# ETUDE DU MODE D'ACTION NEUROTOXIQUE D'UN REPULSIF, LE DEET UTILISE SEUL ET EN ASSOCIATION AVEC UN INSECTICIDE SUR L'ACETYLCHOLINESTERASE DES DUM NEURONES D'UN INSECTE LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA

Aly Ahmed Abd-Ella Mohamed

▶ **To cite this version:**

Aly Ahmed Abd-Ella Mohamed. ETUDE DU MODE D'ACTION NEUROTOXIQUE D'UN REPULSIF, LE DEET UTILISE SEUL ET EN ASSOCIATION AVEC UN INSECTICIDE SUR L'ACETYLCHOLINESTERASE DES DUM NEURONES D'UN INSECTE LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA. Agronomie. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-00969250

**HAL Id: tel-00969250**

**https://theses.hal.science/tel-00969250**

Submitted on 2 Apr 2014

**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.

Année : 2011
N° d'ordre : 1133

# ETUDE DU MODE D'ACTION NEUROTOXIQUE D'UN REPULSIF, LE DEET UTILISE SEUL ET EN ASSOCIATION AVEC UN INSECTICIDE SUR L'ACETYLCHOLINESTERASE DES DUM NEURONES D'UN INSECTE LA BLATTE *PERIPLANETA AMERICANA*

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Sciences Agronomique

ECOLE DOCTORALE VENAM N° 495
(VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER)

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 31 Mars 2011**

**à : Angers**

**par : Aly Ahmed Abd-Ella MOHAMED**

**Devant le jury ci-dessous :**

| | |
|---|---|
| **Mme Maria STANKIEWICZ**<br>Professeur de l'Université N. Copernicus de Torun, Pologne | **Rapporteur** |
| **M. Luc BELZUNCES**<br>Directeur de Recherche INRA, Avignon, France | **Rapporteur** |
| **Mme Véronique MARCHAIS**<br>Maître de conférences de l'université d'Angers, France | **Examinateur** |
| **M. Bruno LAPIED**<br>Professeur de l'Université d'Angers, France | **Directeur de Thèse** |

Laboratoire **R**écepteurs et **C**anaux **I**oniques **M**embranaires (RCIM), UPRES EA 2647/ USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV UFR Sciences, Université d'Angers, 49045 Angers cedex, France

**ED (N°) 495**

# RESUME

Le DEET (N, N-diéthyl-*m*-toluamide), est connu comme le répulsif le plus utilisé au monde. Bien qu'il soit efficace contre un large groupe d'arthropodes, son mode d'action exact et sa cible moléculaire ne sont pas encore connus précisément. Grâce à l'utilisation des techniques d'électrophysiologie (patch-clamp et oil-gap), d'imagerie calcique et biochimique, nous avons étudié le mode d'action du DEET sur des cellules neurosécrétrices identifiées, les DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. Le DEET, à forte concentration, inhibe l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau du DUM neurone. A faible concentration, il induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire *via* l'activation des récepteurs cholinergiques de type muscariniques (mAChRs). Dans un deuxième temps, les interactions synergiques entre le DEET et le propoxur, un carbamate connu pour inhiber l'AChE, ont été étudiées. Les résultats ont révélé que les mAChRs, correspondent bien à une nouvelle cible potentielle pour le DEET et qu'ils sont impliqués dans l'effet synergique. Le DEET, à faible et à forte concentration, agit sur des sites allostériques positifs et négatifs des mAChRs respectivement. L'action du DEET sur le site allostérique positif des mAChRs est responsable de l'effet synergique via une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui potentialise l'effet anti-AChE du propoxur. L'utilisation d'outils pharmacologiques sélectifs a permis l'identification de la voie de signalisation intracellulaire (PLC, PI-PLC, CaMKinase II, récepteurs $IP_3$) impliquée dans l'effet synergique du propoxur. Les résultats présentés dans ce mémoire vont contribuer au développement de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation de combinaisons d'insecticides de familles chimiques différentes afin de réduire les doses des traitements tout en augmentant l'efficacité.

**Mots-clés :** répulsifs, DEET, insecticides, insecte, DUM neurone, patch-clamp, calcium intracellulaire, acétylcholinestérase, récepteurs muscariniques, modulation allostérique.

# ABSTRACT

DEET (N, N-diethyl-m-toluamide), is known as the most widely used repellent in the world. Although, it is effective against a large group of arthropods, its exact mode of action and molecular target are not yet known precisely. By using electrophysiological (patch clamp and oil-gap), calcium imaging and biochemical techniques, we have studied the mode of action of DEET on neurosecretory cells identified as DUM neurons of the cockroach *Periplaneta americana.* DEET, at high concentrations, inhibits the DUM neuron acetylcholinesterase (AChE) activity. At low concentrations, it induces an increase in intracellular calcium concentration via the activation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). In addition, the synergistic interaction between DEET and propoxur, a carbamate insecticide known to inhibit AChE, has been studied. The results show that mAChRs, correspond to new identify targets for DEET and are involved in the synergistic effect on propoxur efficacy. We further demonstrate that the repellent DEET, used at low and high concentration, acts on positive and negative allosteric sites of mAChRs, respectively. The action of DEET on the positive mAChR allosteric site is responsible for the synergistic effect via an increase in intracellular calcium concentration, which potentiates the anti-AChE effect of propoxur. Finally, the use of selective pharmacological tools has allowed the identification of the intracellular signaling pathway (PLC, PI-PLC, CaMKinase II, $IP_3$ receptors) involved in the synergistic effect of propoxur. The results presented in this thesis will contribute to the development of new strategies based on the use of combinations of different chemical insecticides to reduce the doses of treatment while increasing the efficiency.



**Key words:** repellents, DEET, insecticides, insect, DUM neurone, patch-clamp, intracellular calcium, acetylcholinesterase, muscarinic receptors, allosteric modulation.

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Bruno LAPIED**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (**R**écepteurs et **C**anaux **I**oniques **M**embranaires (RCIM) UPRES EA 2647 / USC INRA 2023 IFR 149 QUASAV à l'UFR Sciences de l'Université d'Angers. Et pour m'avoir permis de faire mon travail de thèse dans l'environnement stimulant d'un groupe de recherche de renommée mondiale. J'ai ainsi eu l'occasion de présenter quelques uns de mes résultats scientifiques lors de différents congrès nationaux et internationaux. Ma participation au congrès d'Amsterdam est une des expériences qui m'a tout particulièrement marqué et d'un congrès international à Dijon.

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 Docteur **Luc BELZUNCES** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je tien à remercier le Docteur **Véronique Marchais** pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'être membre de ce jury.

Je remercie les enseignants qui m'ont encouragé et conseillé lors de la réalisation de ce travail : Docteur Alain Hamon, Docteur Steeve Thany, Docteur Hélène Tricoire-leignel, Docteur Christian Legros, Docteur Patricia Licznar et Docteur Cesar Mattei.

Mes ainés Docteur Hélène Gautier, Docteur Céline Lavialle-Defaix, Docteur Laurence Murillo, Docteur Zeineb Es-Salah-Lamoureux, Docteur Bénédicte Moignot, Docteur Béatrice Dubois-Bodereau, Docteur Antonin Ferry, Docteur Delphine Goven et Docteur Delphine Calas-List. Au quotidien, ils m'ont encouragé et fait part de leurs expériences et astuces de jeunes chercheurs. Je leur souhaite à chacun de belles envolées professionnelles et personnelles.

Je tiens à remercier le Docteur Cédric Pennetier pour un avoir permis d'utiliser ses résultats sur l'effet du DEET sur le DUM neurone par la technique d'imagerie calcique.

Merci à Céline Bourdin et Roland Ndong Nna pour leur aide et pour les bons moments passés ensemble. Je leur adresse mes plus sincères encouragements et leur souhaite beaucoup de réussite bonne courage pour votre fin de thèse !

Un très grand merci à Sophie Quinchard pour son soutien technique, logistique et sa convivialité sincère.

Je remercie également Olivier Laurec pour son aide si précieuse au niveau informatique et bricolage, sa bonne humeur, son soutien et ses encouragements. Merci pour ce que tu fais pour nous.

Un très grand merci à Yassine Benzidane pour son aide. Je lui souhaite de continuer le travail sur les DUM neurones et de commencer sa thèse le plus vite possible.

Je remercie également mon directeur du laboratoire en Egypte « Plant protection Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, 71516 Assiut, Egypt » Monsieur le Professeur Abd-Elraoof EL-GHAREEB et tous les membres du laboratoire qui m'ont encouragé et conseillé lors de la réalisation de ce travail.

Je remercie le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Égyptien, l'Ambassade de la République Arabe d'Egypte et le Bureau Culturel à Paris pour leur soutien financier.

Finalement, je veux aussi remercier mes amis pour m'avoir encouragé et écouté à d'innombrables reprises. Merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment.

Je terminerai en remerciant mes Parents qui m'ont apporté un soutien sans faille depuis le début. Merci de dépasser vos limites pour nous. Merci pour leur confiance, leur dévouement, leurs attentions bienveillantes et leurs encouragements.

Pour finir, merci de me pardonner pour ceux que j'ai omis de citer.

## *Dédicace*

**Ce travail est dédicacé en hommage à mon père qui m'a toujours encouragée et soutenue dans mes études, j'espère que tu es, comme toujours, fier de moi, là où tu es maintenant.**

**A ma mère et à mes sœurs et frères**

**Le mérite de ce travail revient à ma petite famille : mon épouse Mervat qui m'a beaucoup aidé grâce à son expérience dans ce domaine et son soutien considérables, mes adorables enfants : Mohamed, Arwa et Mostafa qui ont supporté parfois mes changements d'humeur.**

# TABLE DES MATIERES

**RESUME** ..... **2**

**ABSTRACT** ..... **3**

**REMERCIEMENTS** ..... **4**

**TABLE DES MATIERES** ..... **7**

**LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES** ..... **11**

**AVANT-PROPOS** ..... **14**

**INTRODUCTION DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... **16**

CHAPITRE 1. LES PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET LES REPULSIFS ..... 16

*A- les produits phytosanitaires* ..... *16*

*1- Les produits phytosanitaires- Généralités* ..... *16*

*2- Définition des produits phytosanitaires* ..... *21*

*3- Les insecticides inhibiteurs de l'AChE d'insecte* ..... *22*

*4.1. Les carbamates* ..... *23*

*4.2. Les organophosphorés* ..... *25*

*B- Les répulsifs* ..... *28*

*1- Historique des produits répulsifs* ..... *28*

*2- Définition des produits répulsifs* ..... *29*

*3- Classification des principaux répulsifs et mode d'action* ..... *29*

*3.1. Les répulsifs d'origine naturelle* ..... *29*

*3.1.1. Huile de lavande* ..... *29*

*3.1.2. Huile de citronnelle* ..... *30*

*3.1.3. Citriodiol* ..... *30*

*3.2. Les répulsifs de synthèse* ..... *31*

*3.2.1. IR 35/35* ..... *31*

*3.2.2. KBR 3023* ..... *32*

*3.2.3. Le DEET* ..... *33*

*3.2.3.1. Historique et mode d'action* ..... *33*

*3.2.3.2. Spectre d'action du DEET* ..... *35*

*3.2.3.3. Effet synergique du DEET avec d'autres insecticides* ..... *35*

CHAPITRE 2. MODE D'ACTION DES INSECTICIDES ANTI-ACETYLCHOLINESTERASE ET LES MECANISMES RESISTANCES DEVELOPES PAR LES INSECTES ..... 39

*A- Cibles moléculaires des mécanismes d'action neurotoxiques des insecticides anti-AChE chez l'insecte* ..... *41*

*1- L'acétylcholinestérase (AChE)* ..... *41*
*1.1. Structure, localisation et distribution de l'AChE d'insecte* ..... *43*
*1.2. Classification des AChEs d'insecte* ..... *43*
*1.3. Interaction AChE/PI-PLC* ..... *46*
*1.4. Mécanisme d'action de l'AChE* ..... *46*
*2- Les récepteurs cholinergiques de l'ACh* ..... *49*
*2.1- Les récepteurs cholinergiques de types nicotiniques (nAChRs)* ..... *49*
*Historique et localisation* ..... *49*
*Structure* ..... *49*
*Cas particulier des nAChR des DUM neurones de la blatte P. americana* ..... *50*
*2.2- les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChRs)* ..... *52*
*B- Phénomène de résistance aux insecticides* ..... *54*
*1- Définition de la résistance* ..... *54*
*2- Historique de la résistance chez l'insecte* ..... *54*
*3- Différents types de résistances développés par l'insecte* ..... *56*
*3.1. Les résistances métaboliques* ..... *56*
*3.2. Les résistances par altération de la cible* ..... *57*
*Acétylcholinestérase modifiée* ..... *58*

**MATERIELS ET METHODES ..... 61**

CHAPITRE 1. MODELE BIOLOGIQUE : LES DORSAL UNPAIRED MEDIAN (DUM) NEURONES DE LA BLATTE *P. AMERICANA* ..... 61
*Les DUM neurones du systéme nerveux central (SNC) de la blatte P. americana* ..... *61*
*1- Critères morphologique des DUM neurones* ..... *62*
*2- Critères biochimique des DUM neurones* ..... *64*
*3- Critères électrophysiologique des DUM neurones* ..... *64*
CHAPITRE 2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES ..... 68
*A – Ttechnique de dissociation des DUM neurones* ..... *68*
*1- Présentation du matériel biologique* ..... *68*
*2- Protocole de dissociation cellulaire* ..... *68*
*2.1. Prélèvement des derniers ganglions abdominaux de la chaîne neurveuse de la blatte* ..... *69*
*2.2. Digestion enzymatique* ..... *69*
*2.3. Dissociation mécanique* ..... *69*
*B – Technique électrophysiologique du patch-clamp* ..... *72*
*1- Principe de la technique du patch-clamp* ..... *72*
*2- Dispositif expérimental d'enregistrement et d'analyse* ..... *73*
*3- Composition et application des solutions* ..... *75*
*C- Technique biochimique du dosage de l'activité de l'AChE des DUM neurones de la blatte P. americana* ..... *77*
*1- Culture des DUM neurones* ..... *77*

*2- Test biochimique : dosage de l'activité de l'AChE du DUM neurone* ..... *77*

*2.1. Principe du dosage* ..... *77*

*2.2. Composition des solutions* ..... *78*

**RESULTATS ET DISCUSSIONS ..... 80**

CHAPITRE 1. ETUDE DU MODE D'ACTION DU DEET ET D'UN CARBAMATE LE PROPOXUR SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DU DUM NEURONE DE LA BLATTE *P. AMERICANA* ..... 80

*A- Position du problème* ..... *80*

*B- Caractérisation de l'AChE au niveau de la membrane des DUM neurones* ..... *81*

*1- Effets des inhibiteurs de l'AChE sur les DUM neurones* ..... *81*

*2- Effets intracellulaire et extracellulaire du propoxur sur l'activité de l'AChE des DUM neurones* .. *82*

*3- Caractérisation de l'activité enzymatique de l'AChE des DUM neurones* ..... *85*

*4- Effets du DEET sur l'activité de l'AChE au niveau de la membrane du DUM neurone* ..... *86*

*C- Conclusions* ..... *89*

CHAPITRE 2. ETUDE DE L'EFFET SYNERGIQUE DU DEET SUR L'EFFET DU PROPOXUR SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DU DUM NEURONE ..... 90

*A- Position du problème* ..... *90*

*B- Présentation des résultats* ..... *91*

*1- Effets du DEET à faible concentraition utilisé seul ou en association avec le propoxur sur le DUM neurone* ..... *91*

*2- Rôle du calcium intracellulaire sur l'effet synergique anti-AChE du propoxur* ..... *93*

*2.1. Effet du DEET sur la concentration de calcium intracellulaire du DUM neurone* ..... *93*

*2.2. Effets du BAPTA et de la caféine sur l'effet anti-AChE du propoxur* ..... *94*

*2.3. Effets du chlorure de cadmium sur l'effet synergique induit par le DEET* ..... *95*

*3- Etude des mécanismes intracellulaire impliqués dans la synergie DEET/propoxur* ..... *96*

*3.1. Implication des récepteurs à l'IP3 sur l'effet synergique induit par le DEET* ..... *96*

*3.2. Implication du complexe $Ca^{2+}$-CaM et de la PLC sur l'effet synergique induit par le DEET* ..... *97*

*4- Etude des Effets du DEET utilisé à faible concentration sur l'activité anti-AChE d'un OP, le chlorpyriphos-éthyl sur les DUM neurones de la blatte P. americana* ..... *99*

*C- Conclusions* ..... *101*

CHAPITRE 3. MODULATION ALLOSTERIQUE DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES DE TYPE MUSCARINIQUE DES DUM NEURONES PAR LE DEET ..... 102

*A- Position du problème* ..... *102*

*B- Résultats expérimentaux* ..... *103*

*1- Implication des récepteurs muscariniques synaptiques sur l' effet du DEET* ..... *103*

*2- Rôle des récepteurs muscariniques des DUM neurones dans l' effet synergique induit par le DEET* ..... *105*

*2.1. Action des antagonistes des récepteurs muscariniques sur l'effet synergique induit par le DEET* ..... *105*

*2.2. Effet d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire sur l'effet synergique induit par le DEET en presence de pirenzépine ..... 106*

*3- Modulation allostérique des récepteurs muscariniques des DUM neurones par le DEET ..... 108*

*3.1. Effets d'un agoniste la muscarine sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones ..... 108*

*3.2. Caractérisation de l'effet allostérique du DEET sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones ..... 110*

*3.3. Effet du DEET, à forte concentration, sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones en présence de la toxine muscarinique MT7 ..... 112*

*C- Conclusions ..... 114*

**CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES ..... 116**

**LISTE DES FIGURES ..... 120**

**LISTE DES TABLEAUX ..... 125**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 127**

**ANNEXES ..... 161**

# LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

1-3D :1-3 dichloropropène
2,4,5-T : 2,4-dichlorophénoxy-acétique
2,4-D : acide 2,4,5-trichlorophenoxy-acétique
4-AP : 4-aminopyridine
4-DAMP : Diméthyle-4-(diphenylacetoxy) piperidinium iodide
α -bgt : α-bungarotoxine
ACh : Acétylcholine
AChE : Acétylcholinestérase
ACTA : Association de Coordination Technique Agricole
AD : Amplificateur différentiel
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANT : Antérieur
anti-AChE : Anti-acétylcholinestérasique
AOP : Amplificateur opérationnel
ATCh : Acétylthiocholine
ATP : Adénosine triphosphate
BAPTA : Acide 1,2-bis (o-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique
$BK_{Ca}$ : Canal potassium dépendant du calcium
BuCh : Butyrylcholine
BuChE : Butyrylcholinestérase
BW281c51 :1,5-Bis(4-allyldimethyl- ammonium phenyl) pentan-3-one dibromide
CaM : Calmoduline
CamKII : Protéine kinase dépendant du complexe calcium-calmoduline
$Ca_v$ : Canaux calcique dépandants du potentiel
ChE : Cholinestérase
CICR : « Calcium-induced calcium release »
CRD : réaction croisée déterminant
DAG : Diacylglycérol
DDT : 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthane
DEET : N, N-diéthyl-m-toluamide
DGA : Dernier ganglion abdominal
DMDS : Disulfure de diméthyle
DTNB : 5,5-dithiobis-(2-nitobenzoic acid)
DUM : « Dorsal unpaired median »
EDTA : Ethylène dinitrile tétraacétate
EGTA : Acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)-*N,N,N′,N′*-tétraacétique

EPA : « Environnemental Protection Agency »
FAO : « Food and Agriculture Organization »
Fura 2-AM : Fura-2 pentakis(acétoxy-méthyl) ester
GA : Ganglions abdominaux
GABA : Acide gamma aminobutyrique
Glu : Acide glutamique
GluClR : Récepteur ionotrope sensible au glutamate
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GTP : Guanosine triphosphate
HEPES : Acide 4-(2-Hydroxyéthyl) piperazine-1-éthanesulfonique
HCH : Hexachlorocyclohexanes
HVA : « High voltage-activated »
His : histidine
INa : Courant sodium dépendant du potentiel
INa1 : Courant sodium de type 1
INa2 : Courant sodium de type 2
$IP_3$ : Inositol 1,4,5-triphosphate
$IP_3R$ : Récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate
IR35/35 : N Butyl, N-acetyl-3 éthylaminopropionate
IRAC : « Insecticide Resistance Action Committee »
$K_{ATP}$ : Canaux potassium dépendants de l'ATP
$K_{Ca}$ : Canaux potassium dépendants du calcium
Kdr : « Knockdown resistant »
KBR 3023 : [2 - (2-hydroxyéthyl)-1-piperidinecarboxylic acide 1 -] méthylpropyle
$K_v$ : canaux potassium dépendants du potentiel
LVA : « Low voltage activated »
M-3M3FBS : 2,4,6-trimethl-N[3-(trifluoromethyl) phenyl] benzenesulfonamide
mAChRs : Récepteur de l'acétylcholine de type muscarinique
McN-A-343 : 4-[N-(3-Chlorophenyl)carbamoyloxy]-2butynyltriMéthylammonium chloride(4-Hydroxy -2 -butynyl)-1triméthylammonium3chlorocarbanilate chloride
MT-7 : Toxine muscarinique 7
Mus : Muscarine
nAChRs : Récepteur de l'acétylcholine de type nicotinique
$Na_v$ : Canaux sodium dépendants du potentiel
NHD : Neurohormone D
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OP : Organophosphoré
PA : Potentiel d'Action
$PIP_2$ : Phosphatidylinositol -4.5- diphosphate
PI-PLC : Phospholipase C-phosphatidylinositol

PKA : Protéine kinase dépendant de l'AMPc
PKC : Protéine kinase de type C
PM : Pyrimiphos-méthyl
PMD : Para menthan-3,8-diol
POST : Postérieur
PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur
PZP : Pirenzépine : 11-((2-((dimethylamino)-methyl)1- piperidinyl)acetyl)-5, 11-dihydro-6H-pyrido(2,3-b)-(1,4)-benzodiazepin-6
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
RCR : Résistance de Contre-Réaction
RDL : Résistance à la dieldrine
Ser : Sérine
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TMB-8 : [8-(*N*,*N*-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate]
Trp : Tryptophane
TTX : Tétrodotoxine
Tyr : Tyrosine
U73122 : 1-(6-[([17β]-3-méthoxyestra-1,3,5[10]-trien - 17-yl)amino]hexyl)-1H - pyrrole-2,5-dione
VUM : « Ventral unpaired median »
W7 : Hydrochlorure de N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide

# AVANT-PROPOS

Dans leur milieu naturel, les plantes sont à un stade ou à un autre de leur développement victimes d'attaques de virus, de bactéries, de champignons, d'insectes et d'acariens. Les insectes constituent indiscutablement le taxon animal le plus diversifié avec 5 à 10 millions d'espèces estimées, soit 63% du nombre total d'espèces décrites (**Odegaard, 2000 ; Niven et coll., 2008**). Bien que 0,4% des insectes soient considérés nuisibles pour les activités anthropiques, les problèmes causés par ces derniers sont considérables que ce soit pour la production agricole ou pour la santé humaine et animale (**Nicholson, 2007**)**.** Les pertes mondiales de productions agricoles liées aux insectes ravageurs de culture sont estimées à 18% (**Oerke et Dehne, 2004**)**.** En ce qui concerne les risques pour la santé humaine et animale, plus de 400 arbovirus (arthropod borne virus, c'est-à dire virus transmis par des arthropodes) ont été identifiés comme agents étiologiques qui menacent la santé publique principalement dans les zones intertropicales (**Nicholson, 2007**)**.** .

Dans ce contexte la lutte chimique reste ou des moyens efficace pour contrôler ces populations d'insectes. Par conséquent l'étude du mode d'action des pesticides s'avère plus que jamais nécessaire. Un des objectifs du laboratoire Récepteur et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), est l'étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'action des insecticides neurotoxiques et des répulsifs.

Dans la même façon, les répulsifs sont des substances chimiques visant à repousser les insectes ou à les empêcher d'attaquer l'homme et les animaux (**Combemale 2001, Lundwall et coll. 2005**). Ils provoquent, chez l'insecte, une altération de la conduite de repérage de l'hôte, aboutissant à une déviation du vol, l'éloignant de sa cible potentielle. Cette définition oppose fondamentalement les répulsifs aux insecticides. En effet, ces derniers tuent l'insecte, mais après contact. Les répulsifs agissent sur de nombreux arthropodes (moustiques, mouches, moucherons, taons, tiques, puces et autres acariens...) (**Pennetier et coll., 2005 ; Debboun et coll., 2000 ; 2005 ; 2007 ; Kumar et coll., 1992**). Le choix pour utiliser un répulsif est difficile car il n'existe pas de molécule universellement active (**Combemale, 2001**). L'efficacité et la toxicité des différents répulsifs est étudiée en s'appuyant sur des données de la littérature que ce soit pour les répulsifs oraux, physiques ou de contact, qu'il soit d'origine naturelle (les huiles essentielles) ou de synthèse (diméthyphtalate, l'éthylexanediol, le N, N-diéthyl-m-toluamide (DEET), le 35/35, la pipéridine, le KBR 3023.

Les répulsif comme le DEET a été utilisé contre les arthropodes il y a plus de 50 ans (**McCabe et coll., 1954**). Il est efficace contre une large gamme d'arthropodes, mais son mode d'action exact et les cibles moléculaires ne sont pas connus **(Carroll et coll., 2005 ; Klun et coll., 2006)**. Récemment, il a été montré que le DEET pouvait exercer un effet insecticide sur les insectes vecteurs de maladies. Des études ont indiqué que ce répulsif est capable d'agir au niveau du SNC de l'insecte en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase (**Corbel et coll., 2009).** De plus, des données obtenues sur le terrain au Bénin démontrent un effet synergique sur la mortalité des moustiques entre le DEET et un carbamate, ou un organophosphoré (**Pennetier et coll., 2005 ; 2007; 2009**). Ces derniers effets observés se révèlent d'autant plus intéressants qu'ils permettent de diminuer de façon importante les doses efficaces à utiliser tout en produisant un effet toxique. Cependant à ce jour, les mécanismes responsables de cette synergie sont inconnus (**Pennetier et coll., 2007**)

C'est dans cette thématique scientifique que s'inscrit mon travail de recherche développé au sein du laboratoire. Les résultats présentés dans ce manuscrit concernent principalement la caractérisation des mécanismes intracellulaires impliqués dans la potentialisation de l'effet d'un carbamate le propoxur par le DEET grâce à des études électrophysiologiques et biochimiques sur les dorsal unpaired median (DUM) neurones de la blatte *Periplaneta americana*, maintenus en culture à court terme. Les points forts de ce travail de recherche concernent 1) l'étude de l'effet anti-acétylcholinestérasique (anti-AChE) du DEET utilisé seul ou en association avec un carbamate, le propoxur, 2) la caractérisation des facteurs intracellulaires impliqués dans l'augmentation de l'effet anti-AChE du propoxur induite par le DEET, 3) l'étude du rôle des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique (mAChRs) dans l'effet synergique induit par le DEET.

# INTRODUCTION DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

## CHAPITRE 1 : LES PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET LES REPULSIFS

### A- Les produits phytosanitaires

#### 1. Les produits phytosanitaires - Généralités

L'utilisation des produits phytosanitaires en agriculture remonte à l'antiquité. En Inde L'usage du soufre et du neem (*Azadirachta indica*) comme insecticide semble remonter à environ 2000 ans avant J.C. (**Philogène et coll., 2002).** Vers -1000 avant J.C, Pline l'ancien (23- 79 après J.C) décrit l'utilisation du soufre, du fer, du plomb et de l'arsenic comme insecticides et acaricides en conseillant le soufre dans le traitement contre la gale (l'agent de la gale est l'acarien *Sarcoptesscabiei hominis*) (Pline L'ancien, livres XXXIV et XXXV). Les dérivés arsenicaux sont connus en Chine depuis le XVI$^{ème}$ siècle. C'est vers la fin de ce siècle et au cours du suivant que sont découvertes les propriétés insecticides du tabac (nicotine), ainsi que celles des racines de plantes de la famille des Papilionacées telles *Lonchocarpus* ou *Derris* (roténone), (**Philogène et coll., 2002)**.

Le développement des produits phytosanitaires ne débutera réellement qu'au cours du XIX$^{ème}$ siècle suite aux grandes épidémies qui touchent certaines productions agricoles comme l'épidémie du mildiou de la pomme de terre (*Phytophtora infestans*) qui a provoqué la grande famine en Irlande entre 1845 et 1849. On peut aussi citer l'épidémie de phylloxéra (*Dactylosphaera vitifoliae*) qui a fait sa première apparition en 1863 à Pujault dans le Gard (France) avant d'infester les vignes de l'Europe et de l'Amérique du Nord au cours des trente années suivantes. Cette période est marquée par la mise au point de la bouillie bordelaise par **Alexis Millardet (1838-1902)** en 1885 pour lutter contre les champignons pathogènes de

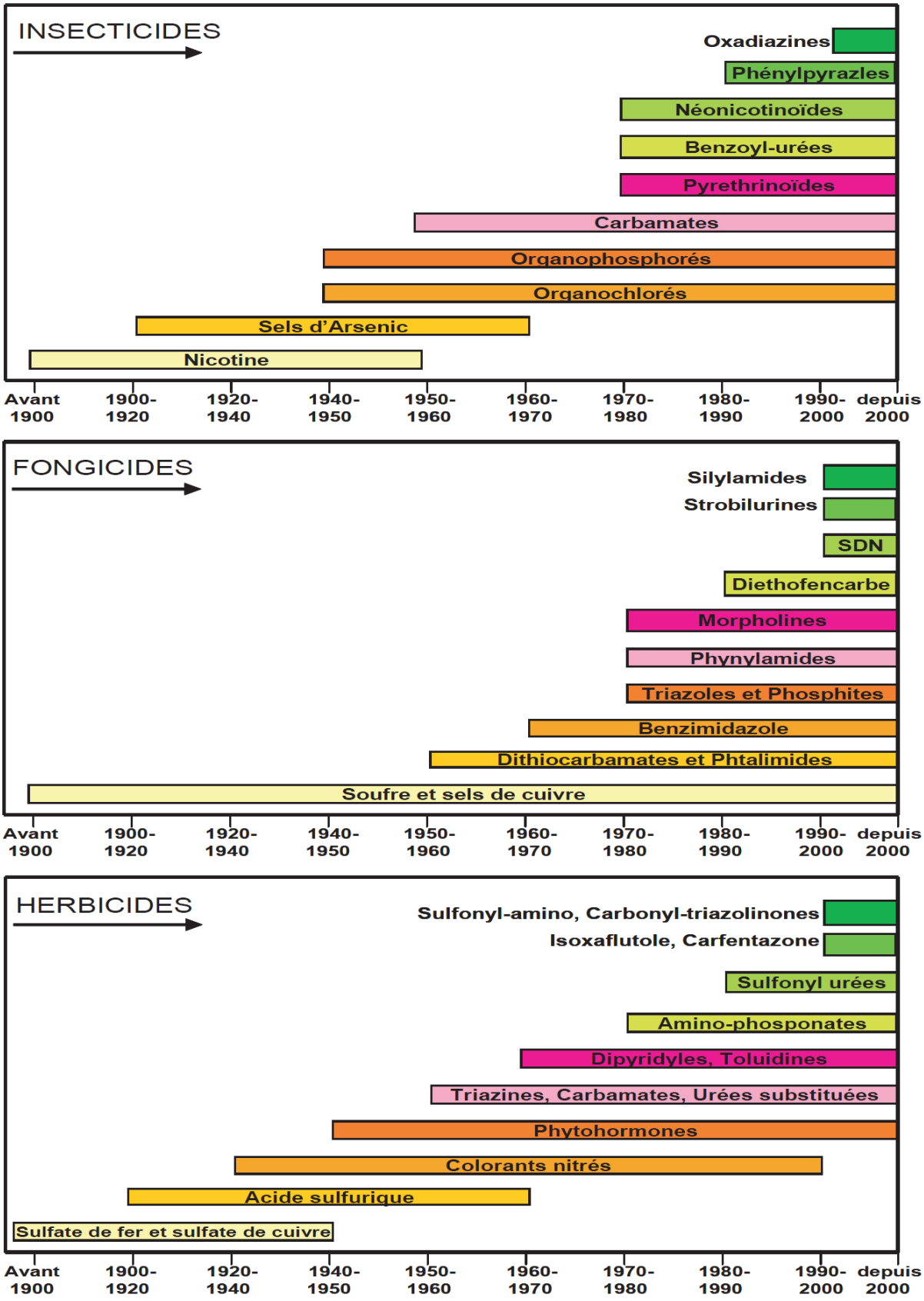



**Figure 1. Historique de l'utilisation des produits phytosanitaires. Modifié d'après pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement, (Calvet et coll., 2005). Edition ACTA. Actualisé d'après l'Index phytosanitaire (ACTA, 2006).**

la vigne tels le mildiou (*Plasmopara viticola*) ou l'oïdium (*Uncinula necator*). Mélange de sulfate de 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 tels 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. Ainsi les pyrèthres font leur apparition. Ce 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, les plus actifs sont les pyréthrines de type I et II. Mais leur photosensibilité limitera leur utilisation et incitera à la recherche de nouveaux composés plus stables.

Au même moment, l'usage de la roténone, déjà connue, se généralise. Mais elle sera supplantée, tout comme les pyrèthres**,** par l'apparition des insecticides de synthèse**,** en particulier les organochlorés dont le plus connu est le DDT synthétisé par **Othman et Zeilder en 1874 (Figure1, 2**). 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. Ainsi le DDT fut l'insecticide « miracle » qui sauva de nombreuses vies en tuant les parasites vecteurs de maladie pour l'homme (tel le pou porteur du typhus) pendant et après la seconde guerre mondiale. Mais cette molécule a été interdite par la suite à cause de sa rémanence et de sa bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Néanmoins les organochlorés connaissent leur heure de gloire jusqu'a dans les années 70.

Actuellement, le débat renaît autour du DDT. L'OMS envisage de permettre l'utilisation du DDT dans la lutte anti-vectorielle en particulier contre le paludisme. Le parasite responsable de cette maladie est transmis lors d'une piqûre par un moustique du genre *Anophèles* comme *Anopheles gambiae, A. funestus et A. nili*. Plus de deux milliards de personnes (environ 40% de la population mondiale) vivent dans des zones à risque de paludisme, notamment en Asie, en Amérique latine et en Afrique (**Collins et Paskewitz,**

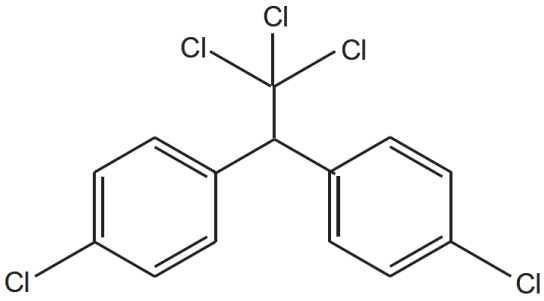
**1995; Hay et coll., 2004**). Plus de 500 millions de cas cliniques sont recensés chaque année, causant une forte morbidité et mortalité (**OMS, 2010**).

Concernant les fongicides, le soufre et le cuivre sont les produits les plus utilisés dans la première moitié du XXème siècle. Par la suite, 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 (**Figure 1**).

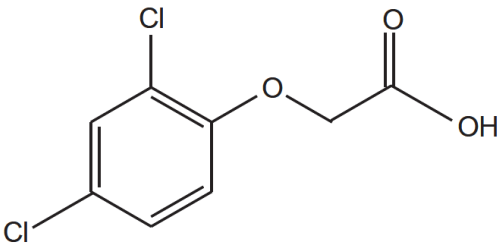
Enfin du côté des herbicides, la découverte majeure fut celle des auxines de synthèse par (**Zimmerman et Hitchcock en 1948)**. Les plus connus sont le 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D), l'acide 2,4,5-trichlorophenoxy-acétique (2,4,5-T) et l'acide 4-chloro-2-méthyle phénoxyacétique (MCPA) (**Figure 2**). 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).**

Les produits phytosanitaires ont connu leur véritable essor durant la deuxième moitié du XXème, 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 pyréthrinoïdes. 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, Programme Ecophyto, 2018**).

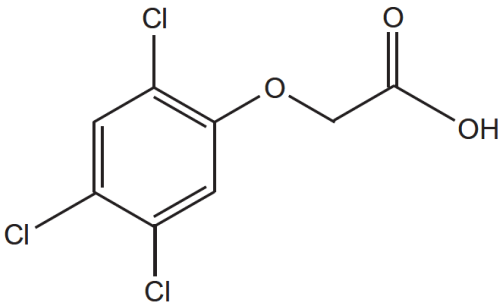
Insecticides: le DDT




Herbicides: le 2,4 D




le 2,4,5 T




Fongicides: le manèbe

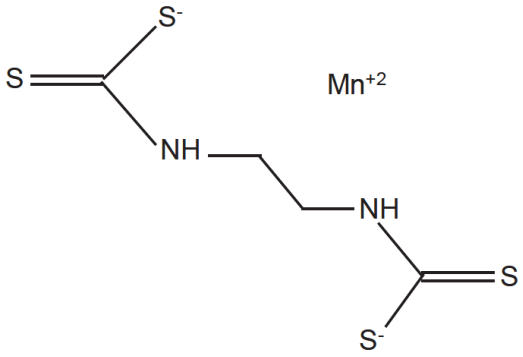



**Figure 2. Structures chimiques des premiers produits phytosanitaires de synthèse, développés dans la 1ère moitié du XXème siècle.**

## 2. Définition des produits phytosanitaires

La directive européenne 91/414/CEE définit les produits phytosanitaires comme « les substances actives et des 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.
- **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

Le terme de « produits biocides » (directive européenne 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 phytosanitaires spécifiques pour la protection des plantes ou produits végétaux quelle que soit l'application (**Gautier, 2007**).

Ainsi un insecticide utilisé pour la protection des plantes sera appelé produit phytosanitaire mais s'il est utilisé pour la désinfection d'un bâtiment par exemple ce sera un produit biocide. Les insecticides sont substance naturelle ou de synthèse capable de repousser, empêchant la reproduction, contrôler ou éliminer l'action des insectes jugés indésirables. En voici quelques familles d'insecticides exemples :

- **Les organochlorés**, parmi les plus anciens et les plus persistants, dont le fameux DDT déjà évoqué. Ils sont surtout utilisés comme insecticides en agriculture. (exemples : aldrine, dieldrine, etc...).
- **Les organophosphorés**, utilisés comme insecticides en agriculture et lutte contre les vecteurs de maladies (exemple : chlorpyriphos éthyl, malathion, dichlorvos, etc…).

- **Les carbamates**, utilisés comme insecticides et fongicides (exemple : propoxur, pyrimicarbe, etc…).
- **Les pyréthrinoïdes** utilisés comme insecticides en agriculture et lutte contre les vecteurs de maladies (exemple : permethrine, ceperméthrine, etc …).
- **Les benzoyl-urées**, utilisés comme insecticides (exemple : diflubenzuron, etc …)
- **Les néonicotinoïdes** utilisés comme insecticides (exemple : imidaclopride, acétamipride, etc...).
- **Les phénylpyrazoles** utilisés comme insecticides (exemple : fipronil).
- **Les oxadiazines** utilisés comme insecticides (exemple : indoxacarbe).

Parce que mon travail de recherche porté principalement sur les inhibiteurs de l'AChE, nous n'évoquerons là que les insecticides présentant cet effet.

### 3. Les insecticides inhibiteurs de l'AChE d'insecte

Les insecticides organophosphorés (OPs) et les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine le neurotransmetteur excitateur le plus répondu chez l'insecte. Si cette hydrolyse n'a pas lieu, l'augmentation de la concentration en acétylcholine induit une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte (**Figure 3**). Ces insecticides ont peu à peu remplacé les organochlorés puisqu'ils possèdent des propriétés insecticides importantes, persistent peu dans l'environnement et n'ont pas tendance à être bioaccumulés dans la chaîne alimentaire.

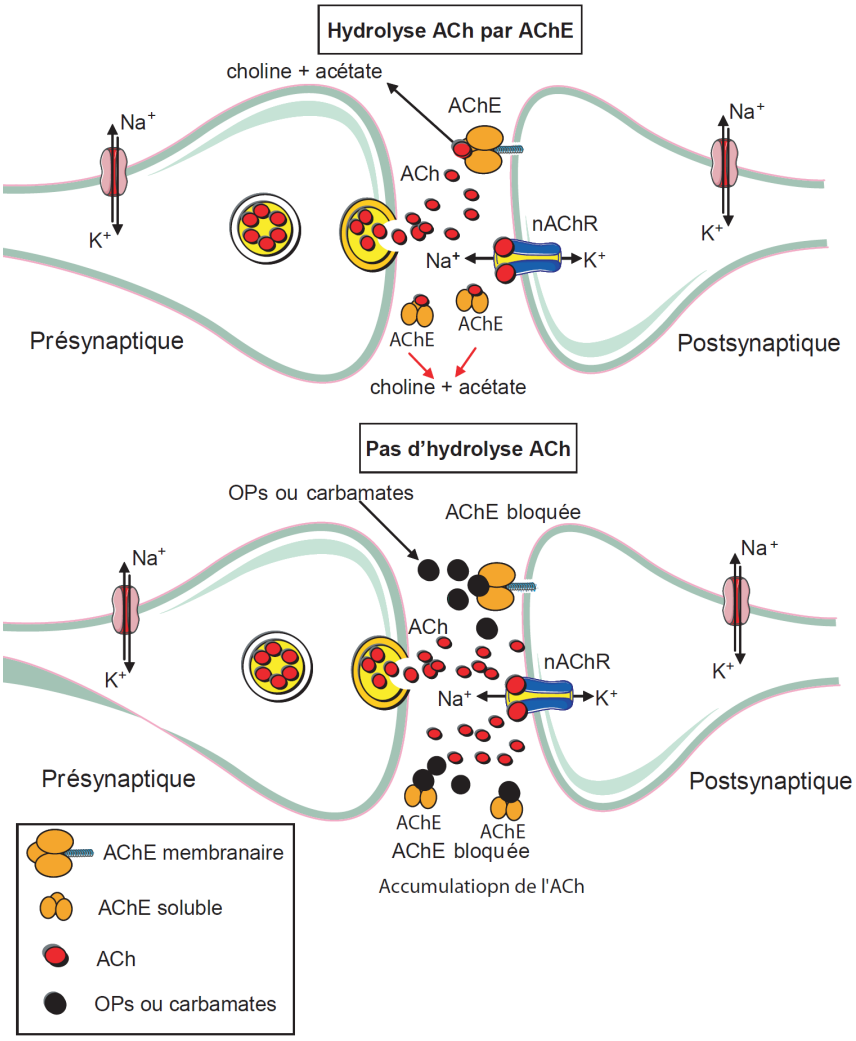



**Figure 3. Le mécanisme d'action toxique des OPs et carbamates principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition de l'AChE en forme membranaire et soluble.**

### *4.1. Les carbamates*

*Définition :* les carbamates sont des composés qui ont été développés surtout à partir des années 50. En plus de leur pouvoir insecticide, ils ont aussi une activité fongicide, herbicide, nématocide et inhibitrice de la germination des plantes. En fait toutes ces activités ne reposent pas sur les mêmes propriétés de ces molécules et donc sur les mêmes mécanismes.

*Historique et structure* : les carbamates sont tous dérivés de l'acide carbamique. Les dérivés utilisés comme insecticides sont en général des esters **(Figure 4),** qui sont stables et sont peu solubles dans l'eau. Les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase, entraînant la paralysie et la mort de l'insecte. L'inhibition de l'acétylcholinestérase est instable et donc rapidement réversible **(Figure 5A)**. Aussi les effets toxiques des carbamates pour les animaux et l'homme sont moins prononcés. Il n'en demeure pas moins que l'utilisation des carbamates requiert des précautions particulières du fait de leurs effets neurotoxiques mais aussi du fait de l'effet carcinogène de certains dérivés **(Testud et Grillet, 2007)**.

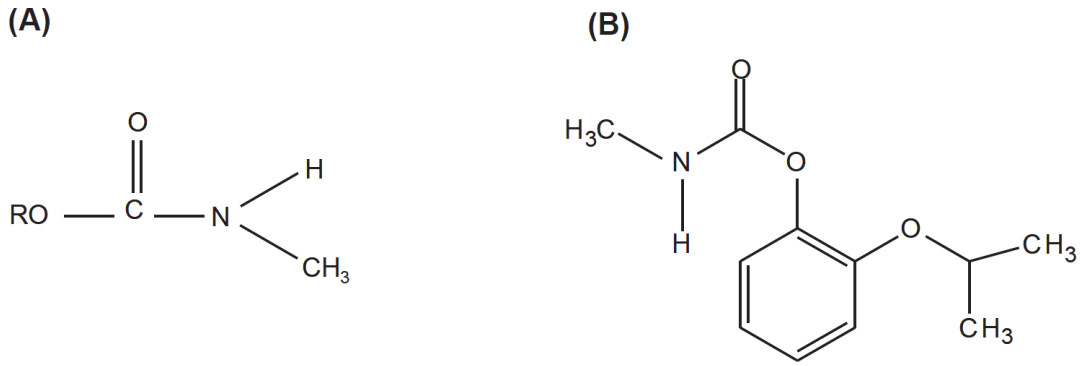



**Figure 4. Structure chimique générale des carbamates (A), structure chimique du propoxur (B). R = radicaux alkyles.**

En fin, les carbamates sont en général rapidement détruits par les microorganismes du sol lorsqu'ils sont présents en faible dose donnant des composés dépourvus de toxicité.

