci commence de pondre dès le lendemain. Il est très rare de trouver des femelles avec plus d'un spermatophore, alors que le mâle peut s'accoupler plusieurs fois (Swier et coll. 1976).

Chez *A. ipsilon*, des ORNs spécifiques aux trois composés de la phéromone ont été décrits, avec une majorité des neurones sensibles au composé principal, Z7-12 :OAc (Gadenne et coll. 1997 ; Jarriault et coll. 2010). L'AL d'*A. ipsilon* est composé de 66 glomérules, dont quatre sont présumés appartenir au MGC (Greiner et coll. 2004). Le codage de l'information phéromonale dans le MGC a été étudié en détail (Jarriault et coll. 2009b, 2010 ; Rospars et coll. 2014).

## 5 Plasticité comportementale et neuronale

Chez *A. ipsilon*, comme chez un certain nombre de noctuelles (Shorey et coll. 1968 ; Turgeon et coll. 1983), le mâle n'est pas sexuellement mature à l'émergence : il a besoin de quelques jours avant de manifester un comportement de réponse à la phéromone sexuelle femelle (Gadenne et coll. 1993). Ainsi la réponse comportementale des mâles d'*A. ipsilon* à la phéromone sexuelle n'est pas une caractéristique apparaissant dès l'émergence, mais serait la conséquence de phénomènes de maturation du système olfactif. De plus, des études sur la migration d'*A. ipsilon* ont montré que les mâles capturés dans les pièges à phéromone pendant les vols de printemps étaient beaucoup plus nombreux que pendant les vols d'automne, suggérant que les premiers étaient en période de reproduction et donc sexuellement matures et que les derniers étaient en phase de diapause adulte induite par le raccourcissement de la photopériode et donc encore immatures (Showers 1997 ; Causse et coll. 1989).

Outre cette plasticité dépendante de l'âge, un changement du comportement sexuel après l'accouplement a été décrit chez *A. ipsilon* et des résultats récents montrent que même l'expérience influence l'attraction des mâles vers la phéromone sexuelle émise par les femelles.

### 5.1 Plasticité olfactive âge-dépendante

Chez *A. ipsilon*, la plasticité olfactive dépendant de l'âge a été étudiée en détail (Anton et coll. 2007). Des expériences en tunnel de vol ont montré que la réponse comportementale à la phéromone croît avec l'âge des papillons pour atteindre une réponse maximum 4 à 6 jours après l'émergence (Gadenne et coll. 1993) (**Figure 12**). Des expériences d'électrophysiologie ont montré que l'origine de la plasticité se situe au niveau du système nerveux central et non pas périphérique. Des électro-antennogrammes (EAG) ont montré que les antennes apparaissent fonctionnelles dès l'émergence du papillon (Gadenne et coll. 1993). Par contre des enregistrements intra-cellulaires de la réponse des neurones du AL montrent que leur sensibilité augmente en fonction de l'âge (Anton et

Gadenne 1999) (**Figure 12**). Des tests des composés individuels de phéromone ont montré que la plasticité de la réponse âge-dépendante des neurones centraux affecte essentiellement le Z7-12 :Ac, composé principal du mélange phéromonal (Gadenne et Anton 2000). Il est important de noter que cette plasticité olfactive est phéromone-dépendante, et n'a pas été observée en réponse aux odeurs de plante (Greiner et coll. 2002).

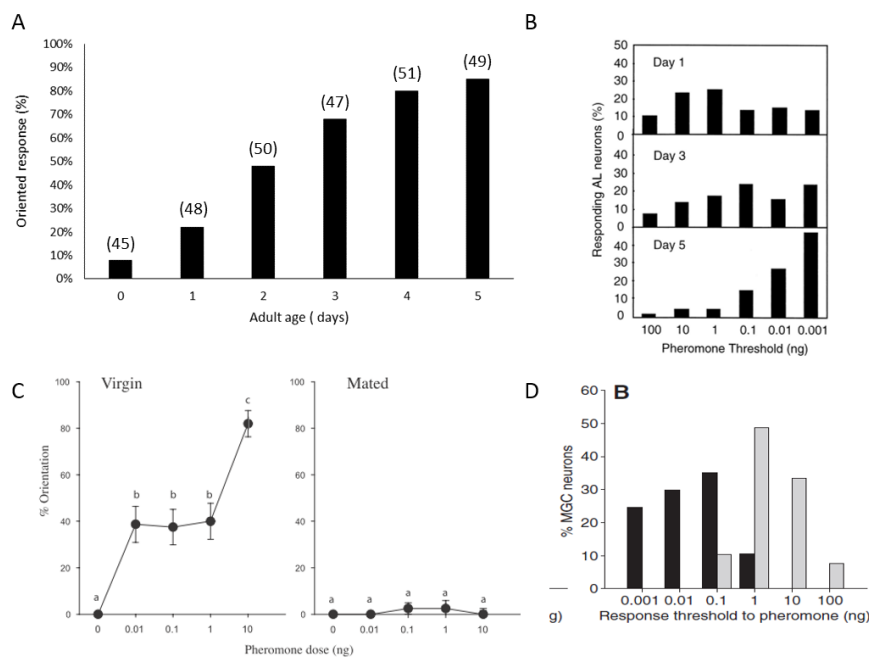
Les études s'intéressant aux mécanismes contrôlant cette plasticité mettent en évidence l'implication de facteurs de nature hormonale ou neuronale. La JH, synthétisée dans les corps allates, joue un rôle important dans le développement de l'insecte et dans les processus de maturation des adultes. En effet la JH est impliquée dans la plasticité olfactive âge-dépendante. Les taux de synthèse de cette hormone augmentent avec l'âge, parallèlement à la réponse à la phéromone (Duportets et coll. 1998b). De plus, la suppression des corps allates chez des mâles matures ou l'injection de JH chez des mâles immatures induit une forte diminution ou une augmentation de la réponse phéromonale (Gadenne et coll. 1993).

Les expériences d'enregistrements intracellulaires de la réponse des neurones du AL ont confirmé le lien entre la JH et la plasticité olfactive liée à l'âge : l'allatectomie sur des mâles matures induit une augmentation du seuil de réponse à la phéromone, et cette augmentation est annulée par l'injection de la JH (Anton et Gadenne 1999). Réciproquement, l'injection de JH chez des mâles immatures induit une diminution du seuil de sensibilité des neurones centraux (Anton et Gadenne 1999 ; Gadenne et Anton 2000). Pour mieux comprendre les voies de signalisation de la JH impliquée dans cette plasticité âge-dépendante, le rôle et les interactions possibles avec la JH du facteur de transcription Krüppel ont été étudiés (Duportets et coll. 2012). L'étude de l'expression de ce facteur, présent essentiellement dans les AL, et l'utilisation d'un inhibiteur de JH, la fluvastatine, ont révélé que ce gène, up-régulé par la JH, pourrait contrôler l'action de celle-ci dans cette plasticité olfactive (Duportets et coll. 2012).

L'implication d'une autre hormone de développement, l'ecdysone (hormone de mue), dans la plasticité neuronale a été mise en évidence. Des travaux récents montrent que l'injection du dérivé le plus actif de l'ecdysone, la 20-Hydroxyecdysone (20 E) induit une réponse comportementale précoce à la phéromone chez les mâles immatures, alors que l'injection d'un antagoniste des récepteurs à la 20 E (cucurbitacine) est responsable d'une baisse de réponse chez les mâles matures (Duportets et coll. 2013). L'action de la 20 E sur la plasticité du comportement se fait probablement via l'action de deux types de récepteurs différents, d'un côté les récepteurs nucléaires Ultra Spiracle (USP) et Ecdysone (EcR) (Duportets et coll. 2013) et de l'autre côté un récepteur membranaire à double affinité dopamine-ecdysone

(DopEcR) (Abrieux et coll. 2013, 2014). L'extinction du gène DopEcR par la technique de RNA interférent induit une baisse de la réponse comportementale et neuronale à la phéromone (Abrieux et coll. 2013, 2014). De plus, des expériences d'injections de ligands (ecdysone ou dopamine) et d'inhibiteurs de leurs récepteurs membranaires et nucléaires (RNAi DopEcR et/ou cucurbitacine) montrent que les deux récepteurs ainsi que les deux acteurs sont nécessaires pour une réponse optimum à la phéromone chez *A. ipsilon* (Abrieux et coll. 2014).

Par ailleurs, d'autres études ont montré l'implication d'une autre amine biogène dans la modulation de la plasticité neuronale âge-dépendante. En particulier, l'injection d'octopamine (OA) augmente la réponse comportementale et neuronale des mâles matures alors que l'injection de miansérine, un antagoniste des récepteurs de l'OA, diminue leur réponse (Jarriault et coll. 2009a). L'action de l'OA se fait en association avec la JH (Jarriault et coll. 2009a).



**Figure 12** : Plasticité chez *A. ipsilon* lié à l'âge et l'accouplement. Pourcentage de réponse comportementale (A) et du seuil de réponse des neurones du AL (B) à la phéromone en fonction de l'âge chez *A. ipsilon*. Pourcentages de réponses comportementales (C) et seuils de réponse des neurones du AL à la phéromone (D) entre mâles vierges et accouplés chez *A. ipsilon*, (d'après Gadenne et coll. 1993 ; Anton et Gadenne 1999 ; Barrozo et coll. 2010b).

## 5.2 Plasticité olfactive dépendant de l'accouplement

La plasticité âge-dépendante précédemment décrite permet la mise en place du système olfactif dans un processus de maturation. Ce mécanisme permet ainsi à l'insecte « d'attendre » avant de s'accoupler (et donc d'être réceptif à la phéromone), le temps que le

développement de ses organes reproducteurs soit terminé. En effet, il a été montré que, chez *A. ipsilon*, la synthèse des protéines dans les glandes sexuelles accessoires (GSA), nécessaires à la production du spermatophore (organe contenant le sperme et fabriqué pendant l'accouplement), augmente avec l'âge, parallèlement avec l'augmentation de la réponse à la phéromone et à la production de JH (Duportets et coll. 1998b).

Une deuxième forme de plasticité olfactive a été mise en évidence chez *A. ipsilon* : les mâles ne sont capables de s'accoupler qu'une seule fois pendant une même scotophase et ils sont incapables de répondre à la phéromone sexuelle juste après la copulation, cette inhibition disparaissant pendant la nuit suivante (Gadenne et coll. 2001) (**Figure 12**). Ce switch-off olfactif rapide et transitoire évite au mâle un nouvel accouplement qui serait stérile, car, une fois la copulation terminée, les GSA sont vides de protéines (Duportets et coll. 1998b). L'inhibition post-copulatoire intervient quelques minutes après le début de la copulation et persiste tout le temps de la scotophase (Vitecek et coll. 2013). Des expériences d'électrophysiologie ont montré que cette plasticité olfactive avait sa source au sein du AL et non au niveau antennaire, les neurones du AL devenant moins sensibles à la phéromone (Gadenne et coll. 2001 ; Barrozo et coll. 2010b). Comme pour la plasticité âge-dépendante, les réponses comportementales et neuronales (au niveau de l'antenne et du AL) aux odeurs de plante ne sont pas affectées par l'accouplement (Barrozo et coll. 2010b ; Barrozo et coll. 2011). Par contre si l'addition d'odeur de plante augmente la réponse à la phéromone chez les mâles vierges, l'addition de phéromone au-dessus d'un certain seuil inhibe la réponse aux odeurs de plante chez les accouplés (Barrozo et coll. 2010b).

Le rôle possible des amines biogènes dans cette plasticité dépendant de l'accouplement a été étudié. Ni la sérotonine ni l'OA ne semblent intervenir dans ce switch-off : aucune des deux amines biogènes ne peut rétablir la réponse comportementale des mâles accouplés et seule l'OA semble avoir un effet sur certaines caractéristiques de la réponse des neurones centraux des mâles accouplés (Barrozo et coll. 2010a). En ce qui concerne les hormones, ni la JH (Duportets et coll. 1998b), ni la 20 E, produite essentiellement dans les GSA (Vitecek et coll. 2013), ne semblent intervenir dans ce switch-off olfactif post-copulatoire.

### 5.3 Plasticité dépendant de l'expérience

Chez *A. ipsilon*, il semble aussi exister une plasticité dépendant de l'expérience, similaire aux effets observés chez une autre noctuelle, *S. littoralis* (Anderson et coll. 2003 , 2007). Des mâles d'*A. ipsilon* matures et même immatures pré-exposés à la phéromone pendant 3 min répondent mieux et plus vite à la phéromone 24h plus tard en tunnel de vol que ceux qui n'ont pas été pré-exposés (Abrieux 2014).



## Objectifs de la thèse

Les insectes vivent dans un monde d'odeurs qui guident leurs comportements. Chez les lépidoptères, comme d'autres insectes, l'information sensorielle et particulièrement l'olfaction joue un rôle essentiel dans la recherche du site de ponte et de nourriture mais également dans la reproduction. Les lépidoptères nocturnes, qui comptent de nombreuses espèces de ravageurs de culture, utilisent la communication chimique pour leur reproduction : le mâle est attiré à longue distance par les phéromones émises par les femelles. Ainsi, le système olfactif des papillons de nuit est capable d'identifier et de discriminer la phéromone sexuelle parmi de nombreuses odeurs présentes dans l'environnement. Outre les odeurs de plante et de phéromones, les insectes peuvent être en présence de perturbateurs influençant la détection des odeurs, dont les insecticides.

Dans un contexte économique où la préservation des cultures contre les ravageurs représente un enjeu capital pour répondre à la demande mondiale en nourriture, l'utilisation des insecticides se révèle être le moyen le plus sûr pour assurer cette protection. Les insecticides néonicotinoïdes, incluant la clothianidine, représentent la dernière génération d'insecticides développée durant ces trois dernières décennies. Malgré la mise en place d'une stratégie d'application contrôlée de cette famille d'insecticides, les néonicotinoïdes restent néanmoins utilisés de manière intensive dans la lutte contre les ravageurs de culture. Caractérisées par une durée de demi-vie très longue, ces molécules persistent dans l'environnement conduisant à leur accumulation à de faibles doses. La clothianidine, par exemple, représente la durée de demi-vie la plus longue dans la famille des néonicotinoïdes, avec une rémanence moyenne de 565 jours (Goulson et coll. 2013). Dans cet environnement contaminé, les insectes peuvent répondre de manière adaptative à une exposition continue aux doses sublétales. C'est pourquoi il est important de comprendre les mécanismes d'action des faibles doses d'insecticides au niveau cellulaire et moléculaire, mais également d'étudier leurs effets sur le comportement des insectes.

Différentes études se sont intéressées aux effets des doses sublétales des insecticides dont les néonicotinoïdes sur les insectes et les études prédominantes ont mis en évidence l'existence d'un effet négatif sur les insectes bénéfiques (Desneux et coll. 2007). Les résultats montrent que les faibles doses d'insecticides agissent en tant que perturbatrices du comportement et des traits de vie (fertilité, fécondité, durée de vie,...). Des études récentes ont également montré un effet des insecticides néonicotinoïdes sur des abeilles en perturbant le comportement de retour à la ruche, entraînant une forte mortalité et un risque de déclin des colonies (Henry et coll. 2012 ; Desneux et coll. 2007). De la même manière, il

a été montré qu'à faibles doses, les insecticides agissent négativement sur différents aspects du comportement des abeilles (El Hassani et coll. 2008 ; Guez et coll. 2003 ; Aliouane et coll. 2009). En plus de leurs effets sur les insectes bénéfiques, l'impact des faibles doses d'insecticides sur le comportement sexuel des ravageurs de culture a fait l'objet de quelques études. Les résultats montrent dans la majorité des cas une altération négative de la réponse à la phéromone chez différents lépidoptères (review dans Haynes 1988). Seul le chlordimeform à très faible dose induit une augmentation de la sensibilité à la phéromone sexuelle chez certains lépidoptères (Linn et Roelofs 1984, 1985). Cependant il n'existe dans la littérature aucune donnée sur les effets des faibles doses de néonicotinoïdes sur la réponse phéromonale ou le système olfactif des insectes ravageurs.

En plus des effets négatifs résumés plus haut, les faibles doses d'insecticides peuvent induire des effets inattendus sur la physiologie et la reproduction des insectes. Ainsi il a été montré que l'exposition à des doses faibles d'insecticides pouvait induire une augmentation de la progéniture chez différentes espèces (Cutler et coll. 2009 ; Cohen 2006 ; Guedes et coll. 2010). Ce phénomène est décrit dans la littérature sous le nom d'hormèse, et caractérisé par un double effet : un effet d'inhibition à forte dose et un effet de stimulation à faible dose. Les insectes peuvent ainsi utiliser un mécanisme adaptatif, leur permettant de surpasser les effets négatifs des insecticides.

Dans ce projet de thèse, nous avons utilisé différentes démarches expérimentales dans l'objectif de comprendre la perception des phéromones dans un environnement contaminé par des insecticides. Le modèle d'étude, *A. ipsilon*, est une noctuelle migratrice dont les larves sont responsables d'importants dégâts agronomiques, et qui montre différentes formes de plasticité olfactive liées à l'expérience, l'âge ou l'état d'accouplement. Le système olfactif est basé sur une transmission synaptique cholinergique impliquant les récepteurs nicotiques. Cette caractéristique le rend sensible à la présence d'insecticides néonicotinoïdes ciblant ces récepteurs. Nous avons testé l'effet de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde, la clothianidine, sur le comportement sexuel et le système olfactif, en fonction de l'état physiologique et l'expérience des mâles d'*A. ipsilon*. Une démarche globale allant du comportement à la physiologie et évaluant l'impact moléculaire a été utilisée durant cette thèse pour répondre à la problématique de recherche.



# Approches méthodologiques

Dans cette thèse, nous avons utilisé des approches méthodologiques complémentaires permettant d'avoir une vision intégrée des effets de doses sublétales de la clothianidine sur le système olfactif phéromonal d'*A. ipsilon*. Nous avons également utilisé une approche moléculaire afin de caractériser les sous-unités des nAChRs composant la cible de la clothianidine et d'étudier les effets de doses sublétales sur l'expression des gènes codant pour ces sous-unités.

## 1 Etude toxicologique

La première étape de cette étude a été de déterminer la toxicité de la clothianidine sur les mâles d'*A. ipsilon*. La mortalité a été observée 24 et 48h après intoxication. En se basant sur les résultats obtenus en utilisant d'autres espèces dont l'abeille (Williamson et coll. 2013), les pucerons (Cutler et coll. 2009) et la pyrale du maïs (Wei et Du 2004), nous avons déterminé un certain nombre de faibles doses (<DL30) pour l'ensemble des tests suivants.

La préparation des différentes solutions de clothianidine s'est faite en plusieurs étapes. Pour cela, une première solution de clothianidine concentrée à 50 µg/µl est préparée dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) pur. Une série de dilutions est par la suite effectuée dans une solution de 20% de sucrose. Différentes doses de clothianidine ont été testées (0,1 ng – 2,5 µg/µl), en parallèle des solutions contenant la dose équivalente en DMSO.

L'intoxication est effectuée en fin de période de photophase, sur des mâles âgés de 4 jours, introduits dans un tube en plastique dont le bout est coupé afin que seule la tête dépasse. Le proboscis est extrait avec des pinces et étendu vers une goutte de 10 µl de la solution de clothianidine ou de son contrôle DMSO équivalent. Une fois la goutte ingérée, les mâles sont placés dans des boîtes individuelles dans une chambre climatisée. Le pourcentage de mâles morts est déterminé après 24 et 48 h. Pour chaque dose de clothianidine, 50 papillons ont été intoxiqués.

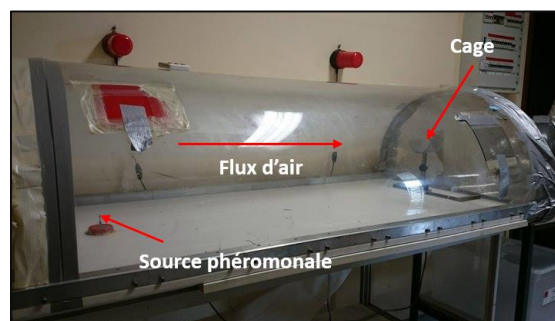
## 2 Approche comportementale

Les tests de comportement ont été effectués en utilisant un tunnel de vol semi-cylindrique de 2 m de long, 0,63 m de hauteur et de largeur (**Figure 13**). Un débit d'air de 0,3 m/s traverse le tunnel. La température lors des tests est maintenue à 22± 1°C. Les mâles sont disposés dans des cages individuelles en début de scotophase, et laissés dans la pièce

expérimentale afin de les acclimater à leur nouvel environnement. Les expériences de comportement sont effectuées en aveugle : l'expérimentateur ne connaît pas l'identité/traitement des papillons testés.

Les mâles sont testés sous lumière rouge (non-perçue par les papillons de nuit) pendant la seconde partie de la scotophase, de 14 h à 17 h correspondant à la période d'activité sexuelle (émission de la phéromone chez les femelles, perception de la phéromone par les mâles et accouplement).

Une phéromone synthétique contenant les 3 composés majeurs de la phéromone émise par les femelles (Z7-12:OAc, Z9-14:OAc et Z11-16:OAc) avec un ratio 4 :1 :4, est utilisée dans les tests. Elle est appliquée sur un papier filtre (10 µl), et déposée à une des extrémités du tunnel. Les cages contenant les mâles seront placées à l'autre extrémité du tunnel, en opposé à la source d'air et de phéromone. Le comportement de chaque mâle est observé pendant 3 min.



**Figure 13** Dispositif du tunnel de vol.

Dans le tunnel de vol, les mâles peuvent montrer les comportements suivants :

Aucune réponse : se traduisant par l'absence de mouvement, le mâle reste dans sa cage. Il peut également marcher ou effectuer des vols aléatoires.

Réponse : correspondant à un vol partiel, traversant les deux tiers de la distance, à un vol orienté complet, parcourant les 120 cm de distance entre le stimulus et la cage ou l'atterrissage, en se posant sur la source de phéromone.

La réponse du mâle par un vol orienté est très caractéristique, correspondant à un vol vers la source de phéromone avec un mouvement horizontal en zigzag. L'absence de mouvement peut traduire une incapacité à voler, c'est pourquoi un test supplémentaire du vol est effectué à l'extérieur du tunnel, les individus incapables de voler étant éliminés de l'expérience.

Différentes expérimentations ont été réalisées pour répondre aux questions sur les effets du traitement d'abord avec différentes doses de la clothianidine et ensuite avec des doses ayant un effet sur le comportement en fonction de l'âge des mâles, ainsi qu'en fonction d'une pré-

exposition avec la phéromone. Les effets de la pré-exposition seule étaient préalablement testés sur des mâles de différents âges et après deux délais différents.

Afin de tester l'effet des doses sublétales de la clothianidine sur le vol orienté des mâles âgés de 5 jours, trois groupes ont été testés :

Le premier groupe correspondant aux mâles intoxiqués à la clothianidine à l'âge de 4 jours avec différentes doses (0,1 à 25 ng/ papillon), un groupe contrôle traité avec les doses de DMSO équivalentes à celles présentes dans les solutions de clothianidine et un dernier groupe de mâles n'ayant eu aucun traitement. Dans un premier temps, les tests de tunnel de vol ont été effectués en exposant les différents groupes de mâles à une dose de phéromone de 20 ng, équivalent à l'émission de phéromone de 20 femelles.

Une deuxième partie des expérimentations a été effectuée en intoxiquant les mâles avec la dose correspondant à la DL20 (10 ng) ou une dose inférieure à la DL0 (0,25 ng) de clothianidine. Ces mâles ont été exposés à différentes doses de phéromone (1 ou 0,01 ng) ou à une source d'odeur de plante (tilleul) et les résultats ont été comparés à deux groupes de contrôles comme dans la première série d'expérimentation.

Dans une autre expérimentation, les effets de 10 ng et 0,25 ng de clothianidine ont été testés sur des mâles de 2 jours, intoxiqués à jour 1. Comme les réponses sont plus faibles chez les jeunes mâles, une dose de 10 ng de phéromone a été utilisée pour ce test.

Pour étudier l'effet de la pré-exposition à la phéromone sur des mâles de différents âges, les réponses à la phéromone ont été testées entre une et deux heures après la pré-exposition le même jour ou 24 h après. Les mâles ont été pré-exposés dans le tunnel de vol sans ouvrir la cage pendant 3 min à 10 ng de la phéromone. La réponse à la phéromone est testée avec une dose de 1 ng. Pour étudier l'effet de la pré-exposition à court terme, les mâles ont été pré-exposés à l'âge d'un ou cinq jours et testés le même jour. Pour les effets à plus long terme, les mâles ont été pré-exposés aux jours 1, 4 ou 5 et testés le jour d'après. Des mâles contrôles de l'âge correspondant ont été testés en parallèle avec chaque groupe pré-exposé.

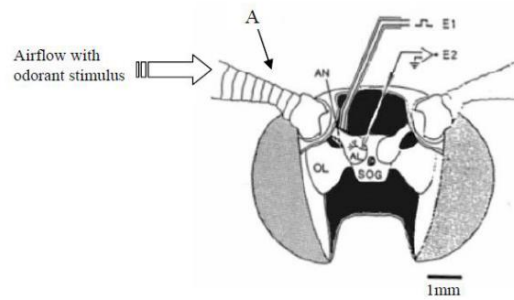
Les interactions entre les effets de la pré-exposition et le traitement à la DL20 de clothianidine ont par la suite été évaluées. Les mâles ont d'abord été pré-exposés à jour 4 avec la phéromone, puis le traitement avec 10 ng de clothianidine a été effectué sous lumière rouge dans les deux heures qui suivent la pré-exposition. Les tests comportementaux ont été faits 24 h plus tard dans le tunnel de vol avec 1 ng de phéromone.

### 3 Approche électrophysiologique

Dans le but d'évaluer les effets des faibles doses de clothianidine révélés par les tests comportementaux sur le système olfactif, différentes techniques ont été utilisées en fonction des questions posées. Pour étudier cet effet sur le système olfactif périphérique, nous avons utilisé la technique de « single sensillum recording ». Cette technique permet un enregistrement électrophysiologique extracellulaire sur une sensille unique, des impulsions nerveuses émises par les neurones récepteurs individuels en réponse à un stimulus olfactif. Des électrodes en tungstène ont été utilisées pour les enregistrements. Les sensilles trichoïdes longues sur les branches des antennes, portant les ORNs spécifiques à la phéromone ont été enregistrées. Les fréquences de potentiels d'action émises après stimulation avec différentes doses de la phéromone permettent de déterminer des courbes dose-réponse.

D'autre part, l'utilisation de la technique d'imagerie calcique sur cerveau intact par application du colorant dans le bain, permet d'observer les variations de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans le cerveau. L'émission fluorescente du colorant sensible aux changements de concentration calcique à la surface du AL est enregistrée par une caméra à haute résolution temporelle. Le signal observé est dominé par les réponses des ORNs en raison de leur grand nombre par rapport aux autres types neuronaux et seules les réponses calciques dans le MGC ont été analysées. La différence d'émission de fluorescence entre le cerveau stimulé et non-stimulé enregistrée pour des stimulations avec différentes doses de la phéromone permet d'établir des courbes dose-réponse.

Par ailleurs, nous avons utilisé la technique d'électrophysiologie intracellulaire afin d'enregistrer les réponses des neurones individuels du MGC dans le AL. Cette technique permet de mesurer le courant à travers la membrane cellulaire, en utilisant une électrode insérée dans le neurone et une électrode de référence dans le milieu extracellulaire. Ainsi on peut enregistrer les potentiels d'action émis par un neurone lorsque l'antenne est stimulée avec une odeur. La mesure de la fréquence des potentiels d'action en réponse à différentes doses d'un stimulus donné permet d'obtenir les informations sur les seuils de réponse du neurone à ce stimulus (**Figure 14**).



**Figure 14** Dispositif d'enregistrement en électrophysiologie intracellulaire (Christensen et Hildebrand 1987)

Pour l'imagerie calcique et les enregistrements intracellulaires, les antennes des mâles sont stimulées avec le même mélange de phéromone synthétique utilisé pour les expérimentations de comportement (Z7-12:OAc, Z9-14:OAc and Z11-16:OAc à un ratio de 4:1:4), dilué dans de l'hexane. Pour les enregistrements des ORNs seul le composé principal de la phéromone, le Z7-12:OAc, a été utilisé. Le contrôle correspond à une stimulation à l'hexane seul. Une série de dilutions décadiques est utilisée, de 0,01 à 100 ng/ $\mu$ l pour les enregistrements périphériques, de 0,01 à 10 ng/ $\mu$ l pour l'imagerie calcique, et de 0,001 pg/ $\mu$ l à 10 ng/ $\mu$ l pour les enregistrements intracellulaires. 10  $\mu$ l d'une solution sont appliquées sur un papier filtre dans une pipette Pasteur. Les pipettes sont préparées chaque jour d'expérimentation et utilisées après un minimum de 30 min permettant l'évaporation du solvant.

Un flux d'air constant (70L/h) est envoyé à l'antenne, et, au moment de la stimulation, un pulse de 200 ms (1s pour l'imagerie calcique) est envoyé à travers la pipette contenant le papier filtre avec la phéromone, introduit dans le flux d'air constant. Les stimuli sont appliqués en concentrations croissantes.

Les intoxications des mâles se font comme pour les expérimentations de comportement, 24 h avant les enregistrements. Deux doses de clothianidine sont utilisées, la dose correspondante à la DL20 (10 ng) ainsi que la dose 0,25 ng. Les réponses pour les insectes traités avec la clothianidine sont comparées avec les réponses pour les insectes traités avec la dose de DMSO correspondante. Pour les enregistrements des ORNs et l'imagerie calcique, des courbes dose-réponses et pour les enregistrements intracellulaires des courbes de seuils de réponses sont comparées statistiquement.

## 4 Approches moléculaires

L'objectif de cette troisième approche, est, dans un premier temps, d'identifier les séquences des gènes codant pour les sous-unités des nAChRs par PCR et RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) puis dans un deuxième temps, de tester l'effet des faibles doses de clothianidine sur les niveaux d'expression de ces différentes sous-unités dans le cerveau puis dans les ALs des mâles d'*A. ipsilon* par PCR quantitative. Bien que le génome d'*A. ipsilon* ne soit pas séquencé, nous disposons néanmoins d'une banque d'ADN complémentaire établie par E. Jacquin-Joly (UMR IEES Versailles-Paris). Par analyse bioinformatique via le programme BLAST (Altschul et Lipman 1990) qui confronte les séquences obtenues avec celles de banques de données type Genbank® (Benson 2013), nous avons identifié des séquences potentielles de sous-unités de nAChRs qui comprenaient tout ou une partie de la séquence codante entière. Ces informations nous ont permis de concevoir des oligonucléotides spécifiques de chaque sous-unité identifiée, qui sont nécessaires 1) à l'obtention des séquences de sous-unités manquantes et/ou des parties initiales ou terminales des séquences codantes de ces sous-unités et 2) à l'amplification spécifique de chaque sous-unité en PCR quantitative.

La recherche de séquences codantes de sous-unités ainsi que l'analyse du niveau d'expression de ces différentes sous-unités ont nécessité l'extraction des ARN totaux issus de cerveaux et/ou de ALs. Ces tissus ont été collectés chez des mâles adultes, cinq jours après l'émergence, pendant la deuxième moitié de la scotophase. Les ARN totaux ont été extraits par la technique de Chomczynski et Sacchi (2006) puis soumis à la synthèse des ADNc (reverse transcription :RT) qui seront utilisés comme matrice quelle que soit l'approche envisagée.

L'amplification des séquences codantes entières a été réalisée en deux étapes. La première consistait à vérifier par PCR les séquences codantes putatives obtenues via le programme BLAST, à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de chaque sous-unité d'*A. ipsilon*. En effet, il s'est avéré que certaines parties de séquences avaient été inversées, ce qui aurait pu être préjudiciable pour la conception d'oligonucléotides spécifiques. A l'issue de cette étape, seules les séquences de deux sous-unités n'avaient pas été mises en évidence à partir de la banque d'ADNc, parmi les huit sous-unités  $\alpha$  et l'unique sous-unité  $\beta$  identifiées chez les différentes espèces de lépidoptères (*Heliothis virescens*, *B. mori*, *Manduca sexta*, *Plutella xylostella*, ...). Etant donné qu'une des deux sous-unités était systématiquement identifiée chez des lépidoptères, nous avons utilisé des oligonucléotides conçus à partir de la séquence nucléotidique de cette sous-unité qui provenait de l'espèce de lépidoptère la plus proche phylogénétiquement d'*A. ipsilon*.

La dernière étape consistait à obtenir les parties de séquences codantes absentes, soit par RACE-PCR (une amorce universelle se fixant sur la partie initiale ou finale du transcrit + une amorce spécifique du gène d'intérêt provenant de la séquence d'*A. ipsilon*), soit par l'utilisation de couples d'amorces hybrides (une amorce spécifique du gène d'intérêt sur la séquence d'*A. ipsilon* + une amorce conçue à partir de la partie de séquence présente chez une autre noctuelle et absente chez *A. ipsilon*).

Ainsi, les séquences nucléotidiques de 7 sous-unités  $\alpha$  et de la sous-unité  $\beta$  ont été amplifiées par PCR, vérifiées par séquençage puis par homologie de séquence (programme BLAST). En effet, les produits de PCR présentant la taille attendue étaient purifiés et clonés dans des vecteurs plasmidiques afin de vérifier leur nature et donc la spécificité des amorces utilisées.

