

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

THÈSE présentée par :

Jean-Noël HOUCHAT

soutenue le : **11 mars 2021**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurobiologie**

Rôle des voies de régulation intracellulaire calcium-
dépendante dans la modulation des récepteurs
cholinergiques de type nicotinique chez les insectes

THÈSE dirigée par :

Monsieur THANY Steeve

Professeur, Université d'Orléans

Madame TAILLEBOIS Emiliane

Maître de Conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Madame RAYMOND Valérie

Professeur, Université d'Angers

Madame ARMENGAUD Catherine

Maître de Conférences, Université Toulouse III - Paul Sabatier

JURY :

Madame PICHON Chantal

Présidente du jury, Professeur, CNRS d'Orléans

Madame RAYMOND Valérie

Professeur, Université d'Angers

Madame ARMENGAUD Catherine

Maître de Conférences, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Monsieur MARTIN Jean-René

Directeur de Recherches, Université Paris-Saclay

Madame TAILLEBOIS Emiliane

Maître de Conférences, Université d'Orléans

Monsieur THANY Steeve

Professeur, Université d'Orléans



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrant de thèse, **Steeve THANY**, pour m'avoir pris sous son aile, accordé sa confiance et avoir été disponible. Un grand merci également à **Emiliane TAILLEBOIS**, qui s'est penchée sur l'encadrement de ma thèse dès son arrivée au laboratoire. Je remercie aussi la **Région Centre Val-de-Loire** pour le financement de ce projet.

Je remercie ensuite les personnes qui ont accepté d'être désignés comme étant membres du jury de soutenance : **Valérie RAYMOND** (SifCiR, Université d'Angers), **Catherine ARMENGAUD** (CRCA, Université Toulouse III), **Jean-René MARTIN** (Institut NeuroPSI, CNRS, Université Paris-Saclay) et **Chantal PICHON** (CBM, CNRS, Orléans).

A l'équipe d'Entomologie et Biologie Intégrée...

Alison CARTEREAU, nous nous connaissons depuis bien avant la thèse maintenant, merci pour avoir été une super collègue et être, par la même occasion, devenue une amie. Je garderai un très bon souvenir de nos journées au labo. Merci de m'avoir supporté. ... **Anaïs LE MAUFF**, tu es arrivée en thèse une année après moi et tu as su t'intégrer à merveille. Merci de m'avoir fait prendre l'air de nombreuses fois dans Orléans, merci pour les soirées, les restos, les cinés, les bars ! Merci aussi pour ton humour, parfois noir mais que j'adore ! ... **Carine MARTIN**, tu m'as accueilli à bras ouverts, présenté le labo, expliqué le fonctionnement de la fac d'Orléans, sorti de situations parfois compliquées, soutenu... Difficile d'être bref ! Merci, merci, merci ! ... **Xavier PINEAU**, pour ta gentillesse, pour les connaissances en entomologie que tu m'as apportées et pour m'avoir dépanné de matériel lors de mes séances de bricolage expérimental ! ... **Stéphanie BANKHEAD**, pour m'avoir confié des cours de biologie de l'insecte que j'ai adoré dispenser. Si quelqu'un m'inspire pour organiser des cours didactiques et bien structurés, c'est toi ! ... **Aurélien SALLE**, ton franc-parler et tes punchlines vont me manquer ! ... **Mathilde BAUDE**, pour ton sens de l'écoute et pour m'avoir emmené faire des relevés de pollen sur parcelles, ça fait du bien de sortir du labo de temps en temps ! ... **Daniel AUGUIN**, pour les discussions enrichissantes tard le soir au labo. ... **Basile MOAMBI**, tu n'es certes plus dans l'équipe étant donné que tu étais de passage pour ton stage de M2, mais je te remercie également car sans toi, je pense que j'aurais mis bien plus de temps que prévu pour maîtriser le poste de patch-clamp. Merci d'avoir égayé ces premiers mois de thèse... **Alexandra CREMADES**, arrivée dans l'équipe lors de ma dernière année de thèse, et avec qui j'aurai partagé de très bons moments, merci d'avoir été aux petits soins pendant les derniers jours.

Aux autres personnes qui ont fait du laboratoire ma deuxième maison...

Isabelle LE JAN, mention spéciale pour toi ! Pour les encouragements, les fous rires, les blagues, la bonne humeur et les tutos jardinage ! J'ai passé d'excellents moments en ta compagnie. ... **Mélanie LARCHER**, que dire ? Tu es une collègue exceptionnelle, toujours prête à rendre service et ayant les mots pour rire, la suite sans toi va sembler un peu vide. ... **Régis FICHOT**, pour avoir pensé à moi lors des pauses café et pour m'avoir traité de branleur pendant trois ans ! ... **Françoise CHEFDOR**, pour ta grande bienveillance, ton ouverture d'esprit, tes conseils sur certaines pratiques de laboratoire et ton amour des animaux ! ... **Laurent LEGUAY**, je t'aurai embêté pendant toute la thèse avec mes questions administratives, ou sur le kempo ! Merci pour ta patience. ... **François**

HERICOURT, pour avoir répondu à mes interrogations en biologie moléculaire, volé à mon secours sur certains mots fléchés et rehaussé ma culture cinématographique ! ... **Sylvain BOURGERIE**, pour avoir été accessible et m'avoir parfois aiguillé lors de certains blocages. ... **Alain DELAUNAY**, pour ton humour et ton aide avec du matériel que je n'avais jamais eu à utiliser auparavant. ... **Sabine CARPIN**, ta bonne humeur et ton rire communicatif apportent beaucoup ! Merci d'avoir été aussi rassurante dans les moments de doute. ... **Domenico MORABITO**, pour ton sens de l'humour, la lecture de l'horoscope et les conseils culinaires, merci de veiller à ce qu'on mange bien ! ... **Stéphane MAURY**, pour ton humour taquin et les discussions intéressantes du matin autour d'un café. ... **Christiane DEPIERREUX**, **Frédéric LAMBLIN**, **Muriel FEINARD-DURANCEAU**, **Cécile VINCENT-BARBAROUX**, vous avez été adorables avec moi au quotidien et avez tout mis en place pour que je puisse assurer des enseignements et booster mon CV, je vous remercie énormément. ... **Florie MIARD**, tu as toujours eu le sourire ! ... **Christophe HANO**, pour ta compréhension et ta gentillesse. ... **Richard BOUCEFFA**, rien ne te résiste, merci de m'avoir rendu le quotidien plus facile et pratique.

Dans le même bateau...

Mamadou Dia SOW, camarade de bureau maintenant docteur, je m'excuse de t'avoir emmené maintes fois en sortant du labo puis d'avoir oublié de te déposer chez toi en cours de route... Mais c'était drôle ! ... **Manhattan LEBRUN**, le monstre de travail également docteur aujourd'hui, tu es devenue une amie et on prend beaucoup de plaisir à passer du temps avec toi ! ... **Laure BOUYER**, maintenant docteur, la douceur même et avec qui il est facile de discuter de tout et de rien. ... **Julien VIGNEAUD**, actuellement doctorant dans le bureau et qui a pris goût aux pauses café ! ... **Robin MOOM**, **Erin MALONEY**, les doctorants venus d'ailleurs, merci pour les bons moments passés ensemble !

Une pensée pour toi, **Arnaud PARIS**. Les repas et discussions du midi avec Mélanie et toi étaient juste géniaux. Merci pour ton humour, ton écoute et tes conseils en culture cellulaire et dans d'autres domaines.

A mes amis, d'enfance à aujourd'hui, dans les bons moments et dans les plus difficiles...

Lolo, **Camille**, **Axel**, vous êtes les meilleurs amis qu'on puisse avoir, merci d'avoir toujours été là ! ... **Dan**, comment ne pas te citer ? Tu es comme une sœur. ... **Manon**, merci d'être présente, drôle et généreuse les bons comme dans les moins bons moments. ... **Deb'**, merci pour le soutien constant que tu me portes depuis tout ce temps, et pour nos discussions à rallonge le soir sur le web ! ... **Tif** et **Emilie**, merci pour les moments de folie que l'on partage depuis que l'on se connaît, ils me permettent de me vider la tête. ... **Morgane**, **Didine**, **Max**, ma **Brenda**, **Hélène**, **Ju'**, **Guillaume**, **Val**, **Chou**, **Tata**, **Kévin**, je ne vous le dis jamais, mais je vous aime tous ! Ma vie ne serait pas la même sans vous. A toi aussi, **Gwen**, pour les sorties et les soirées à Orléans !

A ma famille, qui a toujours veillé à ce que je ne manque de rien, qui a supporté mon caractère parfois difficile et m'a soutenu, psychologiquement comme financièrement. Sans vous, je ne serais pas arrivé aussi loin.

AVANT-PROPOS

Au regard d'une population mondiale croissante et du besoin de garantir des rendements agricoles suffisants pour la nourrir, mais aussi du besoin de la protéger de certaines maladies, les produits phytosanitaires ont pris une place capitale dans la société moderne. Ils protègent les cultures de nombreux ravageurs d'origines fongique, végétale ou animale, et permettent également de lutter contre des vecteurs de maladies telles que le paludisme. Toutefois, des polémiques liées à l'utilisation des produits phytosanitaires tels que les insecticides néonicotinoïdes ont émergé et ont conduit au bannissement de certaines formulations par l'Union Européenne. Ces polémiques sont liées d'une part à la non spécificité des néonicotinoïdes, qui ont eu des effets sur les ravageurs de cultures mais aussi sur des espèces non-cibles, notamment des pollinisateurs tels que les abeilles. D'autre part, les connaissances sur les effets neurotoxiques des néonicotinoïdes sur les insectes restent mal connus. En effet, si le mode d'action agoniste des néonicotinoïdes sur leur cible neuronale, les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs), est bien documenté, les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui entrent en jeu dans la modulation de leurs effets restent faibles. Pourtant, ces mécanismes pourraient expliquer l'apparition de phénomènes de résistance aux néonicotinoïdes.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des voies de régulation intracellulaire impliquant le calcium dans la modulation des effets de différents agonistes sur les nAChRs neuronaux d'un insecte, la blatte américaine. Plus précisément, nous avons cherché à savoir comment ces voies régulent les effets agonistes de la nicotine, mais aussi de la clothianidine (néonicotinoïde) et du sulfoxaflor (insecticide dérivé des sulfoximines) sur deux sous-types de nAChRs insensibles à l' α -BGT nommés nAChR1 et nAChR2.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations.....	1
Introduction Générale.....	5
I. Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique de vertébrés.....	7
1. Historique.....	7
2. Structure et fonction des nAChRs de vertébrés.....	8
2.1. Sous-unités constituant un nAChR de vertébré.....	8
2.2. Pore ionique.....	10
2.3. Site de liaison à l'ACh.....	11
2.4. États d'ouverture du nAChR.....	13
3. Composition en sous-unités et classification pharmacologique des nAChRs de vertébrés.....	14
4. Modulation allostérique des nAChRs de vertébrés.....	15
4.1. Modulateurs allostériques positifs et agonistes allostériques.....	16
4.2. Modulateurs allostériques négatifs.....	17
4.3. Modulateurs allostériques silencieux.....	18
5. Modulation des nAChRs de vertébrés par le calcium et les voies intracellulaires calcium-dépendantes.....	18
5.1. Régulation des niveaux de calcium intra-neuronaux.....	18
5.1.1. Rôle du calcium au niveau synaptique.....	18
5.1.2. Flux calcique au travers des nAChRs.....	19
5.2. Modulation directe des nAChRs par le calcium.....	20
5.3. Modulation des nAChRs de vertébrés par la voie des protéine-kinases C.....	22
5.3.1. Généralités sur les protéines kinases C.....	22
5.3.2. Implication des PKC dans la modulation des nAChRs neuronaux de vertébrés.....	24
5.4. Modulation des nAChRs de vertébrés par la calmoduline et les kinases dépendantes.....	26
5.4.1. Généralités sur la calmoduline.....	26
5.4.2. Régulation CaM-dépendante des nAChRs neuronaux de vertébrés.....	28

5.5. Modulation des nAChRs de vertébrés par la voie de l'AMP cyclique.....	30
5.5.1. Généralités sur l'AMP cyclique.....	30
5.5.2. nAChRs neuronaux de vertébrés et voie AMPc/PKA.....	32
II. Caractérisation des nAChRs neuronaux d'insectes.....	36
1. Diversité des sous-unités de nAChRs d'insectes.....	36
2. Composition en sous-unités, pharmacologie et réponse aux insecticides.....	38
2.1. Caractérisation des propriétés pharmacologiques des nAChRs d'insectes par des approches électrophysiologiques.....	38
2.2. Caractérisation des propriétés pharmacologiques des nAChRs d'insectes par des tests de liaison par affinité.....	39
2.3. nAChRs d'insectes, cible des insecticides néonicotinoïdes.....	40
2.3.1. Structure et mode d'action des néonicotinoïdes.....	40
2.3.2. Composition en sous-unités des nAChRs sensibles/insensibles aux néonicotinoïdes.....	42
2.3.3. nAChRs d'insectes et résistance aux néonicotinoïdes.....	45
3. Modulation allostérique des nAChRs d'insectes et autres invertébrés.....	46
4. Modulation calcium-dépendante des nAChRs d'insectes.....	47
III. Présentation de la structure d'accueil et objectifs de thèse.....	53
Matériels et méthodes.....	57
I. Modèle biologique : la blatte <i>Periplaneta americana</i>.....	59
II. Préparation des neurones DUM.....	60
III. Patch-clamp en configuration "cellule entière".....	61
1. Principe de la technique.....	61
2. Protocole adapté aux neurones DUM de <i>P. americana</i>	62
IV. Imagerie calcique ratiométrique.....	63
1. Principe de la technique.....	63
2. Protocole adapté aux neurones DUM de <i>P. americana</i>	63

Chapitre I : Mode d'action du sulfoxaflor sur les nAChRs insensibles à l'α-bungarotoxine, nAChR1 et nAChR2: effet inhibiteur de l'imidaclopride.....	67
I. Synthèse de l'article.....	69
II. Article publié.....	71
 Chapitre II : Effets d'un analogue du diacylglycérol, le 1,2-dioctanoyl-sn-glycérol (DiC8), sur les courants induits par la nicotine et la clothianidine à travers des récepteurs nicotiniques insensibles à l'α-bungarotoxine exprimés dans les neurones DUM de blatte...	79
I. Synthèse de l'article.....	81
II. Article publié.....	83
 Chapitre III : Identification de CaMKK/AMPK comme une voie intracellulaire calcium-dépendante régulant les courants nicotiniques.....	93
I. Synthèse de l'article.....	95
II. Article non publié.....	97
 Discussion et Perspectives.....	139
 Liste des figures et des tableaux.....	149
Références bibliographiques.....	151
Annexes.....	179

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	adénylylcyclase
ACE	acétamipride
ACh	acétylcholine
AChBP	"acetylcholine-binding protein"
ALS	"alpha-like subunit"
AMPA	acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc	AMP cyclique
AMPK	"AMP-activated protein kinase"
aPKC	PKC "atypique"
α-BGT	α -bungarotoxine
C1-4	domaines non-variables constituant une PKC
CaM	"Ca ²⁺ -modulated protein" ou calmoduline
CaMK	"Ca ²⁺ /CaM-dependent protein kinases" ou CaM-kinases
CaMKK	CaMK-kinase
Cdz	calmidazolium
CICR	"calcium-induced calcium release"
CLT	clothianidine
cPKC	PKC "classique" ou "conventionnelle"
CREB	"cAMP response element-binding protein"
DAG	diacylglycérol
DhβE	dihydro- β -érythroïdine
DiC8	"1,2-dioctanoyl- <i>sn</i> -glycérol"
DIN	dinotéfurane
DM	dorsomorphine
DMPP	1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium
d-TC	d-tubocurarine
DUM	"dorsal unpaired median"
EPI	épibatidine
GC	guanylylcyclase

GMPc	guanosine monophosphate cyclique
HEK-293	"human embryonic kidney cell line"
H-89	N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
5-HI	5-hydroxyindole
5-HT₃	5-hydroxytryptamine
IICR	"IP ₃ -induced calcium release"
IMI	imidaclopride
IP₃	inositol-triphosphate
IP₃R	récepteur à l'inositol-triphosphate
KN-62	dérivé de l'isoquinolinesulfonamide, inhibiteur de CaMKII
KN-93	dérivé de l'isoquinolinesulfonamide, inhibiteur de CaMKII
LGCC	"ligand gated calcium channel" ou canal calcique activé par un ligand
LGIC	"ligand gated ion channel" ou canal ionique activé par un ligand
LP	liquide physiologique
Mec	mécamylamine
MLA	méthyllicaconitine
MLCK	"myosin light chain kinase" ou kinase des chaînes légères de myosine
nAChR	récepteur cholinergique de type nicotinique
nAChRD	"desensitizing nAChR"
nAChRN	"non desensitizing nAChR"
NAM	"negative allosteric modulator" ou modulateur allostérique négatif
NIC	nicotine
NIT	nitenpyram
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nPKC	PKC "nouvelle"
PAM	"positive allosteric modulator" ou modulateur allostérique positif
PC12	lignée cellulaire du phéochromocytome
PDE	phosphodiesterase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase dépendante de la GMP

PLC	phospholipase C
RE	réticulum endoplasmique
RyR	"récepteur à la ryanodine"
SAM	"silent allosteric modulator" ou modulateur allostérique silencieux
SERCA	"sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase"
SFX	sulfoxaflor
STO-609	acide 7-oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylique
THI	thiaclopride
TM1-4	segments transmembranaires des sous-unités composant un nAChR
TMX	thiamétoxam
TNF	facteur de nécrose tumorale
VGCC	"voltage-gated calcium channel" ou canal calcique voltage-dépendant
W7	N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalène-sulfonamide

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique de vertébrés

1. Historique

Les premiers travaux ayant permis la découverte des récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) ont été menés sur des modèles vertébrés, au début des années 1900. John Newport Langley a d'abord observé que l'application de nicotine (NIC) sur le muscle gastrocnémien de la grenouille provoquait sa contraction tonique (Langley, 1908). Il a proposé l'existence, au niveau du muscle, de "radicules réceptifs" auxquels se combinait la NIC pour provoquer la contraction musculaire. L'application de curare, dont les effets paralysant ont été découverts en 1848 par Claude Bernard, inhibe également la contraction du muscle en présence de NIC. Quelques années plus tard, en 1921, Otto Loewi (Prix Nobel de physiologie ou médecine avec Henri H. Dale, en 1936) stimule le nerf vague parasympathique du cœur de grenouille et voit que la transmission de l'excitation nerveuse, au niveau des terminaisons nerveuses, se fait par voie chimique : c'est la découverte de l'acétylcholine (ACh). Dale a ensuite démontré que l'ACh était libérée à la jonction neuromusculaire et qu'elle était impliquée dans la contraction volontaire du muscle squelettique (Dale *et al.*, 1936). Dans les années 1970, les travaux de recherche se sont appuyés sur des modèles comme l'anguille *Electrophorus electricus* et la torpille *Torpedo marmorata*. Ces poissons possèdent un organe électrique muni de milliards de terminaisons nerveuses qui produisent de l'ACh. En se basant sur des recherches antérieures de Lee portant sur les venins de serpents (Lee & Tseng, 1966), Changeux a d'abord testé l' α -bungarotoxine (α -BGT), une toxine issue de *Bungarus multicinctus*, sur l'anguille (Changeux *et al.*, 1970). L' α -BGT était capable de bloquer l'action d'un agoniste cholinergique, la carbamylcholine, sur l'électroplaque isolée (*in vivo*), et sur des fragments de membranes (*in vitro*), permettant l'identification du récepteur à l'ACh. Peu de temps après, la protéine a pu être purifiée (Kasai & Changeux, 1971 ; Olsen *et al.*, 1972 ; Meunier *et al.*, 1974) et son poids moléculaire, déterminé (Hucho & Changeux, 1973). Au même moment, une protéine réceptrice cholinergique similaire a été identifiée dans le tissu de l'organe électrique de torpille (Cartaud *et al.*, 1973). La détermination de la séquence de sa sous-unité liant l'ACh a été entreprise à la fin des années 1970 (Devillers-Thiéry *et al.*, 1979). Un clone codant pour la sous-unité α a été identifié, puis utilisé pour comprendre l'organisation

transmembranaire du polypeptide (Giraudat *et al.*, 1982 ; Devillers-Thiéry *et al.*, 1983). Le premier récepteur fonctionnel a été cloné à partir de *Torpedo californica* et exprimé dans des ovocytes de xénope (Mishina *et al.*, 1984). Il était composé de 4 sous-unités nommées α , β , γ et δ en fonction de leurs poids moléculaires.

Les nAChRs appartiennent à la super famille des récepteurs canaux ("ligand-gated ion channel" ou LGIC en anglais) activés par un ligand endogène, l'ACh ou exogène, la NIC. (Collingridge *et al.*, 2009). L'activation du récepteur provoque l'ouverture du canal puis permet le passage de cations de part et d'autres de la membrane cellulaire (Na^+ et Ca^{2+} entrants, K^+ sortant).

2. Structure et fonction des nAChRs de vertébrés

2.1. Sous-unités constituant un nAChR de vertébré

Alors que les nAChRs musculaires, situés au niveau de la jonction neuro-musculaire, jouent un rôle dans la contraction musculaire, les nAChRs neuronaux sont présents dans le système nerveux central et sont impliqués dans la transmission synaptique rapide. La structure des nAChRs de vertébrés a été observée par microscopie électronique à haute résolution chez la torpille (Unwin, 2005 ; Sine & Engel, 2006). Il s'agit d'un assemblage de 5 sous-unités transmembranaires organisées autour d'un pore central. Le pentamère formé par ces sous-unités a une longueur totale de 160 Å et un diamètre de 80 Å. Il est constitué d'un domaine extracellulaire sur lequel se trouve le site de fixation de l'ACh, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire qui peut posséder des boucles de phosphorylation/déphosphorylation (Figure 1A). Le domaine extracellulaire a une hauteur de 70 Å et est composé de 10 feuillets β et d'une hélice α -amino-(N)-terminale contenant un pont disulfure reliant deux cystéines. Le domaine transmembranaire a quant à lui une hauteur d'environ 30 Å, et le domaine intracellulaire est formé de plusieurs hélices α (Sine & Engel, 2006).

Une sous-unité consiste en un assemblage de 4 segments transmembranaires α -hélicoïdaux numérotés de TM1 à TM4 (Figure 1B). Le segment TM1 porte la chaîne N-terminale extracellulaire, hydrophobe. Les segments TM2 sont impliqués dans la délimitation du pore ionique. Une large boucle intracellulaire relie TM3 et TM4 et présente des sites potentiels de phosphorylation (Itier & Bertrand, 2001). Enfin, TM4 porte une chaîne C-terminale extracellulaire.

Deux types de sous-unités existent. Les sous-unités α possèdent deux cystéines adjacentes en position 192-193 sur le domaine N-terminal, alors que les sous-unités non- α ou β ne les possèdent pas (Figure 1B) (Noda *et al.*, 1982 ; Sumikawa *et al.*, 1982). Une exception importante à cette classification concerne les nAChRs musculaires de vertébrés, pour lesquels les sous-unités ont été nommées α , β , γ ou ϵ et δ , en fonction de leur poids moléculaire (Popot & Changeux, 1984). Elles sont disposées dans l'ordre $\alpha 1 \gamma \alpha 1 \beta 1 \delta$ (Karlin, 2002) et le stade de développement de l'animal peut modifier la composition, comme en témoigne le remplacement de la sous-unité γ d'un muscle fœtal de bœuf par la sous-unité ϵ chez l'adulte (Mishina *et al.*, 1986).

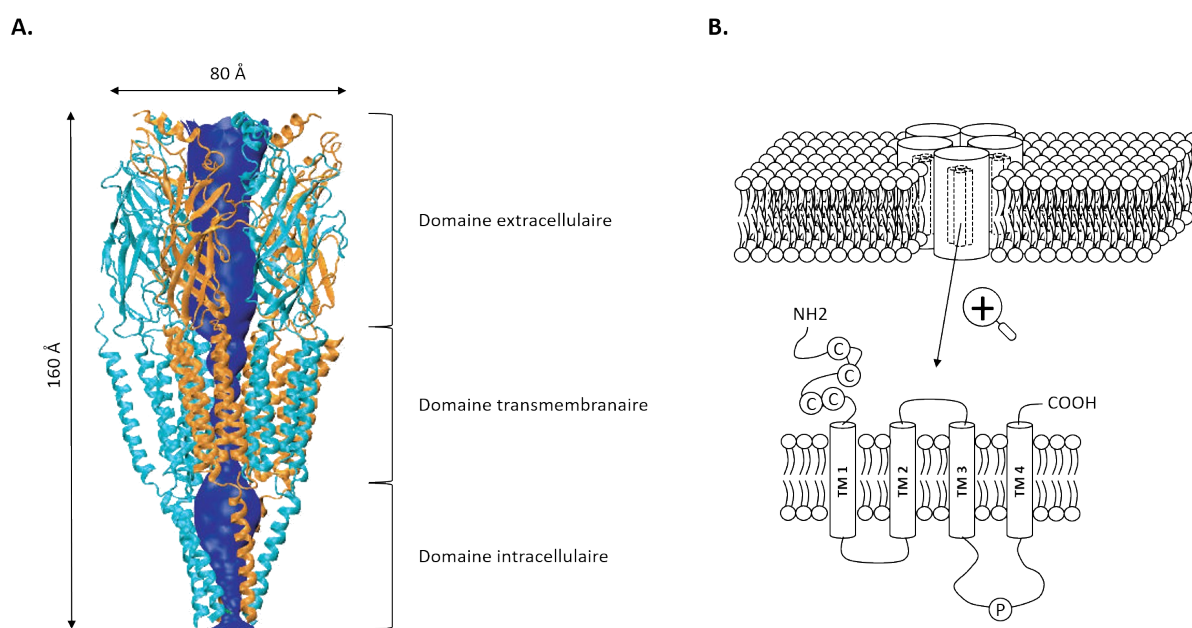


Figure 1 : Structure d'un nAChR musculaire de *Torpedo marmorata*. (A) Organisation des différents domaines du nAChR : domaine extracellulaire portant le site de liaison à l'ACh, domaine transmembranaire et domaine intracellulaire (modifié d'après Sine & Engel, 2006). La sous-unité α est représentée en orange, les autres sous-unités en bleu ciel et le pore ionique en bleu foncé. (B) Schématisation d'un nAChR (haut) et de la composition d'une sous-unité α (bas). "TM", segment transmembranaire ; "C", résidu cystéine ; "P", site de phosphorylation.

Aujourd'hui, 17 sous-unités de nAChRs sont connues chez les vertébrés (Millar & Gotti, 2009) : $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , ϵ et δ . Les récepteurs formés par l'assemblage de ces sous-unités peuvent être homomériques (sous-unités identiques) ou hétéromériques (sous-unités différentes). Cependant, un nombre relativement peu élevé de combinaisons semble donner des récepteurs natifs fonctionnels (Millar, 2003). Ils sont composés des sous-unités $\alpha 2-10$ et $\beta 2-4$ (Role, 1992 ; Sargent, 1993 ; Karlin, 1993). Des études électrophysiologiques menées sur des nAChRs de rats ont

permis de démontrer que les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont capables de s'assembler avec la sous-unité $\beta 2$ pour former des récepteurs fonctionnels $\alpha 2\beta 2$ (Wada *et al.*, 1988 ; Kouvatsos *et al.*, 2016), $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 4\beta 2$ (Boulter *et al.*, 1987). Les sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$ sont capables de former des homopentamères fonctionnels (Cooper *et al.*, 1991 ; Elgoyhen *et al.*, 1994). En revanche, les sous-unités $\alpha 3$ (Vernallis *et al.*, 1993), $\alpha 5$ (Vernallis *et al.*, 1993 ; Ramirez-Latorre *et al.*, 1996) et $\alpha 6$ (Le Novère *et al.*, 1996) forment des hétéropentamères. Le rôle des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 3$ demeure assez flou. Elles semblent avoir un rôle structural car elles doivent être exprimées avec d'autres sous-unités α et β pour former des pentamères fonctionnels, comme $\alpha 5\alpha 4\beta 3$ et $\alpha 3\beta 4\beta 3$ (Ramirez-Latorre *et al.*, 1996 ; Groot-Kormelink *et al.*, 1998). Cette complexité dans la composition en sous-unités des récepteurs se retrouve également avec $\alpha 7$ qui peut former des récepteurs $\alpha 7\beta 2$ (Anand *et al.*, 1993 ; Azam *et al.*, 2003 ; Moretti *et al.*, 2014 ; Thomsen *et al.*, 2015) et $\alpha 9$, qui peut par exemple former des hétéropentamères fonctionnels $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen *et al.*, 2001 ; Filchakova & McIntosh, 2013).

2.2. Pore ionique

Le pore ionique du nAChR (Figure 2) est constitué des hélices α des segments TM2, ainsi que par les parties supérieures des hélices α des segments TM1 (Corringer *et al.*, 2000 ; Unwin, 2005). Il a un diamètre d'environ 25 Å à l'entrée extracellulaire du canal et se rétrécit à environ 6 Å dans le domaine transmembranaire (Unwin & Fujiyoshi, 2012). Les acides aminés des segments TM2 forment des anneaux chargés négativement qui sont impliqués dans la sélectivité ionique du canal (Corringer *et al.*, 2000 ; Itier & Bertrand, 2001). La mutation en arginine de la leucine en position 251 sur la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur musculaire affecte la sélectivité ionique en apportant une charge positive dans le segment TM2, rendant le récepteur sélectif pour les anions et permettant un passage des ions Cl^- (Cetin *et al.*, 2019). Les acides aminés formant des anneaux hydrophobes chargés positivement ont un rôle dans les états de repos (fermeture) et d'activation (ouverture) du canal. La mutation des acides aminés situés dans le domaine TM2 est donc susceptible d'altérer la dynamique d'ouverture et de fermeture du pore ionique. Par exemple, lorsque la leucine et la valine en positions respectives 9 et 13 du domaine TM2 du récepteur $\alpha 9\alpha 10$ de rat sont mutées en thréonine (acide aminé hydrophile), le récepteur recombinant exprimé en ovocyte de xénope a un temps d'ouverture plus long (Plazas *et al.*, 2005).

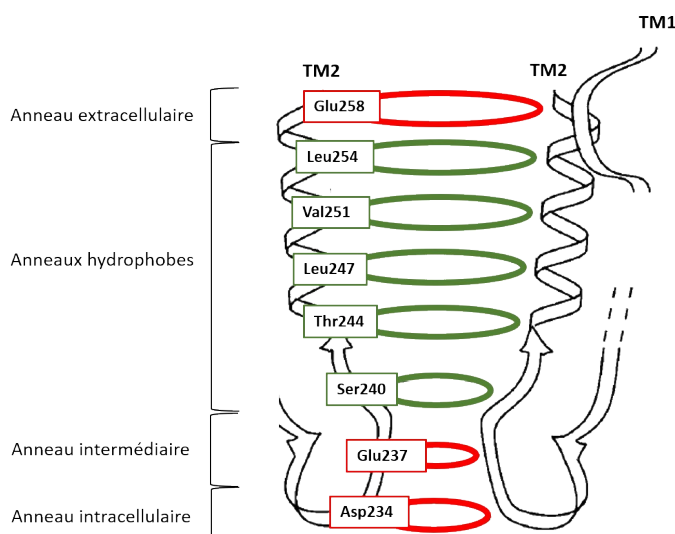


Figure 2 : Anneaux formés par les résidus des segments TM2 d'un pore ionique de nAChR (modifié d'après Corringer *et al.*, 2000). Les anneaux extracellulaire, intermédiaire et intracellulaire (en rouge) sont chargés négativement et sont impliqués dans la sélectivité ionique du canal. Les anneaux hydrophobes (en vert) jouent un rôle dans les états d'ouverture et de fermeture du canal. Les résidus formant les anneaux sont indiqués dans les encadrés sur la chaîne TM2 gauche.

2.3. Site de liaison à l'ACh

Le site de liaison à l'ACh du nAChR (Figure 3) est une "poche" localisée à l'interface entre deux sous-unités α ou entre une sous-unité α et une sous-unité non- α (Karlin, 2002). Un nAChR peut donc héberger jusqu'à 5 sites de liaison. Les boucles A, B et C de la région N-terminale de la sous-unité α contiennent plusieurs résidus formant la composante majeure du site de liaison. Ces résidus sont Tyr⁹³ (boucle A), Trp¹⁴⁹ (boucle B), Tyr¹⁹⁰, Tyr¹⁹⁸ et les deux cystéines en positions 192 et 193 (boucle C) (Arias, 1997). Ils ont été identifiés sur le récepteur musculaire de l'organe électrique de torpille et sont conservés pour l'ensemble des sous-unités α de vertébrés (Karlin, 2002 ; Celie *et al.*, 2004). Seule la tyrosine est remplacée par un aspartate en position 190 dans la sous-unité $\alpha 5$ des récepteurs neuronaux. Des résidus provenant des boucles D, E et F de la sous-unité complémentaire forment la composante complémentaire du site de liaison : l'aspartate et le glutamate (boucle D), la thréonine ou la tyrosine (boucle E) et le tryptophane (boucle F) (Dennis *et al.*, 1988 ; Arias, 1997). Les résidus Trp⁵³, Leu¹¹² et Met¹¹⁴ sont impliqués dans la liaison de l'ACh (Celie *et al.*, 2004).

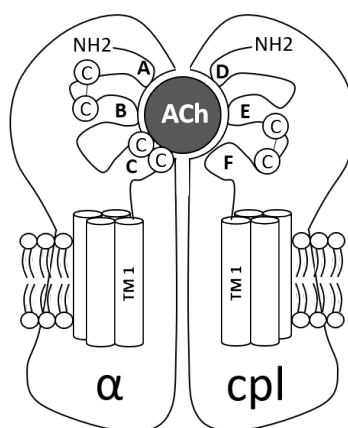


Figure 3 : Schéma du site de liaison à l'ACh (d'après Arias, 1997 et Celie *et al.*, 2004). Les boucles A, B, C de la sous-unité principale (α) et D, E, F de la sous-unité complémentaire (cpl) sont représentées.

La découverte et la cristallisation d'une protéine soluble sécrétée par les cellules gliales de la limnée *Lymnaea stagnalis*, l'AChBP (acetylcholine-binding protein) (Smit *et al.*, 2001, 2003 ; Brejc *et al.*, 2001), a permis d'étudier le site de liaison à l'ACh des nAChRs et les interactions ligand-protéine. L'AChBP a également été retrouvée chez d'autres gastéropodes (Hansen *et al.*, 2004 ; Celie *et al.*, 2005) et un ver marin (Billen *et al.*, 2012). L'AChBP forme un homopentamère de 210 résidus de longueur, homologue du domaine extracellulaire N-terminal des nAChRs, mais elle ne possède ni domaine transmembranaire, ni domaine intracellulaire (Figure 4). La composante principale du site de liaison est caractérisée par des boucles comportant des résidus aromatiques (Brejc *et al.*, 2001 ; Olsen *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2015) : la Tyr⁸⁹ est contenu dans la boucle A, les Trp¹⁴³ et Trp¹⁴⁵ dans la boucle B et les Tyr¹⁸⁵, Tyr¹⁹² et la double-cystéine Cys¹⁸⁷⁻¹⁸⁸ dans la boucle C. La composante secondaire implique les résidus Trp⁵³, Gln⁵⁵ (boucle D), Arg¹⁰⁴, Val¹⁰⁶, Leu¹¹², Met¹¹⁴ (boucle E) et Tyr¹⁶⁴ (boucle F). Les résidus aromatiques Tyr⁸⁹, Tyr¹⁸⁵, Tyr¹⁶⁴ et Trp⁵³ forment la moitié inférieure de la cavité. Les parois de la cavité sont formées par les résidus Tyr¹⁹², Trp¹⁴³, Met¹¹⁴, Gln¹⁵⁵ ainsi que par les cystéines Cys¹⁸⁷⁻¹⁸⁸ et la chaîne principale de Trp¹⁴⁵. Enfin, les résidus Arg¹⁰⁴, Val¹⁰⁶ et Leu¹¹² forment la partie supérieure du site de liaison (Brejc *et al.*, 2001). Récemment, des expériences sur les domaines extracellulaires de sous-unités $\alpha 2$ humaines exprimées dans la levure *Pichia pastoris* ont révélé que ces derniers étaient capables de former des homopentamères liant un agoniste, l'épipatidine (EPI ; Kouvatso *et al.*, 2016). Ces pentamères présentent une forte similitude structurelle avec l'AChBP, et pourraient donc aussi fournir des informations sur les interactions ligand-récepteur.

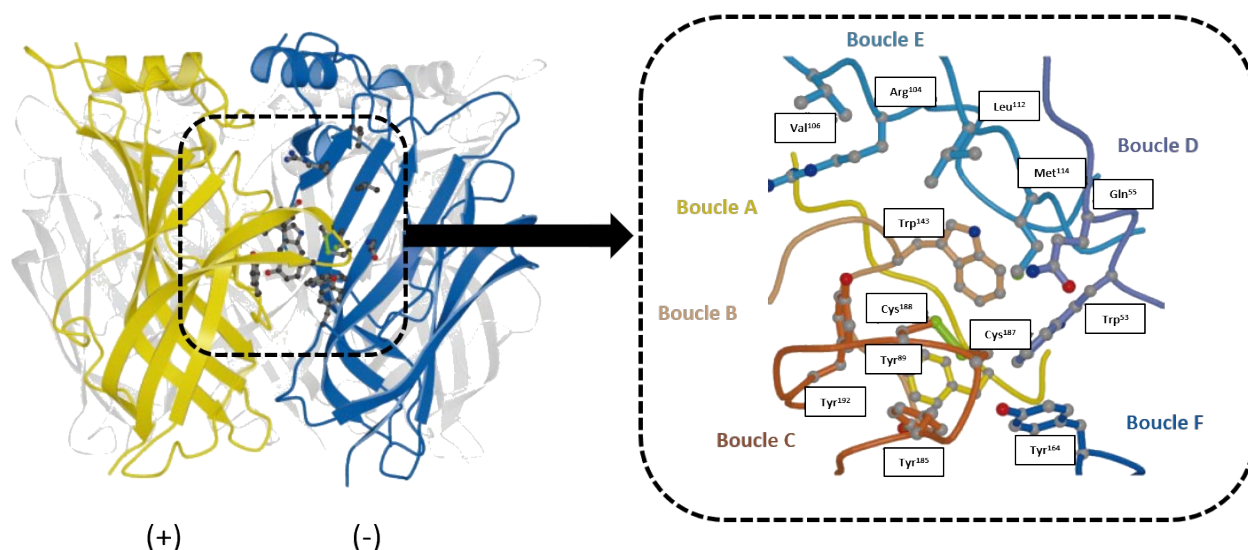


Figure 4 : Modélisation de la structure de l'AChBP de *L. stagnalis* (modifié d'après Brejc *et al.*, 2001). A gauche, les composantes principale (+) et secondaire (-) du site de liaison. A droite, représentation des résidus impliqués dans la formation du site de liaison.

2.4. États d'ouverture du nAChR

Au repos, le nAChR libre de ligand est à l'état "fermé". Le canal a une forme d'entonnoir et présente une partie plus étroite constituée par les résidus Gly²⁴⁰, Glu²⁴¹, Lys²⁴² des boucles α , et les résidus Met²⁴³ et Thr²⁴⁴ du segment TM2. La mutation de ces résidus a révélé que ces ions formaient une sorte de "barrière" obturant le canal (Wilson & Karlin, 1998). La liaison d'un ligand donne lieu à des changements de conformation spatiale du récepteur conduisant à l'ouverture du canal (Figure 5). Plus précisément, lorsqu'un ligand se fixe au site de liaison, la boucle C se déforme pour l'emprisonner (Sine & Engel, 2006). Ceci entraîne la rotation des feuillets β dans le domaine extracellulaire, suivie d'une rotation horaire de 15-16° des hélices contenues dans les segments TM2 (Sansom, 1995 ; Unwin *et al.*, 2002). Les résidus de la barrière ionique s'écartent alors, et le diamètre du canal à ce niveau passe de 3 à 8 Å, permettant le passage des ions (Sine & Engel, 2006). Quand le ligand est appliqué de manière prolongée sur le site de liaison, le récepteur entre dans un état non-conducteur dit "désensibilisé" (Figure 5). Lors de cette phase, la barrière ionique ne se limite plus à la région Gly²⁴⁰-Lys²⁴², mais s'étend de Gly²⁴⁰ à Leu²⁵⁰ (Wilson & Karlin, 2001). Le récepteur retourne ensuite à un état fermé et recouvre sa sensibilité au ligand.

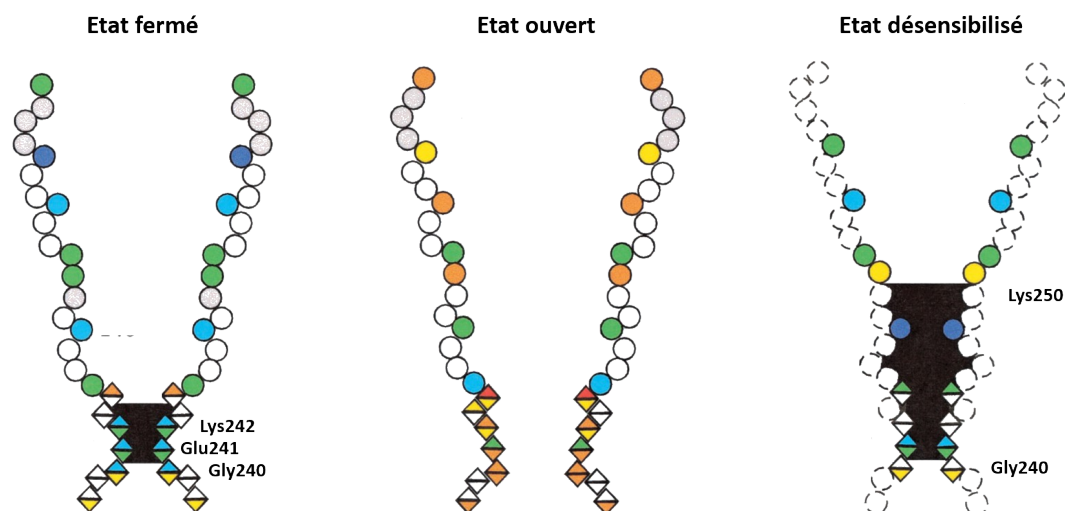


Figure 5 : Changements de conformation d'un nAChR et organisation des résidus du pore ionique aux états fermé, ouvert et désensibilisé (modifié d'après Wilson & Karlin, 2001). Le remplissage noir représente l'étendue de la barrière ionique. Les résidus délimitant la barrière sont indiqués en gras.

3. Composition en sous-unités et classification pharmacologique des nAChRs de vertébrés

L'utilisation de l' α -BGT comme antagoniste a mené à la définition de deux classes pharmacologiques différentes au sein des nAChRs de vertébrés : les récepteurs sensibles et les récepteurs insensibles à l' α -BGT (Le Novère *et al.*, 2002a). Les premiers nAChRs sensibles à l' α -BGT ayant été caractérisés sont homomériques et sont exclusivement constitués soit de sous-unités $\alpha 7$ (Couturier *et al.*, 1990 ; Chen & Patrick, 1997 ; Frazier *et al.*, 1998 ; Drisdell & Green, 2000) soit de sous-unités $\alpha 8$ (Gerzanich *et al.*, 1994 ; Gotti *et al.*, 1994) soit $\alpha 9$ (Elgoyhen *et al.*, 1994). Les résidus en position 184-191 de la sous-unité sont impliqués dans l'interaction du récepteur avec l' α -BGT (Levandoski *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études mettent en évidence des nAChRs hétéromériques sensibles à l' α -BGT, comme le récepteur musculaire embryonnaire $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$ (Mishina *et al.*, 1984), dont la sous-unité α permet la liaison de l' α -BGT (McLane *et al.*, 1990 ; Caffery *et al.*, 2009). Chez le poulet, les sous-unités $\alpha 7$ et $\alpha 8$ sont capables de s'assembler en hétéropentamères présentant une sensibilité à l' α -BGT (Keyser *et al.*, 1993). Les nAChRs insensibles à l' α -BGT sont hétéromériques et formés par la combinaison des sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 6$ et $\beta 2$ - $\beta 4$ (Deneris *et al.*, 1991 ; Le Novère *et al.*, 2002a ; Gotti *et al.*, 2009). Par exemple, les récepteurs $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 4\beta 2$ exprimés en ovocyte de xénope ne sont pas bloqués par l' α -BGT (Wada *et al.*, 1988 ; Boulter *et al.*, 1987).

Outre la distinction entre nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT, la composition en sous-unités peut aussi avoir un impact sur la pharmacologie des récepteurs vis-à-vis de différents agonistes et antagonistes. Les récepteurs humains $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ et $\alpha 7$ ont été exprimés en ovocyte de xénope et différents agonistes et antagonistes ont été testés (Chavez-Noriega *et al.*, 1997). Comparée à la NIC et à l'ACh, les effets agonistes de la cytisine sont moins efficaces sur les récepteurs contenant des sous-unités $\beta 2$, et le récepteur $\alpha 3\beta 2$ semble être plus sensible au 1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium (DMPP) qu'à la NIC. Les récepteurs $\alpha 2\beta 2$ et $\alpha 4\beta 2$ sont inhibés de 50% par la mécamylamine (Mec) alors que $\alpha 2\beta 4$ et $\alpha 4\beta 4$ le sont de 80%. Enfin, les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\beta 4$, à l'inverse de $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 7$, sont davantage inhibés par la dihydro- β -érythroïdine (Dh β E) que par la d-tubocurarine (d-TC). La mutation Val273Thr de la sous-unité $\beta 3$ rend le récepteur $\alpha 3\beta 4\beta 3$ plus sensible à l'ACh (Groot-Kormelink *et al.*, 1998). La stœchiométrie (proportion de sous-unités identiques composant le pentamère), peut également influencer les propriétés pharmacologiques des nAChRs hétéromériques. C'est le cas de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ exprimés dans des cellules HEK-293 ("human embryonic kidney") : les récepteurs $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ sont plus sensibles à l'ACh que les récepteurs $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ (Nelson *et al.*, 2003). Des récepteurs humains $(\alpha 2)_3(\beta 2)_2$ exprimés en ovocytes de xénope et cette stœchiométrie oblige au moins deux sous-unités $\alpha 2$ à se suivre sur le pentamère, or la mutation du résidu Trp84 de la boucle D de la sous-unité $\alpha 2$ elle-même réduit les courants induits par l'ACh, démontrant l'existence d'un site de liaison formé par deux sous-unités $\alpha 2$ (Kouvatsos *et al.*, 2016). De plus, la mutation du résidu Tyr¹⁹⁹ (boucle F) de la sous-unité $\alpha 2$ complémentaire en phénylalanine affecte également les courants induits par l'ACh (Kouvatsos *et al.*, 2016). Ainsi, l'ordre d'enchaînement des sous-unités sur un pentamère influe également sur la pharmacologie des nAChRs.

4. Modulation allostérique des nAChRs de vertébrés

Le concept de modulation allostérique est né des recherches de Jacques Monod, Jeffries Wyman et Jean-Pierre Changeux, qui ont établi un modèle enzymatique dans les années 1960 (Monod *et al.*, 1965). Dans ce modèle, une molécule qui se fixe à un site d'une protéine, est capable de modifier la fixation et l'action d'une molécule se fixant à un autre site de la même protéine. Les modulateurs allostériques des nAChRs sont donc des molécules capables de modifier l'action de l'ACh ou d'un agoniste en interagissant avec un site distinct du site de liaison

orthostérique, modifiant de cette manière la pharmacologie du récepteur. La céruléotoxine, par exemple, illustre le propos : issue du venin de serpent *Bungarus caeruleus*, elle inhibe la dépolarisation de l'électroplaque de torpille sans pour autant se fixer au site de liaison de la NIC (Bon & Changeux, 1975). Selon leur site de liaison et leurs effets sur le récepteur, les modulateurs allostériques des nAChRs peuvent être divisés en 3 classes (Chatzidaki & Millar, 2015) présentées ci-dessous.

4.1. Modulateurs allostériques positifs et agonistes allostériques

Les modulateurs allostériques positifs (PAM : "positive allosteric modulators") sont connus pour augmenter l'amplitude des courants induits par les agonistes orthostériques. L'efficacité de l'agoniste est augmentée grâce à la réduction de la barrière énergétique entre les états ouvert et fermé du récepteur, ou grâce à son augmentation entre les états ouvert et désensibilisé. Les PAM sont actuellement divisés en deux types nommés I et II. Le type II se distingue du type I car en plus d'augmenter l'amplitude des courants, il a un effet sur la désensibilisation du récepteur (Chatzidaki *et al.*, 2015). Plusieurs molécules peuvent agir comme des PAM chez les vertébrés, notamment au niveau des récepteurs $\alpha 7$. C'est par exemple le cas de l'ivermectine, un anthelminthique qui n'affecte pas la cinétique de désensibilisation du nAChR et classé comme PAM de type I (Krause *et al.*, 1998; Sattelle *et al.*, 2009). La génistéine, le 5-hydroxyindole (5-HI) et le NS-1738 ont également été classés PAM de type I (Grønlien *et al.*, 2007; Sattelle *et al.*, 2009). Le PNU-120596 (Hurst *et al.*, 2005 ; Grønlien *et al.*, 2007), le TQS (Grønlien *et al.*, 2007) le A-867744 (Faghih *et al.*, 2009 ; Malysz *et al.*, 2009) et le JNJ-1930942 (Dinklo *et al.*, 2011) ont quant à eux été décrits comme appartenant au type II car ils induisent une forte désensibilisation du récepteur.

Si les PAM ont été séparés en types I et II selon leurs effets sur la désensibilisation des nAChRs, il semble qu'au moins pour les récepteurs $\alpha 7$ d'humain, les deux types soient susceptibles d'affecter la dynamique structurale. Récemment, des travaux ont démontré que des représentants du type I (NS-1738) comme du type II (PNU-120596) provoquent l'augmentation du temps d'ouverture et des ouvertures successives du récepteur $\alpha 7$ humain (Andersen *et al.*, 2016). Des PAM de récepteurs de vertébrés contenant d'autres sous-unités que l' $\alpha 7$ ont aussi été étudiés, tels que la galantamine pour la sous-unité $\alpha 4$ (Inden *et al.*, 2016), l'éthanol pour $\alpha 6$ (Gao *et al.*, 2019) ou encore le levamisole et le morantel pour des nAChRs humains $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 3\beta 4$ exprimés en

ovocyte de xénope (Levandoski *et al.*, 2003). A faible concentration, le morantel est aussi un PAM des récepteurs $\alpha 3\beta 2$ de rat (Wu *et al.*, 2008 ; Chrisman *et al.*, 2014). La protéine endogène Pr-lynx1 de la luciole *Pyrocoelia rufa* se fixe aux nAChRs de manière non-compétitive et augmente l'amplitude des courants induits par la NIC (Choo *et al.*, 2008). Le gène codant pour lynx1 avait été identifié dans le cerveau de la souris et possédait le motif caractéristique de la famille de gènes Ly-6/neurotoxines à laquelle appartient l' α -BGT (Miwa *et al.*, 1999). Ainsi, l'application *in vitro* de lynx1 sur des nAChR $\alpha 4\beta 2$ exprimés en ovocyte de xénope augmente les courants induits par l'ACh. Mais son identification *in vivo* comme PAM est venue plus tard, quand les récepteurs exprimés par des mutants nuls de souris pour *lynx1* ont exprimé une sensibilité et une dynamique de désensibilisation réduites en présence de NIC (Miwa *et al.*, 2006).

D'autres molécules telles que le 4BP-TQS sont des agonistes allostériques et se fixent à un site transmembranaire pour activer les récepteurs $\alpha 7$ sans requérir la fixation d'un ligand orthostérique (Gill *et al.*, 2011). A forte concentration, la génistéine et le 5-HI peuvent se comporter comme des agonistes allostériques de récepteurs chimériques formés d'une partie N-terminale $\alpha 7$ et d'un domaine transmembranaire et intracellulaire de récepteur sérotoninergique 5HT₃ (Grønlén *et al.*, 2010).

4.2. Modulateurs allostériques négatifs

Les modulateurs allostériques négatifs (NAM : "negative allosteric modulators") sont des antagonistes non-compétitifs qui réduisent le temps d'ouverture des nAChR sans modifier la liaison de l'agoniste orthostérique (Arias *et al.*, 1998a, 1998b). Comme les PAM, ils peuvent être divisés en NAM qui bloquent uniquement le passage des ions en se fixant au canal, et en NAM qui affectent également la vitesse de désensibilisation et le retour au repos du récepteur (Chatzidaki & Millar, 2015). Parmi les premiers NAM identifiés chez les vertébrés, des données ont montré que la progestérone se fixe à un site extracellulaire spécifique des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ exprimés en ovocyte de xénope pour inhiber les courants induits par l'ACh (Valera *et al.*, 1992). Les courants induits par la NIC sont aussi inhibés par l'UCI-30002 sur des récepteurs $\alpha 7$ humain, $\alpha 4\beta 2$ humain et $\alpha 3\beta 4$ de rat exprimés en ovocytes de xénope (Yoshimura *et al.*, 2007). Le DB04763 (inhibiteur d'anhydrase carbonique), le DB08122 (inhibiteur de kinase cycline-dépendante) et la péfloxacin (antibiotique) sont également des NAM qui agissent sur les récepteurs $\alpha 7$ humains, par le biais d'un site

allostérique transmembranaire (Smelt *et al.*, 2018).

4.3. Modulateurs allostériques silencieux

Les ligands allostériques n'amplifiant et n'inhibant pas les effets des agonistes orthostériques sont qualifiés de modulateurs allostériques silencieux (SAM : silent allosteric modulators) dès lors qu'ils influencent les effets des PAM, des agonistes allostériques ou des NAM (Schann *et al.*, 2010 ; Noblin *et al.*, 2012 ; Burford *et al.*, 2013). Les SAM sont donc capables de se fixer à un site allostérique et de bloquer la fixation d'un PAM, d'un agoniste allostérique ou d'un NAM. Par exemple, le 2,3,5,6MP-TQS et le 2,4,6MP-TQS n'ont aucun effet sur les courants induits par l'ACh à travers le récepteur $\alpha 7$ humain, mais bloquent les courants induits par un agoniste allostérique, le 2,4MP-TQS : ils sont donc qualifiés de SAM (Gill-Thind *et al.*, 2015). Toutefois, peu d'études portent sur les SAM de nAChRs.

5. Modulation des nAChRs de vertébrés par le calcium et les voies intracellulaires calcium-dépendantes

5.1. Régulation des niveaux de calcium intra-neuronaux

5.1.1. Rôle du calcium au niveau synaptique

Le Ca^{2+} a un rôle majeur dans la transmission synaptique car il est nécessaire à la libération du neurotransmetteur (Kostyuk, 2007). Les premières expériences ayant permis de le démontrer ont été menées sur la jonction neuromusculaire de grenouille (Katz & Miledi, 1965 ; 1967) : l'application de Ca^{2+} provoque une augmentation des potentiels de plaque motrice (dépolarisations provoquées par la fixation du neurotransmetteur à la membrane post-synaptique) reflétant la libération accrue d'ACh par la cellule pré-synaptique. Des observations similaires ont été faites sur l'axone géant de calmar (Augustine *et al.*, 1985) ainsi qu'au niveau des synapses cérébrales (Sabatini & Regehr, 1996) et des calices de Held du rat (Meinrenken *et al.*, 2003). Aujourd'hui, le processus par lequel le Ca^{2+} contrôle la libération des neurotransmetteurs est bien décrit (Sudhof, 2012). Dans les grandes lignes, une dépolarisation au niveau de la terminaison pré-synaptique provoque l'ouverture de canaux transmembranaires, les canaux calciques voltage-dépendants (VGCC : "voltage gated calcium channels") qui laissent entrer des ions Ca^{2+} . L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$ permet à son tour la migration des vésicules contenant le neurotransmetteur vers la fente synaptique, où elles le libèrent afin qu'il puisse activer les

récepteurs post-synaptiques.

Notons que des canaux calciques activés par des ligands (LGCC : "ligand gated calcium channels") sont situés sur le réticulum endoplasmique (RE), qui joue à la fois un rôle de stockeur et de fournisseur d'ions Ca^{2+} au cytoplasme (Berridge, 1998 ; Verkhratsky, 2002). En effet, les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP_3R) et à la ryanodine (RyR) laissent passer des ions Ca^{2+} depuis la lumière du RE jusque dans le cytoplasme lors de leur activation. Les IP_3R , comme leur nom l'indique, sont activés par l'inositol triphosphate (IP_3), mécanisme appelé "IP₃-induced calcium release" ou IICR (Suematsu *et al.*, 1984 ; Jean & Klee, 1986 ; Finch *et al.*, 1991 ; Marshall & Taylor, 1993). En plus de l' IP_3 , le calcium lui-même peut activer les IP_3R (Berridge, 1998 ; Taylor & Tovey, 2010). Les RyR sont activés par le Ca^{2+} , mécanisme appelé "calcium-induced calcium release" ou CICR, mais également par la ryanodine (insecticide d'origine végétale d'où ils tirent leur nom) et la caféine (Mironov & Usachev, 1991 ; Friel & Tsien, 1992 ; Verkhratsky & Shmigol, 1996). Enfin, des ATP-ases transmembranaires appelées "sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases" (SERCA) permettent de contrebalancer les mécanismes de CICR et IICR en acheminant les ions Ca^{2+} dans la lumière du RE (Toyoshima *et al.*, 2003).

5.1.2. Flux calcique au travers des nAChRs

L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule peut se faire via l'activation de différents LGIC comme les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA), à l'acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque (AMPA), au kainate ou encore à la 5-hydroxytryptamine (5-HT₃), mais aussi via le pore ionique des nAChRs (Hucho & Weise, 2001 ; Collingridge *et al.*, 2009). Chez les vertébrés, l'application d'ACh ou d'un agoniste est accompagnée d'une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$, reflétant un influx de Ca^{2+} vers le cytoplasme. Parmi les nAChRs de mammifères tels que l'homme et le rat, les récepteurs $\alpha 7$ sont ceux qui sont connus pour avoir une forte perméabilité au calcium (Séguéla *et al.*, 1993 ; Lax *et al.*, 2002 ; Fucile *et al.*, 2003 ; King *et al.*, 2018). Cette propriété est liée aux segments TM2 des sous-unités du récepteur. La mutation Glu237Ala de l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire TM2 altère la perméabilité calcique du récepteur $\alpha 7$ de poulet, alors que les mutations des résidus Leu²⁵⁴ et Leu²⁵⁵ peuvent en plus modifier l'affinité pour l'ACh et la désensibilisation du récepteur (Bertrand *et al.*, 1993). Les récepteurs $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\beta 4$ humains présentent aussi une certaine perméabilité au Ca^{2+} bien que plus basse que celle des

récepteurs $\alpha 7$ (Lax *et al.*, 2002). La présence de la sous-unité $\alpha 5$ semble essentielle pour observer des influx de calcium induits par la NIC dans les neurones du mésencéphale de souris. En effet, chez des souris présentant des sous-unités $\alpha 5$ dont l'aspartate en position 398 a été muté en asparagine, l'influx de calcium provoqué par l'application de NIC est plus faible (Siaccaluga *et al.*, 2015). Une forte perméabilité des récepteurs $\alpha 9$ vis-à-vis du calcium, a aussi été décrite dans les cellules auditives de rat (Katz *et al.*, 2000 ; Weisstaub *et al.*, 2002). Récemment, les travaux de Fucile et ses collaborateurs ont donné naissance à un modèle de perméabilité calcique basé sur les séquences en amino-acides du domaine transmembranaire TM2 et des régions adjacentes sur des sous-unités de nAChRs (Fucile, 2017). Dans ce modèle, le nombre de charges négatives apportées par les résidus qui constituent le domaine transmembranaire TM2 est une condition-clé à la sélectivité et la perméabilité vis-à-vis des ions Ca^{2+} .

5.2. Modulation directe des nAChRs par le calcium

L'existence de sites de liaison au Ca^{2+} est connue depuis les années 1970 pour les nAChRs musculaires présents sur les organes électriques de *T. californica* et *E. electricus*. L'interaction entre le Ca^{2+} ou l'ACh avec les récepteurs des deux espèces purifiés a été testée par spectrophotométrie, et les nAChRs ont présenté une forte capacité de liaison aux ions Ca^{2+} , compétiteurs de l'ACh (Eldefrawi *et al.*, 1975 ; Chang & Neumann, 1976). Chez *Torpedo ocellata*, la fixation de terbium au récepteur émet de la fluorescence. En présence de Ca^{2+} , le terbium peut être déplacé, ce qui a permis la révélation de sites de liaison au Ca^{2+} sur les récepteurs nicotiniques présents sur l'organe électrique (Rübsamen *et al.*, 1978).

