



**HAL**  
open science

**Etude des effets d'un composé soufré libéré par les  
Allium, le disulfure de diméthyle, sur les neurones  
d'insecte et sur l'activité électroencéphalographique de  
souris**

Helene Gautier

► **To cite this version:**

Helene Gautier. Etude des effets d'un composé soufré libéré par les Allium, le disulfure de diméthyle, sur les neurones d'insecte et sur l'activité électroencéphalographique de souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00345881

**HAL Id: tel-00345881**

**<https://theses.hal.science/tel-00345881>**

Submitted on 10 Dec 2008

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

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

**Etude des effets d'un composé soufré libéré par les *Allium*, le disulfure de diméthyle, sur les neurones d'insecte et sur l'activité électroencéphalographique de souris**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : NEUROSCIENCES**

**ECOLE DOCTORALE D'ANGERS**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le 18 septembre 2007 à Angers**

**par Hélène GAUTIER**

**Devant le jury ci-dessous :**

Mme Maria STANKIEWICZ, Professeur de l'Université de Torun, Pologne, Rapporteur

M. Jacques AUGER, Professeur de l'Université de Tours, Rapporteur

Mme Maryvonne ARDOUREL, Maitre de Conférences de l'Université d'Orléans, Examineur

M. Jean-François REGNIER, Docteur en Pharmacie, Toxicologue de la société Arkema, Examineur

M. Dieter WICHER, Docteur de l'institut Max Plank, Jena, Allemagne, Examineur

**Directeur de thèse :** M. Bruno LAPIED, Professeur de l'Université d'Angers

Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647 / USC INRA,

Université d'Angers - UFR Sciences

2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex, France



*A Roger, mon Papy*



## **REMERCIEMENTS**

---

*Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire « Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires », UPRES EA 2647/USC INRA de l'Université d'Angers. Je remercie le Professeur Bruno Lapied pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et encadrée depuis mon DEA, m'offrant ainsi la possibilité d'accéder à une formation scientifique aussi enrichissante.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur Maria Stankiewicz en acceptant de lire et de porter un jugement sur ce manuscrit. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Jacques Auger pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail qui n'aurait pas pu voir le jour sans ses travaux sur le DMDS. Je le remercie également pour m'avoir accueilli à l'IRBI et ainsi permis de m'initier à la chromatographie en phase gazeuse.*

*Je remercie très chaleureusement le Docteur Maryvonne Ardourel pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Elle sait l'estime et l'amitié que je lui porte.*

*Je tiens à remercier le Docteur Jean-François Régnier pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'être membre de ce jury.*

*Je suis très honorée de compter parmi les membres de mon jury le Docteur Dieter Wicher. Je lui suis très reconnaissante d'avoir accepté de venir juger mon travail.*

*Je remercie la Région Pays de la Loire, le Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur, ainsi que la société Arkema pour leur soutien financier.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du laboratoire de Neurobiologie, UPRES EA 2633, en particulier au Professeur Tobias Hévor, à Céline Montécot-Dubourg, à Benoit Martin et Maryvonne Ardourel, pour m'avoir accueillie et pour m'avoir aidée, initiée et conseillée dans l'apprentissage de l'électroencéphalographie. C'est avec grand plaisir que je leur ferai profiter des savoir-faire que j'ai acquis pendant mes années de thèses.*

*Je remercie les enseignants avec qui j'ai collaboré au cours de ces quatre années. Parmi eux, je tiens à remercier Françoise Grolleau pour avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique pendant mes années de monitorat et Alain Hamon, qui est un excellent pédagogue.*

*Un grand merci à Hélène Tricoire-Leignel pour son aide et son regard critique qui m'ont été précieux. Merci également pour les moments de complicité tant au laboratoire que en dehors. J'adresse mes remerciements à Christian Legros. Ce fut un plaisir de travailler avec toi tant au niveau recherche qu'au niveau enseignement, j'espère que nous aurons encore l'occasion d'échanger des idées autour d'un café. Je remercie Steeve Thany pour ce que nos échanges m'ont apporté, même si nous n'avons pas toujours été d'accord.*

*Un très grand merci à Olivier pour son aide si précieuse au niveau informatique et bricolage, sa bonne humeur, son soutien et ses encouragements. Je pense pouvoir parler au nom de tous, merci pour ce que tu fais pour nous.*

*Merci également aux anciens, actuels et bientôt futur(e)s thésard(e)s du laboratoire pour votre aide et pour les bons moments passés ensemble. Zeineb et Cédric, bon courage pour votre fin de thèse, je serai là pour vous soutenir.*

*Je remercie également toutes les techniciennes que j'ai connu, Hélène, Julia, Nathalie, Sonia et pour finir Sophie, pour leur travail précieux au laboratoire tant au niveau technique que logistique.*

*Une pensée particulière pour ceux qui au fil des jours sont devenus plus que des collègues et resteront des amis.*

*Je remercie Pierre Legras et Jérôme Roux pour leur aide à l'élaboration des protocoles d'anesthésie et de chirurgie réalisés au sein du Service Commun de l'Animalerie Hospitalo-Universitaire. Merci également pour l'ambiance chaleureuse que j'ai su y trouver et à tous ceux que j'ai croisés en ses lieux.*

*J'adresse un grand merci à Mr Frédéric Badawi qui m'a soutenu dans mon projet avec REMENTA et à Anne, assistante si précieuse au CIES. Je remercie REMENTA et ses membres pour les échanges que nous avons pu avoir.*

*J'adresse mes sincères remerciements à mes amis moniteurs et apparentés, Clémentine, Clothilde, Daphnée, Emilie, Magali, Marie-Aude, Sophie, Vincent, Sébastien, Ludovic, Laurent, Gyasi, Adrien pour tous les moments que nous avons partagés, pour le meilleur et pour le pire, à Angers ou à La Rochelle.*

*Un grand merci à Francis pour son aide et son soutien, souvent dans l'ombre. Merci à Will également pour avoir été là sans l'être vraiment.*

*Je remercie également mes professeurs et autres musiciens que j'ai eu le plaisir de rencontrer au Conservatoire d'Angers, lieu d'évasion. Merci à ceux avec qui j'ai eu l'occasion de jouer et ceux que j'ai écouté jouer.*

*Je remercie également les membres de ma famille pour leur soutien. Même si vous n'avez pas toujours compris ce que je faisais dans mon laboratoire vous avez su être là.*

*Un grand merci à mon Angel qui a su me supporter, au sens littéral et au sens figuré, pendant cette fin de thèse. Tu vas pouvoir redécouvrir ce qu'est un vrai dimanche. Et merci à mon Dizzymouth pour m'avoir soutenue à sa manière.*



LISTE DES ABREVIATIONS .....	11
INTRODUCTION.....	13
1 <sup>ère</sup> Partie : PESTICIDES, AMIS OU ENNEMIS ?.....	15
CHAPITRE 1 - LES PESTICIDES.....	15
A. Généralités.....	15
1. Avant -Propos.....	15
2. Historique .....	16
3. Définition des produits phytosanitaires.....	23
4. Le marché des produits phytosanitaires .....	24
5. La réglementation.....	26
B. Classifications des pesticides .....	28
1. Classification chimique .....	28
2. Classification biologique.....	30
C. Les fumigants .....	33
1. Les fumigants déjà autorisés .....	35
2. Les alternatives au bromure de méthyle en développement.....	38
CHAPITRE 2 - LES CIBLES DES INSECTICIDES ET LES RESISTANCES .....	41
A. Les cibles neurotoxiques .....	43
1. Les canaux ioniques dépendants du potentiel .....	43
2. La transmission synaptique .....	50
B. Les cibles non-neurotoxiques.....	58
1. Les régulateurs de croissance des insectes .....	58
2. Les inhibiteurs respiratoires .....	58
C. Le phénomène de résistance.....	64
1. Les résistances métaboliques .....	64
2. Les résistances par altération de la cible .....	71
3. Les résistances dues à la diminution de la pénétration de la molécule et aux modifications comportementales.....	75
CHAPITRE 3 - TOXICOLOGIE DES PESTICIDES .....	77
A. Les effets aigus et les effets chroniques .....	77
B. Les effets chroniques non-neurologiques.....	79
1. Les effets sur la reproduction .....	79
2. Les cancers .....	81
C. Les effets neurologiques.....	81
1. Les anomalies de l'EEG et les syndromes épileptiformes .....	83
2. La maladie de Parkinson et les syndromes parkinsoniens .....	85

2 <sup>ème</sup> Partie : L'ETUDE DU MODE D'ACTION DU DMDS SUR NEURONES D'INSECTE	87
.....	87
CHAPITRE 1 – LES « Dorsal Unpaired Median » (DUM) NEURONES : MODELE	
BIOLOGIQUE .....	87
A. Les DUM neurones du SNC des insectes.....	87
B. Caractéristiques des DUM neurones de la blatte <i>Periplaneta americana</i> : dernières données.....	93
1. Les canaux sodium dépendants du potentiel .....	93
2. Les canaux potassium dépendants du calcium .....	95
3. Les canaux calcium de type TRP .....	97
CHAPITRE 2 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	100
A. Technique de culture à court terme des DUM neurones .....	101
1. Matériel biologique .....	101
2. Précautions expérimentales .....	101
3. Prélèvement des derniers ganglions abdominaux .....	101
4. Digestion enzymatique .....	103
5. Dissociation mécanique.....	103
B. Adaptations de la technique de culture à l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ..	105
C. Technique électrophysiologique du patch-clamp.....	105
1. Principe de la technique .....	105
2. Dispositif d'enregistrement et d'analyse.....	108
3. Composition et application des solutions.....	110
D. Technique de RT-PCR sur DUM neurones isolés.....	112
1. Principe de la technique .....	112
2. Enregistrements électrophysiologiques précédant la RT-PCR sur cellule isolée ..	112
3. Biologie moléculaire .....	114
E. Technique d'imagerie calcique sur DUM neurones isolés.....	118
1. Principe de la technique .....	118
2. Dispositif expérimental .....	120
CHAPITRE 3 - ETUDE DE L'EFFET D'UN NOUVEAU FUMIGANT, LE DMDS, SUR	
L'ACTIVITE ELECTRIQUE ET SUR LES COURANTS SODIUM DEPENDANTS DU	
POTENTIEL DE NEURONES D'INSECTE. ....	121
A. Position du problème.....	121
B. Présentation des résultats .....	124
1. Comparaison des effets du DMDS, du MITC et du DADS sur l'activité électrique des DUM neurones.....	124
2. Action du DMDS sur l'activité spontanée des DUM neurones et sur le courant sodium dépendant du potentiel.....	129
3. Différence de sensibilité des deux courants sodium au DMDS .....	139
C. Conclusions .....	142

CHAPITRE 4 - ETUDE DE L'EFFET DU DMDS SUR LES COURANTS K <sub>Ca</sub> ET SUR LE CALCIUM INTRACELLULAIRE.....	143
NOUVEAUX ARGUMENTS EN FAVEUR DE DEUX COURANTS IK <sub>Ca</sub> .....	143
A. Position du problème.....	143
B. Présentation des résultats .....	145
1. Effets du DMDS sur les courants K <sub>Ca</sub> et sur la concentration en calcium intracellulaire.....	145
2. Caractérisation moléculaire des variants de pSlo dans les DUM neurones .....	162
C. Conclusions et perspectives .....	164
3 <sup>ème</sup> PARTIE : ETUDE NEUROTOXICOLOGIQUE DU DMDS SUR L'ELECTROENCEPHALOGRAMME DE SOURIS.....	167
CHAPITRE 1 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	167
A. Le choix du modèle animal .....	167
B. Mise au point et validation du système d'inhalation.....	168
1. Chambre d'inhalation .....	168
2. Validation du système .....	170
C. Enregistrement d'activités électroencéphalographiques de souris.....	175
1. Chirurgie.....	175
2. Dispositif d'enregistrement .....	178
3. Observations comportementales .....	180
4. Analyses des résultats.....	181
5. Avantages et inconvénients des deux techniques.....	181
CHAPITRE 2 – EFFET DU DMDS SUR L'ELECTROENCEPHALOGRAMME DE SOURIS.....	183
A. Position du problème.....	183
B. Présentation des résultats .....	183
1. Avant-propos .....	183
2. Résultats préliminaires .....	186
3. Effet dose dépendant du DMDS.....	195
C. Conclusion.....	209
4 <sup>ème</sup> PARTIE : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....	211
ANNEXES .....	215
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	231

## LISTE DES ABREVIATIONS

1-3D	1-3 dichloropropène
2,4,5-T	2,4-dichlorophénoxy-acétique
2,4-D	acide 2,4,5-trichlorophénoxy-acétique
4-AP	4-aminopyridine
AA	Acide arachidonique
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACTA	Association de coordination technique agricole
AD	Amplificateur différentiel
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AGRICAN	AGRIculture et CANcer
AM	acétoxymethylester
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
AOP	Amplificateur opérationnel
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAPTA	Acide 1,2-bis(o-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique
BTH	$\beta$ -tyramine hydroxylase
CEE	Communauté économique européenne
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse
CICR	« calcium induced calcium release »
CMR	(substance) cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction
CoQ	Coenzyme Q ou ubiquinone
DADS	Disulfure de diallyle
DAG	Diacyl glycérol
DBCP	Dibromochloropropane
DCJW	<i>N</i> -decarbomethoxylated JW062
DDE	1,1- <i>bis</i> -(4-chlorophényl)-2,2-dichloroéthane
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane
DGA	Dernier ganglion abdominal
DMDS	Disulfure de diméthyle
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
DUM	« Dorsal unpaired median »
EEG	Electroencéphalographie
EGTA	Acide tétraacétique N,N,N',N'-bis-( $\beta$ -amino-éthyléther)-éthylèneglycol
ENV	Ecole nationale vétérinaire
EPA	« Environmental Protection Agency »
FMN	Flavine mononucléotide
FMRF-amide	Phe-Met-Arg-Phe-amide
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GluCl	Récepteur ionotrope sensible au glutamate perméable aux ions chlorures
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSH	Glutathion S-transférase

GST	Glutathion
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
HVA	« High voltage activated »
I	Courant
INa1	Courant sodium de type 1
INa2	Courant sodium de type 2
IP3	Inositol triphosphate
IPT	(2E,6Z,8E)-N-isobutyl-9-phenylnona-2,6,8-triénamide
IRAC	« Insecticide Resistance Action Committee »
IRBI	Institut de recherche de la biologie de l'insecte
K <sub>Ca</sub>	Canaux potassium dépendants de calcium
K <sub>ATP</sub>	Canaux potassium dépendants de l'ATP
LVA	« Low voltage activated »
MCPA	acide 4-chloro-2-méthyle phénoxyacétique
mGluRIII	Récepteur glutamatergique métabotrope de type III
MITC	« Methyl isothiocyanate »
MNB	« Median neuroblaste »
MSA	Mutualité sociale agricole
nAChR	Récepteur cholinergique de type nicotinique
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCCE	« non-capacitive calcium entry » ou TRP $\gamma$
NHD	Neurohormone D ou hormone adipokinétique
NO	Monoxyde d'azote
ODP	« ozone depletion potential »
OP	organophosphoré
PARTAGE	PARkinson, Travail, AGRicole, Environnement
PBT	(substance) persistante, bio-accumulables et toxique
PDE2	Phosphodiesterase de type 2
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PLC	Phospholipase C
Qsp	Quantité suffisante pour
RCI	Régulateur de croissance
RCR	Resistance de contre-réaction
RDL	« resistant to dieldrin »
REACH	“Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals”
RT-PCR	« reverse transcriptase-polymerase chain reaction »
RyR	Récepteur à ryanodine
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SNC	Système nerveux central
SP	Superfusion
SPME	Solid phase microextraction
SVF	Serum de veau fœtal
TAE	Tris-acétate EDTA
TEA	Tetraethylammonium
TIC	Total ion chromatogram
tPBT	(substance) très persistante et très bioaccumulables comme les perturbateurs endocriniens
TRP	« Transient receptor potential » voir NCCE
UIPP	Union des industries de la protection des plantes
UNEP	« United Nations Environment Programme »
V	Potentiel

## INTRODUCTION

Le disulfure de diméthyle (DMDS), objet de ce travail de thèse, est une molécule aux effets nématocide, fongicide et insecticide. D'une part c'est un composé volatile naturel émis par de nombreux organismes vivants, en particulier les plantes du genre *Allium*. D'autre part, c'est un composé bien connu dans l'industrie thiochimique, utilisé par exemple comme agent de sulfuration, dont le leader mondial de sa production est la firme Arkema. Ses potentialités en tant qu'insecticide sont étudiées dans le cadre de la biofumigation (par enfouissement de déchets d'oignons ou de poireaux) et dans le cadre de la recherche d'alternatives de remplacement du bromure de méthyle, interdit ou sur le point de l'être pour la plupart de ses usages. Le mode d'action neurotoxique du DMDS n'avait, jusqu'à ce jour, été révélé que par une seule étude (Dugravot et coll., 2003). Dans cette optique, le coeur de ce manuscrit, constitué de l'étude du mode d'action du DMDS sur neurones d'insecte, s'insère dans la continuité des travaux de Dugravot et ses collaborateurs. Un deuxième aspect du DMDS, l'étude des effets secondaires potentiels, a pu être réalisée grâce à la mise au point d'une technique d'enregistrement électroencéphalographique sur souris.

La **première partie** de ce manuscrit regroupe un ensemble de connaissances sur les pesticides en général et sur des domaines de recherches liés à leur utilisation. Après un bref historique, le premier chapitre traite de certains aspects économiques et réglementaires autour des pesticides avant de donner plus d'informations sur les principaux types de pesticides, en particulier les fumigants. Le deuxième chapitre est consacré au mode d'action moléculaire des principaux insecticides et aux mécanismes de résistance développés par les insectes. Pour terminer cette partie, certains effets délétères des pesticides sur la santé humaine seront présentés.

L'étude du mode d'action du DMDS sur neurones d'insecte fait l'objet de la **deuxième partie**. Les deux premiers chapitres détaillent le modèle animal et les techniques expérimentales utilisées. Les chapitres 3 et 4 exposent les cibles identifiées du DMDS et les perspectives qui découlent de ce travail.

La **troisième partie** correspond à l'étude neurotoxicologique du DMDS sur l'activité électroencéphalographique de souris. Elle est composée de deux chapitres. Le premier retrace le développement et la mise au point de nos conditions expérimentales et le deuxième expose les principaux résultats obtenus.

La **quatrième partie** est constituée des conclusions générales et les perspectives qui découlent de ce travail.



## CHAPITRE 1 - LES PESTICIDES

### A. Généralités

#### 1. Avant -Propos

L'utilisation des pesticides soulève deux grandes questions : Quel est l'intérêt d'utiliser des pesticides ? Quels sont les problèmes liés à leur utilisation ?

L'utilisation répandue des pesticides laisse penser qu'il existe quelques intérêts à leur usage. En effet, les pesticides sont utilisés dans une grande variété d'applications qu'il est possible de résumer en trois domaines.

Le premier est la protection des végétaux et de leurs produits. C'est l'application la plus ancienne et la plus répandue. L'accroissement de la population mondiale et la nécessité d'assurer des rendements corrects et stables, rend la préservation des cultures nécessaire. La protection des végétaux concerne également les espaces de loisir tels que les jardins d'amateurs, les parcs et les terrains de sports. La deuxième grande application est d'ordre sanitaire, par exemple, la désinfection des locaux d'activité humaine, d'habitations, la lutte contre les insectes vecteurs de maladies ou en hygiène humaine, vétérinaire et alimentaire. Pour finir, les surfaces non-agricoles telles que les voies ferrées ou les aérodromes font l'objet de traitements pour assurer leur bon fonctionnement.

Les pesticides sont utilisés pour détruire ou limiter la croissance d'organismes jugés nuisibles. Ils ne sont donc pas inoffensifs. Ils sont à la source de nombreuses pollutions de l'environnement tant au niveau des sols que des eaux. De plus, le manque de sélectivité de certaines molécules ou leur mauvaise utilisation expose l'homme et les organismes non-cibles (animaux ou végétaux) à des risques non-négligeables. Il convient donc d'utiliser les pesticides avec précaution.

Alors, pesticides : amis ou ennemis ?



## 2. Historique

L'étymologie du mot pesticide provient de l'anglais « pest » qui signifie animal, insecte ou plante nuisible et du suffixe «-cide » que l'on trouve dans le verbe latin « caedo, cadere » et qui signifie « tuer ». Ce terme de pesticide regroupe donc toutes les substances destinées à lutter contre les organismes jugés indésirables : les herbicides, les fongicides, les insecticides, les acaricides, les nématicides, les molluscicides, les rodenticides, les corvicides, les bactéricides.

Les premières utilisations de pesticides remonteraient à - 2000 ans avant J.C. en Inde avec l'utilisation du neem ou margousier (*Azadirachta indica*) (Figure 1A) comme insecticide (Philogène et coll., 2002) puis à l'antiquité vers -1000 avant J-C comme le cite Pline L'ancien (23-79 après J-C) dans ses écrits. Ce dernier, rapporte dans son œuvre *Histoire naturelle*, l'ouvrage de référence en matière de connaissances scientifiques et techniques de l'antiquité, l'utilisation de soufre, de fer, de plomb et d'arsenic comme insecticides et acaricides en conseillant le soufre en traitement contre la gale (l'agent de la gale est l'acarien *Sarcoptes scabiei hominis*) (Pline L'ancien, livres XXXIV et XXXV). Les dérivés arsenicaux sont connus en Chine depuis le XVI<sup>ème</sup> siècle. C'est vers la fin de ce siècle et au cours du suivant que sont découvertes les propriétés insecticides du tabac (nicotine) (Figure 1B et C, tableau 1), des racines de plantes de la famille des papilionacées telles *Lonchocarpus* ou *Derris* (roténone) (Figure 2A) (Philogène et coll., 2002).

Le développement des pesticides ne débutera réellement qu'au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle suite aux grandes épidémies qui touchèrent certaines productions agricoles. Ainsi, l'épidémie du mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) provoqua la grande famine en Irlande entre 1845 et 1849 ou encore, l'épidémie de phylloxéra (*Dactylosphaera vitifoliae*) fit sa première apparition en 1863 à Pujault dans le Gard (France) avant d'infester les vignes de l'Europe et de l'Amérique de Nord au cours des trente années suivantes. La vigne fut sauvée en greffant des cépages de *Vitis vinifera* (cépages présents en Europe) sur des portes-greffes de cépages américains résistants à l'insecte (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*), ce qui peut être considéré comme la première lutte biologique de grande ampleur.

Cette période fut marquée par la mise au point de la bouillie bordelaise par Alexis Millardet (1838-1902) en 1885 pour lutter contre les champignons pathogènes de la vigne tels le mildiou (*Plasmopara viticola*) ou l'oïdium (*Uncinula necator*). Mélange de sulfate de

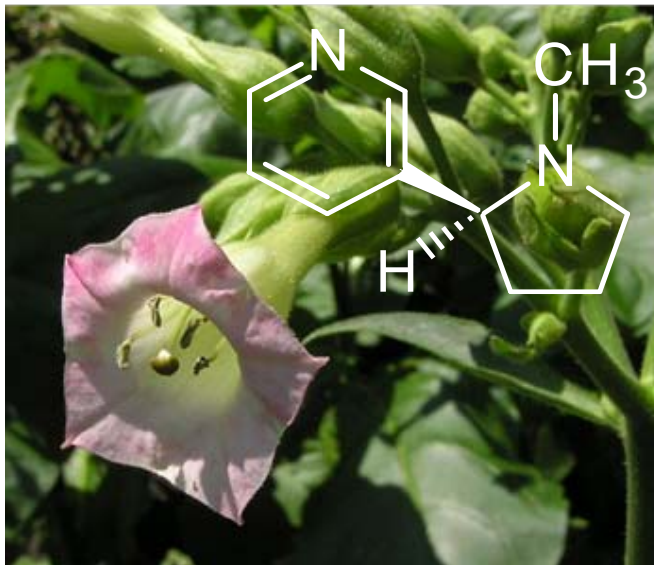
A



B



C



**Figure 1**

**A** : Photographies de Margousier ou Neem (*Azadirachta indica*). De gauche à droite : arbre, branche, fruits (source de composés insecticides).

**B** : Photographie d'un champ de tabac, *Nicotiana tabacum*.

**C** : Photographie d'une fleur de *Nicotiana tabacum* et structure chimique de la nicotine.

cuivre et de chaux, la bouillie bordelaise est encore très largement utilisée, notamment en agriculture biologique, en tant que fongicide et bactéricide sur de nombreuses cultures (vigne, arbres fruitiers ou cultures légumières) (ACTA, 2006). A cette même époque, la lutte contre les insectes ravageurs se fait principalement à l'aide d'insecticides issus de la chimie minérale tel les dérivés de l'arsenic (acéto-arsénite de cuivre contre le doryphore) et la lutte contre les adventices par l'utilisation de produits minéraux non-sélectifs telles des solutions cupriques ou de l'acide sulfurique dilué (Observatoire des résidus des pesticides, 2007 ; Calvet et coll., 2005).

En parallèle d'une utilisation répandue des dérivés arsenicaux (arséniate de plomb), la première moitié du XXème siècle est marquée par le développement des insecticides organiques d'origine naturelle ou de synthèse. Les pyrèthres sont des composés extraits des fleurs des chrysanthèmes, principalement le chrysanthème de Dalmatie (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Leur activité insecticide est due à un mélange d'ester aux toxicités différentes dont les plus actifs sont les pyrèthrines de type I et II (Figure 2B). Leur photosensibilité limitera l'utilisation des pyrèthres et incitera à la recherche de composés plus stables.

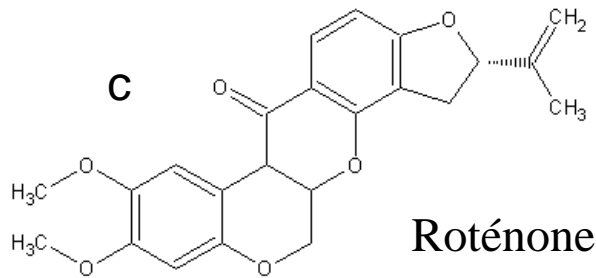
C'est à cette époque que l'usage de la roténone, déjà connue, se généralise (Figure 2A). Mais elle sera supplantée, tout comme les pyrèthres, par l'avènement des insecticides de synthèse, en particulier les organochlorés dont le plus connu est le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane) synthétisé par Othman et Zeilder en 1874 (Figure 3, tableau 1). Ses propriétés insecticides ne furent découvertes qu'en 1939 par P.H. Müller (Prix Nobel de médecine en 1948 pour cette découverte). Au cours de la seconde guerre mondiale, les japonais, qui occupaient les principaux centres de production de pyrèthre, permirent l'essor du DDT en tant que molécule de remplacement. Ce fut l'insecticide « miracle » qui sauva de nombreuses vies en tuant les parasites de l'homme vecteurs de maladie (tel le pou porteur du typhus) pendant et après la seconde guerre mondiale. Interdits par la suite à cause de leur rémanence et de leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, les organochlorés connurent leurs heures de gloire jusqu'aux années 70.

Actuellement, le débat renaît autour du DDT. Des articles du quotidien *Le Monde* du 19 et du 20 septembre 2006 indiquent que l'Organisation Mondiale de la Santé envisage de permettre la réintégration du DDT dans la lutte anti-vectorielle contre le paludisme. Le parasite responsable de la maladie est transmis lors de la piqûre par un moustique du genre des anophèles, parmi eux, *Anopheles gambiae*, *A. funestus* et *A. nili*. Les chiffres sont

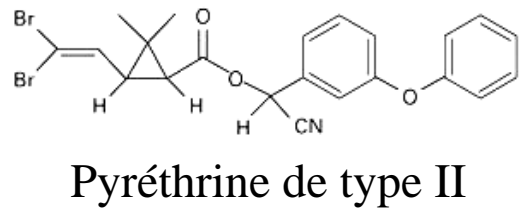
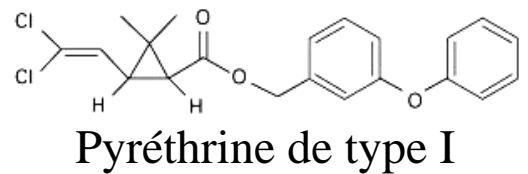
A a



b



B



**Figure 2**

A : Photographies de *Lonchocarpus* et de *Derris* dont est issue la roténone.

a- Branche de *Lonchocarpus*

b- Fleur de *Derris* et feuille en encadré

c- Structure chimique de la roténone

B : Photographies d'un plant de chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium* et structure chimique des deux plus actifs esters extraits de cette plante : les pyréthrines de type I et les pyréthrines de type II

	HERBICIDES	FONGICIDES	INSECTICIDES
<b>Avant 1900</b>	Sulfate de cuivre Sulfate de fer	Soufre Sels de cuivre	Nicotine
<b>1900-1920</b>	Acide sulfurique		Sels d'Arseenic
<b>1920-1940</b>	Colorants nitrés		
<b>1940-1950</b>	Phytohormones		Organochlorés Organophosphorés
<b>1950-1960</b>	Triazines Urées substituées Carbamates	Dithiocarbamates Phtalimides	Carbamates
<b>1960-1970</b>	Dipyridyles Toluidines	Benzimidazole	
<b>1970-1980</b>	Amino-phosphonates Propionates	Triazoles Dicarboximides Phosphites Morpholines Phenylamides	Pyrethriinoïdes Benzoyl-urées Regulateurs de croissance
<b>1980-1990</b>	Sulfonyle urées	Diethofencarbe	Néonicotinoïdes
<b>1990-2000</b>	Isoxaflutole Carfentrazone	Strobilurines SDN	Phénylpyrazoles
<b>Depuis 2000</b>	Sulfonyle-amino- Carbonyl-triazolinones	Silylamides	Oxadiazines

**Tableau 1**

Historique de l'utilisation des pesticides D'après Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement, Calvet et coll. 2002. Edition ACTA. Actualisé d'après l'Index phytosanitaire ACTA 2006.

éloquents : « Environ 40 % de la population mondiale, habitant pour la plupart dans les pays les plus pauvres du monde, sont exposés au paludisme. Environ 500 millions de cas de paludisme aigu sont recensés chaque année. » (Paul Benkimoun, *Le Monde*, 20 septembre 2006). Officieusement, le nombre de décès est estimé à plus de trois millions par an.

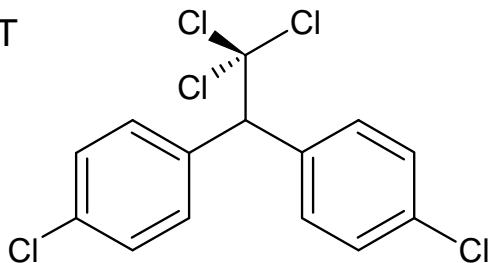
Du côté des herbicides, la découverte majeure fut celle des auxines de synthèse par Zimmerman et Hitchcock en 1942. Les plus connus sont le 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D), l'acide 2,4,5-trichlorophénoxy-acétique (2,4,5-T) et l'acide 4-chloro-2-méthyle phénoxyacétique (MCPA) (Figure 3). Ils agissent uniquement sur les dicotylédones en altérant le fonctionnement des méristèmes primaires et en stimulant les méristèmes secondaires seulement présents chez cette classe (Gaillardon et coll., 2001).

Concernant les fongicides, le soufre et le cuivre sont les plus utilisés dans la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. La découverte des dithiocarbamates en 1934 fût une grande avancée dans la lutte contre les champignons pathogènes mais leur utilisation ne se généralisera qu'après 1950 (Manèbe, figure 3, tableau 1).

Le véritable essor des pesticides se fit pendant la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup>, avec une multiplication des molécules disponibles et une utilisation intensive jusqu'à la fin des années 70. Ce fut l'âge d'or des organochlorés, puis des organophosphorés, des carbamates et des pyrèthrinoïdes. Depuis, la tendance est à la baisse, surtout pour les herbicides et les insecticides pour lesquelles les quantités utilisées à l'hectare ont été diminuée d'au moins 60% (Bernard et Rameil, 2005). A titre d'exemple, les quantités utilisées en 1975 pour les insecticides étaient comprises entre 150g et 1000g/ha, actuellement, grâce en partie aux pyrèthrinoïdes elles sont entre 5 et 50g/ha. En ce qui concerne les herbicides, les quantités qui variaient entre 500 et 2000g/ha avec les triazines en 1980 sont aujourd'hui de l'ordre de 20g avec les sulfonilurées (Calvet et coll., 2005). Malgré une diminution des produits de synthèse, cette tendance est moins forte pour les fongicides du fait d'une forte utilisation du cuivre et du soufre toujours d'actualité (Bernard et Rameil, 2005).

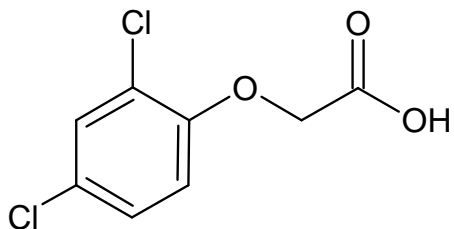
Ces baisses des quantités utilisées s'expliquent par plusieurs phénomènes. Tout d'abord, grâce à l'innovation constante des industries phytosanitaires, les nouvelles molécules mises sur le marché sont de plus en plus actives, quelques dizaines de grammes suffisent à l'hectare. De plus, pour des raisons économiques (traiter massivement à un coût élevé pour l'agriculteur), écologique (protéger l'environnement et la biodiversité des résidus) ou

Insecticide : le DDT

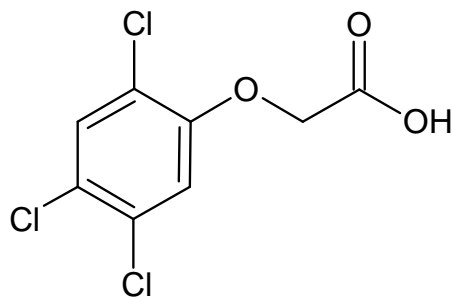


Herbicides :

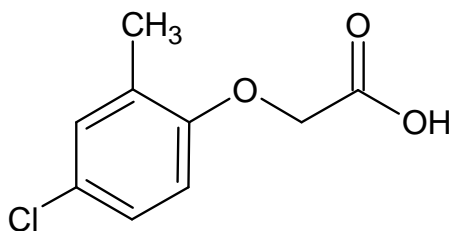
le 2,4 D



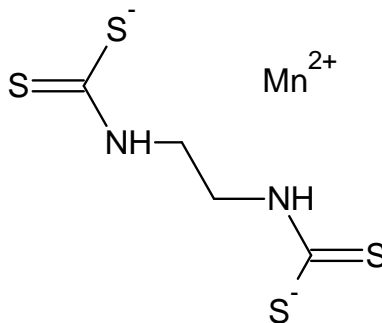
le 2,4,5 T



le MCPA



Fongicide : le manèbe



**Figure 3**

Structures chimiques des premiers pesticides de synthèse développés dans la 1ère moitié du XXème siècle : le DDT, le 2,4 D, le 2,4,5 T, le MCPA et le manèbe.

sanitaires (les pesticides ne sont pas sans danger pour la santé humaine), la tendance actuelle est d'utiliser la lutte chimique à bon escient, de la raisonner dans le cadre de la protection biologique intégrée.

### **3. Définition des produits phytosanitaires**

Avant de poursuivre, il est important de rappeler deux définitions. Tout d'abord le terme de « produits phytopharmaceutiques » (directive 91/414/CEE) désigne « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

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

Le terme de « produits biocides » (directive 98/8/CEE) désigne « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique ». Ne sont pas concernés par cette définition, les produits spécifiques pour la protection des plantes ou produits végétaux quelle que soit l'application.

Ainsi un insecticide utilisé pour la protection des plantes sera appelé produit phytopharmaceutique mais s'il est utilisé pour la désinfection d'un bâtiment ce sera un produit biocide. Les termes de « pesticide » et de « produit phytosanitaire » rassemblant toutes les substances quelque soit leur utilisation seront donc retenus dans la suite de ce manuscrit.



#### **4. Le marché des produits phytosanitaires**

Les chiffres sont des indicateurs à prendre avec précaution car ils révèlent le marché des pesticides mais pas leur consommation. En effet, la consommation des produits phytosanitaires est estimée à partir des chiffres de vente des principales firmes phytopharmaceutiques. Pour une année donnée, l'utilisation réelle des produits ne correspond pas toujours aux chiffres de vente compte-tenu des stockages et déstockages. De plus, les prix et les doses d'applications sont très variables d'une substance active à une autre.

En 2005, le marché des produits phytosanitaires représente plus de 31 milliard de dollars au niveau mondial. L'Amérique du Nord, l'Asie et l'Europe représentent plus des trois quarts du marché (Figure 4A). Par catégorie de produits, les herbicides sont nettement majoritaires en représentant presque 50% du marché. Les insecticides et les fongicides constituent chacun près d'un quart du marché mondial (Figure 4B). Ces répartitions ont peu évolué au cours des dernières années (UIPP<sup>1</sup>).

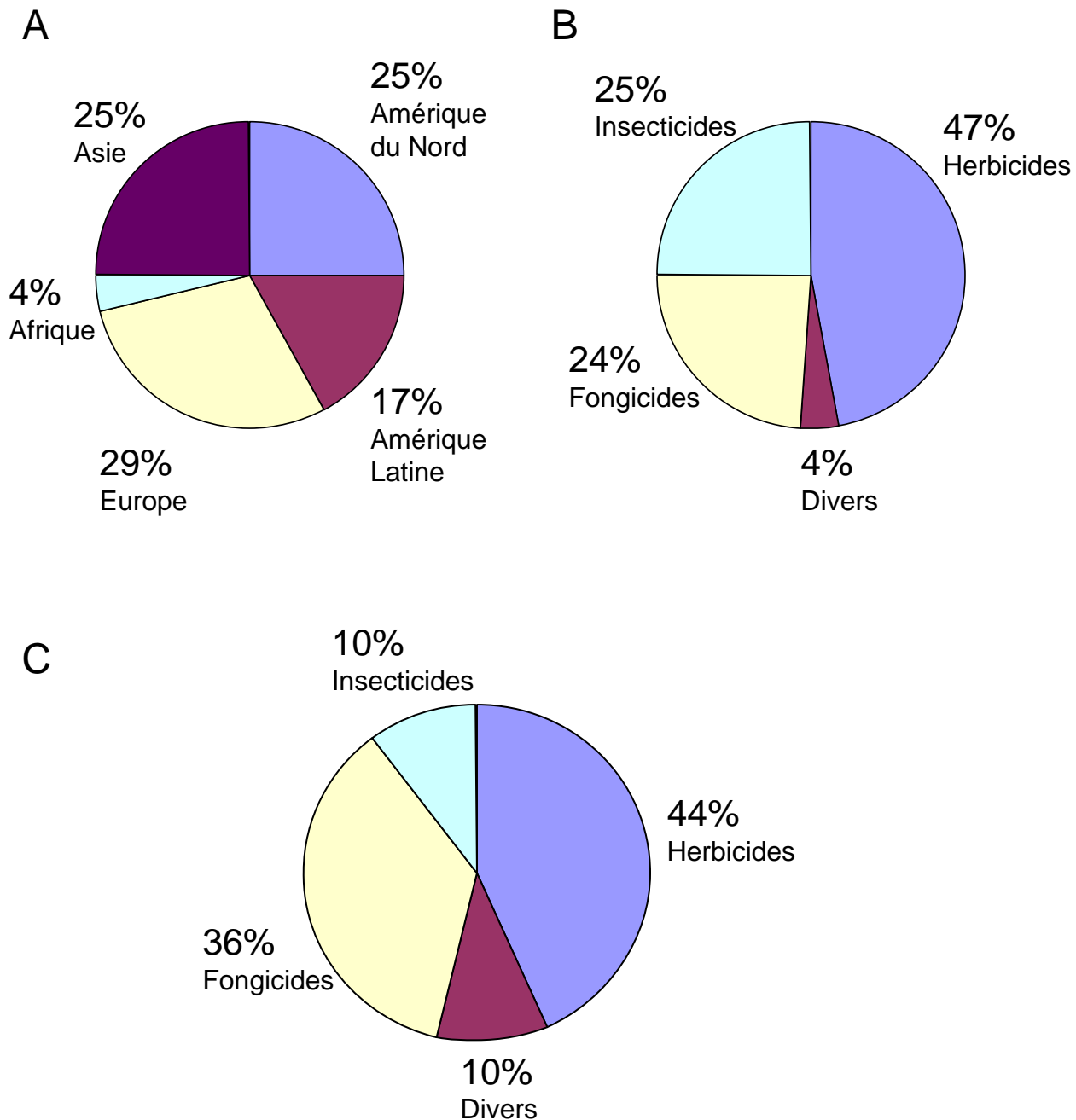
La France possède 33 millions d'hectares de terres cultivées soit 60 % de son territoire. Elle est le premier consommateur de produits phytosanitaires en Europe et le troisième au rang mondial avec 80 000 tonnes vendues par an.

Cependant, d'une année à l'autre la consommation des pesticides est influencée par de nombreux facteurs. Le premier est les conditions climatiques qui vont définir la pression parasitaire et par conséquent l'intensité des traitements. A titre d'exemple, la campagne agricole 2002-2003 a vu une baisse de 8,5% du chiffre d'affaire dégagé par le marché des produits phytosanitaires en grande partie grâce au contexte climatique : inondations dans le Sud-Est de la France à l'automne, périodes de gel en janvier, février et début avril, sécheresse au printemps puis canicule en été. La réunion de tous ces facteurs a occasionné des dégâts sur les cultures et un retard de développement des parasites.

L'intérêt de plus en plus grand pour les biocarburants a largement contribué à l'augmentation des surfaces cultivées en colza au cours des dernières années (de 1079 milliers d'hectares en 2003 à 1211 milliers en 2005). Or les fortes pressions parasitaires subies par le colza nécessitent de nombreux traitements. Ce changement de culture, au détriment de cultures telles le maïs, a ouvert un nouveau marché et ainsi participé à une hausse unique du chiffre d'affaires des ventes de fongicides, d'herbicides et d'insecticides lors de la campagne

---

<sup>1</sup> Union des Industries de la Protection des Plantes. <http://www.uipp.org/repere/chiffre.php>



**Figure 4**

Le marché des produits phytosanitaires (Source, IUPP).

**A** : le marché mondial (2005) des produits phytosanitaires par région du monde, en pourcentage du chiffre d'affaire total (31 190 millions de dollars).

**B** : le marché mondial (2005) des produits phytosanitaires par catégorie de produits, en pourcentage du chiffre d'affaire total (31 190 millions de dollars).

**C** : le chiffre d'affaire de la campagne 2004-2005 en France, par catégorie de produits, en pourcentage du chiffre d'affaire total (1 867 millions de d'euros).

2004-2005 (Figure 4C). Cette hausse reflète une année particulière et souligne l'importance du type de culture dans la consommation des produits phytosanitaires. En effet, les premiers résultats de la campagne 2005-2006 confirment la tendance à la baisse depuis 1999.

Cette tendance est en grande partie due à l'évolution du comportement des agriculteurs vers l'« agriculture raisonnée » qui se confirme au fil des années. Les décisions réglementaires (voir détails par la suite) en interdisant ou réduisant les doses des produits contribuent à une baisse des quantités utilisées en agriculture. Le point noir reste l'utilisation de produits pondéreux comme le soufre et le cuivre (environ un quart des tonnages) essentiellement en agriculture biologique. Globalement, la quantité de substances actives utilisée en France régresse, bien que modérément, depuis 1990.

## **5. La réglementation**

La réglementation autour des pesticides est de plus en plus restrictive. Le premier texte de la législation française relatif aux pesticides date de novembre 1943. Plusieurs décrets, lois et arrêtés plus tard, la France puis l'Europe ont pris de grandes décisions pour réglementer l'usage et la mise sur le marché des produits phytosanitaires. Trois textes sont à la base de la législation européenne sur les pesticides<sup>1</sup>.

La directive n° 91/414/CEE et ses annexes fut le premier texte de loi majeur de la communauté européenne. Face à l'importance des productions végétales et par conséquent de l'utilisation des pesticides dans la Communauté, celle-ci a légiféré afin d'uniformiser les règles dans les pays membres. Cette uniformisation a pour but d'assurer le bon fonctionnement du marché intérieur et surtout de protéger l'homme, les animaux et l'environnement. Cette directive a permis d'établir une liste communautaire des substances actives (Annexe I) et la procédure à suivre pour permettre la mise sur le marché d'une préparation (Annexe II et III) assurant la protection de tous : productions végétales, organismes non visés et environnement.

La directive n° 91/414/CEE et ses annexes ne concernent que les productions végétales, or les pesticides sont utilisés dans d'autres domaines. La directive n° 98/8/CEE et

---

<sup>1</sup> <http://eur-lex.europa.eu>

ses annexes viennent compléter la législation en 1998. Cette directive harmonise les dispositions communautaires au sujet des produits biocides « en posant comme condition un niveau élevé de protection de l'homme, des animaux et de l'environnement ». Elle concerne l'autorisation de mise sur le marché des produits biocides, l'établissement d'une liste des substances actives autorisées et « la reconnaissance mutuelle des autorisations à l'intérieur de la Communauté ».

Enfin, la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (22 mai 2001) est le troisième texte d'importance de la législation européenne. Elle a pour objectif de « protéger la santé humaine et l'environnement des polluants organiques persistants ». Pour se faire elle impose aux parties d'interdire et/ou de prendre les mesures nécessaires pour éliminer ou limiter l'utilisation des substances les plus préoccupantes comme par exemple la dieldrine ou le DDT.

En ce qui concerne la législation en France, depuis la loi du 2 novembre 1943 la plupart des textes ont été abrogés dans les dernières années suite à la rénovation du Code Rural (Ordonnance 2000-550 et Décret en Conseil d'Etat 2003-768)<sup>1</sup>. De plus la législation française s'adapte au fur et à mesure pour suivre l'évolution des directives européennes.

---

<sup>1</sup> [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr)

## **B. Classifications des pesticides**

### **1. Classification chimique**

#### *Les pesticides inorganiques*

Bien que peu nombreux certains sont encore utilisés en très grande quantité comme le soufre et le cuivre en tant que fongicides (25% du volume total des tonnes vendues en 2004 en France, IUPP). Plus aucun insecticide inorganique n'est utilisé aujourd'hui et un seul herbicide est encore employé, le chlorate de sodium. Les pesticides inorganiques sont donc essentiellement des fongicides à base de cuivre et de soufre dont la plus connue est la bouillie bordelaise utilisée sur la vigne, les arbres fruitiers, les pommes de terre et des cultures maraichères.

#### *Les pesticides organo-métalliques*

Ce sont tous des fongicides dont la molécule est constituée d'un anion organique dithiocarbamate et un métal (le manganèse ou le zinc) qui forment un complexe tel le manèbe (avec le manganèse) et le zinèbe (avec le zinc).

#### *Les pesticides organiques*

C'est la classe la plus variée, regroupant plusieurs familles chimiques. La classification de ces familles ou classes chimiques variant d'un ouvrage à l'autre, il est très difficile de dresser une liste particulière. En effet, selon ce que l'on cherche à mettre en valeur : le groupement principal (fonction amine, groupe carbamate), l'arrangement cyclique ou aliphatique des atomes, ou un groupement secondaire particulier (composé chlorés ou fluorés), il est possible de réaliser plusieurs types de classification. Cependant, la classification se fait le plus souvent selon le groupement principal comme le montre le tableau 2.

Famille chimique	Herbicides	Fongicides	Insecticides-acaricides
<b>Acides phénoxyalcanoïques</b>	2,4-D 2,4-MCPA		
<b>Acides benzoïques</b>	dicamba		
<b>Acides picoliniques</b>	piclorame		
<b>Diphényl-éthers</b>	aclonifen bifénox		
<b>Carbamates</b>	phenmédiphame carbétamide chlorprophame	propamocarbe	aldicarbe, carbofuran pyrimicarbe
<b>Thiocarbamates</b>	EPTC triallate	mancozèbe thirame	
<b>Benzonitriles</b>	dichlobénil		
<b>Hydroxybenzonitriles</b>	bromoxynil ioxynil		
<b>Amines, amides</b>	propanil, propyzamide tébutame	mépronil métalaxyl	
<b>Amino-phosphonates</b>	glyphosate		
<b>Toluidines (dinitroanilines)</b>	pendiméthaline trifluraline		
<b>Acétamides</b>	napropamide		
<b>Chloroacétamides</b>	alachlore, métazachlore propachlore		
<b>Triazines</b>	atrazine, simazine, terbutryne		triazoxide
<b>Azoles</b>	aminotriazole	cyproconazole, flutriafol, triticonazole	
<b>Benzothiadiazone</b>	bentazone		
<b>Triazinone</b>	métamitrone métribuzine		
<b>Pyrimidines</b>		fénarimol, éthyrimol	
<b>Imides cycliques</b>		iprodione	
<b>Strobilurines</b>		azoxystrobine	
<b>Urées substituées</b>	chlortoluron, diuron isoproturon, linuron		
<b>Sulfonylurées</b>	metsulfuron-méthyle chlorsulfuron		
<b>Uraciles</b>	bromacile, lénacile		
<b>Ammoniums quaternaires</b>	diquat, paraquat		
<b>Pyréthrinoïdes</b>			cyperméthrine deltaméthrine
<b>Organophosphorés</b>		foséthyl-Al	diazinon, dichlorvos malathion parathion méthyle parathion éthyle
<b>Néonicotinoïdes</b>			imidaclopride
<b>Phénylpyrazoles</b>			fipronil
<b>Oxadiazines</b>			indoxacarbe

**Tableau 2**

Classification chimique des principaux pesticides organiques selon leur usage : herbicides, fongicides, insecticides et acaricides. Quelques exemples de substances actives sont indiqués. D'après Calvet et coll. 2005.

## **2. Classification biologique**

Les ennemis des cultures font partie de tous les groupes d'êtres vivants connus, des acellulaires jusqu'aux mammifères. C'est en fonction de l'organisme vivant qu'ils visent que les pesticides peuvent être également classés. Les principaux sont les herbicides, les fongicides et les insecticides/acaricides (Tableau 2).

### Les adventices et les herbicides

Les adventices sont des plantes herbacées qui, à l'endroit où elles se trouvent, sont indésirables. Concurrentes des plantes cultivées pour l'eau, le soleil et les substances nutritives du sol, les adventices sont également des réservoirs de maladies ou de ravageurs.

Le nombre de matières actives connues est d'environ 150 dont près de 120 sont répertoriées en France (Scalla, 1991) (voir pour revue Gaillardon et coll., 2001) (Tableau 2). La première grande famille d'herbicides correspond aux hormones de synthèse qui miment le mode d'action de l'auxine, perturbant ainsi la croissance des dicotylédones. Le groupe le plus important est constitué de composés interférant avec le photosystème II qui arrêtent la photosynthèse. Il existe également les découplants qui transportent passivement les protons et empêchent les gradients de protons. De plus, des inhibiteurs de la polymérisation des tubulines et donc de la division cellulaire sont utilisés comme herbicides (Gaillardon et coll., 2001).

Les autres familles d'herbicides exercent leur action sur des enzymes bien identifiées du métabolisme végétal, par exemple, la synthèse des lipides, de la cellulose, des caroténoïdes ou d'acides aminés. A titre d'exemple, la protoporphyrinogène oxydase est une enzyme inhibée par ce type d'herbicides.

### Les champignons et les fongicides

Les champignons sont responsables de nombreuses maladies dites cryptogamiques dont les symptômes sont la résultante de l'action parasitaire du champignon et de la réaction de l'hôte.

Les fongicides sont les molécules dont les modes d'actions sont les plus variés (voir pour revue Leroux et coll., 2002)(Tableau 2). Les processus respiratoires, essentiels à la production d'énergie sous forme d'ATP, sont des cibles privilégiées dans la lutte antifongique. En affectant les processus respiratoires, les fongicides inhibent ainsi la germination des spores et immobilisent les zoospores des Oomycètes. Certains sont capables d'inactiver

des nombreuses enzymes impliquées notamment dans la respiration cellulaire. D'autres sont des inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe III ou complexe II) ou du transfert de l'ATP de l'intérieur de la mitochondrie vers le cytoplasme.

Les inhibiteurs de la division cellulaire interagissent avec la  $\beta$ -tubuline ce qui empêche la polymérisation des microtubules, nécessaires à la division cellulaire. Il existe également des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, groupe le plus important de fongicides agricoles. De nouvelles stratégies visent à utiliser les systèmes de défenses des plantes.

### Les insectes et les insecticides

Les insecticides ainsi que leur mode d'action sont détaillés dans le deuxième chapitre de cette partie (II – Cibles des insecticides et résistances).

### Cas particuliers

Bien que les insectes et les acariens soient les ennemis des cultures les plus importants, il existe des pesticides spécifiques des autres nuisibles du règne animal. Les plus importants sont ceux ciblant les invertébrés : les nématodes et les gastéropodes. La majorité des nématicides sont des fumigants (voir section suivante). Le métaldéhyde est le molluscicide le plus répandu bien que son mode d'action ne soit pas connu, les autres composés autorisés en France sont des carbamates (inhibiteurs de l'acétylcholinestérase).

Parmi les vertébrés seuls quelques oiseaux et mammifères sont considérés comme nuisibles. Les rodenticides sont majoritairement des anticoagulants, qui provoquent des hémorragies internes et une anoxie chez les rongeurs. Il existe également des taupicides, des corvicides et des répulsifs contre les oiseaux et le gibier (lapins, lièvres, cervidés) (ACTA, 2006).

Les virus, parasites cellulaires obligatoires, provoquent des viroses dont les symptômes sont très variés. Aucun moyen de lutte directe n'existe contre les viroses. La lutte est basée sur des mesures prophylactiques telles l'utilisation de variétés résistantes et les précautions culturales ou une lutte directe contre les vecteurs dont les principaux sont les animaux (pucerons, aleurodes, nématodes, cicadelles...) et des champignons du sol (*Polymixa*).



Situés entre virus et bactéries dans l'échelle de l'évolution, les phytoplasmes sont des organismes qui se développent à l'intérieur des cellules du phloème. Les moyens de lutte directe contre les phytoplasmoses sont inexistant.

Les bactéries sont responsables de nécroses (gale bactérienne de la tomate, feu bactérien du poirier, du tabac...), de flétrissements (flétrissement bactérien de l'œillet ou de la pomme de terre...), de pourritures molles sur des organes charnus (jambe noire de la pomme de terre) ou de phénomènes de prolifération (gale du collet des arbres fruitiers à noyau). Seuls les sels cupriques (bactériostatiques) et un mélange d'acide acétique, d'acide phosphorique et de peroxyde d'hydrogène ont montré une efficacité sur certaines plantes. La prophylaxie et la lutte anti-vectorielle restent encore les meilleures stratégies (ACTA, 2003).

## **C. Les fumigants**

Les fumigants sont des produits antiparasitaires qui, à une température et une pression données, sont sous une forme gazeuse en quantité suffisante pour tuer un organisme nuisible. Les fumigants présentent un très large spectre d'activité. En effet, ils peuvent être bactéricides, fongicides, insecticides, nématicides et rodenticides. Etant des gaz, les fumigants peuvent se déplacer dans les espaces vides entre les particules de sol (fumigation du sol) ou dans les vides au sein des structures (fumigation ambiante), et pénétrer là où les autres pesticides ne peuvent aller.

Les fumigants sont utilisés dans de nombreux domaines, dès que l'étanchéité peut-être assurée suffisamment longtemps pour garantir leur effet, par exemple :

- le traitement des sols (Figure 5)
- la protection des stocks de graines
- le contrôle des insectes dans les serres
- la lutte contre les termites dans les habitations
- la désinfection des conteneurs de marchandises
- la lutte contre les insectes vecteurs de maladies.

Dans les années 1980, le bromure de méthyle est le fumigant le plus utilisé de part sa grande efficacité et son coût peu élevé. La principale utilisation du bromure de méthyle est la désinfection des sols avant plantation contre les nématodes, les champignons, les insectes et les graines adventices (Figure 5). Il est également utilisé pour la désinfection des serres, la protection des denrées stockées, le traitement des marchandises contre les maladies et les ravageurs de quarantaine. Il est le « biocide » universel.

Mais le revers de la médaille est sévère. D'après l'EPA (Environmental Protection Agency), entre 50 et 95% du bromure de méthyle injecté dans le sol et 90% de celui utilisé dans les serres et les transports est susceptible de se retrouver dans l'atmosphère<sup>1</sup>. Or dans l'atmosphère, le bromure de méthyle réagit avec l'ozone et contribue à sa destruction. Toujours d'après l'EPA, le bromure de méthyle est responsable de 4% de la déplétion de la couche d'ozone. Ce chiffre pourrait aller jusque 15% s'il n'était pas interdit.

Le 16 septembre 1987, le protocole de Montréal relatifs aux substances qui appauvrissent la couche d'ozone fut adopté. Il prévoit une diminution progressive de l'usage

---

<sup>1</sup> <http://www.epa.gov/ozone/mbr/qa.html>

# Préparation du sol

Elimination des obstacles, travail du sol, irrigation



# Application du fumigant

Injection dans le sol ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) ; par le système d'irrigation (métam-sodium),  
dispersion de microgranulés (dazomet)



Immédiatement

# Bâchage



3 à 10 jours

# Lacération du film plastique



24 h

# Enlèvement du film plastique



**Figure 5**

Récapitulatif des principales étapes de la fumigation utilisée en traitement des sols.

Photo : fumigation au bromure de méthyle ([www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)).

du bromure de méthyle jusqu'à son interdiction en 2005 dans les pays industrialisés et en 2015 pour les pays en voie de développement. A cause d'un manque d'alternatives aussi avantageuses économiquement, le bromure de méthyle est encore utilisé sur dérogations, principalement aux Etats Unis (McCook, 2006).

Quelles sont les alternatives les plus prometteuses ? Est-il préférable de développer ou d'améliorer les fumigants déjà connus ou d'encourager le développement de nouvelles molécules ?

Le bromure de méthyle étant principalement utilisé en traitement des sols, seules les alternatives existantes ou développées pour cet usage seront abordées en détails. Cependant, d'autres fumigants sont également à l'étude pour le traitement des denrées stockées telles la phosphine, le sulfure de carbone, le dioxyde de soufre ou l'ozone.

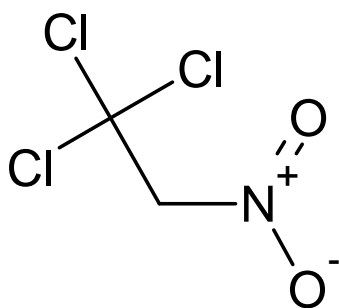
## **1. Les fumigants déjà autorisés**

L'interdiction du fumigant le plus utilisé, a permis de mettre en lumière des fumigants connus depuis longtemps, mais peu exploités à cause du succès du bromure de méthyle. Cette interdiction offre donc de nouveaux horizons pour des fumigants déjà sur le marché.

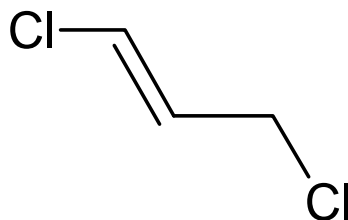
### **a) La chloropicrine**

Les premiers usages de la chloropicrine datent de 1920 (Figure 6). Son intérêt est resté limité jusqu'à ce qu'elle soit utilisée mélangée au bromure de méthyle. En effet, la chloropicrine agit en synergie et potentialise le bromure de méthyle (Wilhelm, 1996). La chloropicrine a une excellente activité fongicide mais est moins effective contre les nématodes et les graines des adventices que le bromure de méthyle (Martin, 2003).

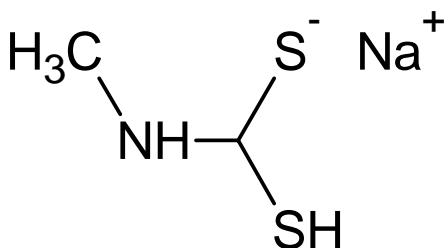
Elle est également utilisée comme « avertisseur d'exposition » en étant ajoutée à certains fumigants indétectables à l'odeur. En effet, la chloropicrine est très irritante et lacrymogène. Combinée à un fumigant inodore, elle permet de signaler une surexposition, protégeant l'utilisateur. Elle est couramment utilisée en mélange ou en alternance avec le bromure de méthyle, le 1,3-dichloropropène et le métam-sodium (Duniway, 2002). De plus



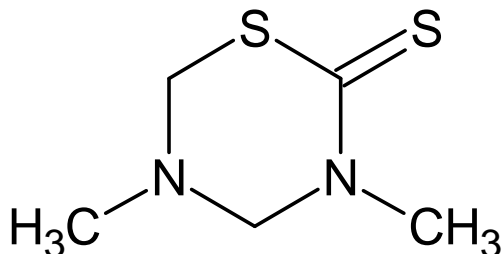
Chloropicrine



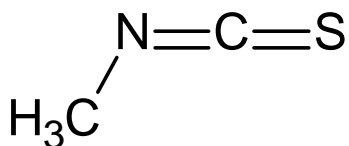
1,3-Dichloropropène



Métam-sodium



Dazomet



Isothiocyanate de méthyle

**Figure 6**

Structures chimiques des fumigants déjà présents sur le marché, pour le traitement des sols, susceptibles de remplacer le bromure de méthyle.

la chloropicrine aurait un effet fertilisant sur les sols en favorisant le développement de micro-organismes bénéfiques aux cultures (Ruzo, 2006).

Actuellement elle n'est autorisée en France que dans une seule formulation, contenant 98% de bromure de méthyle et 2% de chloropicrine, en tant qu'avertisseur (e-phy). Elle pourrait faire l'objet d'une nouvelle évaluation, puisqu'elle est autorisée pour de plus larges usages dans d'autres pays de l'Union Européenne (Testud, 2001b).

### ***b) Le 1,3-dichloropropène***

Le 1,3-dichloropropène (1,3-D) est connu depuis 1956 (Figure 6). Il est utilisé seul, sous le nom de Telone® (Dow AgroSciences), ou en mélange avec la chloropicrine jusqu'à 35% (Telone C-35). Une formulation émulsifiée du Telone C-35 (InLine®, Dow AgroScience) appliquée par rampe d'irrigation (lignes de goutte-à-goutte enterrées) et non par injection dans le sol devrait être bientôt disponible sur le marché américain. Associé au recouvrement du sol avec un film imperméable, ce type d'application, réduit la quantité de fumigant utilisé tout en assurant une excellente efficacité et une meilleure protection de l'utilisateur (Ruzo, 2006). Le 1,3-D présente une très bonne activité nématocide et des propriétés fongicides (Martin, 2003).

En France, le 1,3-D n'est pas commercialisé en mélange, les trois formulations disponibles sur le marché contiennent le produit pur (e-phy).

### ***c) L'isothiocyanate de méthyle et ses précurseurs***

L'isothiocyanate de méthyle (MITC), produit de dégradation du métam-sodium et du dazomet, inhibe de façon non-sélective de nombreuses enzymes (Figure 6) (Ruzo, 2006). Le MITC est un fumigant à large spectre actif contre les nématodes, les graines d'adventices, certains champignons pathogènes et insectes du sol (Duniway, 2002; Ruzo, 2006). Le MITC est également produit par certaines plantes telles les brassicacées qui sont étudiées pour être utilisées comme biofumigants (Matthiessen et Shackleton, 2005).

Le métam-sodium se présente sous forme liquide. Il est injecté dans le sol ou appliqué par irrigation au goutte-à goutte. Le dazomet est disponible sous forme de granulés qu'il faut incorporer au sol (Martin, 2003; ACTA, 2006). La teneur en eau du sol, essentielle pour une

efficacité optimale de ces composés, impose une bonne connaissance de la structure du sol et une gestion de l'irrigation (Ruzo, 2006).

L'intérêt pour ces substances a longtemps été limité à cause de leur efficacité très variable en champs. Les progrès dans les techniques d'applications ont optimisé leur utilisation qui se développe de plus en plus (UNEP, 2005).

## **2. Les alternatives au bromure de méthyle en développement**

### **a) Iodure de méthyle**

Le iodure de méthyle est très proche structurellement du bromure de méthyle (Figure 7). Cette ressemblance structurale fait de lui une alternative prometteuse. Effectivement, il présente une efficacité égale ou supérieure au bromure de méthyle contre les champignons pathogènes, les nématodes et les adventices pour les mêmes concentrations employées (Duniway, 2002). Il diffuse dans le sol plus lentement, mais persiste plus longtemps que le bromure de méthyle tout en étant entièrement biodégradable (Ruzo, 2006).

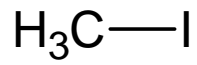
Le Midas® (Arysta LifeScience), spécialité à base de iodure de méthyle, a reçu une autorisation pour usage expérimental sur 400 hectares par l'EPA (Environmental Protection Agency) le 5 septembre 2006. Les résultats obtenus pourraient déboucher sur une utilisation à plus grande échelle<sup>1</sup>.

### **b) Le bromure de propargyle**

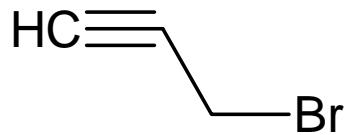
Le bromure de propargyle est connu depuis les années 1960 en tant que fumigant (Figure 7). Son développement n'a jamais abouti sur une mise sur le marché, certainement à cause du risque important d'explosions, n'assurant pas un usage en toute sécurité. Mais la recherche d'alternatives au bromure de méthyle qui a généré un regain d'intérêt pour cette molécule nématicide, fongicide et herbicide, relance le développement de ce composé (Ruzo, 2006). Une nouvelle formulation, plus stable, mise au point par la compagnie Albemarle pourrait permettre à ce fumigant d'être l'une des alternatives viables au bromure de méthyle (Martin, 2003).

---

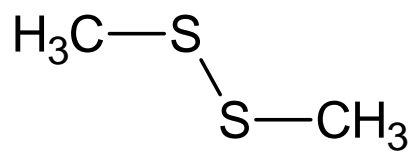
<sup>1</sup> [http://www.arvesta.com/default.asp?V\\_DOC\\_ID=1751](http://www.arvesta.com/default.asp?V_DOC_ID=1751)



Iodure de méthyle



Bromure de propargyle



Disulfure de diméthyle

**Figure 7**

Structures chimiques des principaux composés développés comme alternatives de remplacement du bromure de méthyle pour le traitement des sols.



### c) Le disulfure de diméthyle

Le disulfure de diméthyle (DMDS, Figure 7) est actuellement en développement en tant que fumigant par Cerexagri et Arkema. Le DMDS est une molécule très bien connue dans l'industrie pétrochimique comme agent de sulfuration, dont Arkema est le plus gros producteur au niveau mondial. Grâce à sa demi-vie dans l'atmosphère de quelques heures seulement, le DMDS n'a pas d'effets délétères sur la couche d'ozone (Robinson et coll., 2006).

C'est également une molécule très répandue, issue de nombreux organismes biologiques. Les plantes de la famille des Alliées, telles l'ail, l'oignon et le poireau, sont l'une des sources les plus importantes de DMDS et d'autres dérivés soufrés ayant une activité biocide. Les propriétés des déchets à base d'oignons et de poireaux sont d'ailleurs étudiées afin de les utiliser comme biofumigants (Arnault et coll., 2005).

Le DMDS diffuse très facilement dans le sol (Charles, 2003). Il présente une très bonne activité nématocide (Coosemans, 2005) et fongicide, et est efficace contre certaines graines adventices (Fritsch, 2005). Le DMDS est également un insecticide dont la cible moléculaire est la cytochrome *c* oxidase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) (Dugravot et coll., 2003). Ces effets bactéricides sont encore en cours d'évaluation (Charles, 2003).

Le DMDS présente de nombreux atouts pour être une alternative prometteuse :

- un large spectre d'activité (fongicide, nématocide, insecticide, herbicide et bactéricide),
- une origine naturelle (il est déjà présent dans l'environnement),
- une « zéro ODP » (« ozone depletion potential »),
- et une production déjà bien établie (facilités de développement).

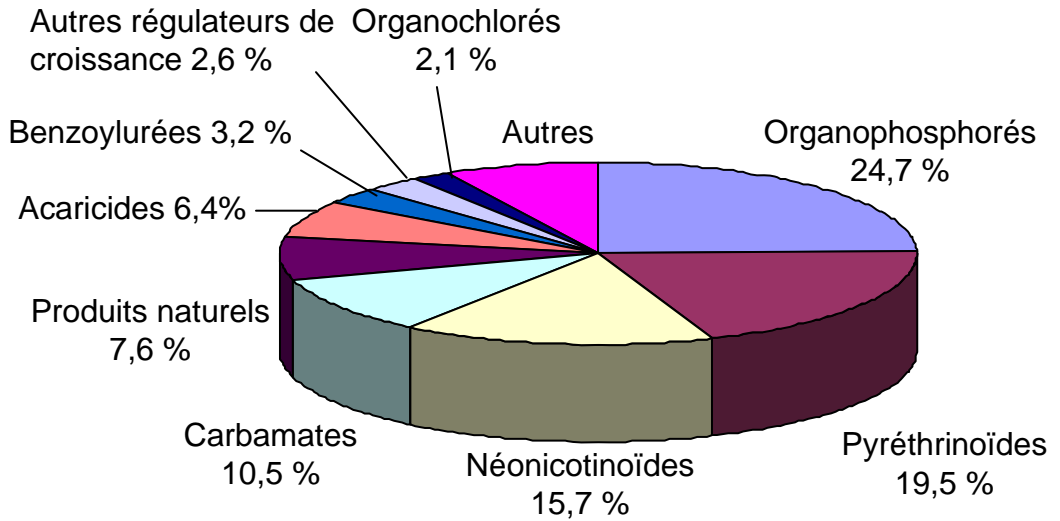
## CHAPITRE 2 - LES CIBLES DES INSECTICIDES ET LES RESISTANCES

Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses. Cependant, seules quatre familles de produits chimiques représentent plus de 10% de part de marché chacune et plus de 70% ensemble : les organophosphorés (à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthriinoïdes de synthèse (à partir de 1970) et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) (Nauen, 2006) (Figure 8A).

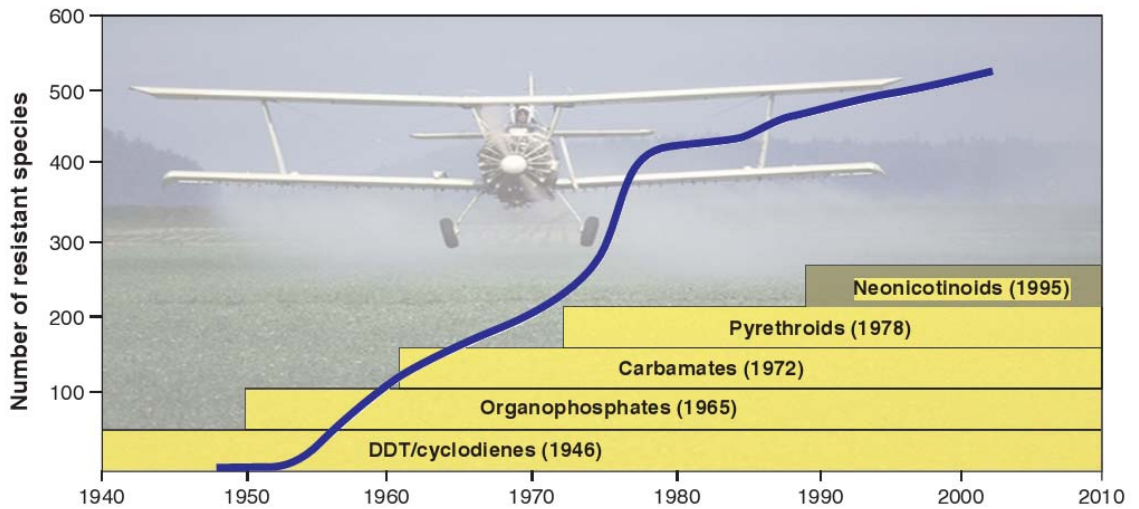
Ces quatre familles agissent sur trois cibles distinctes. Les organophosphorés et les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme qui permet le bon fonctionnement de la transmission synaptique. Les pyréthriinoïdes sont des modulateurs des canaux sodium dépendants du potentiel qui sont à l'origine de la phase de dépolarisation des potentiels d'action. Les néonicotinoïdes, dernière classe d'insecticides, sont des agonistes pleins ou partiels des récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Cette famille inclus l'imidaclopride, l'insecticide le plus vendu au monde, introduit sur le marché par BayerCropScience en 1991.

Mais après des années de lutte chimique intensive, de nombreux insectes ont développé des mécanismes de résistance devenant de moins en moins sensibles aux molécules utilisées. Au cours des 60 dernières années, l'introduction de nouveaux insecticides a toujours été suivie par l'apparition de nouvelles résistances, avec de plus en plus d'insectes multirésistants (Figure 8B). L'enjeu actuel n'est plus uniquement de découvrir de nouvelles molécules pour tenter de gagner cette course contre la montre mais d'identifier les mécanismes à l'origine de ces résistances et de les gérer par l'alternance ou l'association d'insecticides aux modes d'action différents. C'est à cette fin que fut développé l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) en 1984. Comité d'industriels et d'experts scientifiques, l'IRAC a pour but d'informer et d'éduquer les utilisateurs sur les mécanismes de résistance, et surtout de promouvoir la gestion des résistances dans les stratégies de lutte contre les insectes.

A



B



**Figure 8**

A : Parts de marché des différentes classes d'insecticides au niveau mondial (chiffres 2003). D'après Nauen, 2006.

B : Augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistants en fonction de l'apparition de nouvelles classes d'insecticides utilisées à grande échelle. D'après Denholm, 2002.

## **A. Les cibles neurotoxiques**

La cible principale des insecticides est le système nerveux central des insectes puisque près de 90% des insecticides sont neurotoxiques. Ils agissent sur les canaux ioniques dépendants du potentiel, touchant la genèse de l'activité nerveuse, sur les systèmes enzymatiques synaptiques et sur les récepteurs ionotropes, altérant la transmission synaptique, relai nécessaire de l'information nerveuse (Figure 9).

### **1. Les canaux ioniques dépendants du potentiel**

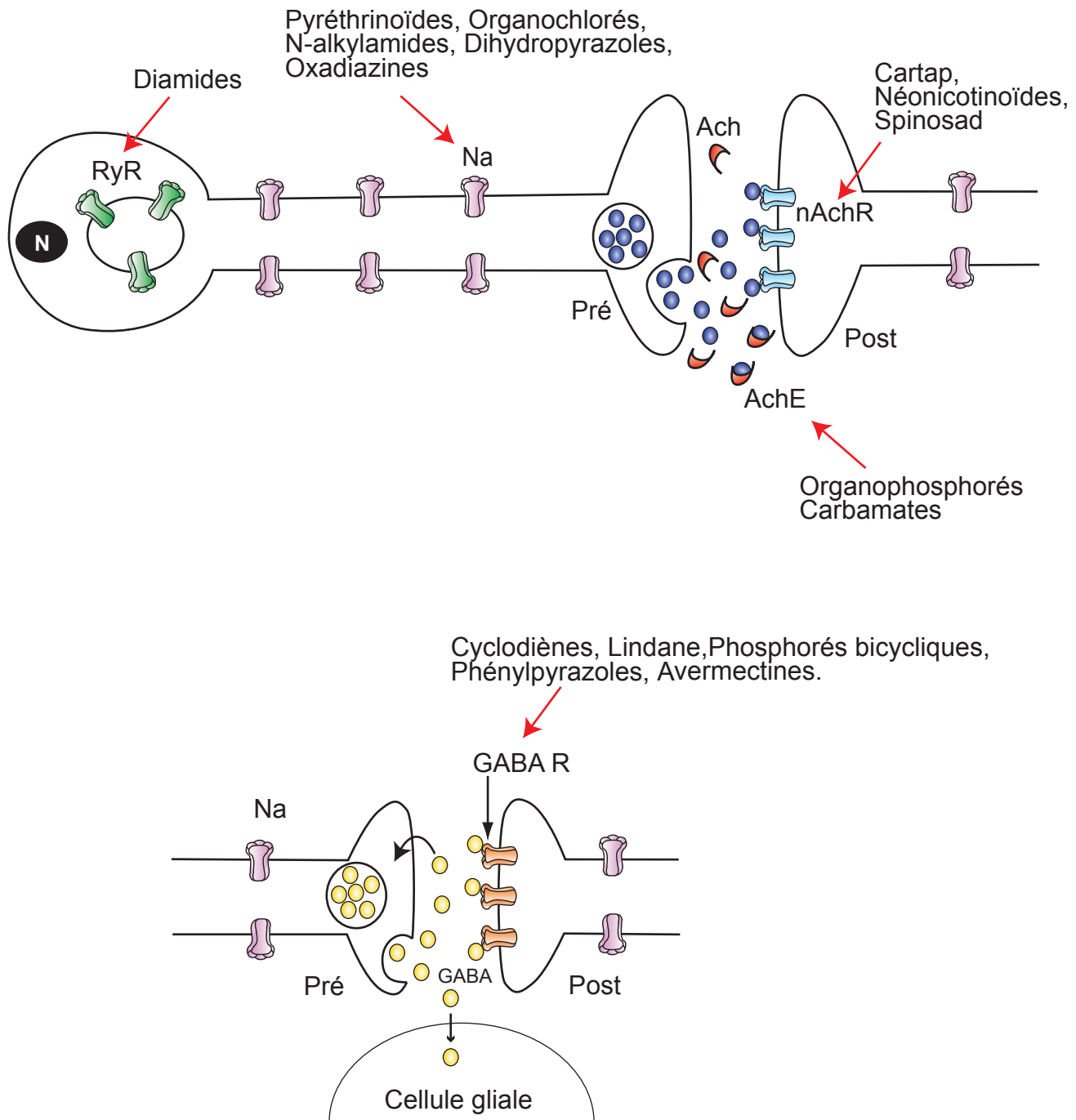
#### **a) Le canal sodium : une cible privilégiée**

Élément clé de l'excitabilité neuronale, le canal sodium est une cible privilégiée pour de nombreux insecticides. Cinq familles de molécules agissent sur ce canal : les pyréthriinoïdes, les organochlorés, les pyrazoles, les alkylamides et la dernière génération, les oxadiazines (Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999; Lapied et coll., 2001; Raymond-Delpech et coll., 2005; Shafer et coll., 2005; Silver et Soderlund, 2005b; Dong, 2007) (Figure 9 et tableau 3).

#### **Les pyréthriinoïdes**

Les pyréthriinoïdes ont été développés à partir des années 70 grâce à la synthèse chimique de molécules photostables analogues des pyréthrines naturelles. Ils représentent près de 25% du marché mondial des insecticides (Shafer et coll., 2005).

Les pyréthriinoïdes sont classés en deux groupes selon leur structure chimique et leur mode d'action. Structurellement, la différence clé entre les groupe I et II est l'absence ou la présence, respectivement, d'une liaison  $\alpha$ -cyanée. Bien que leurs modes d'action soient sensiblement différents, leur cible est identique. Les pyréthriinoïdes modulent le canal sodium. Suite à l'application de pyréthriinoïdes sur l'axone de blatte *Periplaneta americana*, le courant sodium ne s'inactive plus totalement et les queues de courant ainsi induites ont des constantes de temps de plusieurs millisecondes (Pelhate, 1985). De plus ils déplacent l'activation vers des potentiels plus négatifs et ralentissent la fermeture de la variable d'activation (Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999; Narahashi, 2000; Shafer et coll., 2005).



**Figure 9**

A : Représentation schématique d'un neurone et d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des insecticides. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; AChR : récepteur cholinergique de type nicotinique. N : noyau ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique ; RyR : récepteur à ryanodine (Modifié d'après Raymond-Delpech et coll., 2005).

Les pyréthrinoïdes de type II ralentissent plus longtemps l'inactivation que le type I. Le type I prolonge l'inactivation juste suffisamment pour provoquer une activité répétitive alors que le type II la prolonge si longtemps que la membrane se dépolarise. Cette dépolarisation cause une diminution du gradient électrochimique du sodium ce qui entraîne une diminution de l'amplitude des potentiels d'action puis la perte de l'excitabilité neuronale (Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999; Narahashi, 2000; Shafer et coll., 2005).

#### Les organochlorés analogues du DDT

Très utilisés après la seconde guerre mondiale, surtout pour le contrôle des insectes vecteurs de maladies (voir détails dans la 1<sup>ère</sup> partie de l'introduction) le DDT a été interdit en 1972. Depuis, les organochlorés ont presque tous été retirés du marché. En France, le dicofol (acaricide) est le seul composé, analogue du DDT, à être encore commercialisé, (ACTA, 2006). Le mode d'action des organochlorés a été montré comme identique à celui des pyréthrinoïdes de types I (Bloomquist, 1996; Zlotkin, 1999).

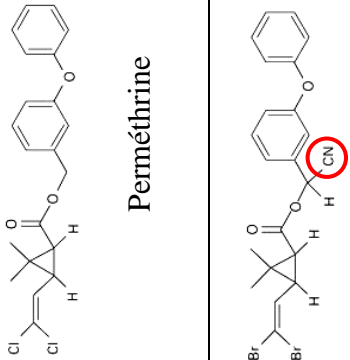
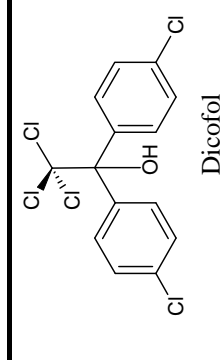
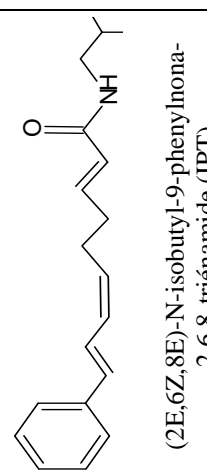
#### Les N-alkylamides

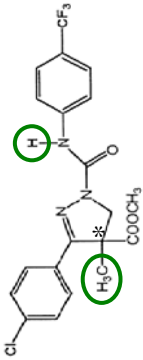
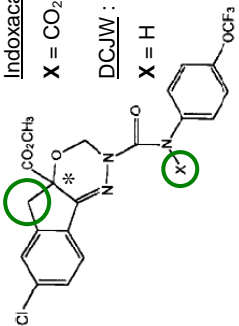
Les N-alkylamides sont une classe d'insecticides, aussi connus sous le nom d'isobutylamides, qui présentent une chaîne aliphatique insaturée et une liaison amide. Ce sont des composés naturels isolés de racines et des fruits de plantes de la famille des *Piperaceae*, *Compositae* et *Rutaceae* ou leurs dérivés de synthèse (Zlotkin, 1999). Les N-alkylamides sont divisés en deux groupes basés sur leur structure, aliphatique (affinine) et aromatique (BTG 502).

L'isobutylamide de synthèse (2E,6Z,8E)-N-isobutyl-9-phenylnona-2,6,8-triénamide (IPT) module l'activité nerveuse de façon similaire à la tétrodotoxine et au DDT suggérant une action sur le canal sodium (Blade et coll., 1985). Malgré de nombreux efforts, aucun N-alkylamide de synthèse n'a su encore montrer une stabilité ou une activité au champ suffisante pour un développement commercial.

#### Les pyrazoles et dihydropyrazoles

Malgré une activité insecticide très prometteuse, ces molécules sont restées confinées dans les laboratoires du fait de leur toxicité importante sur les mammifères (Bloomquist, 1996; Silver et Soderlund, 2005b).

Insecticides	Structure (exemples)	Cible moléculaire	Résistances développées	Spécialité commerciale (exemple/firme)	Références
P Y R E T H R O I D E S	 <p>Permethrine</p> <p>Deltaméthrine</p>	<p>Augmentation de la fréquence des PA (activité répétitive)</p> <p>Ralentissement de la variable d'activation du courant sodium</p>	<p>Résistance de cible type <i>kdr</i> et <i>super kdr</i></p> <p>Résistance métabolique (monooxygénases)</p>	<p>Mouxine PM 25</p> <p>NEODIS Elvagri</p>	<p>Narahashi, 1992</p> <p>Zlotkin, 1999</p> <p>Narahashi, 2000</p>
	type II	 <p>Dicofof</p>	<p>Augmentation de la fréquence des PA (activité répétitive)</p> <p>Ralentissement de la phase d'inactivation du courant sodium</p>	<p>Résistance de cible type <i>kdr</i></p> <p>Résistance métabolique (GSH S-transférases)</p>	<p>Kheltane</p> <p>Dow AgroSciences</p>
N-alkyl-amides	 <p>(2E,6Z,8E)-N-isobutyl-1-9-phenylnona-2,6,8-triénamide (IPT)</p>	<p>Augmentation de la fréquence des PA (activité répétitive), PA prolongés, dépolarisation de la membrane</p>	<p>ND</p>	<p>Non commercialisé</p>	<p>Blomquist, 1996</p> <p>Zlotkin, 1999</p>

<p><b>Dihydro-pyrazoles</b></p>	 <p style="text-align: center;">RH-3421</p>	<p>Diminution de l'activité électrique Inhibition dépendante du potentiel du courant sodium</p>	<p>ND</p>	<p>Non commercialisé</p>	<p>Salgado, 1990 Salgado, 1992 Silver et Soderlund, 2005a</p>
<p><b>Oxadiazines</b></p>	<p><u>Indoxacarbe</u> : X = CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p> <p><u>DCJW</u> : X = H</p>  <p style="text-align: right;">* : centre chiral</p>	<p>Blocage de l'activité électrique Inhibition du courant sodium dépendante du potentiel et de la concentration</p>	<p>Résistance métabolique (monooxygénases)</p>	<p>Explicit Steward DuPont Crop Protection</p>	<p>Wing et coll., 1998 Lapiéd et coll., 2001 Zhao et coll., 2005 Silver et Soderlund, 2005a</p>

**Tableau 3**

Tableau présentant la structure, les effets sur l'activité électrique et sur le canal sodium, le type de résistance et un exemple de spécialité commerciale pour les insecticides touchant le canal sodium. Les cercles indiquent les modifications structurales entre deux familles proches (pyréthrinoides I/II et dihydro-pyrazoles/oxadiazines). ND : non déterminé.



Le RH-3421, un dihydropyrazole, bloque l'activité électrique spontanée des neurones sensitifs, moteurs et centraux de la blatte *Periplaneta americana* et des larves du papillon *Manduca sexta* (Salgado, 1990). Les pyrazoles agissent en bloqueurs dépendants du potentiel des canaux sodium et décalent la courbe d'inactivation lente à l'état stable vers des potentiels plus négatifs suggérant une fixation sur l'état inactivé du canal (Salgado, 1992).

### Les oxadiazines

Les oxadiazines sont les dérivés de dernière génération des pyrazolines dont le représentant majeur est l'indoxacarbe (Silver et Soderlund, 2005b). L'indoxacarbe est commercialisé en France depuis 2003 par la société DuPont de Nemours sous deux spécialités : Explicit™ et Steward™ (e-phy, ; ACTA, 2006) (Chou, mais, tomate et vigne). Molécule chirale, l'indoxacarbe est présent sous deux formes d'énantiomères (R et S). Le mélange est nommé selon la proportion de chaque énantiomère, DPX-MP062 (75% S / 25% R) et DPX-JW062 (50% S / 50% R). Les premières études réalisées montrent que des larves de lépidoptères métabolisent l'indoxacarbe en un métabolite secondaire plus actif, le DCJW (Wing et coll., 1998).

Tout comme les dihydropyrazoles, le DCJW diminue le courant sodium et l'activité spontanée au niveau du système nerveux central des larves de papillon *Manduca sexta* (Wing et coll., 1998). Les résultats obtenus par la suite sur neurones de *Periplaneta americana* ont montré également un effet sur le canal sodium (Lapied et coll., 2001). Le mode d'action du DCJW se confirme comme similaire à celui des dihydropyrazoles puisque qu'il semble agir également sur le même site ou sur un site chevauchant, celui des anesthésiques locaux (site 9 d'après Zlotkin, 1999) (Lapied et coll., 2001; Silver et Soderlund, 2005a).

Alors que les canaux sodium dépendants du potentiel sont une cible très exploitée, peu de molécules agissent sur les autres canaux ioniques. Les canaux chlores, potassium et calcium représentent des cibles potentielles pour le développement de nouveaux insecticides.