Dans un deuxième temps, les niveaux d'expression de ces sous-unités ont été évalués dans le cerveau ainsi que dans les ALs, après intoxication avec les faibles doses de clothianidine. Les mâles de 4 jours ont été intoxiqués selon la procédure décrite précédemment, avec une dose de 10 ng de clothianidine, ou la dose de DMSO correspondante ( $2 \times 10^{-2}\%$ ). Le prélèvement des tissus était effectué 24 h après intoxication pour les mâles traités, et 5 jours après l'émergence pour les contrôles sans traitement. Les ARN totaux des tissus de cerveaux et d'ALs étaient ensuite extraits et utilisés pour la synthèse d'ADNc selon le protocole cité précédemment.

La quantification des niveaux d'expression des sous-unités est étudiée par PCR quantitative (qPCR). Cette technique utilise des marqueurs fluorescents tels que le SYBR®Green pour mesurer la quantité d'ADNc d'un gène spécifique présent dans l'échantillon. Cet agent intercalant se lie à l'ADN double brin lors de l'amplification par PCR et émet un signal fluorescent qui est proportionnel à la quantité d'amplicons produits. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque cycle d'élongation permet donc le suivi, cycle par cycle, de la réaction de PCR. Ainsi, le nombre de cycles nécessaire pour atteindre une quantité de fluorescence fixe et nommé Ct (Cycle Threshold), sera fonction de la quantité de transcrits d'un gène d'intérêt au sein de la matrice d'ADNc. La qualité des résultats obtenus avec ce système, très sensible, est conditionnée par le choix des amorces qui doit garantir la spécificité du gène recherché et provoquer le doublement de la quantité d'ADNc à chaque cycle de PCR (efficacité). La spécificité des amorces vis-à-vis du gène d'intérêt est vérifiée lors de l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR qui permet de déterminer la température de fusion ( $T_m$  : melting temperature) des produits amplifiés. Cette précaution permet notamment d'écartier les couples d'amorces qui entraîneraient la production de plusieurs amplicons de taille variable. En parallèle, les amplicons obtenus par PCR pour

chaque sous-unité ont été clonés et séquencés afin de vérifier leur nature par analyse bioinformatique via le programme BLAST. L'efficacité de chaque couple d'amorces correspond quant à elle à la pente d'une droite de régression établie à partir d'une dilution en cascade d'une matrice de qPCR et doit être comprise entre 3,32 (86%) et 3,7 (100%). La matrice utilisée est un mélange contenant des volumes équivalents des ADNc obtenus à partir des différents lots (intoxiqués clothianidine, intoxiqués DMSO, non intoxiqués...), afin d'éviter les variations liées à l'expression des gènes dans une condition donnée, ou les biais liés à la transcription inverse (RT). Ainsi, les informations de séquences obtenues à partir des amplifications, décrites dans la première partie, ont permis de concevoir des oligonucléotides ciblant spécifiquement chaque sous-unité de nAChRs d'*A. ipsilon*. Ces amorces ont été sélectionnées afin d'amplifier des séquences de petite taille (90-200 pb), garantissant la robustesse de la PCR.

Dans cette étude nous avons utilisé la qPCR relative, qui consiste à comparer les valeurs de Ct du gène d'intérêt avec celles d'un gène de référence suite à leur coamplification. Cette technique permet d'exprimer la quantité de transcrits du gène cible par rapport à celle d'un gène de référence qui ont été obtenus à partir du même échantillon biologique. L'amplification du gène de référence dans les mêmes conditions que celle du gène d'intérêt doit permettre de compenser d'éventuels biais provenant des variations dans la quantité et qualité d'un échantillon à un autre, du rendement d'extraction ou encore des variations d'efficacité de la transcription inverse de chaque échantillon. Les gènes de référence doivent satisfaire aux critères suivants : 1) être un gène endogène existant à l'état d'une seule copie et d'expression constante, 2) être amplifié par PCR avec un couple d'amorces dont l'efficacité est similaire à celle du gène cible et 3) présenter un niveau d'expression équivalent dans les différentes conditions expérimentales. Ainsi, les gènes de référence ont été sélectionnés en fonction de travaux précédents impliquant les mêmes tissus (Duportets et coll. 2013) et la stabilité de l'expression de ces gènes dans les conditions d'intoxication a été validée. Les ADNc de différents tissus issus de différentes conditions ont donc été utilisés en qPCR avec les amorces spécifiques de chaque sous-unité.



# **Partie 2**

# **Résultats**



## Avant-propos

Les résultats obtenus durant ce travail sont présentés sous forme d'articles publiés dans des revues à comité de lecture et de résultats non publiés. Ils sont structurés en quatre parties.

Dans un premier temps nous avons évalué la toxicité de la clothianidine sur les mâles adultes d'*A. ipsilon* en constituant une courbe de mortalité permettant de calculer la DL50, mais également de déterminer un intervalle représentant les faibles doses de cet insecticide. En utilisant une approche comportementale, nous avons évalué l'effet des faibles doses déterminées précédemment sur la réponse des insectes à la phéromone sexuelle dans un tunnel de vol.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet des faibles doses de clothianidine tout au long du système olfactif en collaboration avec l'Unité iEES-Paris. Les données sur les effets de l'insecticide sur le système périphérique en utilisant la technique d'enregistrement sensillaire ont été fournies par Elodie Demondion et Philippe Lucas à l'INRA de Versailles. L'effet de la clothianidine sur l'intégration globale de l'information olfactive au niveau du AL a été évalué en utilisant la technique d'imagerie calcique *in vivo*, et ces expériences ont été effectuées par Nina Deisig et Julie Le Corre à Versailles. Steeve Thany et Delphine Calas ont étudié l'effet d'un traitement à la clothianidine sur des courants des neurones du lobe antennaire en culture primaire, évoqués par l'acétylcholine et la clothianidine par la technique de patch-clamp. Je me suis concentrée sur l'approche électrophysiologique au niveau du AL en réalisant les enregistrements intracellulaires.

Dans la troisième partie, nous avons évalué les effets de faibles doses de clothianidine, qui avaient montré un effet dans les expériences décrites dans les autres manuscrits, sur le comportement des mâles d'*A. ipsilon* en fonction de leur âge et de leur expérience avec la phéromone. Nous avons comparé les réponses à la phéromone sexuelle dans un tunnel de vol chez des mâles immatures et matures après un traitement avec 10 ng de clothianidine et nous avons étudié l'effet d'une pré-exposition à la phéromone sur le comportement seul et en combinaison avec un traitement à la clothianidine.

Dans le quatrième volet, nous nous sommes intéressés à la cible de la clothianidine, à savoir les nAChRs. L'objectif de cette partie était de caractériser les sous-unités de nAChRs présentes chez *A. ipsilon* et d'étudier leur profil d'expression dans le AL avant et après intoxication à la clothianidine.



**Article n°1** Rabhi KK, Esancy K, Voisin A, Crespin L, Le Corre J, Tricoire-Leignel H, Anton S, Gadenne C (2014) Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. PLoS ONE 9(12): e114411. doi:10.1371/journal.pone.0114411

## Résumé de la publication

Dans ce premier article publié dans PlosOne, nous avons évalué la toxicité aiguë orale de la clothianidine et les effets de faibles doses de ce néonicotinoïde sur le comportement de réponse à la phéromone sexuelle des mâles d'*A. ipsilon*.

La courbe de mortalité après 24h d'exposition à l'insecticide a permis d'obtenir une DL50 équivalente à 69 ng/papillon. Aucune mortalité n'a été observée après utilisation de doses inférieures ou égales à 2,5 ng/papillon, cette dose a donc été considérée comme la LD0.

Dans l'objectif d'évaluer les effets de ces doses sur le comportement et la réponse des mâles aux phéromones sexuelles, nous avons utilisé des doses inférieures à la DL30, les doses supérieures ou égales à celle-ci conduisant à une incapacité de vol chez les mâles survivants. Les expériences de tunnel de vol ont permis de distinguer deux doses présentant des effets inattendus. En effet, l'intoxication avec une très faible dose inférieure à la DL0 (0,25 ng) bien que n'ayant pas d'effet sur la locomotion, conduit à la diminution de 20% des réponses à la phéromone. Contrairement à celle-ci, la dose correspondant à la DL20 (10 ng/papillon) induit une augmentation de 35% des réponses à la phéromone sexuelle. Ces effets n'ont pas été observés en exposant les mâles à des odeurs de plante, ce qui suggère que cet effet est spécifique à la phéromone. L'observation des résultats permet d'extraire une courbe sinusoïdale, correspondant à celle observée dans le phénomène d'hormèse. Cependant, les résultats présentés dans cet article semblent correspondre à une courbe d'hormèse inversée, puisque la stimulation se fait à la plus forte dose des molécules toxiques. Ces résultats suggèrent que des faibles doses d'insecticides, accumulés par des résidus de traitement, pourraient induire des adaptations bénéfiques pour la reproduction des insectes ravageurs et ainsi perturber l'efficacité des traitements contre ces cibles.



## RESEARCH ARTICLE

# Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect

Kaouther K. Rabhi, Kali Esancy, Anouk Voisin, Lucille Crespin, Julie Le Corre, H el ene Tricoire-Leignel, Sylvia Anton, Christophe Gadenne\*

INRA/Université d'Angers, Neuroéthologie-RCIM, UPRES-EA 2647 USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, 42, rue Georges Morel, F-49071 Beaucouzé, France

\*[christophe.gadenne@angers.inra.fr](mailto:christophe.gadenne@angers.inra.fr)


 OPEN ACCESS

**Citation:** Rabhi KK, Esancy K, Voisin A, Crespin L, Le Corre J, et al. (2014) Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. PLoS ONE 9(12): e114411. doi:10.1371/journal.pone.0114411

**Editor:** Joseph Clifton Dickens, United States Department of Agriculture, Beltsville Agricultural Research Center, United States of America

**Received:** September 9, 2014

**Accepted:** November 10, 2014

**Published:** December 17, 2014

**Copyright:**   2014 Rabhi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by French National Funding Agency grant ANR-12 ADAP-0012-01 to H.T.-L., S.A., C.G. and a PhD grant to K.K.R., by the « Région Pays de la Loire » to S.A. and C.G. and by a Fulbright grant to K.E.

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

## Abstract

In moths, which include many agricultural pest species, males are attracted by female-emitted sex pheromones. Although integrated pest management strategies are increasingly developed, most insect pest treatments rely on widespread use of neurotoxic chemicals, including neonicotinoid insecticides. Residual accumulation of low concentrations of these insecticides in the environment is known to be harmful to beneficial insects such as honey bees. This environmental stress probably acts as an "info-disruptor" by modifying the chemical communication system, and therefore decreases chances of reproduction in target insects that largely rely on olfactory communication. However, low doses of pollutants could on the contrary induce adaptive processes in the olfactory pathway, thus enhancing reproduction. Here we tested the effects of acute oral treatments with different low doses of the neonicotinoid clothianidin on the behavioral responses to sex pheromone in the moth *Agrotis ipsilon* using wind tunnel experiments. We show that low doses of clothianidin induce a biphasic effect on pheromone-guided behavior. Surprisingly, we found a hormetic-like effect, improving orientation behavior at the LD20 dose corresponding to 10 ng clothianidin. On the contrary, a negative effect, disturbing orientation behavior, was elicited by a treatment with a dose below the LD0 dose corresponding to 0.25 ng clothianidin. No clothianidin effect was observed on behavioral responses to plant odor. Our results indicate that risk assessment has to include unexpected effects of residues on the life history traits of pest insects, which could then lead to their adaptation to environmental stress.

## Introduction

Most animals including insects rely on olfaction to find their mating partners. In moths, which include many important agricultural pests at the larval stage, males are attracted by sex pheromones emitted by conspecific females [1]. Although integrated pest management strategies are increasingly developed [2], most insect pest treatments still rely on neurotoxic chemicals, including neonicotinoid insecticides [3]. These molecules, such as the widely used last-generation insecticide clothianidin, are known to disrupt synaptic transmission through their action on nicotinic acetylcholine receptors [4, 5]. Neonicotinoid insecticides are used extensively for the control of important agricultural crop pests through spraying, seed dressing, and soil additions [3].

The widespread use of such neurotoxic insecticides results in residual accumulation of low concentrations in the environment [6]. This environmental stress probably acts as an “info-disruptor” by modifying the chemical communication system [7], and therefore decreases chances of reproduction in target insects. Sublethal doses of insecticides have been shown to alter various behaviors of beneficial insects such as honey bees [8]. Previous data likewise demonstrate that low doses of certain insecticides disrupt the behavioral response of pest insects to sex pheromone in a few species [9].

However, very low doses of pollutants can, on the contrary, induce an unexpected increase of reproduction abilities in target insects, which could allow them to bypass this stress, favoring the development of insecticide resistance or adaptation [10]. The phenomenon of hormesis, defined as a biphasic response following exposure to a given toxicant with beneficial effects at low-dose exposure and adverse effects at high-dose exposure [11], might be one explanation for these observations. Examples of the toxicological phenomenon of hormesis have been reported for many types of biological and pathological processes including microbial responses, plant responses, reproductive traits, and various stages of cancer [12, 13]. In insects, insecticide-induced hormesis in developmental and reproductive life traits (such as growth stimulation (weight), enhanced pupation, decrease of pupal mortality, increased fecundity and longevity, and increase of oviposition) has likewise been observed following treatments with classical non-neonicotinoid substances such as carbamates and organophosphates [14, 15]. Very little is known on the possible hormetic effect of insecticides in general on olfactory-guided behavior ([14] and references therein) and no study has dealt so far with the effects of neonicotinoid treatments on olfaction.

The black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), is a worldwide pest of many crops including corn and may cause severe stand losses and injury to corn seedlings [16]. In a few moth species including *A. ipsilon*, evidence is accumulating that behavioral and neural responses to odors can be modulated by age, physiological state or previous experience [17–20]. The well-described olfactory plasticity in *A. ipsilon* makes this species an excellent model to study effects of low insecticide doses on olfactory-guided behavior.



Here we tested the effect of low doses of clothianidin (0.1 to 20 ng per moth) on the behavioral responses to sex pheromone in *A. ipsilon* males in wind tunnel experiments. This neonicotinoid has insecticidal effects on a broad range of insect pests including plant-sucking insects [3, 21] and is widely used against *A. ipsilon* in foliar, soil and seed treatments [3, 22, 23]. Contrary to previous studies using only 1–3 doses of insecticides [24, 25], we evaluated dose-dependent effects of clothianidin on *A. ipsilon* behavior in more detail, by testing 8 doses ranging from the LD30 down to below the LD0. We show that acute oral treatments with low doses of clothianidin induced a biphasic effect on pheromone-guided behavior. A positive effect improving orientation behavior was found at a dose of 10 ng clothianidin per moth, corresponding to the LD20, whereas a negative effect, disturbing orientation behavior, was elicited by a treatment with 0.25 ng per moth, corresponding to a dose 10 times lower than the LD0. The effects of both clothianidin doses were restricted to pheromone responses and did not modify responses to plant odor.

## Results

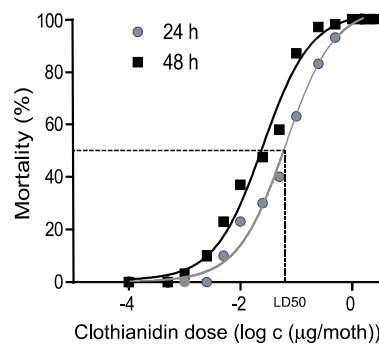
### Acute toxicity assay and sublethal dose determination

Four day-old sexually mature males were fed individually with clothianidin or control solutions (solvent dimethyl sulfoxide [DMSO] or sucrose) and mortality was recorded 24 h and 48 h later. For most males, the solution containing clothianidin was quickly ingested (a few seconds). No mortality was observed in control groups ( $n=50$  for sucrose and solvent groups). The theoretical lethal dose 50 (LD50: dose resulting in 50% mortality post-treatment) was determined by dose-response assays ranging from 0.1 ng to 2.5  $\mu\text{g}/\text{moth}$  ( $n=50$  for each dose) (Fig. 1) and was found to be  $69 \pm 0.04$  ng/moth and  $29 \pm 0.07$  ng/moth 24 h and 48 h after treatment, respectively. Before dying, intoxicated insects exhibited trembling and incapacity to move.

Eight low doses that resulted in 30% of mortality or less 24 h after treatment were used for behavioral tests. The LD30, LD25, LD20, and LD10 were determined to be 25, 15, 10 and 5 ng/moth respectively. The LD0 was determined as 2.5 ng/moth, and we also included treatments with 3 doses below the LD0: 1, 0.25, and 0.1 ng/moth.

### Effect of DMSO on flight ability and pheromone responses

The effect of solvent treatments on male behavior was determined. More than 50 males were tested for each dose of DMSO or sucrose control. No statistical difference in the flight ability, general flight activity and pheromone responses (i.e. oriented flight towards the pheromone) was observed after treatment with any of the 8 DMSO doses used for the preparation of clothianidin solutions as compared with control sucrose-treated males ( $G=18.8$ ,  $df=15$ ,  $P=0.22$ ;  $G=11.16$ ,  $df=15$ ,



**Fig. 1. Toxicity of acute oral clothianidin treatment for adult *A. ipsilon* males.** Four-day-old males were intoxicated with a range of concentrations of clothianidin (0.1 ng–2.5 µg/moth). The number of surviving males was recorded 24 h and 48 h after intoxication. The median lethal dose (LD50) was determined at  $69 \pm 0.04$  ng and  $29 \pm 0.07$  ng/moth 24 h and 48 h after treatment respectively. N=50 for each dose.

doi:10.1371/journal.pone.0114411.g001

$P=0.74$  and  $G=18.17$ ,  $df=15$ ,  $P=0.25$  for flight ability, general flight activity and pheromone responses respectively) (File S1).

In the following experiments, the flight ability and pheromone responses of males intoxicated with clothianidin were thus compared to those of males treated with the corresponding DMSO dose.

#### Effect of clothianidin on flight ability

More than 50 males were tested if they were able to fly for each dose of clothianidin or DMSO. No significant differences in the flight ability between clothianidin- and DMSO-treated males were observed after intoxication with doses of 2.5 ng/moth and lower (2.5 ng/moth:  $G=0.58$ ,  $df=1$ ,  $P=0.44$ ; 1 ng/moth:  $G=0.06$ ,  $df=1$ ,  $P=0.79$ ; 0.25 ng/moth:  $G=0.05$ ,  $df=1$ ,  $P=0.81$ ; 0.1 ng/moth:  $G=0.8$ ,  $df=1$ ,  $P=0.36$ ) (Figure A in [S2 File](#)). On the contrary, exposure to doses of 5 ng clothianidin and above decreased the proportion of males able to fly (25 ng/moth:  $G=8.7$ ,  $df=1$ ,  $P=0.003$ ; 15 ng/moth:  $G=25.03$ ,  $df=1$ ,  $P=5.62 \cdot 10^{-7}$ ; 10 ng/moth:  $G=4.01$ ,  $df=1$ ,  $P=0.04$ ; 5 ng/moth:  $G=6.55$ ,  $df=1$ ,  $P=0.01$ ) (Figure A in [S2 File](#)). Only males that were able to fly were considered for the behavioral analyses described below.

#### Effect of clothianidin on pheromone responses

As there was no significant difference between the oriented responses of control males and males treated with DMSO (see above, File S1), we show the effect of clothianidin on the male oriented response as compared to the corresponding DMSO responses (i.e. the percentage of responses in clothianidin-treated males divided by the percentage of responses of males treated with the corresponding DMSO doses) (Fig. 2). Acute treatment with 2.5 ng, 1 ng, or 0.1 ng clothianidin

(<LD0) did not affect the oriented behavioral response to 20 ng of the pheromone (2.5 ng:  $G=0.17$ ,  $df=1$ ,  $P=0.67$ ; 1 ng:  $G=0.05$ ,  $df=1$ ,  $P=0.81$ ; 0.1 ng:  $G=0.51$ ,  $df=1$ ,  $P=0.47$ ) (Fig. 2). However, significantly fewer males responded to the pheromone after treatment with 0.25 ng/moth as compared to DMSO-treated controls ( $G=4.34$ ,  $P=0.04$ ) (Fig. 2).

In contrast, significantly more males responded to the pheromone after treatment with 10 ng/moth (LD20) as compared to DMSO-treated males ( $G=12.19$ ;  $df=1$ ;  $P=0.0005$ ) (Fig. 2). To check for typical characteristics of a hormetic effect, we also treated male moths with doses close to the LD20 (25, 15 and 5 ng/moth corresponding to LD30, LD25 and LD10). For these doses we observed no significant difference in behavioral pheromone responses compared to DMSO-treated males (25 ng/moth:  $G=0.01$ ,  $df=1$ ,  $P=0.9$ ; 15 ng/moth:  $G=0.18$ ,  $df=1$ ,  $P=0.66$ ; 5 ng/moth:  $G=2.87$ ,  $df=1$ ,  $P=0.09$ ) (Fig. 2). For all tested groups, the general flight activity was high and not statistically different between treated and control males ( $G$  test:  $G=11.14$ ,  $df=15$ ,  $P=0.74$ ) and between groups treated with different doses of clothianidin ( $G=2.72$ ,  $df=7$ ,  $P=0.90$ ) (Figure B in S2 File).

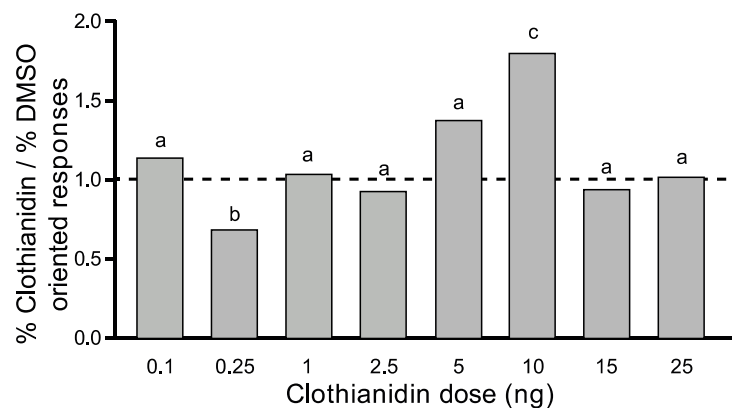
In order to confirm the observed behavioral increase in pheromone response of males after the 10-ng clothianidin treatment (LD20), we examined behavioral responses of treated and untreated males to lower doses of pheromone (Fig. 3A). The effect observed with the 20 ng pheromone dose was confirmed with the 1 ng pheromone dose ( $G=6.25$ ,  $df=1$ ,  $P=0.01$ ) but no significant effect was observed with the 0.01 ng pheromone dose ( $G=0.86$ ,  $df=1$ ,  $P=0.35$ ) (Fig. 3A). Similarly, in order to verify the decreased response levels observed after the 0.25-ng clothianidin treatment, we also tested the pheromone response of males treated with this dose of clothianidin to a lower dose of pheromone. With a 1 ng pheromone stimulus we did not observe a significant decrease in the proportion of responding males as compared to DMSO-treated males ( $G=3.36$ ,  $df=1$ ,  $P=0.066$ ) (Fig. 3B).

### Effects of clothianidin on plant odor responses

We also tested the effect of low doses of clothianidin on the responses of at least 50 intoxicated males/dose to a linden flower extract (see Methods for details). For this, we selected the two clothianidin doses which induced the observed positive (10 ng) and negative (0.25 ng) effects on sex pheromone responses. The general flight activity and the oriented responses towards the linden flower extract were not statistically different between intoxicated and control males (10 ng/moth:  $G=0.56$ ,  $df=1$ ,  $P=0.46$ ; 0.25 ng/moth:  $G=0.69$ ,  $df=1$ ,  $P=0.4$ ) (Fig. 4).

## Discussion

In the present study we show that a low dose (LD20) of a neonicotinoid insecticide can increase behavioral responses to sex pheromone in the surviving



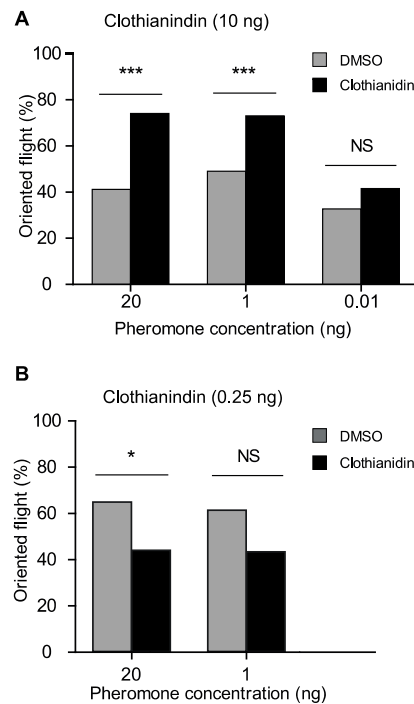
**Fig. 2. Effect of low doses of clothianidin on oriented responses of *A. ipsilon* males towards a 20-ng sex pheromone blend.** The percentage of responses of clothianidin-treated males divided by that of DMSO-treated males is represented. The 0.25-ng dose induced a significant decrease in oriented responses whereas the 10-ng dose induced a significant increase in sex pheromone oriented responses. Bars with same letters are not significantly different (G-test,  $P < 0.05$ ). The dashed line represents an equal response of males treated with clothianidine and the corresponding DMSO dose.  $N > 50$  for all groups.

doi:10.1371/journal.pone.0114411.g002

individuals of a pest insect and a very low dose, while not causing any mortality, can decrease sex pheromone responses. Whereas the latter effect probably reinforces the efficiency of insecticide treatments, the improved pheromone responses observed with the LD20 dose could threaten the efficiency of these treatments. However, this dose, although increasing the pheromone response, reduced the survival rate and flight capacity of the intoxicated moths. Therefore the potential overall gain in the reproductive capacity of males treated with this dose might be minimal. Our results indicate that an insect could modulate its olfactory system to bypass environmental anthropogenic changes, such as the growing presence of insecticide residues.

During acute oral intoxication treatments, *A. ipsilon* males readily and quickly ingested the provided clothianidin solutions, confirming that this neonicotinoid is not a feeding deterrent [23]. Symptoms of intoxication were similar to those described for most neurotoxic insecticides [8, 26]. The *A. ipsilon* LD50 24 h after acute oral intoxication (69 ng/moth) with clothianidin was in the same order of magnitude as that of the honey bee (3–50 ng/bee) [27–29].

Previous studies have shown that sublethal doses of neonicotinoids induce various effects on development and life traits, including behavior, in many insects. These effects are mainly negative, and have been observed principally in beneficial insects such as honey bees (for example [8, 30], but also in ants [31], aphids [24, 32, 33], moths [23, 34, 35], bugs [25, 36, 37], and flies [38]. However, effects of neonicotinoids on responses to behaviorally relevant odors have not been investigated in pest insects so far. Here we show that intoxication with very low sublethal doses of clothianidin (1/10 of the LD0 dose: 0.25 ng/moth) decreased

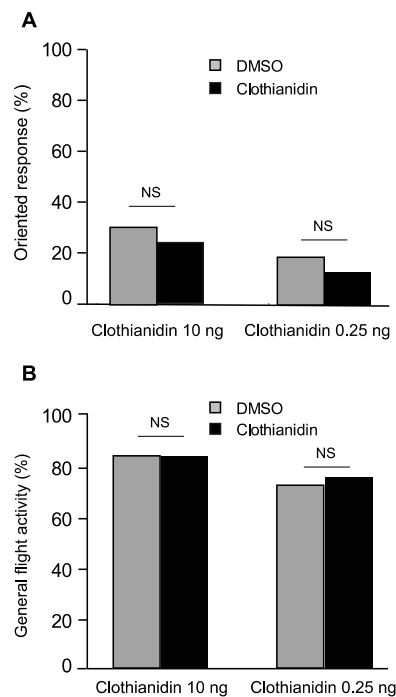


**Fig. 3. Effect of the 10 ng (A) and 0.25 ng (B) doses of clothianidin on responses of *A. ipsilon* males to different doses of the sex pheromone blend.** The effect of the 10 ng clothianidin treatment was confirmed with a 1 ng dose of pheromone but not with a 0.01 ng dose. The effect of the 0.25 ng clothianidin dose was not significant when using a 1 ng pheromone stimulus. N>50 for all groups, G-test, \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0114411.g003

the percentage of *A. ipsilon* males responding to 20 ng of the sex pheromone, corresponding to the emission of 20 females [39], even though this 0.25 ng-clothianidin dose did not affect locomotor behavior, and males were able to fly as well as control males. A few studies have already shown “negative” effects of other types of insecticides on sexual behavior of pest insects, i.e. the behavioral response to sex pheromone [9]. For example, in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, the carbamate carbaryl disrupted zigzagging upwind flight, and the organochloride chlordimeform interfered with all sequences of flight and courtship display [40]. In the corn borer *Ostrinia furnacalis*, treatments with the organophosphate malathion and the pyrethroid deltamethrin decreased the ability of males to respond to the female-produced sex pheromone [41, 42].

Surprisingly, clothianidin treatments at the LD20 dose, a higher dose than that which elicited the observed negative effects, increased the percentage of *A. ipsilon* males responding to the sex pheromone. This effect on the olfactory system can be compared with effects of the cyano-substituted neonicotinoid acetamiprid at doses below LD0, which elicits increased sensitivity to antennal stimulation with



**Fig. 4. Effect of the 10-ng and 0.25-ng low doses of clothianidin on oriented responses (A) and general flight activity (B) of *A. ipsilon* males in presence of a linden flower extract.** Responses to the linden flower extract were not significantly different between clothianidin- and DMSO-treated males for both 0.25 ng and 10 ng clothianidin.  $N > 50$  for all groups, G-test,  $P < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0114411.g004

sucrose similarly to nicotine injections in the honey bee [43, 44]. Very low doses of other insecticides such as chlordimeform have also shifted male moth behavioral sensitivity to low doses of pheromone in *Trichoplusia ni* and *G. molesta* [40, 45]. Another case of increased behavioral responses to olfactory signals after acute insecticide treatments was found in parasitoid wasps. Here sublethal treatments at an LD 20 dose of the organophosphorous and pyrethroid compounds chlorpyrifos and deltamethrin elicited for example improved responses to host kairomones [46, 47]. Unexpected positive effects of sublethal doses of the neonicotinoid imidacloprid on various biological traits such as fecundity and longevity have also been observed in aphids and hemipterans [25, 32, 48].

Such described positive effects of low doses of a toxicant characterize the hormesis effect. Classically, a hormetic response is characterized by a high dose inhibition and a low dose stimulation of a given compound, represented by an inverted U-shape dose-response [10, 11, 49]. Evidence of such a biphasic dose-response relationship for pesticides has been found in many insect species [14]. It is recognized as one of the potential causes underlying pest resurgence and secondary pest outbreaks [15, 50–52]. In the present study, low doses of

clothianidin induced a biphasic effect on the behavioral response to sex pheromone in the moth *A. ipsilon*: negative and positive effects on pheromone responses were obtained with very low (<LD0) and higher (LD20) doses respectively, whereas even higher doses did not affect behavior. To our knowledge, this is the first report of such low dose inhibition and high dose stimulation of a single biological trait following intoxication by a pollutant.

The robustness of our behavioral assay, coupled with the fact that significant positive effects were still found following tests with lower doses of pheromone (1 ng), clearly indicates that the 10 ng clothianidin dose provides the “low-dose stimulation” defined by the hormesis phenomenon. However, declaring that we have a concrete example of hormesis based upon this evidence would be premature for two reasons. Firstly we observed a negative effect at an even lower dose of clothianidin treatment. Secondly, although there was a tendency for a positive behavioral effect following treatment with the 5-ng dose of clothianidin, we did not find a true significant positive effect with a neighboring toxicant dose (5 or 15 ng), a necessary criterion that characterizes hormesis [13]. Our results can thus be interpreted as a hormetic-like effect. We are currently investigating the neurobiological bases of these behavioral effects, using electrophysiological and molecular approaches. In particular, we are testing possible changes in spontaneous activity and in the sensitivity of AL neurons to pheromone under specific clothianidin treatments using intracellular recordings of AL neurons. Additionally, we are investigating the expression levels of different receptor subunits within the *A. ipsilon* brain following treatment with the positive (10 ng) and negative (0.25 ng) sublethal doses using qPCR analysis.

From a mechanistic point of view, the biphasic effect of sublethal doses on male pheromone-guided behavior could be explained by differential affinity of clothianidin to nicotinic receptor subtypes, constituted of different subunits within the olfactory system [53]. Several facts reported in the literature support this hypothesis. In other insects, such as the brown planthopper, the subunit composition of nicotinic receptors has been shown to influence the affinity to the neonicotinoid imidacloprid: while the  $\beta 1$  subunit is required for imidacloprid binding, it is the identity of the remaining subunits associated with  $\beta 1$  that determines binding site affinity [54]. In hybrid rat/*Drosophila* nicotinic receptors, imidacloprid was also found to show differential binding affinities according to the *Drosophila* subunit co-expressed with the rat subunit in a *Drosophila* cell line [55]. For clothianidin, different binding sites of nAChRs have recently been identified, which would allow for different affinities within the same insect [56]. Indeed certain nicotinic receptor subunits have been shown to be differentially expressed in different parts of the honey bee brain, including areas treating olfactory information such as the antennal lobes [57, 58], and could thus explain different affinities to insecticides in different parts of the nervous system. In our case, different neuron types within the moth AL might express different nACh receptor types, consisting of different subunit arrangements leading to different affinity for clothianidin. These differentially affected neuron types within the AL network might exhibit dissimilar activity following treatments with different doses

of clothianidin. Different sets of nicotinic receptor subunits between the MGC and “ordinary” glomeruli of the AL might also explain why behavioral responses to plant odors are not affected by the tested clothianidin treatments.