La capacité du Ca^{2+} extracellulaire à moduler les courants induits par l'ACh suggère que le calcium est un modulateur allostérique des nAChRs neuronaux, et que ces derniers hébergent donc des sites de liaison au calcium (Vernino *et al.*, 1992 ; Mülle *et al.*, 1992 ; Amador & Dani, 1995). En effet, Galzi *et al.* (1996) ont montré que différentes mutations de la séquence 161-172 du domaine N-terminal du récepteur $\alpha 7$ de poulet affectaient l'augmentation de l'amplitude des courants induits par l'ACh et de l'affinité du récepteur pour le ligand provoquées par le calcium. Les mutations Glu18Gln et Glu44Gln abolissent l'augmentation de l'affinité pour le ligand mais la potentialisation des courants ioniques n'est pas affectée. Plus encore, les mutations de l'Asp¹⁶³ et de la Ser¹⁶⁹ favorisent les effets du Ca^{2+} sur l'amplitude des courants ioniques et l'affinité pour le

ligand, alors que des mutations en Glu¹⁶¹, Ser¹⁶⁵ et Tyr¹⁶⁷ les atténuent, et que la mutation de la Glu¹⁷² les bloque complètement.

Le rôle important du domaine 161-172 a été mis en évidence en utilisant le récepteur à la 5HT₃. L'introduction du domaine 161-172 dans le récepteur 5HT₃, normalement insensible aux variations de Ca²⁺, le rend sensible au Ca²⁺ qui le potentialise alors (Galzi *et al.*, 1996). De même, l'utilisation de terbium a révélé que la mutation Glu172Gln modifie *in vitro*, la liaison aux ions Ca²⁺ (Galzi *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent que le domaine 161-172 est impliqué dans la liaison au Ca²⁺, et le résidu Glu¹⁷² semble important pour cette liaison. En effet, dans les récepteurs $\alpha 7$ de poulet exprimés en ovocytes de xénope, la mutation du résidu Glu¹⁷² en glutamine ou en cystéine élimine les effets de potentialisation du Ca²⁺, et l'utilisation de 2-(triméthylammonium)éthylméthane thiosulfonate, un agent réagissant avec les thiols pour former des ponts disulfures, a également montré que la Glu¹⁷² était accessible aux ions perméants et qu'elle régissait donc la perméabilité calcique en plus des courants induits par l'ACh (Eddins *et al.*, 2002).

Un modèle structural basé sur les résidus présents dans la région N-terminale des sous-unités α a été proposé (Le Novère *et al.*, 2002b). Selon ce modèle, plusieurs sites de liaison au Ca²⁺ sont formés par certains résidus du domaine 161-172 de la sous-unité $\alpha 7$. Le résidu Glu⁴⁴ de la sous-unité $\alpha 7$ est très proche du résidu Glu¹⁷² de la sous-unité adjacente, et rien n'exclut leur implication dans un site de liaison au Ca²⁺ à l'interface des deux sous-unités. En outre, les résidus Asp⁴³ de la sous-unité $\alpha 7$ et Asp⁴¹ de la sous-unité adjacente sont également proches de la Glu¹⁷² et forment une poche pouvant éventuellement accueillir un ion Ca²⁺, bien que dans ce cas-là, les distances entre les résidus sont trop grandes pour la formation d'un site de liaison solide. Étant donné que le résidu Glu⁴³ est absent sur les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$, et que le résidu Glu⁴¹ est absent sur les sous-unités $\beta 1$ ou remplacé par une sérine sur $\beta 2$ et $\alpha 1$, les récepteurs homopentamériques $\alpha 7$ posséderaient donc 5 sites de liaison au Ca²⁺ comprenant 3 résidus, alors que les récepteurs $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ posséderaient 2 sites comprenant deux résidus ainsi qu'une sérine. Ceci pourrait également expliquer les différences de perméabilité calcique entre le récepteur $\alpha 7$ et les autres nAChRs. Plus récemment, un flavonoïde issu des fruits et des légumes, la quercétine, a été utilisée pour montrer qu'elle potentialisait les courants induits par l'ACh en interagissant avec le site de liaison au Ca²⁺ du récepteur $\alpha 7$ humain exprimé en ovocyte de xénope. En effet, la mutation du

résidu Glu¹⁹⁵ en Gln réduisait presque entièrement l'augmentation de ces courants par le calcium (Lee *et al.*, 2010).

En conclusion, les sites de liaison au calcium présents sur les nAChRs de vertébrés jouent un rôle dans la potentialisation des courants cholinergiques, comme des sites allostériques. Toutefois, des études sur la modulation des nAChRs par le calcium suggèrent un effet indirect des variations de $[Ca^{2+}]_{intra}$, via des messagers secondaires.

5.3. Modulation des nAChRs de vertébrés par la voie des protéine-kinases C

5.3.1. Généralités sur les protéines kinases C

Les protéines-kinases C (PKC) sont des messagers intracellulaires principalement activés par le diacylglycérol (DAG) produit lors de l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) par la phospholipase C (PLC), et dans une moindre mesure, par des phospholipases A et D issues de la dégradation de la phosphatidylcholine (Nishizuka, 1992). Etant donnée la multitude de substrats qu'elles sont capables de phosphoryler, les PKC jouent un rôle dans de nombreuses fonctions biologiques, parmi lesquelles la désensibilisation des récepteurs, la modulation de la dynamique structurale membranaire, la régulation de transcription, la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, l'apprentissage et la mémoire (Newton, 1995b). La famille des PKC regroupe des chaînes polypeptidiques divisées en une région régulatrice N-terminale et une région catalytique C-terminale. Les premiers représentants mis en évidence, α , β et γ , possèdent 4 domaines non variables (C1-4) et 5 domaines variables. (Coussens *et al.*, 1986 ; Stabel & Parker, 1991). Les domaines C3 et C4 forment la région catalytique, très conservée chez les différentes isozymes. C3 et C4 assurent la fonction kinase en liant l'ATP ainsi que le substrat à phosphoryler (Newton, 1995a). Dans la région régulatrice, le domaine C1 contient un ou deux motifs riches en cystéines qui forment le site de liaison au DAG et aux phorbolesters, ainsi qu'une séquence d'acides aminés formant un pseudo-substrat (Bell & Burns, 1991). Le pseudo-substrat maintient la PKC inactive en se fixant au domaine catalytique et empêchant la liaison d'éventuelles molécules-cibles. La liaison de DAG et/ou de Ca^{2+} détache le pseudo-substrat et rend à l'enzyme sa fonction kinase (Stabel & Parker, 1991). Le domaine C2 contient le site de liaison au Ca^{2+} (Figure 6), qui a été caractérisé par homologie avec d'autres protéines, les synaptotagmines (Newton, 1995a). Il est composé d'un "cœur" formé par 2 feuillets β de 4 brins numérotés $\beta 1-2-5-8$ d'un côté et $\beta 3-4-6-7$ de l'autre. Le

site de liaison se situe entre les boucles qui connectent $\beta 2$ à $\beta 3$ et $\beta 6$ à $\beta 7$ (Sutton & Sprang, 1998) : des résidus aspartates impliqués dans la fixation du Ca^{2+} y sont présents. Chaque domaine C2 peut fixer 3 ions Ca^{2+} .

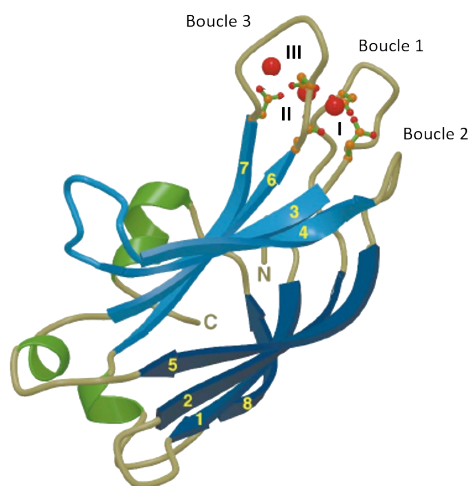


Figure 6 : Structure du site de liaison des ions Ca^{2+} hébergé par le domaine C2 des PKC (d'après Sutton & Sprang, 1998). Les feuillet β sont représentés en bleu clair et en bleu roi. Les brins des feuillet créent des boucles 1, 2 et 3 dont les résidus (boules-bâtonnets) permettent de lier 3 ions Ca^{2+} (sphères rouges).

Les régions régulatrices des PKC ont permis de les classer en 3 sous-familles (Nishizuka, 1992) : les classiques (cPKC), les nouvelles (nPKC) et les atypiques (aPKC). Les cPKC sont en réalité les premières PKC identifiées, α , β (I/II) et γ (Figure 7). Elles sont les seules à posséder un domaine C2. Les aPKC n'ont qu'un seul motif riche en cystéine. Puisque les domaines C1 et C2 répondent respectivement au DAG et au Ca^{2+} , il est possible de déterminer l'appartenance précise d'une isoforme à une sous-famille simplement grâce à ces molécules (Dekker *et al.*, 1995) : les cPKC répondent donc au DAG et au Ca^{2+} , les nPKC ne répondent qu'au DAG et les aPKC ne répondent ni au DAG, ni au Ca^{2+} . Par conséquent, les cPKC seraient les seules isoformes susceptibles de moduler l'activité des nAChRs de façon calcium-dépendante. Les nPKC et les aPKC peuvent néanmoins avoir un rôle modulateur, à condition que des sites spécifiques de phosphorylation soient présents sur les nAChRs. Aujourd'hui, les isoformes connus sont au nombre de 11, les nPKC étant représentées par les isoformes δ , ϵ , η et θ , et les aPKC étant représentées par les isoformes ζ et ι/λ (Kang *et al.*, 2012 ; Figure 7).

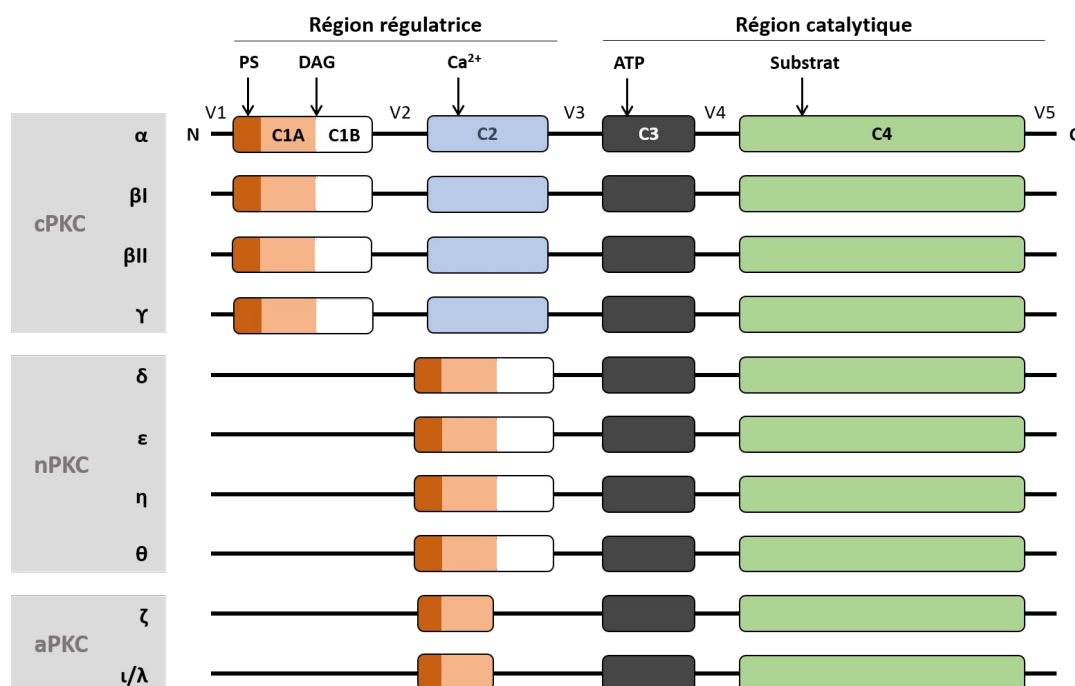


Figure 7 : Structure des différentes isozymes de la famille des PKC (modifié d'après Kang *et al.*, 2012). C1B et C2B sont les deux motifs riches en cystéines du domaine C1. "PS", pseudosubstrat ; "DAG", diacylglycérol ; "V", domaine variable.

5.3.2. Implication des PKC dans la modulation des nAChRs neuronaux de vertébrés

Les recherches portant sur la régulation des nAChRs neuronaux de vertébrés par les PKC ont majoritairement porté sur le récepteur $\alpha 4\beta 2$, sur lequel des sites de phosphorylation ont été identifiés. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKC, le NPC-15437, tout comme l'exposition prolongée à de faibles doses de NIC, désactive le récepteur $\alpha 4\beta 2$ dans les cellules HEK-293, ce qui abolit l'influx de Ca^{2+} en réponse à une dose aiguë de NIC (Eilers *et al.*, 1997). Ces observations ont mené à un mécanisme hypothétique de désactivation du récepteur $\alpha 4\beta 2$ par la NIC et qui requiert la déphosphorylation du nAChR au travers de sites PKC présents sur le récepteur. En effet, quatre sites de phosphorylation pour des PKC ϵ ont été identifiés sur la boucle intracellulaire de la sous-unité $\alpha 4$. La mutation de ces sites ou l'inhibition de la PKC ϵ prolonge la désensibilisation du récepteur $\alpha 4\beta 2$ (Fenster *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2015). La mutation de certains résidus au niveau de sites supposés de phosphorylation PKC dans la boucle intracellulaire TM3-TM4 du récepteur $\alpha 4\beta 2$ peut également moduler la sensibilité de ce dernier aux agonistes. Plus précisément, les mutations Ser516Asp et Thr536Ala réduisent fortement les courants induits par la NIC, tandis que

les courants induits par l'ACh restent inchangés (Biaggi-Labiosa *et al.*, 2015). De même, la mutation du résidu Ser³³⁶ sur des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ exprimés en ovocyte de xénope triple l'amplitude des courants induits par l'ACh, mais est sans effet sur les courants induits par la NIC (López-Hernández *et al.*, 2009).

L'implication des PKC dans la modulation des propriétés fonctionnelles des nAChRs a également été étudiée de manière indirecte via l'activation d'autres neurotransmetteurs comme l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Des études menées sur le striatum de souris exprimant des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ montre en effet que l'activation des récepteurs GABA_B présynaptiques par un agoniste, le baclofène, provoque la diminution de la libération de GABA induite par les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ (McClure-Begley *et al.*, 2014). Cet effet inhibiteur s'estompe suite à une exposition prolongée au baclofène, mais l'utilisation d'antagonistes de PKC, comme l'indolocarbazole Go'7874 et le bisindolylmaleimide Ro-31-8425, le maintient. Des effets inhibiteurs du plomb ont été démontrés sur la libération de GABA induite par les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ de l'hippocampe de rat. L'application d'activateurs spécifiques de PKC mime ces effets et l'inhibition de PKC les bloque (Braga *et al.*, 2004). A l'inverse, l'inhibition de PKC altère la libération de dopamine stimulée par l'activation des nAChRs dans les neurones du cortex préfrontal de rat (Drew & Werling, 2001).

Les PKC semblent également jouer un rôle dans l'expression des nAChRs. Dans des cellules M10 (mélanome humain), l'éthanol réduit dans un premier temps l'augmentation de l'expression protéinique des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ induite par la NIC, puis appliqué de façon chronique, il l'intensifie (Dohrman & Reiter, 2003). La réduction de l'expression des nAChRs par l'éthanol est inhibée par l'utilisation de chébérythrine, un antagoniste des PKC. Ceci suggère que la NIC et l'éthanol interagissent via une voie PKC pour réguler l'expression des récepteurs $\alpha 4\beta 2$, mais pourrait également expliquer la co-dépendance à l'alcool et au tabac (Dohrman & Reiter, 2003).

5.4. Modulation des nAChRs de vertébrés par la calmoduline et les kinases dépendantes

5.4.1. Généralités sur la calmoduline

La calmoduline ou "calcium-modulated protein" en anglais (CaM) a été découverte simultanément par Kikiuchi et Cheung en 1970. Son implication dans la contraction du muscle squelettique est bien décrite (Walsh, 1983 ; Molla *et al.*, 1985) : les ions Ca^{2+} libres se fixent à la CaM pour former un complexe Ca^{2+} -CaM qui active la phosphorylation des chaînes de myosine. La CaM est en fait à l'origine de nombreuses cascades de phosphorylation impliquées dans des fonctions chez les eucaryotes, comme la glycogénolyse, la prolifération cellulaire, l'apprentissage et la mémoire, l'apoptose, la réponse inflammatoire ou encore l'olfaction (Tidow & Nissen, 2013 ; Westerlund & Delemotte, 2018).

La CaM est une molécule de faible poids moléculaire (16,7 kDa) consistant en une région centrale flexible reliant deux domaines globulaires appelés "lobes" aux niveaux N-terminal et C-terminal. Chaque lobe héberge deux motifs EF formés de deux hélices (E et F) et d'une boucle qui contient les acides aminés nécessaires à la liaison d'un ion Ca^{2+} (Ikura & Ames, 2006). Sous la forme libre, les hélices E et F du motif sont assemblées en un bloc dans le lobe N-terminal, et dans une position semi-ouverte dans le lobe C-terminal, ce qui fait penser pour chaque lobe à un index et un pouce réunis (Figure 8A ; Chin & Means, 2000). Douze résidus de la boucle du motif EF, notamment des aspartates, des asparagines et des glutamates, sont impliqués dans la liaison au Ca^{2+} (Lewit-Bentley & Réty, 2000). Lorsque le Ca^{2+} se fixe au motif, les angles inter-hélices changent et le pouce (hélice F) se positionne perpendiculairement à l'index (hélice E). Ces changements de conformation conduisent à une conformation plus ouverte de la CaM, qui expose alors des résidus hydrophobes : le complexe Ca^{2+} -CaM est prêt à activer des molécules-cibles (Figure 8B ; Chin & Means, 2000).

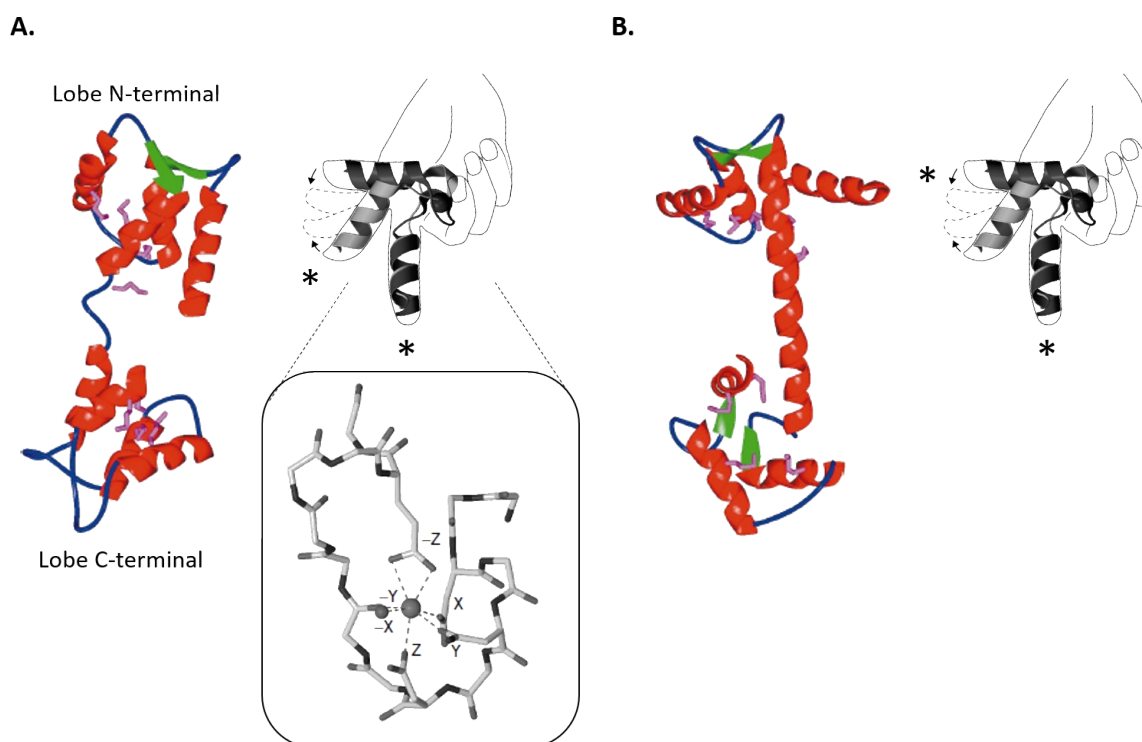


Figure 8 : Dynamique structurale de la CaM (modifié d'après Chin & Means, 2000 et Lewit-Bentley & Réty, 2000). (A) Structure de la CaM au repos. Les hélices E et F sont jointes comme le pouce et l'index d'une main. L'organisation des résidus du site de liaison du Ca²⁺ est présentée dans l'encadré. X, Y acide aspartique ou asparagine ; Z, acide aspartique, asparagine ou sérine ; -Y, groupe carbonyle ; -X, molécule d'eau ; -Z, acide aspartique ou glutamique. (B) Forme liée de la CaM. L'hélice F (pouce) se positionne perpendiculairement à l'hélice E (index). Les résidus hydrophobes (rose) sont alors exposés.

Les kinases dépendantes de la CaM ou CaMK ("Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases") constituent une famille de 5 représentants (CaMKI-V) et de deux kinases dépendantes des CaMK (CaMKK) qui peuvent être séparés en deux types (Swulius & Waxham, 2008) : les CaMK multifonctionnelles (CaMKI, CaMKII, CaMKIV, CaMKV, CaMKKI et CaMKKII) et les CaMK spécialisées (CaMKIII et kinases des chaînes légères de myosine ou MLCK). Si CaMKIII est impliquée dans l'ajout d'acides aminés sur une chaîne peptidique via l'activation du facteur d'élongation EF2 (Nairn & Palfrey, 1987) et MLCK dans la contraction musculaire, les CaMK multifonctionnelles ont une variété de substrats. CaMKII est un dodécamère dont les sous-unités comportent une région N-terminale catalytique, une région auto-régulatrice et une région d'association C-terminale (Hudmon & Schulman, 2002). La région catalytique héberge les sites de fixation de l'ATP sur la partie la plus terminale et du substrat sur la partie adjacente à la région auto-régulatrice. Au repos, l'enzyme est inhibée par la région auto-régulatrice dont certains résidus imitent un substrat

protéique qui interagit avec le domaine catalytique, ce qui empêche la fixation d'un autre substrat. La fixation du complexe Ca^{2+} -CaM à la région régulatrice induit des changements de conformation qui suffisent à désinhiber CaMKII (Hudmon & Schulman, 2002). CaMKI et CaMKIV sont également auto-inhibées au repos (Goldberg *et al.*, 1996), mais présentent des résidus qui peuvent être phosphorylés par une CaMKK après fixation de Ca^{2+} /CaM afin d'assurer une efficacité maximale de la protéine (Lee & Edelman, 1995 ; Matsushita & Nairn, 1998 ; Anderson *et al.*, 1998). CaMKI est impliquée dans des processus tels que la progression du cycle cellulaire, l'inflammation et la motilité des cellules, tandis que CaMKIV joue un rôle dans l'expression des gènes, l'épissage alternatif de l'ARNm, la réponse immunitaire et la survie cellulaire (Racioppi & Means, 2012). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de CaMKK comme le STO-609 (acide 7-oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylique) a par exemple montré le rôle de l'axe CaMKKII/CaMKI dans la viabilité du sperme de poulet en affectant la motilité et la réaction acrosomale des spermatozoïdes (Nguyen *et al.*, 2016). Outre CaMKI et CaMKIV, l'AMPK ("AMP-activated protein kinase), est également une cible de CaMKK. Par exemple, l'inhibition de la voie CaMKK/AMPK empêche la phosphorylation d'une protéine Tau et protège les neurones de l'hippocampe des effets synaptotoxiques produits par certains amyloïdes, ces derniers jouant potentiellement un rôle dans l'apparition des stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Mairet-Coello *et al.*, 2013).

5.4.2. Régulation CaM-dépendante des nAChRs neuronaux de vertébrés

Plusieurs travaux sur les neurones de vertébrés montrent que l'influx de Ca^{2+} provoqué lors de l'activation des nAChRs est associé à des voies de régulation impliquant la CaM et les CaMK. Dans la majorité des cas, les récepteurs $\alpha 7$ sont concernés.

Comme les PKC, les voies de régulation CaM-dépendantes peuvent tout d'abord jouer un rôle dans la libération de neurotransmetteurs induite par l'activation des nAChRs. Dans les neurones de l'hippocampe de rat, l'application de NIC favorise la libération synaptique de glutamate tout en inhibant les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate, et cette inhibition est contrebalancée par l'application d'un inhibiteur de CaM, la fluphénazine, ainsi que par la méthyllycaconitine (MLA), antagoniste spécifique des récepteurs $\alpha 7$ (Fisher & Dani, 2000). Dans les terminaisons nerveuses du cortex préfrontal de rat, l'inhibition de la CaMKII par le KN-62 (dérivé de

l'isoquinolinesulfonamide) empêche la NIC de potentialiser la libération de glutamate induite par la 4-aminopyridine (Wang *et al.*, 2006). L'application de NIC sur les neurones dopaminergiques de souris induit un influx de Ca^{2+} à travers les récepteurs $\alpha 7$ et renforce le pool de vésicules présynaptiques contenant la dopamine (Turner, 2004). Ces effets de la NIC dépendent de la CaM car ils sont bloqués par un antagoniste de la PDE, le calmidazolium (CdZ).

L'apprentissage et la mémoire, les comportements d'addiction à la NIC ainsi que d'autres fonctions peuvent également être régulés par des mécanismes CaM-dépendants à travers les nAChRs de mammifères. Des antagonistes de la CaM et de la CaMKII comme le N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalène-sulfonamide (W7) et le KN-93 montrent que l'influx de Ca^{2+} à travers les récepteurs $\alpha 7$ exprimés dans les cellules PC12 (phéochromocytome), active d'abord le complexe CaM/CaMKII, qui active à son tour une cascade de phosphorylation mettant en jeu différentes kinases telles que la protéine CREB ("cAMP response element-binding protein" ; Gubbins *et al.*, 2010). L'inhibition de la CaM par le W7 bloque la baisse de pression sanguine induite par la NIC dans les noyaux du tractus solitaire du rat (Cheng *et al.*, 2011). L'inhibition d'une phosphatase dépendante de la CaM, la calcineurine, modifie les effets positifs de la NIC sur la mémoire à court terme des souris lors de tests d'évitement (Michalak & Biala, 2017). Des souris mutantes nulles pour CaMKIV ne présentent aucun comportement d'anxiété liée à la privation de NIC, contrairement à des souris dépendantes non-modifiées génétiquement (Jackson *et al.*, 2012).

Enfin, l'expression des nAChRs et les courants induits par des agonistes cholinergiques peuvent être régulés par la CaM et les CaMK. La dépolarisation des neurones sympathiques de rats juvéniles amplifie l'expression du gène de la sous-unité $\alpha 7$, et l'amplification est bloquée par le KN-62, suggérant que l'expression d' $\alpha 7$ est régulée par la voie CaM/CaMK (De Koninck & Cooper, 1995). Dans les neurones dopaminergiques de rat, l'influx de Ca^{2+} à travers les nAChRs active un courant non sélectif pour les cations, sensible à l'acide flufénamique, et inhibé par des antagonistes de la CaM tels que le W7, la trifluopérazine et le CdZ, ainsi que par des antagonistes de CaMKII comme le KN-93 (Yamashita & Isa, 2003).

5.5. Modulation des nAChRs de vertébrés par la voie de l'AMP cyclique

5.5.1. Généralités sur l'AMP cyclique

L'AMP cyclique (AMPc) est un messager secondaire découvert au cours des travaux de Sutherland sur l'épinéphrine (Sutherland, 1970). Lors de la fixation d'un ligand sur un récepteur couplé à une protéine G, la sous-unité $G_{\alpha s}$ de cette dernière est activée et transforme une GTP en GDP qui active à son tour une enzyme membranaire : l'adénylylcyclase ou AC. L'AC produit alors l'AMPc à partir d'ATP (Serezani *et al.*, 2008). L'AMPc agit finalement sur une protéine-kinase AMPc-dépendante (PKA), dont la forme active phosphoryle d'autres protéines. La protéine G activant l'AC est composée de 3 sous-unités G_{α} , G_{β} et G_{γ} . Lorsque la protéine fixe une GTP, elle se dissocie en deux parties : G_{α} est isolée des deux autres qui forment un dimère $G_{\beta\gamma}$ (Hildebrandt, 1997). Selon la sous-famille à laquelle appartient G_{α} , l'interaction avec l'AC varie : elle peut être stimulante ($G_{\alpha s}$), inhibitrice ($G_{\alpha i}$) ou avoir une action indéterminée ($G_{\alpha q}$). Le dimère $G_{\beta\gamma}$ est quant à lui inhibiteur ou stimulateur selon l'isoforme d'AC considérée. Cela constitue un premier critère de différenciation des différents isoformes de la famille des AC (Hanoune & Defer, 2001). Neuf isoformes (AC1-9) codées par différents gènes sont caractérisées dans plusieurs tissus chez les mammifères et réagissent différemment à $G_{\beta\gamma}$. AC1, AC5 et AC6 sont stimulées tandis qu'AC2, AC4 et AC7 sont inhibées par le dimère. Une dixième isoforme, cytoplasmique et dite soluble (sAC), a été purifiée dans les testicules de rat et n'est pas régulée par les protéines G (Buck *et al.*, 1999). AC3 est faiblement stimulée par la PKC, inhibée par CaMKII et stimulée par la CaM, alors qu'AC8 n'est stimulée que par la CaM (Sunahara & Taussig, 2002 ; Tableau 1). AC9 est quant à elle la seule isoforme stimulée par CaMKII, et ce via un dimère $G_{\alpha q}$ (Cumbay & Watts, 2005).

Tableau 1: Isoformes de l'AC chez les vertébrés (modifié d'après Sunahara & Taussig, 2002).

Isoforme	Localisation	Régulation par les sous-unités de protéines G (hors $G\alpha_s$)	Régulation par les protéines-kinases	Effets du calcium	Fonctions potentielles
AC1	Cerveau, médullosurrénale	Inhibée par $G\beta\gamma$ Inhibée par $G\alpha_i$ * (* une $G\alpha_i$)	PKC (faible stimulation) CaMKIV (inhibition)	Stimulée par l'inhibition de Ca^{2+} -CaM	Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique
AC2	Cerveau, muscle squelettique, poumons, cœur	Stimulée par $G\beta\gamma$	PKC (stimulation)		
AC3	Cerveau, épithélium olfactif		PKC (faible stimulation) CaMKII (inhibition)	Stimulée par Ca^{2+} -CaM	Olfaction
AC4	Cerveau, cœur, reins, foie, poumons, utérus, tissu adipeux brun	Stimulée par $G\beta\gamma$	PKC (inhibition)		
AC5	Cerveau, cœur, reins, foie, poumons, utérus, tissu adipeux brun, surrénales	Inhibée par $G\beta\gamma$ Inhibée par $G\alpha_i$	PKA (inhibition) PKC α, ζ (stimulation)		
AC6	Ubiquitaire	Inhibée par $G\beta\gamma$ Inhibée par $G\alpha_i$	PKA (inhibition) PKC (inhibition)	Inhibition	
AC7	Ubiquitaire, forte expression dans le cerveau	Stimulée par $G\beta\gamma$	PKC (stimulation)	Inhibition	Addictions
AC8	Cerveau, poumons (testicules, surrénales, utérus, cœur)			Stimulée par Ca^{2+} -CaM	Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique
AC9	Cerveau, muscle squelettique	Stimulée par une $G\alpha_q$		Stimulée par CaMKII	
sAC	Testicules	Non régulée par les protéines G			Capacitation des spermatozoïdes

La CaM et les kinases associées peuvent donc moduler les niveaux d'AMPc via une action directe sur l'AC. Toutefois, les niveaux d'AMPc peuvent également être modulés par des enzymes elles-mêmes régulées par la CaM : les phosphodiésthérases (PDE). Cette interaction est à l'origine de la découverte de la CaM (Kakiuchi *et al.*, 1970 ; Cheung, 1970). Les PDE sont formées d'un domaine régulateur N-terminal très variable, d'un domaine catalytique conservé et d'un domaine C-terminal (Conti, 2000 ; Jeon *et al.*, 2005). Le domaine régulateur varie en termes de sites de liaison à diverses molécules, notamment la CaM, l'AMPc ou la GMPc, qu'il héberge (Bolger, 1994 ; Conti, 2000). Onze familles de PDE (PDE1-11) ont été identifiées chez les mammifères (Keravis & Lugnier, 2012; Tableau 2). Notons que bien que plusieurs familles soient sélectives pour l'AMPc, seules les PDE1 sont stimulées par la CaM. Ainsi, la stimulation d'une PDE1 par la CaM provoque une dissociation de l'AMPc en AMP et conduit à la réduction du taux d'AMPc dans le cytoplasme.

Tableau 2 : Nomenclature des différentes familles de PDE chez les vertébrés (modifié d'après Keravis & Lugnier, 2012).

Famille	Localisation	Spécificités	Inhibiteurs
PDE1	Cerveau, cœur, poumons, muscle lisse	Stimulée par Ca^{2+} /CaM	Nimodipine, IC86340, IC224, IC295, diocléine
PDE2	Surrénales, cœur, poumons, foie, plaquettes, cellules endothéliales	Stimulée par la GMPc	EHNA, BAY-60-7750, PDP, IC933, oxindole, ND7001
PDE3	Cœur, muscle lisse, poumons, foie, plaquettes, adipocytes, cellules immunitaires	Sélective pour l'AMPc, inhibée par la GMPc	Cilostamide, milrinone, siguazodan, cilostazol
PDE4	Cerveau, cellules de Sertoli, reins, foie, cœur, muscle lisse, poumons, cellules endothéliales, cellules immunitaires	Spécifique de l'AMPc, insensible au GMPc	Rolipram, roflumilast, cilomast, NCS 613
PDE5	Poumons, plaquettes, muscle lisse, cellules endothéliales, cerveau	Spécifique de la GMPc	Zaprinast, DMPPO, sildenafil, tadalafil, vardenafil
PDE6	Photorécepteurs, glande pinéale, poumons	Spécifique de la GMPc, activée par la transducine	Zaprinast, DMPPO, sildenafil, vardenafil
PDE7	Muscle squelettique, cerveau, cœur, reins, pancréas, lymphocytes T	Haute affinité pour l'AMPc, insensible au rolipram	BRL 50481, IC242, ASB16165
PDE8	Testicules, yeux, foie, muscle squelettique, rein, cerveau, ovaires, cœur, thyroïde, lymphocytes T	Sélective pour l'AMPc, insensible à l'IBMX, insensible au rolipram	PF-04957325
PDE9	Reins, foie, poumons, cœur	Spécifique du GMPc, insensible à l'IBMX	BAY-73-6691, PF-04447943
PDE10	Cerveau, testicules, thyroïde	Sélective pour l'AMPc, sensible au GMPc	Papavérine, TP-10, MP-10
PDE11	Muscle squelettique, foie, cœur, prostate, glande pituitaire	Spécifique pour l'AMPc et le GMPc, sensible au GMPc	Aucun inhibiteur sélectif

5.5.2. nAChRs neuronaux de vertébrés et voie AMPc/PKA

Plusieurs études mettent en évidence un lien entre la voie AMPc/PKA et les nAChRs neuronaux de vertébrés. En effet, les variations de la concentration en AMPc, modulées principalement par l'état d'activation de l'AC et aboutissant à la suractivation/désactivation de la PKA, ont des répercussions sur des mécanismes mettant en jeu des nAChRs comme la mémoire et l'analgésie. Dans le cerveau de souris, les effets analgésiques de la NIC sont inhibés par la forskoline, un activateur d'AC, ainsi que par un analogue de l'AMPc, suggérant l'implication d'un récepteur couplé à une protéine G et de la voie AMPc/PKA (Damaj *et al.*, 1994). Le spirocyclopiperzinium est un analgésique agissant via l'activation des récepteurs nicotinique $\alpha 7$ et muscarinique M4 : il agit sur CaMKII et provoque la baisse des taux d'AMPc puis de CREB, ce dernier ayant besoin d'être phosphorylé par une PKA pour être actif (Yang *et al.*, 2018). Les neurones vasopressinergiques contenus dans le noyau supra-optique de rat, quand ils sont activés par la NIC, voient leur concentration calcique augmenter, et ces effets sont bloqués par un

inhibiteur de PKA, le N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide ou H-89 (Shioda *et al.*, 1997). Le S38232 est quant à lui un agoniste spécifique du récepteur $\alpha 4\beta 2$ capable de restaurer la mémoire chez les souris âgées en réduisant la surphosphorylation de la protéine CREB dans le cortex prélimbique (Vandesquille *et al.*, 2013).

La modulation des nAChRs neuronaux par les PKA est en fait rendue possible par la présence de sites spécifiques de phosphorylation. Ces sites ont notamment été mis en évidence au niveau de la sous-unité $\alpha 4$ des récepteurs $\alpha 4\beta 2$. Des expériences de phosphorylation sur des extraits de cerveaux de rat contenant les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ ont montré que la PKA phosphorylait exclusivement des sérines au niveau de la sous-unité $\alpha 4$ et qu'un inhibiteur de PKA, le H8, empêchait toute phosphorylation (Nakayama *et al.*, 1993). Deux sites potentiels de phosphorylation PKA étaient alors retenus sur la sous-unité $\alpha 4$: Lys-Arg-Pro-Ser et Lys-Ser-Ser-Ser. Plus tard, une expérience d'autoradiographie a été réalisée sur des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ exprimés en système hétérologue et incubés avec la région catalytique de PKA (Hsu *et al.*, 1997). Les résultats ont révélé la présence d'une phosphoprotéine ayant le poids moléculaire de la sous-unité $\alpha 4$. La mutation des résidus Ser³⁶⁵, Ser⁴⁷² et Ser⁴⁹¹ élimine les peptides phosphorylés par la PKA lorsque ceux-ci sont mis en présence d'ATP marqué au [³²P]-orthophosphate, identifiant donc 3 sites de phosphorylation au niveau du domaine intracellulaire de la sous-unité $\alpha 4$ (Guo & Wecker, 2002). D'autres nAChRs hébergent des sites de phosphorylation PKA. C'est le cas du récepteur $\alpha 3\beta 4$ modulé par l'activation des récepteurs à l'adénosine A2A, et dont la mutation des résidus Arg³⁸⁵ et Ser³⁸⁸ affecte la fonction (Di Angelantonio *et al.*, 2011). Les domaines intracellulaires des sous-unités $\alpha 7$ de poulet et de rat ont été exprimés dans *E.coli*, purifiés et soumis à des expériences de mutagenèse dirigée : la mutation d'une sérine en position 342 indique une fois de plus un site de phosphorylation PKA pour les deux espèces (Moss *et al.*, 1996).

L'expression des nAChRs peut être modulée par la voie AMPc/PKA. Par exemple, l'application de dbcAMP ("dibutyryl cyclic adenosine") et d'autres substances comme la forskoline augmente la concentration intracellulaire en AMPc dans des cellules humaines TE671/RD (médulloblastome), et provoque une perte de 70% des liaisons de l' α -BGT avec les nAChRs par unité de protéines membranaires lors de tests de liaison par affinité, suggérant que l'AMPc est impliquée dans la régulation de l'expression des nAChRs de la médulla (Bencherif & Lukas, 1991).

Enfin, la voie AMPc/PKA module aussi les courants ioniques induits par l'application d'agonistes nicotiniques. La noradrénaline et un agoniste des récepteurs adrénergiques, l'isoprénaline, réduisent les courants cholinergiques dans les neurones de la glande pinéale du rat, et ces effets sont bloqués par l'application de H-89, suggérant que le système noradrénergique atténue la transmission cholinergique via l'inhibition de la voie AMPc/PKA (Yoon *et al.*, 2014). Dans les neurones cervicaux de rat, la voie AMPc/PKA réduit l'activité des nAChRs (Zhang *et al.*, 2014a). Les courants induits par l'ACh à travers les récepteurs $\alpha 7$ d'interneurones corticaux de souris sont inhibés par la PKA (Komal *et al.*, 2015). Une augmentation de la concentration en AMPc augmente les courants induits par l'ACh dans les neurones des ganglions ciliés de poulet (Margiotta *et al.*, 1987). Le remplacement de Ser⁴⁶⁷ par une alanine ou un aspartate dans la boucle cytoplasmique $\alpha 4$ de récepteurs $\alpha 4\beta 2$ exprimés en ovocytes de xénope modifie aussi les courants induits par l'ACh (Exley *et al.*, 2006).

En résumé, la modulation calcium-dépendante des nAChRs neuronaux de vertébrés met à contribution plusieurs voies de signalisation (AMPc, PKC, CaM/CaMKII et CaMKK ; Figure 9). Cependant, les protéines d'une voie ne régulent pas toujours exclusivement les cibles downstream de cette même voie, et peuvent avoir une action sur d'autres voies. C'est le cas de la CaM capable de réguler l'AC et qui a donc un effet sur la voie de l'AMPc. Ces interactions ajoutent de la complexité dans la compréhension des mécanismes intracellulaires calcium-dépendants qui modulent les nAChRs.

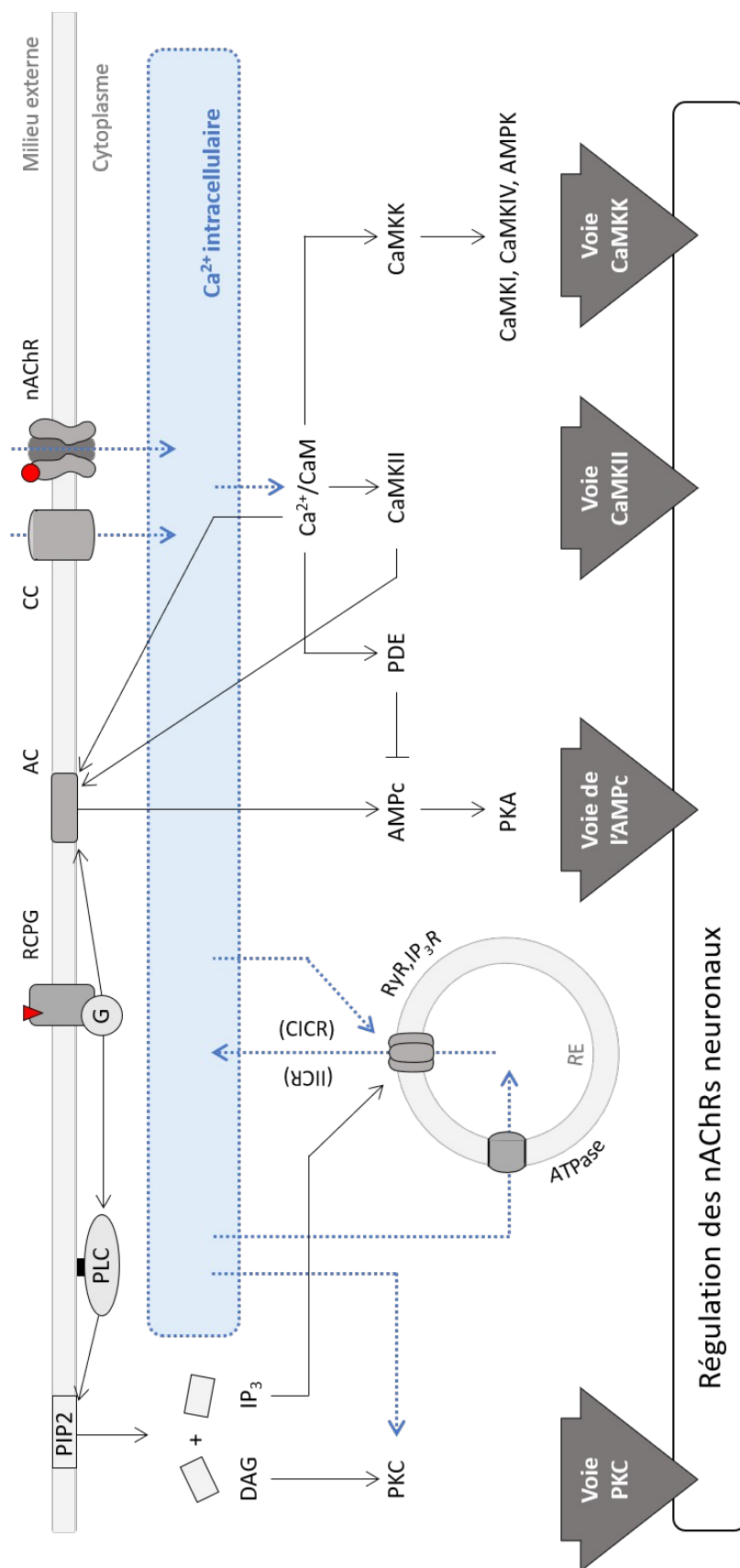


Figure 9: Complexité de la régulation des nAChRs neuronaux par les voies intracellulaires calcium-dépendantes (schéma non-exhaustif). "PIP₂", phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; "PLC", phospholipase C ; "RCPG", récepteur couplé à une protéine G ; "G", protéine G ; "AC", adénylyl cyclase ; "DAG", diacylglycérol ; "IP₃", inositol triphosphate ; "IICR", IP₃-induced calcium release ; "CICR", calcium-induced calcium release ; "PKC", protéine kinase C ; "RyR", récepteur ryanodine ; "IP₃R", récepteur IP₃ ; "PKA", protéine kinase A ; "AMPK", AMP-activated protein kinase ; "PDE", phosphodiesterase ; "CaM", calmoduline ; "CaMK", CaM-kinase ; "CaMKK", CaMK-kinase ; "CaMKI", CaMK-kinase ; "CaMKIV", CaMK-kinase ; "nAChR", récepteur nicotinique.

II. Caractérisation des nAChRs neuronaux d'insectes

1. Diversité des sous-unités de nAChRs d'insectes

Contrairement aux vertébrés, les nAChRs d'insectes sont présents exclusivement au niveau du système nerveux central (Vo *et al.*, 2010). Chez différentes espèces, des gènes codant pour des sous-unités de nAChRs ont été identifiés. Dans les années 1980, l'isolation d'un gène a permis l'identification d'une première sous-unité α nommée α -like subunit (ALS) chez *Drosophila melanogaster* (Bossy *et al.*, 1988). Aujourd'hui, 7 sous-unités α (Dm α 1-7, dont Dm α 1 correspondant à l'ALS) et 3 sous-unités β (Dm β 1-3) sont connues chez la drosophile (Sattelle *et al.*, 2005) et la puce du chat *Ctenocephalides felis* (Bass *et al.*, 2006). Ultérieurement aux travaux sur la drosophile, des sous-unités ont été caractérisées chez d'autres espèces d'insectes (Jones & Sattelle, 2010). Le moustique *Anopheles gambiae* possède 10 sous-unités (Jones *et al.*, 2005), l'abeille *Apis mellifera* en possède 11 (Jones *et al.*, 2006). Les vers de farine *Tribolium castaneum* (Jones & Sattelle, 2007) et à soie *Bombyx mori* (Shao *et al.*, 2007), et plus récemment le papillon *Chilo suppressalis* (Xu *et al.*, 2017) présentent 12 sous-unités. La guêpe parasitoïde *Nasonia vitripennis* possède quant à elle 16 sous-unités (Jones *et al.*, 2010). Très récemment, 5 sous-unités α et 2 sous-unités β ont été clonées chez le diptère *Bradysia odoriphaga* (Shan *et al.*, 2020).

Les analyses phylogénétiques mettent en évidence 7 gènes conservés entre *B. odoriphaga*, *D. melanogaster*, *B. mori*, *A. mellifera* et *T. castaneum* (Shan *et al.*, 2020). Chez la blatte *Periplaneta americana*, 8 sous-unités, 7 Pame α et une Pame β 1, ont été clonées à l'heure actuelle (Taillebois & Thany, 2016). Les sous-unités de nAChRs d'insectes constituent ainsi 7 groupes phylogénétiques conservés dont un seul (α 5-7) présente une forte homologie de séquence et partage un ancêtre commun avec les sous-unités α 7 et α 8 des vertébrés (Figure 10 ; Thany *et al.*, 2007).

Certaines sous-unités des nAChRs d'insectes présentent une faible homologie avec les autres sous-unités et sont dites divergentes (Figure 10). Chez *A. mellifera*, par exemple, 2 sous-unités divergentes ont été identifiées, Amel α 9 et Amel β 2 (Jones *et al.*, 2006). Seul les gènes codant pour des sous-unités Acc β 1 et Acc β 2 ont été clonés et caractérisés chez l'abeille asiatique *Apis cerana cerana*, Acc β 2 présentant une forte homologie avec Amel α 9 (Yu *et al.*, 2011). *N. vitripennis* possède 7 sous-unités divergentes (Nvita α 9-12, Nvit β 2-4) (Jones *et al.*, 2010). Trois sous-unités

divergentes sont identifiées chez *B. mori* (Bm α 9, Bm β 2, Bm β 3) (Shao *et al.*, 2007) et *A. pisum* (Apisum α 9, Apisum α 10, Apisum β 2) (Dale *et al.*, 2010). *Drosophila melanogaster* en possède une seule (Dm β 3) (Sattelle *et al.*, 2005) ainsi que *A. gambiae* (Agama α 9) (Jones *et al.*, 2005).

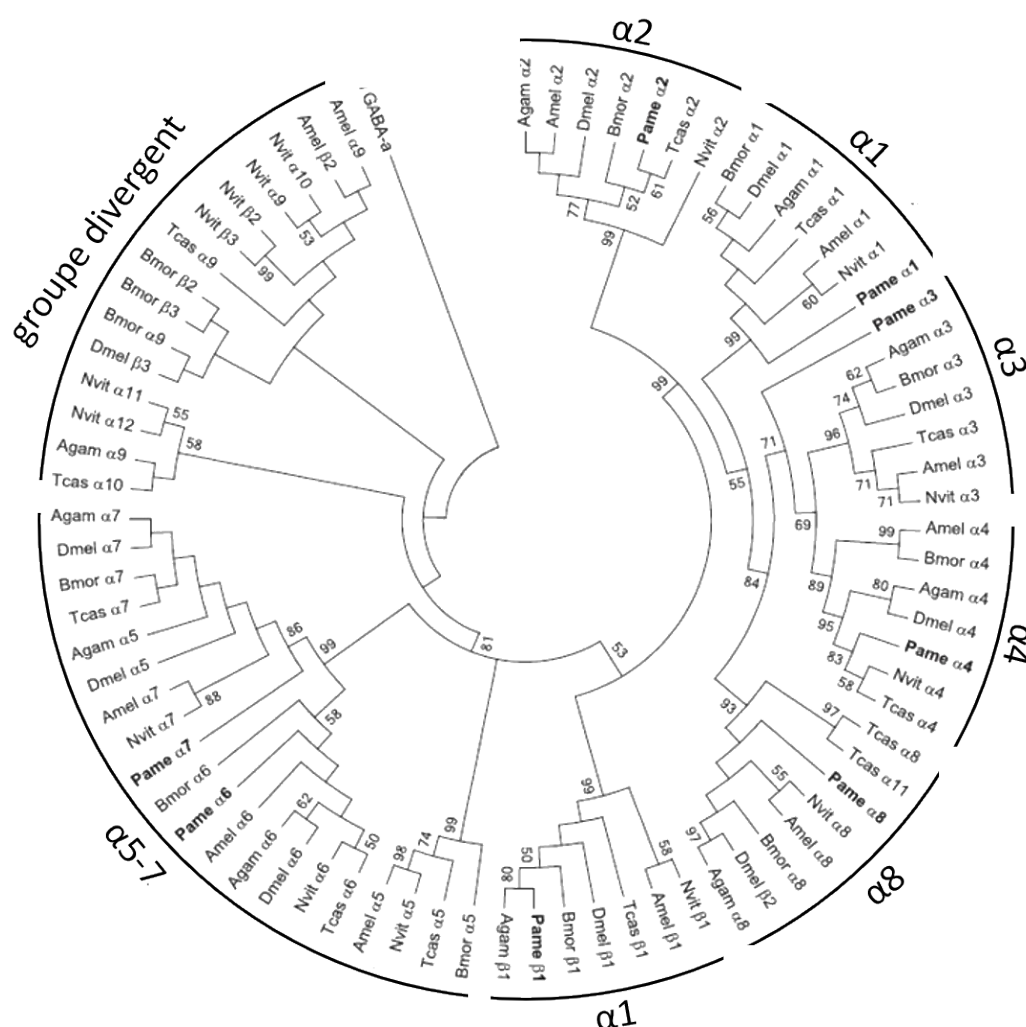


Figure 10 : Arbre phylogénétique des sous-unités composant les nAChRs d'insectes (modifié d'après Taillebois & Thany, 2016). "Agama", *Anopheles gambiae* ; "Amel", *Apis mellifera* ; "Bmor", *Bombyx mori* ; "Dmel", *Drosophila melanogaster* ; "Nvit", *Nasonia vitripennis* ; "Pame", *Periplaneta americana* ; "Tcas", *Tribolium castaneum*.

Le nombre de gènes codant pour les sous-unités des nAChRs d'insectes est plus petit que chez les mammifères, mais des phénomènes d'épissage alternatif peuvent donner un nombre élevé de sous-unités. Par exemple, α 4 a deux exons 4 alternatifs mutuellement exclusifs chez *D. melanogaster* (Lansdell & Millar, 2000a), *A. gambiae* (Jones *et al.*, 2005), *B. mori* (Shao *et al.*, 2007)

A. pisum (Dale *et al.*, 2010) et *N. vitripennis* (Jones *et al.*, 2010). En ce qui concerne la sous-unité $\alpha 6$, l'exon 3 existe en deux formes alternatives chez *A. gambiae* (Jones *et al.*, 2005) et *B. mori* (Jin *et al.*, 2007), alors que l'exon 8 existe en 2 formes chez *A. gambiae* (Jones *et al.*, 2005), *B. mori* (Shao *et al.*, 2007), *A. pisum* (Dale *et al.*, 2010), mais en 3 formes chez *A. mellifera* (Jones *et al.*, 2005), *T. castaneum* (Jin *et al.*, 2007) et *N. vitripennis* (Jones *et al.*, 2010). Chez *B. mori*, la sous-unité $\alpha 8$ présente deux formes alternatives de l'exon 7 similaires à 86%, suggérant un événement de duplication récent (Shao *et al.*, 2007).

2. Composition en sous-unités, pharmacologie et réponse aux insecticides

2.1. Caractérisation des propriétés pharmacologiques des nAChRs d'insectes par des approches électrophysiologiques

Tout comme chez les vertébrés, il a été démontré que la composition en sous-unités influence les propriétés pharmacologiques des nAChRs neuronaux d'insectes. Bien qu'ils puissent être classés en récepteurs sensibles et insensibles à l' α -BGT, les récepteurs insensibles à l' α -BGT peuvent être homomériques ou hétéromériques (Lansdell & Millar, 2000b ; Dupuis *et al.*, 2012). Des enregistrements électrophysiologiques ont permis d'étudier l'activité des nAChRs en réponse à différents agents pharmacologiques. Au niveau des cellules de Kenyon d'abeille, les courants induits par l'ACh sont fortement inhibés en présence d' α -BGT et de façon irréversible (Goldberg *et al.*, 1999). Ultérieurement, Dupuis *et al.* (2011) ont montré que chez l'abeille adulte, la Dh β E et la MLA réduisaient aussi ces courants mais de façon réversible, suggérant des différences pharmacologiques au sein des récepteurs sensibles à l' α -BGT. De même, la dynamique de désensibilisation peut changer, comme le montrent des neurones isolés des ganglions thoraciques de la blatte, où deux sous-types de nAChRs sensibles à l' α -BGT ont été identifiés (Salgado & Saar, 2004). Le premier sous-type se désensibilise lors d'une application prolongée d'agonistes et est nommé "desensitizing nAChR" (nAChRD). Inversement, les nAChRN ("non desensitizing nAChR") ne se désensibilisent pas. Ils sont inhibés par la MLA à raison de 100 pM. Différents antagonistes tels que la Dh β E, la d-TC et la Mec ont également été testés sur nAChRN et nAChRD, mais aucun n'était assez sélectif d'un sous-type de récepteur (Salgado, 2016).

2.2. Caractérisation des propriétés pharmacologiques des nAChRs d'insectes par des tests de liaison par affinité

Des tests de liaison avec ligands radiomarqués ont permis de mettre en évidence les sites de liaison pour des agonistes et antagonistes chez différentes espèces d'insectes (Taillebois *et al.*, 2018). Ainsi, chez les pucerons *M. persicae* (Lind *et al.*, 1999) et *Acyrtosiphon pisum* (Taillebois *et al.*, 2014), 2 sites de liaison pour l' α -BGT, de haute et basse affinité, ont été identifiés alors que *Manduca sexta* n'en présente qu'un (Eastham *et al.*, 1998). L'utilisation d' α -BGT tritiée ($[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-BGT}$) a révélé qu'elle était capable de se lier à des préparations issues de cerveaux de blatte *P. americana*, démontrant l'existence de récepteurs sensibles à l' α -BGT (Orr *et al.*, 1990). Des expériences d'électrophysiologie ont par la suite confirmé la présence d'un site de liaison à l'EPI sur les nAChRs de blatte, dont la liaison pouvait être altérée par l' $[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-BGT}$ (Orr *et al.*, 1997), suggérant la présence de sites de liaison communs pour ces deux molécules. Chez la drosophile, le $[^{125}\text{I}]\text{-azidonicotinoïde}$, une sonde nicotinoïde, a aussi permis d'identifier un site commun de liaison à des agonistes comme la NIC et le carbachol, et à des antagonistes comme l' α -BGT et la d-TC (Tomizawa & Casida, 1997). Tomizawa *et al.* (2005) ont caractérisé un site de liaison commun à l'EPI et à l' α -BGT chez la drosophile. En effet, l'EPI et l' α -BGT s'y lient de façon compétitive. En revanche, sur des récepteurs hybrides constitués de sous-unités Dm α 2 de drosophile ou Mp α 2 de puceron et β 2 de rat, la $[^3\text{H}]\text{-EPI}$ se lie mais pas la $[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-BGT}$, indiquant que les sous-unités β participent également au site de liaison à l' α -BGT et influencent la pharmacologie des récepteurs natifs de drosophile (Tomizawa *et al.*, 2005). Une autre sous-unité, appelée β -like subunit, est capable de former des récepteurs sensibles à l' α -BGT avec les sous-unités Dm α 1 et Dm α 2 (Chamaon *et al.*, 2002).

La caractérisation pharmacologique de récepteurs exprimés en système hétérologue a permis d'identifier certaines sous-unités entrant dans la composition de nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT (Figure 11). Les sous-unités Dm α 5 et Dm α 6 de drosophile exprimées en ovocytes de xénope avec la protéine chaperonne RIC-3 forment des récepteurs homomériques et hétéromériques fonctionnels sensibles à l' α -BGT (Lansdell *et al.*, 2012). Les sous-unités Dm α 2 de *D. melanogaster*, Sg α 1 de *Schistocerca gregaria* et Mp α 1 et Mp α 2 de *M. persicae* sont capables de former des homopentamères fonctionnels. En particulier, les nAChRs constitués de sous-unités Mp α 2 ou de Dm α 2 sont insensibles à l' α -BGT (Sawruk *et al.*, 1990 ; Amar *et al.*, 1995 ; Sgard *et al.*,

1998), suggérant que ces sous-unités apportent une certaine insensibilité à la toxine. En effet, les sous-unités D α 2, C β 2 (*C. felis*) mais également D α 4 coexprimées avec la sous-unité β 2 de rat forment des récepteurs insensibles à l' α -BGT (Bertrand *et al.*, 1994 ; Lansdell & Millar, 2000a ; Dederer *et al.*, 2011). Au contraire, les sous-unités D α 1, D α 3 et C β 1, coexprimées avec la sous-unité β 2 de poulet, constituent des hétéropentamères sensibles à l' α -BGT (Dederer *et al.*, 2011).

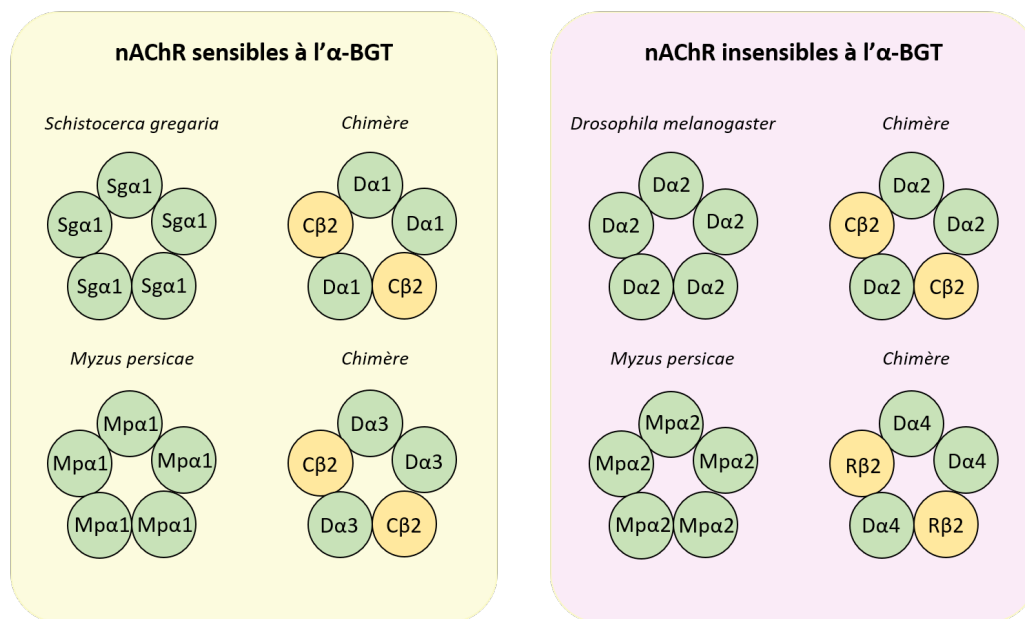


Figure 11 : Diversité des nAChRs d'insectes sensibles et insensibles à l' α -BGT (modifié d'après Dupuis *et al.*, 2012). Les récepteurs chimériques peuvent contenir des sous-unités de poulet (C) ou de rat (R).