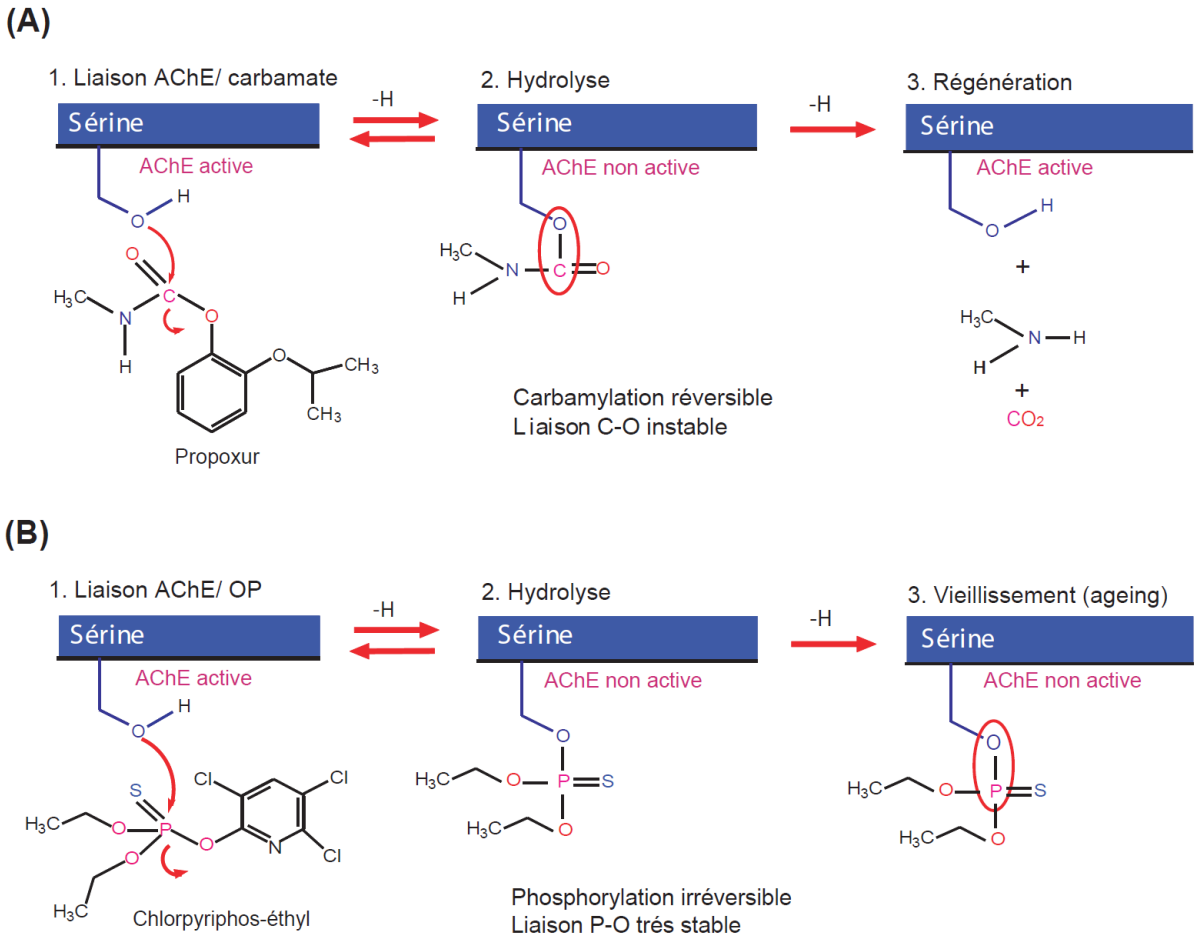



**Figure 5. Mécanisme d'action toxique d'un carbamate le propoxur (A) et d'un OP le chlorpyriphos-éthyl (B) sur l'activité de l'AChE. (Modifié d'après Testud et Grillet, 2007).**

### *4.2. Les organophosphorés (OPs)*

*Définition :* Les premiers composés OPs ont été développés en Allemagne durant la seconde guerre mondiale comme gaz de combat. C'est le cas, par exemple, du tristement célèbre gaz Sarin **(Testud et Grillet, 2007)**. Tous les composés OPs utilisés comme insecticides en agriculture sont des dérivés de ces gaz de combats. Les composés OPs sont des molécules qui sont toutes constituées d'un atome de phosphate sur lequel est attaché différents groupes chimiques **(Figure 6),** qui déterminent les propriétés exactes du composé. Il existe ainsi une grande variété d'insecticides organophosphorés **(Nauen, 2006; Testud et Grillet, 2007).**

*Historique et structure chimique* : Les OPs 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 insecticides OP sont des amides ou des esters des acides phosphoriques, phosphonique, thiophosphorique et thiophosphonique, dont la structure générale est schématisée dans la **(Figure 6**) **(Turdean et coll., 2002a)**. Le tétraéthyl-pyrophosphate, premier OPs synthétisé en Allemagne dans les années 1930, s'est rapidement avéré trop toxique pour les mammifères et trop instable pour une utilisation phytosanitaire à grande échelle **(Testud et Grillet, 2007).** Parallèlement, des recherches conduites pour développer les OPs comme arme chimique aboutissent à la mise au point du tabun et du sarin. C'est en 1944 qu'apparaît le parathion, premier composé largement employé en agriculture et dans la lutte anti vectorielle. L'efficacité des OPs, leur faible rémanence et l'interdiction de nombreux organochlorés au début des années 1970 sont à l'origine de la large utilisation de ces insecticides, dont la production mondiale a été décuplée entre 1955 et 1985. Leur importante toxicité et les accidents professionnels confondus ont conduit à leur substitution progressive, du moins dans les pays développés, par des carbamates et surtout par les pyréthrinoïdes de synthèse (**Eddleston et coll., 2005 ; Testud, 2001 ; Testud et Grillet, 2007).**

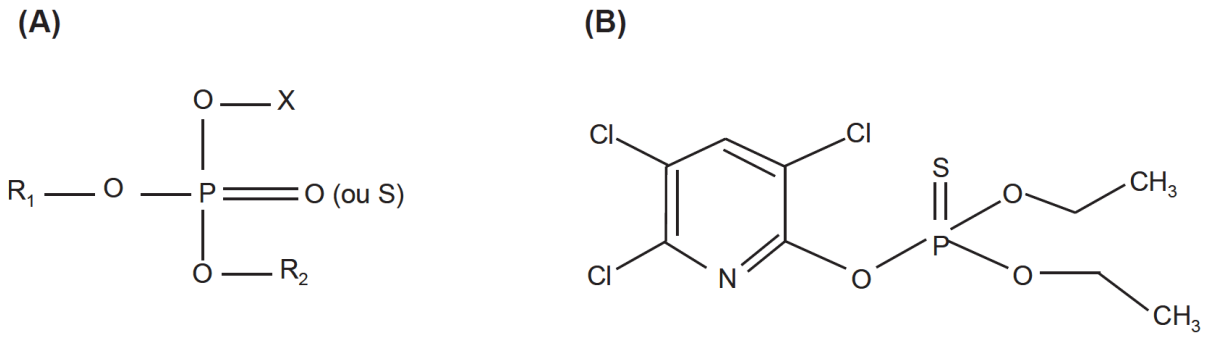



**Figure 6. Structure chimique générale des OPs (A) et structure chimique du chlorpyriphos-éthyl (B). R1 et R2 sont des radicaux alkyles, X = substituant – très grand variété de structure – sur lequel va porter l'hydrolyse : halogène, carboxylate, phénoxy.**

*Toxicité et mode d'action des OPs et carbamates :* Les OPs sont des inhibiteurs irréversibles de l'AChE. Plus précisément, les OPs 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 entrainant le vieillissement de l'enzyme ce qui correspond à une inactivation quasi-définitive **(Figure 5A, B, Worek et coll., 2005; Costa, 2006)**. Chez les insectes les OPs inhibent

l'AChE, enzyme assurant l'hydrolyse de l'ACh, neurotransmetteur du SNC. L'accumulation d'ACh dans la synapse est responsable des effets nicotiniques et muscariniques **(Figure 3, Testud et Grillet, 2007).** Au contraire des OPs, les carbamates inhibent l'AChE de façon réversible. En effet, après phosphorylation par un carbamate, l'AChE est capable de se réactiver spontanément plus ou moins rapidement selon la molécule **(Figures 3, 5A, B).** Il faut souligner qu'en présence de carbamate ou d'OPs, l'excès d'ACh produit par l'inhibition de l'AChE en plus de l'hyperexcitabilité provoquée induit par l'excès d'ACh, une diminution de la libération d'ACh est également obtenue. Dans le dernier cas, l'ACh agit sur un mAChR présynaptique qui est responsable de l'activation d'un mécanisme de 'feed-back' négatif sur la libération du neurotransmetteur (**Fugeur 7, Hue et coll., 1989 ; Le Corronc et coll., 1991 ; Corbel et coll., 2006**). Par conséquent, un premier effet observé (i.e., l'hyperexcitable) une inhibition de la transmissions synaptique est également impliquée dans la toxicité des OPs et des carbamates.

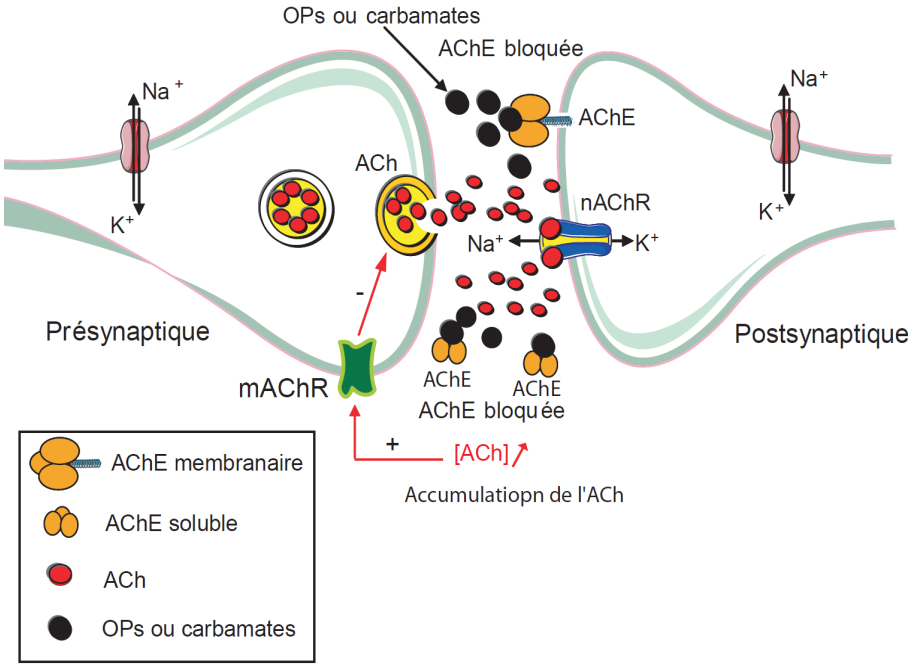



**Figure 7. Le mécanisme d'action toxique des OPs et carbamates principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition de l'AChE en forme membranaire et soluble et l'accumulation de l'ACh agit sur un mAChR présynaptique qui est responsable de l'activation d'un mécanisme de 'feed-back' négatif sur la libération du neurotransmetteur (Modifié d'après Corbel et coll., 2006).**

## B- Les répulsifs

### 1. Historique des produits répulsifs

L'utilisation de composés répulsifs contre les insectes remonte à l'antiquité, lorsque les diverses huiles végétales, les fumées et les goudrons ont été utilisés pour éloigner les insectes **(Peterson et Coats, 2001**). A toutes les époques l'homme a cherché à se protéger de l'attaque des insectes en particulier hématophages. Les hommes préhistoriques se tenaient assis près d'un feu de camp générant de la fumée qui éloigne les insectes (**Novak et Gerberg, 2005**). Dans le même but, ces peuples se couvraient également le visage et certaines parties du corps avec de la boue (**Novak et Gerberg, 2005**); les peintures de guerre des Indiens d'Amérique du Nord avaient sans doute aussi cette fonction. En fin, les indigènes nord américains se frottaient la peau avec des aiguilles de cèdre d'Amérique ou s'enduisaient de graisse d'ours pour se protéger des piqûres d'insectes en été (**Gittins et Trash, 2005; Novak et Gerberg, 2005).**

Les premières mentions de l'existence de répulsifs contre les insectes ont été décrites par Pline l'Ancien, un naturaliste et écrivain latin, et par Dioscorides, un médecin grec, entre 40 et 90 avant Jésus-Christ (**Novak et Gerberg, 2005**). Ils rapportent que l'absinthe éloigne les « moucherons » et les puces. D'autres part, divers extraits de plantes ont été utilisés depuis des milliers d'années comme répulsifs contre les arthropodes hématophages, notamment les extraits du neem (*Azadirachta indica*) (**Ganesalingam, 1987**). Dans les années 1800, l'huile de citronnelle fut l'un des premiers répulsifs largement utilisé après son introduction vers 1852 (**Novak et Gerberg, 2005**). En 1929, le premier répulsif de synthèse a été introduit : le diméthyle phthalate (**Novak et Gerberg, 2005**). Mais c'est surtout pendant les deux dernières Guerres mondiales que le besoin de répulsifs pour les militaires a permis à la recherche de se développer dans ce domaine. Les soldats en zone tropicale devaient se protéger contre les maladies transmises par les arthropodes vecteurs de maladies telles que la malaria, la dengue, le typhus. Ainsi le DEET développé en 1954 par Mc-Cabe, deviendra l'un des plus efficaces et des plus utilisés au monde (**Novak et Gerberg, 2005**).

## 2. Définition des produits répulsifs

Les répulsifs, sont des substances chimiques visant à repousser les insectes ou à les empêcher de piquer l'homme et les animaux. Ils provoquent chez l'insecte une altération de la conduite de repérage de l'hôte, aboutissant à une déviation du vol, l'éloignant de sa cible potentielle. Cette définition oppose fondamentalement les répulsifs aux insecticides. Ces derniers tuent l'insecte, mais après le contact **(Combemale, 2001 ; Lundwall et coll., 2005**). Le répulsif idéal doit répondre à de nombreux critères. D'abord, il ne doit pas être toxique, ni irritant pour la peau. Puis il doit avoir un large spectre d'efficacité contre différents arthropodes, ainsi qu'une durée de protection suffisante. Il doit également être résistant à l'abrasion ou au lessivage, ainsi qu'être abordable, facile à utiliser, sans odeur et avec une texture non huileuse (**Petersen et coll., 2003; Fradin, 2001**). Aucun répulsif ne répond à l'ensemble de ces critères (**Fradin, 2001**). Jusqu'en 1956, le gouvernement des États-Unis a testé plus de 20 000 composés répulsifs afin d'obtenir un produit pouvant répondre au plus grand nombre de ces critères (**Petersen *et coll.,* 2003**).

## 3. Classification des principaux répulsifs et mode d'action

### 3.1. Les répulsifs d'origine naturelle

#### *3.1.1. Huile de lavande*

L'huile de lavande est extraite de quatre principales espèces végétales qui sont : *Lavandula latifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula stoechas* et *Lavandula x intermedia* (**Cavanagh et Wilkinson, 2002**). Principalement à l'origine de l'odeur caractéristique de l'huile de lavande, les acétates linalyliques sont présentés en différentes concentrations selon l'origine de la plante (30-60 % au Sud de la France, 8-18 % en Angleterre, 25 % au Cachemire). L'huile de lavande contient également 30-40 % de géraniol et d'esters (linalol, lavandulol, nérol, cinéol, caryophyllène, coumarine, limonène, bétaocimène, furfural, cétone amylique éthylique, thujone et pinocamphone), ainsi que du camphre à des concentrations variables en fonction de la formulation.

### *3.1.2. Huile de citronnelle*

Les propriétés répulsives et insecticides de cette huile ont été découvertes en 1901. Elle a été utilisée pendant un certain temps dans les salons de coiffure pour le contrôle des puces et des poux **(Peterson et Coats, 2001**). Il existe onze produits homologués qui peuvent être utilisés également contre les moustiques. Leur concentration en substances activés varie entre 2,55 et 15 %. Les répulsifs à base d'huile de citronnelle peuvent contenir plusieurs substances actives. Ces dernières forment des mélanges complexes composés principalement de terpènes (**Sanfaçon et coll., 2002)**.

### *3.1.3. Citriodiol*

Le citriodiol ou PMD (para-Menthane-3,8-diol), est un extrait naturel *d'Eucalyptus citriodora*. Il a été commercialisé dans les années 1990 (origine anglaise). Il est commercialisé en France bien que peu d'études ont été réalisées sur sa toxicité potentielle (**Boulanger, 2007)**. Issu de l'eucalyptus, il pourrait protéger des moustiques jusqu'à 4 heures. Du point de vue chimique le citriodiol est un métabolite du menthol. Il est utilisé comme additif alimentaire ainsi que dans plusieurs préparations pharmaceutiques. Sa formule moléculaire est le $C_{10}H_{20}O_2$ et a comme autre nom chimique le 2-(2-hydroxy-2-méthyl)-5-méthyl- cyclohexanol (**Figure 8**). Dans une formulation qui contient plus de 30 % de produit actif sa durée d'efficacité contre les anophèles et les tiques est de l'ordre de 6 heures **(Trigg, 1996; Trigg et Hill, 1996).** Une étude réalisée en Suède montre une certaine efficacité contre les piqûres de tique lors d'activités en plein air. Il diminue le nombre de piqûres de 65 % (groupe sans répulsif) à 31 % (groupe traité avec le répulsif) **(Gardulf et coll., 2004)**.

Aucune information sur le mode d'action propre au citriodiol n'est réellement disponible dans la littérature scientifique. Cependant, quelques études rapportent qu'il peut chasser les insectes piqueurs en bloquant ou en interférant avec les sites récepteurs utilisés par le repérage de l'hôte **(Boulanger, 2007).**

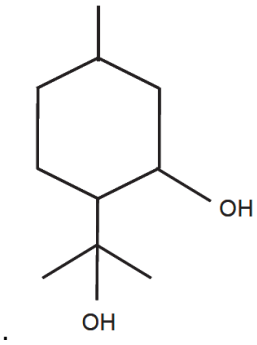



**Figure 8. Structure chimique du citriodiol.**

### 3.2. Les répulsifs de synthèse

Un certain nombre de répulsifs de synthèse existe sur le marché. Leur activité répulsive a principalement été étudiée sur les moustiques :

#### *3.2.1. IR 35/ 35*

IR 35/35 (**Figure 9)** a été commercialisé dans les années 1930 (**Boulanger, 2007)**. L'IR 35/35 a été évalué par l'EPA (Environnemental Protection Agency) aux Etats-Unis par l'OMS sur les pesticides **(Boulanger, 2007)**. La concentration optimale utilisée est de 20 % avec une durée de protection proche du DEET. Chez l'homme, il n'y a pas d'études publiées concernant son innocuité **(Boulanger, 2007).** Une étude récente, réalisée en laboratoire sur *Aedes ægypti* a remis l'IR 35/35 dosé à 7,5 % est 4 fois moins efficace que du DEET dosé à 4,75 % (22,9 contre 88,4 min) (**Fradin et Day, 2002**). L'effet de l'IR 35/35, dans un test de laboratoire sur *An. dirus* est montré moins sensible qu'au DEET (3,8 heures d'efficacité contre 5,8 heures) **(Thavara et coll., 2002),** alors que les mêmes solutions dosées à 20 % d'IR 35/35 et de DEET font preuve d'une efficacité très proche vis-à-vis d'Ae*des ægypti* (9,8 contre 9,7 h) et de *Culex quinquefasciatus* (13,7 contre 12,7 h). Enfin, une étude de terrain sur les moustiques d'*Anopheles gambiæ*, compare l'efficacité du DEET, de l'IR 35/35 et de l'icaridine/KBR 3023 (**Costantini et coll., 2004**). L'$ED_{95}$, c'est-à-dire la dose de répulsif à appliquer sur la peau pour repousser efficacement 95 % d'*An. gambiæ*, est proche et minime pour le DEET et l'icaridine/KBR 3023 (0,09 et 0,08 mg/cm$^2$ contre 0,2 mg/cm$^2$ pour l'IR35/35

respectivement) ce qui traduit clairement la moindre sensibilité d'*An. gambiæ* à l'IR 35/35. Surtout, la rémanence sur la peau de l'icaridine/KBR 3023 est supérieure à celles du DEET et de l'IR 35/35, avec une demi-vie d'environ 4 heures pour l'icaridine/KBR 3023 contre 3 heures pour le DEET et l'IR 35/35.

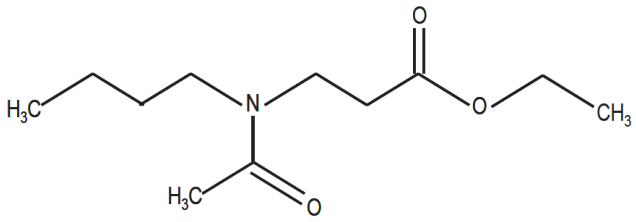



**Figure 9. Structure chimique de l'IR 3535.**

### *3.2.2. KBR 3023*

Le KBR 3023 ou picaridine a été un nouveau répulsif utilisé en santé publique (**Wahle et coll., 1999 ; WHO, 2000 ; Scheinfeld, 2004 ; Carpenter et coll., 2005**). Il a été enregistré pour la première fois aux Etats-Unis en 2001 (**USEPA, 2005**). Son efficacité a été démontrée contre les moustiques et contre un large groupe d'arthropodes hématophages **(Frances et coll., 2004; Scheinfeld, 2004; Carpenter et coll., 2005 ; Brooke et coll., 2010**).

Le KBR 3023 (**Figure 10**) a été récemment commercialisé en France en 1990, pour la protection contre les piqûres d'arthropodes et particulièrement d'anophèles (**Badolo et coll., 2004**). Il a l'avantage de rester efficace jusqu'à 10 heures après son application. Son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé. Les effets secondaires sont limités car il ne présente qu'une faible irritation de contact. Au cours d'essais sur le terrain (en Malaisie), il a été constaté qu'il est aussi efficace que le DEET dans la protection contre *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus* (**Yap et coll., 1998**). Des résultats similaires ont été obtenus en République Tchèque avec *Aedes cantans*, *Aedes annulipes* et *Aedes sticticus* (**Rettich, 1999**). Par contre, l'effet knock-down et la toxicité du produit ne s'observent qu'à doses très élevées. Le KBR 3023 aurait plutôt un effet sur la recherche de l'hôte **(Badolo et coll., 2004, Pennetier et coll., 2007).**

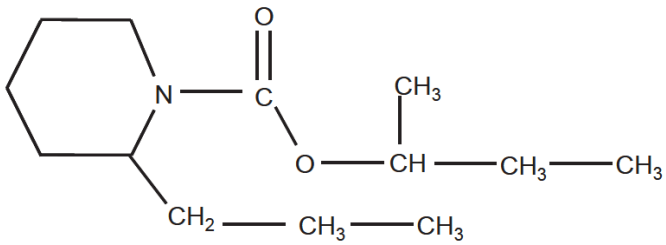



**Figure 10. Structure chimique du KBR 3023.**

### *3.2.3. Le DEET*

#### *3.2.3.1. Historique et mode d'action du DEET*

Le DEET est reconnu comme le plus efficace de tous les répulsifs et il est actuellement le plus vendu sur le marché mondial (**RRD, 2002 ; Fradin et Day, 2002)**. Le DEET a été utilisé comme répulsif depuis 1954 par l'armée américaine et actuellement environ 200 millions de personnes dans le monde chaque année utilisent le DEET (**USEPA, 1998**).

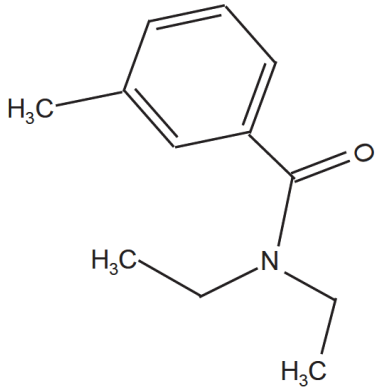



**Figure 11. Structure chimique du DEET (diéthyl-m-toluamide).**

Le DEET contient un minimum de 95% de l'isomère méta, la forme la plus efficace du diéthyle toluamide, comme ingrédient actif (**USEPA, 1998, Figure 11).** Le DEET a été développé et breveté par l'armée américaine en 1946. Parce que le DEET a été reconnu

comme l'un des rares produits efficaces contre les moustiques et les mouches piqueuses, il a été homologué pour une utilisation en santé publique en 1957, (**McCabe et coll., 1954)**.

Le DEET est efficace contre une large gamme d'arthropodes (**Carroll et coll., 2005 ; Klun et coll., 2005**), mais son mode d'action exact et sa cible moléculaire ne sont pas connus (**McIver, 1981 ; Klun et coll., 2005)**. En dépit de l'intérêt général et l'augmentation de l'utilisation du DEET dans les programmes de la santé publique (**Rowland et coll., 2004 ; Durrheim et Govere, 2002**), des controverses subsistent quant à l'identification de ses sites cibles au niveau moléculaire et de son mécanisme d'action exact chez les insectes. Certains auteurs ont suggéré que les répulsifs pouvaient bloquer les pores au niveau antennaire et ainsi empêcher la détection des stimuli émis par l'hôte (**Wright, 1975**). D'autres auteurs ont suggéré que le DEET peut bloquer les réponses électrophysiologiques des neurones sensoriels olfactifs aux odeurs attrayantes des insectes (**Ditzen et coll., 2008)**. Par contre, **Syed et Leal (2008)** ont récemment rapporté que les moustiques peuvent détecter le DEET par l'olfaction, un mécanisme physiologique qui déclenche directement le comportement d'évasion.

Bien que le débat concernant le mode d'action « olfactif » du DEET est toujours une question d'actualité, d'autres tests en laboratoire et des expériences sur le terrain ont révélé que le DEET exerce également un effet dissuasif chez les insectes et qu'il a des propriétés insecticides (**Moss, 1996; N'Guessan et coll., 2006**). Une autre étude récente a montré que le DEET ne repoussait pas les moustiques mais inhibait l'attraction en interférant avec les récepteurs à l'acide lactique impliqués dans la localisation d'hôte (**Dogan et coll., 1999 ; Bohbot et Dickens, 2010)**. **Davis (1985**) a proposé différents modèles d'activité pour expliquer cinq modes d'action potentiels : 1) inversion de la perception du signal attractif en un message irritant, 2) inhibition d'un signal, 3) activation d'un récepteur « à odeur », 4) activation d'un récepteur qui pourrait « brouiller » ou entraîner une réponse comportementale inappropriée et 5) activation de différents récepteurs causant simultanément la perte du signal spécifique lié à la localisation de l'hôte (les répulsifs bloqueraient le système d'information sensoriel).

Très récemment, des travaux ont démontré que le DEET peut inhibe l'AChE chez l'insecte (**Corbel et coll., 2009).** Ces résultats remettent en question la classification de ces produits classés uniquement dans les produits répulsifs jusqu'à maintenant.

#### *3.2.3.2. Spectre d'action du DEET*

Le DEET est un répulsif à large spectre d'utilisation qui est très efficace contre les moustiques de type *Aedes* spp. (**Schreck et McGovern, 1989; Gupta et Rutledge, 1991; Cilek et coll., 2004 ; Trongtokit et coll., 2004, Pennetier et coll., 2005**), *Ae. albopictus* **(Annis, 1991; Barnard et Xue, 2004),** *Culex* spp. (**Trongtokit et coll., 2004; Barnard et Xue, 2004; Frances et coll., 2004),** *Mansonia* spp. (**Curtis et coll., 1987 ; Trongtokit et coll., 2004),** *Anopheles gambiae*, (**Curtis et coll., 1987; Trigg, 1996 ; Costantini et coll., 2004; Pennetier et coll., 2007, 2008, 2009)** et *An. arabiensis*, **(Walker et coll., 1996; Govere et coll., 2001),** *An. dirus*, (**Frances et coll., 1993, 1996 ; Trongtokit et coll., 2004),** *An. minimus* (**Lindsay et Janneh, 1989**), *An. darlingi,* **(Moore et coll., 2002)** et *An. farauti* **(Frances et coll., 1999, 2002).** D'autres insectes vecteur de maladies sont sensible au DEET comme les mouches du sable (Psychodidae), **(Coleman et coll., 1993; Kalyanasundaram et coll., 1994),** les mouches noires (Simulidae) **(Chareonviriyaphap et coll., 1997 ; Debboun et coll., 2000),** les acariens (Trombiculidae) **(Buescher et coll.,1982; Eamsila et coll.,1994),** les tiques dures et molles (Ixodidae) **(Kumar et coll., 1992; Pretorius et coll., 2003 ; Brooke et coll., 2010),** les punaises de lit (*Cimex hemipterus*) **(Kumar et coll., 1992)** et les puces (Siphonaptera) **(Mehr et coll., 1984).**

#### *3.2.3.3. Effet synergique du DEET avec d'autres insecticides*

En toxicologie la synergie désigne la situation qui se produit lorsque l'exposition simultanée à au moins deux produits chimiques, provoque des effets sur les insectes supérieurs à la somme des effets provoqués par les produits utilisés seuls **(Marriam-Webster, 2005)**. L'effet de synergie des insecticides de familles chimiques différentes a pour principales conséquences d'augmente l'effet insecticide, tout en réduisant les doses utilisées de chacun des insecticides **(Corbel et coll., 2006)**.

Puisqu'un mélange de molécules actives à mode d'action différent est considéré comme un nouveau composé, il doit satisfaire aux exigences toxicologiques avant d'être utilisé en santé publique (**Zaim et coll., 2000**). Pour cela, il est nécessaire d'étudier les mécanismes physiologiques mis en jeu dans les phénomènes de synergies observés. La propriété synergique des combinaisons se révèle d'autant plus avantageuse qu'elle permet

de diminuer de façon importante les doses efficientes à utiliser sur l'insecte et augmente l'effet insecticide (**Corbel et coll., 2006).** Des études ont permis de mettre en évidence de forts effets synergiques entre OPs ou carbamates et le répulsif DEET (**Pennetier et coll., 2007)**. Certains auteurs ont montré que les monooxygénases à cytochrome P-450 sont responsables de l'effet synergie observée entre le DEET et carbamates et augment la toxicité du mélange sur les moustiques d'*Ae. aegypti* (**Bonnet et coll., 2009**). Ainsi une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait contribuer à optimiser le choix des répulsifs à utiliser seuls et/ou en association avec des insecticides sur les moustiquaires (**Pennetier et coll., 2007)**. Mais les mécanismes physiologiques responsables de cette synergie dans le système nerveux central d'insecte restent inconnus.

Les mélanges d'insecticides OPs ou carbamates avec les répulsifs ont été étudiés dans l'objectif d'une application sur des moustiquaires pour lutter contre le paludisme (**Pennetier et coll., 2005, 2007**) et pour contourner les phénomènes de résistance des insectes. **Pennetier et coll., (2005)** ont montré que la combinaison d'un insecticides carbamate tel que le propoxur et du DEET induit un effet choc, aussi élevé que celui de la deltaméthrine contre une souche sensible d'*Ae. aegypti.* Les taux de mortalité sont significativement plus élevés sur une souche résistante aux pyréthrinoïdes de ce moustique (**Pennetier et coll., 2005 ; 2007).**

De plus, les mêmes auteures ont montré que l'utilisation de ce mélange est plus efficace que sur les moustiquaires traitées aux pyréthrinoïdes contre les populations sensibles et résistantes *An. gambiae* et n'induit pas une pression supplémentaire sélective sur les gènes de résistance, *Ace1R* et *kdr* (**Pennetier et coll., 2008).** Les moustiquaires imprégnées de ce mélange présentent ainsi un pouvoir létal et irritant qui empêche les piqûres de moustiques. En outre, les moustiques au contact du mélange subissent un puissant effet paralysant, dit effet « Knock down ». Les taux de mortalité mesurés se révèlent satisfaisants, puisqu'ils égalent ceux obtenus avec la deltaméthrine, un pyréthrinoïde de synthèse courant, très efficace contre les moustiques (**Pennetier et coll., 2005, 2007)**. Le PM et le DEET utilisés seuls ont induit le jour de l'imprégnation (T0) 100% de mortalité. L'efficacité insecticide de ces deux produits a diminué rapidement pour atteindre une activité résiduelle (< 20% de mortalité) moins d'un mois après l'imprégnation (**Pennetier et coll., 2009)**. Le mélange (PM+DEET) a également induit 100% de mortalité à T0 mais cette efficacité s'est maintenue au dessus de 95% pendant plus de deux mois avant de diminuer plus lentement pour atteindre un niveau résiduel de 20%, 6 mois après l'imprégnation. De la même manière, l'inhibition du gorgement induite par les mélanges PM+DEET a été plus importante et a duré plus longtemps que les produits utilisés seuls.

**Pennetier et coll., (2005, 2007)** ont testé deux mélanges comprenant un insecticide non-pyréthrinoïde de la famille des OPs le PM, associé soit au DEET, soit à un répulsif de synthèse de nouvelle génération KBR 3023. Chacun de ces mélanges montre une synergie importante en termes de pouvoir létal et d'effet paralysant sur les *anophèles*. Cependant, seule l'association entre l'insecticide et le répulsif standard produit un effet synergique capable d'empêcher le moustique de prendre son repas de sang. Cette synergie s'observe également au niveau de la durée d'efficacité qui se voit prolongée de plusieurs mois par rapport à celle obtenue avec les produits appliqués seuls. La propriété synergique des combinaisons se révèle d'autant plus avantageuse qu'elle permet de diminuer de façon importante les doses efficientes à utiliser sur les moustiquaires (d'environ 6 fois par rapport à l'insecticide employé seul), pour une efficacité équivalente à celle de la deltaméthrine (**Pennetier et coll., 2005)**.

Plus généralement, les mélanges OPs et carbamate (propoxur) /répulsif présentant une forte efficacité contre les insectes vecteurs et porteurs des gènes de résistance (*kdr* et *Ace.1*$^{R}$) pourraient être évalués sur les différents supports utilisés contre différents insectes vecteurs ou ravageurs (**Pennetier et coll., 2007)**. Par exemple, une stratégie de protection des cultures maraîchères en milieu tropical a récemment été développée pour réduire le nombre de traitement foliaire. Il s'agit de couvrir les cultures la nuit avec un filet imprégné d'insecticide (**Martin et coll., 2006**).

En fin une limite importante vient du fait que l'on doit considérer les mélanges OPs ou carbamates/ répulsifs comme de nouveaux composés. Ils doivent donc satisfaire aux critères toxicologiques de l'OMS. Il est donc impératif d'évaluer la toxicité des mélanges sur les mammifères. En effet, très peu d'informations sont disponibles concernant la toxicité des répulsifs, mais plusieurs rapports relatant les symptômes liés à une exposition prolongée au DEET chez l'homme, les mammifères et/ou les invertébrés, reflétaient une action sur le SNC (**Tenenbein, 1987; Lipscomb et coll., 1992; Schaefer et Peters, 1992; Verschoyle et coll., 1992; Schoenig et coll., 1993 ; Corbel et coll., 2009**). Bien que le profil toxicologique du DEET soit favorable (**Fradin, 1998**), certaines études ont mis en évidence une toxicité du DEET lorsqu'il est combiné avec d'autres substances actives (**Moss, 1996; Chaney et coll., 1997; Abdel-Rahman *et coll.,* 2004a b; Abou-Donia et coll., 1996 ; 2004**). Par exemple, les interactions entre le pyridostigmine bromide (un inhibiteur de l'AChE utilisé comme agent prophylactique d'exposition aux gaz OPs) et le DEET soulève beaucoup d'interrogations depuis que plusieurs études ont suggéré l'implication de ces deux molécules dans les syndromes de la guerre du Golf (**Haley et coll., 1997a, b; Haley et Kurt, 1997; McCain et coll., 1997; Chaney et coll., 2000**). L'étude toxicologique de ces mélanges OPs / répulsif

sera d'autant plus rapide et efficace si les mécanismes physiologiques responsables des interactions synergiques sont bien décrits. Ceci implique de bien connaître le mode d'action des différents répulsifs sur le système nerveux des insectes et d'étudier leur toxicologie lorsqu'ils sont utilisés seuls.

# CHAPITRE 2 : MODE D'ACTION DES INSECTICIDES ANTI-ACETYLCHOLINESTERASE ET MECANISMES DE RESISTANCES DEVELOPPES PAR LES INSECTES

L'une des cibles principales des insecticides est le SNC des insectes. En effet près de 85% des insecticides sont neurotoxiques (**Figure 12 B, Nauen, 2006)**. Ils agissent sur les canaux ioniques dépendants du potentiel (le canal sodium), touchant ainsi la genèse de l'activité nerveuse, sur les systèmes enzymatiques synaptiques et extra-synaptiques (AChE) et sur les récepteurs ionotropes (nAChRs, GABARs), altérant la transmission synaptique, relais nécessaire de l'information nerveuse (**Figure 12 A, B**).

Aujourd'hui, seules quatre familles de produits chimiques représentent chacune plus de 10% de part de marché et ensemble plus de 70% : les OPs (à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthrinoïdes de synthèse (à partir de 1970) et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) (**Nauen, 2006**), (**Figure 12 A**).

Ces quatre familles agissent sur trois cibles distinctes. Les OPs et les carbamates inhibent l'AChE, enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'ACh au niveau synaptique et extrasynaptique. Les pyréthrinoïdes 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 nAChRs.

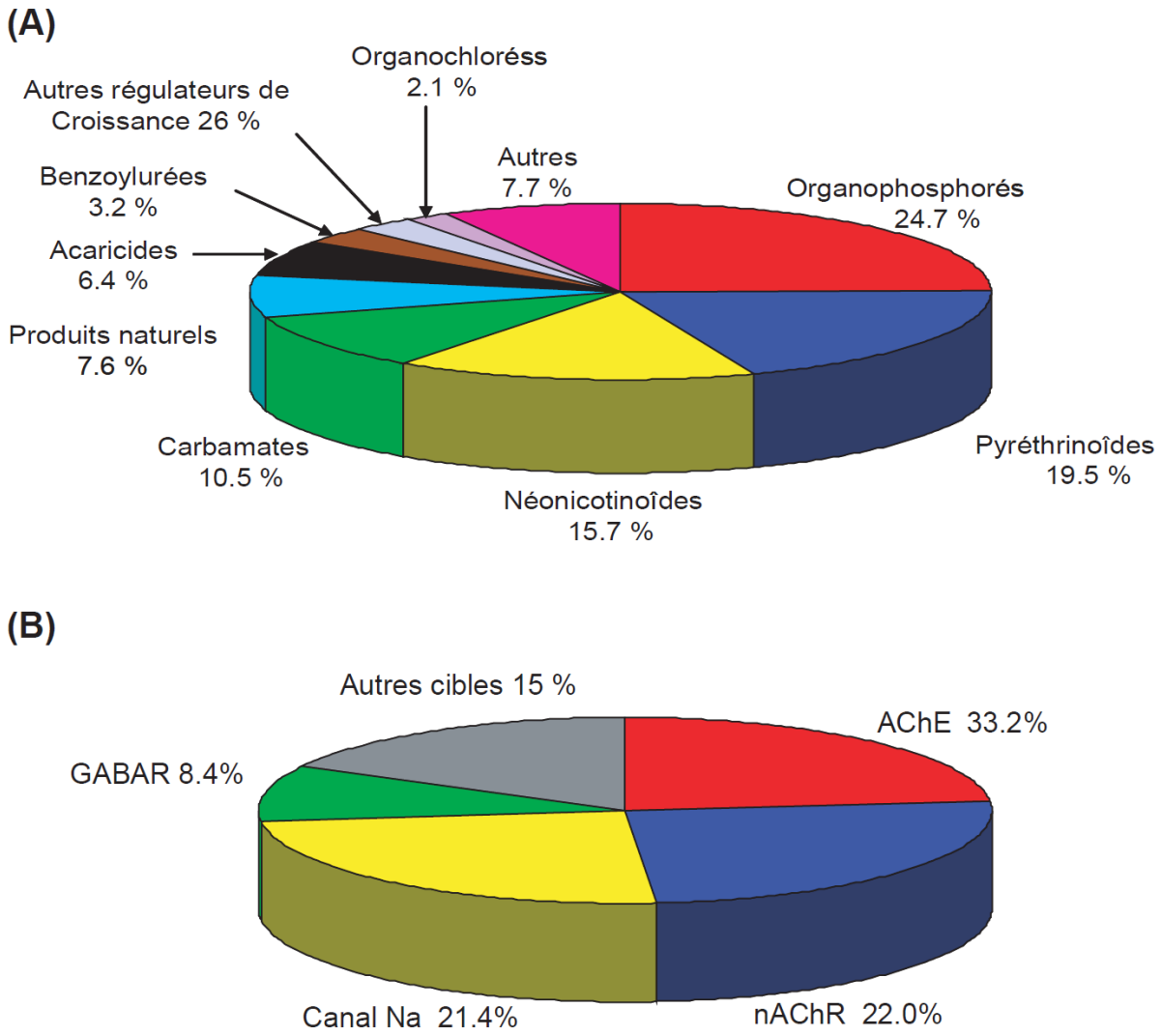



**Figure 12. (A) Parts de marché des différentes classes d'insecticides au niveau mondial (D'après Nauen, 2006). (B) Cibles des insecticides neurotoxiques (Modifié d'après, Phillips McDougall, novembre 2006, www.fao.org). AChE : Acétylcholinestérase, nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique, GABAR : récepteur à l'acide gamma aminobutiryque.**

## A- Cibles moléculaires et mécanismes d'action neurotoxiques des insecticides anti-AChE chez l'insecte

Le système nerveux est constitué d'un réseau de neurones interconnectés par le biais de jonctions spécifiques : les synapses. Le message véhiculé au niveau d'une synapse peut être de nature électrique ou de nature chimique (neurotransmetteurs). Cependant, quelle que soit la nature du signal, la perception de l'information au niveau de la cellule post-synaptique provoque l'activation ou l'inhibition de récepteurs et/ou de canaux ioniques membranaires responsables de la propagation de l'influx nerveux. Actuellement, les insecticides ciblent quatre éléments majeurs impliqués dans cette transmission neuronale : le canal sodium dépendant du potentiel (canal Na), les AChRs, les GABARs et l'AChE (**Figures 13 A, B, Haubruge et Amichot, 1998 ; Raymond-Delpech et coll., 2005).**

### 1. L'acétylcholinestérase

L'AChE (EC 3.1.1.7) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine après la transmission de l'information par ce neurotransmetteur. 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'AChE présente deux sites, le site estérasique contenant la triade catalytique, et le site anionique qui est le site de fixation de la choline (**Champ, 1985**). L'AChE a été découverte en 1938 par David Nachmanson. Il a isolé et purifié cette enzyme à partir des membranes excitables provenant de préparation nervaus de différents mammifères, oiseaux, reptiles et insectes (**Fukuto, 1990**). La plupart des recherches, portant sur sa structure chimique, ont été réalisées à partir de l'enzyme isolée et purifiée de la plaque électrique de l'anguille *Electrophorus electricus (***Leuzinger et coll., 1969 ; Mineau, 1991 ; Villatte et coll., 1998**).

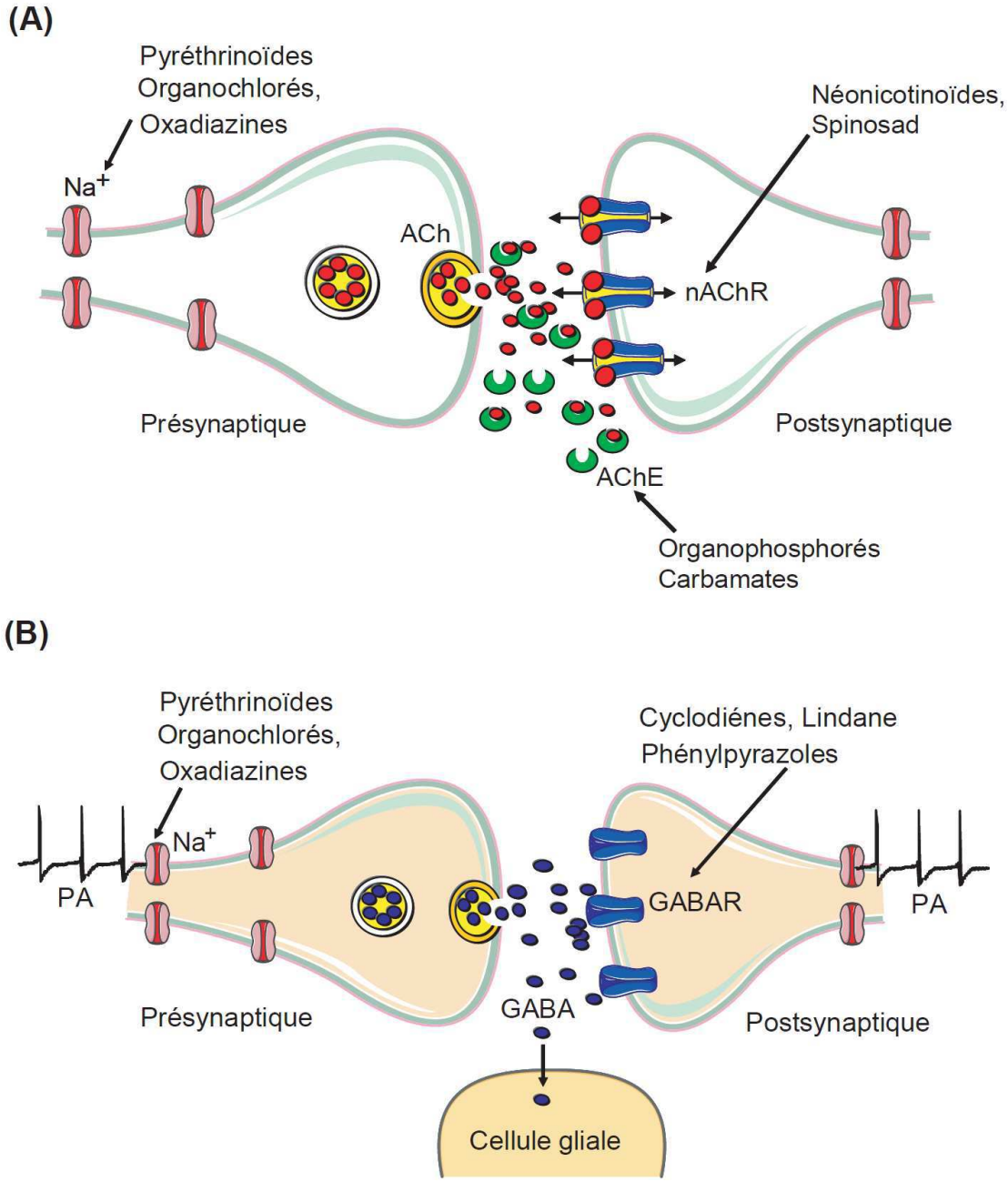



**Figure 13. (A) : Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique; Na : canal sodium (Modifié d'après Raymond-Delpech et coll., 2005).**
**(B) : Représentation schématique d'une synapse GABAergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides. GABA : acide gamma aminobutiryque ; GABAR : récepteur au GABA ; Na : canal sodium ; PA : potentiel d'action ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique (Modifié d'après Raymond-Delpech et coll., 2005).**

### *1.1. Structure, localisation et distribution de l'AChE d'insecte*

Chez l'insecte, l'AChE est une protéine complexe qui possède un site de liaison anionique, un site estérasique, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (**Fukuto, 1990**). Le site actif de l'enzyme contient le site anionique, qui fixe les groupements cationiques du substrat (OPs et carbamates) et le site estérasique (qui possède une sérine), dont le groupement OH est acylé pendant la réaction d'hydrolyse (**Hasan et coll., 1980, Zhorov et coll., 1991**), (**Figure 14 A)**. Le site anionique contient des charges négatives, qui proviennent du groupement COO- des chaînes latérales des acides aminés aspartique ou glutamique. Ce site anionique permet la fixation des charges positives portées par l'ammonium quaternaire de l'ACh (**Lockridge, 1988**).

L'AChE est une sérine hydrolase essentielle pour réguler l'effet du neurotransmetteur excitateur ACh dans le SNC des mammifères et des insectes (**Massoulié, 2002**). Chez les insectes, l'AChE est principalement localisée dans le SNC où elle est présente sous une seule forme moléculaire, un dimère amphiphile ancré dans la membrane par un glycolipide glycosylphosphatidylinositol (GPI) (**Lenoir-Rousseaux, 1985** ; **Lenoir-Rousseaux et Gautron, 1987 ; Fournier et coll., 1988a ; Toutant, 1989**). L'AChE d'insecte est largement distribuée dans le cerveau, les segments thoraciques et abdominaux et les ganglions abdominaux. Les distributions préférentielles inclus les neuropiles du SNC tels que neuropiles protocérébral et tritocérébral, le lobule et la moelle des lobes optiques, l'organisme central, l'intérieur des calices et les glomérules antennaires **(Kreissl et Bicker, 1989 ; Sattelle et coll., 1986).**

### *1.2. Classification des AChEs d'insecte*

Chez les animaux (vertébrés et invertébrés), les cholinestérases sont classées en AChE (E.C. 3.1.1.7) et en Butyrylcholinestérase (E. C. 3.1.1.8) (BuChE) (**Lockridge, 1988 ; Massoulié et coll., 1993).** Les vertébrés possèdent deux choline estérase correspondant à deux gènes distincts l'AChE et la BuChE. Ces deux enzymes se distinguent par leur spécificité envers différents esters de choline (l'ACh et la BuCh- pour l'AChE et la BuChE, respectivement) et leur réactivité envers divers inhibiteurs.

Bien que chez les invertébrés l'AChE existe sous deux types globulaires qui peuvent être hydrophile (buffer-solubles) ou amphiphile (membrane-bound), la forme amphiphile est souvent majoritaire (**Toutant et coll., 1988 ; Arpagaus et coll., 1992, Talesa et coll., 2001).** Les formes globulaires hydrophiles et amphiphiles sont localisés chez beaucoup d'invertébrés (**Fournier et coll., 1987 ; Talesa et coll., 2001 ; Badiou et coll., 2007**). Ceci a été rapporté pour les Coléoptères, les Lépidoptères, Diptères, Hyménoptères, Plécoptères, Ephéméroptères, et d'autres taxons aquatiques **(Krysan et Kruckberg, 1970; Belzunces et coll., 1988a, b; Day et Scott, 1990),** avec les proportions des deux états qui varient pour chaque espèce.