## Methods

### Insects

Adult males of *A. ipsilon* Hufnagel originated from a laboratory colony established in Bordeaux and transferred to Angers. Wild insects are introduced into the colony each spring to maintain genetic diversity and overall health of the colony. Insects were reared on an artificial diet [59] in individual cups until pupation. Pupae were sexed, and males and females were kept separately at 22 °C in an inversed light-dark cycle (16 h: 8 h light: dark photoperiod) with the scotophase starting at 10 am. Newly emerged adults were removed every day from hatching containers and were given access to a 20% sucrose solution *ad libitum*. The day of emergence was considered as Day 0. Four- and five-day old virgin males of *A. ipsilon*, were used in this study.

### Chemicals

Clothianidin (>99% purity, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dilutions were then prepared with a 20% sucrose solution. The DMSO concentration in the most concentrated clothianidin solution used was at 2%. Fresh solutions were prepared weekly as needed from frozen aliquots of the stock solution.

For wind tunnel experiments, we used an artificial pheromone blend containing (Z)-7-dodecenyl acetate (Z7–12:Ac), (Z)-9-tetradecenyl acetate (Z9–14:Ac), and (Z)-11-hexadecenyl acetate (Z11–16:Ac) (Sigma–Aldrich) at a ratio of 4:1:4 as an attractant [39, 60], or a linden flower extract (*Tilia tormentosa*, 55% purity, Boiron laboratories, Sainte-Foy les Lyon, France) [19].

### Clothianidin intoxication

In order to control the insecticide dose received by each individual moth, oral acute exposure was chosen as the method for delivery. Exposure to clothianidin was accomplished by feeding 4-days old males with the various doses of clothianidin. We chose 4-days old males for treatments, because the effects of low doses of clothianidin were assessed 24 h after treatment (day-5), which corresponds to the optimal age for behavioral responses to sex pheromone in wind tunnel experiments [61]. Males were transferred from their rearing chamber before the onset of the scotophase under a ventilated fume hood. They were then placed in plastic pipette tips, with just the head protruding, to limit their movements. Using forceps, the proboscis was extended to a 10 µl drop of the concentration to be tested and held there until the moth had finished ingesting the



entire drop. Control solutions of DMSO corresponding to the concentration of DMSO in each clothianidin treatment were delivered in an identical manner.

To test the impact of this delivery method, initial experiments were performed comparing the behavioral responses of untreated moths, which were fed with 10  $\mu\text{l}$  of sucrose solution under the same conditions of restraint. No mortality was observed in sucrose-treated males, and no significant difference in behavioral responses were found between untreated control moths ( $n=243$ ) and sucrose-fed moths ( $n=231$ ) ( $G=0.91$ ;  $df=1$ ;  $P=0.33$ ).

Once the males had ingested the presented solution, they were placed in individual plastic cups and transferred to a climate chamber different from the rearing room for toxicological (24 h and 48 h later) and behavioral tests (24 h later). Intoxication of a batch of 30 moths took approximately 30 min.

### Mortality tests

Clothianidin treatments were done with 15 different concentrations of clothianidin (0.1 ng–2.5  $\mu\text{g}/\text{moth}$ ) and the corresponding DMSO solutions. Each day of intoxication, clothianidin as well as DMSO and sucrose solutions were applied to a group of 10 moths each. Evaluation of mortality was based on the number of males exhibiting no movement even when prodded or touched, 24 h and 48 h after treatment. A total of 50 males for each group were treated for each concentration.

### Wind tunnel experiments

Behavioral tests were performed using a 2 m-long flight tunnel during the middle of the scotophase (4–7 h after lights off) under red light illumination as described previously [19]. Four-day-old males were treated with 8 different doses of clothianidin (0.1; 0.25; 1; 2.5; 5; 10; 15; 20 ng) or the corresponding DMSO dose. A third group of control males remained untreated. The behavioral responses of 5-day-old intoxicated or control males were tested. Environmental conditions during the bioassay were held constant: 22°C,  $50 \pm 10\%$  relative humidity, and a wind speed of 0.3  $\text{m s}^{-1}$ . All experiments were performed double-blindly to avoid biased observations, i. e. the observer did not know the treatment of the male. A cage containing a single experimental male was introduced in the wind tunnel. After 30 s, during which the male adjusted to the airflow, a filter paper containing the odor stimulus was placed 160 cm upwind from the cage. Pheromone stimulation was performed with an artificial pheromone blend as described above. Different concentrations of this pheromone blend (20, 1, and 0.01 ng in 10  $\mu\text{l}$ ) were used for behavioral tests. Fifty  $\mu\text{l}$  of the undiluted linden flower extract were used to test behavioral responses to the plant odor.

Moth behavior was observed during 3 min. Partial flight (characteristic zigzag flight for half the length of the wind tunnel), complete flight (characteristic flight throughout the wind tunnel, arriving within 2 cm of the odor source), and landing on the odor source were scored as oriented responses. Behaviors such as

random flight, walking, and no movement were scored as “no oriented response”. Oriented and random flights were pooled to assess general flight activity. Flight ability was tested by gently tossing the males that had not flown during their trials in the air. At the end of the experiments, all tested males were discarded in dedicated toxicology containers. For each day of experiments, we tested individuals of the three groups of males (clothianidin-, DMSO-, and sucrose-treated males).

### Statistical analysis

For behavioral assays, statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) were evaluated among groups (control sucrose group versus control DMSO group, and DMSO group versus clothianidin-intoxicated group) using a R x C test of independence by means of a G-test and applying the William's correction [62].

### Supporting Information

**S1 File. Effect of acute oral DMSO treatment on oriented flight (A), flight ability (B), and general flight activity (C) of adult *A. ipsilon* males.** Altogether there was no statistical difference between DMSO- and sucrose-treated males for flight ability, general flight activity and oriented pheromone response (G-test,  $P > 0.05$ ).

[doi:10.1371/journal.pone.0114411.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114411.s001) (EPS)

**S2 File. Effects of low doses of clothianidin on the flight ability (A) and general flight activity (B) of *A. ipsilon* males.** **A** The doses of 25, 15, 10 and 5 ng/moth negatively affected the locomotor behavior of males. **B** No difference in general flight activity was observed after clothianidin treatment.  $N > 50$  for all groups, G-test,  $P \leq 0.05$ .

[doi:10.1371/journal.pone.0114411.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114411.s002) (EPS)

### Acknowledgments

We thank Cyril Le Corre for help with insect rearing and Monique Gauthier for helpful comments on an earlier version of the manuscript. This work was supported by French National Founding Agency grant ANR-12 ADAP-0012-01 to H. T.-L., S. A., C. G. and a PhD grant to K. K. R., by the « Région Pays de la Loire » to S. A. and C. G. and by a Fulbright grant to K.E.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KKR HT-L SA CG. Performed the experiments: KKR KE AV LC JLC CG. Analyzed the data: KKR KE AV LC JLC CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: KKR HT-L SA CG. Wrote the paper: KKR KE HT-L SA CG.

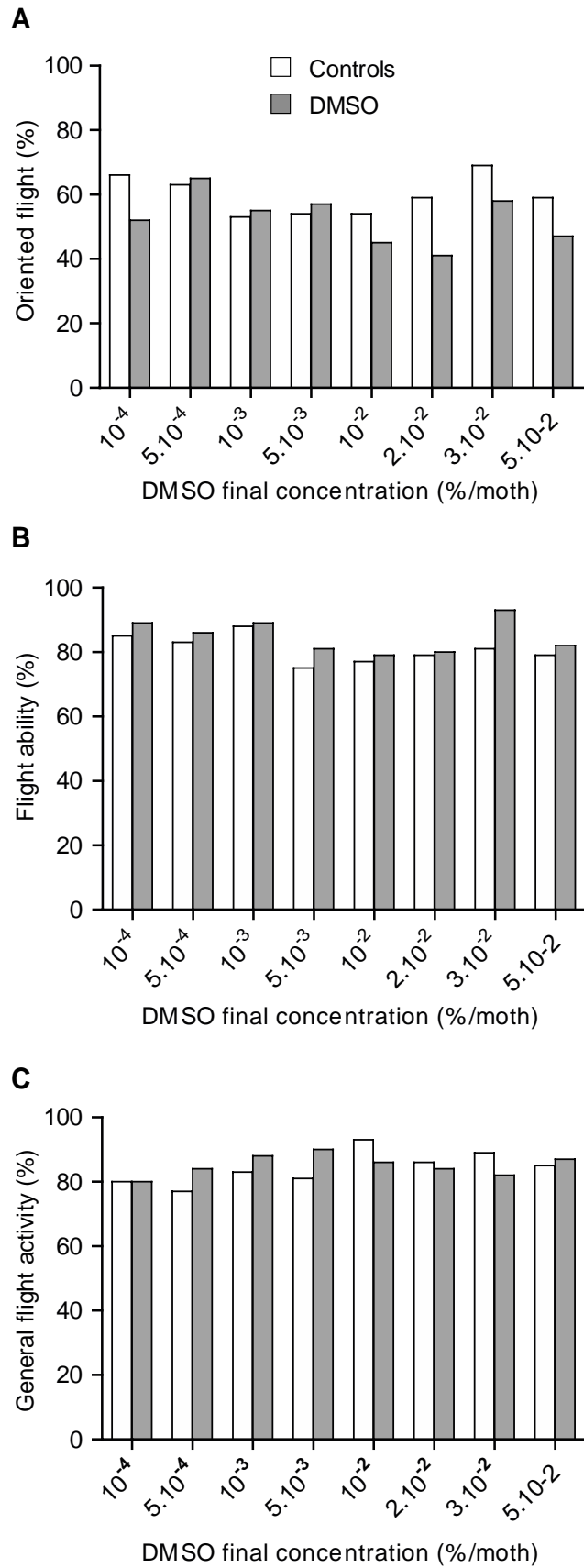
## References

1. **Roelofs WL** (1995) Chemistry of sex attraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 44–49.
2. **Suckling DM, Stringer LD, Stephens AEA, Woods B, Williams DG, et al.** (2014) From integrated pest management to integrated pest eradication: technologies and future needs. *Pest Manage Sci* 70: 179–189.
3. **Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A** (2011) Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J Agric Food Chem* 59: 2897–2908.
4. **Casida JE, Durkin KA** (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol* 58: 99–117.
5. **Matsuda K, Buckingham S, Kleier D, Rauh J, Grauso M, et al.** (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 573–580.
6. **Goulson D** (2013) REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Appl Ecol* 50: 977–987.
7. **Lurling M, Scheffer M** (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol Evol* 22: 374–379.
8. **Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M** (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81–106.
9. **Haynes KF** (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu Rev Entomol* 33: 149–168.
10. **Guedes NMP, Tolledo J, Correa AS, Guedes RNC** (2010) Insecticide-induced hormesis in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J Appl Entomol* 134: 142–148.
11. **Calabrese EJ, Baldwin LA** (2002) Defining Hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21: 91–97.
12. **Calabrese EJ** (2009) The road to linearity: why linearity at low doses became the basis for carcinogen risk assessment. *Arch Toxicol* 83: 203–225.
13. **Calabrese EJ, Baldwin LA** (2001) The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol Sci* 62: 330–338.
14. **Cutler GC** (2013) Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose-Response* 11: 154–177.
15. **Guedes RNC, Cutler GC** (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manage Sci* 70: 690–697.
16. **Rings RW, Arnold FJ, Keaster AJ, Musick GJ** (1974) Worldwide annotated bibliography of the black cutworm *Agrotis ipsilon*, Hufnagel. *Ohio Agric Res Dev Cent Res Circ*: 1–106.
17. **Anton S, Dufour MC, Gadenne C** (2007) Plasticity of olfactory-guided behaviour and its neurobiological basis: lessons from moths and locusts. *Entomol Exp Appl* 123: 1–11.
18. **Anton S, Evenggaard K, Barrozo RB, Anderson P, Skals N** (2011) Brief predator sound exposure elicits behavioral and neuronal long-term sensitization in the olfactory system of an insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3401–3405.
19. **Barrozo RB, Gadenne C, Anton S** (2010) Switching attraction to inhibition: mating-induced reversed role of sex pheromone in an insect. *J Exp Biol* 213: 2933–2939.
20. **Saveer AM, Kromann SH, Birgersson G, Bengtsson M, Lindblom T, et al.** (2012) Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. *P Roy Soc B* 279: 2314–2322.
21. **Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Salgado VL, Kaussmann M** (2003) Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic Biochem Physiol* 76: 55–69.
22. **Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R** (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manage Sci* 64: 1099–1105.
23. **Kullik SA, Sears MK, Schaafsma AW** (2011) Sublethal Effects of Cry 1F Bt Corn and Clothianidin on Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larval Development. *J Econ Entomol* 104: 484–493.

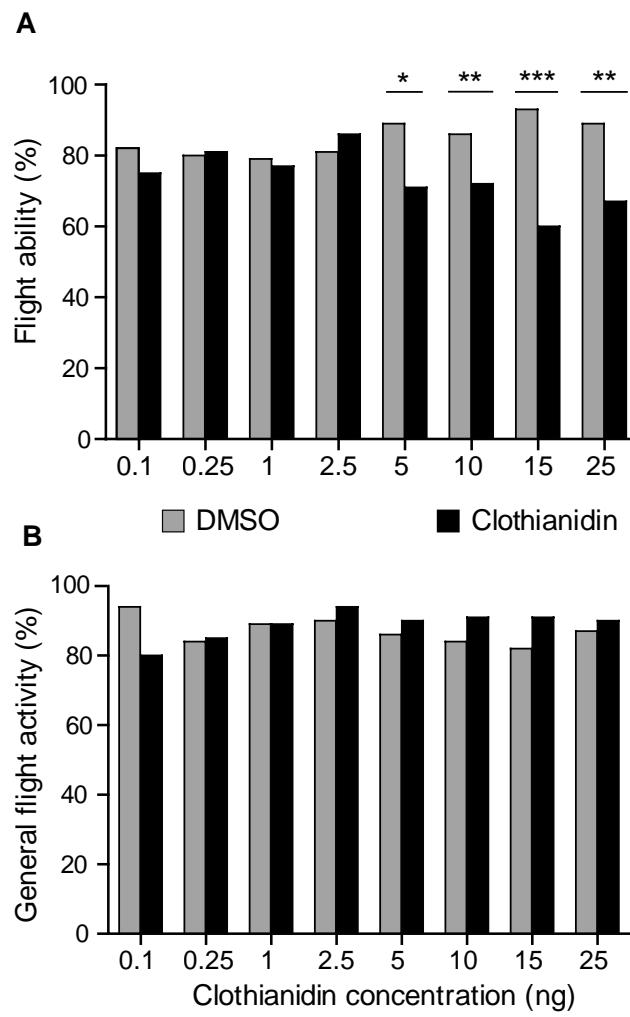
24. Shi X, Jiang L, Wang H, Qiao K, Wang D, et al. (2011) Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pest Manage Sci* 67: 1528–1533.
25. Tan Y, Biondi A, Desneux N, Gao X-W (2012) Assessment of physiological sublethal effects of imidacloprid on the mirid bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Ecotoxicology* 21: 1989–1997.
26. Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, et al. (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28: 113–122.
27. Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors* 683: 85–95.
28. Laurino D, Manino A, Patetta A, Porporato M (2013) Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bull Insectol* 66: 119–126.
29. Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bull Insectol* 64: 107–113.
30. Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, et al. (2012) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336: 348–350.
31. Barbieri RF, Lester PJ, Miller AS, Ryan KG (2013) A neurotoxic pesticide changes the outcome of aggressive interactions between native and invasive ants. *P Roy Soc B* 280: 20132157.
32. Cutler GC, Ramanaidu K, Astatkie T, Isman MB (2009) Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin. *Pest Manage Sci* 65: 205–209.
33. Miao J, Du Z-B, Wu Y-Q, Gong Z-J, Jiang Y-L, et al. (2014) Sub-lethal effects of four neonicotinoid seed treatments on the demography and feeding behaviour of the wheat aphid *Sitobion avenae*. *Pest Manage Sci* 70: 55–59.
34. Ahmad S, Ansari MS, Ahmad N (2013) Acute toxicity and sublethal effects of the neonicotinoid imidacloprid on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Trop Insect Sci* 33: 264–275.
35. Saber M, Parsaeyan E, Vojoudi S, Bagheri M, Mehrvar A, et al. (2013) Acute toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide and thiodicarb on survival, development and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protect* 43: 14–17.
36. Bao H, Liu S, Gu J, Wang X, Liang X, et al. (2009) Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Manage Sci* 65: 170–174.
37. Sohrabi F, Shishehbor P, Saber M, Mosaddegh MS (2011) Lethal and sublethal effects of buprofezin and imidacloprid on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Prot* 30: 1190–1195.
38. Hu XP, Prokopy RJ (1998) Lethal and sublethal effects of imidacloprid on apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* Walsh (Dipt., Tephritidae). *J Appl Entomol* 122: 37–42.
39. Picimbon JF, Gadenne C, Bécard JM, Clément JL, Sreng L (1997) Sex pheromone of the french black cutworm moth, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): identification and regulation of a multicomponent blend. *J Chem Ecol* 23: 211–230.
40. Linn J, C E, Roelofs WL (1984) Sublethal effects of neuroactive compounds on pheromone response thresholds in male oriental fruit moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 1: 331–344.
41. Wei H, Du J (2004) Sublethal effects of larval treatment with deltamethrin on moth sex pheromone communication system of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Pestic Biochem Physiol* 80: 12–20.
42. Zhou H, Du J, Huang Y (2005) Effects of sublethal doses of malathion on responses to sex pheromones by male Asian corn borer moths, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *J Chem Ecol* 31: 1645–1656.
43. El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, et al. (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 653–661.
44. Thany SH, Gauthier M (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res* 1039: 216–219.

45. Linn CE, Roelofs WL (1985) Multiple effects of octopamine and chlordimeform on pheromone response thresholds in the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Pestic Sci* 16: 445–446.
46. Delpuech J, Bardon C, Bouletreau M (2005) Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 49: 186–191.
47. Komeza N, Fouillet P, Bouletreau M, Delpuech J (2001) Modification, by the insecticide chlorpyrifos, of the behavioral response to kairomones of a parasitoid wasp, *Leptopilina bouleari*. *Arch Environ Contam Toxicol* 41: 436–442.
48. Yu Y, Shen G, Zhu H, Lu Y (2010) Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic Biochem Physiol* 98: 238–242.
49. Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Hormesis: the dose–response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 175–197.
50. Cohen E (2006) Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. *Pestic Biochem Physiol* 85: 21–27.
51. Hardin M, Benrey B, Coll M, Lamp W, Roderick G, et al. (1995) Arthropod pest resistance - an overview of potential mechanisms *Crop Protect* 14: 3–18.
52. Morse J (1998) Agricultural implications of pesticide-induced hormesis of insects and mites. *Hum Exp Toxicol* 17: 266–269.
53. Millar NS, Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237–246.
54. Li J, Shao Y, Ding Z, Bao H, Liu Z, et al. (2010) Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 17–22.
55. 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.
56. Taillebois E, Beloula A, Quinchard S, Jaubert-Possamai S, Daguin A, et al. (2014) Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS ONE* 9: e96669.
57. Thany S, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M (2003) Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 12: 255–262.
58. Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G (2005) Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene* 344: 125–132.
59. Poitout S, Buès R (1974) Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères sur milieu artificiel simplifié. *Ann Zool Ecol Anim* 2: 79–91.
60. Gemeno C, Haynes KF (1998) Chemical and behavioral evidence for a third pheromone component in a north american population of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *J Chem Ecol* 24: 999–1011.
61. Gadenne C, Renou M, Sreng L (1993) Hormonal control of sex pheromone responsiveness in the male black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Experientia* 49: 721–724.
62. Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman, W.H. 315 p.

**Figure Supplémentaire 1**



**Figure Supplémentaire 2**







**Article n°2** Kaouther K. Rabhi, Delphine Calas-List, Nina Deisig, Elodie Demondion, Julie Le Corre, Guillaume Robert, Hélène Tricoire-Leignel, Steeve H. Thany, Philippe Lucas, Christophe Gadenne and Sylvia Anton: Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect. (Soumis pour publication)

## Résumé de la publication

Dans ce deuxième article soumis à Proceedings of the Royal Society London B, nous avons étudié les mécanismes neuronaux sous-jacents aux modifications comportementales décrites dans le premier article. Nous avons testé l'effet des doses faibles de clothianidine définies dans la première partie (<DL0 : 0,25 ng/papillon et DL20 : 10 ng/papillon) sur la sensibilité du système olfactif périphérique et central.

Les résultats des enregistrements unitaires et d'imagerie calcique ne montrent aucun effet significatif des deux faibles doses de clothianidine testées sur la réponse des ORNs et l'entrée globale de l'information olfactive au niveau du AL. En revanche, les résultats obtenus par l'électrophysiologie intracellulaire suggèrent que les doses faibles correspondant à la DL20 induisent une augmentation de la sensibilité des neurones du AL, alors que la dose très faible inférieure à la DL0 produit l'effet inverse, en diminuant la sensibilité des neurones du AL. Les enregistrements des courants évoqués par l'acétylcholine et la clothianidine dans les neurones du AL en culture primaire, n'ont par ailleurs pas mis en évidence de changement après traitement à la clothianidine.

Ces résultats suggèrent qu'il existerait un effet dose-dépendant de la clothianidine, conduisant au déplacement du seuil de détection de la phéromone dans les neurones du AL. Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux observés en comportement. Le changement comportemental observé après traitement avec l'insecticide semblerait donc trouver son origine dans une modulation de la sensibilité dans le centre primaire d'intégration de l'information olfactive, les ALs.



**Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect**

Kaouther K. Rabhi<sup>1</sup>, Delphine Calas-List<sup>2</sup>, Nina Deisig<sup>3</sup>, Elodie Demondion<sup>3</sup>, Julie Le Corre<sup>1</sup>, Guillaume Robert<sup>1</sup>, Hélène Tricoire-Leignel<sup>1</sup>, Steeve H. Thany<sup>2†</sup>, Philippe Lucas<sup>3</sup>, Christophe Gadenne<sup>1</sup> and Sylvia Anton<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroéthologie-RCIM, INRA-Université d'Angers, UPRES EA 2647 USC INRA 1330, 42, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), Université d'Angers, UPRES-EA 2647 USC INRA 1330, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers, France

<sup>3</sup> Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), UMR 1392, Département d'Ecologie Sensorielle, INRA, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

† Present Address: Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC - EA 1207) Entomologie et Biologie Intégrée, Université d'Orléans, rue de Chartres - BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

\* Corresponding author: Sylvia Anton

Email: [sylvia.anton@angers.inra.fr](mailto:sylvia.anton@angers.inra.fr)

**Abstract**

Insect pest management relies mainly on neurotoxic insecticides, including neonicotinoids, which tend to accumulate in the environment. These residues have not only negative effects on insect pests, thus improving their control, but also on beneficial insects such as honeybees. On the contrary, low doses of insecticides can have positive effects by enhancing various life traits. Most pest insects rely on olfaction for their reproduction. In moths for example, males are attracted by female-produced sex pheromones. Because olfactory synaptic transmission is cholinergic, neonicotinoid residues could modify the chemical communication system, and consequently reproduction. We recently showed that treatments with different sublethal doses of clothianidin could either enhance or decrease behavioural sex pheromone responses in the male moth, *Agrotis ipsilon*. To investigate the neural mechanisms underlying such behavioural modifications, we tested the effects of the behaviourally active doses of clothianidin on the sensitivity of the peripheral and central olfactory system. We show that there is no peripheral effect of low clothianidin doses whereas the effect on the sensitivity of antennal lobe output neurons is dose-dependent. This correlates with the observed changes of behavioural responses after clothianidin treatment and suggests the antennal lobe as neural substrate for behavioural changes induced by clothianidin.

Keywords sublethal insecticide dose, olfactory receptor neurons, antennal lobe, calcium imaging, electrophysiology, moth

Short Title Insecticide modulates olfaction in a moth

**Introduction**

Currently, pest management strategies rely mainly on neurotoxic insecticides, including neonicotinoids. These latter molecules act selectively on the insect central nervous system as agonists of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), and thus disturb synaptic transmission [1, 2]. They are highly efficient because of their systemic action for crop protection, i.e. their distribution in all organs of a treated plant. Neonicotinoids, such as the widely used clothianidin, have insecticidal effects on a broad range of insect pests [3 and references therein]. Due to their widespread use, pesticide residues accumulate in the environment [4]. In addition to the known lethality at high doses, these pesticide residues

may have negative effects not only on target insects thus improving their pest control effects but also on non-target insects such as honey bees, for which several studies showed that neonicotinoids decrease survival, and impair foraging behaviour and learning and memory functions [5-7]. On the other hand, stimulatory effects on various life traits associated with low doses of insecticides have been reported, and this is currently becoming recognized as a general toxicological phenomenon called hormesis, characterized by inhibition at high doses and stimulation at low doses by the same compound [8-10].

Most animals, including agricultural pest insects, rely on olfaction to find their mating partners. Because synaptic transmission in sensory systems, including olfaction, is cholinergic, neonicotinoid residues could modify the chemical communication system and consequently decrease or even increase reproductive capacities in pest insects. In moths, males are attracted by female-produced sex pheromones [11]. They detect the sex pheromone through olfactory receptor neurons (ORNs) on their antennae. Attraction behaviour is elicited after central processing by neurons in the macroglomerular complex (MGC) of the primary olfactory centre, the antennal lobe (AL) and higher brain centres such as the mushroom bodies and the lateral protocerebrum [12, 13].

In insects, behavioural sex pheromone responses are submitted to modulation as a function of the physiological state or experience [14, 15]. In the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera : Noctuidae), a worldwide pest insect [16] for example, the neuronal basis of age- and mating state-dependent modulation of pheromone-guided behaviour has been investigated: the response threshold of AL neurons is modified depending on age and mating-state, whereas peripheral responses to the sex pheromone do not vary [15]. In this species, we also recently showed that low doses of clothianidin induced differential effects on male orientation towards the pheromone in a wind tunnel [17]. Orientation behaviour was improved after intoxication with 10 ng clothianidin per moth, corresponding to the LD<sub>20</sub>, whereas orientation behaviour was disturbed by a treatment with 0.25 ng per moth, corresponding to a dose 10 times lower than the LD<sub>0</sub> [17].

To investigate the neural mechanisms underlying such behavioural modifications, we tested the effects of the two above mentioned clothianidin doses on individual and global response thresholds of AL input (ORNs) and output (projection neurons) neurons, as well as on ligand-elicited currents in cultured AL neurons, to investigate potential changes in their excitability. We show that there is no peripheral effect of low clothianidin doses whereas the effect on the sensitivity of AL output neurons is dose-dependent. This correlates with the observed changes of behavioural responses after clothianidin treatment and suggests the AL as neural substrate for behavioural changes induced by clothianidin.

## Materials and Methods

### (a) Insects

Experiments were performed with laboratory-reared adult males of *A. ipsilon* fed on an artificial diet [18] in individual cups until pupation. Pupae were sexed, and males and females were kept separately at 22°C in an inversed light-dark cycle (16 h: 8 h light: dark photoperiod). Newly emerged adults were removed every day from hatching containers and given access to 20% sucrose solution *ad libitum*. The day of emergence was considered as Day 0. Four-day old virgin males of *A. ipsilon* were treated with the solvent or insecticide and experiments were performed at the age of five days.

### (b) Chemicals

Clothianidin (99% purity) was first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dilutions (0.25 ng and 10 ng) were prepared with 20% sucrose solution every week. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), unless stated otherwise.

### (c) Clothianidin intoxication

Oral application of clothianidin was accomplished as described previously [17]. Briefly, 4-day-old virgin males were restrained in plastic pipette tips with their head protruding before the onset of the scotophase. They were then fed with either 10 µl of clothianidin solution or DMSO control solution and kept in plastic containers until the next day. Intoxications were performed with the two doses that were previously shown to induce effects on behavioural responses: 0.25 ng/moth and 10 ng/moth. As control group, insects were fed with a solution of DMSO corresponding to the concentration of DMSO in the clothianidin solutions ( $5 \times 10^{-4}$  % or  $2 \times 10^{-2}$  % for the 0.25 ng or 10 ng clothianidin doses respectively). Since no significant effects of DMSO treatments as compared to untreated males had been found in behavioural experiments [17], we only used DMSO treatments as controls in the present study. Note that individual clothianidin doses were always tested in parallel with the corresponding DMSO concentrations, whereas experiments with different doses were done at different times and are therefore not directly comparable among each other due to varying effects over time.

#### (d) Odour Stimulation

For stimulation in calcium imaging and intracellular recordings, an artificial behaviourally active pheromone blend containing (Z)-7-dodecen-1-yl acetate (Z7-12:OAc), (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate (Z9-14:OAc) and (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate (Z11-16:OAc) at a ratio of 4:1:4 was used [19-21]. For single-sensillum recordings, only the major pheromone component, Z7-12:OAc was used since ORNs are tuned to individual pheromone compounds. For all experiments, pheromone stimuli were diluted in decadic steps in hexane and applied on a filter paper introduced in a Pasteur pipette. For single sensillum recordings, doses from 0.1 ng to 1  $\mu$ g of Z7-12:Ac were used. For calcium imaging experiments, the pheromone blend was tested at doses from 0.01 ng to 10 ng. For intracellular recordings, the pheromone blend was used at doses from 0.01 pg to 100 ng. A minimum evaporation time of 30 min was respected. To avoid mechanical stimulation at the odor-onset, the antennae were constantly superfused by a humidified and charcoal-filtered air stream (70 L/h). For peripheral and intracellular recordings, a 200 ms and for imaging experiments a 1 s air pulse (10 L/h) passing through a Pasteur pipette containing the stimulus on a filter paper was introduced into the constant air stream by means of a stimulation device (CS55 Syntech, Kirchzarten, Germany).

#### (e) Single-sensillum recordings

One sensillum was recorded per insect. Insect preparation and recordings were performed as described earlier [22], but using electrolytically sharpened tungsten wires (TW5-6, Science Products, Hofheim, Germany) instead of tip recordings. The recording electrode was inserted at the base of a long sensillum trichodeum located on an antennal branch. The reference electrode was inserted in the antennal stem. Recordings were done using an EX1 amplifier with a 4002 headstage (Dagan, Minneapolis, USA). The biological signal was amplified ( $\times 1000$ ), high-pass (1 Hz) and low-pass (3 kHz) filtered and sampled at 10 kHz via a 16-Bit acquisition board (CRIO-9215, National Inst., Nanterre, France) under Labview (National Inst.). Odour stimuli were applied with inter-stimulus-intervals of at least 1 min. Mean action potential frequencies were measured during the first second after stimulation onset for each tested dose and treatment. The effects of dose and treatment on the frequency of action potentials during this first second after stimulation onset were evaluated statistically using two-way ANOVAs for repeated measurements (Statistica '99, StatSoft Inc., Tulsa, USA).

#### (f) Calcium Imaging

For calcium imaging, moths were restrained individually in Plexiglas chambers, as described earlier [23]. Ten  $\mu$ l of dye solution (50 mg Calcium Green 2-AM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dissolved in 50 ml Pluronic F-127 (20% in DMSO) was bath-applied at 4° celsius for at least one hour on the opened head capsule. After washing with Ringer, recordings were done using a T.I.L.L. Photonics imaging system (Martinsried, Germany) with an epifluorescence microscope (Olympus BX-51WI, Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a 10x water immersion objective. 1004x1002 pixel images were taken with a 14-bit monochrome CCD camera (Andor iXON) during 20 s at a rate of 5 Hz. If possible, three runs of stimulations were recorded for each experimental insect. The interstimulus interval was approximately 60 s.

Identification of activated regions (regions of interest, ROIs) within the AL for each animal was done by superposing activity maps of all stimulations. Raw data were analyzed using custom-made software written in IDL (Research Systems Inc., Colorado, USA) and Visual Basic (Microsoft Excel) as described earlier [23]. Response intensities (difference between recorded signal and the estimated background normalized by the background,  $\Delta F/F$ ) and the time course of responses were averaged over all recordings within the same treatment. For statistical analysis, two-way ANOVAs for repeated measurements were used (Statistica '99, StatSoft Inc., Tulsa, US).

#### (g) Intracellular recordings

For intracellular recordings, moths were immobilized in a cut disposable pipette tip, the head protruding. The brain was exposed by removing the cuticle and overlaying tissue from the AL as described previously [24]. Standard intracellular recording techniques were used [25]. AL neurons in the MGC were penetrated randomly by inserting a recording electrode, filled with 3 M KCl close to the entrance of the antennal nerve. Data were recorded and analysed off-line using Autospike 32 software (Syntech, Kirchzarten, Germany). The neuron response threshold was determined, as previously described, as the lowest concentration, which elicited a pheromone response exceeding the hexane response by at least 20% [26]. Data are presented as cumulative threshold curves as a function of stimulus dose threshold distributions. The proportion of AL neurons responding to sex pheromone at different thresholds were compared statistically between males of different treatment groups with a R x C test of independence, by using a G-test and applying the Williams's correction [27].



#### (h) *In vitro* patch clamp recordings

ALs of three untreated (control) or clothianidin-treated (10 ng at day 4) males were dissected in saline under enzyme treatment and mechanically dissociated for each experiment. Isolated cells were prepared and kept overnight at 29°C under high humidity.