2.3. nAChRs d'insectes, cible des insecticides néonicotinoïdes

2.3.1. Structure et mode d'action des néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont des neurotoxiques dérivés de la nithiazine (Figure 12), une molécule utilisée comme insecticide dans les années 1970 mais qui présente l'inconvénient d'être photo-instable (Tomizawa & Casida, 2005). Par la suite, plusieurs composés aromatiques hétérocycliques de structure proche de celle de la nithiazine ont été synthétisés, avec comme particularité, le remplacement du groupe -nitrométhylène par les groupes -nitroguanidine ou -cyanoamidine, qui les rend photostables (Matsuda *et al.*, 2001 ; Tomizawa & Casida, 2005). Les nitroguanidines comprennent la première molécule synthétisée, l'imidaclopride (IMI), ainsi que la clothianidine

(CLT), le thiaméthoxam (TMX) et le dinotéfurane (DIN). Les cyanoamidines comprennent quant à eux l'acétamipride (ACE) et le thiaclopride (THI ; Matsuda *et al.*, 2001 ; Tomizawa & Casida, 2005). Le nitenpyram (NIT) a, lui, gardé le groupe -nitrométhylène (Figure 12).

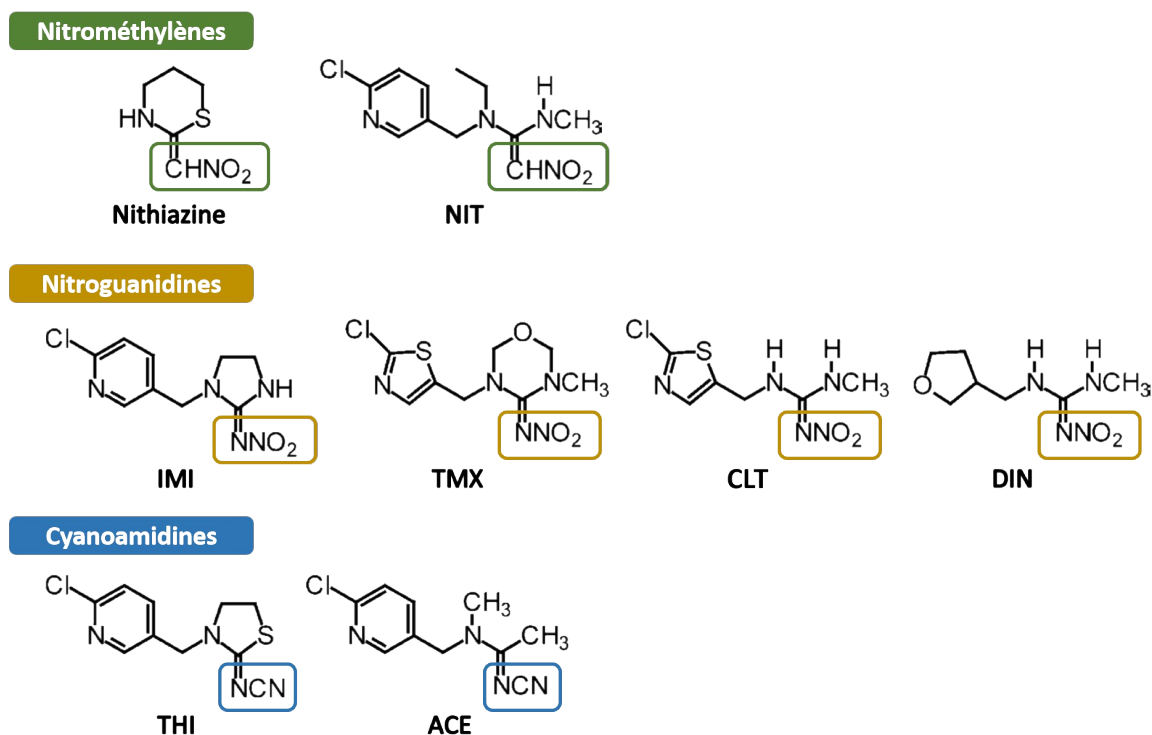


Figure 12 : Structures moléculaires des différents représentants de la famille des néonicotinoïdes (modifié d'après Matsuda *et al.*, 2001 et Tomizawa & Casida, 2005). Les insecticides nitrométhylènes possèdent le groupe -CHNO₂ (vert), les nitroguanidines, le groupe -NNO₂ (ocre), et les cyanoamidines, le groupe -NCN (bleu). "NIT", nitenpyram ; "IMI", imidaclopride ; "TMX", thiaméthoxam ; "CLO", clothianidine ; "DIN", dinotéfurane ; "THI", thiaclopride ; "ACE", acétamipride.

Les néonicotinoïdes sont capables de se fixer au site de liaison des nAChRs d'insectes et ont généralement un mode d'action agoniste, quoique des effets antagonistes aient parfois été remarqués (Salgado & Saar, 2004). Chez l'abeille par exemple, l'analyse des courants cholinergiques de neurones du lobe antennaire a montré que l'IMI était un agoniste des nAChRs (Nauen *et al.*, 2001 ; Déglise *et al.*, 2002). Chez la blatte *P. americana*, les neurones isolés des ganglions thoraciques présentent des nAChRs dont l'amplitude des courants ioniques varie selon les néonicotinoïdes testés (Tan *et al.*, 2007). L'IMI et le THI se sont révélés être de faibles agonistes et les courants qu'ils induisent représentent 20 à 25 % de ceux induits par l'ACh, alors que l'ACE, le

DIN, le NIT et la CLT sont des agonistes induisant des courants de forte amplitude (60 à 100 % de ceux induits par l'ACh) (Tan *et al.*, 2007). Une étude plus récente démontre que la CLT est un agoniste spécifique des nAChRs exprimés par les neurones dits "dorsal unpaired median" (DUM) du dernier ganglion abdominal de la blatte (Thany, 2009). Dans cette étude, l'application de CLT sur les neurones DUM induit un courant ionique non affecté par la présence d'antagonistes muscariniques (pirenzépine, atropine) mais réduit par l' α -BGT et complètement bloqué par la MLA, suggérant que la CLT active des sous-types de nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT. Parmi les sous-types insensibles, nAChR1 et nAChR2, sensibles à la d-TC et à la Mec, respectivement (Courjaret & Lapied, 2001) sont aussi activés par la CLT (Thany, 2009). Enfin, des enregistrements faits au niveau de la synapse cerque/interneurone géant de la blatte indiquent que le TMX est un agoniste des nAChRs (Thany, 2011). La dépolarisation occasionnée par le TMX est réduite par la Mec et la MLA, mais est insensible à la d-TC. De plus, l'atropine réduit partiellement les effets du TMX, suggérant que ce dernier se lie à un récepteur mixte muscarinique/nicotinique (Thany, 2011).

Récemment, de nouveaux insecticides, dérivés des sulfoximines et avec pour représentant principal le sulfoxaflor (SFX), ont été mis sur le marché. Ils sont décrits comme ayant les nAChRs pour cible (Sparks *et al.*, 2013). Des tests de liaison par affinité sur des préparations membranaires de *M. persicae* ont notamment montré que le SFX déplace l'IMI tritié [³H]-IMI (Zhu *et al.*, 2011 ; Watson *et al.*, 2011) et qu'un analogue du SFX, le [³H]-méthyl-SFX, est déplacé par l'IMI, le THI et la CLT avec une constante d'inhibition de l'ordre de quelques picomolaires, suggérant que le SFX interagit avec un site de liaison de forte affinité pour l'IMI (Cutler *et al.*, 2013). De plus, le SFX et certains analogues ont un mode d'action agoniste sur des récepteurs hybrides Dm α 2 / β 2 (rat) exprimés en ovocytes de xénope. En effet, le SFX induit des courants ioniques de plus grande amplitude que ceux induits par l'ACh, et deux analogues, le 6-Cl-pyridil et un analogue cyclisé, induisent également des courants, bien que pas aussi grands que ceux induits par le SFX (Watson *et al.*, 2011).

2.3.2. Composition en sous-unités des nAChRs sensibles/insensibles aux néonicotinoïdes

Des expériences de patch-clamp sur les neurones DUM contenus dans le dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana*, ont mis en évidence deux populations de nAChRs insensibles à l' α -BGT, appelées nAChR1 et nAChR2 (Courjaret & Lapied, 2001 ; Courjaret *et al.*, 2003). Les

enregistrements de courants nicotiniques à différents potentiels dessinent une courbe biphasique, et chacune des deux composantes de la courbe présente des propriétés pharmacologiques distinctes (Figure 13). La première composante, correspondant aux sous-types nAChR1, révèle une sous-population de récepteurs sensibles à la d-TC et activés par l'IMI. La seconde composante révèle quant à elle une sous-population de récepteurs sensibles à la Mec et à l' α -conotoxine-IMI. Les courants résiduels observés en présence de d-TC comme en présence de Mec suggèrent l'existence d'autres sous-types pharmacologiques de nAChRs. Cette hypothèse est confortée d'une part, par des études montrant que l'IMI se lie à des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT chez la blatte (Buckingham *et al.*, 1997), et par l'existence de différents sites de liaison à l'IMI reflétant différents sous-types de récepteurs chez plusieurs espèces d'insectes (pour revue, Taillebois *et al.*, 2018).

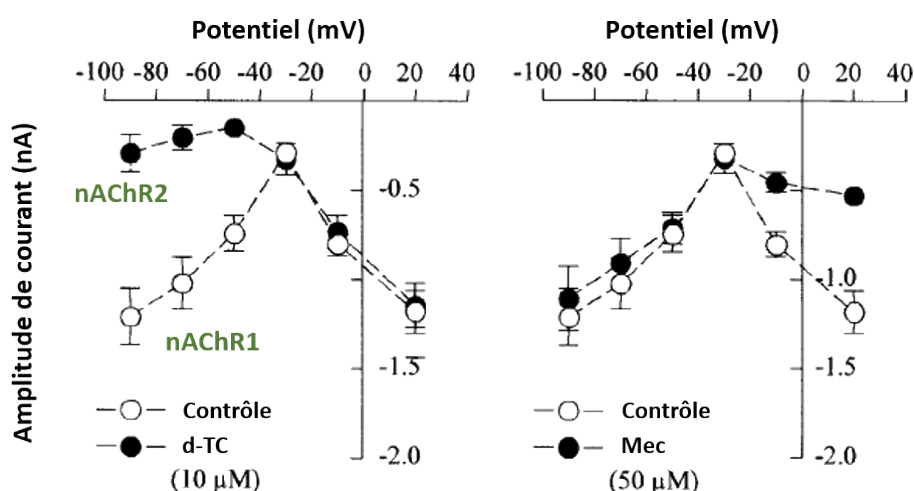


Figure 13 : Courbes courant-potentiel caractérisant les populations de récepteurs insensibles à l' α -BGT nAChR1 et nAChR2 dans les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* (modifié de Courjaret & Lapied, 2001). La première phase de la courbe, correspondant à nAChR1 est inhibée par la d-tubocurarine (d-TC), et la seconde phase correspondant à nAChR2 est inhibée par la mécamylamine (Mec).

Des études récentes ont permis de faire des hypothèses sur la composition en sous-unités des sous-types nAChR1 et nAChR2 (Sun *et al.*, 2017). En effet, l'inhibition de l'expression des sous-unités Pame α 3, Pame α 8 et Pame β 1, par une approche d'ARN interférent, entraîne la réduction des courants induits par l'IMI, suggérant que ces trois sous-unités composent les sous-types nAChR1. Quant aux sous-unités Pame α 1, Pame α 2 et Pame β 1, leur inhibition induit une inhibition de sous-types nAChR2. Des observations similaires ont été faites lors d'expériences d'immunodéplétion sur

les nAChRs natifs purifiés de *Nilaparvata lugens*, et au sein desquels deux sites de liaison à l'IMI ont été identifiés, le premier site impliquant N α 3, N α 8 et N β 1 et présentant une forte affinité pour l'IMI, et le second impliquant les sous-unités N α 1, N α 2 et N β 1, avec une affinité plus faible vis-à-vis de l'IMI (Li *et al.*, 2010). De même, deux sites à forte et faible affinités pour l'IMI ont été identifiés chez la mouche *Musca domestica* (Liu & Casida, 1993) et les hémiptères *M. persicae* et *Nephotettix cincticeps* (Lind *et al.*, 1998) alors que *P. americana*, *D. melanogaster*, *Lucilia sericata*, *M. sexta* et *Heliothis virescens* ne semblent présenter que des sites de faible affinité (Lind *et al.*, 1998). Des chimères formées à partir de la partie N-terminale de la sous-unité C α 1 ou C α 3 de *C. felis* et de la région C-terminale de la sous-unité D α 2, coexprimées avec la sous-unité β 2 de rat, ont une forte affinité pour l'IMI (Bass *et al.*, 2006). Les sous-unités C α 1 et C α 3 contribueraient donc à la formation de récepteurs sensibles à l'IMI. Chez *M. persicae*, ce sont les sous-unités M α 2 et M α 3, car leur co-expression avec la sous-unité β 2 de rat dans des cellules S2 de drosophile donne des nAChRs présentant une affinité élevée pour la [3 H]-EPI et le [3 H]-IMI, tandis que les nAChRs hybrides contenant M α 1 sont insensibles au [3 H]-IMI (Huang *et al.*, 1999).

Des expériences de mutagenèse dirigée ont fait ressortir des résidus importants au sein des sous-unités β 1 et β 2 dans la sélectivité pour l'IMI. Par exemple, les mutations Arg81Gln (boucle D), Asn137Gly (boucle E) et Phe190Trp (boucle F) de la sous-unité M β 1 de *M. persicae* sont impliquées dans la sélectivité pour l'IMI (Song *et al.*, 2009). La sous-unité β 2 d'un récepteur α 4 β 2 de poulet et d'un récepteur hybride D α 2 / β 2 (poulet), exprimés en ovocytes de xénope, a subi les doubles mutations Thr77Lys/Glu79Arg et Thr77Asn/Glu79Arg (boucle D) visant à imiter l'organisation d'une sous-unité d'insecte (Shimomura *et al.*, 2006). Dans les deux cas, ces mutations augmentent fortement l'affinité du récepteur pour l'IMI. Un modèle basé sur l'AChBP propose alors que le groupe nitrogène de l'IMI interagit directement avec les résidus en position 77, alors que les résidus en position 79 permettent ou empêchent l'interaction en fonction de leurs propriétés électrostatiques (Shimomura *et al.*, 2006). Des récepteurs hybrides constitués de la sous-unité N α 1 de *N. lugens* et d'une β 2 rat modifiée contenant les boucles D, E et F de la sous-unité Dm β 1, ont été exprimés en système hétérologue et présentent une sensibilité à l'IMI plus élevée que les récepteurs non modifiés (Yao *et al.*, 2008). Les mutations Ser131Tyr et Asp133Asn (boucle E) et les mutations Thr191Trp et Pro192Lys (boucle F) suggèrent que ces résidus jouent un rôle dans la sélectivité à l'IMI (Yao *et al.*, 2008).

2.3.3. nAChRs d'insectes et résistance aux néonicotinoïdes

L'usage à grande échelle des insecticides néonicotinoïdes a conduit à l'apparition et la sélection de population d'insectes nuisibles résistants à ces molécules. Différents mécanismes de résistance sont impliqués dans la diminution de la sensibilité des insectes aux insecticides ciblant les nAChRs. Le mécanisme le plus répandu est l'augmentation de la détoxification des molécules insecticides par les cytochrome p450, dû en grande majorité à la surexpression de ces enzymes (Bass *et al.*, 2011 ; 2013 ; Puinean *et al.*, 2010). Un autre mécanisme important dans la mise en place de ces résistances est la modification de la cible moléculaire des néonicotinoïdes, les nAChRs neuronaux.

Plusieurs études ont fait état de mutations au niveau de sous-unités de nAChRs en lien avec un phénomène de résistance à un ou plusieurs néonicotinoïdes. Les sous-unités N1 α 1-4 et N1 β 1 de souches de *N. lugens* sensibles et résistantes à l'IMI ont été clonées et soumises à un test de liaison par affinité vis-à-vis de l' [³H]-IMI. Les résultats ont montré que pour N1 α 1 et N1 α 3, la mutation Tyr151Ser diminue la sensibilité à l'IMI (Liu *et al.*, 2005). Par contre, si cette mutation touche les sous-unités N1 α 1 et N1 α 2 coexprimées avec la sous-unité β 2 de rat, l'action agoniste de l'IMI sur les nAChRs hybrides n'est pas modifiée (Liu *et al.*, 2009). Chez la drosophile, une résistance au NIT a été observée suite à la délétion de 53 paires de bases au niveau du résidu 352 de la sous-unité Dm β 2 (Perry *et al.*, 2008). Cette étude montre également que la mutation Leu351Gln et le remplacement du résidu Leu¹¹⁸ par le motif SerGlyThr, confèrent une résistance des drosophiles au NIT (Perry *et al.*, 2008). De même, les drosophiles dont la sous-unité Dm β 2 présente un codon stop en position 352 ont une résistance accrue à l'IMI, à l'ACE et à la CLT (Perry *et al.*, 2012), mettant ainsi en évidence les risques de résistances croisées pour plusieurs molécules insecticides. Chez *M. persicae*, la mutation Arg81Thr de la boucle D de la sous-unité Mp β 1 est associée à une diminution de l'affinité des nAChRs pour l'IMI et une résistance des populations de pucerons pour l'IMI (Bass *et al.*, 2011). Les mutations Ser221Ala et Ser221Gln (boucle C) de la sous-unité Dm α 1 de drosophile donnent des récepteurs insensibles à l'IMI quand celle-ci est coexprimée en ovocyte de xénope avec la β 2 de poulet (Shimada *et al.*, 2020). Shimada *et al.* (2020) proposent alors que des insectes encore plus résistants à l'IMI pourraient émerger si cette mutation Ser221Ala venait à se produire sur des populations présentant aussi des nAChRs dont la sous-unité β 1 a subi la mutation Arg81Thr.

Certaines études montrent que des changements dans le niveau d'expression de certaines sous-unités des nAChRs pourraient également conférer une résistance aux néonicotinoïdes. Ainsi, chez une souche danoise de *M. domestica*, la diminution du niveau d'expression de la sous-unité M α 2 est associée avec une résistance à l'IMI (Markussen & Kristensen, 2010). De même, la sélection d'une souche de *N. lugens* résistante à l'IMI est associée à une baisse du niveau d'expression de la sous-unités N α 8 (Zhang *et al.*, 2015). La modification du niveau d'expression des sous-unités pourrait ainsi impacter la nature et/ou la stoechiométrie des sous-unités formant les nAChRs et conduire à une diminution de la sensibilité des insectes pour les insecticides. Ces modulations du niveau d'expression permettraient ainsi une acclimatation rapide des insectes.

3. Modulation allostérique des nAChRs d'insectes et autres invertébrés

Les effets de certaines molécules en tant que PAM ont été étudiés chez les invertébrés. Les récepteurs sensibles au lévamisole du nématode *Oesophagostomum dentatum* sont par exemple modulés par le menthol (Choudhary *et al.*, 2018). Windley *et al.* (2017) ont montré que l'hexatoxine κ -HXTX-Hv1c de l'araignée *Hadronyche versuta* ralentissait fortement les courants nicotiques et affectait la désensibilisation des nAChRs de blatte, sans affecter l'amplitude des courants ou la relation concentration-réponse. La toxine n'a aucun effet sur les récepteurs α 7, α 3 β 2 et α 3 β 4 humains, ce qui suggère qu'elle est un PAM sélectif des nAChRs d'insectes. Le spinosad, insecticide décrit comme agoniste (Salgado & Saar, 2004 ; Watson *et al.*, 2010), est un agoniste allostérique qui se fixe à un site transmembranaire de la sous-unité α 6 chez plusieurs espèces d'insectes (Perry *et al.*, 2007; Orr *et al.*, 2009; Puinean *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2018).

Quelques NAM ont aussi été caractérisés chez les insectes et d'autres invertébrés malgré le peu d'études. La bicuculline, l'hydrastine et la gabazine inhibent les réponses à l'ACh des neurones contenus dans les ganglions thoraciques du criquet (Jackson *et al.*, 2002). Dans des préparations tissulaires issues de têtes de mouche domestique et contenant des nAChRs, le carvacrol se lie à un site allostérique et empêche la fixation de la NIC (Tong *et al.*, 2013). Curieusement, les courants induits par l'ACh sur l'homologue du récepteur α 7 humain chez *Caenorhabditis elegans* (nématode), ACR-16, sont inhibés par l'ivermectine, le 5-HI, le NS-1738 et la génistéine, alors que ces composés sont des PAM pour les nAChR de vertébrés (Sattelle *et al.*, 2009).

4. Modulation calcium-dépendante des nAChRs d'insectes

Au niveau neuronal, les nAChRs d'insectes sont, comme ceux des vertébrés, une forte voie d'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. L'application d'ACh ou d'agonistes des nAChRs est accompagnée d'une forte augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$ dans les cellules de Kenyon (Bicker, 1996 ; Campusano *et al.*, 2007 ; Dupuis *et al.*, 2012). Un récepteur mixte présentant un profil muscarinique et un profil nicotinique a été identifié dans les neurones DUM de blatte (Lapied *et al.*, 1990), et l'application d'ACh sur ce récepteur induit une hausse de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}}$ (Grolleau *et al.*, 1996). L'application de CLT sur les neurones DUM de blatte provoque également un influx de Ca^{2+} via les nAChRs (Calas-List *et al.*, 2013). La sous-unité $\alpha 1$ participe fortement à l'influx de Ca^{2+} via les nAChR neuronaux de *M. sexta* (Vermehren *et al.*, 2001).

L'influx de calcium qui accompagne l'activation des nAChRs d'insectes peut être modulé par des mécanismes intracellulaires calcium-dépendants. C'est le cas de l'AMPC qui peut moduler les influx de Ca^{2+} induits par la NIC de façon PKA-dépendante, ou PKA-indépendante, dans les corps pédonculés de drosophile (Pavot *et al.*, 2015). De plus, l'altération de la CaM révèle que l'AC régule différemment les influx de Ca^{2+} selon la région du corps pédonculés dans laquelle ils sont enregistrés (Pavot *et al.*, 2015). Des fonctions cognitives mettant en jeu les nAChRs neuronaux peuvent donc dépendre des niveaux intracellulaires de calcium, telles que l'apprentissage et la mémoire à long terme chez l'abeille (Dupuis *et al.*, 2012). D'autres mécanismes impliquant les nAChRs, comme l'addiction, sont modulés par des voies intracellulaires calcium-dépendantes. Des drosophiles wild-type traitées avec un inhibiteur de PDE et une souche de drosophiles exprimant des PDE défectueuses sont par exemple plus réceptives à la NIC que les mouches wild-type lors de tests comportementaux, et inversement, des drosophiles wild-type traitées avec un inhibiteur de PKA et une souche exprimant des PKA défectueuses sont moins réceptives que les drosophiles wild-type (Hou *et al.*, 2004). L'exposition répétée des mouches wild-type à la NIC induit une augmentation des niveaux d'AMPC et de la réponse, et ces effets sont bloqués par l'invalidation de CREB, suggérant que la voie AMPC/PKA/CREB régule ce phénomène (Hou *et al.*, 2004).

Néanmoins, si le Ca^{2+} est requis pour assurer différentes fonctions neurobiologiques, les mécanismes intracellulaires calcium-dépendants qui modulent les nAChRs neuronaux d'insectes ont été peu étudiés. L'étude des séquences des sous-unités de nAChRs a pourtant révélé que

celles-ci hébergeraient plusieurs sites potentiels de phosphorylation PKC, PKA, AMPc ou encore GMPc au niveau boucles intracellulaires TM3-TM4 chez *A. gambiae*, *A. mellifera*, *B. mori* et *N. vitripennis* (Jones *et al.*, 2005 ; 2006 ; 2010 ; Shao *et al.*, 2007).

La blatte *P. americana* a fait l'objet de plusieurs études concernant les mécanismes intracellulaires régulant l'activité et la pharmacologie des nAChRs d'insectes. Dans les motoneurones dépresseurs, par exemple, l'application de 5-HT₃ réduit les courants induits par l'ACh et ses effets sont atténués par la didéoxyadénosine, un inhibiteur d'AC, ce qui suggère un rôle de l'AMPc dans la régulation des nAChRs (Butt & Pitman, 2002). Plus particulièrement, les études menées sur les neurones DUM ont montré que les sous-types de récepteurs, nAChR1 et nAChR2, étaient régulés par différentes voies dépendantes du Ca²⁺, expliquées ci-dessous.

Pour commencer, deux types de PKC régulent l'activité de nAChR1 (Figure 14) (Courjaret *et al.*, 2003). La première PKC, dite PKC1, régule positivement nAChR1 et est sensible aux variations de [Ca²⁺]_{intra}, ce qui fait d'elle une cPKC. A l'inverse, PKC2 régule négativement nAChR1 et n'est pas sensible au Ca²⁺, telle une nPKC. De plus, l'activation de l'AC par la forskoline et l'augmentation directe de la concentration intracellulaire d'AMPc réduisent les courants nicotiques via nAChR1, suggérant que ce récepteur est aussi modulé par la voie AMPc/PKA (Courjaret & Lapied, 2001). L'activité de nAChR2 est modulée par des variations de [Ca²⁺] internes et externes. En effet, en présence d' α -BGT, les courants nicotiques mesurés à travers nAChR2 s'amplifient à mesure que [Ca²⁺]_{extra} augmente, mais sont également affectés par l'application intracellulaire de BAPTA, un chélateur d'ions Ca²⁺ (Thany *et al.*, 2008).

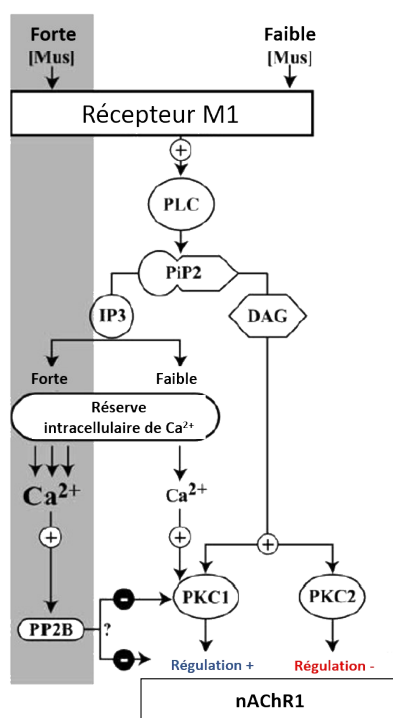


Figure 14 : Voie de régulation PKC de nAChR1 dans les neurones DUM de la blatte *P. americana* (modifié d'après Courjaret *et al.*, 2003). L'activation d'un récepteur couplé à une protéine G (récepteur muscarinique M1) induit la production d'IP3 et de DAG. Le DAG stimule les deux PKC1 et PKC2. PKC1 régule positivement nAChR1 et PKC2, négativement. Seule PKC1 est régulée par le calcium intracellulaire, notamment issu du relargage par les compartiments intracellulaires. "Mus", muscarine ; "PLC", phospholipase C ; "PiP2", phosphoinositol biphosphate ; "IP3", inositol triphosphate ; "DAG", diacylglycérol ; "PP2B", protéine phosphatase 2B ; "PKC", protéine kinase C.

Les effets de la CLT sur les neurones DUM ont aussi été étudiés et ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie de l'AMPC dans la modulation des nAChRs (Calas-List *et al.*, 2013). Les enregistrements électrophysiologiques montrent que l'addition d'AMPC dans la solution intrapipette provoque une augmentation des courants induits par une forte concentration de CLT (1 mM), et cet effet est indépendant de la concentration en AMPC. De plus, l' α -BGT n'a pas d'effet sur cette augmentation, et l'application de d-TC ou de Mec bloque entièrement les courants induits par la CLT, suggérant que les effets opèrent principalement via les nAChRs insensibles à l' α -BGT dont nAChR1 et nAChR2. Les données d'imagerie montrent que l'application de 1 mM de CLT est accompagnée d'une hausse de la $[Ca^{2+}]_{\text{intra}}$. En revanche, à faible concentration de CLT (10 μ M), aucune augmentation de $[Ca^{2+}]_{\text{intra}}$ n'est observée, et les effets de l'AMPC sont dose-dépendants. A faible concentration d'AMPC, les courants induits par la CLT sont bloqués par chaque antagoniste

nicotinique, ce qui suggère que les récepteurs sensibles et insensibles à l' α -BGT sont concernés. A forte concentration d'AMPc, ces courants sont réduits par l' α -BGT mais la co-application de d-TC ou de Mec ne change rien, ce qui reflète un effet de l'AMPc sur les courants sensibles à l' α -BGT. En conclusion, l'ouverture des nAChRs lors de l'application d'une forte concentration de CLT provoquerait un fort influx de calcium dans la cellule, ce qui activerait la CaMKII. Cette dernière activerait à son tour la production d'AMPc par l'AC. Enfin, l'AMPc induirait la phosphorylation des nAChRs par la PKA. L'influx de calcium induit par une faible concentration de CLT ne semble quant à lui pas assez fort pour provoquer les effets observés ci-dessus.

Dans la continuité de ces travaux, les recherches ont porté sur la CaMKII. Le clonage de la CaMKII de *P. americana* a mis en évidence 5 isoformes (PaCaMKII A à E) et seule PaCaMKII-E est exprimée dans les neurones DUM (List *et al.*, 2014). L'inhibition de l'expression de PaCaMKII-E par des oligonucléotides antisens réduit les courants induits par l'application de NIC, et l' α -BGT a un effet sur cette réduction, suggérant que PaCaMKII-E régule les nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT. Une réduction des courants induits par la CLT par l'inhibition de PaCaMKII-E a également été observée, mais il n'y a aucun effet de cette inhibition quand les récepteurs sensibles sont bloqués par l' α -BGT, suggérant une modulation via les nAChRs sensibles à l' α -BGT. Pour la NIC comme la CLT, leur application sur les neurones est suivie d'une forte augmentation de $[Ca^{2+}]_{intra}$. Cette augmentation est affectée par l'inhibition de PaCaMKII-E. Les effets de la NIC, mais aussi de la CLT, sur les nAChRs de blatte, sont donc bien modulés par une isoforme de CaMKII (Figure 15).

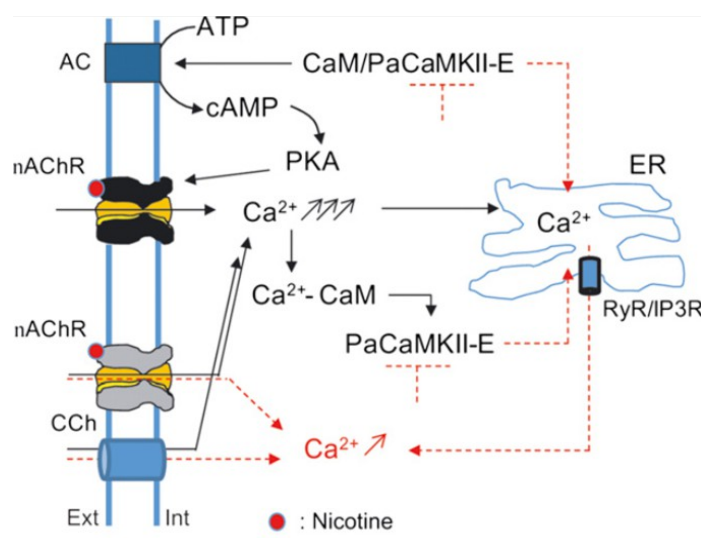


Figure 15 : Schéma de la modulation des nAChRs par les voies de la CaM et de la CaMKII (PaCaMKII-E) dans les neurones DUM de la blatte *P. americana* (modifié d'après List *et al.*, 2014). Le nAChR noir est insensible à l' α -BGT, contrairement au nAChR gris. Les lignes pointillées rouges représentent les voies potentiellement impliquées dans les courants ioniques résiduels induits par la NIC (ou la CLT) et dans les faibles augmentations de calcium intracellulaire. "AC", adénylylcyclase ; "CaM", calmoduline ; "CCh", canal calcique ; "PKA", protéine kinase A ; "RyR/IP3R", récepteur à la ryanodine / récepteur à l'inositol triphosphate.

Enfin, nAChR1 et nAChR2 sont régulés par une voie impliquant la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et une protéine kinase dépendante de la GMP (PKG ; Mannai *et al.*, 2016). L'addition de GMPc dans le milieu intrapipette a d'abord été testée sur les courants nicotiques. Une concentration de 100 μ M de GMPc augmente l'amplitude des courants nicotiques uniquement sur la deuxième partie de la courbe courant-potentiel biphasique correspondant à nAChR2, notamment quand nAChR1 est bloqué avec de la d-TC. Aucun effet de la GMPc n'est observé quand nAChR2 est bloqué avec de la Mec. L'application de GTP non-hydrolysable à raison de 100 μ M permet également d'augmenter les courants nicotiques via nAChR2, alors qu'une GDP non hydrolysable connue pour inhiber la GTP n'affecte en rien les courants nicotiques. La GMPc module donc les courants nicotiques via nAChR2. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de PKG, le KT5823, réduit l'amplitude des courants nicotiques via nAChR2, et la co-application de Mec n'a pas d'effet. Les courants nicotiques via nAChR2 sont donc régulés par la PKG. En outre, la modulation des effets de la NIC sur nAChR2 par la PKG est lié au calcium intracellulaire, étant donné que l'inhibition du calcium par le CdCl_2 annule les effets inhibiteurs du KT5823. L'inhibition spécifique de la guanylylcyclase (GC) par l'ODQ réduit quant à elle les courants nicotiques sur les deux parties de la courbe biphasique, c'est à dire que les deux sous-types nAChR1 et nAChR2 sont régulés par la voie GMPc/PKG (Figure 16). En résumé, une augmentation directe de GMPc provoque l'augmentation des courants nicotiques à travers nAChR2 via l'activation de la PKG, alors que l'augmentation de GMPc via la dégradation de GTP par la GC aurait un fort effet modulateur sur nAChR1 et nAChR2.

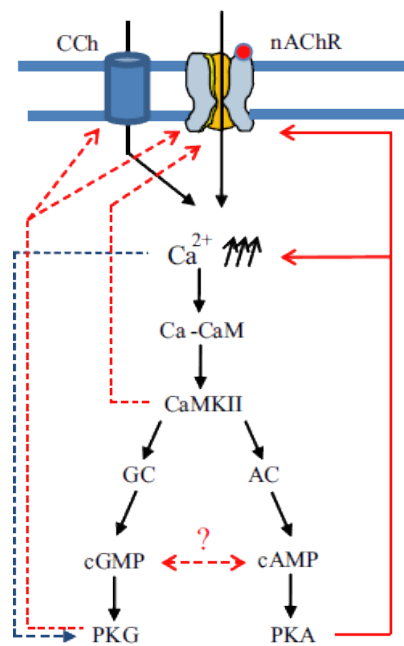


Figure 16 : Schéma de la régulation des nAChRs par la voie GMPC/PKG dans les neurones DUM de la blatte *P. americana* (d'après Mannai *et al.*, 2016). Les lignes pointillées rouges représentent les voies impliquées dans ce processus. "CaM" : calmoduline ; "CCh", canal calcique ; "GC", guanylylcyclase ; "PKA", protéine kinase A ; "PKG", protéine kinase dépendante de la GMP.

III. Présentation de la structure d'accueil et objectifs de thèse

Le Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) compte une équipe d'Entomologie et Biologie Intégrée (EBI) qui s'intéresse aux relations plante-insecte et aux mécanismes de résistance aux composés synthétisés par les plantes ou aux produits phytosanitaires. Les approches vont de l'écologie des insectes à leur comportement en passant par leur physiologie.

Une partie de l'équipe EBI axe ses recherches sur les nAChRs d'insectes en utilisant des techniques d'électrophysiologie, de biologie moléculaire et récemment, d'imagerie. Plusieurs études ont été menées au laboratoire afin d'étudier les propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des nAChRs neuronaux des insectes, notamment en réponse aux insecticides néonicotinoïdes. Une des hypothèses formulées par l'équipe est que des voies de régulation différentes peuvent moduler le mode d'action des néonicotinoïdes et la sensibilité des nAChRs à ces derniers. Particulièrement chez la blatte *Periplaneta americana*, certaines voies de signalisation calcium-dépendante comme la CaMKII, les PKC, l'AMPC et la GMPc modulent les courants induits par la NIC mais aussi par un néonicotinoïde, la CLT (Courjaret *et al.*, 2003 ; Calas-List *et al.*, 2013 ; List *et al.*, 2014 ; Mannai *et al.*, 2016). Étant donné l'existence de sites potentiels spécifiques des PKC, PKA et CaMK sur les nAChRs d'insectes, ces résultats montrent que la réponse des insectes aux néonicotinoïdes peut, en plus de l'augmentation de l'activité métabolique liée à des enzymes de détoxification et de la mutation des nAChRs, être modulée par des mécanismes intracellulaires aboutissant à la phosphorylation des nAChRs. Par conséquent, non seulement l'étude de ces mécanismes apporterait de nouvelles connaissances sur le fonctionnement et la pharmacologie des nAChRs d'insectes, mais constitue un enjeu en termes agronomiques et sanitaires. En effet, la manipulation des processus de régulation intracellulaire des nAChRs pourrait avoir des répercussions sur la sensibilité des insectes aux néonicotinoïdes et donner naissance à de nouvelles stratégies d'amélioration de l'efficacité de ces insecticides, comme proposé par exemple en lutte antivectorielle contre le moustique (Lapied *et al.*, 2009).

Cette thèse s'inscrit dans le cadre des problématiques exposées ci-dessus. L'objectif est de mieux comprendre l'implication des voies de régulation intracellulaire dans la modulation de l'activité des nAChRs d'insectes et de leur réponse aux insecticides.

Pour mener à bien ce projet, les expériences ont porté sur les nAChRs exprimés au niveau des neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*. Nous avons utilisé les techniques de patch-clamp en configuration cellule entière ("whole cell") et d'imagerie calcique ratiométrique au fura-2-AM. Ces techniques sont présentées dans la partie "Matériels et méthodes".

La partie "Résultats" est organisée en différents chapitres. Le chapitre I traite des effets agonistes d'un nouvel insecticide de la famille des sulfoximines, le SFX sur les nAChRs des neurones DUM. Le chapitre II apporte des précisions sur le rôle du DAG et des PKC dans la modulation des courants induits par la NIC et la CLT à travers nAChR1 et nAChR2. Pour cela, nous avons utilisé un analogue du DAG, le 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycérol (DiC8). Dans le chapitre III, nous nous sommes intéressés plus en détail au rôle de la CaM dans la régulation des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT (dont nAChR1 et nAChR2) en utilisant des inhibiteurs et activateurs spécifiques des protéine-kinases et autres molécules dépendantes de la CaM, telles que les CaMKK, la PDE et l'AMPK. La partie "Discussion et perspectives" permet de faire une synthèse et de mettre en perspective l'ensemble des résultats obtenus. Enfin, deux publications sont accessibles en annexes, la première est un article portant sur les conséquences d'une coapplication de perméthrine sur les effets agonistes du DIN, et la seconde est une revue des effets des néonicotinoïdes sur les fonctions cholinergiques des mammifères à travers l'activation des nAChRs neuronaux.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Modèle biologique : la blatte *Periplaneta americana*

La blatte américaine *Periplaneta americana* [Blattaria : Blattidae] (Figure 17A) est une espèce cosmopolite qui affectionne les milieux chauds et humides. Les adultes mesurent entre 29 et 53 mm. Le mâle est facilement distinguable de la femelle car la longueur de ses ailes dépasse celle de son abdomen, et il possède deux stylets entre les cerques que la femelle ne possède pas. C'est un insecte paurométabole : il n'y a pas de stade immobile entre la larve et l'adulte, les deux vivant dans le même milieu. Elle connaît trois stades de développement : œuf, nymphe et adulte. Une oothèque contenant les oeufs est d'abord déposée par la femelle. Les blattes immatures émergent dans les 6 à 8 semaines puis subissent 7 mues successives avant de devenir adultes au bout de 6 à 12 mois selon les conditions de milieu.

Le système nerveux de la blatte (Figure 17B) consiste en un cerveau et une chaîne ventrale. Le cerveau est divisé en 3 régions : protocérébron, deutocérébron et tritocérébron. La chaîne nerveuse est quant à elle une série de ganglions facilement observables à la loupe. En partant du cerveau, le premier de la série est le ganglion sous-oesophagien, très rapproché du cerveau. S'ensuivent 3 ganglions thoraciques et 6 ganglions abdominaux.

Le dernier ganglion abdominal contient des neurones DUM (Figure 17B). Ces derniers, également présents dans les ganglions thoraciques, sont des cellules neurosécrétrices notamment impliquées dans le relargage d'octopamine vers des cibles neuronales et musculaires pour assurer des fonctions énergivores telles que la fuite en présence d'un prédateur (Sinakevitch *et al.*, 1996). Ils ont un diamètre conséquent (entre 45 et 60 μM) et ont une activité spontanée de type pacemaker qui peut être modulée par l'activation des nAChRs ou d'autres récepteurs comme les GABAergiques (Lapied *et al.*, 1990). Les neurones DUM sont donc un modèle intéressant en électrophysiologie pour étudier les courants spontanés ou induits par l'application d'agonistes, mais aussi pour étudier le mode d'action des insecticides néonicotinoïdes sur les nAChRs.

L'ensemble des expériences sont menées sur des neurones DUM d'individus mâles. Les insectes sont maintenus au laboratoire dans une pièce à 29°C, à l'écart de tout insecticide, avec une photopériode de 12h jour : 12h nuit.

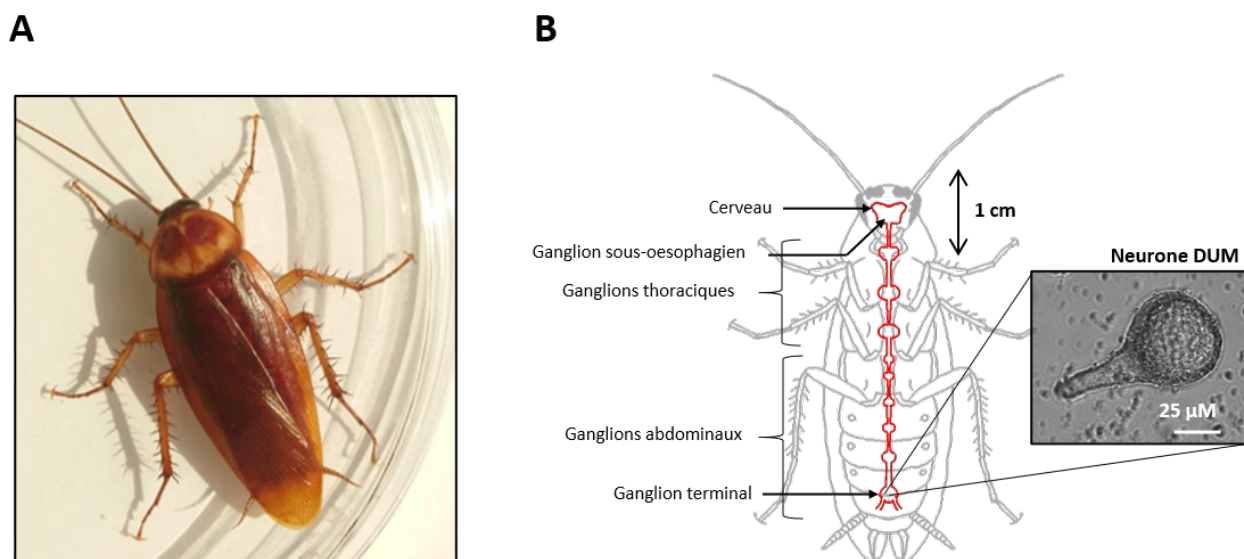


Figure 17 : La blatte *Periplaneta americana* et son système nerveux. (A) Photographie d'un individu mâle. (B) Schéma du système nerveux de la blatte. La photographie représente un neurone DUM isolé et mis en culture.

II. Préparation des neurones DUM

Les expériences sont menées sur les neurones DUM du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*. Les ganglions terminaux de l'abdomen sont prélevés sur des mâles et repris dans un liquide physiologique (LP) standard (NaCl, 200 mM ; KCl, 3,1 mM ; MgCl₂, 4 mM ; CaCl₂, 5 mM ; HEPES, 10 mM ; pH 7,4) enrichi en sucrose (50 mM ; Sigma-Aldrich, France). Ils sont incubés 35 min à 29°C dans du LP additionné de collagénase (type IA ; 1,5 mg/ml ; GIBCO, France) puis rincés trois fois avant d'être repris dans du LP additionné de sérum foetal de veau (5 % v/v), de pénicilline (50 UI/ml) et de streptomycine (50 μg/ml). Ces produits proviennent de chez Sigma-Aldrich, France. Les ganglions sont alors dissociés mécaniquement à l'aide de pipettes Pasteur polies à la flamme et déposés soit dans une boîte de Pétri pour les enregistrements électrophysiologiques (35/09 mm ; NEST ; Grosseron, France), soit sur une lamelle couvre-objet pour les enregistrements d'imagerie (22x40x0,17 mm ; HIRSCHMANN ; Verrerie villeurbanaise, France). Ils peuvent alors adhérer à une couche de poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, France). Les préparations sont incubées overnight à 29°C avant d'être utilisées pour les expériences. Toutes les solutions utilisées sont préalablement filtrées, et le matériel est stérilisé à la flamme. La figure 18 présente les étapes principales de la préparation des neurones DUM.

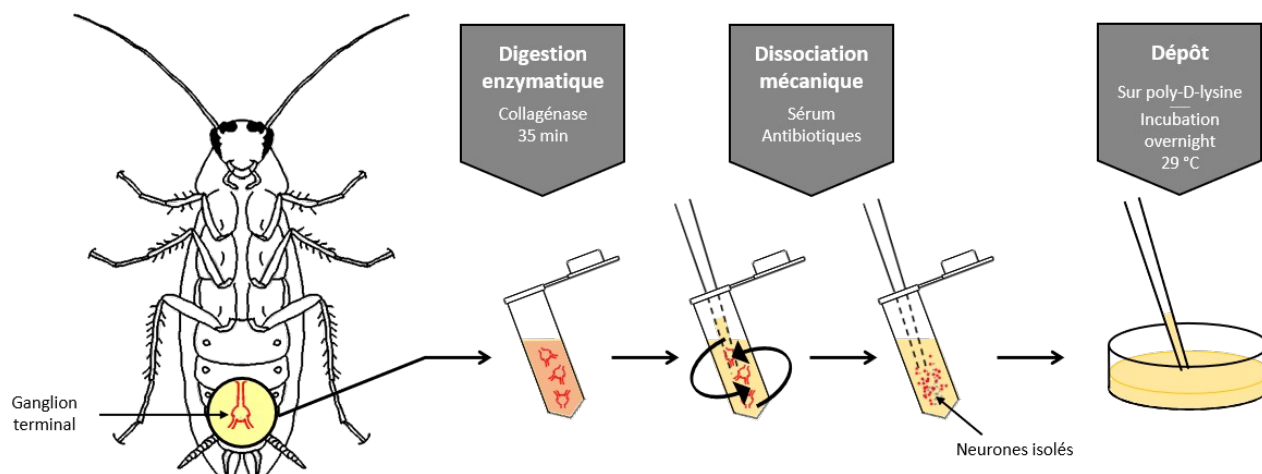


Figure 18 : Principales étapes de dissociation des neurones DUM de la blatte *P. americana*.

III. Patch-clamp en configuration "cellule entière"

1. Principe de la technique

Le patch-clamp est une technique d'électrophysiologie dont le but est d'enregistrer les courants ioniques qui résultent de l'activation des canaux ioniques exprimés au niveau de la membrane des cellules. Pour ce faire, une micropipette en verre est remplie d'une solution ionique (solution intrapipette), installée sur un porte-électrode et mise au contact de la membrane cellulaire. La solution intrapipette assure alors la conduction électrique entre l'extrémité de la pipette accolée à la membrane et l'électrode. Enfin, l'électrode est reliée à un amplificateur et à un système d'acquisition (ordinateur) permettant de mesurer et enregistrer les courants obtenus.

En configuration "cellule entière", lorsque la micropipette est au contact de la cellule, une aspiration permet de détacher le morceau de membrane directement exposé à la solution intrapipette. La cellule est ensuite maintenue au contact de la micropipette grâce à un clamp. Cette configuration de patch-clamp permet de mesurer les courants ioniques de l'ensemble des canaux de la membrane.

2. Protocole adapté aux neurones DUM de *P.americana*

Les neurones isolés de *P.americana* sont installés sur un microscope inversé (AE 2000, Motic) sous une cage de Faraday. Le LP est continuellement renouvelé par un dispositif de perfusion. Ce dernier permet d'appliquer jusqu'à 6 bains différents de composés que l'on souhaite tester sur l'activité des nAChR. L'activation des nAChR est rendue possible par un dispositif d'éjection pressurisé (Miniframe, Medical System Corporation, Etats-Unis) qui envoie de l'air dans une micropipette (résistance comprise entre 1,5 et 2 M Ω) contenant du LP additionné d'ACh ou d'un agoniste. La pointe de la pipette est placée à environ 100 μ m du corps cellulaire et la stimulation dure 100 ms. Les micro-pipettes d'enregistrement contiennent une solution intrapipette définie (K-D-gluconate, 160 mM ; K-Fluoride, 10 mM ; NaCl, 10 mM ; MgCl₂, 1 mM ; CaCl₂, 0,5 mM ; HEPES, 20 mM ; ATP, 3 mM ; EGTA, 10 mM ; pH 7,4) et ont une résistance de 1,5 à 2 M Ω . Les courants ioniques sont amplifiés (Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, CA), digitalisés (convertisseur analogue-digital MiniDigidata 1440, Axon Instruments) et acquis (logiciel Axoscope 10.2, Axon Instruments). Ils sont filtrés passe-bas à 5 KHz. La figure 19 représente le dispositif de patch-clamp du laboratoire.

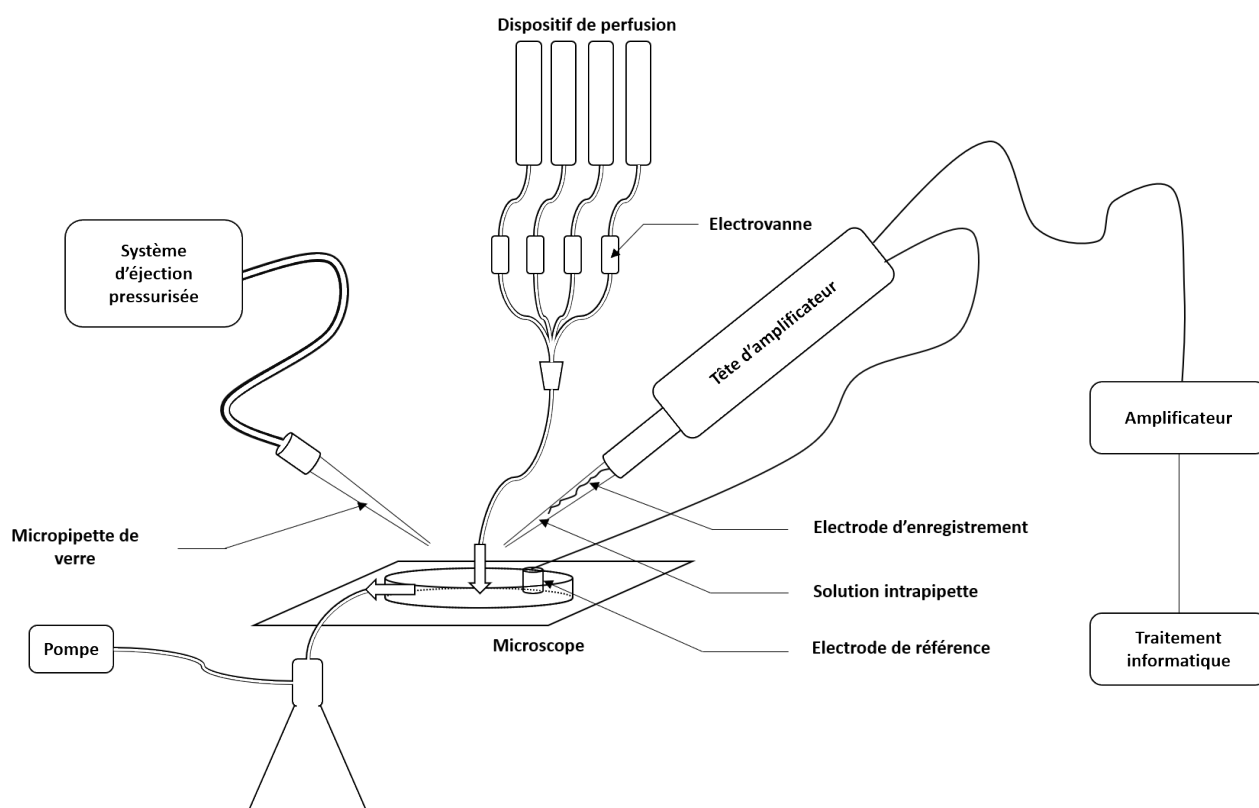


Figure 19 : Dispositif de patch-clamp du laboratoire.

IV. Imagerie calcique ratiométrique

1. Principe de la technique

L'imagerie calcique est une technique permettant d'étudier les flux de calcium à l'intérieur des cellules en utilisant des colorants. Ces colorants ont deux composantes : une partie chélatrice qui fixe le calcium de manière sélective et une partie fluorescente qui, lorsqu'elle est excitée par une longueur d'onde spécifique d'un ultraviolet, émet une lumière de longueur d'onde spécifique. La fixation de calcium modifie les propriétés de fluorescence du colorant et rend visuellement compte des variations de la concentration en calcium dans la cellule.

Au laboratoire, le colorant utilisé sur les neurones DUM de blatte est l'ester de fura-2-acétoxyméthyle, ou fura-2-AM. Ce colorant a la particularité d'émettre de la fluorescence à deux longueurs d'onde d'excitation différentes selon que le calcium est fixé ou libre. En effet, excité à 340 nm, il émet une fluorescence correspondant au calcium fixé, alors qu'à 380 nm, il émet une fluorescence correspondant au calcium libre. Le calcul d'un ratio entre la fluorescence émise aux deux longueurs d'onde d'excitation (F_{340nm}/F_{380nm}) fait alors ressortir les variations de la concentration en calcium intracellulaire dans le temps et/ou dans différentes conditions, comme l'application d'agents pharmacologiques. Le fura-2-AM est donc qualifié de colorant ratiométrique. De plus, comparé à un colorant simple, il présente l'avantage d'être beaucoup moins sensible au photo-blanchiment.

2. Protocole adapté aux neurones DUM de *P.americana*

Les lamelles couvre-objet destinées à l'imagerie calcique sont rincées 3 fois avec du LP additionné de sucrose (50 mM) afin d'enlever le maximum de sérum foetal de veau. Puis, à l'obscurité, les neurones sont incubés 1h à 37°C dans le LP sucré additionné de 0,1 % de Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, France) et de 10 μ M de fura-2-AM (Sigma-Aldrich, France). Ils sont ensuite rincés 2 fois avec du LP et réincubés pendant 30 min à l'obscurité avant d'être installés sous un microscope inversé (IX73, Olympus). Un dispositif de perfusion permet alors de renouveler constamment le LP et de tester les effets de différentes molécules sur les nAChR. Les neurones sont activés à l'aide d'un système d'éjection pressurisé (PLI-100, Medical System Corporation,

Etats-unis) envoyant de l'air dans une micropipette (résistance comprise entre 1,5 et 2 MΩ) contenant de l'ACh ou un agoniste dans du LP, et située à environ 100 μm du corps cellulaire. Une caméra et un système LED (CoolLED pE-340^{fura}) permet de mesurer les fluorescences émises à 340 (F_{340nm}) et 380 nm (F_{380nm}), et le logiciel CellSens Dimensions permet de calculer les ratios F_{340nm}/F_{380nm} (R) dans le temps et à différentes fréquences après soustraction du bruit de fond. Dans le cas des neurones DUM, la durée de l'enregistrement est de 2 min et la fréquence de mesure des ratios est de 2 secondes. Pour la représentation graphique, chaque ratio est exprimé en taux de variation par rapport au ratio initial R0 : $R = \Delta R / R0$. Le dispositif d'imagerie calcique du laboratoire est schématisé en Figure 20.

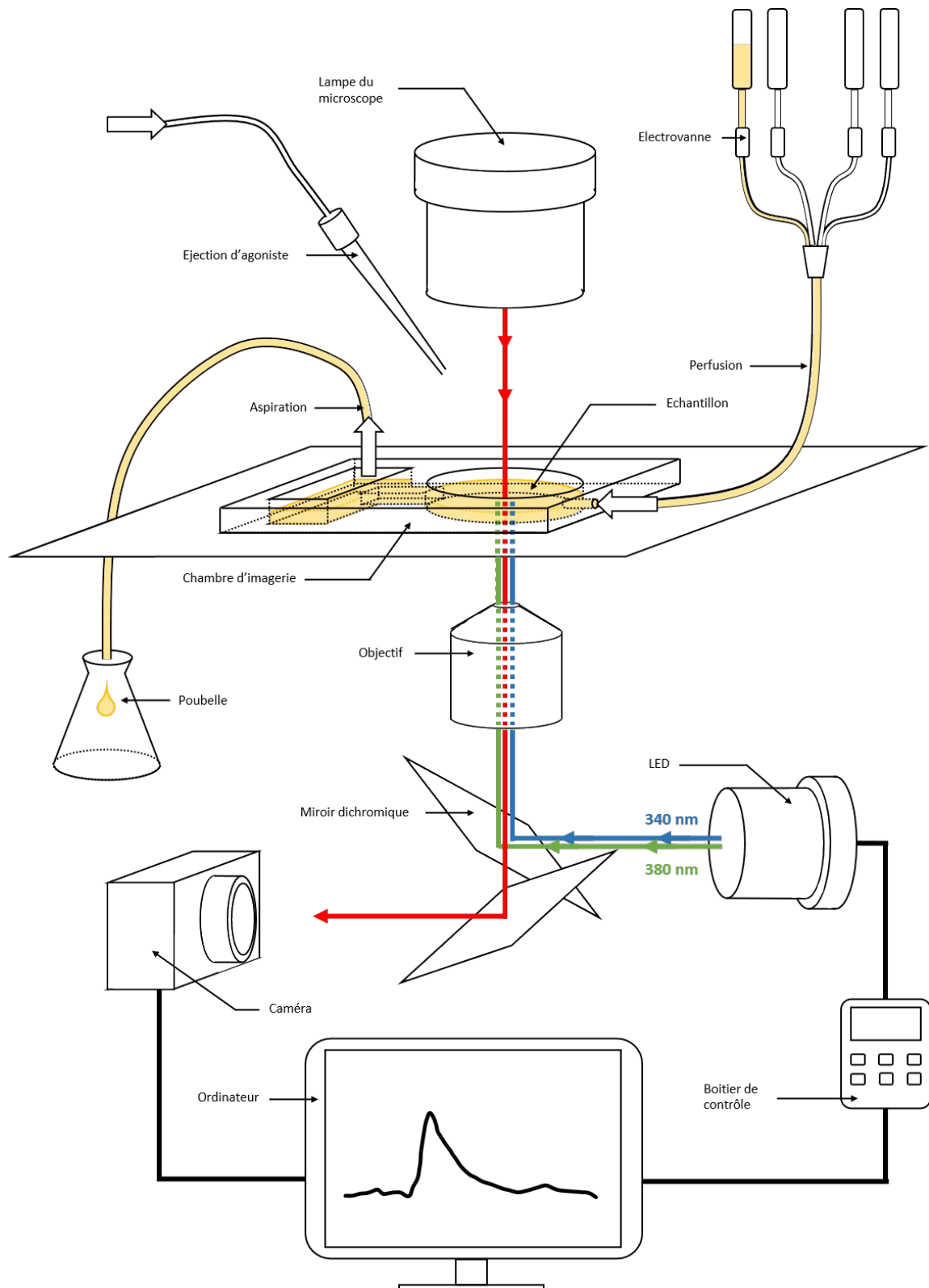


Figure 20 : Dispositif d'imagerie calcique du laboratoire.

RÉSULTATS/ CHAPITRE I

Mode d'action du sulfoxaflor sur les nAChRs insensibles à l' α -bungarotoxine, nAChR1 et nAChR2: effet inhibiteur de l'imidaclopride.