### **b) Les autres canaux ioniques : des cibles potentielles**

Les canaux chlores dépendants du potentiel ont été identifiés comme seconde cible d'insecticides au mode d'action déjà décrit sur un autre canal ou récepteur. Il s'agit de quelques molécules déjà connues pour leur action sur les récepteurs ionotropes au GABA, tel le lindane ou les avermectines (Bloomquist, 2003), ou sur les canaux sodium, telle la deltaméthrine (Forshaw et coll., 2000). Les canaux potassium ont été décrit comme la cible du 1,2-dibenzoyl-1-*tert*-butylhydrazine (RH-5849), qui a été introduit comme insecticide sur la base de son activité d'agoniste de l'ecdysone (Bloomquist, 1996). Les canaux chlores et potassium ne sont pas, pour le moment, des cibles exploitées.

Une autre cible connaît un regain d'intérêt : les récepteurs à ryanodine qui régulent la sortie de calcium des stocks intracellulaires. La ryanodine a été utilisée comme insecticide à partir de 1945 aux Etats Unis. En activant son récepteur présent sur la membrane des stocks de calcium intracellulaire, elle engendre des contractures des muscles d'insectes, de crustacés et de vertébrés pouvant aller jusqu'à la paralysie (Bloomquist, 1996). Son coût élevé et sa toxicité pour l'homme ont limité son utilisation. Malgré cet échec, le récepteur à ryanodine est devenu une cible potentielle pour une nouvelle génération d'insecticide.

L'intérêt pour les molécules de synthèse touchant le récepteur à ryanodine a été amorcé par une étude sur des dérivés chimiques de la ryanodine ayant une meilleure activité insecticide que cette dernière (Jefferies et coll., 1997). Ce n'est qu'en 2005 qu'est apparu le premier dérivé ayant des potentialités commerciales, le flubendiamide (NNI-0001, Nihon Nohyaku / Bayer) de la famille des diamides d'acide phtalique (Tohnishi et coll., 2005; Ebbinghaus-Kintscher et coll., 2006), rapidement suivi par une deuxième génération de dérivés les diamides d'acide anthranilique dont le représentant majeur est le chlorantranilipole (DPX-E2Y45 ; Rynaxypyr™ ; DuPont de Nemours) (Knight et Flexner, 2005; Lahm et coll., 2005; Cordova et coll., 2006; Nauen, 2006) (Figure 9).

Ces deux nouvelles familles ont l'avantage d'être très spécifique des récepteurs à ryanodine d'insectes (Cordova et coll., 2006; Ebbinghaus-Kintscher et coll., 2006), contrairement à la ryanodine. Leur action rapide sur les insectes combinée aux potentialités qu'offrent une nouvelle cible dans la gestion des résistances promettent un bel avenir à cette nouvelle classe d'insecticides (Nauen, 2006).

## **2. La transmission synaptique**

Les ventes d'insecticides agissant sur la transmission synaptique, surtout la transmission cholinergique, représentent plus de la moitié du chiffre d'affaire annuel (Nauen, 2006)(Figure 8A).

### **a) L'acétylcholinestérase**

L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine après la transmission de l'information par ce neurotransmetteur (Figure 9). Si cette hydrolyse n'a pas lieu, l'augmentation d'acétylcholine induit une activité répétitive des neurones aboutissant à la mort de l'insecte. Au niveau moléculaire, l'acétylcholinestérase présente deux sites, le site estérasique contenant la triade catalitique, et le site triméthyle qui est le site de fixation de la choline (Champ, 1985).

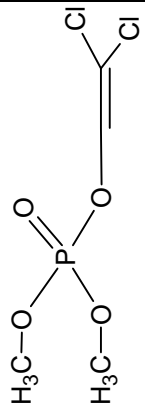
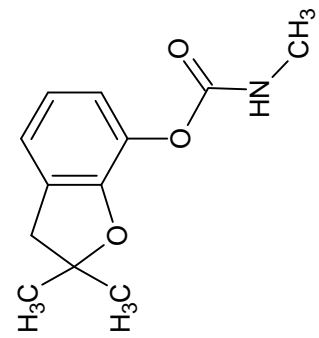
#### Les organophosphorés

Les organophosphorés constituent une grande famille d'insecticides (plus d'une centaines de molécules) commercialisés depuis les années 50. Ils représentent encore presque un quart des ventes d'insecticides au niveau mondial (Nauen, 2006). Les organophosphorés présentent l'avantage d'être très toxiques pour les insectes et peu stables dans l'environnement mais certains d'entre eux sont également très toxiques pour les mammifères (voir chapitre III, toxicologie des pesticides) (Worek et coll., 2005).

Les organophosphorés sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase. Plus précisément, les organophosphorés créent une lésion biochimique en phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant à l'hydrolyse de l'acétylcholine. Dans un deuxième temps, une déalkylation va rendre irréversible cette phosphorylation entraînant le vieillissement de l'enzyme ce qui correspond à une inactivation définitive (Worek et coll., 2005; Costa, 2006)(Tableau 4).

#### Les carbamates

Les carbamates sont également une famille de molécules ayant une grande importance économique et historique. Commercialisés depuis les années 60 les carbamates représentent

Insecticides	Structure (exemples)	Cible moléculaire	Résistances développées	Spécialité commerciale (exemple/firme)	Références
<b>Organo-phosphorés</b>	 <p>Dichlorvos</p>	Inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase	Mutation de cible (AChE) et métabolique Estérases et GSH S-transférases	Dédévap liquide Bayer CropScience	<p>Champ, 1985</p> <p>Worek, 2005</p> <p>Costa, 2006</p> <p>Feyereisen, 1995</p> <p>Regnault-Roger, 2005</p>
<b>Carbamate</b>	 <p>Carbofuran</p>	Inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase	Mutation de cible (AChE)	Diafuran Arista LifeScience SAS	<p>Feyereisen, 1995</p> <p>Gunning, 2001</p> <p>Regnault-Roger, 2005</p>

**Tableau 4**

Les deux grandes classes d'insecticides agissant sur l'acétylcholinestérase : structure, cible, résistances et spécialité commerciale autorisée en France (ACTA, 2006).

aujourd'hui 10% du marché mondial (Nauen, 2006). Au contraire des organophosphorés, ils inhibent l'acétylcholinestérase de façon réversible. En effet, après phosphorylation par un carbamate, l'acétylcholinestérase est capable de se réactiver spontanément plus ou moins rapidement selon la molécule (Tableau 4).

### **b) Les récepteurs à l'acétylcholine**

Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR) sont les récepteurs extra- et post-synaptiques excitateurs les plus importants dans le système nerveux central des insectes (Thany et coll., 2007). Cible connue depuis un siècle, ses potentialités sont exploitées de façon croissante depuis 20 ans (Figure 9).

#### La néréistoxine et ses dérivés de synthèse

La néréistoxine est un puissant bloqueur des nAChR isolé d'un annélide marin *Lumbriconereis heteropoda*. Plusieurs molécules, dérivées de cette structure, ont été développées et utilisées comme insecticides depuis 1960. Les principales sont le cartap, le bensultap et le thiocyclam (Raymond-Delpech et coll., 2005; Millar et Denholm, 2007) (Tableau 5) <sup>(1)</sup>.

La néréistoxine et ses analogues sont des antagonistes non-compétitifs dont l'effet neurotoxique passe par un effet inhibiteur. Cet effet original leur a permis de s'assurer un petit marché, pour contrôler quelques espèces telles que le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*), ou la teigne des crucifères (*Plutella xylostella*). Mais ces molécules ont été dépassées par le succès des agonistes des nAChR comme les néonicotinoïdes (Millar et Denholm, 2007).

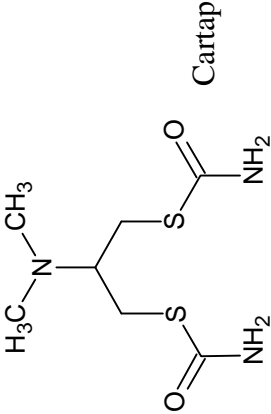
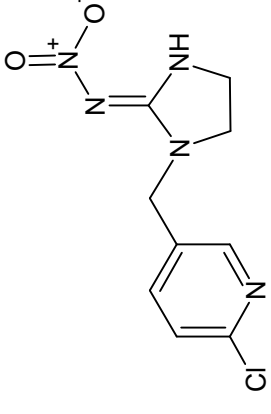
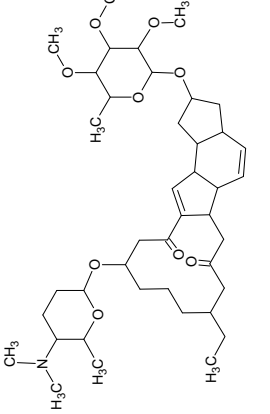
#### La nicotine et les néonicotinoïdes

La nicotine a été utilisée comme insecticide depuis la fin du XVIIème siècle. Elle est un agoniste puissant des nAChR qui tirent leur nom de cette molécule. Son usage est aujourd'hui très limité (elle est interdite en France) du fait de ses effets sur les organismes utiles et sur l'homme.

Les néonicotinoïdes se subdivisent en quatre sous-familles, les nitrométhylènes, les chloronicotinyles, thianicotinyles et les furanicotinyles. La première génération de néonicotinoïdes apparue dans les années 70, avec comme représentant majeur la nithiazine

---

<sup>1</sup> <http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>

Insecticides	Structure (exemples)	Cible moléculaire	Résistances développées	Spécialité commerciale (exemple/firme)	Références
<b>Dérivés de la néréistoxine</b>	 <p>Cartap</p>	Antagonistes non-compétitifs des nAChR	Origine indéterminée	Non commercialisé en France	Ninsin, 2004 Raymond-Delpech et coll., 2005 Nauen et Denholm, 2005
<b>Néonicotinoïdes</b>	 <p>Imidaclopride</p>	Agonistes des nAChR	Résistance métabolique (monooxygénases) Mutation de cible (souvent avec diminution de l'effet de la nicotine)	Confidor Gaucho* Bayer CropScience	Ninsin, 2004 Raymond-Delpech et coll., 2005 Nauen et Denholm, 2005 Thany et coll., 2007
<b>Spinosad</b>	 <p>Spinosyne A</p>	Agonistes des nAChR (sous-unités différentes des néonicotinoïdes)	Mutation de cible	Success4 Dow AgroSciences	Raymond-Delpech et coll., 2005 Nauen et Denholm, 2005 Bielza et coll., 2007 Perry et coll., 2007

**Tableau 5**

Insecticides agissant sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique : Structures, cible, type de résistance, spécialité commerciale. \*retiré du marché français en attente de décision communautaire (ACTA, 2006 ; Dow AgroSciences)

(sous-famille des nitrométhylènes). Très active mais photoinstable, la nithiazine ne connut jamais le succès commercial mais fut le fer de lance d'une nouvelle génération d'insecticides (Nauen et coll., 2001; Millar et Denholm, 2007).

Grâce à quelques modifications structurales, apportant la photostabilité et une plus grande efficacité, la deuxième génération de néonicotinoïdes vit le jour en 1985 avec la découverte de l'imidaclopride commercialisé en 1991 par Bayer (famille des chloronicotinyles) (Tableau 5). D'autres néonicotinoïdes furent développés et commercialisés dans les années qui suivirent : le nitempyram (1995 par Takeda), l'acétamipride (1996 par Soda Japon), le thiamethoxam (1998 par Syngenta), le thiaclopride (2000 par Bayer), la clothianidine (2002 par Takeda et Bayer) et le dinotefuran (2002 par Mitsui) (Millar et Denholm, 2007). Les néonicotinoïdes sont utilisés pour lutter contre les insectes en agriculture, dans les locaux de stockage ou encore en santé animale (par exemple, les produits anti-puces des animaux domestiques).

Les néonicotinoïdes sont tous des agonistes des nAChR mais avec un effet plus ou moins fort selon la molécule. En effet, si l'acétylcholine est définie comme agoniste « plein » des nAChR, alors l'imidaclopride est un agoniste partiel et la clothianidine un « super » agoniste (Matsuda et coll., 2005). La sélectivité de ces composés pour les nAChR d'insectes et leur faible toxicité sur les mammifères ont conduit à leur utilisation grandissante depuis 15 ans.

### Le spinosad

Le spinosad est un mélange de lactones macrocycliques (la spinosyne A et la spinosyne D) isolées de la bactérie *Saccharopolyspora spinosa* (Raymond-Delpech et coll., 2005). Cet insecticide, commercialisé par Dow AgroScience, dispose d'une autorisation provisoire en France depuis 2006. Il est toxique par contact et par ingestion sur une large gamme d'insectes s'attaquant à la vigne et aux arbres fruitiers (les vers de la grappe, la pyrale, les thrips, la drosophile et le carpocapse) <sup>(1)</sup>.

Son efficacité est due à son action combinée sur les nAChR et sur les récepteurs au GABA. De plus, le spinosad agit sur des sous-unités de nAChR différentes de celles visées par les néonicotinoïdes (Raymond-Delpech et coll., 2005; Millar et Denholm, 2007, Tableau 5).

---

<sup>1</sup> <http://www.dowagro.com/fr/success4/>

### c) Les récepteurs ionotropes sensibles au GABA

Le GABA est le neuromédiateur des synapses inhibitrices du SNC des insectes. L'inhibition des synapses GABAergiques provoque une augmentation de l'excitabilité neuronale. A ce titre, les récepteurs au GABA sont des cibles privilégiées d'insecticides (Hue, 1991) (Figure 9).

#### Les cyclodiènes, le lindane et les phosphorés bicycliques

Historiquement, les cyclodiènes, telle que la dieldrine, et le lindane font partie de la première famille d'insecticides de synthèse apparue à la fin de la deuxième guerre mondiale, les organochlorés. Après 30 années d'utilisation intensive, la plupart des organochlorés, furent interdits à cause de leur forte rémanence dans l'environnement et du nombre croissant d'organismes développant des résistances. En France, seul deux cyclodiènes, sont encore autorisés : le diénochloré et l'endosulfan (ACTA, 2006). Les cyclodiènes et le lindane sont des antagonistes des récepteurs au GABA (Bloomquist, 2001; Bloomquist, 2003; Raymond-Delpech et coll., 2005)(Tableau 6).

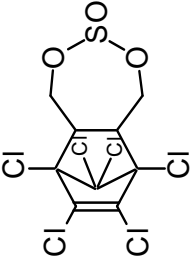
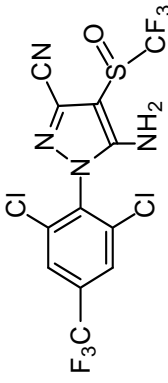
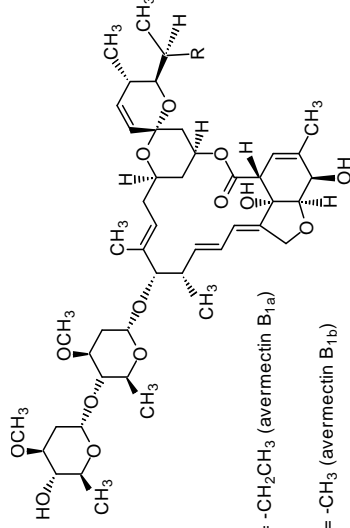
Dans la famille des organophosphorés, connus pour inhiber l'acétylcholinestérase, les dérivés phosphorés bicycliques forment un groupe à part. En effet, ces composés sont des inhibiteurs faibles de l'AcChE mais présentent une activité inhibitrice intéressante sur les récepteurs au GABA d'insectes (Bloomquist, 2003; Raymond-Delpech et coll., 2005).

#### Les phénylpyrazoles

Le représentant principal de cette classe d'insecticides est le fipronil. Le fipronil agit par contact et par ingestion sur de nombreuses espèces d'insectes : coléoptères, diptères, thysanoptères, orthoptères, dictyoptères et hyménoptères (ACTA, 2006). Depuis le 27 février 2004, plusieurs spécialités commerciales contenant du fipronil ont été retirées ou suspendues du marché français en attente d'une décision communautaire. Il ne reste en usage que pour le traitement des locaux de stockage, le matériel de transports, les déchets, les sols ou encore en médecine vétérinaire pour lutter contre les parasites (puces et tiques) des chiens et des chats (e-phy, ; ACTA, 2006).

Le fipronil a pour avantage d'avoir une plus grande affinité pour les récepteurs au GABA des insectes de type RDL ( $CI_{50} = 240 \text{ nM}$ ) que pour les récepteurs  $GABA_A$  des vertébrés ( $CI_{50} = 1,6 \text{ } \mu\text{M}$ ) (Gant et coll., 1998; Raymond-Delpech et coll., 2005). Il augmente la fréquence de décharge des potentiels d'action sur des préparations de SNC d'insectes et



Insecticides	Structure (exemples)	Cible moléculaire	Résistances développées	Spécialité commerciale (exemple/firme)	Références
<b>Cyclodiènes Lindane Phosphorés bicycliques</b>	 <p>Endosulfan</p>	Antagonistes des récepteurs ionotropes au GABA	Mutation de cible ( <i>rdl</i> ) Résistance métabolique (monooxygénases et GSH S-transférases)	Rocky Arista LifeScience SAS	Feyereisen, 1995 Bloomquist, 2001 et 2003 Raymond-Delpech et coll., 2005
<b>Phénylpyrazoles</b>	 <p>Fipronil</p>	Antagonistes des récepteurs ionotropes au GABA (+ GluCl)	Mutation de cible ( <i>rdl</i> ) Résistance métabolique (GSH S-transférases)	Blitz Régent* BASF Agro SAS	Grolleau et Sattelle, 2000 Ikeda et coll., 2003 Le Goff, 2001 et 2005 Raymond-Delpech et coll., 2005
<b>Avermectines</b>	 <p>Abamectine</p> <p>(i) R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (avermectin B<sub>1a</sub>) (ii) R = -CH<sub>3</sub> (avermectin B<sub>1b</sub>)</p>	Bloqueurs à faible concentration et activateurs irréversibles à forte concentration des GABAR (+GluCl)	Résistance métabolique (monooxygénase et estérases) (mutation de cible)	Vertimec Syngenta Agro SAS	Clark et coll., 1994 Bloomquist, 2001 et 2003 Raymond-Delpech et coll., 2005

**Tableau 6**

Insecticides agissant sur les récepteurs ionotropes sensibles au GABA : Structures, cible, type de résistance, spécialité commerciale. \*retiré du marché français en attente de décision communautaire. (ACTA, 2006)

contre l'action du GABA (Gant et coll., 1998). Le fipronil bloque les récepteurs au GABA de type RDL exprimés dans les cellules S2 (*D. melanogaster*) en fonction de leur durée d'ouverture (Grolleau et Sattelle, 2000). Sur les récepteurs GABA de la blatte *Periplaneta americana* il agit à l'état activé et à l'état de repos tout comme sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> (Ikeda et coll., 2001; Zhao et coll., 2003) (Tableau 6).

#### Les avermectines

Les avermectines sont des lactones macrocycliques naturelles (proche des spinosynes) produite par la bactérie *Streptomyces avermitilis*. Plusieurs dérivés semi-synthétiques ont été produits, notamment l'abamectine et l'ivermectine (Bloomquist, 2001). Ces composés agissent de façon originale sur les récepteurs au GABA. A faible concentration (nM) les avermectines bloquent l'action du GABA sur les neurones et les muscles d'invertébrés alors qu'à plus forte concentration ( $\mu\text{M}$ ) elles activent de façon irréversible les récepteurs au GABA (Bloomquist, 2003)(Tableau 6).

#### **d) Les récepteurs ionotropes sensibles au glutamate**

Les récepteurs ionotropes au glutamate (GluCl) n'ont, jusqu'à ce jour, été identifiés que chez les invertébrés faisant d'eux des cibles potentielles d'insecticides (Janssen et coll., 2007). Les insecticides agissant sur les GluCl, ont d'abord été décrits sur d'autres cibles : les récepteurs ionotropes au GABA et les canaux chlores dépendants du potentiel (Tableau 6).

#### Le fipronil

Le fipronil, connu pour toucher les récepteurs ionotropes au GABA, module également les GluCl (Raymond et coll., 2000; Ikeda et coll., 2003). Plus exactement, le fipronil inhibe de façon réversible les GluCl dans leur état activé (Zhao et coll., 2004). La sélectivité du fipronil pour les insectes s'explique en partie par l'inhibition des GluCl.

#### Les avermectines

Les avermectines, telle l'ivermectine, potentialisent ou activent les GluCl. De même que pour le fipronil, l'effet des avermectines sur les GluCl contribue grandement à leur sélectivité pour les invertébrés.

## **B. Les cibles non-neurotoxiques**

### **1. Les régulateurs de croissance des insectes**

La croissance séquentielle est une particularité physiologique des arthropodes. Au cours de leur existence, les insectes passent par plusieurs stades de mues ou de métamorphoses où la synthèse d'une nouvelle cuticule est essentielle. Les régulateurs de croissance des insectes (RCI) perturbent le bon déroulement de cette croissance. Les RCI sont regroupés en trois grandes catégories : les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, tels les benzoyl-urées, les mimétiques de l'hormone juvénile, tel le fénoxy-carbe, et les agonistes de l'ecdysone (hormone déclenchant la mue), telles les benzhydrazides (Tableau 7).


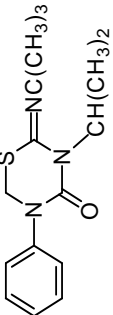
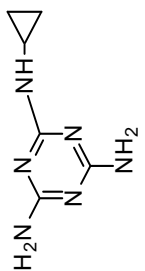

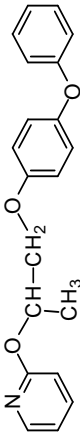
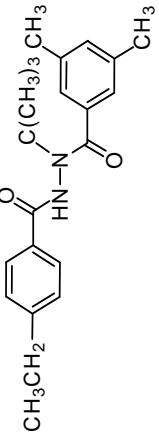
### **2. Les inhibiteurs respiratoires**

La respiration cellulaire fournit l'énergie nécessaire à la vie de la plupart des organismes vivants. La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de cinq complexes protéiques et de coenzymes qui permettent la production d'ATP (complexe I à IV et ATP synthase) (Figure 10). Chaque complexe est une cible d'insecticide (ou d'acaricide). Les composés touchant ces cibles, bien conservées entre les espèces, sont généralement non-spécifiques d'une espèce et donc souvent toxiques.

Il existe quelques insecticides dits multisites qui sont capables d'inhiber plusieurs étapes de la production d'énergie (glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire mitochondriale). Mais ces composés ne sont presque plus utilisés soit pour des raisons toxicologiques comme les dérivés arsenicaux, soit à cause des résistances développées comme les quinoxalines (Delorme et coll., 2002).

#### **a) Inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire**

Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est le plus important et le plus compliqué des complexes de cette chaîne. Il contient au minimum 13 sous-unités chez les bactéries et jusqu'à 43 sous-unités chez les mammifères. Ce complexe catalyse le transfert

Structure et famille chimique	Mode d'action	Insectes ou ordres	Références
<p><b>Inhibiteurs de la synthèse de la chitine</b></p>  <p>Diflubenzuron (Benzoyl-urées)</p>  <p>Buprofézine (Thiadiazinones)</p>  <p>Cyromazine</p>  <p>Fenoxycarbe (carbamate non-neurotoxique)</p>  <p>Pyriproxifène (Pyridines)</p>  <p>Tébufénozide (benzhydrazides)</p>	<p>Interfère avec la mise en place de la chitine</p> <p>Bloque l'hydroxylation de l'ecdysone</p> <p>Rend la cuticule moins extensible</p> <p>Blocage des mues des jeunes stades larvaires (+ ovicides)</p> <p>Déclenchement de mues prématurées (larves) Atteinte de la reproduction (œufs non viables)</p>	<p>lépidoptères</p> <p>homoptères</p> <p>diptères</p> <p>lépidoptères, cochenilles, blattes, moustiques, fourmis</p> <p>aleurodes</p> <p>lépidoptères</p>	<p>Ishaaya, 1998</p> <p>Delorme, 2002</p> <p>Regnault-Roger, 2005</p> <p>INRA, 2006</p>
<p><b>Mimétiques de l'hormone juvénile</b></p>			
<p><b>Agonistes de l'ecdysone</b></p>			

**Tableau 7**

Les régulateurs de croissance des insectes : structure, mode d'action et insectes (ou ordres) d'insectes touchés.

d'électrons du NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) vers l'ubiquinone (ou coenzyme Q) via un mononucléotide à flavine (FMN) et plus de huit centres fer/soufre (Schuler et Casida, 2001)(Figure 10).

### La roténone

La roténone est un insecticide d'origine naturelle. Très utilisée avant 1940, elle est aujourd'hui autorisée essentiellement en agriculture biologique et dans les jardins d'amateurs (e-phy, ; Delorme et coll., 2002). La roténone bloque le transfert des électrons au travers du complexe I. Sa cible moléculaire est la sous-unité « PSST » (Schuler et Casida, 2001). Cette sous-unité est le complexe protéique final qui transfère les électrons du centre fer-soufre N2 à l'ubiquinone (Schuler et coll., 1999).

La sous-unité PSST est également la cible d'acaricides tels le fenpyroximate et le pyridabène (Schuler et Casida, 2001; Delorme et coll., 2002).

### **b) Inhibiteurs du complexe II de la chaîne respiratoire**

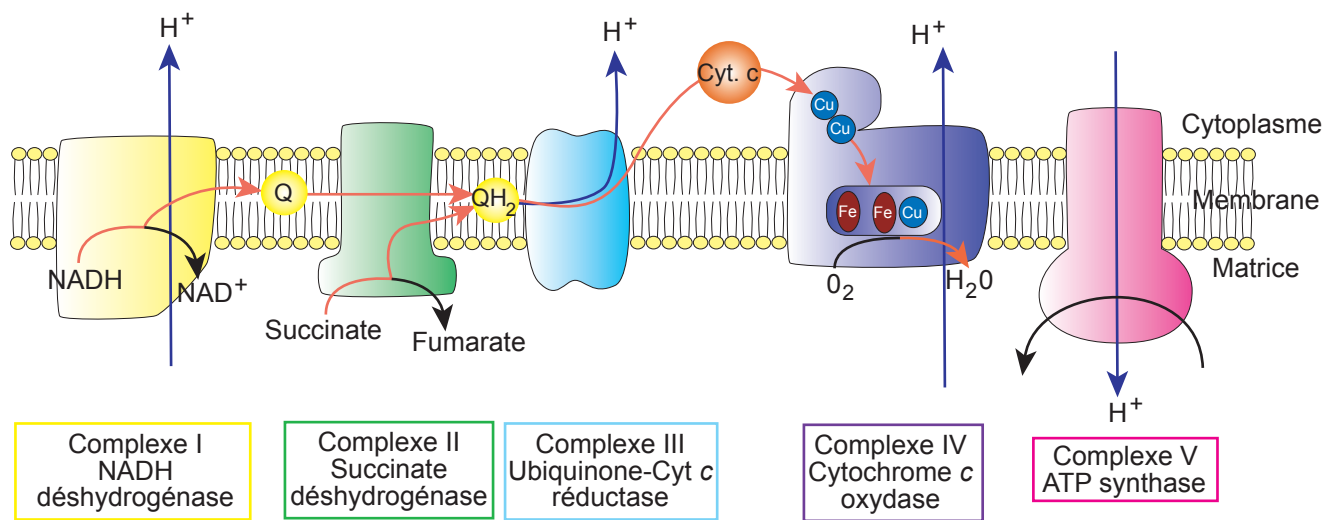
Le complexe II ou complexe de la succinate-CoQ réductase est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Les électrons issus de cette oxydation réduisent l'ubiquinone en ubiquinol. Le complexe II est un ensemble de quatre sous-unités qui contient une flavine adénine dinucléotide, trois centres fer-soufre et un cytochrome *b* (Lancaster, 2002; Rustin et Rotig, 2002)(Figure 10).

### L'hydraméthylnon

L'hydraméthylnon, une amidino-hydrazone, est le seul insecticide touchant le complexe II de la chaîne respiratoire. Il agit en bloquant le transfert d'électrons. Radié par la directive 91/414/CEE, son usage n'est, aujourd'hui, autorisé qu'en tant que biocide, en particulier dans la lutte contre les blattes (Delorme et coll., 2002; ACTA, 2006).

### **c) Inhibiteurs du complexe III de la chaîne respiratoire**

Le complexe III ou ubiquinone-cytochrome *c* réductase accepte les électrons de l'ubiquinol et les transfère au cytochrome *c*. Ce complexe contient 11 sous-unités dont un



**Figure 10**

Chaîne respiratoire mitochondriale. Modifié d'après Lancaster, 2002. Cu : centre cuivre ; Cyt c : cytochrome c ; Fe : centre fer ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; Q : ubiquinone.

cytochrome *b*, une protéine à fer-soufre de type Rieske et un cytochrome *c<sub>1</sub>* (Berry et coll., 2000)(Figure 10).

Aucun insecticide n'a pour cible le complexe III de la chaîne respiratoire. Il est cependant une cible pour des fongicides et un acaricide (l'acéquinocyl) (Delorme et coll., 2002).

#### **d) Inhibiteurs du complexe IV de la chaîne respiratoire**

Le complexe IV (cytochrome *c* oxydase), accepteur final des électrons de la chaîne mitochondriale, est constitué de 11 (*S. cerevisiae*) à 13 (mammifères) sous-unités. Les transporteurs d'électrons de ce complexe sont deux centres cuivre, Cu<sub>A</sub> et Cu<sub>B</sub>, et deux hèmes, *a* et *a<sub>3</sub>* (Figure 10). Les électrons provenant du cytochrome *c* sont utilisés pour réduire l'oxygène moléculaire en eau (Khalimonchuk et Rodel, 2005).

#### **Fumigants**

Bien que de formules chimiques différentes, plusieurs fumigants ont pour cible la cytochrome *c* oxydase. Nous pouvons citer quelques exemples.

Le plus ancien est l'acide cyanhydrique. Il fut utilisé à partir du XIX<sup>ème</sup> siècle pour contrôler les insectes dans les stocks de graines (Price, 1985). Bien qu'il reste d'usage courant dans certains pays, tels le Japon et l'Allemagne, son emploi est aujourd'hui marginal en France (Testud, 2001a).

La phosphine (PH<sub>3</sub>) fut très employée pendant les quarante dernières années. La phosphine a longtemps été considérée comme une alternative au bromure de méthyle. Cependant, de plus en plus de résistances sont développées parmi les insectes, réduisant son usage (Chaudhry, 1997).

La cible moléculaire du DMDS, au centre de ce travail de thèse, a également été identifiée à forte dose comme étant le complexe IV de la chaîne mitochondriale (Dugravot et coll., 2003).

#### **e) Inhibiteurs du complexe V de la chaîne respiratoire**

Le complexe V ou ATP synthétase transforme l'énergie libérée par les quatre précédents complexes en ATP (Figure 10). Il est constitué de deux domaines : F<sub>0</sub> est enchâssé dans la membrane mitochondriale et forme un canal à proton ; F<sub>1</sub>, orienté dans la matrice,

catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP (Weber et Senior, 1997). La réaction que catalyse ce complexe est également appelée phosphorylation oxydative.

### Les découplants

Les premiers découplants à être développés furent les dinitrophénols, peu spécifiques ils ont été progressivement abandonnés. Le chlorfénapyr, un pyrrole, avait été pressenti comme une solution pour lutter contre des souches résistantes des lépidoptères du cotonnier et de la teigne des crucifères (Delorme et coll., 2002). Non autorisé dans de nombreux pays tel le Canada et l'Europe, il fut utilisé aux Etats-Unis pour protéger le coton. Aujourd'hui, il est retiré du marché à cause de sa trop forte toxicité sur les organismes non cibles tels les oiseaux (Environmental et Contaminants Division Pesticides, 2007).

### Les inhibiteurs

Le diafenthiuron est le seul inhibiteur connu en tant qu'insecticide, mais il n'est autorisé en France en particulier à cause de son mauvais profil écotoxicologique. Du côté des acaricides, inhibiteurs de la phosphorylation oxydative, le cyhexatin est le seul commercialisé en France (ACTA, 2006).



## **C. Le phénomène de résistance**

La résistance est définie comme la sélection d'un caractère héréditaire dans une population d'insectes qui se traduit par une perte d'efficacité de l'insecticide utilisé habituellement pour contrôler cette population (IRAC). Le terme de résistance sous-entend une comparaison avec une population d'insectes sensibles à l'insecticide en question. Le terme de résistance croisée est utilisé quand la résistance à un insecticide confère à l'insecte la résistance à un autre insecticide.

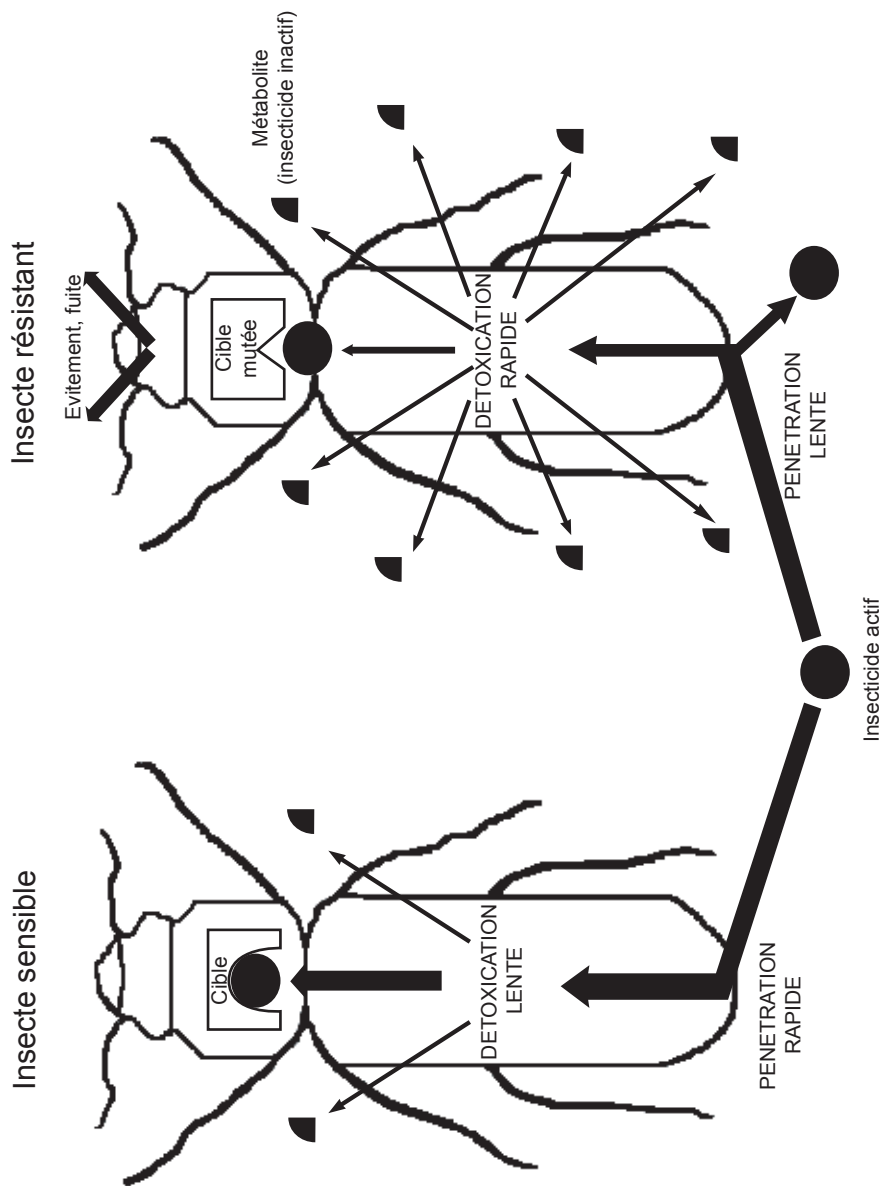
Les résistances se sont développées dans les populations d'insectes au fur et à mesure de l'apparition de nouvelles molécules utilisées de manière intensive. Les premières solutions employées, à tort, furent d'augmenter la quantité d'insecticides utilisés ou de changer de matière active sans réflexion. En effet, l'augmentation des quantités de matières actives a favorisé encore plus la sélection de phénotypes résistants, a accru le coût des traitements, tout en exposant l'environnement à des risques plus importants. La deuxième stratégie de changer de molécule aurait pu être couronnée de succès si elle avait été conduite correctement. Mais utiliser massivement un autre insecticide aboutit à sélectionner un nouveau type de résistance et à lutter contre des insectes qui deviennent multi-résistants.

Conscientes de l'impasse dans laquelle la lutte contre les insectes était engagée, les firmes phytosanitaires orientent leurs nouvelles stratégies vers la prévention et la gestion des résistances. Cela passe par une bonne compréhension de ces phénomènes ainsi que par la connaissance des modes d'actions des insecticides.

Ils existent quatre types de résistances : les résistances métaboliques, les résistances par altération de la cible, la diminution de la pénétration et les résistances comportementales (Figure 11).

### **1. Les résistances métaboliques**

Les résistances métaboliques constituent le mécanisme le plus important développé par les insectes. Il est basé sur le système enzymatique dont disposent tous les insectes pour diminuer la toxicité et/ou éliminer les substances étrangères. Trois catégories d'enzymes



**Figure 11** Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez les insectes.

remplissent cette fonction : les estérases, les monooxygénases à cytochromes P-450 et les glutathion-S-transférases (IRAC, 2006).

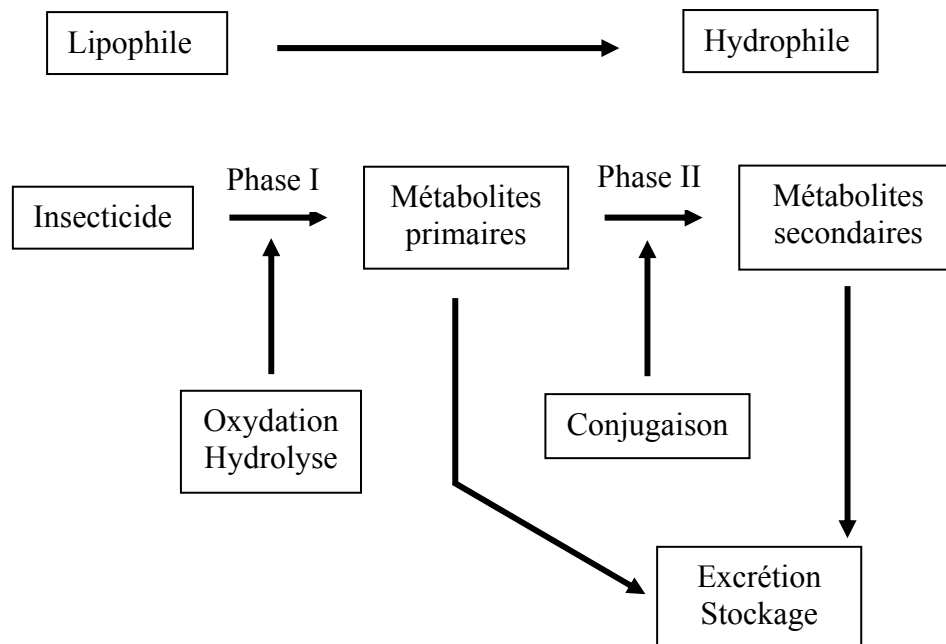


Figure 12 : Processus biochimiques impliqués dans la métabolisation des insecticides chez les insectes (d'après Haubruge et Amichot, 1998).

Les réactions de phase I, catalysées par les estérases et les monooxygénases à cytochrome P-450, activent et/ou convertissent les insecticides en composés plus polaires. L'augmentation de la solubilité dans l'eau facilite l'excrétion. Les réactions de phase II, réalisées par les glutathion-S-transférases, permettent la conjugaison des groupements préalablement introduits (phase I) ou déjà existants avec le glutathion, métabolite endogène fortement hydrophile. Cette conjugaison favorise l'excrétion des insecticides ou de leurs métabolites (Haubruge et Amichot, 1998) (Figure 12).

Chez les insectes résistants, ces systèmes enzymatiques sont plus performants, soit par une quantité d'enzymes plus importante soit par une meilleure activité des enzymes (IRAC, 2006). En dégradant et en excréant mieux les insecticides les insectes résistants maintiennent la quantité d'insecticide qui peut atteindre sa cible à des doses non-létales.

### a) Par les estérases

Les estérases représentent une grande famille de molécules qui catalysent l'introduction d'une molécule d'eau dans une liaison ester ou amide. Les estérases sont souvent impliquées dans les résistances aux organophosphorés, aux carbamates et aux pyréthrinoides. Deux types d'estérases sont impliqués dans les phénomènes de résistance.

. Le premier type est constitué par des estérases non-spécifiques qui fixent les insecticides sans les dégrader et les séquestrent loin de leur site d'action. Cette séquestration confère une résistance à large spectre (Hemingway, 2000).

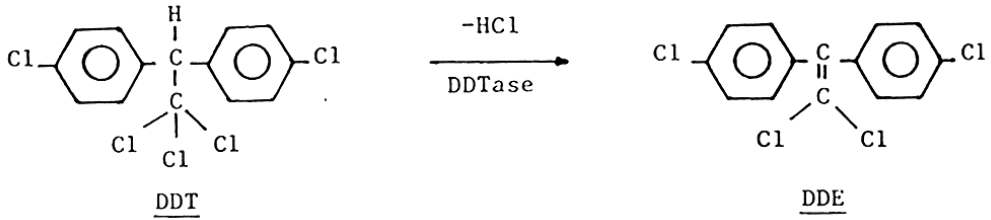
Au niveau moléculaire, le premier mécanisme est une amplification des gènes codant pour ces estérases. Le nombre d'enzymes peut également être augmenté par des mutations dans les régions régulant la transcription ou par méthylation des gènes (Li et coll., 2007). Quel que soit le mécanisme, il permet à l'insecte de disposer d'un plus grand nombre de copies d'ARN (Acide RiboNucléique) pour synthétiser plus d'estérases et donc piéger plus de molécules à effet insecticide.

Le deuxième est constitué par des estérases spécifiques, les carboxylestérases qui métabolisent les insecticides (Figure 13). Grâce à des mutations ponctuelles, certaines estérases sont devenues spécifiques d'un insecticide ou d'un petit groupe (Hemingway et coll., 2004).

L'exemple le plus marquant est celui de la résistance au malathion chez la lucilie cuivrée australienne (*Lucilia cuprida*), une mouche dont les asticots se nourrissent de viande de mouton vivant. Une unique substitution, W251L, confère à l'estérase E3 de *L. cuprida* une spécificité vis-à-vis du malathion. Cette forte activité contre le malathion est contrebalancée par une activité moindre voire très faible contre d'autres organophosphorés (Hemingway, 2000; Li et coll., 2007).

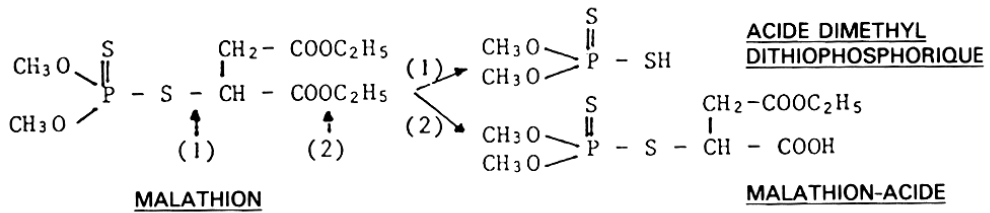
Une autre substitution, G137D (*L. cuprida*), confère une résistance contre plusieurs organophosphorés mais pas contre le malathion (Hemingway, 2000). Les effets de ces deux mutations ne sont pas additifs et les doubles mutants présentent une activité moindre pour hydrolyser le malathion et les autres organophosphorés (Li et coll., 2007).

I - D.D.T. DÉHYDROCHLORASE



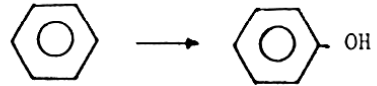
II - RÉACTIONS DE FONCTIONNALISATION

1 - Phosphatases (1) et Carboxylestérases (2)

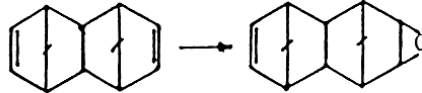


2 - Monoxygénases

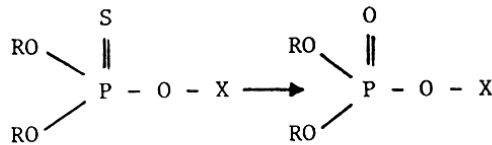
• Hydroxylation des cycles aromatiques :



• Époxydation :

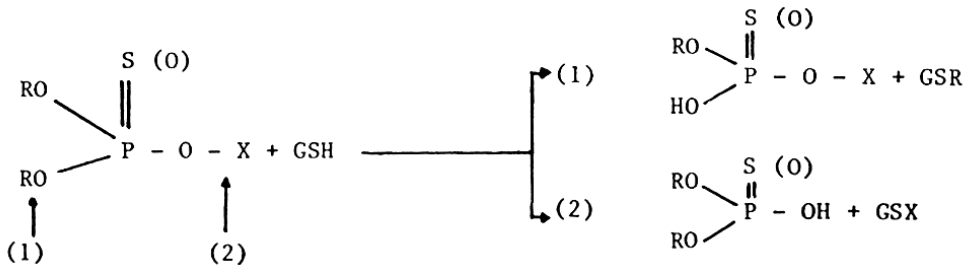


• Désulfuration oxydative



III - RÉACTIONS DE CONJUGAISON

Alkyl-(1) et Aryl-glutathion transférases (2)



**Figure 13**

Principaux systèmes enzymatiques impliqués dans les mécanismes de résistance. Exemples de réactions métaboliques. D'après Delorme, 1985. L'activité DDTase peut être assurée par une glutathion S-transférase (Tang, 1994).

### **b) Par les monooxygénases à cytochrome P-450**

Dans le métabolisme des xénobiotiques, les monooxygénases à cytochrome P-450 (P450s) représentent l'élément le plus important du métabolisme oxydatif. Les P450s sont une très grande famille dont plus de 660 gènes ont été identifiés chez les insectes. Elles ont un très large spectre de substrats (Figure 13), leur permettant d'être le seul système métabolique potentiellement résistant à toutes les classes d'insecticides (Li et coll., 2007).

Le mécanisme le plus connu est l'augmentation du nombre de transcrits d'ARN messenger codant pour les P450s. Aucune amplification de gène n'a, pour le moment, été montrée, mais une augmentation de la régulation de la transcription a été largement prouvée. Cette surexpression est due à des mutations et/ou des insertions-délétions dans la région promotrice *cis* et/ou la région *trans* (Scott, 1999; Li et coll., 2007).

L'un des exemples, démontré chez *Drosophila melanogaster* et *D. simulans* est la surexpression de la protéine CYP6G1 due à l'insertion d'un retrotransposon (*Accord*) dans la séquence promotrice *cis* du gène. Cette surexpression confère une résistance au DDT, à l'imidaclopride, au nitenpyrame (deux nicotinoïdes) et au lufenuron (régulateur de croissance) en fonctionnalisant plus et plus rapidement les molécules insecticides (Daborn et coll., 2002).

Des mutations ponctuelles dans les séquences codantes pour les P450s jouent un rôle, bien que secondaire, dans les résistances. Chez le phénotype résistant 91-R de drosophile (*D. melanogaster*), trois substitutions (R335S, L336V et V476L) dans la séquence de *CYP6A2* proche du site actif sont responsables de l'augmentation du métabolisme du DDT (Scott, 1999; Li et coll., 2007).

De nombreuses résistances sont dues à la surexpression de P450s spécialisées dans une famille ou un insecticide donné. Par exemple, chez *D. melanogaster*, CYP6D1 catalyse l'hydroxylation de plusieurs pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, cyperméthryne) en présence de cytochrome *b*<sub>5</sub> (Scott, 1999; Li et coll., 2007).

Une ou plusieurs P450s semblent être également impliquées dans la résistance à l'indoxacarbe chez *Musca domestica* mais le mécanisme moléculaire n'a pas encore été déterminé (Shono et coll., 2004). De même pour la résistance à l'imidaclopride, la synergie du néonicotinoïde avec le piperonyl butoxide (inhibiteur spécifique des P450) prouve qu'une (ou

plus) P450 est à l'origine de souches résistantes de *D. melanogaster*, mais le gène impliqué n'a pas encore été identifié (Nauen et Denholm, 2005).

### c) Par les glutathion-S-transférases

Les glutathion-S-transférases (GST) constituent un autre groupe important d'enzymes métaboliques impliquées dans les phénomènes de résistances. Les GSTs sont réparties en trois classes chez les insectes, nommées Delta, Epsilon et Sigma en accord avec la nomenclature utilisée chez les vertébrés. Sept gènes codant pour des GSTs ont été identifiés et impliqués dans des résistances.

Les GSTs peuvent agir sur les insecticides de trois façons. La première est la conjugaison de l'insecticide ou de ses métabolites avec le glutathion pour faciliter leur excrétion. La deuxième est l'utilisation du glutathion comme co-facteur dans la déhydrochloration du DDT en métabolite sans activité insecticide, le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) (Tang et Tu, 1994) (Figure 13). La troisième est la séquestration de l'insecticide dans des vacuoles (Hemingway, 2000; Li et coll., 2007).

Pour deux gènes, l'augmentation du nombre de transcrits d'ARN messager est due à une amplification génique. Il s'agit de *MdGSTD3* chez un phénotype de *M. domestica* résistant aux organophosphorés et de *NI\_GSTD1*, identifié chez une souche de *Nilaparvata lugens* (cicadelle du riz) résistante aux pyréthrinoïdes (Li et coll., 2007).

Les cinq autres gènes sont surexprimés chez des insectes résistants aux organophosphorés, aux benzoyl-urées, au DDT et aux pyréthrinoïdes. Les mécanismes moléculaires de ses surexpressions n'ont pas encore été identifiés, seules quelques hypothèses ont été avancées. Parmi ces hypothèses, la surexpression du gène *AaGSTD1* d'une souche résistante au DDT d'*Aedes aegypti* serait due à la perte de fonction d'un répresseur de gène en position *trans* et/ou la diminution de stabilité des ARN messagers (Hemingway et coll., 2004; Li et coll., 2007).

## **2. Les résistances par altération de la cible**

Le deuxième mécanisme le plus fréquent de résistance chez les insectes est l'altération de la cible de l'insecticide. La plupart des insecticides agissent sur une cible bien spécifique. En modifiant cette cible, les insectes empêchent l'insecticide de se fixer correctement sur son site d'action. Les insectes deviennent alors peu ou pas sensibles à l'insecticide (IRAC, 2006). Si la cible est la même, des résistances croisées à plusieurs insecticides peuvent être la résultante d'une seule mutation.

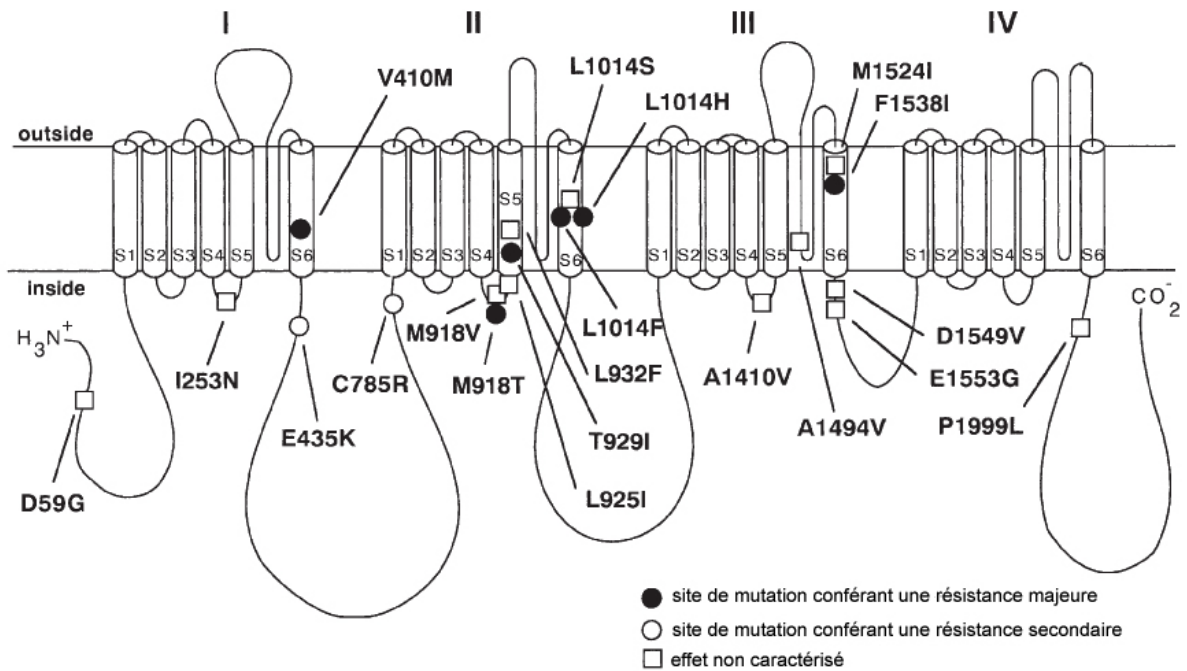
### **a) Canal sodium et résistance de type *kdr***

Le mécanisme de résistance le plus connu pour le canal sodium est celui nommé « knockdown resistance » (*kdr*) (voir pour revue Zlotkin, 1999; Soderlund et Knipple, 2003; Raymond-Delpech et coll., 2005; Dong, 2007).

Les résistances *kdr* réduisent la sensibilité des insectes aux pyréthrinoïdes et au DDT par une ou plusieurs mutations du canal sodium. La plus commune des mutations *kdr*, retrouvée dans au moins quinze espèces d'insectes, est la substitution d'une leucine (L) dans le segment 6 du domaine II par une phénylalanine (F), une histidine (H) ou une sérine (S) (L1014F/H/S) (Zlotkin, 1999; Soderlund et Knipple, 2003; Dong, 2007).

Dans des phénotypes très résistants, des mutations additionnelles sont souvent retrouvées associées à la mutation précédente. L'exemple le plus connu est la résistance dite *super-kdr* de la mouche domestique due à la substitution d'une méthionine en thréonine (M918T) associée à la mutation L1014F. Au total, une dizaine de mutations ont été identifiées comme étant à l'origine des résistances *kdr* (mutation L1014F) et de type *kdr* (autres mutations conférant une résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT) (Zlotkin, 1999; Soderlund et Knipple, 2003; Dong, 2007)(Figure 14).





**Figure 14**

Représentation schématique d'une sous-unité  $\alpha$  de canal sodium dépendant du potentiel d'insecte. La structure est formée de quatre domaine (I à IV) contenant chacun six segments transmembranaires. La position des mutations conférant une résistance *kdr* est indiquée. Les symboles indiquent l'impact fonctionnel déterminé à partir de canaux exprimés dans l'ovocyte de xénope. Modifié d'après Soderlund et Knipple, 2003.

## b) Acétylcholinestérase modifiée

L'acétylcholinestérase (AChE) est la cible moléculaire des organophosphorés et des carbamates. En plus de résistances métaboliques contre ses insecticides, les insectes ont également développé des résistances en modifiant l'AChE. Deux profils de résistances, I et II ont été identifiés et liés à des mutations ponctuelles sur les gènes d'insectes connus (Hemingway et coll., 2004).

Le profil I est caractérisé par une résistance plus élevée pour les carbamates tels le propoxur, le pirimicarbe et le carbosulfan en comparaison aux organophosphorés comme le malaaxon, le paraoxon, le chlorpyrifos et le téméphos.

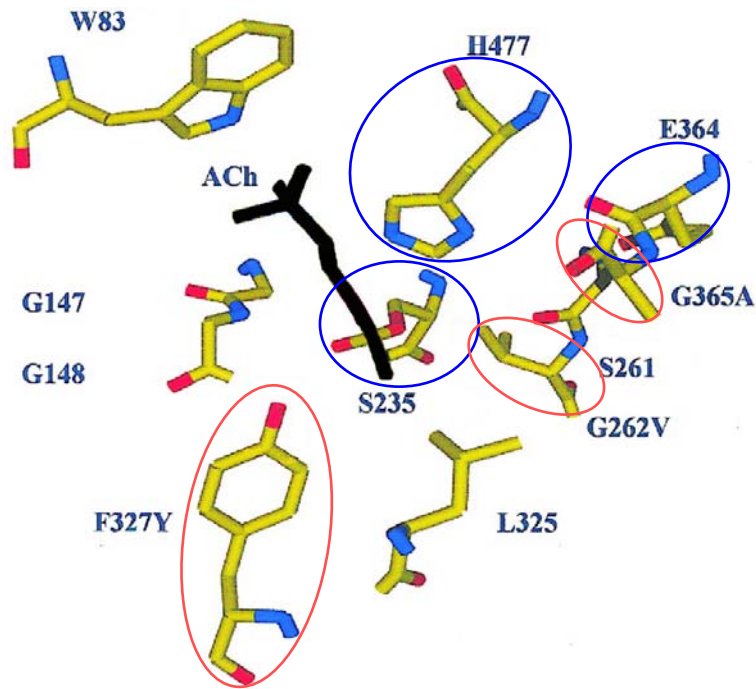
Parmi les insectes ayant ce profil, nous pouvons citer *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus*. Deux gènes *ace* ont été séquencés chez ces moustiques codant pour AChE-1 et AChE-2. L'un d'eux, *ace-1*, est associé à une mutation, G119S<sup>1</sup>, qui modifie la conformation de la gorge catalytique de l'acétylcholinestérase (Figure 15). Cette enzyme modifiée, n'aurait pas moins d'affinité pour les carbamates mais pourrait les hydrolyser plus rapidement (Russell et coll., 2004).

Le profil II est, lui, caractérisé par une résistance élevée pour les organophosphorés associée à une résistance équivalente ou moindre aux carbamates (Hemingway et coll., 2004). Chez *D. melanogaster* un seul gène a été identifié (équivalent à *ace-2*). Cinq mutations sont répertoriées chez les phénotypes résistants, dont deux et une en commun avec *M. domestica* et *Bactrocera oleae* (la mouche de l'olive), respectivement (Russell et coll., 2004).

Les mutations individuelles confèrent une faible insensibilité et modifient peu l'hydrolyse du neurotransmetteur. Seule l'association de plusieurs mutations génère une forte résistance. Ces mutations resserrent le col de la gorge du site actif, limitant l'accès de l'insecticide au site catalytique de l'enzyme (Hemingway et coll., 2004) (Figure 15).

---

<sup>1</sup> En référence à la séquence de *Torpedo californica*.



**Figure 15**

Représentation en 3-dimension des acides aminés importants dans le site actif de l'acétylcholinestérase et localisation des mutations importantes impliquées dans les résistances aux organophosphorés et aux carbamates. Les résidus sont numérotés selon la séquence de *Musca domestica*. L'entrée de la gorge catalytique est formé par les glycines en position 147, 148 et 149 (117, 118 et 119 selon la séquence de *Torpedo californica*). Seules G147 et G148 sont représentées. Les cercles bleus entourent les acides aminés catalytiques. Les cercles rouges indiquent les acides aminés mutés chez *Musca domestica*. ACh : acétylcholine. Modifié d'après Walsh et coll., 2001 et Menozzi et coll., 2004.

### c) Récepteur au GABA et résistance de type rdl

Les récepteurs au GABA d'insectes sont la cible des cyclodiènes comme la dieldrine. Un gène a été cloné chez une souche résistante à la dieldrine de *D. melanogaster*, le gène *rdl* (« resistant to dieldrin ») codant pour la sous-unité RDL du récepteur au GABA. La substitution d'une alanine en position 301<sup>1</sup> par une sérine confère une résistance contre la dieldrine jusqu'à 4000 fois supérieure chez les souches résistantes (Feyereisen, 1995; Ffrench-Constant et coll., 2004).

Cette résistance à la dieldrine a été identifiée chez de nombreux insectes tels *Musca domestica*, *Periplaneta americana* (blatte américaine) et *Tribolium castaneum* (le ver de farine) (Feyereisen, 1995). La résistance au fipronil chez une souche de *Plutella xylostella* est due à la substitution A301S (Li et coll., 2006).

Plus rarement, la substitution se fait sur la même position mais par une glycine c'est le cas chez *Myzus persicae*. Chez *Drosophila simulans*, en plus de la mutation A301G, une souche de laboratoire résistante au fipronil présente une mutation supplémentaire, T350M (Buckingham et coll., 2005; Le Goff et coll., 2005). La mutation A301G a également été identifiée chez *Ae. aegypti*. Elle est également responsable d'une insensibilité à la dieldrine (Hemingway et coll., 2004).

### **3. Les résistances dues à la diminution de la pénétration de la molécule et aux modifications comportementales**

Des modifications de la cuticule de l'insecte ou du tractus intestinal peuvent diminuer la vitesse de pénétration ou d'absorption de l'insecticide. Si la cinétique de pénétration est suffisamment diminuée, l'insecticide sera dégradé avant de pouvoir atteindre sa cible en quantité létale (Haubruge et Amichot, 1998).

Les mécanismes contrôlant la pénétration ont été peu étudiés. Le plus souvent ils ont été mis en évidence par élimination, lorsque les autres moyens identifiés ne suffisent pas à expliquer le phénomène de résistance d'une souche. C'est le cas par exemple chez une souche

---

<sup>1</sup> Cette mutation est souvent identifiée à tort dans la littérature en position 302 (Le Goff, 2005).

de *Blatella germanica* où une diminution de la pénétration cuticulaire est impliquée dans sa résistance à la perméthrine (Wei et coll., 2001).

Le plus souvent, ce type de résistance, ne constitue pas un mécanisme majeur, mais un facteur complémentaire à un autre moyen déjà mis en œuvre par l'insecte.

Les résistances comportementales décrivent toutes modifications dans le comportement de l'insecte qui lui permettent de se soustraire à l'insecticide. La molécule chimique peut être reconnue et servir de stimulus pour que l'insecte s'éloigne (IRAC, 2006).

C'est un effet répulsif, conditionné par l'insecticide. Ce type de résistance comportementale se rencontre essentiellement chez les diptères. Une autre stratégie, au lieu d'augmenter la mobilité sera au contraire de ralentir les déplacements pour diminuer la quantité d'insecticide avec lequel l'insecte sera en contact (Haubruge et Amichot, 1998).

Ces résistances sont moins importantes que les mécanismes physiologiques mais apportent une contribution en évitant que l'insecticide soit en contact à des doses létales (IRAC, 2006).

# CHAPITRE 3 - TOXICOLOGIE DES PESTICIDES

## **A. Les effets aigus et les effets chroniques**

Les pesticides sont des molécules biologiquement actives utilisées pour leur toxicité sur certains organismes. Du fait de cette activité, ces substances peuvent engendrer des troubles graves sur les êtres vivants non visés. L'homme est l'une des cibles non intentionnelle de ces pesticides qui peut être exposé lors de son activité professionnelle, sur son lieu de résidence ou par l'eau de boisson et la nourriture, susceptibles de contenir des résidus. L'étude des effets délétères des produits phytosanitaires est complexe du fait de la grande diversité des molécules et de leurs effets synergiques encore mal connus. Cependant, il est possible de distinguer deux grandes catégories de risques selon le contexte d'exposition :

### - Les effets aigus

Les effets aigus ou précoces font suite à une exposition forte sur un temps court. Il s'agit surtout d'expositions en milieu professionnel dues à une mauvaise manipulation ou un manque de protection, d'accidents domestiques et d'intoxications suicidaires (Testud et coll., 2001). Les effets adverses survenant peu de temps après l'exposition (quelques minutes à quelques jours), il est souvent possible d'identifier l'agent causal. Les premiers symptômes dépendent de la voie de pénétration dans l'organisme : respiratoire, cutanée ou digestive (Multigner et coll., 2005). A titre d'exemple, lors d'une intoxication aux organophosphorés (OP) les premiers signes seront une oppression thoracique en cas d'inhalation, des fasciculations musculaires<sup>1</sup> en cas de pénétration percutanée et des troubles digestifs (diarrhées, nausées, vomissements, crampes abdominales) en cas d'ingestion (Saïssy et Rüttimann, 1999). Les symptômes dépendent également du profil toxicologique de la molécule (Multigner et coll., 2005). En comparaison aux fasciculations musculaires observés lors d'une exposition cutanée aux OP, les pyrétrinoïdes induisent une paresthésie<sup>2</sup> (Ray et Fry, 2006). Les effets adverses les plus fréquents sont les lésions cutanées ou oculaires, très souvent liés à un manque de protection individuelle, viennent ensuite les troubles neurologiques (Grillet et coll., 2001; Multigner et coll., 2005).

---

<sup>1</sup> Contraction involontaire des faisceaux musculaires indépendamment des faisceaux voisins qui sont au repos.

<sup>2</sup> Anomalie sensitive non douloureuse : fourmillement, picotement, sensation de raideur cutanée et parfois sensation thermique

### - Les effets chroniques

Les effets chroniques apparaissent soit à distance d'une exposition unique et intense, par exemple le syndrome neurotoxique retardé suite à une intoxication aigüe aux organophosphorés (Costa, 2006), soit suite à des expositions faibles mais répétées dans le temps (Multigner et coll., 2005). Ces expositions sont les plus difficiles à évaluer compte-tenu de la distance temporelle entre l'exposition et le début des symptômes. Les modèles animaux utilisés en toxicologie apportent de nombreuses informations mais ne permettent pas de prédire certains effets à très long terme, comme les effets cumulatifs de plusieurs substances pendant plus de dix ou vingt années. Les études épidémiologiques apportent des informations pertinentes en faveur d'un lien entre l'utilisation de pesticides et certaines pathologies, mais comportent souvent des biais. L'exposition est parfois difficile à évaluer, surtout lorsqu'elle est déterminée rétrospectivement. L'agent causal est très rarement déterminé avec précision du fait de l'exposition à plusieurs substances. De plus, les études actuelles se portent essentiellement sur les populations à risques comme les agriculteurs ou les habitants de zones agricoles (Sanborn et coll., 2004; Multigner et coll., 2005).

Cependant, les réseaux de toxicovigilance, les études cas-témoins et les études de cohortes permettent de suivre de manière efficace les effets adverses imputables aux pesticides. En France, la Mutualité Sociale Agricole (MSA) gère un réseau de toxicovigilance qu'elle a intensifié depuis 2004 : « Phyt'attitude »<sup>1</sup> (Decoin, 2005). Ce réseau a permis de mieux connaître les substances, les conditions d'intoxication et les symptômes les plus souvent rencontrés. Surement à cause de leur plus forte toxicité intrinsèque, les insecticides et acaricides sont les substances le plus souvent mises en cause (35%, chiffres 2004-2005), alors qu'ils sont moins utilisés que les herbicides ou les fongicides (Multigner et coll., 2005).

L'étude des effets adverses constitue un très vaste domaine aux connaissances fragmentées (les études épidémiologiques, la toxicologie clinique, l'étude de modèles animaux ou cellulaires) qu'il est parfois difficile de rassembler. La suite de ce manuscrit s'attardera sur deux catégories de manifestations suscitant certaines inquiétudes vis-à-vis de l'exposition aux pesticides. La première regroupe les effets non-neurologiques liés une exposition à long terme d'un ou plusieurs pesticides. La deuxième traite des effets neurologiques.

---

<sup>1</sup> <http://www.msa.fr>

## **B. Les effets chroniques non-neurologiques**

Les expositions à de faibles doses de pesticides répétées dans le temps concernent potentiellement toute la population qu'elle soit exposée dans son milieu professionnel ou dans son environnement (eau, air, alimentation). Ces expositions regroupent des effets retardés très hétérogènes, parmi eux les effets sur la reproduction et les risques de cancer.

### **1. Les effets sur la reproduction**

La reproduction regroupe toutes les étapes, de la production des gamètes, à la maturité sexuelle en passant par la fécondation, et l'ensemble du développement embryonnaire. Les deux domaines les plus explorés à ce jour sont la fertilité et le développement embryonnaire et fœtal (Multigner et coll., 2005).

Plusieurs études (voir pour revue Sanborn et coll., 2004; Multigner et coll., 2005) montrent des effets sur la fertilité. L'exemple de plus marquant d'une atteinte de la fonction de reproduction est celui du dibromochloropropane (DBCP). Il s'agit d'un nématicide, principalement employé pour la culture de la banane, qui fut commercialisé dans les années 60. Sur une cohorte de plus de 26 000 hommes (Slutsky et coll., 1999) ont montré, sans ambiguïté, que après trois ans d'exposition au DBCP, 64,3% des hommes présentent une oligospermie ou une azoospermie. A part quelques substances marquantes comme le DBCP, peu ont directement été impliquées. La plupart des études sont contradictoires et présentent des failles ce qui laisse planer un faisceau de présomptions au dessus des pesticides mais sans apporter de preuves irréfutables.



Types d'effets	Informations apportées	Pesticides mis en cause	Références
Effets sur la reproduction	<p>Oligospermie, azoospermie</p> <p>Risque accru de diminution de la fertilité</p> <p>Risque accru d'anomalies congénitales, d'avortements spontanés et de retard de croissance intra-utérin</p>	<p>DBCP, exposition mixte</p> <p>exposition mixte</p> <p>exposition mixte</p>	<p>Slutsky et coll., 1999</p> <p>Multigner et coll., 2005</p> <p>Sanborn et coll., 2004</p>
Cancers	<p>Risque accru de cancer de</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la prostate</li> <li>- du sein</li> <li>- du cerveau</li> </ul> <p>Cancers touchant surtout les enfants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphomes non-hodgkiniens</li> <li>- Leucémies</li> </ul>	<p>Organochlorés, bromure de méthyle</p> <p>Triazines, exposition mixte</p> <p>exposition mixte</p> <p>exposition mixte</p> <p>Dichlorvos, exposition mixte</p>	<p>Alavanja, 2003</p> <p>Sanborn, 2004</p> <p>Multigner et coll., 2005 ; Sanborn et coll., 2002</p>

**Tableau 8**

Effets sur la reproduction et risques de cancers liés à une exposition à un ou plusieurs pesticides.

## **2. Les cancers**

L'usage de pesticides, tout comme d'autres agents tel l'amiante ou le tabac, est un facteur de risque de cancers. Dans les études animales, plusieurs pesticides se sont montrés carcinogènes (par exemple : organochlorés, fipronil, captafol, dichloropropène) et certains sont des promoteurs tumoraux (DDT, chlordane, lindane). (Ditch et coll., 1997). La plupart des études épidémiologiques (Ditch et coll., 1997; Sanborn et coll., 2004) s'accordent pour dire qu'il y a moins de cancers chez les agriculteurs et populations vivant en milieu agricole que dans la population générale. Cette différence peut s'expliquer par les conditions de vie, l'alimentation ou moins de tabagisme.

Cependant, les populations agricoles présentent plus de certains types de cancers, qui sont parfois rares dans la population générale (comme les cancers de la lèvre, par exemple) (Multigner et coll., 2005). Plusieurs associations positives ont été trouvées entre l'exposition aux pesticides et les lymphomes non-Hodgkiniens, les leucémies, les sarcomes des tissus mous, et certains cancers solides (cerveau, sein, rein, poumons, prostate, ovaires) (Ditch et coll., 1997; Sanborn et coll., 2004).

En France, des données précises seront bientôt disponibles grâce à une grande enquête de la MSA lancée dernièrement (l'envoi des questionnaires s'est déroulé entre novembre 2005 et mars 2006) : AGRICAN (AGRIculture et CANcer : rôle de facteurs de risques professionnels). D'après la MSA<sup>1</sup>, le taux de retour est déjà de 20% (120 000 personnes) et ils espèrent 30% (150 000 personnes) après relance ce qui constituera la plus grande cohorte étudiée dans ce type d'enquête. Les premiers résultats sur les cancers les plus fréquents (sein, prostate) sont prévus pour 2008-2009.

## **C. Les effets neurologiques**

Les effets neurologiques font partie des symptômes les plus fréquents lors d'intoxications aiguës. Ils peuvent être bénins, comme les céphalées, les vertiges ou les paresthésies, ou plus graves tels les tremblements, les convulsions, jusqu'au coma et parfois une issue fatale (Saïssy et Rüttimann, 1999; Testud et coll., 2001; Bradberry et coll., 2005; Ray et Fry, 2006). Cette dernière partie traite de deux types d'effets secondaires

---

<sup>1</sup> Communiqué de synthèse, 30 mars 2007.

Symptômes Effets	Informations apportées / Type d'étude <sup>1</sup>	Pesticides mis en cause <sup>2</sup>	Références
EEG normal mais quelques anomalies	Anomalies EEG bifrontales (IA)	Endosulfan (I)	Testud et coll., 2001
	Anomalies de l'EEG (pointes-ondes et ondes lentes frontales) (EP)		
Changements et anomalies de l'EEG	Anomalies EEG (pointes-ondes et ondes lentes) (IA)	Deltaméthrine (I)	Bradberry et coll., 2005
	Anomalies EEG non spécifique (EP)	Organophosphorés (I)	Testud et coll., 2001
	Modification du spectre des fréquences EEG (Rat)	Chlorpyrifos (I)	Timofeeva et Gordon, 2001
	Activités EEG épileptiques (Rat)	Cyperméthrine (I)	Condes-Lara et coll., 1999
	Activités EEG épileptiques (Souris)	Phosphinotricine (H)	Lapouble et coll., 2002
	Activités épileptiformes (IV, tranche d'hippocampe de cobaye)	Organophosphorés (soman et paraoxon) (I) Carbamates (Physostigmine et néostigmine) (I)	Harrison et coll., 2004
convulsions	Convulsions observées lors d'intoxications aiguës (IA)	Organophosphorés (I) Organochlorés (I) Pyréthrinoides (I)	Saïssy et Rüttimann, 1999; Forshaw et coll., 2000; Testud et coll., 2001; Harrison et coll., 2004; Bradberry et coll., 2005; Ray et Fry, 2006
	Convulsions induites chez des modèles animaux	Cyperméthrine (rat) (I) Phosphinotricine (souris) (H) Pyréthrinoides (rat) (I)	Condes-Lara et coll., 1999 Lapouble et coll., 2002 Forshaw et coll., 2000 ; Shafer et coll., 2005

### Tableau 9

Pesticides provoquant des anomalies de l'EEG ou des convulsions.

<sup>1</sup> Etude sur modèle animal, in vitro (IV) ou in vivo (Espèce) ; rapport d'intoxication aiguë (TA) ; étude épidémiologique (EP)

<sup>2</sup> Lorsque cette information est disponible. Insecticide (I), Herbicide (H), Fongicide (F), Acaricide (A)

neurologiques aux manifestations très différentes : les anomalies de l'EEG associées à des syndromes épileptiformes ; la maladie de Parkinson et les syndromes parkinsoniens.

### **1. Les anomalies de l'EEG et les syndromes épileptiformes**

Les effets des pesticides sur l'activité électroencéphalographique, reflétant l'activité électrique du cerveau, sont encore peu étudiées. Il existe cependant des arguments pour justifier ce genre d'études. Les premiers arguments viennent d'études épidémiologiques ou de rapports d'intoxication aigue. En effet, il a été possible d'observer des anomalies de l'EEG chez des sujets exposés à l'endosulfan, la deltaméthrine et aux organophosphorés (Tableau 9) ((Testud et coll., 2001; Bradberry et coll., 2005)). De plus, des études sur modèle animal ont montré le caractère épileptogène de certaines substances telles la cyperméthrine, un insecticide (rat) (Condes-Lara et coll., 1999) ou la phosphinothricine, un herbicide (souris) (Lapouble et coll., 2002). Ce pouvoir épileptogène a également été mis en évidence sur des préparations neuronales pour des organophosphorés et des carbamates (Harrison et coll., 2004) (Tableau 9).

Des convulsions ont été rapportées autant dans les rapports d'intoxication aigue que lors des études sur modèles animaux. Les molécules le plus souvent incriminées sont des insecticides : les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthriinoïdes (Tableau 9) (Condes-Lara et coll., 1999 ; Saïssy et Rüttimann, 1999; Forshaw et coll., 2000; Testud et coll., 2001; Lapouble et coll., 2002 ; Harrison et coll., 2004; Bradberry et coll., 2005; Shafer et coll., 2005 ; Ray et Fry, 2006). Par ailleurs, d'après certains spécialistes des épilepsies, les facteurs environnementaux, comme les pesticides, pourraient être à l'origine d'épilepsies (Thomas et Arzimanoglou, 2003).

Malgré des arguments convaincants, les anomalies de l'EEG font peu souvent l'objet d'études. Cela est en partie du au fait que ces anomalies peuvent n'engendrer aucune symptomatologie. Il existe donc un très large champ d'investigation tant au niveau des études sur modèle animal que des études épidémiologiques de type suivi de cohortes.

Symptômes / Effets	Informations apportées	Pesticides mis en cause <sup>1</sup>	Références
Maladie de Parkinson (MP) Syndrome Parkinsonien (SP)	Lien épidémiologique entre SP et exposition professionnelle aux pesticides	Pas de pesticide spécifique	Engel et coll., 2001
	Lien épidémiologique entre SP et exposition professionnelle aux pesticides Les pesticides sont l'un des facteurs environnementaux pouvant induire MP et SP	Paraquat (H), Organochlorés (I), Carbamates (I), Thiocarbamates (H), Chlorophénoxy (H)	Baldi et coll., 2003 Di Monte et coll., 2002
Dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (modèles animaux)	Relation évidente entre MP et exposition professionnelle aux pesticides	Pas de pesticide spécifique	Sanborn et coll., 2004
	Les pesticides inhibiteurs du complexe I de la mitochondrie reproduisent les effets de la MP	Pyridabène (A), Fénazaquin (A), Tébufenpyrad (A), Roténone (I)	Sherer et coll., 2007 Jenner, 2001
	Effets sur la voie nigrostriée	Heptachlore, Chlorpyrifos, Permethrine, Deltaméthrine (I)	Bloomquist et coll., 2002
	Perte de neurones dopaminergiques	Paraquat (H), Maneb (F), Paraquat + Maneb	Thiruchelvam et coll., 2002; Thiruchelvam et coll., 2003
	Diminution des neurones dopaminergiques TH+	Atrazine (H)	Coban et Filipov, 2007
Transmission dopaminergique affectée	Permethrine (I), Chlorpyrifos (I)	Karen et coll., 2001	

### Tableau 10

Liens entre pesticides et dégénérescence des neurones dopaminergiques, syndromes parkinsoniens et maladie de Parkinson.

<sup>1</sup> Lorsque cette information est disponible. Insecticide (I), Herbicide (H), Fongicide (F), Acaricide (A)

## **2. La maladie de Parkinson et les syndromes parkinsoniens**

La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative qui touche principalement les neurones dopaminergiques de la substance noire. La dégénérescence de ses neurones, impliqués dans le contrôle de la motricité, induit des troubles des mouvements (rigidité, akinésie et tremblements au repos) très handicapants. Les causes exactes de la maladie restent encore inconnues mais l'hypothèse privilégiée est qu'il s'agit de la rencontre entre une prédisposition génétique et un ou plusieurs facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs environnementaux, les pesticides sont incriminés (Di Monte et coll., 2002).

En effet, contrairement à certaines pathologies où le lien avec les pesticides est difficile à déterminer, il existe une évidence épidémiologique entre la maladie de Parkinson (et les syndromes parkinsoniens) et l'exposition aux pesticides (Tableau 10) (Sanborn et coll., 2004; Brown et coll., 2006). Certains pesticides ont clairement été identifiés comme détruisant préférentiellement les neurones dopaminergiques de la substance noire comme l'heptachlor, la deltaméthrine, la paraquat, le maneb et l'un des plus connus la roténone (Tableau 10) (Jenner, 2001 ; Karen et coll., 2001 ; Liss et Roeper, 2001 ; Bloomquist et coll., 2002; Thiruchelvam et coll., 2002; Thiruchelvam et coll., 2003 ; Coban et Filipov, 2007 ; Sherer et coll., 2007). La roténone est même utilisée pour générer des modèles animaux de syndromes parkinsoniens chimio-induits (Hoglinger et coll., 2006).

En France, l'étude TERRE (247 cas, 676 témoins) a révélé que le risque d'être atteint de la maladie de Parkinson était multiplié par 1,9 en milieu agricole. Depuis, la MSA, l'Inserm et l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) ont lancé, en février 2007, l'étude PARTAGE (PARkinson, Travail, AGRicole, Environnement) portant sur 420 cas et 840 témoins, dans quatre départements, pour compléter les résultats de la précédente enquête. Les résultats seront disponibles courant 2008.



### CHAPITRE 1 – LES « Dorsal Unpaired Median » (DUM) NEURONES : MODELE BIOLOGIQUE

L'objectif de ce travail de thèse est l'étude du mode d'action neurotoxique d'un pesticide, le DMDS. Ce sujet nécessite un modèle cellulaire très bien caractérisé. Les « Dorsal Unpaired Median » (DUM) neurones ont plusieurs fois été choisis comme modèle pour l'étude du mode d'action cellulaire de composés à effet insecticide (Buckingham et coll., 1997 ; Raymond et coll., 2000 ; Courjaret et Lapied, 2001; Lapied et coll., 2001 ; Dugravot et coll., 2003 ; Price et Berry, 2006; Janssen et coll., 2007 ).

#### **A- Les DUM neurones du SNC des insectes**

Le système nerveux central (SNC) de la blatte *Periplaneta americana*, de l'ordre des blattoptères (*Blattaria*)<sup>1</sup> est constitué d'une chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire (Figure 16A et B). Les ganglions sont divisés en quatre types selon leur localisation anatomique : les ganglions cérébroïdes ou « cerveau », les ganglions sous-œsophagiens, thoraciques et abdominaux (A1 à A6 ou Dernier Ganglion Abdominal, DGA) (Figure 16B).

Au sein de chaque ganglion de la chaîne nerveuse ventrale (sauf ganglions cérébroïdes), est présente une petite population de neurones : les DUM neurones (Stevenson et Sporhase-Eichmann, 1995). La morphologie des DUM neurones a été décrite chez le criquet pour la première fois par Plotnikova (1969). La dénomination de neurones dorsaux, impairs et médians a été utilisée à partir de l'étude réalisée par Hoyle et coll. (1974). Ils sont en plus grande quantité dans le dernier ganglion abdominal car celui-ci correspond à la fusion de cinq ganglions abdominaux primitifs (A7 à A11), révélés par la présence de plusieurs îlots de DUM neurones (Sinakevitch et coll., 1995) (Figure 16C et D). Les DUM neurones proviennent des neuroblastes impairs et médians (Median Neuroblaste, MNB) qui sont localisés dans les primordia de chaque ganglion à l'exception des ganglions cérébroïdes (Stevenson et Sporhase-Eichmann, 1995; Braunig et Pfluger, 2001).

---

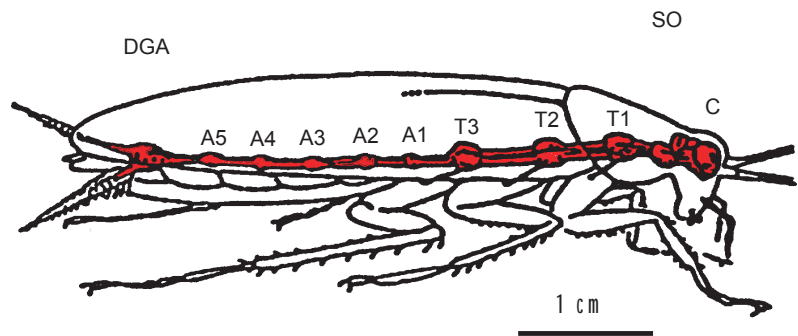
<sup>1</sup> La nouvelle classification, basée sur la phylogénie distingue dans l'ancien ordre des dictyoptères deux nouveaux ordres, celui des Blattoptères et celui des Mantoptères. (Source : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, [http://locust.cirad.fr/tout\\_savoir/taxonomie/taxons\\_7.htm](http://locust.cirad.fr/tout_savoir/taxonomie/taxons_7.htm)).



A

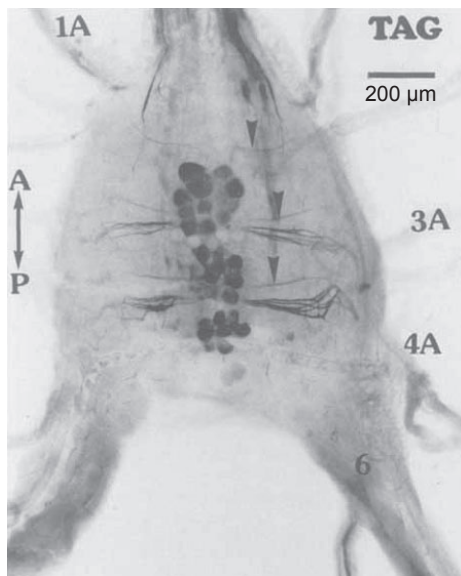


B

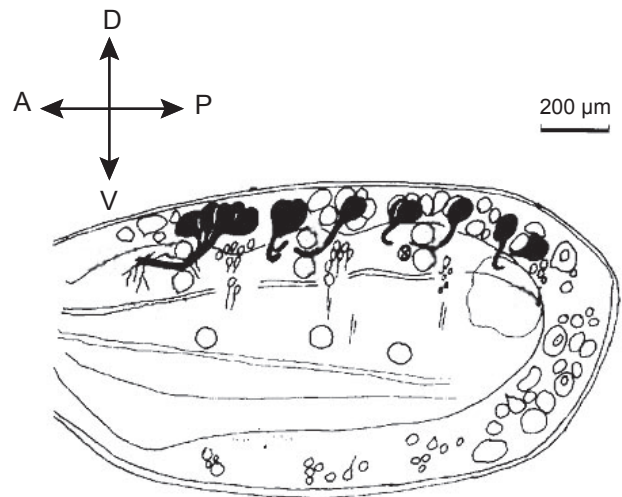


*Periplaneta americana*

C



D



### Figure 16

A : Photographie de blatte mâle adulte *Periplaneta americana*.

B : Représentation schématique du système nerveux central (en rouge) de la blatte *Periplaneta americana*. C : ganglions cérébroïdes ; SO : ganglions sous-oesophagiens ; T1 à T3 : ganglions thoraciques ; A1 à A5 : ganglions abdominaux ; DGA : dernier ganglion abdominal.

C : Photographie montrant la localisation médiane des corps cellulaires des DUM neurones in situ du DGA de blatte mâle révélés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (Sinakevitch et coll., 1996). Les flèches indiquent les neurites des DUM neurones qui se projettent dans les nerfs 1A, 3A, 4A et 6. A : antérieur, P : postérieur.

D : Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*, précisant la localisation des DUM neurones (en noir) identifiés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (modifié d'après Sinakevitch et coll., 1996).

Trois critères permettent de caractériser les DUM neurones :

Critères morphologiques :

Les DUM neurones se caractérisent par un corps cellulaire piriforme (diamètre entre 30 et 60  $\mu\text{m}$ ) d'où émerge un neurite primaire (Bräunig et Pflüger, 2001) (Figure 17A et B). Il existe trois grands types de DUM neurones (voir pour revue Bräunig et Pflüger, 2001).

Les DUM neurones efférents présentent une arborisation neuritique en « T ». Leurs neurites secondaires quittent les ganglions par les nerfs périphériques (Figure 17A). Les DUM neurones intersegmentaires ont une arborisation neuritique en « H » qui relie les ganglions entre eux via les connectifs. Les DUM interneurones locaux possèdent une arborisation neuritique qui se propage uniquement à l'intérieur de la masse intraneuropilaire du ganglion.

Critère biochimique :

Ce sont des cellules neurosécrétrices qui synthétisent et libèrent, en particulier, de l'octopamine, une amine biogène caractérisée chez les invertébrés, et analogue de la dopamine chez les vertébrés (Roeder, 1999) (Figure 16C, D et 17B). L'octopamine est connue pour être un neurotransmetteur, une neurohormone et un neuromodulateur (Roeder, 1999 ; Bräunig et Pflüger, 2001). Les DUM neurones synthétisent d'autres molécules neuroactives, telles que le GABA, la taurine, les peptides de type FMRF-amides, par exemple (Bräunig et Pflüger, 2001).