Ionic currents from AL neurons were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Signals were recorded using an Axopatch 200B amplifier, under pClamp 10.2 control (Molecular Devices). Electrodes had a tip resistance ranging between 4 and 6 MΩ when filled with the standard pipette solution containing (in mM): NaCl 5; KCl 150; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; EGTA 11; ATPMg 1; and adjusted to pH = 7.2 with KOH and 330 mosmol/l. Cells were clamped at a holding potential of -80 mV. Currents were low-pass filtered with a 4-pole Bessel filter at 5 kHz and digitally sampled at 20 kHz. Leak currents were subtracted online by P/4 protocols. Clothianidin (10<sup>-3</sup> M) and acetylcholine (10<sup>-3</sup> M) were pressure ejected (15 psig, 500 ms pulse, Miniframe, Medical System Corporation, USA) through a glass micropipette (resistance 1.8 MΩ) positioned within 100 μm from the recorded cell body.

Mean current amplitudes in neurons from control and clothianidin-treated males were compared using *t*-tests performed with SigmaPlot (v.12.0).

## Results

#### (a) Effects of clothianidin on ORN response thresholds

Extracellular recordings from individual ORNs housed in short sensilla trichodea on the antennae revealed excitatory responses to the major pheromone component (figure 1a). Responses of the recorded ORNs were not significantly different between males treated with either of the two different doses of clothianidin and the corresponding DMSO controls (figure 1b, 10 ng/moth vs. DMSO:  $F_{(1,20)} = 0.0001$ ,  $p = 0.99$ ) (figure 1c, 0.25 ng/moth:  $F_{(1,21)} = 0.102$ ,  $p = 0.75$ ).

#### (b) Effects of clothianidin on the glomerular activation pattern within the AL

Stimulation with the different pheromone doses induced typical biphasic calcium signals within the MGC, which reach their maximum approximately 2 s after odor onset (figure 2a). When comparing the clothianidin treated groups with their corresponding DMSO controls, no

difference in dose-dependent response intensities was found in both cases (figure 2b clothianidin 10 ng vs. DMSO:  $F_{(1,25)} = 1.2$ ,  $p = 0.28$ ; figure 2c, clothianidin 0.25 ng vs. DMSO:  $F_{(1,15)} = 0.21$ ,  $p = 0.65$ ).

#### (c) Effects of clothianidin on AL neuron thresholds

Intracellularly recorded AL neurons showed predominantly excitatory responses to the pheromone, followed in most cases by an inhibitory period (figure 3a), which is characteristic for MGC projection neuron responses [28]. The cumulative threshold curve obtained from neurons recorded from males treated with 10 ng clothianidin was significantly shifted to lower sex pheromone doses as compared to AL neurons in DMSO-treated controls ( $G = 30.55$ ,  $df = 7$ ,  $p \leq 0.0001$ ) (figure 3b). On the contrary, AL neurons in 0.25 ng clothianidin-treated males show a cumulative threshold curve, which is shifted significantly to higher sex pheromone doses as compared to DMSO-treated males ( $G = 29.28$ ,  $df = 7$ ,  $p \leq 0.0001$ ) (figure 3c).

#### (d) Effects of clothianidin on acetylcholine- and clothianidin-evoked currents in AL neurons

When  $10^{-3}$  M acetylcholine was applied on isolated AL neurons from clothianidin-treated (10 ng) males (figure 4), the current amplitude did not significantly differ from cells originating from untreated males (t-test:  $p = 0.904$ ,  $t = -0.124$ ,  $df = 8$ ). Similarly, we did not find any significant difference between current amplitudes of neurons from control and clothianidin-treated males after application of  $10^{-3}$  M clothianidin (t-test:  $p = 0.879$ ,  $t = 0.156$ ,  $df = 12$ ) (figure 4).

## Discussion

In the present study we show that the dose-dependent modifications of pheromone-guided behaviour observed after clothianidin intoxication [17] might originate from the effect of insecticide treatments on the sensitivity of AL neurons to the sex pheromone. Indeed, single sensillum recordings and calcium imaging approaches show no significant effect of clothianidin at the used doses as compared to the corresponding solvent controls on the responses of ORNs and on the global input response in the AL. By contrast, intracellular recordings suggest that this insecticide induces an increase or decrease in sensitivity of AL neurons depending on the clothianidin concentration used.

A low dose of another insecticide, a pyrethroid, has been shown to affect the peripheral detection of sex pheromone [29]. However, this insecticide class differs in its target from neonicotinoids: pyrethroids interact with sodium channels, modifying the excitability of the spike initiation site of ORNs [29]. The absence of effects of clothianidin on the sensitivity of pheromone-responding ORNs is not surprising when taking into consideration that, to our current knowledge, sensory neurons do not receive cholinergic input and probably don't carry acetylcholine receptors. Nevertheless, modulation of the sensory input delivered by ORNs to the AL could occur via feedback synapses from AL local neurons, *i. e.* via presynaptic inhibition. Such effects would not be sufficient to record differences at the level of the antennal sensilla but could potentially be revealed by optical imaging of AL input activity. However, optical imaging responses to the pheromone were not modified by either of the two tested clothianidin doses as compared to responses in males treated with the corresponding DMSO concentration. Therefore we assume that clothianidin indeed only affects central pheromone-sensitive AL neurons.

Patch-clamp recordings from cultured AL neurons, however, did not reveal any changes in the amplitudes of ligand-evoked currents one day after 10 ng clothianidin treatments. This absence of an effect may have multiple causes. For example, the effects observed in intracellular recordings might originate from the AL network and might involve the action of inhibitory synapses, which cannot be evaluated in cell culture. Moreover, only one relatively high dose of acetylcholine and clothianidin ( $10^{-3}$  M) has been tested to evoke currents. In future experiments also lower doses of the ligands should be used for comparing currents between treated and untreated moths.

The modulation of AL neuron sensitivity underlying behavioural plasticity in response to sex pheromone has been shown in different contexts in male noctuid moths, including *A. ipsilon*. Up- and down-regulation of AL sensitivity has been revealed as a function of adult maturation, mating and experience, whereas no or only minor sensitivity changes occur in the peripheral olfactory system [30-37]. Although the cellular and molecular mechanisms of the regulation of AL sensitivity are largely unknown, hormones (juvenile hormone, ecdysone) and biogenic amines (octopamine and dopamine) have been identified as neuromodulators involved in the different forms of behavioural plasticity in *A. ipsilon* males [26, 32, 33, 38]. Here we identified changes of pheromone sensitivity caused by the insecticide clothianidin at the same level as for other types of plasticity, even if the cellular and molecular mechanisms might be different in this case. The sensitivity of MGC neurons decreased after a treatment with a very low dose (0.25 ng) and increased after treatment with a low dose (10 ng). Even though we did not stain intracellularly recorded neurons, the observed response patterns of the majority of the neurons corresponded to the patterns observed in projection neurons in *A.*

*ipsilon* [22, 28]. Electrical properties of AL neurons or more complex effects at the AL network level might participate in the observed changes. It is also possible that the modulation of AL neuron sensitivity is caused by increased dopamine release, which has been shown to be caused by clothianidin treatments in the rat brain [39]. Even though nothing is known on clothianidin effects on dopamine release in insects so far, the recently observed role of the dopamine/steroid receptor DopEcR in regulating the sensitivity of pheromone-responding AL neurons [26] would allow this type of modulation.

Numerous studies have shown a negative effect of neonicotinoid insecticides on cognitive processes, i. e. learning and memory, especially in beneficial insects, such as the honey bee [review in 40]. However, reports on effects of these insecticides on sensory systems are rare. We show here that a dose of clothianidin below the LD0 (0.25 ng) decreases the sensitivity of AL neurons, whereas intoxication with a dose corresponding to the LD20 (10 ng) increases AL neuron sensitivity, i.e. a 100-fold lower pheromone dose is necessary to elicit a response in neurons after intoxication compared to solvent (DMSO)-treated males. This result can be compared with findings in the honey bee, showing that nicotine, a potent ligand of nAChRs, at doses of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  M can increase the sensitivity of the gustatory system to sugar, and can improve olfactory memory, even though the underlying neural mechanisms have not been investigated [41].

The differential effects of clothianidin on the central nervous pheromone responses may be explained by the involvement of distinct nAChRs sub-types with different affinities to this ligand. Different subunit combinations generate nAChRs with different pharmacological properties [42]. Certain nicotinic receptor subunits have in addition been shown to be differentially expressed in different parts of the honey bee brain, including areas treating olfactory information such as the ALs [41, 43, 44]. We hypothesize that different nAChR types with different affinities to clothianidin are expressed in different neuron types within the AL network, which could cause the opposing effects of different doses. In order to investigate which subunits are expressed in which neuron types, it would be necessary to produce antibodies against different receptor subunits and use them for immunocytochemical stainings of the brain.

### **Authors' contributions**

KKR carried out part of the electrophysiological experiments, participated in the design of experiments and data analysis, and drafted the manuscript. DC carried out part of the electrophysiological experiments, data analysis, and helped draft the manuscript. ND and JLC carried out the imaging experiments, and ND participated in data analysis, and helped

draft the manuscript. ED and GR carried out part of the electrophysiological experiments. HTL and SHT participated in the design of experiments, and helped draft the manuscript. PL and CG participated in the design of experiments and data analysis, and helped draft the manuscript. SA designed and coordinated the study, participated in part of the electrophysiological experiments and data analysis and drafted the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Acknowledgements. We thank Corinne Chauvet, Lydie Garnier and Cyril Le Corre for insect rearing.

## Funding

This work was supported by a French National Funding Agency grant ANR-12 ADAP- 0012-01, and by a grant from the « Région Pays de la Loire » to S.A. and C.G.

## References

- [1] Matsuda K, Kanaoka S, Akamatsu M, Sattelle DB. 2009 Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1-10. (doi:10.1124/mol.109.055186).
- [2] Brown LA, Ihara M, Buckingham SD, Matsuda K, Sattelle DB. 2006 Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* **99**, 608-615. (doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04084.x).
- [3] 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. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8).
- [4] Goulson D. 2013 REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* **50**, 977-987. (doi:10.1111/1365-2664.12111).
- [5] Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012 A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**, 348-350. (doi:10.1126/science.1215039).

- [6] Blacquiere T, Smaghe G, van Gestel CA, Mommaerts V. 2012 Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **21**, 973-992.
- [7] Godfray HCJ, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR. 2014 A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings: Biological Sciences* **281**. (doi:10.1098/rspb.2014.0558).
- [8] Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003 Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 175-197.
- [9] Guedes RN, Cutler GC. 2014 Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manage. Sci.* **70**, 690-697.
- [10] Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, Stout JC, Wright GA. 2015 Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* **521**, 74-76. (doi:10.1038/nature14414).
- [11] Roelofs WL. 1995 Chemistry of sex attraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 44-49.
- [12] Anton S, Homberg U. 1999 Antennal lobe structure. In *Insect olfaction* (ed. B.S. Hansson), pp. 98-125. Berlin, Springer.
- [13] Todd JL, Baker TC. 1999 Function of peripheral olfactory organs. In *Insect olfaction* (pp. 67-96, Springer).
- [14] Anderson P, Anton S. 2014 Experience-based modulation of behavioural responses to plant volatiles and other sensory cues in insect herbivores. *Plant, Cell & Environment* **37**, 1826-1835. (doi:10.1111/pce.12342).
- [15] Anton S, Dufour M-C, Gadenne C. 2007 Plasticity of olfactory-guided behaviour and its neurobiological basis: lessons from moths and locusts. *Entomol. Exp. Appl.* **123**, 1-11. (doi:10.1111/j.1570-7458.2007.00516.x).
- [16] Rings RW, Arnold FJ, Keaster AJ, Musick GJ. 1974 Worldwide annotated bibliography of the black cutworm *Agrotis ipsilon*, Hufnagel. *Ohio Agric. Res. Dev. Cent. Res. Circ.*, 1-106.
- [17] Rabhi KK, Esancy K, Voisin A, Crespin L, Le Corre J, Tricoire-Leignel H, Anton S, Gadenne C. 2014 Unexpected effects of low doses of a neonicotinoid insecticide on behavioral responses to sex pheromone in a pest insect. *PLoS ONE* **9(12)**, e114411.

- [18] Poitout S, Buès R. 1974 Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **2**, 79-91.
- [19] Gemeno C, Haynes K. 1998 Chemical and behavioral evidence for a third pheromone component in a north american population of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *J. Chem. Ecol.* **24**, 999-1011. (doi:10.1023/a:1022398318465).
- [20] Picimbon JF, Gadenne C, Bécard JM, Clément JL, Sreng L. 1997 Sex pheromone of the french black cutworm moth, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): identification and regulation of a multicomponent blend. *J. Chem. Ecol.* **23**, 211-230. (doi:10.1023/b:joec.0000006355.13207.91).
- [21] Causse R, Buès R, Barthes J, Toubon J. 1988 Mise en évidence expérimentale de nouveaux constituants des phéromones sexuelles de *Scotia ipsilon* et *Mamestra suasa*. In *Médiateurs chimiques: comportement et systématique des lépidoptères*. Coll. INRA n°46 (ed. INRA), pp. 75-82.
- [22] Barrozo RB, Jarriault D, Deisig N, Gemeno C, Monsempes C, Lucas P, Gadenne C, Anton S. 2011 Mating-induced differential coding of plant odour and sex pheromone in a male moth. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 1841-1850.
- [23] Deisig N, Kropf J, Vitecek S, Pevergne D, Rouyar A, Sandoz J-C, Lucas P, Gadenne C, Anton S, Barrozo R. 2012 Differential interactions of sex pheromone and plant odour in the olfactory pathway of a male moth. *PLoS ONE* **7**, e33159. (doi:10.1371/journal.pone.0033159).
- [24] Gadenne C, Anton S. 2000 Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth. *J. Insect Physiol.* **46**, 1195-1206.
- [25] Christensen TA, Hildebrand JG. 1987 Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* **160**, 553-569.
- [26] Abrieux A, Duportets L, Debernard S, Gadenne C, Anton S. 2014 The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect. *Front. Behav. Neurosci.* **8**. (doi:10.3389/fnbeh.2014.00312).
- [27] Sokal RR, Rohlf FJ. 1995 *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York, Freeman, W.H.; 315 p.

- [28] Jarriault D, Gadenne C, Rospars J-P, Anton S. 2009 Quantitative analysis of sex-pheromone coding in the antennal lobe of the moth *Agrotis ipsilon*: a tool to study network plasticity. *J. Exp. Biol.* **212**, 1191-1201. (doi:10.1242/jeb.024166).
- [29] Lucas P, Renou M. 1992 Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth species. *Pestic. Biochem. Physiol.* **43**, 103-115. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-3575(92)90024-T).
- [30] Anderson P, Hansson BS, Nilsson U, Han Q, Sjöholm M, Skals N, Anton S. 2007 Increased behavioral and neuronal sensitivity to sex pheromone after brief odor experience in a moth. *Chem. Senses* **32**, 483-491. (doi:10.1093/chemse/bjm017).
- [31] Anderson P, Sadek MM, Hansson BS. 2003 Pre-exposure modulates attraction to sex pheromone in a moth. *Chem. Senses* **28**, 285-291.
- [32] Anton S, Gadenne C. 1999 Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5764-5767.
- [33] Gadenne C, Dufour MC, Anton S. 2001 Transient post-mating inhibition of behavioural and central nervous responses to sex pheromone in an insect. *Proc. R. Soc. B* **268**, 1631-1635.
- [34] Gadenne C, Renou M, Sreng L. 1993 Hormonal control of pheromone responsiveness in the male black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Experientia* **49**, 721-724. (doi:10.1007/bf01923960).
- [35] Grosmaître X, Marion-Poll F, Renou M. 2001 Biogenic amines modulate olfactory receptor neurons firing activity in *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* **26**, 653-661.
- [36] Guerrieri F, Gemeno C, Monsempes C, Anton S, Jacquin-Joly E, Lucas P, Devaud J-M. 2012 Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J. Exp. Biol.* **215**, 2334-2341. (doi:10.1242/jeb.060988).
- [37] Pophof B. 2002 Moth pheromone binding proteins contribute to the excitation of olfactory receptor cells. *Naturwissenschaften* **89**, 515-518.
- [38] Jarriault D, Barrozo RB, de Carvalho Pinto CJ, Greiner B, Dufour MC, Masante-Roca I, Gramsbergen JB, Anton S, Gadenne C. 2009 Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: combined effects of octopamine and juvenile hormone. *Horm. Behav.* **56**, 185-191.



- [39] de Oliveira IM, Nunes BVF, Barbosa DR, Pallares AM, Faro LRF. 2010 Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicol. Lett.* **192**, 294-297. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.11.005).
- [40] Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. 2007 The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **52**, 81-106.
- [41] Thany SH, Gauthier M. 2005 Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res.* **1039**, 216-219.
- [42] 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.
- [43] Thany S, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M. 2003 Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **12**, 255-262.
- [44] Thany S, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G. 2005 Apis $\alpha$ 2, Apis $\alpha$ 7-1 and Apis $\alpha$ 7-2 : three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunits in the honeybee brain. *Gene* **344**, 125-132.

## Figure Legends

**Figure 1. Clothianidin does not affect ORN responses.** (a) Example of recording traces from an ORN in a trichoid sensillum stimulated with hexane and the sex pheromone in a male treated with 0.25 ng clothianidin. Bar beneath recording indicates stimulus duration (200 ms). (b, c) Average responses of tested ORNs responding to the major pheromone component (Z7-12:OAc) at different doses in males treated with 10 ng of clothianidin (b) and 0.25 ng of clothianidin (c) and the corresponding DMSO concentrations. N = 11 neurons for 2x10<sup>-2</sup> % DMSO-, 10 ng clothianidin-, 5x10<sup>-4</sup> % DMSO-, and N = 12 for 0.25 ng clothianidin-treated males.

**Figure 2. Clothianidin does not affect global AL input responses.** (a) Average time course of *in vivo* calcium responses in males treated with 0.25 ng clothianidin (N = 9). Bar beneath recording indicates stimulus duration (1 s). (b, c) Average response intensity within the AL to different pheromone doses in males treated with 10 ng of clothianidin (b) and 0.25 ng of clothianidin (c) and the corresponding DMSO concentrations. N = 13, 14, 8, and 9 ALs for 2x10<sup>-2</sup> % DMSO-, 10 ng clothianidin-, 5x10<sup>-4</sup> % DMSO-, and 0.25 ng clothianidin-treated males, respectively.

**Figure 3. Clothianidin intoxication affects response thresholds of AL neurons.** (a) Example of intracellular recording traces of an AL neuron from a clothianidin-treated (10 ng) male stimulated with hexane and the sex pheromone. Bar beneath recording indicates stimulus duration (200 ms). (b, c) Cumulative percentage of tested AL neurons responding to the pheromone blend at different thresholds in males treated with 10 ng of clothianidin (b) and 0.25 ng of clothianidin (c) and the corresponding DMSO concentrations. N = 55, 62, 66, and 54 AL neurons for 2x10<sup>-2</sup> % DMSO-, 10 ng clothianidin-, 5x10<sup>-4</sup> % DMSO-, and 0.25 ng clothianidin-treated males, respectively.

**Figure 4. Clothianidin does not affect ligand-evoked currents in cultured AL neurons.** Mean current amplitudes recorded in response to 500-ms pulses of clothianidin (10<sup>-3</sup> M) and acetylcholine (10<sup>-3</sup> M) for neurons isolated from control (white bars), and clothianidin-treated (10 ng, grey bars) males. Values in parentheses indicate number of experiments in each condition. Data are represented as mean ± SEM.

Figure 1

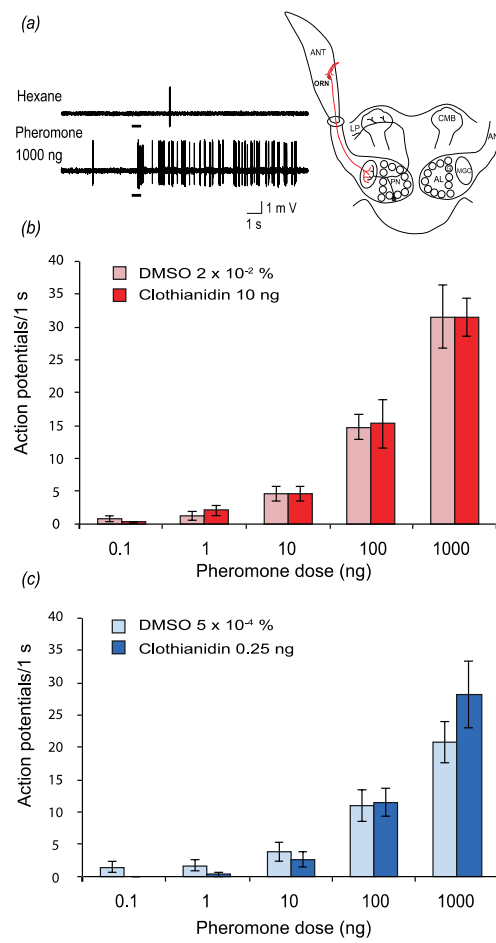


Figure 2

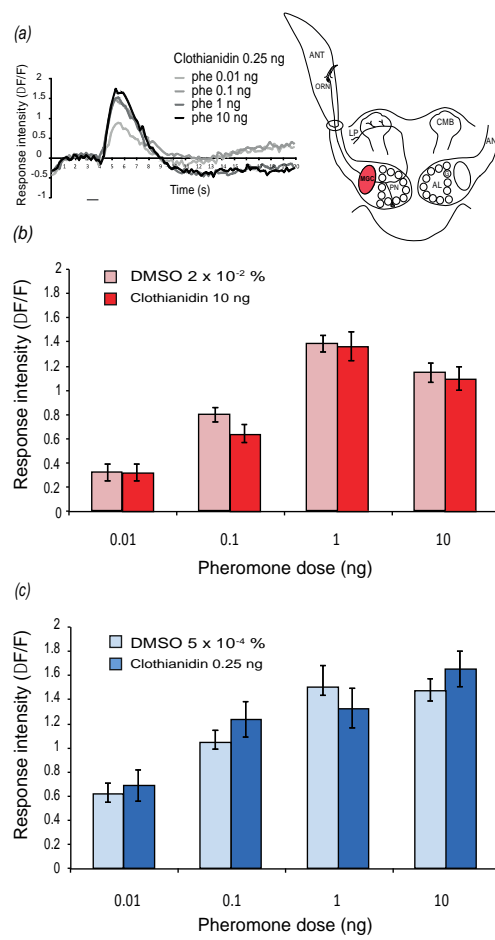


Figure 3

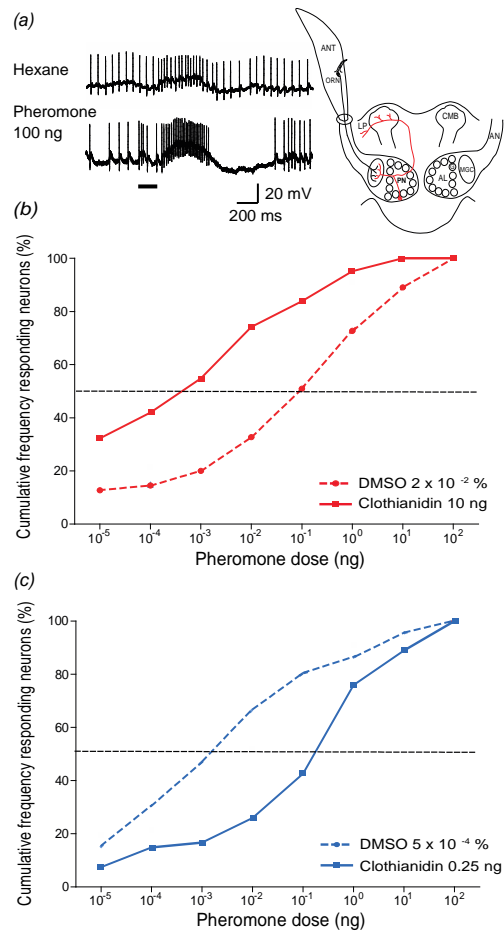
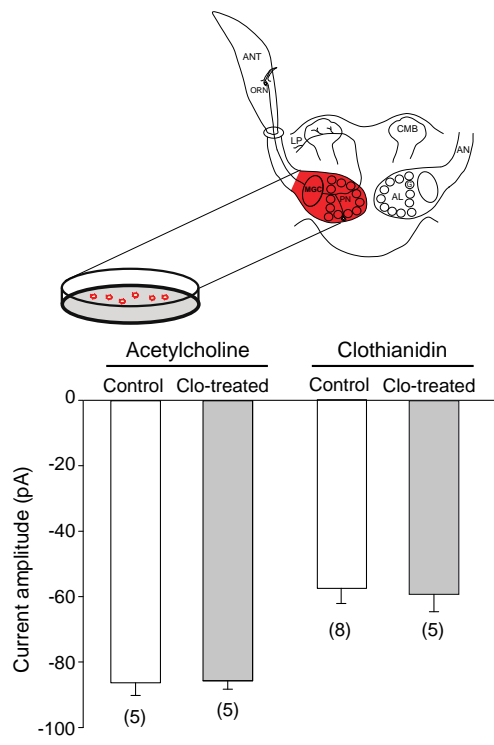


Figure 4



**Article n°3** Antoine Abrieux, Amel Mhamdi, Kaouther K. Rabhi, Julie Egon, Stéphane Debernard, Line Duportets, Hélène Tricoire-Leignel, Sylvia Anton and Christophe Gadenne.

An insecticide further enhances experience-dependent increased behavioural responses to sex pheromone in a male moth.

(Manuscrit)

## Résumé de la publication

Dans ce troisième article, nous avons évalué si les effets de la clothianidine sur le comportement d'*A.ipsilon* dépendent de la plasticité de l'olfaction en lien avec l'âge et l'expérience sensorielle. Nous avons testé les capacités de vol orienté vers la phéromone sexuelle des mâles dans un tunnel de vol après une brève pré-exposition à la phéromone et des traitements aigus à la clothianidine à différents âges. Enfin nous avons soumis les mâles sexuellement matures à la combinaison des deux traitements.

Nos résultats montrent une augmentation significative des réponses à une faible dose de la phéromone 24 h après une brève pré-exposition à une forte dose de phéromone, indépendamment de l'âge des mâles. Les réponses des mâles n'augmentent pas significativement 2 h après la pré-exposition, mais les temps de réponse sont significativement plus courts. Le traitement avec 10 ng de clothianidine améliore les réponses des mâles de 5 jours comme montré dans l'article 1, mais la même dose n'a aucun effet sur les réponses des jeunes mâles immatures de 2 jours. La combinaison de la pré-exposition à la phéromone et du traitement avec 10 ng de la clothianidine des mâles de 4 jours a un effet additif: les mâles testés à jour 5 répondent significativement plus à la phéromone que les mâles soumis à un des deux traitements seuls. Ces résultats montrent que la plasticité des systèmes sensoriels doit être pris en compte quand les effets de traitements avec des insecticides sont évalués chez des ravageurs, mais également chez des insectes non-cibles.





**An insecticide further enhances experience-dependent increased behavioural responses to sex pheromone in a male moth**

Antoine Abrieux<sup>1</sup>, Amel Mhamdi<sup>1</sup>, Kaouther Rabhi<sup>1</sup>, Julie Egon<sup>1</sup>, Stéphane Debernard<sup>2</sup>, Line Duportets<sup>2,3</sup>, Hélène Tricoire-Leignel<sup>1</sup>, Sylvia Anton<sup>1</sup>, and Christophe Gadenne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroéthologie-RCIM, INRA-Université d'Angers, UPRES EA 2647 USC INRA 1330, 42, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex, France

<sup>2</sup> Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement IEES Paris UPMC, UMR 7618, 7 quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>3</sup> Université Paris-Sud, Service d'Enseignement de Biologie Animale, 91405 Orsay, France

\* Correspondence:

Dr. Christophe Gadenne

Neuroéthologie-RCIM, INRA-Université d'Angers, UPRES EA 2647 USC INRA 1330, 42, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex, France

christophe.gadenne@angers.inra.fr

Running title: clothianidine, pre-exposure and pheromone response

Keywords: insect, pre-exposure, pheromone, insecticide, sensitization

## ABSTRACT

Neonicotinoid insecticides are widely used to protect plants against pest insects, and insecticide residues remaining in the environment affect both target and non-target organisms. Whereas low doses of neonicotinoids have been shown to disturb the behaviour of pollinating insects, a recent study has shown that they can improve sex pheromone responses in a pest insect, the male moth *Agrotis ipsilon*, and thus potentially improve reproduction. As male moth behaviour depends also on its physiological state and previous experience with sensory signals, we wondered if insecticide effects would be dependent on plasticity of olfactory-guided behaviour.

We investigated, using wind tunnel experiments, whether a brief pre-exposure to the sex pheromone could enhance the behavioural response to this important signal in the migratory moth *A. ipsilon* at different ages (sexually immature and mature males) and after different delays (2 h and 24 h), and if the insecticide clothianidin would interfere with age effects or the potential pre-exposure-effects. Brief pre-exposure to the pheromone induced an age-independent significant increase of sex pheromone responses 24 h later, whereas sex pheromone responses did not increase significantly 2 h after exposure. However, response delays were significantly shorter compared to naïve males already two hours after exposure. Oral treatment with 10 ng of clothianidin increased sex pheromone responses in sexually mature males, confirming previous results, but did not influence responses in young immature males. Males treated with 10 ng of clothianidin after pre-exposure at day 4 responded significantly more to the sex pheromone at day 5 than males treated with clothianidin only and than males pre-exposed only, revealing an additive effect of experience and the insecticide. Plasticity of sensory systems has thus to be taken into account when investigating the effects of sublethal doses of insecticides on behaviour.

## INTRODUCTION

The use of large quantities of insecticides in plant protection strategies leads to low dose residues in the environment (Jeschke et al., 2011; Goulson, 2013). The most frequently used insecticides today are neonicotinoids with a long half-life (Goulson 2013). Neonicotinoid insecticides target nicotinic acetylcholine receptors (AChRs), responsible for synaptic transmission in the central nervous system of insects and playing a major role in sensory systems (Dupuis et al., 2012). Sublethal doses of these neonicotinoids have been shown to disturb behaviour and memory performance in non-target pollinating insects (Decourtye et al., 2003; Desneux et al., 2007; Yang et al., 2008; Henry et al., 2012). On the other hand,

recent studies have discovered that low doses of neonicotinoids can improve reproduction in target insects such as aphids (Cutler et al. 2013), and that the neonicotinoid clothianidin can increase responses to sex pheromone in male moths at a specific dose (Rabhi et al. 2014). As insect behaviour is highly plastic and depends on their physiological state and previous experience, it is important to study the effects of insecticides in relation to the factors inducing plasticity of behavioural responses.

To cope with variations of their ever changing environment, insects have developed behavioural plasticity as an adaptive strategy and to increase fitness (Auld et al., 2010). This allows individuals to adapt to variations of abiotic conditions and to changes in intra- and interspecific interactions. One strategy to adapt to the environment and increase fitness is to take advantage of earlier sensory experience, i.e. learning (Agrawal, 2001). There is now strong evidence for different forms of learning, such as associative learning and configural learning that exist predominantly in social insects, e.g. honeybees, but also in non-social insects such as fruitflies and moths (DeBelle and Heisenberg, 1994; Menzel and Müller, 1996; Fan et al., 1997; Hartlieb and Hansson, 1999). However, non-associative learning such as habituation and sensitization caused by repeated exposure to sensory stimuli has been shown in many species (Rakitin et al., 1991; Walters et al., 2001). Sensory experience can affect various behaviours by influencing the function of neural circuits in both vertebrates and invertebrates (e.g., Vinson 1984; Menzel et al. 1996; Hudson 1999; Grubb and Thompson 2004).

Regarding reproduction, an accurate and rapid identification of a suitable partner is essential to avoid a waste of time and energy and to decrease the risk for predation, thus suggesting that reproductive signals should be stable and their detection less affected by experience. In most animals including insects, olfaction plays a vital role in behaviours linked with reproductive processes. In moths, males have a specialized, highly sensitive olfactory subsystem dedicated to detection and processing of the female-emitted sex pheromone, leading ultimately to an oriented behaviour towards the conspecific pheromone signal (for review see Baker 1989).

There is now evidence that prior experience also shapes the perception of reproductive sensory cues. Such a type of olfactory plasticity based on non-associative learning has been unveiled in the moth *Spodoptera littoralis*: a brief pre-exposure to sex pheromone enhances behavioural responses to sex pheromone 15 min and 24 h later (Anderson et al., 2003, 2007). Pheromone exposure was also shown to enhance peripheral pheromone detection, central nervous pheromone responses, and to induce changes in the size of the biggest glomerulus processing the main pheromone component within the antennal lobe (AL), the

primary olfactory centre (Anderson et al. 2007; Guerrieri et al., 2012). If such pre-exposure effects are also present in other insects and if they depend on the physiological state of the insect is so far unknown.

In the migratory moth, *Agrotis ipsilon*, males are not sexually mature when they hatch from the pupa and reach maturity only after a few days of adult life (Gadenne et al., 1993). As a consequence, responses of males to the sex pheromone are age-dependent: the behavioural response and the neuron sensitivity within the AL to sex pheromone increase with age (Gadenne et al., 1993; Anton and Gadenne, 1999). We considered thus this species as a suitable model to investigate if pre-exposure to the sex pheromone modifies oriented behaviour as a function of age, and to study if previously reported effects of the insecticide clothianidin on pheromone-guided behaviour of this species are dependent on age or previous experience. We used windtunnel experiments to first test the responses of young immature and older, sexually mature male *A. ipsilon* to the sex pheromone at different time intervals after pre-exposure to the pheromone. Then we compared the effects of clothianidin treatments in males of different ages. Finally, we combined pre-exposure with clothianidin treatments to investigate if the previously revealed effects of the insecticide depend on experience-induced plasticity of the olfactory system.