Chez les insectes, bien que la présence d'une autre enzyme tétramérique a été décrite chez la mouche domestique **(Tripathi et coll., 1978)**, le polymorphisme biochimique semble être limité aux molécules globulaires **(Steele et Smallman, 1976 ; Zingde et coll., 1983)**, avec une forme majeure commune aux différentes espèces **(Lenoir-Rousseaux 1985).** Certains auteurs ont décrit l'existence d'une seule AChE membranaire **(Lenoir-Rousseaux, 1985 ; Lester et Gilbert, 1987),** alors que d'autres auteurs ont montré la présence de variantes biochimiques distincts **(Steele et Smallman, 1976 ; Melanson et coll., 1985 ; Hall et Kankel, 1976).** Chez l'abeille, en particulaire *Apis mellifera*, l'AChE amphiphile (membranaire) existe sous deux formes membranaires, $AChE_{m1}$ et $AChE_{m2}$, et une forme soluble majoritaire, $AChE_{sol1}$ (**Belzunces et coll., 1988b ; Badiou et coll., 2007**). Les deux formes membranaires représentent 95% de l'activité totale et leurs propriétés physcico-chimiques ont été déterminées par **Belzunces et coll., (1988b)**. La forme d'ancrage membranaire chez de nombreuses espèces d'insecte comme *Apis mellifra* (**Belzunces et coll., 1988a ; Badiou et coll., 2007),** *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica* **(Fournier et coll., 1988b),** *Platyhelminth* **(Bentley et coll., 2003)** et *Ctenocephalides felis* **(Ilg et coll., 2010)** est un ancrage de forme GPI (**Figure 14 B, Simons et coll., 1978 ; Belzunces et coll., 1988 a, b ; Badio et coll., 2007).** Cette ancre est attachée au polypeptide portant le site estérase actif de la partie C-terminale de l'AChE et peut être clivée par une lipase endogène **(Fournier et coll., 1988 a, b).**

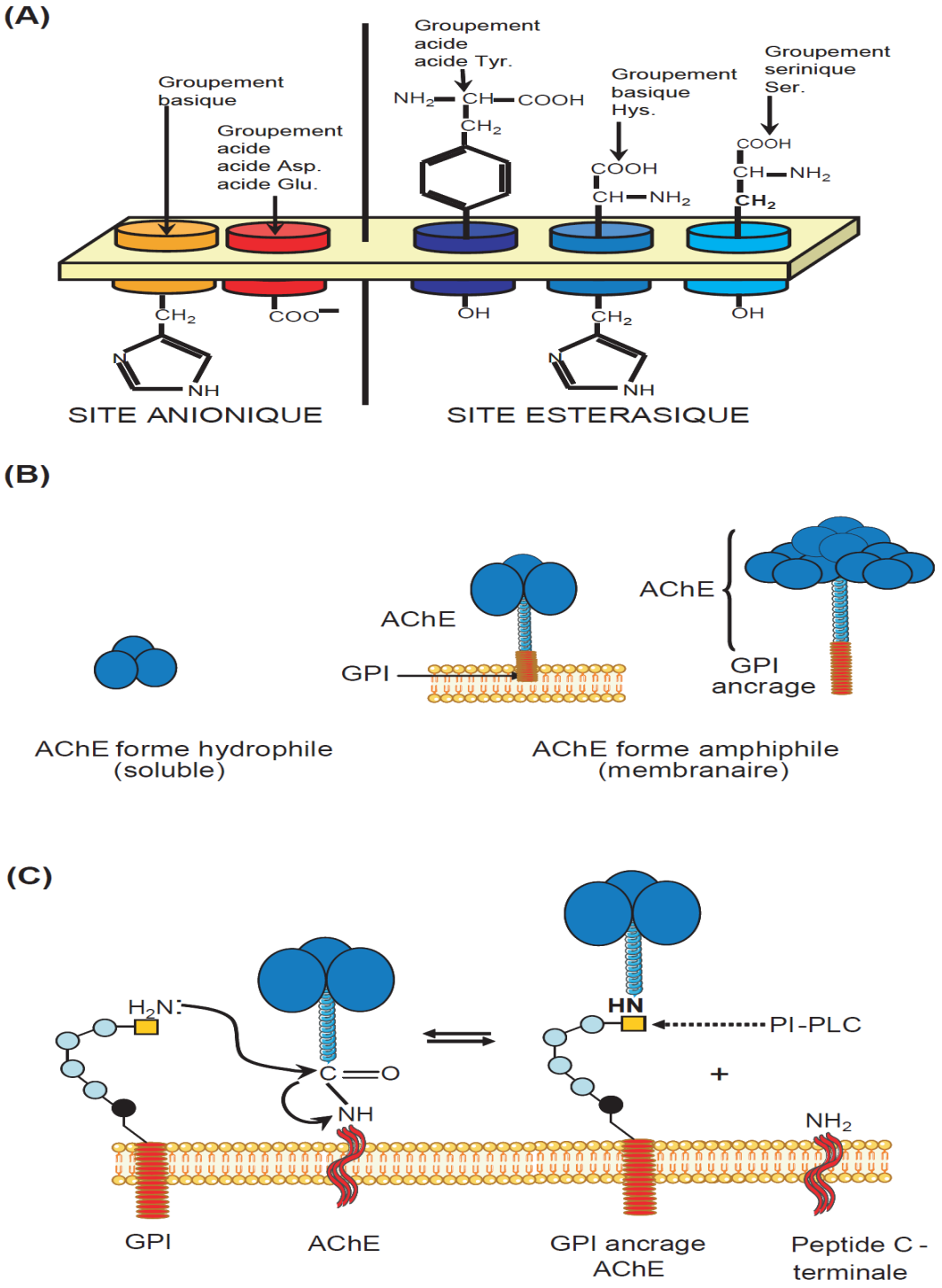



**Figure 14. (A) Structure de l'AChE d'insecte. Asp. : aspartique ; Glu. : glutamique ; Tyr. : tyrosine ; Hys. : histidine ; Ser.: sérine. (Modifié d'après Eldefrawi, 1985; Turdean et coll., 2002b). (B) Différentes formes d'AChE chez les invertébrés. GPI : glycosylphosphatidylinositol (Modifié d'après Simons et coll., 1978 ; Belzunces et coll., 1998a, b ; Rotundo, 2003 ; Badio et coll., 2007). (C) Structure du glycolipide d'ancrage de type (GPI) avec l'AChE et effet du PI-PLC (Modifié d'après Toutant et coll., 1991).**

### *1.3. Interaction AChE/ PI-PLC*

Au cours des dernières années, l'existence d'une glycosylphosphatidylinositol (GPI) d'ancrage a été démontrée pour de nombreuses protéines membranaires (**Ferguson, 1988; Thomas et coll., 1990; Englund, 1993**). Dans la plupart des cas, ce type d'ancrage est sensible à une phospholipase C phosphatidylinositol-spécifique (PI-PLC) qui convertit la protéine membranaire en une forme hydrophile, qui est reconnue par un anticorps anti-CRD (réaction croisée déterminant) **(Bordier et coll., 1986**). L'implication d'un tel mode d'ancrage a été montré pour l'AChE des vertébrés (**Futerman et Silman, 1989**) et l'AChE des insectes, soit par analyse chimique directe de l'ancrage (**Haas et coll., 1988**) ou soit par sa sensibilité à la PI-PLC (**Fournier et coll., 1988b; Belzunces et coll., 1988b**). Toutefois, certains structures d'ancrage de type GPI présentent une résistance à l'action de PI-PLC (**Low et Finean, 1977; Futerman et coll., 1985; Davitz et coll., 1986; Medof et coll., 1986**). Cette résistance à la phospholipase s'explique par l'échec de PI-PLC de réaliser la formation du produit inositol phosphate 1,2-cycliques en raison de l'acylation de l'anneau inositol (**Figure 14 C, Roberts et coll., 1988 ; Toutant, 1989 ; Toutant et coll., 1991**) qui peuvent se produire à la position 2 ou 3 (**Ferguson, 1992**).

### *1.4. Mécanisme d'action de l'AChE*

Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser l'ACh très rapidement en acétate et en choline, ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Le site actif de l'AChE possède un site catalytique qui peut être décomposé en 2 parties, le site estérasique et le site anionique **(Figure 15).** Le site anionique est responsable de la stabilisation du substrat lors de la catalyse par fixation de l'ammonium quaternaire de la partie choline de l'ACh. Il était admis, jusque dans les années 1990, que cette liaison se faisait par interaction électrostatique entre la charge positive de l'ammonium et la charge négative d'un groupement carboxyle libre de l'enzyme (**Rosenberry, 1975)**. Cette interaction est stabilisante, mais en réalité un transfert de charge entre la charge positive de l'ammonium quaternaire de l'ACh et les électrons π du noyau indole du Tryptophane est un mécanisme beaucoup plus important (**Gallivan et Dougherty, 1999**). Ce site est composé d'une majorité de résidus aromatiques et il est estimé que plus de 50% de l'énergie de stabilisation provient de ce dernier. Le site estérasique contenant la triade catalytique Ser200, His440 et Glu327 (numérotation d'après la séquence de l'AChE de *Torpedo*

*californica*) constitue le lieu de la catalyse (**Eldefrawi, 1985 ; Turdean et coll., 2002b**), (**Figures 14 A et 15**). Dans une première étape (**A**), la partie acétyle de la molécule d'ACh se fixe et forme un intermédiaire tétraédrique. Le trou oxyanion favorise la formation de cette intermédiaire en accueillant l'oxygène chargé négativement du carbonyle de l'ACh. L'His440 joue un rôle important en se comportant comme un catalyseur pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire. L'hydrolyse de l'ACh implique la participation du N de l'imidazole de l'histidine qui va attirer le proton de l'hydroxyle de la sérine du site actif, le rendant plus mobile et favorisant l'interaction de l'oxygène de la sérine avec le centre électrophile de l'ACh (**Figure 15**)**.** Une fois le complexe enzymatique/ACh non covalent enzyme substrat formé (A), l'AChE est acétylée par estérification de l'hydroxyle de la sérine active (B) et la partie choline est libérée. L'enzyme est régénérée (C) lorsque l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau, électronégatif, attaque le site électrophile du carbonyle du groupement acétyle produisant de l'acide acétique (**Lockridge, 1988 ; Eldefrawi, 1985 ; Gallivan et Dougherty, 1999 ; Badiou et coll., 2007).**

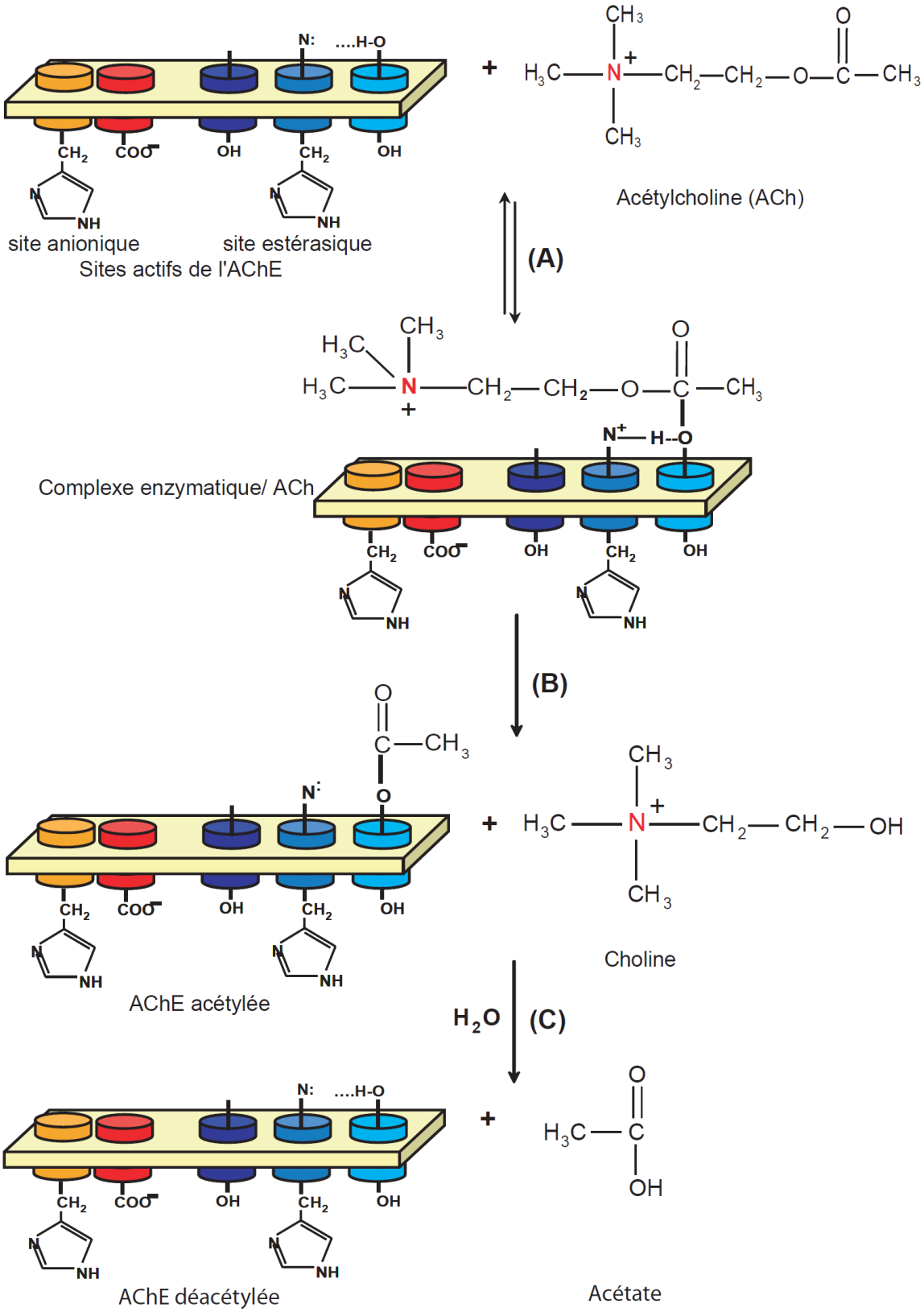



**Figure 15. Mécanisme d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE (Modifié d'après Eldefrawi, 1985 ; Gallivan et Dougherty, 1999 ; Turdean et coll., 2002b ; Testud et Grillet, 2007).**

## *2.* Les récepteurs cholinergiques de l'ACh

Chez les insectes, il existe deux grandes catégories de récepteurs à l'ACh : les récepteurs cholinergiques de types nicotiniques (nAChR) et les récepteurs cholinergiques de types muscariniques (mAChR).

### *2.1. Les récepteurs cholinergiques de types nicotiniques (nAChRs)*

Les récepteurs cholinergiques de types nicotiniques (nAChRs) exprimés par les neurones des insectes sont une des cibles principales des molécules à effet insecticides (**Figure 13, Raymond-Delpech et coll., 2005)**. Leurs localisations, structures, propriétés pharmacologiques et fonctionnelles indiquent une hétérogénéité de ces récepteurs similaire à celle des nAChRs des vertébrés.

**Historique et Localisation** *:* Les récepteurs cholinergiques de types nicotiniques (nAChR) sont les premiers récepteurs cholinergiques dont l'existence a été reconnue (**Maheale, 2004**). En 1906, John Newport Langley (1852-1925) évoque l'idée d'une "substance réceptrice" située à la jonction neuro-musculaire qui serait sensible au curare (comme antagoniste) et à la nicotine (comme agoniste), (**Maheale, 2004**). Historiquement les nAChRs de mammifères ont fait l'objet de nombreuses recherches comparées à celles menées sur les nAChRs d'Insectes. Seize gènes ont été découverts chez les vertébrés : α1-α7, α9, α10, β1- β4, γ, ε et δ **(Albuquerque et coll., 2009).** Chez les insectes, il existe également une classification précise avec plusieurs sous-unités caractérisés **(Figure 16B, Tomizawa et Casida, 2001; 2005 ; Thany et coll., 2007).** Chez les insectes, les nAChRs sont des récepteurs extra- et post-synaptiques au sein du SNC (**Thany et coll., 2007**).

**Structure** *:* A l'heure actuelle, aucune étude ne décrit précisément la structure des récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes. Les seules données disponibles sont soit déduites des connaissances sur les récepteurs neuronaux des vertébrés (**Unwin, 2003, 2005**), soit issues des travaux d'expression dans des systèmes hétérologues (**Lansdell et Millar, 2000**). Les nAChRs sont des récepteurs ionotropes appartenant à la famille des récepteurs canaux. La structure moléculaire de chaque sous-unité formant le pentamère, implique : quatre domaines transmembranaires (M1 à M4) reliés entre eux par une boucle extracellulaire et deux boucles intracellulaires. Les segments M2 et les tiers N-

terminaux des segments M1 de chacune des sous unités forment le canal ionique. La boucle extracellulaire et les 4 domaines transmembranaire sont très conservés (**Perry et coll., 2007 ; Thany et coll., 2007**). La boucle intracellulaire entre les domaines M3 et M4 est de grande taille et très variable. Elle présente des sites de phosphorylation potentiellement impliqués dans la régulation du récepteur. Un domaine carboxy-terminal extracellulaire des sous-unités α et non α (**Figure 16B**). L'ouverture du canal est provoquée par la liaison du ligand endogène, l'ACh ou des substances exogènes agonistes comme la nicotine (**Figure 16A, Thany et coll., 2007**). Il existe une grande variété de sous-unités. Elles sont classées en catégories (α, β, γ, et ε**), (Le Novère et coll., 2002).** La sous- unité α possède deux cystéines adjacentes au niveau du segment N-terminal et les sous-unités non- α (β, γ, ε et δ) ne présentent pas ce doublet de cystéines (**Figure 16B, Perry et coll., 2007).** Le site de liaison à l'ACh se situe à l'interface entre deux sous-unités : α/non-α pour les récepteurs constitués d'au moins deux sous-unités différentes (hétéromériques), ou α/ α pour les récepteurs constitués de cinq sous-unités identiques (homomériques) **(Figure 16C, Thany et coll., 2007**)**.** Les nAChR jouent un rôle central dans la transmission synaptique cholinergique rapide au sein du ganglion chez les insectes (**Sattelle, 1980; Sattelle et Breer, 1990 ; Karlin, 2002**) et sont des cibles importantes des insecticides (**Gepner et coll., 1978; Matsuda et coll., 2001, 2005 ; Raymond-Delpech et coll., 2005 ; Ihara et coll., 2006**).

**Cas particulier des nAChR des DUM neurones de la blatte *P. americana* :** Au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana* il existe deux types de nAChR qui sont insensibles à l'α-BGT (**Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et coll., 2003**). Le nAChR1, bloqué par la d-tubocurarine, est sensible à l'imidaclopride, alors que le nAChR2, bloqué par l'α-conotoxine, est naturellement insensible à l'imidaclopride sans que la blatte ait été en contact avec cet insecticide. Cette différence naturelle de sensibilité des récepteurs nAChR1 et nAChR2 vis-à-vis de l'imidaclopride pourrait expliquer les phénomènes de résistance dont l'origine pourrait être liée à une composition moléculaire différente en sous-unités (**Courjaret et Lapied, 2001**). nAChR1 et nAChR2 se différencient également par leurs propriétés électrophysiologiques mais aussi par les voies de signalisations intracellulaires impliqués dans le régulation différentielle de ces types de nAChRs (i.e., PKA, PKC, CamKinase II) (**Courjaret et coll., 2003 ; Thany et coll., 2008**).

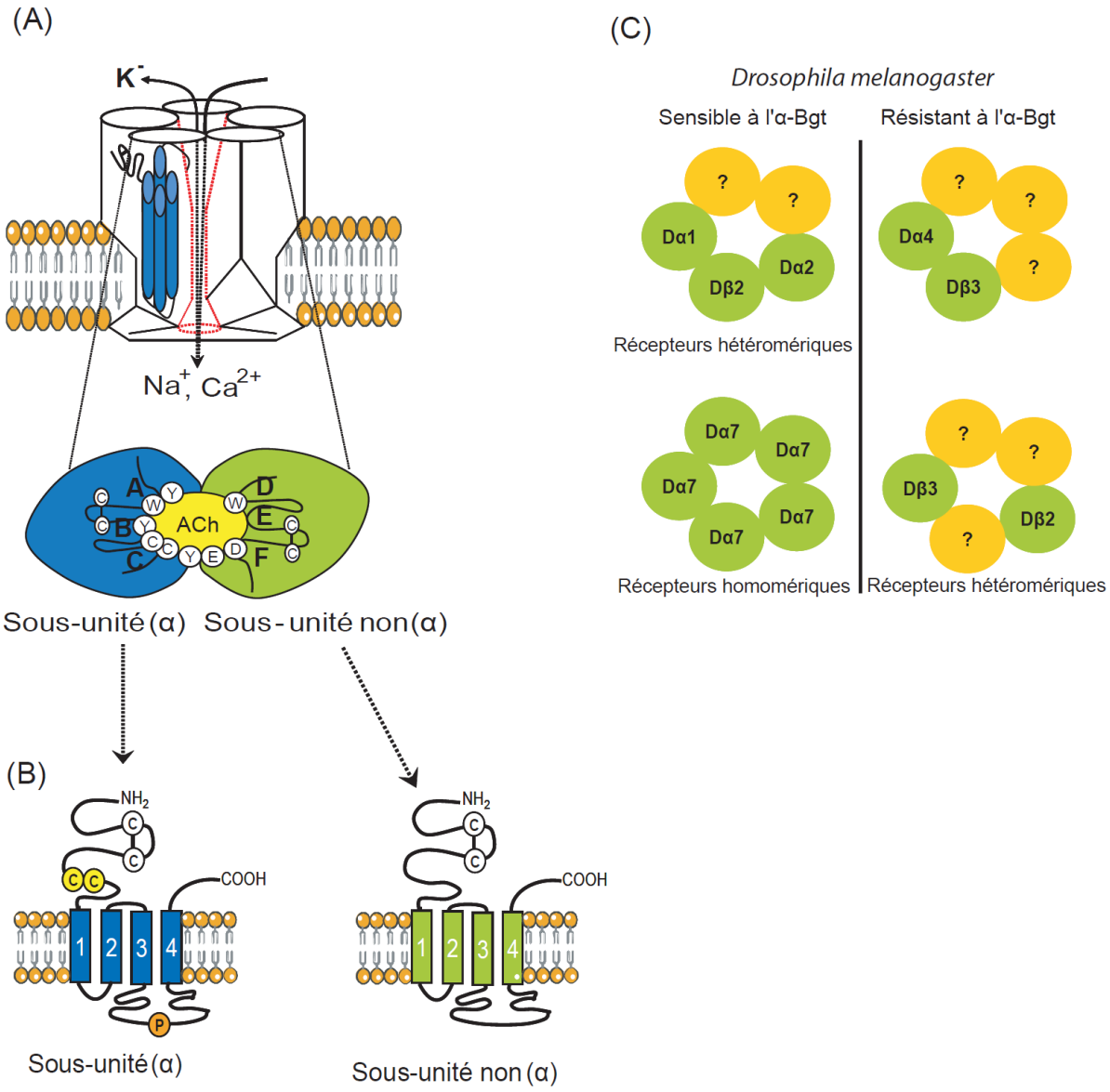



**Figure 16. (A) Structure pentamérique des nAChRs et structure des ses sous-unités qui les composent, (B) Les sous-unités de type α possèdent un doublet de cystéine absent chez les sous-unités de type non- α. La deuxième boucle cytoplasmique possède des sites de régulation par phosphorylation du canal. (C) Exemples de récepteurs homomériques et hétéromérique chez plusieurs espèces d'insectes (D'après Thany et coll., 2007 ; B, Modifié d'après Mastuda et coll., 2001, 2005).**

### *2.2. Les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChRs)*

Les récepteurs muscariniques (mAChRs) représentent la deuxième famille de récepteurs pouvant lier l'ACh. En 1914, Sir Henry Dale a d'abord indiqué que deux alcaloïdes, la nicotine et la muscarine, agissaient comme des agonistes et reproduisaient les différents aspects des effets de l'acétylcholine. Il a proposé que ces effets étaient médiés par deux différents types de récepteurs à l'ACh, nicotinique et muscarinique (**Dale, 1914**). Le mAChR est un récepteur métabotropique Ils possèdent 7 domaines transmembranaires formés d'acides aminés hydrophobes (**Figure 17**) et sont couplés aux protéines G qui déclenche des événements de signalisation intracellulaire **(Honda et coll., 2007)**. Chez les mammifères, il a été possible de caractériser cinq sous-types qui diffèrent par leur structure leur pharmacologie et leurs mécanismes de transduction. Ils peuvent être classés en deux groupes sur la base des systèmes effecteurs couplés (**Figure 17, Bockaert et Pin, 1999 ; Eglen et coll., 2001 ; Kristiansen, 2004**). Les sous-types M1, M3, M5 sont associés à $G_q$, tandis que M2 et M4 sont couplés à $G_i$ (**Eglen et coll., 2001**). La liaison avec l'ACh permet l'activation de la protéine G, hydrolysant alors le GTP (guanosine tri phosphate) en GDP (guanosine di phosphate) ce qui active une cascade des réactions impliquent des seconds messagers (**Hannan et Hall, 1993 ; Trimmer, 1995).**

Chez les insectes le profil pharmacologique des mAChRs est quelque peu semblable à celui des récepteurs de type M1, M2 et M3 de mammifères (**Trimmer, 1995 ; Orr et coll., 1991 ; Lapied et coll., 1992).** Chez les insectes en particulier la blatte *P. americana*, les mAChR de sous-type M1 ont été trouvés sur le soma neuronal des DUM neurones du DGA (**Lapied et coll., 1992**). De plus, des récepteurs de type M2-like ont été identifiés au niveau présynaptiques sur des inter-neurones géants du DGA (**Le Corronc et coll., 1991**).

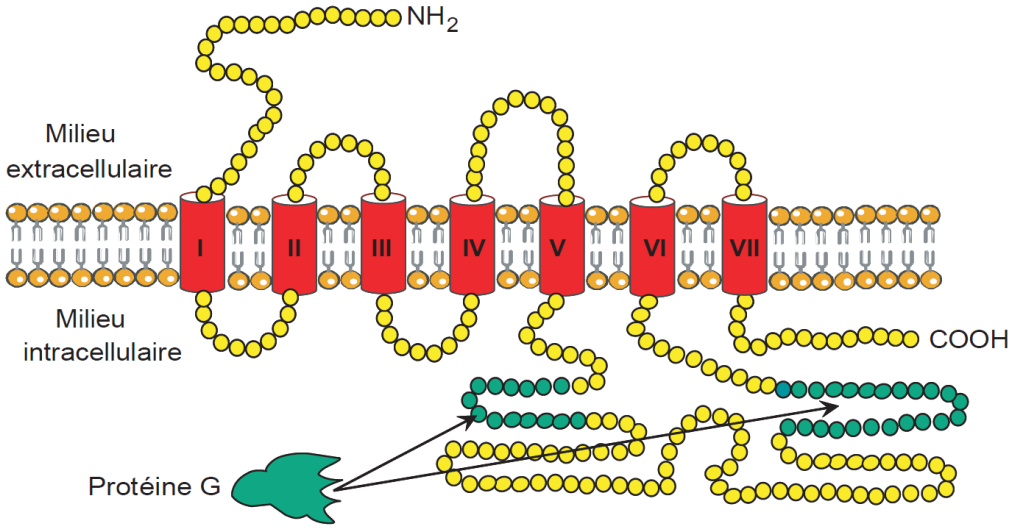



**Figure 17. Structure moléculaire d'un récepteur muscarinique de mammifère, la région proximale de la 3ème boucle cytoplasmique joue un rôle primordial dans le couplage récepteur-protéine G (Modifiée d'après Kuba et coll., 1989; Bockaert et Pin 1999; Eglen et coll., 2001; Kristiansen, 2004).**

La preuve directe que les mAChRs d'insectes jouent un rôle important dans la modulation de la transmission synaptique a été fournie au cours d'études électrophysiologiques réalises au niveau synaptique dans le DGA de la blatte, *Periplaneta americana* (**Hue et coll., 1989; Le Corronc et coll., 1991; Le Corronc et Hue, 1993**). L'activation des mAChRs de type M2 peut déclencher un mécanisme de 'feed-back' négatif entrainent une diminution de la libération d'ACh (**Hue et coll., 1989; Le Corronc et coll., 1991)**. Les mAChRs peuvent mener à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ principalement en stimulant la libération de $Ca^{2+}$ des stocks intracellulaires (**Hinton et coll., 1998**).

## B- Phénomène de résistance aux insecticides

### 1. Définition de la résistance

La résistance a été définie par un comité d'expert OMS en 1957 comme « l'apparition dans une population de la faculté de tolérer des substances toxiques à des doses qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce ». Cette définition, initialement énoncée à propos des arthropodes, s'applique à tous les agents pathogènes, des virus aux mammifères (**WHO, 1992**). Ce phénomène a été décrit chez plus de 500 espèces d'arthropodes, dont 3% d'intérêt vétérinaire.

La résistance est définie aussi par l'IRAC (1984) (Insecticide Resistance Action Committee) 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. 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.

### 2. Historique de la résistance chez l'insecte

Les premiers cas cités entre 1913 et 1916 concernaient la résistance du carpocapse des pommes à l'arséniate de plomb, mais c'est avec l'usage intensif du DDT que les phénomènes de résistance ont pu entraver les campagnes de lutte. Dès 1946, des mouches domestiques, *Musca domestica,* résistantes au DDT sont dépistées en Europe. Le phénomène est également observé chez les moustiques et bientôt des cas de résistance croisée à plusieurs insecticides sont observés chez ces deux espèces. C'est en 1965 que fut signalé pour la première fois un cas de résistance des mouches des étables aux pyréthrines naturelles avec un facteur de résistance important (**Lhoste, 1982**).

Depuis les années 40, les phénomènes de résistances se sont considérablement développés après la seconde guerre mondiale en raison de l'intensification de la lutte chimique et du développement des insecticides organiques de synthèse. Mais après des années de lutte chimique intensive, de nombreux insectes ont développé des mécanismes

de résistance, ces derniers 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 18, Denholm et coll., 2002**). La résistance aux insecticides est un problème mondial dont l'importance sans cesse croissante en fait une composante économique majeure dans la lutte contre les ravageurs des cultures, les insectes vecteurs des maladies, obligeant les industries insecticides à rechercher de nouvelles stratégies de lutte (nouvelles cibles, nouvelles molécules, pesticides biologiques ou l'association d'insecticides aux modes d'action différents à actions synergiques) (**Feyereisen, 1995**). Le premier cas de résistance à un insecticide organique, le DDT, a été décrit chez la mouche domestique en **1947** par **Saccà.** En **1981 Georghiou** recensait 168 espèces d'arthropodes d'intérêt médical ou vétérinaire et 260 espèces intéressant l'agriculture résistantes à au moins un insecticide. Plus de 500 espèces d'insectes et des acariens ont développé une résistance à une ou plusieurs classes d'insecticides (**Plapp, 1984 ; Georghiou, 1990 ; Georghiou et Lagunes-Tejada, 1991 ; Dong, 2007**).

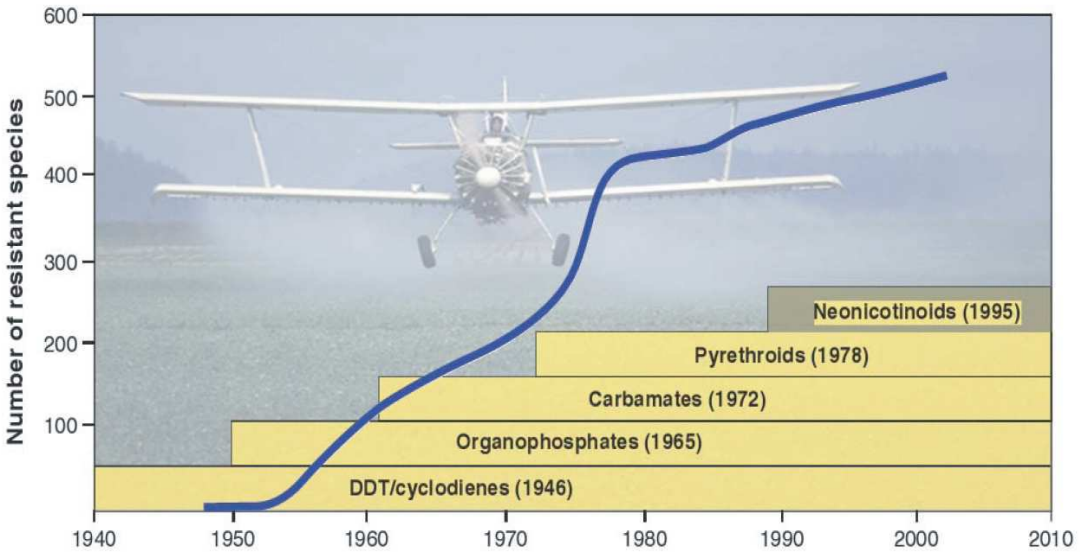



**Figure 18. Augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistants aux insecticides en fonction de l'apparition de nouvelles classes d'insecticides utilisées à grande échelle. (D'après Denholm et coll., 2002).**

## 3. Différents types de résistances développés par l'insecte

Il existe deux principaux types de résistances développés par les insectes : 1) une augmentation du processus de métabolisation par surexpression de certaines enzymes comme les estérases, les monooxygénases et les glutathion S-transférases qui participent à la biotransformation du toxique (**Magnin et coll., 1958 ; Nikou et coll., 2003 ; Pridgeon et coll., 2003 ; Enayati et coll., 2003**), et 2) une altération de la cible principale de l'insecticide (**Figure 19**).

### *3.1. Les résistances métaboliques*

Les résistances métaboliques constituent le mécanisme le plus important développé par les insectes. Il est basé sur le système enzymatique présent chez tous les insectes pour diminuer la toxicité et/ou éliminer les substances. Trois types d'enzymes remplissent cette fonction : les monooxygénases à cytochromes P-450, les estérases et les glutathion-S-transférases (**IRAC, 2006**). L'augmentation de l'expression des gènes codant pour ces trois principaux enzymes, les monooxygénases à cytochrome P-450, transférases glutathion (GST) et carboxy / cholinestérases (CCES), est la cause la plus fréquente de la résistance aux insecticides chez les insectes (**Lapied et coll., 2009**). 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 excrétant mieux les insecticides, les insectes résistants maintiennent la quantité d'insecticides qui peut atteindre sa cible à des doses non-létales (**Figure 19, Lapied et coll., 2009**).

Ces trois types d'enzymes sont impliquées dans l'activation des l'insecticides suivants

- les estérases sont responsables de la métabolisation des organophosphorés, carbamates et des pyréthrinoïdes.
- les glutathion S-transférases sont impliquées dans la détoxification des organochlorés et des organophosphorés.
- les monooxygénases cytochrome P450 sont impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes, aux organophosphorés et dans une moindre mesure aux carbamates.

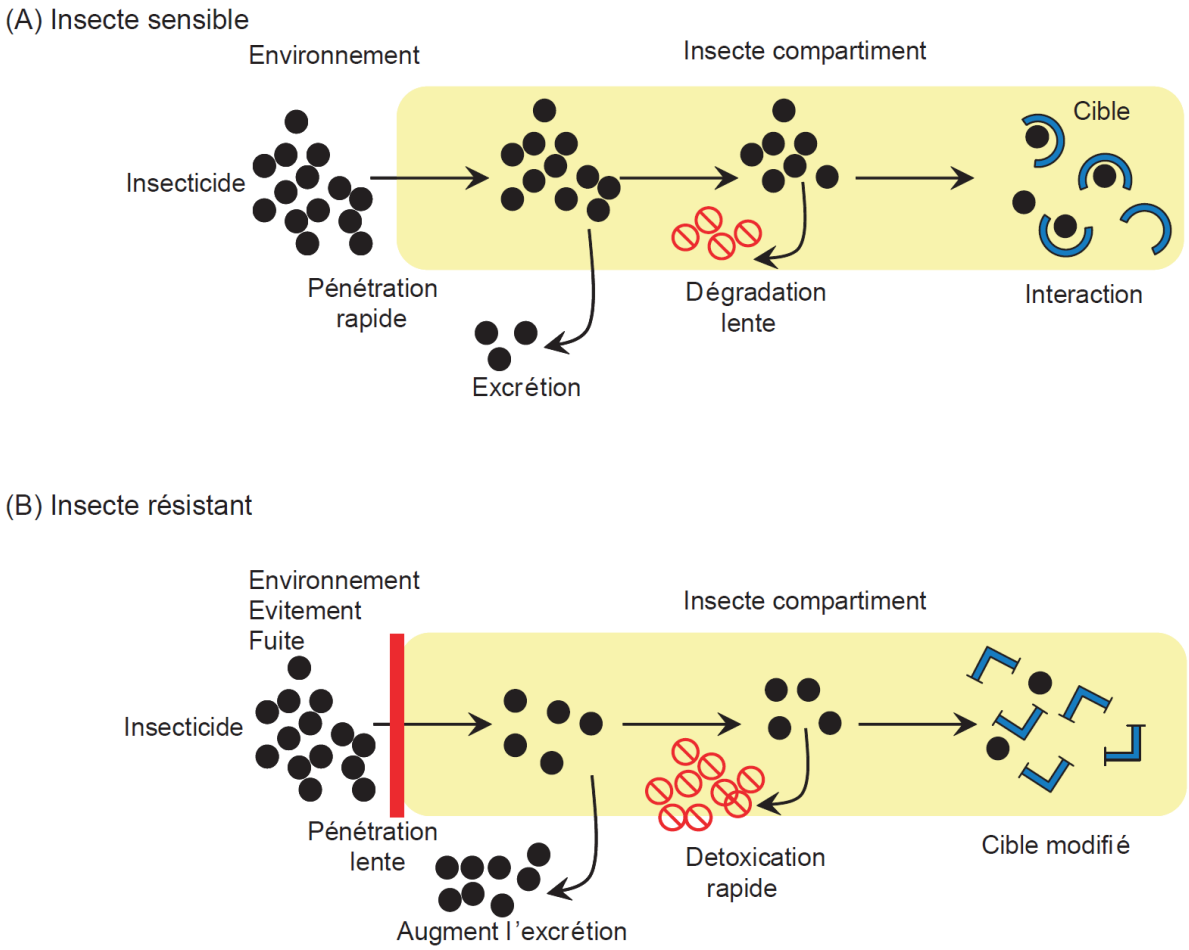



**Figure 19. Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez l'insecte (A) sensible et (B) résistant. (Modifié d'après Lapied et coll., 2009).**

### *3.2. 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. Dans cette partie, nous ne considérions que les cas de résistances rapportés pour l'AChE.

*Acétylcholinestérase modifiée*

L'AChE est la cible des deux insecticides majeurs utilisés en protection des cultures : les carbamates et les OPs (**Weill et coll., 2002**). En plus des résistances métaboliques contre ses insecticides, les insectes ont également développés des résistances en modifiant le site actif de l'AChE (**Magnin et coll., 1985 ; Raymond et coll., 1985 ; Fournier et Mutéro 1994 ; Haubruge et Amichot 1998**). Le clonage moléculaire de l'AChE a été obtenue chez les mouches, les moustiques, les pucerons, les papillons, les scarabées et les blattes (**Hall et Spierer, 1986; Weill et coll., 2002; Gao et coll., 2002; Shang et coll., 2007; Kozaki et coll., 2008; Kim et coll., 2006)**. Il existe, chez la plupart des insectes, deux AChE: AChE1 et AChE2 codées par deux gènes différents, respectivement *ace1* et *ace2*. Il semble qu'AChE1 soit majoritairement responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine (**Hemingway et coll., 2004**).

Des mutations ponctuelles sur la séquence *ace1* permettent aux insectes *Blatella germanica* d'acquérir un fort taux de résistance aux carbamates et aux OPs (**Bourguet *et coll.*, 1996**). Des expériences récentes d'inhibition de l'expression de chacun des gènes *ace1* et *ace2* par des ARN interférents spécifiques confirment le rôle prépondérant de l'AChE1 mais mettent également en évidence une contribution faible mais non négligeable de l'AChE2 à cette fonction (**Revuelta *et coll.*, 2009**). Si la caractérisation fonctionnelle de chacune des enzymes ne fait pas consensus, la localisation et la structure des AChE sont clairement établies : l'AChE1 et l'AChE2 peuvent être libres en position extracellulaire ou liées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (**Bourguet *et coll.*, 1996)**. Le site catalytique de l'ACh est une poche composée d'une triade catalytique (sérine (S), histidine (H) et acide glutamique (E) localisée au fond d'une gorge étroite (**Silman et Sussman, 2008**) **(Figure 20A).** Ce site est la cible de nombreux inhibiteurs dont la conformation est analogue à celle du substrat naturel de l'enzyme. L'inhibition peut être réversible (par les carbamates) ou irréversible (par les OPs) mais peu d'informations sont disponibles au sujet de la régulation de la sensibilité de l'AChE à ses inhibiteurs OPs et carbamates. Chez la drosophile, la résistance à l'OPs provient d'une mutation ponctuelle où une phénylalanine en position 368 est remplacée par la tyrosine. Quant à la résistance élevée aux OPs chez *Drosophila melanogaster*, elle implique plusieurs mutations (**Figure 20B, Menozzi et coll., 2001, 2004**).

Chez les moustiques *C. pipiens* et *C. quinquefasciatus* les deux gènes *ace1 et ace2* codant pour AChE-1 et AChE-2 ont été séquencés. A*ce-1* est associé à une mutation,

G119S (**Figure 20C, D, E, Weill et coll., 2003, 2004**), qui modifie la conformation de la gorge catalytique de l'AChE **(Figure 20A).** Cette enzyme modifiée, n'aurait pas moins d'affinité pour les carbamates mais pourrait les hydrolyser plus rapidement **(Russell et coll., 2004).** Cette mutation a récemment été rapportée chez A*n. gambiae*, et semble être à l'origine de la résistance pour les OPs et les carbamates en Afrique de l'Ouest (**Djogbenou et coll., 2008, 2010; Dabiré et coll., 2009 ; Ahoua Alou et coll., 2010).**

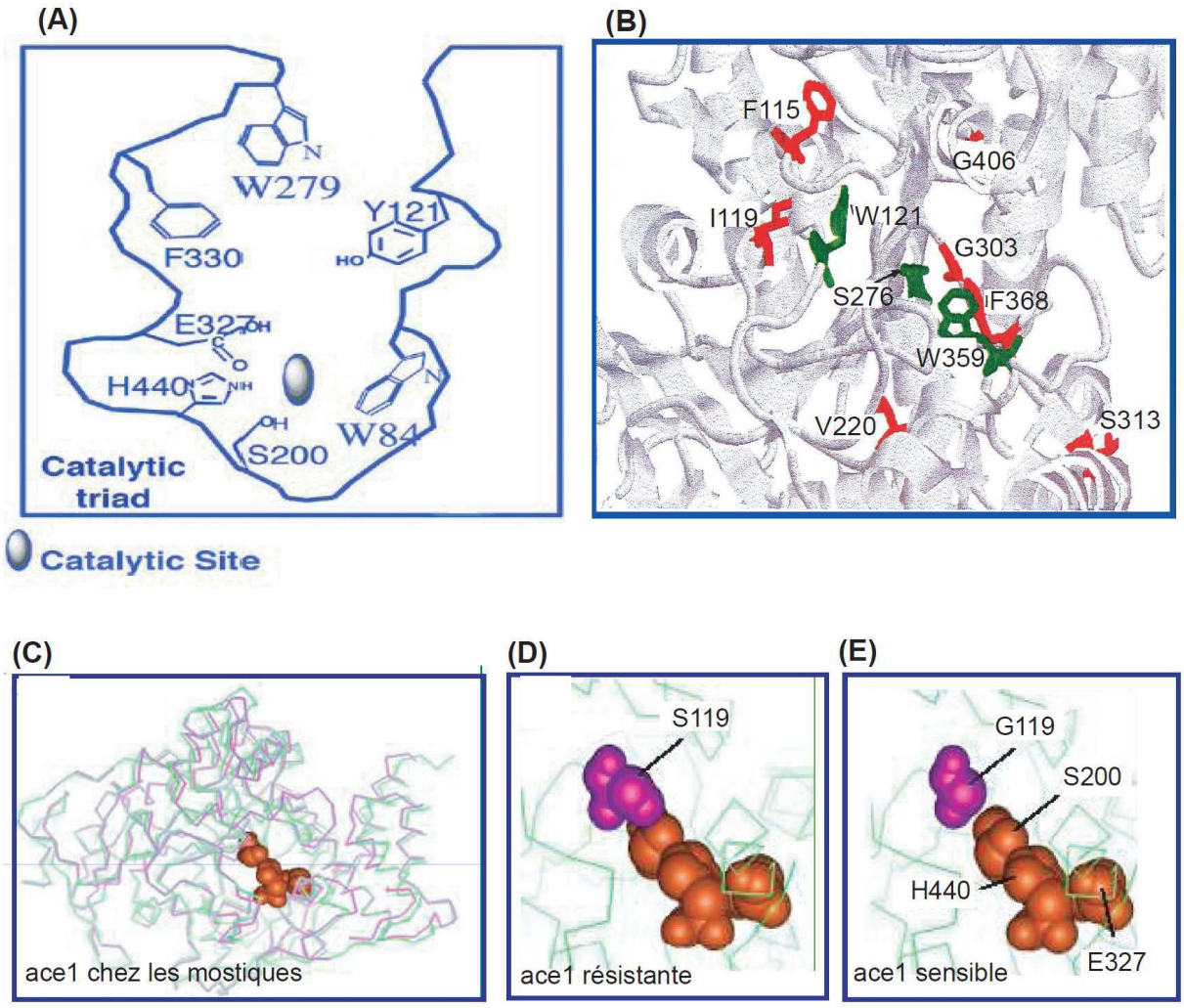



**Figure 20. (A) Représentation schématique d'une coupe transversale du site catalytique de l'AChE (D'après Silman et Sussman, 2008). (B) Modèle 3D de l'AChE avec les 7 mutations (rouge) impliquées dans la résistance aux insecticides. Toutes ces mutations sont proches du site actif (vert) chez les *D. melanogaster* (F115, I199, G303, F368) et les mouches *M. domestica* (V220, G303, F368, G406) (d'après Menozzi et coll., 2001, 2004). (C) Modélisation 3D d'ace1 chez les moustiques. (D) La triade catalytique d'ace1 de la souche résistante d'*A. gambiae* S119. (E) La triade catalytique d'ace1 de la souche sensible d'*A. gambiae* G119 (d'après Weill et coll., 2004).**

Chez les *D. melanogaster* l'ace2 est caractérisée par une sensibilité plus faible aux OPs associée à une résistance équivalente ou moindre aux carbamates **(Hemingway et coll., 2004).** Chez la drosophile ace-1 aù est perdue, ace2 joue un rôle indispensable au niveau des synapses cholinergiques (**Weill et coll., 2004**).

# MATERIELS ET METHODES

## CHAPITRE 1 : MODELE BIOLOGIQUE : LES DORSAL UNPAIRED MEDIAN (DUM) NEURONES DE LA BLATTE *P. AMERICANA*

L'objectif de ce travail de thèse est l'étude du mode d'action neurotoxique d'un répulsif le DEET utilisé seul et en association avec un insecticide de type carbamate, le propoxur, sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et les récepteurs mAChR des DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. Les DUM neurones ont plusieurs fois été choisis comme modèle biologique pour étudier le mode d'action cellulaire de molécules à effet insecticides (**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**). Parce que 1) ces cellules expriment des AChRs (**Lapied et coll., 1990a**) et des AChEs, 2) les corps cellulaires des DUM neurones peuvent être isolés et maintenus en culture à court ou long terme (**Lapied et coll., 1989 ; 1993**), 3) ces cellules isolées conservent à court terme (24 heures) les caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques des neurones *in situ* (**Tribut, 1994**), 4) la technique du patch-clamp est adaptables aux corps cellulaires des DUM neurones isolés (**Grolleau et Lapied, 2000**) et 5) la configuration "cellule entière" de la technique du patch-clamp permet d'appliquer des agents pharmacologiques dans le milieu intracellulaire afin d'étudier les systèmes de transduction indirects.

### Les DUM neurones du SNC de la blatte *P. americana*

Le SNC des insectes, et plus particulièrement de la blatte *P. americana* (**Figure 21 A**), de l'ordre des Blattoptères et de la famille des Blattidae, est constitué d'un cerveau (ganglions cérébroïdes) et d'une chaîne ganglionnaire ventrale segmentaire comprenant des

ganglions sous-oesophagiens, thoraciques (pro-, méso- et métathoraciques) et abdominaux (de A1 à A6 ou Dernier Ganglion Abdominal, DGA), (**Figure 21 B).**

Les ganglions, reliés entre eux par deux connectifs, sont entourés d'une gaine conjonctive qui joue le rôle de soutien et de barrière hémato-encéphalique entre le milieu extérieur et l'environnement des cellules nerveuses (**Burrows, 1996**). Au sein de chaque ganglion de la chaine nerveuse ventral (sauf ganglions cérébroïdes), est présente une petite population de neurones : les DUM neurones (**Hoyle et coll., 1974 ; Stevenson et Spörhase-Eichmann, 1995**). Ils ont été décrit pour la première fois chez le criquet *Locusta migratoria* (**Plotnikova, 1969**), puis chez d'autre insectes et plus particulièrement chez la blatte *P. americana* (**Sinakevitch et coll., 1995, 1996 ; Lapied et coll., 1994 ; Braünig et Pflüger, 2001**). 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 ilots de DUM neurones (**Figure 21C et D, Sinakevitch et coll., 1995**).

Les DUM neurones sont probablement les neurones les mieux caractérisés chez les insectes. De nombreux travaux ont permis de connaître avec précision leurs caractéristiques électrophysiologiques, biochimiques, morphologiques ainsi que leurs rôles physiologiques (**Stevenson et Spörhase-Eichmann, 1995 ; Burrows, 1996 ; Grolleau et Lapied, 2000 ; Bräunig et Pflüger, 2001 ; Wicher et coll., 2001**).

Il existe trois critères permettant de caractériser les DUM neurones

**1. <u>Critères morphologiques des DUM neurones</u>** : les DUM neurones présentent un soma piriforme dont le diamètre est compris entre 30 et 60 µm d'où émerge un neurite primaire (**Braünig et Pflüger, 2001),** (**Figure 22A, B**). Il existe trois grands types de DUM neurones (voir **Braünig et Pflüger, 2001, Figure 21 E,).** Les DUM neurones efférents ont une arborisation neuritique en « T », les neurites secondaires quittent le ganglion par l'intermédiaire des nerfs périphériques spécifiques, les DUM neurones intersegmentaires ont une arborisation neuritique en « H » qui chemine par les connectifs antérieurs et/ou postérieurs reliant deux ganglions entre eux et les DUM interneurones locaux qui possèdent une arborisation neuritique qui se propage uniquement à l'intérieur de la masse intraneuropilaire du ganglion et se distinguent par un plus faible diamètre de leur soma (20-30 µm).