I. Synthèse de l'article

Les sulfoximines, récemment introduites sur le marché et avec le sulfoxaflor (SFX) comme principal représentant, constituent une nouvelle classe d'insecticides. Ils ont été introduits pour lutter contre des insectes piqueurs-suceurs comme *M. persicae*, *Aphis gossypii* ou *N. lugens*, pour lesquels des populations résistantes aux néonicotinoïdes ont déjà été observées (Sparks *et al.*, 2013). En effet, les sulfoximines ont également pour cible les nAChRs d'insectes. Watson *et al.* (2011) ont notamment montré que le SFX a un mode d'action agoniste et induit des courants ioniques de grande amplitude quand il est appliqué sur des récepteurs hybrides $\alpha 2$ (drosophile)/ $\beta 2$ exprimés en ovocytes de xénope. Cependant, le SFX déplace le [^3H]-IMI avec une faible affinité sur des préparations membranaires de *M. persicae* (Watson *et al.*, 2011). Ces observations reflètent le besoin d'explorer davantage le mode d'action du SFX sur les nAChRs d'insectes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au mode d'action que le SFX pourrait avoir sur les sous-types de récepteurs nAChR1 et nAChR2 exprimés par les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. En effet, nAChR1 et nAChR2 sont différemment sensibles aux néonicotinoïdes, ce qui suggère qu'ils pourraient aussi présenter une sensibilité différente au SFX. Pour cela, nous avons testé les effets agonistes du SFX sur nAChR1 et nAChR2 par une approche de patch-clamp.

Nos résultats montrent que le SFX est un super-agoniste des nAChRs insensibles à l' α -BGT des neurones DUM. L'application de 1 mM de SFX induit des courants ioniques deux fois plus grands que ceux induits par l'ACh. Ces courants sont réduits par la Mec mais pas par la d-TC, suggérant que seul nAChR2 est activé par le SFX. Étant donné que l'IMI agit préférentiellement sur nAChR1 (Courjaret & Lapied, 2001), les effets du SFX ont été testés en présence d'IMI. Les résultats indiquent une réduction complète des courants induits par le SFX quand nAChR2 est bloqué par la Mec, suggérant que nAChR1 est activé par le SFX. En revanche, l'IMI réduit les courants induits par le SFX de façon complète quand nAChR1 est bloqué par la d-TC, ce qui suggère l'existence d'au moins deux sous-types de nAChR2 répondant au SFX, l'un étant sensible à l'IMI et l'autre, insensible. Quand la concentration extracellulaire de calcium est augmentée de 5 à 9 mM, les effets de l'IMI sur les courants induits par le SFX restent inchangés, pourtant, cette augmentation de calcium est connue pour amplifier les courants nicotiques via nAChR2 quand nAChR1 est bloqué par la d-TC (Thany *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent que le SFX active les sous-types

nAChR1 et nAChR2 de façon indépendante du calcium, contrairement à la NIC (Courjaret *et al.*, 2003) ou à la CLT (Calas-List *et al.*, 2013).

En conclusion, nous démontrons que le SFX est un super-agoniste des nAChRs exprimés par les neurones DUM de blatte, notamment les sous-types nAChR1 et nAChR2 insensibles à l' α -BGT, et ses effets semblent indépendants du calcium. L'IMI permet de mettre en évidence au moins deux sous-populations de nAChR2, sensibles et insensibles à l'IMI, tous activés par le SFX. La composition en sous-unités de nAChR1 et nAChR2 a déjà fait l'objet d'hypothèses : nAChR1 serait formé des sous-unités α 3, α 8 et β 1 et nAChR2, des sous-unités α 1, α 2 et β 1 (Sun *et al.*, 2017). Des différences dans l'assemblage des sous-unités composant nAChR2 pourraient alors expliquer les différences de sensibilité à l'IMI.

II. Article publié

Neurotoxicology 74 (2019) 132–138



Contents lists available at ScienceDirect

Neurotoxicology

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

Full Length Article

Mode of action of sulfoxaflor on α -bungarotoxin-insensitive nAChR1 and nAChR2 subtypes: Inhibitory effect of imidacloprid

Jean-Noël Houchat^{a,1}, Basile Moambi Dissanamossi^{a,1}, Elodie Landagaray^b,
Monique Mathé-Allainmat^b, Alison Cartereau^a, Jérôme Graton^b, Jacques Lebreton^b,
Jean-Yves Le Questel^b, Steeve H. Thany^{a,*}

^a LBLGC USC INRA 1328, Université d'Orléans, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France^b CEISAM UMR CNRS 6230, Université de Nantes, Faculté des Sciences et des Techniques, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Insect
Nicotinic receptors
Sulfoxaflor
Imidacloprid
Neoncotinoids
Sulfoximines

ABSTRACT

Cockroach neurosecretory cells, dorsal unpaired median (DUM) neurons, express two distinct α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptor subtypes, nAChR1 and nAChR2 which are differently sensitive to the neonicotinoid insecticides and intracellular calcium pathways. The aim of this study is to determine whether sulfoxaflor acts as an agonist of nAChR1 and nAChR2 subtypes. We demonstrated that 1 mM sulfoxaflor induced high current amplitudes, compared to acetylcholine, suggesting that it was a full agonist of DUM neuron nAChR subtypes. Sulfoxaflor evoked currents were not inhibited by the nicotinic acetylcholine receptor antagonist d-tubocurarine (dTC) which reduced nAChR1. But, sulfoxaflor evoked currents were reduced in the presence of 5 μ M mecamylamine which is known to reduce nAChR2 subtype. Interestingly, when 1 μ M imidacloprid was added in the extracellular solution, sulfoxaflor-induced currents were significantly suppressed. Moreover, when extracellular calcium concentration was increased, bath application of 1 μ M imidacloprid partially reduced sulfoxaflor activated currents when nAChR1 was inhibited with 20 μ M dTC and completely suppressed sulfoxaflor currents when nAChR2 was inhibited with 5 μ M mecamylamine. Our data demonstrated therefore that sulfoxaflor activates both nAChR1 and nAChR2 subtypes.

1. Introduction

Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) play a central role in the synaptic transmission and they are the main targets of several insecticides including neonicotinoids (Ihara and Matsuda, 2018; Taillebois et al., 2018; Tomizawa and Casida, 2003, 2005) and sulfoximine derivatives (Cutler et al., 2013; Watson et al., 2011, 2017). They are ligand gated ion channels composed of five subunits which form homomeric or heteromeric receptors. The pharmacological properties of their native forms are currently studied using cockroach neurons expressing nAChR subtypes (Salgado, 2016; Salgado and Saar, 2004; Tan et al., 2007). It was found that neurons from the thoracic ganglia expressed two types of α -bungarotoxin-sensitive receptors: the desensitized subtype called nAChRD and nondesensitized (nAChRN) receptors. The nAChRN subtypes are inhibited by the nAChR antagonist methyllicaconitine (MLA) while the nAChRD subtypes are inhibited by neonicotinoid insecticides such as imidacloprid (IMI) (Salgado and

Saar, 2004). Using cockroach terminal abdominal ganglia, it was found that the cockroach neurosecretory cells, called dorsal unpaired median (DUM) neurons, expressed two α -Bgt-insensitive nAChR subtypes. nAChR1 was blocked by d-tubocurarine (dTC) and was sensitive to IMI while nAChR2 was blocked by mecamylamine (MECA) and was insensitive to protein kinases C (PKC) 1 and 2, respectively (Courjaret et al., 2003; Courjaret and Lapied, 2001; Thany et al., 2008). In addition, increasing extracellular calcium concentration resulted to an increase of nicotine evoked current amplitudes through nAChR2. This increase occurred when nAChR1 was blocked with dTC (Thany et al., 2008). Moreover, pressure ejection of IMI on DUM neuron nAChRs induced only a monophasic current-voltage curve compared to that induced with acetamiprid (ACE) and clothianidin (CLT) which evoked biphasic curves (Bodereau-Dubois et al., 2012). Thus, it was suggested that ACE and CLT were able to activate both nAChR1 and nAChR2 whereas IMI activated only nAChR2 subtype (Bodereau-Dubois et al., 2012).

* Corresponding author.

E-mail address: steeve.thany@univ-orleans.fr (S.H. Thany).¹ Equal contribution.<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.06.003>

Received 16 April 2019; Received in revised form 29 May 2019; Accepted 10 June 2019

Available online 15 June 2019

0161-813X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Sulfoximine insecticides such as sulfoxaflor (SFX) form a new class of active compounds which exhibited structure-activity relationships different from neonicotinoid ones (Babcock et al., 2011). They have been included in the 4C subgroup (nAChR competitive modulators) by the IRAC committee while neonicotinoids are in the 4A subgroup (Sparks et al., 2013). They are used for the control of sap-feeding insects such as *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci* and *Nilaparvata lugens* for which a strong resistance against neonicotinoid insecticides was found (Sparks et al., 2013). Indeed, SFX is a potential new alternative over the current neonicotinoids such as IMI because of the lack of cross-resistance with neonicotinoids (Wang et al., 2017). Like neonicotinoids, sulfoximine potent insecticidal activity was associated to their efficacy at nAChR subtypes (Watson et al., 2011). Thus, it was found that SFX evoked very high amplitude currents through the activation of *Drosophila melanogaster* Dα2/β2 hybrid receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. But, SFX displaced [³H]IMI from *Myzus persicae* nAChR membrane preparations with weak affinity (Watson et al., 2011). These studies demonstrated that the mode of action of SFX on insect nAChRs needs to be further explored. Indeed, it was not clear if it can activate similar or distinct insect nAChRs with IMI (Cutler et al., 2013; Watson et al., 2011). In the present study, we evaluated the mode of action of SFX on cockroach DUM neurons. In particular, we were interested to evaluate its effect on the known α-Bgt-insensitive nAChR1 and nAChR2 subtypes.

2. Materials and methods

2.1. Insects

The experiments were carried out on DUM neuron cell bodies isolated from the dorsal midline of the terminal abdominal ganglion of the nerve cord from adult male cockroaches *Periplaneta americana*.

2.2. Cells isolation

DUM neurons were isolated following enzymatic treatment and mechanical dissociation as previously described (Lapied et al., 1990). Cells were incubated overnight at 29 °C before electrophysiological experiments. Currents were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration (Lapied et al., 1990). The Petri dish containing isolated cell bodies was placed onto the inverted microscope (CK2: Olympus), and continuously bathed with the standard extracellular solution (in mM: NaCl 200, KCl 3.1, MgCl₂ 4, CaCl₂ 5, sucrose 50, HEPES 10, pH 7.4 adjusted with NaOH) using a gravity perfusion system positioned at a distance of 150 μm from the cell body.

2.3. Patch clamp recordings

Signals were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Axon instruments, Foster City, CA), connected to a computer with the pClamp software control (pClamp 10.0, Axon Instruments). The liquid junction potential between the bath and the internal pipette solution was compensated before the formation of a gigaOhm seal (> 5 GΩ). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus) and had resistance of 2 MΩ when filled with the standard pipette solution (osmolality : 227.5) containing (in mM) : NaCl 10; MgCl₂ 1; CaCl₂ 0.5; HEPES 10; ATPMg 1; EGTA 10; K aspartate 160; KF 10; and adjusted to

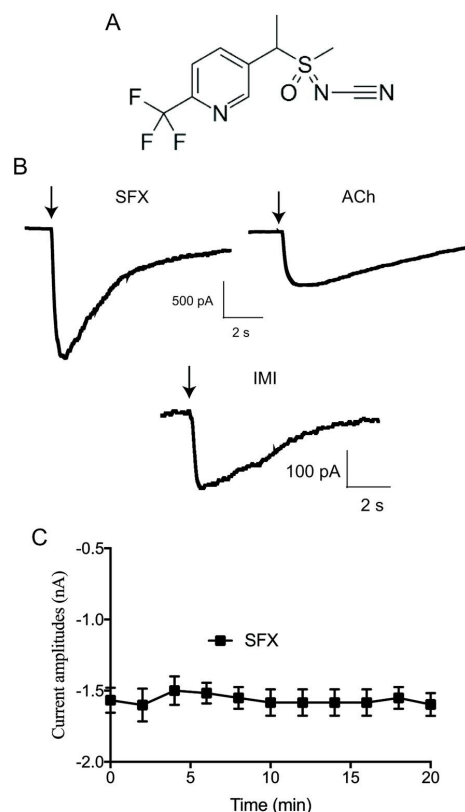


Fig. 1. (A) Chemical structure of sulfoxaflor (SFX) prepared according to literature data (Arndt et al., 2015). (B) Currents represent the effects of 1 mM sulfoxaflor (SFX), acetylcholine (ACh) and imidacloprid (IMI) on DUM neuron nAChRs. Arrows indicate 300 ms pulse application (15 psig). (C) Successive applications of 1 mM SFX (300 ms pulse application) recorded at -50 mV holding potential. Each point represents mean $\pm$ SEM of $n = 12$ cells.

pH 7.4 with KOH. SFX was applied by pneumatic pressure ejection (15 psig, 300 ms, Miniframe, Medical System Corporation, USA) through a glass micropipette (resistance 2.0 MΩ when filled with agonist) positioned in solution at a distance of 150 μm from the isolated cell body. All currents were recorded under bath application of 0.5 μM α-Bgt to block α-Bgt-sensitive nAChRs (Courjaret and Lapied, 2001). Currents were filtered using the Clampfit software.

2.4. Compounds

All compounds were purchased from SIGMA Aldrich France, except for SFX which was prepared according to data previously published (Arndt et al., 2015).

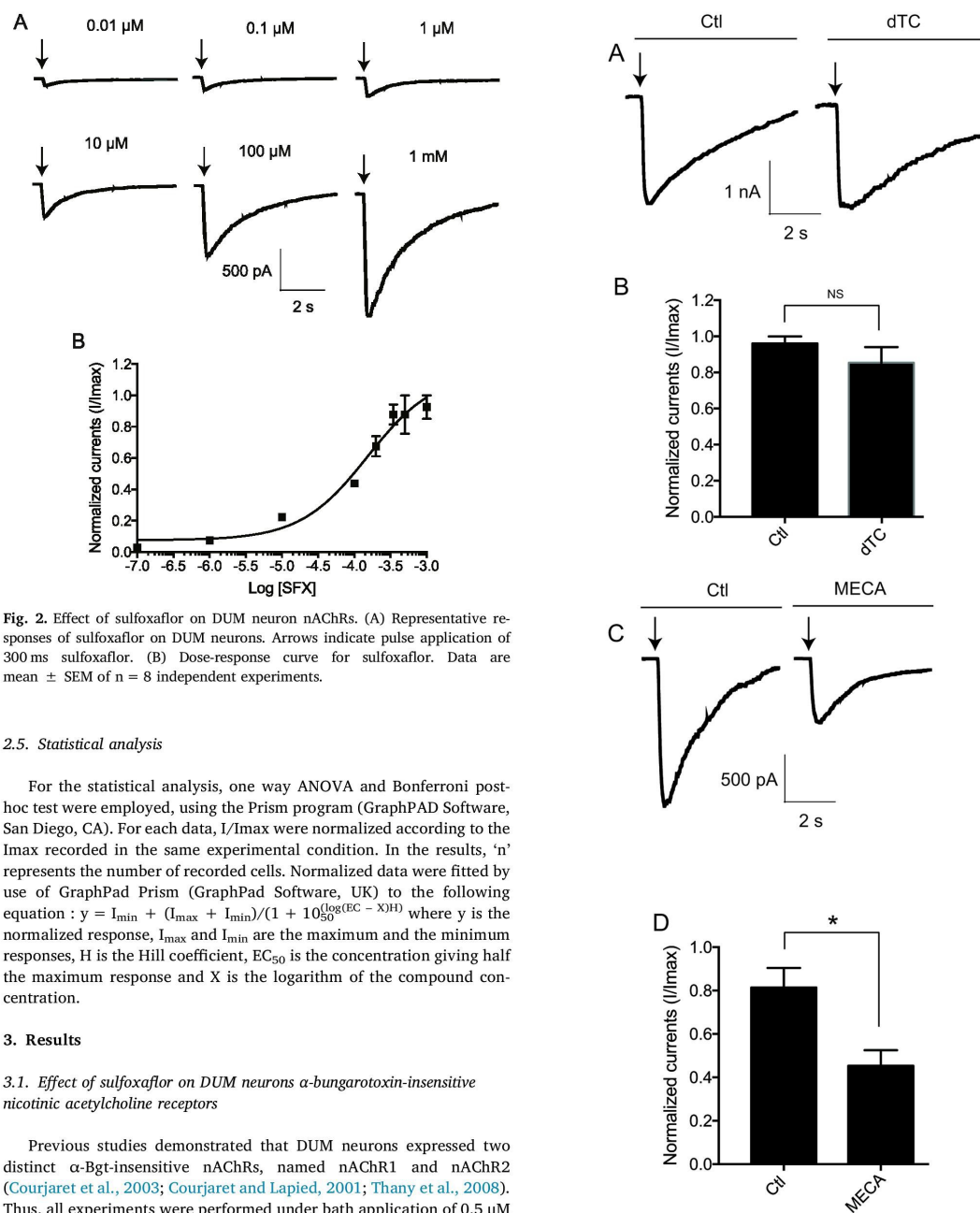


Fig. 2. Effect of sulfoxaflor on DUM neuron nAChRs. (A) Representative responses of sulfoxaflor on DUM neurons. Arrows indicate pulse application of 300 ms sulfoxaflor. (B) Dose-response curve for sulfoxaflor. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 8$ independent experiments.

2.5. Statistical analysis

For the statistical analysis, one way ANOVA and Bonferroni post-hoc test were employed, using the Prism program (GraphPAD Software, San Diego, CA). For each data, I/I_{max} were normalized according to the I_{max} recorded in the same experimental condition. In the results, 'n' represents the number of recorded cells. Normalized data were fitted by use of GraphPad Prism (GraphPad Software, UK) to the following equation: $y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + 10^{(\log(EC_{50} - X)/H)})$ where y is the normalized response, I_{max} and I_{min} are the maximum and the minimum responses, H is the Hill coefficient, EC_{50} is the concentration giving half the maximum response and X is the logarithm of the compound concentration.

3. Results

3.1. Effect of sulfoxaflor on DUM neurons α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors

Previous studies demonstrated that DUM neurons expressed two distinct α -Bgt-insensitive nAChRs, named nAChR1 and nAChR2 (Courjaret et al., 2003; Courjaret and Lapied, 2001; Thany et al., 2008). Thus, all experiments were performed under bath application of 0.5 μ M α -Bgt to inhibit α -Bgt-sensitive nAChRs (Bodereau-Dubois et al., 2012; Courjaret et al., 2003; Courjaret and Lapied, 2001). Pressure application of 1 mM SFX (300 ms pulse duration) induced a mean inward current of -1.56 ± 0.21 nA at a holding membrane potential of -50 mV. The amplitude of the SFX-evoked currents was higher compared to 1 mM ACh, suggesting that SFX was a full activator of α -Bgt-insensitive nAChRs expressed on cockroach DUM neurons (Fig. 1). Note that, no desensitized currents were found during successive applications of 1 mM SFX (Fig. 1C). Using the equation describes above, we

(caption on next page)

Fig. 3. The inhibitory effects of the nAChR antagonists, d-tubocurarine (dTC) and mecamylamine (MECA), on the responses evoked by 1 mM SFX. (A and B) Representative currents after 300 ms pulse application (arrows) of 1 mM SFX during control condition (Ctl) and bath application of 20 μ M dTC. Histograms represent the mean SFX-induced currents recorded at -50 mV holding potential under 20 μ M dTC. In each case, data are mean $\pm$ SEM of $n = 8$ cells. NS : non significant. (C and D) Examples of SFX-induced currents under control condition (Ctl) and bath application of 5 μ M MECA. Arrows indicate 300 ms pulse application of 1 mM SFX. (D) Histograms summarizing the effect of 1 mM SFX under control condition (Ctl) and bath application of 5 μ M MECA. Each histogram represents means $\pm$ SEM of $n = 10$ cells. * $p < 0.05$.

found that successive applications of SFX at different concentrations induced a concentration-dependent response with an EC_{50} value of 153.7 ± 10.2 μ M and a Hill coefficient of 0.9 (Fig. 2). As illustrated in Fig. 3, currents measured in the absence and presence of 20 μ M dTC are not significantly different. Currents are respectively of -1.44 ± 0.08 nA and -1.43 ± 0.1 nA ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 3A and B). However, significant reduced current amplitudes were found when 5 μ M MECA was applied in the bath. As such, currents were reduced from -1.63 ± 0.08 nA under control condition to -0.87 ± 0.05 nA under bath application of 5 μ M MECA ($p < 0.05$, $n = 10$, Fig. 3C and D). These results suggested that dTC was not able to inhibit SFX current amplitudes, leading to the assumption that SFX activated only nAChR2

subtype.

3.2. Imidacloprid reduces sulfoxaflor activated current through nAChR1 and nAChR2 subtypes

To test further the involvement of nAChR1 and nAChR2 subtypes on SFX evoked currents, 1 μ M IMI was applied in the bath during pulse application of 1 mM SFX (300 ms pulse duration). Indeed, it was suggested that IMI acted preferentially on nAChR1 subtype (Courjaret and Lapied, 2001). Note that at 1 μ M, IMI was not able to elicit any current, even when applied on DUM neurons (Data not shown). But, it strongly reduced currents evoked by SFX at different holding potentials (Fig. 4). Indeed, the currents induced by 1 mM SFX at different holding potentials were strongly reduced in the presence of bath application of 1 μ M IMI (Fig. 4A). At -50 mV holding potential, currents were reduced from -1.61 ± 0.8 nA to -0.35 ± 0.03 nA ($p < 0.05$, $n = 8$, Fig. 4B) and SFX-induced currents were partially reversed after 20 min washout (Fig. 4B). These results demonstrated that IMI was able to inhibit SFX evoked current amplitudes. Nevertheless, we noted a residual current when 1 μ M IMI was applied in the bath. This current could suggest a partial blocking effect or the presence of nAChRs insensitive to IMI. Thus, we studied the involvement of nAChR1 and nAChR2 subtypes. As previously shown (see Fig. 3) when nAChR1 was blocked with 20 μ M dTC, SFX currents were not reduced. But, co-application of both 1 μ M

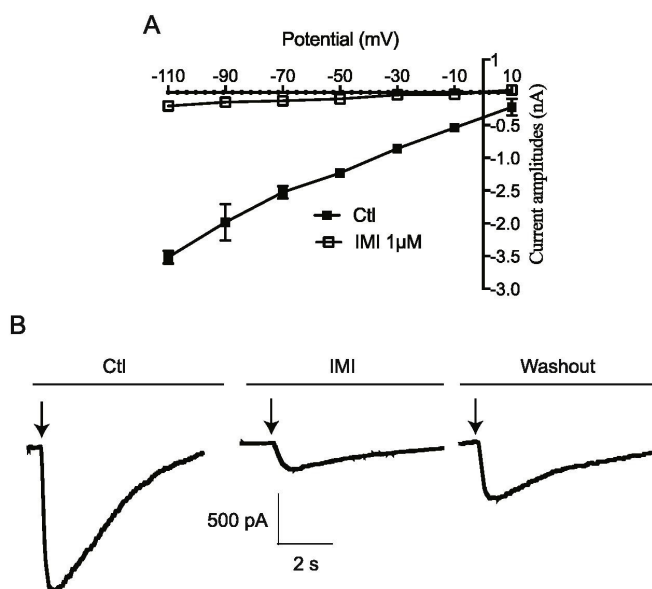


Fig. 4. Effect of SFX on DUM neuron nAChRs. (A) Current-voltage relationships of SFX evoked current amplitudes plotted as a function of steady-state holding potentials 5 min after establishing the whole-cell configuration. Values are means $\pm$ SEM. (B) Currents induced by 1 mM SFX under control condition (Ctl) and during bath application of 1 μ M Imidacloprid (IMI). The reduction by 1 μ M IMI was partially reversible after washout.

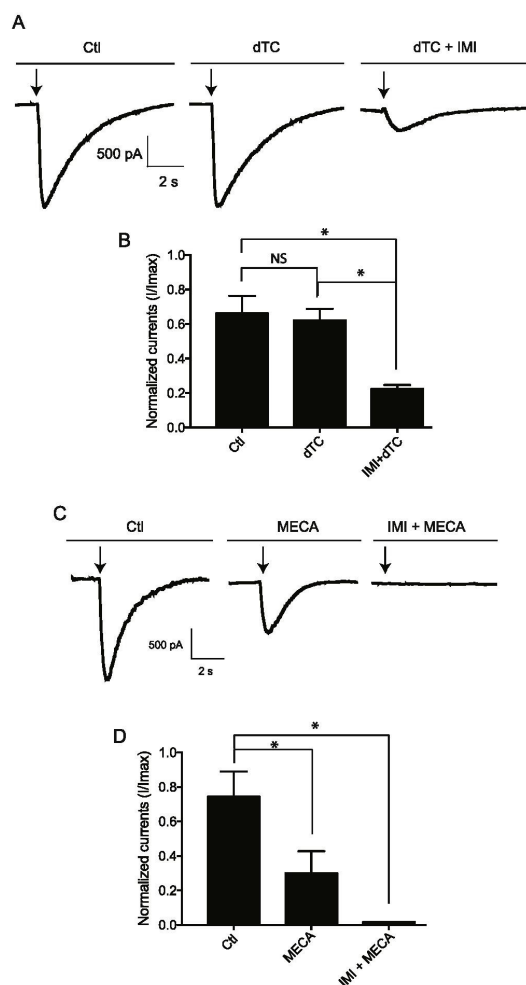


Fig. 5. Effect of SFX on α -bungarotoxin insensitive nAChR1 and nAChR2 under bath application of 1 μ M IMI. Data were recorded using the same cells. Thus, we found that (A) 20 μ M dTC has no effect on SFX-induced currents but currents are strongly reduced when we added 1 μ M imidacloprid (IMI). (B) Histograms summarize data obtained in the same conditions. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$. In each case, $n = 10$ cells. Using the same conditions, (C) bath application of 5 μ M MECA strongly reduced SFX evoked currents which were completely inhibited by under bath application of 1 μ M IMI. (D) Histograms summarize data obtained with MECA. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$. In each case, $n = 12$ cells.

IMI and 20 μ M dTC reduced currents amplitudes to -0.436 ± 0.2 nA (Fig. 5A). We suggested that it existed at least two nAChR2 subtypes, IMI-sensitive and -insensitive which were activated by SFX. Under similar conditions, when nAChR2 was blocked with 5 μ M MECA, we found a significant decrease of SFX evoked current amplitudes and currents were completely blocked when we added 1 μ M IMI in the bath (Fig. 5B). Our data demonstrated that SFX was able to activate nAChR1 subtypes. We proposed that IMI could also activate SFX evoked currents through the activation of both nAChR1 and nAChR2 subtypes.

3.3. Effect of extracellular calcium concentration on SFX evoked currents

In a second series of experiments we used a cell preparation with 9 mM Ca^{2+} . We previously demonstrated that when nAChR1 was blocked with 20 μ M dTC, increasing extracellular Ca^{2+} concentration strongly increased nicotine current amplitudes (Thany et al., 2008). We found that, when extracellular Ca^{2+} concentration was increased from 5 mM (normal saline solution) to 9 mM Ca^{2+} , SFX-induced currents were not increased: currents were -1.52 ± 0.16 nA and -1.43 ± 0.11 nA under control and 9 mM Ca^{2+} solution (data not shown). These data suggested that SFX evoked currents on DUM neuronal nAChRs were not sensitive to extracellular Ca^{2+} increase, compared to nicotine (Thany et al., 2008). Moreover, no significant effect on SFX evoked current amplitudes was found during bath application of 20 μ M dTC used to inhibit nAChR1 (currents were -1.56 ± 0.09 nA and -1.41 ± 0.08 nA, respectively). However, SFX evoked current were reduced when 1 μ M IMI was applied in the bath. Currents were reduced from -1.56 ± 0.09 to -0.47 ± 0.12 nA ($p < 0.05$, $n = 9$, Fig. 6A and B), and were not reversed after washout (data not shown). When nAChR2 was inhibited with 5 μ M MECA, SFX evoked currents were strongly reduced (currents were -0.49 ± 0.04 nA, $p < 0.05$, $n = 8$, Fig. 6C and D). In addition, when 5 μ M MECA was co-applied with 1 μ M IMI currents were completely inhibited ($p < 0.05$, $n = 8$, Fig. 6C and D). Our data confirmed that SFX was able to activate both nAChR1 and nAChR2 subtypes.

4. Discussion

The effects of the sulfoximine insecticide, SFX, on cockroach DUM neurons were tested in the present study. DUM neurons were chosen because they expressed different α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes, more precisely, α -Bgt-insensitive nAChR1 and nAChR2 which were differently sensitive to IMI (Courjaret and Lapied, 2001). Our studies provide evidence that SFX is able to activate DUM neuronal nAChRs and is a full agonist of DUM neuronal nAChRs. We also found that SFX evoked currents were not blocked by bath application of dTC but they were reduced in the presence of MECA which was known to block nAChR2 (Courjaret et al., 2003; Courjaret and Lapied, 2001). The finding that IMI blocked SFX evoked current amplitudes suggested that SFX activated both nAChR1 and nAChR2 subtypes. This finding was confirmed when SFX was tested in bath solution containing higher Ca^{2+} concentration. Indeed, we previously demonstrated that nicotine evoked current amplitudes were affected by an increase of extracellular calcium concentration when nAChR1 was blocked by dTC (Thany et al., 2008). Moreover, our data suggested that SFX was able to activate DUM

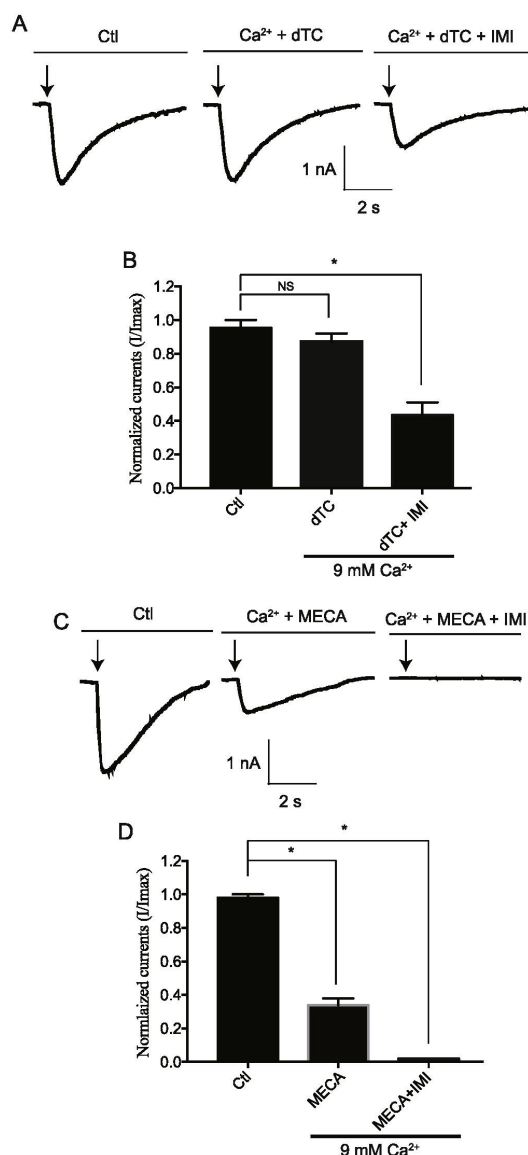


Fig. 6. Effects of SFX on α -bungarotoxin-insensitive, nAChR1 and nAChR2, under bath application of 9 mM Ca²⁺. (A) Currents induced by 1 mM SFX are not affected by 20 μ M dTC but they are reduced by bath application of 1 μ M IMI. (B) Histograms illustrating the effect of bath application of dTC and IMI. Histograms are means $\pm$ SEM of $n = 8$ cells. Data were obtained using the same cell. (C) Effect of 5 μ M MECA on SFX evoked currents. Currents are reduced under bath application of 5 μ M MECA and completely reduced when 1 μ M IMI was added in the bath. (D) Histograms represent the means $\pm$ SEM of $n = 8$ cells. * $p < 0.05$. NS: no significant.

neuronal α -Bgt-insensitive nAChRs which are sensitive to IMI but not blocked by dTC. Thus, at least more than three α -Bgt-insensitive nAChR subtypes may be sensitive to SFX. The mode of action of SFX on nAChR1 and nAChR2 subtypes may reflect their subunit combinations. Indeed, Sun et al, demonstrated that cockroach DUM neuronal α -Bgt-

insensitive nAChR1 was potentially composed of Pa α 3, Pa α 8 and Pa β 1 subunits whereas, Pa α 1, Pa α 2 and Pa β 1 may contribute to nAChR2 (Sun et al., 2017). Considering the number of subunit combinations to form functional receptors, we propose that both nAChR1 and nAChR2 subtypes could reflect the presence of several nAChR populations which are activated by SFX. Thus, nAChR1 could include only IMI-sensitive nAChR subtypes which represents low currents induced by SFX whereas nAChR2 could include nAChR2 subtypes-sensitive and -insensitive to IMI. We propose that the effect of SFX on nAChR1 may be due to this complex subunit combination. This finding was also in accordance with data demonstrating that SFX elicited higher current amplitudes on hybrid drosophila D α 2 β 2 than D α 1 β 2 receptors, expressed on *Xenopus oocytes* (Watson et al., 2011; Zhu et al., 2011). Our data also point out that SFX may interact with IMI-sensitive receptors as found by Cutler et al. who demonstrated that IMI displaced the tritiated analogue of SFX ([³H]-methyl-SFX) with a K_i value in the pM range leading to the assumption that SFX interacted specifically with the high-affinity IMI binding site present in a subpopulation of the total nAChR pool (Cutler et al., 2013) which is in accordance with previous studies demonstrating that resistance of field populations of *Nilaparvata lugens* and *Bemisia tabaci* to sulfoxaflor was significantly correlated with all neonicotinoids, including IMI (Liao et al., 2019, 2017; Longhurst et al., 2013). Here, we advance the hypothesis that the correlation between SFX and neonicotinoids might be due to the same mode of action at insect neuronal nAChRs. In final, the present work add informations to our understanding on the mode of action of SFX on insect nAChRs.

Acknowledgements

J-N Houchat and A. Cartreau received Ph.D grants from the Région Centre Val de Loire and the University of Orléans. This work was granted by the ECRIN project from the Région Pays de la Loire and ScreenRobot project from the Région Centre Val de Loire.

References

- Arndt, K.E., Bland, D.C., Irvine, N.M., Powers, S.L., Martin, T.P., McConnell, J.R., Podhorez, D.E., Renga, J.M., Ross, R., Roth, G.A., Scherzer, B.D., Toyzan, T.W., 2015. Development of a scalable process for the crop protection agent isoclast. *Org. Process Res. Dev.* 19 (3), 454–462.
- Babcock, J.M., Gerwick, C.B., Huang, J.X., Loso, M.R., Nakamura, G., Nolting, S.P., Rogers, R.B., Sparks, T.C., Thomas, J., Watson, G.B., Zhu, Y., 2011. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Manag. Sci.* 67 (3), 328–334.
- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.Y., Thany, S.H., Lapiéd, B., 2012. Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341 (2), 326–339.
- Courjaret, R., Grolleau, F., Lapiéd, B., 2003. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an α -bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* 17 (10), 2023–2034.
- Courjaret, R., Lapiéd, B., 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol. Pharmacol.* 60 (1), 80–91.
- Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A.J., Maiefisch, P., Hall, R.G., Earley, F.G., Pittner, T., Pal, S., Paul, V.L., Goodchild, J., Blacker, M., Hagmann, L., Crosswaite, A.J., 2013. Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 69 (5), 607–619.
- Ihara, M., Matsuda, K., 2018. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. *Curr. Opin. Insect Sci.* 30, 86–92.
- Lapiéd, B., Le Corrion, H., Hue, B., 1990. Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res.* 533 (1), 132–136.
- Liao, X., Jin, R., Zhang, X., Ali, E., Mao, K., Xu, P., Li, J., Wan, H., 2019. Characterization of sulfoxaflor resistance in the brown planthopper. *Nilaparvata lugens* (Stål). *O* (0).
- Liao, X., Mao, K., Ali, E., Zhang, X., Wan, H., Li, J., 2017. Temporal variability and resistance correlation of sulfoxaflor susceptibility among Chinese populations of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Crop. Prot.* 102, 141–146.
- Longhurst, C., Babcock, J.M., Denholm, I., Gorman, K., Thomas, J.D., Sparks, T.C., 2013. Cross-resistance relationships of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor with neonicotinoids and other insecticides in the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Manag. Sci.* 69 (7), 809–813.
- Salgado, V.L., 2016. Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Neurotoxicology* 56, 188–195.

- Salgado, V.L., Saar, R., 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J. Insect Physiol.* 50 (10), 867–879.
- Sparks, T.C., Watson, G.B., Loso, M.R., Geng, C., Babcock, J.M., Thomas, J.D., 2013. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107 (1), 1–7.
- Sun, H., Liu, Y., Li, J., Cang, X., Bao, H., Liu, Z., 2017. The potential subunits involved in two subtypes of alpha-Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 81, 32–40.
- Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A.K., Thany, S.H., 2018. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic. Biochem. Physiol.* (In press).
- Tan, J., Galligan, J.J., Hollingworth, R.M., 2007. Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology* 28, 829–842.
- Thany, S.H., Courjaret, R., Lapied, B., 2008. Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci. Lett.* 438 (3), 317–321.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Wang, W., Wang, S., Han, G., Du, Y., Wang, J., 2017. Lack of cross-resistance between neonicotinoids and sulfoxaflor in field strains of Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 136, 46–51.
- Watson, G.B., Loso, M.R., Babcock, J.M., Hasler, J.M., Letherer, T.J., Young, C.D., Zhu, Y., Casida, J.E., Sparks, T.C., 2011. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (7), 432–439.
- Watson, G.B., Olson, M.B., Beavers, K.W., Loso, M.R., Sparks, T.C., 2017. Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor binding site for sulfoxaflor, a new sulfoximine insecticide for the control of sap-feeding insect pests. *Pestic. Biochem. Physiol.* 143, 90–94.
- Zhu, Y., Loso, M.R., Watson, G.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B., Huang, J.X., Gerwick, B.C., Babcock, J.M., Kelley, D., Hegde, V.B., Nugent, B.M., Renga, J.M., Denholm, I., Gorman, K., DeBoer, G.J., Hasler, J., Meade, T., Thomas, J.D., 2011. Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J. Agric. Food Chem.* 59 (7), 2950–2957.

RÉSULTATS/ CHAPITRE II

Effets d'un analogue du diacylglycérol, le 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycérol (DiC8), sur les courants induits par la nicotine et la clothianidine à travers des récepteurs nicotiniques insensibles à l' α -bungarotoxine exprimés dans les neurones DUM de blatte.

I. Synthèse de l'article

Les effets agonistes des néonicotinoïdes sur les nAChRs d'insectes sont connus, mais peu d'études renvoient à leur modulation par les voies de signalisation intracellulaire. Précédemment chez la blatte *Periplaneta americana*, une régulation différente des sous-types de récepteurs nAChR1 et nAChR2 par les voies de régulation calcium-dépendante, a été démontrée (Courjaret *et al.*, 2003). nAChR1 est régulé par deux PKC, PKC1 (activatrice) dépendante du calcium, et PKC2 (inhibitrice). Quant à nAChR2, il est sensible au calcium intracellulaire et extracellulaire (Thany *et al.*, 2008). En effet, quand nAChR1 est bloqué par la d-TC, les courants nicotiques via nAChR2 augmentent avec le calcium extracellulaire mais sont réduits par la chélation du calcium avec du BAPTA (Thany *et al.*, 2008). D'autres voies calciques telles que la GMPC/PKG (Mannai *et al.*, 2016) et la CaMKII (List *et al.*, 2014) modulent les courants nicotiques à travers les nAChRs de blatte.

Fait intéressant, les effets agonistes de certains néonicotinoïdes sur les nAChRs de blatte sont également modulés par des mécanismes intracellulaires impliquant du calcium. Les effets de la CLT sont par exemple modulés par l'AMPC via les nAChRs insensibles à l' α -BGT dont nAChR1 et nAChR2 (Calas-List *et al.*, 2013), et l'inhibition d'une isoforme de la CaMKII (PaCaMKII-E) dans les neurones DUM réduit les courants induits par la CLT (List *et al.*, 2014). Au vu de cette importance des voies calciques dans la modulation des effets des néonicotinoïdes, nous nous sommes intéressés plus en détails à la modulation de nAChR1 et nAChR2 par PKC1 et PKC2 en réponse à la CLT. Nous sommes partis de l'hypothèse que les effets de la CLT sur nAChR1 et nAChR2, comme ceux de la NIC, étaient régulés par PKC1 et PKC2. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons testé les effets du 1,2-diocanoyl-*sn*-glycérol (DiC8), un analogue du DAG connu pour activer PKC2, sur les courants induits par la NIC et par la CLT.

Nos résultats avec la NIC montrent que sous un traitement constant d' α -BGT, les courants induits par la NIC à -50 mV sont réduits par 10 μ M de DiC8. La courbe courant-potentiel biphasique indique que seule la partie correspondant à nAChR1 est affectée par le DiC8, suggérant que ce dernier agit préférentiellement sur les courants nicotiques de nAChR1. Toutefois, comme la concentration extracellulaire de calcium est connue pour amplifier les courants nicotiques via nAChR2 (Thany *et al.*, 2008), nous avons testé les effets d'un passage de 5 à 9 mM de calcium

extracellulaire sur les courants induits par la NIC en présence de DiC8. Le DiC8 réduit les courants nicotiques amplifiés par une solution extracellulaire enrichie en Ca^{2+} . Des résultats similaires sont obtenus en co-appliquant le DiC8 avec de la caféine, connue pour augmenter le calcium intracellulaire. De plus, le DiC8 n'a pas d'effet sur les courants nicotiques quand ceux-ci sont réduits par le BAPTA, un chélateur d'ions calcium. Les effets du DiC8 sur les courants nicotiques sont donc dépendants du calcium. De plus, la co-application de d-TC avec le DiC8 réduit complètement les courants nicotiques, ce qui est en accord avec la courbe courant-potentiel et suggère que le DiC8 agit sur nAChR1.

Le DiC8 réduit également les courants induits par la CLT. Cependant, ni l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire, ni la caféine, ni le BAPTA, n'ont d'effet sur les courants induits par la CLT. De même, il n'y a aucun effet du calcium extracellulaire et de la caféine sur les courants déjà réduits par le DiC8. En revanche, le DiC8 réduit les courants induits par la CLT en présence de BAPTA. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que contrairement à la NIC, les effets de la CLT sur les nAChRs sont indépendants de la voie PKC. De plus, l'utilisation de d-TC et de Mec réduit complètement les courants en présence de DiC8, ce qui signifie que les effets de la CLT passent par les récepteurs insensibles à l' α -BGT nAChR1 et nAChR2.

En conclusion, nous démontrons que les effets de la NIC et d'un néonicotinoïde (la CLT) sont modulés de façon différente par une même voie de régulation intracellulaire calcium-dépendante. Les effets de la NIC dépendent de PKC1 et PKC2 et opèrent préférentiellement sur nAChR1, alors que la CLT active nAChR1 et nAChR2 de façon indépendante du calcium. Ses effets sur nAChR1 semblent passer par PKC2.

II. Article publié

Neurotoxicology 78 (2020) 143–151



Contents lists available at ScienceDirect

Neurotoxicology

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

Full Length Article

Effects of the DAG analogue 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol (DiC8) on nicotine- and clothianidin-evoked currents through α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach neurosecretory cells



Jean-Noël Houchat, Emiliane Taillebois, Steeve H. Thany*

Université d'Orléans, LBLGC USC INRA 1328, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Insect
Cockroach
Nicotinic acetylcholine receptors
DiC8
Calcium
DUM neurons

ABSTRACT

We previously demonstrated that the cockroach α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors, nAChR1 and nAChR2 subtypes, are differently sensitive to intracellular calcium pathways. Here, using whole cell patch-clamp recordings, we studied the effects of the diacylglycerol (DAG) analogue 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol (DiC8) on nicotine- and clothianidin-evoked currents under an α -bungarotoxin treatment. Our results demonstrated that DiC8 reduced nicotine and clothianidin evoked currents. 10 μ M DiC8 suppressed the increase in nicotine-induced currents which was brought about by application of 5 mM caffeine or 9 mM Ca^{2+} , whereas DiC8 did not affect the decrease in nicotine-induced currents induced by BAPTA. Similarly, bath application of caffeine or 9 mM Ca^{2+} did not change the clothianidin effects, and the amplitude of clothianidin-induced currents was not affected. However, co-application of both 10 μ M DiC8 with 9 mM Ca^{2+} , caffeine or BAPTA reduced clothianidin current amplitudes. We conclude that nicotine and clothianidin differently modulate nAChR1 and nAChR2 subtypes under DiC8 treatment, and that nicotine activates nAChR1, whereas clothianidin activates both nAChR1 and nAChR2 subtypes.

1. Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are expressed in the insect central nervous system and are the main target of neonicotinoid insecticides. They mediate fast cholinergic excitatory neurotransmission and are involved in several functions, such as learning and memory (Gauthier et al., 2006). Unfortunately, the functional properties of insect nAChRs and intracellular regulation mechanisms regulating their function are poorly understood. Most studies were performed using cockroach neurosecretory cells, the dorsal unpaired median (DUM) neurons. We demonstrated that they expressed two distinct α -bungarotoxin (α -Bgt)-insensitive nAChRs called nAChR1 and nAChR2 subtypes respectively (Courjaret et al., 2003; Courjaret and Lapied, 2001; Thany et al., 2008). The nAChR1 receptor was up- and down-regulated by two protein kinases C (PKC), PKC-1 and PKC-2, respectively (Courjaret et al., 2003). The nAChR2 subtype was regulated by both intracellular and extracellular Ca^{2+} when nAChR1 was blocked by D-tubocurarine (D-TC) (Thany et al., 2008). Indeed, when nAChR1 was blocked by D-TC under α -Bgt treatment, nicotine (NIC)-induced

responses were reduced by intracellular application of the Ca^{2+} chelator 1,2-bis-(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA), and increased when extracellular Ca^{2+} concentration was raised. Moreover, we also found that cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase (PKG) pathways modulate NIC evoked currents, because the increase in cGMP concentration affects the function of nAChR2 subtype. Thus, maintaining the guanosine triphosphate level with the guanosine triphosphate- γ -S increases NIC current amplitudes through the nAChR2 subtype. Moreover, when the expression of PaCaMKII-E in DUM neurons was blocked, NIC- and CLT-induced currents decreased. The increase in intracellular Ca^{2+} concentration induced by NIC and clothianidin (CLT) was also reduced when PaCaMKII-E was blocked (List et al., 2014). Therefore, this effect of PaCaMKII-E on NIC and CLT evoked currents was associated with a modulation of cAMP concentration.

We recently demonstrated that, like NIC, neonicotinoid insecticides, such as imidacloprid (IMI), acetamiprid (ACE) and CLT acted as agonists of nAChR1 and nAChR2 subtypes. IMI activated nAChR1 preferentially, whereas ACE and CLT activated both nAChR1 and nAChR2

* Corresponding author.

E-mail address: steeve.thany@univ-orleans.fr (S.H. Thany).<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.03.004>

Received 21 December 2019; Received in revised form 8 March 2020; Accepted 9 March 2020

Available online 10 March 2020

0161-813X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Buckingham et al., 1997; Courjaret and Lapied, 2001). CLT application on DUM neurons induced an increase in intracellular calcium concentration. At low concentrations, CLT effects were associated with an increase in cAMP concentration, whereas high CLT concentration was not affected by cAMP increase in the cells (Calas-List et al., 2013). Similarly, we demonstrated that the inhibition of the PaCaMKII-E activity of the DUM neurons reduced the CLT-evoked currents. In other studies, we found that inhibition of calcium influx through high voltage-activated calcium channels and transient receptor potential γ (TRPy), activated by both depolarization and hyperpolarization, increased nAChR2 sensitivity to ACE when nAChR1 was blocked by the nAChR antagonist, D-TC. A similar effect was found with CLT (Bodereau-Dubois et al., 2012). These results suggested that Ca^{2+} pathways may be an important factor in the modulation of insecticide effects on cockroach DUM neuron nAChRs.

In the present study, we were interested in further characterizing the involvement of calcium pathways in the modulation of α -Bgt-insensitive nAChR1 and nAChR2 subtypes, respectively. We studied the involvement of the diacylglycerol (DAG) analogue 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8) which is known as a PKC-2 activator leading to the down-regulation of nAChR1 (Courjaret et al., 2003). DAG is a lipid messenger mediating the biological effects of various neurotransmitters that is thought to act through the stimulation of PKC, leading to the modulation of ion channels and an alteration of cellular function (Nishizuka, 1992). Using the patch-clamp technique, we compared the effect of DiC8 on NIC- and CLT-induced currents through nAChR1 and nAChR2. Our results indicated that DiC8 differently modulated currents evoked by both NIC and CLT.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were performed using adult male cockroaches *P. americana* reared at 29 °C on a 12:12 h light/dark cycle.

2.2. DUM neuron isolation

DUM neuron cell bodies were isolated from the midline part of the terminal abdominal ganglia (TAG). The TAG were carefully dissected under a binocular microscope, and put into the standard extracellular solution (NaCl, 200 mM; KCl, 3.1 mM; CaCl_2 , 5 mM; MgCl_2 , 4 mM; HEPES, 10 mM; pH 7.4 adjusted with NaOH) with sucrose (50 mM). All the compounds in this solution were purchased from SIGMA Aldrich, France. The ganglia were incubated for 35 min at 29 °C in the standard saline solution supplemented with collagenase (type IA, 1.5 mg/ml, GIBCO, France). They were rinsed twice and transferred back to the saline solution supplemented with fetal calf serum (5% by volume), 50 UI/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma Aldrich, France), before being mechanically dissociated through very gentle trituration using fire-polished Pasteur pipettes. The isolated DUM neurons were allowed to settle and adhere to the poly-D-lysine hydrobromide (MW, 70,000–150,000; Sigma Aldrich, France) coating the bottom of a petri dish (35/09 mm, NEST, Grosseron, France) and incubated overnight at 29 °C. All preparations were made under semi sterile conditions i.e. all equipment was sterilized with ethanol and solutions were filtered.

2.3. Electrophysiological recordings

Signals were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under the voltage-clamp mode with an Axopatch 200B (Patch-clamp amplifier, Axon Instruments, Foster City, CA). They were digitized and acquired using a MiniDigidata 1440 analog-digital converter (Axon Instruments) and Axoscope 10.2 software (Axon Instruments). Signals were low-pass filtered at 5 kHz. The Petri dishes containing isolated cell bodies were placed onto the

inverted microscope (AE 2000, Motic), and were continuously bathed with the standard extracellular solution using a gravity perfusion system positioned within 100 μm from the cell body. In all experiments DUM neuron capacitance ranged between 200 and 250 pF to ensure reproducible current amplitudes between cells. Patch pipettes (borosilicate glass capillary tubes: GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus) were filled with a standard internal solution (K-D gluconic acid, 160 mM; K-fluoride, 10 mM; NaCl, 10 mM; MgCl_2 , 1 mM; CaCl_2 , 0.5 mM; HEPES, 20 mM; EGTA, 10 mM; ATP, 3 mM; pH 7.4 adjusted with KOH) and had resistances ranging from 1.5 to 2 M Ω when filled with internal solution. NIC (1 mM) or CLT (1 mM) were applied by pneumatic pressure ejection (15 psig, 100 ms; Miniframe, Medical System Corporation, USA). The pressure ejection was made through a glass micropipette, with resistance ranging from 1.5 to 2 M Ω , positioned in the solution within 100 μm from the isolated cell body. All agonists were purchased from Sigma Aldrich, France. Currents were recorded for bath application of 0.5 μM α -Bgt.

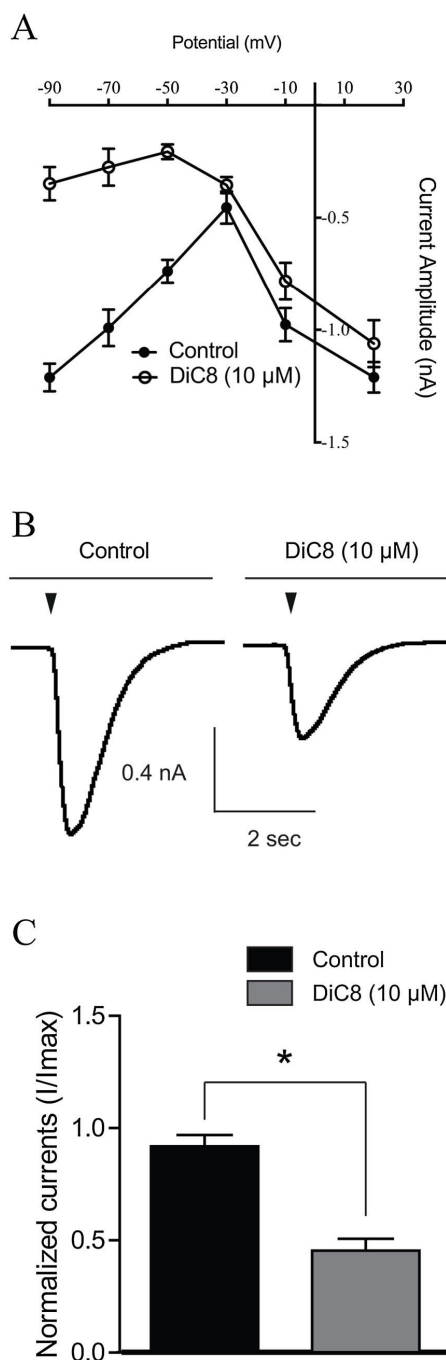
2.4. Statistical analysis

Data were analysed using the Prism program (GraphPAD Software, San Diego, CA). For all data, currents were normalized according to the maximum currents recorded under the same experimental condition (I/I_{max}). Depending on the experimental conditions, one-way ANOVAs with Bonferroni post hoc test, paired *t*-test or Wilcoxon test were employed.

3. Results

3.1. DiC8 decreases nicotine-induced currents and reduces nicotine effects after intracellular calcium increase

To determine whether DiC8 affects NIC-evoked currents through DUM neuron nAChRs, electrophysiological recordings were performed with bath application of 10 μM DiC8 and 300 ms pulse application of 1 mM NIC. The results demonstrated that DiC8 affected the first part of the biphasic current voltage curve corresponding to nAChR1 (Fig. 1A). At -50 mV holding potential (DUM neuron membrane potential), currents were reduced to 50 %, from -0.92 ± 0.05 nA to -0.49 ± 0.05 nA ($n = 12$, $p < 0.05$, Fig. 1B and C). However, because we previously demonstrated that increasing extracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) to 9 mM resulted in an increase in NIC currents through nAChR2 (Courjaret et al., 2003), we aimed to demonstrate whether NIC current was affected by DiC8 under 9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. We first demonstrated that NIC-evoked currents were increased when extracellular calcium concentration was increased from 5 mM (normal saline solution) to 9 mM, and we also confirmed that DiC8 diminished NIC current amplitudes induced by 9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Currents were increased to 41 %, from -1.02 ± 0.06 nA, under normal saline solution of 5 mM, to -1.42 ± 0.13 nA (when extracellular calcium solution was increased to 9 mM) and diminished to 80 %, from -1.02 ± 0.06 nA to -0.22 ± 0.048 nA with bath application of 10 μM DiC8 ($n = 8$, $p < 0.05$, Fig. 2A and B). Note that, when DiC8 was applied before bath application of 9 mM Ca^{2+} , NIC-evoked currents were significantly reduced to 66 %, from -0.72 ± 0.10 nA to -0.21 ± 0.10 nA ($n = 5$, $p < 0.05$, Fig. 2C). But, no change was found between cells treated with DiC8 and co-application of both 10 μM DiC8 and 9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$. NIC-evoked currents were -0.24 ± 0.09 nA ($n = 5$, $p > 0.05$, Fig. 2C). To further confirm the involvement of Ca^{2+} pathways and the DiC8 effect on NIC-induced current amplitudes, we studied the effect of DiC8 when cells were bathed in 5 mM caffeine, known to increase intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) in DUM neurons (Courjaret et al., 2003). We found that bath application of 5 mM caffeine induced a significant increase in NIC-induced current amplitudes. Currents were significantly increased to 40 %, from -0.92 ± 0.06 nA to -1.28 ± 0.16 nA ($n = 12$, $p < 0.05$, Fig. 3A and B). In addition, co-



application of 5 mM caffeine with 10 μ M DiC8 decreased NIC currents to -0.32 ± 0.14 nA compared to the control condition, representing a decrease of 65 % of the current amplitudes ($n = 8$, $p < 0.05$, Fig. 3A

Fig. 1. Effects of DiC8 on nicotine-induced currents. (A) Current-voltage relationships of NIC-induced current amplitudes plotted as a function of steady-state holding potential obtained before and during bath application of 10 μ M DiC8. (B) Examples of NIC-induced currents recorded in control conditions and during bath application of 10 μ M DiC8. Currents are recorded at -50 mV. Arrows indicate 300 ms pulse duration of 1 mM NIC. (C) Histogram illustrating the effect of 1 mM NIC under control conditions and during bath application of DiC8. Each histogram represents mean $\pm$ SEM of $n = 12$ cells. * $p < 0.05$ (paired t test).

and B). Similarly, no increase of NIC currents was found when caffeine was added after pretreatment with DiC8, NIC-evoked currents were -0.49 ± 0.14 nA and -0.39 ± 0.09 nA, under 10 μ M DiC8 and co-application of both DiC8 and caffeine ($n = 5$, $p > 0.05$, Fig. 3C). In the next experiments, we studied the effects of NIC when the calcium chelator, BAPTA was added to the patch pipette. The first part of the biphasic current voltage curve was reduced, corresponding to nAChR1 (Fig. 4A). Currents were reduced to 73 %, from -0.90 ± 0.1 nA to -0.24 ± 0.08 nA at -50 mV holding potential ($p < 0.05$, $n = 8$), but co-application of DiC8 to the extracellular solution did not induce a significant change. ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 4B and C). This result indicates that DiC8 preferentially inhibits NIC-evoked currents through nAChR1. Indeed, experiments performed in the presence of D-TC, which was known to inhibit nAChR1, demonstrated that all NIC-induced currents were completely blocked with 20 μ M D-TC (Fig. 4D).