## MATERIALS AND METHODS

### INSECTS

Experiments were performed with adults of *A. ipsilon* originating from a laboratory colony in Angers. The colony was based on field catches in southern France and wild insects are introduced each spring. The animals were reared on an artificial diet (Poitout and Buès, 1974) in individual cups until pupation. Pupae were sexed and males and females were kept separately in an inversed light/dark cycle (16 h light: 8 h dark photoperiod, with scotophase starting at 10 am) at 22 °C. Newly emerged adults were removed from the hatching containers every day, and were given access to a 20% sucrose solution *ad libitum*. The day of emergence was considered as day 0.

### PRE-EXPOSURE PROCEDURE

All pre-exposure treatments were performed in the wind tunnel, and experiments were performed at mid-scotophase (4–7 h after lights off) under the same light and temperature conditions as for behavioural pheromone response tests (see next paragraph). The

procedure was modified from treatments published for *S. littoralis* (Anderson et al., 2007). Males of the chosen ages were transferred from the rearing room to the wind tunnel room, and placed in plastic cages (maximum of 3 males per cage) before the end of the photophase. A cage was introduced in the wind tunnel. After 30 s during which the males adjusted to the airflow, a filter paper containing the stimulus was placed 160 cm upwind from the cage. Pheromone stimulation was performed with an artificial pheromone blend containing (Z)-7-dodecen-1-yl acetate (Z7–12:OAc), (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate (Z9–14:OAc), and (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate (Z11–16:OAc) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a ratio of 4:1:4 (Picimbon et al., 1997; Gemeno et al., 1998). For pre-exposure, we used a dose of 10 ng pheromone blend, which was previously found to elicit the optimum behavioural response (Barrozo et al., 2010). Each male, kept within the cage, was submitted to pheromone stimulation during 3 min, after which it was removed from the wind tunnel and transferred or not back to the rearing cabinet. Immature (1 day-old) and mature (4 day- and 5 day-old) *A. ipsilon* males were pre-exposed, and then tested for behavioural pheromone response either the same day within 2 h after the pre-exposure treatment or 24 h later (during the next scotophase) (Figure 1).

#### CLOTHIANIDIN TREATMENTS

A clothianidin (99% purity, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution containing 10 ng of clothianidin in 10 µl of the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) was prepared as previously described (Rabhi et al. 2014). The clothianidin dose of 10 ng, which corresponds to the LD20, was chosen because this dose elicited an increase in behavioural and central nervous pheromone responses in 5 day-old *A. ipsilon* males, treated at day 4 (Rabhi et al. 2014, Rabhi et al. submitted). To study age-dependence of clothianidin treatments, 1 day-old and 4 day-old males were fed 10 µl of the clothianidin solution or the corresponding DMSO solution as a control and submitted to behavioural tests 24 h later (Figure 1).

To combine pre-exposure and clothianidin treatments, 4 day-old males were first pre-exposed in the windtunnel and then after 1 to 2 h fed the clothianidin solution under red light, to be tested at day 5 in the windtunnel (Figure 1).

#### BEHAVIOURAL PHEROMONE RESPONSE TESTS

Behavioural tests were performed using a 2 m-long flight tunnel under red light illumination as previously described (Jarriault et al., 2009). Experiments were performed during the

middle of the scotophase (4–7 h after lights off) when males respond maximally to the sex pheromone (Barrozo et al., 2010). Environmental conditions during the bioassay were held constant: 22°C, 50% relative humidity, wind speed of 0.3 ms<sup>-1</sup>. A cage containing a single experimental male was introduced in the wind tunnel. For pheromone stimulation, the same procedure as described above was used, except that the dose was this time a suboptimum dose of 1 ng pheromone blend (Barrozo et al., 2010). Only for tests with young males (day 2), who are less sensitive to the sex pheromone, 10 ng of the pheromone blend were used in order to obtain sufficient responses. The behaviour of the moths was observed for 3 min, and partial flight (half of the distance between the source and the cage), complete flight (within 2 cm of the source) and landing on the pheromone source were considered as an oriented response towards the pheromone. We also noted the latency of each oriented response. All experiments were performed blind to avoid partial observations. Each day of experiments, different groups of males were tested including at least one group of males that were expected to show a high response level to avoid experimental bias.

For the pre-exposure effect, the following 9 groups of males were tested for their pheromone response in the wind tunnel : 1 day-old pre-exposed at day-1 (D1-PE1) and control males (D1); 2 day-old pre-exposed at day-1 (D2-PE1) and 2 day-old control males (D2); 5 day-old pre-exposed at day-4 (D5-PE4), 5 day-old pre-exposed at day-5 (D5-PE5), and control males (D5); 6 day-old pre-exposed at day-5 (D6-PE5) and 6 day-old control males (D6) (Figure 1).

For the clothianidine effect, the following 6 groups of males were tested: 2 day-old DMSO- and clothianidin-treated at day-1 males (D2-DMSO and D2-CLO respectively) and control males (D2); 5 day-old DMSO- and clothianidin-treated at day-4 males (D5-DMSO and D5-CLO respectively) and control males (D5) (Figure 1).

For the combination of pre-exposure and clothianidin treatments, the following 6 groups of males were tested: 5 day-old DMSO-treated (D5-DMSO), CLO-treated (D5-CLO), pre-exposed at day-4 males (D5-PE4) and control males (D5), as well as males pre-exposed at day 4 and treated with DMSO (D5-PE4-DMSO) and 5 day-old pre-exposed and CLO-treated at day-4 males (D5-PE4-CLO) (Figure 1). Control groups were repeated for each type of experiments, because response rates can vary throughout the year.

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical differences in the percentage of responses between groups of experimental males were evaluated using a R X C test of independence by means of a G-test and applying the

Williams's correction (Sokal and Rohlf, 1995). Delays in responses of males that showed a positive oriented response were compared using the Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

### AGE-INDEPENDENT EFFECTS OF PRE-EXPOSURE

The behavioural oriented response of control males significantly increased from day-2 to day-6 ( $G = 10.55$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0.0051$ ), confirming our previous results (e.g. Gadenne et al., 1993; Duportets et al., 2013). The behavioural response of males that had been pre-exposed increased 24 h later independently of the age (Figure 2). The percentage of males that were pre-exposed, and then tested the following day performing an oriented response was significantly higher as compared with that of D2, D5 and D6 control males respectively ( $G = 4.15$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.041$ ;  $G = 7.20$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.007$ ; and  $G = 5.53$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.018$  for D2-PE1, D5-PE4, and D6-PE5 males respectively) (Figure 2A). Also response delays of D2-PE1, and D6-PE5 males were significantly shorter than that of D2, and D6 control males ( $U = 705$ ;  $p < 0.0001$ , and  $U = 1313$ ;  $p < 0.0001$  respectively), although there was no difference in response delays between D5 and D5-PE4 males ( $U = 1004.5$ ;  $p = 0.48$ ) (Figure 2B). Detailed analysis shows that there is no statistical difference in the proportions of the 3 different behavioural sequences of the oriented response (partial flight, complete flight, and landing) between the six groups of insects ( $G = 12.34$ ;  $df = 10$ ;  $p = 0.266$ ).

For the youngest and oldest age groups, responses following pre-exposure were also tested on the same day. There was no difference in the percentage of oriented responses of males that were pre-exposed and then tested the same day as compared with D1 and D5 control males ( $G = 1.98$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.159$ , and  $G = 0.48$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.486$  for D1-PE1 and D5-PE5 males tested respectively) (Figure 3A). However, the response delay of D1-PE1 and D5-PE5 was significantly shorter than that of D1 and D5 control males ( $U = 164$ ;  $p = 0.004$  and  $U = 974$ ;  $p < 0.0001$  respectively) (Figure 3B). Detailed analysis shows that there is no statistical difference in the proportions of the 3 different behavioural sequences of the oriented response (partial flight, complete flight, and landing) between the four groups of insects ( $G = 12.56$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0.0505$ ). Thus there is a short and long term pre-exposure effect on the behavioural response delay to the sex pheromone, whereas we only found a long term effect on the percentage of *A. ipsilon* males orienting towards the pheromone.

## AGE-DEPENDENT EFFECTS OF CLOTHIANIDIN

Two day-old males treated with 10 ng of clothianidin at day 1 did not change their response behaviour to the sex pheromone as compared to untreated and DMSO-treated males respectively ( $G = 0.449$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0.799$ ) (Figure 4A). Also response delays ( $U = 1.27$ ;  $p = 0.52$ ) and the distribution of the behavioural sequences ( $G = 1.19$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0.57$ ) did not change significantly in young males after clothianidin treatment (Figure 4A, B). On the contrary, the oriented response to the sex pheromone of males at day 5 increased significantly after treatment with the same dose of clothianidin at day 4 as compared to untreated and DMSO-treated males, respectively ( $G = 4.95$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.026$ ;  $G = 7.48$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.0066$  for D5/D5-CLO and D5-DMSO/D5-CLO respectively), confirming data obtained in an earlier study (Figure 4C; Rabhi et al., 2014). Also response delays decreased significantly, and the distribution of the different sequences showed a significant difference between D5 and D5-CLO ( $G = 4.93$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.026$ ) and between D5-DMSO and D5-CLO ( $G = 11.3$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.0007$ ) (Figure 4C,D). Thus the same clothianidine dose does not have the same effect on male moths of different ages.

## CLOTHIANIDIN ENHANCES PRE-EXPOSURE EFFECTS IN MATURE MALES

When combining pre-exposure with clothianidin treatments in sexually mature males, we observed a significant increase of responses to the sex pheromone as compared to either individual treatment ( $G = 5.23$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.023$  for D5-PE4-CLO versus D5-PE4;  $G = 7.01$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.008$  for D5-PE4-CLO versus D5-CLO) (Figure 5A), and response delays decreased significantly ( $U = 19.84$ ;  $p = 0.013$ ) (Figure 5B). In addition, the proportion of males landing on the pheromone source was significantly higher for pre-exposed males treated with clothianidin as compared with males treated with clothianidin only ( $G = 8.63$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.033$ ) and with males pre-exposed only ( $G = 8.74$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.031$ ).

## DISCUSSION

In this study, we show that experience affects pheromone responses in *A. ipsilon* males in a similar way at different ages, whereas the insecticide clothianidin at a constant dose only affects behaviour in sexually mature males. Pre-exposure and clothianidin treatment applied together lead to a further increased behavioural response both in terms of an increased percentage of responding males and a reduced response delay.



The results in *A. ipsilon*, revealing a positive pheromone pre-exposure effect (enhancement of pheromone response) confirm previous results obtained in *S. littoralis* (Anderson et al., 2003, 2007), and extend the findings to sexually immature males. In *S. littoralis*, pre-exposure experiments and behavioural pheromone tests were performed only with sexually mature 2- to 3-day-old males and it was suggested that pre-exposure elicits a sensitization to the pheromone (Anderson et al., 2003, 2007; Minoli et al., 2012). Here we show that the behavioural pheromone pre-exposure effect is age-independent in *A. ipsilon*: it was detected not only in mature males, but also in young immature males, indicating that pre-exposure might accelerate maturation of the pheromone processing system.

As opposed to the age-independent pre-exposure effects, we did not observe a behavioural effect of oral treatment with 10 ng of clothianidin in young immature males, a dose which has previously been shown to elicit an hormetic-like effect, *i.e.* increased pheromone responses in sexually mature males (Rabhi et al., 2014). Even though this result shows that clothianidin effects seem to be age-dependent in *A. ipsilon*, further studies using different doses of the insecticide are needed to confirm this result. Our toxicity tests of clothianidin on *A. ipsilon* have shown that young males are less affected by the same doses than older males (data not shown): whereas the dose of 10 ng corresponds to the LD 20 in 5-day-old males, it does not cause mortality in 2-day-old males. A differential effect of sublethal doses of insecticides as a function of age has been described in other insects before and might be due to varying activity of detoxification enzymes at different age (Banken and Stark, 1997; Bouvier et al., 2002, Leonova and Slynko, 1996). We have therefore determined the LD 20 dose in immature males (500 ng, data not shown). Unfortunately, we were not able to perform behavioural tests with males treated with this dose of clothianidin, because most of the surviving males were not able to fly, contrary to 4-day-old males surviving the corresponding LD 20 dose (10 ng).

When combining pre-exposure and clothianidin treatments in mature males, we found an additive effect on behavioural responses, which indicates that sensory experience influences the effect of the insecticide in this target insect. These combined effects lead to the question, if experience and insecticide effects (and eventually also age-effects) might originate from similar modulatory mechanisms.

Even though the olfactory system of *S. littoralis* is modified by brief pre-exposure, eliciting increased sensitivity of peripheral and more pronouncedly in antennal lobe neurons as well as an increase in the volume of the pheromone-processing cumulus of the macroglomerular complex within the antennal lobe (Anderson et al. 2007; Guerrieri et al. 2012), nothing is known so far on the neuromodulators potentially involved in these changes.

In *A. ipsilon*, on the other hand, we have previously shown that the maturation of behavioural and neuronal pheromone responses in *A. ipsilon* can be accelerated by hormonal treatments, *i.e.* injections of JH or 20E (Gadenne et al., 1993; Anton and Gadenne, 1999; Duportets et al., 2013), at the behavioural level by the application of DA (Abrieux et al. 2014) and at the neuronal level, without behavioural effect, by application of OA (Jarriault et al., 2009). In addition to the effects on immature males, we show here that pre-exposure of sexually mature males still enhances their behavioural pheromone response, reaching very high levels (more than 80% responses). These results further confirm that behavioural responses of naïve sexually mature *A. ipsilon* males can still be increased by neuromodulation, as previously shown for example by OA treatments (Jarriault et al., 2009), but not 20E treatments (Duportets et al., 2013).

As for neuronal plasticity as a function of age, the increased behavioural responses of *A. ipsilon* males to the pheromone after a treatment with 10 ng of clothianidin are correlated with increased sensitivity of antennal lobe neurons (Rabhi et al. 2015 submitted). We can therefore speculate that similar modulatory mechanisms might be involved in the two processes. In support of this hypothesis, an increase in DA synthesis has been reported in the rat brain after clothianidin treatment (de Oliveira et al. 2010). Future studies should therefore explore the role of this biogenic amine in the different forms of olfactory plasticity, including insecticide effects.

## CONCLUSIONS

We present here *A. ipsilon* as a favorable model insect to study neural and molecular mechanisms of sensory plasticity including effects caused by insecticides, because broad knowledge on different forms of plasticity is accumulating in this insect with an easily accessible nervous system, existing transcriptomic information and well-established behavioural tests. We might now be able to link behavioural effects with molecular and cellular mechanisms by combining molecular, pharmacological and electrophysiological approaches.

In addition, our findings provide important information in the context of plant protection, because they show that an insecticide can, via the bias of their sensory systems, increase reproduction of a pest insect even further as a function of behavioural and neural plasticity. When studying effects of sublethal doses of insecticides, plasticity of sensory systems thus has to be taken into account.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Le Corre and L. Garnier for help in insect rearing. This work was supported by a PhD grant to A. Abrieux, and research grant from Région Pays de la Loire to S. Anton and C. Gadenne, as well as a grant from the National French Funding Agency ANR (ANR-12 ADAP-0012-01) to S. Anton, C. Gadenne and H. Tricoire-Leignel. A. Mhamdi was supported by a grant from the Agronomy Institute Chott Meriem, Tunisia.

## REFERENCES

- Abrieux, A., Duportets, L., Debernard, S., Gadenne, C., and Anton, S. (2014). The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect. *Front Behav. Neurosci.*, 8, Article 312
- Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294, 321-326.
- Anderson, P., Hansson, B.S., Nilsson, U., Han, Q., Sjöholm, M., Skals, N., and Anton, S. (2007). Increased behavioral and neuronal sensitivity to sex pheromone after brief odor experience in a moth. *Chem. Senses* 32, 483-491.
- Anderson, P., Sadek, M.M., and Hansson, B. (2003). Pre-exposure modulates attraction to sex pheromone in a moth. *Chem. Senses* 28, 285-291.
- Anton, S., and Gadenne, C. (1999). Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5764-5767.
- Auld, J.R., Agrawal, A.A., and Relyea, R.A. (2010). Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proc. R. Soc. B* 277, 503-511.
- Baker, T. C. (1989). Sex pheromone communication in the lepidoptera: New research progress. *Cell. Mol. Life Sci.*, 45, 248-262.
- Banken, J., and Stark, J. D. (1997). Stage and age influence on the susceptibility of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) after direct exposure to Neemix, a neem insecticide. *J. Econ. Entomol.* 90, 1102-1105.
- Barrozo, R.B., Gadenne, C., and Anton, S. (2010). Switching attraction to inhibition: mating-induced reversed role of sex pheromone in an insect. *J. Exp. Biol.* 213, 2933-2939.
- Bouvier, J. C., Boivin, T., and Beslay, D. (2002). Age-dependent response to insecticides

- and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51, 55-66.
- Cutler, G.C. (2013). Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose-Response* 11, 154-177.
- De Oliveira, I.M., Nunes, B.V.F., Barbosa, D.N.R., Pallares, A.M., and Faro, L.R.F. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicol. Lett.* 192, 294-297.
- DeBelle, J.S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263, 692-695.
- Decourtye, A., Lacassie, E., and Pham-Delègue, M.-H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.* 59, 269–278.
- Desneux, N., Decourtye, A., and Delpuech, J.-M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106.
- Duportets, L., Maria, A., Vitecek, S., Gadenne, C., and Debernard, S. (2013). Steroid hormone signaling is involved in the age-dependent behavioral response to sex pheromone in the adult male moth *Agrotis ipsilon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 58-66.
- 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. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1553–1564.
- Fan, R.-J., Anderson, P., and Hansson, B.S. (1997). Behavioural analysis of olfactory conditioning in the moth *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Exp. Biol.* 200, 2969-2976.
- Gadenne, C., Renou, M., and Sreng, L. (1993). Hormonal control of sex pheromone responsiveness in the male black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Experientia* 49, 721-724.
- Gemeno, C., and Haynes, K.F. (1998). Chemical and behavioral evidence for a third pheromone component in a north american population of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *J. Chem. Ecol.* 24, 999-1011.
- Goulson, D. (2013). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977-987.
- Grubb, M., and Thompson, I.D. (2004). The influence of early experience on the

- development of sensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 503-512.
- Guerrieri, F., Gemeno, C., Monsempes, C., Anton, S., Jacquin-Joly, E., Lucas, P., and Devaud, J.-M. (2012). Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J. Exp. Biol.* 215, 2334-2341.
- Hartlieb, E., Hansson, B.S., and Anderson, P. (1999). Sex or food? Appetitive learning of sex odors in a male moth. *Naturwissenschaften* 86, 396-399.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350.
- Hudson, R. (1999). From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function. *J. Comp Physiol. A*, 185, 297-304.
- Jarriault, D., Barrozo, R.B., De Carvalho Pinto, C.J., Greiner, B., Dufour, M.C., Masante-Roca, I., Gramsbergen, J., Anton, S., and Gadenne, C. (2009). Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: Combined effects of octopamine and juvenile hormone. *Horm. Behav.* 56, 185-191.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., and Elbert, A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897-2908.
- Leonova, I. N., and Slynko, N. M. (1996). Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm, *Heliothis armigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32, 157-172.
- Menzel, R., and Mueller, U. (1996). Learning and memory in Honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 379-404.
- Menzel, R., Hammer, M., Muller, U., and Rosenboom, H. (1996). Behavioral, neural and cellular components underlying olfactory learning in the honeybee. *J. Physiol. (Paris)* 90, 395-398.
- Minoli, S., Kauer, I., Colson, V., Party, V., Renou, M., Anderson, P., Gadenne, C., Marion-Poll, F., and Anton, S. (2012). Brief Exposure to Sensory Cues Elicits Stimulus-Nonspecific General Sensitization in an Insect. *PLoS ONE* 7, e34141.
- Picimbon, J., Gadenne, C., Becard, J., Clément, J., and Sreng, L. (1997). Sex pheromone of the French black cutworm moth, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): Identification and regulation of a multicomponent blend. *J. Chem. Ecol.* 23, 211-230.

- Poitout, S., and Buès, R. (1974). Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91.
- Rabhi, K.K., Esancy, K., Voisin, A., Crespin, L., Le Corre, J., Tricoire-Leignel, H., Anton, S., and Gadenne, C. (2014). Unexpected effects of low doses of a neonicotinoid insecticide on behavioral responses to sex pheromone in a pest insect. *PLoS One* 9(12), e114411.
- Rakitin, A., Tomsic, D., and Maldonado, H. (1991). Habituation and sensitization to an electrical shock in the crab *Chasmagnathus*. Effect of background illumination. *Physiol. Behav.* 50, 477-487.
- Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman, W.H.
- Vinson SB. (1984) Parasitoid-host relationships. In: Bell, W.J., Carde, R.T., editors. *Chemical ecology of insects*. London: Chapman and Hall. p. 205-233.
- Walters, E.T., Illich, P.A., Weeks, J.C., and Lewin, M.R. (2001). Defensive responses of larval *Manduca sexta* and their sensitization by noxious stimuli in the laboratory and field. *J. Exp. Biol.* 204, 457-469.
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., and Chang, L.H. (2008). Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101, 1743-1748.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Design of experiments. Treatments were performed on 1-day-, 4-day-, and 5-day-old males, and behavioral tests in wind tunnel were performed either the same day of treatment or 24 h later. Test: behavioral test in wind tunnel.

**Figure 2.** Effect of pheromone pre-exposure on pheromone responses of *A. ipsilon* males of different ages tested 24 h after treatment. One-day-, 4-day- and 5-day-old males were pre-exposed for 3 min with 10 ng of the pheromone blend, and their oriented response to a 1 ng pheromone blend was analyzed in wind tunnel experiments 24 h later (D2-PE1, D5-PE4 and D6-PE5 respectively). Unexperienced 2-day-, 5-day- and 6-day-old males (D2, D5, and D6 males respectively) were used as controls. **(A)** Percentage of males showing oriented response. **(B)** Response delay and standard deviation of males showing oriented responses. Oriented pheromone responses are increased 24 h after brief pre-exposure independently of age. Numbers in bars indicate the numbers of males tested (A) and the number of males that showed an oriented response (B). Bars with the same letter are not significantly different (G-test for (A), Mann-Whitney test for (B),  $P < 0.05$ ).

**Figure 3.** Effect of pheromone pre-exposure on pheromone responses of *A. ipsilon* males of different ages tested the same day of treatment. One-day- and 5-day-old males were pre-exposed for 3 min with 10 ng of the pheromone blend, and their oriented response to a 1-ng pheromone blend was analyzed in wind tunnel experiments between 1 and 2 h later (D1-PE1 and D5-PE5 respectively). Unexperienced 1-day- and 5-day-old males (D1 and D5 males respectively) were used as controls. **(A)** Percentage of males showing oriented response. **(B)** Response delay and standard deviation of males showing oriented responses. Oriented pheromone responses of *A. ipsilon* males do not increase significantly, but occur with shorter delays less than 2 h after brief pre-exposure independently of age. Numbers in bars indicate the numbers of males tested (A) and the number of males that showed an oriented response (B). Bars with the same letter are not significantly different (G-test for (A), Mann-Whitney test for (B),  $P < 0.05$ ).

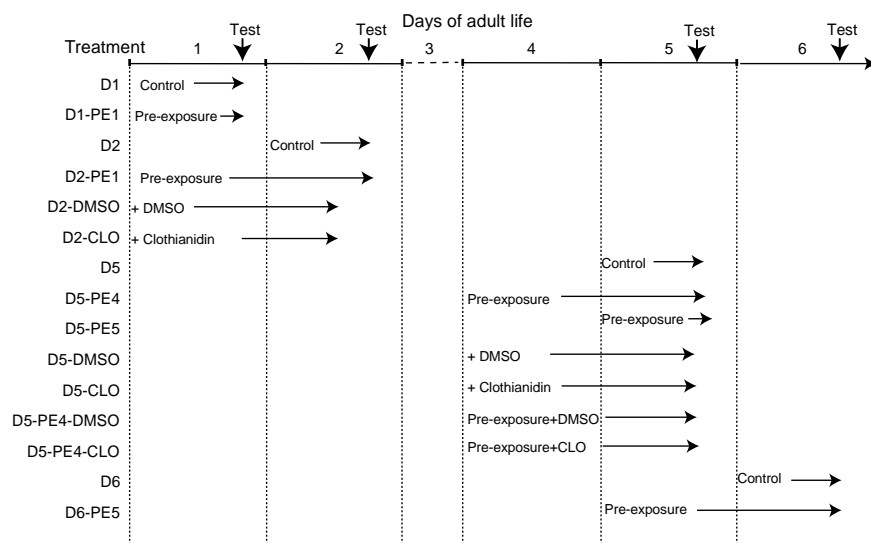
**Figure 4.** Effect of clothianidine treatment on pheromone responses of *A. ipsilon* males of different ages. One- and 4-day-old males were orally treated with 10 ng of clothianidin and

their oriented response to a 10 and 1 ng pheromone blend was analyzed in wind tunnel experiments 24 h later (D2-CLO and D5-CLO respectively). Unexperienced 2-day- and 5-day-old males (non treated D2 and D5 and DMSO-treated D2-DMSO and D5-DMSO males respectively) were used as controls. **(A, C)** Percentage of 2-day-old and 5-day-old males respectively showing oriented response. **(B, D)** Response delay and standard deviation of 2-day-old and 5-day-old males respectively showing oriented responses. Oriented pheromone responses improve after clothianidin treatment in 5-day-old, but not in 2-day-old *A. ipsilon* males. Numbers in bars indicate the numbers of males tested (A, C) and the number of males that showed an oriented response (B, D). Bars with the same letter are not significantly different (G-test for (A, C), Mann-Whitney test for (B, D),  $P < 0.05$ ).

**Figure 5.** Effect of the combined treatment of pre-exposure and clothianidine on pheromone responses of 5-day-old *A. ipsilon* males. Four-day-old males were pre-exposed with 10 ng of the pheromone blend and subsequently orally treated with 10 ng of clothianidin. Behavioural responses to 1 ng of the pheromone blend were observed in the windtunnel 24 h later (D5-PE4-CLO). Unexperienced and solvent-treated males, as well as pre-exposure- or clothianidin-treated males were used as controls. **(A)** Percentage of males showing oriented response. **(B)** Response delay and standard deviation of males showing oriented responses. Clothianidin further enhances oriented pheromone responses of *A. ipsilon* males after brief pre-exposure. Numbers in bars indicate the numbers of males tested (A) and number of males that showed an oriented response (B). Bars with the same letter are not significantly different (G-test for (A), Mann-Whitney test for (B),  $P < 0.05$ ).



Figure 1



**Figure 2**

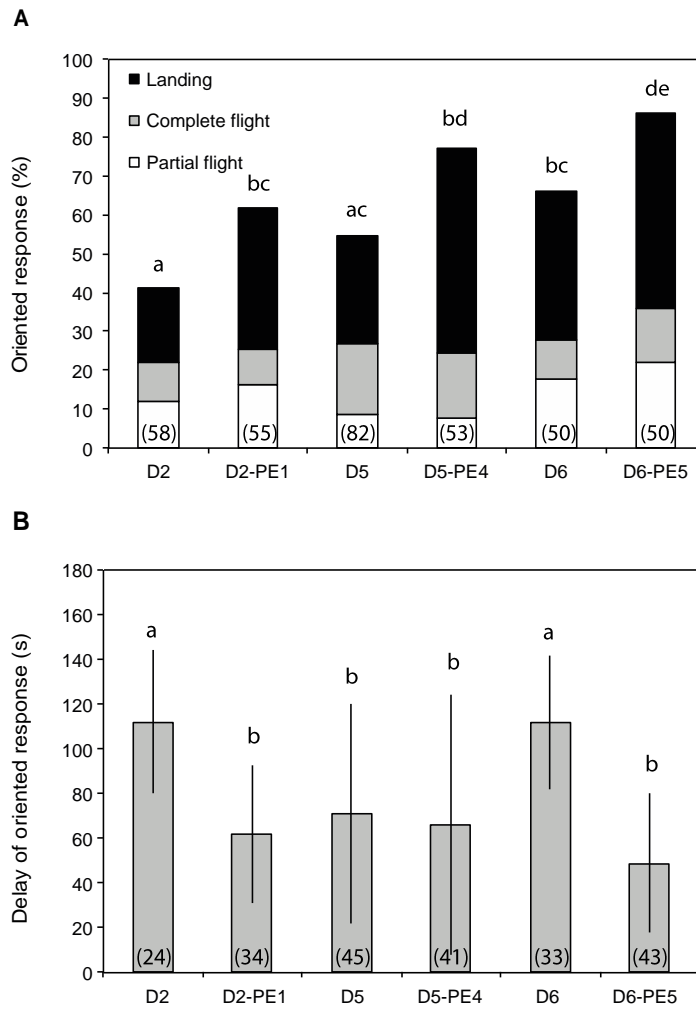


Figure 3

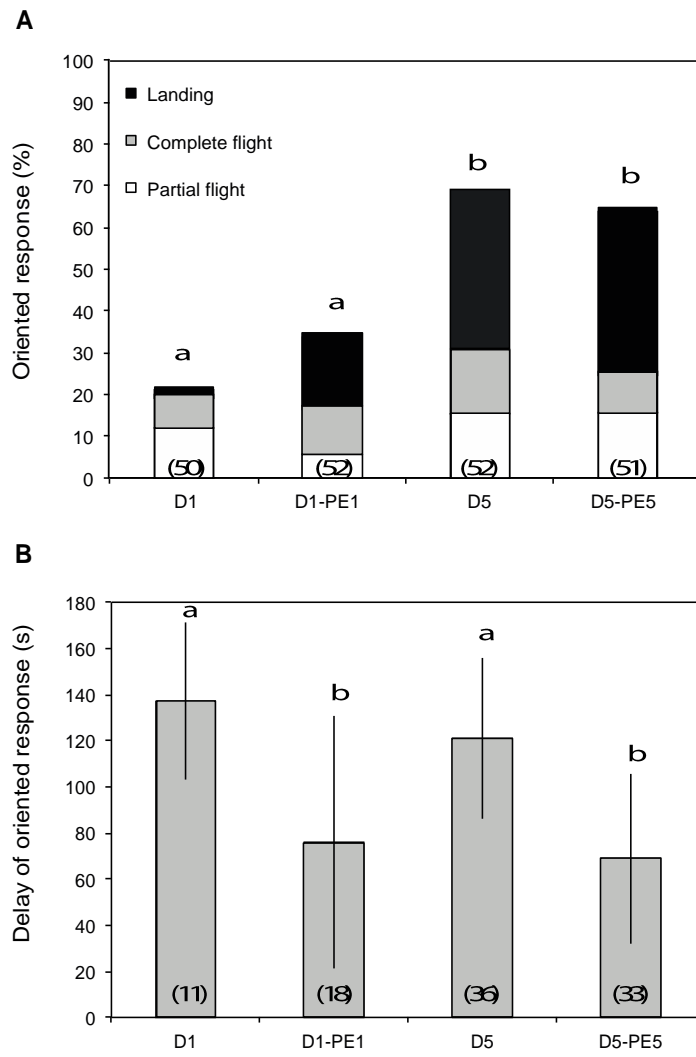


Figure 4

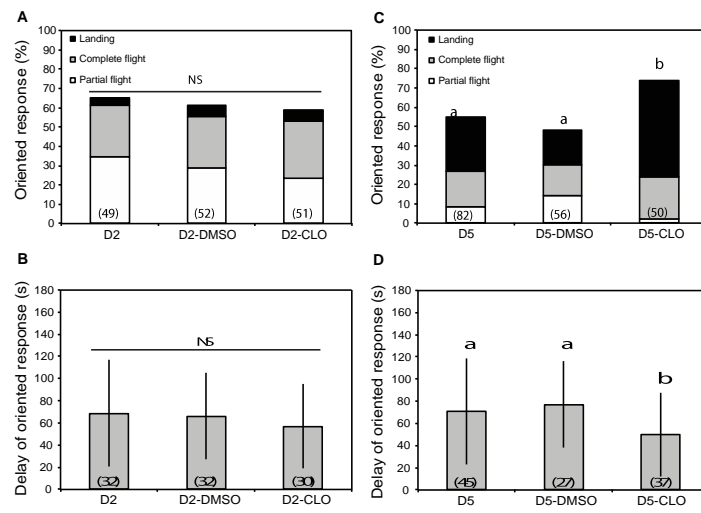
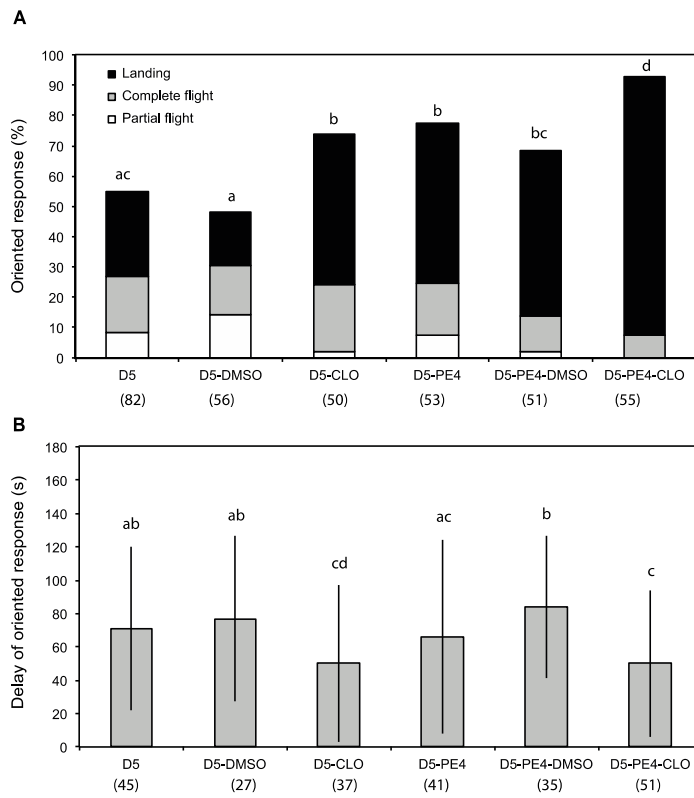


Figure 5





**Article n°4** Kaouther K. Rabhi, Sylvia Anton, Christophe Gadenne and Hélène Tricoire-Leignel. Effects of low doses of the neonicotinoid clothianidin, which modulate pheromone responses in the pest insect, *Agrotis ipsilon*, on the expression of its nicotinic acetylcholine receptors

(Manuscrit)

## Résumé de la publication

Dans ce quatrième article, nous avons identifié et cloné des sous-unités des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine chez *A. ipsilon* et nous avons étudié le taux d'expression des sous-unités en fonction du traitement avec la clothianidine. En utilisant une banque cDNA, du clonage et des analyses d'homologie par BLAST, nous avons identifié sept sous unités  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$  des nAChRs. Toutes les séquences montrent une boucle de cystéines (cys-loop) et quatre domaines transmembranaires et s'apparentent bien aux sous-unités identifiées chez d'autres espèces de papillons de nuit.