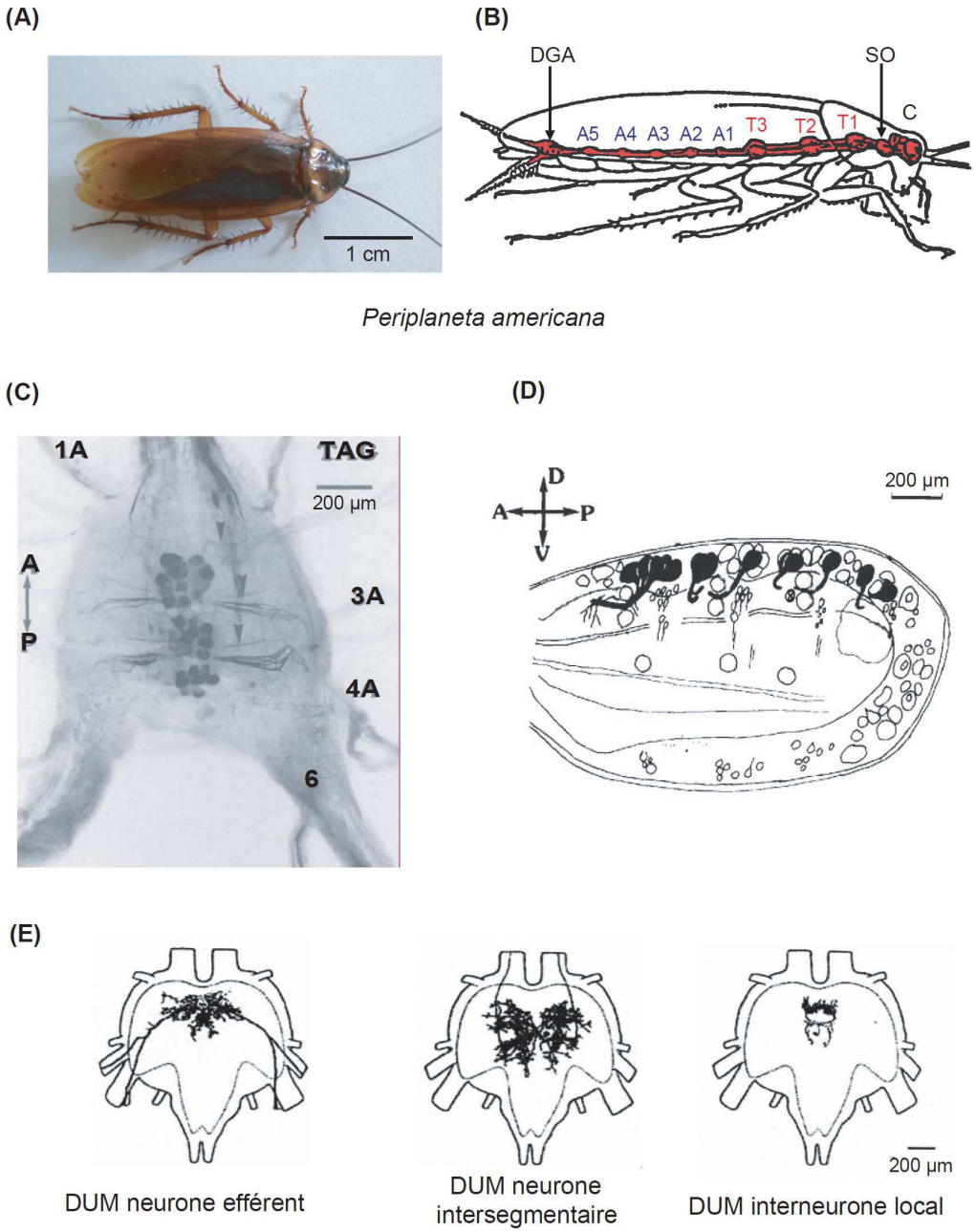



**Figure 21. (A) : Photographie de la blatte mâle adulte *P. americana.* (B) Représentation schématique du système nerveux central (en rouge) de la blatte *P. americana***. C : ganglions cérébroïdes ; SO : ganglions sous-oesophagiens ; T1 à T3 : ganglions thoraciques (Pro-, Meso- et Métathoracique) ; 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 la 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) Représentation schématique d'une coupe sagittale du DGA de la blatte *P. americana*, précisant la localisation des DUM neurones (en noir) identifiés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (D'après Sinakevitch et coll., 1996). (E) Représentation schématique de la morphologie des différents types de DUM neurones chez le criquet (d'après Burrows, 1996).**

**2- <u>Critère biochimique des DUM neurones</u>**: les DUM neurones sont des cellules neurosécrétrices qui synthétisent et libèrent, en particulier, de l'octopamine (OA), une amine biogène caractérisée chez les invertébrés, et analogue de la dopamine chez les vertébrés (**Roeder, 1999**), (**Figure 21C, D et 22B**). L'OA intervient dans un grand nombre de fonctions vitales chez l'insecte et est connue pour être un neurotransmetteur, une neurohormone et un neuromodulateur (**Burrows, 1996 ; Roeder, 1999 ; Braünig et Pflüger, 2001).** La libération d'OA par les DUM neurones efférents va moduler différentes cibles périphériques. Par exemple, les DUM neurones thoraciques modulent les muscles des pattes et des ailes, tandis que les DUM neurones abdominaux innervent les muscles squelettiques impliqués dans le système respiratoire et la reproduction, le cœur et les muscles viscéraux (**Roeder, 1999 ; Sinakevitch et coll., 1995, 1996).** Il a été également révélé que d'autres molécules neuroactives peuvent être synthétisée par les DUM neurones telles que la sérotonine, le GABA, la taurine, les peptides de type FMRF-amides (**Bicker et coll., 1988 ; Sinakevitch et coll., 1996 ; Braünig et Pflüger, 2001 ; Predel et coll., 2004).**

**3- <u>Critère électrophysiologique des DUM neurones</u> :** le troisième critère essentielle des DUM neurones, est leur capacité à générer spontanément et à fréquence régulière des potentiels d'action d'une amplitude, comprise entre 90 et 110 mV, et d'une durée environ de 2 ms (mesurée à 50 % de l'amplitude totale), désignée par le terme « activité pacemaker » (**Lapied et coll., 1989**). Cette genèse spontanée de potentiels d'action est déclenchée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel et modulée par des canaux ioniques responsables de courants dit de repos (**Figure 22C, Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et coll., 2001; Defaix et Lapied, 2005 ; Lavialle-Defaix et coll., 2006).** L'utilisation de la technique du patch-clamp en condition de potentiel et de courant imposés a permis d'étudier l'activité électrique spontanée et les courants ioniques impliqués dans les différentes phases des potentiels d'action (**Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher et coll., 2001 ; Dugravot et coll., 2003 ; Defaix et Lapied, 2005; Lavialle-Defaix et coll., 2006).** Ils sont présentés dans le **tableau 1**.

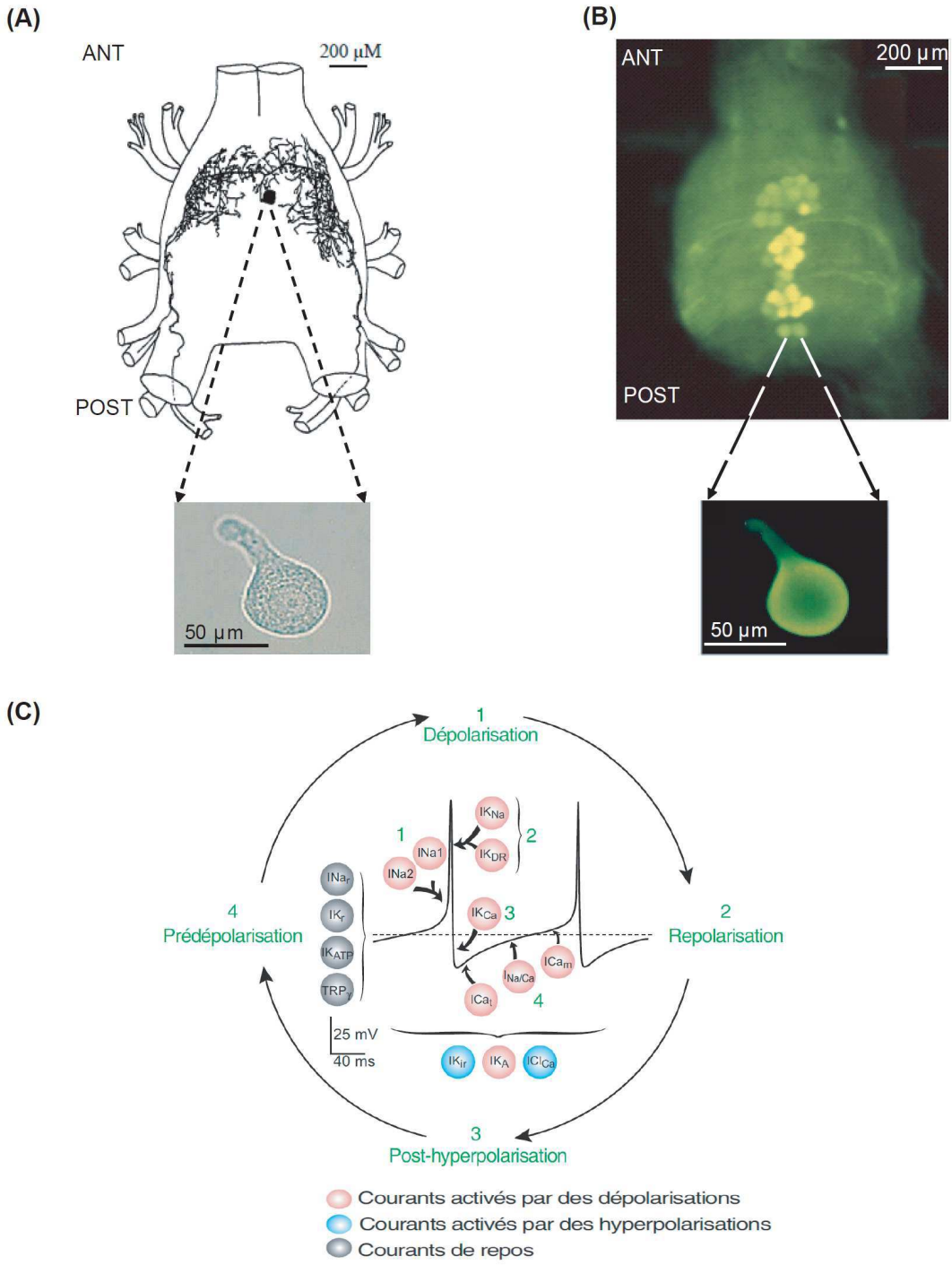



**Figure 22. (A) Morphologie d'un DUM neurone efférent de l'îlot antérieur du DGA de la blatte *P. americana*. L'arborisation neuritique ainsi que le corps cellulaire sont révélés par un marquage antérograde au chlorure de cobalt (Modifié d'après Sinakevitch et coll., 1996). Agrandissement : photographie 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; Dugravot et coll., 2003 ; Defaix et Lapied, 2005; Lavialle-Defaix et coll., 2006).**

**Tableau 1. Récapitulation des différents types de courants ioniques membranaires responsables de l'activité électrique spontanée des DUM neurones du DGA de la blatte *P. americana*. (* résultats obtenus sur le ganglion A5) (Modifié d'après Grolleau et Lapied, 2000).**

| | Type de courant ionique | Seuil d'activation | Agents pharmacologique | Rôle physiologique | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| COURANTS SODIQUES | Courant sodium transitoire (INa 1) | -30 mV | TTX ($CI_{50}$=2.10$^{-9}$M), Saxitoxine, Vératridine *, Toxines de scorpions (LqqIII, Bot$IT_2$, toxine VII) ω-conotoxine MVIIC *, ω-agatoxine IVA* Glutamate (INa1) | Dépolarisation du potentiel d'action | Lapied et coll., (1990b) Wicher et Penzlin, (1998)* Lavialle-Defaix et Coll., (2006) |
| | Courant sodium transitoire (INa 2) | -40 mV | | | |
| | Courant sodium de repos (INar) | Potentiel de membrane | TTX, LqhαIT, 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 ($CI_{50}$=10$^{-7}$M) | Phase de prédépolarisation Régulation de la dréquence décharge de potentiels d'action | Defaix et Lapied, (2005) |
| COURANTS CALCIQUES | 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 lapied (1996) |
| | Courant calcium transitoire à bas seuil d'activation (ICat) | -70 mV | Cadmium 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) | -50 mV | Cadmium Chlorure de nickel (>100 μM) | Phase terminale de la prédépolarisation | Grolleau et Lapied, (1996) |
| | Courant calcium à moyen seuil d'activation (M-LVA) | -50 mV | Cadmium, nickel, ω-conotoxine MVIIC, ω-agatoxine IVA | Fréquence de décharge de potentiels d'action | Wicher et Penzlin, (1997) |
| | Courant calcium de repos (TRPγ) | Potentiel de membrane | Cadmium (100 μM), NPPB, LOE 908 | Homéostasie calcique (contrôle la fréquence des potentiels d'action) Maintien du potentiel de membrane | Heine et Wicher, (1998)* Wicher et coll., (2004) Wicher et coll., (2006) |

**Tableau 1. Cont.**

| | Type de courant ionique | Seuil d'activation | Agents pharmacologique | Rôle physiologique | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| **COURANTS POTASSIQUES** | Courant potassium sensible au sodium intracellulaire ($IK_{Na}$) | -35 mV | TEA, 4-AP,<br>Césium intracellulaire | Initie la phase de repolarisation,<br>Limite la durée des potentiels d'action | Grolleau et Lapied, (1994) |
| | Courant potassium sensible au calcium intracellulaire ($IK_{Ca}$) (composante biphasique) | -40 mV | TEA,<br>Ibériotoxine, Charybotoxine,<br>Contryphan-Vn, BmBKtoxine1<br>Cadmium | Phase de repolarisation et post-hyperpolarisation | Grolleau et Lapied, (1995)<br>Wicher et coll., (1994)<br>Massilia et coll., (2003)<br>Derst et coll., (2003)<br>Xu et coll., (2004) |
| | Courant potassium transitoire de type A ($IK_A$) | -65 mV | 4-AP | Maintien une fréquence basse<br>de décharge des potentiels d'action | Grolleau et Lapied, (1995) |
| | Courant potassium à rectification sortante retardée ($IK_{DR}$) | -50 mV | TEA (>30 μM),<br>Césium intracellulaire | Phase de repolarisation du potentiel d'action | Grolleau et Lapied, (1995)<br>Wicher et coll., (2001) |
| | Courant potassium de repos ($IK_{ATP}$) | Potentiel de membrane | DMDS<br>glibenclamide, tolbutamide | Maintien du potentiel de membrane | Dugravot et coll., (2003) |
| | Courants activés pour des hyperpolarisations : ($IK_{IR}$) | -80 mV | TEA,<br>Baryum et Césium extracellulaire | Limiter l'hyperpolarisation excessive | Raymond et Lapied, (1999) |
| **COURANT CHLORE** | Courant chlore dependant du calcium intracellulaire ($ICl_{Ca}$) | -60 mV | SITS, DIDS, Zinc | | |

# CHAPITRE 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES

## A. Technique de dissociation des DUM neurones

### 1. Présentation du 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℃ avec une photopériode alternant 12h de lumière artificielle et 12h d'obscurité. Seuls les adultes mâle 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.

### 2. Protocole de dissociation cellulaire

L'isolement des corps cellulaires des DUM neurones du DGA, dont le protocole est illustré sur la **Figure 23**, 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 traités à l'alcool (70%). Les instruments de dissections sont nettoyés à l'alcool. Les différents liquides physiologiques (LP) utilisés (voir leurs compositions dans le **Tableau 2**) sont filtrés préalablement à l'aide de filtres stériles (Analypore, diamètre des pores 0,22 µm).

### 2.1. Prélèvement des derniers ganglions abdominaux de la chaîne nerveuse de la blatte

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), la cuticule recouvrant l'abdomen et les viscères sont découpés à l'aide de microciseaux. La chaîne nerveuse est recouverte de LP1 (**Tableau 2**) 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 23 et Tableau 2**). Un nettoyage plus minutieux du ganglion est effectué à l'aide d'aiguilles pour éliminer les ramifications nerveuses et les trachées résiduelles. A chaque dissociation, six ganglions sont prélevés de cette façon.

### 2.2. 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 2**). La digestion enzymatique est effectuée dans une étuve maintenue à une température de 29℃ en atmosphère humide pendant 35 minutes. Les ganglions sont ensuite rincés dans deux bains successifs de LP1 (5 minutes chacun) pour arrêter l'activité enzymatique (**Figure 23**).

### 2.3. Dissociation mécanique

Les ganglions sont transférés dans un tube à hémolyse contenant du LP3 (**Tableau 2**) 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 23**). 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 Chimie) (**Figure 23**) pour permettre l'adhérence des neurones sur le fond de la boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées 24h dans l'étuve à 29℃ en atmosphère humide, avant de procéder aux différentes expériences.

**Tableau 2. Compositions des liquides physiologiques (LP) utilisés pour la technique de dissociation cellulaire.**

| Composés | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 |
|---|---|---|---|---|
| **NaCl (mM)** | 200 | 200 | 200 | 200 |
| **KCl (mM)** | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| **$CaCl_2$ (Mm)** | 5 | 5 | 5 | 5 |
| **$MgCl_2$** | 4 | 4 | 4 | 4 |
| **HEPES** | 10 | 10 | 10 | 10 |
| **Saccharose (mM)** | 50 | 50 | 50 | 50 |
| **Pénicilline (UI/mL)**<br>**Streptomycine (µg/mL)** | 100<br>100 | - | 50<br>50 | |
| **Collagénase (UI/mL) (Worthington Biochemical corporation, GB)** | | 300 | - | |
| **Sérum de veau fœtal (SVF) (%), (Gibco BRL)** | | - | 5 | |
| **pH (ajusté avec NaOH 1 N)** | 7.4 | 7.4 | 7.4 | 7.4 |

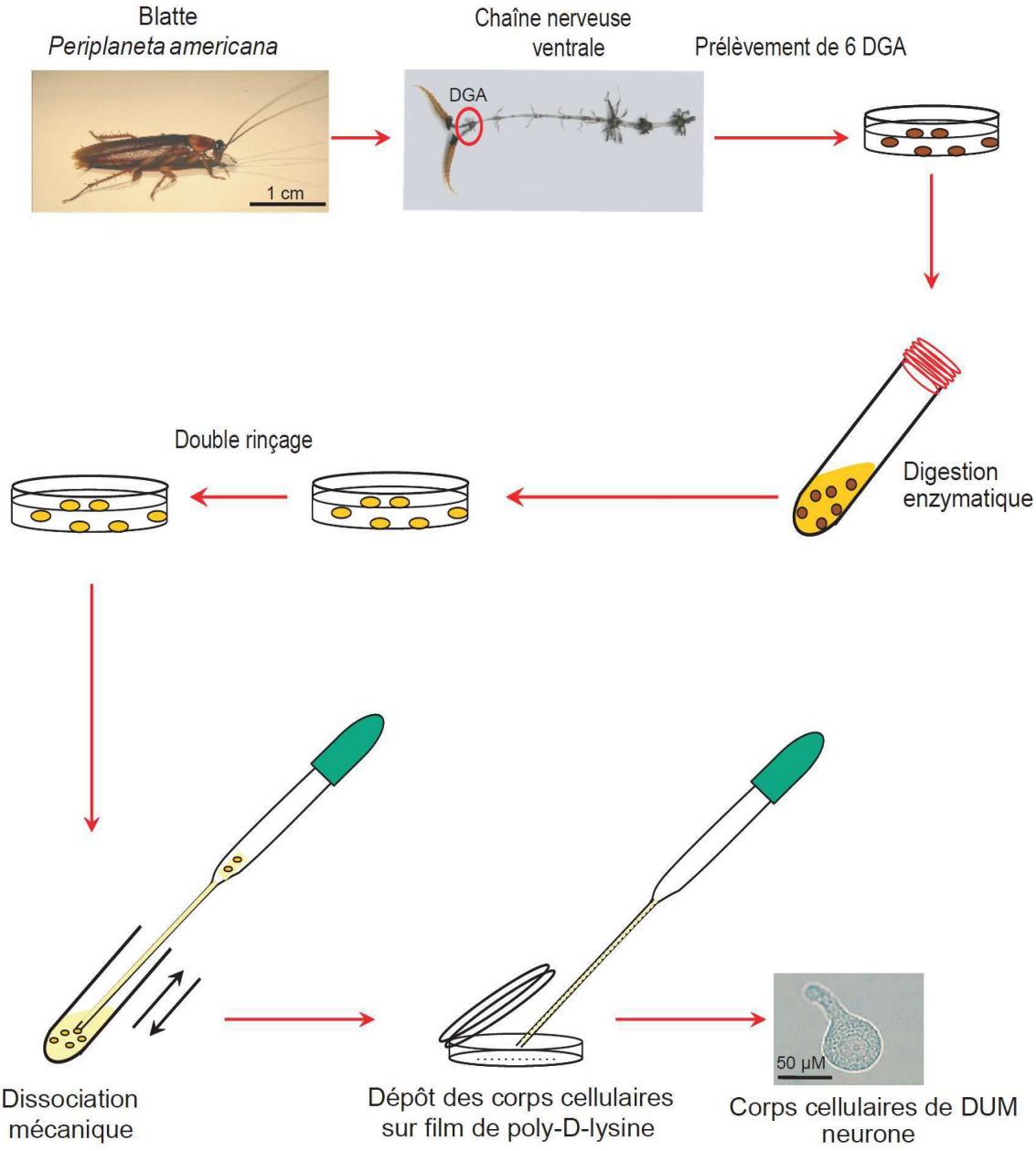



**Figure 23. Principales étapes de la technique de dissociation cellulaire pour obtenir les corps cellulaires de DUM neurones du DGA de la blatte *P. americana*. DGA : Dernier ganglion abdominal (Modifié d'après Lapied et coll., 1989).**

## B. Technique électrophysiologique du patch-clamp

### 1. Principe de la technique du patch-clamp

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**. Cette technique permet d'isoler électriquement une faible portion de membrane pour l'étude de l'activité des canaux ioniques à l'échelle unitaire ou de la cellule entière.

La pipette de patch-clamp (une pipette de verre présentant un diamètre de pointe d'environ 1µm) 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 24A**). Une aspiration supplémentaire à travers la pipette de patch 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 24 A**). 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 :

$$\mathbf{I = N \times Po_{(t,V)} \times i} \qquad (1)$$

Où **I** est le courant macroscopique ; **N**, le nombre de canaux ; **Po**, 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.

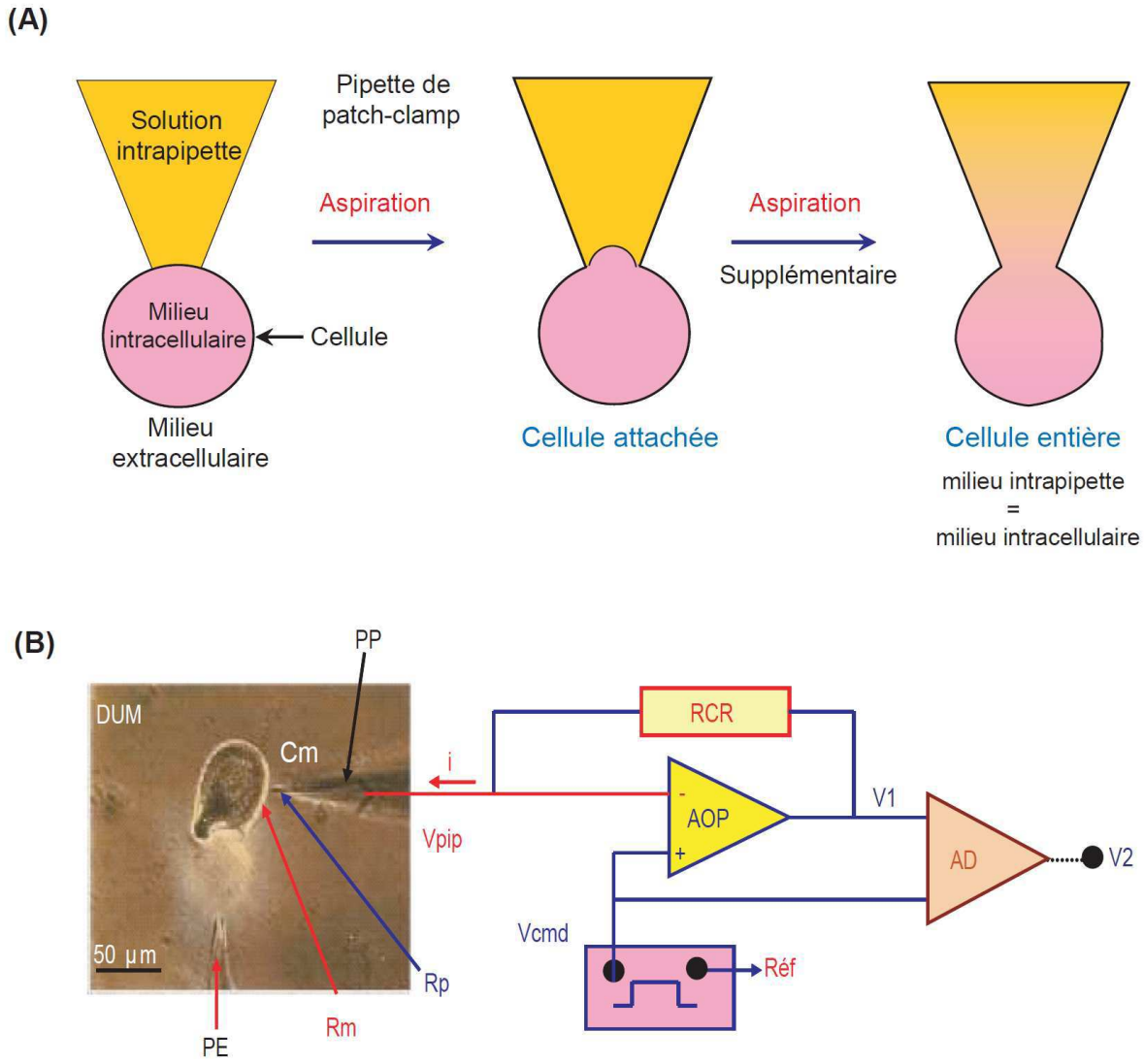



**Figure 24. (A) Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière ». (B) Schéma simplifié du principe de la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ».** AOP : amplificateur opérationnel ; AD : amplificateur différentiel ; Cm : capacité de la membrane ; Rp : résistance de la pipette ; RCR : résistance de contre-réaction ; Réf : 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. PP : pipette de patch-clamp ; PE : Pipette d'éjection ; DUM : Dorsal unpaired median neurone

## 2. Dispositif expérimental, 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 placé 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 (SUTTER INSRUMENT, USA). Une fois remplie de la solution intrapipette (**Tableau 3**) préalablement filtrée (filtre Analypore, diamètre des pores 0,22 µm), leur résistance est comprise entre 1,8 à 2 MΩ (pour l'enregistrement des courant induit par l'ACh et la muscarine) et 1,8 et 2 MΩ pour la pipette de l'éjection. Le potentiel de jonction entre les solutions extracellulaire et intrapipette est toujours compensé avant la formation du scellement.

L'électrode de patch est alors connectée à un amplificateur de type Axopatch 200A (Axon Instrument, Foster City, CA) (**Figure 25**). 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 (Vcmd) (**Figure 24B**). 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 (Vcmd) (**Figure 24B**).

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 :

$$\mathbf{V_2 = Vcmd - V_1 = RCR \times I} \qquad \mathbf{(2)}$$

Un stimulateur programmable (SMP 300 Biologic, Claix, France) permet d'appliquer des stimulations électriques à la préparation (**Figure 25**). Les réponses physiologiques son visualisées sur un oscilloscope numérique (Nicolet 3091, Nicolet Instrument Corporatio Madison, USA) et l'enregistrement des signaux sont effectué par un ordinateur PC (Elonex Pentium 733 MHz, Angers, France) connecté à une interface de type labmaster. Le logiciel pClamp (version 6.0.2, Axon Instruments) permet d'enregistrer et de mesurer l'amplitude des courants ioniques.

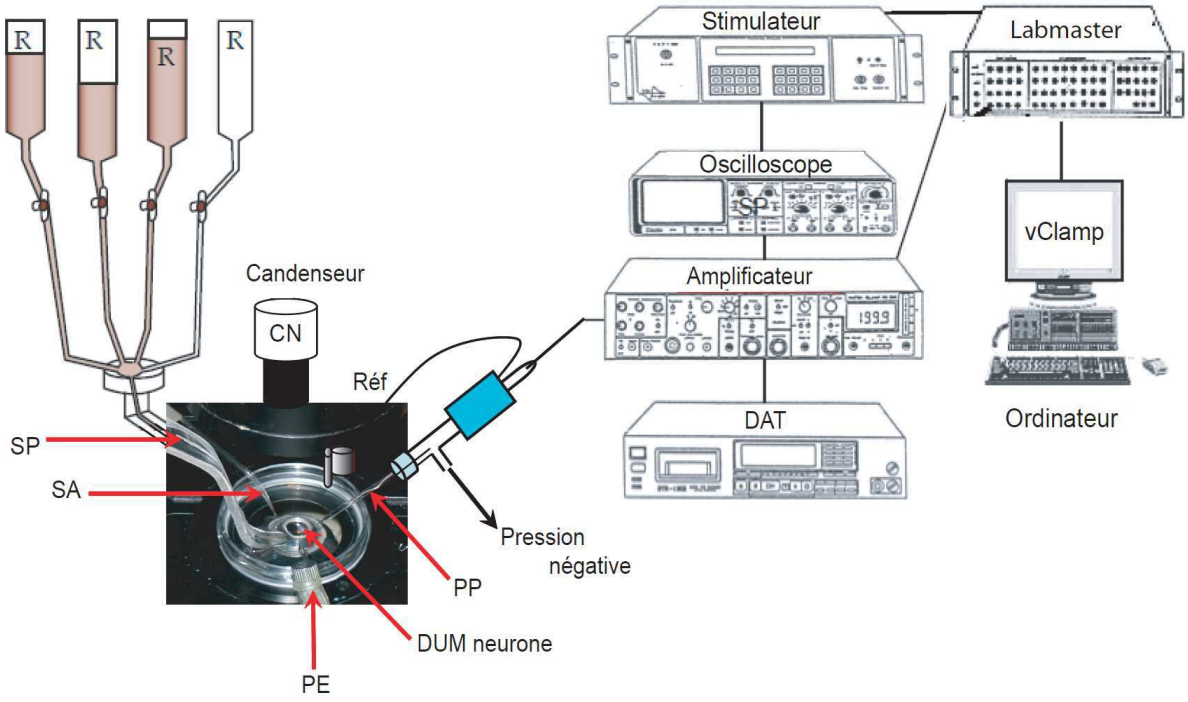



**Figure 25. Représentation schématique de l'installation de patch-clamp. A gauche, les quatre réservoirs (R) sont connectés par un seul cathéter placé sur le système de superfusion (SP). Un système d'aspiration (SA) maintient un niveau constant de liquide dans la boite de culture. La pipette de patch-clamp est fixée sur le porte-pipette (PP). L'amplificateur mesure les différences de potentiel entre la pipette et l'électrode de référence (Réf). 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 labmaster TL125.**

### 3. Composition et application des solutions

Les solutions extracellulaires et intrapipettes utilisées ont été définies de façon à pouvoir étudier les courants ioniques induits par l'application d'agonistes ACh et muscarine. La composition des solutions utilisées est résumée dans le **Tableau 3**. 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. Le système gravimétrique est fixé et dirigé par un micromanipulateur (Narishige, Japon) qui permet de positionner la perfusion à environ 100 µm du corps

cellulaire. Un système d'aspiration assure le renouvellement régulier du milieu et maintient un volume constant dans la boîte de culture (**Figure 25**).

Les agonistes des récepteurs cholinergiques (ACh et muscarine) sont appliqués par éjection pneumatique (Di Angelantonio et Nistri, 2001). Pour cela, la pipette de patch qui a une résistance de 1.8 à 2 MΩ une fois remplie de la solution d'agoniste est positionnée à 50 µm du corps cellulaire. La pipette est connectée à un système d'éjection pneumatique utilisant l'azote (Miniframe PPS2, Medical System Corporation, New York, USA). Ce système permet de contrôler à la fois la pression et la durée d'éjection (15 psi= 1,02 Kg.cm-1) . La technique d'éjection pneumatique présente plusieurs avantages (Di Angelantonio et Nistri, 2001). Elle permet des applications brèves de la solution à tester (à partir de 1 ms) ce qui limite la désensibilisation du récepteur. De plus, il existe une relation directe entre la pression ou la durée d'éjection et la quantité de substance éjectée sur le corps cellulaire. La dose d'agoniste appliquée peut donc être exprimée en terme de durée d'application (**McCaman et coll., 1977; Lapied et coll., 1990a; Di Angelantonio et Nistri, 2001**).

**Tableau 3. Composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées lors des expériences de patch-clamp.**

| **Composition solution intrapipette** | |
|---|---|
| **Composés** | **mM** |
| **$K^+$ /D-gluconic acid** | 160 |
| **K+ Fluoride** | 10 |
| **NaCl** | 10 |
| **$MgCl_2$** | 1 |
| **$CaCl_2$** | 0.5 |
| **HEPES** | 20 |
| **EGTA** | 10 |
| **ATP-Mg** | 3 |
| **AMPc** | 0.1 |
| **Ph** | 7.4 (ajusté avec KOH 1N) |

| **Composition solution extracellulaire** | |
|---|---|
| **Composés** | **mM** |
| **NaCl** | 200 |
| **KCl** | 3.1 |
| **$CaCl_2$** | 5 |
| **$MgCl_2$** | 4 |
| **HEPES** | 10 |
| **pH** | 7.4 (ajusté avec NaOH 1N) |

## C. Technique biochimique du dosage de l'activité de l'AChE des DUM neurones de la blatte *P. americana*

### 1. Culture des DUM neurones

Le prélèvement des DUM neurones réalisé par dissociation des derniers ganglions abdominaux (DGA) (**Lapied et coll., 1989**) s'effectue dans des conditions stériles, (**Figure 26**), comme précédemment décrit (voir partie A)

### 2. Test biochimique : dosage de l'activité de l'AChE du DUM neurone

L'activité de l'AChE résiduelle est mesurée par dosage colorimétrique selon le protocole d'**Ellman et coll., (1961).**

#### *2.1. Principe du dosage*

L'AChE catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Elle est spécifique des esters de l'acide acétique et si, physiologiquement, son substrat est l'acétylcholine, elle catalyse l'acétylthiocholine (ATCh). Dans ce cas, les produits de la réaction d'hydrolyse sont l'acide acétique et la thiocholine. La méthode spectrophotométrique d'Ellman (1961) utilise cette propriété de l'AChE en faisant interagir les groupements thiols ainsi rendus disponibles dans le milieu avec le DTNB pour donner du TNB (coloré en jaune).

La spectrophotométrie est une technique d'analyse qui repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques colorées et indispensable au respect de la loi Beer Lambert. Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche, la couleur perçue résultant de la superposition des teintes des radiations non absorbées. Un spectrophotomètre mesure l'absorbance **λ** (grandeur sans unité) d'une solution diluée colorée contenue dans une cuve.

Pour une radiation incidente monochromatique de longueur d'onde **λ** et d'intensité $I_0$, l'absorbance est définie par la loi de Beer Lambert: $\lambda = \log (I_0 / I)$, avec $I$ intensité lumineuse à la sortie de la cuve.

Dans notre cas, nous avons utilisé l'acetylthiocholine comme substrat qui grâce à l'AChE va libérer de la thiocoline. Ce composé, en présence de DTNB, permettra l'obtention d'une coloration jaune dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre.

Acetylthiocholine + Enzyme (AChE) ⟶ Thiocholine + Acétate (1)
Thiocholine + DTNB ⟶ Coloration jaune (2)

Si l'enzyme est active, les produits de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine réagissent avec le DTNB pour donner une substance qui présente un pic d'absorption pour vue longueur d'onde de 405 nm à 30°C. On peut donc suiv re le déroulement de la réaction par spectrophotométrie (**Figure 26**).

### *2.2. Composition des solutions*

Cette technique permet également de mettre en évidence l'inhibition, dose dépendante, de l'activité AChE par le propoxur, un carbamate inhibiteur spécifique de l'enzyme. 80 µL d'une dissociation cellulaire (dissociation de 6 DGA/mL dilution $^1/_2$) sont déposées dans un puits d'une microplaque (96 puits). Nous avons utilisé 3 puits pour le contrôle et 3 puits pour chaque concentration de l'insecticide. Les cellules sont incubées 15 minutes en présence de concentration croissantes du propoxur (10 µL) (10nM, 30 nM, 100 nM, 1µM à chaque concentration final) et un témoin d'activité initiale sans propoxur est réalisé. Ensuite, nous avons complété tous les puits jusqu'au 100µL par LP+ sucrose. Ensuite, 100 µL du substrat de l'acétylthiocholine (ATCh 1 mM, Sigma Chimie), est ajouté au milieu et est rapidement dégradé en thiocoline et acétate (**Figure 26**). Puis 100µL de réactif DTNB (1mM, Sigma Chimie) est ajouté. Il réagit avec la thiocoline et entraine une coloration jaune du milieu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité de l'AChE. La mesure de la densité optique (DO) (405nm) après 30 minutes d'incubation permet d'établir une courbe de l'activité AChE résiduelle (en %) en fonction de la concentration de propoxur.

Les puits sans propoxur (DUM neurones, ATCh et DTNB) sont utilisés pour calculer l'hydrolyse spontanée du substrat et les valeurs sont soustraites de la mesure de l'activité de l'enzyme. Les conditions de stockage des réactifs sont les suivantes :

- L'ATCh est préparée dans de l'eau distillée et conservé à 4 ℃, et la solution mère (10 mM)
- Le réactif DTNB est préparé dans du PBS 1X 0.1 M phosphate de sodium pH 7.4 et la solution mère (10 mM) peut être conservée quelques jours à 4C°.

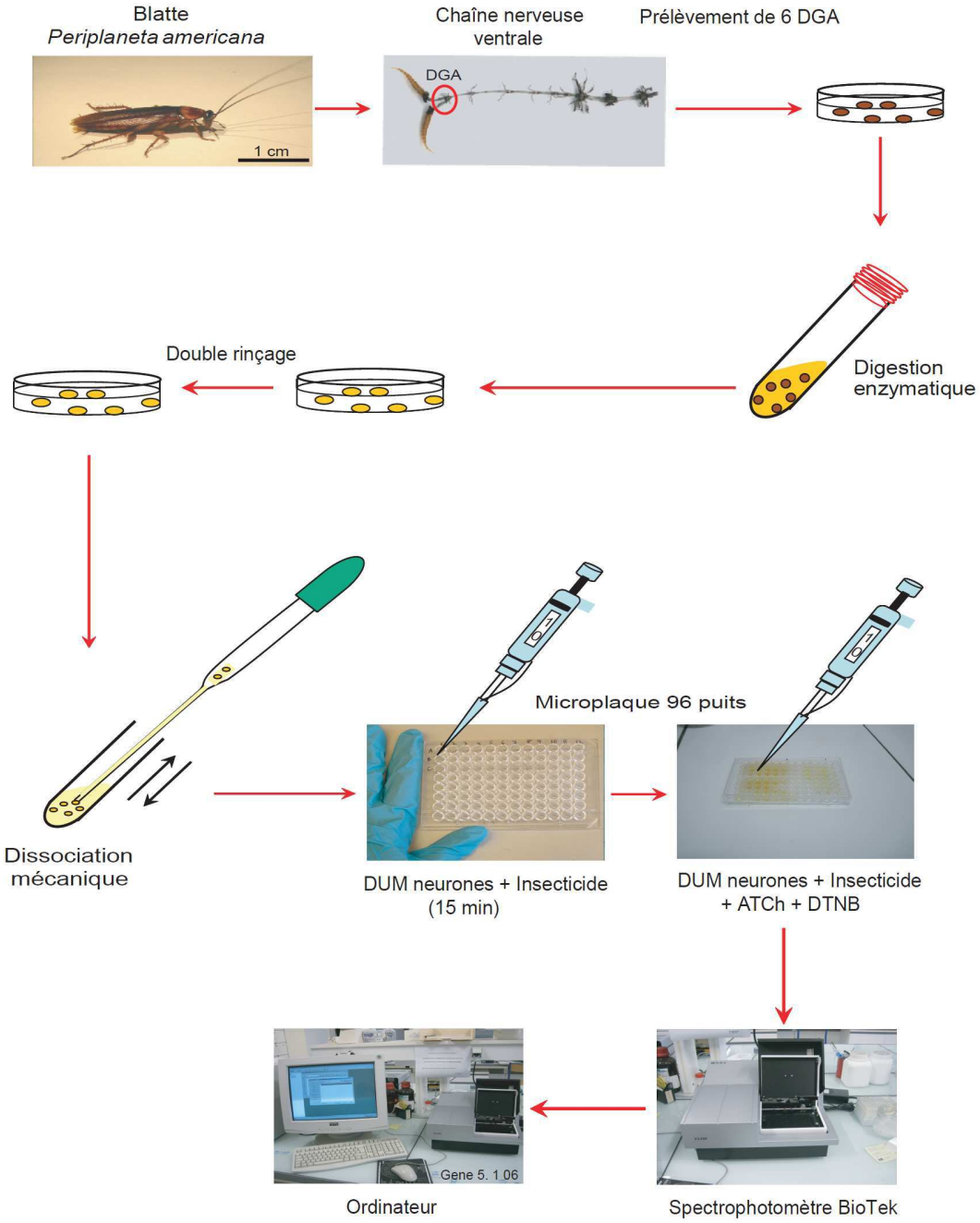



**Figure 26. Technique de dissociation cellulaire de DUM neurone et technique biochimique colorimétrique pour mesurer l'activité de l'AChE.**

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

## CHAPITRE 1 : ETUDE DU MODE D'ACTION DU DEET ET D'UN CARBAMATE LE PROPOXUR SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DU DUM NEURONE DE LA BLATTE *P. AMERICANA*

### A. Position du problème

L'AChE est une serine hydrolase essentielle pour réguler l'effet du neurotransmetteur excitateur l'acétylcholine dans le système nerveux central des mammifères et des insectes (**Massoulié, 2002**). Cette enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) impliqué 1) dans la transmission synaptique et 2) l'intégration de l'information nerveuse au niveau extra-synaptique, est une cible privilégiée des insecticides neurotoxiques appartenant aux familles des OPs et des carbamates. L'inhibition de l'AChE par ces insecticides entraine une accumulation de l'ACh dans l'espace synaptique qui a pour conséquence d'induire une hyperexcitabilité de l'insecte suivie de sa mort.

Dans le cas des DUM neurones du DGA de la blatte *P. americana*, l'ACh ainsi que plusieurs agonistes des récepteurs cholinergiques sont connus pour déclencher des réponses électrophysiologiques. Ces agonistes sont principalement la nicotine et l'arécoline (**Lapied et coll., 1990 ; Tribut et coll., 1994 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany et coll., 2008**). La première partie de cette étude a été de mettre en évidence la présence de l'AChE au niveau de la membrane des DUM neurones à l'aide de la technique du « patch-clamp » en configuration « cellule entière ». La réponse de l'ACh (appliqué par éjection pneumatique) sur la membrane de DUM neurone induit un courant ionique entrant en présence de l'α-BGT. Les courants ioniques observés résultent de l'activation des récepteurs cholinergiques de

type nicotinique (nAChRs) précédemment caractérisés sur cette préparation (**Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et coll., 2003 ; Thany et coll., 2008**). La durée et l'amplitude du courant ionique induit par l'ACh dépend de l'activité de l'AChE. L'effet anti-AChE se traduit donc par une augmentation de la durée et de l'amplitude de la réponse car l'AChE une fois bloquée n'hydrolyse plus l'ACh.

Dans toute notre étude, le paramètre utilisé pour évaluer l'effet anti-AChE correspondant à la durée de la réponse. En effet, en présence d'un inhibiteur de l'AChE une augmentation de la durée de la réponse induite par l'ACh traduit le fait que l'ACh non hydrolysée agit plus longtemps sur le récepteur. Dans certains cas cet effet sera comparé à celui observé sur l'amplitude du courant.

## B. Caractérisation de l'AChE au niveau de la membrane des DUM neurones

### 1. Effets des inhibiteurs de l'AChE sur les DUM neurones

Nous avons utilisés dans un premier temps l'ésérine et le BW284c51 connu par être des inhibiteurs de référence de l'AChE. L'application de l'ésérine (100 nM) et du BW284c51 (100 nM) sur le corps cellulaire induit une augmentation de la durée et de l'amplitude du courant induit par l'ACh (**Tableau 4, Figure 27 A, B, C**). Ces données confirment la présence de l'AChE active dans la membrane des DUM neurones isolés (**Lapied, 1991**). Dans un second temps, cet effet a été comparé à celui provoqué par un carbamate, le propoxur (100 nM) bien connu pour être un inhibiteur de l'AChE (**Pennetier et coll., 2005, 2006 ; Corbel et coll., 2006**). Dans ce cas également, nous avons pu noter une augmentation de la durée et de l'amplitude du courant induit par l'ACh (**Tableau 4, Figure 27 A, B**).

**Tableau 4. Effets des inhibiteurs de l'AChE sur l'amplitude et la durée mesurée à 50 % de l'amplitude du courant induit par l'ACh des DUM neurones de la blatte *P. americana*.**

| Inhibiteurs de l'AChE | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **Esérine (100 nM)** | 145.74 ± 13.49 % ** (n = 6) | 136.95 ± 15.11 % ** (n = 6) |
| **BW284c51 (100 nM)** | 151.94 ± 7.73 % ** (n = 5) | 129.43 ± 4.66 % ** (n = 5) |
| **Propoxur (100 nM)** | 166.80 ± 13.92 % ** (n = 10) | 143.28 ± 6.52 % ** (n = 10) |

(** :p< 0.01, différence significative par rapport au contrôle)

## 2. Effets intracellulaire et extracellulaire du propoxur sur l'activité de l'AChE des DUM neurones

A partir des résultats obtenus ci-dessus, une question reste posée. L'effet du propoxur observé résulte-t-il d'un effet extracellulaire ou intracellulaire ? Nous avons donc étudié l'effet du propoxur (100 nM) additionné à la solution intracellulaire nous n'avons pas observé un effet significatif du propoxur comparé au contrôle (116.27±13.11%, n=8, p>0.05). Par contre, l'application extracellulaire du propoxur produit un effet significatif (166.80 ± 13.92, n= 10, p < 0.01) sur la durée du courant induit par l'ACh (**Figure 28A, B**). Ces résultats mettent en évidence la présence de l'AChE au niveau de la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana.*

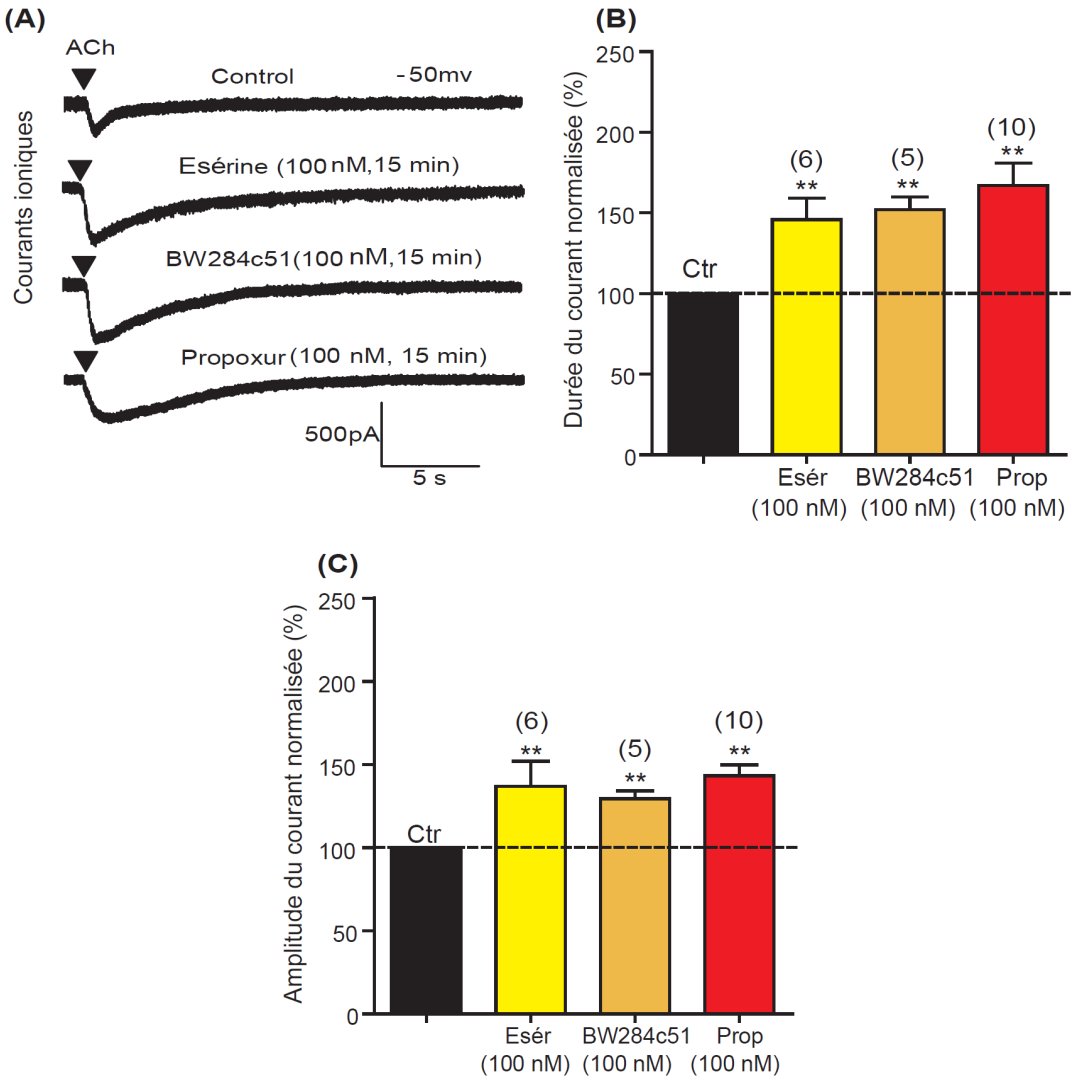



**Figure 27. Effets comparés des inhibiteurs de l'AChE du DUM neurones de la blatte *P. americana*, comme l'ésérine (Esér), (100 nM), le BW281c51 (100 nM) et d'un insecticides carbamate le propoxur (Prop), (100 nM) sur les courants ioniques induits par l'ACh (1M, 300 ms)).** (A) Exemples de courants ioniques entrant induits par l'ACh, enregistrés pour un potentiel de référence à l'état stable de -50 mV en condition contrôle et après application extracellulaire de l'ésérine, du BW284c51 et du propoxur pendant (15 min) en présence d'α-BGT. Histogrammes comparant les effets de l'ésérine, du BW284c51 et du propoxur sur la durée mesurée à 50 % de l'amplitude maximum (B) et sur l'amplitude (C) du courant induit par l'ACh. (Moyennes ± S.E.M), (*$p < 0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, différence significative par rapport au contrôle).