3.2. Clothianidin effects through nAChR1 and nAChR2 are differently modulated by DiC8

Following the previous data, we proposed that DiC8 affects NIC currents through nAChR1. In the second step of the experiment we were interested in studying the effects of DiC8 on CLT evoked currents, because we previously demonstrated that CLT act on both nAChR1 and nAChR2 subtypes. Thus, we hypothesized that DiC8 could reduce CLT induced-currents as found with NIC. Fig. 5A and B show that CLT-induced currents are reduced by 10 μ M DiC8. The response evoked by pressure application of 1 mM CLT was reduced to 65 %, from -0.72 ± 0.07 nA to -0.22 ± 0.07 nA ($n = 8$, $p < 0.05$, Fig. 5A and B). This result led us to suggest that CLT currents recorded under 9 mM $[Ca^{2+}]_e$ will also be diminished by DiC8. To explore this possibility, we first compared the effect of 9 mM $[Ca^{2+}]_e$ on the CLT current amplitudes. Surprisingly, incubation of DUM neurons with 9 mM $[Ca^{2+}]_e$ did not increase CLT current amplitudes. No significant difference was found between the control and cells treated with 9 mM $[Ca^{2+}]_e$ (-0.76 ± 0.16 nA, $n = 8$, $p > 0.05$, Fig. 5C and D). In addition, it was interesting to note that despite DiC8 diminishing CLT current amplitudes, co-application of both 10 μ M DiC8 and 9 mM $[Ca^{2+}]_e$ had no significant effect on CLT-evoked currents (currents were -0.30 ± 0.08 nA, $n = 7$, $p > 0.05$, Fig. 6). We then tested whether DiC8 altered CLT-evoked currents through extracellular or intracellular Ca^{2+} variation, using caffeine and BAPTA. Cells were first treated with 5 mM caffeine in the extracellular solution. We did not find any significant effect on CLT-evoked currents (-0.60 ± 0.14 nA, $n = 8$, $p > 0.05$, Fig. 7A and B), but co-application of caffeine and DiC8 reduced CLT current amplitudes (-0.21 ± 0.04 nA, $n = 8$, $p < 0.05$, Fig. 7A and B). Similar effect of DiC8 was found when it was added before caffeine. CLT-induced currents were reduced to 66 %, from -0.71 ± 0.14 nA to -0.24 ± 0.09 nA ($n = 4$, $p < 0.05$, Fig. 7C and D) and no significant difference was observed between cells treated with DiC8 and co-application of both DiC8 and caffeine (-0.12 ± 0.05 nA, $n = 4$, $p > 0.05$, Fig. 7C and D). Subsequent analyses conducted with BAPTA demonstrated that it has no significant effect on CLT-evoked currents (-0.66 ± 0.15 nA, $n = 8$, $p > 0.05$), but co-application of both BAPTA and DiC8 resulted in a significant reduction in CLT current amplitudes (-0.37 ± 0.08 nA, $n = 8$, $p < 0.05$, Fig. 8). To ensure that DiC8 effects on CLT-evoked currents

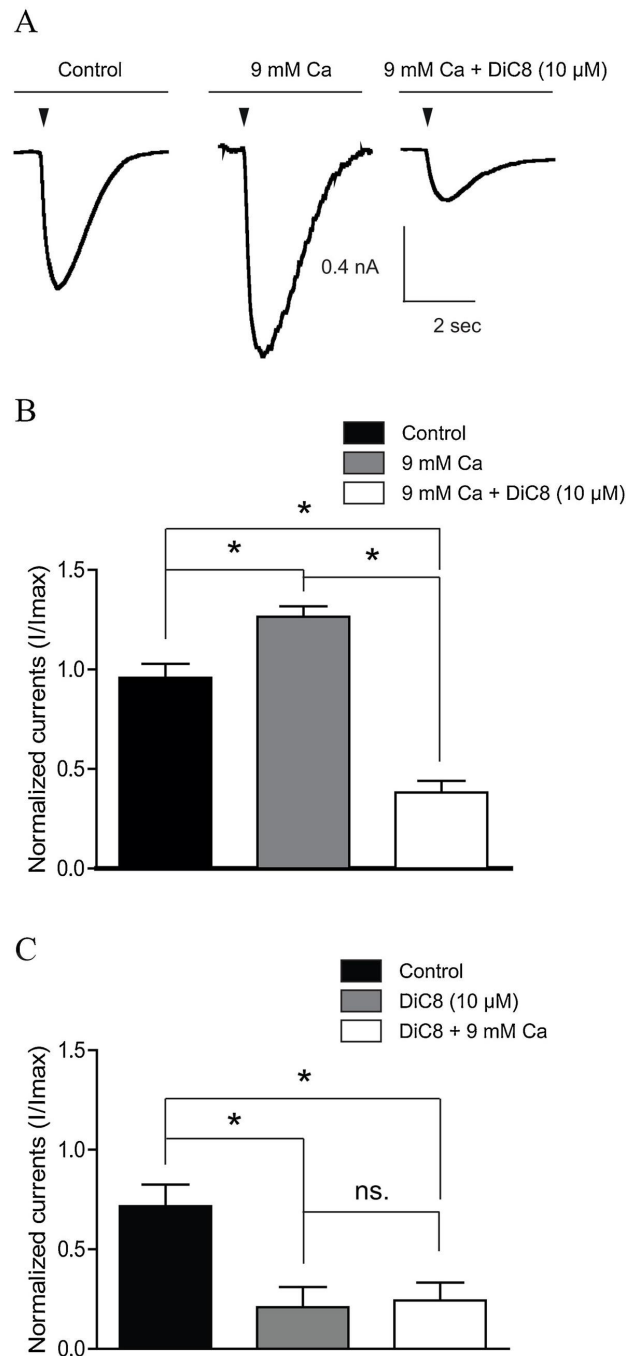


Fig. 2. Effect of 10 μ M DiC8 and 9 mM Ca^{2+} on NIC-induced currents. (A) Examples of NIC-induced currents under control condition, bath application of 9 mM extracellular Ca^{2+} and co-application of both 9 mM Ca^{2+} and 10 μ M DiC8. Currents are recorded at -50 mV holding potential. Arrows indicate pulse application (300 ms) of 1 mM NIC. (B) Histograms illustrating the effects of 1 mM NIC under control condition, bath application of 9 mM Ca^{2+} and co-application of 10 μ M DiC89 and 9 mM Ca^{2+} . Each histogram represents mean $\pm$ SEM of $n = 8$ cells. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

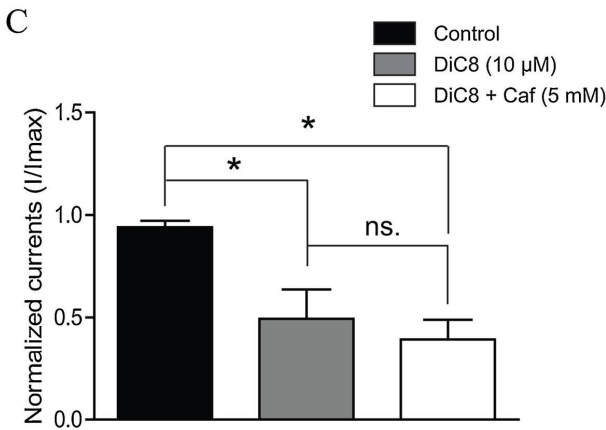
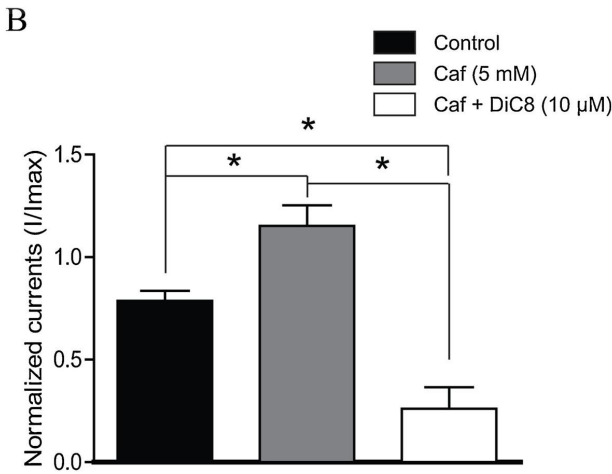
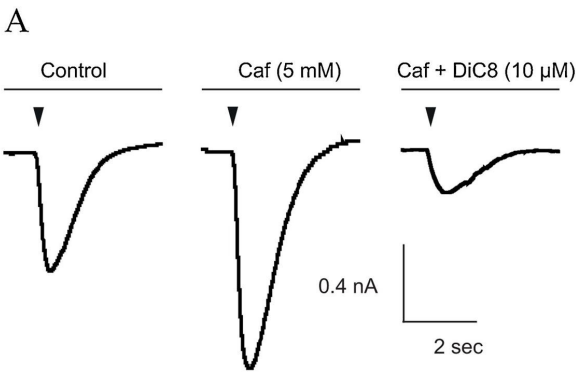


Fig. 3. Effects of DiC8 and caffeine on NIC currents. (A) NIC-induced currents under control condition and bath application of 5 mM caffeine (Caf) and co-application of both 5 mM Caf and 10 μM DiC8. Currents are recorded at −50 mV holding potential. Arrows indicate pulse application (300 ms) of 1 mM NIC. (B) Histograms illustrating the effects of 5 mM caffeine and bath application of both 5 mM caffeine and 10 μM DiC8, on NIC-evoked currents. Each histogram represents mean ± SEM of *n* = 12 cells. * *p* < 0.05 (One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test). (C) cells were treated with 10 μM DiC8 before bath application of both 10 μM DiC8 and 5 mM caffeine (Caf). Histograms represent mean ± SEM of *n* = 5 cells. * *p* < 0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

involved nAChR1 and nAChR2 subtypes, we tested the nicotinic antagonists mecamylamine and *α*-TC. For bath application of 10 μM DiC8, CLT-evoked currents were completely blocked by both 5 μM Mec and 20 μM *α*-TC (*N* = 8, *p* < 0.05, Fig. 9), confirming that these receptors

are associated with CLT-induced currents.

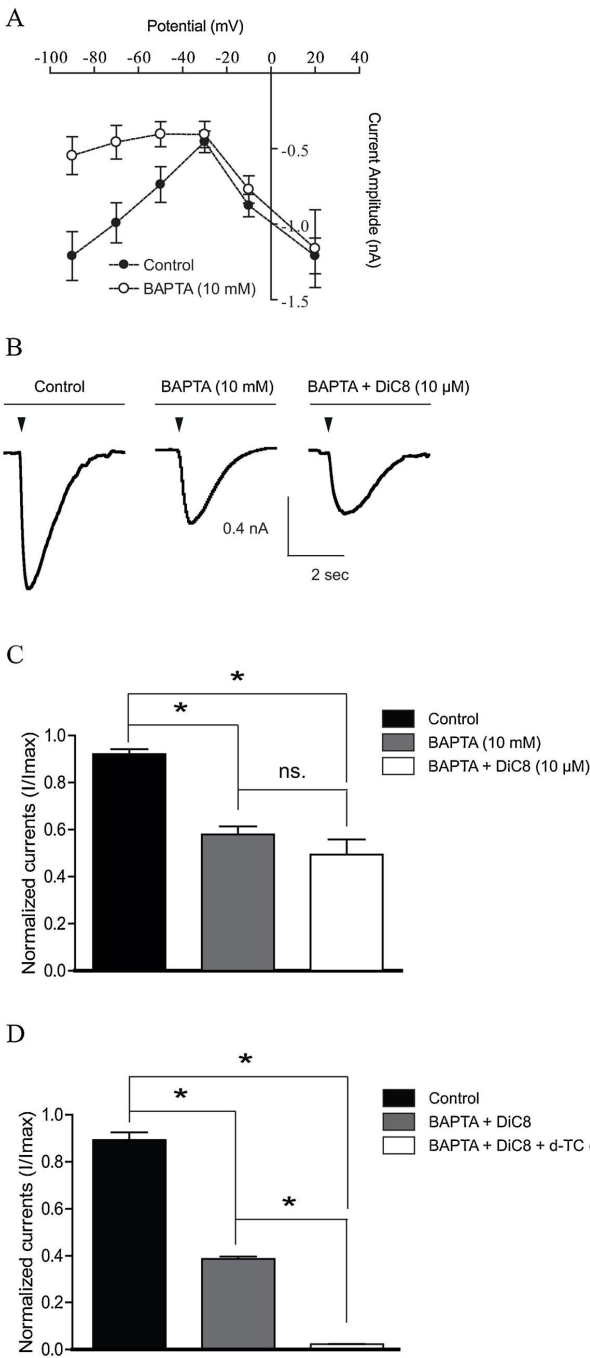


Fig. 4. Effects of NIC in the presence of BAPTA and DiC8. (A) Current-voltage curve relationships of NIC-induced currents obtained before and during patch pipette application of 10 mM BAPTA. Each point represents mean $\pm$ SEM of $n = 12$ cells. (B) Currents induced by NIC in control condition and with 10 mM BAPTA and co-application of both 10 mM BAPTA and 10 μ M DiC8. Currents are recorded at -50 mV. Arrows indicate pulse application of 1 mM NIC (300 ms). (C) Histograms illustrating the effect of 1 mM NIC under control conditions and during bath application of 10 mM BAPTA and 10 μ M DiC8. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 12$ cells. * $p < 0.05$. (D) Histograms illustrate the effects of 1 mM NIC in the presence of co-application of both 10 mM BAPTA and 10 μ M DiC8. In the presence of 20 μ M TC in the extracellular solution, NIC-evoked are completely blocked. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 10$ cells. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

4. Discussion

This study aimed to further investigate and compare the role of DiC8 in the modulation of NIC and CLT-evoked currents through α -Bgt-

insensitive nAChR1 and nAChR2 subtypes. The key finding is that DiC8 reduces NIC-evoked currents through the α -Bgt-insensitive nAChR1 subtype, whereas it affects CLT currents through both nAChR1 and nAChR2 subtypes. The results obtained with NIC converged with the

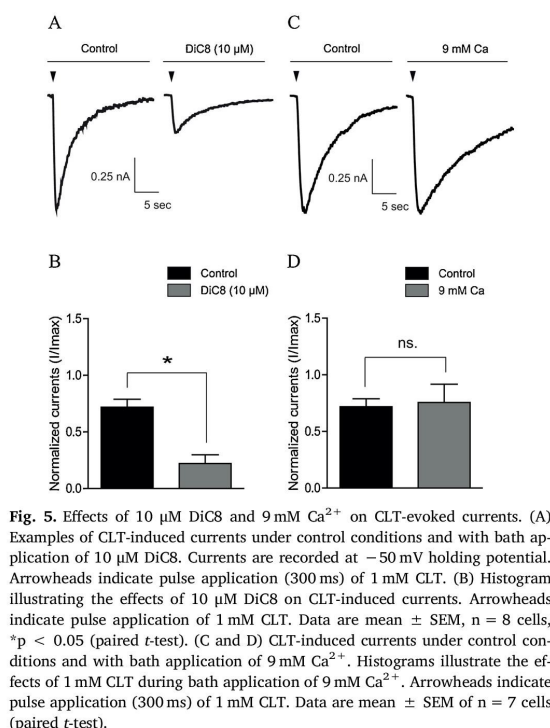


Fig. 5. Effects of 10 μM DiC8 and 9 mM Ca^{2+} on CLT-evoked currents. (A) Examples of CLT-induced currents under control conditions and with bath application of 10 μM DiC8. Currents are recorded at -50 mV holding potential. Arrowheads indicate pulse application (300 ms) of 1 mM CLT. (B) Histogram illustrating the effects of 10 μM DiC8 on CLT-induced currents. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM CLT. Data are mean $\pm$ SEM, $n = 8$ cells, $*p < 0.05$ (paired t -test). (C and D) CLT-induced currents under control conditions and with bath application of 9 mM Ca^{2+} . Histograms illustrate the effects of 1 mM CLT during bath application of 9 mM Ca^{2+} . Arrowheads indicate pulse application (300 ms) of 1 mM CLT. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 7$ cells (paired t -test).

first observations demonstrating that nAChR1 and nAChR2 were regulated by different calcium-dependent intracellular messengers. Indeed, it was first found that the PKC activator DiC8 reduced NIC currents and only affected the first part of the biphasic current voltage curve corresponding to the activation of nAChR1 (Courjaret et al., 2003). We confirmed these previous data and found that the NIC effect could be sensitive to extracellular Ca^{2+} changes, because DiC8 reduced the increase in NIC currents after bath application of caffeine and 9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, and had no effect on NIC evoked currents under BAPTA application. Note that, when DiC8 was applied before caffeine or 9 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, it diminished NIC currents. Moreover, despite the fact that DiC8 was able to reduce CLT current amplitudes, interestingly, the increase or decrease in Ca^{2+} induced by caffeine and BAPTA had no effect on CLT-evoked currents. We hypothesized that the CLT effect did not involve a strong increase in intracellular Ca^{2+} or that at this concentration, CLT application induced its maximum effect. Indeed, we recently demonstrated that at higher CLT concentration, increasing cAMP concentration in the DUM neurons did not cause an increase in CLT-evoked current amplitudes. A significant effect of cAMP modulation was found with lower CLT concentrations (Calas-List et al., 2013). Thus, in the present study, it was possible to suggest that CLT activated intracellular calcium increase as demonstrated by Calas-List et al. (2013). Ca^{2+} increase through caffeine application was not necessary in order to increase the effect, and BAPTA application was not able to induce a significant decrease in CLT currents. On the other hand, Ca^{2+} increase through nAChR activation was sufficient enough to induce a strong effect. In all cases, these data demonstrated that either intracellular calcium pathways differently regulated NIC- and CLT-evoked currents, or that CLT may activate different intracellular calcium pathways. This hypothesis is consistent with previous studies demonstrating that nAChR calcium permeability is involved in various neuronal modulatory pathways. For instance, in rats, the calcium influx

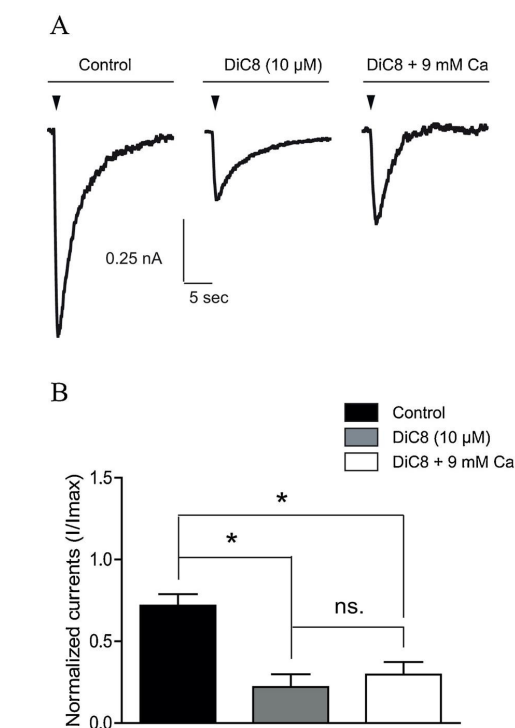
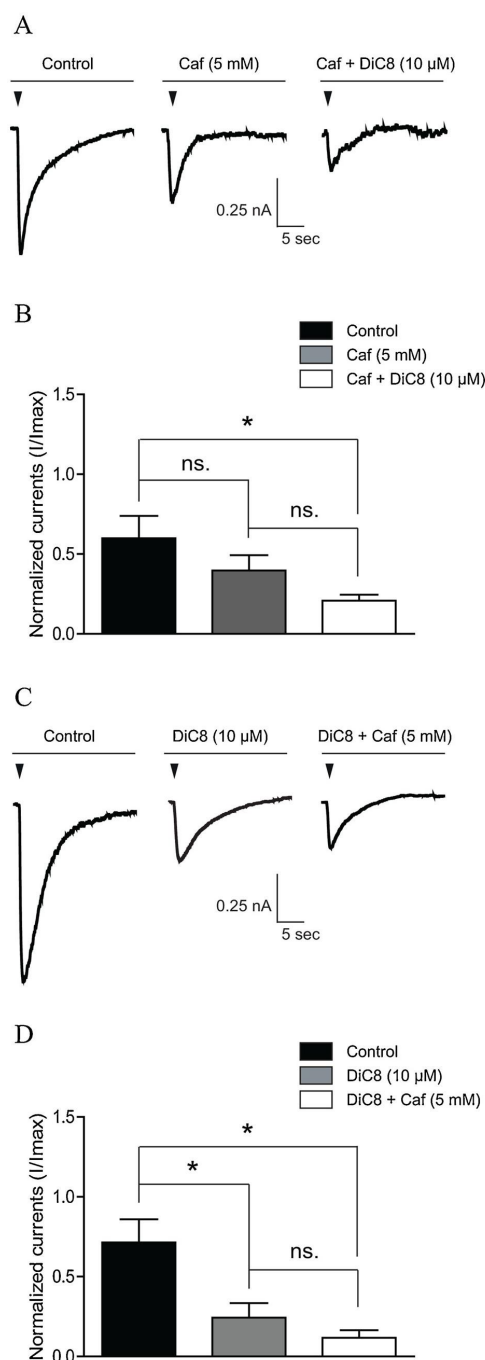


Fig. 6. Effect of 1 mM CLT during bath application of 10 μM DiC8 and co-application of both DiC8 and 9 mM Ca^{2+} . (A) Example of currents induced by 1 mM CLT under control conditions, bath application of 10 μM DiC8 and co-application of 10 μM DiC8 and 9 mM Ca^{2+} . Currents are recorded at -50 mV holding potential. Arrowheads indicate pulse application (300 ms) of 1 mM CLT. (B) Histogram illustrating CLT-induced currents under control conditions, bath application of DiC8 and co-application of both DiC8 and 9 mM Ca^{2+} . Data are mean $\pm$ SEM of $n = 8$ cells. $*p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

associated with nAChR activation was able to modulate Ca^{2+} -dependent ion channels and to modify the excitability of parasympathetic neurons (Adams and Nutter, 1992).

The effects of DiC8 and Ca^{2+} changes on CLT-induced currents suggested that PKC pathways were needed, but not in the same way. Moreover, according to previous data, these results led us to suppose that only PKC-2 was linked to the modulation of CLT-evoked currents through α -Bgt-insensitive nAChRs. This made sense because it was found that low muscarine concentration elevated internal calcium levels, which activated PKC1, whereas high muscarine concentration strongly increased intracellular Ca^{2+} concentration which induced the inhibition of nAChR1 (Courjaret et al., 2003). Consequently, PKC pathways seemed to modulate CLT effects in a calcium-independent manner. This did not mean that Ca^{2+} was not linked to the modulation of CLT responses, because other pathways could associate calcium/calmodulin-dependent messengers. This supposition was consistent with our previous data showing that other mechanisms could be associated with this complex mechanism. We demonstrated that cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase (PKG) pathway modulates NIC-induced currents (Mannai et al., 2016). Thus, it was conceivable that complex interactions between cAMP and cGMP pathways occur, leading to the regulation of the NIC and neonicotinoid effects on cockroach DUM neuron nAChR subtypes.

Finally, all our studies pave the ways in the intracellular regulation



mechanisms of insect nAChRs, and have demonstrated that NIC and neonicotinoid insecticides could be differently modulated by intracellular calcium pathways.

Fig. 7. Effects of DiC8 and caffeine on CLT-induced currents. (A) Examples of currents induced by 1 mM CLT under control conditions, bath application of 5 mM caffeine (Caf) and co-application of both 5 mM caffeine and 10 μM DiC8. (B) Histogram illustrating CLT-induced currents under control conditions bath application of Caf and co-application of both Caf and DiC8. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 8$ cells, $*p < 0.05$ (one way ANOVA with Bonferroni post-hoc test). (C and D) 10 μM DiC8 was applied before 5 mM caffeine (Caf). DiC8 decreases CLT-evoked currents and no significant effect was found when we added 5 mM Caf in the bath. Histogram represents mean $\pm$ SEM of $n = 4$ cells. $*p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

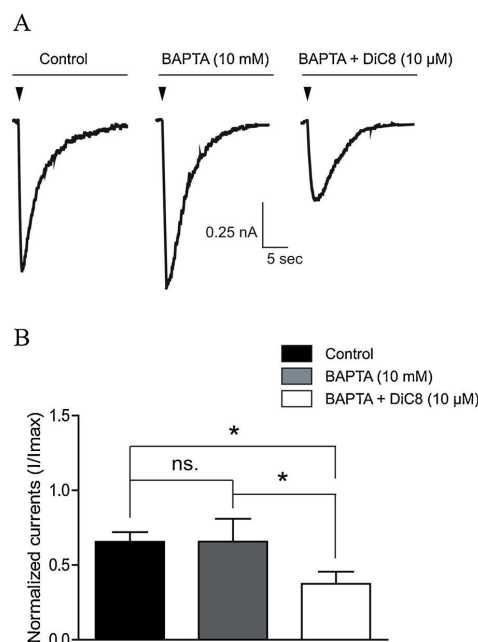


Fig. 8. Effects of DiC8 and BAPTA on CLT-induced currents. (A) Examples of currents induced by 1 mM CLT under control conditions, patch pipette application of 10 mM BAPTA and co-application of both 10 mM BAPTA and 10 μM DiC8. Arrowheads indicate pulse application (300 ms) of 1 mM CLT. (B) Histogram illustrating CLT-induced currents under control conditions, application of BAPTA and co-application of both BAPTA and DiC8. Data are mean $\pm$ SEM of $n = 8$ cells, $*p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

CRedit authorship contribution statement

Jean-Noël Houchat: Investigation, Writing - original draft. **Emiliane Taillebois:** Methodology, Writing - original draft. **Steeve H. Thany:** Supervision, Funding acquisition, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Région Centre Val de Loire, APR IA 'ScreenRobot' project. J.-N. Houchat received a pH.D grant from the University of Orléans.

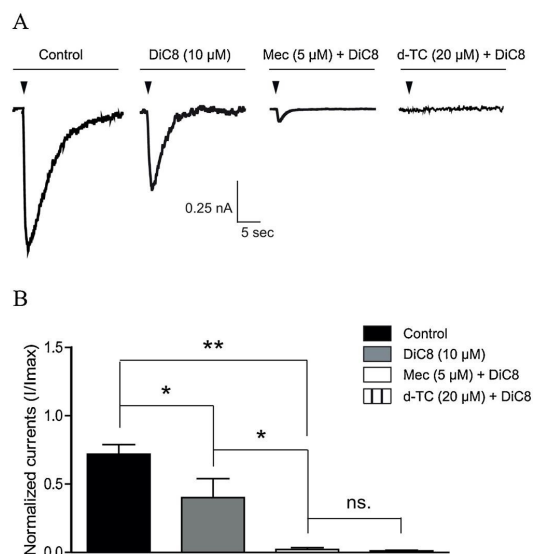


Fig. 9. Effects of mecamlamine and D-tubocurarine on CLT-induced currents, under bath application of DiC8. (A) Currents induced by 1 mM CLT during bath application of 10 μM DiC8 are diminished by 5 μM mecamlamine (Mec) and completely blocked by 20 μM D-tubocurarine (D-TC). Currents are recorded at −50 mV holding potential. Arrowheads indicate pulse application (300 ms) of 1 mM CLT. (B). Histograms summarize the effects of each compound. Data are mean ± SEM of n = 8 cells. *p < 0.05 (Wilcoxon test).

References

Adams, D.J., Nutter, T.J., 1992. Calcium permeability and modulation of nicotinic

- acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J. Physiol. Paris* 86 (1–3), 67–76.
- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.Y., Thany, S.H., Lapied, B., 2012. Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341 (2), 326–339.
- Buckingham, S., Lapied, B., Corrion, H., Sattelle, F., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200 (Pt 21), 2685–2692.
- Calas-List, D., List, O., Quinchard, S., Thany, S.H., 2013. Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of alpha-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology* 37, 127–133.
- Courjaret, R., Lapied, B., 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol. Pharmacol.* 60 (1), 80–91.
- Courjaret, R., Grolleau, F., Lapied, B., 2003. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* 17 (10), 2023–2034.
- Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S.H., Niggebrugge, C., Deglise, P., Kljucic, P., Armengaud, C., Grunewald, B., 2006. Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 86 (2), 164–174.
- List, O., Calas-List, D., Taillebois, E., Juchaux, M., Heuland, E., Thany, S.H., 2014. Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J. Neurochem.* 130 (4), 507–513.
- Mannai, S., Bitri, L., Thany, S.H., 2016. cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway modulates nicotine-induced currents through the activation of alpha-bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors from insect neurosecretory cells. *J. Neurochem.* 137 (6), 931–938.
- Nishizuka, Y., 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258 (5082), 607–614.
- Thany, S.H., Courjaret, R., Lapied, B., 2008. Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci. Lett.* 438 (3), 317–321.

RÉSULTATS/ CHAPITRE III

Identification de CaMKK/AMPK comme une voie intracellulaire calcium-dépendante régulant les courants nicotiniques.

I. Synthèse de l'article

Les nAChRs d'insectes sont intéressants car ils sont impliqués dans la transmission cholinergique rapide et sont la cible des insecticides néonicotinoïdes. Or, peu d'études portent sur les mécanismes intracellulaires qui régulent les nAChRs. Précédemment, des voies de régulation calcium-dépendante des nAChRs ont été mises en évidence dans les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. Notamment, l'AMPc module les effets de la CLT à travers les nAChRs sensibles et insensibles à l' α -BGT (Calas-List *et al.*, 2013) et la CaMKII régule les effets de la NIC à travers les récepteurs sensibles et insensibles à l' α -BGT (List *et al.*, 2014). Ici, nous nous sommes intéressés plus en détail à l'implication des voies dépendantes de la CaM dans la régulation des nAChRs de blatte. Par des approches de patch-clamp et d'imagerie calcique au fura-2-AM, nous avons testé différents antagonistes et activateurs spécifiques de la CaM et des CaMK.

Tout d'abord, les isoformes de la CaM ont été clonées chez la blatte, et leur expression dans plusieurs tissus a été étudiée. Une seule isoforme est exprimée dans les neurones DUM. L'application d'un inhibiteur spécifique de la CaM, le W13, réduit les courants nicotiques, suggérant que cette isoforme est bien impliquée dans la régulation des nAChRs. L'application de calmidazolium, un inhibiteur de la PDE CaM-dépendante, réduit les courants nicotiques. Les effets du Cdz ne sont pas affectés par l' α -BGT. Ces résultats suggèrent que les effets de la PDE passent par les nAChRs sensibles à l' α -BGT. Mais, la co-application de Cdz avec la d-TC ou la Mec réduit les courants, montrant que nAChR1 et nAChR2 sont également régulés par la PDE.

L'application d' α -BGT sur les neurones DUM réduit fortement l'influx de calcium induit par l'activation des nAChRs par la NIC. Ce résultat suggère donc que l'entrée de calcium dans la cellule dépend principalement des nAChRs sensibles à l' α -BGT. Le Cdz réduit également l'influx de calcium induit par la NIC, et cet effet est identique en présence et en absence d' α -BGT. Par conséquent, le complexe Ca/CaM activerait la PDE qui diminuerait les niveaux d'AMPc activant une PKA et conduirait à la sur-régulation de nAChR1 et nAChR2.

L'application d'un inhibiteur de CaMKK, le STO-609, réduit les courants nicotiques. L' α -BGT co-appliquée avec le STO-609, réduit ces courants, suggérant que les effets du STO-609 passent par les nAChRs insensibles à l' α -BGT. De plus, les inhibitions combinées de la CaMKK par le STO-609 et

de la CaMKII par le KN93 bloquent complètement les courants nicotiniques. Nous confirmons donc que la CaMKII régule les courants nicotiniques. La co-application de STO-609 avec de la d-TC ou de la Mec a été testée. Les résultats indiquent que la d-TC n'induit pas de blocage complet des courants, contrairement à la Mec, démontrant ainsi que nAChR2 est associé à la voie CaMKK. Pour aller plus loin dans la caractérisation de cette voie, nous avons testé les effets d'une protéine-cible de la CaMKK, l'AMPK, sur la modulation des courants nicotiniques. L'utilisation de dorsomorphine (DM) permet d'inhiber l'AMPK. Cette inhibition provoque la réduction des courants nicotiniques. De plus, les effets de la DM sont contrebalancés par la co-application d'un activateur d'AMPK, le A-76. En effet, les courants nicotiniques sont maintenus dans le temps par l'AMPK, malgré la présence de DM. Pour vérifier que l'AMPK est bien la cible de CaMKK dans ce mécanisme, nous avons testé les effets d'une co-application de STO-609 et de A-76. De même façon qu'avec la DM, la réduction des courants nicotiniques par le STO-609 est contrebalancée par le A-76.

Le STO-609 provoque à lui seul une forte augmentation de la concentration en calcium, avant-même la stimulation des neurones par la NIC. Ces effets sont identiques en présence et en absence d' α -BGT. Nous faisons l'hypothèse que cette augmentation en calcium intracellulaire est liée à un déstockage par les compartiments intracellulaires.

En conclusion, nous montrons que la PDE peut également moduler les effets de la NIC à travers les nAChRs sensibles à l' α -BGT, et nous mettons en évidence le rôle d'une nouvelle voie, la voie CaMKK/AMPK, dans la régulation des courants nicotiniques.

II. Article non publié

The effects of nicotine-evoked currents on insect neurosecretory cells are differentially blocked by calmidazolium and STO-609

Jean-Noël Houchat, Emiliane Taillebois, Steeve H. Thany

LBLGC USC-INRAE 1328, Université d'Orléans, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France

*Corresponding author : Steeve H. Thany (steeve.thany@univ-orleans.fr)

Abstract

Insect nicotinic neuronal acetylcholine receptors (nAChRs) are involved in learning and memory and are the major targets of neonicotinoid insecticides. To explore the intracellular mechanisms leading to the regulation of insect neuronal nAChRs, we used insect neurosecretory cells called dorsal unpaired median (DUM) neurons. Using whole cell patch-clamp and fura-2-AM calcium imaging methods, we found that compared to our previous studies, nicotine-activated inward currents were also reduced by the phosphodiesterase (PDE) antagonist, calmidazolium (Cdz), through α -bungarotoxin (α -BGT)-sensitive neuronal nAChRs. Cdz effects were associated to the inhibition of Ca^{2+} increase induced by 1 mM nicotine. Because 0.5 μM α -BGT strongly inhibited intracellular Ca^{2+} increase, we suggested that major effect of nicotine on Ca^{2+} increase occurs through homomeric receptors. In addition to the CaM/PaCaMKII-E pathway previously identified, we found that a distinct CaMKK/AMPK pathway also regulates nAChRs. The CaMKK selective inhibitor, STO-609, reduced nicotinic currents amplitude through α -BGT-insensitive nAChRs. Interestingly, intracellular application of A-76 prevented the reduction of nicotine-induced currents observed in the presence of dorsomorphin (DM) and STO-609. In addition, compared to Cdz treatment, STO-609 induced a strong intracellular calcium increase which was not blocked with α -BGT. These findings provide insight into potential complex mechanisms linked to the modulation of insect nAChR subtypes.

1. Introduction

Insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are of major interest because they are involved in rapid neurotransmission and are the main targets of neonicotinoid insecticides. Unfortunately, the mechanisms leading to the intracellular modulation of insect nAChRs, through Ca^{2+} pathways, are poorly understood. Indeed, calcium (Ca^{2+}) plays a key role in the development and plasticity of the nervous system (Berridge et al., 2000; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004; Evans & Zamponi, 2006; Iftinca & Zamponi, 2009). Various Ca^{2+} -dependent proteins may be involved in the mechanisms underlying Ca^{2+} pathways, including calmodulin (CaM), which serves as a Ca^{2+} signal transducer (Berridge et al., 2000; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004). CaM is a ubiquitous Ca^{2+} -binding protein that has been implicated in the Ca^{2+} -dependent regulation of a plethora of cell processes reflecting the need for widespread and varied responses to fluctuations in Ca^{2+} levels. Moreover, Ca^{2+} is involved in neurotransmitter release (Kostyuk, 2007). Especially, the activation of nAChRs by acetylcholine (ACh), or agonists induced an increase in intracellular Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reflecting Ca^{2+} entry in the cell through nAChR pores. For example, in locust Kenyon cells, it was found that ACh induced an increase in Ca^{2+} concentration which triggers nitric oxide production through Ca^{2+} -CaM-dependent activation (Bicker, 1996).

Recent electrophysiological studies performed on insect neurosecretory cells provided evidence that Ca^{2+} /CaM-dependent pathways were involved in the regulation of nicotine-induced currents. Two major hypotheses were first admitted through the activation of two α -bungarotoxin (α -BGT)-insensitive neuronal nAChR subtypes, nAChR1 and nAChR2 respectively. nAChR1 subtype was sensitive to the regulation by two distinct PKC and CaM activation. The CaM inhibitor W7 completely blocked the increase in nicotine-induced

currents through the adenylyl cyclase activator, forskolin, suggesting that the Ca^{2+} /CaM complex was a major factor accounting for the regulation of the cAMP level induced by stimulation of adenylyl cyclase (Courjaret & Lapied, 2001). Similar regulating mechanisms were also found using the neonicotinoid insecticide, clothianidin (CLT). At high and low CLT concentration, cAMP also modulated ionic currents through α -bungarotoxin (α -BGT)-sensitive and -insensitive nAChRs, respectively (Calas-List et al., 2013). Previously, we demonstrated that cockroach nervous system encoded five CaMKII isoforms which were highly expressed in the nerve cord, muscle, gut, head, accessory glands and thoracic ganglia. Their sequences were identical to one another, except for the presence of two peptides of 21 amino acids (Taillebois et al., 2013). Our results were consistent with data from *Drosophila melanogaster*, in which nine isoforms were found (GuptaRoy et al., 1996; GuptaRoy & Griffith, 1996; Hoskins et al., 2007; Ohsako et al., 1993; Sun et al., 2017). Interestingly, we found that only the CaMKII-E isoform was expressed in the DUM neurons (Taillebois et al., 2013), and was involved in the intracellular regulation of DUM nAChR α -bungarotoxin (α -BGT)-insensitive nAChRs (List et al., 2014). Inhibition of PaCaMKII-E using antisense oligonucleotides reduced nicotine-evoked current amplitudes, confirming that Ca^{2+} -CaM/CaMKII pathway was involved in the modulation of nicotine and clothianidin currents on DUM neurons (List et al., 2014).

In the present study, we found that only one CaM isoform was expressed in the DUM neurons. Its inhibition using the CaM inhibitor W13 reduced nicotine current amplitude. Additional electrophysiological experiments using PDE/cAMP, PaCaMKII-E and CaMKK/AMPK inhibitors and Ca^{2+} imaging were performed, and demonstrated an involvement of these pathways in the regulation of nicotine currents.

2. Results

2.1. Calmidazolium affects nicotine-induced currents and calcium influx through α -bungarotoxin-sensitive nAChRs

The involvement of CaM in the modulation of nicotine-induced currents, through α -BGT-insensitive nAChRs, on insect neurosecretory cells was previously described using the calmodulin antagonist, W7 (Courjaret & Lapied, 2001) which is known to inhibit Ca^{2+} -calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE). To further identify the pathways involved from the Ca^{2+} -CaM complex, we first confirmed the presence of one isoform of calmodulin in the DUM neurons (Figure 1, supplementary data). The membrane-permeable CaM inhibitor, such as the naphthalenesulfonamide derivative W13 produced similar decrease of nicotine evoked currents. Bath application of 500 μM W13 reduced nicotine-induced currents from -0.73 ± 0.04 nA to -0.28 ± 0.07 nA ($n = 12$, $p < 0.05$, figure 1). Single cell RT-PCR analysis of DUM neurons after patch clamp recordings revealed that only one CaM isoform was expressed in the cells (Figure 1). To examine the involvement of Ca^{2+} -CaM resulting to PDE activation, we used calmidazolium (CdZ) which is a specific inhibitor of CaM-regulated enzymes such as PDE (Figure 2A). At a -50 mV holding potential (DUM neurons membrane potential), 5 min bath application of 15 μM CdZ resulted in the reduction of nicotine-evoked currents from -1.00 ± 0.08 nA to -0.32 ± 0.06 nA ($n = 10$, $p < 0.05$, figure 2B). In accordance with previous studies, we proposed that CdZ could affect nicotine-evoked currents through α -BGT-sensitive receptors. We therefore co-applied both 0.5 μM α -BGT and 15 μM CdZ in the bath and found that nicotine currents were not affected as currents were reduced to -0.37 ± 0.10 nA ($n = 7$, $p < 0.05$, figure 2B and C). We hypothesized that CdZ inhibited PDE resulting to a blocking of α -BGT-insensitive receptors. Indeed, no significant differences were found between CdZ and co-

application of Cd²⁺ with α -BGT (current amplitudes were reduced to -0.20 ± 0.06 nA, $n = 8$, $p < 0.05$, data not shown). Because all currents were measured at -50 mV holding potential, we therefore measured nicotine-induced currents at both -70 mV (corresponding to nAChR1) and -10 mV (corresponding to nAChR2), in the presence of Cd²⁺. The current-voltage curve is presented in Figure 2D. At -70 mV, the mean amplitude of nicotine-induced currents in control condition was similar to the amplitude observed in the previous report (Courjaret & Lapied, 2001) and no significant effect of Cd²⁺ was observed. The mean amplitude was -0.80 ± 0.10 nA in control condition and remained -0.85 ± 0.15 nA under Cd²⁺ treatment ($n = 7$, Figure 2D). At -50 mV, current amplitudes in control condition were also similar to previous observations (-0.34 ± 0.09 nA, $n = 6$, Figure 2D) and remained -0.20 ± 0.06 nA in the presence of Cd²⁺ ($n = 8$, Figure 2D). Because nAChR1 and nAChR2 are sensitive to distinct nAChR antagonists (Courjaret & Lapied, 2001), our second approach consisted in using d-tubocurarine (d-TC) and mecamylamine (Mec) to block nAChR1 and nAChR2, respectively. Bath application of $20 \mu\text{M}$ d-TC significantly decreased nicotine-induced currents to -0.07 ± 0.01 nA ($n = 6$, $p < 0.05$, Figure 3A and B). In the same conditions, currents were completely inhibited by $5 \mu\text{M}$ Mec ($n = 7$, $p < 0.05$, Figure 3A and B), suggesting that nAChR1 and nAChR2 subtypes are involved in nicotine effect.

In recent studies, we demonstrated that nicotine application induced an ionic current which was associated with an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Here, we suggested that Cd²⁺ in similar way could reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ through α -BGT-insensitive nAChR1 and nAChR2, respectively. We found that in control condition, there was a strong and fast increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the cytosol induced by the activation of nAChR immediately after pressure ejection of 1 mM NIC. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was raised to more than twice more with a peak of 132.04 ± 18.52 ($n = 17$, figure 3C and D) then progressively returned to basal levels. Interestingly, bath application of $0.5 \mu\text{M}$ α -BGT strongly

reduced the $[Ca^{2+}]_i$, demonstrating major increase of intracellular Ca^{2+} was associated to entry through α -BGT-sensitive nAChR subtypes. $\Delta R/R_0$ was reduced to 5.52 ± 2.58 ($n = 6$, $p < 0.05$, figure 3). Moreover, we observed that CdZ (14.52 ± 7.82 , $n = 5$, figure 3C and D) also significantly reduced the increase of intracellular Ca^{2+} induced by 1 mM nicotine which was not affected by the addition of 0.5 μ M α -BGT in the bath (17.41 ± 7.65 , $n = 5$, figure 3C and D). We hypothesized that CdZ affected intracellular Ca^{2+} increase induced by 1 mM nicotine through α -BGT-insensitive receptors. To demonstrate this hypothesis, DUM neurons were bathed with CdZ under 0.5 μ M α -BGT. No significant difference was found with α -BGT applied alone (14.52 ± 7.82 , $n = 6$, figure 4A and B) but, when we added d-TC (7.66 ± 2.86 , $n = 6$, figure 4) or Mec (1.27 ± 1.72 , $n = 4$, figure 4), significant decrease of intracellular calcium concentration was observed, leading us to suggest that the first pathways involve PDE activation by the Ca^{2+} -CaM complex, leading to the blocking of cAMP and the activation of PKA and an up-regulation of both nAChR1 and nAChR2 subtypes.

2.2. STO-609 inhibits nicotine-induced currents through α -bungarotoxin-insensitive nAChRs

In a previous study, we demonstrated that the CaMKII-E isoform was only expressed in DUM neurons (Taillebois et al., 2013), and its inhibition down-regulated the amplitude of nicotine evoked currents which was associated to a decrease of intracellular calcium concentration (List et al., 2014). To further understand the involvement of CaMK in the modulation of nicotine-induced currents, we used the CaMKK inhibitor 7-Oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylic acid (STO-609). To that end, 15 μ M STO-609 was bath applied and DUM neurons recorded during 15 min, at -50 mV holding potential. Nicotine current amplitudes were progressively reduced during the 15 min recording period

(Figure 5A). Nicotine-evoked currents were routinely observed, with peak amplitudes averaging -1.00 ± 0.08 nA, under control condition, and -0.66 ± 0.06 nA with STO-609 ($n = 11$, $p < 0.05$, figures 5A and B). Co-application of STO-609 with α -BGT strongly reduced NIC-induced currents to -0.13 ± 0.04 nA ($n = 6$, $p < 0.05$, figures 5A, B and C). Moreover, because nicotine currents were not completely blocked by STO-609, and KN93, a potent specific inhibitor of CaMKII, attenuates nicotine currents (List et al., 2014), we co-applied both KN93 and STO-609. Nicotine-evoked currents were completely blocked (Figure 5D), confirming previous studies demonstrating that CaMKII pathways are involved. Subsequently, to study the involvement of both α -BGT-insensitive nAChR1 and nAChR2, we applied d-TC and Mec in the presence of STO-609. d-TC (-0.13 ± 0.02 nA, $n = 6$, figure 5E and F) was not able to completely block nicotine-evoked currents which was observed with Mec (-0.02 ± 0.01 nA, $n = 6$, figure 5E and F), suggesting that nAChR2 was associated to the regulation through CaMKK. Moreover, because CaMKKs are known to phosphorylate various kinases, we hypothesized that, one of its targets, the AMP-activated protein kinase (AMPK), could be involved in the modulation of nicotine currents. Thus, we used the AMPK inhibitor dorsomorphin (DM) and the AMPK activator A-769662 (A-76). Bath application of $10 \mu\text{M}$ DM significantly reduced nicotine-induced current amplitudes from -1.00 ± 0.10 nA to -0.54 ± 0.08 nA ($n = 9$, $p < 0.05$, figures 6A and B), whereas when $10 \mu\text{M}$ A-76 were added in the intrapipette solution, this reduction was counterbalanced. In the presence of A-76, the effects of DM were completely abolished, and the mean nicotine-evoked current amplitudes was -0.95 ± 0.10 nA ($n = 10$, $p < 0.05$, figures 6A, B and C). In order to ensure that AMPK was a target of CaMKKs in the regulatory process, we co-applied STO-609 with A-76 and measured nicotine-induced currents. In this condition, at the peak current amplitudes, STO-609 during 5 min decreased nicotine-induced currents from -1.00 ± 0.08 nA to -0.65 ± 0.07 nA ($n = 7$, $p < 0.05$, figures 6D E

and F). As with DM, A-76 inhibited the decrease of nicotine current amplitudes induced by STO-609 (-1.03 ± 0.09 nA, $n = 6$, figures 6D, E and F). Thus, we identified CaMKK/AMPK pathway as a regulator of nicotinic currents through α -BGT-insensitive nAChRs in cockroach DUM neurons.

Moreover, because CaMKK activated multifunctional kinases such as AMPK, resulting in the regulation of various Ca^{2+} , we studied the effect of STO-609 on the intracellular increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after pulse application of 1 mM nicotine. Surprisingly, bath application of STO-609 induced a strong and significant increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ before pulse application of 1 mM nicotine (Figure 7). In this context, co-application with 0.5 μM α -BGT had no effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ compared to control condition ($n = 5$, $p < 0.05$, figure 7A and B). Thus, compared to results obtained under bath application of Cd²⁺, we found that STO may induced a prolonged and irreversible increased of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3. Discussion

Intracellular regulation of calcium pathways through insect nAChRs is less evaluated. Recent studies suggested that they can be involved in the modulation of nicotinic ligands and in particular, neonicotinoid insecticides (Calas-List et al., 2013; List et al., 2014; Mannai et al., 2016). Using DUM neurons as models, we advance to our understanding of the complex mechanisms regulating the functional properties of insect nAChRs in neurosecretory cells, and demonstrated that three different pathways are associated to the modulation of nicotinic currents through Ca^{2+} -calmodulin complex. The first pathway involve the PDE/cAMP/PKA activation which was previously suggested in the modulation of nicotine- and clothianidin-evoked currents (Calas-List et al., 2013). Considering our previous studies, what was surprising in the present report is that CdZ had no effet on nicotine-induced currents through both nAChR1 and nAChR2 subtypes, suggesting that its inhibitory effect on PDE activity was not associated with the modulatory activity of nicotine currents through α -BGT-insensitive receptors, including both nAChR1 and nAChR2. Indeed, we previously demonstrated that changes in the cAMP concentration were associated to a modulatory activity on nicotine currents through nChR1 (Courjaret & Lapied, 2001; Calas-List et al., 2013). Interestingly, CdZ was able to strongly reduce the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induce by nicotine as found with α -BGT. These results provide evidence that nAChR1 and nAChR2 subtypes are not highly permeable to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and that major increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ associated to nicotine application was associated to α -BGT-sensitive receptors. Our hypothesis was exemplified by two findings. First it was suggested that nAChR1 and nAChR2 subtypes are composed of heteromeric receptors which included at least both three different nAChR subunits, respectively (ref). It was also demonstrated, using vertebrate nAChRs, that homomeric receptors like $\alpha 7$ are highly permeable to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ref). We hypothesized that cockroach DUM neuron α -BGT-sensitive

nAChR subtypes could be modulated by CaM/PDE/cAMP pathway (Figure 8). Consequently, we advanced that the activation of AC by CaM increases cAMP concentration which in turn activated PKA and regulated α -BGT-sensitive nAChRs (Calas-List et al., 2013). The subsequent strong Ca^{2+} influx through α -BGT-sensitive nAChRs could inhibit PKC1 which was involved in the activation of nAChR1 (Courjaret et al., 2003), leading to its down-regulation. Indeed, PKC1 was activated or inhibited by low and high $[\text{Ca}^{2+}]_i$, respectively (Courjaret et al., 2003). Thus, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes following nicotine application which was previously associated to α -BGT-insensitive receptors represented a part of the complex intracellular mechanisms leading to the modulation of nAChRs.

For the first time using DUM neurons, we identified a complex involvement of CaMKK in the modulation of nicotine currents. Application of STO-609 on cockroach DUM neurons reduced nicotine-evoked currents, suggesting an involvement of CaMKK. These results were in accordance with our recent studies focussing on the role of PaCaMKII-E on the modulation of nicotine-evoked currents (List et al., 2014). Indeed, using KN93 which is a specific inhibitor of CaMKII, we confirmed that CaMKII was also associated in the modulatory effect on nicotine current amplitudes. Moreover, because nicotine currents were completely inhibited when we co-applied α -BGT, we proposed that STO-609 required an involvement of α -BGT-sensitive and -insensitive nAChR subtypes, in particular nicotine-evoked currents were completely reduced when STO-609 was co-applied with mecamylamine which inhibited nAChR2 subtype. Thus, in the present studies, we demonstrated that CaMKK could modulate nicotine currents amplitude through nAChR2 whereas PaCaMKII-E will require both nAChR1 and nAChR2, respectively (List et al., 2014). In the present study, we also confirmed the involvement of CaMKK/AMPK signaling pathway using DM which reduced nicotine current amplitudes and its effect was inhibited by A-76 which was able to restore the inhibitory effect of STO-609. Despite

that in the present study we demonstrated a link between nicotinic receptor activation and CaMKK/AMPK signalling pathway, we found that contrary to CdZ effect, STO-609 did not induce a decrease of $[Ca^{2+}]_i$ following pulse application of nicotine. Pre-treatment of DUM neurons before application of nicotine evoked a strong and irreversible increase of $[Ca^{2+}]_i$ which was not blocked by α -BGT. We argued that this increase could be associated to the release of $[Ca^{2+}]_i$ stores or an entry from extracellular Ca^{2+} . Thus, compared to our previous studies, we proposed that the strong increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by STO-609 could inhibit PKC1 then nAChR1 (Courjaret et al., 2003).

However, AMPK is known as a key cellular energy sensor and regulator of metabolic homeostasis which in our case, can indicate the impairment of cell integrity. Indeed, we found that bath application of STO-609, not only increased $[Ca^{2+}]_i$ but after 15 - 20 min delay, cells swelled as it was observed in necrosis processes. We hypothesised that STO-609 could affect AMPK activation by CaMKK because AMPK is often linked to necrosis and apoptosis in cells. Pre-treatment of isolated mouse hearts with A-76 stimulated AMPK and reduced myocardial apoptosis and necrosis (Kim et al., 2011). AMPK is likely to phosphorylate a plethora of proteins, as demonstrated by the listing of 57 AMPK-dependent targets solely in murine hepatocytes (Ducommun et al., 2015). Nevertheless, evidence converges for the mammalian tumour necrosis factor α (TNF- α) being a recurrent target of AMPK in cardiac cells (Kewalramani et al., 2009; Peng et al., 2009; Zhang et al., 2014), hepatocytes (Hu et al., 2017) and enteric nervous cells (Coquenlorge et al., 2014). Interestingly, the first invertebrate TNF superfamily homologue ligand was discovered in *Drosophila*, and it was involved in cell death (Igaki et al., 2002).

In final, the present study demonstrate that three different pathways could be involved in regulation of insect nAChRs on insect neurosecretory cells. The first CaM/PDE/cAMP pathway was directly linked to a decrease of nicotine-evoked currents, the CaM/PaCaMKII-E previously identified involved α -BGT-insensitive nAChR1 and nAChR2, and was associated to a modulatory activity of $[Ca^{2+}]_i$ decrease. But, the inhibition of the CaMKK/AMPK pathway did not induce a decrease of $[Ca^{2+}]_i$ probably because STO-609 activated other mechanisms such as the release of $[Ca^{2+}]_i$ stores.

4. Materials and methods

4.1. Animals

Experiments were performed using adult male cockroaches *P. americana* reared at 29°C on 12:12h light/dark cycle.

4.2. Total mRNA extraction from cockroach nerve cord

Cockroaches were previously anaesthetized by chilling to 4°C and then, dissected and opened along the longitudinal dorsal-median line. Ventral nerve cord including thoracic and abdominal ganglia together with the connectives was used for the RNA extraction, using the Trizol® reagent (Invitrogen, USA). Total RNA was isolated from 15 ventral nerve cords.

4.3. Cloning of full-length cDNA sequences

CaM cDNA sequences were cloned using 4µg of total RNA was primed with an Oligo(dT)₂₀ and reverse-transcribed into first-strand cDNA with the SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen, France) (Moignot et al., 2009). Then, specific primers CaM-S1 and CaM-R1 were designed from cockroach *Blattella germanica* nucleotide sequences (Inagaki et al., 1998). These primers targeted a fragment of approximately 402 bp corresponding to CaM (Table 1). PCR was performed in a total volume of 25 µl containing 1 ng of RT products, 0.4 µM of each primer, 0.2 mM dNTP and 1.5 mM MgCl₂, using BlueTaq® polymerase (Invitrogen, France). Then, PCR cycles were conducted at 95°C for 30s, 60°C for 50

min, 72°C for 30 s and a final cycle of 72°C for 5 min. Negative controls in which reactions contained not template cDNA were conducted. PCR products were analyzed on 2 % agarose gel electrophoresis and purified using NucleoSpin Extract II® (Macherey-Nagel, Germany).

Subsequently, 3' and 5' RACE systems for rapid amplification of cDNA ends were performed using the GeneRacer® kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. For the 5' RACE, two GeneRacer® primers GR1 and GR2 were coupled to specific primer CaM-R7. To confirm the amplified products, additional nested primers were performed (Supplementary data, table 1).

4.4. DUM neuron isolation

DUM neurons were isolated from the cockroach terminal abdominal ganglia (TAG). After being carefully dissected, TAG were removed in a standard saline extracellular solution (in mM: 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl₂, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 10 mM ; pH 7.4 adjusted with NaOH) with sucrose (50 mM). Each compound in this solution was purchased from Sigma Aldrich, France. TAG were incubated (35 min, 29°C) in the saline supplemented with collagenase (type I, 1.5 mg/ml, GIBCO), rinsed twice and removed in the saline supplemented with foetal calf serum (5% by volume), 50 UI/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Sigma Aldrich, France). Then they were mechanically dissociated by gentle trituration using fire-polished Pasteur pipettes. The isolated DUM neurons could settle and adhere to Petri dishes (35/09 mm, NEST, Grosseron, France) coated with poly-D-lysine hydrobromide (MW, 70,000-150,000; Sigma Aldrich, France) for path-clamp experiments, or to coverslips (22 x 40 x 0.17 mm, HIRSCHMANN, Verrerie Villeurbannaise, France) for calcium imaging. Cell cultures were

incubated overnight at 29°C. All preparations were made under semi sterile conditions i.e. all equipment was sterilized with ethanol and solutions were filtered.

4.5. Immunocytochemistry

Isolated DUM neurons were first fixed in 2% paraformaldehyde and phosphate-buffered saline (PBS), for 15 min. After fixation, cells were washed in PBS for 3 x 5 min and then 15 min in PBS containing 0.2% Triton X-100. To block nonspecific binding of the primary antibody, DUM neurons were preincubated with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min. Primary antibody was rabbit anti-CaM, 1:400 (Invitrogen). It was applied 2 h at room temperature. After washing five times for 5 min in PBS, the fluorescent labelled secondary antibody (goat anti-rabbit Alexa-546; 1:150) was added for 30 min in the dark. Then, DUM neurons were rinsed in PBS and mounted on glass slides in glycerol/PBS. All steps of labelling were performed at room temperature. Note that, the anti-CaM antibody was raised against the C-terminus of bovine CaM as showed in *Bombyx mori* (Shanavas et al., 1998). All data were acquired with an Olympus BX50 laser scanning confocal microscope using a 60X oil-immersion objective and were analysed using the software Fluoview FV300 version 3.3 (Olympus, France). Alexa 488 was excited with a blue argon laser (488 nm) and detected between 510 and 530 nm. Alexa 546 was excited with a green helium neon laser (543 nm) and detected between 570 and 610 nm.

4.6. Single cell RT-PCR

Under an inverted microscope equipped with a micromanipulator, we used a glass micropipette to pick up individual DUM neurons. The whole cell was collected by aspiration

to a pipette, which is connected from the recording patch clamp electrode. The collected cell was expelled into a DNase/RNase free PCR tube and immediately frozen at -80°C. The critical steps are described below. In each sample containing a single DUM neuron, 0.5 µl DNase I (Invitrogen, France) and 200 mM Tris buffer were added, and incubated at 37°C for 15 min and at 85°C for 5 min. The reverse transcription was performed in a final volume of 15 µl containing 10 mM dNTP, 50 µM Oligo(dT)20 primer (Invitrogen), 5 mM MgCl₂, 13.3 mM DTT and a mix 2.5 units RNase OUT and 13.5 units SuperScript III reverse transcriptase. It was stopped by heating at 85°C for 5 min and treated with 0.5 µl RNase H at 37°C for 20min.

The amplification of CaM was realized in two steps. A first round multiplex PCR was made with specific external primers (CaME-S1 and CaME-R1). Briefly, 3 units of GoTaq polymerase (Promega), 0.2 mM of each primer and 0.2 mM dNTP were added to a final volume of 50 µl. Cycling conditions were 4 min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 20s, 60°C for 2 min, and 72°C for 2 min, ending with a 10 min extension time at 72°C. Then, 1 µl of the first-round product was used directly for second round PCR amplification, with only one nested primer pairs: CaM-S6 and CaM-R7 for CaM using the same PCR conditions. PCR products were analyzed on 2% agarose gel electrophoresis.

4.7. Optimization of PCR sensitivity

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

4.8. Bioinformatic analysis

P. americana (Pame_CaM) orthologues was obtained from NCBI database in other species. The principal homologous sequences are listed in Table 1 with their accession number and abbreviation. For each species the percentage of homology between amino acid sequence and Pame_CaM amino acid sequence was calculated using identity matrix application in bioedit software after sequences alignment using ClustalW program. For sequence alignment, we selected several amino acid CaM sequences from the classes of Insecta and Arachnida and the *Mus musculus* and *Caenorhabditis elegans* sequences for mammalia and nematodes class respectively. The positions of calcium-binding sites are also indicated. The CaM nucleotidic sequences were analysed using the ClustalW program (Thompson et al., 1994). A phylogenetic tree was constructed using neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) with a bootstrap of 1000 replications. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were collapsed. Analyses were conducted in the MEGA6 program (Tamura et al., 2013)

4.9. Electrophysiological recordings

Signals were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under voltage-clamp mode with an Axopatch 200B (Patch-clamp amplifier, Axon Instruments, Foster City, CA). They were digitized and acquired using a MiniDigidata 1440 analog-digital converter (Axon Instruments) and Axoscope 10.2 software (Axon Instruments). Signals were low pass-filtered at 5 kHz. The Petri dishes containing isolated DUM neurons were placed onto an inverted microscope (AE 2000, Motic), and continuously bathed with the standard saline using a gravity perfusion system positioned within 100 μm from the cell body.

In all experiments DUM neurons capacitance ranged between 200 and 250 pF to ensure reproducible current amplitudes. Patch pipettes (borosilicate glass capillary tubes: GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus) were filled with a standard internal solution (in mM: 160 K-D gluconic acid, 10 K-fluoride, 10 NaCl, 1 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 20 HEPES, 10 EGTA, 3 ATP ; pH 7.4 adjusted with KOH). Their resistances ranged from 1.5 to 2 MΩ. Nicotine was applied by pneumatic pressure ejection (15 psig, 100 ms; Miniframe, Medical System Corporation, USA). The pressure ejection was made through a glass micropipette, resistance ranging from 1.5 to 2 MΩ, positioned in solution within 100 μm from the isolated cell body. All compounds were purchased from Sigma Aldrich, France.

4.10. Intracellular calcium recordings

The intracellular calcium levels were recorded using the ratiometric fluorescent dye fura-2-AM. Coverslips containing isolated cell bodies were rinsed two times and incubated in the dark (45 min, 37°C) in the saline supplemented with sucrose (50 mM), Pluronic F-127 (0.1 %) and fura-2-AM (10 μM). All compounds were purchased from Sigma Aldrich, France. They were rinsed twice again and mounted on a perfusing chamber (PM-1, SA-OLY/2-AL, Warner Instruments) under an inverted microscope (IX73, Olympus) installed in a light-tight tissue- and wood-made box. Neurones were bathed using a gravity perfusion system from the outside of the box and whose tubes entered the box through 1 mm holes. This allowed us to control the levels of saline without exposing the samples to exterior light. Pressure ejection of nicotine (15 psig, 100 ms; PLI 100, Medical System Corporation, USA) was made through the same glass micropipettes than those used for patch-clamp. Calcium intracellular levels were measured

using a brightfield/340/380 nm LED camera (CoolLED pE-340^{fura}) and the *cellSens Dimension* acquisition software (Olympus).

4.11. Statistical analyses

Ionic currents were normalized according to the mean amplitude in control conditions (I/I_{mean}) and intracellular levels of calcium were expressed as $\Delta R/R_0$ (where R were the 340 nm / 380 nm ratio value). Mean current amplitudes and mean calcium peaks were compared using R (version 4.0.2).

