



HAL
open science

Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*

Fanny Louat

► **To cite this version:**

Fanny Louat. Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2062 . tel-01058781

HAL Id: tel-01058781

<https://theses.hal.science/tel-01058781>

Submitted on 28 Aug 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.

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Fanny LOUAT

soutenue le : **17 décembre 2013**

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

Discipline/ Spécialité : **Génétique cellulaire et moléculaire**

**Etude des effets liés à l'exposition aux
insecticides chez un insecte modèle,
*Drosophila melanogaster***

THÈSE dirigée par :

Martine DECOVILLE Maître de conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Luc BELZUNCES Directeur de recherche, INRA, Avignon
Serge BIRMAN Directeur de recherche, ESPCI, Paris

JURY:

Frank BRIGNOLAS Professeur, Université d'Orléans (Président du jury)
Luc BELZUNCES Directeur de recherche, INRA
Serge BIRMAN Directeur de recherche, CNRS
Neel RANDSHOLT Chargée de recherche, CNRS
Jean-Claude BELOEIL Directeur de recherche, CNRS
Martine DECOVILLE Maître de conférences, Université Orléans

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS, Orléans) dirigé par Monsieur Jean-Claude Beloeil puis par Madame Eva Jakab Toth.

Je tiens à remercier chaleureusement Martine Decoville pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail ainsi que pour m'avoir prodigué ses nombreux conseils et critiques. Je tiens également à remercier Jean-Claude Beloeil et Sandra Mème de m'avoir accueillie dans leur équipe. Un grand merci aux différents membres de l'équipe, Patrice, Frédéric, Nicolas, Laetitia, Rudy pour leur soutien et leur aide pendant ces trois années de thèse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Monsieur Luc Belzunces, Directeur de recherche à l'INRA d'Avignon, et à Monsieur Serge Birman, Directeur de recherche à l'ESPCI à Paris d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur Franck Brignolas, Professeur à l'université d'Orléans, à Monsieur Jean-Claude Beloeil, Directeur de recherche émérite au CNRS d'Orléans et à Neel Randsholt, Chargée de recherche au LBD à Paris, pour avoir accepté d'être membres du jury.

Je voudrais également remercier David Gosset pour tout le temps passé à réaliser mes images ainsi que les personnes extérieures au laboratoire comme Marie-Claude Lesages et Jean-Charles Leple pour leur aide précieuse concernant les expériences de qPCR. Un grand merci à Abdul-Raouf Issa pour m'avoir enseigné la méthode d'immunohistochimie. Je tiens à remercier les personnes du CEMHTI pour leur aide en particulier Vincent Sarou-Kanian.

Enfin je suis très heureuse de remercier toutes les personnes qui me sont chères et qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions.

En hommage à mon frère, Jean-Baptiste Louat

SOMMAIRE

CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE

<u>I. Les produits phytosanitaires</u>	1
I.1-Utilité des produits phytosanitaires.....	1
I.2-Marché mondial des produits phytosanitaires.....	2
I.3-Risques liés à l'utilisation des produits phytosanitaires.....	3
I.4-Réglementation des produits phytosanitaires.....	3
<u>II. Les insecticides</u>	5
II.1-Historique.....	5
II.2-Les différentes familles d'insecticides et leurs modes d'action.....	6
II.2.1.Les perturbateurs des processus de croissance et de développement.....	7
II.2.1.1.Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine.....	8
II.2.1.2.Les perturbateurs hormonaux.....	10
II.2.2.Les inhibiteurs de la respiration cellulaire.....	12
II.2.3.Utilisation de certaines bactéries comme insecticides.....	14
II.2.4.Le système nerveux des insectes, cible majeure des insecticides.....	15
II.2.4.1.Le récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).....	15
II.2.4.2.Le récepteur canal sodium voltage-dépendant.....	18
II.2.4.3.L'acétylcholinestérase.....	21
II.2.4.4.Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine.....	24
<u>III.Utilisation des insecticides: conséquences sur l'environnement</u>	28
III.1-La résistance chez les insectes.....	28
III.2-Les mécanismes de résistance aux insecticides.....	29
III.2.1.La résistance comportementale.....	29
III.2.2.La résistance cuticulaire.....	29
III.2.3.La résistance via une évolution des cibles de l'insecticide.....	30