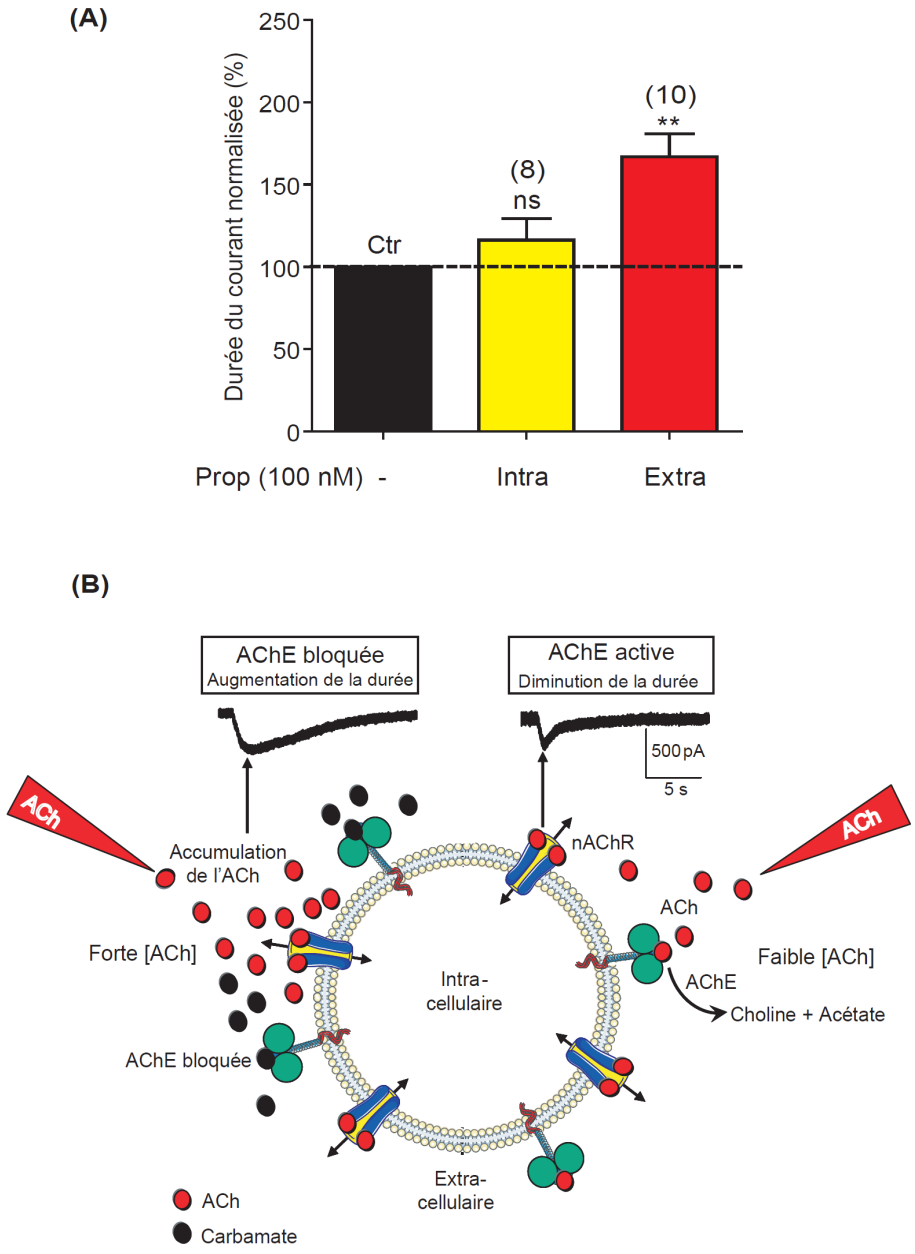



**Figure 28. Effets intracellulaire et extracellulaire du propoxur sur l'activité de l'AChE du DUM neurone de la blatte *P. americana*.** (A) Histogrammes comparant les effets intracellulaire (Intra) et extracellulaire (Extra) du propoxur (100 nM appliqué pendant 15 min) sur l'activité de l'AChE. Ctr : contrôle, ns : différence non significative, ** : $p<0.01$, différence significative par rapport au contrôle. (B) Schéma récapitulatif résument l'effet du propoxur sur l'ACHE membranaire. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; nAChR : récepteurs cholinergiques de type nicotiniques**.**

### 3. Caractérisation de l'activité enzymatique de l'AChE des DUM neurones

Pour confirmer la présence de l'AChE sur la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana, n*ous avons mesuré l'activité enzymatique de l'AChE résiduelle par un dosage colorimétrique selon le protocole **d'Ellman et coll., (1961**). Cette technique permet de mettre en évidence l'inhibition dose-dépendante de l'activité de l'AChE par un insecticide carbamate le propoxur.

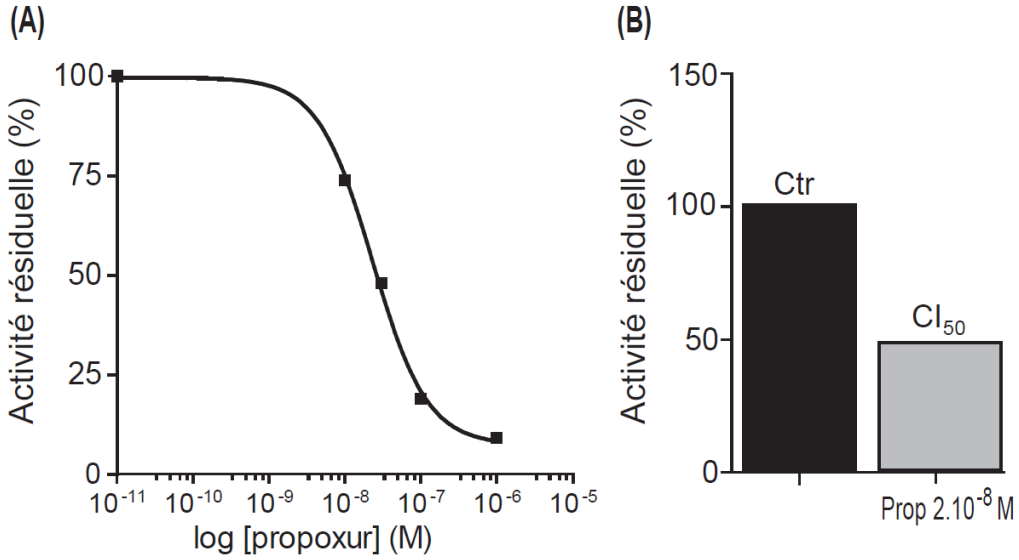



**Figure 29. Dosage de l'activité AChE des DUM neurones de la blatte *P. americana* contrôle et en présence de propoxur à utilisé des concentrations croissantes ($10^{-8}$ à $10^{-6}$ M). (A) Courbe d'inhibition dose-dépendante de l'effet du propoxur sur l'activité enzymatique de l'AChE. (B) Histogramme représentant la concentration de propoxur qui inhibe 50% de l'activité de l'AChE ($CI_{50}$= $2.10^{-8}$M).** Ctr : contrôle.

Nos résultats montrent qu'une concentration relativement faible de propoxur provoque 50% d'inhibition de l'activité de l'AChE ($CI_{50}$) est de $2.10^{-8}$ M de propoxur (**Figure 29A, B**). Ce que suggère une forte affinité du propoxur sur l'AChE des DUM.

## 4. Effets du DEET sur l'activité de l'AChE au niveau de la membrane des DUM neurones

Le DEET est devenu le répulsif le plus couramment utilisé au monde par application topique en raison de son efficacité contre un large spectre de parasites nuisibles y compris les moustiques (**Fradin, 1998**). Cependant, son mode d'action exact et les cibles moléculaires reste male connus (**Klun et coll., 2006; McIver, 1981)**. Bien que des controverses subsistent quant à l'identification de ses sites cibles au niveau moléculaire et de son mécanisme d'action exact chez les insectes, certains auteurs ont suggéré que les répulsifs pouvaient bloquer les pores au niveau antennaire et ainsi empêcher la détection des stimuli émis par l'hôte (**Wright, 1975 ; Syed et Leal., 2008 ; Pickett et coll., 2008**). D'autre part **Ditzen et coll., (2008)** ont suggéré que le DEET peut bloquer les réponses électrophysiologiques des neurones sensoriels olfactifs aux odeurs attrayantes chez *An. gambiae* et *D. melanogaster.* Enfin, très récemment, des travaux ont démontré que le DEET, qui n'est pas classé comme insecticide par les directives européennes pesticides (91/414CE) et biocides (98/8CE), peut exercer un effet insecticide par une inhibition de l'AChE chez l'insecte (**Corbel et Coll., 2009**)**.**

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mode d'action du DEET, nous avons effectué des études électro-pharmacologiques à l'aide de la technique de patch-clamp sur les DUM neurones. L'application de DEET à différents concentration (10 nM, 100 nM et 1µM) augmente de façon significative la durée et l'amplitude du courant induit par l'application d'ACh (**Tableau 5, Figure 30A, B)**. Cependant l'effet observé est moins important quand la concentration de DEET est de plus en plus forte, ce qui laisse suggérer une action complexe du DEET (**Figure 30A, B**).

**Tableau 5. Effets du DEET sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*.**

| Concentration du DEET | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **10 nM** | 176.00 ± 9.95 % ** (n =13) | 140.04 ± 6.50 % ** (n =13) |
| **100 nM** | 153.59 ± 5.22 % ** (n = 4) | 128.33 ± 10.41 % * (n = 4) |
| **1 µM** | 138.60 ± 6.89 % ** (n = 13) | 124.96 ± 6.50 % * (n = 13) |

(* :p< 0.05, ** :p< 0.01, différence significative par rapport au contrôle)

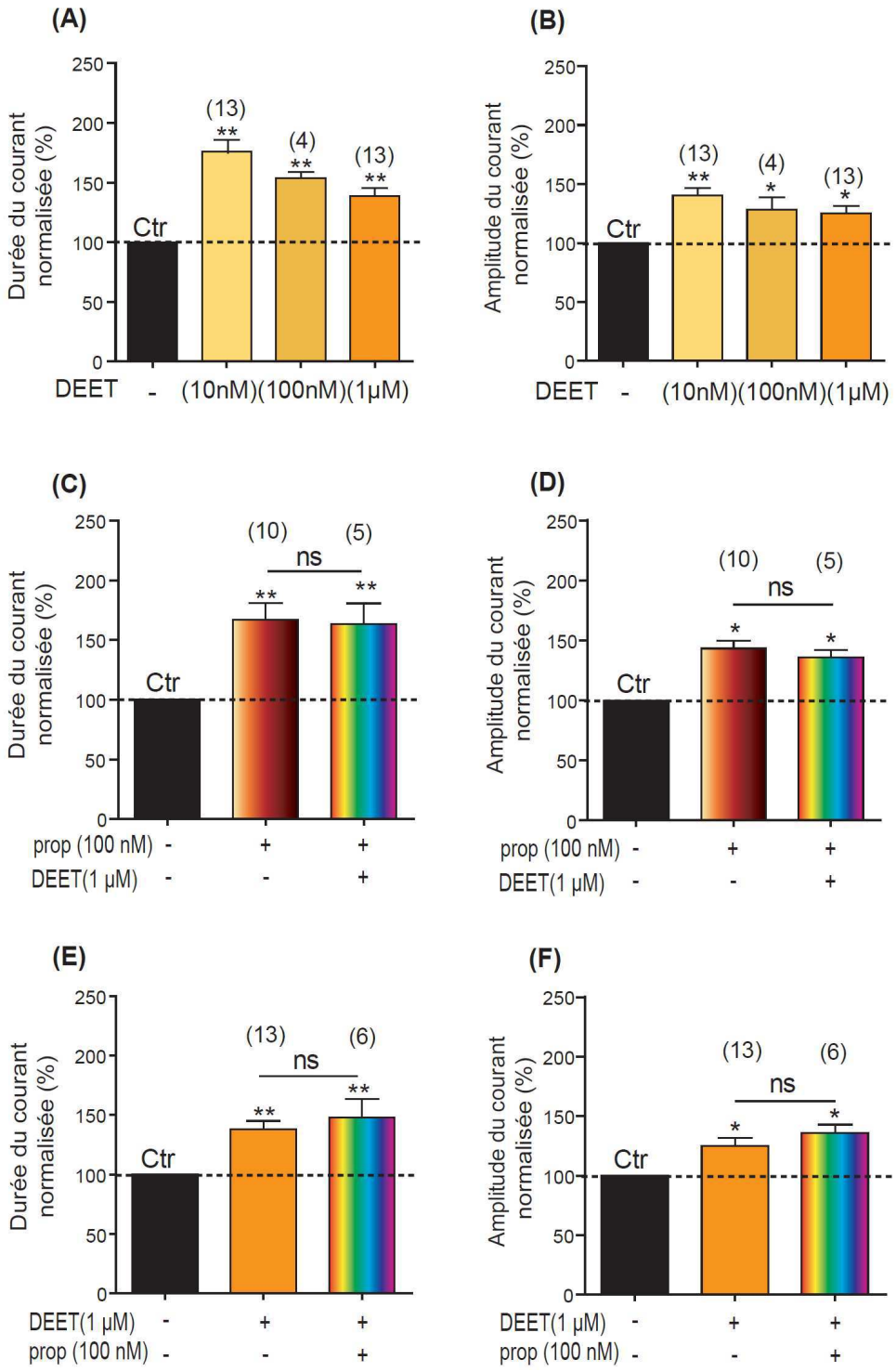



**Figure 30. Effets du DEET sur l'activité de l'AChE des DUM neurones.** (A**)** Histogramme comparatif des effets dose-dépendants du DEET (10 nM, 100 nM, 1 µM) sur la durée et (B) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh. La durée du courant ionique (mesurée à 50 % de l'amplitude) est exprimée en pourcentage de contrôle. (C) Histogramme illustrant des effets du DEET (1 µM,) sur la durée et (D) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh après prétraitement du propoxur (100 nM). (E) Histogramme comparatif des effets du propoxur (100 nM) sur la durée et (F) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh après prétraitement au DEET (1 µM). Ctr : contrôle, ns : différence non significative, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, différence significative par rapport au contrôle.

**Tableau 6. Effets du DEET à fort concentration (1µM) après prétraitement du propoxur (100 nM) et effet du propoxur après prétraitement au DEET (1µM) sur la durée et de l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **DEET (1 µM)** | 138.60 ± 6.89 % ** (n = 13) | 124.96 ± 6.50 % * (n = 13) |
| **DEET (1 µM) + Prop (100nM)** | 147.78 ± 15.73 % ** (n = 6) | 135.72 ±7.12 % * (n = 6) |
| **Prop (100 nM)** | 166.80 ± 13.92 % ** (n = 10) | 143.30 ± 17.36 % ** (n = 10) |
| **Prop (100 nM) +DEET (1µM)** | 163.30 ± 17.36 % ** (n = 5) | 135.67 ± 6.24 % * (n = 5) |

(* :p< 0.05, ** :p< 0.01, différence significative par rapport au contrôle)

Il est intéressant de noter que l'effet anti-AChE d'un mélange DEET+propoxur n'est pas plus important lorsqu'un prétraitement au propoxur est effectué seul. Des effets similaires sont observés avec le mélange propoxur+DEET lorsque le DEET est appliqué en premier (**Tableau 6, Figure 30C, D et E, F**). Ces résultats laissent envisager une cible identique pour le DEET et le propoxur (i.e., AChE). Ils confirment également les études précédentes sur les effets neurophysiologiques de DEET observés sur les synapses excitatrices entre les nerfs cercaux et les interneurones géants du dernier ganglion abdominal (DGA) de la blatte *P. americana.* En effet, le DEET induit un effet biphasique sur l'amplitude du potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) qui est très similaire à celle obtenue avec des composés anti-AChE classiques comme le propoxur (**Corbel et coll., 2006**). Dans ces conditions l'effet biphasique observé peut s'expliquer par une activité anti-AChE du DEET qui provoque une augmentation de la concentration en ACh dans l'espace synaptique. Cette élévation de la concentration en ACh induit ensuite une activation des mAChRs pré-synaptiques responsables du feed-back négatife qui inhibe la libération du neurotransmetteur. C'est le dernier effet qui induit une réduction de l'amplitude du PPSE (**Corbel et coll., 2009**).

## C. Conclusions

Dans un premier temps nous avons montré que l'application des inhibiteurs de l'AChE sur les DUM neurones de la blatte *P. americana* comme l'ésérine, le BW284c51 et un insecticide carbamate le propoxur provoque une augmentation de la durée et l'amplitude du courant ionique induit pat l'ACh. Nous avons pu montrer que l'AChE est bien présente au niveau de la membrane du DUM neurone. Parce qu'il n'y a pas d'effets significatifs quand le propoxur est appliqué par la pipette de patch, il est fortement suggéré que l'AChE du DUM neurone est membranaire. Cette hypothèse a été confirmée par la mesure de l'activité enzymatique de l'AChE du DUM neurone en présence de carbamate, le propoxur.

Enfin, lors d'un prétraitement du DUM neurone par le propoxur ou le DEET utilisé seuls, l'application supplémentaire du mélange DEET+propoxur ne provoque pas d'effets additionnels. Les résultats suggèrent une cible identique du DEET et du propoxur.

# CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'EFFET SYNERGIQUE DU DEET SUR L'EFFET DU PROPOXUR SUR L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE DU DUM NEURONE

## A. Position du problème

Les stratégies développées pour contrôler la résistance sont élaborées pout prévenir ralentir son développement afin d'éviter qu'elle ne soit à l'origine d'échecs dans les traitements utilisés. D'une manière générale, trois méthodes de gestion de la résistance sont pratiquées, 1) la gestion par modération (maintien de la population sensible), 2) la gestion par saturation et 3) l'utilisation de combinaisons d'insecticides (effet synergique) (**Pennetier, 2008**). La gestion de la résistance par utilisation de combinaisons d'insecticides est la plus utilisée chez les insectes comme les moustiques (**Corbel et coll., 2002, 2003, 2004, 2006 ; Hougard et coll., 2003, 2005 ; Darriet et coll., 2003, 2005 ; Pannetier et coll., 2005, 2007, 2009, Bonnet, 2009**), mais aussi chez le principal ravageur du coton *Helicoverpa armigra* en Afrique de l'Ouest (**Martin et coll., 2000**) et chez les larves de simulies (**Kurtak, 1990 ; Hougard et coll., 1993**)

Les premiers résultats obtenus sur le mode d'action du DEET montrent qu'il inhibe l'activité de l'AChE du DUM neurone de la blatte *P. americana*. Dans cette partie nous avons testé les effets du DEET seul ou en association avec d'autres insecticides sur les DUM neurones. Les mélanges d'insecticides OPs ou carbamates avec le DEET ont été déjà étudiés en laboratoire et sur le terrain par une application directe sur les moustiques et les moustiquaires et ceci pour lutter contre le paludisme (**Pennetier et coll., 2005, 2007, 2009 ; Pennetier, 2008 ; Bonnet, 2009**). Cependant, les mécanismes physiologiques impliqués dans l'effet synergique ne sont pas connus. Pour cela, nous avons décidé d'étudier ces mécanismes mis en jeu dans les phénomènes de synergie entre le DEET et l'association avec d'autres insecticides comme le carbamate (propoxur).

## B. Présentation des résultats

### 1. Effet du DEET, à faible concentration, utilisé seul ou en association avec le propoxur sur le DUM neurone

Les études électrophysiologiques ont identifié l'AChE comme cible du DEET dans le SNC des insectes (**Corbel et coll., 2009**). Cependant l'étude des effets dose-dépendant du DEET indiquent clairement un effet complexe de ce répulsif. L'activité anti-AChE est plus importante à faible concentration (10 nM), alors que pour des concentrations plus élevées (1 µM), l'effet du DEET sur la durée du courant entrant induit par l'ACh est plus faible. Puisque, à forte concentration l'association du DEET avec le propoxur n'induit pas d'effet supplémentaire, il était nécessaire de déterminer si à faible concentration (i.e. 10 nM) des résultats différents pourraient été obtenus.

**Tableau 7. Effet du DEET, à faible concentration, utilisé seul ou en association avec le propoxur sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **Prop (100 nM)** | 166.80 ± 13.92 % ** (n = 10) | 143.28 ± 2.52 % ** (n = 10) |
| **DEET (10 nM)** | 176.00 ± 9.95 %** (n = 13) | 140.04 ± 6.50 % ** (n = 13) |
| **DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 367.11 ± 4.22 % *** (n =10) | 175.57 ± 18.46 %*** (n = 10) |

(**: $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, différence significative par rapport au contrôle)

Nos résultats montrent que pour des concentrations 100 fois plus faibles l'effet du DEET est plus complexe. L'application de DEET utilisé à 10 nM potentialise l'effet du propoxur (100 nM) (**Tableau 7, Figure 31A, B**), comparé à l'effet du propoxur utilisé seul à la même concentration. Comme indiqué dans la figure 31 C et D, la co-application du DEET/propoxur induit un déplacement de la courbe effet/log (dose) du propoxur vers des concentrations plus faibles, comparé à la courbe obtenue avec du propoxur utilisé seul (**Tableau 8, Figure 31 C, D**).

**Tableau 8. Comparaison des concentrations effectives produisant 50 % d'effet du propoxur utilisé seul et d'un mélange propoxur+DEET sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane du DUM neurone.**

| Composition du milieu | Durée du courant ($EC_{50}$) | Amplitude du courant ($EC_{50}$) |
|---|---|---|
| **Propoxur seul** | $6.10^{-8}$ M | $6{,}58.10^{-8}$ M |
| **DEET (10 nM) + propoxur** | $2.10^{-8}$ M | $3{,}36.10^{-8}$ M |

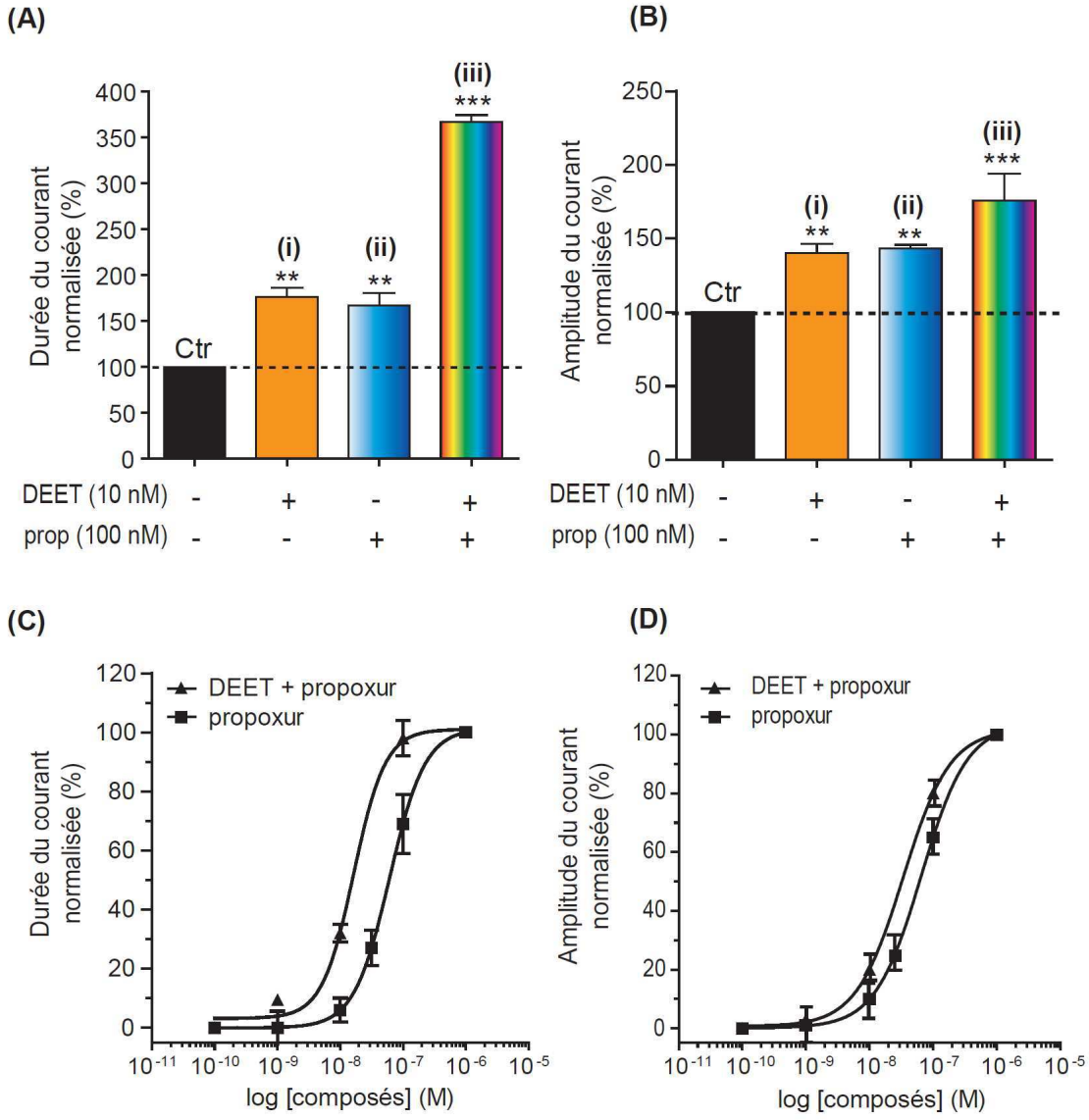



**Figure 31. Effet du DEET à faible concentration (10 nM) sur l'activité anti-AChE seul et associé avec insecticide carbamate, le propoxur.** Histogrammes comparant les effets **i)** du DEET à faible concentration (10 nM), **ii)** du propoxur (100 nM) et **iii)** du propoxur (100 nM) en présence du DEET (10 nM) sur la durée **(A)** et sur l'amplitude **(B)** du courant induit par l'ACh. Courbes dose-réponse comparant l'effet du propoxur seul et d'un mélange propoxur+DEET sur la durée **(C)** et l'amplitude **(D)** du courant induit par l'ACh. Ctr: contrôle, ** : $p<0.01$ ; *** : $p<0.001$, différence significative par rapport au contrôle.

## 2. Rôle du calcium intracellulaire sur l'effet synergique anti-AChE du propoxur.

### 2.1. *Effet du DEET sur la concentration de calcium intracellulaire du DUM neurone*

Grâce à la technique ratiométrique d'imagerie calcique, il a été possible de montrer que le DEET, à faible concentration (100 nM), provoque une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (**Figure 32**). Par conséquent l'existence d'une voie de régulation impliquant le $[Ca^{2+}]_i$ a été envisagée pour tenter d'expliquer l'effet synergique observé avec le propoxur en présence de DEET.

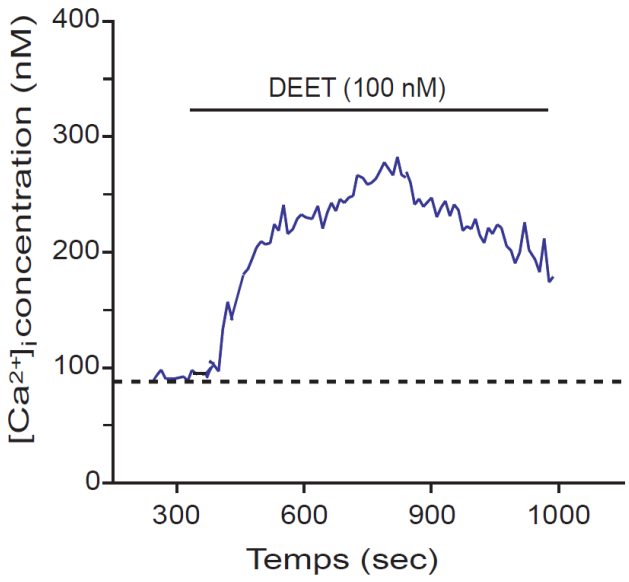



**Figure 32. Effet du DEET sur la concentration de calcium intracellulaire des DUM neurones de la blatte *P. americana*.**

### 2.2. *Effets du BAPTA et de la caféine sur l'effet anti-AChE du propoxur*

La perfusion intracellulaire du chélateur des ions calcium, le BAPTA (10 mM), réduisait l'effet anti-AChE du propoxur (**Tableau 9, Figure 33A, B**). A l'inverse, la caféine, connue pour libérer le calcium des stocks de calcium intracellulaires (**Courjaret et coll., 2003**), augmente l'effet du propoxur (**Tableau 9, Figure 33A, B)**. En résumé l'application de caféine (10 mM) mime les effets du DEET à faible concentration (10 nM) sur l'inhibition de l'AChE induite par le propoxur (100 nM) alors que la perfusion de BAPTA réduit l'effet anti-AChE du propoxur.

**Tableau 9. Effets du BAPTA (10 mM) et de la caféine (10 mM) sur l'effet anti-AChE du propoxur (100 nM).**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **Prop (100 nM)** | 166.80 ± 13.92 % ** (n = 10) | 143.28 ± 6.52 % ** (n = 10) |
| **BAPTA (10mM) + prop (100 nM)** | 117.30 ± 6.93 % ns (n = 7) | 95.95 ± 7.31 % ns (n = 7) |
| **Caféine (10 mM) + prop (100 nM)** | 309.47 ± 26.13 % *** (n =7) | 192.22 ± 13.0 % *** (n = 7) |

(ns : différence non significative, ** :p< 0.01, *** :p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle).

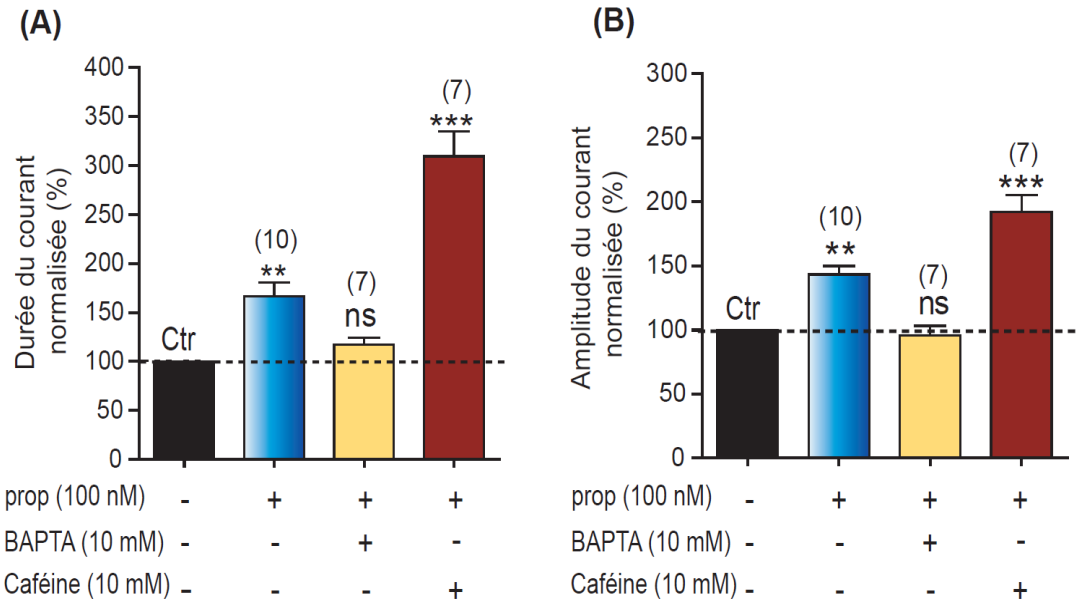



**Figure 33. Effets de la variation de la concentration en calcium intracellulaire sur les effets anti-AChE du propoxur.** Histogrammes comparatifs illustrant les effets du BAPTA (10 mM) et de la caféine (10 mM) sur l'effet du propoxur mesuré sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh. Ctr : contrôle, ns : différence non significative, ** : p<0.01 ; *** : p<0.001, différence significative par rapport au contrôle.

### 2.3. *Effets* du chlorure de cadmium *sur l'effet synergique induit par le DEET*

Basé sur les résultats ci-dessus, l'influence du calcium a été étudiée sur l'effet synergique observé en présence du DEET. La participation du calcium exogène dans la synergie observée (DEET+ propoxur) a été démontrée par l'utilisation du chlorure de cadmium ($CdCl_2$) connu pour être un bloqueur inorganique des canaux calciques membranaires. Dans ce cas, l'application ce $CdCl_2$ (0.5 mM) dans la solution extracellulaire bloque l'effet synergique produit par le DEET (**Tableau 10, Figure 34A, B**).

**Tableau 10. Effet du chlorure de cadmium sur l'effet synergique induit par le DEET utilisé seul à faible concentration (10 nM) et en association avec le propoxur (100 nM).**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **DEET (10 nM)** | 176.00 ± 9.95 % ** (n =13) | 140.04 ± 6.50 % ** (n =13) |
| **$CdCl_2$ (0.5 mM) + DEET (10 nM)** | 146.46 ± 8.57 % ** (n = 6) | 116.90 ± 10.52 % ns (n = 6) |
| **DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 367.11 ± 4.22 % *** (n =10) | 143.82 ± 6.52 % ** (n = 10) |
| **$CdCl_2$ (0.5mM) +DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 163.45 ± 11.46 % ** (n = 6) | 120.29 ± 17.10 % ns (n = 6) |

(ns : différence non significative, ** :p< 0.01, *** :p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle).

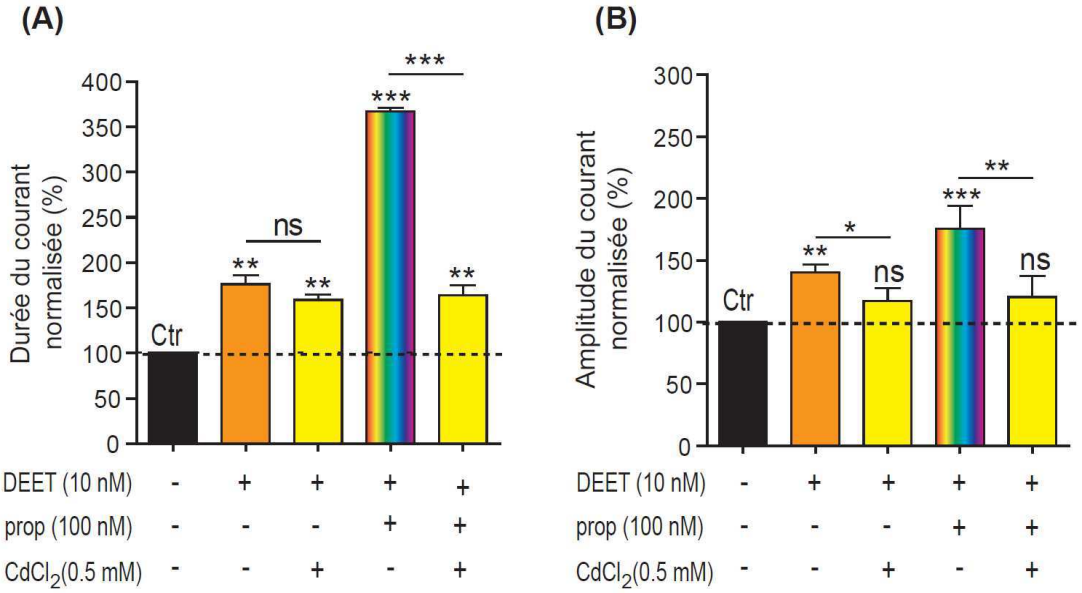



**Figure 34. Effets du chlorure de cadmium sur les effets synergiques induit par le DEET.** Histogrammes comparatifs illustrant les effets du $CdCl_2$ (0.5 mM) sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh et sur l'effet synergique induit par le DEET. Ctr : contrôle, ns : différence non significative, ** : p<0.01 ; *** : p<0.001, différence significative par rapport au contrôle.

## 3. Etude des mécanismes intracellulaires impliqués dans la synergie DEET/ propoxur.

### *3.1. Implication des récepteurs à l'IP3 sur l'effet synergique induit par le DEET*

Nous avons étudié l'origine de l'élévation du $Ca^{2+}$ intracellulaire et la libération de calcium via les récepteurs à l'IP3. L'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs à l'$IP_3$ le TMB-8 (**Birkenbeil and Dedos, 2002 ; Fellner et coll., 2005**). L'application de TMP-8 (100 µM) produit une inhibition de l'effet synergique du DEET (95.34 ± 2.81, n=6, p>0.05) (**Figure 35**). Nos résultats montrent que la libération de calcium via les récepteurs à l'$IP_3$ joue un rôle très important sur l'effet synergique induit par le DEET.

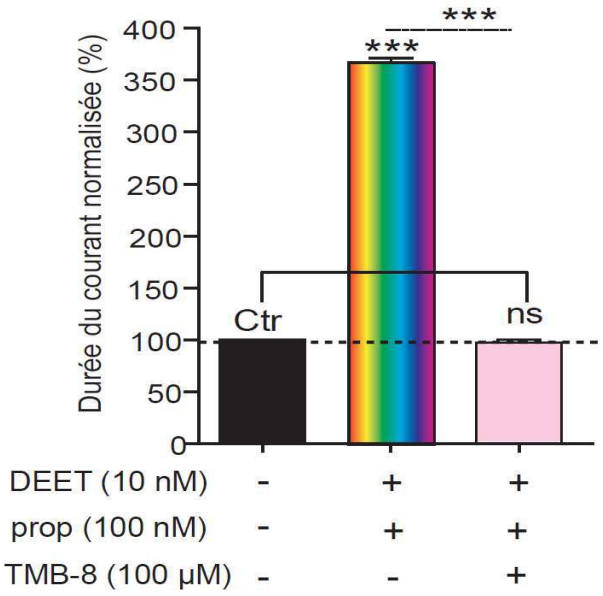



**Figure 35. Histogramme comparatif illustrant les effets du TMB-8 (100 µM) ajouté à la solution extracellulaire sur l'effet synergique induit par le DEET.** Ctr : contrôle, ns : différence non significative, *** : p<0.001, différence significative par rapport au contrôle.

### *3.2. Implication du complexe $Ca^{2+}$-CaM et de la PLC sur l'effet synergique induit par le DEET*

Pour étudier le rôle du calcium intracellulaire sur l'effet synergique induit par le DEET, nous avons testé l'effet d'un inhibiteur de la CaM, le W-7 (0.5mM). En effet, le rôle du complexe calcium- calmoduline ($Ca^{2+}$-CaM) est connu dans les DUM neurones pour être impliqué dans les voies des signalisations intracellulaire (**Courjaret et Lapied, 2001 ; Alix et coll., 2002, Thany et coll., 2007**). Les résultats ont révélé que la perfusion intracellulaire de cet inhibiteur, diminue l'effet synergique du DEET. Ces données suggèrent que le complexe $Ca^{2+}$-CaM joue un rôle très important sur l'effet synergique du DEET (**Tableau 11, Figure 36A**).

Basé sur les résultats présentés ci-dessus, nous avons étudié les interactions possibles entre calcium, complexe $Ca^{2+}$-CaM et récepteurs $IP_3$. Il est connu que la PLC permet la production d'inositol triphosphate ($IP_3$) (**Hannan et Hall, 1993 ; Trimmer, 1995**). L'$IP_3$ se fixe sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique provoquant une libération du calcium intracellulaire. Nos résultats ont montré que durant le pré-traitement au W-7, l'application d'un inhibiteur de la PLC, le composé U73122 (10 µM) (**Torfs et coll., 2000**), s'oppose à l'effet du W-7 et restaure l'effet synergique du DEET. Par contre, l'utilisation d'un activateur de la PLC, le m3M3FBS (10 µM) produit une inhibition de l'effet synergique du DEET (**Tableau 11, Figure 36B**).

**Tableau 11. Effets d'un inhibiteur du la CaM et des inhibiteurs et activateurs de la PLC sur l'effet synergique induit par le DEET.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|
| **DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 367.11 ± 4.22 % *** (n =10) |
| **W-7 (0.5mM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 112.80 ± 34.49 % ns (n = 6) |
| **W-7 (0.5mM) + U73122 (10µM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 230.75 ± 25.01 % ** (n = 4) |
| **m3M3FBS (10µM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 109.02 ± 20.91 % ns (n = 4) |

(ns : différence non significative, ** : p< 0.01, *** : p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle)

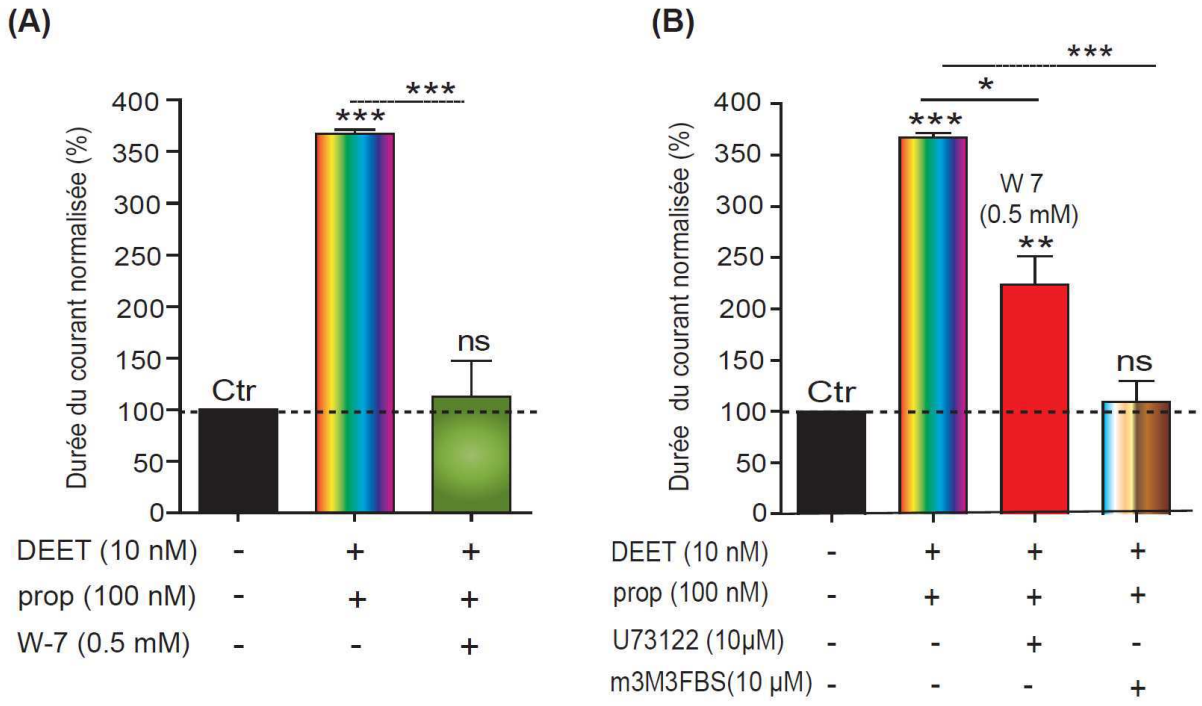



**Figure 36. Rôles du complexe $Ca^{2+}$-CaM et de la PLC sur l'effet synergique du propoxur induit par le DEET. Histogramme comparatif illustrant les effets du W7 (0.5 mM) ajouté dans la solution intrapipette (A) et les effets du U73122 et m3M3FBS (B) sur l'effet synergique induit par le DEET.** Ctr : contrôle, ns : différence non significative, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$, différence significative par rapport au contrôle.

### 4. Etude des effets du DEET utilisé à faible concentration sur l'activité anti-AChE d'un OP, le chlorpyriphos-éthyl sur les DUM neurones de la blatte *P. americana*.

Les résultats obtenus ci-dessus ont montré qu'une faible concentration de DEET potentialise l'effet anti-AChE d'un carbamate le propoxur *via* une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. A partir de ces premiers résultats une question reste posée : existe-t-il un effet similaire induit par le DDET sur l'activité anti-AChE d'un OP?

Nos résultats ont montré que l'application de DEET à faible concentration (10 nM) potentialise l'effet du chlorpyriphos-éthyl (CPP) (1µM). L'application de DEET utilisé à (10 nM) potentialise l'effet du CPP (**Tableau 12, Figure 37A, B**). Comme indiqué dans la figure 37 C, D, la co-application du DEET/CPP induit un déplacement de la courbe effet/log (dose) du CPP vers des concentrations plus faibles, comparé à la courbe obtenue avec du CPP utilisé seul sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh (**Tableau 13, Figure 37C, D**). Nous avons comparé l'effet des mélanges du DEET+ propoxur et DEET+CPP sur l'activité anti-AChE du DUM neurones de la blatte *P. americana*. Ces résultats montrent que les mélanges du DEET+ prop significativement plus importante que les mélanges du DEET+CPP.

**Tableau 12. Effets synergiques induits par le DEET utilisé à faible concentration sur l'activité anti-AChE d'un OP le chlorpyriphos-éthyl au niveau de la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana*.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. | Amplitude du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|---|
| **CPP (1µM)** | 151.78 ± 4.22 % ** (n = 4) | 192.58 ± 8.74 % *** (n = 4) |
| **DEET (10 nM) + CPP (1µM)** | 179.26 ± 9.63 % *** (n = 4) | 175.95 ± 9.57 % *** (n = 4) |

(** : p< 0.01 , *** :p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle)

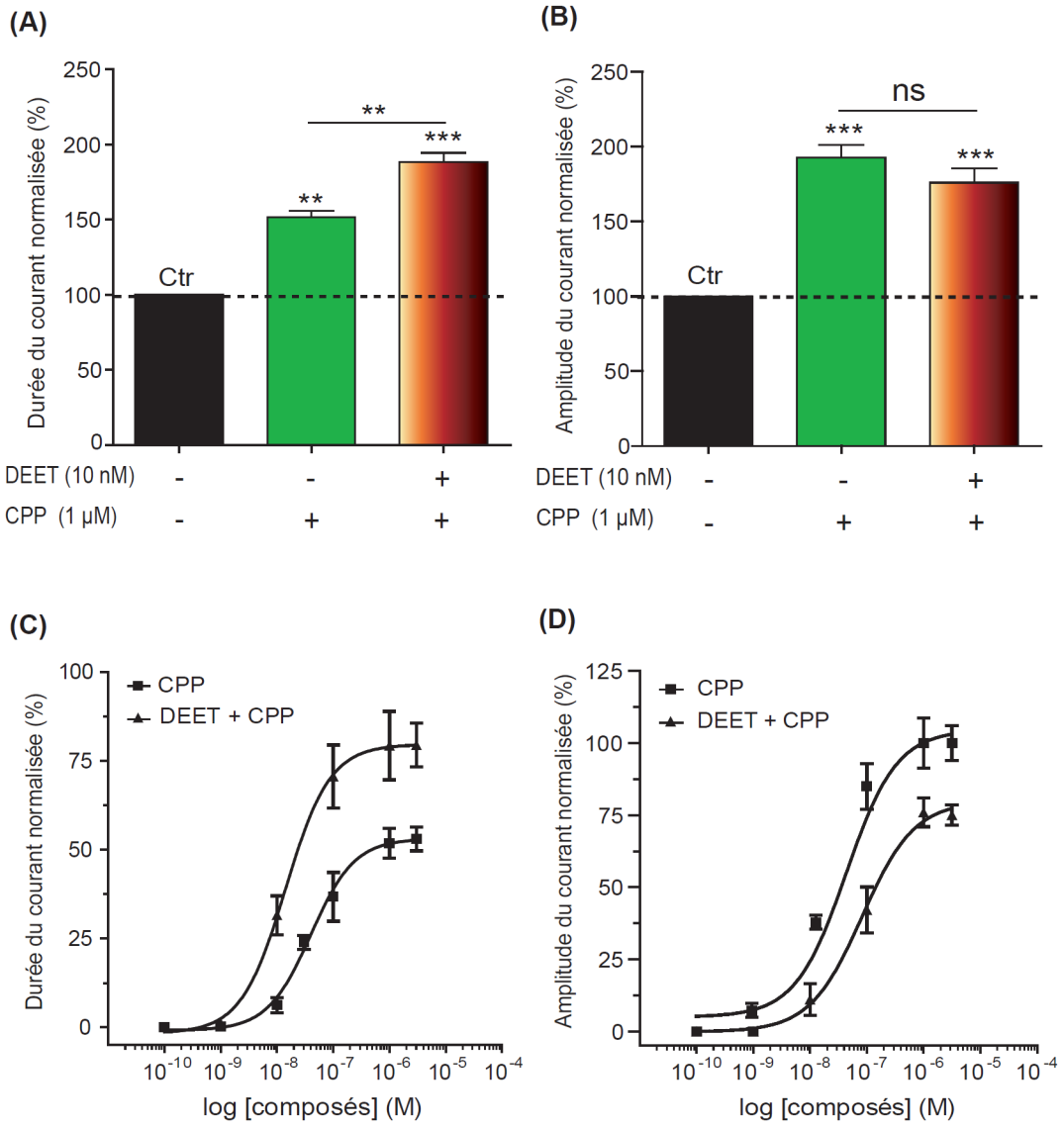



**Figure 37. Effet synergique induit par le DEET utilisé à faible concentration (10 nM) sur l'activité anti-AChE d'un OP le chlorpyriphos-éthyl (CPP) sur le DUM neurone de la blatte *P. americana*.** Histogramme récapitulatif des effets du CPP seul (1 µM) sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh et après prétraitement au DEET (10 nM). Courbes dose-réponses comparant l'effet du CPP seul et du CPP après prétraitement avec le DEET (10 nM) sur la durée (C) et sur l'amplitude (D) du courant induit par l'ACh. Différence significative par rapport au contrôle.

**Tableau 13. Comparaison des concentrations effectives qui produisent 50 % ($EC_{50}$) des effets du CPP utilisé seul en présence de DEET (10 nM) sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane du DUM neurone.**

| Composition du milieu | Durée du courant ($EC_{50}$) | Amplitude du courant ($EC_{50}$) |
|---|---|---|
| **CPP seul** | $4{,}01.10^{-8}$ M | $4{,}33.10^{-8}$ M |
| **DEET (10 nM) + CPP** | $1{,}42.10^{-8}$ M | $8{,}52.10^{-8}$ M |

## C. Conclusions

Pour la première fois, des interactions synergiques entre molécules à mode d'action différent ont été observées sur des neurones d'un insecte la blatte *P. americana*. Le DEET à faible concentration augmente la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ qui induit une augmentation des effets du propoxur.

Après avoir étudié la composante exogène intervenant dans l'élévation de calcium induit par le DEET, nous nous sommes intéressés à l'identification des mécanismes intracellulaires susceptibles d'être impliqués. L'utilisation d'un bloqueur des canaux calciques membranaires le $CdCl_2$ (0.5 mM) bloque l'effet synergique induit par le DEET. Ce qui indique une participation du calcium exogène. A l'aide d'outils pharmacologiques spécifiques, le rôle du calcium *via* le complexe Ca-CaM sur l'effet synergique induit par le DEET a été démontré grâce à l'application d'un inhibiteur de la CaM, le W-7 (0.5 mM) qui diminue l'effet synergique du DEET.

Sur les DUM neurones de la blatte *P. americana*, les récepteurs inter cellulaires le plus souvent impliqués dans l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire sont les récepteurs à l'$IP_3$ (**Courjaret et coll., 2003 ; Thany et coll., 2007**). L'utilisation de le TMB-8 (100 µM), qui inhibe les $IP_3$Rs, produit une inhibition de l'effet synergique du DEET. La PLC est une enzyme impliquée dans la production d'$IP_3$ et connue pour être régulée par le complexe Ca-CaM. Nos résultats ont montré que durant le pré-traitement au W-7, l'application d'un inhibiteur de la PLC, le composé U73122 (10 µM), s'oppose à l'effet du W-7 et restaure l'effet synergique du DEET. Par contre, l'utilisation d'un activateur de la PLC, le m3M3FBS (10 µM) produit une inhibition de l'effet synergique du DEET. Ces résultats révèlent l'implication de la voie de signalisation intracellulaire de la PLC/$IP_3$ dans l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire, responsable de l'effet synergique.