References

- Bicker G. (1996) Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. *Journal of Neuroscience Methods* **69**, 33–41.
- Calas-List D., List O., Quinchard S., Thany S. H. (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *NeuroToxicology* **37**, 127–133.
- Coquenlorge S., Duchalais E., Chevalier J., Cossais F., Rolli-Derkinderen M., Neunlist M. (2014) Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation* **11**, 202.
- Courjaret R., Lapied B. (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Molecular Pharmacology* **60**, 80–91.
- Courjaret R., Grolleau F., Lapied B. (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an α -bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons) : two PKC-mediated opposite regulations of nAChR1. *European Journal of Neuroscience* **17**, 2023–2034.
- Ducommun S., Deak M., Sumpton D., Ford R. J., Núñez Galindo A., Kussmann M., Viollet B., et al. (2015) Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: Identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cellular Signalling* **27**, 978–988.
- Hu K., Gong X., Ai Q., Lin L., Dai J., Cai L., Jiang R., Ge P., Zhang L. (2017) Endogenous AMPK acts as a detrimental factor in fulminant hepatitis via potentiating JNK-dependent hepatocyte apoptosis. *Cell Death Dis* **8**, e2637–e2637.
- Igaki T. (2002) Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. *The EMBO Journal* **21**, 3009–3018.
- Inagaki S., Kaku K., Dunlap D.Y., Matsumura F. (1998) Sequences of cDNAs encoding calmodulin, and partial structures of calmodulin kinase, and a calcium channel of kdr-resistant and -susceptible German cockroaches, *Blattella germanica*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **120**, 225–33.
- Kewalramani G., Puthanveetil P., Wang F., Kim M. S., Deppe S., Abrahani A., Luciani D. S., Johnson J. D., Rodrigues B. (2009) AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- α -induced cardiac cell death. *Cardiovascular Research* **84**, 42–53.
- Kim A. S., Miller E. J., Wright T. M., Li J., Qi D., Atsina K., Zaha V., Sakamoto K., Young L. H. (2011) A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **51**, 24–32.
- Kostyuk P. G. (2007) Key role of calcium signaling in synaptic transmission. *Neurophysiology* **39**, 248–250.

- List O., Calas-List D., Taillebois E., Juchaux M., Heuland E., Thany S. H. (2014) Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J. Neurochem.* **130**, 507–513.
- Moignot B., Lemaire C., Quinchard S., Lapied B., Legros C. (2009) The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana* : evidence for an early duplication of the para-like gene. *Insect Biochem Mol Biol* **39**, 814-23.
- Peng W., Zhang Y., Zhu W., Cao C.-M., Xiao R.-P. (2009) AMPK and TNF- at the crossroad of cell survival and death in ischaemic heart. *Cardiovascular Research* **84**, 1–3.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Shanavas A., Dutta-Gupta A., Murthy C.R. (1998) Identification, characterization, immunocytochemical localization, and developmental changes in the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the CNS of *Bombyx mori* during postembryonic development. *J Neurochem* **70**, 1644-51.
- Taillebois E., Heuland E., Bourdin C. M., Griveau A., Quinchard S., Tricoire-Leignel H., Legros C., Thany S. H. (2013) Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II in the cockroach *Periplaneta americana* : identification of five isoforms and their tissues distribution. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **83**, 138–150.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Zhang C., Wang Z., Dong J., Pan R., Qiu H., Zhang J., Zhang P., Zheng J., Yu W. (2015) Bilirubin modulates acetylcholine receptors in rat superior cervical ganglionic neurons in a bidirectional manner. *Sci Rep* **4**, 7475.

Figures

Figure 1

(A and B) CaM was detected using a rabbit anti-C-terminus of bovine CaM (goat anti Ig-G rabbit-Alexa 546). (C) Single-cell RT-PCR amplification of calmodulin (CaM) and actin in the DUM neuron. Actin (GenBank accession number AY116670) was used as positive control for RT-PCR experiments. Negative controls were performed with extracellular solution in which all tissues were dissected (data not shown). (D) Currents induced by pressure application of 1 mM nicotine and under bath application of W13. (E) Calmodulin expression in *P. americana*. RT-PCR analysis of calmodulin in different tissues. Equal amounts of CaM cDNA (1 µg) were used to amplify CaM cDNA using RT-PCR.

Figure 2

Effects of CdZ on NIC-induced currents. (A) Schematic PDE/cAMP pathways. (B) Examples of nicotine-induced currents under control condition, bath application of 15 µM CdZ and co-application of both CdZ and 0.5 µM α-BGT. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM NIC (300 ms). Currents are recorded at -50 mV holding potential. (C) Histogram illustrating the effects of 1 mM NIC under control condition (n = 25), bath application of CdZ (n = 10) and co-application of CdZ with α-BGT (n = 8). Data are mean ± SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test). (D) Current-voltage relationship of NIC-induced currents under control condition and bath application of 15 µM CdZ and 0.5 µM α-BGT.

Figure 3

Effects of CdZ on NIC-induced currents through nAChR1 and nAChR2, and intracellular Ca^{2+} .

(A) Examples of NIC-induced currents under control condition, 0.5 μM α -BGT, co-application of 15 μM CdZ with α -BGT, and addition of 20 μM d-TC to block nAChR1 or 5 μM Mec to block nAChR2. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM NIC (300 ms). Currents are recorded at -50 mV holding potential. (B) Histogram illustrating the effects of 1 mM nicotine under control condition ($n = 20$), α -BGT ($n = 6$), co-application of CdZ with α -BGT ($n = 7$), and addition of d-TC ($n = 6$) or Mec ($n = 7$). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test). (C and D) Effects of CdZ on nicotine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Average time-course of intracellular Ca^{2+} levels under control condition, bath application of 0.5 μM α -BGT, 15 μM CdZ and co-application of CdZ with α -BGT. Arrowhead indicates pulse application of 1 mM NIC (300 ms). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test).

Figure 4

Effects of CdZ on NIC-induced Ca^{2+} influx through nAChR1 and nAChR2. (A) Average time-

course of intracellular Ca^{2+} levels under control condition, 0.5 μM α -BGT, co-application of 15 μM CdZ with α -BGT, and addition of 20 μM d-TC to block nAChR1 or 5 μM Mec to block nAChR2. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM nicotine (300 ms). (B) Histogram illustrating nicotine-induced calcium peak under control condition ($n = 21$), α -BGT ($n = 6$), co-application of CdZ with α -BGT ($n = 5$), and addition of d-TC ($n = 6$) or Mec ($n = 4$). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test).

Figure 5

Effects of STO-609 on NIC-induced currents. (A) Time-course of the effects of 15 μ M STO-609 (STO) on nicotine-induced currents in the presence and in the absence of 0.5 μ M α -BGT. (B) Examples of NIC-induced currents under control condition, bath application of 0.5 μ M α -BGT, 15 μ M STO and co-application of STO with α -BGT. Currents are recorded at -50 mV holding potential. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM nicotine (300 ms). (C) Histogram illustrating the effects of 1 mM nicotine under control condition ($n = 26$), bath application of α -BGT ($n = 6$), STO ($n = 11$) and co-application of STO with α -BGT ($n = 6$). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test). (D) Effects of 1 mM NIC under control condition, bath application of 15 μ M STO or KN93 and co-application of STO with KN93. (E) Examples of nicotine-induced currents under control condition, 0.5 μ M α -BGT, co-application of 15 μ M STO-609 (STO) with α -BGT, and addition of 20 μ M d-TC to block nAChR1 or 5 μ M Mec to block nAChR2. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM nicotine (300 ms). Currents are recorded at -50 mV holding potential. (F) Histogram illustrating the effects of 1 mM nicotine under control condition ($n = 25$), α -BGT ($n = 6$), co-application of STO with α -BGT ($n = 6$), and addition of d-TC ($n = 6$) or Mec ($n = 6$). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test).

Figure 6

Effects of DM and A-76 on NIC-induced currents. (A) Examples of NIC-induced currents under control condition, bath application of DM and co-application of DM with A-76. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM NIC (300 ms). Currents are recorded at -50 mV holding potential. (B) Histogram illustrating the effects of 1 mM NIC under control condition ($n = 19$),

bath application of DM (n = 9) and co-application of DM with A-76 (n = 10). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test). (C) Time-course of the amplitudes of currents induced by 1 mM nicotine under bath application of 10 μ M dorsomorphin (DM) and when 10 μ M A-76 were added in the intrapipette solution in the presence of DM. (D) Time-course of the amplitudes of currents induced by 1 mM NIC under bath application of 15 μ M STO-609 (STO) and when 10 μ M A-76 were added in the intrapipette solution in the presence of STO. (E) Examples of NIC-induced currents under control condition, bath application of STO and co-application of STO with A-76. Arrowheads indicate pulse application of 1 mM NIC (300 ms). Currents are recorded at -50 mV holding potential. (F) Histogram illustrating the effects of 1 mM NIC under control condition (n = 24), bath application of STO (n = 7) and co-application of STO with A-76 (n = 6). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (ANOVA with Tukey post-hoc test).

Figure 7

Effects of STO-609 on intracellular Ca^{2+} influx. (A) Average time-course of intracellular Ca^{2+} levels under control condition, bath application of 0.5 μ M α -BGT, 15 μ M STO-609 (STO) and co-application of STO with α -BGT. Arrowhead indicates pulse application of 1 mM NIC (300 ms). (B) Histogram illustrating NIC-induced calcium peak under control condition (n = 17), bath application of α -BGT (n = 6), STO (n = 6) and co-application of STO with α -BGT (n = 7). Data are mean $\pm$ SEM. $p^* < 0.05$ (Kruskal-Wallis with Holm post-hoc test).

Figure 8

Summarizing scheme of the Ca^{2+} /CaM-dependent pathways involved in the regulation of nAChRs expressed on cockroach DUM neurons. In red, specific inhibitors of CaM-dependent kinases. In green, specific activators.

Figure 1

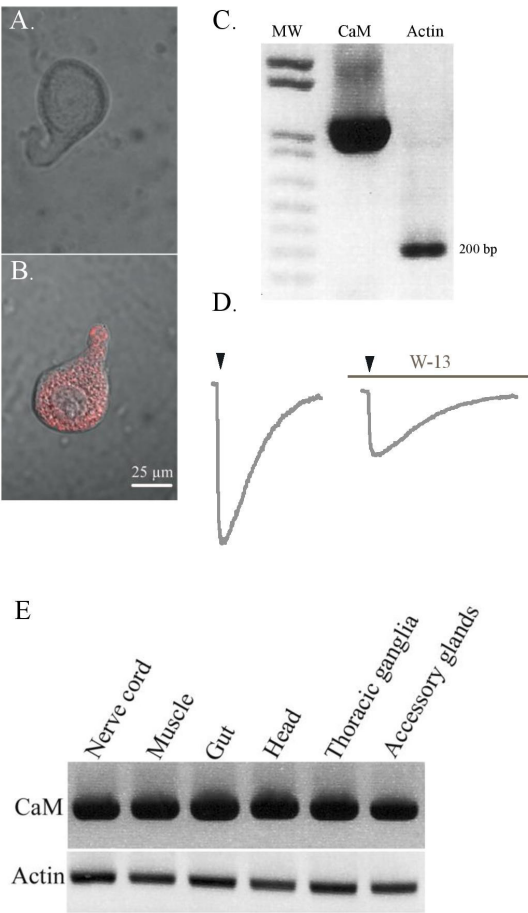


Figure 2

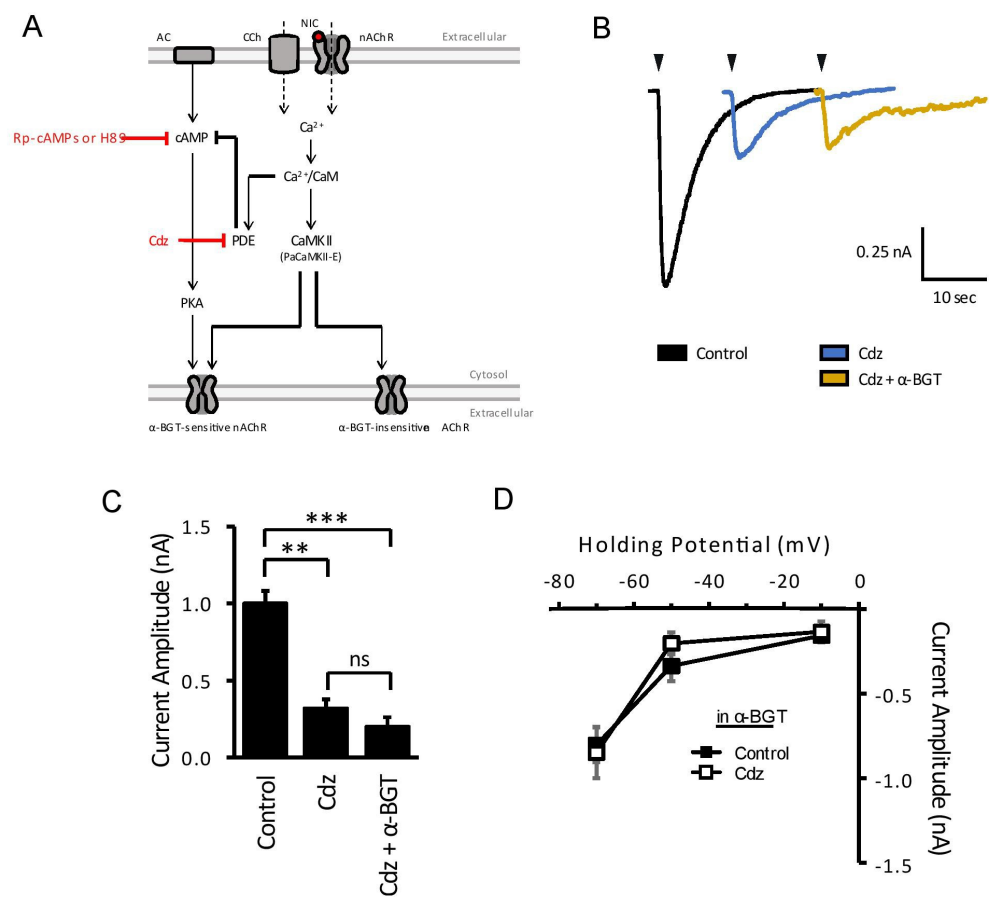


Figure 3

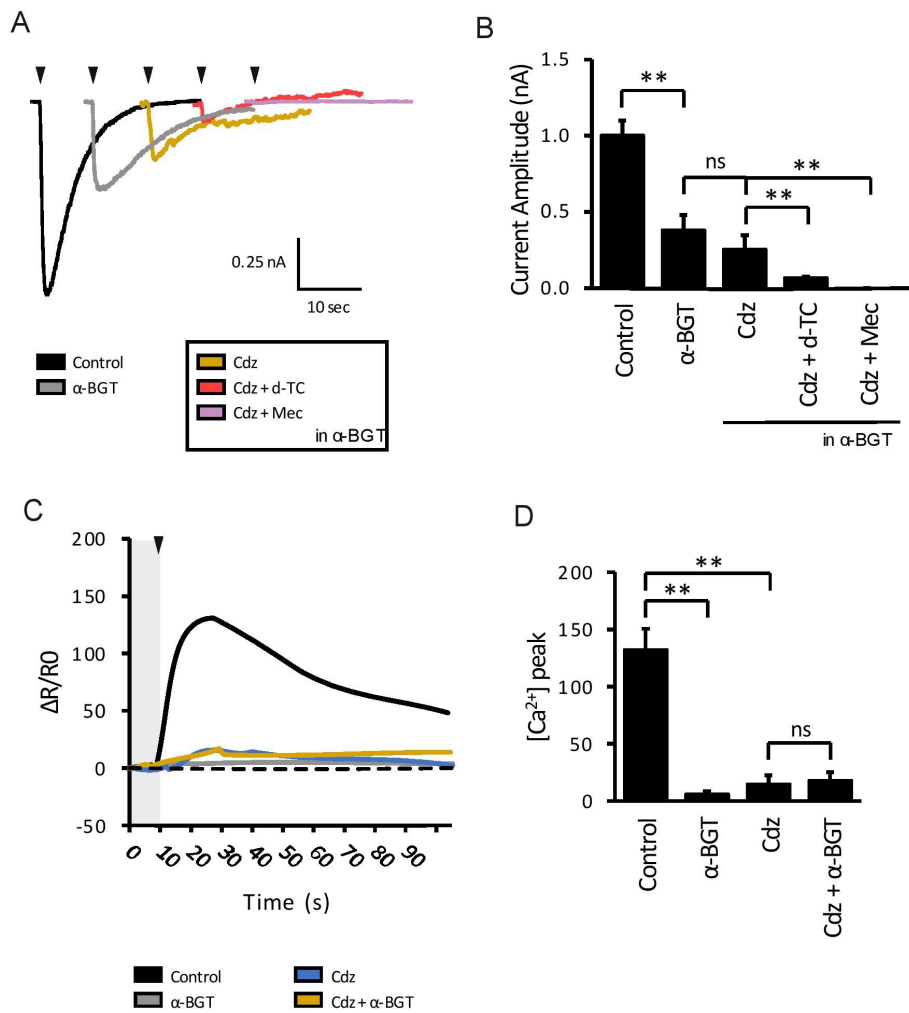


Figure 4

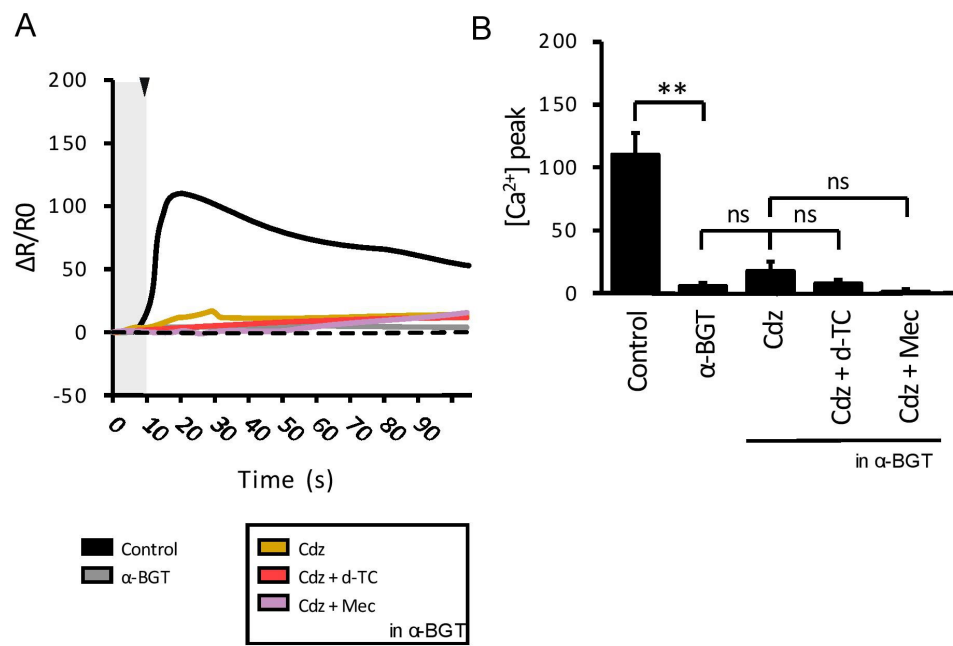


Figure 5

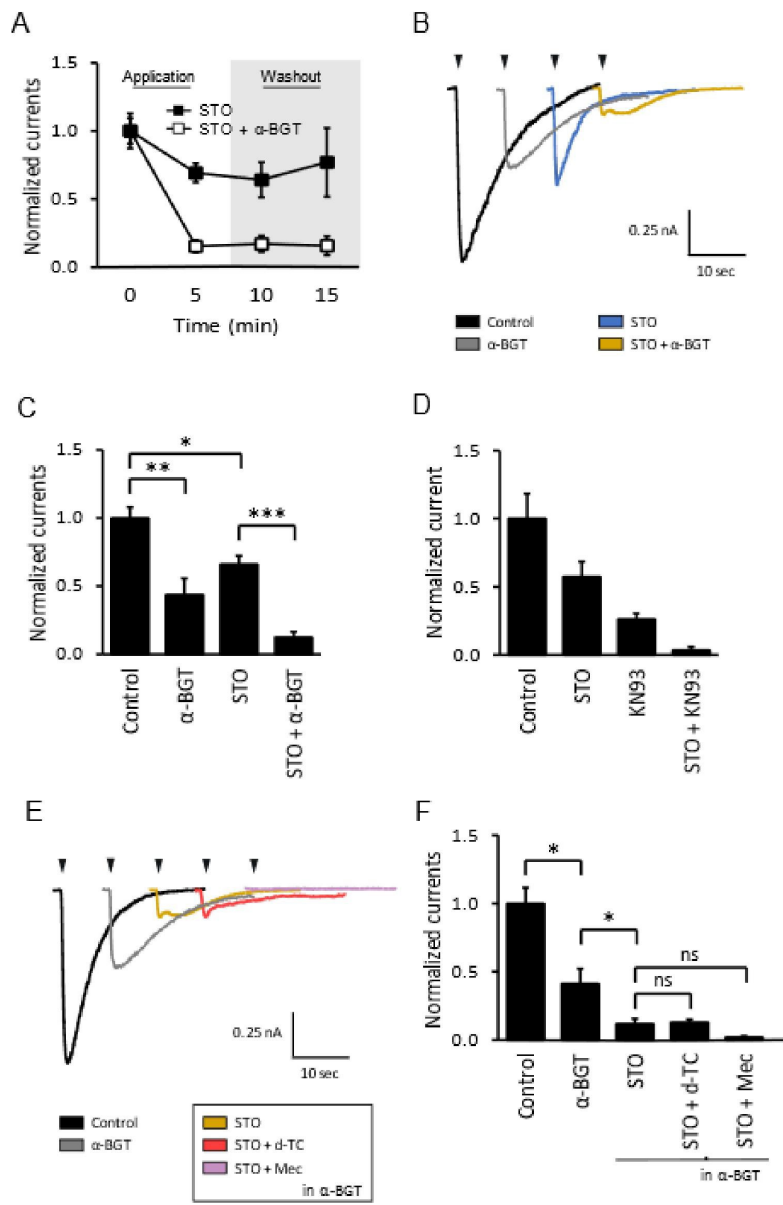


Figure 6

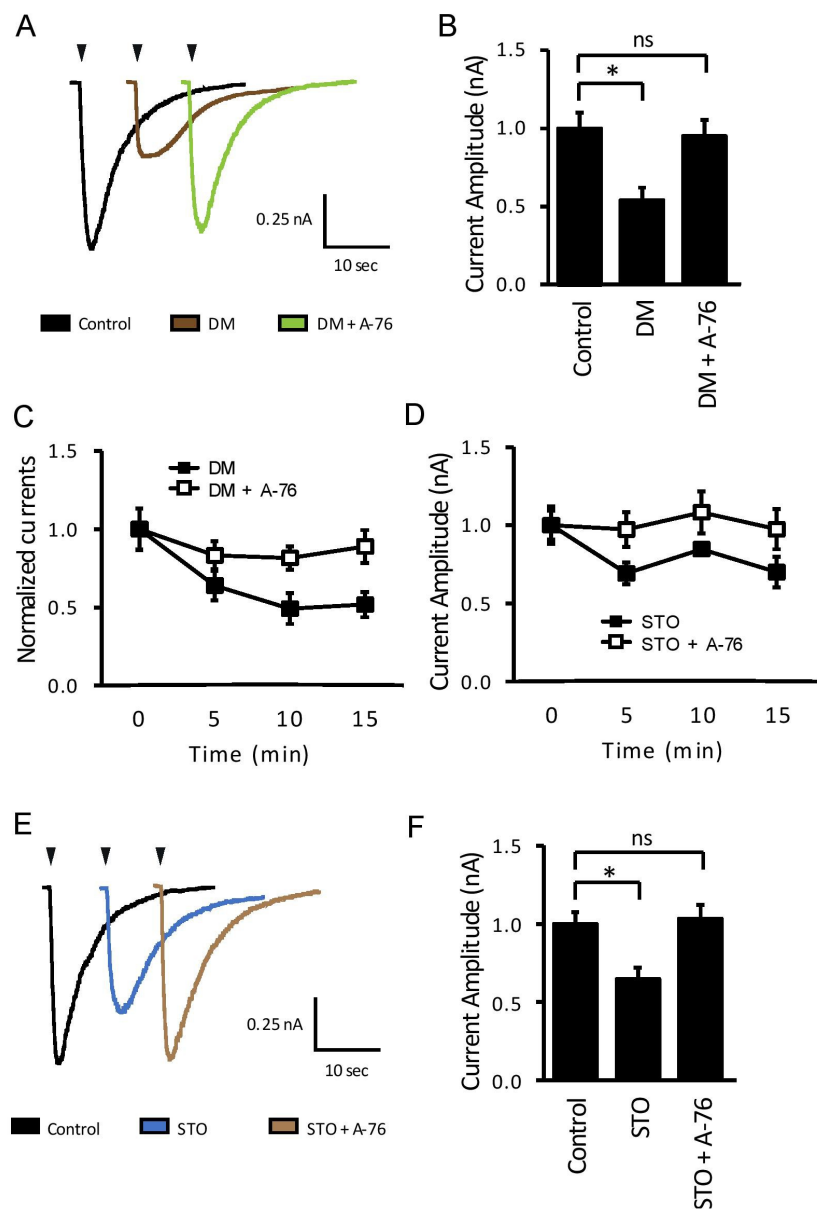


Figure 7

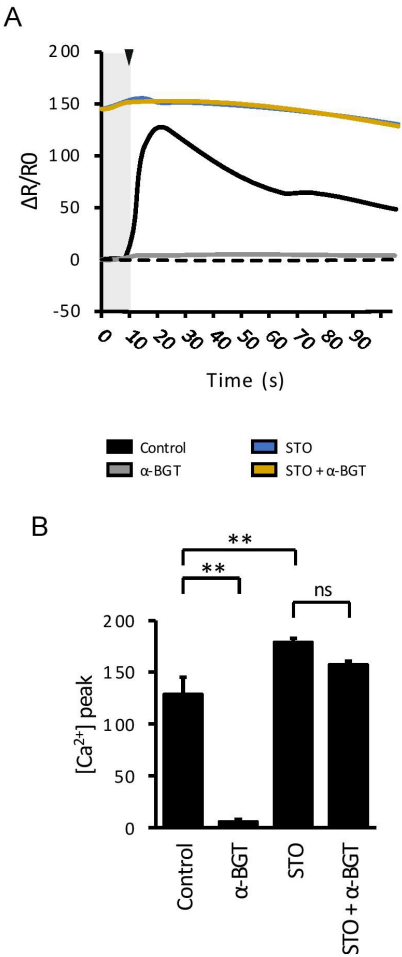
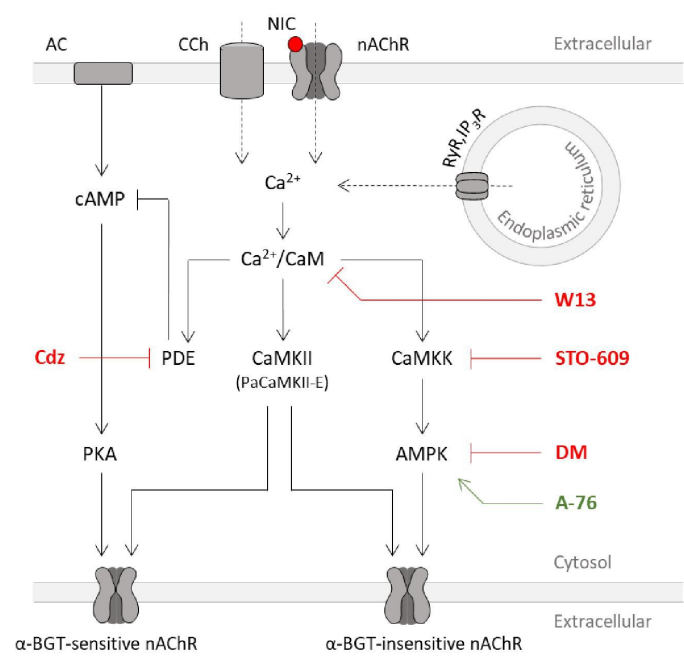


Figure 8



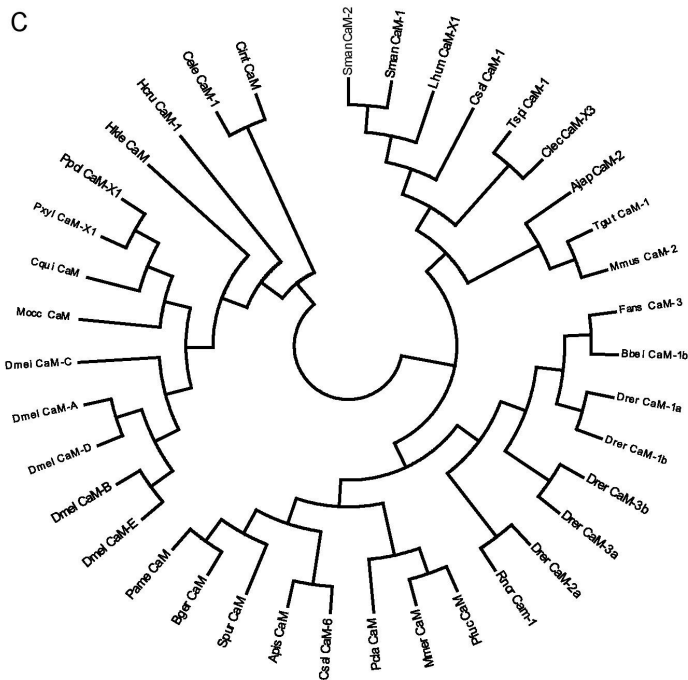


Table 1

Primers used in PCR experiments.

Primers used to amplify the full length cDNA of *P. americana* CaM. GR1 and GR2:
GeneRacer primer 1 and 2, respectively.

Reverse primers		Forward primers	
name	sequence	name	sequence
CaM-R1	GAAGTGGAAACGAGATGATTCG	CaM-S1	GGCTGATCAGCTGACTGAGG
CaM-R7	GAGGCACGTCATGACTAACCTGG	CaM-S7	GCAGAGCTGAGGCACGTCATG
GR1	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	GR2	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
CaM-R10	AATCTGGCGCGAAGTTAATACC	CaM-S3	GATCAGAGAGGCCTTCCGAG
CaME-R1	GTTACCATGATGACATCAAAGTGA	CaME-S1	ATGGCTGATCAGCTGACTG

Table 2

Sequences of calmodulin used in this study.

CaM sequences in several species. The sequences homologous to *P. americana* calmodulin sequence are summarized. For each sequence, the abbreviation, accession number and method used to determine the sequence are noted. The percentage of homology with amino acid sequence of *P. americana* is also indicated.

species	class	CaM isoform	abbreviation*	accession number nucleotides sequence	size (aa)	accession number aa sequence	% homology with Pame_CaM (in aa)
<i>Periplaneta americana</i>	<i>Insecta</i>		Pame_CaM	HQ176458	149	ADX05545	98.6
<i>Blattella germanica</i>	<i>Insecta</i>		Bger_CaM	**		**	
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Insecta</i>	isoform A	Dmel_CaM-A	NM_078986.3 AE013599.5	149	NP_523710.1 AAF58542	100
		isoform B	Dmel_CaM-B	NM_165870.2 AE013599.5	149	NP_725120.1 AAF58543	100
		isoform C	Dmel_CaM-C	NM_001259347.2 AE013599.5	149	NP_001246276.1 AFH08030	100
		isoform D	Dmel_CaM-D	NM_001259348.3 AE013599.5	149	NP_001246277.1 AFH08031	100
		isoform E	Dmel_CaM-E	NM_001299408.1 AE013599.5	149	NP_001286337.1 AHN56135	100
<i>Acromyrmex echinatior</i>	<i>Insecta</i>		Aech_CaM	GI887707.1	172	EGI70237.1	86.0
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Insecta</i>		Apis_CaM	NM_001126168.2	149	NP_001119640.2	99.3
<i>Camponotus floridanus</i>	<i>Insecta</i>		Cflo_CaM	GI438568.1	156	EFN68813.1	94.8
<i>Cerapachys biroi</i>	<i>Insecta</i>		Cbir_CaM	KK107262.1	160	EZA53913.1	92.5

<i>Cimex lectularius</i>	<i>insecta</i>	isoform X3	Clec_CaM-X3	XM_014391526.1	185	XP_014247012.1	80.0
<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>insecta</i>		Cqui_CaM	XM_001849733.1	167	XP_001849785.1	88.6
<i>Linepithema humile</i>	<i>insecta</i>	isoform X1	Lhum_CaM-X1	XM_012376156.1	213	XP_012231579.1	69.4
<i>Papilio polytes</i>	<i>insecta</i>	isoform X1	Ppol_CaM-X1	XM_013291563.1	153	XP_013147017.1	96.7
<i>Papilio xuthus</i>	<i>insecta</i>		Pxut_CaM	XM_011555484.1	233	KP95926.1	63.5
<i>Plutella xylostella</i>	<i>insecta</i>	isoform X1	Pxyl_CaM-X1	XM_011555484.1	153	XP_011553786.1	96.7
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	<i>arachnida</i>		Mocc_CaM	XM_003743828.1	283	XP_003743876.1	52.2
<i>Cupiennius salei</i>	<i>arachnida</i>	calmodulin 1	Csal_CaM-1	LN830640.1	152	CFW94149.1	98.0
		calmodulin 6	Csal_CaM-6	LN830645.1	158	CFW94154.1	94.3
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>crustacea</i>		Pcla_CaM	FI179169.1	149	ACI15835.1	99.3
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>mammalia</i>		Rnor_CaM	NM_031969.2		NP_114175.1	
				NM_012518.3		NP_036650.1	97.9
				NM_017326.3	149	NP_059022.1	
<i>Mus musculus</i>	<i>mammalia</i>		Mmus_CaM	NM_007589.5		NP_031615.1	
				NM_007590.3	149	NP_031616.1	97.9
				M19380.1		AAA66181.1	
				M19381.1		AAA66182.1	
<i>Homo sapiens</i>	<i>mammalia</i>		Hsap_CaM	AC006536.2		AAD45181.1	
				NM_006888.4	149	NP_008819.1	97.9
				X52606.1		CAA36839.1	
<i>Fukomys anselli</i>	<i>mammalia</i>	isoform 3	Fans_CaM-3	HQ326645.1	149	ADP20511.1	97.3
<i>Heterocephalus glaber</i>	<i>mammalia</i>		Hgla_CaM	JH167046.1	188	EH800855.1	77.1
<i>Gallus gallus</i>	<i>aves</i>		Ggal_CaM	L00096.1	149	AAA48653.1	97.9
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>aves</i>	variant 1	Tgut_CaM-1	DQ217246.1	149	ACH46218.1	97.3
<i>Branchiostoma belcheri</i>	<i>Leptocardii</i>		Bbts_CaM	EF177448.1	149	ABM53481.1	99.3
<i>tsingtauense</i>		calmodulin 1a		NM_213351.1		NP_998516.1	97.9
<i>Danio rerio</i>	<i>actinopterygii</i>	calmodulin 2a	Drer_CaM	NM_199996.2	149	NP_956290.1	97.9
		calmodulin 1b		NM_200082.1		NP_956376.1	97.9

		calmodulin 3b				BC066752.1			AAH66752.1	97.9
		calmodulin 3a				BC045298.1			AAH45298.1	97.9
	<i>actinopterygii</i>		Lcro_CaM			KQ041335.1	187		KKF28235.1	78.0
	<i>ascidiacea</i>		Cint_CaM			NM_001032461.1	149		NP_001027633.1	97.9
	<i>bivalvia</i>		Mmer_CaM			JX983189.1	149		AGS56987.1	98.6
	<i>bivalvia</i>		Cgig_CaM			JH816994.1	223		EKC20231.1	65.9
	<i>bivalvia</i>		Pfuc_CaM			AY341376.1	149		AAQ20043.1	98.6
	<i>chromadorea</i>		Cele_CaM			NM_070985.5	149		NP_503386.1	99.3
						BX284605.5			CCD69969	
	<i>secerente</i>	cmd-1	Hcro_CaM-1			KP165062.1	149		AJE31853.1	98.6
	<i>trematoda</i>	calmodulin 2	Sman_CaM-2			HQ163800.1	149		ADW78836.1	98.6
		calmodulin 1	Sman_CaM-1			HQ163799.1	149		ADW78835.1	97.9
	<i>adenophorea</i>		Tpse_CaM			JYDU01000102.1	196		KRX92830.1	75.5
	<i>adenophorea</i>		Tnat_CaM			JYDW01000015.1	215		KRZ61688.1	68.8
	<i>adenophorea</i>		Tsp18			JYDM01000051.1	216		KRZ90833.1	68.5
	<i>adenophorea</i>	calmodulin 1	Tspi_CaM-1			XM_003379512.1	241		XP_003379560.1	61.4
	<i>cestoda</i>	cmd1	Egra_CaM-1			LK028579.1	149		CDS19587.1	97.9
	<i>eutardigrada</i>		Hkle_CaM			HM628689.1	149		AEI07961.1	99.3
	<i>echinoidea</i>		Spur_CaM			XM_775769.4	213		XP_780862.3	69.0
	<i>holothuroidea</i>	calmodulin 2	Alap_CaM-2			AY973205.1	149		AAAY41437.1	99.3

* abbreviation used in this

publication

** not available on genbank

database

bp = base pair

aa = amino acids

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Comme les nAChRs de mammifères, les nAChRs d'insectes sont des pentamères la composition en sous-unités influe sur les propriétés pharmacologiques et l'affinité pour les ligands. De plus, la réponse des nAChRs d'insectes aux agonistes est modulée par des mécanismes de régulation intracellulaire (Figure 21). Or, la manière dont ces mécanismes régulent les effets des agonistes est encore peu connue. La régulation intracellulaire des nAChRs d'insectes est susceptible de jouer un rôle par exemple dans l'apparition de phénomènes de résistance des nAChRs aux néonicotinoïdes, comme l'ont démontré Courjaret et Lapied en utilisant l'IMI (Courjaret & Lapied, 2001). Au cours de cette thèse, et étant donné que de nombreux processus neuronaux y ont recours, nous nous sommes intéressés à la régulation des nAChRs d'insectes par les voies de régulation intracellulaire dépendantes du Ca^{2+} .

Dans une première série d'expériences, nous avons testé l'action agoniste du SFX sur les nAChRs des neurones DUM de la blatte. Le SFX induit un courant ionique deux fois plus grand que celui induit par l'ACh. Au niveau des DUM neurones, l'IMI réduit les courants induits par le SFX de façon partielle en présence de Mec et de façon complète en présence de d-TC, suggérant un effet sur nAChR1 et nAChR2. Le Ca^{2+} extracellulaire étant connu pour affecter les courants induits par la NIC sur les neurones DUM de blatte (Thany *et al.*, 2008), nous avons également testé les effets d'une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extra}}$ sur les courants induits par le SFX. Curieusement, le passage d'une concentration de 5 à 9 mM ne change en rien les effets du SFX : les effets de la NIC sur nAChR1 et nAChR2 sont donc dépendants de la concentration en Ca^{2+} alors que les effets du SFX ne semblent pas l'être. Les effets du SFX ont été testés dans un environnement enrichi en Ca^{2+} (9 mM dans le liquide extracellulaire), or il serait nécessaire de confirmer l'indépendance des effets du SFX vis-à-vis du calcium en mesurant les courants dans un environnement appauvri en Ca^{2+} ou en présence de BAPTA.

L'étude des effets du SFX nous a apporté des informations quant à la pharmacologie des nAChRs insensibles à l' α -BGT. Les récepteurs nAChR2 pourraient être en réalité deux sous-populations, sensibles et insensibles à l'IMI, étant donné que l'IMI inhibe partiellement les réponses au SFX en présence de d-TC. En revanche, les récepteurs nAChR1 seraient tous sensibles à l'IMI. Nous émettons l'hypothèse de la présence d'au moins trois populations de récepteurs correspondant à différents assemblages de sous-unités. Cette hypothèse est confortée par les

travaux récents de Sun *et al.* sur la composition en sous-unités des sous-types nAChR1 et nAChR2. En effet, il a été démontré, par une approche d'ARNi, que les sous-unités Pame α 3, Pame α 8 et Pame β 1 pourraient constituer le sous-type nAChR1 sensible à l'IMI alors que les sous-unités Pame α 1, Pame α 2 et Pame β 1 composeraient le sous-type nAChR2 insensible (Sun *et al.*, 2017). Ces résultats sont dans la continuité de travaux d'immunoprécipitation menés sur des nAChRs purifiés de la cicadelle *N. lugens*, montrant l'implication des sous-unités Nl α 1, Nl α 2 et Nl β 1 dans la formation de récepteurs de faible affinité pour l'IMI, alors que Nl α 3, Nl α 8 et Nl β 1 seraient impliquées dans la formation de récepteurs de forte affinité (Li *et al.*, 2010). Par ailleurs, les nAChRs hybrides composés des sous-unités Dm α 1 ou Dm α 2 de drosophile coexprimées avec la sous-unité β 2 de poulet, sont sensibles au SFX. Les courants induits par le SFX via le récepteur Dm α 1/ β 2 sont plus grands que ceux induits via les récepteurs Dm α 2/ β 2 (Watson *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que les sous-unités Dm α 1 et Dm α 2 pourraient être impliquées dans la formation de deux sous-populations différentes de nAChRs. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si, de façon similaire, Pame α 1 et Pame α 2 seraient impliquées dans la formation de récepteurs sensibles à l'IMI mais avec une sensibilité différente au SFX.

La deuxième conclusion de ces travaux de thèse est que la modulation des nAChRs d'insectes par les voies calcium-dépendantes peut être différente selon l'agoniste considéré (Figure 21). En effet, l'étude des courants induits par la NIC, la CLT et le SFX sur les sous-types nAChR1 et nAChR2 montre qu'ils ne sont pas régulés de la même façon par le calcium. Nous avons mené une première série d'expériences pour savoir si la modulation de nAChR1 et nAChR2 par la voie PKC précédemment décrite (Courjaret & Lapied, 2001 ; Courjaret *et al.*, 2003) était la même selon que l'on utilisait de la NIC ou un néonicotinoïde. Pour rappel, les courants induits par la NIC via nAChR1 sont modulés par PKC1, dépendante de $[Ca^{2+}]$, et PKC2, insensible au Ca^{2+} . Nous avons donc testé les effets de la CLT sur nAChR1 et nAChR2 en présence d'un analogue du DAG, le DiC8, connu pour activer PKC2. L'application de DiC8 sur les neurones DUM réduit les courants induits par la NIC et par la CLT, ce qui suggère que les effets des deux agonistes sont modulés par des PKC, au moins via l'activation de nAChR1. Cependant, la modification des niveaux de Ca^{2+} laisse penser que les PKC ne modulent pas les effets de la NIC et de la CLT de la même façon. D'un côté, le DiC8 affecte l'amplification des courants nicotiques provoquée par l'application de caféine ou par une augmentation de $[Ca^{2+}]_{extra}$. La NIC activerait donc nAChR1 principalement, ce qui est en accord

avec les études précédentes (Courjaret *et al.*, 2003). D'un autre côté, la caféine et l'augmentation de $[Ca^{2+}]$ n'affectent pas les courants induits par la CLT en présence de DiC8, de même que la chélation des ions Ca^{2+} intracellulaires par le BAPTA. De plus, le blocage de nAChR1 par la d-TC et le blocage de nAChR2 par la Mec bloquent complètement les courants. La CLT activerait donc nAChR1 et nAChR2 de manière indépendante du Ca^{2+} , via PKC2 (Figure 21). Cela ne veut pas dire qu'aucun lien n'existe entre la CLT et les voies de régulation calcium-dépendantes, car d'autres voies que les PKC sont déjà décrites comme modulant les effets de la CLT dans les neurones DUM de blatte, comme la voie de l'AMPC (Calas-List *et al.*, 2013) ou de la CaMKII (List *et al.*, 2014).

La troisième partie de cette thèse est l'identification d'une nouvelle voie de régulation CaM-dépendante dans la modulation des nAChRs d'insectes : la voie CaMKK/AMPK. Pour commencer, nous avons mesuré les courants nicotiques et les influx de Ca^{2+} induits par la NIC en présence d'un inhibiteur de CaMKK, le STO-609. Les enregistrements électrophysiologiques indiquent que le STO-609 réduit fortement les courants nicotiques en présence d' α -BGT. De plus, la co-application de Mec et d' α -BGT bloque entièrement les courants, alors que la co-application de d-TC et d' α -BGT n'a pas d'effet. Ces résultats démontrent que la CaMKK est impliquée dans la régulation des courants nicotiques d'au moins un sous-type de nAChR2 sensible à la Mec. Néanmoins, l'absence de courant résiduel dans ces conditions suggère l'existence de sous-types nAChR1 également sensibles à la Mec. Nous avons ensuite testé les effets d'un inhibiteur et d'un activateur d'AMPK, la DM et le A-76, respectivement, sur les courants induits par la NIC. La DM réduit les courants nicotiques quand elle est appliquée dans le milieu extracellulaire, mais quand la solution intrapipette est additionnée d'A-76, les courants contrôles sont maintenus malgré la présence de DM. Cette observation suggère que l'AMPK est une molécule downstream de la voie de régulation des nAChRs impliquant CaMKK. Pour confirmer cela, nous avons réitéré l'expérience en remplaçant la DM par le STO-609 et avons obtenu le même résultat : les courants nicotiques sont maintenus quand le STO-609 et l'A-76 sont co-appliqués. Les données d'imagerie révèlent que l'application de STO-609 sur une cellule au repos provoque une très forte augmentation de $[Ca^{2+}]_{intra}$. En effet, la concentration de calcium dans la cellule au repos atteint une valeur supérieure à celle du pic de calcium induit par l'application de NIC. Il est donc difficile d'évaluer les effets de la CaMKK sur l'influx calcique induit par l'activation des nAChRs, ce dernier étant masqué par l'augmentation de la concentration basique de calcium par l'application de STO-609. De même, nous n'avons pas pu

tester les effets de l'inhibition de la CaMKK simultanément avec l'activation de l'AMPK sur les influx calciques car l'A-76 est appliqué de façon intracellulaire, or contrairement au dispositif de patch-clamp, cela est techniquement infaisable sur le dispositif d'imagerie du laboratoire.

En plus d'augmenter fortement $[Ca^{2+}]_{intra}$, l'application de STO-609 provoque dans quelques cas une hypertrophie des neurones DUM (donnée non présentée). Nous émettons l'hypothèse que l'inhibition de l'AMPK par le STO-609 débloquent les effets d'un facteur de nécrose tumorale ou TNF (tumor necrosis factor) et conduit à ce phénomène. En effet, l'AMPK est un senseur énergétique impliqué dans le maintien de l'intégrité de la cellule en condition de stress via la phosphorylation de nombreuses protéines-cibles. Elle est notamment citée de façon récurrente pour protéger des effets du TNF- α dans les cellules de mammifères (Kewalramani *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014b; Coquenlorge *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2017). De plus, l'identification d'homologues du TNF- α chez la drosophile et le ver à soie renforce notre hypothèse (Igaki *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant, dans un premier temps, de chercher des homologues du TNF- α chez la blatte. Au niveau du système nerveux central, le TNF- α est capable de stimuler l'expression et/ou l'activité de différents canaux calciques tels que les récepteurs à l'AMPA, les récepteurs au NMDA et les IP₃R (Ogoshi *et al.*, 2005 ; Beattie *et al.*, 2002 ; Jara *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2008). Notre seconde hypothèse est donc que le déblocage du TNF par l'inhibition de l'AMPK conduirait à l'ouverture d'un ou plusieurs canaux calciques, expliquant ainsi la forte augmentation de $[Ca^{2+}]_{intra}$. A ce titre, les IP₃R et les RyR sont de bons candidats. En effet, dans des myocytes de rat, le TNF- α active les IP₃R et les RyR, ce qui mène à une augmentation de $[Ca^{2+}]_{intra}$ et à l'hypertrophie des cellules. L'inhibition des IP₃R et des RyR permet d'éviter cette hypertrophie (Wang *et al.* 2010). Pour vérifier notre hypothèse, il faudrait tester les effets du STO-609 dans un milieu extracellulaire ne contenant pas de calcium : dans ces conditions, si le STO-609 induit une augmentation en calcium intracellulaire, c'est que celle-ci vient du déstockage des compartiments intracellulaires. Dans ce cas, les effets du STO-609 pourraient être testés en présence d'inhibiteurs spécifiques des IP₃R et des RyR.

L'application d' α -BGT sur les neurones DUM bloque fortement l'influx de calcium induit par la NIC. Nous faisons l'hypothèse que les nAChRs homomériques sensibles à l' α -BGT sont les récepteurs majoritairement impliqués dans la modulation des effets de la NIC. L'expression hétérologue de nAChRs homomériques représente donc un enjeu pour tester cette hypothèse.

Récemment, un récepteur homomérique fonctionnel composé de sous-unités Pame α 7 de blatte a été exprimé en ovocyte de xénope. Il présente un profil pharmacologique atypique puisqu'il est insensible à l' α -BGT (Cartereau *et al.*, 2020). L'étude des courants nicotiniques et des influx calciques de ce récepteur permettrait de tester notre hypothèse.

Enfin, nous avons obtenu des données supplémentaires concernant le rôle de la PDE dans la régulation des nAChRs. Les études précédentes montrent que l'ajout d'une forte concentration d'AMPC dans la solution intrapipette provoque la réduction des courants nicotiniques à travers nAChR1, et que cette réduction est reproduite par l'inhibition de la PDE (Courjaret & Lapied, 2001). L'inhibition de la PDE provoque donc une augmentation de la concentration d'AMPC suffisante pour inhiber les courants induits par la NIC via nAChR1 (Courjaret & Lapied, 2001). Toutefois, le rôle de la PDE dans la régulation des courants nicotiniques sensibles à l' α -BGT n'a pas été testé. Ici, nous avons utilisé un inhibiteur de PDE, le CdZ, en présence et en absence d' α -BGT, et mesuré les courants induits par la NIC. Nos résultats indiquent une réduction de ces courants par le CdZ seul ou co-appliqué avec l' α -BGT, suggérant que la PDE est impliquée dans la régulation des nAChRs sensibles à l' α -BGT. La mesure des flux calciques nous montre que les influx induits par la NIC sont fortement réduits par le CdZ et que l' α -BGT n'a pas d'effet sur cette réduction. Les influx de calcium via les nAChRs sensibles à l' α -BGT semblent donc être modulés par la PDE. Néanmoins, en présence de CdZ et d' α -BGT, le d-TC n'a pas d'effet significatif sur les influx de calcium induits par la NIC. Cela suggère donc que nAChR1 appartient au pool de nAChRs qui sont affectés par le CdZ, et renforce donc l'idée que nAChR1 peut être régulé par la PDE (Courjaret & Lapied, 2001).

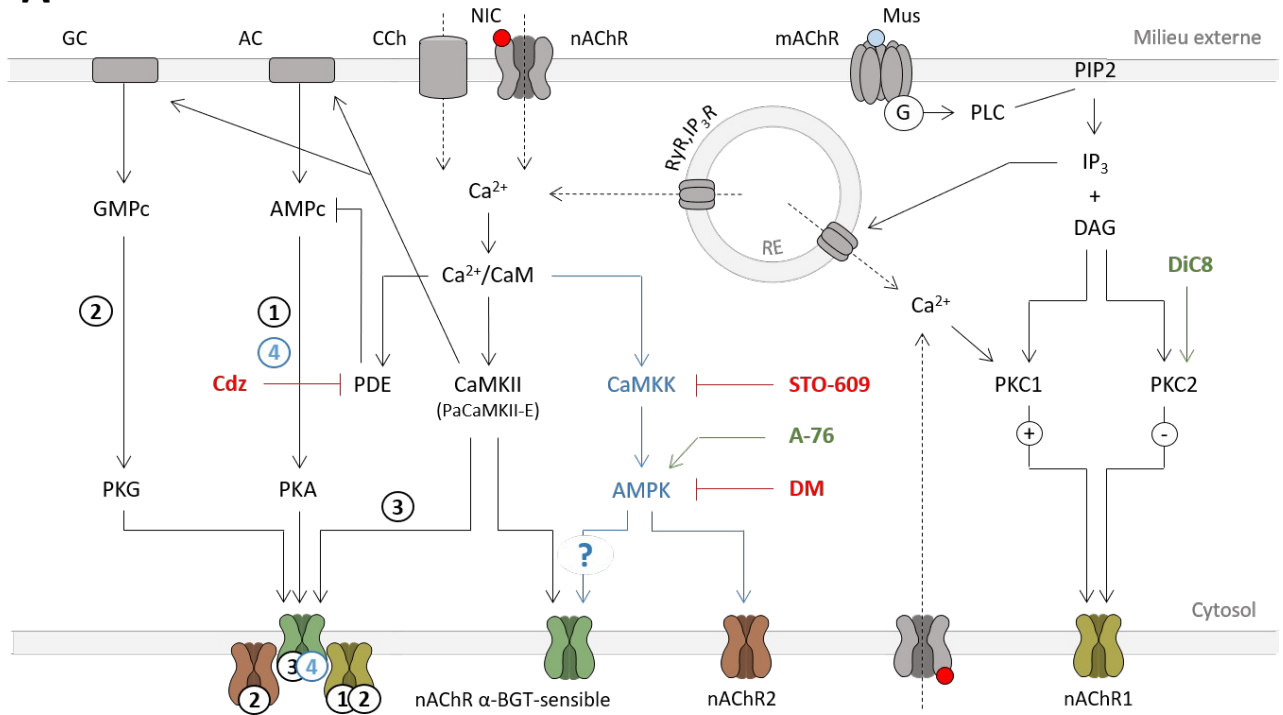
La modulation des nAChRs neuronaux d'insectes met en jeu des voies intracellulaires complexes (Figure 21). Mais, l'étude conjointe des variations de courants et des variations de calcium intracellulaire permet de mieux comprendre l'impact de ces voies sur les propriétés agonistes de la nicotine et des différents ligands. Dans les neurones DUM de blatte, nous montrons que non seulement des voies intracellulaires calcium-dépendantes modulent les effets d'un néonicotinoïde, la CLT, mais que la modulation des effets de la NIC et de la CLT se fait de manière différente. En effet, la NIC et la CLT activent des mécanismes intracellulaires, communs ou spécifiques, qui régulent différents sous-types de nAChRs (sensibles ou insensibles à l' α -BGT, nAChR1, nAChR2). La composition en sous-unités des nAChRs d'insectes a une influence sur leurs propriétés pharmacologiques, notamment en termes de sensibilité aux néonicotinoïdes (Liu *et al.*,

2005 ; Bass *et al.*, 2011 ; Shimada *et al.*, 2020). Par conséquent, il serait judicieux d'étudier l'implication de ces sous-unités et de leurs résidus dans les effets modulateurs des voies calciques en réponse aux néonicotinoïdes. Pour cela, nous pourrions utiliser la technique de mutagenèse dirigée, comme cela a été fait pour identifier des résidus de la sous-unité $\beta 1$ impliqués dans la liaison à l'IMI chez *M. persicae* et *D. melanogaster* (Song *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2008). Très récemment, l'implication de la sous-unité $\alpha 6$ dans la sensibilité des nAChRs aux insecticides spinosynes a été démontrée par la technique CRISPR/Cas9 chez plusieurs espèces d'insectes (Zuo *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2020a ; 2020b ; Lan *et al.*, 2020 ; Zimmer *et al.*, 2016). Cette technique pourrait donc également être utilisée. Les données de séquençage des sous-unités de nAChRs chez *P. americana* indiquent des sites potentiels de phosphorylation par des molécules dépendantes du calcium telles que les PKC et l'AMPC (Jones *et al.*, 2020). On peut donc supposer que ces sites pourraient jouer un rôle dans la modulation des effets des agonistes par les voies calciques que nous avons mises en évidence. Il serait intéressant de modifier ces sites par mutagenèse dirigée pour tester cette hypothèse.

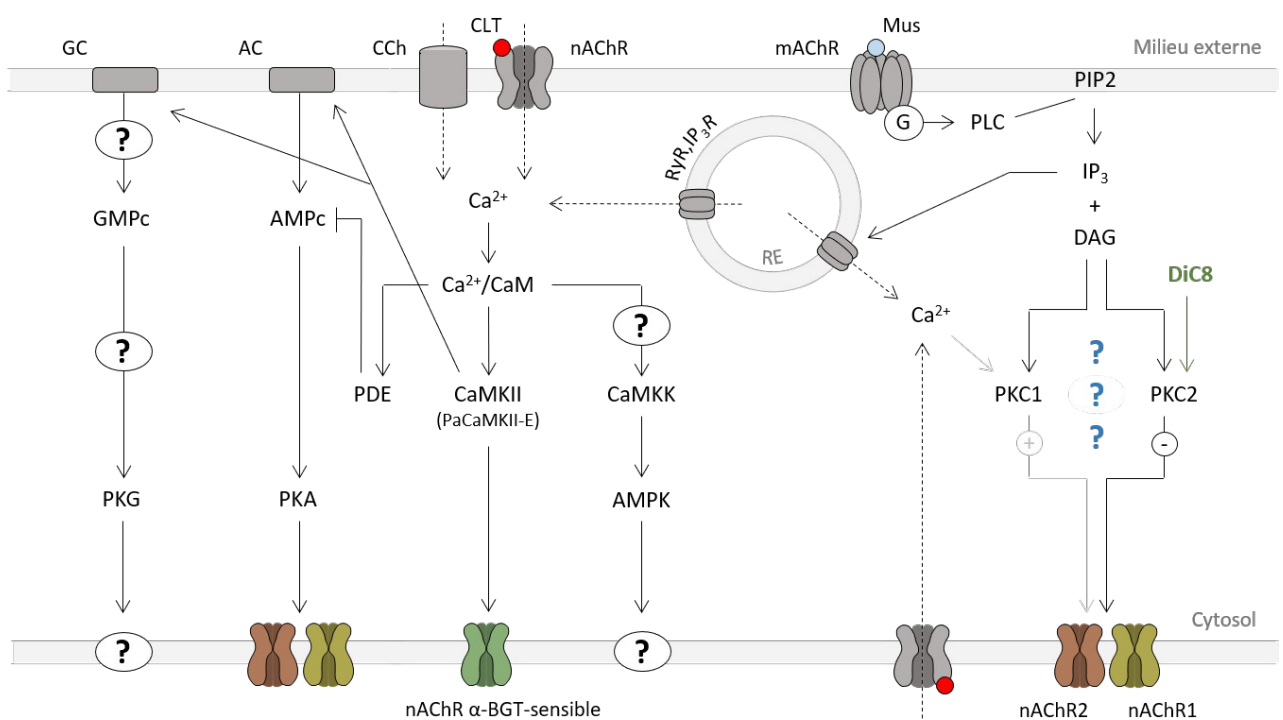
En conclusion, ce projet de thèse aura permis une avancée dans la compréhension de la modulation des nAChRs et des effets de leurs agonistes par les voies de régulation intracellulaires dépendantes du Ca^{2+} (Figure 21). Nous avons notamment montré que la modulation calcium-dépendante des effets agonistes, qu'il s'agisse de NIC, de néonicotinoïdes (CLT) ou d'autres composés tels que les sulfoximines (SFX) varie selon l'agoniste appliqué sur le récepteur, ajoutant ainsi de la complexité à la caractérisation des différentes voies de modulation. Aussi, nous avons identifié pour la première la voie CaMKK/AMPK comme une voie de régulation calcium-dépendante de courants cholinergiques neuronaux.

Figure 21 : Schéma hypothétique des voies de régulation calcium-dépendante modulant les nAChRs de blatte. (A) Modulation des effets de la nicotine (NIC). (B) Modulation des effets de la clothianidine (CLT). En rouge et en vert, inhibiteurs et activateurs exogènes. Les chiffres indiquent la modulation de certains nAChRs par des voies spécifiques. En bleu, apports des travaux de thèse. "AC", adénylylcyclase ; "AMPK", AMP-activated protein kinase ; "CaM", calmoduline ; "(Pa)CaMKII(-E)", CaM-kinase II, isoforme E de la blatte *P. americana* ; "CaMKK", CaMK-kinase ; "CCh", canal calcique ; "DAG", diacylglycérol ; "DM", dorsomorphine ; "G", protéine G couplée au récepteurs muscarinique ; "GC", guanylylcyclase ; "IP3", inositol triphosphate ; "IP₃R", récepteur à l'IP₃ ; "mAChR", récepteur muscarinique M1 ; "Mus", muscarine ; "PDE", phosphodiesterase ; "PIP2", phosphoinositol biphosphate ; "PKA/G", protéine kinase A/G ; "PLC", phospholipase C ; "RE", réticulum endoplasmique ; "RyR", récepteur à la ryanodine.