Critère électrophysiologique :

Les DUM neurones ont un potentiel de membrane compris entre -45 et -60 mV et génèrent spontanément des potentiels d'action de grande amplitude (environ 110 mV) et à fréquence régulière sans aucune afférence excitatrice. Cette activité, dite de type « pacemaker », est une propriété intrinsèque du corps cellulaire. Elle est générée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel et modulée par des canaux ioniques responsables de courants dit de repos (Grolleau et Lapied, 2000 ; Defaix et Lapied, 2005 ; Wicher et coll., 2001 ; Lavalie-Defaix et coll., 2006) (Figure 17C et tableau 11).

Type de courant ionique	Seuil d'activation	Agents pharmacologiques	Rôle physiologique	Références
Courant sodium transitoire (INa 1)	-30 mV	TTX (CI <sub>50</sub> =2.10 <sup>-9</sup> M), Saxitoxine, Vératridine *, Toxines de scorpions (Lq <sup>q</sup> III, BotIT <sub>2</sub> , toxine VII) ω-conotoxine MVIIIC *, ω-agatoxine IVA*, Glutamate (INa1)	Dépolarisation du potentiel d'action	Lapied et coll., 1990 Wicher et Penzlin, 1998 * Stankiewicz et coll., 1996 Grolleau et coll., 2006 Lavialle-Defaix et Coll., 2006
Courant sodium transitoire (INa 2)	-40 mV			
Courant sodium de repos (INar)	Potentiel de membrane	TTX, Lqhc <sup>o</sup> IT, AaHII, toxine VII	Maintien du potentiel de membrane Contrôle du mode de décharge	Lapied et coll., 1999 Grolleau et coll., 2006
Courant calcico-sodique (INa/Ca)	-65 mV	TTX (CI <sub>50</sub> =10 <sup>-7</sup> M)	Phase de prédépolarisation Régulation de l'activité électrique spontanée	Defaix et Lapied, 2005
Courant calcium à haut seuil d'activation (HVA)	-30 mV	Cadmium, nickel, Vérapamil (phénylalkilamine), Diltiazem (benzodiazépine), ω-conotoxine GVIA, toxine VII	ND	Wicher et Penzlin, 1997 Grolleau et coll., 2006
Courant calcium transitoire à bas seuil d'activation (ICat)	-70 mV	Cadmium extracellulaire Chlorure de nickel (<100 μM) Toxine de corail (toxine 38 2%B)	Phase initiale de la prédépolarisation	Grolleau et Lapied, 1996 Brevet n°0314167
Courant calcium maintenu à bas seuil d'activation (ICam)	-60 mV	Cadmium extracellulaire Chlorure de nickel (>100 μM)	Phase terminale de la prédépolarisation	Grolleau et Lapied, 1996
Courant calcium à moyen seuil (M-LVA)	-50 mV	Cadmium, nickel, ω-conotoxine MVIIIC, ω-agatoxine IVA	Fréquence de décharge	Wicher et Penzlin, 1997
Courant calcium de repos (TRPγ)	/	Cadmium (100 μM), NPPB, Acide méfénamique	Homéostasie calcique (contrôle la fréquence des potentiels d'action)	Heine et Wicher, 1998 * Wicher et coll., 2004 * Wicher et coll., 2006

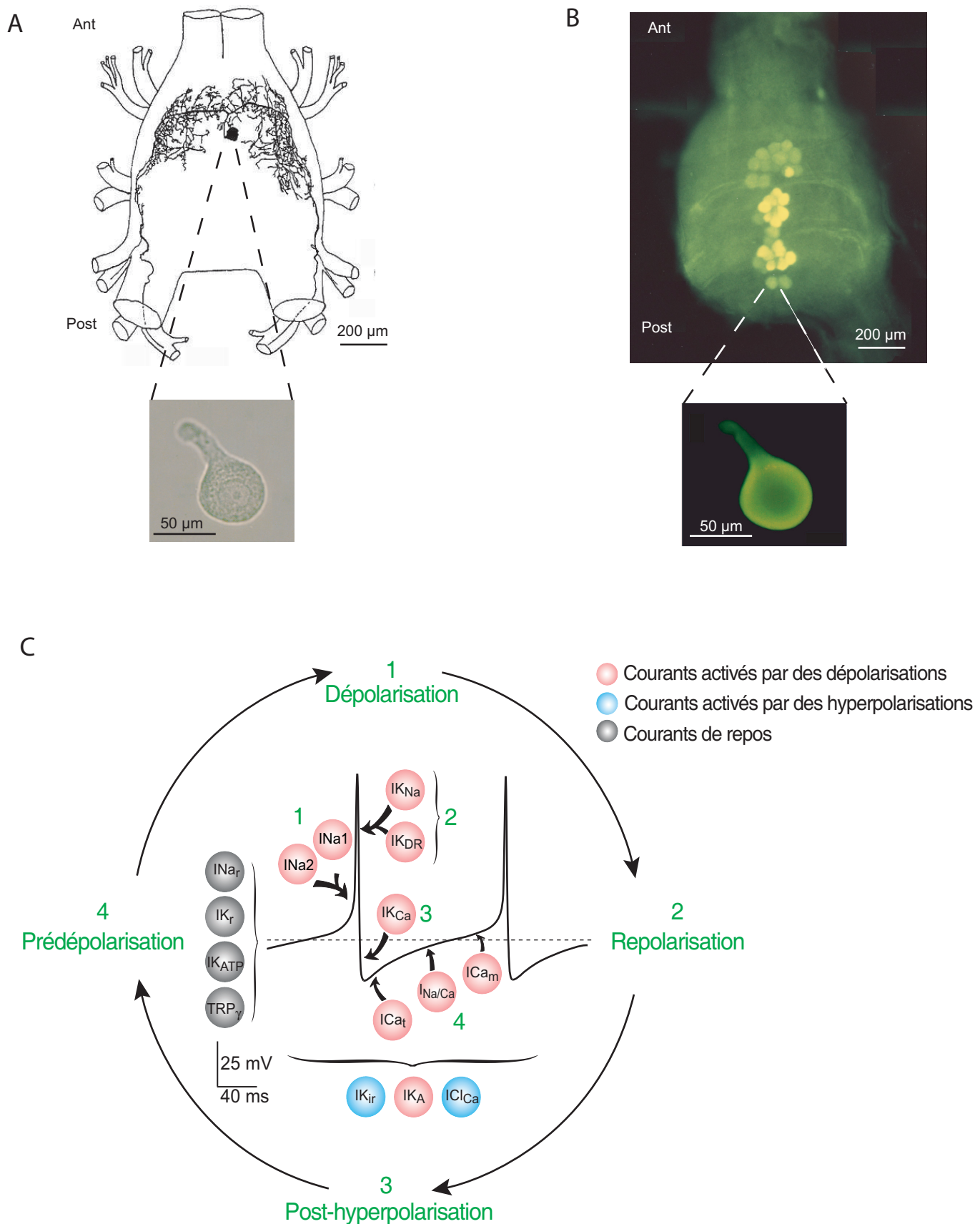
C O U R A N T S  
S O D I U M

C O U R A N T S  
C A L C I U M

Type de courant ionique	Seuil d'activation	Agents pharmacologiques	Rôle physiologique	Références	
C O U R A N T S  P O T A S S I Q U E S	-35 mV	TEA, 4-AP, Césium intracellulaire	Initie la phase de repolarisation, Limite la durée des potentiels d'action	Grolleau et Lapiéd, 1994	
	-40 mV	TEA, Ibériotoxine, Charybotoxine, Contryphan-Vn, BmBKtoxin1 Cadmium	Phase de repolarisation et post- hyperpolarisation	Grolleau et Lapiéd, 1995 Wicher et coll., 1994 Massilia et coll., 2003 Derst et coll., 2003 Xu et coll., 2004	
	-65 mV	4-AP	Maintien une fréquence basse de décharge des potentiels d'action	Grolleau et Lapiéd, 1995	
	-50 mV	TEA (>30 µM), Césium intracellulaire	Phase de repolarisation du potentiel d'action	Grolleau et Lapiéd, 1995	
	/	DMDS (CE <sub>50</sub> =8,7 µM) glibenclamide, tolbutamide	Maintien du potentiel de membrane	Dugravot et coll., 2003	
	Courants activés pour des hyperpolarisations : IK <sub>IR</sub>	-80 mV	TEA, Baryum et Césium extracellulaire	Limiter l'hyperpolarisation excessive	Raymond et Lapiéd, 1999
		-60 mV	SITS, DIDS, BAPTA, Zinc (ZnCl <sub>2</sub> )		
	ICl <sub>Ca</sub>				

**Tableau 11**

Récapitulation des différents types de courants ioniques membranaires responsables de l'activité électrique spontanée des DUM neurones du DGA de la blatte *Periplaneta americana*. (\* résultats obtenus sur le ganglion A5) (modifié d'après Grolleau et Lapiéd, 2000).



**Figure 17**

A : Morphologie d'un DUM neurone efférent de l'îlot antérieur du DGA de la blatte *Periplaneta americana*. L'arborisation neuritique ainsi que le corps cellulaire sont révélés par un marquage antérograde au chlorure de cobalt (modifié d'après Sinakevitch et coll. 1996). Agrandissement : photographie d'un corps cellulaire de DUM neurone isolé du DGA de *P. americana* 24h après dissociation

B : Marquage par des anticorps polyclonaux anti-octopamine des DUM neurones in situ du DGA ou d'un corps cellulaire isolé maintenu en culture à court terme (agrandissement) (d'après Grolleau et Lapied, 2000).

C : Courants ioniques impliqués dans l'activité électrique spontanée des DUM neurones du DGA de *P. americana* (modifié d'après Grolleau et Lapied, 2000 ; Defaix et Lapied, 2005 ; Lavalie-Defaix et coll., 2006).

## **B- Caractéristiques des DUM neurones de la blatte** **Periplaneta americana : dernières données**

### **1. Les canaux sodium dépendants du potentiel**

Les canaux sodium dépendants du potentiel font partie des premiers courants impliqués dans l'activité pacemaker des DUM neurones (Lapied et coll., 1989, 1990). Ils sont la cible de molécules à effets insecticides (par exemple le DCJW, Lapied et coll., 2001)) et de toxines d'araignée ou de scorpion (Grolleau et coll., 2001b ; Grolleau et coll., 2006) (Tableau 11).

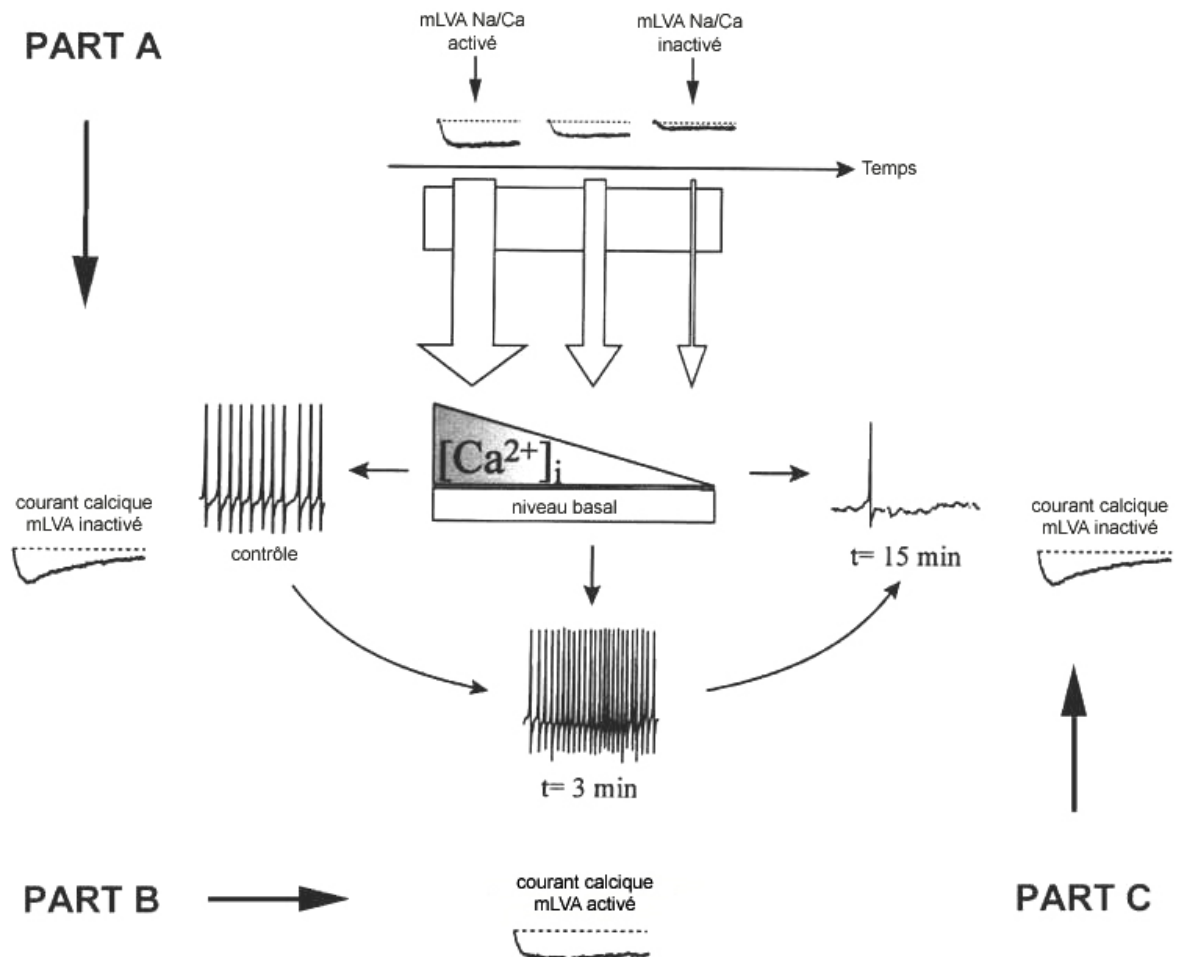
En 2006, l'étude de Lavialle-Defaix et coll. (2006) (voir Annexes) a permis l'identification électrophysiologique de deux courants sodium dépendants du potentiel, INa1 et INa2, responsables de l'activité électrique spontanée des DUM neurones. Ces deux courants ont pu être discriminés grâce à leur sensibilité au glutamate. En effet, INa1 est inhibé via les récepteurs glutamatergiques métabotropes de type III (mGluRIII). En inhibant INa1 avec du glutamate il est alors possible d'étudier les propriétés électrophysiologiques de INa2 et de déduire par soustraction des courants celles de INa1. La dépendance, vis-à-vis du potentiel, de l'activation (étudiée à partir de l'amplitude des queues de courant de désactivation) est ralentie pour INa2, avec une pente  $k$  deux fois plus lente que INa1. Alors que la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation à l'état stable montre un décalage du  $V_{0,5}$  vers des potentiels plus négatifs, sans modification de la pente  $k$ , par rapport à INa1 (Tableau 12). La superposition des courbes d'activation et d'inactivation délimite une gamme de potentiel dans laquelle les canaux conduisent à l'état stable. Cette fenêtre est décalée vers des potentiels plus négatifs pour INa2 par rapport à INa1, ce qui suggère que la réduction de INa1 par le L-glutamate conduit à une augmentation de l'excitabilité neuronale. En effet, l'application de L-glutamate induit une élévation de la fréquence de décharge des DUM neurones.

Enfin, les propriétés de réactivation à partir de l'état inactivé sont distinctes pour INa1 et INa2. La courbe de réactivation de INa1 est décrite avec une fonction biexponentielle, soit deux constantes de temps, alors que celle de INa2 n'a qu'une seule constante de temps qui est plus rapide que la constante lente de INa1 (Tableau 12). INa2 se réactive donc plus

	Activation		Inactivation		Constante de temps de réactivation (ms)
	V <sub>0.5</sub> (mV)	Pente (k)	V <sub>0.5</sub> (mV)	Pente (k)	
INa1	-23.1 ± 0.1 (n=9)	2.4 ± 0.1 (n=9)	-22.9 ± 0.9 (n=11)	7.1 ± 0.9 (n=11)	5.91 ± 2.53 1.26 ± 0.09 (n=9)
INa2	-24.6 ± 0.2 (n=9)	5.3 ± 0.2 (n=9)	-41.6 ± 0.5 (n=11)	7.6 ± 0.4 (n=11)	4.79 ± 0.14 (n=9)

**Tableau 12**

Propriétés d'activation, d'inactivation et de réactivation des courants Na1 et Na2 des DUM neurones. Modifié d'après Lavalie-Defaix et coll., 2006.



**Figure 18**

Le rôle physiologique du courant maintenu Na/Ca sur la fréquence des potentiels d'action, mis en évidence par l'application de cyclosporine A. En condition contrôle, le courant maintenu à bas seuil d'activation (mLVA) a un décours inactivé (PART A). L'application de cyclosporine, qui inhibe progressivement le courant maintenu Na/Ca, lève l'inactivation du courant mLVA ce qui augmente la fréquence de décharge des potentiels d'action (PART B). L'inhibition complète du courant Na/Ca induit, *via* une diminution du calcium intracellulaire, une inactivation du mLVA et provoque une diminution de la fréquence des potentiels d'action (PART C). Modifié d'après Defaix et Lapied (2005) et Grolleau et Lapied (1996).

rapidement que  $INa_1$  ce qui contribue à augmenter la fréquence de décharge des DUM neurones comme observé lors de l'application de L-glutamate.

#### Cas particulier : le courant calcico-sodique

L'une des dernières avancées est la caractérisation d'un courant maintenu ayant une double conductance, calcique et sodique (Defaix et Lapied, 2005). Le courant maintenu  $Na^+/Ca^{2+}$  est régulé par deux voies de signalisation, l'une dépendante de l'AMP cyclique et l'autre du calcium intracellulaire. Ce courant est impliqué dans la phase de prédépolarisation des potentiels d'action des DUM neurones. Il participe ainsi à la modulation de la fréquence de l'activité spontanée des DUM neurones en influant sur le courant calcique mLVA (Figure 18) (Defaix et Lapied, 2005).

## **2. Les canaux potassium dépendants du calcium**

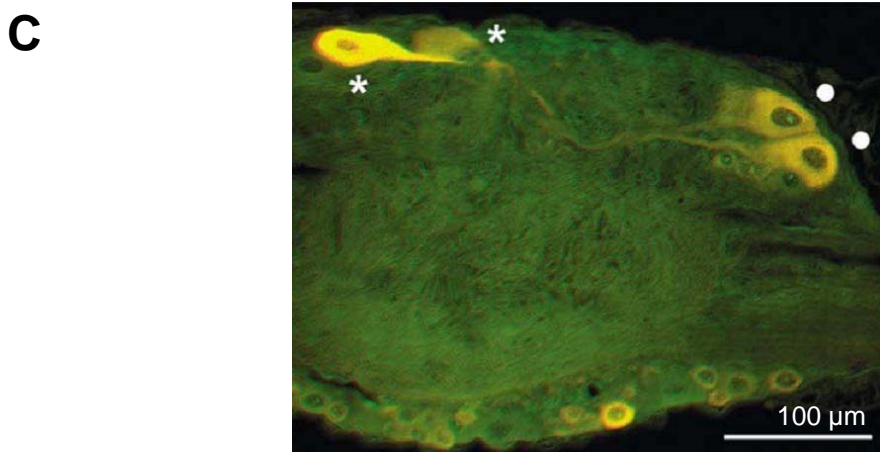
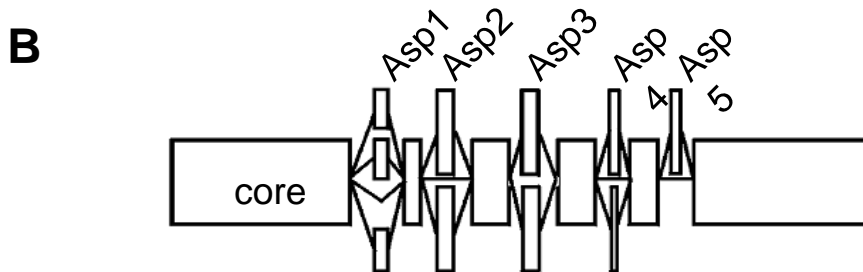
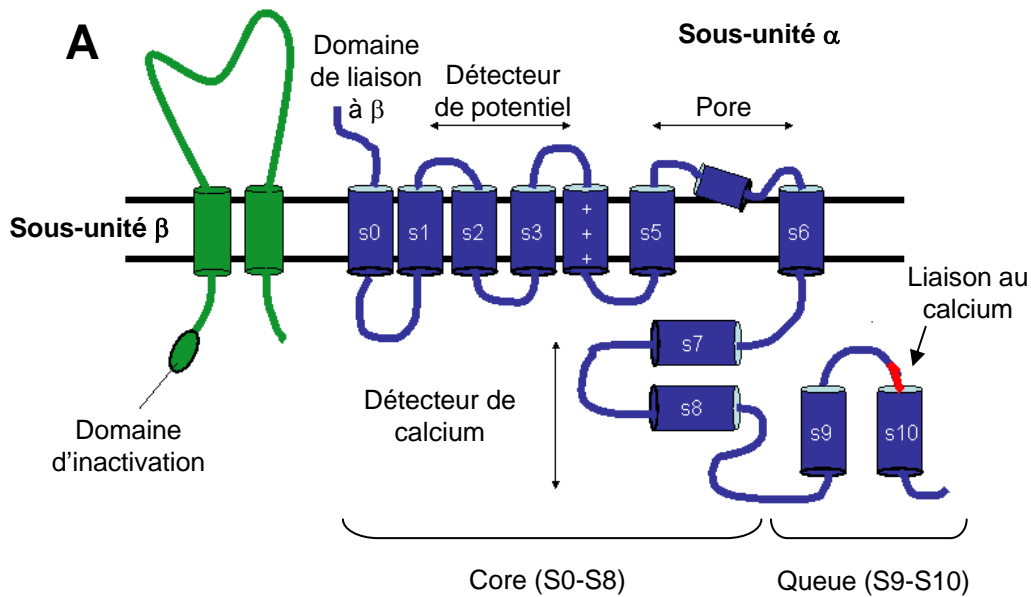
Les courants potassium dépendants du calcium, aussi appelés courants BK ou Slo car le premier gène cloné fut celui de mutant « Slowpoke » (*i.e.* léthargique) de *D. melanogaster* (Atkinson et coll., 1991), sont activés par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et par une dépolarisation (Xu et coll., 2004). Ils ont été décrits sur DUM neurones par Wicher et coll. (1994) puis caractérisés en 1995 par Grolleau et Lapied (1995). Ces courants ont une composante transitoire qui s'active et s'inactive rapidement et une composante maintenue qui s'active plus lentement et ne s'inactive pas (Grolleau et Lapied, 1995).

#### Caractéristiques moléculaires

Le gène *pSlo* (AF452164), cloné par Derst et coll. (2003), présente 88,7% d'identité avec le gène *dSlo* (*Drosophila melanogaster*) et code pour un canal présentant les caractéristiques des canaux de type Slo (Vergara et coll., 1998 ; Derst et coll., 2003) (Figure 19A) :

- la région du pore contient le motif GYG, spécifique du filtre de sélectivité ionique des canaux potassium ;
- Six segments transmembranaires (S1 à S6) présentent une homologie avec les canaux potassium dépendants du potentiel et le segment S4 est le détecteur de potentiel ;





**Figure 19**

**A** : Représentation schématique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des canaux potassium dépendants du calcium de type *Slo*. Modifié d'après <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/jacob/teaching/ionchan/maxi-K.html>

**B** : Représentation schématique des sites d'épissage de *pSlo*. Modifié d'après Derst et coll., 2003.

**C** : Double marquage immunologique anti-pSlo et anti-taurine sur une coupe sagittale du 5ème ganglion abdominal. Les cellules dans lesquelles les canaux pSlo et la taurine sont colocalisés apparaissent en jaune. Les cercles blancs désignent des DUM neurones. D'après Derst et coll., 2003.

- Un segment transmembranaire spécifique des canaux de type Slo (S0) ;
- Une courte extrémité N-terminale ;
- Une large extrémité C-terminale présentant le site de liaison au calcium (Derst et coll., 2003).

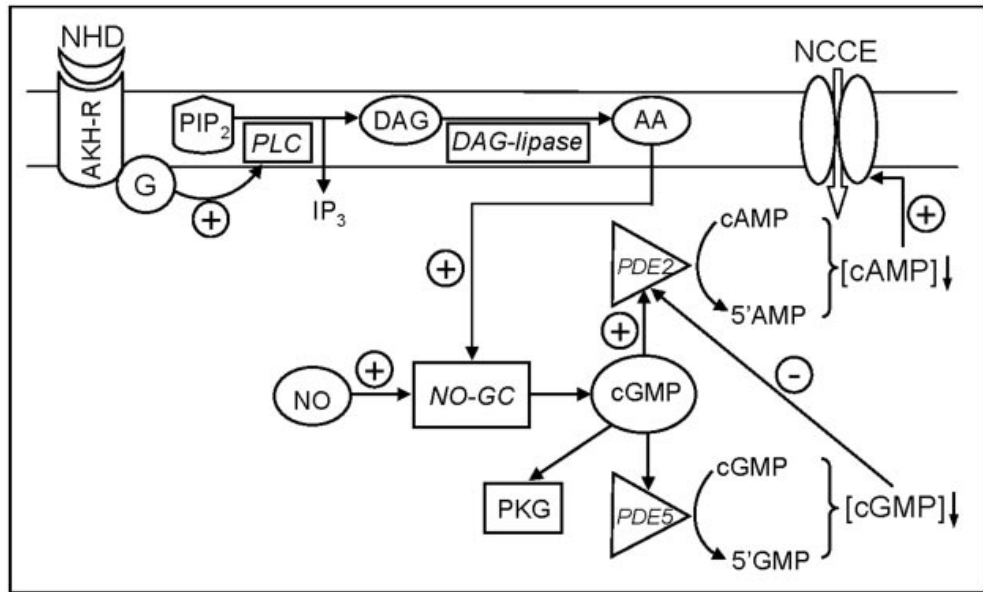
Plusieurs variants d'expressions (Asp1 à Asp5) ont été identifiés dans plusieurs tissus dont le système nerveux central (Figure 19B). De plus, des marquages immunologiques ont montré que les DUM neurones expriment les canaux pSlo (Figure 19C) (Derst et coll., 2003).

### **3. Les canaux calcium de type TRP**

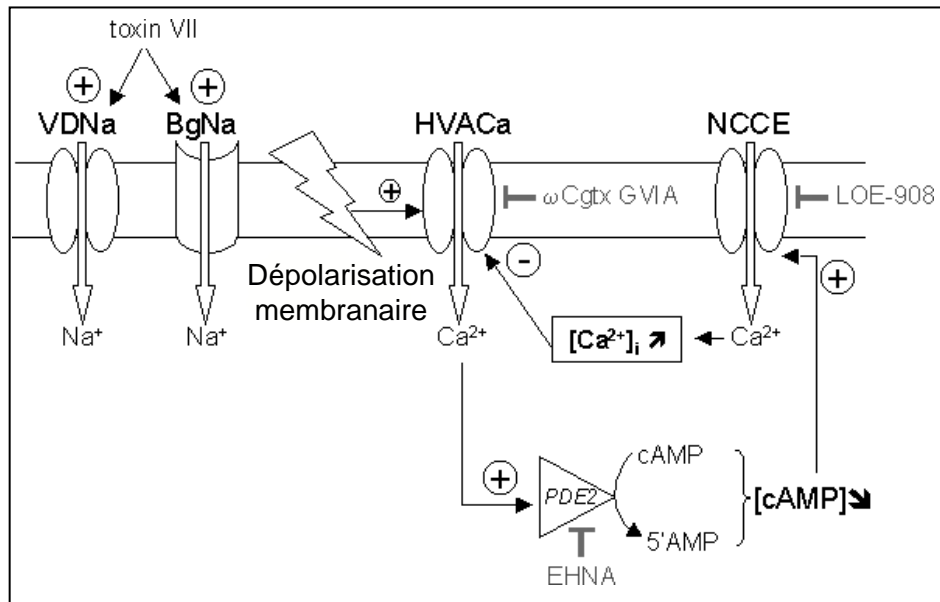
Le calcium est un messager intracellulaire universel qui contrôle de nombreux processus cellulaires comme la neurosécrétion ou le métabolisme. Le niveau de calcium intracellulaire peut être augmenté par une entrée de calcium extracellulaire et/ou une sortie des stocks de calcium intracellulaires (Messutat et coll., 2001). L'influx de calcium extracellulaire se fait, le plus souvent, par les canaux calcium dépendants du potentiel ou des canaux calcium dit de repos (Grolleau et Lapied, 1996 ; Wicher et Penzlin, 1997 ; Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et coll., 2004, 2006 ; Grolleau et coll., 2006). Cet influx peut s'accompagner d'une sortie des stocks intracellulaires via les récepteurs à ryanodine ou les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (Messutat et coll., 2001).

Le dernier canal calcium identifié et cloné sur DUM neurones est le TRP $\gamma$  Wicher et coll. (2006). Ce canal fut tout d'abord décrit par Heine et Wicher (1998) comme courant calcium de repos puis mis en évidence sous le nom de NCCE (« Non-Capacitive Calcium Entry », Wicher et coll., 2004) avant sa caractérisation moléculaire (Wicher et coll., 2006). L'activation de ce canal, par une diminution de la concentration en AMP cyclique (AMPc), a été montrée dans l'effet de la neurohormone D (NHD) (Figure 20A, Wicher et coll., 2004). En effet, la stimulation du récepteur à l'hormone adipokinétique par la NHD, induit l'activation d'une phospholipase C qui hydrolyse le PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en diacylglycérol (DAG) et IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trisphosphate). Le DAG est le précurseur de l'acide arachidonique (AA). L'AA libéré à partir du DAG active une guanylate cyclase sensible au NO ce qui induit une élévation du niveau de GMP cyclique (GMPc). L'augmentation de la concentration en GMPc, stimule la phosphodiesterase 2 (PDE2) qui

A



B



### Figure 20

**A** : Schéma récapitulatif de la voie de signalisation intracellulaire, mise en jeu lors de l'application de la neurohormone D, qui régule le canal NCCE de la blatte *Periplaneta americana* (modifié d'après Wicher et coll., 2004).

AA : acide arachidonique ; AKH-R : récepteur de l'hormone adipokinétique ; DAG : diacylglycérol ; NCCE : « noncapacitive calcium entry » ; IP3 : phosphatidylinositol ; NO : monoxyde d'azote ; NO-GC : guanylate cyclase sensible au NO ; PDE : phosphodiesterase ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PKG : protéine kinase G ; PLC : phospholipase C.

**B** : Schéma récapitulatif de l'effet neurotoxique de la b-toxine VII du scorpion *Tityus serrulatus* impliquant le canal NCCE (modifié d'après Grolleau et coll., 2006).

BgNa : canal sodium de repos ; EHNA : erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride ; HVACa : canal calcique de type HVA ; VDNa : canal sodium dépendant du potentiel ;  $\omega$ -CgTx GVIA, *Conus geographus* omega conotoxine.

hydrolyse l'AMPc. Pour finir, cette diminution de la concentration en AMPc stimule le NCCE. D'après Grolleau et coll. (2006), l'activation de la PDE2 par une élévation du calcium intracellulaire, suite à l'application d'une toxine  $\beta$  du scorpion *Tityus serrulatus*, est également à l'origine d'une stimulation du NCCE *via* une diminution de l'AMPc (Figure 20B).

# CHAPITRE 2 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

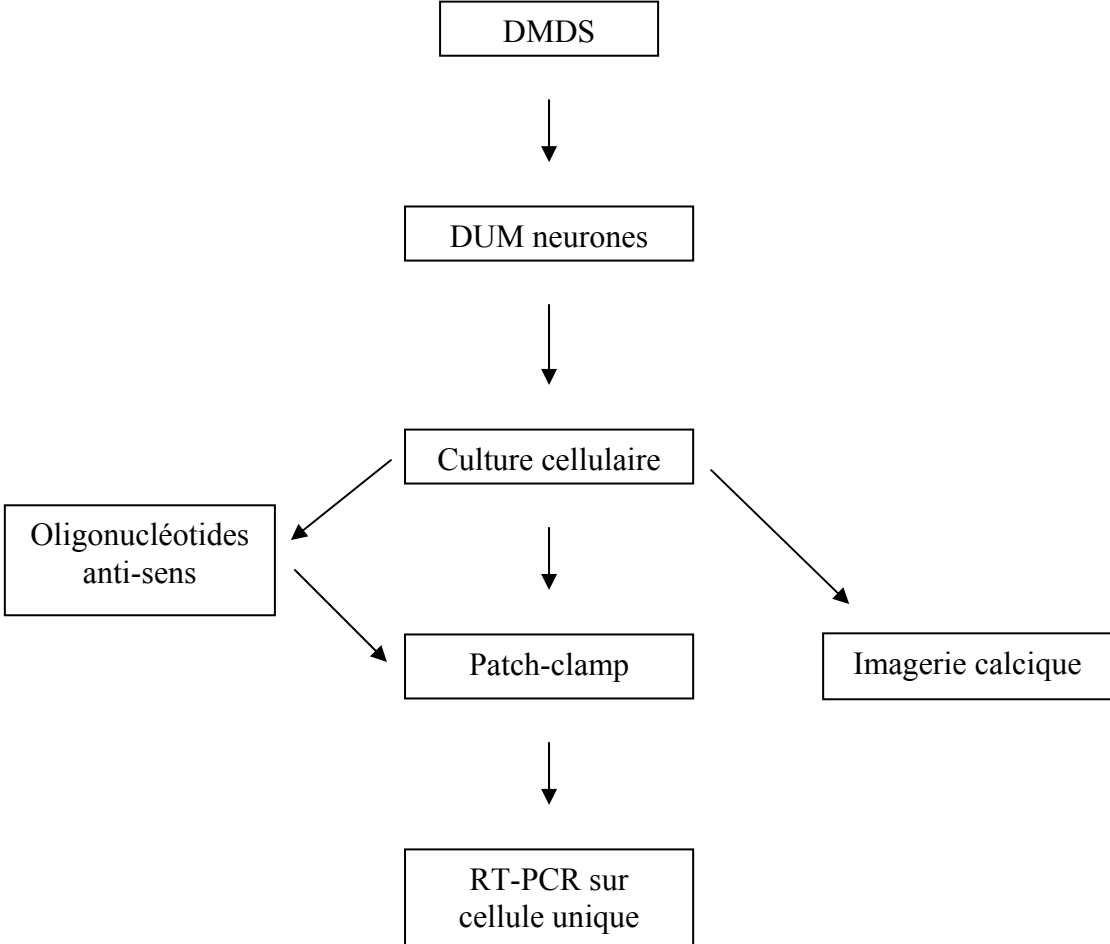


Schéma représentant les différentes techniques adaptées et utilisées pour étudier l'effet du DMDS à partir du modèle DUM neurone.

## **A. Technique de culture à court terme des DUM neurones**

### **1. Matériel biologique**

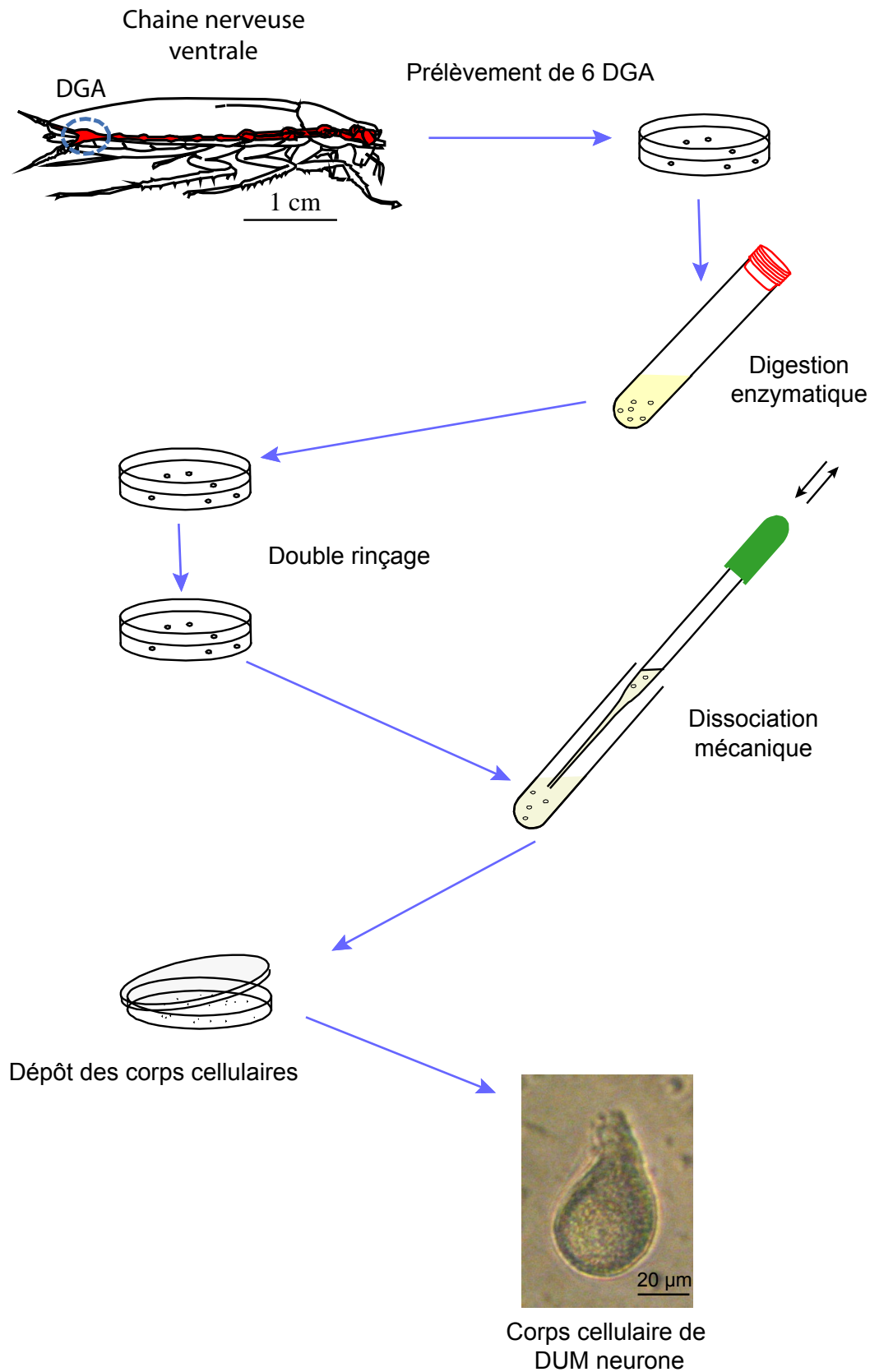
Les DUM neurones sont isolés du DGA de la blatte mâle adulte *Periplaneta americana*. Les blattes sont élevées au laboratoire à une température constante de 29°C et avec une photopériode alternant 12h de lumière artificielle et 12h d'obscurité. Seuls les adultes mâles sont prélevés pour différentes raisons : le système nerveux central des blattes mâles est moins recouvert de tissus adipeux que les femelles ce qui facilite la dissection. De plus, la grande majorité des connaissances anatomiques et fonctionnelles proviennent d'expérimentations effectuées sur les blattes mâles adultes (Hue et Callec, 1990). Enfin l'utilisation des mâles permet de préserver l'élevage.

### **2. Précautions expérimentales**

L'isolement des corps cellulaires des DUM neurones du DGA, dont le protocole est illustré sur la figure 21, requiert plusieurs précautions afin d'éviter la contamination bactérienne ou fongique des cellules isolées qui seront mises en culture. Cette technique de dissociation, mise au point au laboratoire (Lapied et coll., 1989), est réalisée sous hotte à flux laminaire horizontal. La paillasse ainsi que les instruments de dissections sont préalablement nettoyés à l'alcool (70%). Les différents liquides physiologiques (LP) utilisés (voir compositions dans le tableau 13) sont filtrés préalablement à l'aide de filtres stériles (Analyapore, diamètre des pores 0,22 µm).

### **3. Prélèvement des derniers ganglions abdominaux**

Après avoir sectionné la tête, les pattes et les ailes, la blatte est épinglée face dorsale sur un support en polystyrène recouvert de papier aluminium désinfecté à l'alcool. Le système nerveux des insectes se situant sur la face ventrale, la dissection est donc effectuée par ce côté pour limiter la contamination des ganglions résultant du prélèvement du tube digestif. Sous contrôle binoculaire (grossissement x6.4 puis x16), une fenêtre est réalisée dans la cuticule



**Figure 21**

Principales étapes de la technique de dissociation cellulaire pour obtenir les corps cellulaires de DUM neurones.

DGA : Dernier ganglion abdominal.

ventrale au niveau du DGA. Les viscères sont aussitôt recouverts de LP1 (Tableau 13) additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Sigma, L'isle d'Abeau Chesnes, France) afin d'éviter tout dessèchement de la préparation. Après avoir retiré la glande conglobée puis écarté les glandes accessoires, il est possible de prélever le DGA en sectionnant les nerfs cercaux et le connectif qui relie le cinquième ganglion au DGA. Le ganglion ainsi prélevé est alors déposé dans une boîte de culture contenant du LP1 (Figure 21 et tableau 13). Un nettoyage plus minutieux du ganglion est effectué à l'aide d'aiguilles montées pour éliminer les ramifications nerveuses et les trachées résiduelles. A chaque dissociation, six ganglions sont prélevés de cette façon.

#### **4. Digestion enzymatique**

Les six ganglions sont ensuite placés dans un tube à hémolyse stérile contenant de la collagénase type IA (300 UI/mL, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA) (LP2, Tableau 13). La digestion enzymatique est effectuée dans une étuve maintenue à une température de 29°C en atmosphère humide pendant 35 minutes. Les ganglions sont ensuite rincés dans deux bains successifs de LP1 (5 minutes chacun) (Figure 21).

#### **5. Dissociation mécanique**

Les ganglions sont transférés dans un tube à hémolyse contenant du LP3 (Tableau 13) enrichi en sérum de veau fœtal (GibcoBRL, Paisley, Ecosse). La dissociation mécanique s'effectue par aspirations-refoulements successifs à l'aide de pipettes Pasteur dont les diamètres sont progressivement réduits à la flamme (Figure 20). Le premier diamètre a pour but de désorganiser la structure du ganglion, le deuxième, d'isoler les îlots de DUM neurones et le troisième d'individualiser les corps cellulaires des DUM neurones. Pour les expériences de patch-clamp, les cellules ainsi isolées sont déposées dans des boîtes de Pétri (35 mm, Falcon, AES France) préalablement traitées à la poly-D-lysine (100 µg/ml, MM 70000-150000, Sigma)(Figure 21). La poly-D-lysine permet l'adhérence des neurones sur le fond de la boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées 24h dans l'étuve à 29°C en atmosphère humide, avant de procéder aux différentes expériences.



	LP 1	LP 2	LP 3	LP 4
NaCl (mM)	200	200	200	200
KCl (mM)	3,1	3,1	3,1	3,1
CaCl <sub>2</sub> (mM)	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> (mM)	4	4	4	4
HEPES (mM)	10	10	10	10
Saccharose (mM)	50	50	50	50
Pénicilline (UI/mL) Streptomycine (µg/mL)	100 100	0	50 50	0
Collagénase (UI/mL) (Worthington Biochemical Corporation, GB)	0	300	0	0
SVF (%) (Gibco BRL)	0	0	5	0
pH (ajusté avec NaOH 1N)	7,4	7,4	7,4	7,4

**Tableau 13**

Compositions des liquides physiologiques (LP) utilisés pour la technique de dissociation cellulaire

## **B. Adaptations de la technique de culture à l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens**

Les oligonucléotides anti-sens (AS) sont de courts fragments d'acides nucléiques qui en créant des doubles brins avec les ARN messagers inhibent leur traduction. Cette technique a été adaptée à la culture court-terme des DUM neurones selon le protocole précédemment décrit par Fickbohm et Trimmer (2003) sur les neurones de papillon *Manduca sexta*.

Les AS choisis correspondent aux 45 premières bases de la séquence signal du *pSlo* (Derst et coll., 2003) à partir du codon initiateur. Ils correspondent à un mélange de trois séquences de 15 bases chacune. Des oligonucléotides « reverse anti-sens » (RAS) ont également été utilisés pour confirmer qu'aucun effet observé n'était dû à la nature physique des oligonucléotides (Europrim, Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

pSlo AS: CTC ACA GTT CGA CAT (1-15); CAC CGA TGT CAT CTC (16-30); ATC TTC GCC TGG TGA (31-45)

pSlo RAS: TAC AGC TTG ACA CTC (1-15); CTC TAC TGT AGC CAC (16-30); AGT GGT CCG CTT CTA (31-45)

Les DUM neurones sont incubés avec un mélange des trois séquences (10  $\mu$ M chaque) directement dans le milieu de culture pendant 24h ou 48h. Lors des incubations de 48h la moitié du milieu est renouvelée à partir de 24h.

## **C. Technique électrophysiologique du patch-clamp**

### **1. Principe de la technique**

La technique du patch-clamp a été mise au point par Neher et Sakmann (Neher et coll., 1978) à la fin des années 70, puis améliorée par Hamill et ses collaborateurs en 1981.

Le neurone à étudier est choisi selon plusieurs critères morphologiques lors de l'observation au microscope optique. Le corps cellulaire est pyriforme avec un diamètre d'environ 50  $\mu$ M (Figure 21). La membrane doit être régulière et réfringente, le cytoplasme légèrement granuleux. De plus les cellules doivent présenter un noyau bien délimité.

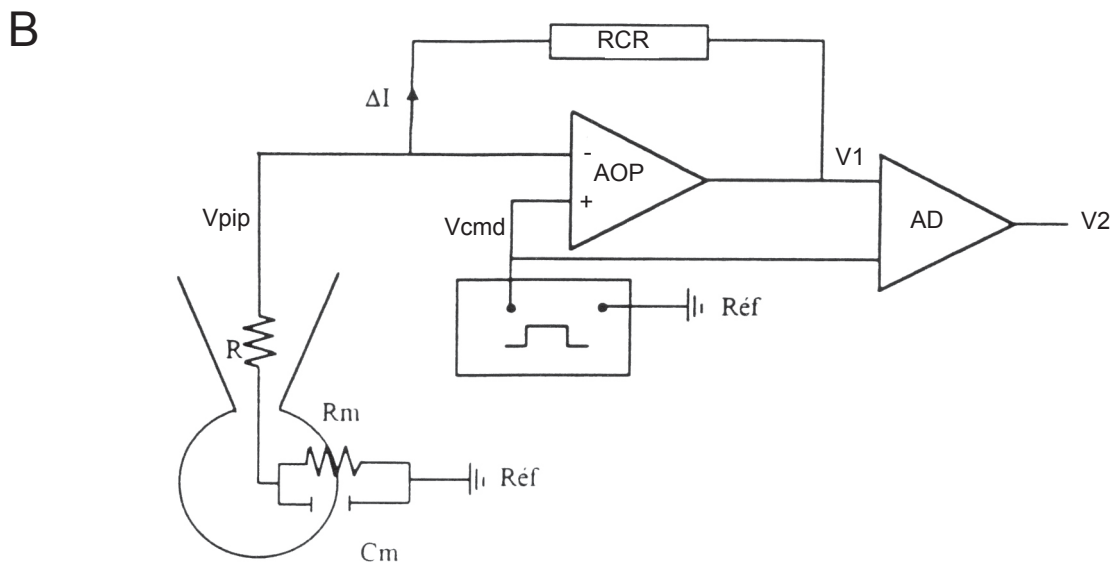
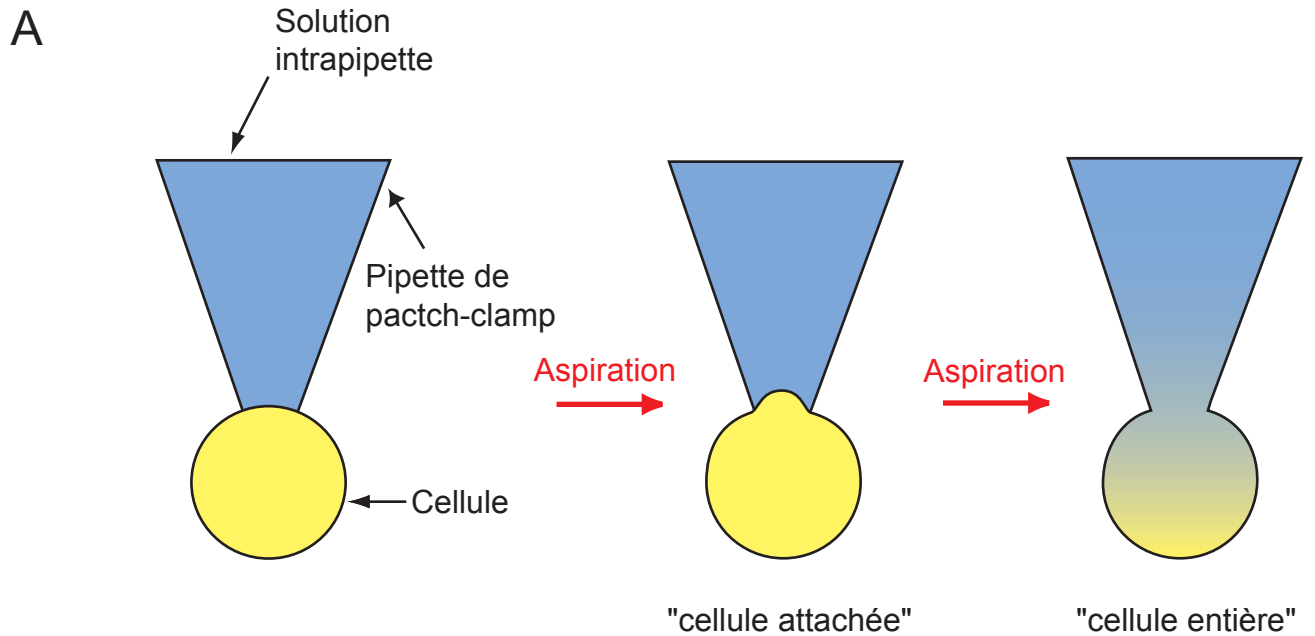
La pipette de patch-clamp est approchée à proximité de la membrane du neurone. Une pression positive est maintenue à l'intérieur de la pipette de manière à éviter une contamination de la pointe par d'éventuels débris cellulaires ou par le milieu extracellulaire. La pointe est alors appuyée sur la membrane de la cellule et une pression négative est exercée pour créer une zone de contact de forte résistance électrique entre la pointe de la pipette et la membrane de la cellule. Cette résistance, appelée résistance de scellement ou « seal », peut atteindre plusieurs gigaohms ( $10^9 \Omega$ ). Ainsi, le morceau de membrane se trouvant sous la pointe de la pipette est isolé électriquement du reste de la cellule, c'est la configuration « cellule attachée » (Figure 22A). Une aspiration supplémentaire à travers la pipette de patch-clamp est appliquée jusqu'à provoquer la rupture de la portion de membrane se trouvant sous la pointe de la pipette afin d'obtenir la configuration « cellule entière » (Figure 22A). Il y a alors une continuité physique et électrique entre la pipette et le cytoplasme de la cellule.

Cette configuration « cellule entière » présente l'avantage de contrôler le milieu intracellulaire et éventuellement d'y appliquer des agents pharmacologiques non perméables. Elle permet d'enregistrer des variations de potentiel et l'activité de l'ensemble des canaux ioniques présents à la surface de la membrane de la cellule, dans les conditions de courant imposé et de potentiel imposé, respectivement de telles sorte que :

$$I = N \times P_{o(t,V)} \times i \quad (1)$$

Où I est le courant macroscopique ; N, le nombre de canaux ;  $P_o$ , la probabilité d'ouverture d'un canal ionique à un instant t et à un potentiel V et i, le courant élémentaire qui traverse un seul canal ionique.

Par contre, cette configuration « cellule entière » présente un inconvénient majeur. Le processus de « run-down », qui consiste en la diminution progressive de l'amplitude du courant au cours du temps. Le « run-down » est due à une dilution des composants du milieu intracellulaire (processus de « wash-out ») par le milieu intrapipette, indispensables au bon fonctionnement des canaux ioniques étudiés. Cet inconvénient peut être en partie résolu par un enrichissement du milieu intrapipette en éléments énergétiques (e.g. ATP, GTP).



**Figure 22**

A : Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière ».

B : Schéma simplifié du principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ».

AOP : amplificateur opérationnel ; AD : amplificateur différentiel ; Cm : capacité de la membrane ; R : résistance de la pipette ; RCR : résistance de contre-réaction ; Ref : potentiel de référence ; Rm : Résistance de la membrane ; Vcmd : potentiel de commande ; Vpip : potentiel de la pipette ; V1 : potentiel à la sortie de l'AOP ; V2 : potentiel à la sortie de l'AD ; i : courant.

## **2. Dispositif d'enregistrement et d'analyse**

Les boîtes de Pétri contenant les corps cellulaires des DUM neurones isolés sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, Rungis, France). La pipette de patch est maintenue par un porte-pipette fixé à la tête de l'amplificateur. L'ensemble (pipette + tête de l'amplificateur) est déplacé au moyen d'un micromanipulateur piézo-électrique tridimensionnel (Burleigh TS-5000-150, Burleigh Instruments, New York, USA). Le dispositif repose sur une table antivibratoire et est intégré dans une cage de Faraday.

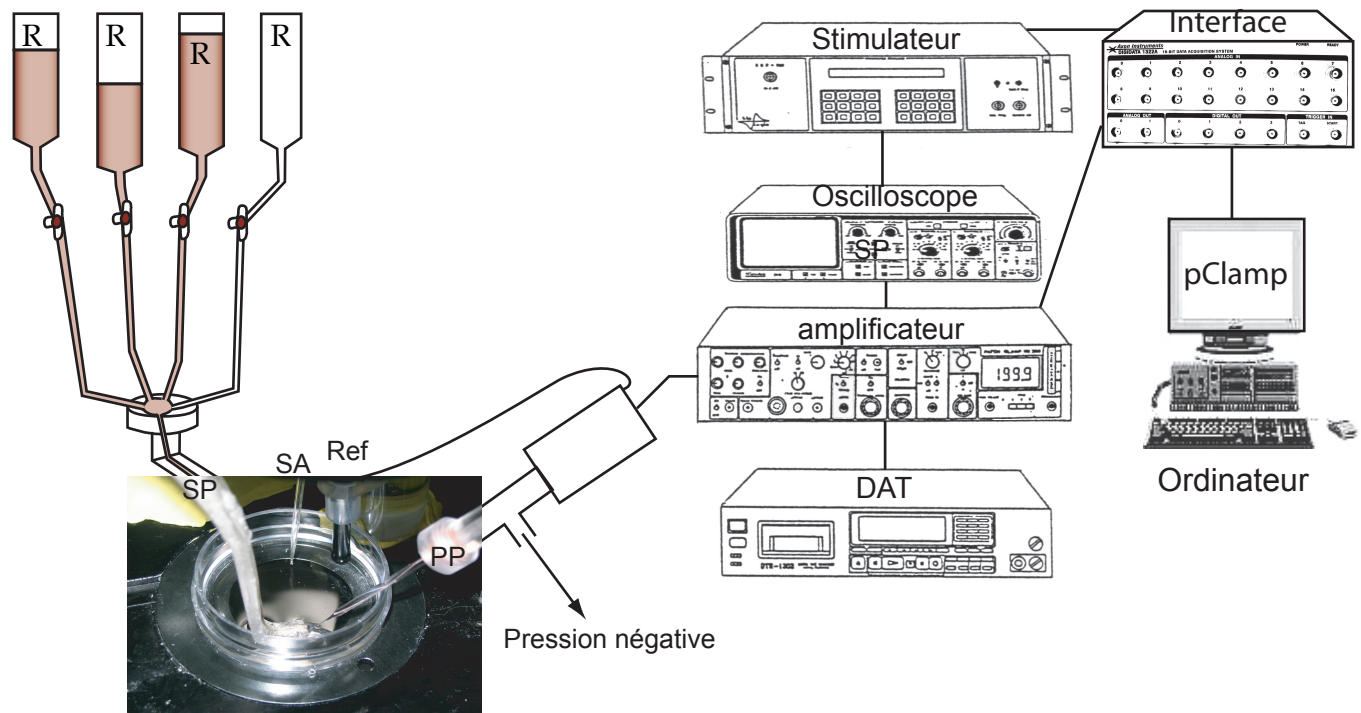
Les pipettes utilisées sont étirées à partir de tube de verre borosilicatés (GC 150 T-10, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) au moyen d'une étireuse verticale (PP 83, Narishige, Japon). Une fois remplie de la solution intrapipette (Tableau 14, 15 et 16) préalablement filtrée (filtre Analypore, diamètre des pores 0,22  $\mu\text{m}$ ), leur résistance est comprise entre 1,1 à 1,4  $\text{M}\Omega$  (pour l'enregistrement des potentiels d'action) et 0,8 et 1  $\text{M}\Omega$  (pour l'enregistrement des courants sodium et potassium). Le potentiel de jonction entre les solutions extracellulaire et intrapipette est toujours corrigé avant la formation du scellement.

L'électrode est alors connectée à un amplificateur de type Axopatch 200A (Axon Instrument, Foster City, CA) (Figure 23). Les signaux électrophysiologiques sont filtrés par un filtre passe-bas d'une valeur de 5 kHz. Le dispositif comprend un amplificateur opérationnel (AOP) qui est monté en convertisseur courant-tension. L'AOP maintient au travers de la résistance de contre-réaction (RCR) une différence de potentiel nulle à ses bornes d'entrée. Le système oblige le potentiel de la pipette, relié à la borne négative de l'AOP, à suivre le potentiel appliqué par l'expérimentateur à la borne positive ( $V_{\text{cmd}}$ ) (Figure 2B).

Le courant ionique, converti en courant électrique ( $I$ ) par l'électrode, passe ainsi intégralement dans la RCR. Un amplificateur différentiel (AD) compare ensuite la valeur de sortie de l'AOP ( $V_1$ ) et le potentiel imposé ( $V_{\text{cmd}}$ ) (Figure 22B).

Le potentiel mesuré à la sortie de l'AD ( $V_2$ ) est donc l'image du courant ionique enregistré par l'électrode. La relation suivante peut s'établir :

$$V_2 = V_{\text{cmd}} - V_1 = \text{RCR} \times I \quad (2)$$



**Figure 23**

Représentation schématique de l'installation de patch-clamp. A gauche, les quatre réservoirs (R) sont connectés par un seul cathéter placé sur le système de superfusion (SP). Un système d'aspiration (SA) maintient un niveau constant de liquide dans la boîte de culture. La pipette de patch-clamp est fixée sur le porte-pipette (PP). L'amplificateur mesure les différences de potentiel entre la pipette et l'électrode de référence (Ref). L'amplificateur est relié d'une part, à l'oscilloscope pour visualiser les variations de courants et de potentiels ainsi chocs appliqués par le stimulateur, et d'autre part au système d'acquisition pClamp via l'interface ou à l'enregistreur DAT (Digital Audio Tape).

Un stimulateur programmable (SMP 300 Biologic, Claix, France) permet d'appliquer des stimulations électriques à la préparation (Figure 23). Les réponses physiologiques sont visualisées sur un oscilloscope numérique (Nicolet 3091, Nicolet Instrument Corporation, Madison, USA) et l'enregistrement des signaux est effectué par un ordinateur PC (Elonex Pentium 733 MHz, Angers, France) connecté à une interface Digidata 1322A (Axon Instruments) et/ou sur cassettes numériques DAT (DTR 1204, Biologic) pour l'enregistrement de l'activité électrique spontanée. Le logiciel pClamp (version 8.0.2, Axon Instruments) permet d'enregistrer et de mesurer l'amplitude des courants ioniques (fréquence d'échantillonnage 33 kHz) ainsi que l'activité électrique spontanée sur l'ordinateur (Figure 23). Lors de l'enregistrement des courants globaux, la soustraction des courants capacitifs et du courant de fuite est assurée par le protocole P/6 programmé grâce au logiciel pClamp. Ce protocole consiste à générer six « pré-pulses » de polarité opposée à l'échelon de potentiel test, juste avant l'application de celui-ci. L'analyse des courants ioniques enregistrés est effectuée par l'intermédiaire du logiciel Clampfit (version 8.0.2, Axon instrument) et les données numériques sont analysées par le logiciel Prism (version 4.0, GraphPad, USA).

### **3. Composition et application des solutions**

Les solutions extracellulaires et intrapipettes utilisées ont été définies de façon à pouvoir étudier soit l'activité électrique spontanée, soit le courant sodium (Lavialle-Defaix et coll., 2006) ou le courant potassium (Grolleau et Lapied, 1995). Dans ce cas, le courant maintenu calcico-sodique est inhibé par l'application de 3 mM d'ATP dans la solution intrapipette (Defaix et Lapied, 2005). La composition des solutions utilisées est résumée dans les tableaux 14, 15 et 16. Les différents produits chimiques proviennent de Sigma (L'isle d'Abeau Chesnes, France).

Les solutions sont appliquées au moyen d'un système de perfusion gravimétrique multicanaux. Ce système présente l'avantage de pouvoir changer rapidement la composition du milieu extracellulaire afin de tester les différentes solutions ou divers agents pharmacologiques. Ce système gravimétrique est fixé et dirigé par un micromanipulateur (Narishige, Japon) qui permet de positionner la perfusion à environ 100  $\mu\text{m}$  du corps cellulaire. Un système d'aspiration assure le renouvellement régulier du milieu et maintient un volume constant dans la boîte de culture (Figure 23).

Solution Intrapipette		Solution extracellulaire	
K aspartate (mM)	160	NaCl (mM)	200
K fluoride (mM)	10	KCl (mM)	3,1
NaCl (mM)	10	CaCl <sub>2</sub> (mM)	5
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	MgCl <sub>2</sub> (mM)	4
CaCl <sub>2</sub> (mM)	0,5	HEPES (mM)	10
HEPES (mM)	10		
EGTA (mM)	10		
ATP-Mg (mM)	1		
pH	7,4 (ajusté avec KOH 1N)	pH	7,4 (ajusté avec NaOH 1N)

**Tableau 14**

Solutions utilisées en conditions de courant-imposé pour enregistrer les potentiels d'action spontanés ou déclenchés des DUM neurones

Solution Intrapipette		Solution Extracellulaire	
CsCl (mM)	90	NaCl (mM)	80
CsF (mM)	80	TEACl (mM)	120
NaCl (mM)	15	KCl (mM)	3,1
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	CaCl <sub>2</sub> (mM)	2
HEPES (mM)	10	MgCl <sub>2</sub> (mM)	7
EGTA (mM)	5	CdCl <sub>2</sub> (mM)	1
ATP-Mg (mM)	3	4-AP (mM)	5
		HEPES (mM)	10
pH	7,4 (ajusté avec CsOH 1N)	pH	7,4 (ajusté avec TEA-OH 1N)

**Tableau 15**

Solutions utilisées en conditions de potentiel-imposé pour enregistrer les courants sodium dépendants du potentiel

Solution Intrapipette		Solution Extracellulaire	
KCl (mM)	135	NaCl (mM)	100
KF (mM)	25	Trizma-HCl (mM)	70
NaCl (mM)	9	KCl (mM)	3,1
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	CaCl <sub>2</sub> (mM)	5
CaCl <sub>2</sub> (mM)	0,1	MgCl <sub>2</sub> (mM)	4
HEPES (mM)	10	HEPES (mM)	10
EGTA (mM)	1	TTX	100 nM
ATP-Na <sub>2</sub> (mM)	3		
pH	7,4 (ajusté avec KOH 1N)	pH	7,4 (ajusté avec NaOH 1N)

**Tableau 16**

Solutions utilisées en conditions de potentiel-imposé pour enregistrer les courants potassium dépendants du potentiel.



## **D. Technique de RT-PCR sur DUM neurones isolés**

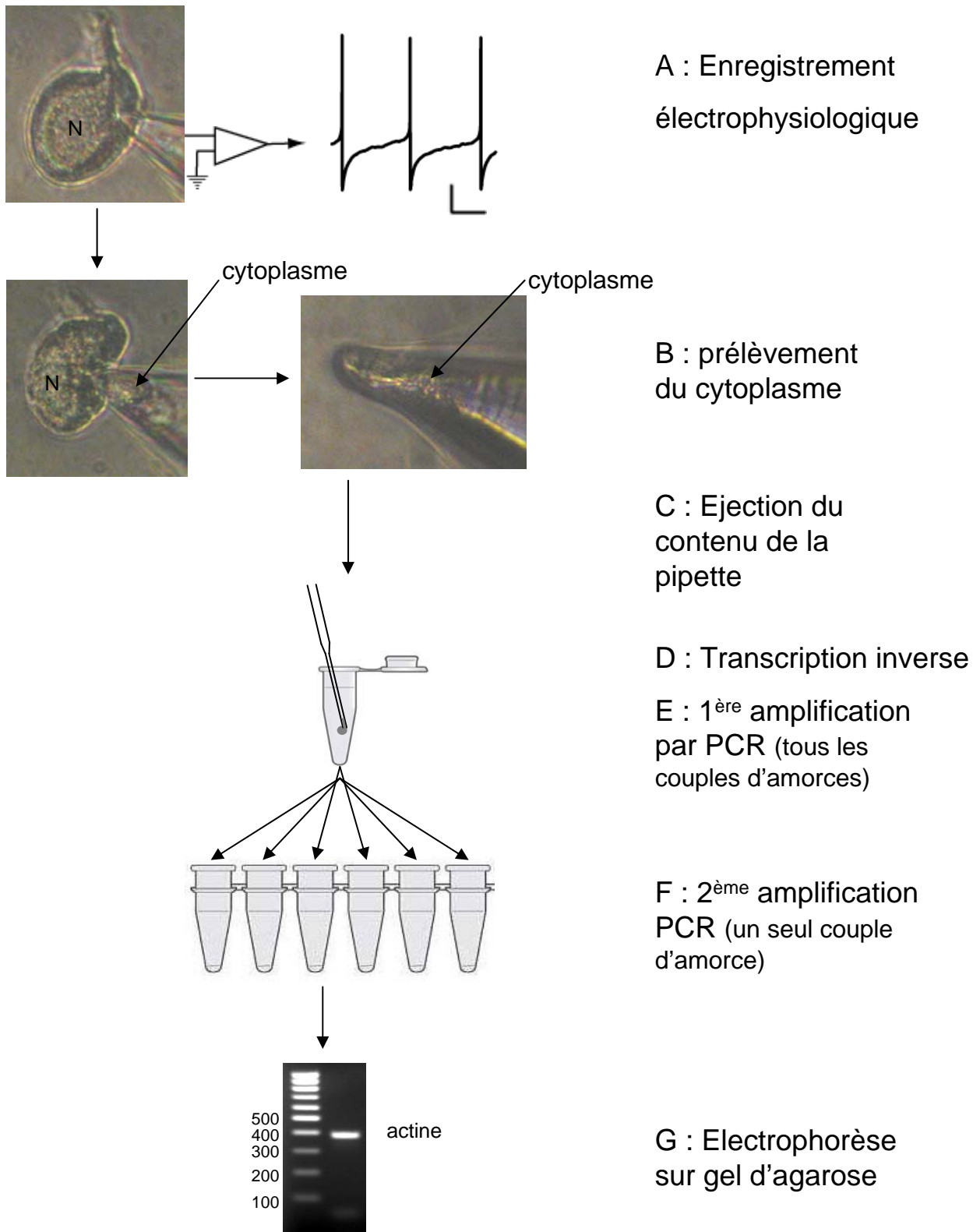
### **1. Principe de la technique**

La technique de RT-PCR sur cellule unique permet d'étudier en parallèle les propriétés électrophysiologiques et le profil d'expression d'ARN messagers (ARNm) d'intérêt d'une seule cellule, nous permettant d'établir une corrélation entre son phénotype et son génotype. Elle est basée sur la combinaison du patch-clamp avec la RT-PCR (Monyer et Lambolez, 1995; Sucher et Deitcher, 1995; Audinat et coll., 1996). Très largement employée dans le domaine des vertébrés, cette technique est très peu utilisée pour l'étude de l'expression des récepteurs et des canaux ioniques des neurones du système nerveux central des invertébrés (O'Dowd et coll., 1995; Blackshaw et coll., 2003; Wagatsuma et coll., 2005; Wicher et coll., 2006).

La technique d'enregistrement électrophysiologique utilisée est identique à celle décrite précédemment (voir C.1 Principe de la technique de patch-clamp). A la fin de l'enregistrement le contenu cytoplasmique est aspiré à l'intérieur de la pipette. Le prélèvement est contrôlé par observation au microscope optique en évitant soigneusement de prélever le noyau qui contient l'ADN génomique. La pipette contenant le cytoplasme est éloignée immédiatement de la cellule et son contenu est éjecté dans un tube. Une réaction de rétro-transcription sera aussitôt réalisée pour produire des ADNc, substrats de l'ADN polymérase et plus stables que les ARNm. Les produits de transcription inverse serviront de matrices aux PCR réalisées par la suite (Figure 24).

### **2. Enregistrements électrophysiologiques précédant la RT-PCR sur cellule isolée**

Bien que la technique soit analogue à un enregistrement de patch-clamp classique, elle requiert certaines précautions essentielles. La première précaution réside dans l'utilisation de matériel et de produits spécialement dédiés à la RT-PCR sur cellule unique, garantis dépourvu de traces d'ARNases et ADNases. La verrerie a été nettoyée à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 M, qui dénature les ARNases, et autoclavée. Les capillaires destinés à fabriquer les



**Figure 24**

Résumé des étapes de la technique de RT-PCR sur DUM neurones isolés.

microélectrodes ont été également autoclavés. La zone autour de l'étireuse est nettoyée à l'aide de NaOH 0,1M et l'environnement est maintenue stérile grâce à l'utilisation d'un bec bunsen. Le port de gants pendant toute la durée des expériences complète ces précautions.

Le prélèvement du cytoplasme est l'une des étapes les plus délicates. Les temps d'enregistrements en configuration cellule entière sont limités pour préserver au mieux l'intégrité des ARNm ayant une courte durée de vie. De plus les très faibles quantités d'ARN contenues dans une cellule augmentent la nécessité d'apporter un très grand soin à l'ensemble de ces manipulations. Pour faciliter le prélèvement du cytoplasme, de nature visqueuse, les diamètres des pipettes utilisées sont sensiblement plus importants (résistances entre 0,7 et 0,9 MΩ). Le volume de solution dans la pipette, fixé à 8 μL, permet une bonne qualité d'enregistrement tout en ne diluant pas excessivement les ARNm présents dans le cytoplasme.

### **3. Biologie moléculaire**

Le contenu cytoplasmique est rapidement éjecté dans un tube Eppendorf® (Biopur, Eppendorf, Hamburg, Allemagne), préalablement conservé dans la glace, contenant 1 μL de tampon Tris 200 mM pH 8,5, dans lequel sera réalisée la transcription inverse (Tableau 17). Le volume total récupéré varie entre 3,5 et 8 μL. Un mélange d'hexanucléotides aléatoires et les quatre dNTP sont ajoutés (Tableau 18). Le tube est chauffé à 65°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les structures secondaires des ARN et il est ensuite transféré immédiatement dans la glace pour une incubation de 2 minutes.

La transcriptase inverse (Superscript III, Europrim, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), l'inhibiteur de ARNases (RNaseOUT, Invitrogen) et le dithiothréitol (DTT) ont été préalablement aliquotés sous azote et conservés à -80°C pour les protéger de l'oxydation avec l'air. Le DTT et le MgCl<sub>2</sub> (cofacteur de nombreuses polymérases) sont nécessaires au bon déroulement des réactions enzymatiques. Ces composés sont ajoutés lors du passage dans la glace. Le tube sera ensuite maintenu à 25°C pendant 10 minutes pour permettre l'appariement des hexanucléotides qui serviront d'amorces à la transcription inverse. La polymérisation de l'ADNc est réalisée à 45°C pendant 55 à 60 minutes. Les enzymes seront ensuite inactivées par 5 minutes à 85°C. La dernière étape (incubation à 37°C, 20 minutes) consiste à dégrader

Transcription Inverse	Concentration initiale	Concentration voulue	Volume (μL)
Matrice	inconnue	inconnue	3,5 à 8
Tampon tris	200 mM	10 mM	1
dNTP + hexanucléotides	25 ng/μl d'hexanucléotides et 5mM de chaque dNTP		1
DTT	0,2 M	5 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	30 mM	5 mM	à déterminer
Enzymes (Superscript III + RNaseOUT)	200 UI/μL + 40 UI/μL	5 UI/μL + 1 UI/μL	1
Qsp H <sub>2</sub> O			20
ARNase H	2 UI/μL	0,05 UI/μL	0,5
PCR1 « multiplexe »			
Amorces	5 μM/amorce	0,6 μM	2,4
dNTP	10 mM	0,2 mM	2
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1mM	4
KOD	1 UI/μL	0,02 UI/μL	2
Tampon de l'enzyme	10X	1X	10
Qsp H <sub>2</sub> O			100
PCR2			
Matrice (1/200 à 1/500)	inconnue	inconnue	2
Amorces	5 μM/amorce	0,4 μM	1,6
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,4
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1mM	0,8
KOD	1 UI/μL	0,02 UI/μL	0,4
Tampon de l'enzyme	10X	1X	2
Qsp H <sub>2</sub> O			20

**Tableau 17**

Compositions et concentrations des produits de réaction de biologie moléculaire.

l'ARN fixé à l'ADN par la ARNase H (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, Californie) (Tableau 17).

Les ADNc synthétisés ont servis de matrice pour une réaction de PCR (Tableau 17). La première, dite en « multiplexe » est réalisée dans le même tube avec des couples d'amorces spécifiques ciblant (Tableau 18) :

- la  $\beta$ -tyramine hydroxylase (BTH), témoin de l'activité octopaminergique de la cellule testée ;
- l'actine, témoin d'une éventuelle contamination ADN génomique, les amorces utilisées étant de part et d'autre d'un intron ;
- le core et la région C terminale de *pSLO* (AF 452164) ;

Les PCR sont réalisées en conditions de démarrage dites « Hot start » (décrite ci-dessous). Par ailleurs, il a été choisi une ADN polymérase produite par *Pyrococcus kodakaraensis* : la KOD (Toyobo, Novagen®, EMD Biosciences, Darmstad, Allemagne). Elle est parmi les polymérases thermostables les plus efficaces et les plus fiables de part son domaine 3'-5' exonucléasique qui lui confert une activité de relecture (Mizuguchi et coll., 1999). La KOD a pour particularité d'être maintenue inactive par deux anticorps monoclonaux qui libéreront l'enzyme qu'après avoir été dénaturés par chauffage à 94°C. Ceci permet un démarrage à chaud (« Hot start ») qui évite une polymérisation non spécifique. Le programme du thermocycleur (Flexigen... ATGC) est fixé de la façon suivante : 94°C : 4 min ; 35 fois [94°C : 30s, 55°C : 30s, 72°C : 2 min] ; 72°C : 8 min.

Les produits de PCR sont purifiés avec le Kit PCR clean-up Gel extraction, Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel Hoerd, France). Ils servent de matrice à une deuxième PCR dans des tubes contenant des couples d'amorces internes spécifiques pour réamplifier les ADNc recherchés (Tableau 17 et 18). Le programme de cette seconde PCR est : 94°C : 4 min ; 35 fois [94°C : 30s, 60°C : 30s, 72°C : 30s] ; 72°C : 8min.

Les amplicons sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,7%, TAE) et purifiés (kit extract II) pour être sous-clonés dans le plasmide pCR®4-TOPO® (TOPO cloning kit for sequencing, Invitrogen). Le séquençage de dix clones par produits de PCR a été réalisé dans les deux sens par la société Genoscreen ou sur la plateforme Génopôle Ouest de Roscoff.

Cible		Séquence nucléotidique	Taille attendue
<i>pSlo</i> S0 à S5	PCR1	S 5'-CAAGGTCCGGAAATGGTGGTGC-3'	NV
		R 5'-CAGCAGGTGGATGATGCCGGCA-3'	
	PCR2	S 5'-GCCTTCGCTTTCCTGTGCTG-3'	480 pb
		R 5'-CATCAGACGCAATGCTCTGAG-3'	
<i>pSlo</i> Cterm	PCR1	S 5'-ACCGTGGGTTATGGTGATGT-3'	NV
		R 5'-ACCTGCAGACCTCCATTGTT-3'	
	PCR2 ASP1	S 5'-ACCGTGGGTTATGGTGATGT-3'	
		R 5'-CGACTCGTAGGTGATG-TGA-3'	
	PCR2 ASP2	S 5'-GAGGATGTGGATGTGGAGGT-3'	
		R 5'-CGTCAGGGTCTTGGCAGTA-3'	
	PCR2 ASP3	S 5'-CTAGCACCAGGGTTTTCCAC -3'	
		R 5'-ATCTCAATGGCCAGAAGCAG-3'	
	PCR2 ASP4/5	S 5'-CTGTAAAGCATGCCATGACG-3'	
		R 5'-ACCTGCAGACCTCCATTGTT-3'	
Actine	PCR1	S 5'-CTGACCCTTAAATACCCCATTTG-3'	NV
		R 5'-CACAATTTCTCGTTTCGGCGTG-3'	
	PCR2	S 5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3'	386 pb
		R 5'-GTAAAGCTGTAACCACGCTCAG-3'	
BTH	PCR1	S 5'-CAAGCATCACGTGGTGCAATAC-3'	NV
		R 5'-CATCTCTGATGTGTCGTGTGAAC-3'	
	PCR2	S 5'-CAAGCATCACGTGGTGCAATAC-3'	494 pb
		R 5'-TGAGTATGCCTTCCGTTGGC-3'	

Les amorces pSLO Cterm sont issues de Derst et al. 2003. Les amorces de l'actine ont été dessinées d'après la séquence reclonee au laboratoire. Les amorces de la  $\beta$ -tyramine hydroxylase (BTH) clonee au laboratoire par Quentin Coquerel master M1 ASB 2005-2006. S : amorce sens. R : amorce anti-sens (reverse). NV : non visualisé.

### Tableau 18

Séquences des amorces des réactions de polymérisation en chaîne.

## **E. Technique d'imagerie calcique sur DUM neurones isolés**

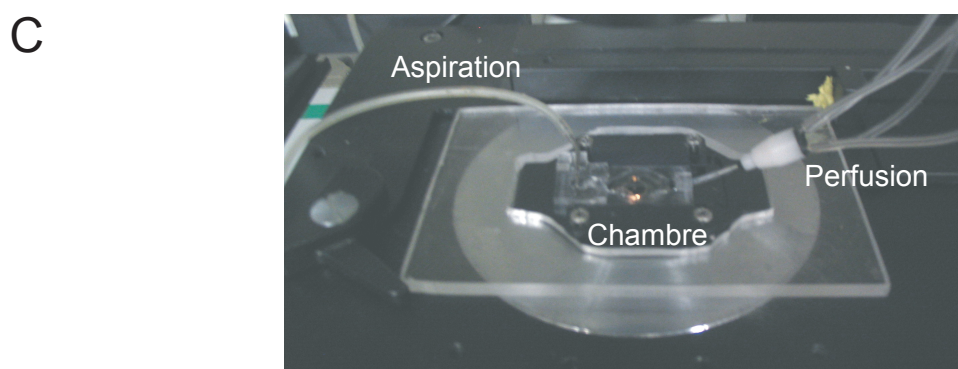
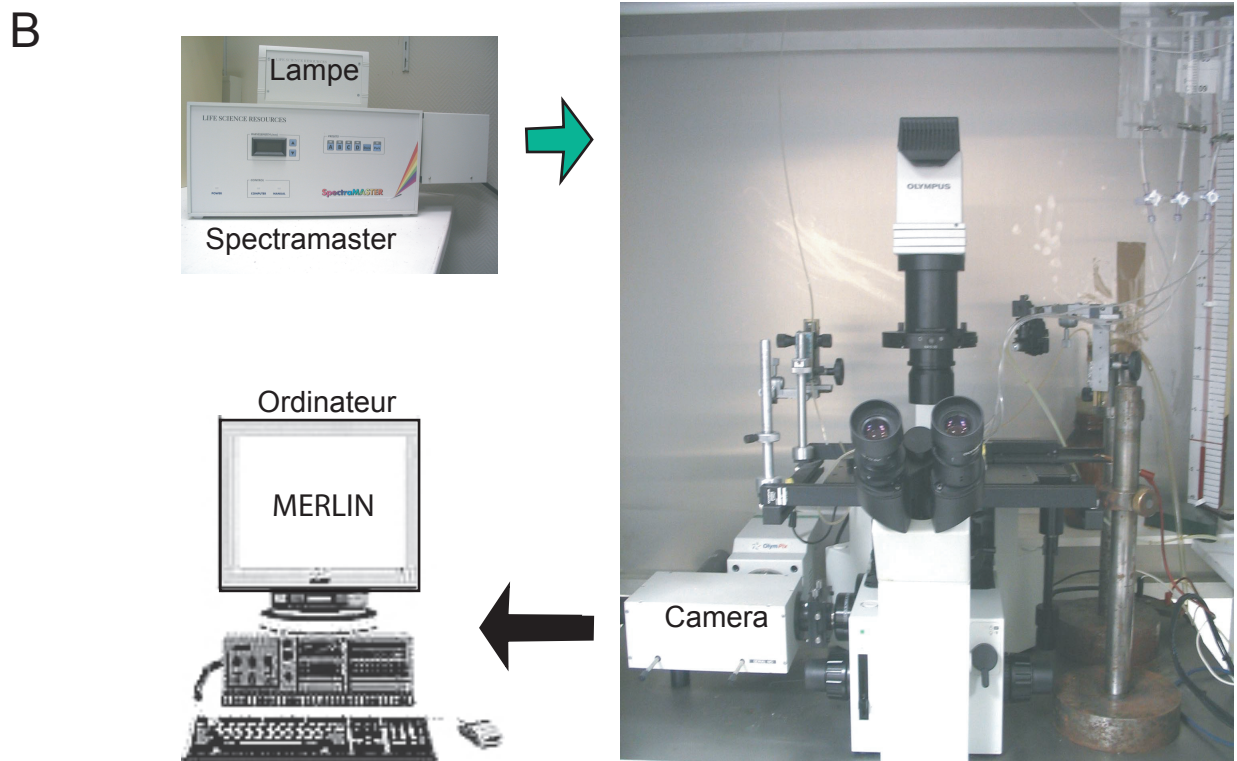
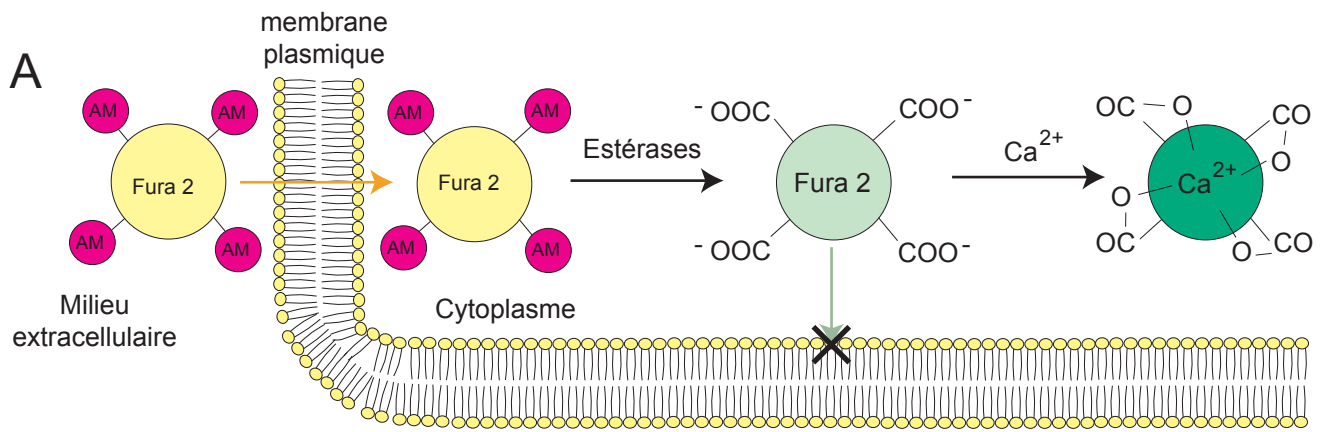
### **1. Principe de la technique**

La mesure de la concentration en calcium intracellulaire n'est possible qu'en utilisant des indicateurs qui se lient au calcium. De nombreux indicateurs sont disponibles et sont répartis en trois groupes : 1) les photoprotéines telles que les aequaporines qui sont des indicateurs luminescents, c'est-à-dire qu'elles émettent de la lumière lorsqu'elles sont liées au calcium. 2) les indicateurs dont la fluorescence d'excitation ou d'émission est modifiée lors de la liaison au calcium. 3) les protéines sensibles au calcium qui sont basées sur l'association entre une protéine fluorescente et la calmoduline (Brownlee, 2000).

Il existe plus d'une centaine d'indicateurs fluorescents qui sont très largement utilisés. Leur structure présente une forte homologie avec un chélateur du calcium tel le BAPTA et l'EGTA associé à un fluorophore (Brownlee, 2000).

De nombreux types cellulaires peuvent être chargés par une simple incubation avec la forme acétoxyméthylester (AM) des sondes fluorescentes. Sous cette forme, liposoluble, les molécules pénètrent dans la cellule où elles seront clivées en une forme hydrosoluble séquestrée dans le cytoplasme (Figure 25A).

L'indicateur utilisé pour les mesures de calcium intracellulaire sur les DUM neurones, le fura-2, permet de réaliser des mesures ratiométriques. Cette sonde est dite « double-excitation/simple-émission ». Lorsque la sonde est libre elle présente un maximum d'émission pour une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et lorsqu'elle est liée au calcium son maximum d'émission est pour une longueur d'onde de 380 nm. Dans les deux cas, la fluorescence émise est enregistrée à une longueur d'onde de 510 nm. Un rapport (R) est calculé entre les fluorescences émises à 340 nm et 380 nm. L'évolution de ce rapport permet de quantifier directement les variations de la concentration en calcium intracellulaire.



### Figure 25

A : Principe de l'utilisation d'une sonde acétoxy méthylée, exemple du fura 2. Lorsque la molécule de fura 2 est acétoxy méthylée (AM) elle est liposoluble donc elle traverse les membranes. Les estérases cellulaires vont cliver les résidus acétoxy méthyle ce qui rend le fura 2 hydrosoluble et le piège ainsi dans le cytoplasme. C'est sous cette forme que le fura 2 est à même de lier un ion calcium.

B : Dispositif expérimental pour l'enregistrement de la concentration en calcium intracellulaire.

C : Photographie de la chambre de perfusion positionnée sur la platine du microscope.



## **2. Dispositif expérimental**

Le protocole de dissociation cellulaire est le même que celui présenté précédemment pour les expériences de patch-clamp. Les DUM neurones sont cependant déposés sur des lames de verre recouvertes de poly-D-lysine afin de limiter les interférences entre le support et le faisceau lumineux.

Les cellules sont incubées dans du LP4 (tableau 13) contenant 10  $\mu$ M de Fura 2-AM et 0,5% d'acide pluronique, un détergent doux, pendant 90 min à 35°C, à l'obscurité, pour permettre la pénétration de la sonde dans les cellules. Les lames sont ensuite rincées trois fois dans du LP4 puis remises à incuber pendant 60 min pour permettre un clivage optimal de la sonde dans le cytoplasme. Cette étape est très importante car le clivage libère les groupements carboxyliques dont les oxygènes électronégatifs vont permettre le piégeage des ions calcium (Figure 25A). Trois rinçages sont ensuite réalisés avant que les lames ne soient montées dans une chambre d'enregistrement (Warner Instruments, Hamden, USA) (Figure 25C). Celle-ci est déposée sur la platine d'un microscope inversé (Olympus, IX50) et reliée à un système de perfusion gravimétrique (figure 25B). Les longueurs d'ondes d'excitation sont produites par une lampe au xénon (Life Sciences Resources Ltd, cambridge, GB) et sont sélectionnées par un système spectramaster (Life Sciences Resources) commandé par ordinateur. La fluorescence émise est captée par une camera CCD (Olympix FE250, Olympus). Le logiciel Merlin (version 2.0, Life Sciences Resources) permet de sélectionner les longueurs d'ondes, le temps d'exposition (150 ms), d'enregistrer les images et de mesurer en temps réel (le ratio est calculé toutes les 13,1 secondes) l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire (figure 25B).