# CHAPITRE 3 : MODULATION ALLOSTERIQUE DES RECEPTEURS CHOLINERGIQUES DE TYPE MUSCARINIQUE DES DUM NEURONES PAR LE DEET

## A. Position du problème

A partir des résultats présentés ci-dessus qui indiquent l'implication d'une voie de signalisation intracellulaire (PLC/ IP3), l'hypothèse de la participation des mAChRs a été proposée. Chez les insectes, les mAChRs de sous-type M1 et M3 sont couplés à une G-protéine impliquée dans l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire qui fait intervenir la PLC, le DAG et l'$IP_3$ (**Nathanson, 2000**). La PLC est une enzyme membranaire qui coupe un phospholipide membranaire le $PIP_2$ en deux molécules qui vont jouer le rôle de seconds messagers: le DAG et l'IP3. L'$IP_3$ se fixe sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique, provoquant une libération du calcium vers le cytosol (**Hannan et Hall, 1993 ; Trimmer, 1995 ; Newton, 2001**). Sur les DUM neurones, la présence des mAChRs de types M1/M3 et M2 a été démontrée grâce à l'utilisation d'un agoniste : le MCN.A.343 et d'un antagoniste spécifique, la pirenzépine (**Lapied et coll., 1992**). Sur cette même préparation, le couplage des mAChRs de type M1 à la voie de signalisation intracellulaire PLC/ IP3/ DAG a également été caractérisée (**Courjaret et coll., 2003**). Par conséquent, la troisième partie de ce travail de recherche concerne l'implication des mAChRs synaptiques et extrasynaptiques dans l'effet neurotoxique du DEET.

## B. Résultats expérimentaux

### 1. Implication des récepteurs muscariniques synaptiques sur l'effet du DEET

Il existe peu de modèles chez l'insecte qui permettent d'étudier avec précision le mode de fonctionnement d'une synapse identifiée entre deux neurones. Cependant, le développement de la technique électrophisologique de simple oil-gap permet d'étude les synapses excitatrices entre les nerfs cercaux et les interneurones géants du dernier ganglion abdominal (DGA) de la blatte *P. americana* (**Hue et Callec, 1990**). A l'heure actuelle, trois types de récepteurs cholinergiques ont été caractérisés du point de vue pharmacologique au niveau synaptique sur cette préparation 1) les récepteurs cholinergiques de type nicotiniques postsynaptiques, sensibles à l'alpha-bungarotoxine, 2) les récepteurs cholinergiques muscariniques de type M2 localisés au niveau présynaptique et 3) les récepteurs cholinergiques muscariniques de type M1 au niveau postsynaptique (**Hue et coll., 1989 ; Hue et Callec, 1990 ; Le Corronc et coll., 1990 ; Le Corronc et Hue 1992**).

L'effet du DEET a été étudié sur la transmission synaptique des DGA de la blatte, *P. americana*. Grâce à la technique de l'oil-gap (**Figure 38A, Hue et Callec, 1990**) il a été possible de montrer que le DEET à faible concentration (500 nM) produit une dépolarisation de la membrane ganglionnaire postsynaptique. Par contre l'application du DEET à forte concentration (0.01 mM) ne provoque pas de variation du potentiel de la membrane postsynaptique (**Figure 38B, C)**. De la même façon, l'application de DEET à faible concentration (500 nM) en présence d'atropine (1 µM) un bloqueur des récepteurs muscariniques ne provoque pas de variation de potentiel de la membrane postsynaptique. Ces résultats suggèrent que le DEET à faible concentration active les mAChRs de la membrane postsynaptique mais à fort concentration inhibe ces mêmes mAChRs.

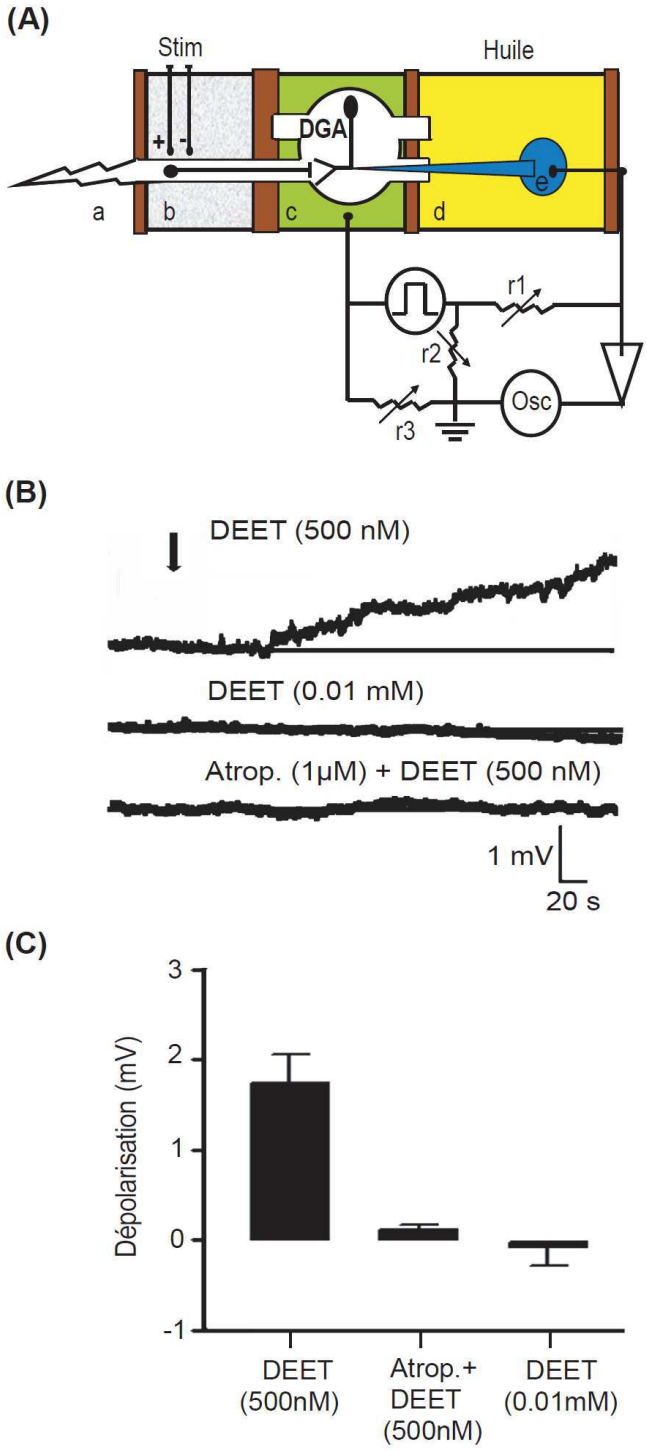



**Figure 38. Effets du DEET à faible et à forte concentrations sur les mAChRs de la transmission synaptique de la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana*.** (A) Schéma récapitulatif de la technique de l'oil-gap synaptique pour enregistrer les événements synaptiques (Modifié d'après **Hue et Callec, 1990**). Stim : stimulation, Osc : oscilloscope, DGA : dernier ganglion abdominal, r1,2,3 : résistances. (B) Effet du DEET à faible et forte concentration (500 nM, 0.01 mM) seul et en présence d'atropine sur la membrane postsynaptique. (C) Histogramme récapitulatif de l'effet du DEET à faible et forte concentrations seule et en présence d'atropine sur la membrane postsynaptique.

## 2. Rôle des récepteurs muscariniques des DUM neurones sur l'effet synergique induit par le DEET

### *2.1. Action des antagonistes des récepteurs muscariniques sur l'effet synergique induit par le DEET*

Avant d'étudier plus en détails le rôle des mAChRs sur l'effet synergique induit par le DEET à faible concentration (10 nM), nous avons réalisé une étude comparative en présences des antagonistes des mAChRs de types M1 et M3 sur le DUM neurone de la blatte *P. americana*. L'application de pirenzépine (PZP) (100 nM) inhibe l'effet du DEET (10 nM) utilisé seul (**Tableau 14, Figure 39A**). Des effets similaires ont été obtenus lors de l'application de 4-DAMP (100 nM) antagoniste des mAChRs de sous-type M3 (**Tableau 14, Figure 39A**), suggérant que l'activation des mAChRs de sous-types M1 et M3 sont impliqués dans l'effet du DEET sur l'AChE. De la même façon, l'application de PZP et de 4-DAMP bloquent l'effet synergique induit par le DEET en présence du propoxur (**Tableau 14, Figure 39B**).

**Tableau 14. Effet des antagonistes des mAChRs sur l'effet du DEET utilisé seul et sur l'effet synergique induit par le DEET.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|
| **DEET (10 nM)** | 176.00 ± 9.95 % ** (n =13) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM)** | 118.30 ± 15.27 % ns (n = 4) |
| **4-DAMP (100 nM) + DEET (10 nM)** | 117.13 ± 11.17 % ns (n = 4) |
| **DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 367.11 ± 4.22 % *** (n =10) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 123.66 ± 12.47 % ns (n = 4) |
| **4-DAMP (100 nM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 125.54 ± 10.78 % ns (n = 4) |

(ns : différence non significative, ** : $p< 0.01$, *** : $p< 0.001$, différence significative par rapport au contrôle)

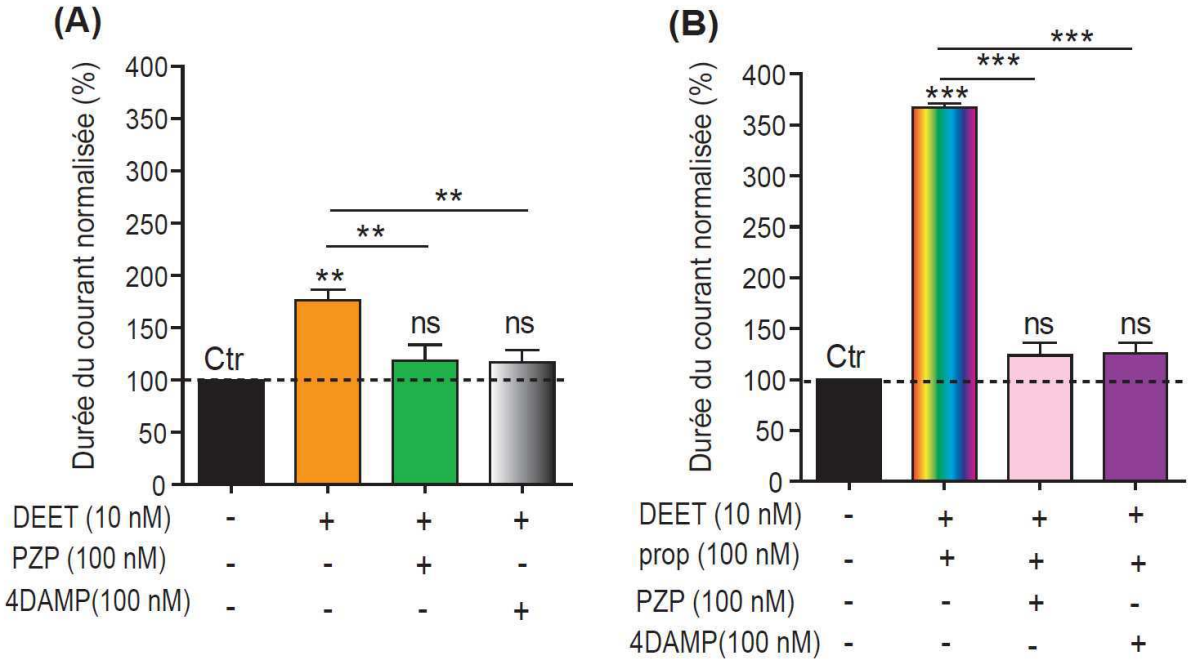



**Figure 39. Implication des récepteurs cholinergiques de type muscariniques dans l'effet synergique induit par le DEET au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana*.** Histogramme comparatif de l'effet des antagonistes spécifiques des mAChRs, la PZP (100 nM, M1) et le 4-DAMP (100 nM, M3) sur l'effet du DEET (10 nM) testé seul (A) et sur l'effet synergique induit par le DEET (B). ns : différence non significative ** : p< 0.01, *** :p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle.

### *2.2. Effet d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire sur l'effet synergique induit par le DEET en présence de pirenzépine*

La perfusion intracellulaire d'une solution à forte $[Ca^{2+}]_i$ (c'est à dire sans EGTA) permet d'augmenter l'effet du DEET (10 nM) testé seul après prétraitement à la PZP (100 nM), (**Tableau 15, Figure 40A**). De la même façon, l'application de PZP sur le corps cellulaire du DUM perfusé par une solution sans EGTA permet de restaurer en partie l'effet synergique du mélange DEET/propoxur (**Tableau 15, Figure 40B**).

**Tableau 15. Effet d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire en présence de PZP sur l'effet synergique induit par le DEET.**

| Composition du milieu | Durée du courant (%) ± S.E.M. |
|---|---|
| **DEET (10 nM)** | 176.00 ± 9.95 % ** (n =13) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM)** | 118.30 ± 15.27 % ns (n = 4) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM) sans EGTA** | 164.26 ± 7.47 % ** (n = 4) |
| **DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 367.11 ± 4.22 % *** (n =10) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM)** | 123.66 ± 12.47 % ns (n = 4) |
| **PZP (100 nM) + DEET (10 nM) + prop (100 nM) sans EGTA** | 207.86 ± 12.07 % *** (n = 4) |

(ns : différence non significative, ** : p< 0.01, *** : p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle).

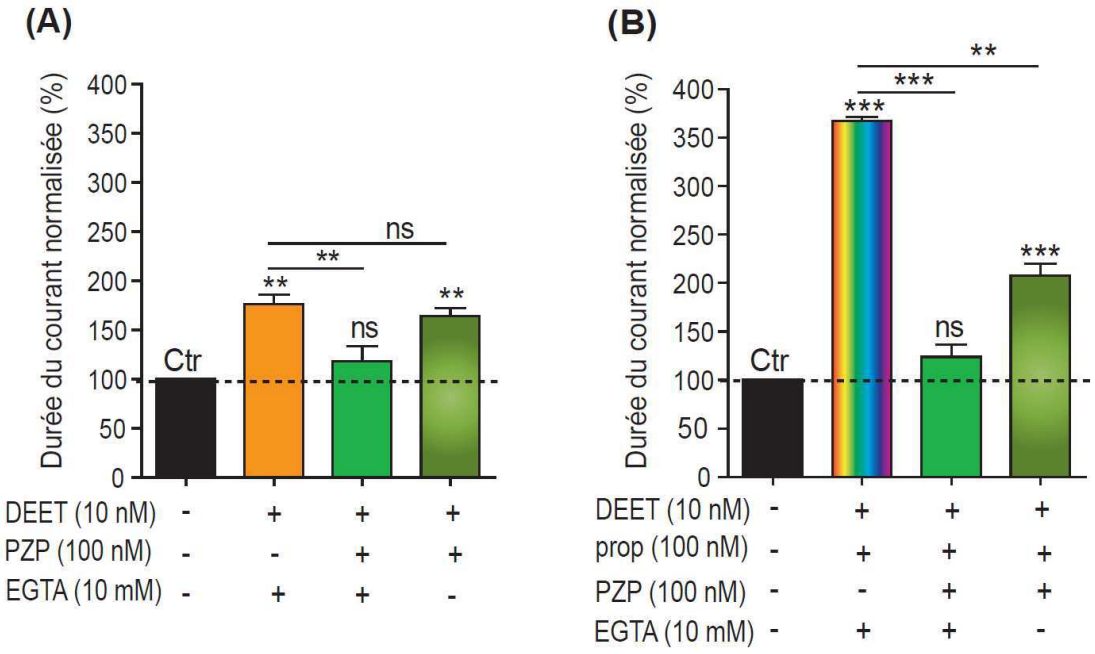



**Figure 40. Implication des mAChRs de type M1 dans l'effet synergique induit par le DEET au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana*.** (A) Histogramme comparatif de l'effet d'une solution sans EGTA sur l'effet du DEET (10 nM) testé seul en presence de PZP (100 nM). (B) Histogramme comparatif d'une solution intrapipette sans EGTA sur l'effet synergique du mélange DEET (10 nM) / propoxur (100 nM). Chaque barre d'histogramme représente la moyenne ± SEM. ns : différence non significative ** : p< 0.01, *** :p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle.

## 3. Modulation allostérique des récepteurs muscariniques des DUM neurones par le DEET

### *3.1. Effets d'un agoniste la muscarine sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones*

Chez la blatte *P. americana*, deux récepteurs de l'ACh de type muscariniques ont été identifiés. L'activation de ces récepteurs par le McN-A-343 induit une réponse biphasique. Ils sont apparentés par leur pharmacologie aux sous-types M1 (inhibé par la PZP) et M2 (inhibé par la méthoctramine) des récepteurs de type muscarinique des vertébrés (**Lapied et coll., 1992**).

Nous avons testé l'effet de la muscarine (10 mM) sur le DUM neurone de la blatte par éjection pneumatique pendant différentes durées (50, 100, 300, 500, 800, 1000 ms). Les résultats obtenus sont illustrés sur la **figure 41 A, B**. L'application de muscarine induit un courant entrant qui présente une cinétique d'activation lente dont l'amplitude augmente en fonction de la durée d'éjection. La **figure 41A** illustre des exemples typiques de ces courants muscariniques ($I_{mus}$) évoqués par l'éjection pneumatique de muscarine (de 50 à 1000 ms).

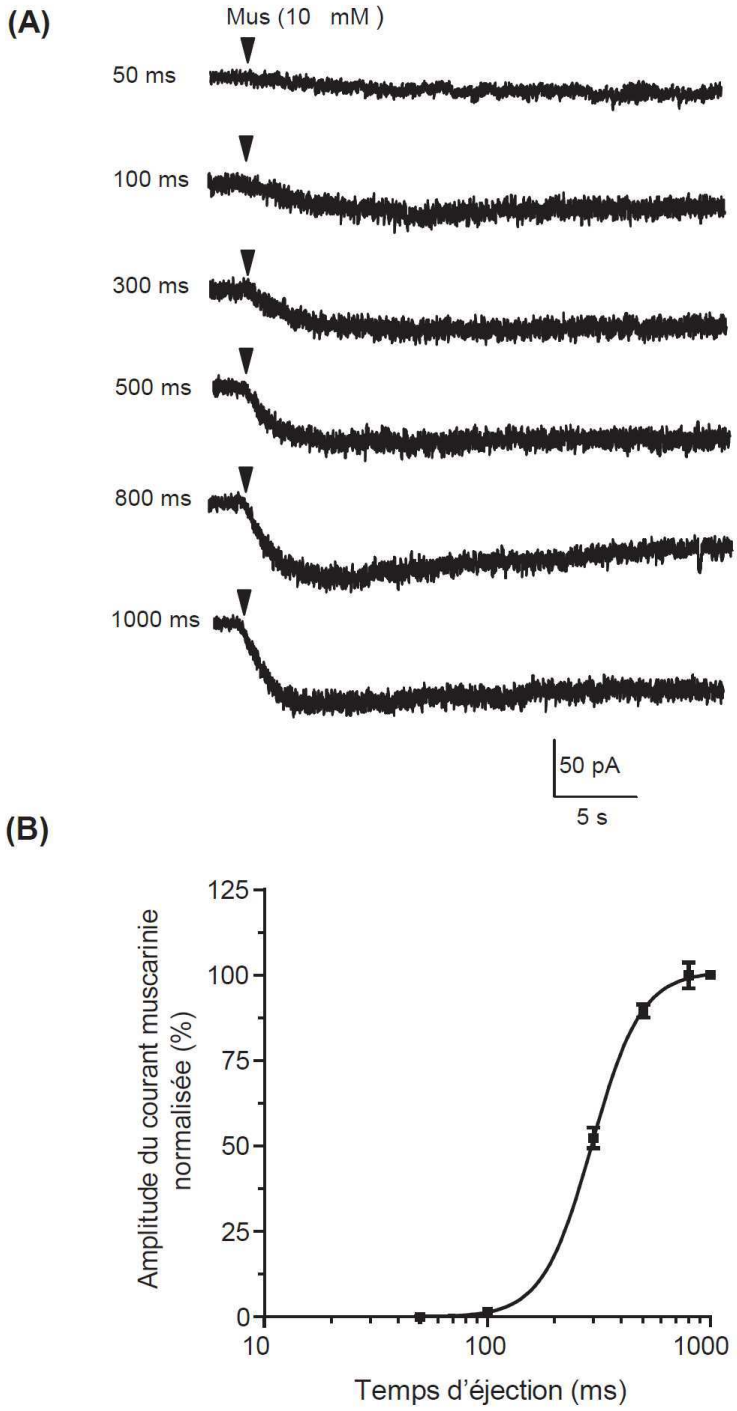



**Figure 41. Courants induits par l'activation des récepteurs muscariniques ($I_{mus}$) suite à l'application de muscarine sur les DUM neurone de la blatte *P. americana*.** (A) Exemples des courants ioniques entrant induits par la muscarine (10 mM) et enregistrés pour un potentiel de référence à l'état stable de -50 mV. (B) Courbe dose-réponse de l'amplitude du courant ($I_{mus}$) obtenue lors de l'application par éjection pneumatique de la muscarine 10 mM (50, 100, 300, 500, 800, 1000 ms, 15psig) sur les corps cellulaires du DUM neurones isolés.

### 3.2. *Caractérisation de l'effet allostérique du DEET sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones*

Les modulateurs allostériques des récepteurs muscariniques ont été largement étudiés chez les vertébrés (**Huang et coll., 2005; Tränkle et coll., 2005; Grossmuller et coll., 2006; Holzgrabe et coll., 2006; Jäger et coll., 2007**). Ces études montrent que la liaison des ligands allostériques intervient au niveau des régions extracellulaires du récepteur et en particulier au niveau de la boucle extracellulaire E2 (**Figure 42**). Les résultats obtenus précédemment indiquent clairement l'impliquation des mAChRs dans l'effet neurotoxique du DEET. De plus, cet effet semble dépendre de la concentration de répulsif utilisé. En effet, sur la préparation synaptique, une faible concentration de DEET provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique alors qu'une forte concentration induit une inhibition de la réponse. Ce double effet permet d'envisager la possibilité que le DEET puisse se comporter comme un modulateur allostérique. Par conséquent, dans cette partie, nous avons testé l'effet du DEET à faible et à forte concentrations sur le courant muscarinique au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana*.

Les résultats présentés sur la figure **43 A, B**, **C** indiquent que l'application du DEET à faible et forte concentrations modifie l'amplitude du courant induit par l'éjection pneumatique de muscarine (10 mM, 800 ms) sur un corps cellulaire de DUM neurone isolé. A faibles concentrations (1 nM, 10 nM et 100 nM), le DEET provoque une augmentation de l'amplitude du courant induit par la muscarine ($I_{mus}$) (**Tableau 16, Figure 43 A, B**, **C**). Par contre, l'application du DEET à forte concentration (1 µM et 10 µM) réduit fortement l'amplitude du courant ($I_{mus}$) (**Tableau 16, Figure 43 A, B**, **C**).

**Tableau 16. Caractérisation de l'effet allostérique du DEET sur les mAChRs, utilisé seul et en présence de la toxine muscariniqueMT-7 (10 nM) au niveau de la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana*.**

| Concentration du DEET | Amplitude du courant muscarinique (%) ± S.E.M. | |
|---|---|---|
| | DEET | DEET + MT-7 (10 nM) |
| **1 nM** | 114.60 ± 3.89 % ns (n = 3) | - |
| **10 nM** | 148.96 ± 3.25 % ** (n = 4) | - |
| **100 nM** | 124.56 ± 3.49 % * (n = 4) | 125.58 ± 3.22 % * (n = 4) |
| **1 µM** | 51.90 ± 3.21 % ** (n = 4) | 114.66 ± 4.13 % ns (n = 4) |
| **10 µM** | 36.66 ± 5.10 % *** (n = 5) | 100.88 ± 3.75 % ns (n = 4) |

(ns : différence non significative, * : p< 0.05, ** : p< 0.01, *** : p< 0.001, différence significative par rapport au contrôle).

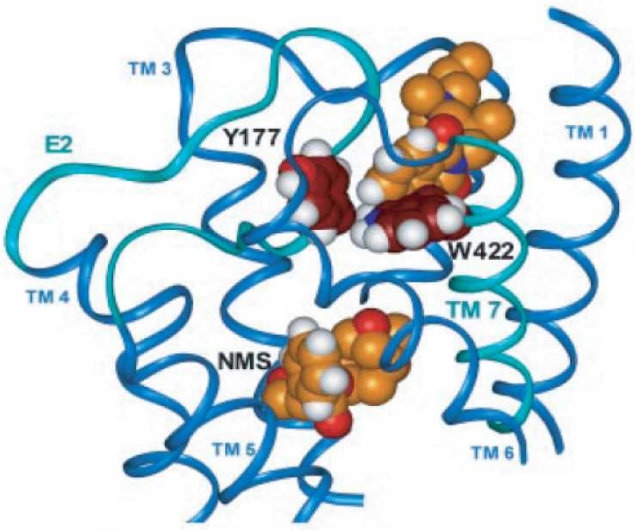



**Figure 42. Liaison de ligands ortho et allostériques au récepteur muscarinique M2.** Les deux ligands sont en jaune, les résidus Y177 et W422 du récepteur muscarinique M2 en rouge.(D'après **Jäger et coll., 2007**).

### 3.3. *Effet du DEET, à forte concentration, sur les récepteurs muscariniques des DUM neurones en présence de la toxine muscarinique MT7*

La toxine muscarinique (MT7) est un ligand antagoniste allostérique le plus sélectif des récepteurs muscariniques de type M1 chez l'homme (**Servent et Fruchart-Gaillard, 2009)**. Nous avons testé l'effet du DEET à forte concentration (1 µM et 10 µM) en présence de la toxine MT7 (10 nM). Nos résultats montrent que l'application du DEET à forte concentration (1 µM et 10 µM) réduit fortement l'amplitude du courant ($I_{mus}$) (**Tableau 16, Figure 43 A, B, C**). Par contre, l'application du DEET à forte concentration (1 µM et 10 µM) en présence de la toxine MT7 inhibe la réduction de l'amplitude du courant muscarinique observé en présence de DEET (**Tableau 16, Figure 43 C**). Ces résultats suggèrent que la présence de la MT7 (antagoniste spécifique de site allostérique négatif des mAChRs, **Servent et Fruchart-Gaillard, 2009 ; Marquer et coll., 2010)** bloque l'effet du DEET sur ce site allostérique négatif des mAChRs.

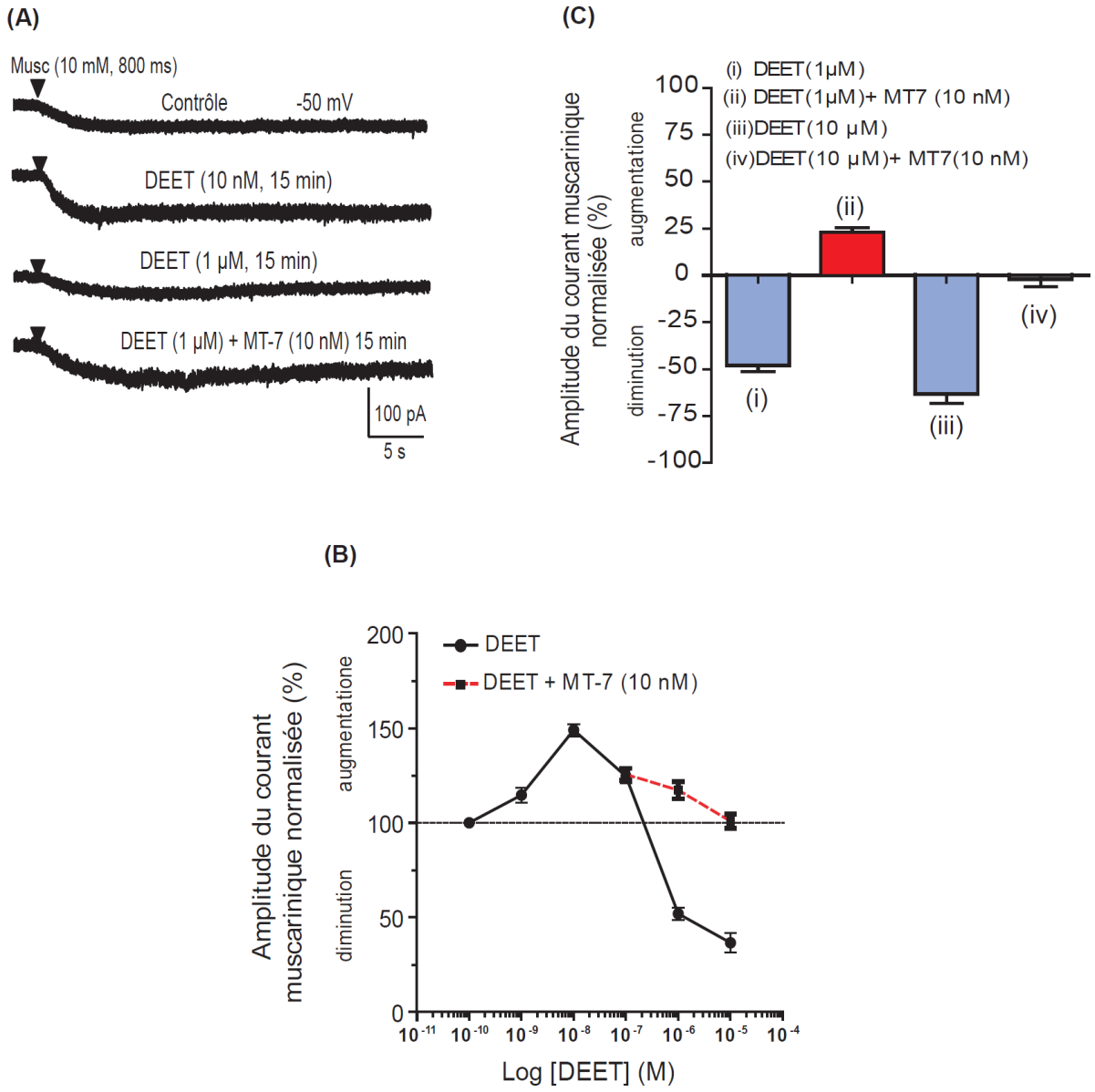



**Figure 43. Effets du DEET à faible et à forte concentrations seul et en présence de MT7 sur les mAChRs du DUM neurone de la blatte *P. americana*.** (A) Exemples de courants ioniques entrants induits par la muscarine (10 mM, 800ms, potentiel de référence à l'état stable de -50 mV). La muscarine (10 mM) est appliquée par éjection pneumatique (800 ms, 15psig) dans des conditions contrôles et après application du DEET à faible et forte concentrations seul et en présence de MT7 (10 nM). (B) Courbe dose-réponse de l'effet du DEET à faible et à forte concentrations seul et en présence de MT7 (10 nM) sur le courant muscarinique. (n= de 4 à 6 cellules chaque point). (C) Histogramme récapitulatif de l'effet du DEET à faible et à forte concentrations, seul et en présence de MT7 (10 nM) sur les mAChRs.

## C. Conclusions

Nos résultats jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence les effets synergiques entre le DEET, à faible concentration, et un carbamate le propoxur. Certaines études ont déjà signalé les interactions synergiques entre le DEET et certains autres produits chimiques, en particuliers les inhibiteurs de l'AChE tels que le propoxur, le pyrimiphos-méthyl, le piridostigmine Bromide (PB) sur les blattes et les moustiques (**Moss, 1996 ; Pennetier et coll., 2005 ; 2007 ; 2008 ; 2009**). Cependant les mécanismes physiologiques responsables de ces interactions restaient mal connus.

En combinant les techniques d'électrophysiologie de patch-clamp sur le DUM neurone et de l'oil-gap sur synapse, nous avons pu montrer, dans une première partie, que le DEET agit en augmentant indirectement le niveau de $[Ca^{2+}]_i$, qui est à l'origine des effets synergiques. De plus, nous avons montré que les mAChRs d'insecte constituent une nouvelle cible pour ce répulsif.

L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs muscariniques la PZP (100 nM) antagoniste des mAChRs de type M1 et le de 4-DAMP (100 nM) antagoniste des mAChRs de type M3, nous a permis de caractériser le type de récepteurs muscariniques à la fois dans l'effet du DEET et dans l'effet synergique observé. Ces données ont été confirmées par l'application du DEET sur la membrane postsynaptique des inter-neurones géant du DGA. Le DEET, à faible concentration produit une dépolarisation de la membrane postsynaptique par l'activation des mAChRs. Par contre l'application du DEET à forte concentration, inhibe les mAChRs. Ce double effet traduit un effet allostérique du DEET, confirmée par les expériences réalisés sur le DUM neurone.

Nos résultats révèlent que, l'application du DEET à faible concentration augmente l'amplitude du courant induit par la muscarine. Par contre, l'application du DEET à forte concertation réduit fortement l'amplitude de ce courant. En conclusion, le DEET à faible et à forte concentrations agit sur des sites allostériques positif et négatif des mAChRs, respectivement (**Figure 44A, B**).

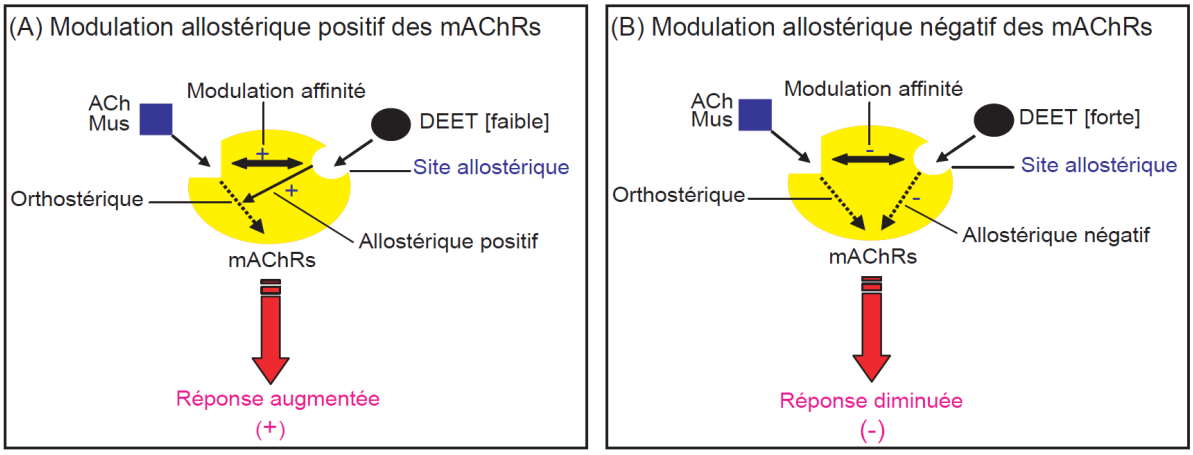



**Figure 44. Modulation allostérique positive et négative des mAChRs par le DEET.**

# 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 DEET sur neurones d'insecte, et d'autre part sur l'effet synergique du DEET avec d'autres insecticides carbamates et OP comme le propoxur et le chlorpyrifos-éthyl. De plus, un nouveau mécanisme d'action a été mis en évidence pour expliquer l'effet neurotoxique d'un répulsif qui peut se comporter dans certaines conditions comme un modulateur allostérique des mAChRs. De ces travaux, nous pouvons conclure que :

- L'AChE est présente au niveau de la membrane des DUM neurone de la blatte *P. americana*. Ces résultats ont été confirmés par l'application des inhibiteurs de l'AChE, l'ésérine, le BW284c51 et d'un carbamate le propoxur sur le DUM neurone.

- Le DEET inhibe l'activité de l'AChE du DUM neurone, car il est capable d'entrer en compétition avec l'ACh et le propoxur pour inhiber l'AChE

- L'application du DEET à faible concentration provoque un effet synergique du propoxur *via* l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. Ces résultats montrent que l'association de deux familles de molécules chimiques différentes augmente l'effet insecticide,

- L'application du DEET à faible et à forte concentration modifie l'activité des mAChRs aux niveaux synaptiques et extrasynaptiques.

- Le DEET à faible et à forte concentration agit sur des sites allostériques positifs et négatifs des mAChRs, respectivement.

- Les mécanismes responsables de la synergie entre le DEET et le propoxur sont maintenant bien connus. Le DEET, à faible concentration, agit directement sur un site allostérique positif des mAChRs, provoquant une augmentation de l'effet anti-AChE du propoxur.

- La voie de signalisation intracellulaire qui implique la PLC, la PI-PLC, l'IP3, le complexe Ca-CaM est en partie responsable de l'effet synergique induit par le DEET.

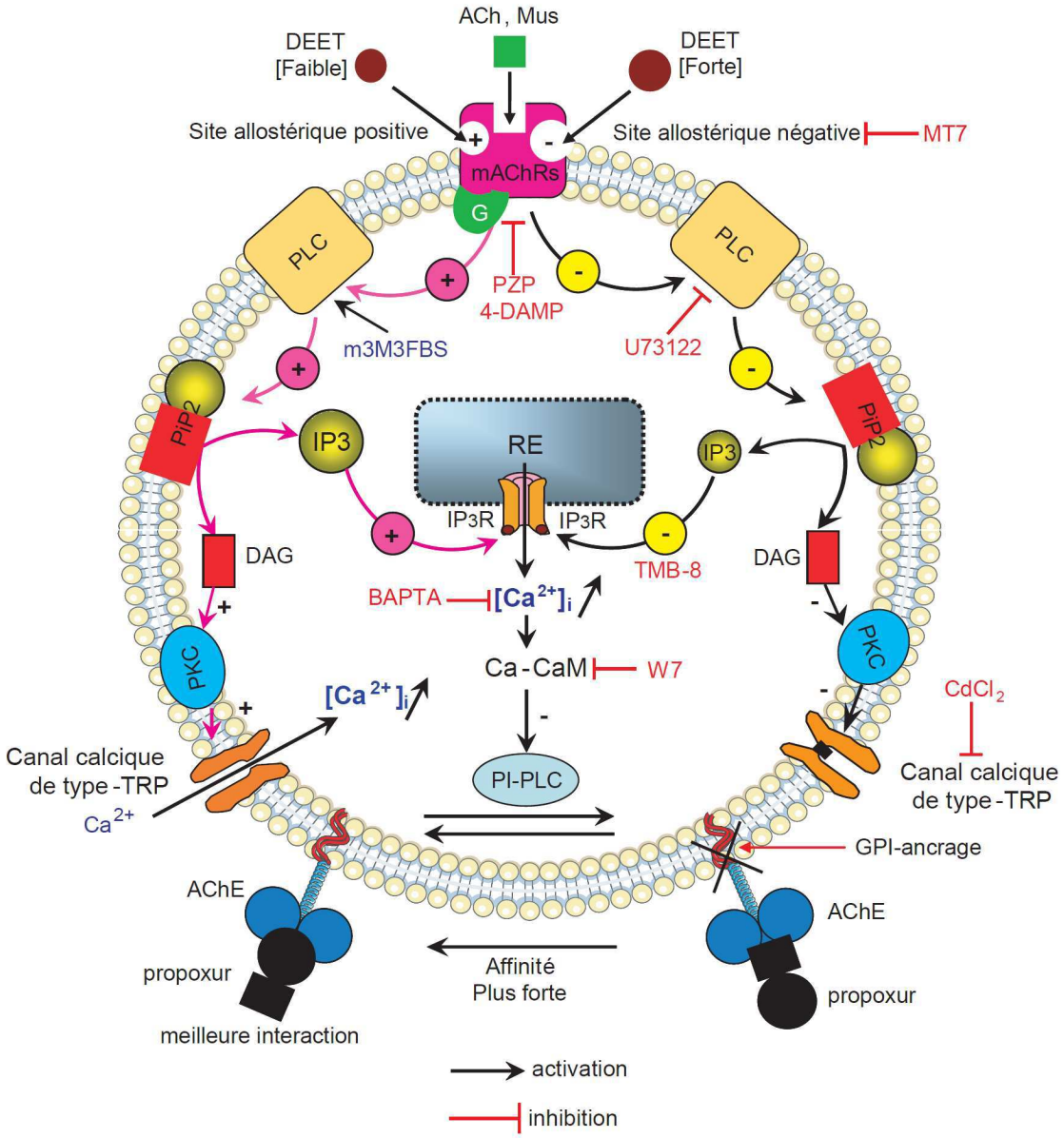



**Figure 45. Schéma récapitulatif des mécanismes physiologiques impliqués dans l'effet synergique observé entre le DEET et le propoxur sur en corps cellulaire de DUM neurone.**

La **figure 45** reprend les mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet synergique observé entre le DEET et le propoxur. Les récepteurs cholinergiques de type muscariniques (mAChRs) sont des cibles potentielles du DEET. Pour des faibles concentrations, l'effet du DEET est complexe. En effet, à faible concentration le DEET agit sur un site allostérique positif des mAChRs. L'activation de la protéine G qui en résulte stimule la PLC qui hydrolyse le $PIP_2$ en deux molécules qui vont jouer le rôle de seconds messagers : le DAG et l'$IP_3$ (**Hannan et Hall, 1993 ; Trimmer, 1995**). L'$IP_3$ qui se fixe sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique ($IP_3Rs$) provoque une libération du calcium intracellulaire dans le cytosol. La libération de calcium permet la formation d'un complexe Ca-CaM impliqué dans

la modulation d'une seconde enzyme la PI-PLC qui module l'activité de l'AChE membranaire. C'est cette modulation qui serait responsable du changement d'affinité de l'AChE pour le propoxur.

En conclusion, nous avons montré que l'effet neurotoxique du DEET sur le DUM neurone de la blatte *P. americana* est dû à plusieurs mécanismes. Nous avons identifié également une nouvelle cible moléculaire, les mAChRs, en plus de l'AChE, précédemment identifiée (**Corbel et coll., 2009**).

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes. Actuellement, avec le développement croissant des phénomènes de résistance chez les insectes, la recherche dans le domaine phytosanitaire s'oriente vers la découverte de nouvelles cibles pour les molécules à effet insecticide et ce dans le souci d'éviter des résistances croisées. Les interactions synergiques entre le DEET et le propoxur suggèrent qu'il est possible d'optimiser l'efficacité d'un traitement, tout en réduisant les doses.

A la vue de ces résultats, il apparaît indispensable 1) de poursuivre les recherches sur les modes d'action du DEET et des autres répulsifs et 2) d'étudier les mécanismes d'action physiologiques impliqués dans la synergie avec d'autres insecticides (OPs et carbamates). La poursuite de ces recherches est d'autant plus importante que les quantités de répulsifs appliquées sur la peau par des millions d'utilisateurs chaque année sont beaucoup plus importantes que celles appliquées sur des supports comme les moustiquaires. Il est donc nécessaire d'adapter le traitement pour obtenir de meilleures conditions d'utilisations et éviter des problèmes de santé publique et de santé environnementale.

Comme nous l'avons exposé à la fin de nos résultats, ce travail de thèse laisse envisager plusieurs perspectives sur les DUM neurones de la blatte *P. americana* :

- Cloner et séquencer les transcrits des AChE présents dans la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*.
- Identifier l'AChE, c'est-à-dire caractériser les sous-types et les isoformes de l'AChE des DUM neurones.
- Etudier le rôle physiologique du GPI-PLC sur l'activité de l'AChE du DUM neurone.

- Cloner et séquencer les transcrits des mAChRs présents dans la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*.

- Comprendre les interactions synergiques entre les autres répulsifs et les insecticides pour développer une nouvelle stratégie basée sur l'optimisation de l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses.