A



B



Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure 1 : Structure d'un nAChR musculaire de <i>Torpedo marmorata</i>	9
Figure 2 : Anneaux formés par les résidus des segments TM2 d'un pore ionique de nAChR.....	11
Figure 3 : Schéma du site de liaison à l'ACh.....	12
Figure 4 : Modélisation de la structure de l'AChBP de <i>L. stagnalis</i>	13
Figure 5 : Changements de conformation d'un nAChR.....	14
Figure 6 : Structure du site de liaison des ions Ca^{2+} hébergé par le domaine C2 des PKC.....	23
Figure 7 : Structure des différentes isoformes de la famille des PKC.....	24
Figure 8 : Dynamique structurale de la CaM.....	27
Figure 9 : Complexité de la régulation des nAChR neuronaux par les voies intracellulaires calcium-dépendantes.....	35
Figure 10 : Arbre phylogénétique des sous-unités composant les nAChRs d'insectes.....	37
Figure 11 : Diversité des nAChRs d'insectes sensibles et insensibles à l' α -BGT.....	40
Figure 12 : Structures moléculaires des différents néonicotinoïdes.....	41
Figure 13 : Courbes courant-potentiel caractérisant les populations de récepteurs insensibles à l' α -BGT nAChR1 et nAChR2.....	43
Figure 14 : Voie de régulation PKC de nAChR1 dans les neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i> . .	49
Figure 15 : Schéma de la modulation des nAChRs par les voies de la CaM et de la CaMKII (PaCaMKII-E) dans les neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i>	51
Figure 16 : Schéma de la régulation des nAChRs par la voie GMPC/PKG dans les neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i>	52
Figure 17 : La blatte <i>Periplaneta americana</i> et son système nerveux.....	60
Figure 18 : Principales étapes de dissociation des neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i>	61
Figure 19 : Dispositif de patch-clamp du laboratoire.....	62
Figure 20 : Dispositif d'imagerie calcique du laboratoire.....	65
Figure 21 : Schéma hypothétique des voies de régulation calcium-dépendante modulant les nAChRs de blatte.....	147

Tableaux

Tableau 1: Isoformes de l'AC chez les vertébrés.....31

Tableau 2 : Nomenclature des différentes familles de PDE chez les vertébrés.....32

Références bibliographiques

- Amador M., Dani J. A. (1995)** Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci* **15**, 4525–4532.
- Amar M., Thomas P., Wonnacott S., Lunt G. G. (1995)** A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitising homo-oligomeric nicotinic acetylcholine receptor when expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* **199**, 107–110.
- Anand R., Peng X., Lindstrom J. (1993)** Homomeric and native alpha 7 acetylcholine receptors exhibit remarkably similar but non-identical pharmacological properties, suggesting that the native receptor is a heteromeric protein complex. *FEBS Lett* **327**, 241–246.
- Andersen N. D., Nielsen B. E., Corradi J., Tolosa M. F., Feuerbach D., Arias H. R., Bouzat C. (2016)** Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective. *Neuropharmacology* **107**, 189–200.
- Anderson K. A., Means R. L., Huang Q. H., Kemp B. E., Goldstein E. G., Selbert M. A., Edelman A. M., Freneau R. T., Means A. R. (1998)** Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J Biol Chem* **273**, 31880–31889.
- Arias H. R. (1997)** Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev* **25**, 133–191.
- Arias H. R. (1998a)** Noncompetitive inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by endogenous molecules. *J Neurosci Res* **52**, 369–379.
- Arias H. R. (1998b)** Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 173–220.
- Augustine G. J., Charlton M. P., Smith S. J. (1985)** Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J Physiol* **367**, 163–181.
- Azam L., Winzer-Serhan U., Leslie F. M. (2003)** Co-expression of $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* **119**, 965–977.
- Bao W. X., Narai Y., Nakano A., Kaneda T., Murai T., Sonoda S. (2014)** Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in $\alpha 6$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. *Pestic Biochem Physiol* **112**, 51–55.
- Bass C., Lansdell S. J., Millar N. S., Schroeder I., Turberg A., Field L. M., Williamson M. S. (2006)** Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Insect Biochem Mol Biol* **36**, 86–96.

-
- Bass C., Puinean A. M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul V. L., et al. (2011)** Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci* **12**, 51.
- Bass C., Zimmer C. T., Riveron J. M., Wilding C. S., Wondji C. S., Kaussmann M., Field L. M., Williamson M. S., Nauen R. (2013)** Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 19460.
- Beattie E. C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J. C., Ha B. K., Von Zastrow M., Beattie M. S., Malenka R. C. (2002)** Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* **295**, 2282–2285.
- Bell R. M., Burns D. J. (1991)** Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 4661–4664.
- Bencherif M., Lukas R. J. (1991)** Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptor expression by human TE671/RD cells following second messenger modulation and sodium butyrate treatments. *Mol Cell Neurosci* **2**, 52–65.
- Berridge M. J. (1998)** Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13–26.
- Bertrand D., Ballivet M., Gomez M., Bertrand S., Phannavong B., Gundelfinger E. D. (1994)** Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate $\beta 2$ subunit and *Drosophila* α subunits. *Eur J Neurosci* **6**, 869–875.
- Bertrand D., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Bertrand S., Changeux J. P. (1993)** Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6971–6975.
- Biaggi-Labiosa N. M., Avilés-Pagán E., Caballero-Rivera D., Báez-Pagán C. A., Lasalde-Dominicci J. A. (2015)** Engineering $\alpha 4\beta 2$ nAChRs with reduced or increased nicotine sensitivity via selective disruption of consensus sites in the M3-M4 cytoplasmic loop of the $\alpha 4$ subunit. *Neuropharmacology* **99**, 273–284.
- Bicker G. (1996)** Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. *Journal of Neuroscience Methods* **69**, 33–41.
- Billen B., Spurny R., Brams M., Elk R. van, Valera-Kummer S., Yakel J. L., Voets T., Bertrand D., Smit A. B., Ulens C. (2012)** Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 9173.
- Bolger G. B. (1994)** Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal* **6**, 851–859.
- Bon C., Changeux J. P. (1975)** Ceruleotoxin: an acidic neurotoxin from the venom of *Bungarus caeruleus* which blocks the response to a cholinergic agonist without binding to the cholinergic receptor site. *FEBS Lett* **59**, 212–216.
-

-
- Bossy B., Ballivet M., Spierer P. (1988)** Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *EMBO J* **7**, 611–618.
- Boulter J., Connolly J., Deneris E., Goldman D., Heinemann S., Patrick J. (1987)** Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7763–7767.
- Braga M. F. M., Pereira E. F. R., Mike A., Albuquerque E. X. (2004)** Pb^{2+} via protein kinase C inhibits nicotinic cholinergic modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 700–710.
- Brejck K., Dijk W. J. van, Klaassen R. V., Schuurmans M., Der Oost J. van, Smit A. B., Sixma T. K. (2001)** Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269–276.
- Buck J., Sinclair M. L., Schapal L., Cann M. J., Levin L. R. (1999)** Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 79.
- Buckingham S., Lapied B., Corronc H., Sattelle F. (1997)** Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of Experimental Biology* **200**, 2685–2692.
- Burford N. T., Clark M. J., Wehrman T. S., Gerritz S. W., Banks M., O'Connell J., Traynor J. R., Alt A. (2013)** Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the μ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10830–10835.
- Butt S. J. B., Pitman R. M. (2002)** Modulation by 5-hydroxytryptamine of nicotinic acetylcholine responses recorded from an identified cockroach (*Periplaneta americana*) motoneuron. *Eur J Neurosci* **15**, 429–438.
- Caffery P. M., Krishnaswamy A., Sanders T., Liu J., Hartlaub H., Klysik J., Cooper E., Hawrot E. (2009)** Engineering neuronal nicotinic acetylcholine receptors with functional sensitivity to α -bungarotoxin: a novel $\alpha 3$ -knock-in mouse. *Eur J Neurosci* **30**, 2064–2076.
- Calas-List D., List O., Quinchard S., Thany S. H. (2013)** Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology* **37**, 127–133.
- Campusano J. M., Su H., Jiang S. A., Sicaeros B., O'Dowd D. K. (2007)** nAChR-mediated calcium responses and plasticity in *Drosophila* Kenyon cells. *Dev Neurobiol* **67**, 1520–1532.
- Cartaud J., Benedetti E. L., Cohen J. B., Meunier J. C., Changeux J. P. (1973)** Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett* **33**, 109–113.
- Cartereau A., Taillebois E., Selvam B., Martin C., Graton J., Le Questel J.-Y., Thany S. H. (2020)** Cloning and expression of cockroach $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Front Physiol* **11**, 418–418.
-

-
- Celie P. H. N., Klaassen R. V., Rossum-Fikkert S. E. van, Elk R. van, Nierop P. van, Smit A. B., Sixma T. K. (2005)** Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **280**, 26457–26466.
- Celie P. H. N., Rossum-Fikkert S. E. van, Dijk W. J. van, Brejc K., Smit A. B., Sixma T. K. (2004)** Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**, 907–914.
- Cetin H., Epstein M., Liu W. W., Maxwell S., Rodriguez Cruz P. M., Cossins J., Vincent A., Webster R., Biggin P. C., Beeson D. (2019)** Muscle acetylcholine receptor conversion into chloride conductance at positive potentials by a single mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 21228.
- Chamaon K., Smalla K.-H., Thomas U., Gundelfinger E. D. (2002)** Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex. *J Neurochem* **80**, 149–157.
- Chang H. W., Neumann E. (1976)** Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor proteins: release of calcium ions caused by acetylcholine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3364–3368.
- Changeux J. P., Kasai M., Lee C. Y. (1970)** Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1241–1247.
- Chatzidaki A., D'Oyley J. M., Gill-Thind J. K., Sheppard T. D., Millar N. S. (2015)** The influence of allosteric modulators and transmembrane mutations on desensitisation and activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **97**, 75–85.
- Chatzidaki A., Millar N. S. (2015)** Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **97**, 408–417.
- Chavez-Noriega L. E., Crona J. H., Washburn M. S., Urrutia A., Elliott K. J., Johnson E. C. (1997)** Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 346–356.
- Chen D., Patrick J. W. (1997)** The α -bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the $\alpha 7$ subunit. *J Biol Chem* **272**, 24024–24029.
- Cheng P.-W., Lu P.-J., Chen S.-R., Ho W.-Y., Cheng W.-H., Hong L.-Z., Yeh T.-C., et al. (2011)** Central nicotinic acetylcholine receptor involved in Ca^{2+} -calmodulin-endothelial nitric oxide synthase pathway modulated hypotensive effects. *Br J Pharmacol* **163**, 1203–1213.
- Cheung W. Y. (1970)** Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* **38**, 533–538.
- Chin D., Means A. R. (2000)** Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* **10**, 322–328.
-

-
- Choo Y. M., Lee B. H., Lee K. S., Kim B. Y., Li J., Kim J. G., Lee J. H., Sohn H. D., Nah S. Y., Jin B. R. (2008)** Pr-lynx1, a modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the insect. *Mol Cell Neurosci* **38**, 224–235.
- Choudhary S., Marjaniović D. S., Wong C. R., Zhang X., Abongwa M., Coats J. R., Trailović S. M., Martin R. J., Robertson A. P. (2019)** Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **9**, 44–53.
- Chrisman P. A., Podair J. I., Jobe E. M., Levandoski M. M. (2014)** Intra-subunit flexibility underlies activation and allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **79**, 420–431.
- Collingridge G. L., Olsen R. W., Peters J., Spedding M. (2009)** A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**, 2–5.
- Conti M. (2000)** Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol* **14**, 1317–1327.
- Cooper E., Couturier S., Ballivet M. (1991)** Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**, 235–238.
- Coquenlorge S., Duchalais E., Chevalier J., Cossais F., Rolli-Derkinderen M., Neunlist M. (2014)** Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation* **11**, 202.
- Corringer P. J., Le Novère N., Changeux J. P. (2000)** Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 431–458.
- Courjaret R., Grolleau F., Lapied B. (2003)** Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an α -bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *European Journal of Neuroscience* **17**, 2023–2034.
- Courjaret R., Lapied B. (2001)** Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* **60**, 80–91.
- Coussens L., Parker P. J., Rhee L., Yang-Feng T. L., Chen E., Waterfield M. D., Francke U., Ullrich A. (1986)** Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859–866.
- Couturier S., Bertrand D., Matter J. M., Hernandez M. C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. (1990)** A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* **5**, 847–856.
- Cumbay M. G., Watts V. J. (2005)** G α_q potentiation of adenylate cyclase type 9 activity through a Ca²⁺/calmodulin-dependent pathway. *Biochem Pharmacol* **69**, 1247–1256.
-

-
- Cutler P., Slater R., Edmunds A. J. F., Maienfisch P., Hall R. G., Earley F. G. P., Pitterna T., et al. (2013) Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci* **69**, 607–619.
- Dale H. H., Feldberg W., Vogt M. (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* **86**, 353–380.
- Dale R. P., Jones A. K., Tamborindeguy C., Davies T. G. E., Amey J. S., Williamson S., Wolstenholme A., et al. (2010) Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol* **19 Suppl 2**, 141–153.
- Damaj M. I., Welch S. P., Martin B. R. (1994) Nicotine-induced antinociception in mice: role of G-proteins and adenylate cyclase. *Pharmacol Biochem Behav* **48**, 37–42.
- De Koninck P., Cooper E. (1995) Differential regulation of neuronal nicotinic ACh receptor subunit genes in cultured neonatal rat sympathetic neurons: specific induction of $\alpha 7$ by membrane depolarization through a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase pathway. *J Neurosci* **15**, 7966–7978.
- Dederer H., Werr M., Ilg T. (2011) Differential sensitivity of *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in recombinant hybrid receptors to nicotinoids and neonicotinoid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **41**, 51–61.
- Déglise P., Grünewald B., Gauthier M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci Lett* **321**, 13–16.
- Dekker L. V., Palmer R. H., Parker P. J. (1995) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 396–402.
- Deneris E. S., Connolly J., Rogers S. W., Duvoisin R. (1991) Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 34–40.
- Dennis M., Giraudat J., Kotzyba-Hibert F., Goeldner M., Hirth C., Chang J. Y., Lazure C., Chrétien M., Changeux J. P. (1988) Amino acids of the *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry* **27** 7, 2346–57.
- Devillers-Thiery A., Changeux J.-P., Paroutaud P., Strosberg A. D. (1979) The amino-terminal sequence of the 40 000 molecular weight subunit of the acetylcholine receptor protein from *Torpedo marmorata*. *FEBS Letters* **104**, 99–105.
- Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M., Changeux J. P. (1983) Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2067–2071.
-

-
- Di Angelantonio S., Piccioni A., Moriconi C., Trettel F., Cristalli G., Grassi F., Limatola C. (2011)** Adenosine A2A receptor induces protein kinase A-dependent functional modulation of human $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptor. *J Physiol* **589**, 2755–2766.
- Dinklo T., Shaban H., Thuring J. W., Lavreysen H., Stevens K. E., Zheng L., Mackie C., et al. (2011)** Characterization of 2-[[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **336**, 560–574.
- Dohrman D. P., Reiter C. K. (2003)** Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. *Brain Res* **975**, 90–98.
- Drew A. E., Werling L. L. (2001)** Protein kinase C regulation of dopamine transporter initiated by nicotinic receptor activation in slices of rat prefrontal cortex. *J Neurochem* **77**, 839–848.
- Drisdell R. C., Green W. N. (2000)** Neuronal α -bungarotoxin receptors are $\alpha 7$ subunit homomers. *J Neurosci* **20**, 133–139.
- Dupuis J. P., Gauthier M., 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.
- Dupuis J., Louis T., Gauthier M., Raymond V. (2012)** Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 1553–1564.
- Eastham H. M., Lind R. J., Eastlake J. L., Clarke B. S., Towner P., Reynolds S. E., Wolstenholme A. J., Wonnacott S. (1998)** Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*. *European Journal of Neuroscience* **10**, 879–889.
- Eddins D., Sproul A. D., Lyford L. K., McLaughlin J. T., Rosenberg R. L. (2002)** Glutamate 172, essential for modulation of L247T $\alpha 7$ ACh receptors by Ca^{2+} , lines the extracellular vestibule. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1454–1460.
- Eilers H., Schaeffer E., Bickler P. E., Forsayeth J. R. (1997)** Functional deactivation of the major neuronal nicotinic receptor caused by nicotine and a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* **52**, 1105–1112.
- Eldefawi M. E., Eldefawi A. T., Penfield L. A., O'Brien R. D., Van Campen D. (1975)** Binding of calcium and zinc to the acetylcholine receptor purified from *Torpedo californica*. *Life Sci* **16**, 925–935.
- Elgoyhen A. B., Johnson D. S., Boulter J., Vetter D. E., Heinemann S. (1994)** $\alpha 9$: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **79**, 705–715.
-

-
- Elgoyhen A. B., Vetter D. E., Katz E., Rothlin C. V., Heinemann S. F., Boulter J. (2001)** $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3501–3506.
- Exley R., Moroni M., Sasdelli F., Houlihan L. M., Lukas R. J., Sher E., Zwart R., Bermudez I. (2006)** Chaperone protein 14-3-3 and protein kinase A increase the relative abundance of low agonist sensitivity human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* **98**, 876–885.
- Faghiih R., Gopalakrishnan S. M., Gronlien J. H., Malysz J., Briggs C. A., Wetterstrand C., Ween H., et al. (2009)** Discovery of 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744) as a novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem* **52**, 3377–3384.
- Fenster C. P., Beckman M. L., Parker J. C., Sheffield E. B., Whitworth T. L., Quick M. W., Lester R. A. (1999)** Regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C. *Mol Pharmacol* **55**, 432–443.
- Filchakova O., McIntosh J. M. (2013)** Functional expression of human $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors in *X. laevis* oocytes is dependent on the $\alpha 9$ subunit 5' UTR. *PLoS One* **8**, e64655–e64655.
- Finch E. A., Turner T. J., Goldin S. M. (1991)** Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* **252**, 443–446.
- Fisher J. L., Dani J. A. (2000)** Nicotinic receptors on hippocampal cultures can increase synaptic glutamate currents while decreasing the NMDA-receptor component. *Neuropharmacology* **39**, 2756–2769.
- Frazier C. J., Rollins Y. D., Breese C. R., Leonard S., Freedman R., Dunwiddie T. V. (1998)** Acetylcholine activates an α -bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci* **18**, 1187–1195.
- Friel D. D., Tsien R. W. (1992)** Phase-dependent contributions from Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release to caffeine-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* **8**, 1109–1125.
- Fucile S. (2017)** The distribution of charged amino acid residues and the Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors: a predictive model. *Front Mol Neurosci* **10**, 155.
- Fucile S., Renzi M., Lax P., Eusebi F. (2003)** Fractional Ca^{2+} current through human neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **34**, 205–209.
- Galzi J. L., Bertrand S., Corringer P. J., Changeux J. P., Bertrand D. (1996)** Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* **15**, 5824–5832.
-

-
- Gao F., Chen D., Ma X., Sudweeks S., Yorgason J. T., Gao M., Turner D., et al. (2019) Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptor is a highly sensitive target of alcohol. *Neuropharmacology* **149**, 45–54.
- Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. (1994) Homomers of $\alpha 8$ and $\alpha 7$ subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol Pharmacol* **45**, 212–220.
- Gill J. K., Savolainen M., Young G. T., Zwart R., Sher E., Millar N. S. (2011) Agonist activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 5867.
- Gill-Thind J. K., Dhankher P., D'Oyley J. M., Sheppard T. D., Millar N. S. (2015) Structurally similar allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors exhibit five distinct pharmacological effects. *J Biol Chem* **290**, 3552–3562.
- Giraudat J., Devillers-Thiery A., Auffray C., Rougeon F., Changeux J. P. (1982) Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. *EMBO J* **1**, 713–717.
- Goldberg F., Grünewald B., Rosenboom H., Menzel R. (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J Physiol* **514** (3), 759–768.
- Goldberg J., Nairn A. C., Kuriyan J. (1996) Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* **84**, 875–887.
- Gotti C., Clementi F., Fornari A., Gaimarri A., Guiducci S., Manfredi I., Moretti M., Pedrazzi P., Pucci L., Zoli M. (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* **78**, 703–711.
- Gotti C., Hanke W., Maury K., Moretti M., Ballivet M., Clementi F., Bertrand D. (1994) Pharmacology and biophysical properties of $\alpha 7$ and $\alpha 7$ - $\alpha 8$ α -Bungarotoxin receptor subtypes immunopurified from the chick optic lobe. *European Journal of Neuroscience* **6**, 1281–1291.
- Grolleau F., Lapied B., Buckingham S. D., Mason W. T., Sattelle D. B. (1996) Nicotine increases $[Ca^{2+}]_i$ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with “mixed” nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neurosci Lett* **220**, 142–146.
- Grønlien J. H., Håkerud M., Ween H., Thorin-Hagene K., Briggs C. A., Gopalakrishnan M., Malysz J. (2007) Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* **72**, 715–724.
-

-
- Grønlien J. H., Ween H., Thorin-Hagene K., Cassar S., Li J., Briggs C. A., Gopalakrishnan M., Malysz J. (2010)** Importance of M2-M3 loop in governing properties of genistein at the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inferred from $\alpha 7/5$ -HT3A chimera. *Eur J Pharmacol* **647**, 37–47.
- Groot-Kormelink P., Luyten W., Colquhoun D., Sivilotti L. (1998)** A reporter mutation approach shows incorporation of the “orphan” subunit $\beta 3$ into a functional nicotinic receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**, 15317–15320.
- Gubbins E. J., Gopalakrishnan M., Li J. (2010)** $\alpha 7$ nAChR-mediated activation of MAP kinase pathways in PC12 cells. *Brain Research* **1328**, 1–11.
- Guo X., Wecker L. (2002)** Identification of three cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites within the major intracellular domain of neuronal nicotinic receptor $\alpha 4$ subunits. *J Neurochem* **82**, 439–447.
- Hanoune J., Defer N. (2001)** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145–174.
- Hansen S. B., Talley T. T., Radic Z., Taylor P. (2004)** Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. *J Biol Chem* **279**, 24197–24202.
- Hildebrandt J. D. (1997)** Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* **54**, 325–339.
- Hou J., Kuromi H., Fukasawa Y., Ueno K., Sakai T., Kidokoro Y. (2004)** Repetitive exposures to nicotine induce a hyper-responsiveness via the cAMP/PKA/CREB signal pathway in *Drosophila*. *J Neurobiol* **60**, 249–261.
- Hsu Y. N., Edwards S. C., Wecker L. (1997)** Nicotine enhances the cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of $\alpha 4$ subunits of neuronal nicotinic receptors. *J Neurochem* **69**, 2427–2431.
- Hu K., Gong X., Ai Q., Lin L., Dai J., Cai L., Jiang R., Ge P., Zhang L. (2017)** Endogenous AMPK acts as a detrimental factor in fulminant hepatitis via potentiating JNK-dependent hepatocyte apoptosis. *Cell Death & Disease* **8**.
- Huang Y., Williamson M. S., Devonshire A. L., Windass J. D., Lansdell S. J., Millar N. S. (1999)** Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *J Neurochem* **73**, 380–389.
- Hucho F., Changeux J. P. (1973)** Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. *FEBS Lett* **38**, 11–15.
- Hucho F., Weise C. (2001)** Ligand-gated ion channels. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**, 3100–3116.
-

-
- Hudmon A., Schulman H. (2002)** Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* **364**, 593–611.
- Hurst R. S., Hajós M., Raggenbass M., Wall T. M., Higdon N. R., Lawson J. A., Rutherford-Root K. L., et al. (2005)** A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: *in vitro* and *in vivo* characterization. *J Neurosci* **25**, 4396–4405.
- Igaki T., Kanda H., Yamamoto-Goto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T., Miura M. (2002)** Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. *EMBO J* **21**, 3009–3018.
- Ikura M., Ames J. B. (2006)** Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1159–1164.
- Inden M., Takata K., Yanagisawa D., Ashihara E., Tooyama I., Shimohama S., Kitamura Y. (2016)** $\alpha 4$ nicotinic acetylcholine receptor modulated by galantamine on nigrostriatal terminals regulates dopamine receptor-mediated rotational behavior. *Neurochem Int* **94**, 74–81.
- Itier V., Bertrand D. (2001)** Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett* **504**, 118–125.
- Jackson C., Bermudez I., Beadle D. J. (2002)** Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors in isolated *Locusta migratoria* neurones. *Microsc Res Tech* **56**, 249–255.
- Jara J. H., Singh B. B., Floden A. M., Combs C. K. (2007)** Tumor necrosis factor alpha stimulates NMDA receptor activity in mouse cortical neurons resulting in ERK-dependent death. *J Neurochem* **100**, 1407–1420.
- Jean T., Klee C. B. (1986)** Calcium modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) microsomes. *J Biol Chem* **261**, 16414–16420.
- Jeon Y. H., Heo Y.-S., Kim C. M., Hyun Y.-L., Lee T. G., Ro S., Cho J. M. (2005)** Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1198–1220.
- Jin Y., Tian N., Cao J., Liang J., Yang Z., Lv J. (2007)** RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit $\alpha 6$ transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evol Biol* **7**, 98.
- Jones A. K., Bera A. N., Lees K., Sattelle D. B. (2010)** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity (Edinb)* **104**, 247–259.
- Jones A. K., Goven D., Froger J.-A., Bantz A., Raymond V. (2020)** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta americana*. *Pest Manag Sci*.
-

-
- Jones A. K., Grauso M., Sattelle D. B. (2005)** The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* **85**, 176–187.
- Jones A. K., Raymond-Delpech V., Thany S. H., Gauthier M., Sattelle D. B. (2006)** The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* **16**, 1422–1430.
- Jones A. K., Sattelle D. B. (2007)** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* **8**, 327.
- Jones A. K., Sattelle D. B. (2010)** Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv Exp Med Biol* **683**, 25–43.
- Kakiuchi S., Yamazaki R., Nakajima H. (1970)** Properties of a heat-stable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract. *Proceedings of the Japan Academy* **46**, 587–592.
- Kang J.-H., Toita R., Kim C. W., Katayama Y. (2012)** Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnol Adv* **30**, 1662–1672.
- Karlin A. (1993)** Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiology* **3**, 299–309.
- Karlin A. (2002)** Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* **3**, 102–114.
- Kasai M., Changeux J. P. (1971)** *In vitro* excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists : I. pharmacological properties of the excitable membrane fragments. *J Membr Biol* **6**, 1–23.
- Katz B., Miledi R. (1965)** The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **161**, 496–503.
- Katz B., Miledi R. (1967)** The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *The Journal of physiology* **189**, 535–544.
- Katz E., Verbitsky M., Rothlin C. V., Vetter D. E., Heinemann S. F., Elgoyhen A. B. (2000)** High calcium permeability and calcium block of the $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res* **141**, 117–128.
- Keravis T., Lugnier C. (2012)** Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* **165**, 1288–1305.
- Kewalramani G., Puthanveetil P., Wang F., Kim M. S., Deppe S., Abrahani A., Luciani D. S., Johnson J. D., Rodrigues B. (2009)** AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- α -induced cardiac cell death. *Cardiovasc Res* **84**, 42–53.
-

-
- Keyser K. T., Britto L. R., Schoepfer R., Whiting P., Cooper J., Conroy W., Brozowska-Precht A., Karten H. J., Lindstrom J. (1993)** Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci* **13**, 442–454.
- Kim A. S., Miller E. J., Wright T. M., Li J., Qi D., Atsina K., Zaha V., Sakamoto K., Young L. H. (2011)** A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 24–32.
- King J. R., Ullah A., Bak E., Jafri M. S., Kabbani N. (2018)** Ionotropic and metabotropic mechanisms of allosteric modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor intracellular calcium. *Mol Pharmacol* **93**, 601–611.
- Komal P., Estakhr J., Kamran M., Renda A., Nashmi R. (2015)** cAMP-dependent protein kinase inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity in layer 1 cortical interneurons through activation of D1/D5 dopamine receptors. *J Physiol* **593**, 3513–3532.
- Kostyuk P. G. (2007)** Key role of calcium signaling in synaptic transmission. *Neurophysiology* **39**, 248–250.
- Kouvatsos N., Giastas P., Chroni-Tzartou D., Pouloupoulou C., Tzartos S. J. (2016)** Crystal structure of a human neuronal nAChR extracellular domain in pentameric assembly: ligand-bound $\alpha 2$ homopentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 9635–9640.
- Krause R. M., Buisson B., Bertrand S., Corringer P. J., Galzi J. L., Changeux J. P., Bertrand D. (1998)** Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **53**, 283–294.
- Lan J., Wang Z., Chen Z., Zhang L., Zhao J., Guan Q., Liao C., Liu N., Han Q. (2020)** Identification of the *Aedes aegypti* nAChR gene family and molecular target of spinosad. *Pest Management Science* n/a.
- Langley J. N. (1908)** On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of “receptive” substances: Part III. The reaction of frog’s muscle to nicotine after denervation. *J Physiol* **37**, 285–300.
- Lansdell S. J., Collins T., Goodchild J., Millar N. S. (2012)** The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits D $\alpha 5$ and D $\alpha 7$ form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neuroscience* **13**, 73.
- Lansdell S. J., Millar N. S. (2000a)** The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* **39**, 671–679.
- Lansdell S. J., Millar N. S. (2000b)** Cloning and heterologous expression of D $\alpha 4$, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* **39**, 2604–2614.
-

-
- Lapied B., Le Corrond H., Hue B. (1990)** Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res* **533**, 132–136.
- Lapied B., Pennetier C., Afaire-Marchais V., Licznar P., Corbel V. (2009)** Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol* **27**, 190–198.
- Lax P., Fucile S., Eusebi F. (2002)** Ca^{2+} permeability of human heteromeric nAChRs expressed by transfection in human cells. *Cell Calcium* **32**, 53–58.
- Le Novère N., Corringer P.-J., Changeux J.-P. (2002a)** The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* **53**, 447–456.
- Le Novère N., Grutter T., Changeux J.-P. (2002b)** Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca^{2+} -binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3210–3215.
- Le Novère N., Zoli M., Changeux J. P. (1996)** Neuronal nicotinic receptor $\alpha 6$ subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci* **8**, 2428–2439.
- Lee A. M., Wu D.-F., Dadgar J., Wang D., McMahon T., Messing R. O. (2015)** PKC ϵ phosphorylates $\alpha 4\beta 2$ nicotinic ACh receptors and promotes recovery from desensitization. *Br J Pharmacol* **172**, 4430–4441.
- Lee B.-H., Choi S.-H., Shin T.-J., Pyo M. K., Hwang S.-H., Kim B.-R., Lee S.-M., et al. (2010)** Quercetin enhances human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion current through interactions with Ca^{2+} binding sites. *Mol Cells* **30**, 245–253.
- Lee C. Y., Tseng L. F. (1966)** Distribution of *Bungarus multicinctus* venom following envenomation. *Toxicon* **3**, 281–288.
- Lee J. C., Edelman A. M. (1995)** Activation of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 631–637.
- Levandoski M. M., Lin Y., Moise L., McLaughlin J. T., Cooper E., Hawrot E. (1999)** Chimeric analysis of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor reveals amino acids conferring sensitivity to α -bungarotoxin. *J Biol Chem* **274**, 26113–26119.
- Levandoski M. M., Piket B., Chang J. (2003)** The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* **471**, 9–20.
- Lewit-Bentley A., Réty S. (2000)** EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 637–643.
- Li J., Shao Y., Ding Z., Bao H., Liu Z., Han Z., Millar N. S. (2010)** Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 17–22.
-

-
- Lind R. J., Clough M. S., Earley F. G. P., Wonnacott S., Reynolds S. E. (1999)** Characterisation of multiple α -bungarotoxin binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 979–988.
- Lind R. J., Clough M. S., Reynolds S. E., Earley F. G. P. (1998)** [3 H]Imidacloprid labels high- and low-affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **62**, 3–14.
- List O., Calas-List D., Taillebois E., Juchaux M., Heuland E., Thany S. H. (2014)** Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J Neurochem* **130**, 507–513.
- Liu M. Y., Casida J. E. (1993)** High affinity binding of [3 H]Imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **46**, 40–46.
- Liu Z., Han Z., Zhang Y., Song F., Yao X., Liu S., Gu J., Millar N. S. (2009)** Heteromeric co-assembly of two insect nicotinic acetylcholine receptor α subunits: influence on sensitivity to neonicotinoid insecticides. *J Neurochem* **108**, 498–506.
- Liu Z., Williamson M. S., Lansdell S. J., Denholm I., Han Z., Millar N. S. (2005)** A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8420–8425.
- López-Hernández G. Y., Biaggi-Labiosa N. M., Torres-Cintrón A., Ortiz-Acevedo A., Lasalde-Dominicci J. A. (2009)** Contribution of position α 4S336 on functional expression and up-regulation of α 4 β 2 neuronal nicotinic receptors. *Cell Mol Neurobiol* **29**, 41–53.
- Mairet-Coello G., Courchet J., Pieraut S., Courchet V., Maximov A., Polleux F. (2013)** The CaMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* **78**, 94–108.
- Malysz J., Grønlien J. H., Anderson D. J., Håkerud M., Thorin-Hagene K., Ween H., Wetterstrand C., et al. (2009)** In vitro pharmacological characterization of a novel allosteric modulator of α 7 neuronal acetylcholine receptor, 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744), exhibiting unique pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 257–267.
- Mannai S., Bitri L., Thany S. H. (2016)** cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway modulates nicotine-induced currents through the activation of α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors from insect neurosecretory cells. *Journal of Neurochemistry* **137**, 931–938.
- Margiotta J. F., Berg D. K., Dionne V. E. (1987)** Cyclic AMP regulates the proportion of functional acetylcholine receptors on chicken ciliary ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8155–8159.
-

-
- Markussen M. D. K., Kristensen M. (2010)** Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manag Sci* **66**, 1257–1262.
- Marshall I. C., Taylor C. W. (1993)** Biphasic effects of cytosolic Ca²⁺ on Ins(1,4,5)P₃-stimulated Ca²⁺ mobilization in hepatocytes. *J Biol Chem* **268**, 13214–13220.
- Matsuda K., Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Grauso M., Sattelle D. B. (2001)** Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 573–580.
- Matsushita M., Nairn A. C. (1998)** Characterization of the mechanism of regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I by calmodulin and by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**, 21473–21481.
- McClure-Begley T. D., Grady S. R., Marks M. J., Collins A. C., Stitzel J. A. (2014)** Presynaptic GABA_B autoreceptor regulation of nicotinic acetylcholine receptor mediated [³H]-GABA release from mouse synaptosomes. *Biochem Pharmacol* **91**, 87–96.
- McLane K. E., Wu X. D., Conti-Tronconi B. M. (1990)** Identification of a brain acetylcholine receptor α subunit able to bind α -bungarotoxin. *J Biol Chem* **265**, 9816–9824.
- Meinrenken C. J., Borst J. G. G., Sakmann B. (2003)** Local routes revisited: the space and time dependence of the Ca²⁺ signal for phasic transmitter release at the rat calyx of Held. *J Physiol* **547**, 665–689.
- Meunier J. C., Sealock R., Olsen R., Changeux J. P. (1974)** Purification and properties of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* electric tissue. *Eur J Biochem* **45**, 371–394.
- Michalak A., Biala G. (2017)** Calcium homeostasis and protein kinase/phosphatase balance participate in nicotine-induced memory improvement in passive avoidance task in mice. *Behav Brain Res* **317**, 27–36.
- Millar N. S. (2003)** Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* **31**, 869–874.
- Millar N. S., Gotti C. (2009)** Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**, 237–246.
- Mironov S. L., Usachev J. M. (1991)** Caffeine affects Ca uptake and Ca release from intracellular stores: fura-2 measurements in isolated snail neurones. *Neurosci Lett* **123**, 200–202.
- Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M. (1984)** Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* **307**, 604–608.
-

-
- Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B. (1986)** Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**, 406–411.
- Miwa J. M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G. W., Sánchez R., Sali A., Role L. W., Heintz N. (1999)** lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* **23**, 105–114.
- Miwa J. M., Stevens T. R., King S. L., Caldarone B. J., Ibanez-Tallon I., Xiao C., Fitzsimonds R. M., et al. (2006)** The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival *in vivo*. *Neuron* **51**, 587–600.
- Molla A., Katz S., Demaille J. G. (1985)** Role of calmodulin in the regulation of muscle contraction, in *Current Topics in Membranes and Transport*, (Bronner F., ed), Vol. 25, pp. 147–180. Academic Press.
- Monod J., Wyman J., Changeux J. P. (1965)** On the nature of allosteric transitions : a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88–118.
- Moretti M., Zoli M., George A. A., Lukas R. J., Pistillo F., Maskos U., Whiteaker P., Gotti C. (2014)** The novel $\alpha 7\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol* **86**, 306–317.
- Moss S. J., McDonald B. J., Rudhard Y., Schoepfer R. (1996)** Phosphorylation of the predicted major intracellular domains of the rat and chick neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit by cAMP-dependent protein kinase. *Neuropharmacology* **35**, 1023–1028.
- Mulle C., Choquet D., Korn H., Changeux J. P. (1992)** Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* **8**, 135–143.
- Nairn A. C., Palfrey H. C. (1987)** Identification of the major M_r 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem* **262**, 17299–17303.
- Nakayama H., Okuda H., Nakashima T. (1993)** Phosphorylation of rat brain nicotinic acetylcholine receptor by cAMP-dependent protein kinase *in vitro*. *Brain Res Mol Brain Res* **20**, 171–177.
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R. (2001)** Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* **57**, 577–586.
- Nelson M. E., Kuryatov A., Choi C. H., Zhou Y., Lindstrom J. (2003)** Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **63**, 332–341.
- Newton A. C. (1995a)** Protein Kinase C: seeing two domains. *Current Biology* **5**, 973–976.
-

-
- Newton A. C. (1995b)** Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**, 28495–28498.
- Nguyen T. M. D., Combarrous Y., Praud C., Duittoz A., Blesbois E. (2016)** Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs) effects on AMP-activated protein kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions. *PLoS One* **11**, e0147559.
- Nishizuka Y. (1992)** Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607–614.
- Noblin D. J., Bertekap R. L. J., Burford N. T., Hendricson A., Zhang L., Knox R., Banks M., O'Connell J., Alt A. (2012)** Development of a high-throughput calcium flux assay for identification of all ligand types including positive, negative, and silent allosteric modulators for G protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol* **10**, 457–467.
- Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa S. (1982)** Primary structure of α -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* **299**, 793–797.
- Ogoshi F., Yin H. Z., Kuppumbatti Y., Song B., Amindari S., Weiss J. H. (2005)** Tumor necrosis-factor- α (TNF- α) induces rapid insertion of Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. *Exp Neurol* **193**, 384–393.
- Olsen J. A., Balle T., Gajhede M., Ahring P. K., Kastrup J. S. (2014)** Molecular recognition of the neurotransmitter acetylcholine by an acetylcholine binding protein reveals determinants of binding to nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* **9**, e91232.
- Olsen R. W., Meunier J. C., Changeux J. P. (1972)** Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* by affinity chromatography. *FEBS Lett* **28**, 96–100.
- Orr G. L., Orr N., Hollingworth R. M. (1990)** Localization and pharmacological characterization of nicotinic-cholinergic binding sites in cockroach brain using α - and neuronal bungarotoxin. *Insect Biochemistry* **20**, 557–566.
- Orr N., Shaffner A. J., Richey K., Crouse G. D. (2009)** Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **95**, 1–5.
- Orr N., Shaffner A. J., Watson G. B. (1997)** Pharmacological characterization of an epibatidine binding site in the nerve cord of *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **58**, 183–192.
- Park K. M., Yule D. I., Bowers W. J. (2008)** Tumor necrosis factor- α potentiates intraneuronal Ca^{2+} signaling via regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* **283**, 33069–33079.
-

-
- Pavot P., Carbognin E., Martin J.-R. (2015)** PKA and cAMP/CNG channels independently regulate the cholinergic Ca²⁺-response of *Drosophila* mushroom body neurons. *eNeuro* **2**.
- Peng W., Zhang Y., Zhu W., Cao C.-M., Xiao R.-P. (2009)** AMPK and TNF- α at the crossroad of cell survival and death in ischaemic heart. *Cardiovasc Res* **84**, 1–3.
- Perry T., Chan J. Q., Batterham P., Watson G. B., Geng C., Sparks T. C. (2012)** Effects of mutations in *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits on sensitivity to insecticides targeting nicotinic acetylcholine receptors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **102**, 56–60.
- Perry T., Heckel D. G., McKenzie J. A., Batterham P. (2008)** Mutations in D α 1 or D β 2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 520–528.
- Perry T., McKenzie J. A., Batterham P. (2007)** A D α 6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol* **37**, 184–188.
- Plazas P. V., De Rosa M. J., Gomez-Casati M. E., Verbitsky M., Weisstaub N., Katz E., Bouzat C., Elgoyhen A. B. (2005)** Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the α 9 α 10 nicotinic cholinergic receptor. *Br J Pharmacol* **145**, 963–974.
- Popot J. L., Changeux J. P. (1984)** Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev* **64**, 1162–1239.
- Puinean A. M., Foster S. P., Oliphant L., Denholm I., Field L. M., Millar N. S., Williamson M. S., Bass C. (2010)** Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet* **6**, e1000999.
- Puinean A. M., Lansdell S. J., Collins T., Bielza P., Millar N. S. (2013)** A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Neurochemistry* **124**, 590–601.
- Racioppi L., Means A. R. (2012)** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* **287**, 31658–31665.
- Ramirez-Latorre J., Yu C. R., Qu X., Perin F., Karlin A., Role L. (1996)** Functional contributions of α 5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* **380**, 347–351.
- Role L. W. (1992)** Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 254–262.
- Rübsamen H., Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. E., Hess G. P. (1978)** Characterization of calcium-binding sites of the purified acetylcholine receptor and identification of the calcium-binding subunit. *Biochemistry* **17**, 3818–3825.
- Sabatini B. L., Regehr W. G. (1996)** Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* **384**, 170–172.
-

-
- Salgado V. L. (2016)** Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Neurotoxicology* **56**, 188–195.
- Salgado V. L., Saar R. (2004)** Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J Insect Physiol* **50**, 867–879.
- Sansom M. S. (1995)** Ion-channel gating. Twist to open. *Curr Biol* **5**, 373–375.
- Sargent P. B. (1993)** The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* **16**, 403–443.
- Sattelle D. B., Buckingham S. D., Akamatsu M., Matsuda K., Pienaar I. S., Jones A. K., Sattelle B. M., Almond A., Blundell C. D. (2009)** Comparative pharmacology and computational modelling yield insights into allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **78**, 836–843.
- Sattelle D. B., Jones A. K., Sattelle B. M., Matsuda K., Reenan R., Biggin P. C. (2005)** Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **27**, 366–376.
- Sawruk E., Schloss P., Betz H., Schmitt B. (1990)** Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated α -subunit. *EMBO J* **9**, 2671–2677.
- Schann S., Mayer S., Franchet C., Frauli M., Steinberg E., Thomas M., Baron L., Neuville P. (2010)** Chemical switch of a metabotropic glutamate receptor 2 silent allosteric modulator into dual metabotropic glutamate receptor 2/3 negative/positive allosteric modulators. *J Med Chem* **53**, 8775–8779.
- Sciacaluga M., Moriconi C., Martinello K., Catalano M., Bermudez I., Stitzel J. A., Maskos U., Fucile S. (2015)** Crucial role of nicotinic $\alpha 5$ subunit variants for Ca^{2+} fluxes in ventral midbrain neurons. *FASEB J* **29**, 3389–3398.
- Séguéla P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J., Patrick J. (1993)** Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**, 596–604.
- Serezani C. H., Ballinger M. N., Aronoff D. M., Peters-Golden M. (2008)** Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 127–132.
- Sgard F., Fraser S. P., Katkowska M. J., Djamgoz M. B., Dunbar S. J., Windass J. D. (1998)** Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor α subunits from the insect pest *Myzus persicae*. *J Neurochem* **71**, 903–912.
- Shan T., Chen C., Ding Q., Chen X., Zhang H., Chen A., Shi X., Gao X. (2020)** Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in *Bradysia odoriphaga*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **165**, 104563.
-

-
- Shao Y.-M., Dong K., Zhang C.-X. (2007)** The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **8**, 324.
- Shimada S., Kamiya M., Shigetou S., Tomiyama K., Komori Y., Magara L., Ihara M., Matsuda K. (2020)** The mechanism of loop C-neonicotinoid interactions at insect nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ subunit predicts resistance emergence in pests. *Scientific Reports* **10**, 7529.
- Shimomura M., Yokota M., Ihara M., Akamatsu M., Sattelle D. B., Matsuda K. (2006)** Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. *Mol Pharmacol* **70**, 1255–1263.
- Shioda S., Yada T., Muroya S., Takigawa M., Nakai Y. (1997)** Nicotine increases cytosolic Ca^{2+} in vasopressin neurons. *Neurosci Res* **29**, 311–318.
- Sinakevitch I. G., Geffard M., Pelhate M., Lapied B. (1996)** Anatomy and targets of dorsal unpaired median neurones in the terminal abdominal ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol* **367**, 147–163.
- Sine S. M., Engel A. G. (2006)** Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**, 448–455.
- Smelt C. L. C., Sanders V. R., Newcombe J., Burt R. P., Sheppard T. D., Topf M., Millar N. S. (2018)** Identification by virtual screening and functional characterisation of novel positive and negative allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **139**, 194–204.
- Smit A. B., Brejc K., Syed N., Sixma T. K. (2003)** Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci* **998**, 81–92.
- Smit A. B., Syed N. I., Schaap D., Minnen J. van, Klumperman J., Kits K. S., Lodder H., et al. (2001)** A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **411**, 261–268.
- Song F., You Z., Yao X., Cheng J., Liu Z., Lin K. (2009)** Specific loops D, E and F of nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit may confer imidacloprid selectivity between *Myzus persicae* and its predatory enemy *Pardosa pseudoannulata*. *Insect Biochem Mol Biol* **39**, 833–841.
- Sparks T. C., Watson G. B., Loso M. R., Geng C., Babcock J. M., Thomas J. D. (2013)** Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pestic Biochem Physiol* **107**, 1–7.
- Stabel S., Parker P. J. (1991)** Protein kinase C. *Pharmacology & Therapeutics* **51**, 71–95.
- Südhof T. C. (2012)** Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011353.
-

-
- Suematsu E., Hirata M., Hashimoto T., Kuriyama H. (1984)** Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 481–485.
- Sumikawa K., Houghton M., Smith J. C., Bell L., Richards B. M., Barnard E. A. (1982)** The molecular cloning and characterisation of cDNA coding for the α subunit of the acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res* **10**, 5809–5822.
- Sun H., Liu Y., Li J., Cang X., Bao H., Liu Z. (2017)** The potential subunits involved in two subtypes of α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochem Mol Biol* **81**, 32–40.
- Sunahara R. K., Taussig R. (2002)** Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**, 168–184.
- Sutherland E. W. (1970)** On the biological role of cyclic AMP. *JAMA* **214**, 1281–1288.
- Sutton R. B., Sprang S. R. (1998)** Structure of the protein kinase C β phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca^{2+} . *Structure* **6**, 1395–1405.
- Swulius M. T., Waxham M. N. (2008)** Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2637–2657.
- Taillebois E., Beloula A., Quinchard S., Jaubert-Possamai S., Daguin A., Servent D., Tagu D., Thany S. H., Tricoire-Leignel H. (2014)** Neonicotinoid binding, toxicity and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* **9**, e96669.
- Taillebois E., Thany S. H. (2016)** Characterization of the nicotine acetylcholine receptor subunits in the cockroach *Periplaneta americana* mushroom bodies reveals a strong expression of $\beta 1$ subunit : involvement in nicotine-induced currents. *Arch Insect Biochem Physiol* **93**, 40–54.
- Taillebois E., Cartereau A., Jones A. K., Thany S. H. (2018)** Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **151**, 59–66.
- Tan J., Galligan J. J., Hollingworth R. M. (2007)** Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* **28**, 829–842.
- Taylor C. W., Tovey S. C. (2010)** IP_3 receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a004010.
- Thany S. H. (2009)** Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* **30**, 1045–1052.
- Thany S. H. (2011)** Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology* **60**, 587–592.
-

-
- Thany S. H., Courjaret R., Lapied B. (2008)** Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical α -bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci Lett* **438**, 317–321.
- Thany S. H., Lenaers G., Raymond-Delpech V., Sattelle D. B., Lapied B. (2007)** Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **28**, 14–22.
- Thomsen M. S., Zwart R., Ursu D., Jensen M. M., Pinborg L. H., Gilmour G., Wu J., Sher E., Mikkelsen J. D. (2015)** $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunits form heteromeric receptor complexes that are expressed in the human cortex and display distinct pharmacological properties. *PLoS One* **10**, e0130572.
- Tidow H., Nissen P. (2013)** Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS J* **280**, 5551–5565.
- Tomizawa M., Casida J. E. (1997)** [125 I]Azidonicotinoid photoaffinity labeling of insecticide-binding subunit of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor. *Neurosci Lett* **237**, 61–64.
- Tomizawa M., Casida J. E. (2005)** Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 247–268.
- Tomizawa M., Millar N. S., Casida J. E. (2005)** Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 1347–1355.
- Tong F., Gross A. D., Dolan M. C., Coats J. R. (2013)** The phenolic monoterpene carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. *Pest Manag Sci* **69**, 775–780.
- Toyoshima C., Nomura H., Sugita Y. (2003)** Crystal structures of Ca^{2+} -ATPase in various physiological states. *Ann N Y Acad Sci* **986**, 1–8.
- Turner T. J. (2004)** Nicotine enhancement of dopamine release by a calcium-dependent increase in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J Neurosci* **24**, 11328–11336.
- Unwin N. (2005)** Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* **346**, 967–989.
- Unwin N., Fujiyoshi Y. (2012)** Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *J Mol Biol* **422**, 617–634.
- Unwin N., Miyazawa A., Li J., Fujiyoshi Y. (2002)** Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the α subunits. *J Mol Biol* **319**, 1165–1176.
- Valera S., Ballivet M., Bertrand D. (1992)** Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9949–9953.
-

-
- Vandesquille M., Baudonnat M., Decorte L., Louis C., Lestage P., Béracochéa D. (2013)** Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging* **34**, 1599–1609.
- Verkhatsky A. (2002)** The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium* **32**, 393–404.
- Verkhatsky A., Shmigol A. (1996)** Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium* **19**, 1–14.
- Vermehren A., Qazi S., Trimmer B. A. (2001)** The nicotinic alpha subunit MARA1 is necessary for cholinergic evoked calcium transients in *Manduca* neurons. *Neurosci Lett* **313**, 113–116.
- Vernallis A. B., Conroy W. G., Berg D. K. (1993)** Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits while maintaining subunit segregation among receptor subtypes. *Neuron* **10**, 451–464.
- Vernino S., Amador M., Luetje C. W., Patrick J., Dani J. A. (1992)** Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **8**, 127–134.
- Vo D. T., Hsu W. H., Abu-Basha E. A., Martin R. J. (2010)** Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **33**, 315–322.
- Wada K., Ballivet M., Boulter J., Connolly J., Wada E., Deneris E., Swanson L., Heinemann S., Patrick J. (1988)** Functional expression of a new pharmacological subtype of brain nicotinic acetylcholine receptor. *Science (New York, N.Y.)* **240**, 330–334.
- Walsh M. P. (1983)** Calmodulin and its roles in skeletal muscle function. *Can Anaesth Soc J* **30**, 390–398.
- Wan Y., Yuan G., He B., Xu B., Xie W., Wang S., Zhang Y., Wu Q., Zhou X. (2018)** Foc $\alpha 6$, a truncated nAChR subunit, positively correlates with spinosad resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Insect Biochem Mol Biol* **99**, 1–10.
- Wang B.-W., Liao W.-N., Chang C.-T., Wang S.-J. (2006)** Facilitation of glutamate release by nicotine involves the activation of a Ca^{2+} /calmodulin signaling pathway in rat prefrontal cortex nerve terminals. *Synapse* **59**, 491–501.
- Wang G.-J., Guo L.-Y., Wang H.-X., Yao Y.-S. (2017)** IP₃R and RyR calcium channels are involved in neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Transl Res* **9**, 343–354.
- Wang H.-T., Tsai C.-L., Chen M.-E. (2018)** Nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 6$ associated with spinosad resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pestic Biochem Physiol* **148**, 68–73.
-

-
- Wang J., Ma H., Zuo Y., Yang Y., Wu Y. (2020a)** CRISPR-mediated gene knockout reveals nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit $\alpha 6$ as a target of spinosyns in *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science* **76**, 2925–2931.
- Wang X., Ma Y., Wang F., Yang Y., Wu S., Wu Y. (2020b)** Disruption of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ mediated by CRISPR/Cas9 confers resistance to spinosyns in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science* **76**, 1618–1625.
- Watson G. B., Chouinard S. W., Cook K. R., Geng C., Gifford J. M., Gustafson G. D., Hasler J. M., et al. (2010)** A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 376–384.
- Watson G. B., Loso M. R., Babcock J. M., Hasler J. M., Letherer T. J., Young C. D., Zhu Y., Casida J. E., Sparks T. C. (2011)** Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochem Mol Biol* **41**, 432–439.
- Weisstaub N., Vetter D. E., Elgoyhen A. B., Katz E. (2002)** The $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* **167**, 122–135.
- Westerlund A. M., Delemotte L. (2018)** Effect of Ca^{2+} on the promiscuous target-protein binding of calmodulin. *PLoS Comput Biol* **14**, e1006072.
- Wilson G. G., Karlin A. (1998)** The location of the gate in the acetylcholine receptor channel. *Neuron* **20**, 1269–1281.
- Wilson G. G., Karlin A. (2001)** Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 1241.
- Windley M. J., Vetter I., Lewis R. J., Nicholson G. M. (2017)** Lethal effects of an insecticidal spider venom peptide involve positive allosteric modulation of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **127**, 224–242.
- Wu T.-Y., Smith C. M., Sine S. M., Levandoski M. M. (2008)** Morantel allosterically enhances channel gating of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 2$ receptors. *Mol Pharmacol* **74**, 466–475.
- Wu Z., Cheng H., Jiang Y., Melcher K., Xu H. E. (2015)** Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* **36**, 895–907.
- Xu G., Wu S.-F., Teng Z.-W., Yao H.-W., Fang Q., Huang J., Ye G.-Y. (2017)** Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Sci* **24**, 371–384.
- Yamashita T., Isa T. (2003)** Ca^{2+} -dependent inward current induced by nicotinic receptor activation depends on Ca^{2+} /calmodulin-CaMKII pathway in dopamine neurons. *Neurosci Res* **47**, 225–232.
-

-
- Yang H., Sun Q., Liang Y., Jiang Y., Li R., Ye J. (2018)** Antinociception of the spirocyclopiperazinium salt compound LXM-15 via activating $\alpha 7$ nAChR and M4 mAChR and inhibiting CaMKII α /cAMP/CREB/CGRP signalling pathway in mice. *Regul Toxicol Pharmacol* **94**, 108–114.
- Yao X., Song F., Chen F., Zhang Y., Gu J., Liu S., Liu Z. (2008)** Amino acids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor β subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 834–840.
- Yoon J.-Y., Jung S.-R., Hille B., Koh D.-S. (2014)** Modulation of nicotinic receptor channels by adrenergic stimulation in rat pinealocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C726-735.
- Yoshimura R. F., Hogenkamp D. J., Li W. Y., Tran M. B., Belluzzi J. D., Whittemore E. R., Leslie F. M., Gee K. W. (2007)** Negative allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors blocks nicotine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 907–915.
- Yu X., Wang M., Kang M., Liu L., Guo X., Xu B. (2011)** Molecular cloning and characterization of two nicotinic acetylcholine receptor β subunit genes from *Apis cerana cerana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **77**, 163–178.
- Zhang C., Wang Z., Dong J., Pan R., Qiu H., Zhang J., Zhang P., Zheng J., Yu W. (2014a)** Bilirubin modulates acetylcholine receptors in rat superior cervical ganglionic neurons in a bidirectional manner. *Sci Rep* **4**, 7475.
- Zhang J.-L., Xu Y., Shen J. (2014b)** Cordycepin inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis factor (TNF)- α production via activating amp-activated protein kinase (AMPK) signaling. *Int J Mol Sci* **15**, 12119–12134.
- Zhang J.-Y., Pan M.-H., Sun Z.-Y., Huang S.-J., Yu Z.-S., Liu D., Zhao D.-H., Lu C. (2010)** The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **11**, 611.
- Zhang Y., Wang X., Yang B., Hu Y., Huang L., Bass C., Liu Z. (2015)** Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J Neurochem* **135**, 686–694.
- Zhu Y., Loso M. R., Watson G. B., Sparks T. C., Rogers R. B., Huang J. X., Gerwick B. C., et al. (2011)** Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J Agric Food Chem* **59**, 2950–2957.
- Zimmer C. T., Garrood W. T., Puinean A. M., Eckel-Zimmer M., Williamson M. S., Davies T. G. E., Bass C. (2016)** A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **73**, 62–69.
- Zuo Y., Xue Y., Lu W., Ma H., Chen M., Wu Y., Yang Y., Hu Z. (2020)** Functional validation of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha 6$ as a target of spinosyns in *Spodoptera exigua* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Pest Management Science* **76**, 2415–2422.
-

ANNEXES

Annexe I : Cartereau *et al.*, 2018

Neurotoxicology 67 (2018) 206–214



Contents lists available at ScienceDirect

Neurotoxicology

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

Full Length Article

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



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Insect
Pyrethroid
Neonicotinoid
Insecticide
Combination

ABSTRACT

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

1. Introduction

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

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

The physiological effect of pesticides was studied using the

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

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

¹ Equal contribution.

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

Received 1 February 2018; Received in revised form 10 May 2018; Accepted 5 June 2018
Available online 08 June 2018

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

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

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

2. Materials and methods

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

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

2.2. Electrophysiological recordings

2.2.1. Mannitol-gap recordings

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

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

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

2.2.2. Patch clamp recordings

Permethrin and dinotefuran-induced currents were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under voltage-clamp mode. Membrane potential and input membrane resistance were recorded under current-clamp mode. Ejection pipettes and patch-clamp electrodes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC150T-10; Clark Electromedical Instruments Harvard Apparatus, UK) using a P-97 model puller (Sutter Instruments, USA). Patch pipettes had resistances ranging from 1 to 1.2 MΩ when filled with internal pipette solution (see composition below). The liquid junction potential between extracellular and intracellular solutions was always corrected before the formation of a gigaohm seal (> 1 GΩ). Signals were recorded with an Axopatch 200A (Axon instruments, USA). Currents induced were displayed on a computer with software control pClamp (version 10.0, Axon Instruments, USA) connected to a digitizer (DIGIDATA 1322, Axon Instruments, USA). DUM neuron somata were voltage-clamp at a steady-state holding potential of −50 mV. Experiments were carried out at room temperature (20–22 °C).

2.3. Compounds

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

2.4. Statistical analysis

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

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

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

3. Results

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

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

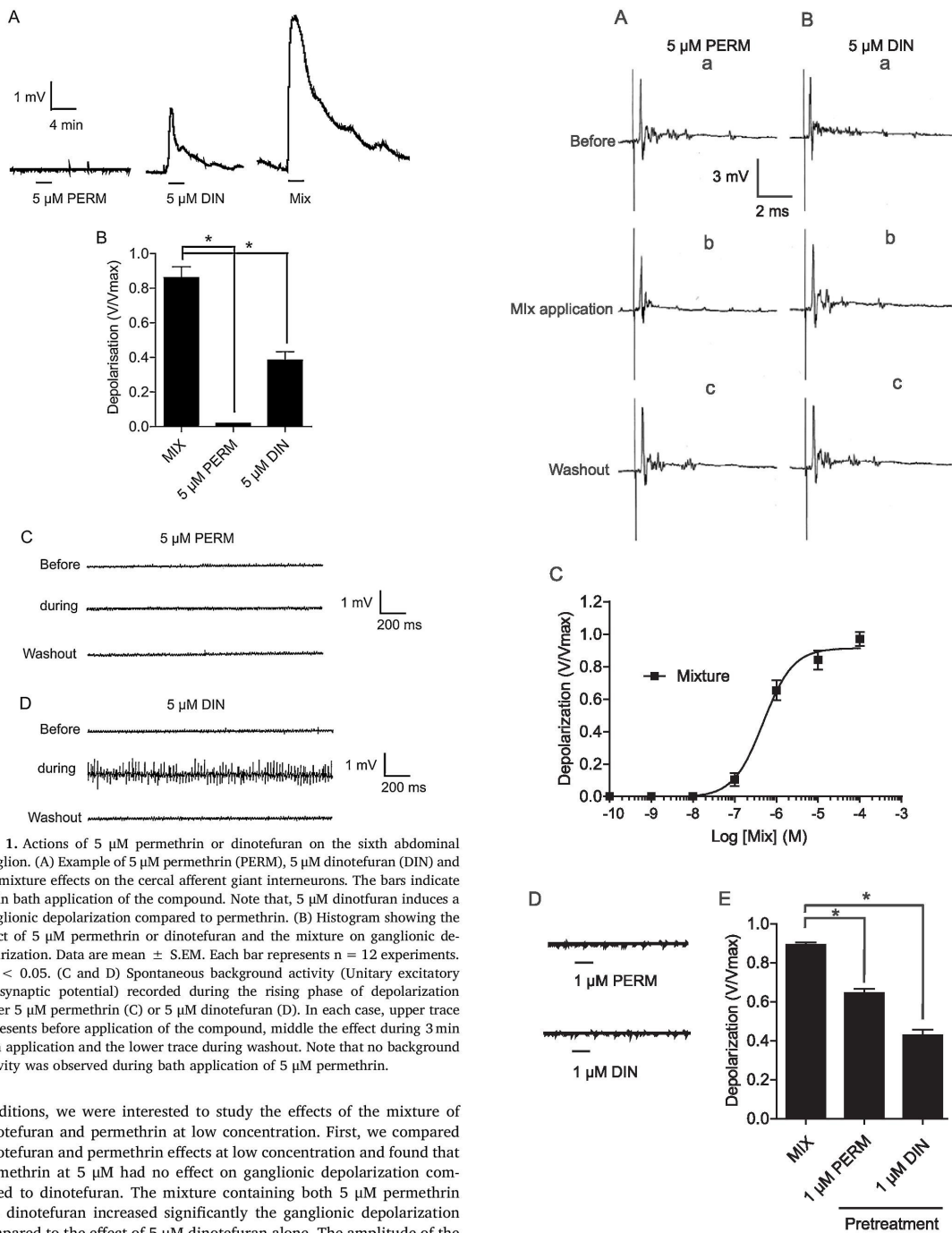


Fig. 1. Actions of 5 μ M permethrin or dinotefuran on the sixth abdominal ganglion. (A) Example of 5 μ M permethrin (PERM), 5 μ M dinotefuran (DIN) and the mixture effects on the cercal afferent giant interneurons. The bars indicate 3 min bath application of the compound. Note that, 5 μ M dinotefuran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

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

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

Table 1
Effect of 5 μ M permethrin or dinotefuran on excitatory postsynaptic potential recorded after electrical stimulation of the nerve XI. In each experimental condition (Permethrin or dinotefuran), identical letters indicate no significant difference ($p < 0.05$). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.