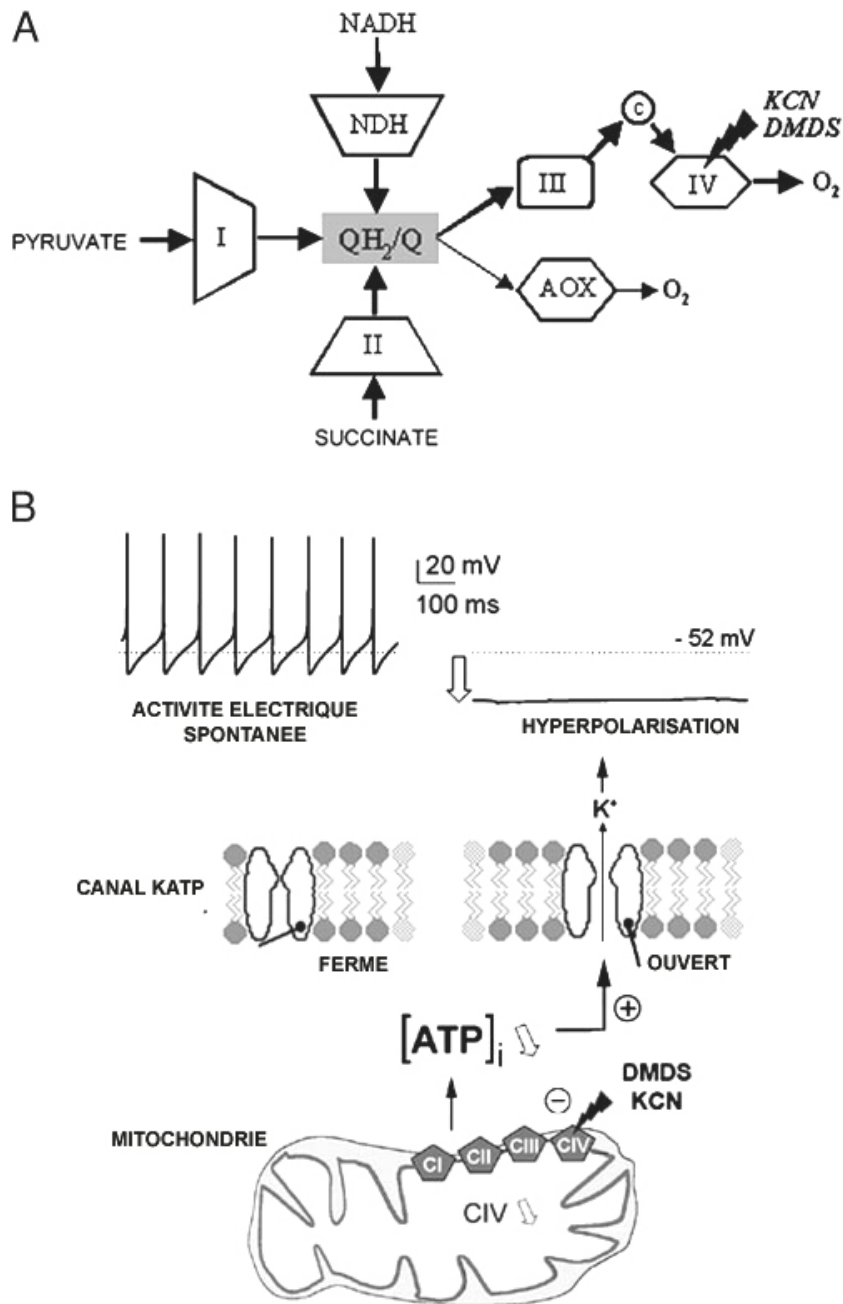
# CHAPITRE 3 - ETUDE DE L'EFFET D'UN NOUVEAU FUMIGANT, LE DMDS, SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE ET SUR LES COURANTS SODIUM DEPENDANTS DU POTENTIEL DE NEURONES D'INSECTE.

## **A- Position du problème**

Les potentialités du DMDS en tant que pesticide sont actuellement étudiées afin de le proposer comme fumigant pour le traitement des sols, en remplacement du bromure de méthyle. Cependant, jusqu'à récemment l'effet insecticide du DMDS n'avait jamais été réellement démontré. L'étude de Dugravot et coll. (2003) est la première à avoir montré que le DMDS pouvait avoir des propriétés insecticides neurotoxiques sur différentes espèces d'insectes comme *Callosobruchus maculatus* et son parasitoïde, l'hyménoptère *Dinarmus basalis* ainsi que la blatte *Periplaneta americana*.

Grâce à une approche multidisciplinaire, il a été possible de comprendre l'effet du DMDS à forte concentration et d'identifier la cible moléculaire de ce composé (Figure 26). En fait, le DMDS à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  agit directement sur le complexe IV de la chaîne respiratoire de la mitochondrie en inhibant l'activité de la cytochrome *c* oxydase (Figure 26A) (Dugravot et coll. 2003). Dans ces conditions, il se produit une diminution de la concentration en ATP intracellulaire. Cette diminution entraîne une activation de certains canaux ioniques, les canaux potassiques dépendants de l'ATP intracellulaire. Ces canaux couplent le métabolisme cellulaire à l'activité électrique (Ashcroft et Gribble, 1998; Inagaki et Seino, 1998). Ils sont fermés lorsque le ratio ADP/ATP est élevé et s'ouvrent quand ce ratio diminue. Dans ces conditions et en présence de DMDS, la réduction de la concentration en ATP active ces canaux potassiques. Il se produit alors une hyperpolarisation de la membrane associée à une perte de l'activité électrique neuronale (Figure 26B).

L'étude de Dugravot et coll. (2003) a également révélé une légère diminution de l'amplitude des potentiels d'action, associée à une réduction du courant sodium dépendant du potentiel, sans s'attarder sur ce phénomène. Cet autre effet du DMDS suggère un mode d'action plus complexe à des concentrations plus faibles. Afin de mettre en évidence d'autres effets du DMDS potentiellement masqués lors de l'application d'une forte dose (100  $\mu\text{M}$ ), il a été entrepris d'évaluer l'action de ce composé à des doses cent fois plus



**Figure 26**

**A** : Représentation schématique simplifiée du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire de mitochondrie végétale. I, II, III et IV représentent les quatre complexes de la chaîne respiratoire. NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite ; NDH : NADH déshydrogénase ; QH<sub>2</sub>/Q : ubiquinone ; AOX : oxydase alternative ; c : cytochrome c ; KCN : cyanure de potassium. Modifié d'après Dugravot et coll., 2003.

**B** : Représentation schématique de l'effet de l'inhibiteur du DMDS à forte concentration (100 μM) sur la cytochrome c oxydase d'un DUM neurone. A gauche : activité électrique spontanée enregistrée en condition contrôle, les canaux potassium dépendants de l'ATP (KATP) sont fermés. A droite : En présence de DMDS (100 μM), inhibiteur du complexe IV, la concentration intracellulaire en ATP diminue ce qui active les canaux KATP. L'ouverture des canaux KATP provoque une hyperpolarisation de la membrane et une perte de l'activité électrique. Modifié d'après Dugravot et coll., 2003.

faibles, soit 1  $\mu\text{M}$ , sur l'activité électrique spontanée des DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. Les canaux ioniques impliqués dans cette activité spontanée sont bien connus (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et coll., 2001) et toute modification de cette activité oriente le choix des cibles potentielles à étudier.

En plus du DMDS, nous nous sommes intéressés à deux autres molécules : l'isothiocyanate de méthyle (MITC) et le disulfure de diallyle (DADS). Le MITC est le métabolite actif du dazomet et du métam-sodium, deux produits déjà commercialisés (Ruzo, 2006). Le DADS est un composé soufré volatil libéré par les *Allium* doué, comme le DMDS mais dans une moindre mesure, d'activités insecticide et fongicide (Arnault et coll., 2005). Nous avons étudié les effets du MITC, un autre fumigant, et du DADS, une molécule proche du DMDS, sur l'activité électrique des DUM neurones en comparaison à ceux observés avec le DMDS.

Cette comparaison nous a permis de souligner l'originalité de l'effet du DMDS avant d'étudier de façon plus précise son mode d'action sur neurones d'insectes.

Nous avons montré que le DMDS, utilisé à une concentration cent fois plus faible que Dugravot et ces collaborateurs, modifie la fréquence et le mode de décharge de l'activité spontanée et régulière des DUM neurones. Nous nous sommes ensuite intéressés, dans un premier temps, au courant entrant sodium dépendant du potentiel puisque celui-ci est connu pour être impliqué dans la genèse de l'activité électrique spontanée des DUM neurones (Lapied et coll., 1989; Lapied et coll., 1990; Grolleau et Lapied, 2000; Wicher et coll., 2001).

## **B- Présentation des résultats**

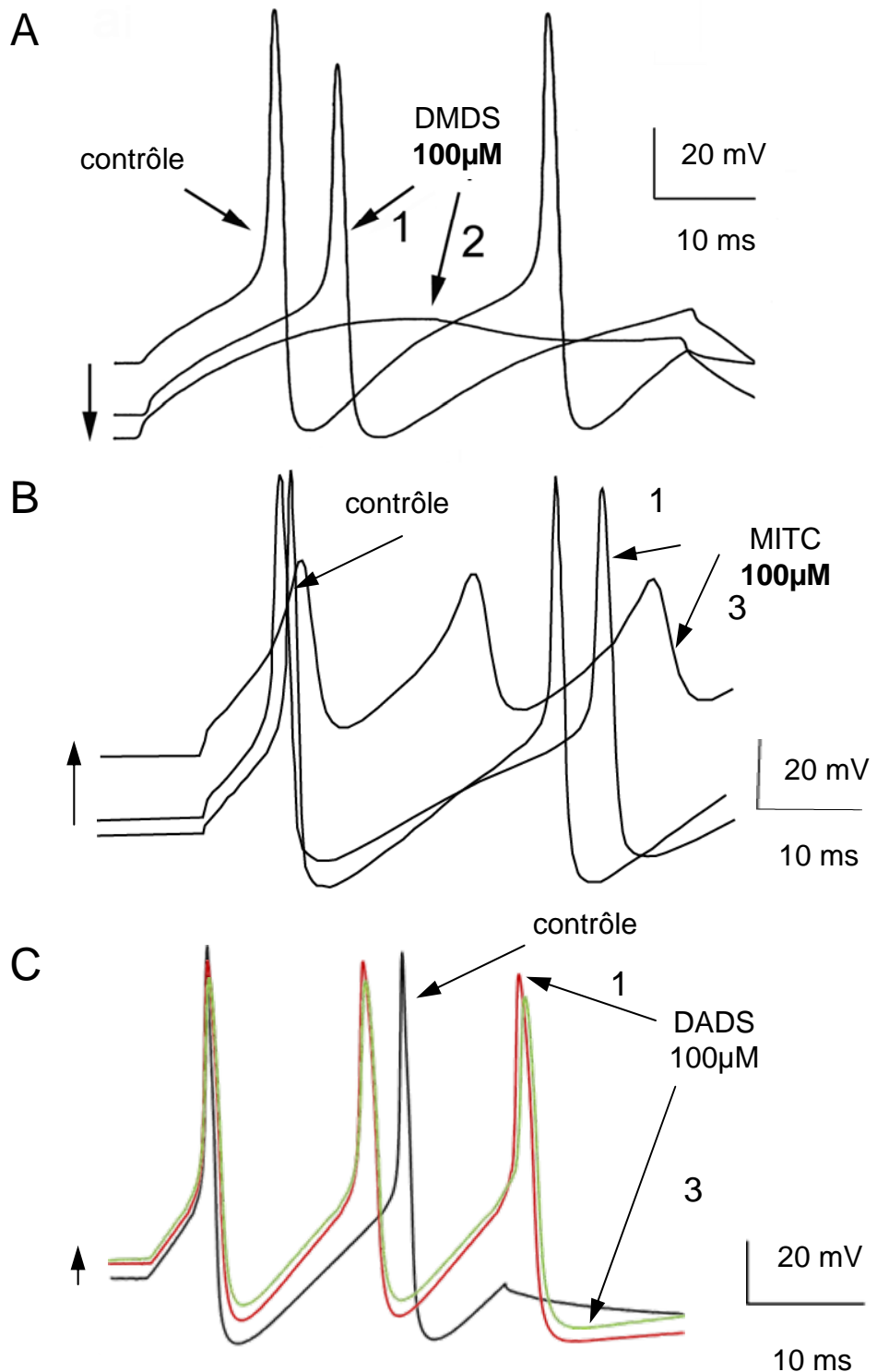
### **1- Comparaison des effets du DMDS, du MITC et du DADS sur l'activité électrique des DUM neurones**

Avant d'étudier plus en détails le mode d'action du DMDS à 1  $\mu\text{M}$ , nous avons réalisé une étude comparative de ses effets à forte et faible concentration avec deux autres molécules le MITC et le DADS.

Nous avons tout d'abord comparé les effets des trois molécules à 100  $\mu\text{M}$  sur potentiels d'action déclenchés (Figure 27). A partir des résultats obtenus, trois paramètres ont été mesurés à dix minutes d'application pour chaque composé : le potentiel de membrane, la post-hyperpolarisation et la durée à 50 % de l'amplitude du potentiel d'action (Figure 28).

Au contraire du DMDS, qui induit une hyperpolarisation de  $9,25 \pm 2,5$  mV ( $n=5$ ,  $p=0,0385$ ), le MITC et le DADS induisent une dépolarisation du potentiel de membrane, de  $11,28 \pm 4,645$  mV ( $n=5$ ,  $p=0,0466$ ) et de  $10,33 \pm 2,578$  mV ( $n=4$ ,  $p=0,0214$ ), respectivement (Figure 27A et 28A). Pour le MITC, à vingt minutes d'application, la dépolarisation est encore plus marquée et s'accompagne d'une profonde altération du décours des potentiels d'action. Alors que la phase de post-hyperpolarisation est significativement réduite ( $p=0,0354$ ) par le DMDS, elle est peu ou pas affectée par le MITC et le DADS (Figure 27B et 28B). Le seul point commun aux trois molécules est l'augmentation de la durée des potentiels d'action, de façon significative pour le DMDS et le MITC ( $p=0,0138$  et  $p=0,0069$ , respectivement) (Figure 27C et 28C).

En résumé, à forte concentration, le DMDS induit une hyperpolarisation qui va, tout d'abord, réduire la fréquence des potentiels d'action puis provoquer une perte de l'activité électrique (Figure 27A). Le MITC ralentit la fréquence des potentiels d'action, dans un premier temps, puis provoque une forte dépolarisation qui modifie nettement les potentiels d'action : amplitude réduite, durée augmentée et fréquence plus élevée (Figure 27B). Le DADS induit des effets moins marqués que le DMDS et le MITC. Il induit une dépolarisation qui peut être à l'origine de la petite augmentation de fréquence observé et de la diminution de l'amplitude des potentiels d'action (Figure 27C). Pour conclure, les résultats obtenus indiquent clairement que le DMDS, à 100  $\mu\text{M}$ , agit de façon bien distincte par rapport au MITC et au DADS.



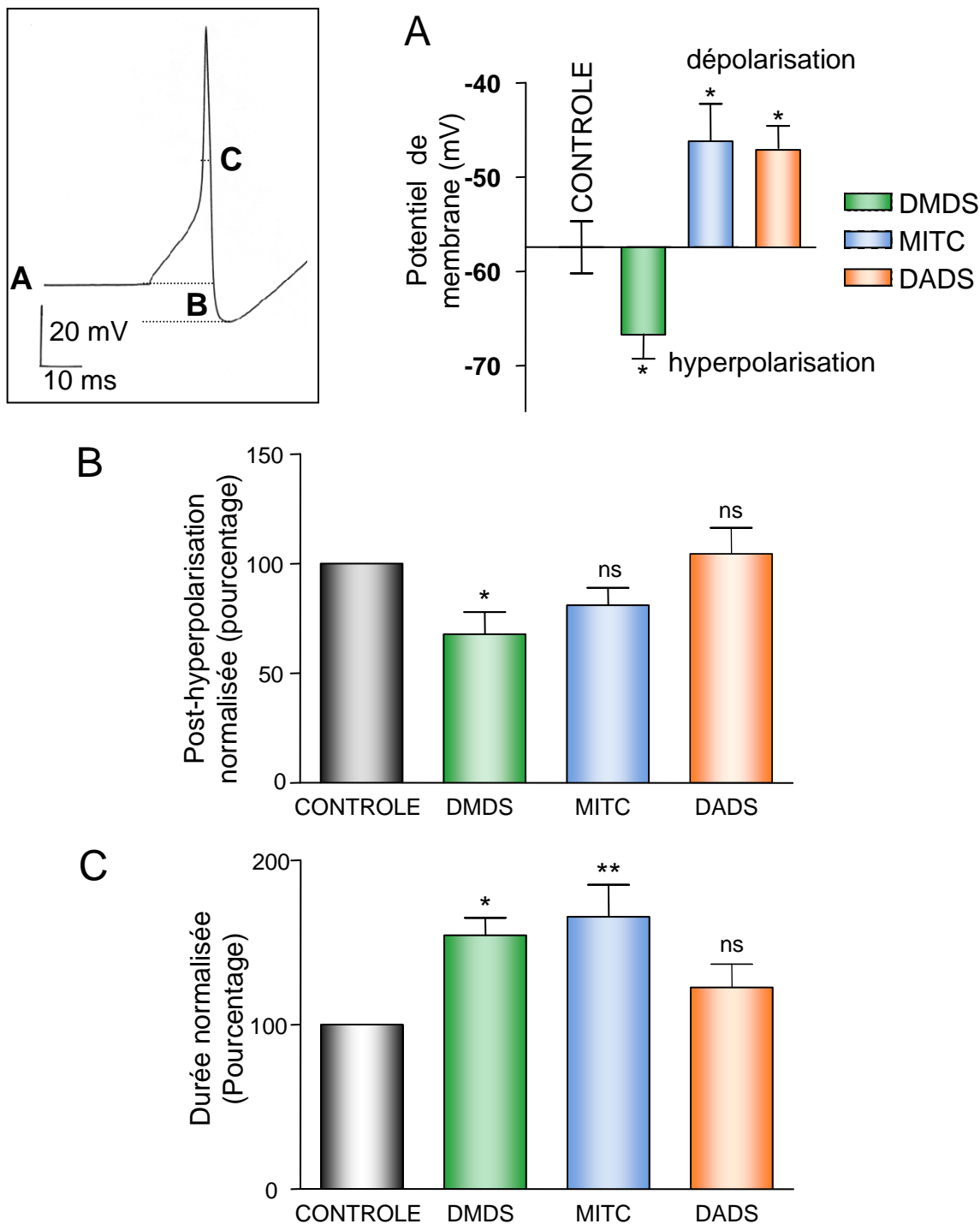
**Figure 27**

Comparaison des effets du DMDS, du MITC et du DADS à 100  $\mu\text{M}$  sur les potentiels d'action déclenchés (choc : 0,7 nA, 50 ms) de DUM neurones.

**A :** Superposition de potentiels d'action en condition contrôle et après 10 (1) et 16 minutes (2) d'application de DMDS. Modifié d'après Dugravot et coll., 2003.

**B :** Superposition de potentiels d'action en condition contrôle et après 10 (1) et 20 minutes (3) d'application de MITC.

**C :** Superposition de potentiels d'action en condition contrôle et après 10 (1) et 20 minutes (3) d'application de DADS.



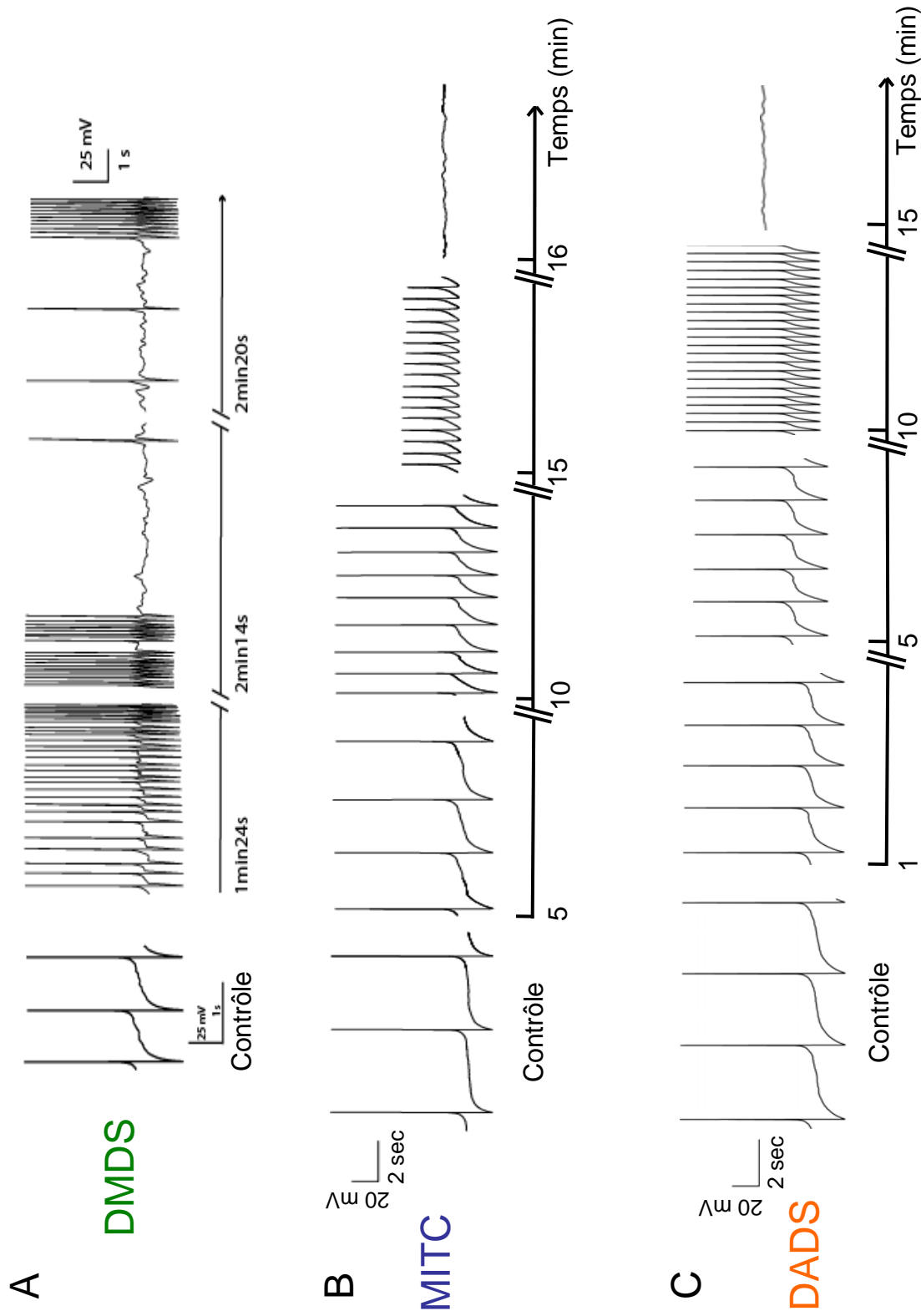
**Figure 28**

Comparaison des effets du DMDS, du MITC et du DADS sur le potentiel de membrane (A), l'amplitude de la post-hyperpolarisation (B) et la durée du potentiel d'action mesurée à 50% de l'amplitude (C).

**A** : Valeur du potentiel de membrane en condition contrôlée et après 20 minutes d'application de DMDS, de MITC et de DADS à 100  $\mu$ M.

**B** : Amplitude de la post-hyperpolarisation normalisée en fonction de l'amplitude contrôlée après 20 minutes d'application de DMDS, de MITC et de DADS à 100  $\mu$ M.

**C** : Durée du potentiel d'action à 50% de l'amplitude normalisée en fonction de la durée contrôlée après 20 minutes d'application de DMDS, de MITC et de DADS à 100  $\mu$ M.



**Figure 29**  
 Comparaison des effets du DMDS, du MITC et du DADS, à 1  $\mu$ M, sur l'activité électrique spontanée des DUM neurones, en fonction du temps d'application. **A** : Activité spontanée en conditions contrôle et lors de l'application de DMDS. **B** : Activité spontanée en conditions contrôle et lors de l'application de MITC. **C** : Activité spontanée en conditions contrôle et lors de l'application de DADS.



Dans un second temps, nous avons procédé à une comparaison des effets des trois substances sur l'activité spontanée des DUM neurones mais à une concentration cent fois plus faible (1  $\mu$ M).

Très rapidement après l'application (entre une à cinq minutes), le DMDS augmente la fréquence des potentiels d'action tout en modifiant considérablement le mode de décharge. En effet, le neurone passe d'un mode de décharge régulier à des bouffées de potentiels d'action, d'une durée comprise entre 5 et 45 secondes, séparées par des phases de silence (Figure 29A). Au fur et à mesure de l'application, la durée des bouffées de potentiels d'action diminue alors que les phases de silences sont de plus en plus longues. A partir de dix minutes d'application, l'activité électrique est alors constituée de très courtes bouffées de potentiels d'action (un à cinq potentiels d'action) qui apparaissent de manière aléatoire. A vingt minutes, le neurone s'hyperpolarise et n'a plus aucune activité spontanée.

Le premier effet du MITC, est une augmentation de la fréquence des potentiels d'action sans modification de l'amplitude dans un premier temps (Figure 29B). Cette augmentation est visible à partir de cinq minutes d'application mais n'est réellement marquée qu'à partir de dix minutes. Le mode de décharge des potentiels d'action n'est pas modifié par l'application de MITC. A partir de quinze minutes d'application, le neurone se dépolarise. Cette dépolarisation est associée à une augmentation de fréquence et à une forte diminution de l'amplitude des potentiels d'action dont le décours est très altéré, puis à une perte totale d'activité spontanée.

Très rapidement après le début de la perfusion de DADS (une à deux minutes), une légère augmentation de la fréquence des potentiels d'action est visible, sans modification du mode de décharge (Figure 29C). Une diminution de l'amplitude des potentiels d'action est également observée, mais elle n'est significative qu'à partir de cinq minutes d'exposition. A ce même temps le neurone présente un début de dépolarisation. A dix minutes, la fréquence des potentiels d'action augmente à nouveau. Cette augmentation induit par la suite une dépolarisation de la membrane qui aboutit à une mort neuronale.

En conclusion, tout comme à 100  $\mu$ M, à une faible concentration le MITC et le DADS agissent différemment du DMDS. Cette comparaison préliminaire avec un autre fumigant déjà commercialisé, le MITC, et le DADS (molécule de la même origine biologique que le DMDS), nous a permis de souligner la singularité du mode d'action du DMDS qui fait l'objet de la suite de ce manuscrit.

## **2- Action du DMDS sur l'activité spontanée des DUM neurones et sur le courant sodium dépendant du potentiel**

### **POSITION DU PROBLEME**

Nous avons précédemment montré que le DMDS à faible dose (1  $\mu\text{M}$ ) engendre des effets opposés à ceux révélés par Dugravot et ses collaborateurs (2003) à forte dose (100  $\mu\text{M}$ ). En effet, appliqué à 1  $\mu\text{M}$ , le DMDS augmente la fréquence de décharge des potentiels d'action et modifie le mode de décharge en bouffées d'hyperactivités espacées par des phases de silence. Dans un premier temps, nous avons testé si cette activité électrique irrégulière peut être contrecarrée par l'application d'un anti-épileptique, le lévétiracétam, commercialisé sous le nom de Keppra® (UCB Pharma, Bruxelles, Belgique). Dans un second temps, nous avons évalué l'effet du DMDS sur le courant sodium dépendant du potentiel qui est à la base de l'excitabilité neuronale pour chercher des réponses quant à l'origine de ces bouffées de potentiels d'action.

Les résultats obtenus font l'objet de la première moitié de la **publication n°1**, sous forme de chapitre d'ouvrage.

### **Publication n°1**

« Métabolites secondaires végétaux et fongiques à potentialités insecticides »

Hélène GAUTIER, Thomas GUILLEMETTE, Philippe SIMONEAU et Bruno LAPIED  
*Toxines et cancer*, Edité par Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M. et Marchot P.  
Rencontres en toxinologie, 2006, © LAVOISIER, Paris, p 285-294. ISBN : 2-7430-0958-6

# Métabolites secondaires végétaux et fongiques à potentialités insecticides

Hélène GAUTIER<sup>1</sup>, Thomas GUILLEMETTE<sup>2</sup>, Philippe SIMONEAU<sup>2</sup>, Bruno LAPIED<sup>1</sup>

1. Laboratoire RCIM UPRES EA 2647, UFR Sciences, 2 Bd Lavoisier, 49045 Angers cedex

2. UMR PaVé N°77- UFR Sciences 2 Bd Lavoisier 49045 Angers cedex

[bruno.lapied@univ-angers.fr](mailto:bruno.lapied@univ-angers.fr), tel : 02 41 73 54 38, fax : 02 41 73 52 15

## *Plant and fungal secondary compounds as potential insecticide agents*

### **Summary**

*Biotic interactions are the results of a long co-evolution process between hosts and pathogens. Sophisticated strategies have been developed by organisms to invade others or alternatively to protect themselves against invaders. Due to their structural and functional diversities, secondary metabolites represent major actors of the molecular cross talk between hosts and pathogens. Such molecules therefore constitute a potential source of natural compounds for insect control. We present here two types of secondary metabolites that may be used to develop biopesticides: sulfur-containing compounds from Allium species and depsipeptidic toxins synthesized by entomopathogenic fungi.*

## **Introduction**

Les modalités qui régissent les interactions biotiques résultent d'une longue co-évolution entre les parasites et leurs hôtes. Ainsi, certains organismes ont développé des stratégies élaborées pour agresser d'autres organismes qui, eux-mêmes, ont mis en place des systèmes de protection sophistiqués. Les métabolites secondaires, de par l'extrême diversité de leurs structures et de leurs propriétés biologiques, sont des acteurs incontournables de cette « course aux armements ». Ainsi les végétaux accumulent constitutivement (phytoanticipines) ou suite à un stress (phytoalexines) des composés de défense issus du métabolisme secondaire. De même, certains microorganismes synthétisent et sécrètent diverses molécules (toxines) souvent considérées comme des facteurs de virulence essentiels à l'expression de leur pouvoir pathogène. Dans ce contexte, il est tentant de puiser dans cet arsenal naturel pour trouver des substances à propriétés insecticides qui pourraient constituer une alternative aux molécules chimiques utilisées actuellement. Nous présenterons dans cet article deux exemples de métabolites secondaires pouvant servir de base au développement de tels biopesticides : les composés secondaires soufrés des alliacées et les toxines depsipeptidiques produites par certains champignons entomopathogènes.

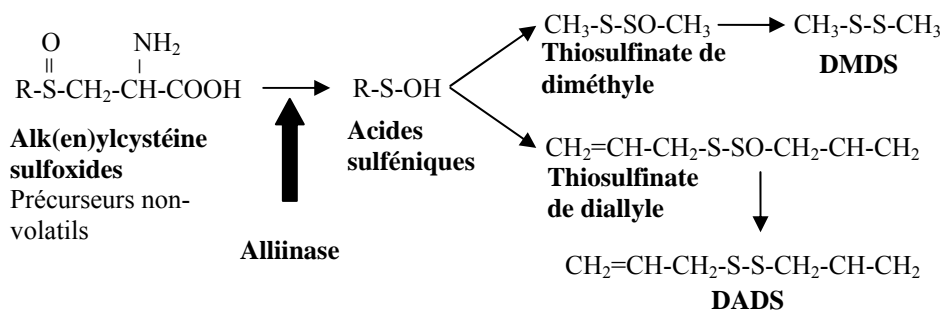
## **Les composés soufrés des alliacées**

Ces composés secondaires sont des substances allélochimiques qui agiraient comme des systèmes de défenses constitutifs directs. Le mode d'action de ces substances peut s'exercer de façon très diverses sur les insectes. Il est possible de distinguer des effets de ces substances végétales soit sur le système nerveux central (la nicotine) [21], soit sur le métabolisme de ces organismes (la roténone) [28] ou encore sur la croissance des insectes phytophages (l'azadirachtine) [16]. En plus de cette production constitutive de composés, les plantes ont également développé des systèmes de défense effectifs peu après le début de l'attaque pour répondre activement contre un insecte phytophage. Ainsi, les réponses des plantes peuvent être différentes qualitativement (production de composés de nature différente selon le traitement infligé) ou quantitativement (production de composés identiques mais qui varient dans leur concentration relatives) [6]. Les plantes ont donc développé au cours de l'évolution tout un arsenal de substances chimiques dont certaines pourraient faire l'objet d'application agronomique, en particulier dans la lutte contre les insectes ravageurs.

Parmi ces substances, les composés secondaires produits par les plantes de la famille des alliacées du genre *Allium* qui regroupe de nombreuses espèces cultivées comme le poireau, l'oignon, l'ail, sont des composés secondaires soufrés qui jouent un rôle important dans les processus de défense naturelle de la plante. Le poireau, par exemple, en plus des acides aminés habituels tels que la cystéine ou la cystine, est très riche en acides aminés

soufrés non protéiques tels que les alk(en)ylcystéine sulfoxides formés à partir de la cystéine et de l'acide glutamique [4]. Ces dérivés semblent très spécifiques des *Allium* [1] et constituent les précurseurs des substances volatiles soufrées. Lors de l'attaque d'un insecte phytophage, la destruction des cellules végétales (par brisure, par exemple) permet aux dérivés soufrés d'être mis en présence d'une enzyme située dans les vacuoles, l'alliinase (*figure 1*). Cette attaque enzymatique provoque après la coupure de la liaison C-S la synthèse d'une série de composés soufrés volatils [17], (*figure 1*) dont l'acide sulfénique qui forme après condensation des molécules des thiosulfinate symétriques ou mixtes. Ces thiosulfinate, instables, vont donner naissance aux disulfures par la perte de l'atome d'oxygène, comme par exemple le diméthyle disulfure ou DMDS dont l'étude du mode d'action fait l'objet de cet article. A l'heure actuelle, les potentialités du DMDS en tant que pesticide sont étudiées afin de le proposer comme fumigant pour le traitement des sols.

C'est dans ce contexte que des études ont été entreprises pour élucider le mécanisme d'action toxique de ce composé sur les insectes ravageurs. Le modèle biologique utilisé, la blatte mâle *Periplaneta americana* est un insecte que se prête particulièrement à ce type d'investigations [13]. D'élevage très peu coûteux, il permet d'avoir des spécimens en abondance et à tout moment dans l'année. Les structures physiologiques (nerveuses, par exemple) sur lesquelles ont été effectuées les expériences sont parfaitement identifiées et permettent une adaptation rapide et facile aux techniques d'investigations les plus modernes (électrophysiologie, biologie moléculaire, toxicologie et pharmacologie). A quelques exceptions près, les mécanismes cellulaires et moléculaires chez l'insecte sont très proches de ceux des vertébrés. Le modèle neuronal utilisé qui a permis de mieux comprendre l'effet insecticide neurotoxique du DMDS correspond à une population de cellules neurosecrétrices aminergiques, les « Dorsal Unpaired Median » (DUM) neurones. Ces neurones sont caractérisés par une activité électrique spontanée qui résulte de la combinaison séquentielle de différents canaux ioniques transmembranaires qui s'activent et s'inactivent de façon cyclique, imposant une instabilité permanente du potentiel de membrane [8,29].



**Figure 1.** Réaction enzymatique permettant la biosynthèse des substances volatiles soufrées comme par exemple le DMDS à partir des alk(en)ylcystéine sulfoxides chez les *Allium*.

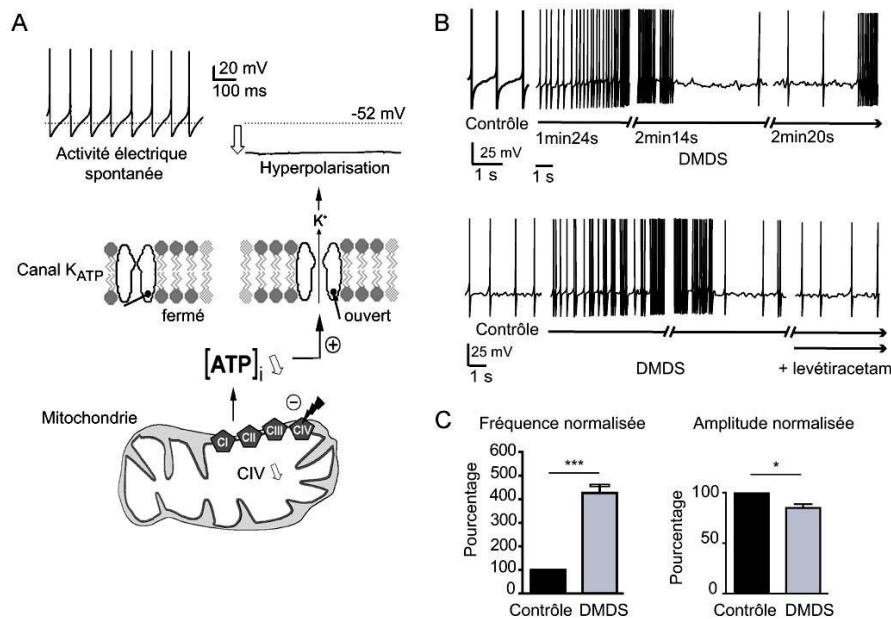
**Figure 1.** Enzymatic reactions involved in the biosynthesis of *Allium* volatil sulfur compounds such as DMDS from sulfoxide alk(en)ylcystein

## Effets neurotoxiques du DMDS à forte concentration sur l'activité électrique de neurones d'insecte

Grâce à une approche expérimentale complémentaire associant l'électrophysiologie (patch clamp), l'oxymétrie et la spectrophotométrie, il a été possible de caractériser un des effets neurotoxiques du DMDS. Appliqué à une forte concentration (100 μM), le DMDS induit une hyperpolarisation du potentiel de membrane des neurones d'insecte couplée à une disparition de l'activité électrique. La diminution de la résistance membranaire, due à l'augmentation d'une conductance ionique, induite par le DMDS a orienté les hypothèses vers l'activation d'un courant potassium de repos. L'application de gibenclamide et de tolbutamide [14] a confirmé l'implication des canaux potassium dépendants de l'ATP dans l'effet du DMDS. L'ATP intracellulaire semblait donc correspondre à une cible directe et/ou indirecte de ce composé soufré. L'oligomycine (un inhibiteur de l'ATPase mitochondriale) et le 2,4-dinitrophénol (un agent découplant) produisant un effet identique au DMDS, a conforté l'hypothèse d'une diminution de la concentration en ATP intracellulaire à l'origine de la neurotoxicité. Enfin, des mesures de la respiration cellulaire réalisées à la fois sur des cellules d'insectes et sur des mitochondries purifiées de pois ont démontré que le DMDS produit un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par une inhibition du complexe IV [7]. Il se produit alors une diminution de la production d'ATP intracellulaire mitochondrial. Cette diminution active les canaux potassium dépendants de l'ATP intracellulaire [15] qui induit l'hyperpolarisation et la perte d'activité électrique observées en présence de DMDS (*figure 2A*) [7].

## Effets neurotoxiques du DMDS à faible concentration sur l'activité électrique de neurones d'insecte

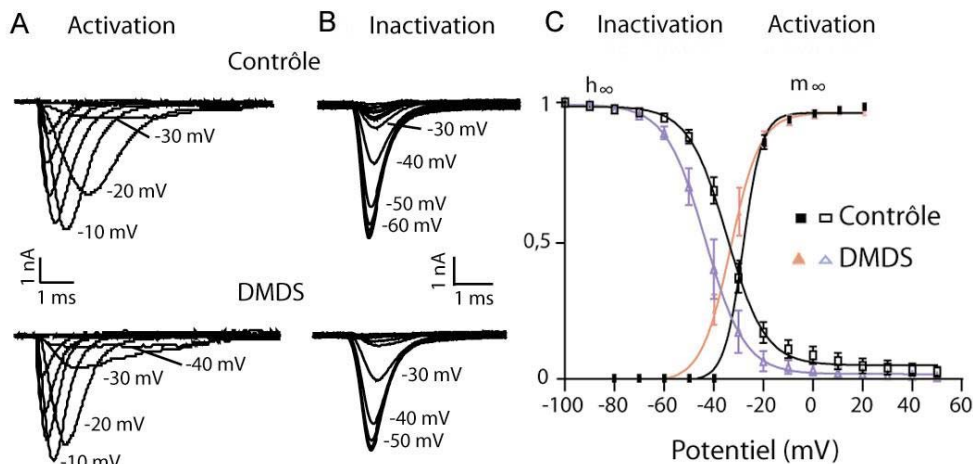
Le DMDS appliqué à une concentration 100 fois plus faible ( $1\mu\text{M}$ ) induit une légère dépolarisation des DUM neurones associée à une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action (*figure 2B et C*). Au cours d'une application prolongée, cette activité paroxystique observée diminue et laisse place à une activité électrique générée par bouffée de potentiel d'action séparée par des phases de silence. L'application d'un anti-épileptique, le levétiracetam permet de bloquer l'effet du DMDS (*figure 2B*).



**Figure 2** A Représentation schématique de l'effet du DMDS utilisé à forte concentration ( $100\mu\text{M}$ ) sur l'activité électrique spontanée des DUM neurones (d'après [7]). B : Effets du DMDS à faible concentration ( $1\mu\text{M}$ ) sur l'activité électrique spontanée d'un DUM neurone. Cet effet est inhibé en présence d'un agent anti-épileptique le levétiracetam. C : Histogrammes comparatifs des effets du DMDS utilisé à  $1\mu\text{M}$  sur la fréquence de décharge et l'amplitude des potentiels d'action.

**Figure 2 A :** Scheme summarizing the main effects of high concentration of  $100\mu\text{M}$  DMDS on DUM neuron electrical activity (from [7]). **B :** Effects of low concentration of DMDS ( $1\mu\text{M}$ ) on spontaneously active DUM neuron. This effect was completely inhibited after pretreatment with the anti-epileptic drug, levetiracetam. **C :** Comparative histogram illustrating the effects of  $1\mu\text{M}$  DMDS on both action potential amplitude and firing frequency.

A partir de ces observations, l'implication des canaux sodium dépendants du potentiel a été fortement suspectée. Dans des conditions de potentiel imposé et en présence des différents inhibiteurs des canaux potassium et calcium [20], il est possible d'isoler le courant sodium impliqué dans l'activité électrique spontanée des DUM neurones [8]. Dans des conditions contrôles, l'application d'échelons de potentiel dépolarisants permet de générer une famille de courants entrants sodium qui s'activent et s'inactivent (*figure 3A*). Parce que le DMDS ne modifie pas de façon significative l'amplitude du courant sodium, l'effet de ce composé a été étudié sur les propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable. Alors que la courbe d'activation à l'état stable (m) est obtenue à partir de l'équation classique d'Hodgkin-Huxley, la dépendance vis à vis du potentiel des paramètres d'inactivation (h) est étudiée par la technique de la double impulsion, test et conditionnante [20] (*figure 3B et C*). L'amplitude du courant entrant normalisé par rapport au maximum est portée en fonction de l'amplitude de l'impulsion conditionnante. La courbe représentant l'inactivation du canal sodium en fonction du potentiel est obtenue grâce à l'utilisation de l'équation de Boltzmann [20]. Le recouvrement des courbes d'activation et d'inactivation permet de définir une «fenêtre» qui s'étend dans une gamme de potentiel très précise (dans des conditions contrôles de  $-40\text{ mV}$  à  $+10\text{ mV}$ ) (*figure 3C*), fenêtre dans laquelle les canaux sodium conduisent à l'état stable, c'est à dire qu'ils ne s'inactivent pas. En présence de DMDS à  $1\mu\text{M}$ , la dépendance vis à vis du potentiel des paramètres d'activation et d'inactivation n'est pas modifiée (*figure 3C*). Par contre, il est observé un déplacement de cette fenêtre de recouvrement des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (entre  $-10\text{ mV}$  et  $-55\text{ mV}$ ).



**Figure 3.** Effets du DMDS sur les propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable du courant entrant sodium des DUM neurones.  
**Figure 3.** Effects of DMDS on steady state activation and inactivation parameters of the DUM neuron inward sodium current

La conséquence immédiate d'un tel effet est de rendre le neurone plus excitable, ce qui se traduit par une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action (*figure 2B*).

## Les cyclodepsptides fongiques

Les champignons entomopathogènes peuvent produire divers métabolites qui participent à l'expression de leur pouvoir pathogène vis-à-vis de leurs hôtes. Plusieurs de ces métabolites correspondent à des dérivés peptidiques comme par exemple la beauvericine et la destruxine produites par respectivement *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*. L'utilisation de ces champignons pour la lutte contre les insectes n'est pas récente puisque dès 1879 *M. anisopliae* a été testé dans des expérimentations visant à contrôler *Anisoplia austriaca*. Le spectre d'hôte de cette espèce est très large puisque environ 200 espèces d'insectes peuvent être infectées par ce champignon. Divers bioinsecticides à base de *B. bassiana* et *B. brongnartji* sont aussi *actuellement* utilisés pour lutter contre la pyrale du maïs et le ver blanc. De plus, l'utilisation de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* contre la transmission du paludisme est *également* en cours d'investigation. Du fait de l'intérêt croissant de ces champignons dans le cadre de la lutte biologique contre les insectes parasites des cultures, nous présentons dans cette seconde partie une mise au point sur les connaissances actuelles concernant les toxines qu'ils produisent.

## Structures chimiques et organismes producteurs

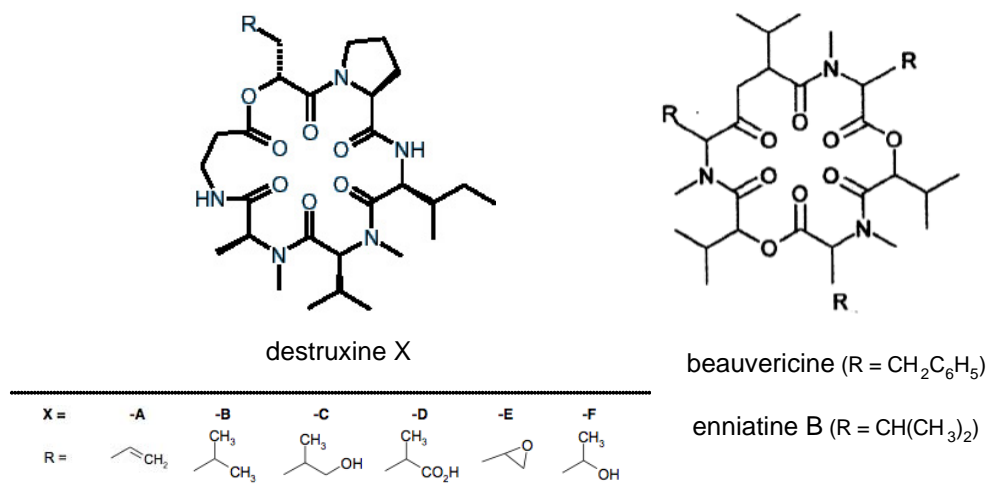
Les deux premières destruxines ont été identifiées en 1961 [19] et ont été nommées destruxines A et B. L'appellation « destruxine » provient de l'espèce *Oospora destructor* (rebaptisée depuis *Metarhizium anisopliae*) à partir de laquelle ces deux métabolites ont été initialement isolés. Depuis, plus d'une trentaine de composés naturels différents ont été recensés au sein de cette famille métabolique. La plupart des destruxines sont synthétisées par *M. anisopliae*, mais d'autres organismes producteurs ont été identifiés tel que le champignon phytopathogène *Alternaria brassicae*. Les molécules appartenant à la famille des destruxines sont des composés cycliques de type depsipeptide car constitués par 5 acides aminés et un  $\alpha$ -hydroxy-acide (HA). Leur formule générique est : cyclo-(-HA-prolyl-isoleucyl-N-méthyl-Valyl-N-méthyl-alanyl- $\alpha$ -alanyl-). Les structures des différentes destruxines varient entre elles principalement par la nature de l'hydroxy-acide et des radicaux R portés par les différents acides aminés [24]. A titre d'exemple les destruxines A-E présentent une séquence identique de 5 acides aminés et ne diffèrent entre eux que par le radical porté par le résidu hydroxylé. (*figure 4*).

La beauvericine est également un hexadepsipeptide cyclique mais de structure plus répétitive que les destruxines puisqu'elle est constituée par l'alternance de 3 résidus N-méthyl-phénylalanine avec 3 acides  $\alpha$ -hydroxy-isovalérique (Hiv) (*figure 4*). Ce composé a été à l'origine isolé à partir du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* [10]. Il a depuis été détecté chez plusieurs autres champignons dont des

espèces phytopathogènes du genre *Fusarium*, qui affectent des cultures de première importance au niveau économique. Ainsi, ces mycotoxines pourraient intégrer la chaîne alimentaire et être à l'origine d'effets encore peu étudiés sur la santé animale et humaine.

## Purification, synthèse et biosynthèse

Plusieurs méthodes ont été décrites pour isoler les destruxines à partir des filtrats de culture de *M. anisopliae*, la plupart utilisent des extractions à base de dichlorométhane suivies de séparations par HPLC avec une phase stationnaire de type RP-C18 et une phase mobile acetonitrile-H<sub>2</sub>O. Les quantités produites pour chaque destruxine sont très variables en fonction des isolats étudiés. Ainsi, une étude réalisée sur 39 souches de *M. anisopliae* [18] montre que certaines produisent de 5 à 10 µg de destruxine A et E par mg de poids sec alors que ces deux molécules sont indétectables chez d'autres isolats. Outre cette variabilité intra-spécifique naturelle, certains auteurs ont employé des traitements mutagènes (rayonnements ultraviolets, éthyl méthane sulfonate) sur *M. anisopliae* pour augmenter les quantités de destruxines produites [12]. La composition du milieu de culture du champignon semble également influencer les niveaux de production, toutefois les résultats publiés à ce sujet sont contradictoires et les conditions optimales restent difficiles à établir. Malgré ces efforts d'optimisation et de sélection de souches hyper-productrices, les quantités isolées sont généralement faibles. Plusieurs méthodes permettant de synthétiser *in vitro* ces composés ont été décrites [24]. Ces synthèses, qui conduisent à des quantités significativement plus importantes de toxine pure, sont généralement réalisées par couplage séquentiel des acides aminés et des hydroxy-acides pour former une molécule linéaire qui est ensuite cyclisée.

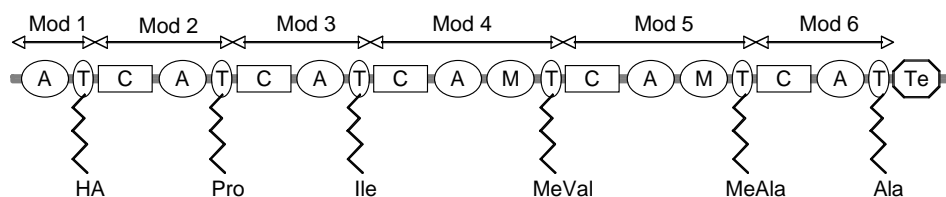


**Figure 4.** Structures chimiques des principales destruxines, de la beauvericine et de l'enniatine B.

**Figure 4.** Chemical structures of the most common destruxin derivatives, the beauvericin and the enniatin B.

Malgré l'intérêt porté à ces molécules potentiellement insecticides, relativement peu d'information est disponible concernant leur biosynthèse. D'une manière générale, les microorganismes sont capables de produire de nombreux peptides qui possèdent de larges spectres d'activités biologiques et qui peuvent être classés en deux groupes distincts selon leur mode de synthèse. Certains sont produits à la suite de modifications post-transcriptionnelles et protéolytiques de précurseurs peptidiques issus de la voie ribosomique. La grande majorité est cependant synthétisée par une voie non ribosomique par le biais de protéines multifonctionnelles appelées peptide synthétases (NonRibosomal Peptide Synthetase, NRPS) [23]. Il apparaît ainsi probable que la synthèse des destruxines est réalisée par ces protéines qui ont en commun une organisation modulaire. Chaque module d'environ 600 acides aminés est défini comme une unité semi-autonome à l'intérieur de la NRPS portant toutes les informations nécessaires à la reconnaissance, l'activation par adénylation, la modification éventuelle (méthylation, épimérisation) et l'incorporation de l'un des résidus dans le peptide final. Bien que pouvant fonctionner de façon indépendante, les différents modules d'une même NRPS doivent agir de concert pour permettre la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés pris en charge par des modules voisins et ainsi permettre l'extension du peptide [23]. Plusieurs études ont été réalisées pour isoler le gène codant la destruxine synthétase chez *M. anisopliae* et chez *A. brassicae* [2,9]. Toutefois dans les deux cas, les peptides synthétases codées par les gènes identifiés ne correspondent vraisemblablement pas à la destruxine synthétase. En effet, l'analyse bioinformatique des séquences protéiques déduites de ces deux gènes révèle des organisations modulaires différentes de l'organisation théorique de cette enzyme (*figure 5*). D'autre part, il a récemment été

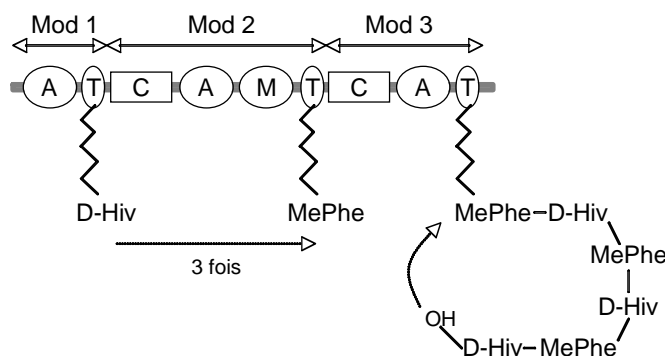
montré que la disruption du gène isolé chez *M. anisopliae* n'a pas d'incidence sur la production de destruxine [22].



**Figure 5.** Structure potentielle de la destruxine synthétase (en considérant une initiation de la synthèse par l' $\alpha$ -hydroxy-acide (HA)). Chaque module d'une NRPS est constitué de domaines de condensation (C), d'adénylation (A), de thiolation (T) et éventuellement de méthylation (M). Un domaine de terminaison (Te) est généralement présent à l'extrémité C-terminale du dernier module et est impliqué dans le processus d'oligomérisation et de cyclisation lors de l'assemblage du peptide. A chaque module correspond un résidu constitutif du peptide final : HA, proline (Pro), isoleucine (Ile), N-méthylvaline (MeVal), N-méthylalanine (MeAla) et  $\beta$ -alanine (Ala).

**Figure 5.** Potential organization of the destruxin synthetase (by considering that chain extension is initiated with the  $\alpha$ -hydroxy acid (HA)). A minimal NRPS module consists of a condensation (C), an adenylation (A), a thiolation (T) and possibly a methylation (M) domain. A terminal (Te) domain is generally found at the C-terminal end of the last module and catalyzes release of the peptidic product by cyclization or oligomerization. Each module activates a residue which is constituent of the final synthesized peptide : HA, proline (Pro), isoleucine (Ile), N-methylvaline (MeVal), N-methylalanine (MeAla) and  $\beta$ -alanine (Ala).

Une NRPS de 250 kDa nommée beauvericine synthétase a été purifiée à partir de *B. bassiana* [25]. Ces auteurs ont montré qu'elle fonctionnait de façon similaire à la NRPS qui catalyse la synthèse de l'enniatine chez *Fusarium* spp. dont la structure est très voisine de celle de la beauvericine (figure 4). Par analogie avec les informations disponibles sur la synthèse de l'enniatine, la beauvericine synthétase est vraisemblablement constituée par deux modules, l'un catalysant l'incorporation de l'hydroxy-acide Hiv et l'autre permettant l'activation de la phénylalanine. Un domaine de méthylation est présent dans ce second module et permet la formation de N-méthyl-phénylalanine au cours de la synthèse du peptide. Cette enzyme fonctionne alors sur un mode itératif, chaque module étant utilisé 3 fois pour une synthèse du produit final complet (figure 6). D'une manière générale, il est intéressant de constater que toxines sont synthétisées par des champignons relativement éloignés d'un point de vue phylogénique et qui présentent des spectres d'hôtes et des niches écologiques assez différents. Ceci suggère l'existence d'un possible transfert horizontal des gènes codant ces toxines entre des champignons appartenant à des lignées évolutives différentes. La mise en évidence d'un chromosome surnuméraire potentiellement porteur du gène de la destruxine synthétase chez *M. anisopliae* semble confirmer cette hypothèse [27].



**Figure 6.** Structure potentielle de la beauvericine synthétase. Chaque module d'une NRPS est constitué de domaines de condensation (C), d'adénylation (A), de thiolation (T) et éventuellement de méthylation (M). Les deux premiers modules prennent en charge respectivement l'acide  $\alpha$ -hydroxy-isovalérique (Hiv) et la N-méthyl-L-phénylalanine (MePhe). Le dernier module est considéré comme un module d'attente qui assure l'oligomérisation et la cyclisation du métabolite final.

**Figure 6.** Potential organization of the beauvericin synthetase. A minimal NRPS module consists of a condensation (C), an adenylation (A), a thiolation (T) and possibly a methylation (M) domain. The modules 1 and 2 activate the  $\alpha$ -hydroxy-isovaleric acid (Hiv) and the N-methyl-L-phenylalanine (MePhe) respectively. The module 3 consists of a waiting module which is involved in cyclization and oligomerization of the final metabolite.



## Activités biologiques

*M. anisopliae* et *B. bassiana* sont les agents de la muscardine verte et blanche respectivement, ainsi nommées de par la couleur des conidies qui se développent sur les cadavres d'insectes. Après pénétration de la cuticule par les tubes germinatifs, le mycélium se développe à l'intérieur du corps de l'insecte provoquant sa mort. Leur pouvoir pathogène envers les insectes serait lié à la production de destruxine et de beauvericine. qui outre leur action insecticide et phytotoxique, possèdent une large gamme d'activités biologiques (antibiotique, antivirale, antitumorale et immunodépresseur) et donc un fort potentiel pour des applications d'ordre médicale. Toutefois, malgré de nombreux travaux, le rôle exact de ces toxines dans le processus d'infection des insectes reste à démontrer. Plusieurs études rapportent une corrélation entre la production *in vitro* de destruxines et le niveau de virulence des souches entomopathogènes testées [18]. Néanmoins, d'autres travaux montrent que des souches faiblement productrices demeurent virulentes suggérant l'implication d'autres composés dans le déterminisme du pouvoir pathogène. Il semble que les destruxines puissent être impliquées dans le processus infectieux soit directement en provoquant la mort de l'hôte, soit indirectement en supprimant les réactions de défense. Par exemple, l'application de destruxine A et E provoque des altérations morphologiques des plasmatocytes de *Galleria mellonella* [26]. D'autres cibles cellulaires des destruxines ont aussi été mentionnées. Elles agiraient notamment comme des inhibiteurs spécifiques et réversibles des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires (V-ATPases) [3]. Elles sont également suspectées d'agir sur la régulation des processus intracellulaires dépendants du calcium [11]. Au contact de l'insecte, elles provoquent initialement une paralysie attribuée à une dépolarisation musculaire liée à une ouverture des canaux calciques membranaires. Les destruxines présentent en effet des propriétés ionophoriques. Il a notamment été montré par modélisation moléculaire que deux molécules de destruxine A peuvent former un complexe avec le cation divalent Ca<sup>2+</sup> [11]. La beauvericine a également pour effet d'accroître la perméabilité des membranes aux ions, notamment par formation de complexes avec les cations (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>), et ainsi de modifier l'homéostasie ionique au niveau cellulaire. Comme pour les destruxines, sa toxicité serait liée à une augmentation des concentrations intracellulaires en Ca<sup>2+</sup> qui induirait le processus apoptotique [5].

## Références bibliographiques

- [1] Auger J., Thibout E., Substances soufrées des *Allium* et des crucifères et leurs potentialités phytosanitaires. In C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogène, C. Vincent (Eds), *Biopesticides d'origine végétale*, Tec & Doc, Paris, 2002, pp. 7-95.
- [2] Bailey A.M., M.J., Kershaw B.A., Hunt I.C., Paterson A.K., Charnley S.E., Reynolds J.M., Clarkson J., Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **173** (1996) 195-197.
- [3] Bandani A.R., Amiri B., Butt T.M., Gordon-Weeks R., Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes, *Biochim Biophys Acta* **1510** (2001) 367-77.
- [4] Block E., The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31** (1992) 1135-1178.
- [5] Chen B.F., Tsai M.C., Jow G.M., Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells, *Biochem Biophys Res Commun* **340** (2006) 134-139.
- [6] Dicke M., Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* (1999) 131-142.
- [7] Dugravot S., Grolleau F., Macherel D., Rochetaing A., Hue B., Stankiewicz M., Huignard J., Lapiéd B., Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect KATP channels, *J. Neurophysiol.* **90** (2003) 259-270.
- [8] Grolleau F., Lapiéd B., Dorsal unpaired median neurons in the insect central nervous system : Towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity, *J. Exp. Biol.* **203** (2000) 1633-1648.
- [9] Guillemette T., Sellam A., Simoneau P., Analysis of a nonribosomal peptide synthetase gene from *Alternaria brassicae* and flanking genomic sequences, *Curr Genet.* **45** (2004) 214-224.
- [10] Hamill R.L., Higgins C.E., Boaz H.E., Gorman M., The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*, *Tetrahedron Lett.* **49** (1969) 4255-4258.
- [11] Hinaje M., Ford M., Banting L., Arkle S., Khambay B., An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A, *Arch Biochem Biophys* **405** (2002) 73-77.
- [12] Hsiao Y.M., Ko J.L., Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultra-violet using HPLC method, *Toxicon* **39** (2001) 837-841.
- [13] Hue B., Callec J.J., in : I. Huber, E.P. Masler, B.R. Rao (Eds.) *Cockroaches as models for neurobiology : applications in biomedical research*, Boca Raton, Florida, CRC Press Inc., 1990, pp. 149-168.
- [14] Inagaki N., Gonoï T., Clement J.P., Wang C.Z., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S., A family of sulfoxylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive potassium channels, *Neuron* **16** (1996) 1011-1017.
- [15] Inagaki N., Seino S., ATP-sensitive potassium channels : structures, functions and pathophysiology, *Jpn. J. Physiol.* **48** (1998) 397-412.
- [16] Isman M.B., Neem insecticides, *Pestic. Outlook* **8** (1997) 32-38.
- [17] Jaillais B., Cadoux F., Auger J., SPME-HPLC analysis of *Allium* lacrymatory factor and thiosulfates, *Talanta* **50** (1999) 423-431.
- [18] Kershaw M.J., Moorhouse E.R., Bateman R., Reynolds S.E., Charnley A.K., The role of destruxins in the pathogenicity of *metarhizium*

- anisopliae for three species of insect *J Invertebr Pathol* **74** (1999) 213-23.
- [19] Kodaira Y., Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*, *Agric Biol Chem* **25**: (1961) 261-262.
- [20] Lapiéd B., Malécot C.O., Pelhate M., Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones, *J. Exp. Biol.* **151** (1990) 387-403.
- [21] Lauwerys R., Toxicologie professionnelle et intoxications industrielles, Masson, Paris 1990.
- [22] Moon Y.S., Krasnoff B., Donzelli D.G., Vandenberg J.D., Churchill A.C., Gibson D.M., Targeted disruption of e peptide synthetase gene in *Metarhizium anisopliae* has no effect on destruxins production or virulence against insects *Society for Invertebrate Pathology Annual Meeting*, **51** (2005)
- [23] Mootz H.D., Schwarzer D., Marahiel M.A., Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases, *ChemBiochem* **3** (2002) 490-504.
- [24] Pedras M.S., Irina L., Zaharia I., Ward D.E., The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity, *Phytochemistry* **59** (2002) 579-596.
- [25] Peeters H., Zocher R., Kleinkauf H., Synthesis of beauvericin by a multifunctional enzyme, *J Antibiot (Tokyo)* **41** (1988) 352-359.
- [26] Vilcinskas A., Matha V., Götz P., Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *J Insect Physiol* **43** (1997) 1149-1159.
- [27] Wang C., Skrobek A., Butt T.M., Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae*, *FEMS Microbiol Lett* **226** (2003) 373-378.
- [28] Weinzerl R., Botanicals insecticide, soaps and oils, In J.E. Rechcigl, N.A. Rechcigl (Eds.) *Biological Biotechnological control of insect pest*, Boca raton, Florida, 1998, pp. 101-121.
- [29] Wicher D., Walther C., Wicher C., Non synaptic ion channel in insect-basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles, *Prog. Neurobiol.* **64** (2001) 431-525.

## ***RESUME DES RESULTATS OBTENUS***

Dans un premier temps nous avons montré que l'application de lévétiracétam (Keppra®, UCB Pharma) contrecarre l'activité électrique irrégulière induite par le DMDS. Une telle modification de l'activité électrique des DUM neurones suggérait un effet sur le courant sodium dépendant du potentiel qui est responsable de la phase de dépolarisation des potentiels d'action (voir pour revues Grolleau et Lapied, 2000; Wicher et coll., 2001). Nous avons pu confirmer que le DMDS agit sur ce courant (Tableau 19 et 20, fond gris clair). Plus exactement, le DMDS ralentit la dépendance vis-à-vis du potentiel de la courbe d'activation avec une pente  $k$  légèrement plus lente et un décalage du  $V_{0,5}$  d'environ 5 mV vers des potentiels plus hyperpolarisés (Tableau 19, gris clair). De plus, la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation à l'état stable du courant sodium en présence de DMDS, montre un déplacement du  $V_{0,5}$  de l'ordre de 9 mV vers des potentiels plus négatifs, sans modification du facteur  $k$  (Tableau 20, gris clair).

Le recouvrement des courbes d'activation et d'inactivation délimite une « fenêtre » qui délimite une gamme de potentiels dans laquelle les canaux conduisent à l'état stable, c'est-à-dire qu'ils sont toujours fonctionnels. La conséquence d'un déplacement des deux courbes, donc de cette « fenêtre » vers des potentiels plus négatifs est de rendre la préparation neuronale beaucoup plus excitable. Cela se traduit par une augmentation de la fréquence des potentiels d'action.

Le déplacement de la « fenêtre » des canaux sodium conduisant à l'état stable par le DMDS peut donc être l'origine de l'augmentation de fréquence des potentiels d'action observée précédemment.

### **3- Différence de sensibilité des deux courants sodium au DMDS**

Depuis cette étude montrant l'effet du DMDS sur le courant sodium dépendant du potentiel, il a été possible de mettre en évidence la présence de deux courants sodium dépendants du potentiel (voir Annexes) (Lavialle-Defaix et coll., 2006).

Ces deux courants nommés INa1 et INa2 ont pu être différenciés grâce à leur sensibilité différente au L-glutamate, INa1 étant le courant sensible au L-glutamate. De plus, ces courants diffèrent également par leurs propriétés biophysiques (activation, inactivation et réactivation) et leurs mécanismes de régulation intracellulaire.

A partir de ces nouvelles données, nous avons voulu déterminer si le DMDS agit préférentiellement sur l'un des deux courants ou sur les deux. Nous avons donc prétraité la préparation avec du L-glutamate, permettant de bloquer INa1 et d'étudier la dépendance vis-à-vis du potentiel des paramètres d'activation et d'inactivation de INa2 isolé, avant d'appliquer le DMDS (Figure 30, tableau 19 et 20, fond blanc).

De même que pour le courant sodium global, le DMDS induit un décalage des courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable de INa2 vers des potentiels plus négatifs (Figure 30). Le déplacement du  $V_{0,5}$  de la courbe d'activation par le DMDS est le même pour le courant sodium global ( $4,96 \pm 0,5$  mV,  $n=8$ ) que pour INa2 ( $5,04 \pm 0,7$  mV,  $n=7$ ) (Tableau 19). De plus, le ralentissement de la pente  $k$  de la courbe d'activation sous DMDS est du même ordre de grandeur pour INa global et INa2 ( $1,34 \pm 0,4$  et  $1,26 \pm 0,5$  respectivement) (Tableau 19). Par ailleurs, les courbes d'inactivation à l'état stable de INa global et INa2 sont déplacées de  $8,71 \pm 0,5$  mV ( $n=8$ ) et de  $10,09 \pm 0,4$  mV ( $n=7$ ) (pas de différence significative,  $p=0,0546$ ), respectivement, sans modification de la pente dans les deux cas (Tableau 20).

Les résultats obtenus indiquent clairement que le DMDS modifie de façon identique le courant sodium global et le courant Na2 isolé, montrant que le DMDS agit spécifiquement sur le courant Na2.

	<b>Activation</b>			
	<b>V<sub>0,5</sub> (mV)</b>	<b>Différence</b>	<b>Pente (k)</b>	<b>Différence</b>
<b>INa global</b>	-28,44 ± 0,2 (n=8)	4,96 ± 0,5	4,57 ± 0,2 (n=8)	1,34 ± 0,4
<b>DMDS 1 μM</b>	-33,40 ± 0,3 (n=8)		5,91 ± 0,2 (n=8)	
<b>INa2 (Glu 10 μM)</b>	-32,84 ± 0,3 (n=7)	5,04 ± 0,7	6,17 ± 0,2 (n=7)	1,26 ± 0,5
<b>DMDS 1 μM</b>	-37,88 ± 0,4 (n=7)		7,43 ± 0,3 (n=7)	

**Tableau 19**

Comparaison de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation du courant sodium global (gris) et du courant Na2 (blanc) avant et après application de DMDS (1 μM).

	<b>Inactivation</b>			
	<b>V<sub>0,5</sub> (mV)</b>	<b>Différence</b>	<b>Pente (k)</b>	<b>Différence</b>
<b>INa global</b>	-34,73 ± 0,3 (n=8)	8,71 ± 0,5	-7,74 ± 0,2 (n=8)	0,23 ± 0,3
<b>DMDS 1 μM</b>	-43,44 ± 0,2 (n=8)		-7,97 ± 0,1 (n=8)	
<b>INa2 (Glu 10 μM)</b>	-38,09 ± 0,2 (n=7)	10,09 ± 0,4	-8,69 ± 0,2 (n=7)	-0,23 ± 0,3
<b>DMDS 1 μM</b>	-48,18 ± 0,2 (n=7)		-8,46 ± 0,1 (n=7)	

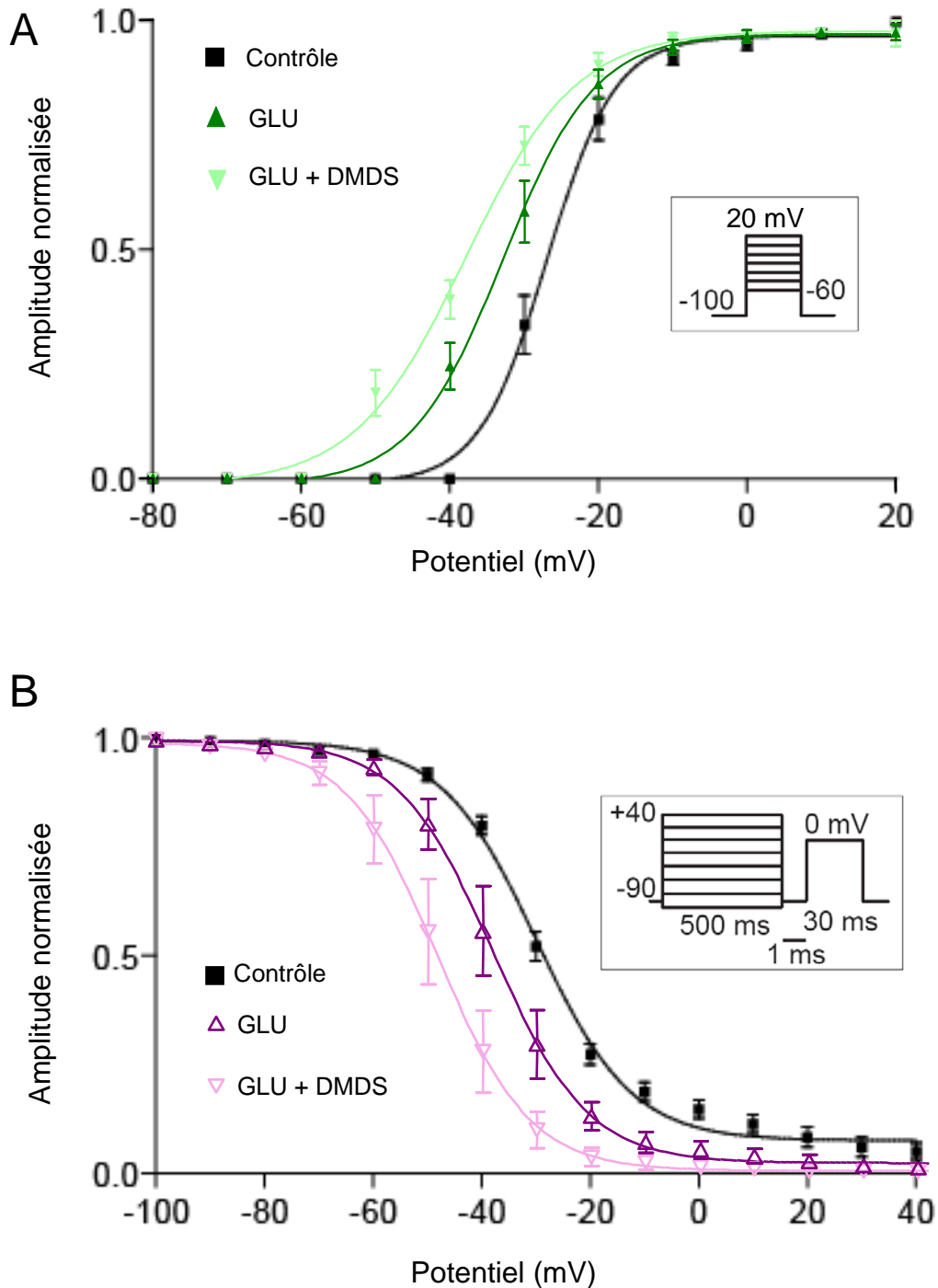
**Tableau 20**

Comparaison de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation à l'état stable du courant sodium global (gris) et du courant Na2 (blanc) avant et après application de DMDS (1 μM).

<b>Mode d'application du DMDS</b>	<b>Activation</b>		<b>Inactivation</b>	
	<b>extracellulaire</b> n=8	<b>intrapipette</b> n=7	<b>extracellulaire</b> n=8	<b>intrapipette</b> n=6
<b>V<sub>0,5</sub> (mV)</b>	-33,41 ± 0,3	-33,67 ± 0,3	-43,44 ± 0,2	42,25 ± 0,6
<b>Pente k</b>	5,91 ± 0,2	6,57 ± 0,2	-7,97 ± 0,1	-8,52 ± 0,5

**Tableau 21**

Comparaison de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation à l'état stable du courant sodium global selon le mode d'application du DMDS, à 1 μM, par la solution extracellulaire ou par la solution intrapipette.



**Figure 30**

**A** : Superposition des courbes d'activation du courant sodium global (contrôle) et du courant Na<sub>2</sub> (glutamate 10  $\mu$ M, GLU) avant et après application de DMDS 1  $\mu$ M (GLU + DMDS).

**B** : Superposition des courbes d'inactivation à l'état stable du courant sodium global (contrôle) et du courant Na<sub>2</sub> (glutamate 10  $\mu$ M, GLU) avant et après application de DMDS 1  $\mu$ M (GLU + DMDS).

## **C- Conclusions**

Le DMDS (1 $\mu$ M) modifie, dans les minutes qui suivent son application, la fréquence et le mode de décharge des DUM neurones. Un tel effet ne peut s'expliquer que par un mode d'action touchant plusieurs cibles. La première cible identifiée est le courant sodium global dépendant du potentiel et plus particulièrement INa2. Le DMDS déplace la fenêtre des courbes d'activation et d'inactivation dans laquelle les canaux conduisent à l'état stable vers des potentiels plus négatifs, ce qui rend les DUM neurones plus excitables. L'augmentation de fréquence suite à l'application du DMDS peut donc s'expliquer par ce déplacement.

Cependant, le mécanisme qui permet au DMDS d'agir reste encore incertain. Plusieurs hypothèses sont envisageables : une action directe sur le canal (par la face externe ou la face interne), une insertion du DMDS dans la membrane qui modifierai l'environnement autour des canaux (interaction lipides-protéines), un mécanisme d'action indirect tel l'implication d'un second messager ou d'une protéine capable de moduler le canal. D'après l'étude de Dugravot et ses collaborateurs (2003), le DMDS, à 100  $\mu$ M, pénètre à l'intérieur des cellules pour atteindre la cytochrome *c* oxydase et l'inhiber. L'effet du DMDS, à 1  $\mu$ M, sur la dépendance vis-à-vis du potentiel des propriétés d'activation et d'inactivation du courant sodium a été comparé selon le mode d'application : par la solution extracellulaire et par la solution intrapipette (Tableau 21). Aucune différence n'a été constatée. Le DMDS est donc capable, également à faible dose, de traverser ou de s'insérer dans la membrane.

A ce jour, nos données sont insuffisantes pour déterminer comment le DMDS agit sur le canal sodium. L'utilisation d'anticorps anti-DMDS pourrait montrer la distribution du DMDS dans les DUM neurones (sous-membranaire ou diffuse, par exemple) et apporter un élément de réponse. Il faudrait évaluer l'implication du calcium intracellulaire en étudiant les propriétés d'activation et d'inactivation de INa2 en présence de BAPTA (chélateur des ions calcium) et dans un deuxième temps en augmentant la concentration en calcium intracellulaire (Thèse Laviaille-Defaix, 2005).

## CHAPITRE 4 - ETUDE DE L'EFFET DU DMDS SUR LES COURANTS $K_{Ca}$ ET SUR LE CALCIUM INTRACELLULAIRE.

### NOUVEAUX ARGUMENTS EN FAVEUR DE DEUX COURANTS $IK_{Ca}$

#### **A- Position du problème**

L'étude des effets du DMDS sur l'activité spontanée des DUM neurones a montré la réduction d'une autre composante également essentielle dans la genèse de l'activité électrique. Il s'agit de la phase de post-hyperpolarisation dans laquelle participe le courant potassium dépendant du calcium ( $IK_{Ca}$ ) (Lapied et coll., 1989 ; Grolleau et Lapied, 1995 ; Grolleau et Lapied, 2000). La potentialisation de ce courant diminue la fréquence de décharge des potentiels d'action (Wicher et coll., 1994 ; Derst et coll., 2003 ; Heidel et Pflugger, 2006)

Les courants  $K_{Ca}$  sont également appelés BK pour « Big conductance  $K^+$  channel » ou Slo. La probabilité et la durée d'ouverture des canaux  $K_{Ca}$  sont dépendantes du potentiel et de la concentration en calcium intracellulaire. Au niveau pharmacologique, les courants  $K_{Ca}$  des DUM neurones sont sensibles, entre autres, au chlorure de cadmium, qui agit de façon indirecte en inhibant l'influx de calcium *via* les canaux calciques dépendants du potentiel, ainsi qu'à des toxines de scorpion comme la charybdotoxine et l'ibérottoxine qui agissent directement sur les canaux (Grolleau et Lapied, 2000 ; Derst et coll., 2003 ; Heidel et Pflugger, 2006).

L'action du chlorure de cadmium correspond à une diminution de la concentration en calcium intracellulaire *via* l'inhibition des canaux calciques. A l'inverse, d'autres substances, comme la neurohormone D, élèvent la concentration en calcium intracellulaire et induisent ainsi une augmentation du courant  $K_{Ca}$  (Wicher et Reuter, 1993; Wicher et coll., 1994). En modifiant la concentration de calcium intracellulaire, une substance peut donc être capable de moduler les courants  $K_{Ca}$ .

Derst et coll. (2003) ont montré, par des marquages immunologiques que les DUM neurones expriment les canaux pSlo et qu'il existe plusieurs variants d'expression (Asp1 à Asp5) identifiés dans le système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana*. Il est



possible que ses différents variants, présents dans la partie C-terminale du canal, soient épissés de deux façons différentes pour constituer deux types de canaux. La deuxième partie de ce chapitre est consacré à l'exposition de la mise en place au laboratoire d'une nouvelle technique, la RT-PCR sur cellule unique qui a permis d'identifier les variants exprimés spécifiquement dans les DUM neurones.

## **B- Présentation des résultats**

### **1- Effets du DMDS sur les courants $K_{Ca}$ et sur la concentration en calcium intracellulaire**

Les résultats obtenus font l'objet de la publication n°2 au « Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics », section « Neuropharmacology ».

#### **Publication n°2**

« Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide »

Hélène GAUTIER, Jacques AUGER, Christian LEGROS et Bruno LAPIED  
*J Pharmacol Exp Ther* (2008) **32**: 149-59

# Calcium-Activated Potassium Channels in Insect Pacemaker Neurons as Unexpected Target Site for the Novel Fumigant Dimethyl Disulfide

Hélène Gautier, Jacques Auger, Christian Legros, and Bruno Lapied

*Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur, Equipe d'Accueil 2647/Unité Sous Contrat Institut National de la Recherche Agronomique, Université d'Angers, Unité de Formation et de Recherche Sciences, Angers cedex, France (H.G., C.L., B.L.); and Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6035, Université François Rabelais, Faculté des Sciences, Parc de Grandmont, France (J.A.)*

Received July 16, 2007; accepted October 16, 2007

## ABSTRACT

Dimethyl disulfide (DMDS), a plant-derived insecticide, is a promising fumigant as a substitute for methyl bromide. To further understand the mode of action of DMDS, we examined its effect on cockroach octopaminergic neurosecretory cells, called dorsal unpaired median (DUM) neurons, using whole-cell patch-clamp technique, calcium imaging and antisense oligonucleotide strategy. At low concentration (1  $\mu$ M), DMDS modified spontaneous regular spike discharge into clear bursting activity associated with a decrease of the amplitude of the afterhyperpolarization. This effect led us to suspect alterations of calcium-activated potassium currents (IKCa) and  $[Ca^{2+}]_i$  changes. We showed that DMDS reduced amplitudes of both peak transient and sustained components of the total potassium current. IKCa was confirmed as a target of DMDS by using iberiotoxin, cadmium chloride, and pSlo antisense oligonucle-

otide. In addition, we showed that DMDS induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise in Fura-2-loaded DUM neurons. Using calcium-free solution, and (*R,S*)-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-isoquinoline-1-yl)-2-phenyl-*N,N*-di-[2-(2,3,4-trimethoxy-phenyl)ethyl]-acetamide (LOE 908) [an inhibitor of transient receptor potential (TRP) $\gamma$ ], we demonstrated that TRP $\gamma$  initiated calcium influx. By contrast,  $\omega$ -conotoxin GVIA (an inhibitor of N-type high-voltage-activated calcium channels), did not affect the DMDS-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise. Finally, the participation of the calcium-induced calcium release mechanism was investigated using thapsigargin, caffeine, and ryanodine. Our study revealed that DMDS-induced elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  modulated IKCa in an unexpected bell-shaped manner via intracellular calcium. In conclusion, DMDS affects multiple targets, which could be an effective way to improve pest control efficacy of fumigation.

Fumigants are gaseous pesticides that have numerous uses for the control of insects, protection of stored products, disinfestations, or quarantine in buildings and commodities, and as preplant soil treatment. In addition, fumigants have been used in management of public health pests such as flies and mosquitoes. Among volatile fumigants, phosphine (QUICKPHOS aluminum tablet) and methyl bromide have been widely used against a broad spectrum of pest (e.g., nematodes, fungi, insects, mites, rodents, weeds, and some

bacteria). However, phosphine has many drawbacks, including slow action and a rapid increase in insect resistance to this compound (Mills, 2001; Collins et al., 2002; Schlipalius et al., 2002). In the same context, methyl bromide has been mainly used as a quarantine treatment for plants and to control insect in buildings and commodities. However, methyl bromide is being phased out because of its role in ozone depletion. This prompts the Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer to eliminate this substance (Bell, 2000; UNEP 2000; Yates et al., 2003; Caddick, 2004). In addition to environmental concerns, there are serious questions regarding methyl bromide toxicology and risk assessment (Ruzo, 2006). Although the principal target site for methyl bromide seems to be the central nervous system, its precise mechanism of toxicity is

Financial support for this research was obtained through ARKEMA France. H.G. was supported by a doctoral fellowship of the Région Pays de la Loire. Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>. doi:10.1124/jpet.107.128694.

**ABBREVIATIONS:** IKCa, calcium-activated potassium current(s); DMDS, dimethyl disulfide; DUM, dorsal unpaired median; TAG, terminal abdominal ganglia; ASO, antisense oligonucleotides; LOE 908, (*R,S*)-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-isoquinoline-1-yl)-2-phenyl-*N,N*-di-[2-(2,3,4-trimethoxy-phenyl)ethyl]-acetamide; TRP, transient receptor potential; IbTx, iberiotoxin; BK, calcium-activated potassium channels of large conductance; HVA, high-voltage-activated; SK, calcium-activated potassium channels of small conductance; PP, protein phosphatase; 1,3-D, 1,3-dichloropropene.

unclear (Yang et al., 1995). Based on these findings, developed countries have agreed to a schedule of reductions. To date, the methyl bromide consumption in these countries is less than 12% of the baseline defined by consumption in 1991 (UNEP, 2006). Consequently, many chemicals [e.g., 1,3-D (TELONE II), chloropicrine (TELONE C-35, InLine), and metam-sodium, which is a recognized precursor to the formation of methyl isothiocyanate (VAPAM HL, BASAMID in soils)] and physical alternatives have been proposed as replacements for methyl bromide (Fields and White, 2002; Martin, 2003; Tomlin, 2003; Ruza, 2006; UNEP, 2006).

The important efforts spent in the past 10 years to develop and make available in the short term molecules that can successfully be applied to soil fumigation have been concentrated on ubiquitous natural products detected as metabolites in numerous biological processes. Among them, sulfur volatile compounds such as dimethyl disulfide (DMDS) (Auger et al., 1989), first suggested as a grain fumigant, is undergoing extensive studied for fungus, nematode, and also insect control in soil (Dugravot et al., 2003; Church and Rosskopf, 2004). DMDS treatment, at relatively high concentration (i.e., 100  $\mu$ M), results in insecticidal activity through an inhibition of cytochrome *c* oxidase in the insect central nervous system (Dugravot et al., 2003). This effect subsequently decreases the intracellular ATP concentration, which thereby activates insect neuronal ATP-dependent potassium channels, which produce an important hyperpolarization associated with the disappearance of action potentials. This insect neurotoxicity supported the development of DMDS as a soil fumigant used to control insects. However, the use of novel compounds as alternative to classic fumigants needs to consider an optimum insecticidal activity with an admitted paucity of definitive mammalian toxicological effect. In this context, additional studies have been planned on the insect central nervous system with much lower concentration (i.e., 1  $\mu$ M) to understand in depth the pathway of neurotoxicity. This approach has allowed us, for the first time, to elucidate the neurotoxic effect of DMDS on unusual neuronal targets identified as calcium-activated potassium channels through complex regulatory pathways.

## Materials and Methods

**Preparation.** Experiments were performed on DUM neuron cell bodies isolated from the midline of the terminal abdominal ganglia (TAG) of the nerve cord of adult male cockroaches (*Periplaneta americana*). Cockroach DUM neurons are electrophysiologically well characterized since most of the biophysical and pharmacological properties of ionic currents underlying their spontaneous action potentials have already been established (Grolleau and Lapiéd, 2000; Wicher et al., 2001). Cockroaches were obtained from our laboratory stock colonies maintained under standard conditions (29°C; photoperiod of 12-h light/12-h dark). Animal care and handling procedures were in accordance with French institutional and national health guidelines. Animals were immobilized ventral side up on a dissection dish. The ventral cuticle and accessory glands were removed to allow access to the ventral nerve cord. The TAG, carefully dissected under a binocular microscope, were placed in normal cockroach saline containing (200 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM sucrose, and 10 mM HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH).