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

**Figure 1 :** Historique de l'utilisation des produits phytosanitaires. Modifié 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. ..... 17

**Figure 2 :** Structure chimiques des premiers produits phytosanitaires de synthèse, dévelopés dans la 1ère moitié du XXème siècle : ..... 20

**Figure 3 :** Le mécanisme d'action toxique des OPs et carbamates principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition de l'AChE en forme membranaire et soluble ..... 23

**Figure 4 :** Structure chimique générale des carbamates (A), structure chimique du propoxur (B) ..... 24

**Figure 5 :** Mécanisme d'action toxique d'un carbamate le propoxur (A) et d'un OP le chlorpyriphos-éthyl (B) sur l'activité de l'AChE (Modifié d'après Testud et Grillet, 2007)..... 25

**Figure 6 :** Structure chimique générale des OPs (A) et structure chimique du chlorpyriphose-éthyl (B) ..... 26

**Figure 7 :** Le mécanisme d'action toxique des OPs et carbamates principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition de l'AChE en forme membranaire et soluble et l'accumulation de l'ACh agit sur un mAChR présynaptique qui est responsable de l'activation d'un mécanisme de 'feed-back' négatif sur la libération du neurotransmetteur (Modifié d'après Corbel et coll., 2006) ..... 27

**Figure 8 :** Structure chimique du citriodiol ..... 31

**Figure 9 :** Structure chimique de l'IR 3535..... 32

**Figure 10 :** Structure chimique du KBR 3023..... 33

**Figure 11 :** Structure moléculaire du DEET (*diéthyl-m-toluamide)*..... 33

**Figure 12 :** (A) Parts de marché des différentes classes d'insecticides au niveau mondial, (D'après Nauen, 2006). (B) Cibles des insecticides neurotoxiques (Modifié d'après, Phillips McDougall, november 2006, www.fao.org) ..... 40

**Figure 13 :** (A) Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides. (B) Représentation schématique d'une synapse GABAergique entre deux neurones avec les cibles principales des insecticides (Modifié d'après Raymond-Delpech et coll., 2005) . 42

**Figure 14 :** (A) Structure de l'AChE d'insecte (Modifié d'après Eldefrawi, 1985; Turdean et coll., 2002). (B) Différentes formes d'AChE chez les invertébrés (Modifié d'après Simons et coll., 1978 ; Belzunces et coll.,

1998a,b ; Rotundo, 2003 ; Badio et coll., 2007). (C) Structure du glycolipide d'ancrage de type (GPI) avec l'AChE et effet du PI-PLC (Modifié d'après Toutan et coll., 1991). ..... 45

**Figure 15 :** Mécanisme d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE (Modifié d'après Eldefrawi, 1985 ; Gallivan et Dougherty, 1999 ; Turdean et coll., 2002 ; Testud et Grillet, 2007) ..... 48

**Figure 16 :** (A) Structure pentamérique des nAChRs et structure des sous-unités qui les composent. (B) Les sous-unités de type α possèdent un doublet de cystéine absent chez les sous-unités de type non- α. La deuxième boucle cytoplasmique possède des sites de régulation par phosphorylation du canal. (C) ) Exemples de récepteurs et homomériques hétéromérique chez plusieurs espèces d'insectes (D'après Thany et coll., 2007 ; B, Modifié d'après Mastuda et coll., 2001, 2005) ..... 51

**Figure 17 :** Structure moléculaire d'un récepteur muscarinique de mammifère, la région proximale de la 3ème boucle cytoplasmique joue un rôle primordial dans le couplage récepteur-protéine G (Modifiée d'après Kuba et coll., 1989; Bockaert et Pin 1999; Eglen et coll., 2001; Kristiansen, 2004). ..... 53

**Figure 18 :** Augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistanes aux insecticides en fonction de l'apparition de nouvelles classes d'insecticides utilisées à grande échelle. (D'après Denholm et coll., 2002).. ..... 55

**Figure 19 :** Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez l'insecte (A) sensible et (B) résistant. (Modifié d'après Lapied et coll., 2009) ..... 57

**Figure 20 :** (A) Représentation schématique d'une coupe transversale du site catalytique de l'AChE (D'après Silman et Sussman, 2008). (B) Modèle 3D de l'AChE avec les 7 mutations (rouge) impliquées dans la résistance aux insecticides. Toutes ces mutations sont proches du site actif (vert) chez les *D. melanogaster* (F115, I199, G303, F368) et les mouches *M. domestica* (V220, G303, F368, G406) (d'après Menozzi et coll.,, 2004). (C) Modélisation 3D de ace1 chez les mostiques. (D) La triade catalytique d'ace-1 de la souche résistante d'*A. gambiae* S119. (E) La triade catalytique d'ace-1 de la souche sensible d'*A. gambiae* G119 (d'après Weill et coll., 2004). ..... 59

**MATERIELS ET METHODES**

**Figure 21 :** (A) Photographie de la blatte mâle adulte *P. americana*. (B) Représentation schématique du système nerveux central (en rouge) de la blatte *P. americana*. (C) Photographie montrant la localisation médiane des corps cellulaires des DUM neurones in situ du DGA de la blatte mâle révélés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (Sinakevitch et coll., 1996). (D) Représentation schématique d'une coupe sagittale du DGA de la blatte *P. americana*, précisant la localisation des DUM neurones (en noir) identifiés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (D'après Sinakevitch et coll., 1996). (E) Représentation schématique de la morphologie des différents types de DUM neurones chez le criquet (d'après Burrows, 1996).. ..... 63

**Figure 22 :** (A) Morphologie d'un DUM neurone efférent de l'îlot antérieur du DGA de la blatte *P. 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; Dugravot et coll., 2003 ; Defaix et Lapied, 2005; Lavialle-Defaix et coll., 2006). ..... 65

**Figure 23 :** Principales étapes de la technique de dissociation cellulaire pour obtenir les corps cellulaires de DUM neurones du DGA de la blatte *P. americana*. DGA : Dernier ganglion abdominal (Modifié d'après Lapied et coll., 1989)..... 71

**Figure 24 :** (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 ».. ..... 73

**Figure 25 :** 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 boite 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 (Réf). 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 labmaster TL125..... 75

**Figure 26 :** Technique de dissociation cellulaire de DUM neurone et technique biochimique colorimétrique pour mesurer l'activité de l'AChE.. ..... 79

**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**Figure 27 :** Effets comparés des inhibiteurs de l'AChE du DUM neurones de la blatte *P. americana*, comme l'ésérine (Esér), (100 nM), le BW281c51 (100 nM) et d'un insecticides carbamate le propoxur (Prop), (100 nM) sur les courants ioniques induits par l'ACh (1M, 300 ms). (A) Exemples de courants ioniques entrant induits par l'ACh, enregistrés pour un potentiel de référence à l'état stable de -50 mV en condition contrôle et après application extracellulaire de l'ésérine, du BW284c51 et du propoxur pendant (15 min) en présence d'α-BGT. Histogrammes comparant les effets de l'ésérine, du BW284c51 et du propoxur sur la durée mesurée à 50 % de l'amplitude maximum (B) et sur l'amplitude (C) du courant induit par l'ACh... 83

**Figure 28 :** Effets intracellulaire et extracellulaire du propoxur sur l'activité de l'AChE du DUM neurone de la blatte *P. americana.* (A) Histogrammes comparant les effets intracellulaire (Intra) et extracellulaire (Extra) du propoxur (100 nM appliqué pendant 15 min) sur l'activité de l'AChE. (B) Schéma récapitulatif résument l'effet du propoxur sur l'ACHE membranaire. ... ..... 84

**Figure 29 :** Dosage de l'activité AChE des DUM neurones de la blatte *P. americana* contrôle et en présence de propoxur à utilisé des concentrations croissantes ($10^{-8}$ à $10^{-6}$ M). (A) Courbe d'inhibition dose-dépendante de l'effet du propoxur sur l'activité enzymatique de l'AChE. (B) Histogramme représentant la concentration de propoxur qui inhibe 50% de l'activité de l'AChE ($CI_{50}= 2.10^{-8}$M)..... 85

**Figure 30 :** Effets du DEET sur l'activité de l'AChE des DUM neurones. (A) Histogramme comparatif des effets dose-dépendants du DEET (10 nM, 100 nM, 1 µM) sur la durée et (B) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh. La durée du courant ionique (mesurée à 50 % de l'amplitude) est exprimée en pourcentage de contrôle. (C) Histogramme illustrant des effets du DEET (1 µM,) sur la durée et (D) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh après prétraitement du propoxur (100 nM). (E) Histogramme comparatif des effets du propoxur (100 nM) sur la durée et (F) sur l'amplitude du courant induit par l'ACh après prétraitement au DEET (1 µM).. ..... 87

**Figure 31 :** Effet du DEET à faible concentration (10 nM) sur l'activité anti-AChE seul et associé avec insecticide carbamate, le propoxur. Histogrammes comparant les effets i) du DEET à faible concentration (10 nM), ii) du propoxur (100 nM) et iii) du propoxur (100 nM) en présence du DEET (10 nM) sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh. Courbes dose-réponse comparant l'effet du propoxur seul et d'un mélange propoxur+DEET sur la durée (C) et l'amplitude (D) du courant induit par l'ACh. ..... 92

**Figure 32 :** Effet du DEET sur la concentration de calcium intracellulaire des DUM neurones de la blatte *P. americana*.. ..... 93

**Figure 33 :** Effets de la variation de la concentration en calcium intracellulaire sur les effets anti-AChE du propoxur. Histogrammes comparatifs illustrant les effets du BAPTA (10 mM) et de la caféine (10 mM) sur l'effet du propoxur mesuré sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh . ..... 94

**Figure 34 :** Effets du chlorure de cadmium sur les effets synergiques induit par le DEET. Histogrammes comparatifs illustrant les effets du $CdCl_2$ (0.5 mM) sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh et sur l'effet synergique induit par le DEET..... 95

**Figure 35 :** Histogramme comparatif illustrant les effets du TMB-8 (100 µM) ajouté à la solution extracellulaire sur l'effet synergique induit par le DEET... ..... 96

**Figure 36 :** Rôles du complexe $Ca^{2+}$-CaM et de la PLC sur l'effet synergique du propoxur induit par le DEET. Histogramme comparatif illustrant les effets du W7 (0.5 mM) ajouté dans la solution intrapipette (A) et les effets du U73122 et m3M3FBS (B) sur l'effet synergique induit par le DEET. ..... 98

**Figure 37 :** Effet synergique induit par le DEET utilisé à faible concentration (10 nM) sur l'activité anti-AChE d'un OP le chlorpyriphos-éthyl (CPP) sur le DUM neurone de la blatte *P. americana*. Histogramme récapitulatif des effets du CPP seul (1 µM) sur la durée (A) et sur l'amplitude (B) du courant induit par l'ACh et après prétraitement au DEET (10 nM). Courbes dose-réponses comparant l'effet du CPP seul et du CPP après prétraitement avec le DEET (10 nM) sur la durée (C) et sur l'amplitude (D) du courant induit par l'ACh.. ..... 100

**Figure 38 :** Effets du DEET à faible et à forte concentrations sur les mAChRs de la transmission synaptique de la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana* . (A) Schéma récapitulatif de la technique de l'oil-gap synaptique pour enregistrer les événements synaptiques (Modifié d'après **Hue et Callec, 1990**). (B) Effet du DEET à faible et forte concentration (500 nM, 0.01 mM) seul et en présence d'atropine sur la membrane

postsynaptique. (C) Histogramme récapitulatif de l'effet du DEET à faible et à forte concentrations seule et en présence de l'atropine sur la membrane postsynaptique..... 104

**Figure 39 :** Implication des récepteurs cholinergiques de type muscariniques dans l'effet synergique induit par le DEET au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana*. Histogramme comparatif de l'effet des antagonistes spécifiques des mAChRs, la PZP (100 nM, M1) et le 4-DAMP (100 nM, M3) sur l'effet du DEET (10 nM) testé seul (A) et sur l'effet synergique induit par le DEET (B)..... 106

**Figure 40 :** Implication des mAChRs de type M1 dans l'effet synergique induit par le DEET au niveau du DUM neurone de la blatte *P. americana*. (A) Histogramme comparatif de l'effet d'une solution sans EGTA sur l'effet du DEET (10 nM) testé seul en presence de PZP (100 nM). (B) Histogramme comparatif d'une solution intrapipette sans EGTA sur l'effet synergique du mélange DEET (10 nM) / propoxur (100 nM)..... 107

**Figure 41 :** Courants induits par l'activation des récepteurs muscariniques ($I_{mus}$) suite à l'application de muscarine sur les DUM neurone de la blatte *P. americana*. (A) Exemples des courants ioniques entrant induits par la muscarine (10 mM) et enregistrés pour un potentiel de référence à l'état stable de -50 mV. (B) Courbe dose-réponse de l'amplitude du courant ($I_{mus}$) obtenue lors de l'application par éjection pneumatique de la muscarine 10 mM (50, 100, 300, 500, 800, 1000 ms, 15psig) sur les DUM neurones isolés..... 109

**Figure 42 :** Liaison de ligands ortho et allostérique au récepteur muscarinique M2. Les deux ligands sont en jaune, les résidus Y177 et W422 du récepteur muscarinique M2 en rouge. (D'après Jäger et coll., 2007).... ..... 111

**Figure 43 :** Effets du DEET à faible et à forte concentrations seul et en présence de MT7 sur les mAChRs du DUM neurone de la blatte *P. americana*. (A) Exemples de courants ioniques entrants induits par la muscarine (10 mM, 800ms, potentiel de référence à l'état stable de -50 mV). La muscarine (10 mM) est appliquée par éjection pneumatique (800 ms, 15psig) dans des conditions contrôles et après application du DEET à faible et forte concentrations seul et en présence de MT7 (10 nM). (B) Courbe dose-réponse de l'effet du DEET à faible et à forte concentrations seul et en présence de MT7 (10 nM) sur le courant muscarinique. (n= de 4 à 6 cellules chaque point). (C) Histogramme récapitulatif de l'effet du DEET à faible et à forte concentrations, seul et en présence de MT7 (10 nM) sur les mAChRs..... 113

**Figure 44 :** Modulation allostérique positive et négative des mAChRs induit par le DEET..... 115

**Figure 45 :** Schéma récapitulatif des mécanismes physiologiques impliqués dans l'effet synergique observé entre le DEET et le propoxur d'un corps cellulaire de DUM neurone..... 117

# LISTE DES TABLEAUX

**MATERIELS ET METHODES**

**Tableau 1:** Récapitulation des différents types de courants ioniques membranaires responsables de l'activité électrique spontanée des DUM neurones du DGA de la blatte *P. americana*. (* résultats obtenus sur le ganglion A5) (Modifié d'après Grolleau et Lapied, 2000)**.** ..... 66

**Tableau 2** : Compositions des liquides physiologiques (LP) utilisés pour la technique de dissociation cellulaire. ..... 70

**Tableau 3 :** Composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées lors des expériences de patch-clamp. . ..... 76

**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**Tableau 4 :** Effets des inhibiteurs de l'AChE sur l'amplitude et la durée mesurée à 50 % de l'amplitude du courant induit par l'ACh des DUM neurones de la blatte *P. americana*. ..... 82

**Tableau 5 :** Effets du DEET sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*. ..... 86

**Tableau 6 :** Effets du DEET à fort concentration (1µM) après prétraitement du propoxur (100 nM) et effet du propoxur après prétraitement au DEET (1µM) sur la durée et de l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*. ..... 88

**Tableau 7 :** Effet du DEET, à faible concentration, utilisé seul ou en association avec le propoxur sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane des DUM neurones de la blatte *P. americana*..... 91

**Tableau 8 :** Comparaison des concentrations effectives produisant 50 % d'effet du propoxur utilisé seul et d'un mélange propoxur+DEET sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane du DUM neurone ..... 92

**Tableau 9 :** Effets du BAPTA (10 mM) et de la caféine (10 mM) sur l'effet anti-AChE du propoxur (100 nM). ..... 94

**Tableau 10:** Effet du chlorure de cadmium sur l'effet synergique induit par le DEET utilisé seul à faible concentration (10 nM) et en association avec le propoxur (100 nM) ..... 95

**Tableau 11 :** Effets d'un inhibiteur du complexe $Ca^{2+}$-CaM et des inhibiteurs et inhibiteurs de la PLC sur l'effet synergique induit par le DEET ..... 97

**Tableau 12 :** Effets synergique induit par le DEET utilisé à faible concentration sur l'activité anti-AChE d'un OP le chlorpyriphos-éthyl au niveau de la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana*. ..... 99

**Tableau 13 :** Comparaison des concentrations effectives qui produisent 50 % ($EC_{50}$) des effets du CPP utilisé seul en présence de DEET (10 nM) sur la durée et l'amplitude du courant induit par l'ACh au niveau de la membrane du DUM neurone. ..... 100

**Tableau 14 :** Effet des antagonistes des mAChRs sur l'effet du DEET utilisé seul et sur l'effet synergique induit par le DEET..... 105

**Tableau 15 :** Effet d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire en présence de PZP sur l'effet synergique induit par le DEET ..... 107

**Tableau 16 :** Caractérisation de l'effet allostérique du DEET sur les mAChRs, utilisé seul et en présence de la toxine MT-7 (10 nM) au niveau de la membrane du DUM neurone de la blatte *P. americana*. ..... 111

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abdel-Rahman A., Abou-Donia S., El-Masry E. M., Shetty A. and Abou-Donia M. B. (2004a).** Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health, A* 67: 163-192.

**Abdel-Rahman A., Dechkovskaia A. M., Goldstin L. B., Bullman S. H., Khan W., El-Masry E. M. and Abou-Donia M. B. (2004b).** Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health, A* 67: 331-356.

**Abou-Donia M. B., Dechkovskaia A. M., Goldstein L. B., Abdel-Rahman A., Bullman S. L. and Khan W. A. (2004).** Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 77(2): 253-262.

**Abou-Donia M. B., Wilmarth K. R., Abdel-Rahman A. A., Jensen K. F., Oehme F. W. and Kurt T. L. (1996).** Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundam Appl Toxicol*, 34(2): 201-222.

**ACTA (2006)**. Index phytosanitaire. Paris: Action de Coordination des Techniques Agricoles, 824 p.

**Ahoua Alou L.P., Koffi A. A., Adja M. A., Tia E., Kouassi P. H., Koné M. and Chandre F. (2010).** Distribution of *ace-1*$^{R}$ and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae s.s.* populations from Côte d'Ivoire. *Mala J*, 9: 167.

**Albuquerque E. X., Pereira E. F. R., Alkondon M. And Rogers S. W. (2009).** Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: structure and function. *Physiol Rev*, 89: 73-120.

**Alix P., Grolleau F. and Hue B. (2002).** C2+/calmodulin-dependent protein kinase regulates GABA-activated Cl- current in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol,* 87: 2972-2982

**Annis B. (1991).** Comparison of the effectiveness of two deet formulations against *Aedes albopictus* in the Philippines. *J Am Mosq Control Assoc, 7*: 543.

**Arpagaus M., Richier P., Berge J. B. and Toutant J. P. (1992).** Acetylcholinesterases of the nematode *Steinernema carpocapsae. Eur J Biochem,* 207:1101-1108.

**Badiou A., Brunet J.L. and Belzunces L. P. (2007).** Existence of two membrane-bound acetylcholinesterase in the honey bee head*. Archives Insect Biochemi Physiol*, 66: 122-134.

**Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., Ouedraogo A. P. and Costantini C. (2004).** Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop Med Int Health,* 9: 330-334.

**Barnard D. R. and Xue R. D. (2004).** Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus, Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (*Diptera: Culicidae*). *J Med Entomol,* 41: 726.

**Belzunces L. P., Lenoir-Rousseaux J. J. and Bounias M. (1988a).** Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads. *Insect Biochem.* 18: 811-819.

**Belzunces L. P., Toutant J. P. and Bounias M. (1988b).** Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochem J,* 255:463-470.

**Bentley G. N., Jones A. K. and Agnew A. (2003).** Mapping and sequencing of acetylcholinesterase genes from the platyhelminth blood fluke *Schistosoma*. *Gene,* 314: 103-112.

**Bernard J. L. and Rameil V. (2005).** Innovation en protection des plantes et consommation des produits phytosanitaires. Evolutions constatées sur des marchés majeurs. *Phytoma,* 584: 17-32.

**Bicker G. (1996).** Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. *J Neurosci Methods*, 69 (1): 33-41.

**Birkenbeil H. and Dedos S. G. (2002).** $Ca^{2+}$ as second messenger in PTTH-stimulated prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32:1625–1634.

**Bloomquist J. R. (1996).** Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol*, 41: 163-190.

**Bockaert J. and Pin J. P. (1999).** Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J,* 18(7): 1723-1729.

**Bohbot J. D. and Dickens J. C. (2010).** Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity. *PLOSONE*, 5(8): e12138.

**Bonnet J., Pennetier C., Duchon S., Lapied B. and Corbel V. (2009).** Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 2:17.

**Bordier C., Etges R. J., Ward J., Turner M.J. and Cardoso de Almeida M. L. (1986).** *Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycophospholipid membrane anchor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 5988-5991.

**Boulanger N. (2007).** Quelles mesures de prévention primaire peut-on proposer pour éviter une borréliose de Lyme ? *Med Maladies Infect,* 37: 456-462.

**Bourguet D., Capela, R. and Raymond M. (1996).** An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* L. mosquitoes from Portugal. *J Econ Entomol,* 89:1060-1066.

**Bourguet D., Raymond M., Fournier D., Malcolm C. A., Toutant J. P., and Arpagaus M. (1996).** Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Neurochem,* 67(5): 2115-2123.

**Braünig P. and Pflüger H. J. (2001).** The unpaired median neurons of insects. *Adv Insect Physiol,* 28: 185-266.

**Brooke W., Bissinger R. and Michael Roe R. (2010).** Tick repellents: past, present and future. *Pesticides Biochem Physiol*, 96: 63-79.

**Buckingham S. D., Hue B. and Sattelle D. B. (1994).** Actions of bicuculline on cell body and neuropilar membranes of identified insect neurones. *J Exp Biol*, 186:235-244.

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

**Buescher M. D., Rutledge L. C. and Wirtz R. A. (1982).** Tests of commercial repellents on human skin against *Aedes aegypti. Mosquito News,* 42: 428.

**Burrows M. (1996).** The neurobiology of an insect brain. *Oxford University Press, Oxford*, 669 pp.

**Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M. P. and Coquet Y. (2005).** Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. *Editions France Agricole,* 637 p.

**Carpenter S., Eyres K., McEndrick I., Smith L., Turner J., Mordue W. and Mordue Luntz A.J. (2005).** Repellent efficiency of Bayrepel against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitol Res*, 95: 427-429.

**Carroll J. F., Klun J. A. and Debboun M. (2005).** Repellency of two species of ticks (Acari: Ixodidae) by DEET and SS220 applied to skin involves olfactory sensing. *Med Vet Entomol,* 19: 1-6.

**Cavanagh H. M. and Wilkinson J. M. (2002).** Biological activity of lavender essential oil. *Phytother Res*, 16(4): 301-308.

**Champ P. (1985).** Mode d'action et utilisation des organophosphorés. Mode d'action et utilisation des insecticides : Insectes, insecticides, santé. Paris, Publication A.**:** 207-223.

**Chaney L. A., Rockhold R. W., Mozingo J. R., Hume A. S. and Moss J. I. (1997).** Potentiation of pyridostigmine bromide toxicity in mice by selected adrenergic agents and caffeine. *Vet Hum Toxicol,* 39: 214-219.

**Chaney L. A., Wineman R. W., Rockhold R. W., Hume A. S. (2000).** Acute effects of an insect repellent, N, N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. *Toxicol Appl Pharmacol,* 165: 107-114.

**Chareonviriyaphap T., Roberts D. R., Andre R. G., Harlan H. J., Manguin S., and Bangs M. J. (1997).** Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Control Assoc,* 13: 171.

**Christopoulos, A. (2002).** Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov,* 1(3): 198-210.

**Cilek J. E., Petersen J. L. and Hallmon C. E. (2004).** Comparative efficacy of IR3535 and DEET as repellents against adult *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus. J Am Mosq Control Assoc,* 20: 299.

**Coleman R. E., Robert L. L., Roberts L. W., Glass J. A., Seeley D. C., Laughinghouse A., Perkins P. V. and Wirtz R. A. (1993).** Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol, 30*: 499.

**Collins F. H. and Paskewitz S. M. (1995).** Malaria: current and future prospects for control. *Annu Rev Entomol*, 40: 195-219.

**Combemale P. (2001).** La prescription des répulsifs. *Med Trop*, 61: 99-103.

**Corbel V., Chandre F., Darriet F., Lardeux F., and Hougard J. M. (2003).** Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol,* 17: 158-164.

**Corbel V., Darriet F., Chandre F. and Hougard J. M. (2002).** Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite*, 9: 255-259.

**Corbel V., Raymond M., Chandre F., Darrier F. and Hougard J. M. (2004).** Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Manag Sci,* 60: 375-380.

**Corbel V., Stankiewicz M., Bonnet J., Grolleau F., Hougard J. M. and Lapeid B. (2006).** Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicol,* 1-12.

**Corbel V., Stankiewicz M., Pennetier C., Fournier D., Stojan J., Girard E., Dimitrov M., Molgó J., Hougard J. M. and Lapied B. (2009).** Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol,* 7: 47.

**Costa L. G. (2006)**. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta,* 366: 1-13.

**Costantini C., Badolo A. and Ilboudo-Sanogo E. (2004).** Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes, *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 98: 644.

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

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

**Curtis C. F., Lines J. D., Ijumba J., Callaghan A., Hill N. and Karimzad M. A. (1987).** The relative efficacy of repellents against mosquito vectors of disease. *Med Vet Entomol,* 1: 109

**Dabiré K. R., Diabate A., Djogbénou L., Ouari A., N'Guessan R., Ouedraogo J. B., Hougard J. M., Chandre F. and Baldet T. (2009).** Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J*, 8(7): 188.

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

**Darriet F., Corbel V. and Hougard J. M. (2003).** Efficacy of mosquito nets treated with a pyrethroid organophosphorous mixture against Kdr- and Kdr+ malaria vectors (*Anopheles gambiae*). *Parasite*, 10: 359-362.

**Darriet F., Hougard J. M. and Corbel V. (2005).** Effect of pyrethoid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Bull Soc Pathol Exot*, 98: 201-204.

**Davis, E. E. (1985).** Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol,* 22: 237-243.

**Davitz M. A., Low M. G. and Nussenzweig V. (1986).** Release of decay accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Exp Med,* 163: 1150-1161.

**Day K. E. and Scott I. M. (1990).** Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat Toxicol*, 8: 101-114.

**Debboun M., Frances S. P. and Strickman D. (2007).** Insect repellents: principles, methods, and uses. *CRC Press, Taylor & Francis Group*.

**Debboun M., Strickman D. A. and Klun J. A. (2005).** Repellents and the military: our first line of defense. *J Am Mosq Control Assoc,* 21 (supplément au no 4): 4-6.

**Debboun M., Strickman D. A., Solberg V. B., Wilkerson R. C., McPherson K. R., Golenda C., Keep L., Wirtz R. A., Burge R. and Klein T. A. (2000).** Field evaluation of deet and a piperidine repellent against *Aedes communis (*Diptera: Culicidae) and *Simulium venustum* (Diptera: Simuliidae) in the Adirondack Mountains of New York. *J Med Entomol, 37*: 919.

**Defaix A. and Lapied B. (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: 135-146.

**Denholm I., Devine G. J. and Williamson M. S. (2002).** Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science,* 297: 2222-2223.

**Derst C., Messutat S., Walther C., Eckert M., Heinemann S. H. and Wicher D. (2003).** The large conductance $Ca^{2+}$-activated potassium channel (pSlo) of the cockroach *Periplaneta americana*: structure, localization in neurons and electrophysiology. *Eur J Neurosci,* 17: 1197-1212.

**Di Angelantonio S. and Nistri A. (2001).** Calibration of agonist concentrations applied by pressure pulses or via rapid solution exchanger. *J Neurosci Methods*, 110 (1-2): 155-161.

**Ditzen M., Pellegrino M. and Vosshall L. B. (2008).** Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, 319(5871): 1838-1842.

**Djogbénou L., Chandre F., Berthomieu A., Dabire R., Koffi A., Alout H. and Weill M. (2008).** Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS One*, 3: e2172.

**Djogbénou L., Noel V. and Agnew P. (2010).** Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J,* 9: 12.

**Dogan E. B., Ayres J. W. and Rossignol P. A. (1999).** Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. *Med Vet Entomol,* 13: 97-100

**Dong K. (2007).** Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*, 7 (1): 17-30.

**Dugravot, S., Grolleau F., Macherel D., Rochetaing A., Hue B., Stankiewicz, M., Huignard J. and Lapied B. (2003)**. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect $K_{ATP}$ channels. *J Neurophysiol,* 90: 259-270.

**Durrheim D. N. and Govere J. M. (2002).** Malaria outbreak control in an African village by community application of 'deet' mosquito repellent to ankles and feet. *Med Vet Entomol*, 16(1): 112-115.

**Eamsila C., Frances S. P. and Strickman D. (1994).** Evaluation of permethrin-treated military uniforms for personal protection against malaria in northeastern Thailand, *J Am Mosq Control Assoc,* 10: 515.

**Eddleston M., Singh S. and Buckley N. (2005).** Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid,* 13: 1744-1755.

**Eglen R. M., Choppin A. and Watson N. (2001).** Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sc, 22*: 409-414.

**Eldefrawi A. T. (1985).** Acetylcholinesterases and anticholinesterases. *In*: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, eds.). *Pergamon Press, Oxford,* pp. 115-130.

**Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Feather-Stone R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.

**Enayati A. A., Vatandoost H., Ladonni H., Townson H. and Hemingway J. (2003).** Molecular evidence for kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol*, 17: 138-144.

**Englund P. T. (1993).** The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem*, 62: 121-138.

**Fellner S. K., Rybczynskib R. and Gilbertb L. I. (2005).** Ca2+ signaling in prothoracicotropic hormone-stimulated prothoracic gland cells of *Manduca sexta*: Evidence for mobilization and entry mechanisms. *Insect Biochem Mol Biol*, 35: 263–275.

**Ferguson M. A. J. (1988).** Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem,* 57: 285-320.

**Ferguson M. A. J. (1992).** Site of palmitoylation of a phospholipase C-resistant glycosylphosphatidylinositol membrane anchor*. Biochem J,* 284: 297-300.

**Feyereisen R. (1995)**. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett,* 82/83: 83-90.

**Fournier D. and Mutéro A. (1994).** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol,* 108 C: 19-31.

**Fournier D., Bride J. M., Karch F. and Bergé J. B. (1988a).** Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster:* Identification of two subunits encoded by the same gene. *FEB, Vol* 238(2): 333-337.

**Fournier D., Bergé J. B., Cardoso de Almeida M. L. and Bordier C. (1988b).** Acetylcholinesterase from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycophospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase*. J Neurochem,* 50(4): 1158-1163.

**Fournier D., Cuany A., Bride J. M. and Berge J. B. (1987).** Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L). *J Neurochem,* 49: 1455-1461.

**Fradin M. S and Day J. F. (2002).** Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med,* 347: 13-18.

**Fradin M. S. (1998).** Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. *Ann Intern Med*, 128(11): 931-940.

**Fradin M. S. (2001).** Insect repellents dans comprehensive dermatologic drug therapy. Wolvertun SE, ed., Philadelphia, pp. 717-734.

**Frances S. P., Cooper R. D., Popat S. and Sweeney A. W. (1999).** Field evaluation of the repellents DEET, CIC-4 and AI3-37220 against *Anopheles* in Lae, Papua New Guinea. *J Am Mosq Control Assoc,* 15: 339.

**Frances S. P., Eikarat N., Sripongsai B. and Eamsila C. (1993).** Response of *Anopheles dirus* and *Aedes albopictus* to repellents in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc, 9*: 474.

**Frances S. P., Klein T. A., Hildebrandt D. W., Burge R., Noigamol C., Eikarat N., Sripongsai B. and Wirtz R. A.(1996).** Laboratory and field evaluation of deet, CIC-4, and AI3-37220 against *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Med Entomol,* 33: 511.

**Frances S. P., Van Dung N., Beebe N. W. and Debboun M. (2002).** Field evaluation of repellent formulations against daytime and nighttime biting mosquitoes in a tropical rainforest in northern Australia. *J Med Entomol*, 39: 541.

**Frances S. P., Waterson D. G., Beebe N. W. and Cooper R. D. (2004).** Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia. *J Med Entomol,* Vol. 41(3): 414-417.

**Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Marquer C., Ménez A. and Servent D. (2006).** Identification of various allosteric interaction sites on M1 muscarinic receptor using 125I-Met35-oxidized muscarinic toxin 7. *Mol Pharmacol*, 69(5): 1641-51.

**Fukuto R. T. (1990).** Mechanism of action of organphosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*, 87: 245-257.

**Futerman A. H. and Silman I. (1989).** Covalently attached phosphatidylinositol as the membrane anchoring domain of acetylcholinesterase and other membrane proteins. *In*: Freysz L, Hawthorne JN, Toffano G (eds): Neurochemical Aspects of Phospholipid Metabolism, Vol. 20. Fidia Research. Padova: Livana Press, pp. 83-93.

**Futerman A. H., Low M. G., Michaelson D. M. and Silman I. (1985).** Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Neurochem,* 45: 1487-1494.

**Gaillardon P., Leroux P. and Delorme R. (2001).** Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles : I - Les herbicides. *Phytoma,* 544: 10-16.

**Gallivan J. P. and Dougherty D. A. (1999).** Cation-π interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci USA,* 96: 9459-9464.

**Ganesalingam V.K. (1987).** Use of the neem plant in Sri Lanka at the farmer's level. *Proc 3rd Int Neem Conf, Nairobi,* pp. 95-100.

**Gao J. R., Kambhampati S. and Zhu K. Y. (2002).** Molecular cloning and characterization of a green bug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase

possibly evolved from a duplicate gene lineage. *Insect Biochem Mol Biol,* 32: 765-775.

**Gardulf A., Wohlfart A. and Gustafson R. (2004).** A prospective cross-over field trial shows protection of lemon eucalyptus extract against tick bites. *J Med Entomol,* 41: 1064-1067.

**Gautier H. (2007).** 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. Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers, 245 pages.

**Georghiou G. P. (1981).** The occurrence of resistance to pesticides in arthropods: an index of cases reported through 1980. *FAO United Nations*, 172 p.

**Georghiou G. P. (1990).** Overview of insecticide resistance. *ACS Symp Ser,* 421: 18-41.

**Georghiou G. P. and Lagunes-Tejada A. (1991).** The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Ed. *FAO, Rome*.

**Gepner J. I., Hall L. M. and Sattelle D. B. (1978).** Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. *Nature (Lond),* 276**:** 188-190.

**Gittins J. and Trash B. H. (2005).** Bear oil to pennyroyal: traditional cures for mosquito bites and prevention. *Wing Beats,* 16: 16-20.

**Govere J., Braack L. E., Durrheim D. N., Hunt R. H. and Coetzee M. (2001).** Repellent effects on *Anopheles arabiensis* biting humans in Kruger Park, South Africa. *Med Vet Entomol,* 15*:* 287.

**Grolleau F. and Lapied B. (1994).** Transient $Na^+$ - activated $K^+$ current in beating pacemaker-isolated adult insect neurosecretory cells (DUM neurones). *Neurosci Lett,* 167: 46-50.

**Grolleau F. and Lapied 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 Lapied B. (1996).** Two distinct low-voltage-activated $Ca^{2+}$ currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol*, 76 (2): 963-976.

**Grolleau F. and Lapied B. (2000)**. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying pontaneous electrical activity. *J Exp Biol,* 203: 1633-1648.

**Grolleau F., Stankiewicz M., Kielbasiewicz E., Martin-Eauclaire M. F., Lavialle C., De Vente J. and Lapied B. (2006).** Indirect activation of neuronal noncapacitative $Ca^{2+}$ entry is the final step involved in the neurotoxic effect of *Tityus serrulatus* scorpion B-toxin. *Eur J Neurosci,* 23: 1465-1478.

**Grossmuller M., Antony J., Trankle F., Holzgrab U. and Mohr K. (2006).** Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372(4): 267-276.

**Gupta R. K. and Rutledge L. C. (1991).** Controlled release repellent formulations on human volunteers under three climatic regimens. *J Am Mosq Control Assoc,* 7: 490.

**Haas R., Marshall T. L. and Rosenberry T. L. (1988).** *Drosophila* acetylcholinesterase: Demonstration of a glycoinositol phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochem,* 27: 6453-6457.

**Haley R. W. and Kurt T. L. (1997).** Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. *Jama,* 277: 231-237.

**Haley R. W., Hom J., Roland P. S., Bryan W. W., van Ness P. C., Bonte F. J., Devous M. D. Sr., Mathews D., Fleckenstein J. L., Wians F. H. Jr., Wolfe G. I. and Kurt T. L. (1997a).** Evaluation of neurologic function in Gulf War veterans. A blinded case-control study. *Jama*, 277: 223-230.

**Haley R. W., Kurt T. L. and Hom J. (1997b).** Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms. *Jama,* 277: 215-222.

**Hall J. C. and Kankel D. B. (1976).** Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics,* 83: 517-535.

**Hall L. M. C. and Spierer P. (1986).** The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 50 leader. *EMBO J,* 5: 2949-2954.

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

**Hannan F. and Hall L. M. (1993).** Muscarinic acetylcholine receptors in invertebrates: Comparisons with homologous receptors from vertebrates. *In:* Comparative molecular neurobiology, Eds: Pichon Y.; Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 98-145.

**Hasan F. B., Cohen S.G. and Cohen J.B. (1980).** Hydrolysis by acetylcholinesterase. Apparent molal volumes and trimethyl and methyl subsites. *J Biol Chem*, 255: 3898-3904.

**Haubruge E. and Amichot M. (1998).** Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 2(3): 161-174

**Hay S. I., Guerra C. A., Tatem A. J., Noor A. M. and Snow R. W. (2004).** The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis,* 4: 327-336.

**Heine M. and Wicher D. (1998).** $Ca^{2+}$ resting current and $Ca^{+2}$-induced $Ca^{+2}$ relase in insect neurosecretory neurons. *Neuroreport*, 9: 3309-3314.

**Hemingway J. and Hilary R. (2000).** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Reviews of Entomology,* 45: 371-391.

**Hemingway J., Hawkes N. J., McCarroll L. and Ranson H. (2004).** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol,* 34: 653-665.

**Holzgrabe U., De Amici M. and Mohr K. (2006).** Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors. *J Mol Neurosci*, 30(1-2): 165-168.

**Honda H., Tomizawa M. and Casida J. H. (2007).** Insect muscarinic acetylcholine receptor: pharmacological and toxicological profiles of antagonists and agonists. *J Agric Food Chem*, 55: 2276-2281.

**Hougard J. M., Corbel V., N'Guessan R., Darriet F., Chandre F., Akogbeto M., Baldet T., Guillet P., Carnevale P., Traore-Lamizana M., Asidi A. N., N'Guessan R., Koffi A. A., Curtis C. F., Hougard J. M. and Chandre F. (2005).** Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambdacyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J,* 4: 25.

**Hougard J. M., Corbel V., N'Guessan R., Darriet F., Chandre F., Akogbeto M., Baldet T., Guillet P., Carnevale P. and Traope-Lamizana M. (2003).** Efficacy of mosquito nets treatedwith insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*, 93: 491-498.

**Hougard J. M., Poudougo P., Guillet P., Back C., Akpoboua L. K. B. and Quilévéré D. (1993).** Criteria for the selection of larvicides by the onchocerciasis control programme in West Africa. *Ann Trop Med Parasitol*, 85: 435-442.

**Hoyle G., Dagan D., Moberly B. and Colquhoun W. (1974).** Dorsal unpaired median insect neurons make neurosecretory ending on skeletal muscle. *J Exp Zool,* 187: 159-165.

**Huang X. P., Prilla S., Mohr K. and Ellis J. (2005).** Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M2 muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3- phthalimidopropyl) ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol*, 68(3): 769-778.

**Hue B. and Callec J. J. (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**,** 149-168.

**Hue B., Lapied B., and Malécot C. O. (1989).** Do presynaptic muscarinic receptors regulate acetylcholine release in the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana? J Exp Biol,* 142: 447- 451.

**Ihara M, Brown L. A., Ishida C., Okuda H., Sattelle D. B. and Matsuda K. (2006).** Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of american cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *J Pestic Sci,* 31(1): 35-40.

**Ilg T., Schmalz S., Werr M. and Cramer J. (2010).** Acetylcholinesterases of the cat flea *Ctenocephalides felis*: identification of two distinct genes and biochemical characterization of recombinant and in vivo enzyme activities*. Insect Biochem Mol Biol*, 40: 153-164.

**IRAC (2006).** Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. A Manual Produced by Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) (http://www.iraconline.org/documents/vectormanual.pdf).

**Jäger D., Schmalenbach C., Prilla S., Schrobang J., Kebig A., Sennwitz M., Heller E., Tränkle C., Holzgrabe U., Höltje H. D. and Mohr K. (2007).** Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*, 282(48): 34968-34976.

**Jakubik J., Bacakova L., El-Fakahany E. E., and Tucek S. (1997).** Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 52: 172-179.

**Janssen D., Derst C., Buckinx R., Van den Eynden J., Rigo J. M. and Van Kerkhove E. (2007).** Dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria* express ivermectin- and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels. *J Neurophysiol,* 97(4): 2642-2650.

**Kalyanasundaram M., Srinivasan R., Subramanian S. and Panicker K. N. (1994).** Relative potency of DEPA as a repellent against the sandfly, *Phlebotomus papatasi. Med Vet Entomol, 8:* 68.

**Karlin A. (2002).** Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci,* 3: 102-114.

**Kim J. I., Jung C. S., Koh Y. H. and Lee S. H. (2006).** Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. *Insect Mol Biol*, 15: 513-522.

**Klun J. A., Khrimian A. and Debboun M. (2006).** Repellent and deterrent effects of SS220, Picaridin, and Deet suppress human blood feeding by *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Phlebotomus papatasi. J Med Entomol,* 43(1): 34-39.

**Kozaki T., Kimmelblatt B. A., Hamm R. L. and Scott J. G. (2008).** Comparison of two acetylcholinesterase gene cDNAs of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, in insecticide susceptible and resistant strains. *Arch Insect Biochem Physiol,* 67: 130-138.

**Kreissl S. and Bicker G. (1989).** Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honey bee. *J Comp Neurol,* 286(1): 71-84.

**Kristiansen K. (2004).** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the super family of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*, 103: 21-80.

**Krysan J. L. and Kruckberg W. C. (1970).** The sedimentation properties of cholinesterase from a may fly (*Hexagenia bilineata* (Say); Ephemeroptera) and the honey bee (*Apis mellifera* L). *Int J Biochem*, 1: 241-247.

**Kukkonen *A.*, Perakyla M., Akerman K. E. and Nasman J. (2004).** Muscarinic toxin 7 selectivity is dictated by extracellular receptor loops. *J Biol Chem,* 279(49): 50923-50929.

**Kumar S., Prakash S., Kaushik M. P. and Rao K. M. (1992).** Comparative activity of three repellents against the ticks *Rhipicephalus sanguineus* and *Argas persicus*. *Med Vet Entomol,* 6: 47.

**Kurtak D. C. (1990).** Maintenance of effective control of *Simulium damnosum* in the face of insecticide resistance. *Acta Leiden,* 59: 95-112.

**Lansdell S. J. and Millar N. S. (2000).** Cloning and heterologous expression of Dα4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacol,* 39: 2604-2614.

**Lapied B. (1991).** Etudes de l'activité électrique et de la pharmacologie des récepteurs cholinergiques des "Dorsal Unpaired Median" neurones du 6éme ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* L. Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers, 238 pages.

**Lapied B., Grolleau F. and Sattelle D. B. (2001).** Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol,* 132: 587-595.

**Lapied B., Malecot C. O. and Pelhate M. (1990a).** Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res,* 533:132-136.

**Lapied B., Malecot C. O. and Pelhate M. (1990b).** 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., Malecot C. O. and Pelhate M. (1989).** Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol,* 144: 535-549.

**Lapied B., Pennetier C., Apaire-Marchais V., Licznar P. and Corbel V. (2009).** Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol*, 27(4): 190-198.

**Lapied B., Sinakevitch I. G., Grolleau F. and Hue B. (1994).** DUM neurones in the cockroach TAG: morphology, electrophysiology and pharmacology aspects: *In*: Insect neurochemistry and neurophysiology, edited by CRC press.

**Lapied B., Stankiewicz M., Grolleau F., Rochat H., Zlotkin E. and Pelhate M. (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: 1449-1460.

**Lapied B., Tribut F. and Hue B. (1992).** Effects of McN-A-343 on insect neurosecretory cells: evidence for muscarinic-like receptor subtypes. *Neurosci Lett*, 139 (2): 165-168.

**Lapied B., Tribut F., Sinakevitch I. G., Hue B. and Beadle D. J. (1993).** Neurite regeneration of long-term cultured adult insect neurosecretory cells identified as DUM neurons. *Tissue and Cell,* 25: 893-906.

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

**Le Corronc H. and Hue B. (1993).** Pharmacological and electro-physiological characterization of a postsynaptic muscarinic receptor in the central nervous system of the cockroach. *J Exp Biol,* 181: 257-278.

**Le Corronc H., Lapied B. and Hue B. (1991).** M2-like presynaptic receptors modulate acetylcholine release in the cockroach (*Periplaneta americana*) central nervous system. *J Insect Physiol*, 37: 647-652.

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

**Lenoir-Rousseaux J. J. (1985).** Les arthropodes possèdent une même forme moléculaire majoritaire d'acétylcholinestérase. *C R Seances Soc Biol,* 179: 741-747.

**Lenoir-Rousseaux J. J. and Gautron J. (1987).** Activity, localization and molecular form of acetylcholinesterase in the male accessory glands of metamorphosing, *Tenebrio molitor* L. *Insect Biochem*, 17(5):739-750.

**Leroux P., Delorme R. and Gaillardon P. (2002).** Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles : II - Les fongicides. *Phytoma,* 545: 8-15.

**Lester D. and Gilbert L. (1987).** Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta. Insect Biochem*, 17: 99-109

**Leuzinger W., Goldberg M. and Cauvin E. (1969).** Molecular properties of acetylcholinesterase. *J Mol Biol*, 40: 217-225.

**Lhoste J. 'ed' (1982).** 'Monographie deltaméthrine'. Roussel-Oussel-Uclaf, Paris, 305 pages.

**Lindsay S. W. and Janneh L. M. (1989).** Preliminary field trials of personal protection against mosquitoes in the Gambia using deet or permethrin in soap, compared with other methods. *Med Vet Entomol,* 3: 97.

**Lipscomb J. W., Kramer J. E. and Leikin J. B. (1992).** Seizure following brief exposure to the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide. *Ann Emerg Med,* 21: 315-317.

**Lockridge O. (1988).** Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9(4): 125-128.

**Low M. G. and Finean J. B. (1977).** Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocyte by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS Lett,* 82: 143-146.

**Lundwall E., Pennetier C., Corbel V., Gentile L. and Legros F. (2005).** Paludisme : se protéger des piqûres d'anophèles. *Rev Part,* 55: 841-848.

**Magnin M., Fournier D. and Pasteur N. (1985).** Mécanismes physiologiques de la résistance des insecticides aux insecticides. *Cah ORSTOM, sér Entomol Méd Parasitol*, 23(4): 273-280.

**Marquer C., Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Grandjean O., Girard E., Le Maire M., Brown S. and Servent D. (2010).** Influence of MT7 toxin on the oligomerization state of the M1 muscarinic receptor. *Biol Cell*, 102: 409-420.

**Martin T., Assogba-komlan F., Houndete T., Hougard J. M., Chandre F. (2006).** Efficacy of mosquito netting for sustainable small holders' cabbage production in Africa. *J Econ Entomol*, 99: 450-454.

**Martin T., Ochou G. O., Hala-Nklo F., Vassal J. M. and Vayssaire M. (2000).** Pyrethroid resistance in cotton bullworm, *Helicoverpa armigera,* in West Africa. *Pest Manag Sci,* 56: 546-554.

**Massilia G. R., Eliseo T., Grolleau F., Lapied B., Barbier J., Bournaud R., Molgo J., Cicero D. O., Paci M., Schininà M. E., Ascenzi P. and Polticelli F. (2003).** Contryphan-Vn: a modulator of $Ca^{2+}$ -dependent $K^{+}$ channels. *Biochem Biophys Res Commun,* 303: 238-246.

**Massoulié J. (2002).** The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11: 130-143.

**Massoulié J., Sussman J., Bon S. and Silman I. (1993).** Structure and functions of AChE and BuChE. *Dans* Progress in brain research. Vol. 98. *Éditeur*: A. C. Cuello. *Elsevier, Amsterdam,* pp. 139-146.

**Mastuda K., Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Graus M. and Sattelle D. (2001).** Neonicotinoid: insecticides acting on insect nicotinc acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 573-580.

**Matsuda K., Ozoe Y. and Sattelle D. B. (2007).** Molecular pharmacology of insect ion channels and implications for insect toxicology. *Invert Neurosci*, 7 (1): 1-2.

**May L. T., Leach K., Sexton P. M., and Christopoulos A. (2007).** Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 47**:**1-51.

**McCabe E. T., Barthel W. F., Gertler S. I. and Hall S. A. (1954).** Insect repellents, III, N, N diethylamides. *J Org Chem,* 19: 493.

**McCain W. C., Lee R., Johnson M. S., Whaley J. E., Ferguson J. W., Beall P. and Leach G. (1997).** Acute oral toxicity study of pyridostigmine bromide, permethrin, and DEET in the laboratory rat. *J Toxicol Environ Health,* 50: 113-124.

**McCaman R. E., Mckenna D. G. and Ono J. K. (1977).** A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes. *Brain Res*, 136 (1):141-147.

**McIver S. B. (1981).** A model for the mechanism of action of the repellent DEET on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 18: 357-361.

**Medof M. E., Walker E. I., Roberts W. L., Haas R. and Rosenberry T. L. (1986).** Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by C-terminal glycolipid. *Biochem,* 25: 6740-6747.

**Mehr Z. A., Rutledge L. C. and Inase J. L. (1984).** Evaluation of commercial and experimental repellents against *Xenopsylla cheopis (*Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol, 21*: 665.

**Melanson S. W., Yun C. H., Pezzementi M. L. and Pezzementi L. (1985).** Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster. Comp Biochem Physiol*, 81(1): 87-96.

**Menozzi P., An Shi M., Lougarre A., Tang Z. H. and Fournier D. (2004)**. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol*, 4:4

**Menozzi P., Shi M. A., Lougarre A., Tang Z. H. and Fournier D. (2001).** Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol,* 359: 175-181.

**Mentel T., Duch C., Stypa H., Wegener G., Muller U. and Pfluger H. J. (2003).** Central modulatory neurons control fuel selection in flight muscle of migratory locust. *J Neurosci,* 23: 1109-1113.

**Merriam-Webster (2005).** Medline Plus medical dictionary. http://www.nlm.nih.gov/ medlineplus/ plusdictionary.html.

**Mineau P. (1991).** Cholinesterase inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment, Vol. 2. *Elsevier, Amsterdam,* pp. 3-123.

**Moore S. J., Lenglet A. and Hill N. (2002).** Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in Vaca Diez Province, the Bolivian Amazon. *J Am Mosq Control Assoc,* 18: 107.

**Moss J. I. (1996).** Synergism of toxicity of N, N Diethyl -m- toluamide to German Cockroaches (Ortoptera: Blattelidae) by Hydrolytic Enzyme Inhibitors. *J Econ Entomol*, 89(5): 1151-1155.

**Narahashi T. (2000).** Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther,* 294: 1-26.

**Nathanson N. M. (2000).** A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci USA,* 97**:** 6245-6247.

**Nauen R. (2006)**. Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Man Sci,* 62: 690-692.

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

**Newton A. C. (2001).** Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors and macromolecular interactions. *Chem Rev,* 101**:** 2353-2364.

**N'Guessan R., Rowland M., Moumouni T. L., Kesse N. B. and Carnevale P. (2006).** Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100(12): 1091-1097.

**Nicholson G. M. (2007).** Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49 (4): 413-422.

**Nikou D., Ranson H. and Hemingway J. (2003).** An adult-specific CYP6 P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 318: 91-102.

**Niven J. E., Graham C. M. and Burrows M. (2008).** Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annu Rev Entomol*, 53: 253-271.

**Novak R. J. and Gerberg E. J. (2005).** Natural-based repellent products: efficacy for military and general public uses. *J Am Mosq Control Assoc*, 21 (supplément au no 4): 7-11.

**Odegaard F. (2000).** How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. *Biological J Linnean Soc*, 71: 583-597.

**Oerke E. C. and Dehne H. W. (2004).** Safeguarding production - losses in the major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23: 275-285.

**OMS (2010).** Statistiques sanitaires mondiales. Bibliothèque de l'OMS.

**Orr G. L., Orr N. and Hollingworth R. M. (1991).** Distribution and pharmacological characterization of muscarinic-cholinergic receptors in the cockroach brain. *Arch Insect Biochem Physiol, 16*: 107-122.

**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 Publication A., Paris, pp. 185-189.

**Pennetier C. (2008).** Interactions entre insecticides non-pyréthrinoïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae* : Mécanismes, efficacité et impact sur l'évolution de la résistance. Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier 1, 194 pages.

**Pennetier C., Corbel V. and Hougard J. M. (2005).** Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 72(6): 739-744.

**Pennetier C., Corbel V., Boko P., Odjo A., N'Guessan R., Lapied B. and Hougard J. M. (2007).** Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J,* 6: 38.

**Pennetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S., Dabire R. K., Lapied B., Chandre F. and Hougard J. M. (2008).** Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis,* 14: 1707–1714.

**Pennetier C., Costantini C., Corbel V., Licciardi S.,Dabire R.K., Lapied B., Chandre F. and Hougard J. M. (2009).** Synergy between repellent and organophosphates on bed net: efficacy and behavioural responses of natural free-flying *Anopheles gambiae* mosquitoes*. PLoS ONE*, 4(11): e7896.

**Perry T., Heckel D. G., Mckenzie J. A. and Batterham P. (2007).** Mutation in Dα1 or Dα2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemi Mol Biol*, 38: 520-528.

**Petersen L. R., Marfin A. A. and Gubler D. J. (2003).** West Nile virus. *JAMA,* Vol. 290 (4).

**Peterson C. and Coats J. (2001).** Insect repellent- past, present and future. *Royal Soci Chem*, 154-158.

**Phillips McDougall (2006).** The global crop protection market- Industry prospects. Presentation at the CPDA conference held in 17 July, Salt Lake City.

**Philogène B. J. R., Regnault-Roger C. and Vincent C. (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* pp. 1-17.

**Pickett J. A., Birkett M. A. and Logan J. G. (2008).** DEET repels ORNery mosquitoes. *PNAS*, 105 (36):13195-13196.

**Pinto J., Lynd A., Vicente J. L., Santolamazza F., Randle N. P., Gentile G., Moreno Simard F., Charlwood J. D., do Rosario V. E., Caccone A., della Torre A. and Donnelly M. J. (2007).** Multiple origins of knockdown resistance mutations in the Afrotropical mosquito vector *Anopheles gambiae. PLoS One,* 2: e1243.

**Plapp F. W. (1984).** The genetic basis of insecticide resistance in the housefly : evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Put Biochem PhlGol*, 22: 194-201.

**Plotnikova S. N. (1969).** Effector neurons with several axons in the ventral nerve cord of the Asian grasshopper *Locusta migratoria*. *J Evol Biochem Physiol,* 5: 276-277.

**Predel R., Neupert S., Wicher D., Gundel M., Roth S. and Derst C. (2004).** Unique accumulation of neuropeptides in an insect: FMRFamide-related paptides in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Eur J Neurosci*, 20: 1499-1513.

**Pretorius A. M., Jensenius M., Clarke F. and Ringertz S. H. (2003).** Repellent efficacy of DEET and KBR 3023 against *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 40: 245.

**Price D. N. and Berry M. S. (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: 309-319.

**Pridgeon J. W., Zhang L. and Lui N. (2003).** Overexpression of CYP4G19 associated with a pyrethroid-resistant strain of the German cockroach, *Blattela germanica* (L.). *Gene,* 314: 157-163.