III.2.3.1.Modifications du récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique	30
III.2.3.2.Modifications du récepteur canal sodium voltage-dépendant	31
III.2.3.3.Modifications de l'acétylcholinestérase	33
III.2.3.4.Modifications du récepteur nicotinique à l'acétylcholine	33
III.2.4.La résistance métabolique	34
III.2.4.1.Les carboxylestérases (COEs)	36
III.2.4.1.1.Carboxylestérases et résistances aux insecticides	37
III.2.4.2.Les monooxygénases à cytochromes P450 (CYPs)	38
III.2.4.2.1.Mode d'action des CYPs	38
III.2.4.2.2.Nomenclature des CYPs	39
III.2.4.2.3.Les CYPs chez les insectes	40
III.2.4.2.4.CYPs et résistance aux insecticides	41
III.2.4.3.Les glutathion S-transférases (GSTs)	43
III.2.4.3.1.Mode d'action des GSTs	44
III.2.4.3.2.Nomenclature des GSTs	44
III.2.4.3.3.GSTs et résistance aux insecticides	46
III.3-L'impact des insecticides sur les organismes non cibles	47
III.3.1.Les insectes non cibles	48
III.3.1.1.Effets sur le comportement des insectes	48
III.3.1.2.Effets physiologiques	50
III.3.2.Autres organismes	52
III.3.3.L'homme	55
III.3.3.1.Effets sur le système endocrinien et la reproduction	55
III.3.3.2.Effets cancérigènes	56
III.3.3.3.Effets sur le système immunitaire	57
III.3.3.4.Effets neurologiques et comportementaux	58
<u>IV.Objectifs de la thèse</u>	60

CHAPITRE II: ETUDE DE L'EFFET D'UN NEONICOTINOIDE, L'IMIDACLOPRIDE, CHEZ LA DROSOPHILE.

<u>I. Introduction</u>	63
I.1-L'imidaclopride, un néonicotinoïde.....	63
I.2-La cible de l'imidaclopride: le récepteur nicotinique à l'acétylcholine.....	64
I.3-L'effet de l'imidaclopride chez la drosophile.....	65
<u>II. Caractérisation des effets létaux et sublétaux après exposition à l'imidaclopride chez la drosophile</u>	66
II.1-Introduction à l'article I.....	66
II.2-Résultat complémentaire: effet «knock down» de l'imidaclopride sur la drosophile.....	74
II.2.1.Matériel et méthodes: l'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	75
II.2.1.1.L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	75
II.2.1.2.Protocole d'exposition à l'imidaclopride.....	75
II.2.2.Résultat: étude de l'effet «knock-down» par IRM.....	76
<u>III. Caractérisation de la résistance de la souche Orléans</u>	78
III.1-La souche Orléans est plus résistante que la souche Oregon-R.....	78
III.2-Introduction à l'article II.....	79
<u>IV. Discussion</u>	108
IV.1-Différence de sensibilité à l'imidaclopride entre les mâles et les femelles.....	108
IV.2-Impact de l'imidaclopride chez la drosophile à des doses sublétales.....	109
IV.3-Résistance à l'imidaclopride chez les femelles Orléans (intoxication aiguë).....	110

CHAPITRE III: ETUDE DE L'EFFET D'UN ORGANOCHLORE, LA DIELDRINE, CHEZ LA DROSOPHILE.

<u>I. Introduction</u>	115
-------------------------------------	------------

I.1-La dieldrine, un organochloré.....	115
I.2-La cible de la dieldrine: le récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique.....	117
I.3-La dieldrine et la maladie de Parkinson.....	117
I.3.1.La maladie de Parkinson.....	117
I.3.2.La dieldrine: implication dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.....	118
I.3.3.Modélisation de la maladie de Parkinson chez la drosophile.....	119
I.3.4.Objectif de l'étude: modéliser l'impact d'une exposition à la dieldrine chez un insecte modèle, la drosophile.....	121
<u>II. Matériel et méthodes</u>	124
II.1-Les souches de drosophiles et conditions d'élevage.....	124
II.2-Conditions d'exposition à la dieldrine.....	124
II.3-Test de la durée du développement.....	124
II.4-Test de la longévité.....	125
II.5-Test de préférence alimentaire.....	125
II.6-Test pour l'activité locomotrice.....	127
II.7-Immunohistochimie sur les cerveaux de larves et d'adultes.....	127
II.8-L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM).....	128
II.9-Analyse des métabolites par HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning).....	129
II.10-Analyse des modifications d'histones par Western blot.....	129
II.11-Analyses statistiques.....	130
<u>III. Résultats expérimentaux</u>	132
III.1-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur la durée de vie.....	132
III.1.1.Effet de la dieldrine sur la durée du cycle de vie.....	132
III.1.2.Effet de la dieldrine sur la longévité.....	135
III.1.3.Exposition à la dieldrine chez la larve ou l'adulte: conséquence sur la longévité.....	137
III.4.Etude de l'effet de la dieldrine sur la prise de nourriture.....	140
III.2-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur l'activité locomotrice.....	141
III.2.1.Effet de la dieldrine sur l'activité locomotrice.....	141
III.2.2.Exposition à la dieldrine chez la larve ou l'adulte: effet sur l'activité locomotrice.....	144
III.3-Exposition chronique à la dieldrine: neurodégénérescence???	146