**Cell Isolation and Electrophysiological Recordings.** Isolation of adult DUM neuron cell bodies was performed under sterile conditions using enzymatic digestion and mechanical dissociation of

the TAG. Briefly, ganglia were excised and incubated for 35 min at 29°C in cockroach saline supplemented with 300 IU/ml collagenase (type I; Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ). After thoroughly washing off the enzyme, ganglia were mechanically dissociated by gentle repeated suction through fire-polished Pasteur pipettes. According to the cobalt-filling technique together with immunohistochemical mapping and electrophysiological recordings (Sinakevitch et al., 1996; Grolleau and Lapiéd, 2000), it was assumed that most of TAG DUM neurons investigated formed a relatively homogeneous population of cells. The isolated DUM neuron cell bodies were maintained at 29°C for 24 h before experiments were carried out.

The whole-cell patch-clamp technique was used to record spontaneous electrical activity and voltage-gated potassium currents (voltage-clamp mode; Grolleau and Lapiéd, 1995). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) using a PP83 electrode puller (Narishige, Tokyo, Japan). Pipettes had resistances ranging from 1.1 to 1.4 M $\Omega$  (for action potentials recordings) or from 0.8 to 1.1 M $\Omega$  (for potassium currents recording) when filled with internal solutions (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>5 G $\Omega$ ).

Voltage-dependent potassium currents (Grolleau and Lapiéd, 1995) were recorded with an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) with the low-pass four-pole Bessel filter set to 5 kHz. Command potentials were generated by a programmable stimulator (SMP 310; Biologic Science Instruments, Claix, France) or a PC computer (Elonex, Pentium 733 MHz; sampling frequency, 33 kHz) connected to a 16-bit analog-to-digital converter (Digidata 1322A; Axon Instruments). The pClamp package, version 8.0.2 (Axon Instruments) was used for data acquisition and analysis. Although leak and capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents was performed with an on-line P/6 protocol provided by pClamp. Series resistance value was obtained for each experiment from the patch-clamp amplifier settings after compensation and varied between 3 and 5 M $\Omega$ . DUM neuron cell bodies were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -80 mV, and test pulses, 100 ms in duration, were applied from the holding potential at 0.25 Hz. For current-clamp experiments, spontaneous action potentials were displayed on a digital oscilloscope (310; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA), and they were stored on a digital audio tape (DTR-1204; Biologic Science Instruments, Claix, France) or on the hard disk of the computer for subsequent off-line analysis. Patch-clamp experiments were conducted at room temperature (20–22°C). Data, when quantified, were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Differences between means were tested for statistical significance by Student's *t* test. For data analysis including fitting procedures, the software Prism 2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used.

**Calcium Imaging.** Falcon 1006 Petri dishes with glass coverslips were coated with poly-D-lysine hydrobromide (mol. wt. 70,000–150,000; Sigma Chemical, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), and isolated DUM neuron cell bodies were plated as described above. External recording solution contained 200 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The cells were incubated in the dark with 10  $\mu$ M Fura-2 pentakis(acetoxy-methyl) ester (Sigma Chemical) for 60 min at 37°C. After loading, cells were washed three times in saline. The glass coverslips were then mounted in a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Imaging experiments were performed with an Olympus IX50 inverted microscope (Olympus, Rungis, France) equipped with epifluorescence. Excitation light was provided by a 75-W integral xenon lamp (Life Science Resources, Cambridge, UK). Excitation wavelengths (340 and 380 nm) were applied using a computer-driven Spectramaster (Life Science Resources). Images were collected with an Olympix digital charge-coupled device camera (AstroCam; Life Science Resources), and

they were recorded in the computer with Merlin software, version 2.0 (Life Science Resources). Exposure times at 340 and 380 nm were usually 150 ms, and images were collected at various frequencies. Regions of interest were defined and analyzed off-line.

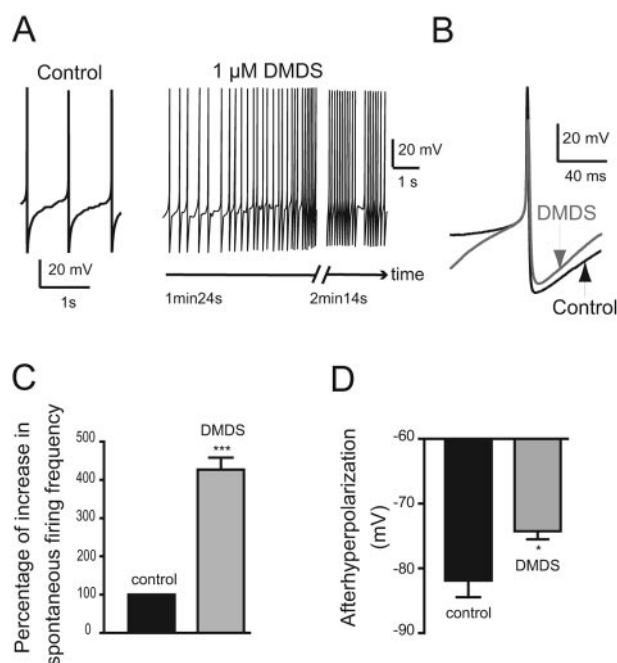
**Antisense Assay.** According to the protocol described by Fickbohm and Trimmer (2003), isolated DUM neurons were treated with either 10  $\mu$ M antisense oligonucleotides (ASO) targeted to the pSlo coding region (GenBank accession no. AF452164) or reverse antisense oligonucleotides. For inhibition of pSlo expression, DUM neurons were incubated with a mixture of three 15-mers ASO (Europrim; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) targeting the first 45 base pairs of the coding region of pSlo and designed with the following sequences: 5'-CTCACAGTTGCACAT-3', 5'-CACCGATGTCATCTC-3', and 5'-ATCTTCGCCTGGTGA-3'. For control experiments, the sequences of reverse antisense oligonucleotides corresponds to the three reverse sequences of ASO indicated above. We performed 24-h and 48-h incubations at 29°C. After the 24-h incubation, the cell culture medium containing oligonucleotides was half replaced.

**Solutions.** For voltage-clamp experiments, the extracellular solution contained 100 mM NaCl, 70 mM Trizma-HCl, 3.1 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES buffer, and 100 nM tetrodotoxin; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Patch pipettes were filled with internal solution containing 135 mM KCl, 25 mM KF, 9 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 3 mM ATP-Na<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with KOH. Drug solutions were prepared in the external solution, and they were applied in the immediate vicinity of the cell body by a gravity perfusion system. In some cases, the tested compounds were added in the internal pipette solution immediately before use. For current-clamp recordings, cells were bathed in external solution containing 200 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The internal solution contained 160 mM K-aspartate, 10 mM K-fluoride, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 1 mM ATP-Mg, and 10 mM HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with KOH. All chemicals were purchased from Sigma Chemical, except LOE 908, an inhibitor of TRP $\gamma$ , generously gifted by Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany) and iberitoxin (IbTx; Latoxan, Valence, France). DMDS was prepared in dimethyl sulfoxide. Final dilution never contained more than 0.1% dimethyl sulfoxide. This concentration of solvent was found to be without effect on electrophysiological properties of DUM neurons.

## Results

**Effect of DMDS on DUM Neuron Pacemaker Activity.** All DUM neuron cell body tested in this study generated endogenous pacemaker activity. The overshooting spikes were separated by a long-lasting slow prepolarization phase, during which the threshold for action potential triggering was reached, with a spontaneous frequency ranging from 2 to 4 Hz at room temperature (Fig. 1A). Bath application of 1  $\mu$ M DMDS produced a very slight depolarization (2–3 mV) associated, within the first 2 min, with an increase in the action potential discharge frequency ( $\sim$ 12 Hz after 2 min; Fig. 1C). After 2 min, DMDS transformed the beating pacemaker activity into a burst of electrical activity containing approximately 10 spikes separated by short silent periods ( $\sim$ 500 ms; Fig. 1A). It was interesting to note that during DMDS treatment, the modified DUM neuron firing pattern was associated with a reduction of the amplitude of the action potential afterhyperpolarization (Fig. 1, B and D).

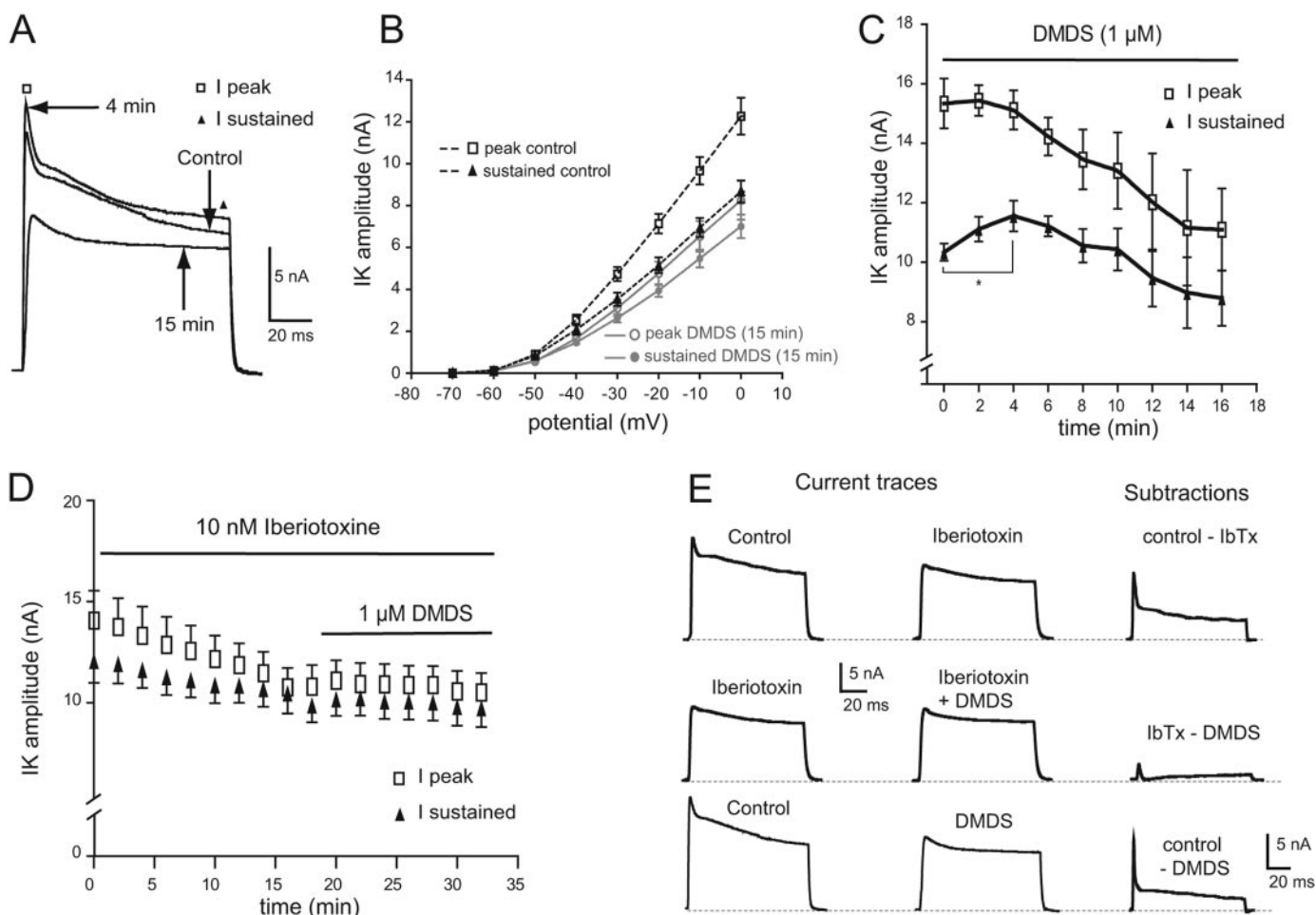
**Effect of DMDS on Voltage-Dependent Calcium-Activated Potassium Currents.** Based on the findings described above and because we previously established that calcium-activated potassium currents were involved in the



**Fig. 1.** Effects of DMDS on DUM neuron pacemaker activity. A, spontaneous overshooting action potentials recorded in control and after bath application of 1  $\mu$ M DMDS. Within the first 2 min, DMDS produced an increase of action potential discharge frequency associated with a slight depolarization. After 2 min of exposure, while the depolarization was stabilized, the beating pacemaker activity was transformed into a burst of electrical activity. B, superimposed action potentials prior (control) and 2 min after application of 1  $\mu$ M DMDS. Note the reduction of the amplitude of the afterhyperpolarization. C and D, histograms comparing spontaneous action potential frequency (C) and afterhyperpolarization amplitude (D) under control condition (black bars) and in the presence of 1  $\mu$ M DMDS (gray bars). Values are mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 7$ ).

development of the afterhyperpolarization that modulated the DUM neuron repetitive discharge frequency (Grolleau and Lapied, 1995, 2000), we examined further the mode of action of low concentration of DMDS on the voltage-dependent calcium-activated potassium currents under voltage-clamp conditions. Calcium-activated potassium currents can be isolated from the total outward current using IbTx or inorganic calcium channel blockers, such as cadmium chloride (Fig. 2E, top traces; Grolleau and Lapied, 1995). Note that the currents shown in Fig. 2E (right) were difference current obtained by subtraction of IbTx-resistant current from the corresponding total outward current (control; Fig. 2E, left).

We first tested DMDS on the total outward potassium current recorded during a 100-ms test pulse (from  $-80$  mV to  $+10$  mV). After 15 min, external application of 1  $\mu$ M DMDS significantly reduced both peak transient and late components at all potential tested (Fig. 2, A and B). Unexpected results were obtained when time course of inhibition by DMDS of the total outward current was measured at the beginning (peak transient component) and at the end of the depolarizing pulse (sustained component). Figure 2C compared the effect of 1  $\mu$ M DMDS on transient and sustained components of the outward current. It seemed that DMDS did not affect similarly the amplitude of both components since a monotonic reduction of the amplitude of the peak transient component was mainly observed, whereas the effect on the sustained component was bell-shaped. In this last case, within the first 4 min, DMDS produced an increase of

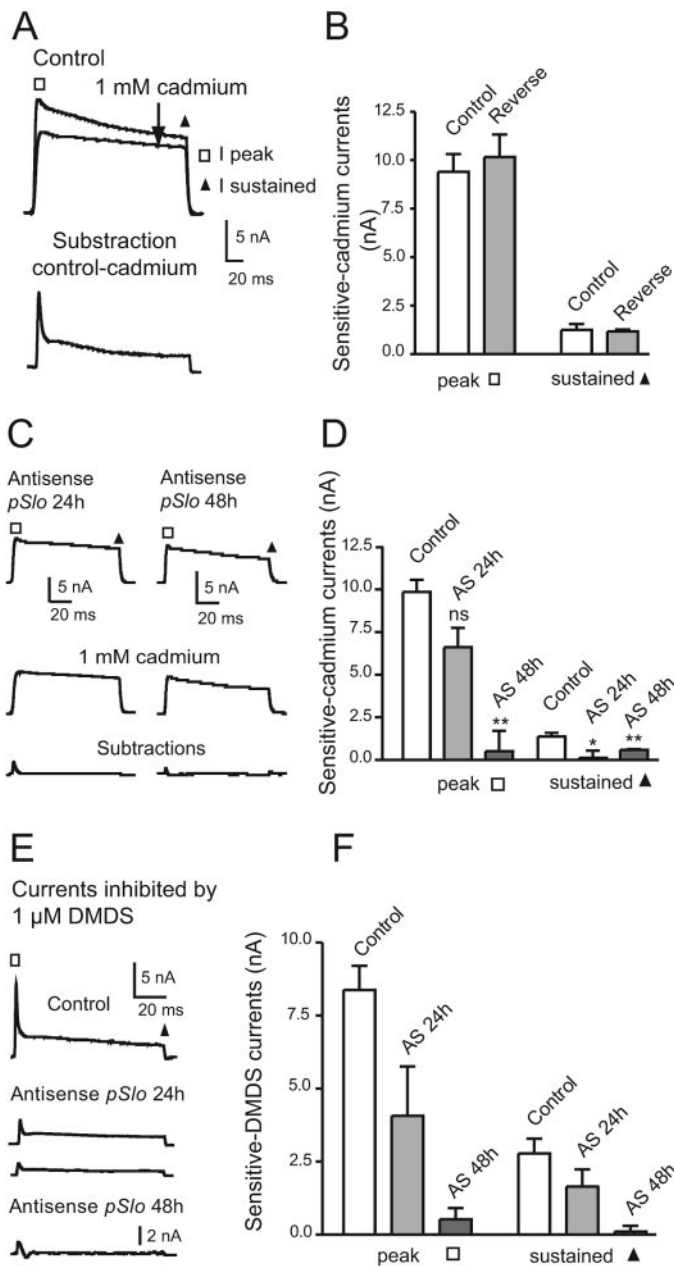


**Fig. 2.** DMDS inhibited DUM neuron calcium-activated potassium currents. **A**, original current traces evoked by a 100-ms depolarizing pulse to +10 mV from a holding potential of  $-80$  mV, recorded after 4 and 15 min of  $1 \mu\text{M}$  DMDS bath applied. **B**, current-voltage relationship of both peak transient and sustained outward potassium current before (control) and after application of  $1 \mu\text{M}$  DMDS. **C**, comparative time course of the changed peak transient and sustained component amplitudes induced by bath application of  $1 \mu\text{M}$  DMDS. **D**, time course of the changed outward current amplitude (peak transient and sustained components) obtained from DUM neurons pretreated with 10 nM iberiotoxin and subsequent application of  $1 \mu\text{M}$  DMDS. **E**, typical example of outward potassium currents recorded in control and in the presence of 10 nM iberiotoxin (top traces), 10 nM iberiotoxin, and  $1 \mu\text{M}$  DMDS coapplied (middle traces), and  $1 \mu\text{M}$  DMDS alone (bottom traces). The cells were held at a holding potential of  $-80$  mV and depolarized to +10 mV. Data points are means  $\pm$  S.E.M. observed in five cells.

the sustained component, which was statistically significant (Fig. 2C), to reach a maximum at 4 min before decreasing for longer time exposure. By contrast, the peak transient current amplitude was relatively stable within the first 2 min, and then it progressively decreased. The first indication that DMDS affected calcium-activated potassium currents came from the results illustrated in Fig. 2, A and E (left traces). The DMDS-sensitive current (Fig. 2E, right, bottom), obtained by subtraction of the record after DMDS treatment from the control at 15 min, displayed a biphasic waveform composed of a well developed fast transient component followed by a late sustained current. This DMDS-sensitive outward current was very similar to that previously described in DUM neurons and identified as calcium-activated potassium currents (Grolleau and Lapied, 2000; Wicher et al., 2001). The second argument was obtained from experiments performed with IbTx. When DUM neuron cell bodies were pretreated for 15 min with 10 nM IbTx, known to block calcium-activated potassium currents in DUM neurons (Grolleau and Lapied, 1995; Fig. 2E, top traces),  $1 \mu\text{M}$  DMDS did not affect both peak transient and sustained components of the current

(Fig. 2D). Accordingly, the view that calcium-activated potassium currents were targeted by DMDS was also well illustrated in Fig. 2E (middle traces) in which the DMDS-sensitive current disappeared in the presence of 10 nM IbTx, indicating that IbTx already blocked the calcium-activated potassium current.

Finally, to substantiate that BK (pSlo; Derst et al., 2003) channels were blocked by DMDS, additional experiments were performed using antisense oligonucleotides technology for decreasing endogenous mRNA of pSlo, with further assessment of its impact on calcium-activated potassium currents in DUM neurons (see *Materials and Methods*). In the initial studies, we confirmed the efficacy and specificity of antisense oligonucleotides in the down-regulation of DUM neuron BK (pSlo) channels by measuring both peak transient and sustained component amplitudes of the calcium-activated potassium currents after antisense versus reverse antisense treatments. As shown in Fig. 3, A and B, 1 mM cadmium chloride, known to block calcium-activated potassium currents in this neuronal preparation (Grolleau and Lapied, 1995), was able to inhibit both components of



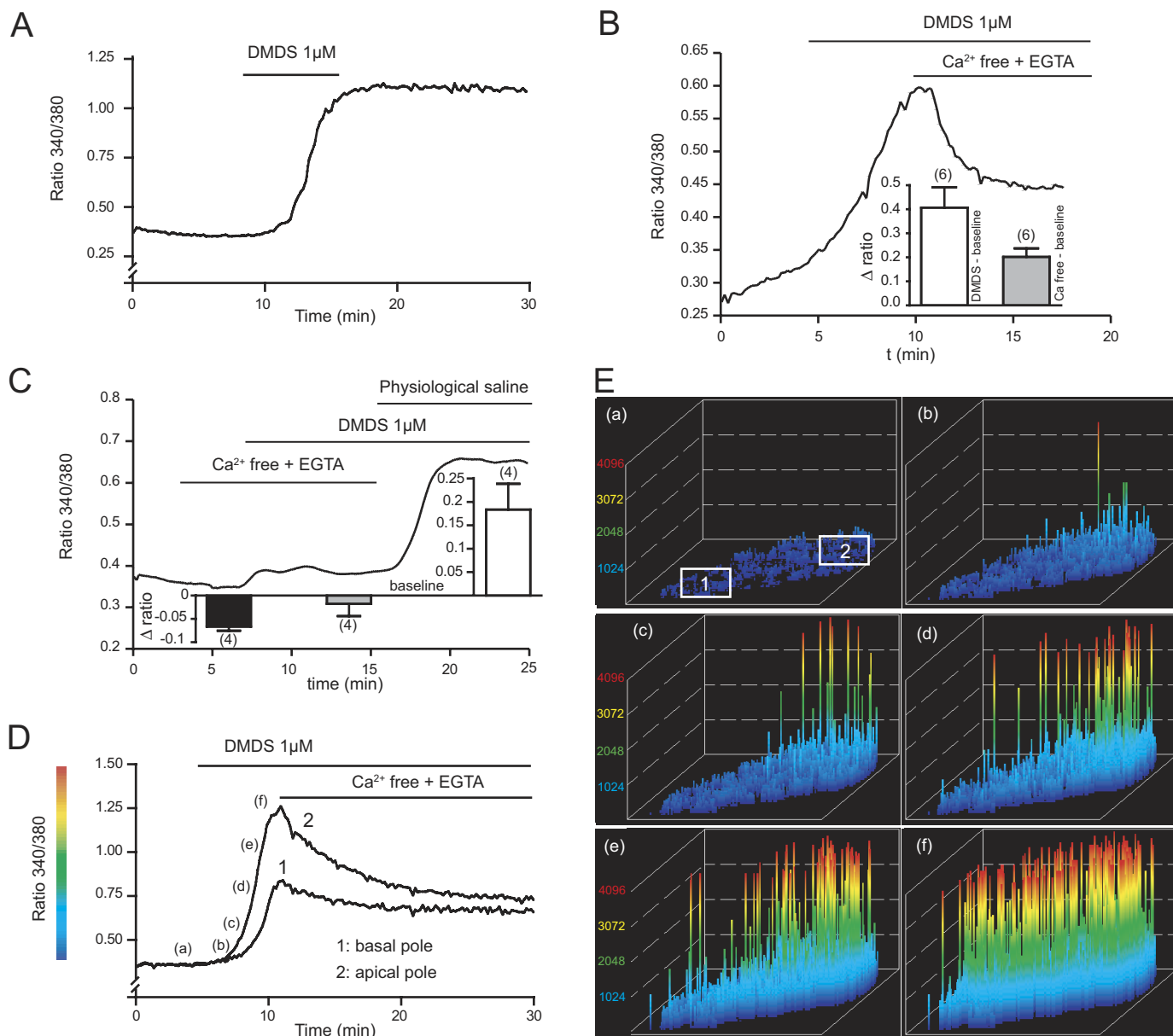
**Fig. 3.** Knockdown of DUM neuron BK channels by antisense oligonucleotides treatment inhibited the effects of DMDS on calcium-activated potassium currents. A and B, DUM neurons were cultured for 24 h with reverse antisense oligonucleotides corresponding to the first 45 base pairs of the coding region of pSlo (10  $\mu\text{M}$ ). Cadmium chloride (1 mM) was used as positive control (A) to reveal biphasic calcium-activated potassium currents corresponding to the cadmium sensitive current obtained by subtraction of the record after cadmium chloride treatment from the control (A, bottom trace). Outward currents were evoked by a 100-ms depolarizing pulse to +10 mV from a holding potential of -80 mV. B, histogram illustrating the lack of effect of reverse antisense oligonucleotides on calcium-activated potassium currents. C, DUM neurons were incubated with 10  $\mu\text{M}$  antisense oligonucleotides (AS) directed against the coding region of pSlo for 24 and 48 h. Outward currents were activated by a 100-ms depolarizing pulse to +10 mV from a holding potential of -80 mV before and after application of 1  $\mu\text{M}$  cadmium chloride. In both cases, antisense treatment inhibited calcium-activated potassium currents confirmed by the absence of cadmium-sensitive currents. D, histogram comparing the effects of antisense oligonucleotides on both peak transient and sustained components of calcium activated potassium currents. Note that the effect was more pronounced after 48-h treatment (black bars). Outward currents shown in E were difference currents obtained by subtraction of DMDS-resistant current from the total current

the current even if DUM neuron cell bodies were treated for 24 h or 48 h with reverse antisense. This indicated that treatment with reverse antisense oligonucleotides did not produce unspecific effects on calcium-activated potassium currents. Comparing DUM neurons pretreated with pSlo antisense oligonucleotides for 24 and 48 h with DUM neurons pretreated with reverse antisense oligonucleotides revealed a significant decrease of amplitudes of both the peak transient and sustained component of the calcium-activated potassium currents (Fig. 3, A–D). These effects were much more pronounced at 48 h (Fig. 3, C and D). In these last cases, bath application of 1 mM cadmium chloride, which we used to check for remaining calcium-activated currents (positive control), did not produce any additional effect on the outward current. These experiments indicated that calcium-activated potassium channel expression was suppressed in DUM neuron cell bodies pretreated by antisense oligonucleotides targeted pSlo mRNA (Fig. 3C). Next, we tested the effect of subsequent application of 1  $\mu\text{M}$  DMDS on DUM neurons pretreated with pSlo antisense oligonucleotides for 24 and 48 h. This resulted in a strong reduction of DMDS-sensitive outward currents since antisense oligonucleotides reduced the conductance of the calcium-activated potassium currents (Fig. 3, E and F). Once again, the effects observed were more pronounced at 48 h rather than 24 h.

**DMDS-Induced Changes in Intracellular Calcium Concentration.** The unexpected results illustrated in Fig. 2B led us to suspect an atypical DMDS-induced calcium-dependent regulation of these channels in DUM neurons. Consequently, a new set of experiments was designed to investigate the expected effect of DMDS on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The resting level of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in isolated Fura-2-loaded DUM neuron cell bodies (saline containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) was measured as  $29.6 \pm 2.3$  ( $n = 32$ ).

Bath application of 1  $\mu\text{M}$  DMDS produced a marked elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  followed by a sustained elevated level. The maximum calcium rise did not decay to the baseline after washing (Fig. 4A). We next examined the source of the intracellular calcium rise observed in DUM neurons. When the experiments were performed in an EGTA-buffered calcium-free superfusing solution, the DMDS-induced elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  quickly decayed toward the resting level and stabilized to a plateau phase, which was higher than the baseline  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  level (Fig. 4B). These results indicated that the elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resulted, in part, from extracellular calcium through plasma membrane calcium channels. This was confirmed in Fig. 4C. If DUM neuron cell bodies were pretreated with an EGTA-buffered calcium-free superfusing solution, 1  $\mu\text{M}$  DMDS was ineffective in producing any  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise. By contrast, subsequent bath application of normal physiological saline restored the ability of DMDS to produce elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . After careful observation of the calcium response produced by 1  $\mu\text{M}$  DMDS, the time course  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise differed according to the cell region (Fig. 4, D and E). As indi-

recorded on DUM neurons cultured for 24 and 48 h in the presence of 10  $\mu\text{M}$  antisense oligonucleotides. Note that the DMDS-sensitive currents were strongly reduced after treatment. F, histogram comparing the inhibition of the effect of 1  $\mu\text{M}$  DMDS on both components (i.e., peak and sustained) of the calcium-activated potassium currents recorded from DUM neurons incubated for 24h (gray bars) and 48h (black bars) with antisense oligonucleotides. Values are means  $\pm$  S.E.M. from five cells.



**Fig. 4.** DMDS induced an intracellular calcium concentration rise in Fura-2-loaded DUM neuron cell bodies. **A**, bath application of 1  $\mu\text{M}$  DMDS increased intracellular free calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). **B**, dependence of the DMDS-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise on extracellular calcium. The calcium response slowly declined and stabilized to a plateau phase higher than the baseline level when external calcium was substituted with an EGTA-buffered calcium-free superfusing solution. Inset, comparative histogram illustrating changes in (expressed as  $\Delta$  ratio) 340/380 nm measured in the presence of 1  $\mu\text{M}$  DMDS (white bar) and after subsequent application of EGTA-buffered calcium-free solution (gray bar). **C**, pretreatment with EGTA-buffered calcium-free solution inhibited DMDS-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise. After washing off calcium-free solution, an elevation in cytosolic free calcium was observed. Inset,  $\Delta$  ratio 340/380 nm measured under different experimental conditions as indicated. The negative value of  $\Delta$  ratio indicated a decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . **D**, progressive  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in the apical pole (2) and in the initial segment region (basal pole; 1) were plotted as a function of time of DMDS treatment and after subsequent application of EGTA-buffered calcium-free solution. **E**, three-dimensional spatiotemporal images of Fura-2 fluorescence of a single DUM neuron cell body after application of 1  $\mu\text{M}$  DMDS. Images shown were acquired (a) before and (b–f) after the start of DMDS exposure (D). The elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was measured in parallel at the basal pole level (1) and at the apical pole level (2) (Ea). Note that the calcium response occurred first in the apical region and later in the rest of the cell body. Data are means  $\pm$  S.E.M. Values in parentheses indicate number of experiments in each condition.

cated in Fig. 4E, a, illustrating the three-dimensional cytofluorescence intensity plot, the elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was detected and quantified in two defined fields, field 1 in the initial segment (basal pole) and field 2 in the apical of the soma. During the first 8 min, cytofluorescence intensity gradually increased in the apical pole of the DUM neuron, whereas there was no significant calcium response in the initial segment (Fig. 4, D and E, b and c). The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise occurred in the apical pole, with a half-maximum response

reached 1 min later than in the initial segment. After  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reached its maximum in the apical pole,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  continued to rise in the initial segment (Fig. 4, D and E, e and f). In both cases,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation slowly declined toward the same resting value and stabilized to a plateau phase after external application of EGTA-buffered calcium-free solution.

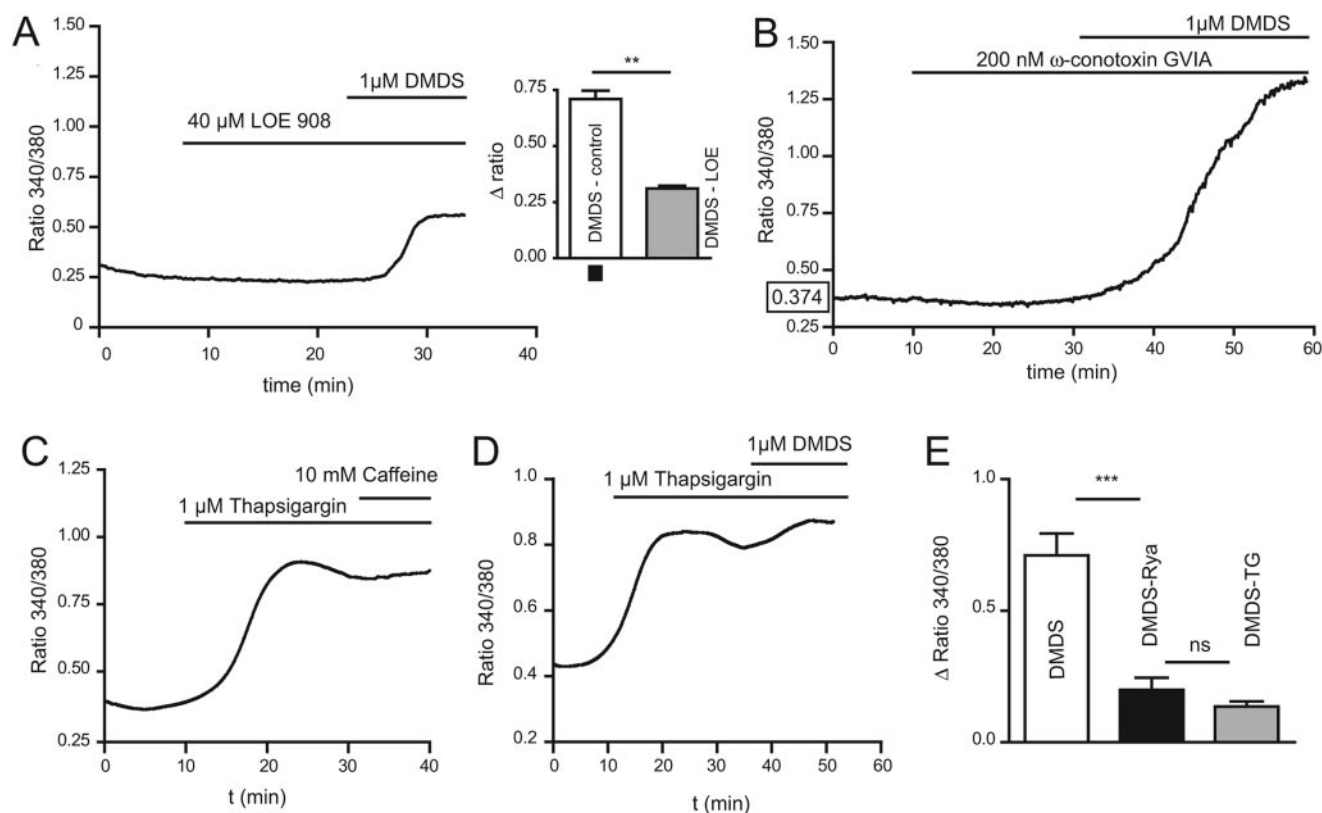
Previous findings reported that calcium influx, in DUM neurons, might be accomplished by a functionally unusual pathway first identified as noncapacitive calcium entry



(Wicher et al., 2006) and later as  $\text{TRP}\gamma$  (Wicher et al., 2006) situated at the apical region of the neurons. Based on findings presented above, it was tempting to suggest that the elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  triggered by DMDS might involve  $\text{TRP}\gamma$ . Consequently, additional experiments were performed with LOE 908 known to specifically inhibit non-capacitative calcium entry in DUM neurons (Wicher et al., 2006). As shown in Fig. 5A, the enhancement of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to  $1 \mu\text{M}$  DMDS was strongly reduced after  $40 \mu\text{M}$  LOE 908 pretreatment. DUM neurons are known to also express HVA calcium channels (Grolleau and Lapied, 2000; Wicher et al., 2001), which might be essential for triggering calcium signals. By contrast, HVA calcium channels seemed not to be involved since preincubation of DUM neuron cell bodies with  $200 \text{ nM}$   $\omega$ -conotoxin GVIA, one of the more potent N-type HVA calcium channel blockers, did not produce elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produced by  $1 \mu\text{M}$  DMDS (Fig. 5B). Altogether, these results indicated that  $\text{TRP}\gamma$  might represent the first step essential for initiating calcium response.

As indicated above, although the attenuated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in the presence of EGTA-buffered calcium-free solution indicated the participation of extracellular calcium, the small residual response observed (Fig. 4, C and D) might also suggest the

involvement of calcium from intracellular stores. To verify this hypothesis, several experiments were performed using pharmacological compounds acting at different levels of the calcium-induced calcium release mechanism. We first examined the effect of thapsigargin, the well known tight-binding inhibitor of the ubiquitous sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase involved in the uptake of calcium into intracellular stores. As shown in Fig. 5C, application of  $1 \mu\text{M}$  thapsigargin produced an important rise in cytosolic free calcium that was independent of the presence of external calcium. This effect reflected an inhibition of calcium accumulation by endoplasmic reticulum pools. This was confirmed by cumulative application of  $10 \text{ mM}$  caffeine, known to facilitate release of calcium from internal stores, which did not induce additional effect on the internal calcium concentration. Based on these results, we performed similar experiments but this time in the presence of DMDS. As already observed in Fig. 5C,  $1 \mu\text{M}$  thapsigargin produced an elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . As expected, subsequent application of  $1 \mu\text{M}$  DMDS did not affect significantly the internal calcium concentration (Fig. 5D). Confirming evidence that the DMDS-induced calcium rise might also involve calcium from intracellular stores came from experiments performed with ryanodine, known to interrupt release of calcium from endoplasmic reticulum pools. As



**Fig. 5.** Involvement of  $\text{TRP}\gamma$  and calcium released from internal stores in the neurotoxic effect of DMDS. A, DMDS-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise was strongly reduced by preincubation of DUM neuron cell bodies with  $40 \mu\text{M}$  LOE 908, known to block  $\text{TRP}\gamma$  in DUM neurons. Inset, comparative histogram of intracellular calcium changes ( $\Delta$  ratio 340/380 nm) produced by DMDS alone and in the presence of LOE 908 (\*\*,  $p < 0.01$ ). Black square below the white bar corresponds to the value taken from Fig. 4B. Values are means  $\pm$  S.E.M. from four to nine cells. B, by contrast, pretreatment with  $200 \text{ nM}$   $\omega$ -conotoxin GVIA, a blocker of N-type HVA calcium channels, did not affect the enhancement of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produced by  $1 \mu\text{M}$  DMDS. C to E, involvement of internal stores in the effect of DMDS. C, thapsigargin, an inhibitor of the sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, was first tested on DUM neuron cell bodies;  $1 \mu\text{M}$  thapsigargin increased the intracellular free calcium ions, reflecting an inhibition of calcium accumulation by endoplasmic reticulum pools. Subsequent application of  $10 \text{ mM}$  caffeine did not trigger additional calcium response. D, under the same experimental condition described in C,  $1 \mu\text{M}$  DMDS coapplied with  $1 \mu\text{M}$  thapsigargin did not produce any significant  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise. E, histogram comparing the effects of  $1 \mu\text{M}$  DMDS applied alone, and after pretreatment of DUM neuron cell bodies with 1)  $100 \mu\text{M}$  ryanodine (Rya), known to block release of calcium from endoplasmic reticulum pools, and 2)  $1 \mu\text{M}$  thapsigargin (TG). In the last two cases,  $1 \mu\text{M}$  DMDS did not produce any calcium response (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; N.S., nonsignificant). Values are mean  $\pm$  S.E.M. from nine cells.

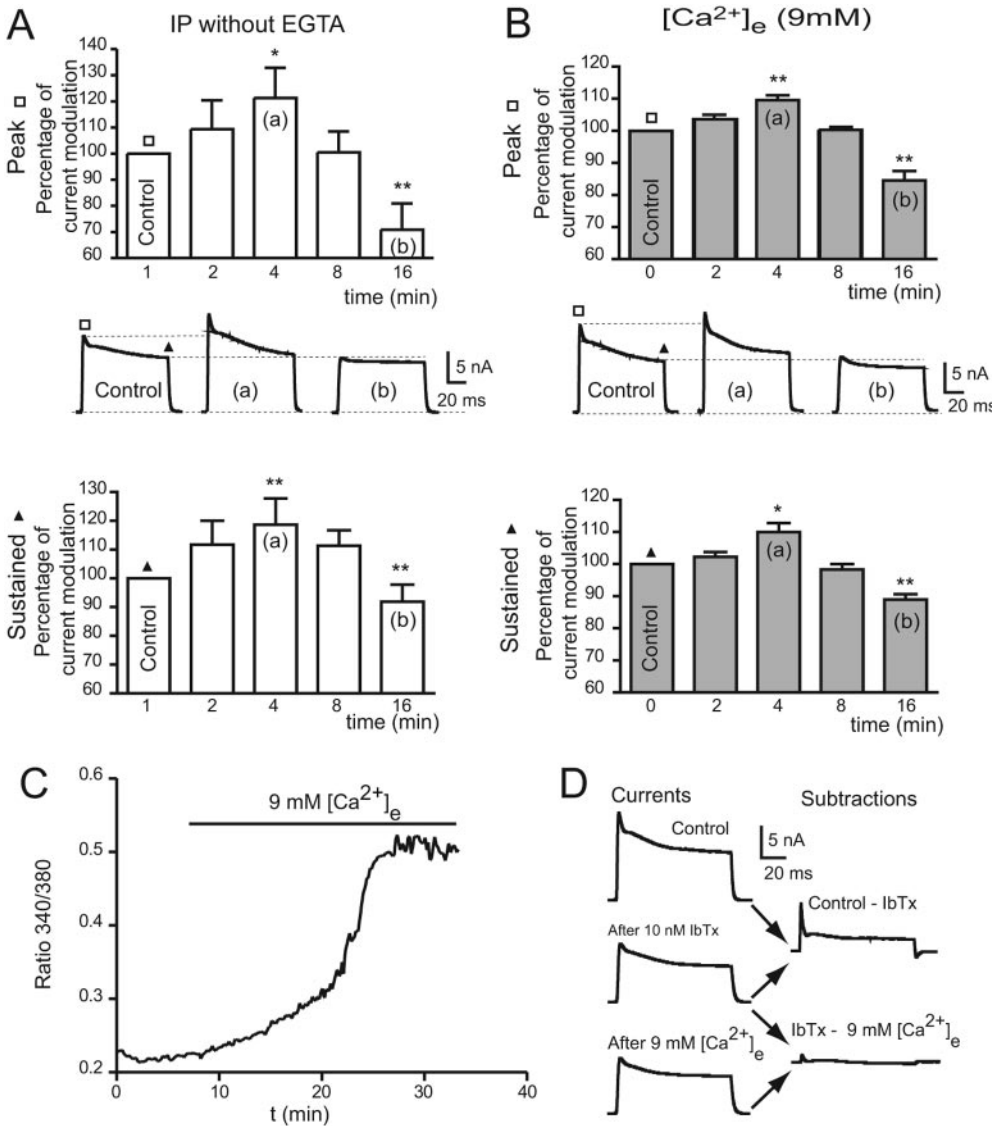
illustrated in Fig. 5E, preincubation of DUM neuron cell bodies with 100  $\mu$ M ryanodine strongly reduced the  $[Ca^{2+}]_i$  rise produced by 1  $\mu$ M DMDS. An effect that was very similar to that of observed with thapsigargin (Fig. 5E).

**$[Ca^{2+}]_i$  Rise Produced a Bell-Shaped Regulation of Calcium-Activated Potassium Currents in DUM Neurons.** Time course of the effect of DMDS on both components of the outward current (i.e., fast transient and sustained components) (Fig. 2C) might suggest an unusual bell-shaped regulation, dependent on  $[Ca^{2+}]_i$  rise induced by DMDS. To substantiate this hypothesis, we examined the influence of intracellular and/or extracellular calcium changes on both amplitudes of the peak transient and sustained components of the calcium-activated potassium currents. Intracellular perfusion of DUM neurons with high  $[Ca^{2+}]_i$  (i.e., without EGTA) pipette solution should allow for a first approximation of the calcium sensitivity of the calcium-activated potassium channels. As shown in Fig. 6A, immediately after establishing the whole-cell configuration, both components (i.e., peak transient and sustained components) of the currents increased in amplitude to reach a maximum at 4 min of EGTA exposure. Subsequently, when the concentration of EGTA rose on dialysis of the cell, both compo-

nents were reduced, with an effect more pronounced for the peak transient component. It was interesting to note that the time for which the amplitudes of the currents were maximum was very similar to that of obtained with DMDS (Fig. 2B). We also wanted to test the influence of external calcium concentration changes on the calcium-activated potassium currents. When external calcium concentration was raised from 5 to 9 mM, an important  $[Ca^{2+}]_i$  rise was observed (Fig. 6C). In this case, a similar bell-shaped regulation of both components was also observed, with a maximum occurring at 4 min. For shorter or longer exposure than 4 min, these two components were reduced in amplitude. The difference current shown in Fig. 6D, obtained by subtraction of IbTx-resistant current from the total current, indicated that bath application of 9 mM external calcium did not affect potassium current amplitude recorded from DUM neuron cell bodies pretreated with 10 nM iberiotoxin.

### Discussion

To our knowledge, no published information exists on detailed mechanisms of action of volatile organic fumigants against insects. Insect models, with their large accessible

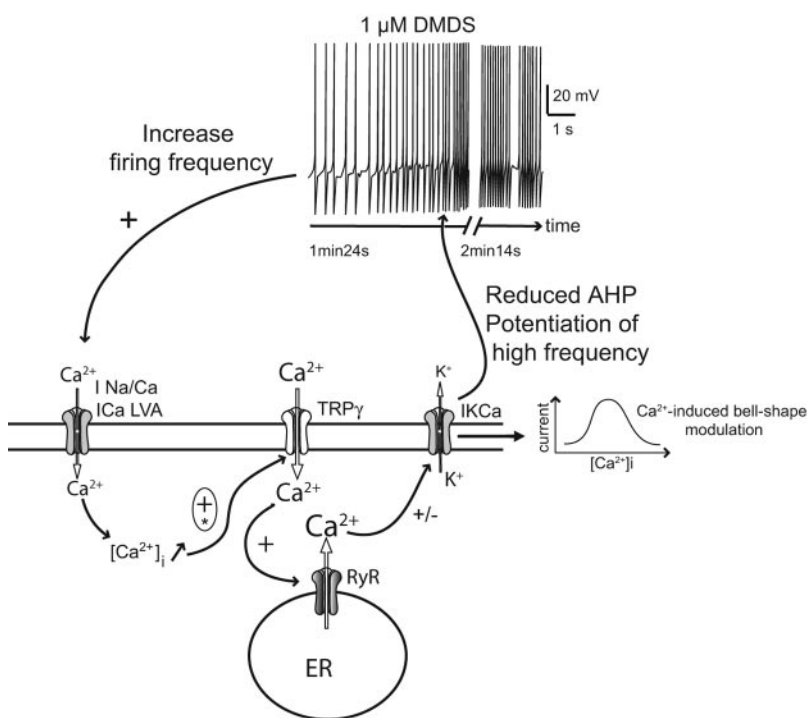


**Fig. 6.** Bell-shaped regulation of calcium-activated potassium currents in DUM neurons. A, histogram illustrating the effect of high internal calcium concentration introduced into the cell (no EGTA into the patch pipette) on peak transient (top) and sustained (bottom) of the calcium-activated potassium currents versus time. Maximum amplitude of both components was reached at 4 min of exposure. For shorter or longer exposure than 4 min, the two components were reduced in amplitude. Middle, outward potassium currents evoked by a 100-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of  $-80$  mV. B, very similar effects were obtained on both components of the calcium-activated potassium currents when the external calcium concentration was raised from 5 to 9 mM. Current traces were recorded according to the protocol indicated just above. C, elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  observed after bath application of solution containing 9 mM calcium. D, difference currents obtained by subtraction of iberiotoxin-resistant current from the total current. Note that bath application of 9 mM external calcium did not affect potassium current amplitude recorded from DUM neuron cell bodies pretreated with 10 nM iberiotoxin. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ).

cells and well partitioned nervous system, contribute new insight in the evaluation of insecticidal properties of such volatile low-molecular-weight compounds. For this purpose, the main advantage of insect models is to allow high-throughput screening in the physiological context. They are gaining momentum as a needed tool to bridge the gap between *in vitro* and preclinical animal assays.

Because insect resistance to a given fumigant and/or insecticide in general (e.g., compounds based on natural products or of synthetic origin) is increasing (Raymond-Delpech et al., 2005; Dong, 2007), it seems evident that single-molecule replacements for methyl bromide, phosphine, or both, for example, may not be as effective as combination of chemicals. However, previous observations have clearly reported the incompatibility interactions between different fumigants (Ruzo, 2006). Simultaneous presence of metam-sodium with halogenated fumigants in polar organic solvents or moist soil (Guo et al., 2005) give rise to rapid degradation of the halogenated fumigants and to decomposition of metam to methyl isothiocyanate. Moreover, it has been demonstrated that simultaneous and sequential application of metam-sodium with chloropicrine and 1,3-D accelerates transformation of the two fumigants, reducing their availability in soil (Zheng et al., 2004). This results in the loss of active ingredient that occurs due to the reaction between fumigants and a poor pest control efficacy of field fumigation. Consequently, these observations have spurred research to solve such problems. A relatively recent alternative approach exists, consisting of the use of a chemical, which induces multiple metabolism alterations within the same organism via, for instance, second messenger activation (e.g., intracellular calcium), affecting distinct identified targets. In this context, DMDS may represent an exciting alternative to the phase-out of classic fumigants (e.g., methyl bromide) since, depending on the concentration used, DMDS produces significantly different alterations of the main physiological functions in insects.

Previous findings have indicated that relatively high concentration of DMDS reduces neuronal activity via an activation of ATP-dependent potassium current (Dugravot et al., 2003). This effect is attributed to an inhibition of cytochrome *c* oxidase. From these results, it is interesting to note that this mode of action observed at high concentration is very similar to that of phosphine (Singh et al., 2006). However, although this mode of action has been proposed to be similar, previous comparisons of LC<sub>50</sub> values for 24-h treatments with each fumigant indicate that DMDS is much more toxic toward invertebrates, such as nematodes, for example, than is phosphine (Valmas and Ebert, 2006). Among other possibilities, this might suggest that DMDS could produce unexpected additional effects reflecting this higher toxicity. In this present study, we show that at 100-fold lower concentration, DMDS induces distinct complex additional effects summarized in Fig. 7. Previous studies performed on the same neuronal preparation have revealed that DMDS produces negative shift of both activation and inactivation curves of the voltage-dependent sodium current (Gautier et al., 2006). From these results, we have assumed that this hyperpolarized shift of the voltage dependence of both activation and inactivation parameters would produce channels that could function in a hyperexcitable manner, as illustrated in Figs. 1A and 7. The increase in the action potential discharge frequency associated with the slight depolarization reinforces the involvement of the low-voltage-activated currents previously identified as Na/Ca current (Defaix and Lapied, 2005) and both transient and maintained calcium currents (Grolleau and Lapied, 2000; Wicher et al., 2001). These currents are known to participate in the regulation of intracellular calcium level and to be involved in the generation of the pacemaker potential. The consecutive calcium influx modulates, in a positive manner, TRP $\gamma$  (Grolleau et al., 2006; Wicher et al., 2006). This further enhances intracellular calcium level via the additional participation of calcium from internal stores through the calcium-induced calcium release mechanism activation. Finally, intracellular calcium changes



**Fig. 7.** Hypothetic pattern of DMDS-induced bell-shaped regulation of calcium-activated potassium currents via elevation in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in DUM neurons. This scheme summarizes the essential intracellular molecular events involved in this unusual regulation. *I*<sub>Na/Ca</sub> and LVA *I*<sub>Ca</sub> are low-voltage activated currents 1) permeable to sodium and calcium and 2) permeable to calcium known to have specialized function in the development of the prepolarization of the pacemaker activity (Grolleau and Lapied, 2000; Defaix and Lapied, 2005; \*, from Grolleau et al., 2006).

regulate, in a bell-shaped manner, the calcium-activated potassium currents involved in the afterhyperpolarization that modulates the DUM neuron firing properties.

These last results also emphasized the involvement of unusual target sites for such insecticidal chemicals. Although the insecticidal toxic effect of fumigants is only hypothesized in insects, it is well known in the literature that the commonly used insecticides either exert their toxicity by virtue of acetylcholinesterase inhibition at the synapses and neuromuscular junctions, or they affect voltage-dependent sodium channels, ionotropic receptors such as nicotinic acetylcholine, and GABA receptors, which are considered as classic molecular targets in insects (Tomizawa and Casida, 2003; Raymond-Delpech et al., 2005). Recently, the question of the implication of another class of molecular targets that could play crucial indirect role in insecticide neurotoxicity has been raised. It has previously been indicated that ATP-dependent potassium channels, indirectly involved in toxicity, are a consequence of insecticide-induced mitochondrial dysfunction (Jenner, 2001; Dugravot et al., 2003). This downstream consequence could represent an epidemiological linkage between insecticide and neuropathological diseases (Jenner, 2001; Liss and Roeper, 2001).

In this study, we have provided new evidence for the participation of such an indirect target in insecticide neurotoxicity. Until now, calcium-activated potassium currents have not been identified as putative targets for such neurotoxic compounds. We have demonstrated that DMDS affects calcium balance-targeted calcium-activated potassium channels by an unexpected regulation, not reported before, for such potassium channels. Calcium-activated potassium channels identified as BK, SK (including KCa2.1, 2.2, and 2.3) channels and calcium-activated potassium channels of intermediate conductance (KCa 3.1) are known to be regulated by intracellular pathways involving calmodulin, phosphorylation process (e.g., through protein kinase A activation), and calcium-dependent and -independent protein phosphatases (calcineurin and PP1, respectively). In addition, distinct calcium-dependent regulatory mechanisms with different calcium selectivity were also known to influence BK channel-gating properties (Stocker, 2004; Latorre and Brauchi, 2006; Neylon et al., 2006), and some of calcium-activated potassium channels (e.g., SK2; Allen et al., 2007) are known to form multiprotein complexes containing associated calmodulin, both subunits of protein kinase CK2 and two different subunits of protein phosphatase PP2A. These SK2 channels seem to be regulated in a dynamic manner directly by protein kinase CK2 and PP2A and indirectly by calcium. In our case, the dual role of intracellular calcium on calcium-activated potassium currents via this bell-shaped regulation was unknown. Although the intracellular mechanisms involved in such unusual regulation still remain to be elucidated, the increase of intracellular calcium concentration that represents an important mechanism responsible for the abrogation of calcium-dependent potassium current activation may explain why exposure to sublethal levels of DMDS could potentially lead to higher toxicity. The associated increase of DUM neuron spontaneous firing frequency observed during DMDS exposure indicates a close relationship between calcium-activated potassium channels and production of changes in beating activity. Because it is well known that DUM neurons regulate vital functions in insects (e.g., heart wall muscle activity) via the

release of octopamine (Sinakevitch et al., 1996), any neurotoxic mechanisms able to modulate, directly and/or indirectly, calcium-activated potassium channels could significantly alter neurosecretory properties, closely related to the firing pattern, which thereby will affect physiological functions. This reveals new important physiological features that should be considered during the design of chemical compounds.

## References

- Allen D, Fakler B, Maylie J, and Adelman JP (2007) Organization and regulation of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel multiprotein complexes. *J Neurosci* **27**:2369–2376.
- Auger J, Lecomte C, and Thibout E (1989) Leek odour analysis by gas chromatography and identification of the most active substance for the leek *Acolepiopsis assectella*. *J Chem Ecol* **15**:1847–1854.
- Bell CH (2000) Fumigation in the 21st century. *Crop Prot* **19**:563–569.
- Caddick L (2004) Search for methyl bromide and phosphine alternatives. *Outlooks Pest Manag* **6**:118–120.
- Church GT and Roskopf EN (2004) Evaluation of DMDS for production of ornamental cockscomb (*Celosia argentea*), in *Proceedings of International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*; 2004 Oct. 31–Nov. 3. pp 87–1–87–5, Methyl Bromide Alternatives Outreach, Orlando, FL.
- Collins PG, Daglish GJ, Bengston M, Lambdin TM, and Pavic H (2002) Genetics of Resistance to Phosphine in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *J Econ Entomol* **95**:862–869.
- Defaix A and Lapiéd B (2005) Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invertebr Neurosci* **5**:135–146.
- Derst C, Messutat S, Walther C, Eckert M, Heinemann SH, and Wicher D (2003) The large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (pSlo) of the cockroach *Periplaneta americana*: structure, localization in neurons and electrophysiology. *Eur J Neurosci* **17**:1197–1212.
- Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebr Neurosci* **7**:17–30.
- Dugravot S, Grolleau F, Macherel D, Rochetaing A, Hue B, Stankiewicz M, Huignard J, and Lapiéd B (2003) Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels. *J Neurophysiol* **90**:259–270.
- Fickbohm D and Trimmer BA (2003) Antisense inhibition of neuronal nicotinic receptors in the tobacco-feeding insect, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* **53**:172–185.
- Fields PG and White ND (2002) Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects. *Annu Rev Entomol* **47**:331–359.
- Gautier H, Guillemette T, Simoneau P, and Lapiéd B (2006) Plant and fungal secondary compounds as potential insecticide agents, in *Rencontres en Toxinologie* (Goudey-Perrière F, Benoit E, Goyffon M, and Marchot P eds) pp 285–294, Lavoisier, Paris, France.
- Grolleau F and Lapiéd B (1995) Separation and identification of multiple potassium currents regulating the pacemaker activity of insect neurosecretory cells (DUM neurons). *J Neurophysiol* **73**:160–171.
- Grolleau F and Lapiéd B (2000) Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol* **203**:1633–1648.
- Grolleau F, Stankiewicz M, Kielbasiewicz E, Martin-Eauclair MF, Lavialle C, De Vente J, and Lapiéd B (2006) Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry is the final step involved in the neurotoxic effect of Tityus serrulatus scorpion B-toxin. *Eur J Neurosci* **23**:1465–1478.
- Guo M, Yates SR, Papiernik SK, and Zheng W (2005) Incompatibility of metam sodium with halogenated fumigants. *Pest Manag Sci* **61**:467–476.
- Jenner P (2001) Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* **24**:245–247.
- Latorre R and Brauchi S (2006) Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel: activation by Ca<sup>2+</sup> and voltage. *Biol Res* **39**:385–401.
- Liss B and Roeper J (2001) ATP-sensitive potassium channels in dopaminergic neurons: transducers of mitochondrial dysfunction. *News Physiol Sci* **16**:214–217.
- Martin FN (2003) Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 325–350.
- Mills KA (2001) Phosphine-resistance—where to now?, in *Abstracts of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*; 2000 Oct. 29–Nov. 3. p. 128, Fresno, CA.
- Neylon CB, Fowler CJ, and Furness JB (2006) Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A. *Auton Neurosci* **126–127**:258–263.
- Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, and Sattelle DB (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebr Neurosci* **5**:119–133.
- Ruzo LO (2006) Physical, chemical and environmental properties of selected chemical alternatives for the pre-plant use of methyl bromide as soil fumigant. *Pest Manag Sci* **62**:99–113.
- Schlipalius DI, Cheng Q, Reilly PE, Collins PJ, and Ebert PR (2002) Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. *Genetics* **161**:773–782.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, and Lapiéd 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.
- Singh S, Bhalla A, Verma SK, Kaur A, and Gill K (2006) Cytochrome-c oxidase

- inhibition in 26 aluminum phosphide poisoned patients. *Clin Toxicol (Phila)* **44**: 155–158.
- Stocker M (2004) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* **5**:758–770.
- Tomizawa M and Casida JE (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* **48**: 339–364.
- Tomlin CDS (2003) *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 13th ed. British Crop Protection Council, Alton, UK.
- United Nations Environment Programme (UNEP) (2000) *The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer as either adjusted and or amended in London, 1990; Copenhagen, 1992; Vienna, 1995; Montreal, 1997; and Beijing, 1999*. UNEP/Ozone Secretariat, Nairobi, Kenya.
- United Nations Environment Programme (UNEP) (2006) *Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee*. UNEP/Ozone Secretariat, Nairobi, Kenya.
- Valmas N and Ebert PR (2006) Comparative toxicity of fumigants and a phosphine synergist using a novel containment chamber for the safe generation of concentrated phosphine gas. *PLoS ONE* **1**:e130.
- Wicher D, Walther C, and Wicher C (2001) Non-synaptic ion channels in insects—basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* **64**:431–525.
- Wicher D, Agricola HJ, Schonherr R, Heinemann SH, and Derst C (2006) TRP-gamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *J Biol Chem* **281**:3227–3236.
- Yang RS, Witt KL, Alden CJ, and Cockerham LG (1995) Toxicology of methyl bromide. *Rev Environ Contam Toxicol* **142**:65–85.
- Yates SR, Gan J, and Papiernik SK (2003) Environmental fate of methyl bromide as a soil fumigant. *Rev Environ Contam Toxicol* **177**:45–122.
- Zheng W, Yates SR, Guo M, Papiernik SK, and Kim JH (2004) Transformation of chloropicrin and 1,3-Dichloropropene by metam sodium in a combined application of fumigants. *J Agric Food Chem* **52**:3002–3009.

---

**Address correspondence to:** Dr. Bruno Lapied, Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur, Equipe d'Accueil 2647/USC Institut National de la Recherche Agronomique, Université d'Angers, Unité de Formation et de Recherche Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France. E-mail: bruno.lapied@univ-angers.fr

---

## ***RESUME DES RESULTATS OBTENUS***

### ***1. Effets du DMDS sur les courants $K_{Ca}$***

Comme nous l'avons précédemment décrit, le DMDS (1  $\mu$ M) augmente de façon très importante la fréquence des potentiels d'action des DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. Cette augmentation de fréquence est associée à une diminution significative de la phase de post-hyperpolarisation. En poursuivant nos investigations sur les courants potassium, nous avons montré que le DMDS module le courant global, composé d'un pic transitoire et d'une phase maintenue. Dans les premières minutes, le DMDS augmente la composante maintenue de ce courant avant de diminuer l'amplitude des deux composantes. L'utilisation d'ibériotoxine a ensuite révélé que le DMDS agit sur le courant potassium dépendant du calcium des DUM neurones. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens anti-pSlo a également confirmé que les canaux  $K_{Ca}$  sont la cible du DMDS. Cependant, l'effet en deux temps observé suggère une action indirecte du DMDS *via* un mécanisme de régulation intracellulaire tel le calcium. Les courants  $K_{Ca}$  étant dépendants du calcium nous avons poursuivi nos investigations dans ce sens.

Nous sommes parti de l'hypothèse que l'augmentation de fréquence induite par le DMDS provoquerai une entrée de calcium dans la cellule *via* les canaux Na/Ca (Defaix et Lapied, 2005) et les canaux calcique de type LVA (Grolleau et Lapied, 1996) et que cet influx de calcium est à l'origine des variations de l'amplitude du courant potassium.

### ***2. Effets du DMDS sur la concentration de calcium intracellulaire***

Comme supposé, le DMDS (1  $\mu$ M) provoque une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui débute par le pole apical du neurone. Grâce à l'utilisation d'une solution extracellulaire dépourvue de calcium, nous avons montré que la première étape de l'augmentation interne du calcium a une origine exogène. Nous avons ensuite voulu déterminer quel(s) type(s) de canaux sont impliqués dans l'influx de calcium. L'élévation de calcium intracellulaire observée au niveau du pole apical a orienté nos investigations vers les canaux de type TRP $\gamma$  (Wicher et coll., 2004; Wicher et coll., 2006). L'application de LOE 908, un inhibiteur des canaux TRP $\gamma$ , réduit considérablement l'augmentation induite par le DMDS ce qui indique que ces canaux sont impliqués dans l'élévation du calcium

intracellulaire. Un prétraitement des cellules avec l' $\omega$ -conotoxine GVIA (inhibiteur des canaux calciques de type HVA), n'implique pas les canaux calciques de type HVA dans l'effet du DMDS.

Après avoir étudié la composante exogène intervenant dans l'élévation de calcium induite par le DMDS, nous nous sommes intéressés à l'identification des mécanismes intracellulaires susceptibles d'être impliqués. Les résultats obtenus jusqu'à présent nous orientent vers un mécanisme type « Calcium Induce Calcium Release » (CICR), c'est-à-dire que l'entrée de calcium dans la cellule induirait une sortie de calcium des stocks intracellulaires. Afin d'évaluer l'implication des stocks intracellulaires, nous avons utilisé la thapsigargine qui inhibe les pompes à calcium ATPasique des réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, SERCA). Les SERCA permettent la recapture du calcium dans les systèmes de stockage de la cellule. Leur inhibition permet donc de vider ces stocks intracellulaires (Heine et Wicher, 1998). Suite à un prétraitement avec la thapsigargine, le DMDS n'induit qu'une faible montée du calcium intracellulaire ce qui permet de conclure que l'effet du DMDS sur le niveau de calcium passe par une mobilisation des stocks intracellulaires.

Sur les DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*, les récepteurs les plus souvent impliqués dans le CICR sont les récepteurs à ryanodine (Heine et Wicher, 1998; Messutat et coll., 2001). Le DMDS appliqué après un prétraitement à la ryanodine, à sa concentration inhibitrice (100  $\mu\text{M}$ ), provoque une faible élévation du niveau de calcium intracellulaire du même ordre de grandeur que celle induite par le DMDS après prétraitement à la thapsigargine. Ces élévations du calcium intracellulaire induites par le DMDS après traitement à la ryanodine ou à la thapsigargine sont significativement différentes de celles provoquées par le DMDS seul confirmant ainsi l'hypothèse que l'effet du DMDS passe par un mécanisme de type CICR.

### **3. Effets du calcium intracellulaire sur l'amplitude du courant $K_{\text{Ca}}$**

Afin de déterminer l'influence du calcium sur le courant  $K_{\text{Ca}}$ , deux conditions expérimentales ont été mises en place pour augmenter le calcium, par l'intérieur de la pipette et par la solution extracellulaire. De la même manière que le DMDS mais plus marquée, l'élévation du calcium intracellulaire, par la solution intrapipette induit tout d'abord une augmentation du courant potassium (les deux composantes) puis une inhibition.

L'augmentation du calcium par la solution extracellulaire a les mêmes effets sur le courant potassium soit dans un premier temps une augmentation, puis une réduction.

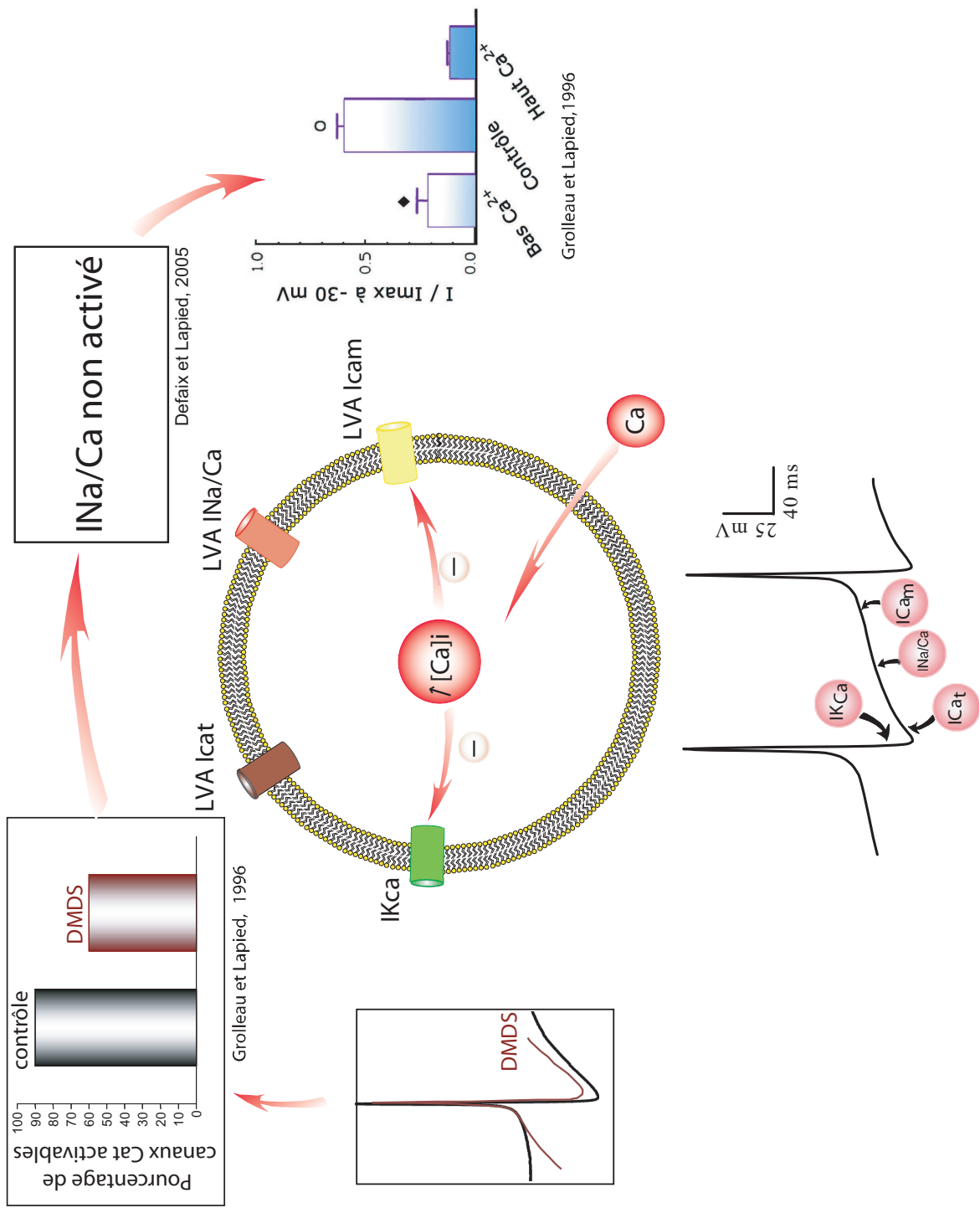
D'après les résultats obtenus, le courant  $K_{Ca}$  des DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana* est régulé en cloche selon la concentration de calcium intracellulaire. Les effets du DMDS sur le courant  $K_{Ca}$  peuvent donc être dus à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire.

#### **4. Conclusion et perspectives**

En conclusion, l'augmentation de la fréquence des potentiels d'action des DUM neurone par le DMDS, induit une entrée de calcium par les canaux responsables de la phase de prédépolarisation, c'est-à-dire les canaux Na/Ca et les canaux calciques de type LVA ( $ICa_t$  et  $ICa_m$ ) (Grolleau et Lapied, 2000; Wicher et coll., 2001; Defaix et Lapied, 2005). Cette première entrée de calcium s'ajoute au niveau de base de calcium du neurone, la concentration en calcium intracellulaire devient alors suffisante pour activer les canaux de type  $TRP\gamma$  (Grolleau et coll., 2006). Ce nouvel influx de calcium exogène pourrait déjà agir sur les canaux  $K_{Ca}$ , en augmentant l'amplitude du courant, ce qui reste une hypothèse. La principale conséquence de l'influx *via* les canaux de type  $TRP\gamma$  est la modulation des récepteurs à ryanodine qui vont permettre une sortie de calcium en provenance des stocks intracellulaire, ce qui correspond à un CICR. Cette nouvelle augmentation de calcium agirait alors sur les courants  $K_{Ca}$  mais de manière inhibitrice. La réduction de l'amplitude des courants  $K_{Ca}$  réduit la phase de post-hyperpolarisation du potentiel d'action ce qui contribue à une potentialisation de la décharge à haute fréquence des potentiels d'action.

Mais une forte réduction de l'amplitude de la post-hyperpolarisation peut être à l'origine d'une inhibition de l'activité spontanée. En effet, la phase de prédépolarisation qui conditionne la fréquence de décharge et qui permet d'atteindre le seuil de déclenchement du PA fait intervenir trois types de courants ioniques activés pour des potentiels négatifs. Ces courants ioniques ont été identifiés comme étant des courants calciques de type LVA transitoire ( $ICa_t$ ) et maintenu ( $ICa_m$ ) (Grolleau et Lapied, 1996) et un courant calcico-sodique maintenu ( $INa/Ca$ ) (Defaix et Lapied, 2005). C'est l'organisation fonctionnelle synchronisée des trois courants qui conditionne le développement de la phase de prédépolarisation. Le  $ICa_t$  est activé en premier. Il permet de dépolariser la membrane pour atteindre une gamme de





**Figure 31**  
Schéma hypothétique de l'effet indirect du DMDS sur les courants LVA Cat, Na/Ca et Cam à partir de la réduction de la post-hyperpolarisation.

potentiel compatible avec celle du  $\text{INa}/\text{Ca}$ . Ce courant une fois activé va lui même déclencher l'activation du courant calcique maintenu. Dans ce dernier cas le seuil de déclenchement du PA est atteint.

Si la diminution de la post-hyperpolarisation est trop importante elle ne permet plus d'hyperpolariser la membrane suffisamment pour activer le  $\text{ICa}_t$  (Figure 31). De plus l'augmentation de calcium intracellulaire observée sous DMDS peut inhiber le courant calcico-sodique et le courant calcique maintenu, ces deux derniers courants étant connus pour être régulés par le calcium intracellulaire (Grolleau et Lapied, 1996 ; Defaix et Lapied 2005). Tous ces facteurs réunis peuvent concourir à une inhibition réversible de la phase de prédépolarisation ce qui expliquerait les phases de silence observées. Seule l'étude des effets du DMDS sur chacun de ses courants permettrait de confirmer cette hypothèse.

Parallèlement à ces perspectives, des améliorations pourraient être apportées à l'utilisation des oligonucléotides anti-sens. En effet, la limite de cette technique dans les conditions que nous avons testées est la fragilité des membranes neuronales, accentuée à 48h d'incubation, qui rend délicates les expérimentations. Cette fragilité est due au traitement avec les oligonucléotides mais également à notre technique de dissociation cellulaire qui engendre un stress important pour les cellules. Lors d'une dissociation sans traitement avec des oligonucléotides, les cellules incubent pendant 24h dans les meilleures conditions (cf 2<sup>ème</sup> partie, Chapitre 2) ce qui permet de diminuer les effets délétères dus au processus technique et de stabiliser les cellules. Or lors d'un traitement avec les oligonucléotides nous introduisons un facteur de stress supplémentaire dont les effets délétères sont susceptibles de se combiner avec ceux de la dissociation. Pour empêcher cette synergie néfaste aux cellules, il faudrait séparer dans le temps l'étape de dissociation et celle du traitement. Cette séparation est cependant difficile dans le cadre de culture à court terme (24h, exceptionnellement 48h), comme c'est le cas dans les expériences présentées dans ce travail. Seules des cultures à plus long terme (2 à 3 semaines) (Lapied et coll., 1993 ; Smith et Howes, 1996) permettraient de combiner des cellules stables lors du traitement et une durée de traitement suffisante. De plus, des neurones stables sont susceptibles de mieux réagir aux traitements et ainsi de diminuer leur durée.

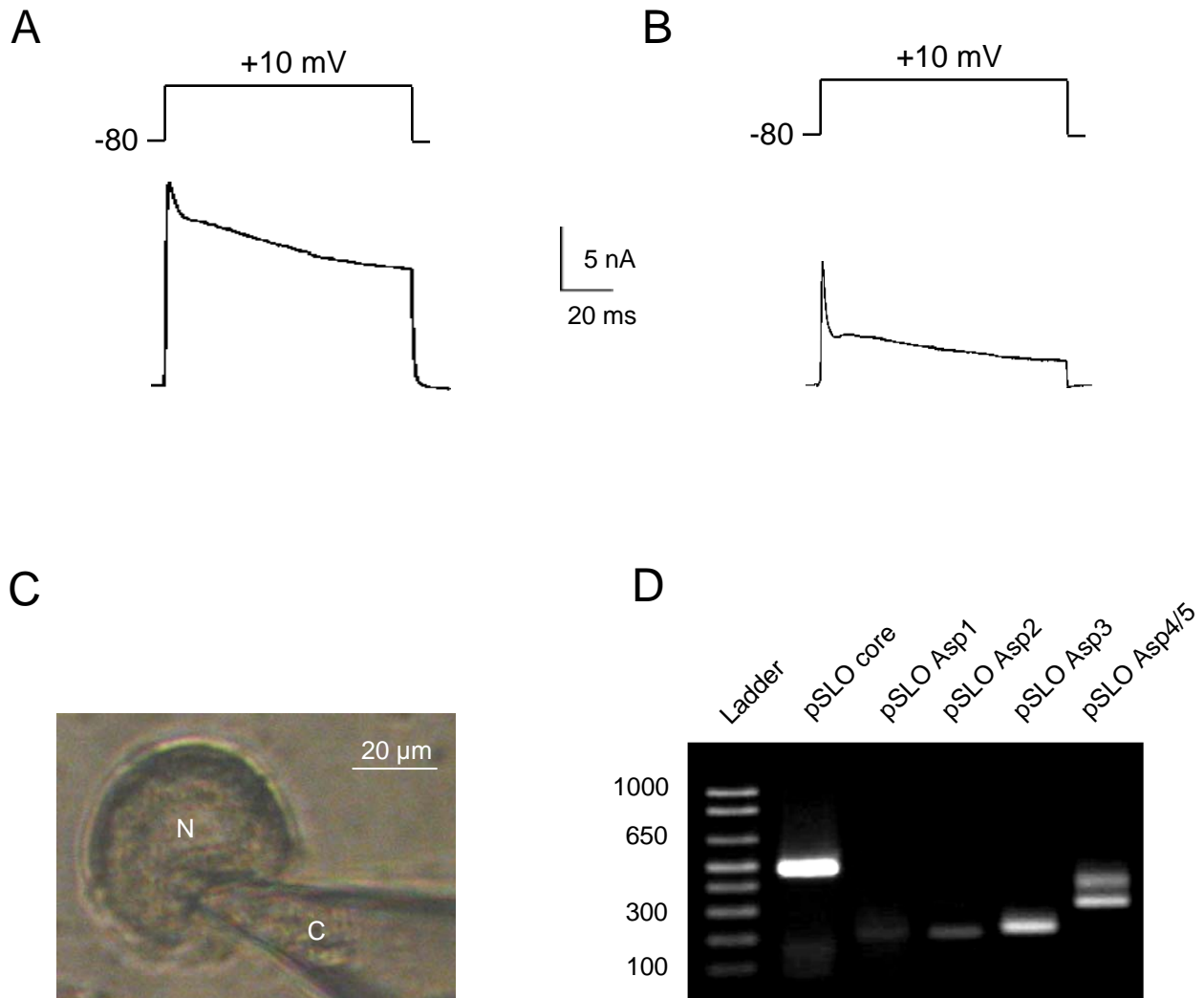
## **2- Caractérisation moléculaire des variants de pSlo dans les DUM neurones**

L'étude du mode d'action du DMDS sur les DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana* nous a conduit à nous intéresser de plus près aux courants potassiques dépendants du calcium, plus précisément aux variants de l'épissage alternatif de pSlo exprimés par ces neurones (Figure 32).

L'un des critères électrophysiologiques de sélection des neurones a été l'enregistrement d'un courant potassium global (Figure 32A) sur lequel l'action du cadmium, connu pour inhiber de façon indirecte les courants  $K_{Ca}$  (Grolleau et Lapied, 2000; Heidel et Pfluger, 2006) a été testée (Figure 32B). La photo (Figure 32C) illustre le prélèvement du cytoplasme après l'enregistrement électrophysiologique. C'est à partir des ARN messagers contenus dans ce cytoplasme qu'il nous a été possible d'amplifier certaines séquences de pSlo présentes dans les DUM neurones.

Pour tester la présence d'ARNm codant pour les canaux pSlo, le premier couple d'amorce a été choisi pour amplifier le core du canal, séquence identique pour tous les variants d'expression (Figure 32D, puit 2). Les puits 3 à 6 du gel 32D correspondent aux variants d'expressions de pSlo, caractérisés par Derst et coll. (2003) sur le système nerveux central de *Periplaneta americana*, que nous avons identifié sur DUM neurones. Tous les variants, Asp1 à Asp4/5, sont présents dans les DUM neurones.

Ces résultats ne constituent qu'une première étape. La vérification de la présence de ces variants d'expression était essentielle avant de vouloir identifier s'il existe des arrangements particuliers de ces variants. En effet, il est admis que la diversité génétique des canaux pSlo résulte de l'épissage alternatif (Wicher et coll., 2001). L'étude des combinaisons fonctionnelles de ses variants chez les DUM neurones est susceptible d'apporter un argument supplémentaire en faveur de l'existence de deux canaux pSlo, responsables l'un de la composante transitoire du courant et l'autre de la composante maintenue.



### Figure 32

**A :** courant potassium global obtenu par l'application d'un choc dépolarisant (potentiel de référence : -80 mV, choc : + 10 mV, durée : 200 ms).

**B :** courant inhibé par le chlorure de cadmium (obtenu par soustraction des courants enregistrés avant et après le chlorure de cadmium).

**C :** Photographie d'un corps cellulaire de DUM neurone qui montre un prélèvement de cytoplasme en cours. C : cytoplasme ; N : noyau.

**D :** Amplification par RT-PCR sur DUM neurone du core de pSlo et des variants d'expression Asp1 à Asp5. La séparation des amplicons a été effectuée sur gel d'agarose 1,7%, TAE 0,5X.

## **C- Conclusions et perspectives**

En combinant les techniques d'électrophysiologie et d'imagerie calcique nous avons pu montrer, dans une première partie, que le DMDS agit de façon complexe et spécifique sur les courants  $K_{Ca}$ . Les résultats présentés révèlent également que le DMDS agit en augmentant le niveau de calcium intracellulaire, ce qui est à l'origine des effets sur les courants  $K_{Ca}$ . Il reste cependant d'autres cibles potentiellement touchées par le DMDS, tels les courants calciques de type LVA et le courant calcico-sodique, à identifier.

Au-delà de l'identification de certaines cibles, l'étude du mode d'action du DMDS a apporté de nouvelles informations sur les courants potassium dépendants du calcium des DUM neurones de *P. americana* ainsi que des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de deux courants distincts.

En effet, sur les DUM neurones de la blatte *P. americana*, les courants  $K_{Ca}$  ont deux composantes : une transitoire qui s'active et s'inactive rapidement et une maintenue qui s'active plus lentement et ne s'inactive pas (Grolleau et Lapied, 1995). Une des hypothèses permettant d'expliquer ces deux composantes est l'existence de deux types de courants  $K_{Ca}$  (Grolleau et Lapied, 1995 ; Grolleau et Lapied, 2000; Wicher et coll., 2001; Derst et coll., 2003; Heidel et Pflugger, 2006). Plusieurs arguments, avancés au cours de différentes études, vont dans cette direction. Le premier argument est la composante biphasique du courant, où l'idée de deux courants ayant des propriétés d'activation et d'inactivation différentes serait biologiquement plus compatible qu'un seul courant. D'autant plus que les deux composantes ont pu être séparées grâce au potentiel conditionnant avant un choc dépolarisant (Grolleau et Lapied, 1995). Le deuxième argument en faveur de cette hypothèse est la différence entre le courant pSlo exprimé dans les cellules HEK293, qui ne présente que la composante maintenue, et le courant  $K_{Ca}$  enregistré sur DUM neurones natifs (Derst et coll., 2003). Toutefois, l'origine de ces deux courants peut être le fruit de deux transcrits, donc de deux protéines, ou d'un seul transcrit associé ou non à la présence d'une sous-unité auxiliaire de type  $\beta$  (Derst et coll., 2003; Heidel et Pflugger, 2006).

Dans la première partie de ce chapitre nous avons montré qu'une élévation de calcium, par l'intérieur ou l'extérieur de la cellule, induit une augmentation suivie d'une diminution du courant  $K_{Ca}$ . Cette modulation en cloche, tout comme l'effet du DMDS, est sensiblement

différente pour la composante maintenue et la composante transitoire. En effet, le DMDS induit une augmentation significative de la composante maintenue mais pas pour la composante transitoire. De plus, le DMDS diminue la composante transitoire de manière plus importante et plus rapide que la composante maintenue. Cette diminution plus importante de la composante transitoire est également observée lors de l'augmentation de calcium intracellulaire. Sans le prouver, ces résultats vont dans la direction de deux courants potassium dépendants du calcium.

L'autre argument en faveur de cette hypothèse est la différence de cinétique observé lors de l'inhibition des courants par l'utilisation d'oligonucléotides. En effet, dès 24h la composante transitoire est beaucoup plus touchée que la composante maintenue. Si la technique de RT-PCR sur cellule unique permet d'identifier des arrangements de variants particuliers, leur inhibition sélective pourrait confirmer l'hypothèse de deux transcrits distincts ou orienter les recherches vers une sous-unité de type  $\beta$ .



## CHAPITRE 1 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Ce chapitre traite de l'évolution des conditions expérimentales et de la technique d'enregistrement d'électroencéphalogramme (EEG) mises en place pour répondre au mieux à notre problématique : le DMDS a-t-il un effet sur l'activité EEG de souris ? Au fil de l'avancée des travaux, des problèmes rencontrés et des questions soulevées, nous avons amélioré notre protocole afin de réaliser nos expériences dans les meilleures conditions.

Les expériences préliminaires, par la technique « classique » (avec câbles) d'enregistrement d'EEG ont été réalisées au laboratoire de Neurobiologie, UPRES EA 2633, Université d'Orléans. Le protocole utilisant la télémétrie a, lui, été réalisé au laboratoire RCIM pour les enregistrements et au service commun animalerie hospitalo-universitaire (SCAHU, Université d'Angers) pour la chirurgie préparatrice.

### **A. Le choix du modèle animal**

Les souris sont parmi les modèles animaux de pathologies humaines, les plus utilisées, et notamment pour étudier les maladies neurodégénératives (Langui et coll., 2007) ou les épilepsies (Baraban, 2007).

La première souche de souris utilisée dans les tests préliminaires est la souche CBA/J, une lignée consanguine dite « sensible » aux convulsivants, tels que la méthionine sulfoximine et la phosphinothricine, étudiés au laboratoire de Neurobiologie (UPRES EA 2633) (Lapouble et coll., 2002). Par la suite, la lignée non consanguine Swiss, a été choisie car elle ne présente aucun phénotype particulier vis-à-vis des convulsivants et représente une population hétérogène utilisée en toxicologie.



## **B. Mise au point et validation du système d'inhalation**

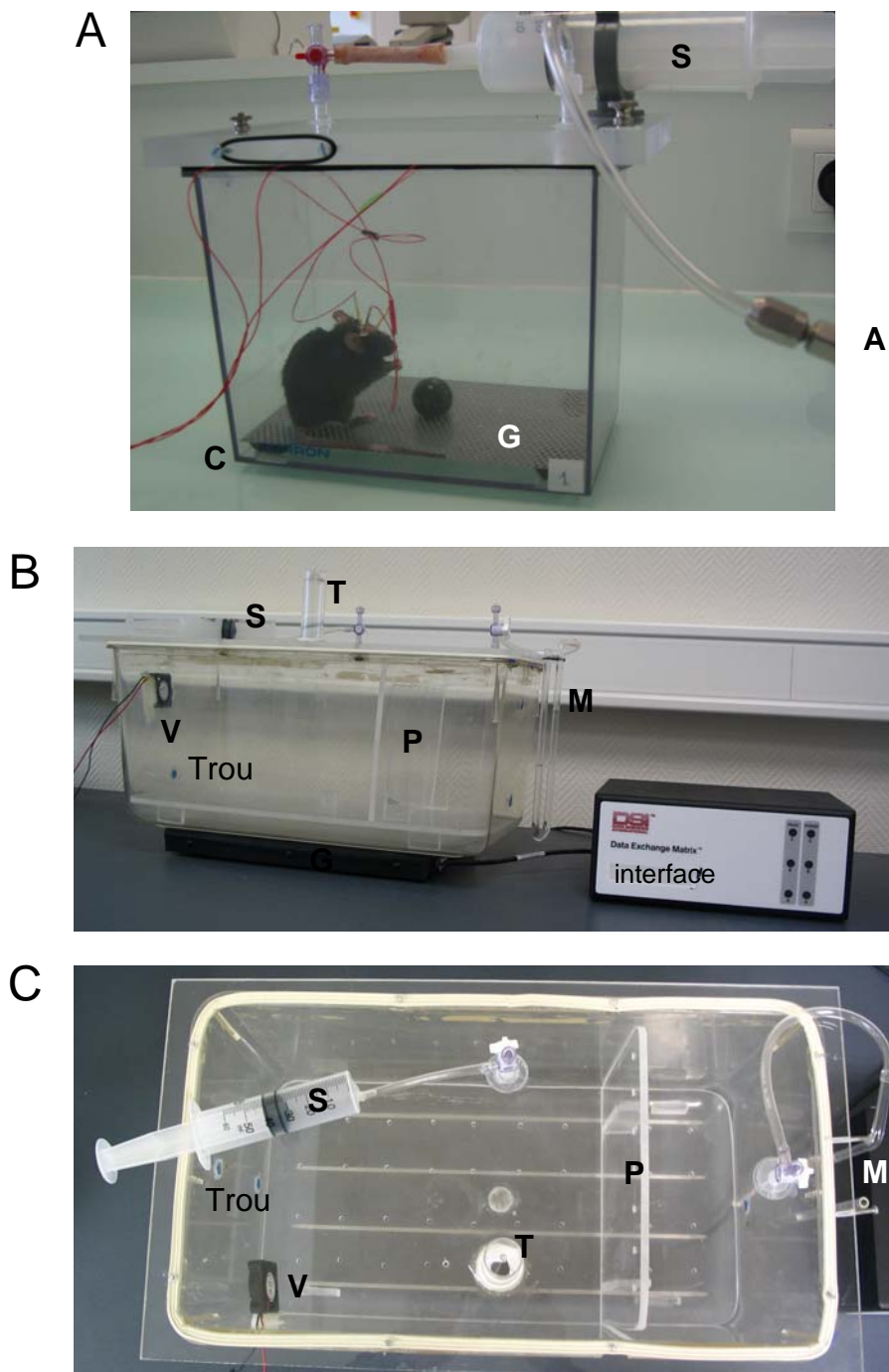
Les premières expérimentations réalisées au Laboratoire de Neurobiologie utilisent des boîtes (figure 33A) conçues pour des études de métabolisme qui présentent certains inconvénients notamment un volume total limité (1,6 L) et aucun dispositif pour l'application de DMDS. Dans le but de réaliser les expérimentations dans les meilleures conditions, une chambre d'inhalation a été conçue en nous inspirant des boîtes de métabolisme du laboratoire de Neurobiologie et des expérimentations publiées par Dugravot et coll. (2003).