**Programme Ecophyto (2018).** Un plain pour réduire de moitié l'usage des pesticides.

**Rappe A. (1992).** Pesticides et santé : les pesticides en balance. Édition association pharmaceutique Belge.

**Raymond M., Pasteur N., Fournier D., Cuany A., Bergé J. and Magnin M. (1985).** Le gène d'une acétylcholinestérase insensible au propoxur détermine la résistance de *Culex pipiens* L. à cet insecticide. *C R Acad Sc Parasit,* 300 Série III (14): 509-512.

**Raymond V. and Lapied B. (1999).** Hyperpolarization-activated inward potassium and calcium-sensitive chloride currents in beating pacemaker insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Neurosci,* 93: 1207-1218.

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

**Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B. M., Rauh J. J. and Sattelle D. B. (2005).** Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci,* 5: 119-133.

**Rettich F. (1999).** Laboratory and field evaluation of two new mosquito repellents, *In*: Proceedings of 13th European SOVE Meeting, pp. 121-125.

**Revuelta L., Piulachs M. D., Bellés X., Castañera P., Ortego F., Díaz-Ruíz J. R., Hernández-Crespo P., and Tenllado F. (2009).** RNAi of ace1 and ace2 in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect Biochem Mol Biol,* 39(12): 913-919

**Roberts W. L., Santikarn S., Reinhold V. and Rosenberry T. L. (1988):** Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J Biol Chem,* 263: 18776-18784.

**Roeder T. (1999).** Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol*, 59: 533-561.

**Rosenberry T. L. (1975).** Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol,* 43: 103-218.

**Rotundo R. L. (2003).** Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 32: 743-766.

**Rowland M., Downey G., Rab A., Freeman T., Mohammad N., Rehman H., Durrani N., Reyburn H., Curtis C., Lines J. and Fayaz M. (2004).** DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Trop Med Int Health,* 9(3): 335-342.

**RRD (Re-evaluation Decision Document) (2002).** Personal insect repellents containing DEET (N,N-diethyl-m-toluamide and related compounds). *Pest Management Regulatory Agency, Health Canada, April* 15.

**Russell R. J., Claudianos C., Campbell P. M., Horne I., Sutherland T. D. and Oakeshott J. G. (2004).** Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophoshate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol,* 79: 84-93.

**Saccà G. (1947).** Sull'esistenza ***di*** Mosche domestiche resistenti al DDT *Riv. di Parassit.*, 8: 127.

**Sanfaçon G., Lessard S., Schnebelen M., Bolduc D. G. and Paul M. (2002).** Efficacité risques des moyens de protection personnelle contre la transmition du virus du Nil occidental. Institut national de santé publique du Québec, Québec, 77 pages.

**Sattelle D. B. (1980).** Acetylcholine receptors of insects. *Adv Insect Physiol,* 15: 115-215.

**Sattelle D. B. and Breer H. (1990).** Cholinergic nerve terminals in the central nervous system of insects: molecular aspects of structure, function and regulation. *J Neuroendocrinol,* 2**:** 241-256.

**Sattelle D. B., Ho Y. W., Crawford G. D., Salvaterra P. M. and Mason W. T. (1986).** Immunocytochemical staining of central neurones in *Periplaneta americana* using monoclonal antibodies to cholineacetyltransferase. *Tissue Cell,* 18: 51-61.

**Schaefer C. and Peters P.W. (1992).** Intrauterine diethyltoluamide exposure and fetal outcome. *Reprod Toxicol*, 6(2): 175-176.

**Scheinfeld N. (2004).** Picaridin: a new insect repellent. *J Drug Dermatol,* 3: 59-60.

**Schoenig G. P., Hartnagel R. E., Jr., Schardein J. L. and Vorhees C. V. (1993).** Neurotoxicity evaluation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in rats. *Fundam Appl Toxicol,* 21: 355-365.

**Schreck C. E. and McGovern T. P. (1989).** Repellents and other personal protection strategies against *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc, 5*: 247.

**Servent D. and Fruchart-Gaillard C. (2009).** Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem*, 109: 1193-1202.

**Shafer T. J., Meyer D. A. and Crofton K. M. (2005).** Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect,* 113: 123-136.

**Shang J. Y., Shao Y. M., Lang G. J., Yuan G., Tang Z. H., and Zhang C. X. (2007).** Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells. *Insect Sci,* 14: 443-449.

**Silman I. and Sussman J. L. (2008).** Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chem Biol Interact,* 175(1-3): 3-10.

**Simons K., Helenius A., Leonard K., Sarvas M. and Gething M. J. (1978).** Formation of protein micelles from amphiphilic membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA,* 75: 5306-5310.

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

**Sinakevitch I. G., Geffard M., Pelhate M. and Lapied B. (1995).** Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol,* 198: 1539-1544.

**Steele R. W. and Smallman B. N. (1976).** Acetylcholinesterase from the house-fly head. molecular properties of soluble forms. *Biochem Biophys Acta*, 445: 131-146.

**Stevenson P. A. and Spörhase-Eichmann U. (1995).** Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol part A: Physiol,* 110: 203-215.

**Syed Z. and Leal W. S. (2008).** Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(36): 13598-13603.

**Talesa V., Romani R., Antognelli C., Giovannini E. and Rosi G. (2001).** Soluble and membrane-bound acetylcholinesterases in *Mytilus galloprovincialis* (Pelecypoda: Filibranchia) from the northern Adriatic Sea. *Chemico Biol Interaction,* 134(2): 151-166.

**Tenenbein M. (1987).** Severe toxic reactions and death following the ingestion of diethyltoluamide containing insect repellents. *Jama*, 258: 1509-1511.

**Testud F. (2001).** Insecticides organophosphorés, carbamates anticholinestérasiques et pyréthrinoïdes de synthèse. *In*: Testud F, Garnier R, Delemotte B, editors. Toxicologie humaine des produits phytosanitaires. *Paris, ESKA,* pp. 67-116.

**Testud F. and Grillet J. P. (2007).** Insecticides organophosporés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. *Toxicol Pathol Profess*, 16-059-10: 1-24.

**Thany S.H., Courjaret R., Lapied B. (2008).** Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical α-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci Lett*, 438 (3): 317-321.

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

**Thavara U., Tawatsin A. and Chompoosri. J. (2001).** Repellency of IR3535 and DEET. *J Am Mosq Control Assoc*, 17 :190-5.

**Thomas J. R., Dwek R. A. and Rademacher T. W. (1990).** Structure, biosynthesis and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem,* 29: 5413-5422.

**Tomizawa M. and Casida J. E. (2001).** Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag Sci,* 57: 914-922.

**Tomizawa M. and Casida J. E. (2005).** Neonicotinoid insecticides toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 45: 247-268.

**Torfs H., Shariatmadari R., Guerrero F., Parmentier M., Poels J., Van Poyer W., Swinnen E, De Loof A., Akerman K. and Vanden Broeck J. (2000).** Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. *J Neurochem,* 74**:** 2182-2189.

**Toutant J. P. (1989).** Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol,* 32: 423-446.

**Toutant J. P., Arpagaus M. and Fournier D. (1988).** Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster:* quaternary structure and hydrophobic character. *J Neurochem,* 50: 209-218.

**Toutant J. P., Krall J. A., Richards M. K., and Rosenberry T. L. (1991).** Rapid analysis of glycolipid anchors in amphiphilic dimmers of acetylcholinesterase. *Cell Mol Neurobiol*, 11(1): 219-230.

**Tränkle, C., Dittmann A., Schulz U., Weyand O., Buller S., Jöhren K., Heller E., Birdsall N.J. M., Holzgrabe U., Ellis J., Höltje H. D., and Mohr K. (2005).** Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their

atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. *Mol Pharmacol*, 68(6): 1597-1610.

**Tribut F. (1994).** Effets de l'axotomie sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des récepteurs cholinergiques des cellules neurosécrétrices : les « Dorsal Unpaired Median » (DUM) neurones du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* L. Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers, 240 pages.

**Tribut F., Duval A. and Lapied B. (1994).** Two distinct receptors are activated by arecoline on cockroach sixth abdominal ganglion DUM neurones. *J Exp Biol*, 186: 325-331.

**Trigg J. (1996).** Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. *J Am Mosq Control Assoc*, 12: 243-246.

**Trigg J. and Hill N. (1996).** Laboratory evaluation of a eucalyptus-based repellent against 4 biting arthropods*. Phytother Res,* 10: 313-316.

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

**Tripathi R. K. and O'Brien R. D. (1973).** Insensitivity of acetylcholinesterase as a factor in resistance of house flies to the organophosphate Rabon. *Put Biochcm Physiiol*, 3: 495-498.

**Tripathi R. K., Telford J. N. and O'Brien R. D. (1978).** Molecular and structural characteristics of house fly brain acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta,* 525: 103-111.

**Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Krisadaphong P. and Apiwathnasorn, C. (2004).** Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health, 35:* 325.

**Turdean G. L., Popescu I. C., Oniciu L. and Thevenot D. R. (2002a).** Sensitive detection of organophosphorus pesticides using a needle type amperometric

acetylcholinesterase-based bioelectrode. Thiocholine electrochemistry and immobilised enzyme inhibition. *J Enzyme Inhib Med Chem,* 17(2): 107-115.

**Turdean G. L., Popescu I. C. and Oniciu L. (2002b).** Biocapteurs ampérométriques à cholinestérases pour la détermination des pesticides organophosphorés. *Can J Chem*, 80: 315-331.

**Unwin N. (2003).** Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett*, 555: 91-95.

**Unwin N. (2005).** Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol*, 346: 967-989.

**USEPA (1998).** Reregistration Eligibility Decision (RED): DEET, EPA738-R-98-010, in Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency, Washington DC.

**USEPA (2005).** New pesticide fact sheet-picaridin. United States Environmental Protection Agency. Available from: <http://www.epa.gov/opprd001/factsheet/picaridin.pdf>.

**Verschoyle R. D., Brown A. W., Nolan C., Ray D. E. and Lister T. (1992).** A comparison of the acute toxicity, neuropathology, and electrophysiology of N,N-diethyl-m-toluamide and N,N-dimethyl-2,2- diphenylacetamide in rats. *Fundam Appl Toxicol,* 18: 79-88.

**Villatte F., Marcel V., Estrada-Mondaca S. and Fournier D. (1998).** Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens Bioelecton*, 13(2): 157-164.

**Wahle B.S., Sangha G. K., Lake S. G., Sheets L. P., Croutch C. and Christensen W. R. (1999).** Chronic toxicity and carcinogenicity testing in the Sprague–Dawley rat of a prospective insect repellent (KBR 3023) using the dermal route of exposure. *Toxicology*, 142: 41-56.

**Walker T. W., Robert L. L., Copeland, R. A., Githeko A. K., Wirtz R. A., Githure J. I. and Klein T. A. (1996).** Field evaluation of arthropod repellents, deet and a piperidine

compound, AI3-37220, against *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in western Kenya, *J Am Mosq Control Assoc*, 12: 172.

**Weill M., Fort P., Berthomieu A., Dubois M. P., Pasteur N., and Raymond M. (2002).** A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci,* 269: 2007-2016.

**Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P. and Raymond M. (2003).** Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature,* 423: 136-137.

**Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. and Raymond M. (2004).** The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol,* 13: 1-7.

**WHO (1992).** Vector resistance to pesticides: Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. *Technical Reports Series* Ed. *WHO. Geneve,* 818: 58.

**WHO (2000).** Review of IR3535, KBR3023, (RS)-methoprene 20% EC, pyriproxyfen 0.5% GR and lambda-cyhalothrin 2.5% CS. *World Health Organization, Geneve*.

**Wicher D. and Penzlin H. (1997).** $Ca^{2+}$ currents in central insect neurons: electrophysiological and pharmacological properties. *J Neurophysiol,* 77: 186-199.

**Wicher D. and Penzlin H. (1998).** Omega-Toxins affect $Na^{+}$ currents in neurosecretory insect neurons. *Receptors Channels,* 5:355-366.

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

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

**Wicher D., Walther C. and Penzlin H. (1994).** Neurohormone D induces ionic current changes in cockroach central neurones. *J Comp Physiol, [A]* 174: 507-515.

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

**Worek F., Koller M., Thiermann H. and Szinicz L. (2005).** Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicol,* 214: 182-189.

**Wright R. H. (1975).** Why mosquito repellents repel insects. *Sci Am,* 233: 104-111.

**Xu C. Q., Brone B., Wicher D., Bozkurt O., Lu W. Y., Huys I., Han Y. H., Tytgat J., Van Kerkhove E. and Chi C. W. (2004).** BmBKTx1, a novel $Ca^{2+}$ -activated $K^{+}$ channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *J Biol Chem,* 279: 34562-34569.

**Yap H.H., Jahangir K., Chong A.S., Adanan C.R., Chong N.L., Malik Y.A. and Rohaizat B. (1998).** Field efficacy of a new repellent, KBR 3023, against *Aedes albopictus* (SKUSE) and *Culex quinquefasciatus* (SAY) in a tropical environment. *J Vector Ecol,* 23: 62-68.

**Zaim M., Aitio A. and Nakashima N. (2000).** Safety of pyrethroid-treated nets. *Med Vet Entomol,* 14: 1-5.

**Zhorov B. S., Shestakova N. N. and Rozengart E. V. (1991).** Determination of productive conformation of acetylcholinesterase substrates using molecular mechanics. *Quant Struct Act Relat,* 10: 205-210.

**Zimmerman P. W. and Hitchcock A. E. (1948).** Plant hormones. *Ann Rev Biochem*, 17: 601-626.

**Zingde S., Rodrigues V., Joshi S. M. and Krishnan K. S. (1983).** Molecular properties of *Drosophila* acetylcholinesterase. *J Neurochem,* 41: 1243-1252.

**Zlotkin E. (1999).** The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol,* 44: 429-455.

# ANNEXES

**Soumise à *Emerging Infectious Diseases* (2011)**

*Anopheles gambiae* isolated neurons: a new biological model for optimizing insecticide effects

C. Lavialle-Defaix[1]*, V. Apaire-Marchais[1]*, C. Legros[1], C. Pennetier[2], A. Mohamed[1,3], P. Licznar[1], V. Corbel[2] & B. Lapied[1]$

Adresses

(1) Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) - UPRES EA 2647 / USC INRA 2023, IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex, France.

(2) Institut de Recherche pour le Développement (IRD), MIVEGEC (UM1-CNRS 5290-IRD 224), Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 01 BP 4414 RP Cotonou, Benin.

(3) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, 71516 Assiut, Egypt

*Equally contribution to this work.

$Corresponding author: Pr B. Lapied, Laboratoire RCIM UPRES EA 2647 / USC INRA 2023 / IFR 149 QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France

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

Fax number: +33 241 73 52 15

To understand better the mode of action of insecticides and repellents at both molecular and cellular levels, we have developed an innovative biological model based on *Anopheles gambiae* mosquito isolated neurons. This new cellular model, adapted to multidisciplinary approaches, offers promising prospects to overcome insecticide resistance mechanisms and to lead the development of more effective strategies using insecticides and repellents for the control of vector-borne diseases.

Despite considerable efforts in recent years dedicated throughout the world to control vector-borne diseases, malaria is still a major public health problem with nearly 250 million cases a year and 800 000 deaths among them, 85% are children under five years old[1]. The only chemicals recommended by World Health Organization (WHO) to control adult mosquito vectors are neurotoxic insecticides, which target the sodium channels (pyrethroids) and the acetylcholinesterases (organophosphates and carbamates)[2]. Unfortunately the main malaria vector species *Anopheles gambiae* developed multiple resistance mechanisms to these insecticides[3]. This is worrying because it may impede the WHO Global Action Plan for malaria control and its eradication. In this context, there is an urgent need to deeply investigate insecticide/repellent mode of action, at both molecular and cellular levels, for developing new research strategies to ensure better control of insecticide-resistant malaria vectors[4].

Although, behavior observations, phenotypic and genotypic studies brought important knowledges allowing the development of alternative strategies against mosquitoes[3], it became rapidly evident that such approaches were limited and the need to find out new methodologies appeared crucial to optimize efficacy of chemical compounds. This was reinforced by the lack of data describing the physiology and pharmacology of insecticide/repellent targets-interactions at mosquito neuronal level.

Until now, primary neuronal cultures have been developed from numerous insect species[5]. Because they express membrane receptors and ion channels targeted by insecticides, they constitute ideal biological models to investigate the mode of action of insecticides. More recently, the use of such biological models have highlighted that intracellular regulatory mechanisms have fundamental consequences for the sensitivity of insecticide targets[4,6]. However, among insect neuronal preparations available, the fully differentiated Mosquito Isolated Neurons (MIN) are still missing. We set up a novel biological model of *An. gambiae* adult MIN which is offering all facilities to study the mode of action of insecticides/repellents, to overcome resistance mechanisms and to characterize intracellular regulation mechanisms involved in the modulation of the sensitivity of insecticide targets.

MIN were obtained from adult *An. gambiae* heads using mechanical dissociation (**Fig. 1a,b**). The proportion of neurons among dissociated cells was evaluated by a double immunocytochemical labeling method, using a rabbit anti-horseradish peroxydase (HRP) primary antibody as neuronal cell surface marker[7]. Counterstaining with acridine orange, that binds to DNA in the nuclei of all cells, yielded the total number of cells. 53.4% of the cell population (n=196) were double-labeled and were therefore identified as neurons (**Fig. 1d-f**). Neurons appeared as small spherical cells with a diameter estimated at about 5 µm. (**Fig. 1c**).

To confirm that our new mosquito neuronal model i) expresses targets for insecticides and repellents, including voltage-gated $Na^+$ channels (Nav channels), acetylcholinesterases (AChE) and cholinergic receptors and ii) is suitable for the development of molecular, electrophysiological and biochemical approaches, essential to study the mode of action of insecticides and repellents, we first adapted RT-PCR on such preparation. Using cDNA from isolated cell, we performed a multiplex nested or semi-nested PCR with specific primers (**Supplementary Table 1 online**) for genes encoding the α1 nicotinic acetylcholine receptor (Agα1 nAchR), the alpha subunit of voltage-gated $Ca^{2+}$ channel (AgCav1), the Shaker-related $K^+$ channel (AgKv1), the acetylcholinesterase-1 (AChE-1), the acetylcholinesterase-2 (AChE-2) and the alpha subunit of Nav channel (AgNav1). The second round of PCR amplification revealed the simultaneous expression of all of these transcripts in the isolated cells from mosquito heads (**Fig. 1g**). Each PCR product was detected with the expected size and direct sequencing confirmed their molecular identity. This genotyping reinforces the data obtained by immunocytochemistry and demonstrates that isolated neurons express specific targets identified as nicotinic acetylcholine receptor (Agα1 nAchR), voltage-gated ion channels required for membrane excitability (AgCav1, AgNav1 and AgKv1) and enzymes such as acetylcholinesterases, (AChE-1 and AChE-2) known to degrade the neurotransmitter acetylcholine (ACh).

In addition, to ensure that transcripts encoded functional ion channels, we examined further the electrophysiological properties of Nav channels expressed in MIN. For that

purpose, we adapted whole-cell patch-clamp technique to record global ionic currents in MIN. These neurons have only small diameter spherical cell body geometry in which an adequate space-clamp is easily attained. The whole-cell currents activated by a depolarizing pulse from a holding potential of -90 mV consisted of a fast small inward current followed by a biphasic outward current (**Supplementary Table 2 online, Fig. 2a**). To isolate the inward sodium current, calcium and potassium current inhibitors were used. As illustrated in **Figure 2b**, application of TTX, the reference Nav channel blocker completely inhibited the residual inward current, indicating that this latter resulted of $Na^+$ influx through voltage-gated channel. **Figure 2c** shows typical example of a TTX-sensitive $Na^+$ current from an isolated mosquito neuron in response to a series of voltage-clamp steps. The peak current-voltage (I-V) relationship was illustrated in **Figure 2d.** The voltage-dependence of the steady-state inactivation and activation of the sodium current together with the recovery time from inactivation were studied according to the protocols shown in **Figures 2e,f.** All the biophysical characteristics of the voltage dependence of the $Na^+$ current were summarized in **supplementary Table 2 online**. These results indicate that the Nav channels expressed in *An. gambiae* MIN were functional with an inward current which displayed general electrophysiological properties very similar to those of other invertebrate neurons[8]. Nav channels represent the key target sites for the insecticide pyrethroids[9]. Among pyrethroids used in vector control, permethrin is one of the most popular insecticides used against mosquitoes[2]. Application of permethrin on MIN indicated that the $Na^+$ current is sensitive to this pyrethroid. As shown in **Figure 2g**, compared to the control current, the decrease of the $Na^+$ current recorded in the presence of permethrin presented a biphasic aspect composed of a fast component followed by the development of a slow maintained one. The deactivation of the slow component was represented by a large inward tail current when the membrane was stepped back to the holding potential. These typical effects of permethrin observed on the $Na^+$ current were well in accordance with the effect of pyrethroids described in numerous insect neuronal preparations[9]. These results confirm that MIN are a suitable model to investigate the effects of insecticides acting on the Nav channels. Furthermore, our MIN

model can i) help to understand further the molecular processes involved in target-site resistance to pyrethroids (*Kdr* and super-*Kdr*) and ii) contribute to the design of novel insecticidal compounds.

We next focused on the characterization of AChE, another crucial target involved in the cholinergic neurotransmission in insect by specifically hydrolyzing ACh in the cholinergic synapses. AChE is the molecular target for insecticides including organophosphates, carbamates and more recently the most commonly used insect repellent, DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide)[10]. To demonstrate that the different transcripts encoded functional nAChR and AChEs, we investigated the anticholinesterasic effects of DEET on MIN. We used the whole-cell patch-clamp technique combined with the pneumatic pressure ejection of the neurotransmitter ACh, as previously described elsewhere[11]. As expected, the results illustrated in **Figures 2h,i** demonstrated a clear and significant inhibition of AChE after bath application of DEET ($10^{-7}$ M). The ACh-induced inward current recorded under voltage-clamp condition following pressure ejection of ACh onto the isolated cell was significantly increased in both amplitude and duration (**Fig. 2h,i**), in accordance with a typical anti-cholinesterasic effect. At the same time, we implemented a biochemical assay to demonstrate that it is possible to measure the AChE enzymatic activity on MIN. The enzymatic activity was measured by using Ellman's colorimetric method[12] in the presence of the carbamate propoxur. AChE residual activity of mosquito neurons was determined for increasing concentrations of propoxur. The inhibitory concentration 50 ($IC_{50}$) value of propoxur was estimated at about $2.10^{-7}$ M and a decrease of 42.4% of AChE activity was observed in the presence of $10^{-7}$ M of propoxur (**Fig. 2j**). Altogether, these data indicate that MIN express functional nAChR and AChE.

In conclusion, we proposed the first mosquito neuronal model for the malaria vector *An. gambiae*. By using electrophysiology, pharmacology, molecular biology and biochemistry, we demonstrated that *An. gambiae* MIN express functional receptors and ion channels targeted by insecticides. This new method will be a major leap for both basic and applied research relative to mosquito control. Such approach can be used to build neuronal

models of the other major mosquito vectors such as *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Dengue and Chikungunya viruses) or *Culex quinquefasciatus* (Filariasis). The development of this neuronal mosquito model will have direct practical applications on insecticidal treatment. It will be a powerful neurobiological tool to bring new highlights on i) the mode of action of both insecticides and repellents, ii) the effect of mixtures of two unrelated insecticides and/or insecticide/repellent, which are proposed as promising novel strategies for the control of vector-borne diseases[13,14] and iii) the management of insecticide-resistant malaria vectors.

## METHODS

Methods of any associated references are available in the online version of the paper at htpp://www.nature.com/naturemethods/.


## ACKNOWLEDGMENTS

C. Lavialle-Defaix was supported by a post-doctoral grant of the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, programme REAC SEST06 030 01). We thank S. Quinchard from RCIM laboratory, Angers University and R. Filmon from the microscopy department, SCIAM, Angers University, for technical assistance. *Anopheles gambiae* eggs were provided by IRD, UR016, Montpellier, France. A. Mohamed was supported by a doctoral fellowship of the Egyptian Government.


## AUTHORS CONTRIBUTIONS

B.L., V.A.-M., C.L.-D. and C.L. conceived and planned the study.

C.L.-D., V.A.-M., C.L., A.M., P.L. and B.L. performed the experiments and analysed the data.

C.L.-D., V.A.-M., C.P., V.C., P.L. and B.L. wrote the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

## ONLINE METHODS

**Mosquitoes**. The reference susceptible strain of *A. gambiae* (Kisumu) provided by CCPV/IRD Montpellier, was used in this study and maintained under laboratory conditions: 26 ± 1℃ and 68 ± 1 % relative humidity. This strain, originated from Kenya, was colonized for many years in laboratory and was free of any detectable insecticide resistance mechanism.

**Cells isolation procedure (Fig. 1).** The mosquito heads were carefully cut under a binocular microscope (**Fig. 1a**). Antenna, maxillary palps, labium and antennal pedicels were removed. Head was excised and placed in mosquito saline buffer containing (in mM) 130 NaCl, 2.5 KCl, 3 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 35 sucrose, 5 HEPES, 5% foetal bovine serum, 50 UI $ml^{-1}$ penicillin and 50 µg $ml^{-1}$ streptomycin. Dissociation of neuronal cells from head was performed mechanically by repetitive gentle suctions through fire-polished Pasteur pipettes (**Fig. 1b**). The cell suspension was transferred in Falcon 1006 Petri dishes with glass coverslips for microscopic observations and electrophysiological experiments. For immunocytochemistry and molecular biology, isolated cells were transferred in chamber slides and in microtubes, respectively. The glass coverslips and the chamber slides were pre-coated with poly-D-lysine hydrobromide (Sigma). The cells were examined using an inverted optic microscope (Olympus IK50) (**Fig. 1c**).

**Cell culture stainings.** Isolated cells were placed in chamber slides and fixed for 15 min with 2% paraformaldehyde containing 2% (w/v) sucrose in phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.2). After fixation, cells were washed 3 times for 5 min in PBS and 5 min in PBS containing 0.2% Triton X-100 (PBS-T). In order to block non-specific binding of the primary antibody, cells were pre-incubated with 4% bovine serum albumin (BSA, Sigma) in PBS-T for 1 h. Primary rabbit anti-horseradish peroxydase (HRP) antibodies (Sigma) used at a dilution of 1:5,000 in PBS-T, was applied overnight at 4℃. After washing in PBS-T, cells were

incubated with secondary antibody (Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG, Chemicon International) used at a dilution of 1:1,000 in PBS-T containing 1% BSA for 40 min in the dark at 20℃. Then, the secondary antibody solution was removed and the cells were incubated with acridine orange at 0,01% in PBS for 2 min. Subsequently, the cells were rinsed in PBS and mounted on glass slides using glycerol/PBS. Double-labeled preparations were analyzed using a confocal laser scanning microscope (Olympus BX50). We used the helium/neon laser (excitation wavelength 543 nm, detection range 555-700 nm) for imaging of Cy3 fluorescence and the argon laser (excitation wavelength 488 nm, detection range 500-650 nm) for imaging of acridine orange. Typical cells were chosen using the transmitted light scan mode of the confocal microscope (magnification 600X). Images were recorded with Fluoview 3.3 (FV300) software (Olympus).

**Gene expression profiling of mosquito neurons by multiplex PCR.** Total RNA was extracted from isolated cells with the NucleoSpin RNA XS system (Macherey-Nagel) including a DNaseI treatment and transcribed into cDNA using protocols described previously[15]. Amplification was performed by multiplex semi-nested or nested PCR with specific primers sets (**Supplementary Table 1**) matching genes encoding the α1 nicotinic acetylcholine receptor (Ag$\alpha$1 nAChR), the $\alpha$ subunit of the voltage-gated $Ca^{2+}$ channel (AgCav1), the Shaker-related $K^+$ channel (AgKv1), the acetylcholinesterase 1 (AChE-1), the acetylcholinesterase 2 (AChE-2) and the $\alpha$ subunit of the voltage-gated $Na^+$ channel (AgNav1). To amplify simultaneously the different cDNAs, the first round of PCR was performed in a single tube, containing 2 µl cDNA, 2 µl 10x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.25 µM of each gene-specific primer in a 20 µl final volume and 0.3 U EuroTaq DNA polymerase (BioCat GmbH). The second round of PCR was done in separate tubes using 0.25 µl of the first PCR as template and a second nested or semi-nested gene specific primer set in a 50 µl final volume. For both PCR, an initial denaturation was carried out at 94℃ for 4 min, followed by 35 cycles (20 sec at 94℃, 30 sec at 60℃, 1 min at 72℃) of amplification and a final cycle of 10 min at 72℃. The PCR products of expected size were separated on

agarose gel and purified using NucleoSpin Extract II® (Macherey-Nagel) for direct sequencing (Millegen). BioEdit V7.0.9 software (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) was used for DNA sequence analysis.

**Electrophysiological recordings**. The glass coverslips were mounted in a recording chamber (Warner Instruments) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration[16] was used to record both voltage-dependent and ACh-induced ionic currents (voltage-clamp mode). Ionic currents were recorded with an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), filtered at 5 kHz using a 4-pole lowpass Bessel filter. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus) using a Sutter P-97 (Sutter Instruments). Pipettes had resistances ranging from 6 to 8 MΩ when filled with internal solutions. The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>5GΩ). In all experimental conditions, cells were bathed in external solution containing (in mM) 130 NaCl, 2.5 KCl, 3 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 5 HEPES, pH was adjusted to 7.2 with NaOH 1M, except otherwise stated (see below). The internal solution contained (mM): 140 K-gluconate, 10 NaCl, 3 $MgCl_2$, 0.1 $CaCl_2$, 1.5 EGTA, 1 ATP-Mg and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.2 with KOH 1M.

The solutions used to record sodium current were designed to eliminate interference from outward potassium and inward calcium currents. The extracellular solution superfusing the cells contained (in mM) 130 NaCl, 50 TEA-Cl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 0.5 $CaCl_2$, 0.5 $CdCl_2$, 5 4-AP, 10 HEPES, pH was adjusted to 7.2 with NaOH 1M. Patch pipettes were filled with an internal solution containing (in mM) 140 CsCl, 7 NaCl, 2 $MgCl_2$, 2 EGTA, 10 HEPES, 1 ATP-Mg, pH was adjusted to 7.2 with CsOH 1M. 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. Mosquito neurons were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -70

mV and 15-ms test pluses were applied from the holding potential at a frequency of 0.3 Hz. Patch-clamp experiments were conducted at room temperature (20-22℃).

**Pneumatic pressure ejection application of the neurotransmitter acetylcholine (ACh).** Acetylcholine (100 μM, Sigma) was applied by pneumatic pressure ejection (15 psig, 200-ms pulses), with a pneumatic pressure system (Miniframe, Medical System Corporation, NY) to minimize receptor desensitization resulting from bath application of agonist[11]. The pressure ejection was made through a glass micropipette (resistance of 2 MΩ when filled with agonist) positioned in solution within 40 μm from the isolated neuron cell body. In no experiment did the pressure ejection of normal saline realized with the same protocol affect the current baseline. Repeated applications of acetylcholine were made with an interval of 2 min between the end of one application and the beginning of the next.

**Data analysis.** Data analysis, including fitting procedures, was performed using the software Prism 4 (Graph Pad software). Results, when quantified, were expressed as means $\pm$ S.E.M.. Differences between means were tested for statistical significance by Student's *t* test. The smooth lines of the current-voltage relationship represented the best fit to the mean data according to the equation[17]:

$$I = G\,[1-\{1/(1+\exp((V-V_{0.5}/K))\}](V-Vrev) \qquad (1)$$

where I is the maximum inward current amplitude, V is the membrane potential, $V_{0.5}$ and K are the activation parameters, G is the maximum conductance and Vrev is the extrapolated reversal potential of the current. The voltage-dependence of the steady-state activation was fitted by a single Boltzmann equation of the type:

$$I/Imax = 1/\{1+\exp[(V_{0.5}-V)/k]\} \qquad (2)$$

where I is the current amplitude at a given potential, Imax is the maximum current amplitude, $V_{0.5}$ is the potential at which half the Nav channels are activated and k is the slope factor. The voltage dependence of the steady-state inactivation was determined using a conventional two-pulse voltage-clamp protocol. Inactivation properties were studied by applying a conditioning pulse between -80 mV and + 20 mV (in steps of 10 mV) that was long enough (500 ms) to allow the inactivation process to reach its steady-state level. Thereafter, the membrane potential was stepped back to the holding potential (-70 mV) for 1 ms to ensure that the activation variable remained constant and a 15-ms test pulse was applied to 0 mV. The normalized peak current amplitudes were normalized to the peak current amplitude during the first test pulse, plotted against the potential of the conditioning pulse, and fit with the following Boltzmann equation:

$$I/Imax = 1/\{1+\exp[(V-V_{0.5})/k]\} \quad (3)$$

where I is the peak current, Imax was the maximum peak current from a holding potential of -70 mV, $V_{0.5}$ is the potential at which half current was inactivated, V is the potential of the conditioning pulse and k corresponded to the slope factor. A two-pulse protocol was used to study the rate of recovery from inactivation. It consisted of two identical depolarizing pulses applied from a holding potential of -70 mV to 0 mV and separated by a variable time (1-15 ms in steps of 1 ms). The first depolarizing pulse (conditioning pulse) was long enough (10 ms in duration) to give more than 95% inactivation of the current. To determine the time constant for recovery from inactivation, the curve was fitted using the software Clampfit (version 9.0, Axon Instruments) with a single exponential function:

$$I/Imax = A \exp(-t/\tau) \quad (4)$$

where I is the current amplitude, Imax is the maximum current amplitude measured at 0 mV from a holding potential of -70 mV, A is the corresponding relative amplitude with time constant $\tau$.

**Biochemical assay of AChE activity.** Seven heads from *An. gambiae* mosquito adults were placed in 700 µL of the mosquito saline buffer and isolation of neuron cells was performed using mechanical dissociation as described (**Fig. 1**). Hundred µL of the suspension were incubated for 15 min with 10 µL of a carbamate insecticide (propoxur). Dilutions ($10^{-4}$ to $10^{-8}$) from the initial concentration (1M) were used for propoxur. AChE residual activity was determined spectrophotometrically[12] at 405 nm at 30 min using 100 µL of 1 mM acetylthiocholine (ATC) (Sigma) and 100 µL of 1mM DTNB (Sigma) for each dilution, and was expressed as a percentage of initial activity (without inhibitor). Values obtained are means of three independent experiments, each performed in triplicate.

## REFERENCES


1. WHO, World Malaria Report 2010, World_Health_Organization (2010).
2. WHO In: *WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP/2006.3,* Ed. World_Health_Organization (2006).
3. Ranson, H. *et al*. *Trends Parasitol*. **27**, 91-98 (2011).
4. Lapied, B., Pennetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P., & Corbel, V. *Trends Biotechnol.* **27**, 190-198 (2009).
5. Beadle, D.J. *Invert Neurosci.* **6,** 95-103 (2006).
6. Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. & Lapied, B. *J Pharmacol Exp Ther*. **333**, 264-272 (2010).
7. Loesel, R., Weigel, S., & Braunig, P. *J Neurosci Methods* **155**, 202-206 (2006).
8. Wicher, D, Walther, C. & Wicher, C. *Prog Neurobiol*. **64**, 431-525 (2001).
9. Soderlund, D.M. *Pest Manag Sci*. **64**, 610-616 (2008).
10. Corbel, V. *et al*. *BMC Biol*. **7**, 47 (2009).
11. Lapied, B., Le Corronc, H. & Hue, B. *Brain Res*. **533**, 132-136 (1990).
12. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr., V. & Featherstone, B.B. *Biochem Pharmacol*. **7**, 88-95 (1961).
13. Pennetier, C. *et al*. *Malar J.* **6**,38 (2007).
14. Pennetier, C. *et al*. *PLoS One* **4**, e7896 (2009).
15. Moignot, B., Lemaire, C., Quinchard, S., Lapied, B. & Legros C. *Insect Biochem Mol Biol*. **39**,814-823 (2009).
16. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E, Sakmann, B. & Sigworth, F.J. *Pflüger Arch*. **391**, 85-100 (1981).
17. Stühmer, W. In: *Molecular Biology of Ionic Channels*. Ed. Agnew, W.S. & Sigworth, F.J. pp 271-276. San Diego: Academic Press Inc. (1988).

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Mosquito neuron isolation procedure and characterization

(**a**) *Anopheles gambiae* head. (**b**) Mechanical dissociation of neurons from mosquito head. (**c**) Mosquito neurons observed under inverted microscope. (**d-f**) Confocal laser-scanning images: (**d**) counterstaining with acridine orange binds DNA in the nuclei of all cells. (**e**) HRP-staining in neurons among isolated cells. (**f**) Fluorescent double-labeling as a result of superimposing (**d**) and (**e**) identified cells as neurons (arrows). (**g**) Electrophoretic analysis of amplicons obtained by multiplex PCR using cDNA of isolated neurons (*Agα1 nAChR*: 548 bp, *Ag Cav*: 777 bp, *AgKv1*: 470 bp, *ace*-1: 558 bp, *ace*-2: 433 bp and *AgNav1*: 895 bp).

**Figure 2** Whole cell patch-clamp and biochemical studies of mosquito isolated neurons

(**a-f**) Biophysical properties of the TTX-sensitive inward sodium current studied under voltage-clamp condition, in the presence of potassium and calcium channel blockers, according to the protocols shown in inset. (**g**) Illustration of the type I pyrethroid (permethrin) effect on the sodium current, indicating that sodium channels were sensitive to pyrethroids. (**h,i**) Pressure ejection application of acetylcholine (ACh) onto isolated neuron, elicited an inward current, revealing the anticholinesterasic effect of the repellent DEET. (**j**) Dose-dependent anticholinesterasic effect of the carbamate propoxur on the neuronal residual AChE activity.

**Supplementary Table 1**. Oligonucleotide primers used for PCR

| Gene (partial) | Position | Sequence (5'-3') | Product length (bp) | Accession no. |
|---|---|---|---|---|
| *Ag$\alpha$1 nAChR* | 12-33<br>562-583 | GCTACTCACGGCTGTGTTCATA<br>CGATGCCGATGTCGATGTTGTC | | |
| *Ag$\alpha$1 nAChR* (semi-nested) | 36-58<br>562-583 | GTTACAATTTGCTACCGGCCTGG<br>CGATGCCGATGTCGATGTTGTC | 548 | AY705394 |
| *AgCav1* | 14-37<br>842-865 | CGGCCAAAATGGATGACACTGAGT<br>GTGGATCATCCATTATCTCTCCCG | | |
| *AgCav1* (semi-nested) | 89-112<br>842-865 | CGGGAACAGCAATTGGAACGACAA<br>GTGGATCATCCATTATCTCTCCCG | 777 | EF595743 |
| *AgKv*1 | 63-86<br>544-566 | GTTGAGCAGTCAGGATGAAGAAGG<br>CTAATTATGGCTACAACCCTGGC | | |
| *AgKv*1 (semi-nested) | 97-120<br>544-566 | CACGGTTTTGGGGGAGGTCATACT<br>CTAATTATGGCTACAACCCTGGC | 470 | XM_310869 |
| *ace*-1 | 3-24<br>567-588 | GGAGATCCGAGGGCTGCTGATG<br>GTAGGGAATGCCGAGCCACACG | | |
| *ace*-1 (semi-nested) | 31-52<br>567-588 | CTACGGTTAGGACGGCGGATGG<br>GTAGGGAATGCCGAGCCACACG | 558 | XM_321792 |
| *ace*-2 | 11-31<br>445-466 | CGTACTACCACCAGTCGGCAG<br>CGTCATCGTCCTGGAAATAGTC | | |
| *ace*-2 (semi-nested) | 34-54<br>445-466 | GGCGTCGGCAACGTGCTGGTG<br>CGTCATCGTCCTGGAAATAGTC | 433 | XM_310628 |
| *AgNav1* | 4614-38<br>5571-95 | CTACATGTATCTGTACTTTGTGTTC<br>TTCGAGGATAACAGCAATGTACATG | | |
| *AgNav1* (nested) | 4648-72<br>5518-42 | TTTGGGTCATTCTTCACGTTGAATC<br>GATACGCCAATAAGTACGTTATGCC | 895 | AM422833 |

**Supplementary Table 2** Biophysical characteristics of the inward sodium current of adult isolated mosquito neurons.

| Current-voltage relationship | | INa amplitude (pA) at -10 mV | Midpoint of steady-state activation | Slope factor of activation k | Midpoint of steady-state inactivation ($V_{0.5}$, mV) | Slope factor of inactivation k | Time constant of recovery from inactivation (ms) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Activation threshold (mV) | Reversal potential (mV) | | | | | | |
| -40 ± 2 (n=12) | +46.0 ± 5 (n=12) | -196.7 ± 23.7 (n=12) | -27.04 ± 0.10 (n=11) | 5.8 ± 0.1 (n=11) | -47.4 ± 0.2 (n=9) | 8.6 ± 0.1 (n=9) | 2.7 ± 0.2 (n=12) |

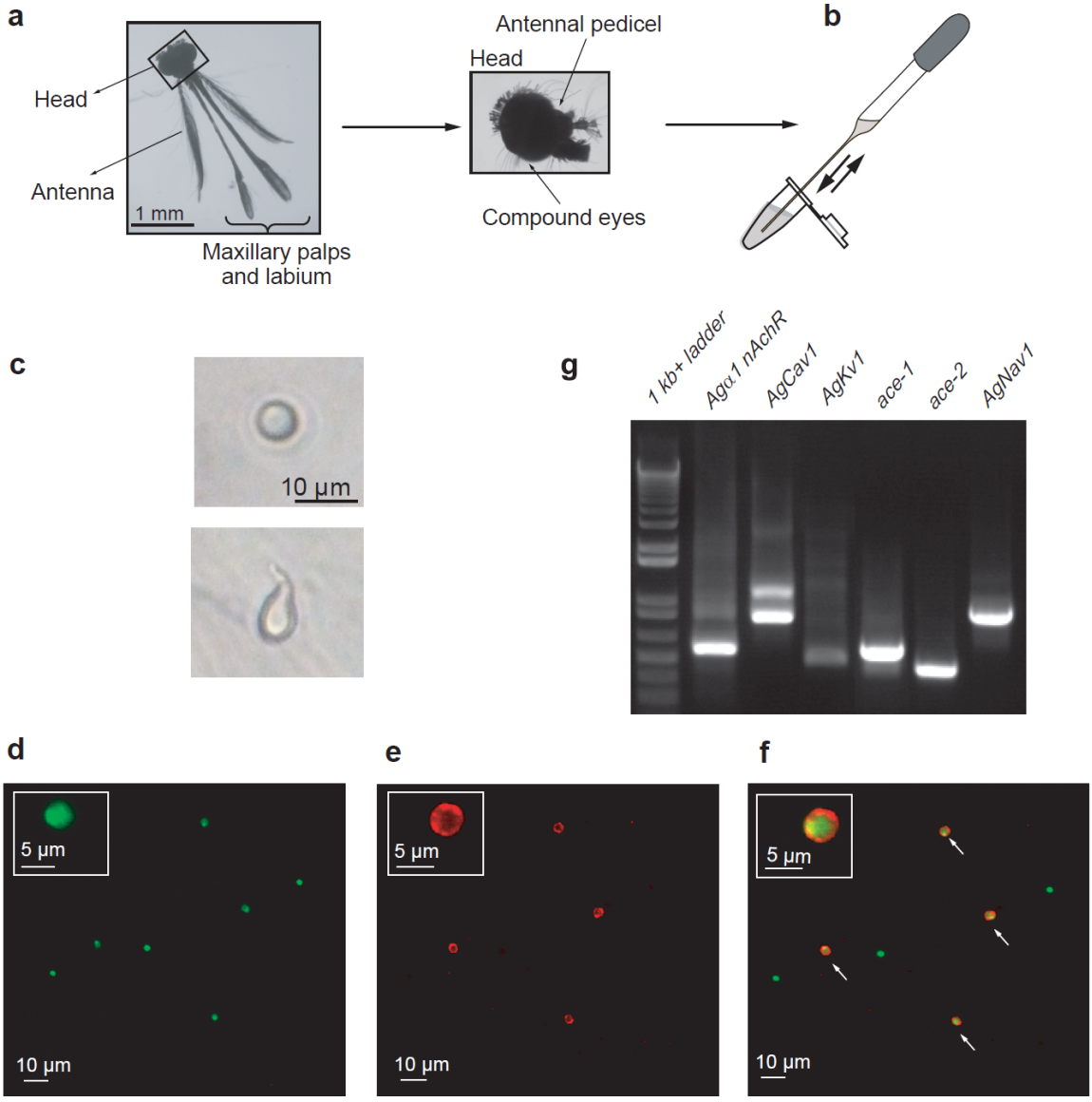

a
Head
Antenna
1 mm
Maxillary palps
and labium
Antennal pedicel
Head
Compound eyes
b
c
10 µm
g
1 kb+ ladder
Agα1 nAchR
AgCav1
AgKv1
ace-1
ace-2
AgNav1
d
5 µm
10 µm
e
5 µm
10 µm
f
5 µm
10 µm

Figure 1

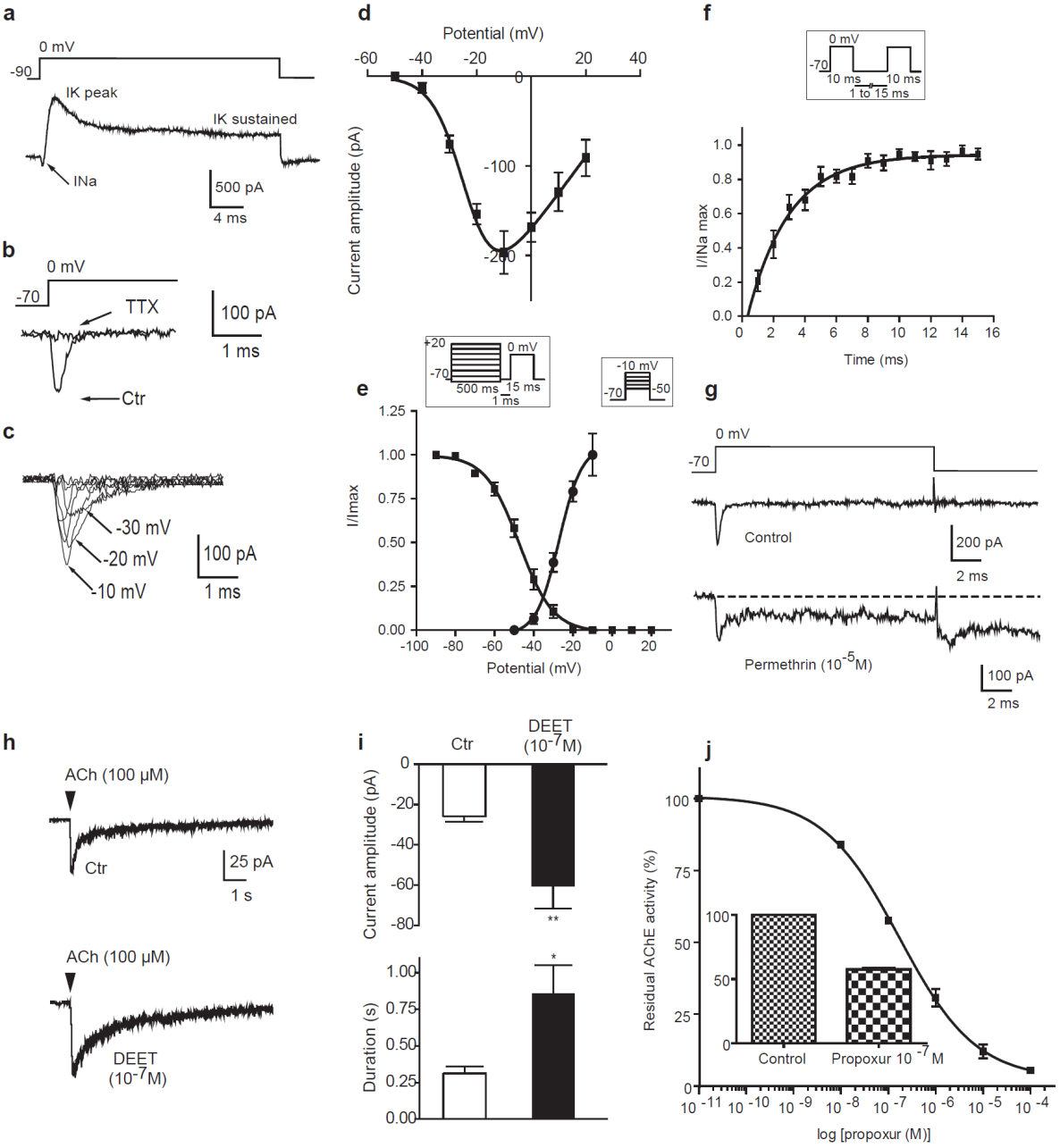

a
0 mV
-90
IK peak
IK sustained
INa
500 pA
4 ms
b
0 mV
-70
TTX
100 pA
1 ms
Ctr
c
-30 mV
-20 mV
-10 mV
100 pA
1 ms
d
Potential (mV)
-60 -40 -20 0 20 40
-100
-200
Current amplitude (pA)
e
+20
0 mV
-70
500 ms
15 ms
1 ms
-10 mV
-70
-50
I/Imax
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-100 -80 -60 -40 -20 0 20
Potential (mV)
f
0 mV
-70
10 ms
10 ms
1 to 15 ms
I/INa max
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
Time (ms)
g
0 mV
-70
Control
200 pA
2 ms
Permethrin (10-5M)
100 pA
2 ms
h
ACh (100 µM)
Ctr
25 pA
1 s
ACh (100 µM)
DEET
(10-7M)
i
Ctr
DEET
(10-7M)
Current amplitude (pA)
0
-20
-40
-60
-80
**
Duration (s)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
j
Residual AChE activity (%)
100
75
50
25
0
100
50
0
Control
Propoxur 10 -7 M
10 -11 10 -10 10 -9 10 -8 10 -7 10 -6 10 -5 10 -4
log [propoxur (M)]

Figure 2