L'analyse de l'expression des sous-unités dans le cerveau entier ne montre pas de différences significatives entre les mâles d'*A. ipsilon* traités avec 10 ng de la clothianidine par rapport à des mâles traités avec le DMSO. Ceci peut être dû à des changements différentiels de sous-unités dans différentes parties du cerveau avec des rôles fonctionnels différents. Des résultats préliminaires sur l'expression des sous-unités dans le lobe antennaire montrent par contre une baisse d'expression de toutes les sous-unités sauf l' $\alpha 4$  après le traitement avec 10 ng de clothianidine. Ces changements dans l'expression des sous-unités nicotiques pourraient jouer un rôle dans les changements de la sensibilité des neurones du lobe antennaire et du comportement sexuel, observés préalablement après le traitement avec la clothianidine.





**Effects of low doses of the neonicotinoid clothianidin, which modulate pheromone responses in the pest insect *Agrotis ipsilon*, on the expression of its nicotinic acetylcholine receptors**

Kaouther K. Rabhi, Sylvia Anton, Christophe Gadenne and Hélène Tricoire-Leignel\*

INRA/Université d'Angers, Neuroéthologie-RCIM, UPRES-EA 2647 USC INRA 1330, 42, rue Georges Morel, F-49071 Beaucouzé, France

\*Corresponding author

Dr. Hélène Tricoire-Leignel

Neuroéthologie-RCIM, INRA-Université d'Angers, UPRES EA 2647 USC INRA 1330, 42, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex, France

E-mail: [helene.leignel@univ-angers.fr](mailto:helene.leignel@univ-angers.fr)

**Keywords** : Neonicotinoid, nicotinic acetylcholine receptor, sublethal dose, olfaction, moth

## Abstract

Insect pest management relies mainly on neurotoxic insecticides, including neonicotinoids, which tend to accumulate in the environment. These residues have not only negative effects on insect pests, thus improving their control, but also on beneficial insects such as honeybees. On the contrary, low doses of insecticides can have positive effects on pest insects by enhancing various life traits. Moths, which include many pest species as larvae, rely on female-emitted sex pheromone perception for their reproduction. We recently showed that treatments with different sublethal doses of the neonicotinoid clothianidin could either enhance or decrease the behavioural and central nervous responses to pheromone in the male moth, *Agrotis ipsilon*. As an agonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), clothianidin might impair cholinergic olfactory synaptic transmission. To investigate the possibility that nAChRs could participate in the observed clothianidin-induced modulation of pheromone perception in *A. ipsilon* males, we cloned seven  $\alpha$  and one  $\beta$  nAChR subunits in this species, and we tested the effects of the dose of clothianidin enhancing behavioural responses to the pheromone on their expression. When using whole brain tissue, we did not find any significant changes in expression for any of the subunits in clothianidin- relative to solvent-treated males. Preliminary results for antennal lobe tissue, however, indicate a down-regulation of the expression of most subunits in clothianidin- as compared to solvent-treated males. The lack of effect in whole brain tissue might be due to up- and downregulation occurring in different parts of the brain, canceling out each other, whereas the potential expression differences observed in the antennal lobes, might play a role in the sensitivity changes of central olfactory neurons.

## Introduction

Currently, pest management strategies rely mainly on neurotoxic insecticides, including neonicotinoids. Neonicotinoids, such as the widely used clothianidin, have insecticidal effects on a broad range of insect pests (Jeschke et al., 2011). Due to their widespread use and long half-life, neonicotinoid residues accumulate in the environment (Goulson, 2013). At the physiological level, these insecticides cause excitatory, depressive and paralytic symptoms, limiting insect movements, before their death as expected. Because of their long half life, neonicotinoid residues remain in the environment and have been shown to elicit negative effects on non-target insects such as honey bees, impairing foraging behaviour and learning and memory functions (review in Blacquiere et al., 2012; Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Decourtye and Devillers, 2010).

A contrario, we recently showed that low doses of the neonicotinoid clothianidin induced hormetic-like effects on male orientation towards the pheromone in a wind tunnel in the moth *A. ipsilon* (Rabhi et al., 2014). In particular, orientation behaviour was improved after intoxication with 10 ng clothianidin per moth, corresponding to the LD20 (Rabhi et al., 2014). We also found that central, but not peripheral olfactory neurons increase their sensitivity to the sex pheromone after intoxication with 10 ng clothianidin (Rabhi et al. this thesis, Part 2 Article 2), but nothing is known on the molecular mechanisms involved in this hormetic-like effect.

Neonicotinoids act selectively on the insect central nervous system as full, super or partial agonists of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), and thus disturb synaptic transmission (Matsuda et al., 2001; Tomizawa and Casida, 2003; Brown et al. 2006; Tan et al., 2007). nAChRs belong to the Cys-loop ligand-gated ion channels (LGICs) superfamily, which also includes the GABA, glycine, and 5-HT<sub>3</sub> receptors (Dupuis et al., 2012) nAChRs are pentameric LGICs, the five subunits being symmetrically or pseudosymmetrically arranged around a central ion-conducting pore, forming homo- or heteropentamers of related subunits. Different subunits constitute distinct receptor subtypes with different pharmacological and functional properties. Ten to 12 specific genes coding for different receptor subunits have been detected in the genome of various insect species (Jones and Sattelle, 2010; Shao, 2007) and are present in different parts of the central nervous system (Thany et al., 2003; 2005). The presence or absence of receptor subunits has been shown to modify the affinity for certain ligands (Lansdell and Millar, 2000) and neonicotinoid insecticides can up- or down-regulate the expression of subunit genes differentially (Yu et al., 2011; Taillebois et al. 2014). In the housefly *Musca domestica*, neonicotinoid-resistant strains showed a low expression of the Mda2 nAChR subunit (Markussen and Kristensen, 2010). In the honey bee, knockdown of the Amela8 subunit by RNA interference impaired olfactory learning and memory processes (Louis et al., 2012).

Because synaptic transmission in sensory systems, including olfaction, is cholinergic, and because most pest insects use olfactory cues in the context of reproduction, neonicotinoid residues could modify their chemical communication system. As a first step to investigate the molecular basis of neonicotinoid effects on olfactory-guided behaviour in insects, we identified and cloned the different nAChR subunits in *A. ipsilon* males. Because the genome of this insect is not yet available, partial sequences of 8 subunits were identified from a cDNA bank (E. Jacquin-Joly, personal communication), or through cloning experiments using nAChR subunit specific primers. We then investigated the effect of the sublethal dose eliciting improved pheromone attraction in males of *A. ipsilon* on the nAChR subunit

expression in the brain and more specifically in the primary olfactory centre, the antennal lobe, using qPCR.

## Materials and Methods

### Insects and tissue collection

Experiments were performed with adults of *A. ipsilon* originating from a laboratory colony in Angers. The colony was based on field catches in southern France and wild insects are introduced each spring. The animals were reared on an artificial diet (Poitout and Buès, 1974) in individual cups until pupation. Pupae were sexed and males and females were kept separately in an inversed light/dark cycle (16 h light: 8 h dark photoperiod, with scotophase starting at 10 am) at 22 °C. Newly emerged adults were removed from the hatching containers every day, and were given access to a 20% sucrose solution *ad libitum*. The day of emergence was considered as day 0.

For expression studies, brains of experimental and control males were dissected under Ringer's solution 24 h after treatments with clothianidin or the solvent DMSO. The tissues were immediately flash-frozen in Eppendorf vials kept in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further treatment.

### Chemicals

Clothianidin (99% purity) was first dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dilutions with 10  $\mu$ l containing 10 ng of clothianidin were prepared with 20% sucrose solution every week. All chemicals, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), unless stated otherwise.

### Clothianidin intoxication

Oral application of clothianidin was accomplished as described previously (Rabhi et al., 2014). Briefly, 4-day-old virgin males were restrained in plastic pipette tips with their head protruding before the onset of the scotophase. They were then fed with either 10  $\mu$ l of clothianidin solution or DMSO control solution and kept in plastic containers until the next day. Intoxications were performed with the 10 ng/moth dose that was previously shown to induce a positive effect on behavioural and central nervous responses to the pheromone (Rabhi et al. 2014, Rabhi et al. this thesis, Part 2 Article 2). As control group, insects were

fed with a solution of DMSO corresponding to the concentration of DMSO in the clothianidin solution ( $2 \times 10^{-2}$  %).

#### RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted with TRIzol reagent (TRI Reagent®, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and were quantified by spectrophotometry at 260 nm. DNase treatment was performed (1 Unit DNase I, Invitrogen) during 15 min at room temperature followed by an inactivation of 10 min at 65°C. After DNase treatment, single stranded cDNAs were synthesized from total RNAs (1 µg) with SuperScript III Reverse Transcriptase (First Strand Synthesis Supermix, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

#### Cloning of the nAChR subunits

Although the *A. ipsilon* genome is not available, a cDNA bank established earlier by E. Jacquin-Joly (UMR IEES Versailles, Paris) was used to identify partial or full-length sequences of nAChR subunits, through the BLAST program (Altschul and Lipman, 1990) based on gene databank as Genbank® (Benson et al., 2013) (Table 1). Specific primers of each subunit were designed from potential identified sequences in order to check the sequence and/or to amplify cDNA missing ends. Some primers were also designed from subunit sequences available in *Heliothis virescens*, the phylogenetically closest moth and from *Bombyx mori*, a moth with the whole genome sequenced (Table 2).

PCRs were carried out with 200 ng of brain cDNA using 1.5 units of GoTaq® DNA polymerase (Promega). The primer sets (*A. ipsilon* specific primers, *H. virescens* primers or two species primers) were added thereafter at 0.25 µM and each dNTP at 0.2 mM. Following an initial 5 min denaturation at 94 °C, the thermal amplification procedure included 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60 °C to 68 °C (depending on the primer set used) for 30 s, elongation at 72 °C for 30 s and then final elongation at 72 °C for 5 min.

When appropriate, RACE-PCR was performed in order to identify the 5' and/or 3' missing regions of a subunit cDNA sequence (GeneRacer™ kit, Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

PCR products were purified by agarose gel electrophoresis (NucleoSpin® Extract II, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and cloned into pCR™4-TOPO® plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After colony isolation, DNA minipreps were prepared (NucleoSpin® Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren,

Germany) and one to three DNA clones containing the proper insert for each subunit were then sequenced (GATC Biotech SARL, Mulhouse, France). Bioinformatic analyses using BLAST program (Altschul and Lipman, 1990) were carried out to identify the obtained sequences, which were processed to alignment using MUSCLE 3.7 program (Edgar, 2004). The transmembrane domains of each sequence were predicted using the TMHMM server 2.0 (Krogh et al., 2001).

To assess the identity of the 8 putative *A. ipsilon* nAChR subunits, available amino acid sequences for *B. mori*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Cydia pomonella* and *H. virescens* were retrieved from the NCBI database. The multiple protein sequence alignment was constructed with MUSCLE 3.7 (Edgar, 2004) and the ambiguously aligned regions were removed using Gblocks 0.91b (Talavera and Castresana, 2007) with the following options: MNSCP= 31, MNSFP= 31, MNCNP= 8, MLB= 5; allowed gap positions: with half. This analysis retrieved 348 informative positions (29% of the original 1194 positions) mainly at the transmembrane domains and well-conserved extracellular loops. Phylogenetic analyses based on the Maximum Likelihood (ML) method and the site-homogeneous GTR + G model for each gene (General Time model Reversible model framework, with gamma distributed rates among sites) were carried out using RAxML 8 (Stamatakis et al., 2008). The phylogenetic tree based on 100 bootstrap replicates was displayed using the TreeView application (Page, 1996)

#### Relative expression of nAChR subunits using qPCR

Based on previous results in the pea aphid (Taillebois et al., 2014), we investigated the effect of intoxication with a low dose of clothianidin on nAChR subunit expression in *A. ipsilon* using qPCR. Specific primers for each subunit were designed using Primer3 software (Untergasser et al., 2012; Koressaar and Remm, 2007). Amplification specificity of each primer set was verified by cloning and sequencing the amplification products (data not shown) and confirmed by a single peak in the melting curve analysis. Amplification efficiencies were between 87,32 and 95,47 %, allowing validation of each primer set for qPCR experiments (Table 2). In order to correct for sample to sample variations in RT-PCR efficiency and errors in sample quantification, we used three different housekeeping genes already selected as reference genes for normalization in the same species (Duportets et al., 2013): the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH (accession number JX975723), the ribosomal proteins RpL8 (accession number JX975720.1) and RpL13 (accession number JX975721).

According to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009), qPCR was performed on cDNA preparations from brains or antennal lobes isolated from males intoxicated with clothianidin (CLO) or DMSO as described previously (Abrieux et al., 2013). We used the SYBR detection system either in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) from the technical platform of The Integrative Biology Institute (University Pierre et Marie Curie, France) for the brain tissues or in a CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad) from the technical platform of Nucleic Acid Analysis (INRA Beaucozú, France) for antennal lobes. Experiments were performed in triplicate using 100 (brain) or 200 (AL) ng cDNA of each group (CLO or DMSO), 0.5  $\mu$ M of each subunit specific primer set and the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations in a final volume of 10 $\mu$ L. The qPCR protocol included an initial step at 94°C for 5 min, then 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, and a final melting curve ranging from 60°C to 95°C. Data were analyzed with Light Cycler iQ software and Microsoft Excel. The standard curve was analyzed for all primers and gave amplification efficiencies of  $92,85 \pm 7,94\%$ .

Relative expression ratio (R) was calculated according to the Pfaffl formula (Pfaffl, 2001), using primer efficiency (E) and CP value variation between DMSO and CLO groups ( $\Delta$ CP) for each nAChR subunit. Ratios were normalized to the mean of three reference genes (D'Haene et al., 2012 and expressed in 1-scale (ratio<1 = gene down-regulation; ratio>1 = gene up-regulation):  $R = (E_{\text{subunit}})^{\Delta\text{CP}_{\text{subunit}}(\text{control} - \text{sample})} / (E_{\text{reference}})^{\Delta\text{CP}_{\text{reference}}(\text{control} - \text{sample})}$ .

### Statistical analyses

A two-way ANOVA with repeated measures, followed by a Bonferroni posthoc test ( $p < 0.05$ ) was conducted to analyze the qPCR results using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

## Results

### Identification of *A. ipsilon* nAChR subunits

cDNA bank analyses, cloning experiments and phylogenetic analyses result in the identification of seven alpha subunits ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ) and one beta subunit ( $\beta 1$ ) of nAChRs in *A. ipsilon* (Figure 1, Table 1, Figure 2). The nucleic sequences identified include coding sequences from 306 to 1597 bp leading to 102 to 532 amino acid protein sequences. All sequences display the structure of nAChR mRNA *i.e.* 1) the large extracellular loop including well-conserved amino-acids as the Ligand-Gated Ion Channel family signature (two

disulfide bonds forming cysteines *i.e.* the Cys-loop) and the adjacent cysteine residues involved in the acetylcholine binding site (YxCC), 2) the four transmembrane domains, the second of which (TM2) combining most of the lining channel residues, 3) a highly variable intracellular loop between TM3 and TM4 (Figure 1). To ascertain the appropriate nomenclature of each nAChR subunit, a phylogenetic tree including putative *A. ipsilon* nAChR subunits and those of the fruitfly (*Dmel*), the honeybee (*Amel*), the silkworm (*Bmor*), the codling moth (*Cpom*) and the tobacco budworm (*Hvir*) was constructed (Figure 2). As another member of the cys-loop ligand gated ion channel family, the GABA receptor subunit RDL of four insect species was chosen to represent the out group in the phylogenetic tree. Because of the too small length of the amino acid sequence identified, Aips $\alpha$ 7 nAChR subunit was not included in the phylogenetic analysis. However, the Aips  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 8 and  $\beta$ 1 nAChR subunits group together with their respective nAChR subunits in the 4-5 other insect species. Each Aips subunit displays a higher degree of conservation with the respective moth subunit than with the corresponding honeybee and fruitfly subunits, as expected. The analysis highlights a group of divergent subunits in four insect species, which clusters separately from the most highly conserved nAChR subunit groups. The clusters identified in this phylogenetic tree are consistent with the groups of insect nAChR subunits identified in previous studies (Jones and Satelle, 2010; Lees et al., 2014; Martin and Garczynski, 2014). Thus, phylogenetic analysis revealed 7 highly conserved core groups among species ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 6-7,  $\alpha$ 8,  $\beta$ 1) and a 8<sup>th</sup> group including divergent subunits with low sequence identity with the other nAChR subunits and within the group among species (Figure 2). Except for Aips $\alpha$ 7, nAChR subunit, which was excluded from the analysis because of its protein sequence shortness, all Aips subunits appear in the appropriate cluster, confirming their identity as members of the nAChRs subunit family.

#### Expression of nAChR subunits as a function of clothianidin treatment

To assess the effect of clothianidin treatment at the molecular level, we investigated the relative expression of the 8 nAChR subunits forming the neonicotinoid receptors identified in *A. ipsilon*, using qPCR. Considering the whole brain, none of the subunits express differently 24h after 10 ng clothianidin intoxication as compared to DMSO treatment ( $\alpha > 0.05$ ; Figure 3). As we previously found an effect of the 10 ng clothianidin treatment on the sensitivity of antennal lobe neurons (Rabhi et al. this thesis, Part 2 Article 2), we then started to investigate more specifically the effect of the treatment on the expression of the nAChR subunits in antennal lobe tissue, involved in olfactory processing. The first experiment shows that the clothianidin treatment seems to decrease the expression level of most of the nAChR



subunits except Aips $\alpha$ 4 (Figure 3). This preliminary result needs to be confirmed in further experiments.

## Discussion

Using cDNA bank information and cloning strategy, we identified full-length or partial sequences of 8 nAChR subunits in the moth *A. ipsilon*. The multiple protein sequence alignment including nAChR subunit protein sequences of 5 insect species assesses the identity of each Aips subunit, confirming their membership within the nAChR family. Compared to whole genome-sequenced moths like the silkworm (Shao et al., 2007) and more recently the codling moth (Martin and Graczynski, 2014), some subunits could not be identified so far in *A. ipsilon*, i.e. the conserved  $\alpha$ 5 subunit and divergent subunits ( $\alpha$ 9,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). Because these subunits display a lower homology sequence inbetween species, deeper bioinformatic analysis using the cDNA bank is needed to confirm their potential presence.

Although some nucleic sequence lengths were quite small for some subunits, we were able to design subunit-specific primers for qPCR. As described earlier (Bustin et al., 2009), the essential points for primers are their specificity and their efficiency in PCR amplification. Both were assessed before the qPCR experiment as explained above by cloning and sequencing, and by a standard curve, respectively. When analysing the effect of clothianidin treatments on gene expression in whole brains, no significant variation in Aips nAChR expression was observed, whatever the subunit considered. However, it is difficult to draw any conclusion from this result, because nAChR subunit expression might either be differentially up- and down-regulated in different parts of the brain canceling out potential differences, or differences in expression in small parts of the brain might be below the detection level, if a large quantity of tissue containing nAChRs is analysed. Interestingly, the preliminary results for antennal lobe tissue, indicate a down-regulation of the expression of all nAChR subunits except for Aips $\alpha$ 4. These results need to be confirmed in further replicates allowing statistical analysis. If any differences in subunit expression after clothianidin treatment would be confirmed, these might change the affinity not only for neonicotinoids, but also for acetylcholine in certain neuron types/regions of the brain and could thus help to explain why neonicotinoid treatment might change their own efficiency at the long run (adaptation/resistance,...) and why synaptic transmission in the olfactory system might change its efficiency after treatments. Differential presence of subunits in different parts of the brain/different neuron types needs in the future to be confirmed by in situ hybridisation or antibody staining.

## Acknowledgments

We thank Lydie Garnier and Cyril Le Corre for their help with insect rearing, Muriel Bahut and the platform ANAN, University of Angers for technical support and access to their equipment. This work was supported by French National Founding Agency grant ANR-12 ADAP-0012-01 to H. T.-L., S. A., C. G. and a PhD grant to K. K. R., by the « Région Pays de la Loire » to S. A. and C. G.

## References

- Abrieux, A., Debernard, S., Maria, A., Gaertner, C., Anton, S., Gadenne, C., and Duportets, L. (2013). Involvement of the G-protein-coupled dopamine/ecdyteroid receptor dopecr in the behavioral response to sex pheromone in an insect. *PLoS ONE* 8, e72785.
- Altschul, S.F., and Lipman, D.J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5509-5513.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36-42.
- Blacquiere, T., Smaghe, G., Van Gestel, C.A., and Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973-992.
- 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. *J. Neurochem.* 99, 608-615.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- D'Haene, B., Mestdagh, P., Hellems, J., and Vandesompele, J. (2012). miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol* 822, 261-272.
- Decourtye, A., and Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 85-95.
- Duportets, L., Maria, A., Vitecek, S., Gadenne, C., and Debernard, S. (2013). Steroid

- hormone signaling is involved in the age-dependent behavioral response to sex pheromone in the adult male moth *Agrotis ipsilon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 58-66.
- 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. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1553-1564.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., and Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 1-5.
- Goulson, D. (2013). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977-987.
- Guedes, R.N.C., and Cutler, G.C. (2014). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manage. Sci.* 70, 690-697.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., and Elbert, A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897-2908.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 25-43.
- Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-1291.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567-580.
- Lansdell, S.J., and Millar, N.S. (2000). The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39, 671-679.
- Lees, K., Jones, A.K., Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., Woods, D.J., and Bowman, A.S. (2014). Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Int. J.*

*Parasitol.* 44, 75-81.

- Louis, T., Musso, P.-Y., De Oliveira, S.B., Garreau, L., Giurfa, M., Raymond, V., and Gauthier, M. (2012). Amel $\alpha$ 8 subunit knockdown in the mushroom body vertical lobes impairs olfactory retrieval in the honeybee, *Apis mellifera*. *Eur. J. Neurosci.* 36, 3438-3450.
- Markussen, M., and Kristensen, M. (2010). Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M $\alpha$ 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manage. Sci.* 66, 1257-1262.
- Martin, J.A., and Garczynski, S.F. (2014). Putative nicotinic acetylcholine receptor subunits express differentially through the life cycle of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Sci.* in press.
- Matsuda, K., Buckingham, S., Kleier, D., Rauh, J., Grauso, M., and Sattelle, D. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573-580.
- Page, R.D.M. (1996). The circumscription, taxonomy and biogeography of *Porterandia* (Rubiaceae-Gardenieae) *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Poitout, S., and Buès, R. (1974). Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2, 79-91.
- Rabhi, K.K., Esancy, K., Voisin, A., Crespin, L., Le Corre, J., Tricoire-Leignel, H., Anton, S., and Gadenne, C. (2014). Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. *PLoS ONE* 9, e114411.
- 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.
- Stamatakis, A., Hoover, P., and Rougemont, J. (2008). A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol.* 57, 758-771.
- Taillebois, E., Beloula, A., Quinchard, S., Jaubert-Possamai, S., Daguin, A., Servent, D., Tagu, D., Thany, S.H., and Tricoire-Leignel, H. (2014). Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS ONE* 9, e96669.

- Talavera, G., and Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56, 564-577.
- 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., Crozatier, M., Raymond-Delpech, V., Gauthier, M., and Lenaers, G. (2005). Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene* 344, 125-132.
- Thany, S.H., Lenaers, G., 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 Mol. Biol.* 12, 255-262.
- Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339-364.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115.
- Yu, X., Wang, M., Kang, M., Liu, L., Guo, X., and Xu, B. (2011). Molecular cloning and characterization of two nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit genes from *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 77, 163-178.

## Figure Legends

**Figure 1: Protein sequence alignment of nAChR subunits identified in the moth *Agrotis ipsilon*.** **Thick line:** transmembrane domain (TM1, TM2, TM3, TM4). **Box:** qPCR primer set for each nAChR subunit. The disulphide bond between two cysteine (Cys-loop) is the molecular signature of the ligand-gated ion channel family. **#** YxCC motif involved in the acetylcholine binding site. The two adjacent cysteine residues in this motif are missing in the beta subunit, as expected.

**Figure 2: Phylogenetic tree showing the relationship between *Agrotis ipsilon* (Aips) nAChR subunits and fruitfly (Dmel), honeybee (Amel), silkworm (Bmor), codling moth**

**(Cpom), tobacco budworm (Hvir) nAChR subunits.** The GABA receptor subunit RDL from the fruitfly (AAF50311), the honeybee (AJE68941), the silkworm (NP\_001182629) and the tobacco budworm (CAB41615) were used as outgroup. The distance scale 0.1 represents 10% differences between two sequences. *A. ipsilon* putative nAChR subunits appear in bold characters. The accession numbers of the nAChR subunits used in this phylogenetic analysis are: DmelA1 (NP\_524481), DmelA2 (AAF56302), DmelA3 (CAA75688), DmelA4 (NP\_001097669), DmelA5 (AAS64703), DmelA6 (NP\_723494), DmelA7 (NP\_996514), DmelB1 (NP\_523927), DmelB2 (AAF56304), DmelB3 (CAC48166), AmelA1 (NP\_001091690), AmelA2 (NP\_001011625), AmelA3 (NP\_001073029), AmelA4 (NP\_001091691), AmelA5 (AJE70263), AmelA6 (NP\_001073564), AmelA7 (NP\_001011621), AmelA8 (NP\_001011575), AmelA9 (NP\_001091694), AmelB1 (NP\_001073028), AmelB2 (NP\_001091699), BmorA1 (NP\_001103388), BmorA2 (NP\_001103397), BmorA3 (NP\_001103387), BmorA4 (NP\_001103389), BmorA5 (NP\_001166811), BmorA6 (NP\_001091842), BmorA7 (NP\_001166818), BmorA8 (NP\_001166817), BmorA9 (ABV72691), BmorB1 (NP\_001166819), BmorB2 (ABV72693), BmorB3 (ABV72694), CpomA1 (AJA39816), CpomA2 (AJA39817), CpomA3 (AJA39818), CpomA4 (AJA39819), CpomA5 (AJA39820), CpomA6 (AJA39821), CpomA7 (AJA39822), CpomA8 (AJA39823), CpomA9 (AJA39824), CpomB1 (AJA39825), CpomB2 (AJA39826), CpomB3 (AJA39827), HvirA2 (AAD09808), HvirA3 (CAA04056), HvirA6 (AAD32698), HvirA7 (AAD32697), HvirA8 (AAD09809), HvirB1 (AAD09810).

**Figure 3: Relative expression of *Aips* nAChR subunits in the brain (n=3) and the antennal lobes (n=1) of male moths intoxicated with 10ng clothianidin, with DMSO-intoxicated male moths as control group.** Each amplification was performed in triplicate. The dotted line indicates an expression ratio of 1 indicating no difference in nAChR subunit expression level between control and intoxicated groups. No significant difference was found in the expression of any subunit in brain tissue, whereas most subunits seem to be down-regulated in antennal lobe tissue.

**Table 1.** Nucleic sequence information of *Agrotis ipsilon* nAChR subunits according to cDNA bank resources kindly provided by E. Jaquin-Joly and cloning experiments.