### **1. Chambre d'inhalation**

La chambre d'inhalation réalisée (Figure 33B et C) présente un volume de 20L. Afin d'assurer l'étanchéité de la chambre, un joint en caoutchouc repose sur le rebord supérieur de la boîte. De plus, le couvercle en plexiglas comporte huit points d'ancrages. Un manomètre à eau permet de vérifier l'étanchéité et les variations de pression à l'intérieur de la chambre. Les dépressions générées par la consommation en oxygène de la souris sont compensées par injection d'air à l'aide d'une seringue. Le CO<sub>2</sub> et la vapeur d'eau sont respectivement absorbés par de l'hydroxyde de potassium et du dichlorure de calcium placés en arrière du portoir à boisson pour éviter tout contact avec l'animal.

Afin d'éviter que le DMDS ne soit absorbé, la litière en copeaux de bois utilisée lors de l'hébergement des souris a été supprimée. Une plaque perforée en plexiglas a été positionnée à environ 2 cm de hauteur afin de permettre l'écoulement des urines et ainsi limiter la gêne de l'animal.

Le DMDS est appliqué sur un papier Watman et inséré dans un tube vissé sur le couvercle. Le DMDS présentant une densité supérieure à l'air, une application par le haut permet de s'assurer que le DMDS se volatilise au mieux. Un petit ventilateur annexe a, de plus, été scellé à l'habitable afin d'assurer une répartition homogène du DMDS dans la chambre.



**Figure 33**

**A** : Dispositif expérimental d'enregistrement des électroencéphalogrammes, utilisé dans l'étude préliminaire au laboratoire de Neurobiologie. A: arrivée d'air ; C: câbles reliés à l'électroencéphalographe ; G: grille ; S: seringue permettant de vérifier la pression dans la cage.

**B et C** : Photographies de la boîte d'inhalation conçue par la suite pour les expérimentations. G : grille en plexiglas perforée pour l'écoulement des urines. M : manomètre à eau permettant de vérifier la pression à l'intérieur. P : portoir à biberon perforé. S : seringue pour réintroduire de l'air. T : tube pour l'introduction du DMDS. V : ventilateur pour l'homogénéisation des gaz. Certains trous (obturés par des septum bleus) réalisés pour vérifier la teneur en DMDS sont indiqués.

**B** : Vue de côté. La plaque réceptrice est située sous l'habitacle. Elle est reliée à l'interface à droite.

**C** : Vue de dessus.

## **2. Validation du système**

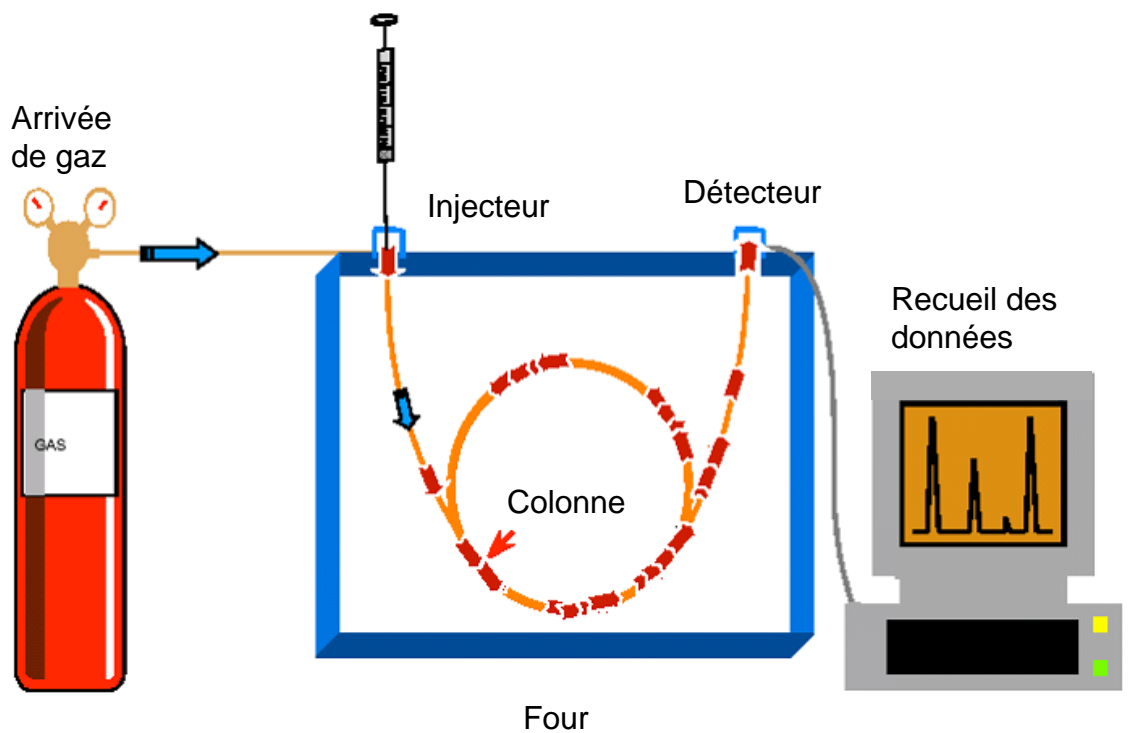
Afin de pouvoir utiliser la chambre d'inhalation dans le cadre de nos expérimentations, une étape préliminaire visant à vérifier la répartition homogène du DMDS dans l'habitacle a été nécessaire. Ainsi, des mesures par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) ont été réalisées à l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte à Tours.

### **a) Principe de la technique**

La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour séparer, identifier et quantifier les produits volatils et thermostables. Le principe, résumé sur la figure 34, consiste tout d'abord à injecter le mélange à séparer dans l'injecteur et à le vaporiser à chaud. Ensuite ce « nuage » est transporté au travers d'une colonne de séparation grâce à un gaz porteur. La séparation s'effectue à chaud grâce à la colonne et à sa phase stationnaire. La détection des produits séparés s'effectue en sortie de colonne. Un des détecteurs le plus répandu est le détecteur par ionisation à flamme (en anglais: FID), mais la proportion des spectromètres de masse (GC-MS) croît à cause de l'extrême sensibilité de ce détecteur et au fait que l'obtention du spectre de masse permet l'identification des produits.

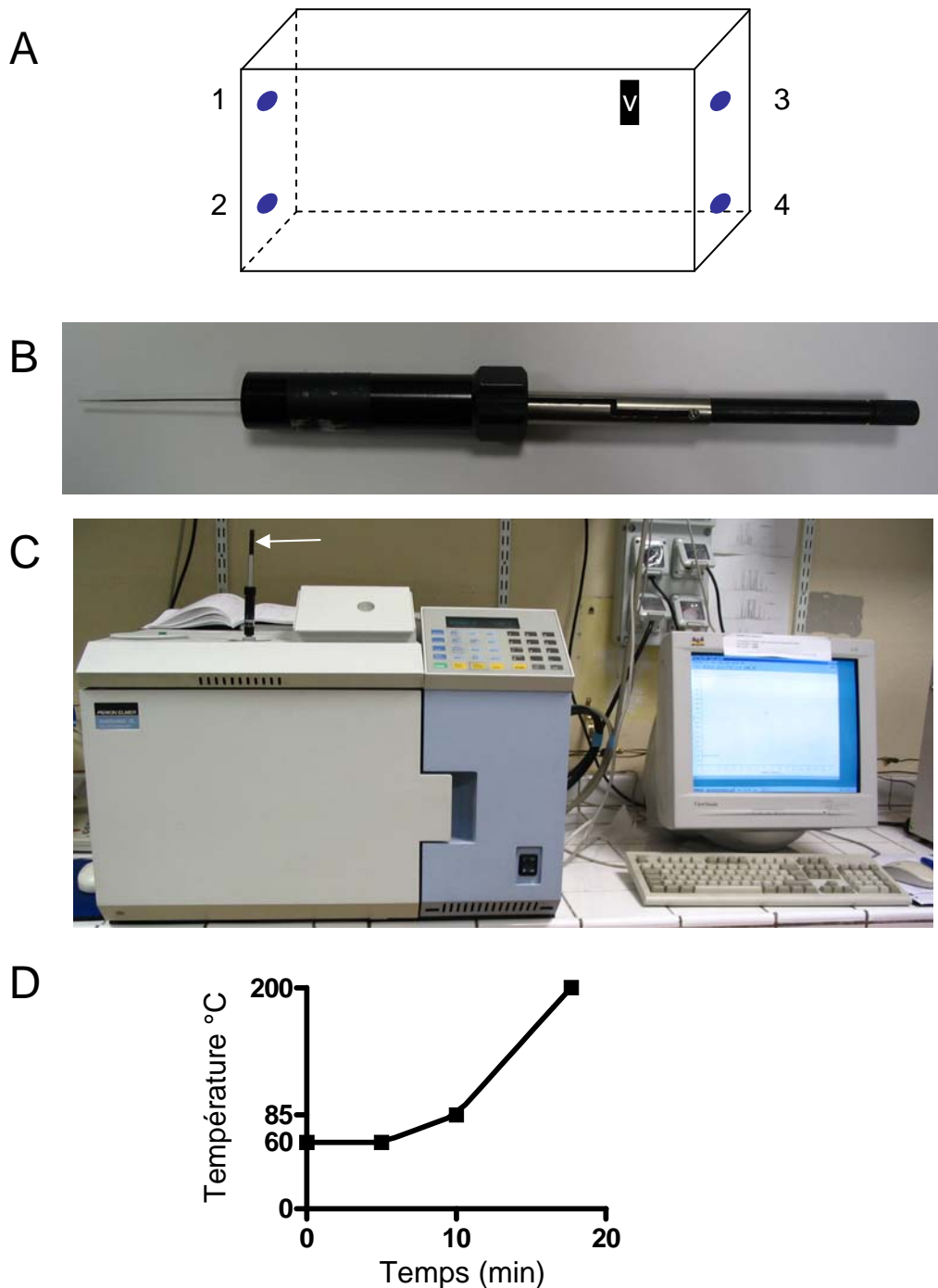
### **b) Piégeage du DMDS**

Les mesures de DMDS ont nécessité de modifier la chambre d'inhalation précédemment décrite. Quatre trous, dont le positionnement est schématisé figure 35A, ont été effectués dans l'habitacle puis obturés avec un septum (Chromsep blue 12 mm, Chrompack, Les Ulis, France) dans lequel une fibre SPME (Solid Phase Micro Extraction) a été introduite. Cette fibre rétractable est recouverte d'un adsorbant (polydiméthylsiloxane 100  $\mu$ M, SUPELCO, Bellefonte, PA) sur lequel sont piégées les molécules volatiles dont le DMDS. La fibre est positionnée à l'intérieur d'une seringue (SUPELCO) qui permet de percer le septum, de positionner la fibre puis de la rétracter (Figure 35B). Après un piégeage de 5 minutes la fibre est immédiatement introduite dans l'injecteur du chromatographe (Figure 35C) où les molécules sont désorbées par la chaleur (200°C).



**Figure 34**

Principe de la chromatographie en phase gazeuse. Les composants à analyser sont injectés dans la colonne. Le gaz porteur permet de les véhiculer au travers la colonne. Le programme de température est déterminé par l'expérimentateur et dépend des composants recherchés. Un détecteur est placé à la sortie du four et transmet les informations à l'ordinateur et au logiciel d'acquisition des données.



**Figure 35**

**A :** Représentation schématique de la boîte d'inhalation. Les positions des points de piégeage du DMDS sont indiquées par les chiffres 1 à 4 en référence à la position du ventilateur (v).

**B :** Seringue de piégeage de micro-extraction en phase solide (Solid Phase MicroExtraction, SPME)

**C :** Chromatographe utilisé lors des expérimentations et ordinateur utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. La flèche représente la seringue SPME positionnée lors d'une injection de DMDS.

**D :** Programme de chauffage du four choisi pour détecter le DMDS.

### **c) Acquisition et traitement des données**

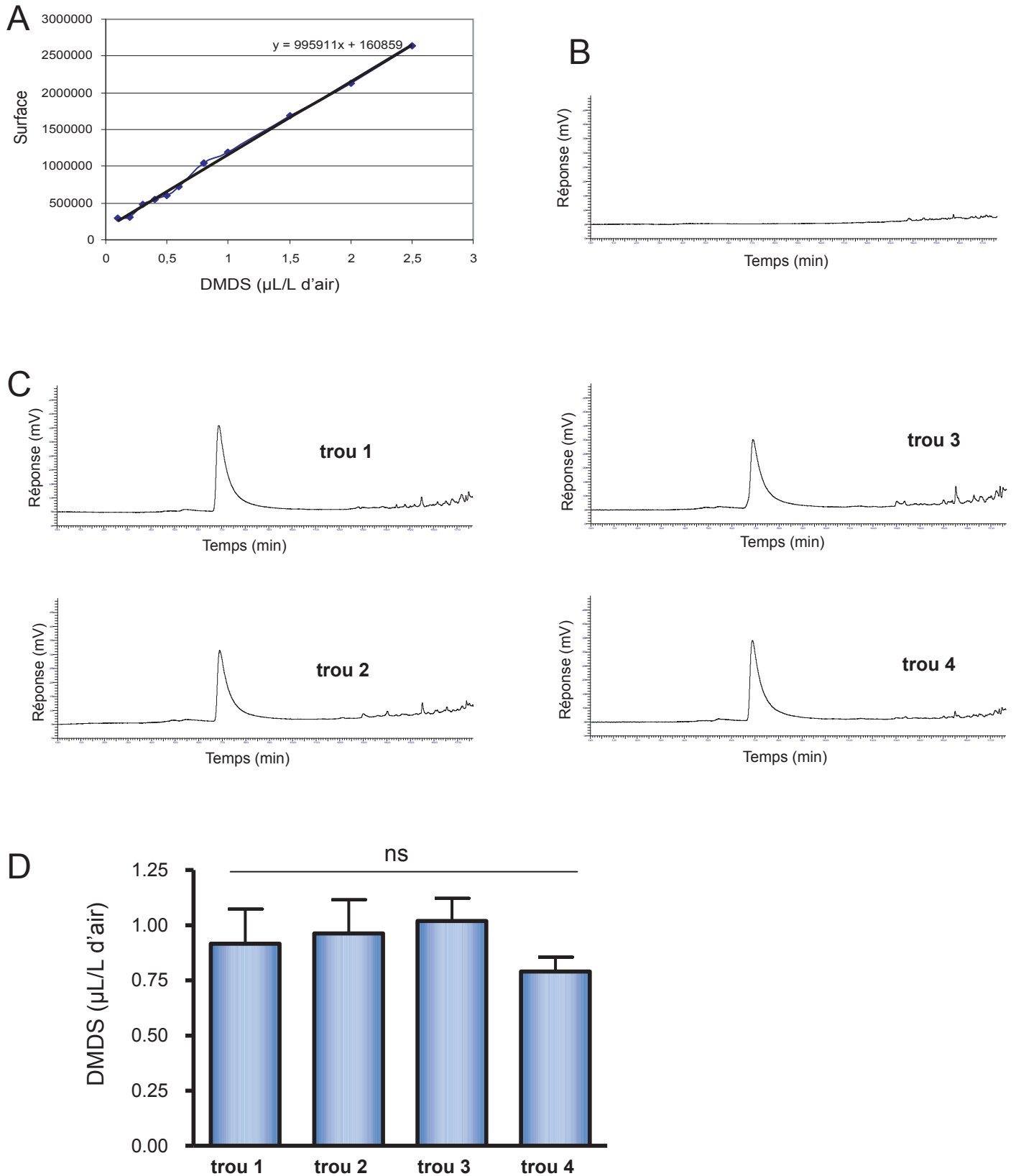
Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse (Gas Chromatograph AutoSystem XL, Perkin Elmer, Norwalk, USA) avec un injecteur PSS (Programable Split-Splitless) et une colonne capillaire de méthylpolysiloxane (phényle 5%) (PE-5MS: 20 m x 0,18 mm x 0,18  $\mu$ m, Perkin Elmer). Le gaz vecteur est l'hydrogène. La température de la colonne (Figure 35D) est de 60°C pendant cinq minutes puis augmente jusqu'à 85°C, de 5°C par minute. Elle montera ensuite jusqu'à 200°C à raison de 15°C par minute. Le détecteur utilisé est un spectromètre de masse (Turbomass, Perkin Elmer), relié à un ordinateur qui permet l'acquisition et l'analyse des résultats *via* le logiciel Turbochrom workstation (version 6.1, Perkin Elmer). Les TIC (total-ion chromatogram) sont enregistrés en mode d'impact électronique (70eV) et les données traitées en plein écran (full-scan).

### **d) Vérification de la teneur en DMDS dans les boîtes d'inhalation par chromatographie en phase gazeuse**

Les travaux préalablement réalisés par l'équipe de l'IRBI ont fourni les informations nécessaires à l'identification du DMDS sur les chromatogrammes, c'est-à-dire son temps de rétention et la gamme étalon (Figure 36A) qui lie de façon linéaire la surface des pics obtenus et la concentration en DMDS. Ainsi, le temps de rétention attendu du DMDS, dans les conditions précédemment décrites, se situe entre 6,88 et 6,9 minutes.

Dans un premier temps, des mesures ont été réalisées en l'absence de DMDS afin de vérifier qu'il n'y a pas de substances contaminantes dans l'habitacle, qui pourraient avoir le même temps de rétention que le DMDS (Figure 36B). Les chromatogrammes figure 36C correspondent aux piégeages réalisés aux quatre trous de la boîte (Figure 35A) lors de l'introduction de DMDS à 1  $\mu$ L/L d'air. Pour chaque piégeage, le pic attendu, correspondant au DMDS, est similaire.

La teneur en DMDS réelle dans l'air est quantifiée à l'aide de la gamme étalon préalablement réalisée à l'IRBI (Figure 36A). Nous avons ainsi fait correspondre la surface du pic à la concentration de DMDS réelle aux quatre points de piégeage dans la boîte. Les histogrammes figure 36D montrent la moyenne des prises pour chaque emplacement. Il



**Figure 36**

A : Gamme étalon du DMDS donnant la relation entre la surface des pics et la concentration de DMDS. Source, Lauréline Roy, IRBI.

B : Blanc réalisé avant l'introduction du DMDS dans l'habitable.

C : Exemples de chromatogrammes enregistrés pour chacun des points de piégeage du DMDS : 1, 2, 3, 4.

D : Moyenne des prises réalisées à chaque point de piégeage (n=4). Test statistique : ANOVA, test de Kruskal-Wallis.

n'existe aucune différence significative entre les concentrations en DMDS des quatre trous (ANOVA, test de Kruskal-Wallis,  $p=0,4380$ ) ce qui confirme que le DMDS se distribue de façon homogène à l'intérieur de l'habitacle.

## **C. Enregistrement d'activités électroencéphalographiques de souris**

Les enregistrements d'activités EEG ont été réalisés dans un premier temps par une technique conventionnelle (avec câbles), puis par télémétrie (Kramer et Kinter, 2003; Weiergraber et coll., 2005). Nous présenterons une comparaison des deux techniques pour chaque étape, de la chirurgie jusqu'aux analyses des résultats.

### **1. Chirurgie**

La chirurgie de la technique classique est relativement facile et rapide, contrairement à celle pour l'implantation des transmetteurs de télémétrie. Cette dernière nécessite des connaissances et des habilitations spécifiques acquises au cours de stages d'expérimentation animale niveau 1 et de chirurgie expérimentale (ENV, Nantes. Agrément n° 49057).

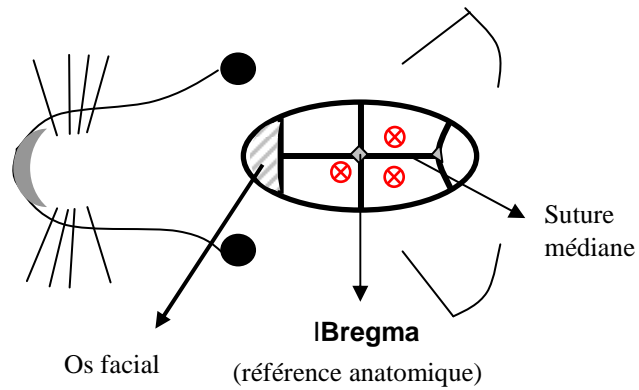
#### *Technique conventionnelle*

Les animaux utilisés sont des souris CBA/J mâles, âgées de 10 à 12 semaines (Elevage Dépre, Ardenay, France) et anesthésiées par inhalation d'isoflurane (AErrane<sup>®</sup>, Baxter S.A., Maurepas, France). Le système employé (Équipement Vétérinaire Minerve, Esternay, France) comprend une cuve à évaporation, où l'anesthésique est volatilisé, est reliée d'une part, à l'arrivée d'air comprimé, *via* un débitmètre, et d'autre part, à la cage d'induction et au plan de travail. Pendant la phase d'induction, la souris est placée dans une boîte en plexiglas hermétique, où elle inhale de l'air contenant 4,5% d'isoflurane. Lorsque l'animal est endormi (3-4 minutes), il est positionné sur un plan de travail muni d'un dispositif qui permet une anesthésie en continu (2% d'isoflurane) lors de l'implantation des électrodes.

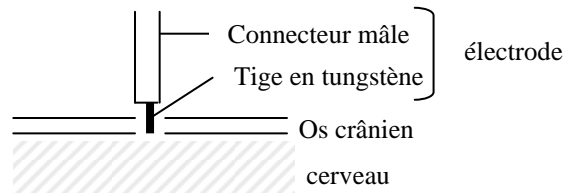
Une incision longitudinale est alors pratiquée au niveau du crâne. A l'aide d'une fraise dentaire, trois trous sont effectués dans l'os du crâne : un au niveau frontal en avant du point



**A**



**B**



**Figure 37**

**A** : Représentation schématique de la localisation de l'insertion des électrodes, vue de dessus.

⊗ Points d'insertion des électrodes.

**B** : Schéma en coupe de la zone d'implantation des électrodes. Les électrodes ne pénètrent pas dans le cortex.

bregma et deux au niveau pariétal en arrière du point bregma, de part et d'autre de la suture médiane (Figure 37A). Les trois électrodes, constituées d'une tige en tungstène (longueur : 1 mm, diamètre : 150 µm) (rod, tungstène, 0.010x4 inch, Phymed, Paris, France) sont soudées à un connecteur mâle (wire-pro 220-PO200, Farnell, Villefranche, France) puis insérées dans les orifices avant d'être maintenues avec de la colle cyanolite renforcée par une résine dentaire (Paladur, Hraeus kulzer GmbH & Co, Hanau, France). Les électrodes ne pénètrent pas dans le cortex cérébral (Figure 37B). Après cette chirurgie préparatrice, les souris sont remises dans leur cage pendant 10 jours.

### Télémetrie

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss âgées de 10 à 12 semaines provenant de l'élevage du SCAHU sur le site de la faculté de médecine d'Angers. La chirurgie d'implantation des transmetteurs et le suivi postopératoire ont été réalisés au SCAHU.

Le protocole d'anesthésie est identique à celui de la technique conventionnelle. Du fait d'une chirurgie plus invasive, des précautions supplémentaires d'asepsie ont été prises. La zone d'incision est au préalable dépilée et l'antisepsie est réalisée par l'application de bétadine® dermique (Povidone iodée 10%, Viatrix Pharmaceuticals, Merignac, France). Après positionnement de l'animal sur un cadre de stéréotaxie une incision longitudinale est pratiquée au niveau du crâne. A partir de cette incision, une poche sous-cutanée est réalisée à l'aide de ciseaux à bouts ronds. Les tissus sont hydratés à l'aide de sérum physiologique stérile (NaCl 9g/L).

Le corps du transmetteur est alors glissé dans la poche sous-cutanée (Figure 38A et B). A l'aide d'une fraise dentaire, deux trous sont réalisés dans la boîte crânienne, en arrière du point bregma, de part et d'autre de la suture médiane. Les électrodes sont implantées dans les trous réalisés, fixées à l'aide de colle cyanolite et de ciment dentaire acrylique (Paladur). La plaie est alors refermée à l'aide de fil non résorbable (Ethilon 4.0, Ethicon, Issy les Moulineaux, France)

L'analgésie est assurée par deux antidouleurs : la nalbuphine® et l'ibuprofène. La nalbuphine® (solution injectable 20mg/2mL, Laboratoire SERB, Paris, France) est un antalgique opioïde mixte qui permet de soulager la douleur aiguë pendant et après la chirurgie. Elle est administrée par voie sous-cutanée (4mg/kg), 30 minutes avant la chirurgie,

4 heures après le réveil, puis deux fois par jour jusqu'à ce que le processus de cicatrisation soit bien engagé (3 à 7 jours). L'ibuprofène pédiatrique (Advil®, Wyeth santé familiale, Paris, France), quant à lui est un anti-inflammatoire non-stéroïdien qui soulage la douleur mais à un degré moindre que la nalbuphine®. Il est administré dans l'eau de boisson (0.2 mg/ml, jusqu'à l'enlèvement des points de sutures soit 10 à 15 jours) et assure analgésie constante qui limite les sensations douloureuses entre les injections de nalbuphine®. Les animaux sont ensuite transférés dans les locaux dédiés à l'expérimentation.

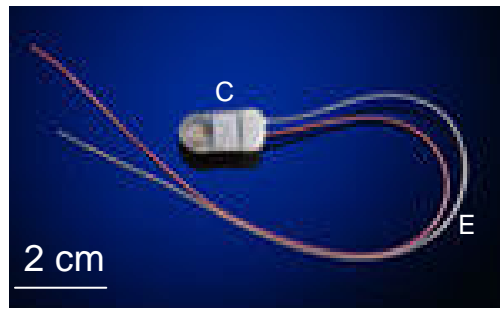
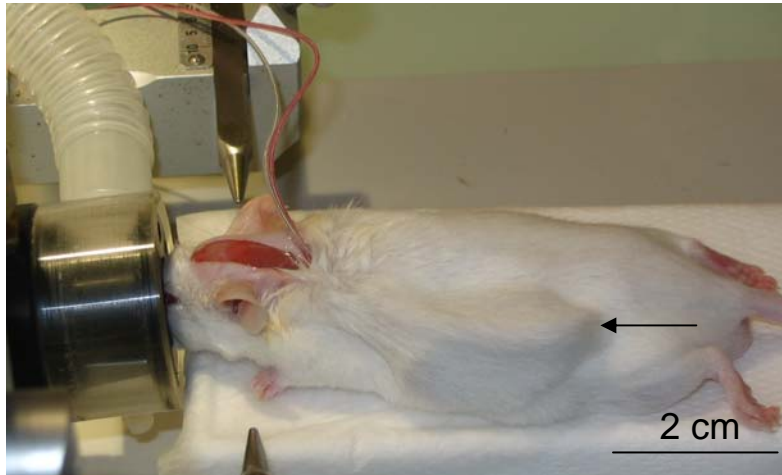
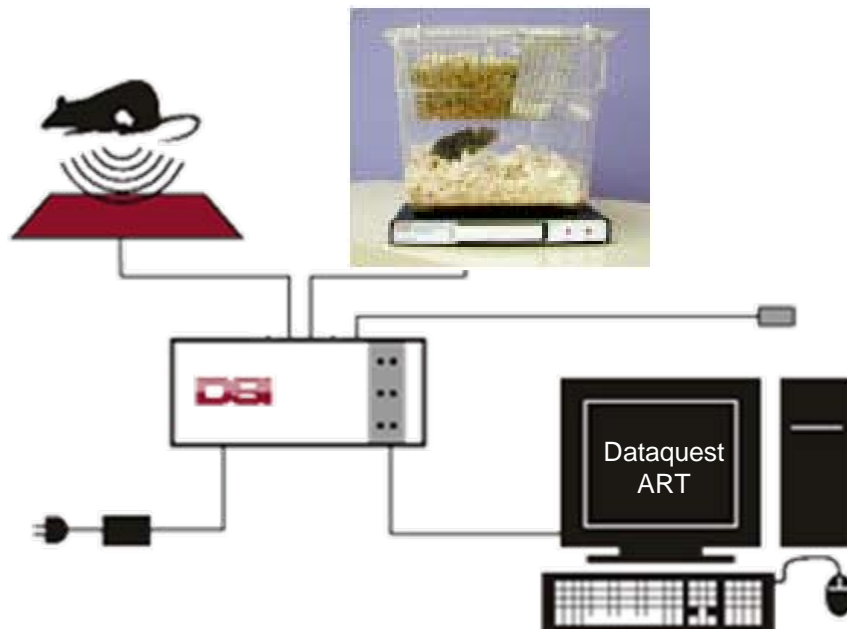
## **2. Dispositif d'enregistrement**

### Technique conventionnelle

Les activités électroencéphalographiques sont enregistrées à l'aide d'un électroencéphalographe (Reega Minidix-TR-, Paris, France). Les animaux sont raccordés au système d'enregistrement par des connecteurs femelles (wire-pro 220-SO2, Farnell) reliés aux connecteurs mâles implantés. L'électrode frontale, utilisée comme électrode de référence est reliée à la terre. Les souris sont ensuite placées dans l'habitacle (Figure 33A) fermé hermétiquement. Un délai d'une demi-heure environ est maintenu avant le premier enregistrement, pendant lequel l'animal s'habitue à son nouvel environnement. Après ce temps d'adaptation, l'activité cérébrale est enregistrée en condition basale pendant dix minutes (au minimum). Le DMDS est alors déposé à la dose de 2 µL de produit actif (2% v/v dans le DMSO) par litre d'air (volume de la boîte = 1,6 L) sur un papier filtre placé sous la grille. L'activité électroencéphalographique est enregistrée continuellement sur papier avec une vitesse de défilement de 2,5 mm/s, 10 mm/s ou 15 mm/s selon la précision voulue.

### Télémetrie

Le dispositif expérimental permettant les enregistrements EEG est schématisé figure 38C. L'implant PhysioTel® (Figure 6A, TA10-ETA-F20, DataSciences International, St Paul, USA) est un transmetteur activé par un aimant. Les ondes télémétriques émises par le transmetteur sont captées par le receveur (RPC-1, DSI) puis dirigées vers l'interface (Data Exchange Matrix) qui correspond à un convertisseur analogique-numérique (fréquence d'échantillonnage de 1 kHz). L'interface est reliée à un ordinateur qui permet l'acquisition et l'analyse des EEG *via* le logiciel Dataquest ART (version 4.0 Silver, DSI).

**A****B****C****Figure 38**

**A** : Transmetteur PhysioTel® TAE-F20 implanté dans les souris. **C** : corps de l'implant. **E** : électrodes en acier inoxydable recouvertes de silicone.

**B** : Etape de la chirurgie implantatrice. La souris est placée sur un cadre de stéréotaxie sur lequel est adapté le système d'anesthésie gazeuse. La flèche indique le transmetteur dans la poche sous-cutanée.

**C** : Schéma simplifié du système d'enregistrement EEG par télémétrie. Le transmetteur à l'intérieur de l'animal envoie les ondes au récepteur placé sous la cage. La plaque réceptrice transmet les informations à l'interface qui les convertit avant de les transférer à l'ordinateur.

Les souris sont placées une journée avant le début des enregistrements dans la boîte d'inhalation (Figure 33B et C) dont le couvercle a été remplacé par une grille. Une première série d'enregistrements (5 minutes d'enregistrements toutes les 30 minutes) est réalisée pendant 24h dans les mêmes conditions. La boîte est ensuite refermée et une deuxième série d'enregistrements est conduite pendant 24h. A la suite de ses deux séries, la boîte entièrement aérée avant d'être refermée. Le DMDS est alors appliqué à 135, 271 et 542 ppm<sup>1</sup> (soit 0.5, 1 et 2 µL/L d'air) et l'activité EEG est enregistrée en continu.

Après 24h d'application du DMDS, les souris sont remises dans leur cage initiale et sont observées régulièrement pendant leur récupération. Après deux semaines, les animaux sont euthanasiés et les cerveaux prélevés selon le protocole décrit par Gaillard et coll. (2004). Les cerveaux sont conservés à -80°C et pourront être utilisés pour des marquages immunohistochimiques.

### **3. Observations comportementales**

Le comportement, les signes extérieurs de l'état physiologique général et les troubles neuromusculaires des animaux ont été noté pendant l'application de DMDS. Nos observations restent cependant limitées car une manipulation de l'animal est exclue pendant la durée des tests en atmosphère confinée. Au niveau du comportement, ont été prises en compte les modifications des activités normales de l'animal (telles la prise de nourriture, le toilettage) ou l'apparition de comportements particuliers comme l'enfouissement défensif qui est caractéristique d'un stimulus aversif pour l'animal. Ce comportement se traduit par l'alternance de phases d'hyperactivité, avec enfouissement du museau dans la litière, et de phases de prostrations. Les signes extérieurs de l'état général sont : les irritations (rougeurs) et les écoulements au niveau du nez et des yeux, la fermeture partielle ou totale des yeux et les difficultés respiratoires.

Les troubles neuromusculaires surveillés sont, dans l'ordre de leur gravité, les **tremblements** (agitation involontaires par petites oscillations d'une partie ou de l'ensemble du corps), les **myoclonies** (contraction spasmodiques isolées et involontaires d'un muscle ou d'une partie du corps), les **convulsions toniques** (hypertonie des quatre membres tendus en direction de l'appendice caudal), les **convulsions cloniques** (contractions produisant de

---

<sup>1</sup> Concentration (ppm) = (volume de solution DMDS x densité) / (volume de la boîte x concentration massique)

grands mouvements) et les **convulsions tonico-cloniques** (perte d'équilibre et une chute sur le flanc accompagnée de tremblements généralisés). Une attention a également été portée sur les **troubles de la locomotion** tels la perte d'équilibre, l'incoordination motrice, l'hypoactivité ainsi que la vigilance de l'animal (sommolence, perte de conscience).

#### **4. Analyses des résultats**

##### *Technique conventionnelle*

Les données expérimentales, disponibles sur papier, imposent une analyse manuelle des enregistrements. Dans les conditions d'enregistrement contrôle, deux paramètres sont mesurés : le nombre d'évènements (fréquence de base) et l'amplitude de ces évènements (amplitude de base). Les souris présentant une activité EEG extrême (par exemple une fréquence significativement supérieure à la fréquence de base du lot étudié) sont exclues de protocoles. Compte-tenu de l'analyse quantitative importante effectuée ultérieurement, les résultats obtenus ici ne seront présentés que de façon qualitative.

##### *Télémetrie*

Les données obtenues par cette technique d'enregistrement sont numériques. Elles permettent donc une analyse par le logiciel Dataquest ART (filtrage : 0,5 Hz – 50 Hz) puis un traitement des données par les logiciels Excell (Microsoft) et Prism (GraphPad). Les amplitudes des activités EEG ont été mesurées cinq minutes toutes les demi-heures par segments de 10 secondes. Les amplitudes sont normalisées par rapport au segment contrôle (10 secondes, même heure, jour précédent) puis moyennées sur cinq minutes. Pour les analyses de fréquences, six intervalles ont été définis. Ils correspondent aux principaux rythmes EEG constituant un enregistrement : delta (0,5-4 Hz), thêta (4-8 Hz), alpha (8-12 Hz), bêta (12-32 Hz) et gamma (32-50 Hz).

#### **5. Avantages et inconvénients des deux techniques**

La méthode « classique » d'enregistrement d'EEG présente deux avantages, son coût peu élevé et sa chirurgie peu traumatisante. Le premier inconvénient est le support papier des données et leur analyse peu précise (pour cette raison, les résultats quantitatifs ne seront pas présentés dans ce manuscrit). Si le DMDS avait été une substance injectable cet inconvénient

aurait pu être résolu par l'emploi d'un convertisseur analogique-numérique dont l'usage se généralise pour les enregistrements d'EEG. Mais l'état gazeux du DMDS impose un habitacle hermétique dans lequel la souris doit être placée. Dans ces conditions, les fils électriques génèrent de nombreux problèmes (mauvaise étanchéité, débranchement des fils) et rendent les expérimentations difficiles.

En utilisant un système télémétrique, nous pouvons garantir l'étanchéité de la boîte d'inhalation plus facilement et l'enregistrement de signaux EEG est sans contrainte pour l'animal. La télémétrie présente deux avantages essentiels. L'utilisation du radio-émetteur affranchit des problèmes inhérents aux câbles traditionnels comme la gêne des souris, le débranchement des câbles ou la bonne étanchéité de la boîte d'inhalation (passage des fils). Le deuxième avantage concerne l'analyse des résultats. Les données numériques sont plus précises et peuvent être exploitées de manière plus performante (plus de paramètres disponibles et plus de rapidité). Cependant, outre le coût élevé du système télémétrique, la chirurgie est plus traumatisante que l'implantation classique. Elle requiert des connaissances, du matériel, des précautions et un suivi plus important. Mais une fois la récupération achevée, les souris retrouvent un comportement normal et ne sont pas gênées par des électrodes externes (Weiergraber et coll., 2005).

# CHAPITRE 2 – EFFET DU DMDS SUR L'ELECTROENCEPHALOGRAMME DE SOURIS

## **A- Position du problème**

Nous avons montré précédemment que les effets du DMDS sur l'activité spontanée des DUM neurones sont inhibés par un antiépileptique, le lévétiracetam (Gautier et coll., 2006). Basé sur ces observations, l'un des effets secondaires possible du DMDS sur le système nerveux central de mammifère peut s'apparenter à des crises ou des convulsions de nature épileptiforme.

Pour soutenir cette hypothèse, plusieurs pesticides ont déjà été identifiés comme provoquant des anomalies de l'EEG ou comme convulsivant (Testud et coll., 2001; Bradberry et coll., 2005). C'est le cas par exemple d'un herbicide, le glyphosate d'ammonium (également nommé phosphinothricine) et d'insecticides comme la cyperméthrine qui induisent des crises de type épileptique (Condes-Lara et coll., 1999; Lapouble et coll., 2002). Plus généralement des anomalies de l'EEG et/ou des convulsions ont été rapportées chez des sujets exposés aux organochlorés (par exemple, l'endosulfan), aux pyréthriinoïdes (par exemple, la deltaméthrine) et aux organophosphorés (Saïssy et Rüttimann, 1999; Forshaw et coll., 2000; Testud et coll., 2001; Harrison et coll., 2004; Bradberry et coll., 2005; Ray et Fry, 2006).

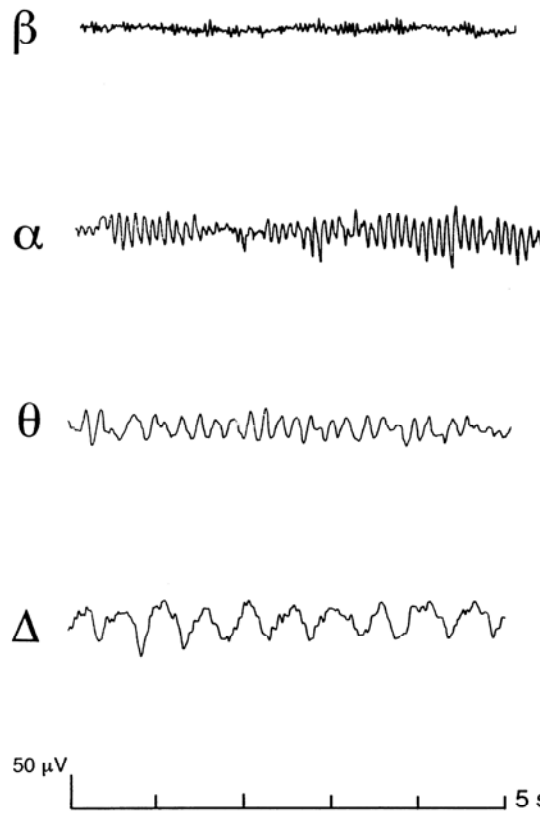
## **B- Présentation des résultats**

### **1. Avant-propos**

L'électroencéphalographie (EEG) permet de mesurer l'activité électrique du cerveau provoquée par le courant généré dans les neurones. Cette technique a été créée en 1924 par Hans Berger, en Allemagne.



A



B



### Figure 39

A : Principaux rythmes EEG. De haut en bas : bêta (12 à 32 Hz), alpha (8 à 12 Hz), thêta (4 à 7 Hz) et delta (0,5 à 3 Hz).

B : Activités paroxystiques élémentaires.

Ligne 1 de gauche à droite : pointe (10 à 70 ms), pointe lente (70 et 200 ms), polypointe.

Ligne 2 de gauche à droite : pointe-onde rapide (2,5 Hz), pointe-onde lente (3,5 Hz), polypointe-  
onde.

Sources : Thomas et Arzimanoglou, 2003 ; Crespel et coll., 2005 ; Crespel et coll., 2006.

L'EEG peut enregistrer les fluctuations rythmiques des potentiels électriques du cerveau, le potentiel évoqué par un stimulus particulier (par exemple une tonalité ou un faisceau de lumière) ou les signaux pathologiques tels que des pointes d'activité épileptique.

Pour faciliter la lecture et la compréhension de cette partie nous avons choisi de rappeler brièvement la définition de termes spécifiques aux études électroencéphalographiques :

- une **bouffée** est un groupement de plusieurs éléments d'apparition soudaine se détachant nettement du rythme de fond. Une bouffée peut être physiologique ou pathologique. Quand la durée de la bouffée est prolongée, on peut employer le terme de décharge.
- Une **décharge** est une bouffée de plusieurs secondes. Une décharge peut être non pathologique comme la décharge rythmique temporale moyenne mais il est vrai que ce terme est souvent employé pour décrire une activité épileptique.
- Un **graphoélément** est élément de l'EEG constituant une activité cérébrale.
- Un **paroxysme** est un graphoélément se détachant nettement du rythme de fond
- Le **rythme (activité) de fond** est le rythme de base de l'EEG observé dans l'état de vigilance concerné et suivant l'âge du sujet (Crespel et Gélisse, 2005).

Il existe quatre principaux rythmes physiologiques définis par leur fréquence : le rythme alpha (8 à 12 Hz), qui caractérise l'état de veille calme, le rythme bêta (12 à 32 Hz) qui apparaît dans des conditions d'éveil actif et de sommeil, le rythme thêta (4 à 8 Hz) qui peut caractériser un état de veille calme (rythme thêta postérieur) ou être le signe de l'endormissement, et enfin, le rythme delta (0,5 à 4 Hz) qui est caractéristique du sommeil lent et profond ou d'une souffrance (Figure 39A).

Dans le domaine de l'épileptologie, six activités paroxystiques élémentaires peuvent être définies (Figure 39B) :

- la **pointe** est de très brève durée (10 à 70 ms) et de grande amplitude.
- La **pointe lente** a une durée comprise entre 70 et 200 ms et prend donc un aspect moins acéré.
- La **pointe-onde** est une pointe suivie immédiatement d'une onde lente. Si la fréquence du complexe est inférieure à 2,5 Hz, il est nommé **pointe-onde lente** que la pointe ait une durée supérieure ou inférieure à 70 ms.

- La **polypointe** est la succession de plusieurs pointes.
- La **polypointe-onde** est une succession d'une polypointe et d'une ou plusieurs ondes lentes de même polarité (Thomas et Arzimanoglou, 2003; Crespel et coll., 2006).

Ces anomalies, isolées ou organisées rythmiquement, peuvent être des signes de syndromes épileptiformes.

## **2. Résultats préliminaires**

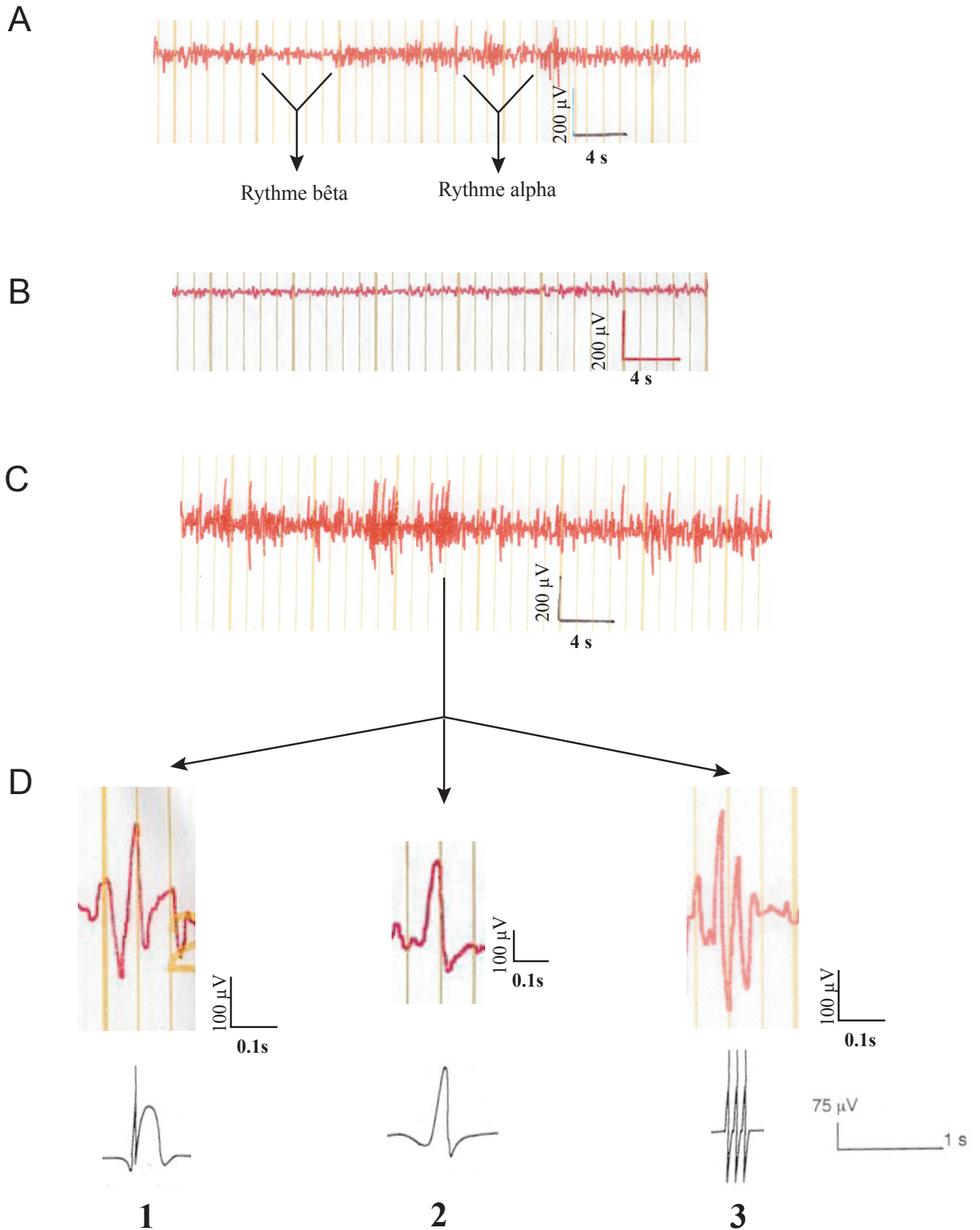
### **a) Effets du DMDS sur la souche CBA/J**

Afin de tester si le DMDS utilisé à faible concentration est épileptogène, nous avons entrepris une première série d'expérience sur des souris consanguines de la lignée CBA/J, lignée dite « sensible » à certains convulsivants (voir 3<sup>ème</sup> Partie, Chapitre 1).

Dans les conditions normales, l'activité encéphalographie des souris présente deux types de rythmes : le rythme bêta et le rythme alpha bloqué par l'ouverture des yeux. (Figure 40A). Bien que les doses de DMDS indiquées dans ce paragraphe soient indicatives, le comportement des souris est modifié dès le contact avec le DMDS. Il est observé dans un premier temps une phase d'hyperactivité durant laquelle se manifestent des réflexes de fuite associés à des sauts plus ou moins volontaires. Au cours des 20 premières minutes, les souris présentent deux comportements opposés en alternance. Le premier comportement correspond à des phases de prostrations, le second à des phases d'hyperactivité.

Toutes les souris exposées au DMDS à une dose élevée (de l'ordre de 2  $\mu$ L/L d'air), montrent une baisse de l'activité de base électroencéphalographique (Figure 40B). Cette diminution est associée à l'apparition d'anomalies de l'EEG (Figure 40C et D) composées, entre autres, d'activités paroxystiques élémentaires caractéristiques des symptômes de types épileptiques (Thomas et Arzimanoglou, 2003; Crespel et coll., 2006). Sont illustrées dans la figure 40D, une pointe-onde rapide (1), une pointe lente (2) et une pointe diphasique (3).

Ces résultats, qui constituent la première étape de ce travail, suggèrent que le DMDS peut être à l'origine d'anomalies visibles sur l'électroencéphalogramme. Cependant des études complémentaires sont indispensables pour vérifier et quantifier plus précisément ces observations.



**Figure 40**

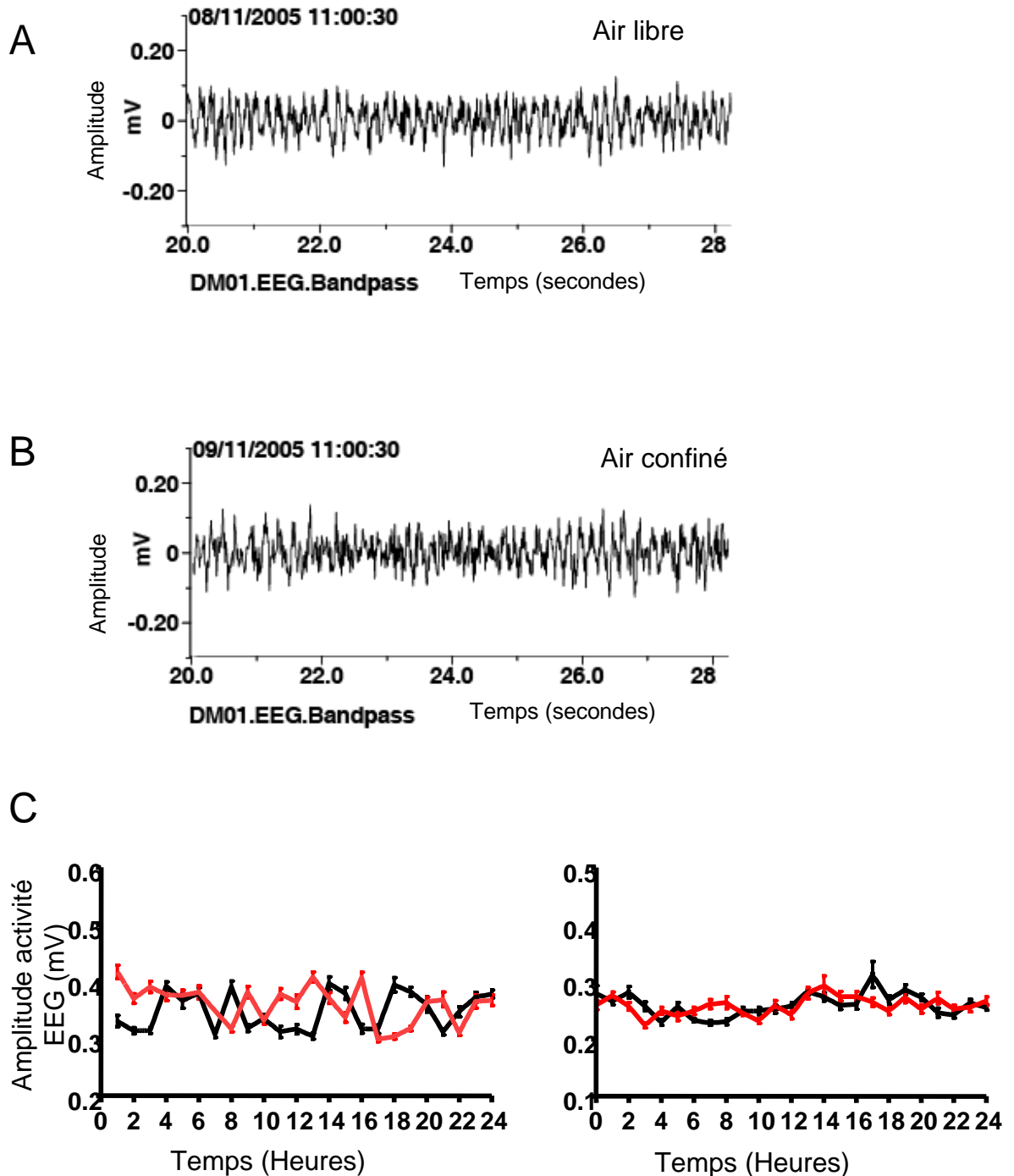
A : Activité EEG de base.

B : Activité de base réduite

C : Activités paroxystiques

D : Figures paroxystiques élémentaires. Haut : tracés expérimentaux. Bas : tracés théoriques d'après Thomas et Arzimanoglou, 2003.

1 : pointe-onde rapide (3,3 Hz), 2 : pointe lente, 3 : polypointe



**Figure 41**

**A** : Exemple de tracé EEG dans les conditions contrôle air libre.

**B** : Exemple de tracé EEG dans les conditions contrôle air confiné, à la même heure mais 24h après le tracé contrôle air libre.

**C** : Graphiques illustrant l'amplitude brute de l'activité EEG de fond de deux individus, par heure, sur 24h dans les conditions contrôles air libre (noir) et air confiné (rouge). Chaque point correspond à la moyenne de l'amplitude de segments de 10 secondes sur cinq minutes.

### ***b) Effets du DMDS sur la souche Swiss***

La première vérification que nous avons réalisée est l'effet du confinement sur l'amplitude de l'EEG. Lors du premier enregistrement contrôle (Figure 41A), les souris sont laissées dans leur boîte d'élevage (dimensions intérieures en mm : profondeur x largeur x hauteur = 265x160x140). Après 24h d'enregistrement, leur boîte est placée dans un habitacle fermé et l'EEG enregistré pendant 24h (Figure 41B). Il n'existe pas de différence significative entre ces deux conditions « contrôles » (air libre vs air confiné) quelques soient les souris comme le montrent les exemples individuels de la figure 41C.

#### ***Comportements observés***

Lors de l'application d'une dose relativement élevée de DMDS (estimée à 2 $\mu$ L/L d'air soit 542 ppm) il est possible d'observer plusieurs comportements et caractéristiques de l'effet du DMDS communs à toutes les souris (Tableau 22).

<b>Temps</b>	<b>Observation/Comportement</b>
Dès l'application	Tentatives de fuite
De 2-5 min à 30 min	Réflexe d'enfouissement : alternance prostration/enfouissement
A partir de 20-30 min	Spasmes respiratoires. Respiration saccadée
A partir d'une heure	Prostrée le plus souvent, activité de plus en plus rare
A 24h	Nez irrité, yeux collés (sécrétions), perte de poids (14,50 $\pm$ 1,5 %), hypotonie et hypothermie.

Tableau 22 : Troubles du comportement et observations communs aux souris lors de l'application d'une dose estimée de 2 $\mu$ L de DMDS par litre d'air.

Plusieurs de ces observations avaient déjà été remarquées dans les premières expériences réalisées. La gêne que ressentent les souris se manifeste en premier par des tentatives de fuite puis survient un réflexe d'enfouissement qui se caractérise par l'alternance de phases de prostrations et de phases d'hyperactivité (Figure 42A). Au niveau des observations des signes de l'état général, le nez et les yeux sont irrités, avec des écoulements plus ou moins prononcés autour des yeux. Une gêne respiratoire accompagnée de spasmes (Figure 42B) est notée à partir de 20 à 30 minutes d'exposition au DMDS. Au bout d'une

A



enfouissement



inactivité



enfouissement

B



spasme respiratoire

C



prostration

**Figure 42**

Photographies prises pendant l'application du DMDS

A : Exemple de l'alternance prostration/enfouissement lors de l'application de DMDS. Cliché haut gauche et bas : enfouissement. Cliché haut droit : phase de prostration entre les deux enfouissements illustrés.

B : Spasme respiratoire accompagné d'un bref mouvement de tête vers l'arrière.

C : Individu prostré.

heure, les souris économisent leurs mouvements (Figure 42C). Bien que les souris soient nourries *ad libitum* une perte de poids de près de 15 % ( $p < 0,001$ ) a été observée.

### Résultats EEG

Les périodogrammes permettent de connaître l'importance de chaque fréquence sur une portion d'enregistrement d'EEG. Des changements majeurs dans les rythmes EEG sont ainsi identifiables, comme c'est le cas lors de l'application de DMDS (Figure 43). Des anomalies provoquées par l'application de DMDS (dose estimée à 2 $\mu$ L/L d'air) sont observables essentiellement dans la première demi-heure. Ce sont des bouffées caractérisées par une fréquence particulière (autour de 10Hz) visibles sur le périodogramme (Figure 43B). La durée et le nombre cumulé de ces bouffées ont été caractérisés pendant le temps d'application du DMDS découpé par intervalles de 5 minutes (Figure 44 A). Les bouffées sont plus nombreuses ( $\geq 30$ ) pour un temps court d'application (entre 0 et 15 min) et leur durée est inférieure à 2 secondes. Entre 15 et 25 minutes d'application, le nombre de bouffées diminuent mais leur durée augmente (jusqu'à 2,6 secondes). A partir de 25 minutes, le nombre et la durée des bouffées diminuent jusqu'à leur complète disparition au delà de 40 minutes.

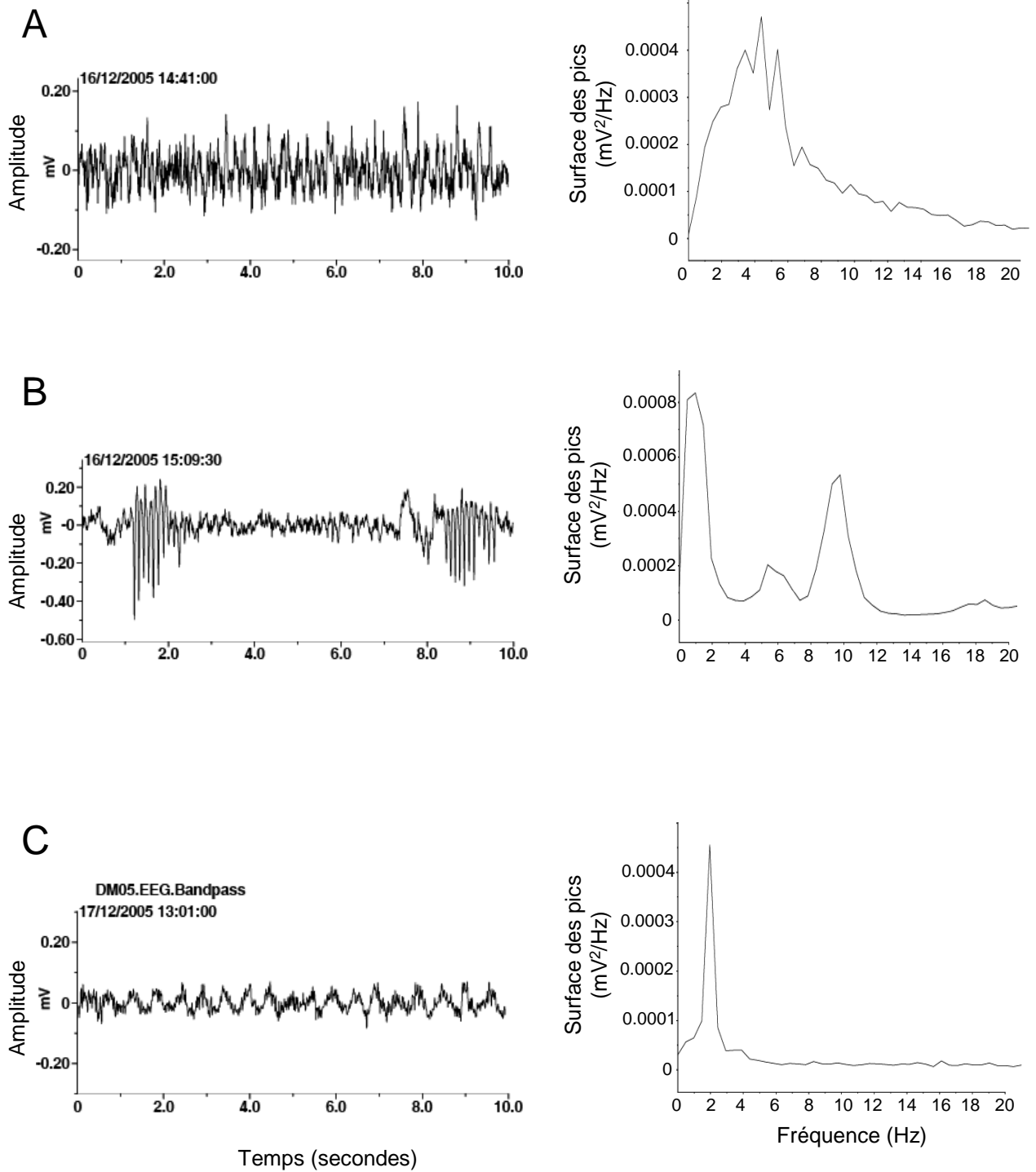
Les amplitudes des signaux EEG en condition d'air confiné vs lors de l'application du DMDS ont été comparées sur plusieurs tranches horaires pour l'exemple présenté figures 44B et C, à l'aide du test statistique de Student (Tableau 23).

Conditions testées	Significativité
Contrôle/DMDS 0-10 min	$p < 0,0001$
Contrôle/DMDS 10-20 min	$p < 0,0001$
Contrôle/DMDS 20-30 min	$p = 0,0016$
Contrôle/DMDS 24 h	$p < 0,0001$

Tableau 23 : Comparaison de l'amplitude de l'EEG par test statistique type *t-test de Student*.

Du fait des bouffées, l'amplitude de l'EEG est irrégulière et significativement augmentée dans les trente premières minutes de l'application. Le graphique figure 44B illustre ces changements d'amplitude sur un fragment de 10 minutes (de 10 à 20 minutes d'exposition) en comparaison à un fragment de durée similaire mais en conditions contrôles. Le deuxième effet du DMDS est la dépression du signal EEG dont le début (de 1h à 19h





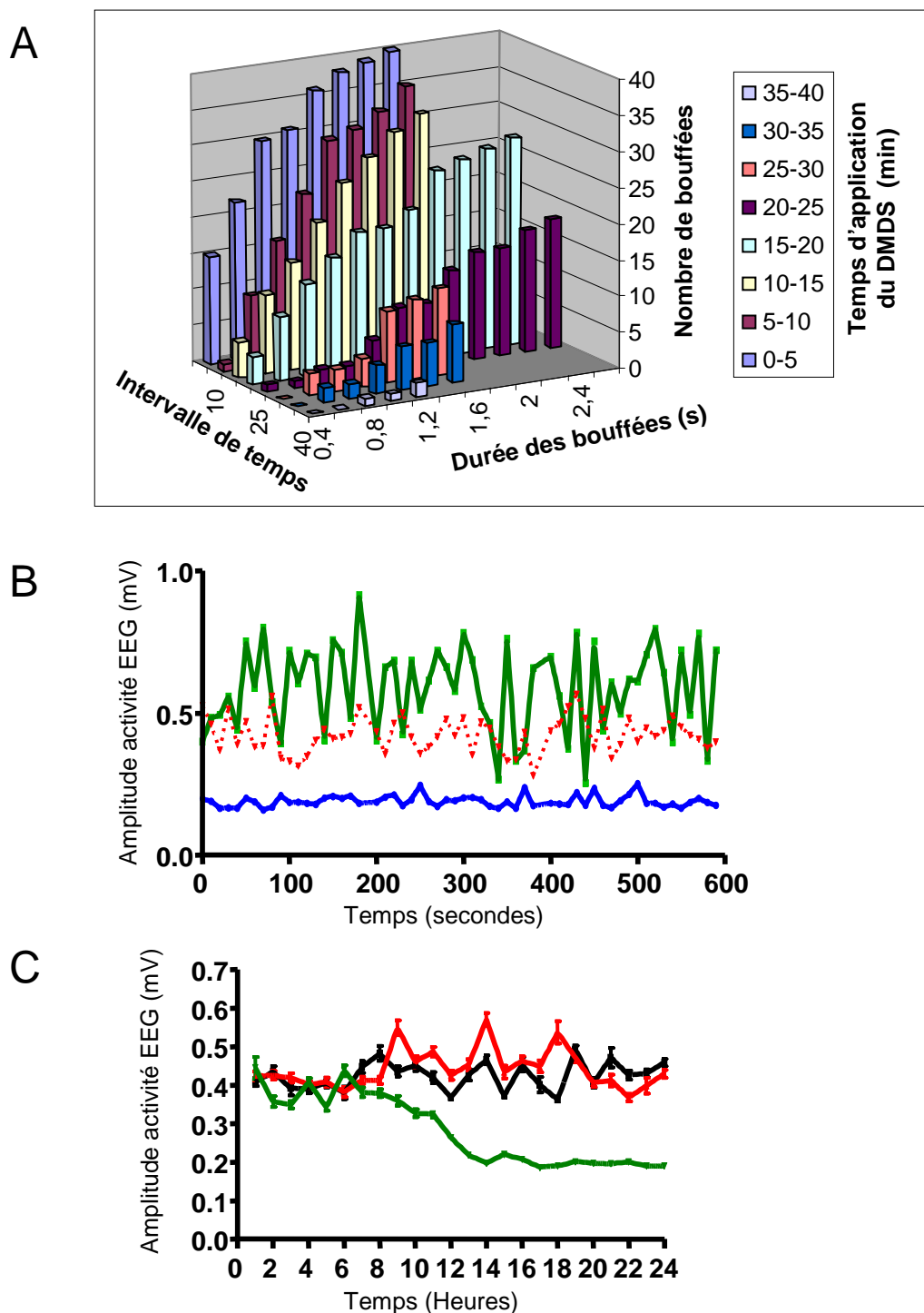
**Figure 43**

Effets du DMDS sur l'activité EEG de souris. Enregistrements (colonne de gauche) et périodogramme (colonne de droite) en conditions contrôles et lors de l'application de DMDS.

**A :** Conditions contrôles air confiné 20 minutes avant application de DMDS.

**B :** DMDS à 10 minutes d'application.

**C :** DMDS à 22h d'application.



### Figure 44

Effet du DMDS sur l'activité EEG de souris.

**A** : Caractérisation des bouffées de l'individu présenté figure 42. Les bouffées ont été comptées et séparées en fonction de leur durée pour chaque intervalle de 5 min de 0 à 40 minutes d'application.

**B** : Amplitude brute d'un fragment de 10 minutes de 10 à 20 minutes d'exposition de DMDS (vert) en comparaison à un fragment de durée similaire mais en conditions contrôles (rouge pointillé) et à 23h d'exposition (bleu).

**C** : Amplitude brute toutes les heures sur 24h en conditions contrôle air libre (noir), air confiné (rouge) et DMDS (vert).

d'exposition) et l'importance varient entre les souris. Dans l'exemple présenté, l'amplitude de l'EEG est diminuée de 56 % pendant les quatre dernières heures d'exposition et la fréquence majoritaire a également été modifiée (figure 43C et 44C). De plus, les souris testées ont présentés des seuils de sensibilités différents. Ainsi, l'apparition de bouffées a été observée uniquement chez deux souris sur six testées, et la baisse d'amplitude chez quatre d'entre-elles.

La deuxième étape de ce travail, a permis la mise au point d'un système d'enregistrement d'EEG par télémétrie. Les premiers résultats obtenus ont essentiellement une valeur indicative. En effet, la teneur dans l'air du DMDS n'a pas été vérifiée. Une sorption du DMDS sur la litière ne pouvant être exclue ainsi qu'une répartition inégale dans l'habitable, de nombreuses précautions sont à prendre avec ses résultats. Les doses théoriques administrées sont de 1 $\mu$ L et 2 $\mu$ L de DMDS par litre d'air. Mais il est fort probable, d'après les données sur le comportement et les résultats développés dans les paragraphes suivants, que ces doses soient surestimées. Cependant ces données ont permis de mieux quantifier certains paramètres, de standardiser la procédure et d'orienter les protocoles. Malgré les biais de ces résultats préliminaires, ceux-ci indiquent clairement que le DMDS modifie l'activité EEG de souris Swiss. Nous avons par la suite amélioré les conditions d'inhalation afin de relier une dose précise de DMDS aux effets observés.

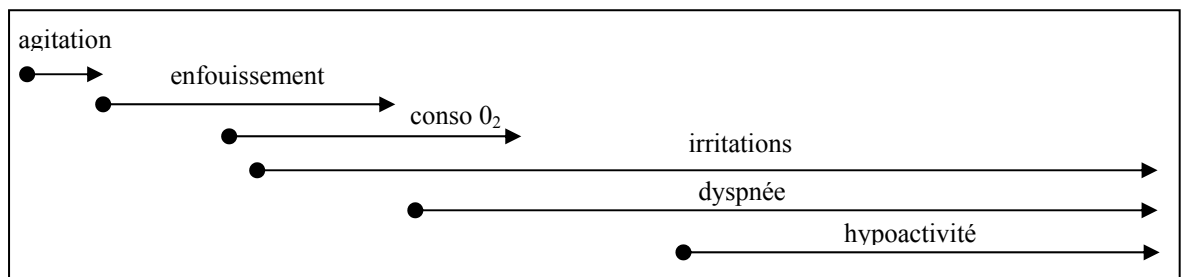
### 3. Effet dose dépendant du DMDS

Les expériences présentées dans cette partie, et les résultats qui en découlent, ont été réalisées en améliorant le système d'enregistrement suites aux problèmes rencontrés lors des deux séries d'expériences préalablement décrites.

#### a) Modifications du comportement

Quelle que soit la dose de DMDS testée (de 0,5 à 2 $\mu$ L/L d'air), les souris montrent une suite de comportements et des modifications de l'état général communes à toutes les souris, qui apparaissent suivant différents temps d'exposition (Figure 45A, tableau).

Tout comme nous l'avons précédemment décrit, le premier comportement observé est une forte agitation pendant laquelle les animaux cherchent à se soustraire au DMDS. Cette agitation évolue très rapidement vers une réaction d'enfouissement défensif qui s'exprime à l'encontre de stimuli aversifs. Ce comportement fouisseur (les souris frottent leur museau sur la grille en plexiglas en adoptant les mêmes postures qu'en présence de litière) est observable pendant 15 à 25 minutes. Quelques minutes après le début de ce réflexe, il est possible d'observer une nette dépression au niveau du manomètre à eau (Figure 45B), signe d'une forte augmentation de la consommation d'oxygène. Cette importante variation de pression est visible pendant 10 à 20 minutes.



Représentation schématique de la séquence des comportements observés sous DMDS.

Le temps d'apparition des signes d'irritation au niveau du nez et des yeux des animaux est dépendant de la dose de DMDS appliquée. Ces signes apparaissent plus tôt lorsque la dose est élevée (Figure 45A, tableau). L'observation d'une atteinte respiratoire débute peu après l'apparition des irritations. Les souris présentent une respiration laborieuse, saccadée et irrégulière ainsi que spasmes respiratoires associés à un renversement de la tête (Figure 45A et C).

**A**

Dose de DMDS ( $\mu\text{L/L}$ )	Agitation Tentatives de fuite	Réflexe d'enfouissement	Augmentation de la consommation d' $\text{O}_2$	Yeux, nez irrités	Spasmes respiratoires Dyspnée	Hypoactivité et somnolence	Décès
0,5	0 à +2 min	+2 à +8 min	+10 à +20 min	+12 à +20 min	+14 à +30 min	+1h30 à +2h45	1/4
1	0 à +2 min	+2 à +4 min	+10 à +20 min	+7 à +15 min	+10 à +30 min	+50 min à +2h	2/4
>1	0 à +2 min	+2 à +5 min	+10 à +20 min	+6 à +10 min	+7 à +22 min	+30 min à +1h	3/3

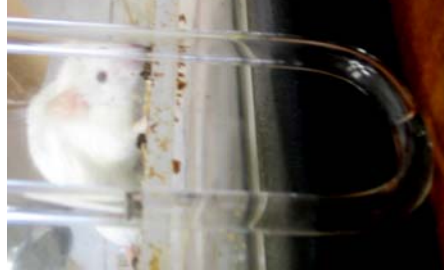
**B****C****D****E****Figure 45**

Tableau récapitulatif et photographies des comportements observés lors de l'application de DMDS. **A** : Délai d'apparition des comportements observés en fonction de la dose de DMDS appliquée. **B** : Dépression engendrée par le DMDS visible sur le manomètre. Souris pendant une phase d'inactivité entre deux comportements fouisseurs. **C** : Souris pendant un spasme respiratoire. **D** : Sursaut associé à un tremblement. **E** : Individu prostré.

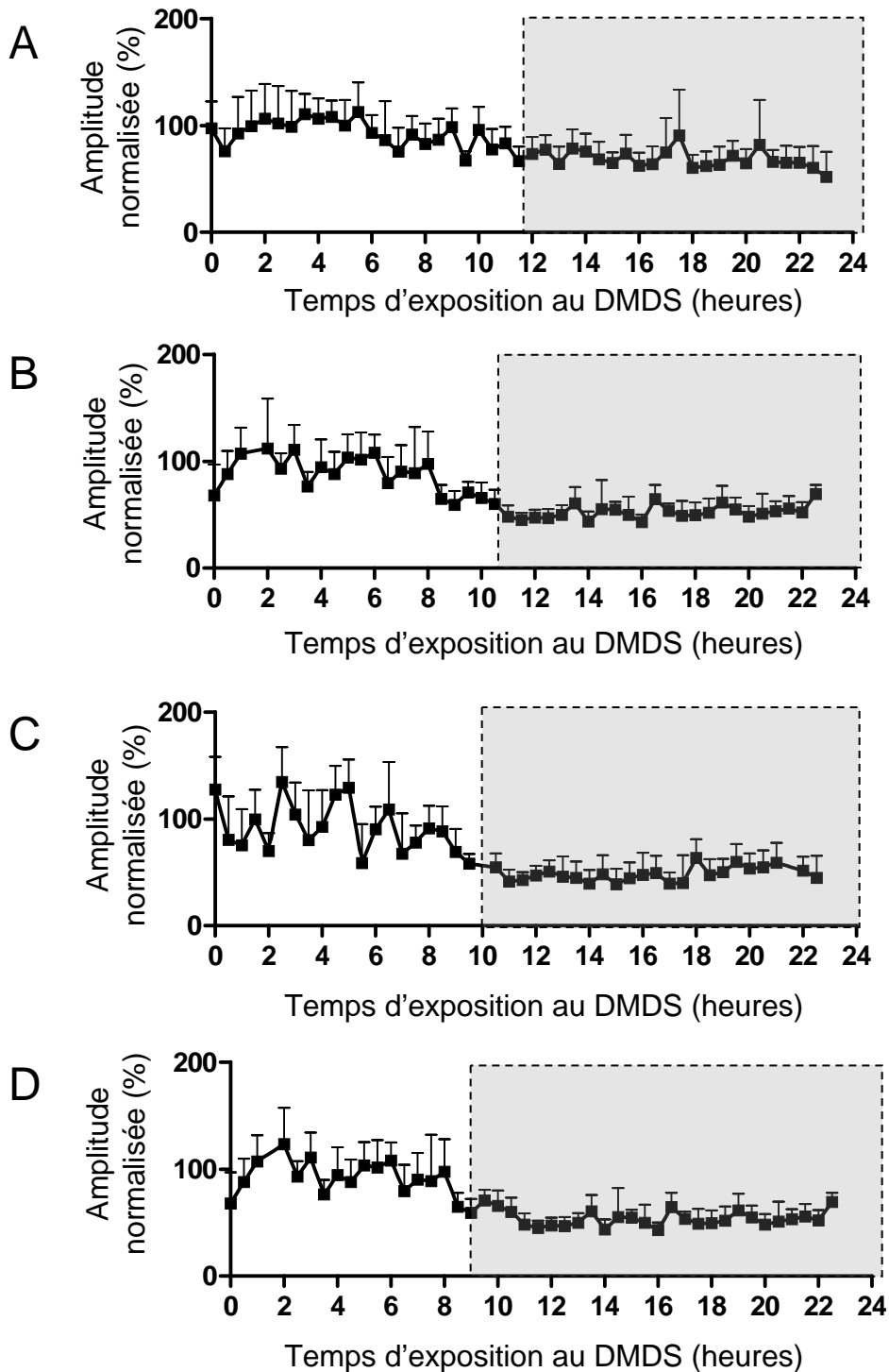
A partir de 30 minutes d'exposition pour une dose élevée (2  $\mu\text{L/L}$  d'air) et de 1h30, pour la dose la plus faible testée (0,5  $\mu\text{L/L}$  d'air), les phases d'activités se raréfient, les souris sont de plus en plus souvent prostrées et présentent une tendance à la somnolence (Figure 45A et E). Cette hypoactivité est accompagnée de signes révélateurs d'une atteinte sérieuse de l'état général pour les doses les plus élevées : perte d'appétit, absence de toilettage avec souillures génitales. Une perte de poids d'environ 10% a également été constatée.

Parallèlement à cette séquence d'évènements commune à tous les animaux, d'autres phénomènes, tels que des troubles neuromusculaires ont été observés chez certaines des souris testées. Pour la plus faible dose appliquée (0,5  $\mu\text{L/L}$  d'air), toutes les souris ont présenté des légers tremblements faisant penser à des frissons accompagnés pour la moitié d'entre-elles de sursauts (Figure 45D). Ces symptômes sont également retrouvés pour trois souris exposées aux doses plus élevées dont deux (soumises à 1 et 2  $\mu\text{L/L}$  d'air) ont été affectées par des signes supplémentaires : des petites secousses musculaires localisées au niveau des vibrisses et de la face ainsi que des secousses musculaires des membres antérieurs, pour celle traitée à 1  $\mu\text{L/L}$  d'air. Ces petites contractions musculaires involontaires sont appelées myoclonies, et constituent les symptômes de certains types d'épilepsies (Thomas et Arzimanoglou, 2003). Bien que ces troubles neuromusculaires ressemblent à des symptômes décrits dans le domaine des épilepsies, seule l'étude de l'électroencéphalogramme peut déterminer si le DMDS peut engendrer ces anomalies.

## ***b) Modifications des tracés EEG***

### ***(1) Analyse globale***

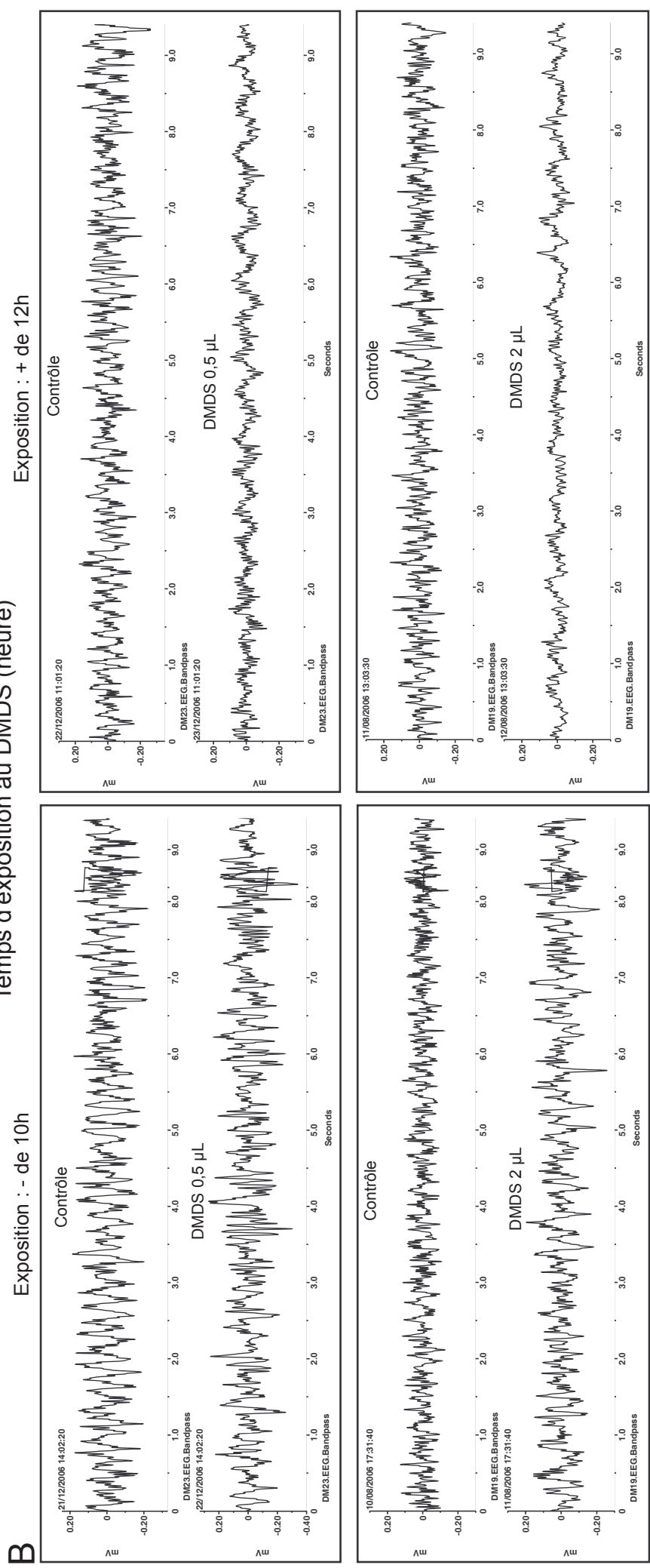
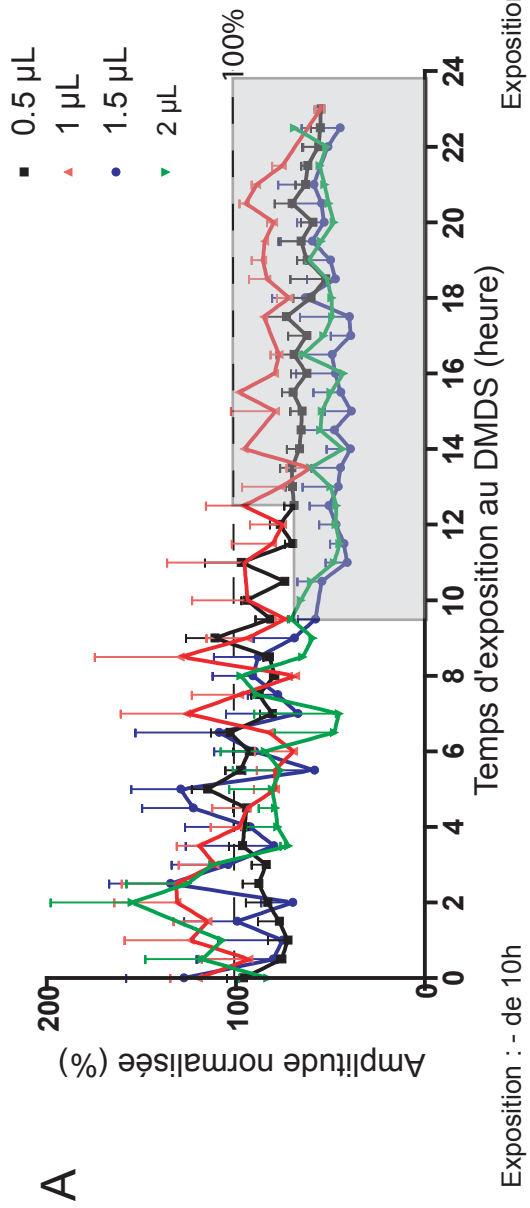
De manière similaire aux résultats précédemment obtenus, l'effet du DMDS sur l'amplitude de l'EEG se déroule en deux temps. Pour la plus faible dose (0,5  $\mu\text{L/L}$  d'air), quelques modifications de l'EEG visibles vont se confirmer pour les doses plus élevées (Figure 46A). Les graphiques (Figure 46A) représentent l'amplitude normalisée en fonction du temps d'application du DMDS pour quatre individus traités de 0,5 à 2  $\mu\text{L/L}$  d'air. Pendant les premières heures (Figure 46, parties non grisées), l'amplitude est instable. Elle varie autant entre les segments de 10 secondes qui constituent les portions de cinq minutes mesurés toutes



**Figure 46**

Effet du DMDS sur l'amplitude de l'activité EEG. Les amplitudes des activités EEG ont été mesurées cinq minutes toutes les demi-heures par segments de 10 secondes, normalisées par rapport au segment contrôle puis moyennées. Chaque graphique correspond à un individu pour chaque dose testée.

**A :** DMDS à 0,5 µL/L d'air. **B :** DMDS à 1 µL/L d'air. **C :** DMDS à 1,5 µL/L d'air. **D :** DMDS à 2 µL/L d'air.



**Figure 47**

A : Superposition des moyennes des amplitudes normalisées pour chaque dose testée en fonction du temps d'application.

B : Exemple de tracés pour deux doses de DMDS : 0,5 (cadres en haut) et 2  $\mu\text{L/L}$  d'air (cadres en bas) pour un temps court (cadres à gauche) et un temps long (cadres à droite). Chaque cadre est composé du tracé contrôle enregistré 24h avant le tracé sous DMDS.



les demi-heures (écart-type important) que entre les portions de cinq minutes elles-mêmes, ce qui donne un aspect acéré des tracés pendant les premières heures. Dans un second temps, les écart-types deviennent plus faibles par rapport à ceux des signaux EEG précédents, suggérant une diminution de l'activité EEG, et l'amplitude diminue de 30 à 50%, pour les individus présentés (Figure 46, parties grisées).

A l'issue de ces résultats, deux zones temporelles concernant l'effet du DMDS, peuvent être définies en fonction du temps d'exposition. La limite entre ces deux zones se situe vers 10h d'exposition pour les doses les plus élevées testées (1,5 et 2  $\mu\text{L/L}$  d'air) et entre 12h et 14h d'exposition pour les doses les plus faibles (0,5 et 1  $\mu\text{L/L}$  d'air) (Figure 47A). Les quatre cadres de la figure 47B, illustrent des tracés EEG en conditions contrôles (pris 24h avant DMDS) et après exposition du DMDS pour les deux parties de l'effet du DMDS, pour une faible et une forte dose (0,5 et 2  $\mu\text{L/L}$  d'air). Sur les tracés à gauche (partie 1 de l'effet du DMDS), une amplitude légèrement plus élevée est à noter pour les deux doses représentées. Sur les tracés illustrant la 2<sup>ème</sup> partie de l'effet du DMDS, une diminution de l'ordre de 40 à 50% de l'amplitude associée à une modification des activités de l'EEG est également visible.