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

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

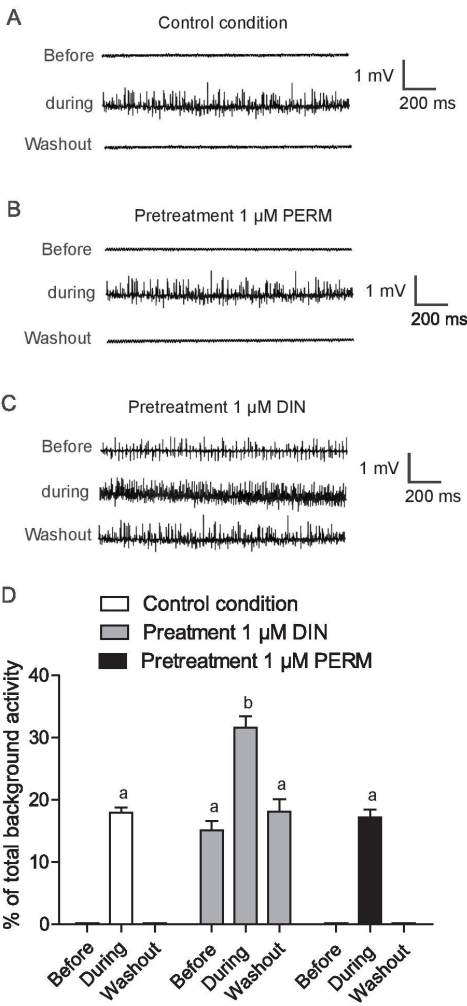


Fig. 3. Effect of the mixture containing 5 μ M dinotefuran and 5 μ M permethrin on background spontaneous activity after pretreatment with 1 μ M dinotefuran or permethrin. (A) Effect of the mixture on excitatory background activity recorded at the maximum ganglionic depolarization. (Aa) Before the application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

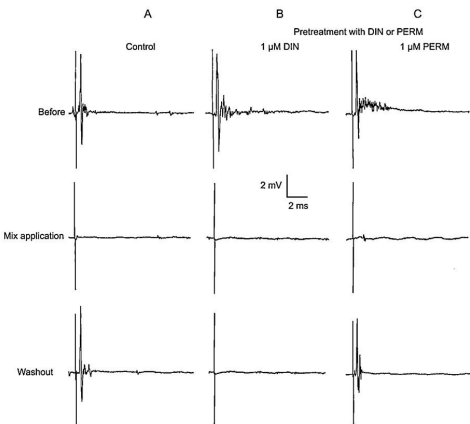


Fig. 4. Effects of the mixture on excitatory postsynaptic potentials obtained after electrical stimulation of the nerve XI after pretreatment of the sixth abdominal ganglion with 1 μ M dinotefuran or permethrin. (A) The effect of the mixture was first recorded using saline solution (Control condition).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

Table 2
Effect of the mixture on excitatory postsynaptic potential recorded under pretreatment with 1 μ M permethrin (PERM) or dinotefuran (DIN). Data are mean $\pm$ S.E.M. of $n = 12$ experiments in each condition. Identical letters indicate no significant difference.

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

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

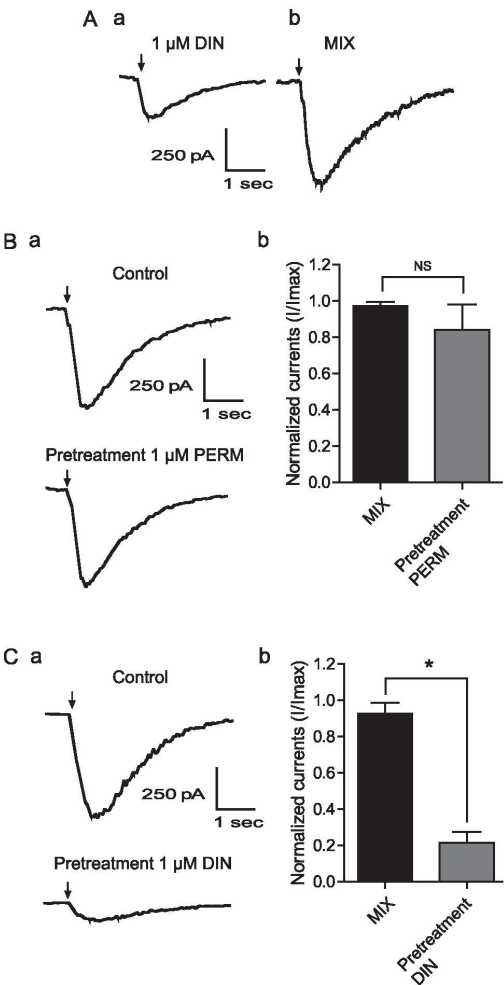


Fig. 5. Currents recorded on nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach DUM neurons. (A) Example of currents induced by 1 μ M dinotefuran (Aa) or the mixture (Ab) of both 1 μ M permethrin and dinotefuran. (B) Effects of 5 min pretreatment with 1 μ M permethrin (PERM). (Ba) Typical example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

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

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

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

4. Discussion

4.1. Effects of the mixture containing pyrethroids and neonicotinoids

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

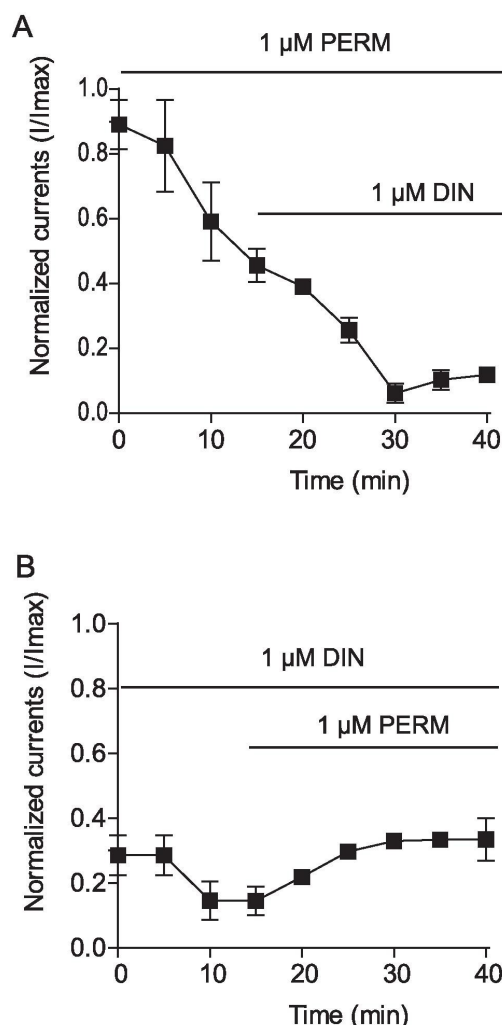


Fig. 6. Time-dependent effect of the mixture during bath application of 1 μ M permethrin or dinotefuran. (A) Mixture was continuously bathed with 1 μ M permethrin, resulting to a decrease of mixture-induced currents. The current amplitude continuously decreases despite application of 1 μ M dinotefuran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

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

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

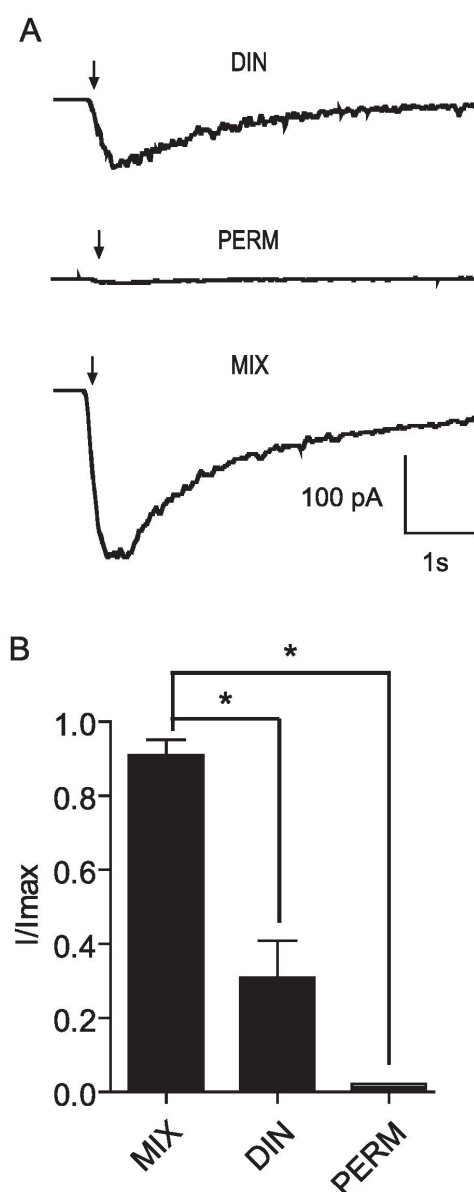


Fig. 7. Effect of dinotefuran, permethrin and the mixture on cockroach nAChRs expressed on Kenyon cells. (A) Currents induced by 1 μ M dinotefuran (DIN), 1 μ M permethrin (PERM) and the mixture (MIX) of 1 μ M permethrin and 1 μ M dinotefuran. Arrows indicate 300 ms pulse (15 psig) duration. (B) Histograms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

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

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

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

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

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

Conflict of interest

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

Acknowledgements

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

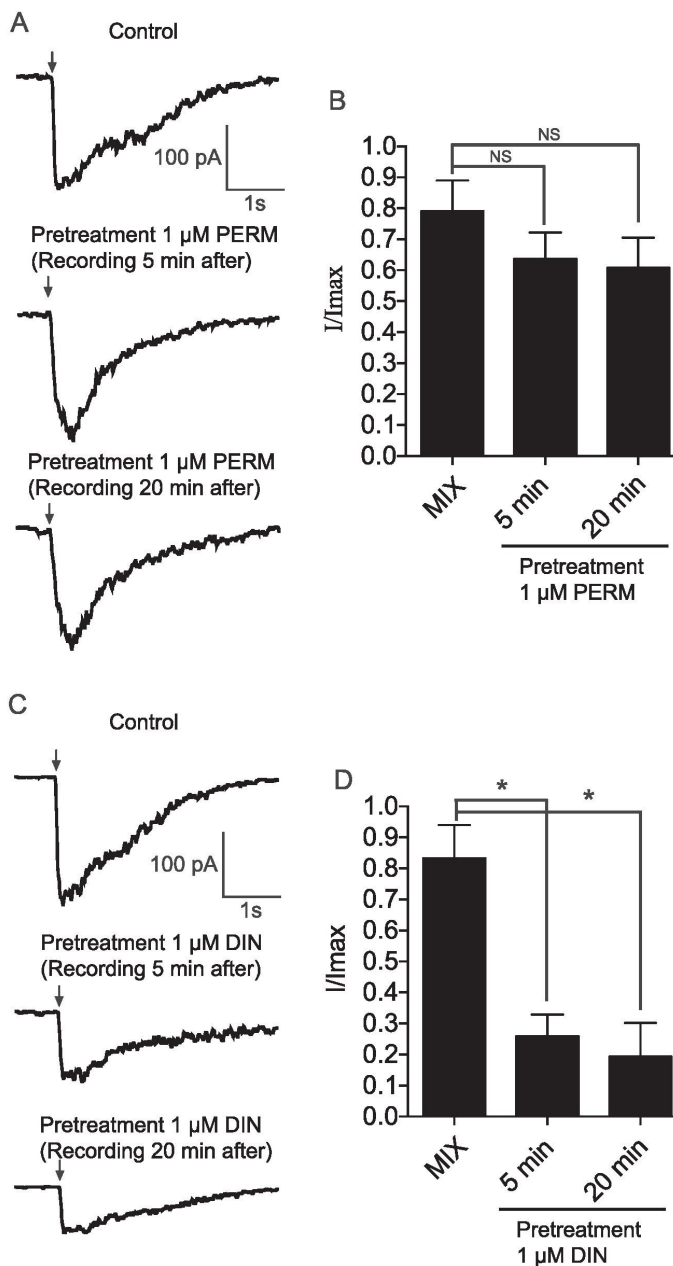


Fig. 8. Pretreatment of Kenyon cells with 1 μ M permethrin (PERM) or 1 μ M dinotefuran (DIN). (A) The mixture-induced currents recorded at -50 mV holding potential in control condition (Control) and 5 min and 20 min during pretreatment with 1 μ M permethrin (PERM). (B) Histograms summarize the data obtained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

References

- Blagburn, J.M., Sattelle, D.B., 1987. Nicotinic acetylcholine receptors on a cholinergic nerve terminal in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol. A* 161 (2), 215–225.
- Breckenridge, C.B., Holden, L., Sturgess, N., Weiner, M., Sheets, L., Sargent, D., Soderlund, D.M., Choi, J.S., Symington, S., Clark, J.M., Burr, S., Ray, D., 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neuro Toxicol.* 30 (Suppl 1), S17–31.
- Buckingham, S., Lapied, B., Corrone, H., Sattelle, F., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200 (Pt 21), 2685–2692.
- Callec, J.J., 1974. In: Treherne, J.E. (Ed.), *Synaptic Transmission in the Central Nervous System of Insects*. American Elsevier ed., North-holland.
- Callec, J.J., Boistel, J., 1966. Phenomena of excitation and inhibition at the level of the last abdominal ganglion of the cockroach, *periplaneta americana* L. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 160 (12), 2418–2424.
- Callec, J.J., Sattelle, D.B., 1973. A simple technique for monitoring the synaptic actions of pharmacological agents. *J. Exp. Biol.* 59 (3), 725–738.
- Callec, J.J., Sattelle, D.B., Hue, B., Pelhate, M., 1980. Central synaptic actions of pharmacological agents in insects: oil-gap and mannitol-gap studies. In: Sherwood, M. (Ed.), *Neurotox* 79. Plenum Press, New York, pp. 93–100.

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

Annexe II : Houchat *et al.*, 2020

International Journal of
*Environmental Research
and Public Health*



Review

An Overview on the Effect of Neonicotinoid Insecticides on Mammalian Cholinergic Functions through the Activation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors

Jean-Noël Houchat, Alison Cartereau, Anaïs Le Mauff, Emiliane Taillebois and
Steeve H. Thany * 

University of Orleans, LBLGC USC INRAE 1328. 1 rue de Chartres, 45060 Orléans, France;
jean-noel.houchat@univ-orleans.fr (J.-N.H.); alison.cartereau@univ-orleans.fr (A.C.);
anaïs.le-mauff@univ-orleans.fr (A.L.M.); emiliane.taillebois@univ-orleans.fr (E.T.)

* Correspondence: steeve.thany@univ-orleans.fr

Received: 1 April 2020; Accepted: 30 April 2020; Published: 6 May 2020



Abstract: Neonicotinoid insecticides are used worldwide and have been demonstrated as toxic to beneficial insects such as honeybees. Their effectiveness is predominantly attributed to their high affinity for insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Mammalian neuronal nAChRs are of major importance because cholinergic synaptic transmission plays a key role in rapid neurotransmission, learning and memory processes, and neurodegenerative diseases. Because of the low agonist effects of neonicotinoid insecticides on mammalian neuronal nAChRs, it has been suggested that they are relatively safe for mammals, including humans. However, several lines of evidence have demonstrated that neonicotinoid insecticides can modulate cholinergic functions through neuronal nAChRs. Major studies on the influence of neonicotinoid insecticides on cholinergic functions have been conducted using nicotine low-affinity homomeric $\alpha 7$ and high-affinity heteromeric $\alpha 4\beta 2$ receptors, as they are the most abundant in the nervous system. It has been found that the neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin can activate the release of dopamine in rat striatum. In some contexts, such as neurodegenerative diseases, they can disturb the neuronal distribution or induce oxidative stress, leading to neurotoxicity. This review highlights recent studies on the mode of action of neonicotinoid insecticides on mammalian neuronal nAChRs and cholinergic functions.

Keywords: ACh; cholinergic functions; nicotinic receptors; modulation; neonicotinoid insecticides

1. Introduction

Neonicotinoid insecticides have contributed to improvements in global agricultural productivity for decades by controlling insects and plant pathogens, providing higher crop yields and improved product quality. Over the last ten years, the extensive use of neonicotinoid insecticides has been criticized due to the risks associated with their toxicity to humans and other non-target species. Neonicotinoid insecticides include several compounds, such as imidacloprid (IMI), acetamiprid (ACE), clothianidin (CLT), and thiamethoxam (TMX), which act on neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). They are considered as partial or full agonists of insect neuronal nAChRs and poor agonists of mammalian receptors. Full agonists are compounds that, at saturation concentrations, activate the channels to a near 100% open probability. Thus, ACh is a full agonist of nAChRs. Consequently, partial agonists will evoke less total current than full agonists and occupy the same binding site. They can also inhibit receptor activation by endogenous or exogenous full agonists. Thus, the same compound can be a full agonist of one subtype of nAChRs, and a partial agonist or antagonist of another subtype.

Moreover, nAChRs are considered as prototypical allosteric proteins that undergo conformational changes upon the binding of a ligand [1–3]. Agonists bind to the ligand-binding or orthosteric site on the ligand-binding domain. Allosteric modulators are pharmacological compounds that bind to the receptor at a distinct site from the ligand-binding domain and change the free energy associated with transitions between functional states. This leads to the activation (positive allosteric modulators) or reduction of the ligand-evoked response (negative allosteric modulators) (Figure 1). The cholinergic system in mammals has been studied extensively. It is known that it provides diffuse innervation to the entire brain, driving and modulating a wide variety of behaviors. ACh is released from presynaptic cholinergic axon terminals and binds to the extracellular ligand-binding domain of the nAChRs. Thus, through neuronal nAChRs, ACh regulates processes such as cell excitability and neuronal integration. These processes influence physiological functions, leading to the involvement of neuronal nAChRs in many diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease [4–7]. Given the role of neuronal nAChRs in both insects and mammals, few studies have described the involvement of neonicotinoid insecticides on mammalian cholinergic functions through neuronal nAChRs. Therefore, in this work, we aim to provide an overview of recent studies on the involvement of neonicotinoid insecticides on neuronal cholinergic functions.

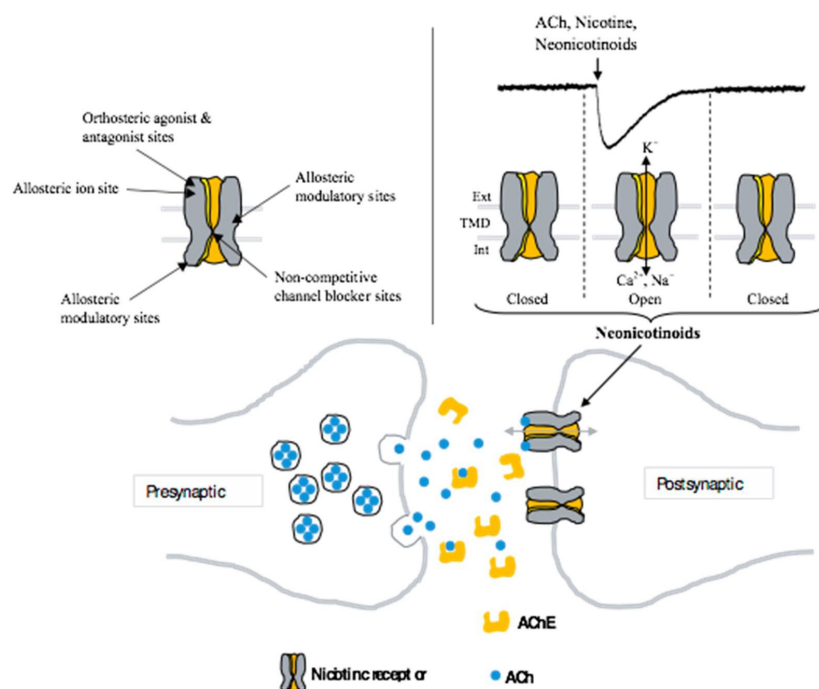


Figure 1. Representation of the cholinergic synapse and ion channel selectivity. The neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are located at the postsynaptic terminal. Agonist, antagonist, non-competitive channel blocker, and allosteric sites are represented in the cut-away view showing four of the five subunits forming the pentameric receptor-channel complex. Ext: Extracellular; TMD: transmembrane domain; Int: intracellular.

2. Diversity of Mammalian Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors

2.1. Multiple Receptor Subtypes and Different Pharmacological Properties

Mammalian neuronal nAChRs are of significant importance because cholinergic synaptic transmission plays a key role in rapid neurotransmission, learning, and memory processes. Neuronal nAChRs are composed of 17 homologous genes coding for nAChR subunits [8,9]. These subunits can be divided into two subgroups: the muscle-type receptor composed of a heteromeric receptor ($\alpha 1\beta\gamma(\epsilon)\delta$), and the neuronal-type receptor, which is more complex in terms of the number of subunits and combinations. They incorporate different subunits and are composed of: (1) Homomeric receptors which are comprised of one subunit, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, or $\alpha 10$, which can form an $\alpha 9\alpha 10$ heteromeric receptor; (2) heteromeric receptors, which are formed by subunits $\alpha 2$ – $\alpha 6$ in combination with $\beta 2$ – $\beta 4$. Consequently, multiple receptor subtypes can be formed with different stoichiometry, subunit combinations, and pharmacological properties [10]. Thus, when opened, neuronal nAChRs are cation-selective channels that permit the flow of sodium (Na^+), potassium (K^+), and calcium (Ca^{2+}) ions across the membrane (Figure 1). A net influx of cations through the channel pore depolarizes the cell membrane and increases neuronal excitability. The impact of neuronal nAChR activation on cholinergic function depends on subunit composition because each nAChR subtype has unique activation, agonist selectivity, channel conductance, and desensitization properties. The vast majority of subunit combinations have not been studied, and a significant number of publications on neonicotinoid modes of action refer to the low-affinity homomeric $\alpha 7$ and high-affinity heteromeric $\alpha 4\beta 2$ receptors because they are the most abundant in the nervous system [11]. For heteromeric receptors such as $\alpha 4\beta 2$, the ratio of subunits forming the receptors may have an influence on the pharmacological properties of the receptors [12–17]. For example, receptors with the composition $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ exhibit higher single-channel conductance and a shorter mean open lifetime than receptors with the composition $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ [16]. Moreover, long-term exposure of $\alpha 4\beta 2$ receptors to nicotine causes an increase in the number of binding sites at the cell surface, known as up-regulation, whereas $\alpha 7$ desensitizes rapidly in response to high agonist concentrations [18] and has a high relative permeability to calcium [19,20]. Indeed, it is known that nicotine has a low affinity for $\alpha 7$ receptors, and high doses of nicotine may be required for the regulation of the $\alpha 7$ receptor. The different modulatory effect of nicotine on both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs suggests that different mechanisms may activate the up-regulation of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$.

2.2. Neonicotinoids Are Poor Activators of Mammalian Neuronal nAChRs

The discovery of neonicotinoid insecticides from a lead compound, leading to nithiazine, then followed by the synthesis of IMI, has been described in various degrees [21–23]. Nicotine and neonicotinoids have some structural similarities (especially IMI), and act on the same receptor subtype but in a different way. Interactions between neuronal nAChRs and neonicotinoids are studied by measuring inward currents caused by neonicotinoids. It has been recognized that neonicotinoids activate insect neuronal nAChRs as agonists in different ways [24]. As one of the most widely used neonicotinoid insecticides in the world, IMI is known as a partial agonist, while CLT and ACE are “super” agonists. In contrast, TMX is a poor agonist, despite being able to activate synaptic activity [25]. Unfortunately, there are few studies relating to the mode of action of neonicotinoid insecticides on mammalian neuronal nAChRs. Using clonal rat pheochromocytoma (PC12) cells, Nagata et al. demonstrated that IMI weakly activated nAChRs with conductance states identical to those of ACh-generated currents [26]. Moreover, using a single-channel patch-clamp method, they found that co-application of both IMI and ACh resulted in a decrease in the mean open time and mean burst duration of the currents of main conductance states, compared with those induced by ACh alone [26]. Ihara et al. found that IMI, nitenpyram (NTP), and CH-IMI (the nitromethylene analog of IMI), all induced inward currents which were rapidly desensitized. However, IMI and NTP were partial agonists on the $\alpha 7$, whereas CH-IMI and DN-IMI (the desnitro derivative of IMI) were full agonists because their currents were closed to that of the ACh [27]. Similarly, on the $\alpha 4\beta 2$ receptors,

it was found that IMI, CH-IMI, and NTP were inactive as agonists, whereas DN-IMI—which lacks the nitro group—was a full agonist [27]. The weak action of neonicotinoids on the $\alpha 4\beta 2$ receptor was attributed in part to the $\beta 2$ subunit lacking basic residues in loop D. This led to the idea that “insect-selective” residues confer neonicotinoid sensitivity by direct interactions or changes in the α subunit conformations [27]. Overall, this poor agonist action of neonicotinoids on $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs explains the lack of substantial data concerning the effect of these compounds on other mammalian nAChRs, considering their diversity within the mammalian nervous system.

3. Detoxification Mechanisms in Mammals in Regards to Neonicotinoid Sensitivity

The higher sensitivity of insects to neonicotinoid insecticides relative to mammals may be due to several factors. Firstly, it may relate to enzymatic detoxification mechanisms, which are important considering that the metabolite will not affect the receptor target. In this case, it has been considered that changes in xenobiotic-metabolic enzyme expression, and particularly the overexpression of cytochrome P450, are associated with increased neonicotinoid resistance in insects [28–34]. Thus, the toxicity of neonicotinoids in insects could be explained as a lack of, or decrease in, the physiological activity of detoxifying enzymes [35,36]. This difference was found between the bees *Apis mellifera* and *Apis cerana*, in which it was demonstrated that *A. cerana* was more sensitive to IMI and CLT compared to *A. mellifera*, in part because glutathione-S-transferase activity was significantly higher in *A. mellifera* [36]. Unfortunately, no study refers to the effectiveness of these enzymatic mechanisms in mammals with regards to neonicotinoid resistance or sensitivity. Considerable efforts have been made to identify neonicotinoid insecticide metabolism in mammals [37–43]. Human CYP450 enzymes, and in particular, CYP3A4, 2C19, and 2B6, have been found to convert TMX to CLT. CYP3A4, 2C19, and 2A6 metabolized CLT to desmethyl-CLT, and CYP2C19 converted TMX to desmethyl-TMX [42]. These enzymes were involved with considerable amounts of neonicotinoid substrates, which increased or decreased in different parts of the mammalian body, such as the liver and brain. In other studies, it was considered that because of this enzymatic activity, neonicotinoids such as TMX could be hepatotoxic and hepatocarcinogenic [44–46]. Consequently, the complex activity of detoxifying enzymes in mammals is no longer associated with their ability to provide resistance to neonicotinoids, but with their capacity to increase toxicity. It was also proposed that insecticides are more effective at the ambient temperature of insects (around 15–20 °C) than that of mammals (if we consider 36 °C as a reference temperature). However, this hypothesis seems to have been challenged by findings that neonicotinoids show significantly lower efficacy at low temperatures (between 14 and 22 °C) when used to manage the *Drosophila suzukii* (Matsumura) [47]. Acute toxic assays on aquatic insects such as the mayfly *Isonychia bicolor* demonstrated an increase in IMI uptake with increasing environmental temperatures [48]. According to these studies, it appears that an increase in environmental temperature was more effective as a factor inducing physiological variations, leading to neonicotinoid toxicity in the insects. Indeed, Mao et al. proposed that the sensitivity of *Nilaparvata lugens* to NTP and other insecticides increased significantly when the temperature changed from 18 to 36 °C. They also found that this increase in sensitivity was correlated to a decrease in cytochrome P450 activity [49]. Their latter observation appears more comprehensive considering that a great proportion of mammals, including humans, have a temperature around 36 °C, and that a decrease in detoxifying enzyme activities will result in the activation of the neonicotinoid targets. Thirdly, if we agree that most neonicotinoids undergo metabolic modifications at multiple sites in both insects and mammals, we must presume that the mechanisms by which neonicotinoids could be toxic to mammals are predominantly associated with their neuronal targets, the nAChR subtypes. Thus, two hypotheses can be made: (i) neonicotinoids will directly activate neuronal nAChRs as agonists, leading to excitation of the cholinergic system; (ii) neonicotinoids are not able to activate (or poorly activate) mammalian neuronal nAChRs at a binding site and will be considered as modulators. Thus, much of the remaining knowledge concerning the toxic effect of neonicotinoids should be considered in regard to their modulatory activity on mammalian cholinergic function and neuronal nAChRs.

4. Alterations of Cholinergic Functions

4.1. Modulation of Mammalian Neuronal nAChR Function

The major problem found with neonicotinoid insecticides is to always consider them as agonists of neuronal nAChRs (Figure 2). Indeed, despite neonicotinoids being poor activators of neuronal nAChRs, several studies have demonstrated that they can interact with nAChR agonists [50–52]. In a previous study, Matsuda et al. found that the responses of $\alpha 4\beta 2$ to ACh were potentiated by IMI [53]. Toshima et al. proposed that ACh-evoked currents through chicken $\alpha 4\beta 2$ receptors can be potentiated by CLT and IMI [52]. To address the mechanism of potentiation, they studied the effect that co-application of IMI and CLT had on the concentration-response curve of ACh. In the presence of IMI and CLT, the ACh concentration-response curve for $\alpha 4\beta 2$ was shifted to the left, whereas thiacloprid (THC) shifted the curve to the right, and was also able to inhibit ACh-evoked currents [52]. These results demonstrated that IMI, CLT, and THC have differential action on mammalian neuronal nAChRs, which may be due to their activity on a particular site in the nAChRs [54]. Thus, we propose that the first effect of neonicotinoids on mammalian neuronal nAChRs is to disrupt nAChR responses to the endogenous ligand, ACh. Exposure of HEK cells expressing human $\alpha 4\beta 2$ receptors to CLT and IMI showed inward currents of low amplitudes. However, IMI strongly reduced ACh responses, whereas CLT enhanced the responses. This difference was associated with the subunit stoichiometry of $\alpha 4\beta 2$ receptors containing three α subunits rather than two α subunits (as with IMI), and CLT inhibited ACh-evoked currents [50]. One of the major questions has been to demonstrate whether a similar effect would be seen with a homomeric receptor where the fifth position is occupied by the same subunit. Recently, using $\alpha 7$ homomeric nAChRs, we demonstrated that the co-application of low concentrations of CLT and acetamiprid (ACE) with ACh did not change ACh-evoked current amplitudes. However, pretreatment before the application of ACh significantly increased ACh-evoked currents by almost two-fold [51]. To confirm the modulatory effect of neonicotinoids, we used TMX, which is known as ineffective against mammalian neuronal nAChRs. A low concentration of TMX decreased the ACh-induced currents through the $\alpha 7$ receptor when it was co-applied or pretreated [51]. All these results reinforce the idea that the mode of action of neonicotinoid insecticides is more attributable to their modulatory effect on mammalian receptors than agonist efficacy. Indeed, through the modulatory effect we are able to understand why they can disturb cholinergic synaptic transmission.

4.2. Are Neonicotinoid Insecticides Able to Interact with Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases?

The involvement of pesticides in neurodegenerative diseases has been the subject of several polemics, particularly over the past 10 years. This is due to the extensive use of pesticides in the environment and growing evidence demonstrating that they can disturb the development of the mammalian central nervous system [55–57]. Controversies have also been fueled by the fact that epidemiological evidence is far from conclusive, as considerable heterogeneity has been observed between the patients and chemicals involved. In addition, neurodegenerative diseases are complex syndromes resulting from different genetic and environmental factors that give rise to various degrees of cognitive deficits, motor deficits, and other functions. Nevertheless, oxidative stress and apoptosis have been well investigated as neurotoxic mechanisms leading to the toxic effect of several pesticides [58–60]. However, few studies have indicated that neonicotinoid exposure could be associated with neurodegenerative disease. Recently, Dhouib et al. suggested that curcumin, which has anti-inflammatory, antioxidant, and anti-tumor properties, protects rats against ACE-induced cerebellum toxicity, such as an increase in AChE activities, a decline in cell viability, and oxidative stress [61]. Moreover, Kagawa and Nagao found that mice embryos exposed to ACE from day 6 to day 13 developed hypoplasia of the cortical plate and decreased neurogenesis. Newborn ACE-exposed mice showed an abnormal neuronal distribution in the neocortex, increased numbers of the microglial marker Iba1, and the active microglia had a globular structure (amoeboid-type microglia) [57]. In some contexts, in pathological states such as Parkinson's disease, it has been proposed that inappropriate

microglial activation contributes to neurodegeneration through the production of cellular oxidants and cytokines [62,63]. The current treatment for Alzheimer's disease (AD) is acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, which partially block the degradation of ACh in the synapse and enable more of the neurotransmitter to reach and activate cholinergic receptors [64]. It was also found that nAChR density decreased with disease progression, suggesting a link between beta-amyloid ($A\beta$) and nAChR function [65]. Soluble $A\beta$ species, particularly oligomeric $A\beta$ 1–42, interacts with several nAChR subtypes [66]. In addition, AD is also associated with the deterioration of memory and cognitive function. With a base chemical structure similar to nicotine, and because neuronal nAChRs are considered to be affected in several neurodegenerative diseases [65,66], additional studies are needed to further explore the potential involvement of neonicotinoid insecticides on neurodegenerative diseases through neuronal nAChRs.

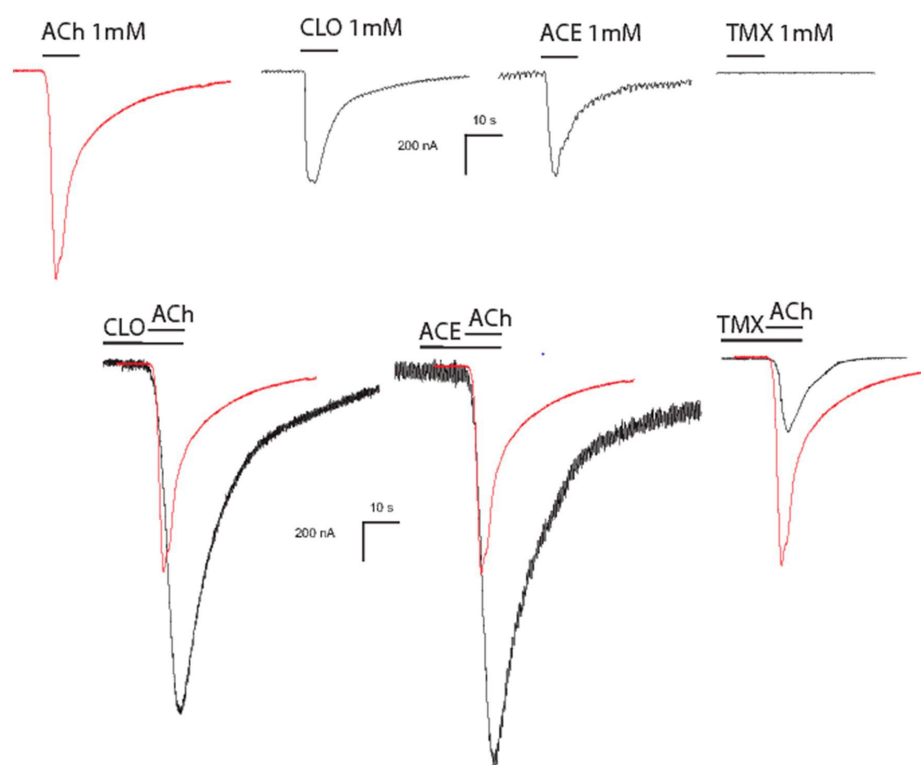


Figure 2. Effects of neonicotinoids on ACh-evoked current amplitudes. Clothianidin (CLT) and acetamiprid (ACE) enhance ACh-induced current amplitudes of the mammalian α 7 neuronal nAChRs and thiamethoxam (TMX) decreases ACh-induced current amplitudes.

4.3. Neonicotinoid Insecticides Affect Other Mammalian Neuronal Mechanisms

Mammalian neuronal nAChRs are involved in several functions, such as the release of dopamine in the striatal region, glutamatergic synapse formation, and brain development [67–69]. The effect of IMI on the properties of stellate cells of the ventral cochlear nucleus (VCN) demonstrated that it increased neuronal excitability and caused a depolarizing shift in the membrane potential. The IMI effect was blocked by the specific nicotinic receptor antagonists d-tubocurarine (d-TC) and α -bungarotoxin (α -Bgt). The blocking of α -Bgt suggested that α 7 homomeric receptors were involved in the spontaneous action potential induced by IMI [56]. The modulatory effect of neonicotinoids on mammalian nervous systems

was also studied through the activation of catecholamine release. It was found that *in vivo*, TMX and its metabolite CLT induced the release of dopamine in the rat striatum. The CLT activated $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ to induce an *in vivo* striatal release of dopamine. Intrastratial infusion of CLT increased extracellular dopamine levels, which was blocked by pretreatment with nAChR antagonists, N-n-decylnicotinium iodide (NDNI), dihydro- β -erythroidine (DH β E), and methyllycaconitine (MLA) [70]. Moreover, it was found that IMI facilitated tyrosine hydroxylase (TH) transcription via the activation of $\alpha 3\beta 4$ neuronal nAChRs and $\alpha 7$ receptors. Activation took place at concentrations that are known to produce physiological responses such as catecholamine secretion through the nAChRs in adrenal chromaffin cells. Thus, it was proposed that IMI facilitated the physiological functions of adrenal glands in mammals [71]. In other studies, it was found that exposure to TMX altered behavioral and biochemical processes related to the cholinergic systems in rats. Acetylcholinesterase (AChE) activity was measured in different brain regions such as the hippocampus, striatum, and cortex. It was found that TMX reduced spontaneous motor activity and decreased AChE activity in the hippocampus, cortex, and striatum. The inhibition of AChE activity was long-standing and was accompanied by deficits in behavioral performance [72]. Although the mechanisms leading to the effect of TMX on these brain structures are not well understood, it was hypothesized that TMX activates neuronal nAChRs, leading to an increase in serotonin release, which could explain the anxiogenic effect observed in rats during the plus-maze test [72]. Moreover, all these studies raise the question of a link between neonicotinoids and the blood–brain barrier (BBB) penetration. Indeed, no studies have highlighted a direct adverse effect of neonicotinoids on the BBB, though some have demonstrated an increase of BBB permeability after pyrethrinoid uptake [73,74]. The penetration of neonicotinoids into the mammalian central nervous system has been attributed to their hydrophobicity, which is greater than nicotine [75]. Considering their potential toxic effect through the activation of neuronal nAChRs, studies on the toxicological capacity of neonicotinoids to alter the BBB mechanisms are critical.

5. Conclusions

In summary, the enzymatic activity of CYP450 and other enzymes was not sufficient to demonstrate that they can activate resistance in mammals in the same way as in insects. The most evident finding is that neuronal nAChRs are major factors involved in neonicotinoid toxicity in mammalian central nervous systems. We suggest here that neonicotinoid insecticides could differently activate or modulate each neuronal nAChR. The main mechanisms in mammals seem to be a modulatory effect, which will have a consequence on the activation of receptors and the modulation of synaptic activity. Moreover, mammals express different nAChR subtypes in the peripheral and central nervous systems. The modulatory effect of neonicotinoids found with $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ suggests that similar mechanisms need to be explored in other mammalian neuronal nAChRs.

Author Contributions: writing—original draft preparation, J.-N.H., A.C., A.L.M., E.T., S.H.T.; writing—review and editing, E.T., S.H.T.; supervision, S.H.T.; funding acquisition, S.H.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research was funded by the Région Centre Val de Loire, “Screenrobot project” and “The manuscript was free of charge”.

Acknowledgments: J.-N. Houchat and A. Le Mauff received Ph.D. grants from the Région Centre Val de Loire and the French Department of Army (DGA, Direction Générale de l’Armement). A. Cartereau received a grant from the University of Orléans.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The contents of this review are solely the responsibility of the authors.

References

1. Changeux, J.-P.; Edelstein, S.J. Allosteric Receptors after 30 Years. *Neuron* **1998**, *21*, 959–980. [\[CrossRef\]](#)
2. Changeux, J.-P. The concept of allosteric modulation: An overview. *Drug Discov. Today Technol.* **2013**, *10*, e223–e228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Changeux, J.-P.; Edelstein, S.J. Allosteric Mechanisms of Signal Transduction. *Science* **2005**, *308*, 1424–1428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Arora, K.; Cheng, J.; Nichols, R.A. Nicotinic Acetylcholine Receptors Sensitize a MAPK-linked Toxicity Pathway on Prolonged Exposure to β -Amyloid. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 21409–21420. [\[CrossRef\]](#)
5. Barykin, E.P.; Garifulina, A.I.; Kryukova, E.V.; Spirova, E.N.; Anashkina, A.; Adzhubei, A.A.; Shelukhina, I.V.; Kasheverov, I.E.; Mitkevich, V.A.; Козин, С.А.; et al. Isomerization of Asp7 in Beta-Amyloid Enhances Inhibition of the $\alpha 7$ Nicotinic Receptor and Promotes Neurotoxicity. *Cells* **2019**, *8*, 771. [\[CrossRef\]](#)
6. Tanimura, A.; Du, Y.; Kondapalli, J.; Wokosin, D.L.; Surmeier, D.J. Cholinergic Interneurons Amplify Thalamostriatal Excitation of Striatal Indirect Pathway Neurons in Parkinson's Disease Models. *Neuron* **2019**, *101*, 444–458. [\[CrossRef\]](#)
7. Leino, S.; Koski, S.; Hanninen, R.; Tapanainen, T.; Rannanpää, S.; Salminen, O. Attenuated dopaminergic neurodegeneration and motor dysfunction in hemiparkinsonian mice lacking the $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Neuropharmacology* **2018**, *138*, 371–380. [\[CrossRef\]](#)
8. Le Novère, N.; Corringer, P.-J.; Changeux, J.-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* **2002**, *53*, 447–456. [\[CrossRef\]](#)
9. Lukas, R.J.; Changeux, J.P.; Le Novère, N.; Albuquerque, E.X.; Balfour, D.J.; Berg, D.K.; Bertrand, D.; Chiappinelli, V.A.; Clarke, P.B.; Collins, A.C.; et al. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 397–401.
10. Lindstrom, J.; Schoepfer, R.; Conroy, W.; Whiting, P.; Das, M.; Saedi, M.; Anand, R. The Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family: Structure of Nicotinic Receptors from Muscle and Neurons and Neuronal α -Bungarotoxin-Binding Proteins. *Results Probl. Cell Differ.* **1991**, *287*, 255–278. [\[CrossRef\]](#)
11. Gotti, C.; Zoli, M.; Clementi, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: Native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 482–491. [\[CrossRef\]](#)
12. Anand, R.; Conroy, W.G.; Schoepfer, R.; Whiting, P.; Lindstrom, J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11192–11198.
13. Nelson, M.E.; Kuryatov, A.; Choi, C.H.; Zhou, Y.; Lindstrom, J.; Kohout, T.A.; Lefkowitz, R.J. Alternate Stoichiometries of $\alpha 4 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 332–341. [\[CrossRef\]](#)
14. Zhou, Y.; Nelson, M.E.; Kuryatov, A.; Choi, C.; Cooper, J.; Lindstrom, J. Human $\alpha 4 \beta 2$ acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9004–9015. [\[CrossRef\]](#)
15. DeDominicis, K.E.; Sahibzada, N.; Olson, T.T.; Xiao, Y.; Wolfe, B.B.; Kellar, K.J.; Yasuda, R.P. The $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ Stoichiometry of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Predominates in the Rat Motor Cortex. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *92*, 327–337. [\[CrossRef\]](#)
16. Mazzaferro, S.; Bermudez, I.; Sine, S.M. $\alpha 4 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: Relationships Between Subunit Stoichiometry and Function at the Single Channel Level. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 2729–2740. [\[CrossRef\]](#)
17. Maurer, J.; Sandager-Nielsen, K.; Schmidt, H.D. Attenuation of nicotine taking and seeking in rats by the stoichiometry-selective $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator NS9283. *Psychopharmacology* **2016**, *234*, 475–484. [\[CrossRef\]](#)
18. Dani, J.A.; Radcliffe, K.A.; Pidoplichko, V.I. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 31–38. [\[CrossRef\]](#)
19. Séguéla, P.; Wadiche, J.; Dineley-Miller, K.; Dani, J.; Patrick, J. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 596–604. [\[CrossRef\]](#)
20. Bertrand, D.; Galzi, J.L.; Devillers-Thiery, A.; Bertrand, S.; Changeux, J.P. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6971–6975. [\[CrossRef\]](#)

21. Maienfisch, P.; Huerlimann, H.; Rindlisbacher, A.; Gsell, L.; Dettwiler, H.; Haettenschwiler, J.; Sieger, E.; Walti, M. The discovery of thiamethoxam: A second-generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 165–176. [\[CrossRef\]](#)
22. Wakita, T.; Yasui, N.; Yamada, E.; Kishi, D. Development of a novel insecticide, Dinotefuran. *J. Pestic. Sci.* **2005**, *30*, 112–123. [\[CrossRef\]](#)
23. Kagabu, S. Discovery of Imidacloprid and Further Developments from Strategic Molecular Designs. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2887–2896. [\[CrossRef\]](#)
24. Tan, J.; Galligan, J.J.; Hollingworth, R.M. Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology* **2007**, *28*, 829–842. [\[CrossRef\]](#)
25. Thany, S.H. Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 587–592. [\[CrossRef\]](#)
26. Nagata, K.; Song, J.H.; Shono, T.; Narahashi, T. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 731–738.
27. Ihara, M.; Matsuda, K.; Otake, M.; Kuwamura, M.; Shimomura, M.; Komai, K.; Akamatsu, M.; Raymond, V.; Sattelle, D.B. Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila*-chicken $\text{SAD}\beta 2$ and $\text{ALSB}\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 133–144. [\[CrossRef\]](#)
28. Clements, J.; Olson, J.M.; Sanchez-Sedillo, B.; Bradford, B.; Groves, R.L. Changes in emergence phenology, fatty acid composition, and xenobiotic-metabolizing enzyme expression is associated with increased insecticide resistance in the Colorado potato beetle. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2019**, *103*, e21630. [\[CrossRef\]](#)
29. Chen, X.; Tang, C.; Ma, K.; Xia, J.; Song, D.; Gao, X. Overexpression of UDP-glycosyltransferase potentially involved in insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover collected from Bt cotton fields in China. *Pest Manag. Sci.* **2019**, *76*, 1371–1377. [\[CrossRef\]](#)
30. Tang, B.; Dai, W.; Qi, L.; Zhang, Q.; Zhang, C. Identification and Functional Analysis of a Delta Class Glutathione S-Transferase Gene Associated with Insecticide Detoxification in *Bradysia odoriphaga*. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 9979–9988. [\[CrossRef\]](#)
31. Jin, R.; Mao, K.; Liao, X.; Xu, P.; Li, Z.; Ali, E.; Wan, H.; Li, J.-H. Overexpression of CYP6ER1 associated with clothianidin resistance in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *154*, 39–45. [\[CrossRef\]](#)
32. Sun, X.; Gong, Y.; Ali, S.; Hou, M. Mechanisms of resistance to thiamethoxam and dinotefuran compared to imidacloprid in the brown planthopper: Roles of cytochrome P450 monooxygenase and a P450 gene CYP6ER1. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *150*, 17–26. [\[CrossRef\]](#)
33. Elzaki, M.E.A.; Miah, M.A.; Wu, M.; Zhang, H.; Pu, J.; Jiang, L.; Han, Z. Imidacloprid is degraded by CYP353D1v2, a cytochrome P450 overexpressed in a resistant strain of *Laodelphax striatellus*. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 1358–1363. [\[CrossRef\]](#)
34. Bao, H.; Gao, H.; Zhang, Y.; Fan, D.; Fang, J.; Liu, Z. The roles of CYP6AY1 and CYP6ER1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: Expression levels and detoxification efficiency. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2016**, *129*, 70–74. [\[CrossRef\]](#)
35. He, C.; Xie, W.; Yang, X.; Wang, S.-L.; Wu, Q.-J.; Zhang, Y. Identification of glutathione S-transferases in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and evidence that GSTd7 helps explain the difference in insecticide susceptibility between *B. tabaci* Middle East-Minor Asia 1 and Mediterranean. *Insect Mol. Boil.* **2017**, *27*, 22–35. [\[CrossRef\]](#)
36. Li, Z.; Li, M.; He, J.; Zhao, X.; Chaimanee, V.; Huang, W.-F.; Nie, H.; Zhao, Y.; Su, S. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2017**, *140*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
37. Dick, R.A.; Kanne, D.B.; Casida, J.E. Identification of Aldehyde Oxidase as the Neonicotinoid Nitroreductase. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 317–323. [\[CrossRef\]](#)
38. Dick, R.A.; Kanne, D.B.; Casida, J.E. Substrate Specificity of Rabbit Aldehyde Oxidase for Nitroguanidine and Nitromethylene Neonicotinoid Insecticides. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 38–43. [\[CrossRef\]](#)
39. Ford, K.A.; Casida, J.E. Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 1549–1556. [\[CrossRef\]](#)

40. Schulz-Jander, D.A.; Casida, J.E. Imidacloprid insecticide metabolism: Human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol. Lett.* **2002**, *132*, 65–70. [\[CrossRef\]](#)
41. Schulz-Jander, D.A.; Leimkuehler, W.M.; Casida, J.E. Neonicotinoid Insecticides: Reduction and Cleavage of Imidacloprid Nitroimine Substituent by Liver Microsomal and Cytosolic Enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1158–1165. [\[CrossRef\]](#)
42. Shi, X.; Dick, R.A.; Ford, K.A.; Casida, J.E. Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4861–4866. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Swenson, T.L.; Casida, J.E. Aldehyde Oxidase Importance In Vivo in Xenobiotic Metabolism: Imidacloprid Nitroreduction in Mice. *Toxicol. Sci.* **2013**, *133*, 22–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Swenson, T.L.; Casida, J.E. Neonicotinoid formaldehyde generators: Possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicol. Lett.* **2013**, *216*, 139–145. [\[CrossRef\]](#)
45. Green, T.; Toghill, A.; Lee, R.; Waechter, F.; Weber, E.; Noakes, J. Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicol. Sci.* **2005**, *86*, 36–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Green, T.; Toghill, A.; Lee, R.; Waechter, F.; Weber, E.; Pfeffer, R.; Noakes, J.; Robinson, M. Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol. Sci.* **2005**, *86*, 48–55. [\[CrossRef\]](#)
47. Saeed, N.; Tonina, L.; Battisti, A.; Mori, N. Temperature Alters the Response to Insecticides in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* **2018**, *111*, 1306–1312. [\[CrossRef\]](#)
48. Camp, A.; Buchwalter, D.B. Can't take the heat: Temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *178*, 49–57. [\[CrossRef\]](#)
49. Mao, K.; Jin, R.; Li, W.; Ren, Z.; Qin, X.; He, S.; Li, J.; Wan, H. The influence of temperature on the toxicity of insecticides to *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *156*, 80–86. [\[CrossRef\]](#)
50. Li, P.; Ann, J.; Akk, G. Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *89*, 1295–1301. [\[CrossRef\]](#)
51. Cartereau, A.; Martin, C.; Thany, S.H. Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *175*, 1987–1998. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Toshima, K.I.M.; Kanaoka, S.; Tarumoto, K.; Yamada, A.; Sattelle, D.B.; Matsuda, K. Potentiating and blocking actions of neonicotinoids on the response to acetylcholine of the neuronal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pestic. Sci.* **2008**, *33*, 146–151. [\[CrossRef\]](#)
53. Matsuda, K.; Buckingham, S.D.; Freeman, J.C.; Squire, M.D.; Baylis, H.; Sattelle, D.B. Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 518–524. [\[CrossRef\]](#)
54. Toshima, K.; Kanaoka, S.; Yamada, A.; Tarumoto, K.; Akamatsu, M.; Sattelle, D.B.; Matsuda, K. Combined roles of loops C and D in the interactions of a neonicotinoid insecticide imidacloprid with the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 264–272. [\[CrossRef\]](#)
55. Hirano, T.; Yanai, S.; Takada, T.; Yoneda, N.; Omotehara, T.; Kubota, N.; Minami, K.; Yamamoto, A.; Mantani, Y.; Yokoyama, T.; et al. NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment. *Toxicol. Lett.* **2018**, *282*, 57–63. [\[CrossRef\]](#)
56. Bal, R.; Erdogan, S.; Theophilidis, G.; Baydas, G.; Nazıroğlu, M.; Nazıroğlu, M. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *NeuroToxicology* **2010**, *31*, 113–120. [\[CrossRef\]](#)
57. Kagawa, N.; Nagao, T. Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to acetamiprid. *J. Appl. Toxicol.* **2018**, *38*, 1521–1528. [\[CrossRef\]](#)
58. Giordano, G.; Afsharinejad, Z.; Guizzetti, M.; Vitalone, A.; Kavanagh, T.J.; Costa, L.G. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *219*, 181–189. [\[CrossRef\]](#)
59. Lee, J.E.; Park, J.H.; Shin, I.C.; Koh, H.C. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *263*, 148–162. [\[CrossRef\]](#)

60. Vidau, C.; Polo, R.-A.G.; Niso-Santano, M.; Gómez-Sánchez, R.; Pedro, J.M.B.-S.; Pizarro-Estrella, E.; Blasco, R.; Brunet, J.-L.; Belzunces, L.P.; Fuentes, J.M. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *NeuroToxicology* **2011**, *32*, 935–943. [\[CrossRef\]](#)
61. Dhouib, I.E.; Annabi, A.; Doghri, R.; Rejeb, I.; Dallagi, Y.; Bdiri, Y.; Lasram, M.M.; Elgaaiied, A.; Marrakchi, R.; Faza, S.; et al. Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: Biochemical, histological, and behavioral changes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 27515–27524. [\[CrossRef\]](#)
62. Barger, S.; Harmon, A.D. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* **1997**, *388*, 878–881. [\[CrossRef\]](#)
63. McDonald, U.R.; Brunden, K.R.; Landreth, G.E. Amyloid Fibrils Activate Tyrosine Kinase-Dependent Signaling and Superoxide Production in Microglia. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 2284–2294. [\[CrossRef\]](#)
64. Kamkwala, A.; Newhouse, P. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors: Novel Cholinergic Treatments for Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *13*, 1. [\[CrossRef\]](#)
65. Sun, J.L.; Stokoe, S.A.; Roberts, J.P.; Sathler, M.F.; Nip, K.A.; Shou, J.; Ko, K.; Tsunoda, S.; Kim, S. Co-activation of selective nicotinic acetylcholine receptors is required to reverse beta amyloid-induced Ca²⁺ hyperexcitation. *Neurobiol. Aging* **2019**, *84*, 166–177. [\[CrossRef\]](#)
66. Thomsen, M.S.; Arvaniti, M.; Jensen, M.M.; Shulepko, M.A.; Dolgikh, D.A.; Pinborg, L.H.; Hartig, W.; Lyukmanova, E.N.; Mikkelsen, J.D. Lynx1 and Abeta1–42 bind competitively to multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Neurobiol. Aging* **2016**, *46*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
67. Hellström-Lindahl, E.; Gorbounova, O.; Seiger, Å.; Mousavi, M.; Nordberg, A. Regional distribution of nicotinic receptors during prenatal development of human brain and spinal cord. *Dev. Brain Res.* **1998**, *108*, 147–160. [\[CrossRef\]](#)
68. Miwa, J.; Freedman, R.; Lester, H.A. Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: Emerging hypotheses. *Neuron* **2011**, *70*, 20–33. [\[CrossRef\]](#)
69. Lozada, A.F.; Wang, X.; Goukko, N.; Massey, K.A.; Duan, J.; Liu, Z.; Berg, D.K. Glutamatergic synapse formation is promoted by $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 7651–7661. [\[CrossRef\]](#)
70. Faro, L.R.F.; Tak-Kim, H.; Alfonso, M.; Duran, R. Clothianidin, a neonicotinoid insecticide, activates $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and muscarinic receptors to induce in vivo dopamine release from rat striatum. *Toxicology* **2019**, *426*, 152285. [\[CrossRef\]](#)
71. Kawahata, I.; Yamakuni, T. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, facilitates tyrosine hydroxylase transcription and phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression to enhance catecholamine synthesis and its nicotine-evoked elevation in PC12D cells. *Toxicology* **2017**, *394*, 84–92. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Rodrigues, K.; De Santana, M.B.; Nascimento, J.D.; Picanço-Diniz, D.; Maués, L.; Santos, S.; Ferreira, V.; Alfonso, M.; Duran, R.; Faro, L. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2010**, *73*, 101–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Amaraneni, M.; Pang, J.; Mortuza, T.B.; Muralidhara, S.; Cummings, B.S.; White, C.A.; Vorhees, C.V.; Zastre, J.; Bruckner, J.V. Brain uptake of deltamethrin in rats as a function of plasma protein binding and blood–brain barrier maturation. *NeuroToxicology* **2017**, *62*, 24–29. [\[CrossRef\]](#)
74. Mortuza, T.B.; Edwards, G.L.; White, C.A.; Patel, V.; Cummings, B.S.; Bruckner, J. Age Dependency of Blood-Brain Barrier Penetration by cis- and trans-Permethrin in the Rat. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *47*, 234–237. [\[CrossRef\]](#)
75. Yamamoto, I.; Tomizawa, M.; Saito, T.; Miyamoto, T.; Walcott, E.C.; Sumikawa, K. Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1998**, *37*, 24–32. [\[CrossRef\]](#)



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Jean-Noël HOUCHAT

Rôle des voies de régulation intracellulaire calcium-dépendante dans la modulation des récepteurs cholinergiques de type nicotinique chez les insectes

Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) des insectes sont impliqués dans la transmission synaptique rapide et sont la cible d'insecticides tels que les néonicotinoïdes. Si le mode d'action agoniste des néonicotinoïdes sur les nAChRs d'insectes est bien décrit, peu d'études renvoient aux mécanismes intracellulaires capables de les moduler. Chez la blatte *Periplaneta americana*, nous avons démontré que les effets agonistes de la nicotine (NIC), d'un néonicotinoïde, la clothianidine (CLT) et d'un insecticide dérivé des sulfoximines, le sulfoxaflor (SFX), sont modulés de façon différente par les mécanismes intracellulaires calcium-dépendants. Les courants induits par la NIC à travers un récepteur insensible à l'alpha-bungarotoxine, nAChR1, dépendent notamment d'une protéine kinase C sensible au calcium, alors que les courants induits par la CLT n'en dépendent pas. De même, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, connue pour affecter les courants nicotiniques via nAChR1, n'affecte pas les courants induits par le SFX sur ce même récepteur. Ces résultats suggèrent que la modulation des effets agonistes par le calcium dépend de l'agoniste lui-même. De plus, nous avons mis en évidence que la calmoduline-kinase kinase (CaMKK) est elle-aussi capable de moduler les courants nicotiniques via la stimulation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), identifiant ainsi une nouvelle voie de régulation calcium-dépendante des nAChRs d'insectes. En conclusion, ces travaux permettent d'aller plus loin dans la compréhension des voies de régulation intracellulaire modulant les effets agonistes des insecticides neurotoxiques sur les nAChRs d'insectes.

Mots clés : récepteurs nicotiniques ; insectes ; calcium ; néonicotinoïdes

Role of calcium-dependent intracellular pathways in the modulation of insect nicotinic acetylcholine receptors

Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are involved in fast synaptic transmission and are the target of insecticides such as neonicotinoids. The agonist action of neonicotinoids on insect nAChRs is well described, but fewer studies refer to the intracellular mechanisms modulating insecticides action. Using the cockroach *Periplaneta americana*, we demonstrated that calcium-dependent pathways differently modulate agonist effects of nicotine (NIC), clothianidin (CLT) and the sulfoximin insecticide sulfoxaflor (SFX). NIC-induced currents through the alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR subtype nAChR1, depend on a calcium-sensitive protein kinase C whereas CLT do not. In addition, calcium increase is known to affect NIC-induced currents through nAChR1 and has no effect on SFX-induced currents through the same receptor. These results suggest that calcium-dependent modulation of agonist effects depends on the agonist. Moreover, we found that the calmodulin kinase kinase (CaMKK) also regulates NIC-induced currents through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Thus, we identified a new calcium-dependent intracellular pathway involved in nAChR modulation. To conclude, this work paves the way to a better understanding of intracellular modulation of neurotoxic insecticides action on insect nAChRs.

Keywords : nicotinic acetylcholine receptors; insects; calcium; neonicotinoids