<i>A.ipsilon</i> nAChR subunit	<u>cDNA bank</u>				<u>Cloning experiments</u>
	Isotig (bp)	CDS on contig (pb)	5'UTR (pb)	3'UTR (pb)	(bp)
$\alpha$ 1	1023	267	-	>754	<b>1584</b>
$\alpha$ 2	2067	<b>1242</b>	-	>824	1220
$\alpha$ 3	-	-	-	-	<b>820</b>
$\alpha$ 4	2108	<b>336</b>	-	-	-
$\alpha$ 6	4638	<b>1519*</b>	123	>3008	1465
$\alpha$ 7	2110	<b>306</b>	-	1773	198
$\alpha$ 8	3297	<b>1597*</b>	76	1592	-
$\beta$ 1	2202	<b>1476</b>	-	>728	958

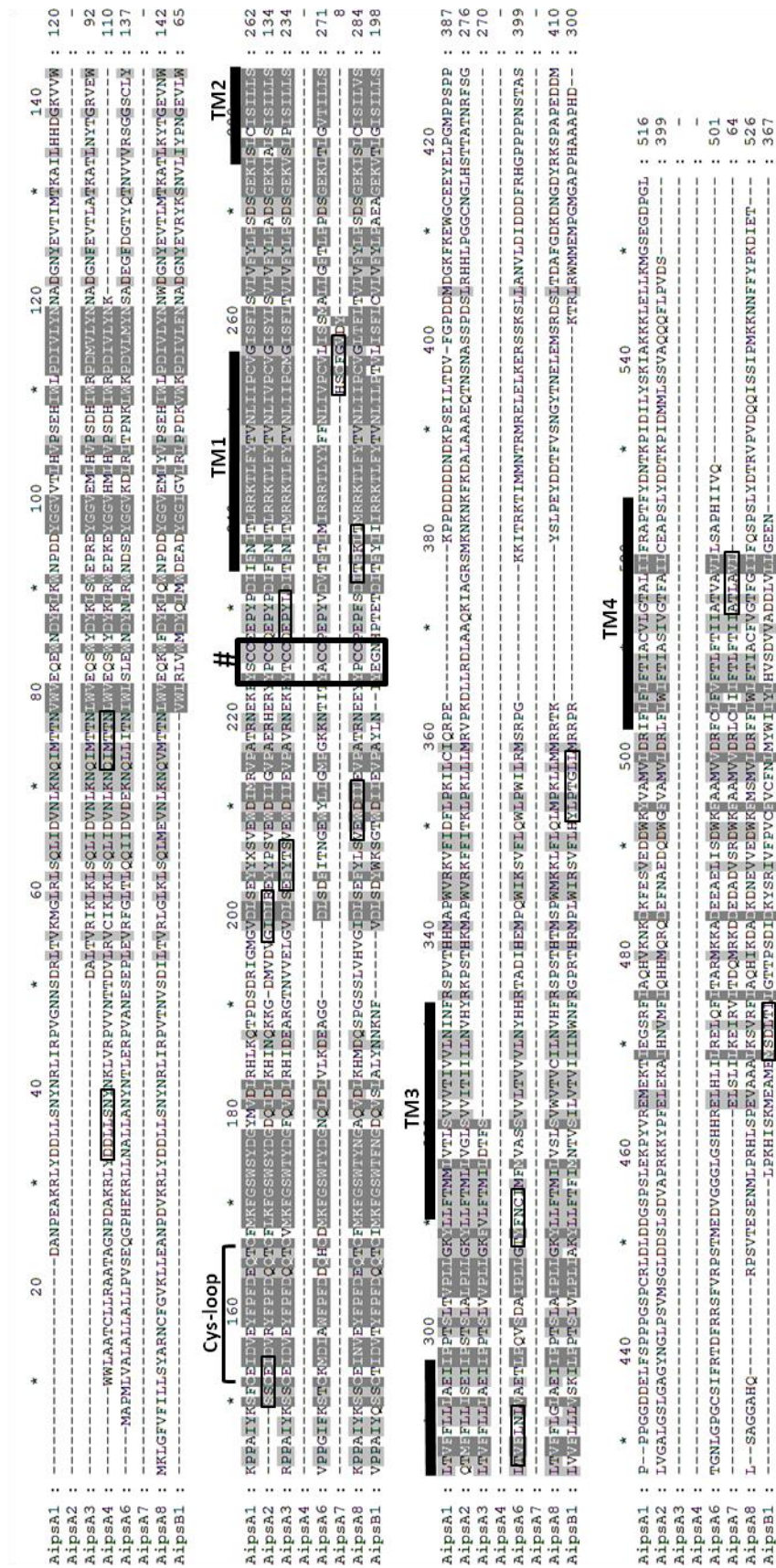
\* full length cDNA

**Table 2.** Primer sets designed from *A. ipsilon* and/or *B. mori* or *H. virescens* and used in cloning and qPCR experiments

A. <i>ipsilon</i> target gene	Experi- ment	Forward primer		Reverse primer		Amplicon size (pb)
		Name	Nucleotide Sequence (5'->3')	Name	Nucleotide Sequence (5'- >3')	
<b>α1</b>	qPCR	Noc-a1S1	GACTGGAAGTACGTAGCCATG	Noc-a1R7	TCACCTTCCGACCCCATC	191
	cloning	Bmor_a1S4	CGACGCGAACCCCTGAAGCG	Noc_a1R2	GGTCTCTGAAATTCGTCTTACG	1548
<b>α2</b>	qPCR	Noc-a2S3	CCATCTTCAAGTCTCGTGTG	Noc-a2R8	CGAAGGTGCGATGCCGACGTC	153
<b>α3</b>	qPCR	Noc-a3S3	CCTGTCCGAGTTCTACACC	Noc-a3R4	AGGTATGGCTCATCGCAGC	96
	cloning	Hvir_a3S1	CAGCGACGCGCTCACCGTG	Hvir_a3R2	CTCGACACGTTTCAGCATATGC	810
<b>α4</b>	qPCR	Noc-a4S9	GACCTCCTCTCCAACACTACAA	Noc-a4R10	AGGTTTCGTTGTCATTATCTGG	134
<b>α6</b>	qPCR	Noc-a6S5	GACGGTGTTCCCTCAACCTG	Noc-a6R6	TGATGCAGTTGAAGTATGTCC	110
<b>α7</b>	qPCR	Noc-a7S1	GCGCACAGTTGCTTCGGTGTC	Noc-a7R2	CAGCAGCACGGCTAGCGTGG	198
<b>α8</b>	qPCR	Noc-a8S3	GTGGAATGGGACATACTGGA	Noc-a8R4	CGCATTGTGAGCTTGAATGTT	101
<b>β1</b>	qPCR	Noc-b1S7	TACCTGCCAACGGGACTC	Noc-b1R	GGATGGTGAAGTCCGACATC	164
<b>Rpl8</b>	qPCR	RpL8-F	CCAGTTTGTCTACTGCGGCAA	RpL8-R	GCTTAACCCTAGTACGCTTGCCA	199
<b>Rpl13</b>	qPCR	Rpl13-F	TCCACTTCAGACCCCTTCAAAGA	Rpl13-R	AGTACTTACGGCCAGGTTTCAAGC	195
<b>GAPDH</b>	qPCR	GAPDH-F	TGGCTTCCTTGTCTGAACGGAAA	GAPDH-R	ACGAACATGGGTGCATCAGCACT	204



Figure 1



**Figure 2**

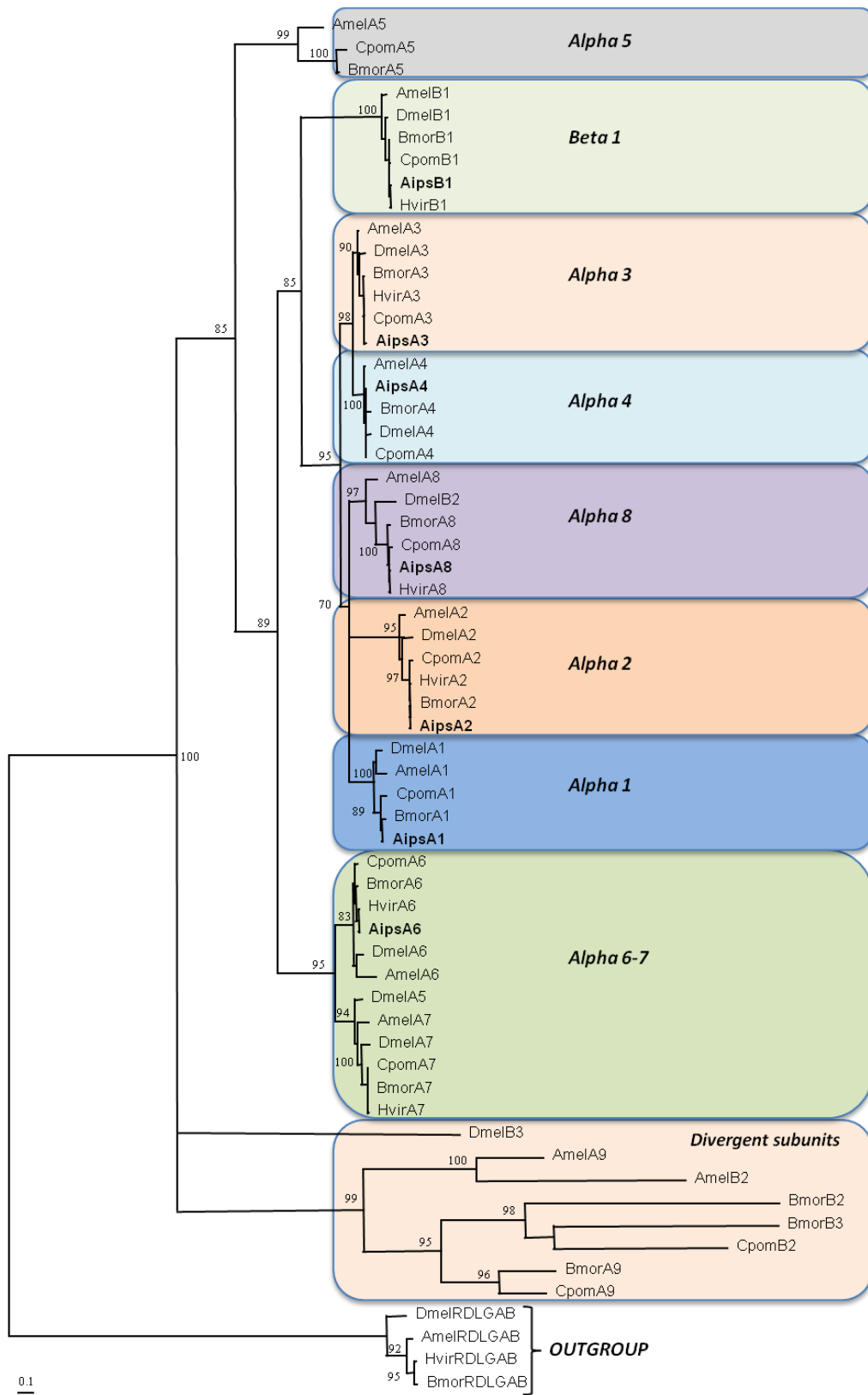
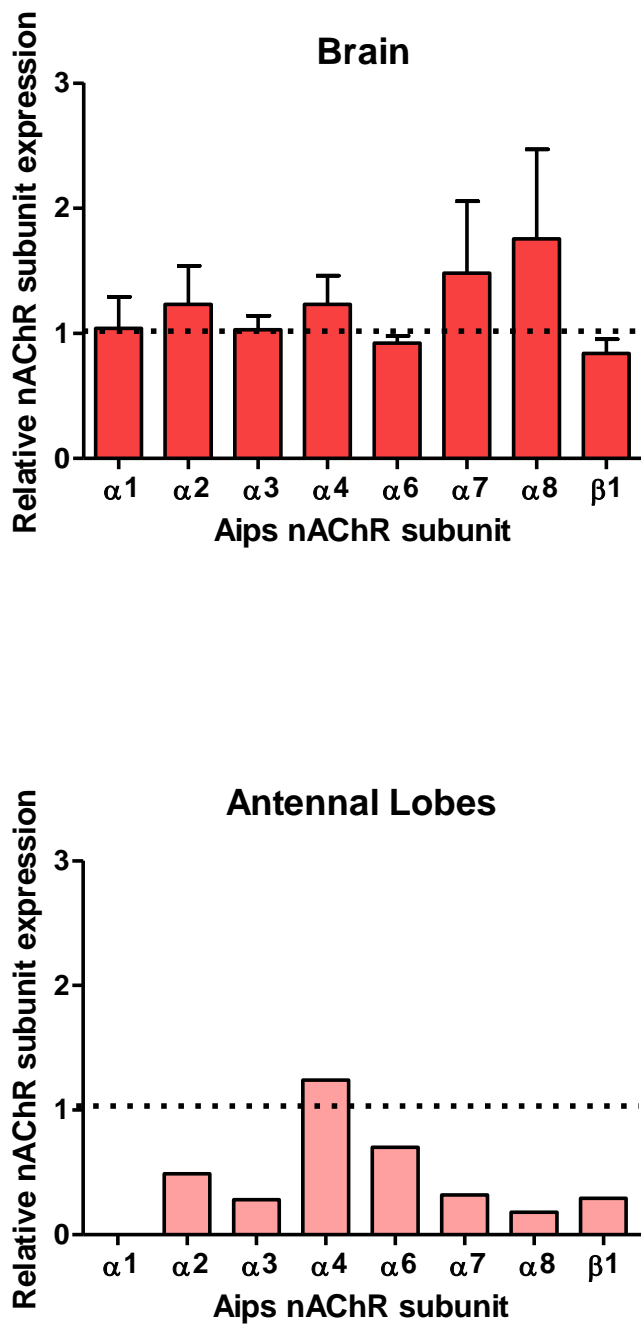


Figure 3





**Partie 3**

**Discussion**  
**et**  
**Perspectives**



## Discussion et Perspectives

Dans un environnement de plus en plus anthropisé, les animaux doivent pouvoir s'adapter non seulement pour survivre mais aussi pour se reproduire et ainsi pérenniser l'espèce. Les traitements insecticides à base de néonicotinoïdes se révèlent très efficaces contre la plupart des insectes ravageurs, mais perturbent fortement le comportement et la survie de nombreuses espèces d'insectes utiles, en particulier l'abeille.

L'utilisation massive de ces substances induit l'accumulation de résidus dans l'environnement. Ceux-ci ont certainement un effet additif toxique sur les insectes-cibles. Cependant des études de plus en plus nombreuses montrent que ces résidus peuvent aussi avoir un effet positif non désiré sur certains traits de vie des insectes ravageurs.

Dans mon travail de thèse, j'ai étudié les effets de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un insecte ravageur, la noctuelle *A. ipsilon*.

Nos résultats montrent que des mâles traités oralement avec des faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde, la clothianidine, modifient leurs réponses comportementales et neuronales à la phéromone sexuelle: elles sont augmentées à la dose de 10 ng (DL20) et diminuées à la dose de 0,25 ng (< DL0). Ces modifications du comportement s'accompagnent de modifications de la sensibilité des neurones centraux du lobe antennaire et non pas de ceux du système olfactif périphérique. Cet effet biphasique comportemental et neuronal s'apparente à un effet hormétique. De plus, la dose de 10 ng accroît encore plus l'effet positif sur la réponse à la phéromone obtenu après une pré-exposition à la phéromone.

Nous émettons l'hypothèse que la clothianidine agirait sur l'expression des sous-unités des récepteurs nicotiques pour lesquels elle joue le rôle d'agoniste, perturbant ou améliorant la transmission synaptique selon la dose et l'affinité des sous-unités.

Ces résultats montrent que la mise au point de nouveaux insecticides nécessite la prise en compte de ces effets inattendus sur les traits de vie qui pourraient induire une adaptation au stress environnemental des insectes-cibles.

### ✓ *Un large spectre de doses de clothianidine testées*

La première étape de mon travail a consisté à évaluer la toxicité (taux de létalité) de la clothianidine sur les mâles d'*A. ipsilon*. Bien qu'elle ne soit pas représentative d'un contexte

d'intoxication dans des conditions naturelles, nous avons développé un protocole d'intoxication aiguë. Il représente l'avantage de pouvoir contrôler les conditions et la quantité de substances administrées aux insectes. L'ingestion rapide des doses de clothianidine présentées aux mâles montre qu'il n'existe pas d'effet répulsif de l'insecticide chez notre modèle, en accord avec les résultats constatés chez les abeilles (*A. mellifera*) et le bourdon (*B. terrestris*) après exposition au choix entre le sucrose seul ou le sucrose contenant un des trois insecticides néonicotinoïdes, imidacloprid, thiamethoxam et clothianidine (Kessler et coll. 2015). Les abeilles et bourdons préfèrent même des solutions de sucrose contenant l'imidacloprid ou le thiamethoxam par rapport à une solution de sucrose seul, mais les neurones gustatifs des pièces buccales ne répondent pas aux doses d'insecticides présents naturellement dans le nectar (Kessler et coll. 2015). Il sera intéressant d'évaluer également chez notre modèle, si une préférence pour une solution de sucrose contenant la clothianidine existe et si le système gustatif peut détecter la clothianidine et/ou si la sensibilité des neurones gustatifs au sucre change en fonction du traitement avec la clothianidine. Chez *A. ipsilon*, la DL50 à 24h est de l'ordre de 69 ng/ papillon et se rapproche de celle observée chez les abeilles et les larves de drosophiles *D. melanogaster* (15-25 ng/larve) (Di Prisco et coll. 2013). En se basant sur des travaux précédents (Haynes et Baker 1985 ; Cutler et coll. 2009 ; Williamson et coll. 2013), nous avons utilisé des doses comprises entre la DL50 et des doses jusqu'à 25 fois inférieures à la valeur de NOAEL. Nous avons choisi un intervalle de doses plus large que dans d'autres études, pour nous donner les moyens de détecter des effets différentiels.

L'approche comportementale nous a, dans un premier temps, restreint à éliminer les plus fortes doses prévues, en raison d'un effet négatif sur la locomotion et le vol, comme observé auparavant chez d'autres espèces après intoxication (revue Desneux et coll. 2007).

### ✓ **Effet biphasique de la clothianidine et hormone**

La toxicologie se définit comme "l'étude des effets indésirables des xénobiotiques" (Gallo et Doull 1991). Ceci implique que tout produit devient toxique (ayant un effet négatif quelconque sur l'individu) pour un organisme dès que la dose se situe au-dessus du seuil NOAEL. Une dose dite sublétales doit donc se situer au-dessous de la dose NOAEL. Les doses de clothianidine ingérées par les papillons testés en tunnel de vol ont été volontairement choisies au-dessus (jusqu'à la DL30) et au-dessous de la dose NOAEL (jusqu'à 25 fois moins que la DL0). Pour notre étude, on ne peut donc pas parler strictement de doses sublétales pour les premières, mais plutôt de "faibles doses". Cependant le terme de "sublétales" est toutefois employé pour les doses inférieures à la DL50 dans les tests



écotoxicologiques au champ (voir Gill et coll. 2012). Beaucoup d'études sur les effets des insecticides ont été réalisées en utilisant des doses appelées sublétales qui étaient très souvent au-dessus du NOAEL, allant même parfois jusqu'à la DL70 (LD20 : Shi et coll. 2011 ; Bao et coll. 2009 ; DL30 : Wei et Du 2004 ; DL40 : Tan et coll. 2012 ; DL50 : Godfray et coll. 2014 ; El Hassani et coll. 2008 ; DL70 : Desneux et coll. 2004).

Outre les effets négatifs sur la locomotion cités plus haut, nous avons distingué deux doses induisant des effets inattendus sur la réponse comportementale à la phéromone sexuelle. Une diminution des réponses est observée après intoxication avec une très faible dose de 0,25 ng/papillon, alors que l'intoxication avec la dose de 10 ng/papillon (correspondant à la DL20) induit une augmentation du comportement sexuel chez les mâles sexuellement matures.

L'effet de cette dernière dose pourrait correspondre à un effet hormétique dont la définition est une réponse biphasique à un stress, caractérisée par une inhibition/toxicité à forte dose et une stimulation/effet positif à faible dose. Ce phénomène a été rapporté dans différents domaines mais plus fréquemment dans le domaine médical en mesurant différents critères biologiques, comme la reproduction, la longévité, la locomotion en réponse à plusieurs types de stress (température, stress nutritionnel ou encore l'exposition à des produits toxiques) (Calabrese et Blain 2005). L'étude de ce phénomène chez les insectes est généralement liée à l'utilisation et aux effets des insecticides en lien avec les études sur leur toxicité. Durant ces dernières années une multitude de travaux se sont intéressés aux effets négatifs de faibles doses de néonicotinoïdes sur les insectes bénéfiques dont les abeilles, pointant du doigt l'existence d'un effet négatif sur l'apprentissage olfactif, la mémoire ou encore le comportement de butinage (Decourtye et coll. 2003 ; Henry et coll. 2012). Les effets négatifs des faibles doses de néonicotinoïdes ont aussi été étudiés chez de nombreux insectes ravageurs, montrant que ces produits affectaient de nombreux traits de vie (revue Desneux et coll. 2007). Cependant très peu d'études montrent des effets positifs hormétiques chez les insectes. Par exemple, l'exposition à un insecticide néonicotinoïde (l'imidaclopride) pouvait induire une augmentation de la reproduction et de longévité chez le puceron *M. persicae* (Cutler et coll. 2009). De même la clothianidine induit une augmentation de poids chez les larves d'*A. ipsilon* (Kullik et coll. 2011). Chez le puceron *M. persicae*, l'imidacloprid induit une augmentation de la JH circulante et de la fécondité (Yu et coll. 2010).

Nos résultats montrent un effet comme étant « *hormetic-like* », parce que les résultats biphasiques nous rappellent la définition du phénomène d'hormèse mais avec une courbe inversée (stimulation à forte dose et inhibition à faible dose). Dans son article publié dans

Toxicological Sciences en 2001, Calabrese et Baldwin mettent en avant 4 critères principaux permettant de classer les effets d'un produit toxique comme effets hormétiques :

- Les individus intoxiqués doivent être comparés à un contrôle subissant les mêmes conditions d'expérience.
- Les réponses (augmentation ou diminution) doivent être statistiquement différentes de celle du contrôle.
- Au moins deux doses faibles doivent présenter le même effet.
- Au moins une dose doit présenter les critères d'inhibition.

Ainsi les résultats que nous avons obtenus en comportement permettent de répondre à trois des quatre critères cités précédemment. En effet, une seule faible dose (10 ng/papillon) a permis d'obtenir une augmentation des réponses à la phéromone sexuelle significativement différente de celle des contrôles. C'est pourquoi dans notre cas nous ne pouvons pas parler d'hormèse au sens strict.

### ✓ *Clothianidine et plasticité olfactive*

Les effets de la clothianidine sur le comportement en parallèle avec la sensibilité des neurones du AL ressemblent aux effets dans différentes formes de plasticité décrites auparavant chez *A. ipsilon*. En effet la réponse comportementale et neuronale à la phéromone sexuelle augmente après un traitement de 10 ng de clothianidine de la même façon qu'avec la maturation (Gadenne et coll. 1993 ; Anton et Gadenne 1999) ou après une pré-exposition à la phéromone (Abrieux 2014). A contrario, la réponse comportementale et neuronale diminue après un traitement de 0,25 ng de clothianidine, de façon similaire qu'après un accouplement (Gadenne et coll. 2001). Les cas de plasticité olfactive décrits préalablement chez *A. ipsilon* dépendent de l'état physiologique ou sexuel (âge et accouplement) ou de l'expérience (pré-exposition). Ici c'est un facteur externe xénobiotique (un insecticide) qui induit ces changements du comportement et de la sensibilité des neurones olfactifs centraux. Différentes études ont montré l'implication d'hormones (JH et ecdysone) et d'amines biogènes (octopamine et dopamine) sur la modulation de la réponse phéromonale chez *A. ipsilon* (Anton et Gadenne 1999 ; Jarriault et coll. 2009a ; Barrozo et coll. 2010a ; Duportets et coll. 2010, 2013 ; Abrieux et coll. 2013, 2014). Nous émettons l'hypothèse que des neuromodulateurs pourraient également être impliqués dans les changements de sensibilité causés par les traitements avec la clothianidine. En soutien de cette hypothèse, chez les vertébrés, des études ont montré que la clothianidine pouvait induire une augmentation de la synthèse de dopamine dans le cerveau de rats (de Oliveira

et coll. 2010). Il serait donc possible que chez la noctuelle, les traitements avec des faibles doses de clothianidine induiraient un changement dans le taux de dopamine, qui pourrait par la suite moduler la sensibilité des neurones du lobe antennaire. Pour tenter de répondre à ces hypothèses, il faudrait réaliser des dosages du taux de dopamine cérébral et/ ou modifier le taux ou l'activité de la dopamine par des injections ou des blocages de ses récepteurs comme le DopEcR, après traitement à la clothianidine. Il serait aussi intéressant d'étudier l'expression du gène et de la protéine DopEcR en fonction du traitement avec la clothianidine.

Nos résultats montrent un effet de la clothianidine sur la sensibilité des neurones du AL. Des résultats récents menés sur la noctuelle *S. littoralis* ont montré une augmentation de volume du MGC, responsable du traitement de l'information phéromonale, après une pré-exposition à la phéromone, en corrélation avec une augmentation de la sensibilité des neurones du MGC (Guerrieri et coll. 2012). Il serait intéressant de réaliser des analyses de volumétrie du MGC chez *A. ipsilon* après traitement à la clothianidine, d'autant que celle-ci semble augmenter encore l'effet obtenu après pré-exposition (Abrieux 2014).

La plasticité olfactive "clothianidine-dépendante" ressemble aussi à celle observée pour la maturation ou l'accouplement concernant un autre aspect: les réponses aux odeurs de plante ne sont pas modifiées par le traitement (Greiner et coll. 2002 ; Barrozo et coll. 2010b ; Rabhi et coll. 2014). Nous émettons l'hypothèse que le réseau neuronal traitant l'information sur les odeurs de plante présente des différences dans les récepteurs nicotiniques par rapport au système phéromonal et pourrait ne pas être susceptible au traitement avec la clothianidine.

### ✓ ***Clothianidine et mécanismes de la modulation olfactive***

Nos résultats montrent que l'origine de cette plasticité olfactive dépendant de la clothianidine se situe au niveau central et non périphérique. Des études préalables ont montré que des faibles doses d'un insecticide pyréthrianoïde pouvaient augmenter le seuil de détection de la phéromone sexuelle au niveau du système olfactif périphérique d'un papillon de nuit (Lucas et Renou 1992). Cependant, l'intoxication avec les doses de la clothianidine montrant un effet sur le comportement des mâles d'*A. ipsilon*, n'avaient pas d'effet sur les réponses de neurones récepteurs à la phéromone sexuelle, mesurées avec des enregistrements électrophysiologiques sur l'antenne et en imagerie calcique *in vivo* dans le AL par nos collègues de l'INRA de Versailles. L'absence d'effet d'un insecticide néonicotinoïde sur le système périphérique d'*A. ipsilon* n'est pas surprenante dans la mesure où jusqu'à présent

aucune étude n'a rapporté l'existence de récepteurs nicotiques de l'acétylcholine dans les ORNs. Notre hypothèse était que l'information sensorielle transmise par les ORNs pourrait être modulée au niveau présynaptique par un *feedback* provenant des neurones locaux du lobe antennaire. Cela ne semble pas être le cas, ou l'intensité d'un tel effet n'atteint pas un seuil détectable ni au niveau des sensilles de l'antenne, ni au niveau de l'activité globale du AL après stimulation avec la phéromone sexuelle.

Contrairement aux résultats sur le système périphérique, les enregistrements de neurones du MGC du AL montrent des changements de sensibilité à la phéromone après traitement aux deux doses de clothianidine ayant un effet comportemental. L'intoxication avec la très faible dose de 0,25 ng de clothianidine induit une forte baisse de sensibilité des neurones du MGC, alors que l'intoxication avec la DL20 de clothianidine mène à l'augmentation de la sensibilité des neurones du MGC. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus en étudiant le comportement sexuel. Confrontées les unes aux autres, ces observations suggèrent que la clothianidine affecte uniquement le système olfactif central qui est cholinergique. Bien qu'il existe différentes études traitant l'effet des néonicotinoïdes sur les processus cognitifs (Desneux et coll. 2007), peu se sont intéressées aux effets de ces insecticides sur les systèmes sensoriels. A ma connaissance seuls des effets sur le système gustatif ont été décrits pour le moment (Lambin et coll. 2001 ; Eiri et Nieh 2012).

En se fixant sur les récepteurs nicotiques (Buckingham et coll. 1997), médiateurs de la transmission synaptique excitatrice (Breer et coll. 1985), la clothianidine induirait une perturbation du traitement de l'information olfactive liée au système cholinergique (Lozano et coll. 2001). Les analyses de génomes d'insectes ont révélé l'existence de différents types de sous-unités composant les nAChRs qui permettent la formation de multiples sous-types de récepteurs (Dupuis et coll. 2012). Ces différents sous-types peuvent présenter des propriétés pharmacologiques différentes influençant l'affinité des récepteurs et leur sensibilité aux insecticides (Lind et coll. 1998 ; Lansdell et Millar 2000 ; Thany et coll. 2007 ; Taillebois et coll. 2014). Dans notre étude, les effets dose-dépendants observés pourraient provenir d'une différence d'affinité à la clothianidine pour des sous-types de récepteurs qui pourraient être exprimés différemment au sein du réseau de neurones constituant le AL (Thany et coll. 2003, 2005). Ainsi, nous suggérons que les populations de PNs et de LNs, constituant le réseau neuronal du AL, n'expriment pas les mêmes sous-types de nAChRs, et ainsi ne seront pas affectés de la même manière par l'intoxication. La très faible dose de clothianidine (0,25 ng) se fixerait plus rapidement sur des sites à forte affinité: la diminution des réponses à la phéromone suggérant que la clothianidine aurait ralenti l'activation de la réponse à la phéromone en inhibant partiellement les neurones responsables de cette activation, les PNs. De la même manière, l'augmentation des réponses à la phéromone

sexuelle après intoxication avec la DL20 de clothianidine (10 ng) aurait pour origine l'inhibition des neurones inhibiteurs, les LNs. L'absence d'effet significatif après intoxication avec des doses proches de la DL20 ou de la dose 0,25 ng suggère qu'il existerait un équilibre ou un seuil d'inhibition et d'activation à partir duquel nous pouvons observer un effet sur le comportement sexuel. Une première étape dans la vérification de notre hypothèse pourrait être l'étude de la présence de différentes sous-unités des nAChRs dans différents types de neurones dans le AL. Ceci est envisageable par la production d'anticorps et leur utilisation en immunocytochimie, ou par hybridation *in situ*, éventuellement combiné avec des anticorps contre le GABA pour identifier les LNs.

En parallèle à ces travaux, nous avons identifié les sous-unités des récepteurs nicotiques chez *A. ipsilon* et avons commencé d'étudier leur expression en fonction des traitements avec la clothianidine. La mise à disposition d'une banque d'ADNc établie par Emanuelle Jaquin-Joly (INRA Versailles) ainsi que l'existence de différentes séquences dans les banques de données ont permis d'identifier 8 séquences de gènes codants pour des sous-unités de récepteurs nicotiques. Le nombre de sous-unités identifiées chez *A. ipsilon* reste dans le même ordre de grandeur que celles présentes chez les autres insectes : 10 (*D. mélanogaster*), 11 (*A. mellifera* et *A. pisum*) et 12 (*B. mori* et *T. castaneum*) (Jones et coll. 2005, 2006; Shao et coll. 2007). L'arbre phylogénétique construit a permis de classer les différentes sous unités présentant une grande homologie avec celles connues chez les autres espèces. Ceci confirme l'appartenance de ces séquences à la famille des sous-unités de nAChRs et permettrait leur utilisation par la suite pour les expériences de qPCR. Les séquences obtenues par alignement et BLAST, ont été suffisantes pour concevoir des amorces spécifiques pouvant être utilisées en PCR quantitative. Comme il avait été précédemment montré que des traitements avec des néonicotinoïdes à faible dose peuvent influencer l'expression de certaines sous-unités de nAChRs (Taillebois et coll., 2014; Yu et coll. 2011), nous avons évalué les profils d'expression dans le cerveau avant et après intoxication aux faibles doses de clothianidine. Ces connaissances pourraient nous aider à identifier des sous-unités potentiellement impliquées dans les effets dose-dépendants de la clothianidine sur le comportement sexuel. L'analyse des résultats de PCR quantitative à partir de cerveaux entiers n'a pas révélé d'effet significatif de la dose de 10 ng de clothianidine. La présence des récepteurs nicotiques dans les différentes parties du cerveau, avec des rôles fonctionnels différents, pourrait ressembler d'une régulation différentielle d'expression des sous-unités par la clothianidine. Ces effets différentiels pourraient masquer un effet possible de la clothianidine au niveau des structures impliquées dans l'olfaction. Pour rechercher plus spécifiquement un effet dans le système olfactif, nous avons commencé d'évaluer l'expression des sous-unités nicotiques uniquement sur les tissus des

AL car nous avons trouvé des effets de la clothianidine sur la sensibilité des neurones du AL. Les résultats préliminaires suggèrent une baisse de l'expression des différentes sous-unités, et peut-être une augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha 4$ . La confirmation de ces résultats permettra de mieux comprendre le rôle des sous-unités nicotiques dans les effets observés sur le comportement et le système olfactif d'*A. ipsilon*.

## Conclusions

De plus en plus d'études révèlent les dangers d'une utilisation intensive non maîtrisée des insecticides, et plus particulièrement des néonicotinoïdes. Jusqu'à présent ces études se focalisaient essentiellement sur les effets des faibles doses sur les insectes utiles. Mais il apparaît maintenant que ces substances peuvent, sous forme de résidus, faciliter le développement ou la reproduction des insectes-cibles contre lesquels ils ont été mis au point.

Au cours de cette thèse, j'ai pu montrer qu'un néonicotinoïde très répandu, la clothianidine, pouvait avoir, à une certaine dose, un effet paradoxal sur le comportement d'un insecte ravageur, en améliorant son comportement de réponse à la phéromone, indispensable pour sa reproduction. Il est bien sûr difficile de connaître précisément les taux d'insecticides résiduels dans l'environnement. Nos résultats ayant été obtenus au laboratoire, il est donc risqué et prématuré de les étendre à ce qui se passe dans la nature. Bien que l'application orale de l'insecticide peut correspondre à une situation rencontrée par les papillons adultes dans la nature pendant le butinage, les néonicotinoïdes ciblant les ravageurs lépidoptères ayant un effet principal sur les larves, il est maintenant nécessaire d'étudier les effets de traitements larvaires à faible dose sur les capacités olfactives des adultes.

Les connaissances acquises par l'équipe sur la plasticité du système olfactif des insectes m'ont permis, par une approche de neuro-éthologie, de mieux comprendre les mécanismes d'action possibles de la clothianidine à faible dose sur le système olfactif. Mes résultats montrent que le AL est un acteur principal de cette "plasticité" clothianidine-dépendante et que les effets de l'insecticide sont dépendants de l'état physiologique de l'insecte et s'additionnent à l'effet de la pré-exposition. Il reste maintenant à montrer si les mêmes mécanismes cellulaires et moléculaires pourraient être impliqués dans les différentes formes de modulation de la réponse à la phéromone de ce ravageur.

Un autre point important à prendre en compte est que des changements d'expression de sous-unités des nAChRs ne peuvent pas seulement modifier la transmission synaptique et donc la perception d'informations sensorielles, mais ils peuvent également changer l'affinité des nAChRs pour les néonicotinoïdes et donc modifier l'effet des traitements sur les insectes cibles.

Ceci montre, enfin, que les insectes sont non seulement capables de moduler leur système olfactif en fonction de leur état physiologique ou sexuel, mais aussi face à un stress environnemental d'origine anthropique: ils n'ont pas fini de nous surprendre!

*Conclusions*



## Bibliographie

- Abrieux, A. (2014). Rôle d'un récepteur à double affinité Ecdysone/Dopamine (DopEcR) et d'un facteur de transcription (Krüppel) dans la plasticité de l'olfaction chez un papillon de nuit. Thèse 3ème cycle, Université d'Angers.
- Abrieux, A., Debernard, S., Maria, A., Gaertner, C., Anton, S., Gadenne, C., and Duportets, L. (2013). Involvement of the G-protein-coupled dopamine/ecdysteroid receptor DopEcR in the behavioral response to sex pheromone in an insect. *PLoS one* 8, e72785.
- Abrieux, A., Duportets, L., Debernard, S., Gadenne, C., and Anton, S. (2014). The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect. *Front. Behav. Neurosci.* 8(312).
- Adams, M.D., and Sekelsky, J.J. (2002). From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 189-198.
- Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., and Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155-197.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., and Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113-122.
- Altschul, S.F., and Lipman, D.J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5509-5513.
- Anderson, P., Hansson, B.S., Nilsson, U., Han, Q., Sjöholm, M., Skals, N., and Anton, S. (2007). Increased behavioral and neuronal sensitivity to sex pheromone after brief odor experience in a moth. *Chem. Senses* 32, 483-491.
- Anderson, P., Sadek, M., and Hansson, B. (2003). Pre-exposure modulates attraction to sex pheromone in a moth. *Chem. Senses* 28, 285-291.
- Andersson, M.N., Larsson, M.C., and Schlyter, F. (2009). Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single-cell responses to ecologically relevant odors. *J. Insect Physiol.* 55, 556-567.
- Anton, S., Dufour, M.C., and Gadenne, C. (2007). Plasticity of olfactory-guided behaviour and its neurobiological basis: lessons from moths and locusts. *Ent. Exp. Appl.* 123,

1-11.