## ***(2) Analyses individuelles par dose de DMDS***

Parallèlement à l'analyse globale de l'amplitude des signaux EEG, nous avons décomposé les activités EEG de fond par bandes de fréquences correspondants aux rythmes EEG les plus importants : delta (0,5-4 Hz), thêta (4-8 Hz), alpha (8-12 Hz), bêta (12-32 Hz) et gamma (32-50 Hz). Les observations pour trois individus testées pour les doses : 0,5  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  et 2  $\mu\text{L}$  de DMDS/L d'air seront présentées successivement. Chaque dose est représentée par une planche (Figure 48A, B et C) dont l'organisation est similaire: les cadres de gauche correspondent aux conditions contrôles (soit 24h avant le tracé EEG sous DMDS), les cadres de droite sont des enregistrements en présence de DMDS. Les cadres du haut représentent la 1<sup>ère</sup> partie de l'effet (< 10h), et les cadres du bas, la 2<sup>ème</sup> partie de l'effet (> 12h). Pour chaque cadre, le premier tracé représente l'EEG composé de toutes les fréquences de 0,5 à 50 Hz. Les tracés suivants représentent, chacun, une des bandes de fréquences qui composent l'EEG, de gamma (fréquences les plus rapides) à delta (fréquences les plus lentes). En conditions contrôles, deux rythmes peuvent être majoritaires sans être pathologiques : alpha et thêta, selon les individus (Crespel et al, 2005).

## **Figure 48**

Effet du DMDS sur les bandes de fréquence composant l'activité EEG de souris en fonction de la dose.

Cadres de gauche : conditions contrôles 24h avant le tracé sous DMDS. Cadres de droite : en présence de DMDS. Cadres en haut : 1<sup>ère</sup> partie de l'effet du DMDS (moins de 10h). Cadres en bas : 2<sup>ème</sup> partie de l'effet du DMDS (plus de 12h).

Pour chaque cadre :

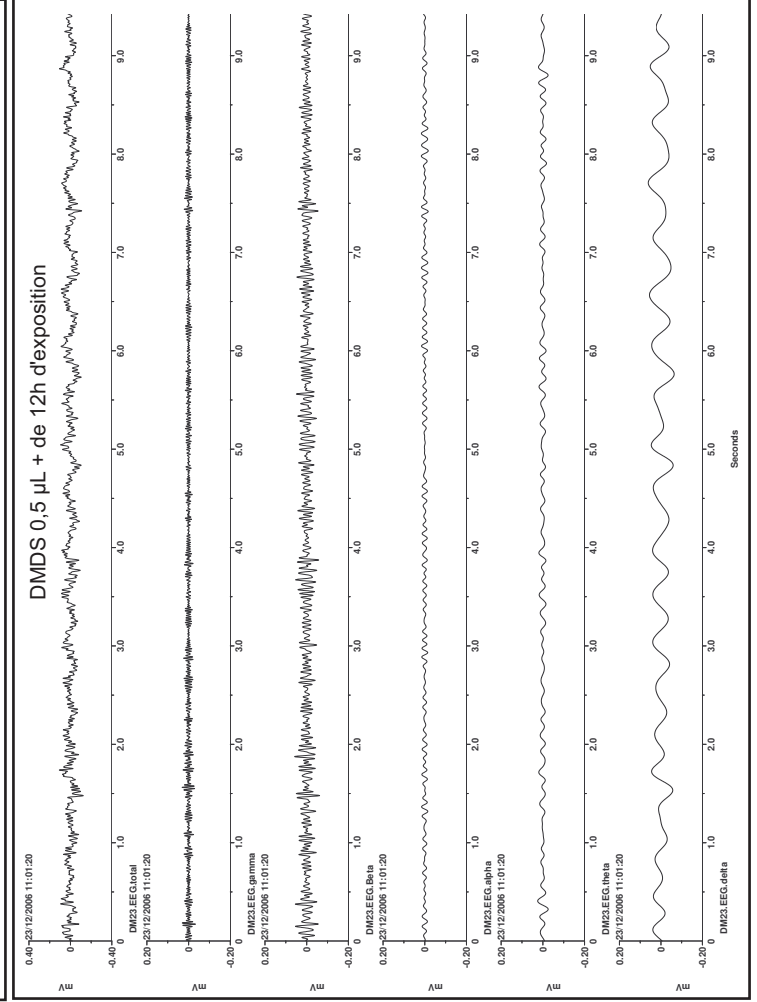
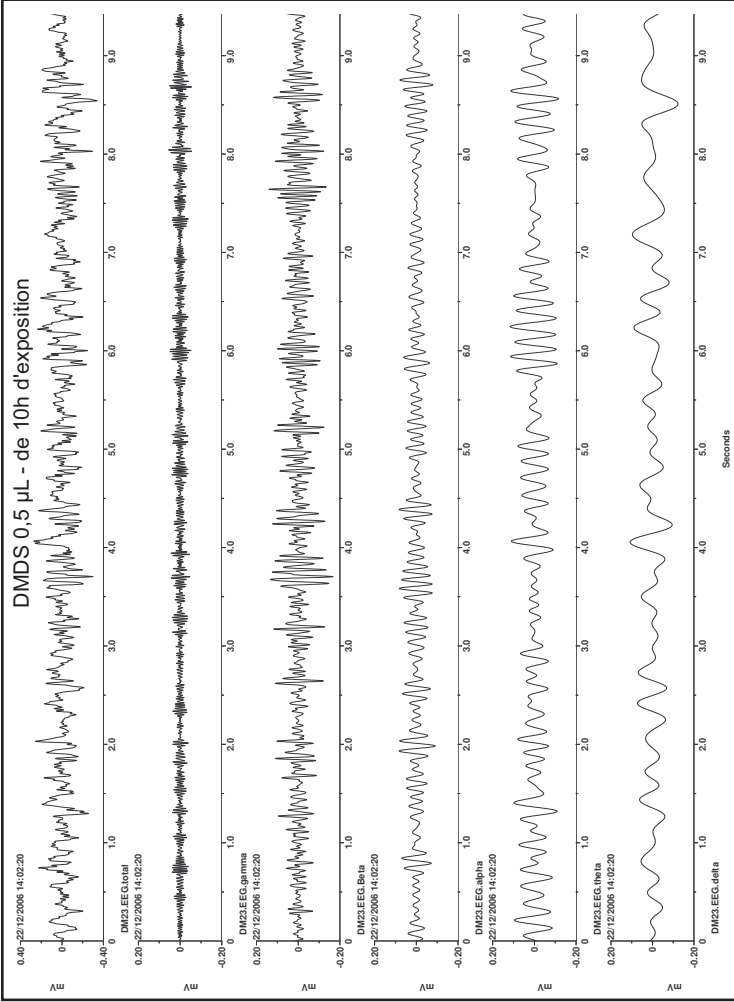
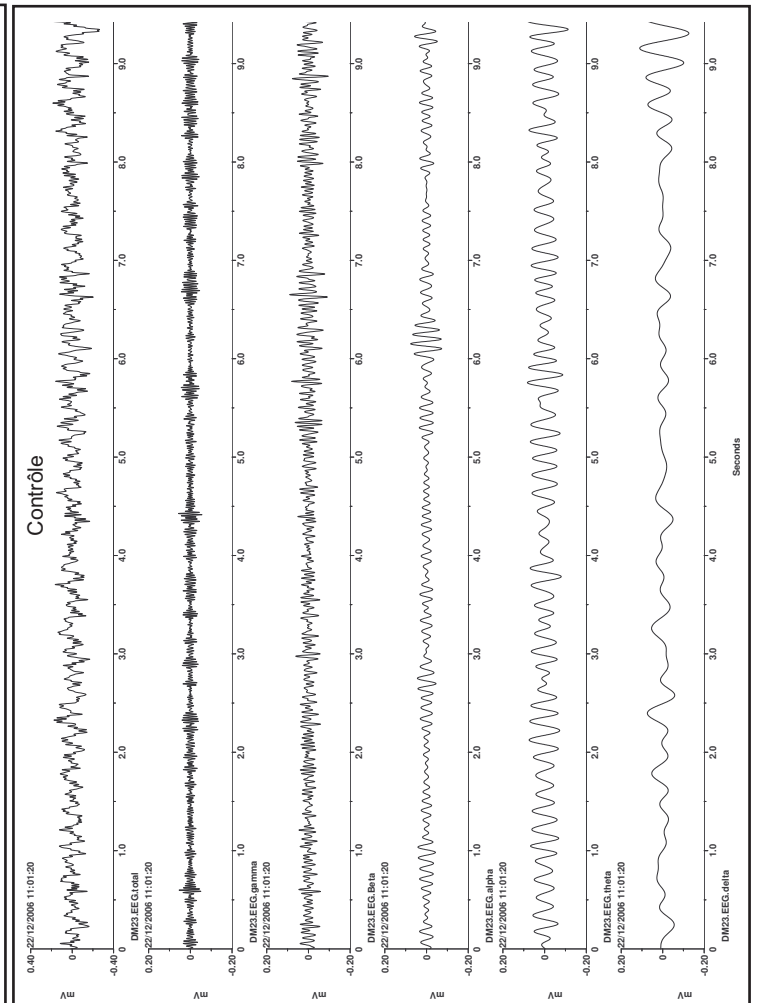
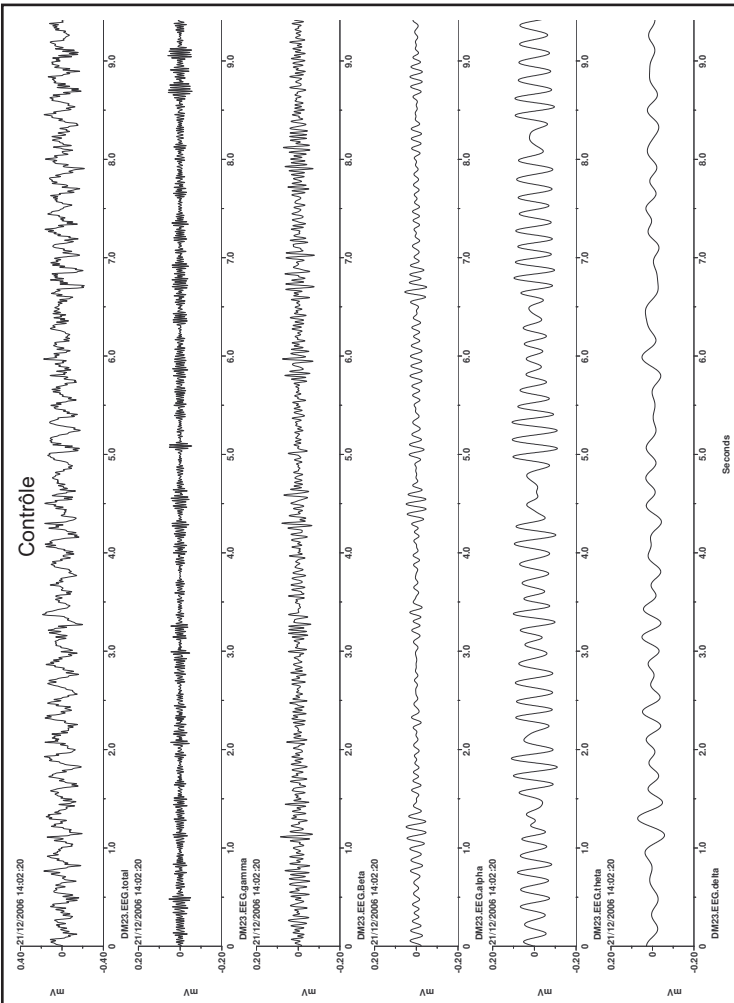
- 1<sup>ère</sup> ligne : EEG composé de toutes les fréquences de 0,5 à 50 Hz
- 2<sup>ème</sup> ligne : bande de fréquence gamma, 32 à 50 Hz
- 3<sup>ème</sup> ligne : bande de fréquence bêta, 12 à 32 Hz
- 4<sup>ème</sup> ligne : bande de fréquence alpha, 8 à 12 Hz
- 5<sup>ème</sup> ligne : bande de fréquence thêta, 4 à 8 Hz
- 6<sup>ème</sup> ligne : bande de fréquence delta, 0,5 à 4 Hz

**A** : DMDS à 0,5 µL/L d'air.

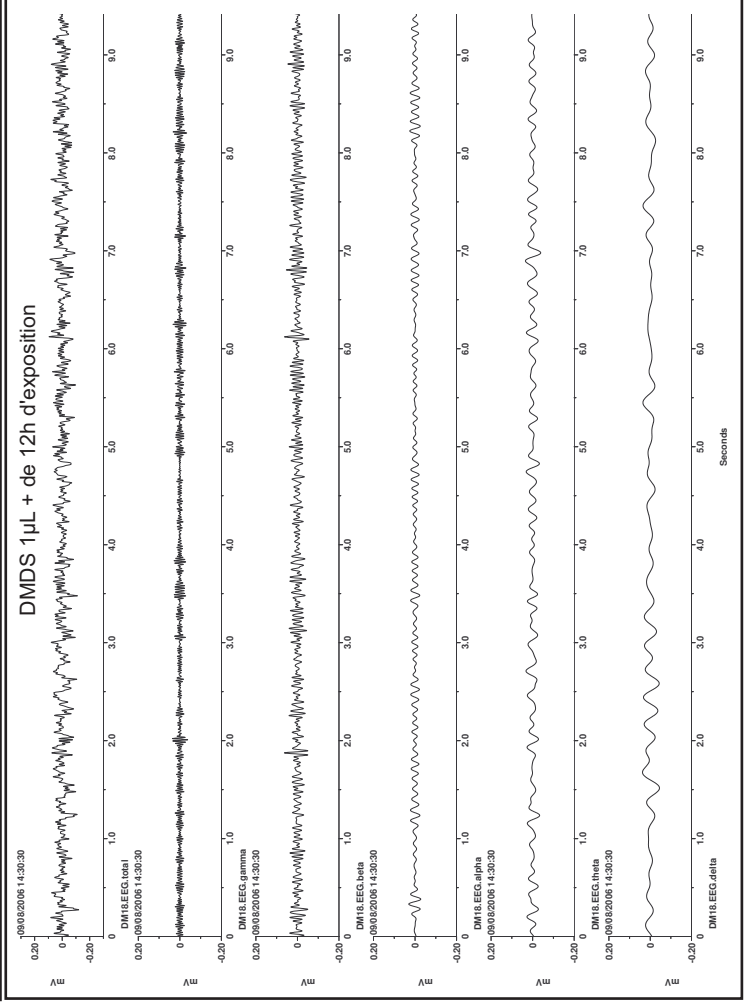
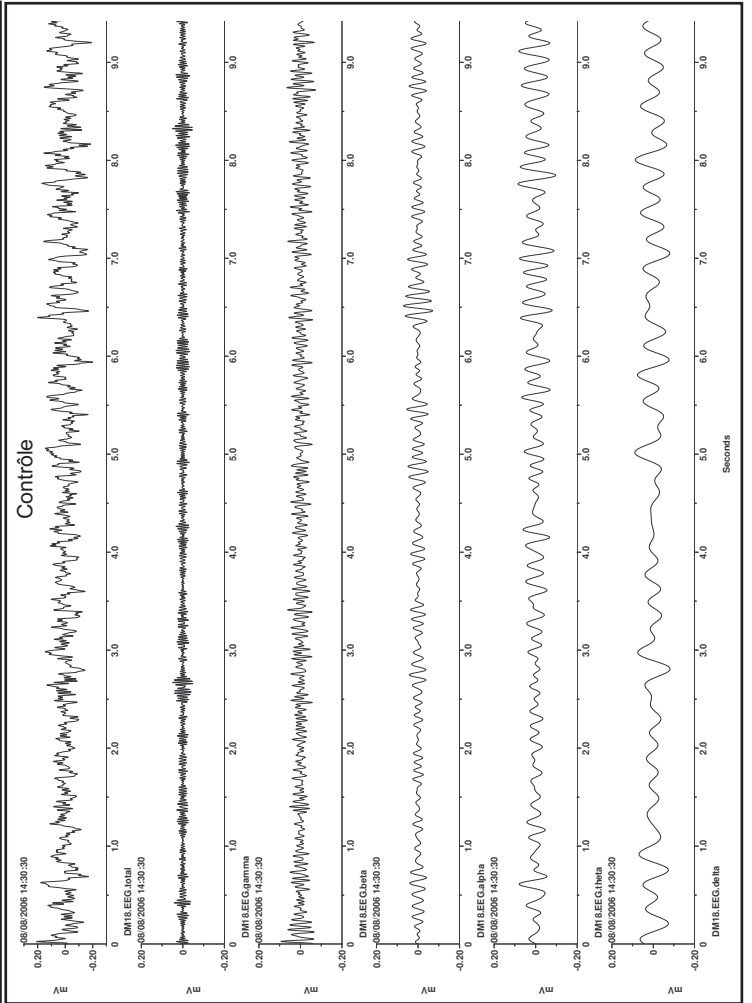
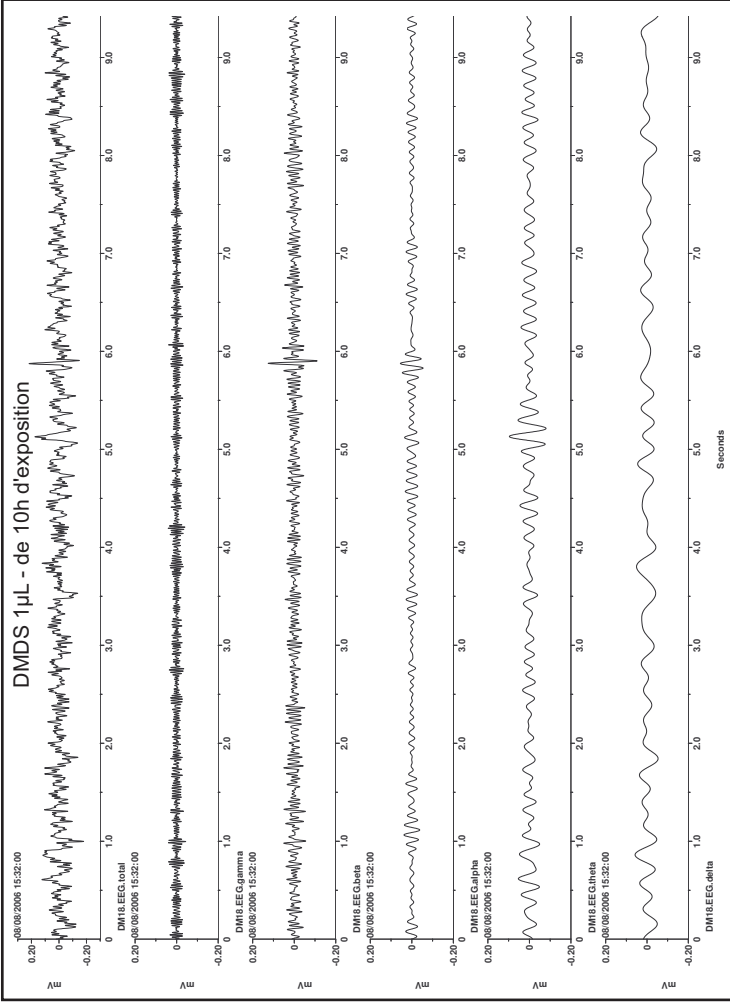
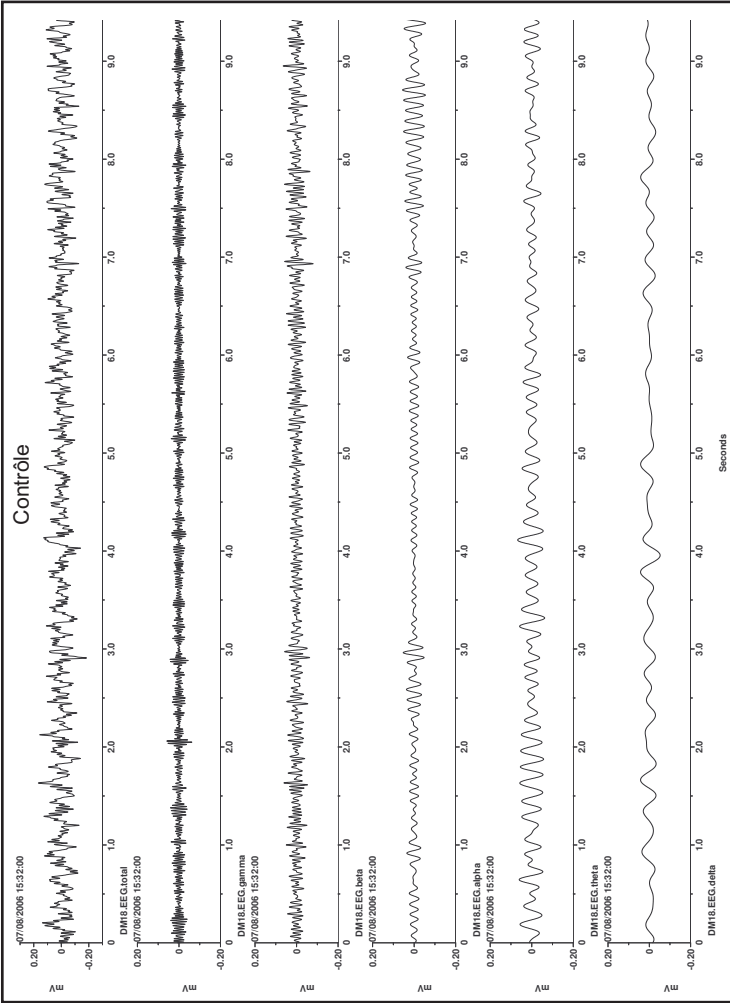
**B** : DMDS à 1 µL/L d'air.

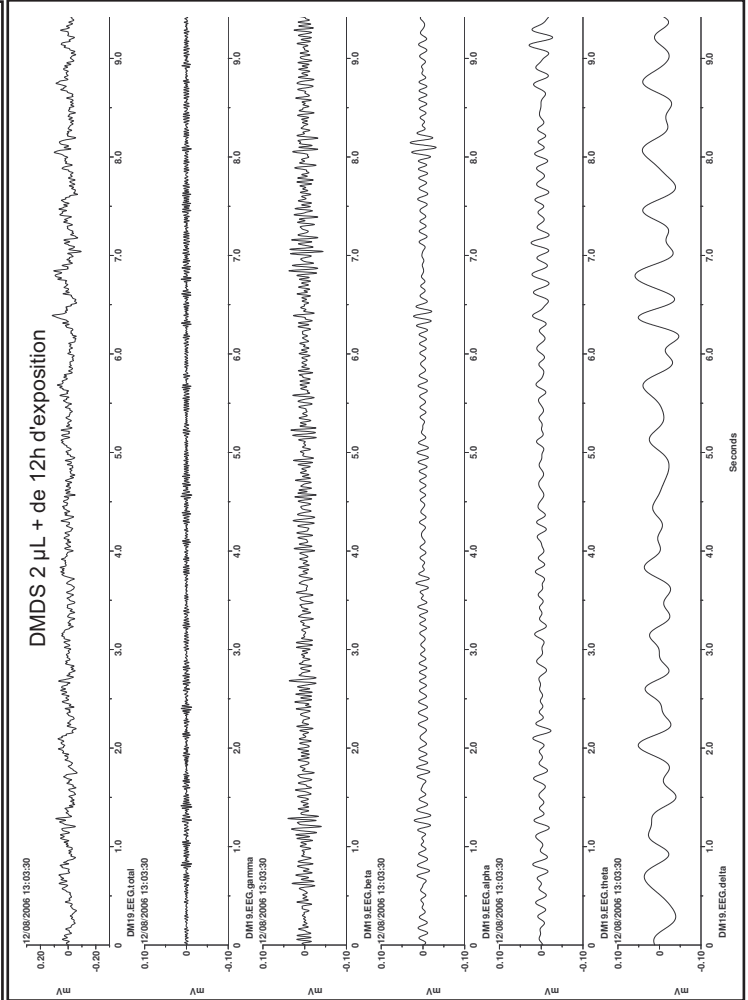
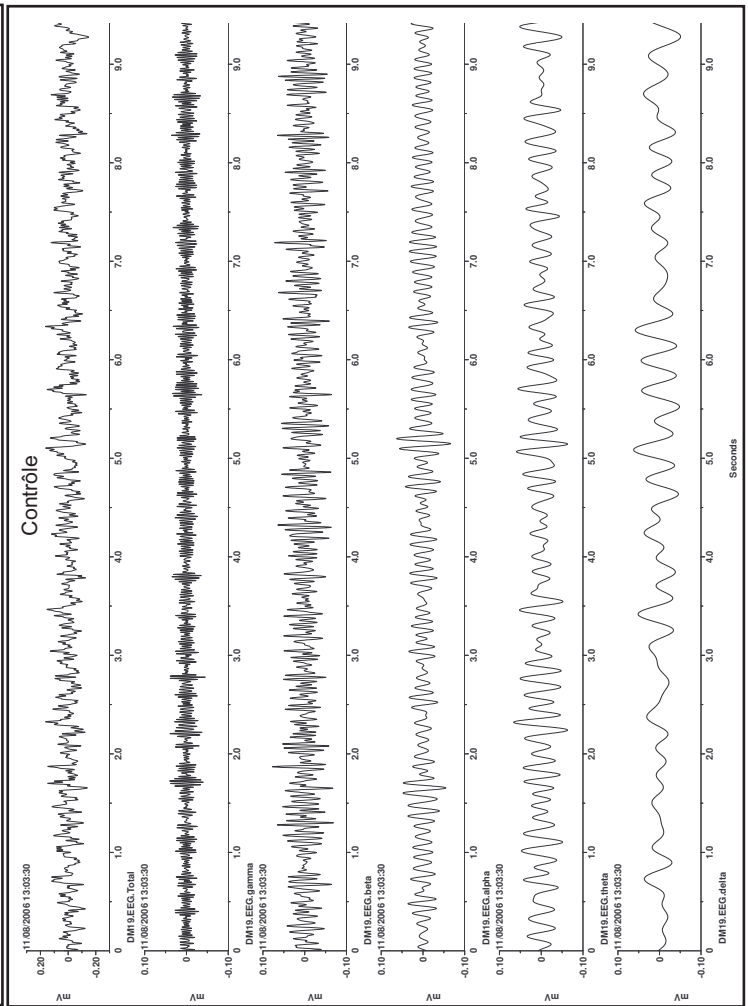
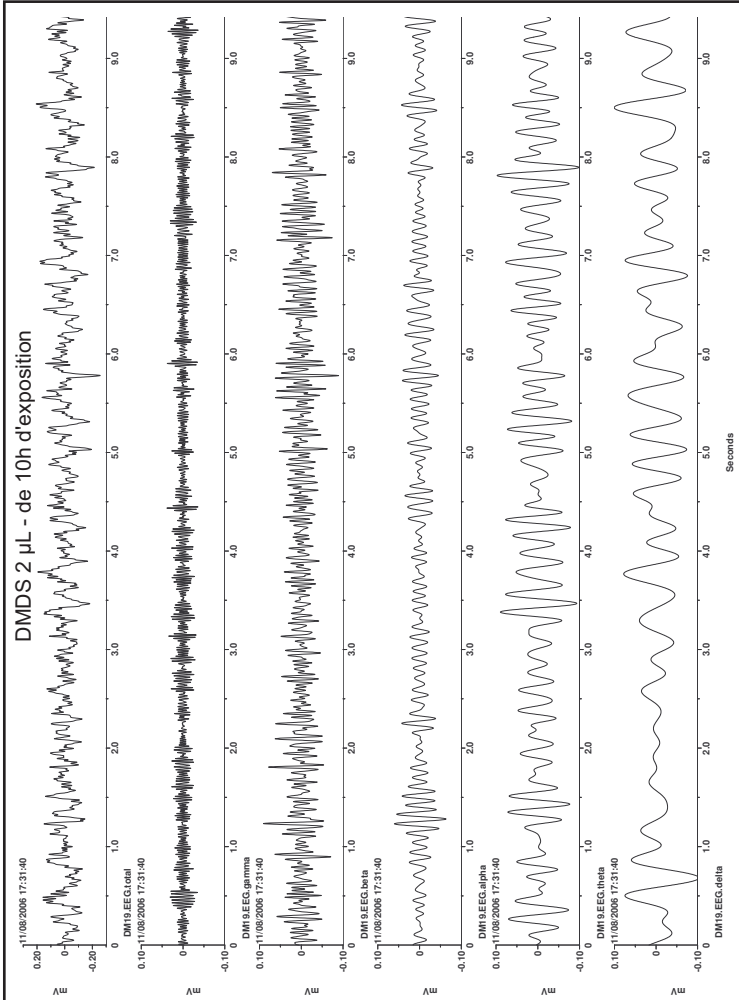
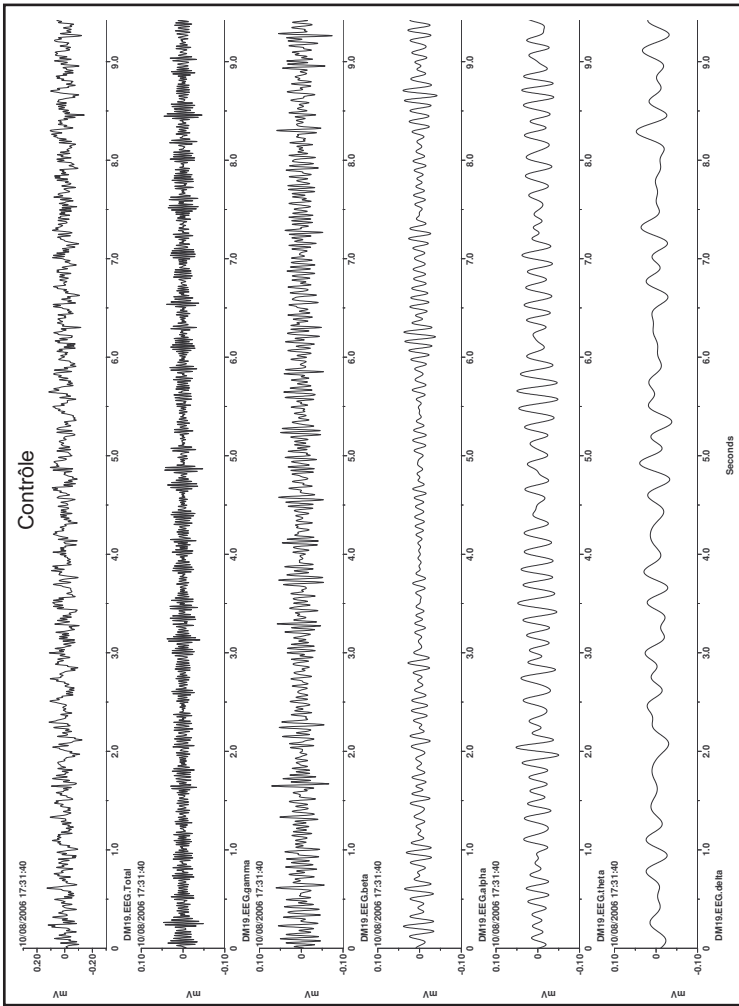
**C** : DMDS à 2 µL/L d'air.

A



B





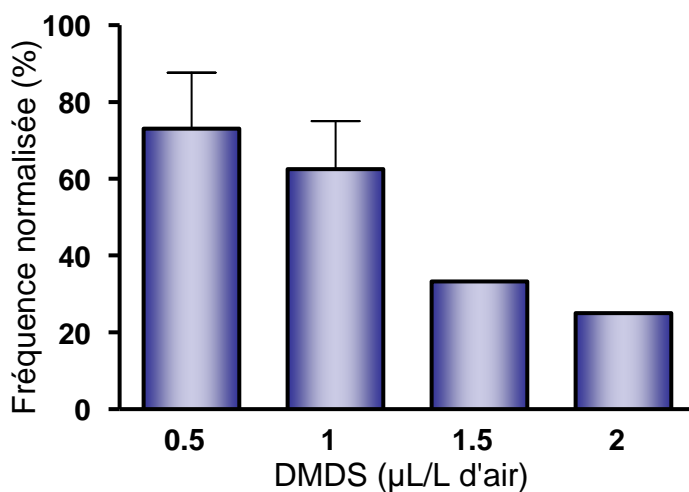
### DMDS 0,5 $\mu$ L/L d'air

Les deux enregistrements contrôles (Figure 48A, cadres de gauche) sont composés majoritairement de rythmes thêta avec une participation dans les mêmes proportions des autres bandes de fréquences. Après exposition au DMDS (Figure 48A, cadre droit haut, + 2h30), nous avons pu noter une participation plus importante de certains rythmes, assez bien marquées pour les rythmes bêta. Ces rythmes, typiques d'une activité cérébrale d'éveil, sont normalement de faible amplitude mais peuvent être augmentés par certains agents pharmacologiques tels les benzodiazépines et les barbituriques (Goldensohn et al., 1999 ; Crespel et al, 2005). Donc, l'augmentation de cette activité bêta dans l'enregistrement présenté peut être due soit à un rythme bêta amplifié par le DMDS, soit à l'apparition d'anomalies dont la fréquence est la même que celle des rythmes bêta dites « paroxysmal activity resembling beta » (Goldensohn et al., 1999).

Après une longue exposition au DMDS (Figure 48A, cadre droit bas, + 23h), l'amplitude de l'EEG est nettement diminuée et les activités sont fortement modifiées. L'EEG est alors majoritairement constitué d'ondes delta de faible amplitude sur lesquelles se superposent des rythmes bêta également de faible amplitude. Cet excès d'ondes lentes traduit un ralentissement pathologique qui est le signe d'une souffrance imputable à la toxicité du DMDS.

### DMDS 1 $\mu$ L/L d'air

Les tracés contrôles (Figure 48B, cadres gauche) ont comme rythmes dominants alpha et thêta. Après une courte exposition au DMDS, peu de modifications sont visibles sur l'EEG, hormis une légère augmentation de l'amplitude et une pointe qui se greffe sur le rythme bêta (Figure 48B, cadre droit haut, + 30 minutes). Les effets les plus importants sont visibles après un long temps d'exposition (Figure 48B, cadre droit bas, +23h30). L'amplitude de l'EEG est nettement diminuée. Toutes les activités sont touchées par cette baisse, bien qu'elle soit faible pour bêta. Un ralentissement des activités est également visible. Le tracé EEG est alors surtout composé d'ondes lentes (delta et une petite participation de thêta) sur lesquelles se superposent les ondes bêta.



**Figure 49**

Graphique illustrant le ralentissement (exprimé en pourcentage de la fréquence contrôle prise 24h avant) de la fréquence majoritaire des activités EEG à 12h d'application de DMDS. Pour les doses 0,5 et 1 µL/L d'air, l'histogramme représente la moyenne des individus. Pour les doses de 1,5 et 2 µL/L d'air il s'agit d'individu unique (Décès avant les 12h pour les autres individus).

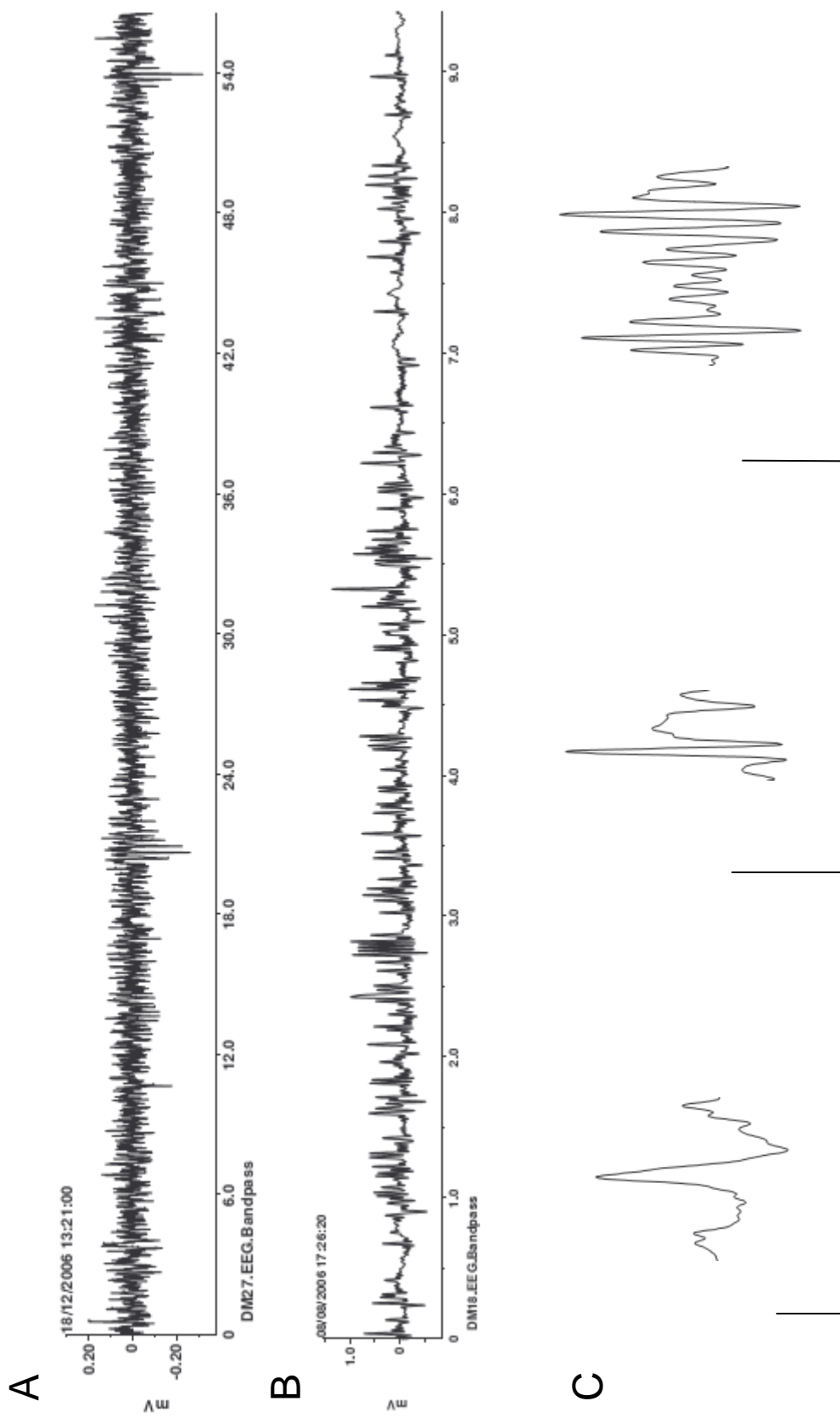
### DMDS 2 $\mu$ L/L d'air

Le rythme dominant de ces enregistrements contrôles est thêta, bien que la participation d'autres rythmes (bêta contrôle haut ; alpha, delta et bêta contrôle bas) n'est pas négligeable (Figure 48C, cadres gauches). Après une courte exposition au DMDS (Figure 48C, cadre droit haut, + 1h30) l'activité EEG de fond est plus irrégulière et son amplitude est plus importante. L'augmentation d'amplitude de l'EEG est marquée pour les ondes lentes (delta, thêta) mais s'avère plus faible pour bêta et alpha. Après une longue exposition au DMDS (Figure 48C, cadre droit, bas, + 21h) l'EEG présente les mêmes types d'altérations précédemment décrites : une diminution de l'amplitude associée à un ralentissement pathologique. Le tracé est composé majoritairement d'ondes delta et d'une activité bêta de faible amplitude.

Bien que nous ayons pu observer quelques modifications dans les activités de l'EEG lors de l'application de DMDS, aucun profil commun à toutes les souris n'a pu être défini par les analyses de fréquences quantitatives effectuées. Un ralentissement dose-dépendant des rythmes de fond associé à la baisse d'amplitude a cependant pu être mis en évidence (Figure 49).

Parallèlement à ces altérations de l'activité de fond de l'EEG, quelques bouffées isolées similaires à celles déjà décrites en résultats préliminaires (Figure 43) ont été décrites sur un individu traité à 1 $\mu$ L de DMDS par litre d'air (Figure 50A). Par contre, ces bouffées n'ont pu être reliées aux observations comportementales des troubles neuromusculaires observés, en particulier les myoclonies, du fait d'artéfacts pouvant provenir de l'activité musculaire (Figure 50B). En effet, l'activité électrique produite par les muscles lors de leur contraction (volontaire ou non) peut parfois masquer l'activité EEG sous-jacente (Goldensohn et coll., 1999 ; Crespel et coll., 2005). Ainsi, pour certains individus, le tracé électrique est profondément modifié au même moment que ces troubles neuromusculaires, ce qui suggère que l'activité EEG est masquée par l'électromyogramme. Ces modifications profondes du tracé EEG ont pu être quantifiées en durée et en fréquence mais leur origine reste encore inconnue. La présence de graphoéléments anormaux isolés tels des pointes lentes, des pointes ondes ou des polypointes a pu être également observée (Figure 50C, D et E).





**Figure 50**

Anomalies observées lors de l'application de DMDS.

**A :** Bouffées d'ondes à une fréquence de 10 Hz. **B :** Artéfacts contemporains de tremblements et de myoclonies observées. **C :** Graphoéléments isolés. De gauche à droite : pointe lente, pointe-onde et polypointe. Echelle, 200μV et 200 ms.

## **C- Conclusion**

Au cours de notre étude nous avons montré que le DMDS induit des altérations de l'activité EEG au niveau de l'amplitude, des rythmes et de l'apparition de motifs suspects. Cependant les informations dont nous disposons sont encore insuffisantes pour conclure sur la nature exacte de ses altérations et demandent la poursuite de ces travaux. Néanmoins un changement de protocole notamment dans la durée d'exposition au DMDS serait souhaitable. En effet, dans le souci d'étudier tous les effets du DMDS nous avons choisi une durée d'inhalation de 24h. Il apparaît aux vues de nos résultats que les motifs suspects apparaissent dans les premières heures. De plus les procédures habituelles d'inhalation de produits toxiques sont le plus souvent d'une durée de 2, 4 ou 6 heures. Une réduction de la durée d'exposition, d'au minimum 14h permettrait, de diminuer la souffrance des animaux tout en nous assurant d'être dans la fenêtre de temps la plus intéressante pour la recherche d'anomalies.

L'effet le plus caractéristique que nous avons observé est la diminution de l'amplitude des signaux EEG, associée à la léthargie des animaux. Mais ces symptômes qui n'apparaissent que tardivement sont liés à une atteinte générale des animaux. Il est donc peu probable d'observer un risque de ce type en intoxication aiguë (sauf en cas d'exposition massive au pronostic vital fortement compromis). Cependant, d'après les irrégularités de l'activité EEG observée dans les premières heures d'expositions, il existe un risque d'apparitions d'anomalies. Un suivi EEG pourrait donc être intégré au suivi médical des professionnels potentiellement exposés.

La première cible du DMDS clairement identifiée est la cytochrome *c* oxydase du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Dugravot et coll., 2003). Elle est également la cible d'un autre fumigant, la phosphine. L'inhibition de ce complexe IV par le DMDS induit une perte de l'activité neuronale *via* l'ouverture des canaux potassium dépendant de l'ATP (Dugravot et coll., 2003). Or ce mécanisme a été également mis en évidence dans l'action de la roténone (inhibiteur du complexe I) (Liss et Roeper, 2001), clairement identifiée comme à l'origine de processus neurodégénératifs à l'origine de syndromes parkinsoniens (Sherer et coll., 2007) (Caboni et coll., 2004; Hoglinger et coll., 2006). Il existe donc un autre risque à prendre en compte, celui d'effets secondaires retardés, suite à une exposition aiguë importante ou à des expositions chroniques de plus faibles

quantités. Dans cette optique, les cerveaux des souris testées ont été prélevés deux semaines après l'exposition au DMDS. Un marquage spécifique des neurones dopaminergiques sur des coupes de ces cerveaux, pourraient apporter des éléments de réponses sur une éventuelle atteinte de ces neurones par le DMDS. Des inhalations de faibles quantités de DMDS répétées dans le temps pourraient être également envisagées afin d'évaluer le risque d'une exposition chronique. Une autre perspective de recherche concerne l'étude du devenir des dérivés du DMDS et de leur toxicité potentielle. En effet, les produits de dégradations d'une molécule peuvent parfois être plus toxiques que la molécule elle-même, comme l'aldicarbe métabolisé en aldicarbe-sulfoxide (Testud et coll., 2001).

## 4<sup>ème</sup> PARTIE : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

---

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont permis d'approfondir les connaissances, d'une part, sur le mode d'action du DMDS sur neurones d'insecte, d'autre part, sur les canaux potassium dépendants du calcium des DUM neurones. De plus, les résultats obtenus sur les DUM neurones nous ont conduits à évaluer les effets DMDS sur l'activité électroencéphalographique de souris. De ces travaux, nous pouvons conclure que :

- Le DMDS décale vers des potentiels plus négatifs la dépendance vis-à-vis du potentiel des propriétés d'activation et d'inactivation du courant  $\text{Na}_2$ , ce qui rend le neurone plus excitable.
- Le DMDS module les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de façon indirecte *via* le calcium intracellulaire. En augmentant la fréquence de décharge des DUM neurones, le DMDS permet une entrée de calcium *via* les canaux  $\text{Na}/\text{Ca}$  et les canaux calciques de type LVA ( $\text{ICa}_t$  et  $\text{ICa}_m$ ) (Grolleau et Lapied, 2000; Wicher et coll., 2001; Defaix et Lapied, 2005). Cet influx de calcium va permettre indirectement l'activation du  $\text{TRP}\gamma$  (Grolleau et coll., 2006). Cette nouvelle entrée de calcium va provoquer une sortie d'ions calcium des stocks intracellulaires qui vont agir sur les courants  $\text{K}_{\text{Ca}}$ .
- Les légères différences dans la régulation en cloche par le calcium des deux composantes du courant  $\text{K}_{\text{Ca}}$  ainsi que l'inhibition par des oligonucléotides plus rapide pour la composante maintenue constituent de nouveaux arguments en faveur de l'existence de deux courants  $\text{K}_{\text{Ca}}$  distincts.
- Le DMDS modifie l'activité électroencéphalographique de souris. Le DMDS est susceptible de provoquer des anomalies qui doivent encore être étudiées avant de pouvoir conclure sur le risque pour l'utilisateur d'appliquer le DMDS.

Le DMDS, dont l'évaluation en tant qu'insecticide devrait bientôt être achevée, présente aux vues de nos résultats des atouts majeurs à moduler cependant. Le premier atout,

déjà en partie révélé par (Dugravot et coll., 2003), est que le DMDS touche deux composés essentiels à homéostasie cellulaire :

- l'ATP, à forte dose (100  $\mu$ M) le DMDS diminue sa concentration *via* l'inhibition de la cytochrome *c* oxydase.
- le calcium intracellulaire, le DMDS à faible dose augmente, par un influx exogène de calcium qui induit un mécanisme de type CICR, la concentration en calcium intracellulaire.

Les variations de l'ATP et du calcium vont ensuite pouvoir moduler des courants ioniques, tels les courants  $K_{ATP}$  et  $K_{Ca}$ . Dans le cadre de la gestion de résistance, le DMDS fait un très bon candidat. En effet, un tel mécanisme d'action ayant plusieurs cibles dont des cibles indirectes diminue la probabilité d'apparition de mutations de plusieurs cibles chez un même individu. Cependant des années de traitements intensifs réussiront à faire apparaître des insectes résistants s'il n'est pas utilisé de façon raisonnée.

Le fait que le DMDS soit déjà présent dans l'environnement, qu'il ait une demi-vie dans l'atmosphère de courte durée et qu'il ne réagisse pas avec l'ozone atmosphérique constituent un deuxième atout pour le DMDS en vue de sa commercialisation en tant que fumigant.

Cependant, comme tout pesticide le DMDS présente un risque pour l'utilisateur du fait de sa toxicité intrinsèque. Le moyen le plus efficace de limiter ce risque reste, comme pour les autres substances actives, la prévention par l'information et la protection de l'utilisateur.

L'utilisation d'un modèle insecte dans le premier temps de nos expérimentations avec le DMDS a permis d'orienter la suite de nos expérimentations sur mammifère. Tout comme les travaux de Pelhate et coll. (1990) et Grolleau et coll. (2001), ce travail souligne l'intérêt d'utiliser les neurones d'insectes pour révéler un mode d'action qui puisse ensuite orienter les recherches voire expliquer les effets observés sur des modèles de mammifères. De manière plus générale, les modèles invertébrés sont de très bons outils. Ils permettent d'amorcer la compréhension de mécanismes très complexes chez les vertébrés. Ils sont de plus en plus utilisés en modèles de pathologies humaines telles les épilepsies (Baraban, 2007) ou la maladie de Parkinson (Schmidt et coll., 2007 ; Vehovszky et coll., 2007).

Comme nous l'avons exposé à la fin de la 2<sup>ème</sup> et de la 3<sup>ème</sup> partie, ce travail de thèse laisse envisager plusieurs perspectives de travail autant sur neurones d'insectes que sur souris.

- Le mécanisme qui permet au DMDS d'agir sur le canal sodium reste encore à élucider. En effet, il peut s'agir d'une action directe sur le canal, d'une insertion dans la membrane puisque le DMDS est capable de les traverser ou de l'implication d'un second messenger ou d'une protéine modulatrice.
- L'effet du DMDS doit être étudié sur les courants calciques impliqués dans la phase de prédépolarisation des potentiels d'action des DUM neurones, c'est-à-dire, ceux de type LVA ICat, ICam, et INa/Ca.
- Les études préliminaires sur les variants de pSlo doivent être poursuivis afin de connaître les arrangements fonctionnels des canaux pSlo dans les DUM neurones, grâce à la RT-PCR sur cellule unique. L'utilisation d'oligonucléotides antisens pour d'inhiber un canal (ou un récepteur) sur DUM neurones isolés constitue une approche préliminaire et nécessite des améliorations.
- Concernant les expérimentations sur souris, le temps d'inhalation doit être réduit et il faut poursuivre l'étude afin de conclure sur les effets du DMDS sur l'activité électroencéphalographique de souris
- Pour finir, les cerveaux prélevés sur les souris ayant inhalé du DMDS pourront être utilisés pour réaliser des marquages immunohistochimiques et révéler la ou les aires cérébrales qui présentent une éventuelle dégénérescence neuronale.



## ANNEXES

### **Résumé non publié :**

**Identification of new targets for the fumigant dimethyl disulfide on insect pacemaker neurons.**

*Gautier H., Legros C. et Lapied B.*

Congrès FENS 2006, Vienne (Autriche)

### **Article publié :**

**Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons.**

*Lavialle-Defaix, C., H. Gautier, A. Defaix, B. Lapied and F. Grolleau*

*J. Neurophysiol.* 2006 **96**: 2437-50.



## RESUME

### **GAUTIER H, LEGROS C. & LAPIED B.**

*Laboratoire RCIM, UPRES EA 2647, Angers, France*

Identification of new targets for the fumigant dimethyl disulfide on insect pacemaker neurons

Since the ban of the most use fumigant, methyl bromide, dimethyl disulfide (DMDS), a plant-derived insecticide, was claimed to be a promising substitute. To date, at high concentrations (100  $\mu\text{M}$ ), DMDS induces membrane hyperpolarization and reduction of insect neuronal activity through mitochondrial dysfunction involving inhibition of cytochrome oxydase (1).

The aim of our work was to further understand the mode of action of DMDS. Interestingly, we observed that at lower concentrations (1  $\mu\text{M}$ ), DMDS affects new targets involved in spontaneous electrical activity of insect neurons. Whole cell patch-clamp studies and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging were performed on cockroach (*Periplaneta americana*) octopaminergic neurosecretory cells, called dorsal unpaired median (DUM) neurons. DMDS modified spontaneous regular spike discharge into clear bursting activity associated with afterhyperpolarization (AHP) decrease. This reduction of AHP focused our study on  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel and on variation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) level.

In addition, we showed that DMDS was able to increase the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in DUM neurons. Using  $\text{Ca}^{2+}$  free solution, we established that this rise needed participation of external  $\text{Ca}^{2+}$ . Using omega-conotoxin (HVA inhibitor) and LOE 908 (inhibitor of noncapacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry, NCCE), we demonstrated that DMDS induced influx of  $\text{Ca}^{2+}$  via HVA  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation which, in turn, induced activation of NCCE. This event caused a  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stock by ryanodine receptor activation. Besides, we demonstrated that the modulation of IKCa by DMDS is fitted by an U-shaped-curve, as it was observed with experimental variations of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In order to prove that IKCa is one other target of DMDS we realise a double approach by using iberiotoxin (IKCa inhibitor) and antisense strategy against pSlo (2).

In conclusion, DMDS shows a neurotoxic activity more complex than expected bringing to light the necessity of understanding their targets.

(1) Dugravot and al. 2003, J. Neurophysiol. 90: 259-270

(2) Derst and al. 2003, Eur. J. Neurosci. 17: 1197-1212

# Differential Regulation of Two Distinct Voltage-Dependent Sodium Currents by Group III Metabotropic Glutamate Receptor Activation in Insect Pacemaker Neurons

Céline Lavialle-Defaix,<sup>1</sup> Hélène Gautier,<sup>1</sup> Antoine Defaix,<sup>1</sup> Bruno Lapiéd,<sup>1</sup> and Françoise Grolleau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur, Equipe d'Accueil 2647, Université d'Angers, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Sciences and <sup>2</sup>Laboratoire Biologie Intégrée Neurovasculaire, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique 6214/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 771, UFR Sciences Médicales, Angers, France

Submitted 6 June 2006; accepted in final form 3 August 2006

**Lavialle-Defaix, Céline, Hélène Gautier, Antoine Defaix, Bruno Lapiéd, and Françoise Grolleau.** Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 96: 2437–2450, 2006. First published August 9, 2006; doi:10.1152/jn.00588.2006. Using whole cell patch-clamp technique and immunocytochemistry on adult dorsal unpaired median (DUM) neurons isolated from the cockroach *Periplaneta americana* CNS, we reported the characterization of a native mGluR, sharing pharmacological properties with vertebrate metabotropic glutamate receptor III (mGluRIII) that regulated voltage-dependent sodium current ( $I_{Na}$ ). The global  $I_{Na}$  was dissociated by means of L-glutamate sensitivity, deactivation time constant, voltage dependence of activation and inactivation, recovery from inactivation, and intracellular regulation process. These two currents were respectively designated  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  for L-glutamate-sensitive and -insensitive sodium currents. L-glutamate selectively reduced  $I_{Na1}$  by an increase of intracellular cAMP level. Using different activators and/or inhibitors of G proteins and cAMP/PKA cascade, together with St-Ht31 (an inhibitor of PKA binding to AKAP) and AKAP-79 antibodies, we established that mGluRIII was linked to  $I_{Na1}$  by a Gi/o and a suspected Gs protein. According to the activated signaling pathway, L-glutamate elevated the cAMP level, which thereby activated cytosolic PKA and released PKA bound to AKAP. As expected from both biophysical and pharmacological studies, we showed that, through an inhibition of  $I_{Na1}$ , L-glutamate increased DUM neuron spontaneous electrical activity. These results indicated that such mGluRIII-activated dual processes provided a new physiological control of pacemaker neuronal firing.

## INTRODUCTION

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) form a family of eight structurally related receptors (mGluR1–8), which can be divided into three groups according to their sequence similarities, pharmacological properties, and signaling cascades (Coutinho and Knopfel 2002; Pin and Acher 2002; Schoepp et al. 1999). Group I is composed of mGluR1 and mGluR5 receptors that activate phospholipase C, whereas group II (mGluR2 and mGluR3) and group III (mGluR4, -6, -7, and -8) can inhibit adenylyl cyclase activity by pertussis toxin-sensitive Gi/o proteins, which prevents formation of

cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) (for review see Moldrich and Beart 2003). Through this molecular diversity, glutamate displays widespread and diverse actions on neuronal excitability by modulating different types of ion channels. Calcium and potassium channels are end targets in a large number of regulatory pathways that are initiated by mGluR activation. Regulation of potassium channels by mGluRs is particularly prominent. mGluR-mediated suppression or enhancement of potassium currents (e.g., calcium-dependent potassium currents or the GIRK family of inwardly rectifying potassium current) has been extensively studied and reviewed (Anwyl 1999; Dutar et al. 2000; Gebremedhin et al. 2003).

Among voltage-dependent ionic channels, which generate inward current, N-type calcium channels have been found to be most commonly inhibited by mGluRs (Anwyl 1999). In addition, recent studies have also described a potent action of mGluR agonists on other voltage-gated calcium channels subtypes. These include low-voltage-activated calcium channels regulated by mGluR2 controlling activation of a protein tyrosine kinase in rat retinal ganglion cells (Robbins et al. 2003) and P/Q-type channels inhibited by mGluR7a through a PKC-dependent phosphorylation cascade in cultured cerebellar granule neurons (Perroy et al. 2000). Although these voltage-dependent ionic channels are known to have specialized functions in cellular excitability, only very few data are available about mGluR-induced regulation of the voltage-dependent sodium channel (Yang and Gereau 2004).

In this study, we have used a well-known insect neuronal model identified as dorsal unpaired median (DUM) neurons, known to express pacemaker activity involving a large number of identified voltage-dependent ionic channels that have specialized function in neuronal excitability (Grolleau and Lapiéd 2000; Wicher et al. 2001). Among neurotransmitters known to regulate DUM neurons pacemaker activity, it has been reported that glutamate may have important physiological roles. Previous findings have revealed that locust abdominal DUM neurons, for instance, receive significant glutamatergic input from descending intersegmental interneurons (Pflüger and Watson 1995). Furthermore, several arguments lead us to speculate that different groups of mGluRs are expressed in insect and involved in the modulation of electrical activity (Washio 2002).

Address for reprint requests and other correspondence: B. Lapiéd, Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France (E-mail: bruno.lapiéd@univ-angers.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Finally, the *Drosophila* genome database (Adams et al. 2000) contains at least six members of this G-protein-coupled receptor gene family. To date, a homologue of mammalian group II mGluRs, DmGluRA, has been cloned from the *Drosophila* head cDNA library (Parmentier et al. 1996). It has been shown that DmGluRA is distributed in both larval and adult *Drosophila* CNS (Parmentier et al. 1996; Ramaekers et al. 2001). Using an oocyte expression system, we established that DmGluRA is coupled, by a pertussis toxin-sensitive G protein, to an inwardly rectifying potassium channel (Raymond et al. 1999). In this study, we demonstrate for the first time, that a native neuronal mGluR, sharing pharmacological properties with vertebrate mGluRIII, differentially regulates voltage-dependent sodium currents. We also report that none of the classical mechanisms known to link mGluRIII to the effectors occur in pacemaker DUM neurons.

## METHODS

### Preparation

Experiments were performed on DUM neuron cell bodies isolated from the midline of the terminal abdominal ganglia (TAG) of the nerve chord of adult male cockroach (*Periplaneta americana*). Insects were obtained from our laboratory stock colonies maintained under standard conditions (29°C, photoperiod of 12-h light/12-h dark). Animals were pinned ventral side up on a dissection dish. The ventral cuticle and accessory glands were removed to allow access to the ventral nerve cord. The abdominal nerve cord and its TAG, carefully dissected under a binocular microscope, were placed in normal cockroach saline containing (in mM) 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 50 sucrose, and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH.

### Cell isolation

Isolation of adult DUM neuron cell bodies was performed under sterile conditions using enzymatic digestion and mechanical dissociation of the median part of the TAG as previously described (Lapied et al. 1989). According to the cobalt-filling technique together with immunohistochemical mapping and electrophysiological recordings, it was assumed that most of TAG DUM neurons investigated formed a relatively homogeneous population of cells (Lapied et al. 1989; Sinakevitch et al. 1994). Ganglia were excised and incubated for 35 min at 29°C in cockroach saline supplemented with 1.5 mg/ml collagenase (type I, Worthington, Lakewood, NJ). After thoroughly washing off the enzyme, ganglia were mechanically dissociated by gentle repeated suction through fire-polished Pasteur pipettes. Then, the isolated DUM neuron cell bodies were maintained at 29°C for 24 h before experiments were carried out. In this condition, DUM neuron cell bodies never displayed neurite outgrowth.

### Electrophysiological recordings

Patch-clamp technique in the whole cell recording configuration (Hamill et al. 1981) was used to record voltage-gated sodium currents (voltage-clamp mode; Lapied et al. 1990) and spontaneous action potentials (current-clamp mode without current injection). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) using a PP83 puller (Narishige, Tokyo, Japan). Pipettes had resistances ranging from 0.8 to 1 M $\Omega$  (for sodium currents recording) or 1.1 to 1.5 M $\Omega$  (for action potentials recordings) when filled with internal solutions (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>5 G $\Omega$ ).

Voltage-dependent sodium currents were recorded in isolation in the presence of both calcium and potassium channel blockers (see composition of solutions just below). They were recorded with an Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) amplifier, filtered at 5 kHz using a four-pole low-pass Bessel filter. Data were stored on-line on the hard disk of a PC computer (Elonex, Pentium 733 MHz, sampling frequency 33 kHz) connected to a 16-bit A/D converter (Digidata 1322A, Axon Instruments). The pClamp package (version 8.0.2, Axon Instruments) was used for data acquisition and analysis. Although leak and capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents was performed with an on-line P/6 protocol provided by pClamp. Series resistance value was obtained for each experiment from the patch-clamp amplifier settings after compensation and varied between 3 and 5 M $\Omega$ .

DUM neuron cell bodies were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -90 mV (except when otherwise stated) and 30-ms test pulses were applied from the holding potential. For current-clamp experiments, spontaneous action potentials were displayed on a digital oscilloscope (310, Nicolet Instruments, Madison, WI) and stored on a DAT (DTR-1204, Biologic Science Instruments, Claix, France). Patch-clamp experiments were conducted at room temperature (20–22°C). Data, when quantified, were expressed as means  $\pm$  SE. Differences between means were tested for statistical significance by Student's *t*-test. For data analysis including fitting procedures, the software Prism 4 (GraphPad software, San Diego, CA) was used.

### Solutions

For voltage-clamp experiments, the extracellular solution contained (in mM): 80 NaCl, 100 TEA-Cl, 3.1 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1 CdCl<sub>2</sub>, 5 4-aminopyridine (4-AP), and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with TEA-OH. Patch pipettes were filled with internal solution containing (in mM): 90 CsCl, 70 CsF, 15 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 3 ATP-Mg, and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with CsOH. Drug solutions were prepared in the external solution and applied in the immediate vicinity of the cell by a gravity perfusion system. In some cases, the tested compounds were added in the internal pipette solution immediately before use. For current-clamp recordings, cells were bathed in external solution containing (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 4 MgCl<sub>2</sub>, 5 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The internal solution contained (in mM): 160 K-aspartate, 10 K-fluoride, 10 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 1 ATP-Mg, and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with KOH. The metabotropic glutamate receptor agonists L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4), *trans*-azetidine-2,4-dicarboxylic acid (*t*-ADA), the mGluRs antagonists (*RS*)- $\alpha$ -methylserine-*O*-phosphate (MSOP), (2*S*,3*S*,4*S*)-2-methyl-2-(carboxycyclopropyl)glycine (MCCG), (*RS*)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA), the phosphodiesterase inhibitors, 2-(1-propyloxyphenyl)-8-azapurin-6-one (zaprinast) and 4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)pyrrolidin-2-one (rolipram) were purchased from Tocris Bioscience (Avonmouth, UK). The mGluR agonist (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*)-(+)-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylate (LY354740) was a gift from Lilly Research Laboratories (Indianapolis, IN). L-Glutamate, *N*-2[-(*p*-bromocinnamyl-amino)ethyl-5-isoquinolinesulfonamide (H89), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP), forskolin, and picrotoxin were purchased from Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France). The pertussis toxin A-protomer (PTX) came from VWR International (Fontenay sous Bois, France). St-Ht31 (AKAP Stearated-Ht31 inhibitor peptide) was purchased from Promega (Madison, WI). Zaprinast, rolipram, and IBMX were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Final dilution never contained more than 0.1% DMSO. This concentration of solvent was found to be without effect on electrophysiological properties of DUM neurons.

## Immunocytochemistry

For light microscope immunocytochemistry, isolated DUM neurons were fixed for 1 h with 4% paraformaldehyde containing 5% (wt/vol) sucrose in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). After fixation, cells were washed three times for 5 min each in PBS and 5 min in PBS containing 0.2% Triton X-100 (PBS-T). To block non-specific binding of the primary antibody, cell bodies were preincubated with 4% bovine serum albumin (BSA) in PBS-T for 1 h. Primary antisera (rabbit anti-cyclic-AMP polyclonal antibodies; Euromedex, Mundolsheim, France) or goat anti-AKAP-79 polyclonal antibodies (Autogen-Biobclear, Calne, UK), diluted respectively 1/800 and 1/50 in PBS-T, were applied overnight at 4°C or 12 h at 20°C for the anti-AKAP-79 antibodies. The anti-AKAP-79 antibodies were raised against the N-terminal region of human AKAP-79. After repeated washing in PBS-T, the secondary antibody [fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-rabbit IgG (Euromedex)] or bovine anti-goat IgG (Autogen-Biobclear) diluted 1/300 and 1/30 in PBS-T containing 1% BSA were applied at 20°C for 3 h in the dark. Isolated DUM neuron cell bodies were then rinsed in 4% BSA in PBS and mounted on glass slides in glycerol/PBS. The fluorescence detection was captured using an Axiocam HRC camera mounted on a Zeiss Axioskop microscope. Images were digitized with Axiovision and stored as TIF format files for later analysis. The quantification of the change in immunofluorescence was performed using the software ImageJ 1.34s (Scion, Frederick, MD). The anti-AKAP-79 antibody binding was inhibited by the blocking-peptide (Autogen-Biobclear). The cell bodies were preincubated for 1 h with the blocking peptide (1/20) diluted in PBS containing 4% BSA. Then, the anti-AKAP-79 primary antibodies diluted to 1/100 were incubated with the blocking peptide (1/20) for 12 h at 20°C in PBS-T.

## RESULTS

### Voltage-dependent sodium current is modulated by activation of a group III metabotropic glutamate receptor

The effect of L-glutamate at a final concentration of 10  $\mu$ M was examined on isolated adult DUM neuron cell body, in the voltage-clamp mode. Figure 1A (*inset*) shows a typical example of a transient inward current ( $I_{Na}$ ) elicited by a voltage step from  $-90$  to  $0$  mV before and after bath application of 10  $\mu$ M L-glutamate. In all DUM neuron cell bodies tested, L-glutamate reduced the peak  $I_{Na}$  amplitude by  $48.0 \pm 3.9\%$  ( $n = 24$ ) (Fig. 1A) without modification of either the potential at which the current was maximum or the extrapolated reversal potential (Fig. 1B). For comparison, the global inward sodium current was completely blocked by 100 nM tetrodotoxin (TTX; Fig. 1C).

The smooth lines of the current–voltage relationship represented the best fit to the mean data ( $n = 6$ ) according to the equation (Stühmer 1988)

$$I = G \left( 1 - \frac{1}{1 + \exp(V - V_{0.5}^a / K^a)} \right) (V - V_{rev}) \quad (1)$$

where  $I$  is the amplitude of the inward current;  $V$  is the membrane potential;  $V_{0.5}^a = -27.2$  and  $-32.6$  mV and  $K^a = 5.3$  and  $7.6$  are the activation parameters for control and L-glutamate, respectively;  $G = 203$  and  $128.7$  nS, representing the conductance; and  $V_{rev} = +46.3$  and  $+40.9$  mV are the extrapolated reversal potential of the current, for control and L-glutamate, respectively. These last two parameters were obtained from the linear regression (correlation coefficient  $r = 0.999$ ) through the data points for potentials more positive than

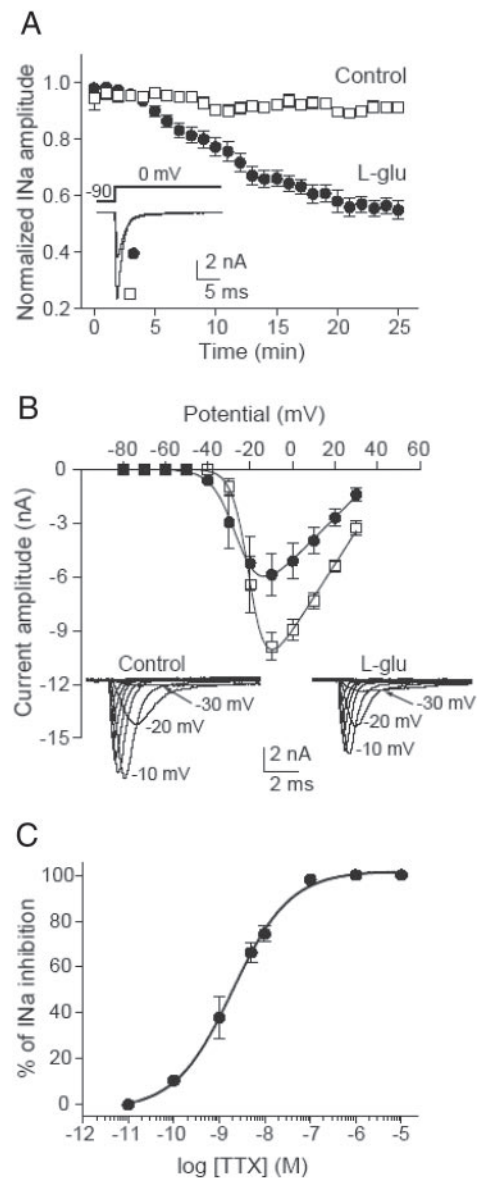


FIG. 1. Modulation of dorsal unpaired median (DUM) neuron voltage-dependent inward sodium current by L-glutamate. *A*: time course of the normalized amplitude of peak sodium current in control ( $\square$ ,  $n = 7$ ) and under 10  $\mu$ M L-glutamate treatment ( $\bullet$ ,  $n = 24$ ). *Inset*: representative example of whole cell inward sodium current traces obtained under control condition ( $\square$ ) and in the presence of L-glutamate (10  $\mu$ M applied during 25 min, the protocol used is indicated above current traces) ( $\bullet$ ). *B*: current–voltage relationship constructed from values of maximum current amplitude plotted as a function of test potentials (holding potential  $-90$  mV) under control condition ( $\square$ ,  $n = 6$ ) and after bath application of L-glutamate (10  $\mu$ M,  $\bullet$ ,  $n = 6$ ). Smooth curves represent the best fit according to Eq. 1. Data are means  $\pm$  SE. *Inset*: family of sodium currents recorded at different test potentials ranging from  $-80$  to  $+30$  mV, from a holding potential of  $-90$  mV. *C*: semi-logarithmic dose–response curve for the blockade of inward sodium current by tetrodotoxin (TTX). Percentage inhibition of the peak sodium current was plotted as a function of  $\log$  [TTX]. Smooth line represents the best fit to the mean data according to the Hill equation ( $n = 3$  to 6 cells).

$0$  mV. Control experiments were also performed to assess the degree of rundown of  $I_{Na}$ . When cells were repeatedly pulsed to  $0$  mV from a holding potential of  $-90$  mV at a frequency of 1 pulse/min, no significant rundown was observed in our experimental condition for  $\leq 25$  min ( $7.1 \pm 2.4\%$ ,  $n = 7$ , Fig. 1A).

Because several groups of mGluRs might be expressed in DUM neuron cell body (Washio 2002), the following experiments were performed to characterize the pharmacological profile of mGluR involved in  $I_{Na}$  reduction. Figure 2A shows comparative semi-logarithmic curves of  $I_{Na}$  reduction induced by L-glutamate and different mGluR agonists. The solid line fits the data according to the Hill equation (correlation coefficient  $r = 0.999$ ), yielding a half-inhibiting L-glutamate concentration ( $EC_{50}$ ) of 16 nM. The concentration–response curves for three other mGluR agonists (including *t*-ADA, LY354740, and L-AP4, which are selective ligands for groups I, II, and III, respectively) were also tested on  $I_{Na}$  amplitude. As shown in Fig. 2A, only L-AP4 partially mimicked the inhibitory effect of L-glutamate on  $I_{Na}$ . However, the  $EC_{50}$  value estimated for this agonist (760 nM) was about 50-fold higher than  $EC_{50}$  calculated for L-glutamate. For comparison, LY354740 and *t*-ADA used at a final concentration of 10  $\mu$ M had no or only a weak effect on  $I_{Na}$  amplitude ( $4.7 \pm 1.9\%$ ,  $n = 5$  and  $10.7 \pm 3.0\%$ ,  $n = 5$ , respectively). These weak effects were not significantly different compared with control ( $7.1 \pm 2.4\%$ ,  $n = 7$ ,  $P > 0.05$ ).

We also assessed the contribution of each mGluR group using specific antagonists. Concentration–response curves for three specific vertebrate mGluR antagonists are shown in Fig. 2B. Only the mGluRIII antagonist MSOP potently blocked, in a dose-dependent manner, the effect of L-glutamate. The  $IC_{50}$  value for MSOP, estimated by the Hill equation, was 45  $\mu$ M. Neither AIDA nor MCCG, mGluRI and II antagonists, respectively, totally blocked the effect of L-glutamate when applied in the same concentration range (Fig. 2B). Together, these results demonstrated that  $I_{Na}$  was modulated by mGluR sharing pharmacological properties with the vertebrate mGluRIII.

From this pharmacological study, two important points emerged. First, L-glutamate-induced  $I_{Na}$  reduction was always significantly higher than the effect produced by L-AP4 (Fig. 2, C and D). L-AP4 tested at 10 or 200  $\mu$ M reduced  $I_{Na}$  by  $32.7 \pm 5.6\%$  ( $n = 7$ ) and  $29.8 \pm 1.9\%$  ( $n = 14$ ), respectively. After

200  $\mu$ M L-AP4 treatment,  $I_{Na}$  amplitude was always further reduced by subsequent addition of 10  $\mu$ M L-glutamate to  $52.3 \pm 5.5\%$  ( $n = 7$ , Fig. 2D,  $P < 0.05$ ). Second, the maximum inhibition obtained with L-glutamate was always  $<60\%$ . This suggested, among other possibilities, that the total sodium current could be dissociated into two components, one sensitive and another insensitive to L-glutamate. This hypothesis was substantiated by means of tail current analysis reflecting the deactivation kinetics of channel closing on repolarization. Figure 3A shows typical control peak current and deactivation tail current traces evoked by a short depolarizing pulse (1.5 to 2 ms in duration to ensure fully activation). Under control conditions, tail current deactivation was best described by the sum of two exponentials giving the corresponding slow ( $\tau_1$ ) and fast ( $\tau_2$ ) time constants ( $\tau_1 = 7.06 \pm 1.12$  ms,  $\tau_2 = 0.52 \pm 0.04$  ms, respectively,  $r = 0.960 \pm 0.003$ ,  $n = 29$ ; Fig. 3, A and B, Eq. 2)

$$I_{I_{max}} = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (2)$$

in which  $A_1$  and  $A_2$  are the corresponding relative amplitude with time constants  $\tau_1$  and  $\tau_2$ . For comparison, the use of one exponential function gave a weak correlation coefficient ( $r$ ) of  $0.875 \pm 0.015$  ( $n = 15$ , Student's *t*-test,  $P < 0.001$ ). These results suggested that more than one  $I_{Na}$  was present. In 17 of 24 neurons, L-glutamate (10  $\mu$ M) strongly reduced  $\tau_1$  to  $3.35 \pm 0.56$  ms ( $P < 0.05$ ) without any significant effect on  $\tau_2$  ( $0.61 \pm 0.07$  ms, Fig. 3B). In the same way, the corresponding first component amplitude ( $A_1$ ) was also reduced (62%). Although, this last effect might be related to a poorly clamped sodium current reflecting an inadequate voltage clamp, we present here a number of arguments against a possible voltage-clamp artifact. First, as indicated in the METHODS (also see Lapiéd et al. 1990), the adequacy of the voltage clamp was assessed by measuring the cell potential directly with an intracellular microelectrode. In none of the experiments did the cell potential differ from the patch pipette potential by  $>4$  mV, even during the largest current flow. Second, as shown in Fig.

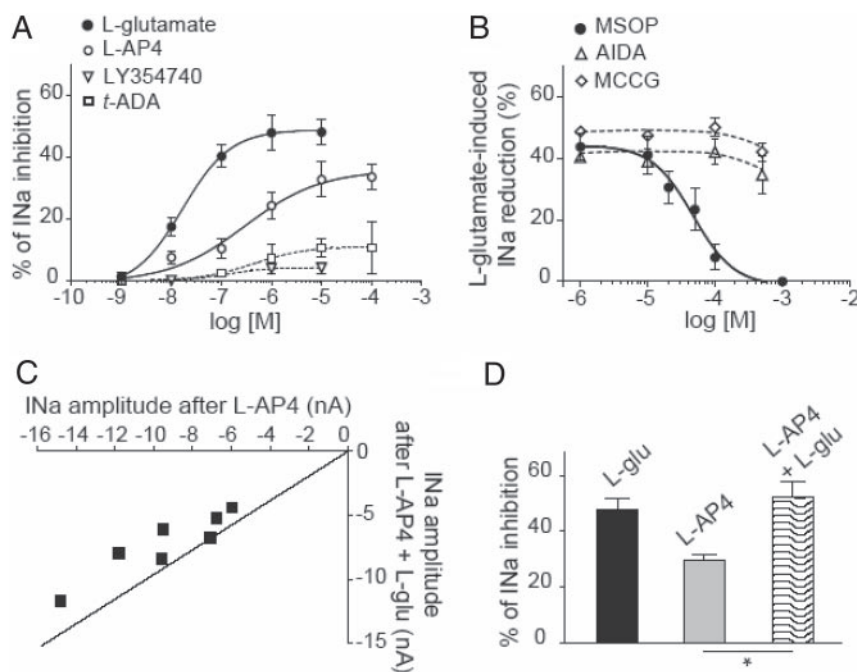


FIG. 2. Group III metabotropic glutamate receptor (mGluR) modulates DUM neuron voltage-dependent sodium current. A and B: pharmacological characterization of mGluR-induced reduction of the whole cell inward sodium current. A: semi-logarithmic dose–response curves for the reduction of inward sodium current by L-glutamate and 3 vertebrate mGluR agonists L-AP4 (group III), *t*-ADA (group I), and LY354740 (group II). B: semi-logarithmic dose–response curves for the blockage of L-glutamate-induced sodium current reduction by 3 mGluR antagonists MSOP (group III), AIDA (group I), and MCCG (group II). Curves in A and B represent the best fit to the mean data points according to the Hill equation yielding the corresponding  $EC_{50}$  (A) and  $IC_{50}$  (B) indicated in the text. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 5$  to 24 cells). C: graph illustrating the additional effect induced by L-glutamate (10  $\mu$ M) on the inward sodium current recorded in the presence of L-AP4 (200  $\mu$ M). Straight line represents the theoretical correlation ( $r = 1$ ). D: histogram summarizing the significant effect of L-glutamate on the sodium current amplitude in the presence of L-AP4 (\*, significantly different,  $P < 0.05$ ). Each bar of histogram represents the means  $\pm$  SE ( $n = 7$  to 24 cells). In all experiments, the sodium currents were elicited with a 30-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of  $-90$  mV.

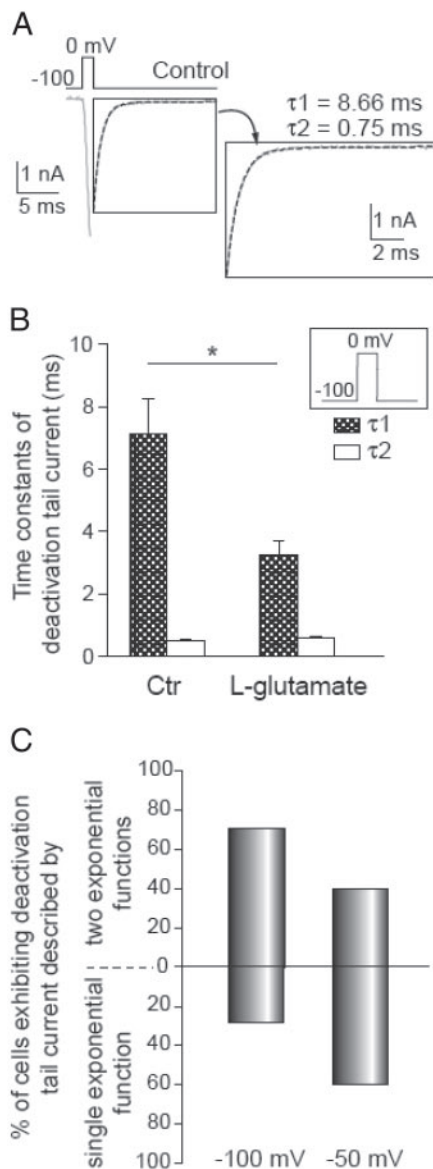


FIG. 3. Identification of two distinct voltage-dependent sodium currents based on tail current analysis. *A*: typical example of control deactivation tail sodium current recorded in response of a 2-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of  $-100$  mV. Tail current of total sodium current was better fitted by two exponential functions. Values of  $\tau_1$  and  $\tau_2$  obtained from Eq. 2 are given in inset ( $r = 0.990$ ). *B*: histogram comparing the values of the 2 time constants of deactivation tail current ( $\tau_1$  and  $\tau_2$ ) defined in control and after application of L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SE ( $n = 17$ ; \*, significantly different,  $P < 0.05$ ). *C*: histogram summarizing percentage of cells exhibiting deactivation tail current described by a single or 2 exponential functions after application of L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ). Cells were repolarized immediately to  $-100$  or  $-50$  mV after 2-ms pulse to 0 mV from a holding potential of  $-100$  mV.

1*B*, the inward current was seen to be progressively activated at all tested potentials, contrary to what was expected under very poor voltage-clamp conditions. In this case, a loss of voltage control was seen as an all-or-none inward current and an instantaneous increase of current to maximum values. Finally, parallel experiments were performed using 20 mM external sodium concentration to reduce the driving force. In these conditions we always obtained similar results as described above (data not illustrated). All together, these results

indicated that L-glutamate preferentially blocked the slower component of the total  $I_{\text{Na}}$  and led us to conclude that the global  $I_{\text{Na}}$  can be further dissociated by means of glutamate sensitivity and deactivation time constants as  $I_{\text{Na}1}$  and  $I_{\text{Na}2}$  for L-glutamate-sensitive and -insensitive currents, respectively.

Interestingly, in seven to 24 neurons treated with L-glutamate, the deactivation tail current recorded at  $-100$  mV was found to be best fitted with a one-exponential function ( $0.58 \pm 0.07$  ms,  $n = 7$ , Fig. 3*B*), which was very close to the value of  $\tau_2$  determined in control. This indicated that in about 29% of neurons tested,  $I_{\text{Na}1}$  was completely blocked by L-glutamate, at this potential (Fig. 3*C*). In fact, the percentage of cells displaying single-exponential function of deactivation tail current versus neurons exhibiting two exponential deactivation tail current was dependent on the membrane potential at which the cell was stepped back after short depolarizing pulse. At  $-50$  mV, which is the physiological DUM neuron membrane potential, 60% of neurons tested exhibited a deactivation tail current described by a single exponential (Fig. 3*C*). These results might indicate that L-glutamate was more potent in affecting  $I_{\text{Na}1}$  in a voltage-dependent manner.

#### *I<sub>Na1</sub>* and *I<sub>Na2</sub>* are further separated by means of activation, inactivation, and recovery from inactivation studies

To reinforce the idea that two separate voltage-dependent sodium channels were present in DUM neurons, we next focused on the study of activation and inactivation properties of  $I_{\text{Na}1}$  and  $I_{\text{Na}2}$ .  $I_{\text{Na}1}$  can be studied in isolation by subtracting the residual current after L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ) from the control current. As a result of the findings presented above, only neurons displaying a single exponential tail current after L-glutamate treatment were considered in this biophysical analysis. The voltage range for activation of the two distinct  $I_{\text{Na}1}$  and  $I_{\text{Na}2}$  can be assayed from the amplitude of the tail currents after pulses of various amplitudes ( $-60$  to 0 mV, in 10-mV increments), reflecting current flow through all open channels before any have been able to close. The resulting tail current amplitude curves should be proportional to the fraction of channels that are activated at a given potential. Figure 4*A* shows normalized plots of the two tail current amplitudes (determined by fitting exponentials) as a function of the voltage activation. To compare more quantitatively the voltage dependency of the two tail currents, the voltage relationships are fitted by a Boltzmann equation

$$It/I_{\text{max}} = 1/\{1 + \exp[(V_{0.5} - V)/k]\} \quad (3)$$

where  $It$  is the tail current,  $I_{\text{max}}$  is the maximum tail current amplitude (measured at 0 mV),  $V_{0.5}$  is the step potential yielding half-maximum tail current, and  $k$  is the slope factor. As illustrated in Fig. 4*A*,  $I_{\text{Na}2}$  was activated in a more negative potential range than  $I_{\text{Na}1}$ . The current observed at  $-40$  mV was almost purely  $I_{\text{Na}2}$ . This was more obvious at  $-30$  mV. Furthermore, the curve for  $I_{\text{Na}2}$  was 1.5 mV shifted to the left of  $I_{\text{Na}1}$  (estimated from  $V_{0.5}$ ) and showed a slower voltage dependency because the slope factor  $k$  was about twice as low as the  $k$  value calculated for  $I_{\text{Na}1}$  (Fig. 4*A*, Table 1).

The voltage dependence of steady-state inactivation ( $h_{\infty}$ ) was also examined using a double-pulse protocol (inset, Fig.

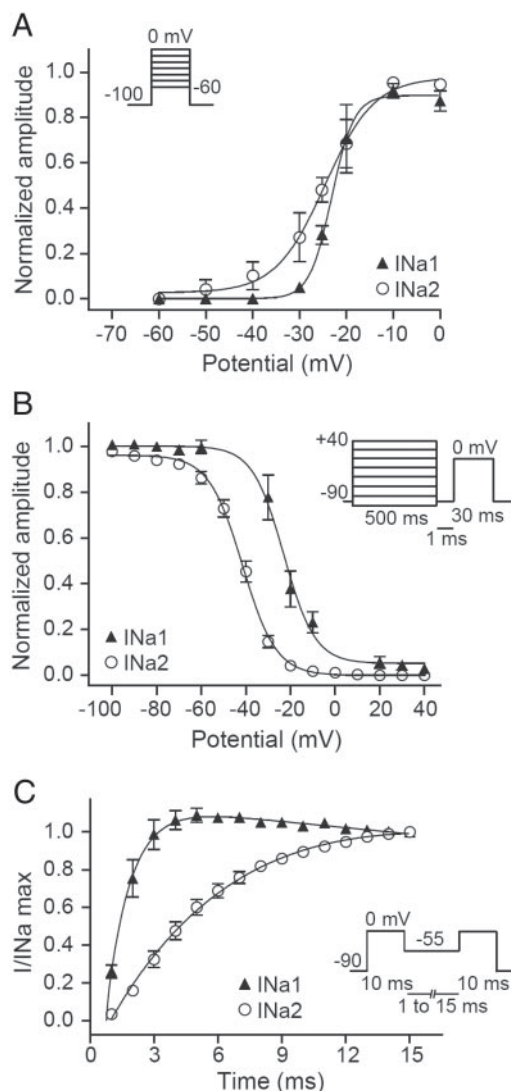


FIG. 4. Electrophysiological properties of the two voltage-dependent sodium currents. *A*: normalized amplitude of tail sodium current of the L-glutamate-sensitive ( $I_{Na1}$ , filled triangles) and -insensitive ( $I_{Na2}$ , open circles) whole cell inward sodium currents were plotted as a function of the activation potential according to the protocol shown in *inset* ( $n = 9$ ). Values were obtained from tail currents recorded after 2-ms depolarizing steps to various test potentials from a holding potential of  $-100$  mV. Smooth curves were fitted to the mean data points using Boltzmann distribution (Eq. 3). *B*: voltage dependence of inactivation parameter of  $I_{Na1}$  (filled triangles) and  $I_{Na2}$  (open circles) studied according to the 2-pulse voltage-clamp protocol indicated in *inset*. Smooth curves of inactivation were fitted through data points ( $n = 11$ ) using Boltzmann distribution (Eq. 4). *C*: time course of recovery from inactivation of  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$ . Standard protocol is shown in *inset*. Cells were prepulsed to 0 mV for 10 ms then brought back to the recovery potential ( $-55$  mV) for increasing recovery durations before the 10-ms test pulse to 0 mV. Smooth curves through the data points ( $n = 9$ ) correspond to the best fits using one or 2 exponential functions (see Eq. 2 in the text). For all experiments, the L-glutamate-sensitive sodium currents were obtained by subtracting currents recorded after  $10 \mu\text{M}$  L-glutamate from control. Data points are mean values  $\pm$  SE.

4B), by holding the cells at prepulse potentials between  $-100$  and  $+40$  mV, in 10-mV increments, for 500 ms. Thereafter the membrane potential was stepped back to the holding potential ( $-90$  mV) for 1 ms before a 30-ms test potential to 0 mV. The  $h_{\infty}$  curves were constructed in Fig. 4B by plotting the normal-

ized peak amplitude of the current against the conditioning potential. Average data of  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  were both fitted using a Boltzmann equation

$$I/I_{\max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k]\} \quad (4)$$

where  $I$  is the peak current,  $I_{\max}$  is the maximum peak current from a holding potential of  $-100$  mV,  $V_{0.5}$  is the potential at which half current was inactivated, and  $k$  corresponds to the slope factor. The midpoint of the  $h_{\infty}$  curve was  $18.7$  mV shifted toward more negative potentials for  $I_{Na2}$  ( $P < 0.05$ ; Fig. 4B) with a slope factor  $k$  7.65 and 7.08 per  $e$ -fold change for  $I_{Na2}$  and  $I_{Na1}$ , respectively (Fig. 4B). Finally, a two-pulse protocol (*inset*, Fig. 4C), used to determine the rate of recovery from inactivation of both  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$ , consisted of two identical depolarizing pulses applied from a holding potential of  $-90$  mV (or from the recovery potentials) to 0 mV and separated by a variable time (1–15 ms in 1-ms steps). The first depolarizing pulse (conditioning pulse) was long enough (10 ms in duration) to give  $>95\%$  inactivation of the current. Between the two pulses, the membrane was repolarized to  $-55$  mV (i.e., DUM neuron membrane potential). To determine the time constant for recovery from inactivation, the curves were fitted using a single- or double-exponential function (see Eq. 2). At  $-55$  mV, the mean values ( $n = 9$ ) were best fitted either by one exponential function for  $I_{Na2}$  or two exponential functions for  $I_{Na1}$  (Fig. 4C, Table 1).

#### Does L-glutamate-induced inhibition of $I_{Na1}$ involve the cyclic AMP pathway?

It is well known in the literature that among mGluRs, some of them (e.g., mGluRIII) suppress the activity of voltage-dependent ion channels by a mechanism involving a heterotrimeric pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein (G protein) of the Gi/o subtype negatively coupled to adenylyl cyclase, which thereby modulates the intracellular cAMP level. To examine the possibility that the reduction in  $I_{Na}$  amplitude (resulting in the suppression of  $I_{Na1}$ ) involved an intracellular cAMP level, antibodies raised against cAMP (De Vente et al. 1993) were used. The control experiments in the presence of AIDA ( $500 \mu\text{M}$ ) and MCCG ( $500 \mu\text{M}$ ), two antagonists of mGluRI and mGluRII, respectively, did not occlude the elevation of cAMP level observed in the presence of L-glutamate (Fig. 5, A and B,  $n = 6$ ). By contrast, pretreatment with MSOP ( $500 \mu\text{M}$ ), a mGluRIII antagonist, in the presence of AIDA and MCCG completely abolished the intensity of fluorescent cAMP immunostaining produced by L-glutamate (Fig. 5, C and D,  $n = 6$ ). These results provided evidence that the effect of the mGluRIII activation on  $I_{Na1}$  involved an unexpected rise in internal cAMP level. To more deeply explore this hypothesis, DUM neurons were dialyzed using an internal solution containing different concentrations of cAMP, ranging from 0.1 to 2 mM (Fig. 6A). It should be mentioned that the cAMP concentrations in the pipette solution did not necessarily reflect the actual concentrations of the cyclic nucleotide inside the cell arising from access resistance to the cell and the presence of endogenous cyclic nucleotide phosphodiesterases. Moreover, the above experiments were performed in adenosine triphosphate (ATP)-free intracellular solution, to limit the extent of endogenous cAMP synthesis by the neuron, which might interfere with the effects of exogenous

TABLE 1. Activation, inactivation, and recovery from inactivation parameters of  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  in DUM neurons

	Midpoint of Activation ( $V_{0.5}$ , mV)	Slope Factor of Activation k	Midpoint of Inactivation ( $V_{0.5}$ , mV)	Slope Factor of Inactivation k	Time Constant of Recovery From Inactivation, ms
$I_{Na1}$	$-23.1 \pm 0.1$ ( $n = 9$ )	$2.4 \pm 0.1$ ( $n = 9$ )	$-22.9 \pm 0.9$ ( $n = 11$ )	$7.1 \pm 0.9$ ( $n = 11$ )	$5.91 \pm 2.53$ $1.26 \pm 0.09$ ( $n = 9$ )
$I_{Na2}$	$-24.6 \pm 0.2$ ( $n = 9$ )	$5.3 \pm 0.2$ ( $n = 9$ )	$-41.6 \pm 0.5$ ( $n = 11$ )	$7.6 \pm 0.4$ ( $n = 11$ )	$4.79 \pm 0.14$ ( $n = 9$ )

cAMP introduced through the patch pipette. As shown in Fig. 6A, a concentration-dependent decrease of the global  $I_{Na}$  amplitude was observed. Maximal inhibition was obtained with 2 mM cAMP ( $40.6 \pm 3.1\%$ ,  $n = 7$ ), a percentage close to that obtained with L-glutamate (Fig. 2D). An alternative way of increasing internal cAMP level was to use inhibitors of phosphodiesterase (PDE). We therefore tested the effect of IBMX, a broad-spectrum PDE inhibitor applied alone. As expected, a reduction of the global  $I_{Na}$  amplitude was observed during bath

application of 10  $\mu$ M IBMX. The average decrease was  $30.5 \pm 1.8\%$  ( $n = 4$ , Fig. 6B). In an attempt to narrow the identity of PDE subtype, more specific pharmacological inhibitors were used. PDE that preferentially hydrolyzes cAMP was first considered by using rolipram (for review see Beavo 1995). Bath application of 100  $\mu$ M rolipram caused a reduction of  $I_{Na}$  of  $27.1 \pm 3.8\%$  ( $n = 7$ , Fig. 6B). For comparison, we tested zaprinast, known to block PDE, that converts cGMP to 5' GMP. At 20  $\mu$ M, zaprinast did not cause a significant effect on  $I_{Na}$  amplitude compared with control experiments ( $7.2 \pm 1.2\%$ ,  $n = 6$ ,  $P > 0.05$ , Fig. 6B). These results confirmed the key role played by intracellular cAMP in the modulation of  $I_{Na1}$ .

It is worth mentioning that the effect of L-glutamate on  $I_{Na}$  amplitude was completely inhibited when DUM neurons were dialyzed using high internal cAMP concentration (2 mM) compared with 0.3 mM cAMP (Fig. 6C). In addition, the effects of L-glutamate were partially or almost completely blocked by intracellular application of 0.1 or 0.3 mM H89, respectively, known to inhibit PKA (Engh et al. 1996) (Fig. 6D). These results indicated that  $I_{Na}$  reduction observed with L-glutamate occurred by activation of PKA, after elevation of cAMP level.

#### Pretreatment with the active A-protomer of pertussis toxin and forskolin affects the L-glutamate-induced $I_{Na1}$ inhibition

As indicated just above, mGluRIII might suppress the activity of voltage-dependent ion channels by a mechanism involving a Gi/o protein subtype. To examine this possibility, we used the active A-protomer of PTX in the pipette solution, which inactivates the Gi/o protein (Kaslow and Burns 1992). After establishing the whole cell configuration, a time-dependent decrease in total  $I_{Na}$  amplitude was observed and usually stabilized within 15 min. The average percentage of  $I_{Na}$  inhibition reached  $32.0 \pm 2.0\%$  ( $n = 12$ , Fig. 7A) in the presence of PTX (10 nM). Interestingly, L-glutamate applied in the presence of PTX further decreased current amplitude ( $17.7 \pm 1.0\%$ ,  $n = 8$ , Fig. 7, A and B), indicating that besides this PTX-dependent mechanism, an additional pathway could be involved in the  $I_{Na1}$  reduction. Moreover, as shown in Fig. 7C, PTX did not produce any effect on  $I_{Na}$  amplitude after DUM neuron pretreatment with 10  $\mu$ M L-glutamate. These unexpected results seemed to indicate that the PTX-sensitive Gi/o proteins were already blocked by L-glutamate. Based on these findings, it was tempting to suggest that elevation in cAMP level, related to the inhibition of the PTX-sensitive G protein, underlies the reduction of  $I_{Na}$  amplitude. This was confirmed by the experiments shown in Fig. 7B. The percentage of  $I_{Na}$  reduction was more important in DUM neurons dialyzed using internal solution containing 0.1 mM cAMP and PTX ( $30.8 \pm 1.9\%$ ,  $n = 6$ ) instead of 0.1 mM cAMP alone ( $12.05 \pm 3.1\%$ ,

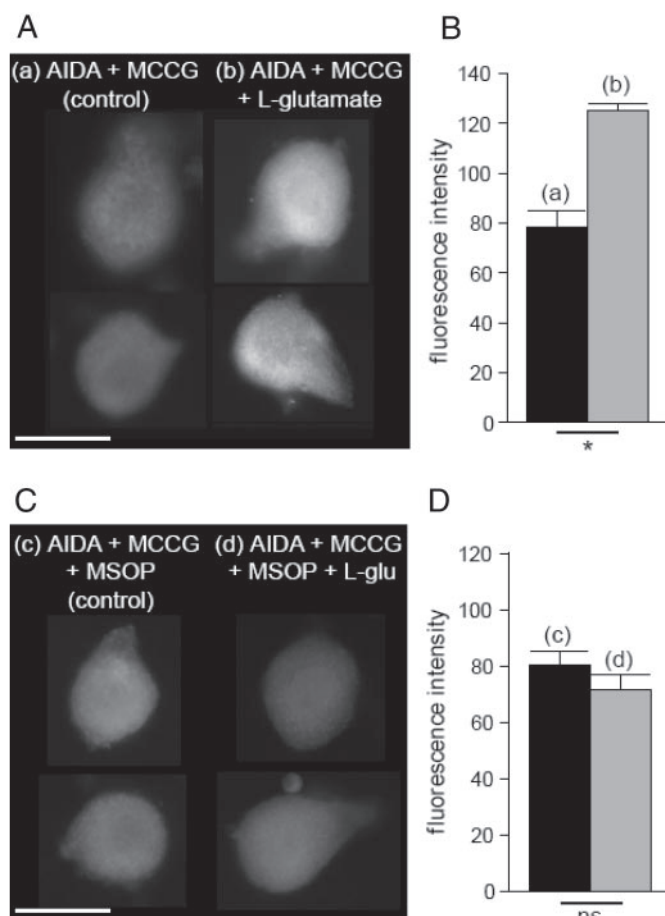
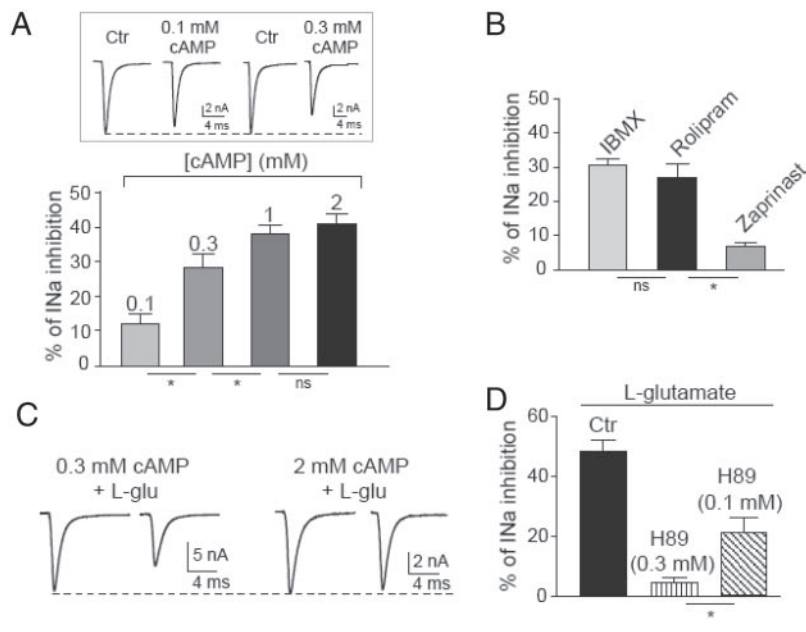


FIG. 5. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) immunoreactivity of isolated DUM neuron cell bodies. A: cells were pretreated with 500  $\mu$ M AIDA and 500  $\mu$ M MCCG, the mGluRI and mGluRII antagonists, respectively, for 20 min before (a) and after application of 10  $\mu$ M of L-glutamate for 25 min (b). B: comparative quantification of the change in immunofluorescence measured in control (a,  $n = 6$ ) and after application of 10  $\mu$ M L-glutamate (b,  $n = 6$ ; \*, significantly different,  $P < 0.05$ ). C: after pretreatment of DUM neuron cell bodies with 500  $\mu$ M MSOP (c), the mGluRIII antagonist, cAMP immunostaining induced by L-glutamate was completely abolished (d). D: histogram illustrating the quantification of the fluorescence intensity measured in both experimental conditions ( $n = 6$ ; ns, not significant,  $P > 0.05$ ). Green fluorescence was replaced by gray level. Scale bar: 50  $\mu$ m.





**FIG. 6.** Involvement of cAMP/protein kinase A (PKA) pathway in the mGluRIII-induced  $I_{Na1}$  modulation. **A:** histogram illustrating the dose-dependent decrease of the whole cell inward sodium current recorded in the presence of different cAMP concentrations imposed in the pipette solution. Concentrations are indicated above each bar. *Inset:* examples of sodium current traces recorded in control ( $t = 0$  min after whole cell established) and after 15 min of cAMP perfusion (0.1 or 0.3 mM). Each bar histogram represents the mean values  $\pm$  SE ( $n = 5$  to 19 cells) (\*, significantly different,  $P < 0.05$  and ns, not significant). **B:** effects of bath application of phosphodiesterase inhibitors, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 10  $\mu$ M), rolipram (100  $\mu$ M), and zaprinast (20  $\mu$ M) on the whole cell global  $I_{Na}$ . **C:** typical examples of sodium current traces recorded in the presence of 2 concentrations of cAMP (0.3 or 2 mM,  $n = 4$ ) before and after application of 10  $\mu$ M L-glutamate (L-glu). **D:** comparative histogram summarizing the effects of bath application of L-glutamate (10  $\mu$ M) on sodium current amplitude in control and after intracellular application of the PKA inhibitor *N*-2-[(*p*-bromocinnamyl-amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89). At 0.1 and 0.3 mM, H89 partially blocked or abolished L-glutamate-induced  $I_{Na}$  reduction, respectively. Experiments were performed with an adenosine triphosphate (ATP)-free intracellular solution containing 0.1 mM cAMP. Each bar histogram represents the mean values  $\pm$  SE ( $n = 5$ ) (\*, significantly different,  $P < 0.05$ ). For experiments illustrated in A–D, the sodium currents were elicited with a 30-ms depolarizing pulse to 0 mV applied from a holding potential of  $-90$  mV.

$n = 12$ , Fig. 7B). This indicated that the PTX-induced removal of adenylyl cyclase inhibition was sufficient to produce an increase in cAMP concentration.

Finally, it has also been demonstrated that some metabotropic receptors (i.e., adrenergic receptors) are coupled to both inhibitory G protein (Gi/o) and stimulatory G protein (Gs) to modulate adenylyl cyclase and thereby the internal cAMP level (Brink et al. 2000; Eason et al. 1992; Hermans 2003). The origin of the additional effect observed with L-glutamate in the presence of PTX was then examined by studying the effect of an activator of adenylyl cyclase, forskolin, known to mimic the activation of a Gs protein (Fig. 7D). Experiments were carried out in the presence of PTX to ensure that the Gi/o protein pathways did not interfere with each other. In this case and as shown in Fig. 7D,  $I_{Na}$  amplitude decreased during bath application of 10  $\mu$ M forskolin ( $19.0 \pm 5.6\%$ ,  $n = 4$ ) but  $I_{Na}$  was not further reduced when L-glutamate (10  $\mu$ M) was coapplied with forskolin. This was also confirmed more directly by studying the effect of forskolin alone and in combination with L-glutamate on cAMP immunostaining under the same experimental conditions as previously described (see Fig. 5). As we observed with L-glutamate (Figs. 5A and 7E), forskolin (10  $\mu$ M) increased cAMP immunoreactivity in DUM neuron cell bodies in the same order of magnitude (Fig. 7, E and F). Furthermore, in the presence of 10  $\mu$ M forskolin, L-glutamate did not produce any significant increase of the intensity of cAMP immunoreactivity (Fig. 7, E and F;  $P > 0.05$ ).

#### L-glutamate affects $I_{Na1}$ by an additional PKA-AKAP interaction-dependent pathway

Although L-glutamate increased the intracellular cAMP level, our data demonstrated that the inhibitory effect of L-glutamate on  $I_{Na}$  was mediated through the activation of PKA by high cAMP levels. There is now an increasing body of evidence that indicates that cAMP signaling is compartmentalized in many if not all cells (for review see Tasken and Aandahl 2004). Various enzymes such as PKA have been

shown to be anchored to specific intracellular sites such as A-kinase anchoring proteins (AKAPs). Furthermore, in the presence of high internal cAMP level, AKAP is able to release PKA, which induces physiological functions. This indicates the fundamental role of intracellular cAMP gradients in this highly organized signaling pathway. These findings also explained why, in our case, a relatively high concentration of H89 was needed to ensure full inhibition of PKA (i.e., classical cytosolic PKA and PKA released from AKAP; see Fig. 6D).

Two different sets of experiments were therefore designed to explore the hypothesis that the effect of L-glutamate also involved a PKA anchored to an AKAP. The importance of PKA-mediated phosphorylation in the modulation of  $I_{Na1}$  was determined from experimental inhibition of the anchoring of PKA by St-Ht31, a cell-permeable stearylated Ht31 counterpart (Vijayaraghavan et al. 1997), known to release PKA from the AKAP (Carr et al. 1991). When the St-HT31 was applied alone, a current reduction of  $30.2 \pm 4.3\%$  ( $n = 5$ ) was observed (Fig. 8A). We next examined the effect of St-Ht31 in cells dialyzed with low concentrations of H89 (0.1 mM). It was previously reported in DUM neurons that this concentration of H89 inhibited only cytosolic PKA activity (Courjaret and Lapiet 2001). When H89 (0.1 mM) was tested alone in the pipette solution on  $I_{Na}$ , only a slight reduction was observed ( $6.9 \pm 4.0\%$ ,  $n = 9$ , data not shown). As shown in Fig. 8B, St-Ht31, in the presence of 0.1 mM H89, reduced  $I_{Na}$  amplitude, reaching a steady level 10 min after treatment ( $20.1 \pm 2.3\%$  below the control;  $n = 5$ ). After stable baseline was achieved under St-Ht31, subsequent addition of 10  $\mu$ M L-glutamate did not lead to a further decrease of the current amplitude ( $6 \pm 3\%$ ,  $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ). These results showed that L-glutamate, which produced a high elevation in internal cAMP level, also regulated  $I_{Na1}$  by PKA through AKAP interactions. This was reinforced by immunocytochemical experiments performed with antibodies against AKAP79, which is the best-known neuronal AKAP able to bind PKA. As shown in Fig. 8C, DUM neuron cell bodies treated with anti-AKAP79

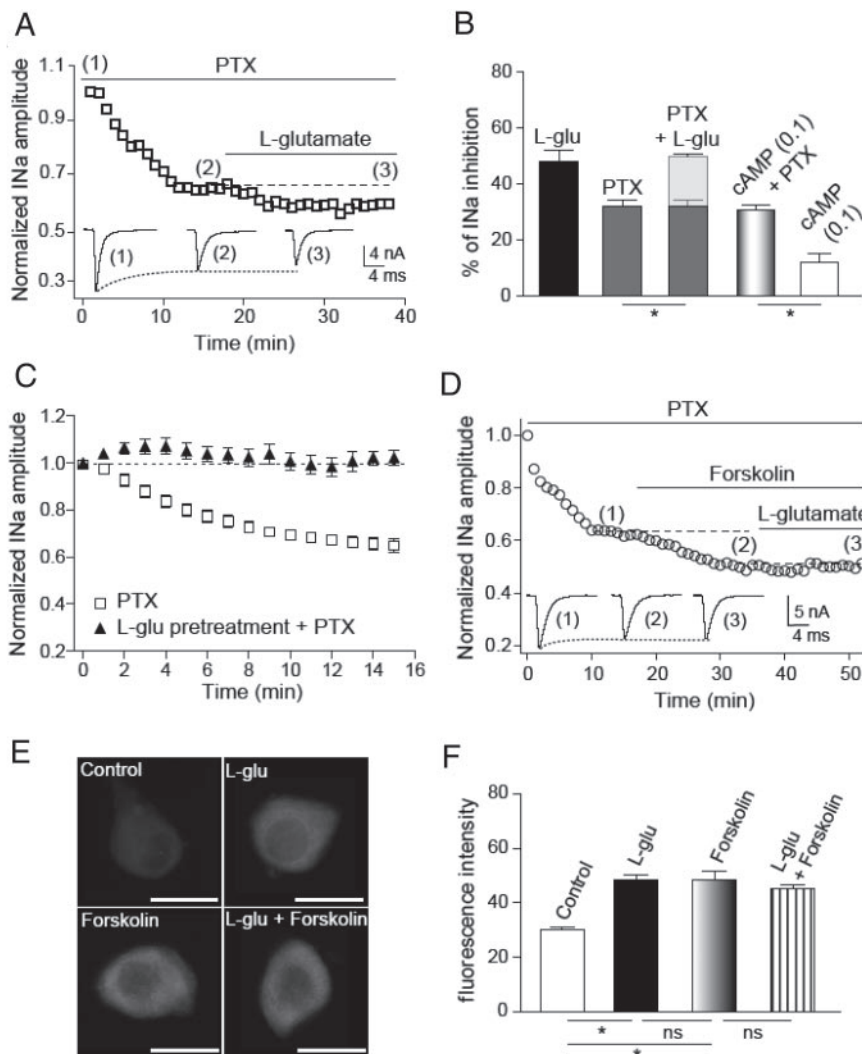


FIG. 7. Characterization of the G protein involved in the mGluR3-induced  $I_{Na1}$  inhibition. *A*: time course of normalized sodium current amplitude measured in the presence of L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ) after intracellular application of the pertussis toxin A-protomer (PTX,  $10 \text{ nM}$ ) added in the pipette solution. *Inset*: sodium current traces elicited with a 30-ms depolarizing pulse to  $0 \text{ mV}$  from a holding potential of  $-90 \text{ mV}$  and recorded at the time indicated in *A*. *B*: histogram summarizing the percentage of  $I_{Na1}$  inhibition induced by L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ) with or without intracellularly applied PTX. After PTX treatment, the L-glutamate further reduced  $I_{Na1}$  by  $17.7 \pm 1.0\%$  (light gray bar,  $n = 8$ ). Intracellular coapplication of PTX ( $10 \text{ nM}$ ) with  $0.1 \text{ mM}$  cAMP induced a more important  $I_{Na1}$  reduction compared with  $0.1 \text{ mM}$  cAMP applied alone. Each bar histogram represents mean values  $\pm$  SE (\*, significantly different,  $P < 0.05$ ). *C*: time course of normalized peak sodium current amplitude recorded in the presence of PTX (open squares,  $n = 12$ ) and after DUM neurons pretreated with  $10 \mu\text{M}$  L-glutamate (filled triangles,  $n = 5$ ). Data are mean values  $\pm$  SE. *D*: typical example of normalized sodium peak current plotted vs. time. Cells were pretreated with PTX ( $10 \text{ nM}$ ) before the adenylyl cyclase activator forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ) was applied alone or in combination with L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ). *Inset*s: sodium currents activated with a 30-ms depolarizing pulse to  $0 \text{ mV}$  applied from a holding potential of  $-90 \text{ mV}$  and are representative of 4 experiments. *E* and *F*: cAMP immunostaining on isolated DUM neuron cell bodies. *E*: photomicrographs illustrating cAMP immunostaining in control ( $n = 21$ ), after treatment with L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 11$ ) or forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 7$ ) alone and after forskolin/L-glutamate coexposure ( $n = 16$ ). Experimental conditions were similar to those indicated in Fig. 5. *F*: comparative histogram representing the quantification of the change in immunofluorescence measured for each experimental conditions (\*, significantly different,  $P < 0.05$ ; ns, not significant). Green fluorescence was replaced by gray level. Scale bar:  $50 \mu\text{m}$ .

antibodies showed fluorescence represented by small points preferentially localized at the apical pole of the cell near the initial segment (Fig. 8*Ca*). Negative control experiments were performed in parallel using the specific blocking peptide. In this case, we never observed AKAP79 immunoreactivity (Fig. 8*Cb*).

#### Regulation of $I_{Na1}$ and spiking

The physiological significance of the inhibition of  $I_{Na1}$  on pacemaker activity was examined by measuring both action potential amplitude and spontaneous firing frequency before and after L-glutamate or L-AP4 application (Fig. 9). L-glutamate was applied on DUM neurons pretreated with picrotoxin ( $1 \mu\text{M}$ ), AIDA ( $500 \mu\text{M}$ ), and MCCG ( $500 \mu\text{M}$ ) to avoid possible interference with another glutamatergic receptor (i.e., ionotropic receptors, group I and group II metabotropic receptors, respectively) expressed in DUM neurons. As shown in Fig. 9, L-glutamate ( $10 \mu\text{M}$ ) significantly reduced spike amplitude from  $139.5 \pm 2.1 \text{ mV}$  (control, Fig. 9*A*) to  $123.8 \pm 4.4 \text{ mV}$  ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 9*B*), whereas L-AP4 ( $100 \mu\text{M}$ ) produced only a very slight effect on action potential amplitude compared with the control (from  $138.3 \pm 3.9$  to  $132.1 \pm 9.4 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ , Fig. 9, *D* and *E*) that was not significant. This spike

amplitude reduction was always associated with an increase in action potential discharge frequency ( $74.2 \pm 20.8\%$ ,  $n = 6$  and  $71.8 \pm 12.1\%$  for L-glutamate and L-AP4, respectively; Fig. 9, *B* and *E*). Finally, pretreatment of DUM neuron cell bodies by  $500 \mu\text{M}$  MSOP completely suppressed the L-glutamate effects observed on pacemaker activity (Fig. 9, *C* and *F*).

#### DISCUSSION

In the present study we reported that group III metabotropic glutamate receptor activation allowed us to identify two distinct voltage-dependent sodium currents in pacemaker DUM neurons. They differed from each other on the basis of their sensitivity to L-glutamate, electrophysiological properties, and intracellular signaling pathways involving cAMP, both cytosolic and anchored PKA, by an unexpected inhibition of a Gi/o protein and activation of a suspected Gs protein.

#### Identification of $I_{Na1}$ and $I_{Na2}$ in pacemaker DUM neurons

Our findings demonstrated, in the same pacemaker neurosecretory neuron, the coexistence of two distinct voltage-dependent inward sodium currents defined as  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$ , which had a specialized function in the pacemaker activity. Very

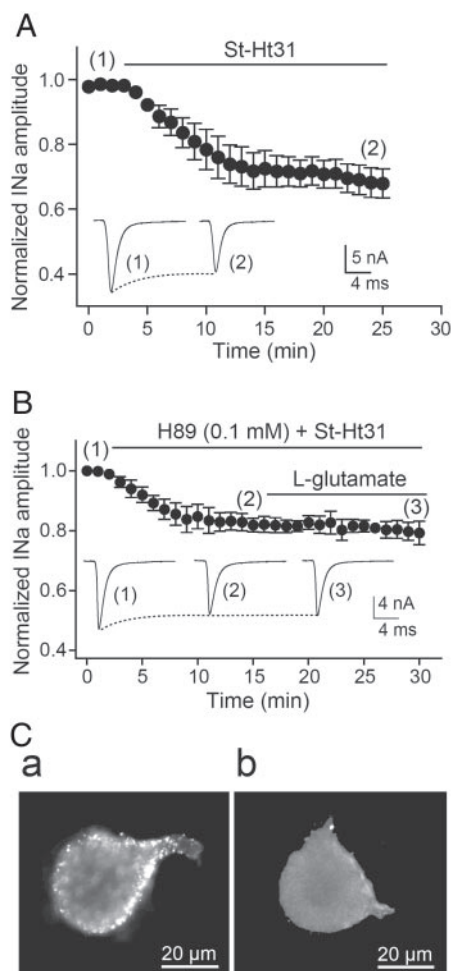


FIG. 8. Involvement of PKA–A-kinase anchoring protein (AKAP) complex in mGluRIII-mediated inhibition of  $I_{Na1}$ . *A*: time course of normalized sodium current recorded in the presence of St-Ht31 ( $20 \mu\text{M}$ ). *Inset*: representative current traces obtained in control (1) and in the presence of St-Ht31 (2). *B*: normalized sodium current amplitude recorded in the presence of H89 ( $0.1 \text{ mM}$ ) coapplied with St-Ht31 ( $20 \mu\text{M}$ ) was plotted vs. time. At this concentration, H89 inhibited only cytosolic PKA activity. Bath application of  $10 \mu\text{M}$  L-glutamate in the presence of H89 ( $0.1 \text{ mM}$ ) and St-Ht31 ( $20 \mu\text{M}$ ) mixture did not produce an additional effect on the sodium current amplitude. *Insets*, *A* and *B*: sodium currents were elicited with a 30-ms depolarizing pulse to  $0 \text{ mV}$  applied from a holding potential of  $-90 \text{ mV}$ . Data are mean values  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). *C*: AKAP immunostaining on DUM neurons cell bodies. DUM neurons were incubated with antibodies against AKAP-79 (*a*) and after pretreatment with the blocking peptide (*b*).

recently, previous findings obtained from neurons acutely dissociated from thoracic ganglia of *Periplaneta americana* reported the characterization of two types of TTX-sensitive sodium currents, designated type I and type II, with different pharmacological and biophysical properties (Zhao et al. 2005). However, a direct comparison of our results with those described in this study is not easy because, in this last case, they were obtained from a nonidentified heterogeneous population of neurons. Interestingly, although saxitoxin and tetrodotoxin were known to block the global inward sodium current in DUM neurons (Lapied et al. 1990, 2001), L-glutamate suppressed only a fraction of the global sodium current. Using specific mGluR agonists and antagonists, it was possible to establish that the pharmacological profile of the mGluR involved in the reduction of the voltage-dependent inward so-

dium current was related to group III mGluR. Apart from only one investigation reporting that a group II mGluR activation negatively regulated a TTX-resistant sodium current in mouse dorsal root ganglion neurons (Yang and Gereau 2004), our study was the first example that demonstrated the involvement of a group III mGluR in the regulation of the neuronal sodium current. In our case, L-glutamate, by mGluRIII activation, discriminated these two currents as  $I_{Na1}$  for L-glutamate-sensitive current and  $I_{Na2}$  for L-glutamate-insensitive current. To examine their specific biophysical properties, a subtraction procedure was used. L-glutamate-sensitive current was studied by subtracting inward current recorded in the presence of L-glutamate from inward currents recorded in the absence of L-glutamate.  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  differed on the basis of their voltage dependence of activation and inactivation, time constant of deactivation, and recovery from inactivation.  $I_{Na1}$  activated in the more positive potential range than  $I_{Na2}$  and exhibited a steeper voltage dependency. In addition, its voltage-dependent inactivation was about  $20 \text{ mV}$  shifted toward more positive potential. This gave rise to a larger “mh” overlap than for  $I_{Na1}$ .

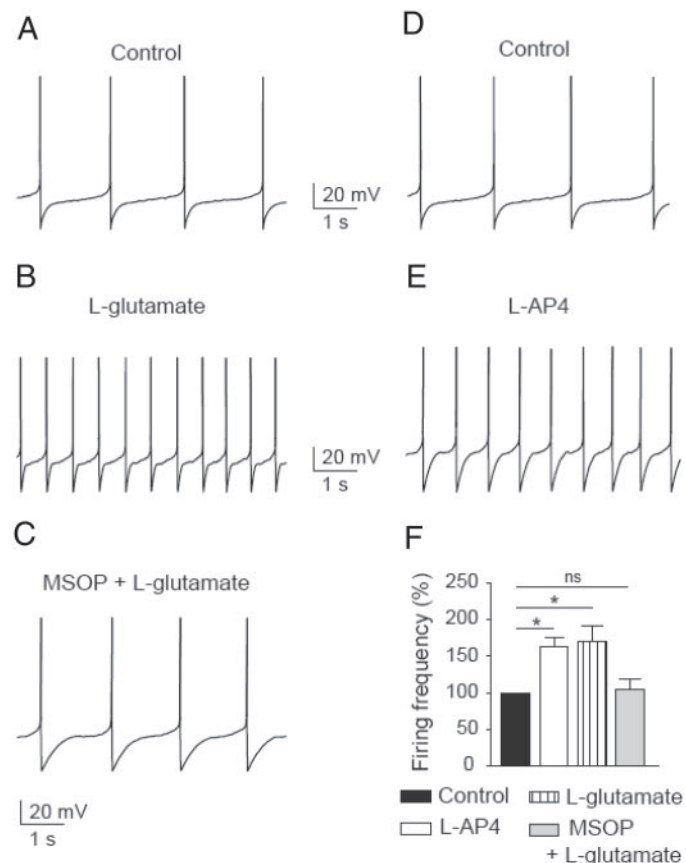


FIG. 9. Effects of L-glutamate and L-AP4 on spontaneously active DUM neuron cell bodies. *A–C*: spontaneous action potentials recorded before (*A*) and after application of  $10 \mu\text{M}$  L-glutamate (*B*). *C*: pretreatment of DUM neuron cell bodies with  $500 \mu\text{M}$  MSOP abolished the effects of L-glutamate on the pacemaker activity. *D* and *E*: spontaneously active DUM neurons recorded in control (*D*) and after bath application of  $100 \mu\text{M}$  L-AP4 (*E*). *F*: histogram summarizing the effects of L-glutamate, L-AP4, and MSOP on the firing frequency. (\*) above bar histogram indicates that the differences are statistically significant ( $P < 0.05$ ; ns, not significant). Data represent means  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). In these experiments, cells were treated with  $100 \mu\text{M}$  picrotoxin, an inhibitor of L-glutamate-gated chloride channels and with mGluRI and mGluRII antagonists, AIDA ( $500 \mu\text{M}$ ) and MCGG ( $500 \mu\text{M}$ ), respectively.

Finally, study of the recovery from inactivation showed that the recovery process of  $I_{Na1}$  was lower than that of  $I_{Na2}$  because the recovery process for  $I_{Na1}$  occurred in two phases, a fast one and a slow one. Taken together these specific biophysical properties of  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  should influence the DUM neuron pacemaker activity as discussed in the following text in the *Physiological significance* section below. In accordance with these results, recent studies demonstrated that alternative splicing and RNA editing of German cockroach sodium channel gene exhibited a broad range of functional and pharmacological properties (Liu et al. 2004; Song et al. 2004; Tan et al. 2002). Moreover, functional expression of two splicing variants *para*<sup>CSMA</sup> (BgNav) sodium channels in *Xenopus* oocytes revealed distinct electrophysiological properties regarding their voltage dependency of activation and inactivation as well as their recovery from inactivation (Tan et al. 2002). Consequently, it is tempting to suggest that the two sodium channel populations identified in DUM neurons could result from molecular diversity and generate two splicing and/or RNA-editing variants of a sodium channel gene in cockroach *Periplaneta americana*.

#### Involvement of PTX-sensitive Gi/o protein and cAMP/PKA pathway in the mGluRIII-induced $I_{Na1}$ inhibition

The mechanism by which mGluRIII inhibited  $I_{Na1}$  in DUM neurons was complex. It is well assumed in the literature that mGluRIIIs are negatively coupled to adenylyl cyclase by the activation of a PTX-sensitive Gi/o protein. This normally mediates an inhibitory effect on cAMP accumulation. We showed here, using electrophysiological and immunocytochemistry studies, that L-glutamate inhibited  $I_{Na1}$  by an increase in cAMP level. This blockade did not really match with the classical mGluRIII model because, in DUM neurons, mGluRIII activation involved the inhibition of Gi/o proteins. This inhibition of Gi/o proteins by PTX applied alone mimicked the reduction of  $I_{Na1}$  observed in experiments in which DUM neuron cell body was dialyzed with high cAMP concentration added in the patch pipette solution. This indicated that 1) the PTX-sensitive Gi/o protein was tonically active in DUM neurons in the absence of agonist and 2) basal activation of this Gi/o protein was necessary to maintain a low internal cAMP level for optimizing pacemaker activity by full activation of voltage-dependent sodium currents. These results were mimicked with DUM neurons pretreated with L-glutamate. In these conditions, PTX failed to produce any effect on  $I_{Na1}$ , suggesting that Gi/o proteins were already inhibited by L-glutamate. As a finding of these results, the molecular events involved in the regulation of  $I_{Na1}$  might be summarized in Fig. 10. Inhibition of PTX-sensitive Gi/o proteins by mGluRIII activation led to inhibition of  $I_{Na1}$  through cytosolic PKA stimulation after the increase of cAMP level (Fig. 10). In vertebrates the phosphorylation of sodium channels by PKA leading to a reduction of inward sodium current was previously described (Catterall 2000; Li et al. 1992; Smith and Goldin 1997). Moreover, neurotransmitters such as dopamine also modulated voltage-gated sodium channels by cAMP/PKA pathway in neostriatal and hippocampal neurons (Cantrell et al. 1997, 1999a; Schiffmann et al. 1995).

In insects, different PKA phosphorylation sites were identified in *para* sodium channel  $\alpha$  subunit from *Drosophila mela-*

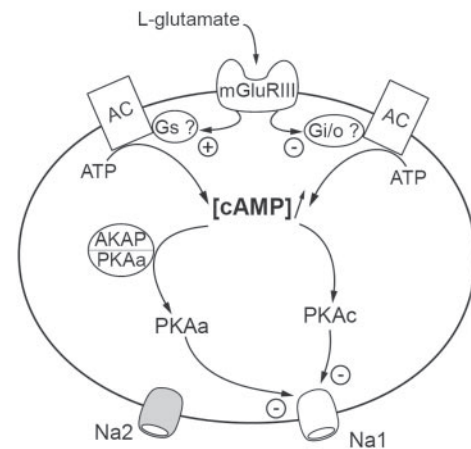


FIG. 10. Proposed model for the inhibition of Na1 channels by mGluRIII activation. This scheme summarizes the essential components of the intracellular signaling pathways that may regulate Na1 channels by the effects of L-glutamate on mGluRIII (see text for details). Na2, glutamate-insensitive sodium channels; PKAa, PKA controlled through association with AKAP; PKAc, cytosolic PKA; mGluRIII, metabotropic glutamate receptor III; AC, adenylyl cyclase; Gs and Gi/o, stimulatory and inhibitory G proteins.

*nogaster* (Loughney et al. 1989), Vssc1, and BSC1 from *Musca domestica* and *Blattella germanica* respectively (Ingles et al. 1996; Liu et al. 2001). Although direct evidence for the implication of G protein was not shown, Wicher (2001) demonstrated, in *Periplaneta americana* DUM neurons, a dose-dependent reduction of sodium current amplitude through the cAMP/PKA pathway, by neurohormone D. In our case we reported that PKA stimulation-induced reduction of  $I_{Na1}$  might occur through elevation of cAMP level by both inhibition of Gi/o and activation of suspected Gs proteins. This last assumption was based on findings reporting that L-glutamate further reduced  $I_{Na1}$  amplitude in DUM neurons pretreated with PTX. Using forskolin, which activates adenylyl cyclase and mimics Gs protein activation, we also established that, in cells pretreated with PTX, forskolin-stimulated cAMP formation decreased  $I_{Na1}$  amplitude in an order of magnitude similar to that observed with L-glutamate under the same experimental conditions. These results seemed to be indicative of a mGluRIII also coupled to another G protein such as Gs protein involved in the stimulation of the cAMP/PKA pathway. In the literature, the coupling between a G-protein-coupled receptor (i.e., adrenergic, muscarinic, glutamatergic, and serotonergic receptors) and two G proteins are known (Cussac et al. 2002; Dittman et al. 1994; Eason et al. 1992; Selkirk et al. 2001). However, in these studies, the effect produced by L-glutamate, by elevation of cAMP level after both inhibition of Gi/o and activation of Gs proteins, has not been previously reported.

According to these results mGluRIII activated by L-glutamate regulated  $I_{Na1}$  through a parallel pathway that could involve different types of PKA. Besides classical cytosolic PKA, subcellular localization of PKA mainly arises from anchoring of the PKA regulatory subunits to AKAP. This complex is known to produce optimal regulation of ion channels (Tasken and Aandahl 2004). For instance, AKAP-15 is involved in targeting PKA to rat brain sodium channels (Tibbs et al. 1998) and it is also required for dopaminergic modulation of sodium currents in hippocampal neurons (Cantrell et al. 1999b, 2002). In addition, the effectors regulated by PKA through AKAP interactions are very sensitive to changes in

cAMP concentration. In our case, a high elevation in cAMP level seemed to play a key role in the release of PKA from the AKAP, which thereby potentiated the L-glutamate-induced inhibition of  $I_{Na1}$ . We established here that St-Ht31, known to release PKA from its site of localization, decreased  $I_{Na}$  amplitude when applied alone. In addition, St-Ht31 completely occluded the effect of L-glutamate in the presence of 0.1 mM H89, which inhibited cytosolic PKA at this concentration (Courjaret and Lapiéd 2001). According to the hypothetical scheme shown in Fig. 10, we thus proposed an additional parallel model in which L-glutamate-induced stimulation of adenylyl cyclase, by suspected Gs proteins, led to a further increase in cAMP level. This in turn converted inactive forms of PKA (i.e., PKA-AKAP complex) into active forms (PKA released from an AKAP). Then PKA directly and/or indirectly inhibited  $I_{Na1}$ . Together, these results indicated that such a dual process involving cytosolic and anchored PKA would provide an original physiological control of neuronal firing by a single neurotransmitter (L-glutamate) acting on mGluRIII coupled to two different G proteins (Fig. 10).

### Physiological significance

Although previous findings reported that the DUM neuron action potential depolarizing phase was mediated by the activation of voltage-dependent sodium channels (Grolleau and Lapiéd 2000; Lapiéd et al. 1990; Wicher et al. 2001), this refined electrophysiological study demonstrated that two distinct inward sodium currents, rather than one, were involved in the pacemaker activity. The specific biophysical and pharmacological properties of  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  were expected to have important consequences for cellular excitability. For instance, the DUM neurons expressing only the Na2 channel would be expected to respond to slow depolarizing inputs that Na1 channel DUM neurons could not respond to. In addition, a study of the voltage dependency of both activation and inactivation showed an enlarged steady-state window current for  $I_{Na1}$ . In this case,  $I_{Na1}$  can give rise to a larger “mh” overlap over a potential range more positive compared with  $I_{Na2}$  “mh” overlap. Then, we expected that an inhibition of  $I_{Na1}$  would result in hyperexcitability. This was reinforced by the study of the recovery from inactivation measured at a recovery voltage of  $-55$  mV, corresponding to the DUM neuron physiological membrane potential. The recovery from inactivation played a major role in the repriming of sodium currents because the firing rate was limited by the repriming rate. Thus because the Na1 channels reprimed more slowly than did Na2 channels, L-glutamate-treated DUM neurons expressing only a pure population of Na2 channels should be able to sustain higher firing rates than neurons expressing Na1 channels. According to these findings, activation of mGluRIII was expected to influence pacemaker activity.

L-Glutamate reduced action potential amplitude but also increased spontaneous firing. Under these conditions, the variation of the global sodium current produced changes in the pacemaker activity. It is interesting to note that previous observations reported that modification of the sodium current inactivation property was always accompanied by a reduction of sodium current (Wicher 2001). In addition, it was also demonstrated, using a model reproducing the modulation of the sodium current, that changing inactivation properties of the

sodium current associated with such reduction of sodium conductance caused a steep increase in firing frequency (Wicher et al. 2006). In light of these results, the physiological consequences of 1) the reduction of the peak inward current observed with L-glutamate and 2) the modification of the inactivation property (i.e., inactivation time constants for  $I_{Na1}$  and  $I_{Na2}$  were  $\tau_S = 8.5$  ms,  $\tau_f = 0.72$  ms and  $\tau_S = 6.8$  ms,  $\tau_f = 0.81$  ms, respectively) on the firing frequency, matched previous findings (Wicher et al. 2006) and confirmed the simulated situation describing an increase of spike frequency under such conditions. These results, together with previous findings on the specific physiological targets innervated by TAG DUM neurons in *Periplaneta americana* (e.g., accessory glands, heart wall muscles) (Sinakevitch et al. 1994, 1996), indicate that the regulation of voltage-dependent sodium channels involved in the pacemaker activity may play crucial roles in the adaptation of DUM neurons to different behavioral situations, which thereby will influence vital physiological functions.

Finally, we also suggested, among other possibilities, that L-glutamate, by mGluRIII activation, could inhibit  $I_{Na1}$  in a voltage-dependent manner. Although further experiments are needed to confirm these results, it was previously demonstrated that M2 muscarinic receptor could also be voltage sensitive (Ben Chaim et al. 2003). In this case, the apparent affinity of M2 muscarinic receptors toward acetylcholine was reduced on depolarization. This voltage sensitivity could reside in the receptor region that coupled to the G protein rather than in the acetylcholine binding site. Moreover, Cantrell et al. (1999a) demonstrated that dopaminergic receptors (D1) regulated sodium current by PKA in a voltage-dependent manner, in which membrane depolarization facilitated inhibition of sodium current by dopamine agonist. We report here that L-glutamate was more potent in inhibiting  $I_{Na1}$  in a positive potential range (i.e.,  $-50$  mV), suggesting that the apparent affinity of DUM neuron mGluRIII toward L-glutamate was enhanced in the physiological membrane potential range (i.e.,  $-55$  to  $-45$  mV). This exciting feature, never reported until now, may provide a new mechanism for modulation of the signal transduction process in excitable cells.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor J. D. Viéumont from Unité Mixte de Recherche Sciences Agronomiques Appliquées à l'Horticulture (Université d'Angers) for technical assistance in immunocytochemistry.

### GRANTS

C. Lavialle-Defaix, H. Gautier, and A. Defaix were supported by a doctoral fellowship of the Région Pays de la Loire.

### REFERENCES

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195, 2000.
- Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 83–120, 1999.
- Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725–748, 1995.
- Ben-Chaim Y, Tour O, Dascal N, Parnas I, and Parnas H. The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. *J Biol Chem* 278: 22482–22491, 2003.
- Brink CB, Wade SM, and Neubig RR. Agonist-directed trafficking of porcine alpha(2A)-adrenergic receptor signaling in Chinese hamster ovary cells: 1-isoproterenol selectively activates G(s). *J Pharmacol Exp Ther* 294: 539–547, 2000.

- Cantrell AR, Scheuer T, and Catterall WA.** Voltage-dependent neuromodulation of  $\text{Na}^+$  channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 19: 5301–5310, 1999a.
- Cantrell AR, Smith RD, Goldin AL, Scheuer T, and Catterall WA.** Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci* 17: 7330–7338, 1997.
- Cantrell AR, Tibbs VC, Westenbroek RE, Scheuer T, and Catterall WA.** Dopaminergic modulation of voltage-gated  $\text{Na}^+$  current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 19: RC21, 1999b.
- Cantrell AR, Tibbs VC, Yu FH, Murphy BJ, Sharp EM, Qu Y, Catterall WA, and Scheuer T.** Molecular mechanism of convergent regulation of brain  $\text{Na}^+$  channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15. *Mol Cell Neurosci* 21: 63–80, 2002.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, and Scott JD.** Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem* 266: 14188–14192, 1991.
- Catterall WA.** From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13–25, 2000.
- Courjaret R and Lapid B.** Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* 60: 80–91, 2001.
- Coutinho V and Knopfel T.** Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8: 551–561, 2002.
- Cussac D, Newman-Tancredi A, Duqueyroux D, Pasteau V, and Millan MJ.** Differential activation of Gq/11 and Gi(3) proteins at 5-hydroxytryptamine(2C) receptors revealed by antibody capture assays: influence of receptor reserve and relationship to agonist-directed trafficking. *Mol Pharmacol* 62: 578–589, 2002.
- De Vente J, Schipper J, and Steinbusch HW.** A new approach to the immunocytochemistry of cAMP. Initial characterization of antibodies against acrolein-fixed cAMP. *Histochemistry* 99: 457–462, 1993.
- Dittman AH, Weber JP, Hinds TR, Choi EJ, Migeon JC, Nathanson NM, and Storm DR.** A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. *Biochemistry* 33: 943–951, 1994.
- Dutar P, Petrozzino JJ, Vu HM, Schmidt MF, and Perkel DJ.** Slow synaptic inhibition mediated by metabotropic glutamate receptor activation of GIRK channels. *J Neurophysiol* 84: 2284–2290, 2000.
- Eason M, Kurose H, Holt BD, Raymond JR, and Liggett SB.** Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *J Biol Chem* 267: 15795–15801, 1992.
- Engh RA, Girod A, Kinzel V, Huber R, and Bossemeyer D.** Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. *J Biol Chem* 271: 26157–26164, 1996.
- Gebremedhin D, Yamaura K, Zhang C, Bylund J, Koehler RC, and Harder DR.** Metabotropic glutamate receptor activation enhances the activities of two types of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in rat hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 23: 1678–1687, 2003.
- Grolleau F and Lapid B.** Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol* 203: 1633–1648, 2000.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch* 391: 85–100, 1981.
- Hermans E.** Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99: 25–44, 2003.
- Ingles PJ, Adams PM, Knipple DC, and Soderlund DM.** Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 319–326, 1996.
- Kaslow HR and Burns DL.** Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* 6: 2684–2690, 1992.
- Lapid B, Grolleau F, and Sattelle DB.** Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol* 132: 587–595, 2001.
- Lapid B, Malecot CO, and Pelhate M.** Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* 144: 535–549, 1989.
- Lapid B, Malecot CO, and Pelhate M.** Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J Exp Biol* 151: 387–403, 1990.
- Li M, West JW, Lai Y, Scheuer T, and Catterall WA.** Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 8: 1151–1159, 1992.
- Liu Z, Chung I, and Dong K.** Alternative splicing of the BSC1 gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 703–713, 2001.
- Liu Z, Song W, and Dong K.** Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from U-to-C RNA editing of an insect sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11862–11867, 2004.
- Loughney K, Kreber R, and Ganetzky B.** Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58: 1143–1154, 1989.
- Moldrich RX and Beart PM.** Emerging signalling and protein interactions mediated via metabotropic glutamate receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2: 109–122, 2003.
- Parmentier ML, Pin JP, Bockaert J, and Grau Y.** Cloning and functional expression of a *Drosophila* metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic CNS. *J Neurosci* 16: 6687–6694, 1996.
- Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J, and Fagni L.** Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci* 20: 7896–7904, 2000.
- Pflüger HJ and Watson AH.** GABA and glutamate-like immunoreactivity at synapses received by dorsal unpaired median neurones in the abdominal nerve cord of the locust. *Cell Tissue Res* 280: 325–333, 1995.
- Pin JP and Acher F.** The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1: 297–317, 2002.
- Ramaekers A, Parmentier ML, Lasnier C, Bockaert J, and Grau Y.** Distribution of metabotropic glutamate receptor DmGlu-A in *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J Comp Neurol* 438: 213–225, 2001.
- Raymond V, Hamon A, Grau Y, and Lapid B.** DmGluRA, a *Drosophila* metabotropic glutamate receptor, activates G-protein inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 269: 1–4, 1999.
- Robbins J, Reynolds AM, Treseder S, and Davies R.** Enhancement of low-voltage-activated calcium currents by group II metabotropic glutamate receptors in rat retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 23: 341–350, 2003.
- Schiffmann SN, Lledo PM, and Vincent JD.** Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J Physiol* 483: 95–107, 1995.
- Schoepp DD, Jane DE, and Monn JA.** Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38: 1431–1476, 1999.
- Selkirk JV, Price GW, Nahorski SR, and Challiss RA.** Cell type-specific differences in the coupling of recombinant mGlu1alpha receptors to endogenous G protein sub-populations. *Neuropharmacology* 40: 645–656, 2001.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, and Lapid B.** Octopamine-like immunoreactivity in the dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the accessory gland of the male cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* 276: 15–21, 1994.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, and Lapid B.** 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, 1996.
- Smith RD and Goldin AL.** Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci* 17: 6086–6093, 1997.
- Song W, Liu Z, Tan J, Nomura Y, and Dong K.** RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *J Biol Chem* 279: 32554–32561, 2004.
- Stühmer W.** Electrical recordings from cloned sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. In: *Molecular Biology of Ionic Channels*, edited by Agnew WS and Sigworth FJ. San Diego, CA: Academic Press, 1988.
- Tan J, Liu Z, Nomura Y, Goldin AL, and Dong K.** Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *J Neurosci* 22: 5300–5309, 2002.

- Tasken K and Aandahl EM.** Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84: 137–167, 2004.
- Tibbs VC, Gray PC, Catterall WA, and Murphy BJ.** AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain sodium channels. *J Biol Chem* 273: 25783–25788, 1998.
- Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, and Carr DW.** Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem* 272: 4747–4752, 1997.
- Washio H.** Glutamate receptors on the somata of dorsal unpaired median neurons in cockroach, *Periplaneta americana*, thoracic ganglia. *Zool Sci* 19: 153–162, 2002.
- Wicher D.** Peptidergic modulation of an insect Na(+) current: role of protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol* 85: 374–383, 2001.
- Wicher D, Berlau J, Walther C, and Borst A.** Peptidergic counter-regulation of Ca(2+)- and Na(+)-dependent K(+) currents modulates the shape of action potentials in neurosecretory insect neurons. *J Neurophysiol* 95: 311–322, 2006.
- Wicher D, Walther C, and Wicher C.** Non-synaptic ion channels in insects: basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* 64: 431–525, 2001.
- Yang D and Gereau RWt.** Group II metabotropic glutamate receptors inhibit cAMP-dependent protein kinase-mediated enhancement of tetrodotoxin-resistant sodium currents in mouse dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 357: 159–162, 2004.
- Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ, and Narahashi T.** Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neurotoxicology* 26: 455–465, 2005.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**ACTA (2003).**

Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement. Paris. Action de Coordination des Techniques Agricoles, 972 p.

**ACTA (2006).**

Index phytosanitaire. Paris: Action de Coordination des Techniques Agricoles, 824 p.

**Alavanja, M. C., C. Samanic, M. Dosemeci, J. Lubin, R. Tarone, C. F. Lynch, C. Knott, K. Thomas, J. A. Hoppin, J. Barker, J. Coble, D. P. Sandler and A. Blair (2003).**

Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* **157**: 800-14.

**Arnault, I., I. André, S. Diwo-Allain, J. Auger and F. Vey (2005).**

Propriétés pesticides des alliacées. *Phytoma* **578**: 40-43.

**Ashcroft, F. and F. Gribble (1998).**

Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends in Neurosciences* **21**: 288-94.

**Atkinson, N. S., G. A. Robertson and B. Ganetzky (1991).**

A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* **253**: 551-5.

**Audinat, E., B. Lambolez and J. Rossier (1996).**

Functional and molecular analysis of glutamate-gated channels by patch-clamp and RT-PCR at the single cell level. *Neurochem Int* **28**: 119-36.

**Baldi, I., A. Cantagrel, P. Lebailly, F. Tison, B. Dubroca, V. Chrysostome, J. F. Dartigues and P. Brochard (2003a).**

Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology* **22**: 305-10.

**Baldi, I., P. Lebailly, B. Mohammed-Brahim, L. Letenneur, J. F. Dartigues and P. Brochard (2003b).**

Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol* **157**: 409-14.

**Baraban, S. C. (2007).**

Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Curr Opin Neurol* **20**: 164-8.

**Benkimoun, P. (2006).**

L'OMS relance l'utilisation du DDT pour lutter contre le paludisme. Le Monde. Paris. 20 septembre 2006

**Bernard, J. L. and V. Rameil (2005).**

Innovation en protection des plantes et consommation des produits phytosanitaires. Evolutions constatées sur des marchés majeurs. *Phytoma* **584**: 17-32.



- Berry, E. A., M. Guergova-Kuras, L. S. Huang and A. R. Crofts (2000).**  
Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* **69**: 1005-75.
- Bielza, P., V. Quinto, J. Contreras, M. Torne, A. Martin and P. J. Espinosa (2007).**  
Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. *Pest Manag Sci* **63**: 682-7.
- Blackshaw, S. E., L. P. Henderson, J. Malek, D. M. Porter, R. H. Gross, J. D. Angstadt, S. M. Levasseur and R. A. Maue (2003).**  
Single-cell analysis reveals cell-specific patterns of expression of a family of putative voltage-gated sodium channel genes in the leech. *J Neurobiol* **55**: 355-71.
- Blade, R. J., P. E. Burt, R. J. Hart and M. D. V. Moss (1985).**  
The action of insecticidal isobutylamide compounds on the insect nervous system. *Pesticides Science* **16**: 554.
- Bloomquist, J. R. (1996).**  
Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* **41**: 163-90.
- Bloomquist, J. (2001)**  
GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action. Biochemical sites of insecticide action and resistance I. Ishaaya. Berlin, Springer-Verlag 17-42.
- Bloomquist, J., R. Barlow, J. Gillette, W. Li and M. Kirby (2002).**  
Selective effects of insecticides on nigrostriatal dopaminergic nerve pathways. *Neurotoxicology* **23**: 537-44.
- Bloomquist, J. R. (2003).**  
Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol* **54**: 145-56.
- Bradberry, S. M., S. A. Cage, A. T. Proudfoot and J. A. Vale (2005).**  
Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev* **24**: 93-106.
- Braunig, P. and H. J. Pfluger (2001).**  
The unpaired median neurons of insects. *Advances in Insect Physiology* **28**: 185-266.
- Brown, T., P. Rumsby, A. Capleton, L. Rushton and L. Levy (2006).**  
Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect* **114**: 156-64.
- Brownlee, C. (2000).**  
Cellular calcium imaging: so, what's new? *Trends Cell Biol* **10**: 451-7.
- Buckingham, S., B. Lapied, H. Corronc and F. Sattelle (1997).**  
Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* **200**: 2685-92.
- Buckingham, S. D., P. C. Biggin, B. M. Sattelle, L. A. Brown and D. B. Sattelle (2005).**  
Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol* **68**: 942-51.

**Caboni, P., T. B. Sherer, N. Zhang, G. Taylor, H. M. Na, J. T. Greenamyre and J. E. Casida (2004).**

Rotenone, Deguelin, Their Metabolites, and the Rat Model of Parkinson's Disease. *Chem Res Toxicol* **17**: 1540-48.

**Calvet, R., E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.-P. Charnay and Y. Coquet (2005)**

Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole. 637 p.

**Champ, P. (1985)**

Mode d'action et utilisation des organophosphorés. Mode d'action et utilisation des insecticides : Insectes, insecticides, santé. Paris, Publication A.: 207-23.

**Charles, P. (2003)**

DMDS: a new alternative for soil disinfection. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, San Diego, USA.

**Chaudhry, M. Q. (1997).**

A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pestic. Sci.* **49**: 213-28.

**Clark, J. M., J. G. Scott, F. Campos and J. R. Bloomquist (1994).**

RESISTANCE TO AVERMECTINS : Extent, Mechanisms, and Management Implications. *Annu. Rev. Entomol.* **40**: 1-30.

**Coban, A. and N. M. Filipov (2007).**

Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J Neurochem* **100**: 1177-87.

**Condes-Lara, M., A. Graff-Guerrero and L. Vega-Riveroll (1999).**

Effects of cypermethrin on the electroencephalographic activity of the rat: a model of chemically induced seizures. *Neurotoxicol Teratol* **21**: 293-8.

**Coosemans, J. (2005).**

Dimethyl disulfide (DMDS): a potential novel nematicide and soil disinfectant. *Acta Hort.* **698**: 57-63.

**Cordova, D., E. A. Benner, M. D. Sacher, J. J. Rauh, J. S. Sopa, G. P. Lahm, T. P. Selby, T. M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D. F. Rhoades, L. Wu, R. M. Smith and Y. Tao (2006).**

Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticides Biochemistry and Physiology* **84**: 196-214.

**Costa, L. G. (2006).**

Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* **366**: 1-13.

**Courjaret, R. and B. Lapied (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.

**Crespel, A. and P. Gélisse (2005).**

Atlas d'électroencéphalographie. Paris: John Libbey Eurotext, volume 1, 325 p.

**Crespel, A., P. Gélisse, M. Bureau and P. Genton (2006).**

Atlas d'électroencéphalographie. Paris: John Libbey Eurotext, volume 2, 412 p.

**Daborn, P. J., J. L. Yen, M. R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffers, N. Tijet, T. Perry, D. Heckel, P. Batterham, R. Feyereisen, T. G. Wilson and R. H. ffrench-Constant (2002).**

A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* **297**: 2253-6.

**Decoin, M. (2005).**

Pesticides et santé, la MSA informe. *Phytoma* **585**: 8-11.

**Defaix, A. and B. Lapied (2005).**

Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invert Neurosci* **5**: 135-46.

**Delorme, R. (1985)**

Les phénomènes de résistance : mécanismes biochimiques et physiologiques. Insectes, insecticides, santé. Paris, Publication A.:257-272

**Delorme, R., P. Leroux and P. Gaillardon (2002).**

Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles : III- Les insecticides-acaricides. *Phytoma* **548**: 7-13.

**Denholm, I., G. J. Devine and M. S. Williamson (2002).**

Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science* **297**: 2222-3.

**Derst, C., S. Messutat, C. Walther, M. Eckert, S. H. Heinemann and D. Wicher (2003).**

The large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (pSlo) of the cockroach *Periplaneta americana*: structure, localization in neurons and electrophysiology. *Eur J Neurosci* **17**: 1197-212.

**Di Monte, D., M. Lavasani and A. Manning-Bog (2002).**

Environmental factors in parkinson's disease. *Neurotoxicology* **23**: 487-502.

**Ditch, J., S. H. Zahm, A. Hanberg and H.-O. Adami (1997).**

Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control* **8**: 420-43.

**Dong, K. (2007).**

Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*.

**Dugravot, S., F. Grolleau, D. Macherel, A. Rochetaing, B. Hue, M. Stankiewicz, J. Huignard and B. Lapied (2003).**

Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels. *J Neurophysiol* **90**: 259-70.

**Duniway, J. M. (2002).**

Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology* **92**: 1337-43.

e-phy: [www.e-phy.agriculture.gouv.fr](http://www.e-phy.agriculture.gouv.fr)

**Ebbinghaus-Kintscher, U., P. Luemmen, N. Lobitz, T. Schulte, C. Funke, R. Fischer, T. Masaki, N. Yasokawa and M. Tohnishi (2006).**

Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in insects. *Cell Calcium* **39**: 21-33.

**Engel, L. S., H. Checkoway, M. C. Keifer, N. S. Seixas, W. T. Longstreth, Jr., K. C. Scott, K. Hudnell, W. K. Anger and R. Camicioli (2001).**

Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med* **58**: 582-9.

U.S. Fish and Wildlife Service Environmental Contaminants Division Pesticides : <http://www.fws.gov/contaminants/Issues/Chlorfenapyr.cfm>

**Feyereisen, R. (1995).**

Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* **82-83**: 83-90.

**Ffrench-Constant, R. H., P. J. Daborn and G. Le Goff (2004).**

The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**: 163-70.

**Fickbohm, D. and B. A. Trimmer (2003).**

Antisense inhibition of neuronal nicotinic receptors in the tobacco-feeding insect, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* **53**: 172-85.

**Forshaw, P. J., T. Lister and D. E. Ray (2000).**

The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* **163**: 1-8.

**Fritsch, J. (2005).**

Dimethyle disulfide as a new chemical potential alternative to methyl bromide in soil disinfestation in France. *Acta Hort.* **698**: 71-76.

**Gaillard, F., L. Domballe and A. Gaillard (2004).**

Fetal cortical allografts project massively through the adult cortex. *Neuroscience* **126**: 631-7.

**Gaillardon, P., P. Leroux and R. Delorme (2001).**

Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles : I - Les herbicides. *Phytoma* **544**: 10-16.

**Gant, D. B., A. E. Chalmers, M. A. Wolff, H. B. Hoffman and D. F. Bushey (1998).**

Fipronil: action at the GABA receptor. *Reviews in toxicology* **2**: 147-56.

**Gautier, H., T. Guillemette, P. Simoneau and B. Lapied (2006)**

Plant and fungal secondary compounds as potential insecticide agents. Rencontres en toxicologie Lavoisier. Paris: 285-94.

**Goldensohn, E. S., A. D. Legatt, S. Koszer and S. M. Wolf (1999).**

Goldensohn's EEG interpretation : Problems of overreading and underreading. Armonk: Futura Publishing Company, Inc., 382 p.

**Grillet, J.-P., B. delemotte and F. Testud (2001)**

L'évaluation, la prévention et la gestion du risque toxique professionnel lié aux pesticides en milieu agricole. Toxicologie humaine des produits phytosanitaires F. Testud, R. Garnier and B. Delemotte. Paris, Editions ESKA / Editions LACASSAGNE: 41-49.

**Grolleau, F. and B. Lapied (1994).**

Transient Na(+)-activated K<sup>+</sup> current in beating pacemaker-isolated adult insect neurosecretory cells (dum neurones). *Neurosci Lett* **167**: 46-50.

**Grolleau, F. and B. Lapied (1995).**

Separation and identification of multiple potassium currents regulating the pacemaker activity of insect neurosecretory cells (DUM neurons). *J Neurophysiol* **73**: 160-71.

**Grolleau, F. and B. Lapied (1996).**

Two distinct low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol* **76**: 963-76.

**Grolleau, F. and B. Lapied (2000).**

Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol* **203**: 1633-48.

**Grolleau, F. and D. B. Sattelle (2000).**

Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Br J Pharmacol* **130**: 1833-42.

**Grolleau, F., L. Gamelin, M. Boisdron-Celle, B. Lapied, M. Pelhate and E. Gamelin (2001a).**

A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* **85**: 2293-97.

**Grolleau, F., M. Stankiewicz, L. Birinyi-Strachan, X. H. Wang, G. M. Nicholson, M. Pelhate and B. Lapied (2001b).**

Electrophysiological analysis of the neurotoxic action of a funnel-web spider toxin, delta-atracotoxin-HV1a, on insect voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J Exp Biol* **204**: 711-21.

**Grolleau, F., M. Stankiewicz, E. Kielbasiewicz, M.-F. Martin-Eauclaire, C. Lavialle, J. De Vente and B. Lapied (2006).**

Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry is the final step involved in the neurotoxic effect of *Tityus serrulatus* scorpion B-toxin. *European Journal of Neuroscience* **23**: 1465-78.

**Gunning, R. V. and G. D. Moores (2001)**

Insensitive acetylcholinesterase as sites for resistance to organophosphates and carbamates in insects : Insensitive acetylcholinesterase confers resistance in lepidoptera. Biochemical sites of insecticide action and resistance I. Ishaaya. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin: 221-38.

**Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981).**

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100.

**Harrison, P. K., R. D. Sheridan, A. C. Green, I. R. Scott and J. E. H. Tattersall (2004).**

A Guinea Pig Hippocampal Slice Model of Organophosphate-Induced Seizure Activity. *J Pharmacol Exp Ther* **310**: 678-86.

**Haubruge, E. and M. Amichot (1998).**

Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **2**: 161-74.

**Heidel, E. and H.-J. Pfluger (2006).**

Ion currents and spiking properties of identified subtypes of locust octopaminergic dorsal unpaired median neurons. *European Journal of Neuroscience* **23**: 1189-206.

**Heine, M. and D. Wicher (1998).**

Ca<sup>2+</sup> resting current and Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in insect neurosecretory neurons. *Neuroreport* **9**: 3309-14.

**Hemingway, J. (2000).**

The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 1009-15.

**Hemingway, J., N. J. Hawkes, L. McCarroll and H. Ranson (2004).**

The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 653-65.

**Hoglinger, G. U., W. H. Oertel and E. C. Hirsch (2006).**

The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection. *J Neural Transm Suppl*: 269-72.

**Hoyle, G., D. Dagan, B. Moberly and W. Colquhoun (1974).**

Dorsal unpaired median insect neurons make neurosecretory ending on skeletal muscle. *J Exp Zool* **187**: 159-65.

**Hue, B. and J.-J. Callec (1990)**

Electrophysiology and pharmacology of synaptic in the central nervous system of the cockroach. Cockroaches as model for neurobiology. Applications in biochemical research I. Huber, E. P. Masler and B. R. Rao. Boca-Raton, CRC Press: 149-68.

**Hue, B. (1991).**

Functional assay for GABA receptor subtypes of a cockroach giant interneuron. *Arch Insect Biochem Physiol* **18**: 147-57.

**Ikeda, T., X. Zhao, K. Nagata, Y. Kono, T. Shono, J. Z. Yeh and T. Narahashi (2001).**  
Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 914-21.

**Ikeda, T., X. Zhao, Y. Kono, J. Z. Yeh and T. Narahashi (2003).**  
Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. *Neurotoxicology* **24**: 807-15.

**Inagaki, N. and S. Seino (1998).**  
ATP-sensitive potassium channels: structures, functions, and pathophysiology. *Jpn J Physiol* **48**: 397-412.

**INRA (2006).** Pesticides, agriculture et environnement : rapport d'expertise, INRA et Cemagref.

**IRAC (2006).** Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance, Insecticide Resistance Action Committee: 7-13.

**Ishaaya, I. and A. R. Horowitz (1998)**  
Insecticides with novel mode of action: an overview. Insecticides with novel mode of action: mechanisms and application I. Ishaaya and D. Degheele. Berlin, Springer-Verlag: 1-24.

**Janssen, D., C. Derst, R. Buckinx, J. Van den Eynden, J. M. Rigo and E. Van Kerkhove (2007).**  
Dorsal Unpaired Median Neurons of *Locusta migratoria* express ivermectin- and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels. *J Neurophysiol*.

**Jefferies, P. R., P. Yu and J. E. Casida (1997).**  
Structural modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. *Pesticides Science* **51**: 33-38.

**Jenner, P. (2001).**  
Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* **24**: 245-7.

**Karen, D. J., W. Li, P. R. Harp, J. S. Gillette and J. R. Bloomquis (2001).**  
Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos. *Neurotoxicology* **22**: 811-7.

**Khalimonchuk, O. and G. Rodel (2005).**  
Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**: 363-88.

**Knight, A. L. and L. Flexner (2005).**  
Disruption of mating in codling moth(Lepidoptera:Tortricidae) by chlorantranilipole, ananthranilic diamide insecticide. *Pest Management Sciences* **63**: 180-89.

**Kramer, K. and L. B. Kinter (2003).**  
Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics* **13**: 197-205.

**Lahm, G. P., T. P. Selby, J. H. Freudenberger, T. M. Stevenson, B. J. Myers, G. Seburyamo, B. K. Smith, L. Flexner, C. E. Clark and D. Cordova (2005).**

Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg Med Chem Lett* **15**: 4898-906.

**Lancaster, C. R. (2002).**

Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 1-6.

**Langui, D., F. Lachapelle and C. Duyckaerts (2007).**

[Animal models of neurodegenerative diseases]. *Med Sci (Paris)* **23**: 180-6.

**Lapied, B., C. O. Malecot and M. Pelhate (1989).**

Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* **144**: 535-49.

**Lapied, B., C. O. Malecot and M. Pelhate (1990).**

Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J Exp Biol* **151**: 387-403.

**Lapied, B., F. Tribut, I. G. Sinakevitch, B. Hue and D. J. Beadle (1993).**

Neurite regeneration of long-term cultured adult insect neurosecretory cells identified as DUM neurons. *Tissue and Cell* **25**: 893-906.

**Lapied, B., M. Stankiewicz, F. Grolleau, H. Rochat, E. Zlotkin and M. Pelhate (1999).**

Biophysical properties of scorpion alpha-toxin-sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci* **11**: 1449-60.

**Lapied, B., F. Grolleau and D. B. Sattelle (2001).**

Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol* **132**: 587-95.

**Lapouble, E., C. Montecot, A. Sevestre and J. Pichon (2002).**

Phosphinothricin induces epileptic activity via nitric oxide production through NMDA receptor activation in adult mice. *Brain Res* **957**: 46-52.

**Lavialle-Defaix, C. (2005)**

Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodium dépendants du potentiel des Dorsal Unpaired Median neurones de la blatte *Periplaneta americana* - Influence des mécanismes de régulation intracellulaires dans l'efficacité d'un insecticide de la famille des oxadiazines. Neurosciences Angers 278 p.

**Lavialle-Defaix, C., H. Gautier, A. Defaix, B. Lapied and F. Grolleau (2006).**

Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol* **96**: 2437-50.



**Le Goff, G. (2001)**

Etudes des mécanismes de résistance développés par une souche de *Drosophila simulans* contre un insecticide, le fipronil. *Sciences de la Vie Antibes* 119 p.

**Le Goff, G., A. Hamon, J. B. Berge and M. Amichot (2005).**

Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J Neurochem* 92: 1295-305.

**Leroux, P., R. Delorme and P. Gaillardon (2002).**

Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles : II - Les fongicides. *Phytoma* 545: 8-15.

**Li, A. G., Y. H. Yang, S. W. Wu, C. Li and Y. D. Wu (2006).**

Investigation of resistance mechanisms to fipronil in diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae). 99: 914-19.

**Li, X., M. A. Schuler and M. R. Berenbaum (2007).**

Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-53.

**Liss, B. and J. Roeper (2001).**

ATP-sensitive potassium channels in dopaminergic neurons: transducers of mitochondrial dysfunction. *News Physiol Sci* 16: 214-7.

**Martin, F. N. (2003).**

Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 325-50.

**Massilia, G. R., T. Eliseo, F. Grolleau, B. Lapied, J. Barbier, R. Bournaud, J. Molgo, D. O. Cicero, M. Paci, M. E. Schinina, P. Ascenzi and F. Polticelli (2003).**

Contryphan-Vn: a modulator of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 238-46.

**Matsuda, K., M. Shimomura, M. Ihara, M. Akamatsu and D. B. Sattelle (2005).**

Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1442-52.

**Matthiessen, J. N. and M. A. Shackleton (2005).**

Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Manag Sci* 61: 1043-51.

**McCook, A. (2006).**

The banned pesticide in our soil. *The Scientist* 20: 40.

**Menzio, P., M. A. Shi, A. Lougarre, Z. H. Tang and D. Fournier (2001).**

Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evolutionary Biology* 359: 175-81.

**Messutat, S., M. Heine and D. Wicher (2001).**

Calcium-induced calcium release in neurosecretory insect neurons: fast and slow responses. *Cell Calcium* **30**: 199-211.

**Millar, N. S. and I. Denholm (2007).**

Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci.*

**Mizuguchi, H., M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka (1999).**

Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 762-8.

**Monyer, H. and B. Lambolez (1995).**

Molecular biology and physiology at the single-cell level. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 382-7.

**Multigner, L., S. Cordier and B. Jégou (2005)**

Effets adverses des produits phytosanitaires sur la santé humaine. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement Lavoisier. Paris: 243-59.

**Narahashi, T. (1992).**

Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 236-41.

**Narahashi, T. (2000).**

Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 1-26.

**Nauen, R., U. Ebbinghaus-Kintscher, A. Elbert, P. Jeschke and K. Tietjen (2001)**

Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticide. Biochemical sites of insecticide action and resistance I. Ishaaya. Berlin, Springer-Verlag 77-106.

**Nauen, R. and I. Denholm (2005).**

Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* **58**: 200-15.

**Nauen, R. (2006).**

Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Sciences* **62**: 690-92.

**Neher, E., B. Sakmann and J. H. Steinbach (1978).**

The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* **375**: 219-28.

**Ninsin, K. D. (2004).**

Rapid report acetamiprid resistance and cross-resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pest Manag Sci* **60**: 839-41.

**O'Dowd, D., J. Gee and M. Smith (1995).**

Sodium current density correlates with expression of specific alternatively spliced sodium channel mRNAs in single neurons. *J. Neurosci.* **15**: 4005-12.

**ORP (2007).** Les pesticides / Historique, Observatoire des résidus des pesticides.

**Pelhate, M. (1985)**

L'axone géant de blatte, électrophysiologie-pharmacologie. Application à l'étude du mode d'action d'insecticides. Mode d'action et utilisation des insecticides : Insectes, insecticides, santé. Paris, Publication A.: 185-89.

**Pelhate, M., Y. Pichon and D. J. Beadle (1990)**

Cockroach axons and cell bodies : electrical activity. Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research. E. P. Masler and B. R. Rao. Boca-Raton, FL: CRC: 131-48.

**Perry, T., J. A. McKenzie and P. Batterham (2007).**

A Dalpha6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 184-8.

**Philogène, B. J. R., C. Regnault-Roger and C. Vincent (2002)**

Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. Biopesticides d'origine végétale C. Regnault-Roger, P. B.J.R. and C. Vincent. Paris, Lavoisier: 1-17.

**Plotnikova, S. N. (1969).**

Effector neurons with several axons in the ventral nerve cord of the asian grasshopper *Locusta migratoria*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **5**: 276-77.

**Price, D. N. and M. S. Berry (2006).**

Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *J Insect Physiol* **52**: 309-19.

**Price, N. R. (1985).**

The mode of action of fumigants. *J. stored Prod Res* **21**: 157-64.

**Ray, D. E. and J. R. Fry (2006).**

A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol Ther* **111**: 174-93.

**Raymond-Delpech, V., K. Matsuda, B. M. Sattelle, J. J. Rauh and D. B. Sattelle (2005).**

Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci* **5**: 119-33.

**Raymond, V. and B. Lapied (1999).**

Hyperpolarization-activated inward potassium and calcium-sensitive chloride currents in beating pacemaker insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Neuroscience* **93**: 1207-18.

**Raymond, V., D. B. Sattelle and B. Lapied (2000).**

Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport* **11**: 2695-701.

**Regnault-Roger, C. and P. B.J.R. (2005)**

Evolution des insecticides organiques de synthèse. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement C. Regnault-Roger, G. Fabres and B. J. R. Philogène. Paris, Lavoisier: 19-44.

**Robinson, P. W., T. L. Estes, R. S. Whitson and W. A. Perdue (2006)**

Dimethyl disulfide (DMDS) a methyl bromide replacement candidate. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, Orlando, USA.

**Roeder, T. (1999).**

Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**: 533-61.

**Russell, R. J., C. Claudianos, P. M. Campbell, I. Horne, T. D. Sutherland and J. G. Oakeshott (2004).**

Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol* **79**: 84-93.

**Rustin, P. and A. Rotig (2002).**

Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 117-22.

**Ruzo, L. O. (2006).**

Physical, chemical and environmental properties of selected chemical alternatives for the pre-plant use of methyl bromide as soil fumigant. *Pest Manag Sci* **62**: 99-113.

**Saïssy, J. M. and M. Rüttimann (1999).** Intoxication par les organophosphorés. Paris, Consensus d'actualisation SFAR - Médecine d'urgence.

**Salgado, V. L. (1990).**

Mode of action of insecticidal dihydropyrazoles: selective block of impulse generation in sensory nerves. *Pest Sci* **38**: 389-411.

**Salgado, V. L. (1992).**

Slow voltage-dependent block of sodium channels in crayfish nerve by dihydropyrazole insecticides. *Mol Pharmacol* **41**: 120-6.

**Sanborn, M., D. Cole, K. Kerr, C. Vakil, L. H. Sanin and K. Bassil (2004).**

Systematic review of pesticide human health effects. Toronto, Ontario College of Family Physicians: 186.

**Scalla, R. (1991).**

Les Herbicides, mode d'action et principes d'utilisation, sous la direction de René Scalla. Paris: Lavoisier, 450 p.

**Schmidt, E., M. Seifert and R. Baumeister (2007).**

Caenorhabditis elegans as a Model System for Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis* **4**: 199-217.

**Schuler, F. and J. E. Casida (2001).**

The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci* **57**: 932-40.

**Schuler, F., T. Yano, S. Di Bernardo, T. Yagi, V. Yankovskaya, T. P. Singer and J. E. Casida (1999).**

NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4149-53.

**Scott, J. G. (1999).**

Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **29**: 757-77.

**Shafer, T. J., D. A. Meyer and K. M. Crofton (2005).**

Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* **113**: 123-36.

**Sherer, T. B., J. R. Richardson, C. M. Testa, B. B. Seo, A. V. Panov, T. Yagi, A. Matsuno-Yagi, G. W. Miller and J. T. Greenamyre (2007).**

Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem* **100**: 1469-79.

**Shono, T., L. Zhang and J. G. Scott (2004).**

Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticides Biochemistry and Physiology* **80**: 106-12.

**Silver, K. and D. M. Soderlund (2005a).**

State-dependent block of rat Nav1.4 sodium channels expressed in xenopus oocytes by pyrazoline-type insecticides. *Neurotoxicology* **26**: 397-406.

**Silver, K. S. and D. M. Soderlund (2005b).**

Action of pyrazoline-type insecticides at neuronal target sites. *Pesticides Biochemistry and Physiology* **81**: 136-43.

**Sinakevitch, I. G., M. Geffard, M. Pelhate and B. Lapied (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**: 147-63.

**Sinakevitch, I. I., M. Geffard, M. Pelhate and B. Lapied (1995).**

Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* **198**: 1539-44.

**Slutsky, M., J. L. Levin and B. S. Levy (1999).**

Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. *Int J Occup Environ Health* **5**: 116-22.

**Smith, P. J. and E. A. Howes (1996).**

Long-term culture of fully differentiated adult insect neurons. *J Neurosci Methods* **69**: 113-22.

**Soderlund, D. M. and D. C. Knipple (2003).**

The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**: 563-77.

**Stevenson, P. A. and U. Sporhase-Eichmann (1995).**

Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **110**: 203-15.

**Sucher, N. J. and D. L. Deitcher (1995).**

PCR and patch-clamp analysis of single neurons. *Neuron* **14**: 1095-100.

**Tang, A. H. and C. P. Tu (1994).**

Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *J Biol Chem* **269**: 27876-84.

**Testud, F. (2001a)**

L'acide cyanhydrique. Toxicologie humaine des produits phytosanitaires F. Testud, R. Garnier and B. Delemotte. Paris, Editions ESKA / Editions LACASSAGNE. p243-249

**Testud, F. (2001b)**

La chloropicrine. Toxicologie humaine des produits phytosanitaires F. Testud, R. Garnier and B. Delemotte. Paris, Editions ESKA / Editions LACASSAGNE: 263-66.

**Testud, F., R. Garnier and B. Delemotte (2001)**

Toxicologie humaine des produits phytosanitaires. Paris, Editions ESKA / Editions LACASSAGNE. **Tome I**: 270.

**Thany, S. H., G. Lenaers, V. Raymond-Delpech, D. B. Sattelle and B. Lapied (2007).**

Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 14-22.

**Thiruchelvam, M., A. McCormack, E. K. Richfield, R. B. Baggs, A. W. Tank, D. A. Di Monte and D. A. Cory-Slechta (2003).**

Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci* **18**: 589-600.

**Thiruchelvam, M., E. K. Richfield, B. M. Goodman, R. B. Baggs and D. A. Cory-Slechta (2002).**

Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology* **23**: 621-33.

**Thomas, P. and A. Arzimanoglou (2003)**

Explorations complémentaires en épileptologie. Epilepsies Masson. Paris: 27-63.

**Timofeeva, O. A. and C. J. Gordon (2001).**

Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Res* **893**: 165-77.

**Tohnishi, M., H. Nakao, T. Furuya, A. Seo, H. Kodama, K. Tsubata, S. Fujioka, H. Kodama, T. Hirooka and T. Nishimatsu (2005).**

Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. *J Pestic Sci* **30**: 354-60.

**UNEP (2005).** Rapport d'activités du Comité des choix techniques pour le bromure de méthyle United Nation Environment Program, Ozone secretariat.

**Vehovszky, A., H. Szabo, L. Hiripi, C. J. Elliott and L. Hernadi (2007).**

Behavioural and neural deficits induced by rotenone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. A possible model for Parkinson's disease in an invertebrate. *Eur J Neurosci* **25**: 2123-30.

**Vergara, C., R. Latorre, N. V. Marrion and J. P. Adelman (1998).**

Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 321-9.

**Wagatsuma, A., H. Sadamoto, T. Kitahashi, K. Lukowiak, A. Urano and E. Ito (2005).**

Determination of the exact copy numbers of particular mRNAs in a single cell by quantitative real-time RT-PCR. *J Exp Biol* **208**: 2389-98.

**Walsh, S. B., T. A. Dolden, G. D. Moores, M. Kristensen, T. Lewis, A. L. Devonshire and M. S. Williamson (2001).**

Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**: 175-81.

**Weber, J. and A. E. Senior (1997).**

Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **1319**: 19-58.

**Wei, Y., A. G. Appel, W. J. Moar and N. Liu (2001).**

Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L). *Pest Manag Sci* **57**: 1055-9.

**Weiergraber, M., M. Henry, J. Hescheler, N. Smyth and T. Schneider (2005).**

Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Res Brain Res Protoc* **14**: 154-64.

**Wicher, D. and G. Reuter (1993).**

Neurohormone D increases the intracellular Ca<sup>2+</sup> level in cockroach neurones through a Cd(2+)-sensitive Ca<sup>2+</sup> influx. *Neurosci Lett* **159**: 13-6.

**Wicher, D., C. Walther and H. Penzlin (1994).**

Neurohormone D induces ionic current changes in cockroach central neurones. *J Comp Physiol [A]* **174**: 507-15.

**Wicher, D. and H. Penzlin (1997).**

Ca<sup>2+</sup> currents in central insect neurons: electrophysiological and pharmacological properties. *J Neurophysiol* **77**: 186-99.

**Wicher, D. and H. Penzlin (1998).**

omega-Toxins affect Na<sup>+</sup> currents in neurosecretory insect neurons. *Receptors Channels* **5**: 355-66.

**Wicher, D., C. Walther and C. Wicher (2001).**

Non-synaptic ion channels in insects--basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* **64**: 431-525.

**Wicher, D., S. Messutat, C. Lavialle and B. Lapied (2004).**

A New Regulation of Non-capacitative Calcium Entry in Insect Pacemaker Neurosecretory Neurons: involvement of arachidonic acid, no-guanylyl cyclase/cGMP, and cAMP. *J Biol Chem* **279**: 50410-9.

**Wicher, D., H. J. Agricola, R. Schonherr, S. H. Heinemann and C. Derst (2006).**

TRPgamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *J Biol Chem* **281**: 3227-36.

**Wilhelm, S. N. (1996).**

Chloropicrin as a soil fumigant. *Agricultural Research Service (USDA) Reports 2*: <http://www.ars.usda.gov/is/np/mba/july96/wilhell.htm>.

**Wing, K. D., M. E. Schnee, M. Sacher and M. Connair (1998).**

A novel oxadiazine insecticides is bioactivated in Lepidopteran larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* **37**: 91-103.

**Worek, F., M. Koller, H. Thiermann and L. Szinicz (2005).**

Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* **214**: 182-9.

**Xu, C. Q., B. Brone, D. Wicher, O. Bozkurt, W. Y. Lu, I. Huys, Y. H. Han, J. Tytgat, E. Van Kerkhove and C. W. Chi (2004).**

BmBKTx1, a novel Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *J Biol Chem* **279**: 34562-9.

**Zhao, X., V. L. Salgado, J. Z. Yeh and T. Narahashi (2003).**

Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 914-24.

**Zhao, X., J. Z. Yeh, V. L. Salgado and T. Narahashi (2004).**

Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **310**: 192-201.

**Zhao, X., T. Ikeda, V. L. Salgado, J. Z. Yeh and T. Narahashi (2005).**

Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neurotoxicology* **26**: 455-65.

**Zlotkin, E. (1999).**

The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol* **44**: 429-55.