- Anton, S., Evengard, K., Barrozo, R.B., Anderson, P., and Skals, N. (2011). Brief predator sound exposure elicits behavioral and neuronal long-term sensitization in the olfactory system of an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 3401-3405.
- Anton, S., and Gadenne, C. (1999). Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5764-5767.
- Anton, S., and Hansson, B.S. (1996). Antennal lobe interneurons in the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) : processing of aggregation pheromones in adult males and females. *J. Comp. Neurol.* 370, 85-96.
- Anton, S., and Homberg, U. (1999). "Antennal lobe structure," in *Insect olfaction*. Springer, 97-124.
- Arias, H.R. (1997). Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25, 133-191.
- Ayyanath, M.-M., Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., and Sibley, P.K. (2013). Transgenerational Shifts in Reproduction Hormesis in Green Peach Aphid Exposed to Low Concentrations of Imidacloprid. *PLoS ONE* 8, e74532.
- Baker, T. (1989). Sex pheromone communication in the Lepidoptera: New research progress. *Cell. Mol. Life Sci.* 45, 248-262.
- Baker, T., and Haynes, K. (1987). Manoeuvres used by flying male oriental fruit moths to relocate a sex pheromone plume in an experimentally shifted wind- field. *Physiol. Entomol.* 12, 263-279.
- Baker, T., Willis, M., Haynes, K., and Phelan, P. (1985). A pulsed cloud of sex pheromone elicits upwind flight in male moths. *Physiol. Entomol.* 10, 257-265.
- Bao, H., Liu, S., Gu, J., Wang, X., Liang, X., and Liu, Z. (2009). Sublethal effects of four insecticides on the reproduction and wing formation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Manage. Sci.* 65, 170-174.
- Barbier, M., and Lederer, E. (1960). Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifica* L). *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 250, 4467-4469.

- Barrozo, R.B., Gadenne, C., and Anton, S. (2010b). Switching attraction to inhibition: mating-induced reversed role of sex pheromone in an insect. *J. Exp. Biol.* 213, 2933-2939.
- Barrozo, R.B., Jarriault, D., Deisig, N., Gemeno, C., Monsempes, C., Lucas, P., Gadenne, C., and Anton, S. (2011). Mating-induced differential coding of plant odour and sex pheromone in a male moth. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1841-1850.
- Barrozo, R.B., Jarriault, D., Simeone, X., Gaertner, C., Gadenne, C., and Anton, S. (2010a). Mating-induced transient inhibition of responses to sex pheromone in a male moth is not mediated by octopamine or serotonin. *J. Exp. Biol.* 213, 1100-1106.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36-42.
- Blacquiere, T., Smaghe, G., Van Gestel, C.A., and Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973-992.
- Böröczky, K., Wada-Katsumata, A., Batchelor, D., Zhukovskaya, M., and Schal, C. (2013). Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3615-3620.
- Breer, H., Kleene, R., and Hinz, G. (1985). Molecular forms and subunit structure of the acetylcholine receptor in the central nervous system of insects. *J. Neurosci.* 5, 3386-3392.
- Brown, W.L., Eisner, T., and Whittaker, R.H. (1970). Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *Bioscience* 20, 21-22.
- Buckingham, S., Lapied, B., Corronc, H.L., and Sattelle, F. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200, 2685-2692.
- Bues, R., Freuler, J., Toubon, J., Gerber, S., and Poitout, S. (1994). Stabilité du polymorphisme enzymatique dans les populations d'un Lépidoptère migrant, *Agrotis ipsilon*. *Entomol. Exp. Appl.* 73, 187-191.
- Busto, G.U., Cervantes-Sandoval, I., and Davis, R.L. (2010). Olfactory learning in *Drosophila*. *Physiology* 25, 338-346.
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., and Hecker, E. (1959). Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx Mori*-reindarstellung und konstitution. *Z. Naturforsch. B.*

14, 283-284.

Byrne, F.J., and Toscano, N.C. (2006). Uptake and persistence of imidacloprid in grapevines treated by chemigation. *Crop Protect.* 25, 831-834.

Calabrese, E.J. (2005). Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ. Pollut.* 138, 378-411.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol. Sci.*, 62, 330-338.

Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A. (2003). Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 175-197.

Callow, R., and Johnston, N.C. (1960). The Chemical Constitution and Synthesis of Queen Substance of Honeybees (*Apis Mellifera*) Preliminary Note. *Bee World* 41, 152-153.

Carlsson, M.A., Diesner, M., Schachtner, J., and Nässel, D.R. (2010). Multiple neuropeptides in the *Drosophila* antennal lobe suggest complex modulatory circuits. *J. Comp. Neurol.* 518, 3359-3380.

Casida, J.E. (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609-619.

Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99-117.

Casida, J.E., and Quistad, G.B. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983-998.

Castelán, F., Mulet, J., Aldea, M., Sala, S., Sala, F., and Criado, M. (2007). Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants. *J. Neurochem.* 100, 406-415.

Causse, R., Buès, R., Barthes, J., and Toubon, J. (1988). Mise en évidence expérimentale de nouveaux constituants des phéromones sexuelles de *Scotia ipsilon* et *Mamestra suasa*. *Méd. Chim. Comp. Syst. Léop.(Coll. INRA)* 46, 75-82.

Causse, R., Buès, R., Barthes, J., Toubon, J.F., and Poitout, S. (1989). Utilisation du piégeage sexuel pour l'étude des migrations de *Agrotis ipsilon*. Comparaison avec

- le piégeage lumineux. *Bull. OILB SROP* 12, 49-50.
- Cayrol, R. (1972). Famille des Noctuidae. *Entomologie appliquée à l'agriculture* 2, 1255-1520.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1, 581-585.
- Christensen, T.A., and Hildebrand, J.G. (1987). Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth, *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol.* 160, 553-569.
- Cohen, E. (2006). Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. *Pestic. Biochem. Physiol.* 85, 21-27.
- Cutler, C.G., Ramanaidu, K., Astatkie, T., and Isman, M.B. (2009). Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin. *Pest Manage. Sci.* 65, 205-209.
- Dale, R., Jones, A., Tamborindeguy, C., Davies, T., Amey, J., Williamson, S., Wolstenholme, A., Field, L., Williamson, M., and Walsh, T. (2010). Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol. Biol.* 19, 141-153.
- David, C.T., Kennedy, J.S., Ludlow, A.R., Perry, J.N., and Wall, C. (1982). A reappraisal of insect flight towards a distant point source of wind-borne odor. *J. Chem. Ecol.* 8, 1207-1215.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., and Williamson, M.S. (2007). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol. Biol.* 16, 361-375.
- De Oliveira, I.M., Nunes, B.V.F., Barbosa, D.R., Pallares, A.M., and Faro, L.R.F. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicol. Lett.* 192, 294-297.
- Decourtye, A., and Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. *Adv. Insect Physiol.* 683, 85-95.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., and Pham-Delegue, M.H. (2004).

- Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 410-419.
- Decourtye, A., Lacassie, E., and Pham- Delègue, M.H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manage. Sci.* 59, 269-278.
- Deisig, N., Dupuy, F., Anton, S., and Renou, M. (2014). Responses to pheromones in a complex odor world: sensory processing and behavior. *Insects* 5, 399-422.
- Delpuech, J.-M., Legallet, B., and Fouillet, P. (2001). Partial compensation of the sublethal effect of deltamethrin on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere* 42, 985-991.
- Delpuech, J.M., Bardon, C., and Boulétreau, M. (2005). Increase of the Behavioral Response to Kairomones by the Parasitoid Wasp *Leptopilina heterotoma* Surviving Insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 186-191.
- Desneux, N., Decourtye, A., and Delpuech, J.M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106.
- Desneux, N., Pham- Delègue, M.H., and Kaiser, L. (2004). Effects of sub- lethal and lethal doses of lambda- cyhalothrin on oviposition experience and host- searching behaviour of a parasitic wasp, *Aphidius ervi*. *Pest Manage. Sci.* 60, 381-389.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., and Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 18466-18471.
- Dicke, M. (2009). Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ.* 32, 654-665.
- Distler, P. (1990). GABA-immunohistochemistry as a label for identifying types of local interneurons and their synaptic contacts in the antennal lobes of the American cockroach. *Histochemistry* 93, 617-626.
- Distler, P.G., and Boeckh, J. (1997a). Synaptic connections between identified neuron types in the antennal lobe glomeruli of the cockroach, *Periplaneta americana*: I. Uniglomerular projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 378, 307-319.
- Distler, P.G., and Boeckh, J. (1997b). Synaptic connections between identified neuron

- types in the antennal lobe glomeruli of the cockroach, *Periplaneta americana*: II. Local multiglomerular interneurons. *J. Comp. Neurol.* 383, 529-540.
- Dorato, M.A., and Engelhardt, J.A. (2005). The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42, 265-274.
- Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Hu, Z., Nauen, R., He, S.Y., Zhorov, B.S., and Dong, K. (2013). Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11785-11790.
- Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893-1902.
- Duportets, L., Barrozo, R., Bozzolan, F., Gaertner, C., Anton, S., Gadenne, C., and Debernard, S. (2010). Cloning of an octopamine/tyramine receptor and plasticity of its expression as a function of adult sexual maturation in the male moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Mol. Biol.* 19, 489-499.
- Duportets, L., Bozzolan, F., Abrieux, A., Maria, A., Gadenne, C., and Debernard, S. (2012). The transcription factor Krüppel homolog 1 is linked to the juvenile hormone-dependent maturation of sexual behavior in the male moth, *Agrotis ipsilon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 158-166.
- Duportets, L., Dufour, M., Couillaud, F., and Gadenne, C. (1998a). Biosynthetic activity of corpora allata, growth of sex accessory glands and mating in the male moth *Agrotis ipsilon* (Hufnagel). *J. Exp. Biol.* 201, 2425-2432.
- Duportets, L., Gadenne, C., Dufour, M.-C., and Couillaud, F. (1998b). The pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*: immunohistochemistry, molecular characterization and bioassay of its peptide sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 591-599.
- Duportets, L., Maria, A., Vitecek, S., Gadenne, C., and Debernard, S. (2013). Steroid hormone signaling is involved in the age-dependent behavioral response to sex pheromone in the adult male moth *Agrotis ipsilon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 58-66.
- 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. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1553-1564.

- 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. *J. Neurophysiol.* 106, 1604-1613.
- Eiri, D.M., and Nieh, J.C. (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *J. Exp. Biol.* 215, 2022-2029.
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2008). Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 653-661.
- Gadenne, C. (1993). Effects of fenoxycarb, JH mimetic, on female sexual behaviour of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (lep:Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 39, 25-29.
- Gadenne, C., and Anton, S. (2000). Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth. *J. Insect Physiol.* 46, 1195-1206.
- Gadenne, C., Dufour, M.-C., and Anton, S. (2001). Transient post-mating inhibition of behavioural and central nervous responses to sex pheromone in an insect. *Proc. R. Soc. B: Biological Sciences* 268, 1631-1635.
- Gadenne, C., Picimbon, J.-F., Becard, J.-M., Lalanne-Cassou, B., and Renou, M. (1997). Development and pheromone communication systems in hybrids of *Agrotis ipsilon* and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Chem. Ecol.* 23, 191-209.
- Gadenne, C., Renou, M., and Sreng, L. (1993). Hormonal control of pheromone responsiveness in the male black cutworm *Agrotis ipsilon*. *Experientia* 49, 721-724.
- Galizia, C.G., and Menzel, R. (2001). The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J. Insect Physiol.* 47, 115-130.
- Galizia, C.G., and Rössler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 399-420.
- Gallo, M., and Doull, J. (1991). "History and scope of toxicology," in *Toxicology: the basic science of poisons*, eds. M. Amdur, J. Doull & C. Klaassen. 8th Edition ed (New York: Pergamon), 3-10.
- Gao, Q., Yuan, B., and Chess, A. (2000). Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat. Neurosci.* 3, 780-785.



- Gemeno, C., and Haynes, K.F. (1998). Chemical and behavioral evidence for a third pheromone component in a North American population of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *J. Chem. Ecol.* 24, 999-1011.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., and Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature* 491, 105-108.
- Godfray, H.C.J., Blacquiere, T., Field, L.M., Hails, R.S., Petrokofsky, G., Potts, S.G., Raine, N.E., Vanbergen, A.J., and Mclean, A.R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc. R. Soc. B: Biological Sciences* 281, 20140558.
- Goulson, D. (2013). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977-987.
- Gräter, F., Xu, W., Leal, W., and Grubmüller, H. (2006). Pheromone discrimination by the pheromone-binding protein of *Bombyx mori*. *Structure* 14, 1577-1586.
- Greiner, B., Gadenne, C., and Anton, S. (2002). Central processing of plant volatiles in *Agrotis ipsilon* males is age-independent in contrast to sex pheromone processing. *Chem. Senses* 27, 45-48.
- Greiner, B., Gadenne, C., and Anton, S. (2004). Three- dimensional antennal lobe atlas of the male moth, *Agrotis ipsilon*: A tool to study structure–function correlation. *J. Comp. Neurol.* 475, 202-210.
- Guedes, N., Tollo, J., Corrêa, A., and Guedes, R. (2010). Insecticide- induced hormesis in an insecticide- resistant strain of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *J. Appl. Entomol.* 134, 142-148.
- Guerrieri, F., Gemeno, C., Monsempes, C., Anton, S., Jacquín-Joly, E., Lucas, P., and Devaud, J.-M. (2012). Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J. Exp. Biol.* 215, 2334-2341.
- Guez, D., Belzunces, L., and Maleszka, R. (2003). Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 217-222.
- Ha, T.S., and Smith, D.P. (2006). A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate-

- induced responses in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 26, 8727-8733.
- Hammer, M., and Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Memory* 5, 146-156.
- Hansson, B.S., and Anton, S. (2000). Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 203-231.
- Harris, M.A., Oetting, R.D., and Gardner, W.A. (1995). Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture. *Biol. Control* 5, 412-418.
- Harris, S., Morris, P., Wray, S., and Yalden, D. (1995). A review of British mammals: population estimates and conservation status of British mammals other than cetaceans. *Joint Nature Conservation Committee, Peterborough*.
- Haynes, K., and Baker, T. (1985). Sublethal effects of permethrin on the chemical communication-system of the pink bollworm moth, *Pectinophora-gossypiella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2, 283-293.
- Haynes, K.F. (1988). Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 33, 149-168.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350.
- Hill, A., Rings, R., Swier, S., and Roelofs, W. (1979). Sex pheromone of the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *J. Chem. Ecol.* 5, 439-457.
- Hoffmann, G.R. (2009). A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose Response* 7, 1-51.
- Homberg, U., and Müller, U. (1999). "Neuroactive substances in the antennal lobe," in *Insect olfaction*. Springer, 181-206.
- Hoskins, S.G., Homberg, U., Kingan, T.G., Christensen, T.A., and Hildebrand, J.G. (1986). Immunocytochemistry of GABA in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 244, 243-252.
- Howard, P.H., Boethling, R.S., Jarvis, W.F., Meylan, W.M., and Michalenko, E.M. (1991 ).

- Handbook of environmental degradation rates*. New York: CRC Press.
- Ignell, R., Anton, S., and Hansson, B.S. (2001). The antennal lobe of Orthoptera—atomy and evolution. *Brain. Behav. Evol.* 57, 1-17.
- Jarriault, D., Barrozo, R.B., De Carvalho Pinto, C.J., Greiner, B., Dufour, M.-C., Masante-Roca, I., Gramsbergen, J.B., Anton, S., and Gadenne, C. (2009a). Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: Combined effects of octopamine and juvenile hormone. *Horm. Behav.* 56, 185-191.
- Jarriault, D., Gadenne, C., Lucas, P., Rospars, J.P., and Anton, S. (2010). Transformation of the Sex Pheromone Signal in the Noctuid Moth *Agrotis ipsilon*: From Peripheral Input to Antennal Lobe Output. *Chem. Senses* 35, 705-715.
- Jarriault, D., Gadenne, C., Rospars, J.-P., and Anton, S. (2009b). Quantitative analysis of sex-pheromone coding in the antennal lobe of the moth *Agrotis ipsilon*: a tool to study network plasticity. *J. Exp. Biol.* 212, 1191-1201.
- Jeschke, P., Harder, A., Etzel, W., Gau, W., Thielking, G., Bonse, G., and Iinuma, K. (2001). Synthesis and anthelmintic activity of thioamide analogues of cyclic octadepsipeptides such as PF1022A. *Pest Manag. Sci.* 57, 1000-1006.
- Jeschke, P., and Uneme, H. (2003). Chlothianidin (TI-435) - the third member of the chloronicotiny insecticides (CNI) family. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 56.
- 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. *Invertebr. Neurosci.* 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 Res.* 16, 1422-1430.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 25-43.
- Kaissling, K.E., Strausfeld, C., and Rumbo, E. (1987). Adaptation processes in insect olfactory receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 510, 104-112.

- Karlson, P., and Luscher, M. (1959). Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55-56.
- Kaupp, U.B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Rev. Neurosci.* 11, 188-200.
- Keil, T.A. (1999). "Morphology and development of the peripheral olfactory organs," in *Insect olfaction*. Springer, 5-47.
- Kennedy, J. (1983). Zigzagging and casting as a programmed response to wind-borne odour: a review. *Physiol. Entomol.* 8, 109-120.
- Kessler, S.C., Tiedeken, E.J., Simcock, K.L., Derveau, S., Mitchell, J., Softley, S., Stout, J.C., and Wright, G.A. (2015). Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* 521, 74-76.
- Kromann, S.H., Saveer, A.M., Binyameen, M., Bengtsson, M., Birgersson, G., Hansson, B.S., Schlyter, F., Witzgall, P., Ignell, R., and Becher, P.G. (2015). Concurrent modulation of neuronal and behavioural olfactory responses to sex and host plant cues in a male moth. *Proc. R. Soc. B* 282, 20141884.
- Kullik, S.A., Sears, M.K., and Schaafsma, A.W. (2011). Sublethal effects of Cry 1F Bt corn and clothianidin on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development. *J. Econ. Entomol.* 104, 484-493.
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., and Gauthier, M. (2001). Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48, 129-134.
- Lansdell, S.J., and Millar, N.S. (2000). The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist,  $\alpha$ -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39, 671-679.
- Laue, M., Steinbrecht, R.A., and Ziegelberger, G. (1994). Immunocytochemical localization of general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Naturwissenschaften* 81, 178-180.
- Laurent, F.M., and Rathahao, E. (2003). Distribution of [<sup>14</sup>C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 8005-8010.
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., Wang, M., Huang, Z.,

- Bécard, J.-M., Crauser, D., and Slessor, K.N. (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17559-17564.
- Lind, R.J., Clough, M.S., Reynolds, S.E., and Earley, F.G. (1998). [3 H] Imidacloprid Labels High-and Low-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptor-like Binding Sites in the Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 3-14.
- Linn, C., and Roelofs, W. (1984). Sublethal effects of neuroactive compounds on pheromone response thresholds in male oriental fruit moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1, 331-344.
- Linn, C., and Roelofs, W. (1986). Modulatory effects of octopamine and serotonin on male sensitivity and periodicity of response to sex pheromone in the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3, 161-171.
- Loublier, Y., Douault, P., Causse, R., Barthes, J., Bues, R., and Poitout, S.-H. (1994). Utilisation des spectres polliniques recueillis sur *Agrotis (Scotia) ipsilon* Hufnagel (Noctuidae) comme indicateur des migrations. *Grana* 33, 276-281.
- Lozano, V.C., Armengaud, C., and Gauthier, M. (2001). Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 187, 249-254.
- Lucas, P., and Renou, M. (1992). Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 43, 103-115.
- Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novere, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., Dani, J.A., Grady, S.R., Kellar, K.J., Lindstrom, J.M., Marks, M.J., Quik, M., Taylor, P.W., and Wonnacott, S. (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 51, 397-401.
- Manahan, S.E. (2002). *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. CRC Press.
- Mason, R., Tennekes, H., and Sanchez-Bayo, F. (2013). Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J. Environ. Immunol. Toxicol.* 1, 3-12.

- 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 Pharmacol. Sci.* 22, 573-580.
- Menzel, R., and Muller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 379-404.
- Millar, N.S. (2009). A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 78, 766-776.
- Millar, N.S., and Lansdell, S.J. (2010). Characterisation of insect nicotinic acetylcholine receptors by heterologous expression. *Adv. Insect Physiol.* 683, 65-73.
- Minoli, S., Kauer, I., Colson, V., Party, V., Renou, M., Anderson, P., Gadenne, C., Marion-Poll, F., Anton, S., and Coleman, M.J. (2012). Brief exposure to sensory cues elicits stimulus-nonspecific general sensitization in an insect. *PloS one* 7, e34141.
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., and Yasukochi, Y. (2004). The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* 11, 27-35.
- Mommaerts, V., Sterk, G., Hoffmann, L., and Smagghe, G. (2009). A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Manage. Sci.* 65, 949-955.
- Murlis, J., Willis, M.A., and Cardé, R.T. (2000). Spatial and temporal structures of pheromone plumes in fields and forests. *Physiol. Entomol.* 25, 211-222.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., and Kausmann, M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 76, 55-69.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., and Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manage. Sci.* 57, 577-586.
- Olsen, S.R., and Wilson, R.I. (2008). Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature* 452, 956-960.
- Peñuelas, J., and Llusà, J. (2004). Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends Ecol. Evol.* 19, 402-404.

- Philbert, M.A., Billingsley, M.L., and Reuhl, K.R. (2000). Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol. Pathol.* 28, 43-53.
- Philogène, B., Regnault-Roger, C., and Vincent, C. (2008). "Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui," in *Biopesticides d'origine végétale*. Lavoisier, 1-17.
- Picimbon, J.-F., Becard, J.-M., Sreng, L., Clement, J.-L., and Gadenne, C. (1995). Juvenile hormone stimulates pheromoneotropic brain factor release in the female black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *J. Insect Physiol.* 41, 377-382.
- Picimbon, J.F., Gadenne, C., Bécard, J.M., Clément, J.L., and Sreng, L. (1997). Sex pheromone of the french black cutworm moth, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): identification and regulation of a multicomponent blend. *J. Chem. Ecol.* 23, 211-230.
- Prosser, P., and Hart, A.D.M. (2005). Assessing Potential Exposure of Birds to Pesticide-Treated Seeds. *Ecotoxicology* 14, 679-691.
- Quero, C., and Baker, T.C. (1999). Antagonistic effect of (Z)-11-hexadecen-1-ol on the pheromone-mediated flight of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Behav.* 12, 701-710.
- Rabhi, K.K., Esancy, K., Voisin, A., Crespin, L., Le Corre, J., Tricoire-Leignel, H., Anton, S., and Gadenne, C. (2014). Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. *PloS one* 9, e114411.
- Rafaëli, A. (2005). Mechanisms involved in the control of pheromone production in female moths: recent developments. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 7-15.
- Raina, A.K., and Klun, J.A. (1984). Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. *Science* 225, 531-532.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., and Sattelle, D.B. (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* 5, 119-133.
- Renwick, J., and Chew, F. (1994). Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 377-400.
- Roelofs, W.L. (1995). Chemistry of sex attraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 44-49.

## Bibliographie

- Root, C.M., Masuyama, K., Green, D.S., Enell, L.E., Nässel, D.R., Lee, C.-H., and Wang, J.W. (2008). A presynaptic gain control mechanism fine-tunes olfactory behavior. *Neuron* 59, 311-321.
- Rospars, J.-P., Grémiaux, A., Jarriault, D., Chaffiol, A., Monsempe, C., Deisig, N., Anton, S., Lucas, P., and Martinez, D. (2014). Heterogeneity and convergence of olfactory first-order neurons account for the high speed and sensitivity of second-order neurons. *PLoS Comp. Biol.* 10, e1003975.
- Rospars, J.P. (1988). Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17, 243-294.
- Rouyar, A., Deisig, N., Dupuy, F., Limousin, D., Wycke, M.-A., Renou, M., and Anton, S. (2015). Unexpected plant odor responses in a moth pheromone system. *Front. Physiol.* 6, 148.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., and Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002-1006.
- Schachtner, J., Schmidt, M., and Homberg, U. (2005). Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+ Hexapoda). *Arthropod Struct. Dev.* 34, 257-299.
- Schäfer, S., and Bicker, G. (1986). Distribution of GABA- like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 246, 287-300.
- Schneider, D. (1964). Insect antennae. *Annu. Rev. Entomol.* 9, 103-122.
- Schneider, D. (2000). Using *Drosophila* as a model insect. *Nat. Rev. Genet.* 1, 218-226.
- Scott, J.G., Warren, W.C., Beukeboom, L.W., Bopp, D., Clark, A.G., Giers, S.D., Hediger, M., Jones, A.K., Kasai, S., and Leichter, C.A. (2014). Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment. *Genome Biol.* 15, 466.
- Seki, Y., and Kanzaki, R. (2008). Comprehensive morphological identification and GABA immunocytochemistry of antennal lobe local interneurons in *Bombyx mori*. *J. Comp. Neurol.* 506, 93-107.
- Shang, J.Y., Shao, Y.M., Lang, G.J., Yuan, G., Tang, Z.H., and Zhang, C.X. (2007). Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx*



- mori*, in insect cells. *Insect Sci.* 14, 443-449.
- 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.
- Shepherd, G., and Koch, C. (1990). "Dendritic electrotonus and synaptic integration," in *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, 439-473.
- Shi, X., Jiang, L., Wang, H., Qiao, K., Wang, D., and Wang, K. (2011). Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pest Manage. Sci.* 67, 1528-1533.
- Shorey, H. (1964). Sex pheromones of noctuid moths. II. Mating behavior of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) with special reference to the role of the sex pheromone. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 57, 371-377.
- Shorey, H., McFarland, S., and Gaston, L.K. (1968). Sex pheromones of noctuid moths. XIII. Changes in pheromone quantity, as related to reproductive age and mating history, in females of seven species of Noctuidae (Lepidoptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61, 372-376.
- Showers, W.B. (1997). Migratory ecology of the black cutworm. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 393-425.
- Showers, W.B., Smelser, R.B., Keaster, A.J., Whitford, F., Robinson, J.F., Lopez, J.D., and Taylor, S.E. (1989). Recapture of marked black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) males after long-range transport. *Environ. Entomol.* 18, 447-458.
- Smart, R., Kiely, A., Beale, M., Vargas, E., Carraher, C., Kralicek, A.V., Christie, D.L., Chen, C., Newcomb, R.D., and Warr, C.G. (2008). Drosophila odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 770-780.
- Soreq, H., and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302.
- Starner, K., and Goh, K.S. (2012). Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010-2011. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 316-321.
- Steinbrecht, R., Ozaki, M., and Ziegelberger, G. (1992). Immunocytochemical localization of

- pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res.* 270, 287-302.
- Steinbrecht, R.A. (1970). Zur morphometrie der antenne des seidenspinners, *Bombyx mori* L.: Zahl und verteilung der riechsensillen (Insecta, Lepidoptera). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 68, 93-126.
- Sun, X., Tolbert, L., and Hildebrand, J. (1997). Synaptic organization of the uniglomerular projection neurons of the antennal lobe of the moth *Manduca sexta*: a laser scanning confocal and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 379, 2-20.
- Swier, S.R., Rings, R., and Musick, G. (1977). Age-related calling behavior of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70, 919-924.
- Swier, S.R., Rings, R.W., and Musick, G. (1976). Reproductive behavior of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 546-550.
- Taillebois, E., Beloula, A., Quinchard, S., Jaubert-Possamai, S., Daguin, A., Servent, D., Tagu, D., Thany, S.H., and Tricoire-Leignel, H. (2014). Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* 9, e96669.
- Tan, Y., Biondi, A., Desneux, N., and Gao, X.-W. (2012). Assessment of physiological sublethal effects of imidacloprid on the mirid bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Ecotoxicology* 21, 1989-1997.
- Tassonyi, E., Charpantier, E., Muller, D., Dumont, L., and Bertrand, D. (2002). The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res. Bull.* 57, 133-150.
- Thany, S.H., Crozatier, M., Raymond-Delpech, V., Gauthier, M., and Lenaers, G. (2005). Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene* 344, 125-132.
- Thany, S.H., Lenaers, G., 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 Mol. Biol.* 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 Pharmacol. Sci.* 28, 14-22.
- Todd, J.L., and Baker, T.C. (1999). "Function of peripheral olfactory organs," in *Insect*

- olfaction*. Springer), 67-96.
- Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247-268.
- Touhara, K., and Vosshall, L.B. (2009). Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 307-332.
- Turgeon, J.J., Mcneil, J.N., and Roelofs, W.L. (1983). Responsiveness of *Pseudaletia unipuncta* males to the females sex pheromone. *Physiol. Entomol.* 8, 339-344.
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346, 967-989.
- Vincent, C., Ferran, A., Guige, L., Gambier, J., and Brun, J. (2000). Effects of imidacloprid on *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) larval biology and locomotory behavior. *Eur. J. Entomol.* 97, 501-506.
- Vitecek, S., Maria, A., Blais, C., Duportets, L., Gaertner, C., Dufour, M.-C., Siaussat, D., Debernard, S., and Gadenne, C. (2013). Is the rapid post-mating inhibition of pheromone response triggered by ecdysteroids or other factors from the sex accessory glands in the male moth *Agrotis ipsilon*? *Horm. Behav.* 63, 700-708.
- Vo, D., Hsu, W.H., Abu- Basha, E., and Martin, R. (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 315-322.
- Vogt, R.G., and Riddiford, L.M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293, 161-163.
- Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P.S., Rzhetsky, A., and Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96, 725-736.
- Wang, S., Zhang, S., Sato, K., and Srinivasan, M.V. (2005). Maturation of odor representation in the honeybee antennal lobe. *J. Insect Physiol.* 51, 1244-1254.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W., and Burt, J.P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123, 1-155.
- Wei, H.-Y., and Du, J.-W. (2004). Sublethal effects of larval treatment with deltamethrin on moth sex pheromone communication system of the Asian corn borer, *Ostrinia*

- furnacalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80, 12-20.
- Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H., and Hansson, B.S. (2008). Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452, 1007-1011.
- Williamson, S.M., and Wright, G.A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J. Exp. Biol.* 216, 1799-1807.
- Wilson, R.I., and Laurent, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the Drosophila antennal lobe. *J. Neurosci.* 25, 9069-9079.
- Yamada, T., Takahashi, H., and Hatano, R. (1999). "A novel insecticide, acetamiprid," in *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer, 149-176.
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., and Chang, L.H. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101, 1743-1748.
- Yu, R., Craik, D.J., and Kaas, Q. (2011). Blockade of neuronal  $\alpha 7$ -nAChR by  $\alpha$ -conotoxin Iml explained by computational scanning and energy calculations. *PLoS Comp. Biol.* 7, e1002011.
- Yu, Y., Shen, G., Zhu, H., and Lu, Y. (2010). Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 238-242.
- Zhang, Q.-H., Schlyter, F., and Anderson, P. (1999). Green leaf volatiles interrupt pheromone response of spruce bark beetle, *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.* 25, 2847-2861.

# Thèse de Doctorat

Kaouther k Rabhi

## Effet de faibles doses d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un lépidoptère ravageur des cultures, *Agrotis ipsilon*

### Résumé

Durant leur cycle de vie, les insectes doivent faire face à différents perturbateurs pour réussir à survivre et à se reproduire. L'utilisation de plus en plus répandue des insecticides néonicotinoïdes, en raison de leur grande efficacité, a conduit à l'accumulation de résidus dans l'environnement. Ceux-ci ont certainement un effet additif toxique sur les insectes cibles. Cependant il a été montré que ces résidus peuvent aussi avoir un effet positif non désiré sur certains traits de vie des insectes ravageurs.

Dans ma thèse, j'ai étudié les effets d'un insecticide néonicotinoïde sur le système olfactif d'un insecte ravageur, la noctuelle *Agrotis ipsilon*. Nos résultats montrent que l'exposition aiguë des mâles à des faibles doses de clothianidine modifie leurs réponses comportementales à la phéromone sexuelle: une baisse est observée à la dose 0,25 ng/insecte (<DL0) alors que la dose de 10 ng (DL20) induit une augmentation de la réponse chez les adultes naïfs ou pré-exposés à la phéromone. Cet effet biphasique à faible et très faible dose s'apparente à un effet hormétique et les modifications observées sont corrélées avec des changements de sensibilité du système olfactif central et non périphérique. Nous émettons l'hypothèse que la clothianidine agirait sur l'expression des sous-unités des récepteurs nicotiques pour lesquels elle joue le rôle d'agoniste, changeant leur affinité pour l'acétylcholine et perturbant ou améliorant la transmission synaptique des signaux sensoriels selon la dose. Nos résultats montrent que la prise en compte d'effets de doses sublétales d'insecticides est essentielle non seulement pour les insectes non cibles, mais aussi des insectes cibles.

### Mots clés

Insecticides néonicotinoïdes, Hormèse, Phéromone, Récepteurs nicotiques, Comportement sexuel, Lobe antennaire.

### Abstract

Insects face a multitude of environmental stresses, which they have to bypass in order to survive and reproduce. The extensive use of neonicotinoid insecticides, because of their high efficiency, leads to the accumulation of residues in the environment, which can have an additive toxic effect on target insects. However, such residues can also have unwanted positive effects on certain life traits of pest insects.

In my thesis I studied the effects of a neonicotinoid insecticide on the olfactory system of the pest insect *Agrotis ipsilon*. Our results show that acute oral treatments of males with low doses of clothianidin modify their behavioural responses to the sex pheromone: a treatment with 0.25 ng/moth (<LD0) induces a decrease of pheromone responses whereas intoxication with 10 ng/moth (LD20) leads to an increase in the capacity of naive and pre-exposed males to locate a pheromone source as compared to controls. We propose that this biphasic effect, with low dose stimulation and very low dose inhibition is an hormetic-like effect, that is correlated with sensitivity changes within the central, but not the peripheral olfactory system. We hypothesize that the observed modifications might be due to a differential effect of clothianidin on the expression of different subunits of nicotinic acetylcholine receptors, which might change the affinity of the receptors for acetylcholine, and thus disturb or improve synaptic transmission of sensory signals as a function of the insecticide dose. Our results show that effects of sublethal doses of insecticides need to be taken into account not only for non-target, but also for target insects when evaluating pest management strategies.

### Key Words

Neonicotinoid insecticides, Hormesis, Pheromone, Nicotinic receptors, Sexual behaviour, Antennal lobe.