III.3.1.Effet de la L-DOPA sur l'activité locomotrice.....	146
III.3.2.Effet de la dieldrine sur le nombre de neurones dopaminergiques.....	147
III.3.2.1.Les neurones dopaminergiques chez la larve.....	147
III.3.2.2.Les neurones dopaminergiques chez l'adulte.....	149
III.3.3.Imagerie par Résonance Magnétique: structure globale du cerveau des drosophiles.....	150
III.4-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur le métabolisme.....	155
III.5-Exposition chronique à la dieldrine: effet sur l'acétylation des histones.....	160
III.5.1.Implication des HDACs et des HATs dans l'effet induit par l'exposition à la dieldrine.....	161
III.5.2.Etude des modifications de l'épigénome induites par une exposition à la dieldrine.....	164
III.6-Un transporteur ABC impliqué dans la sensibilité à la dieldrine???	166
<u>IV. Discussion</u>	168
IV.1-La dieldrine induit une neurodégénérescence chez la drosophile.....	168
IV.2-Mise au point de l'Imagerie par Résonance Magnétique.....	172
IV.3-La dieldrine affecte l'homéostasie des phospholipides: étude par HRMAS.....	174
IV.4-Des processus épigénétiques sont impliqués dans la neurodégénérescence induite par la dieldrine.....	179
IV.5-Les mâles et les femelles ne montrent pas la même sensibilité à la dieldrine.....	179
IV.6-Un transporteur ABC pourrait être impliqué dans la sensibilité à la dieldrine.....	181
IV.7-Conclusion.....	184
CHAPITRE IV: CONCLUSION GENERALE	186
Bibliographie	189

CHAPITRE I: Introduction générale

I-Les produits phytosanitaires

I.1-Utilité des produits phytosanitaires.

Les produits phytosanitaires permettent de lutter contre des organismes considérés comme nuisibles. Ils sont actuellement utilisés dans de nombreux domaines comme l'hygiène vétérinaire (élimination des puces chez les chiens et les chats), la protection des denrées alimentaires, les usages domestiques (jardinage, produits ménagers) et l'entretien des espaces publics (espaces verts, routes, voies ferrées). Ces produits phytosanitaires sont également employés dans le domaine de la santé publique pour lutter contre les vecteurs de maladies humaines (le paludisme, la fièvre jaune, la dengue...). Par exemple, le paludisme est responsable de la mort de 655 000 personnes dans le monde en 2010 (OMS, rapport 2011), d'où l'importance de l'utilisation des produits phytosanitaires pour lutter contre ces maladies. Cependant, ces produits restent principalement utilisés dans le domaine agricole. En effet, ce domaine doit faire face à une demande croissante pour l'alimentation. On estime que les besoins alimentaires mondiaux vont s'accroître de 50% d'ici 2030 alors que la surface des terres cultivables reste limitée (rapport d'activité UIPP 2011/2012). Pour répondre à ces besoins, l'augmentation de la productivité agricole est devenue une priorité et la protection des cultures, essentielle. L'usage des produits phytosanitaires apparaît comme une des solutions possibles. En effet, en absence de ces produits, on estime que 30 à 40% des récoltes seraient détruites par les maladies, les insectes ravageurs etc..., à travers le monde (rapport d'activité UIPP 2011/2012).

Les produits phytosanitaires regroupent plusieurs classes dont les trois principales sont: les fongicides, les herbicides et les insecticides. Contre les virus et les parasites responsables de

certaines maladies humaines (paludisme, fièvre jaune, dengue...), le moyen actuel reste de lutter contre les vecteurs de ces maladies soit les insectes (cicadelles, moustiques...). Les insecticides permettent donc de lutter contre les insectes mais aussi contre les pathogènes qu'ils véhiculent.

I.2-Marché mondial des produits phytosanitaires.

Le marché mondial des produits phytosanitaires est d'environ 44 milliards de dollars en 2011 (figure 1A) ce qui correspond à une augmentation de 44% en 5 ans. Les herbicides représentent presque la moitié du marché mondial avec 45,2%. Les insecticides constituent 26,1% du marché et les fongicides 25,9% en 2010 (figure 1B). Ces trois classes de produits phytosanitaires représentent à elles-seules presque la totalité du marché mondial (97%). La France est le premier consommateur de produits phytosanitaires en Europe et se place au 3^{ème} rang mondial derrière les Etats-Unis et l'Inde.

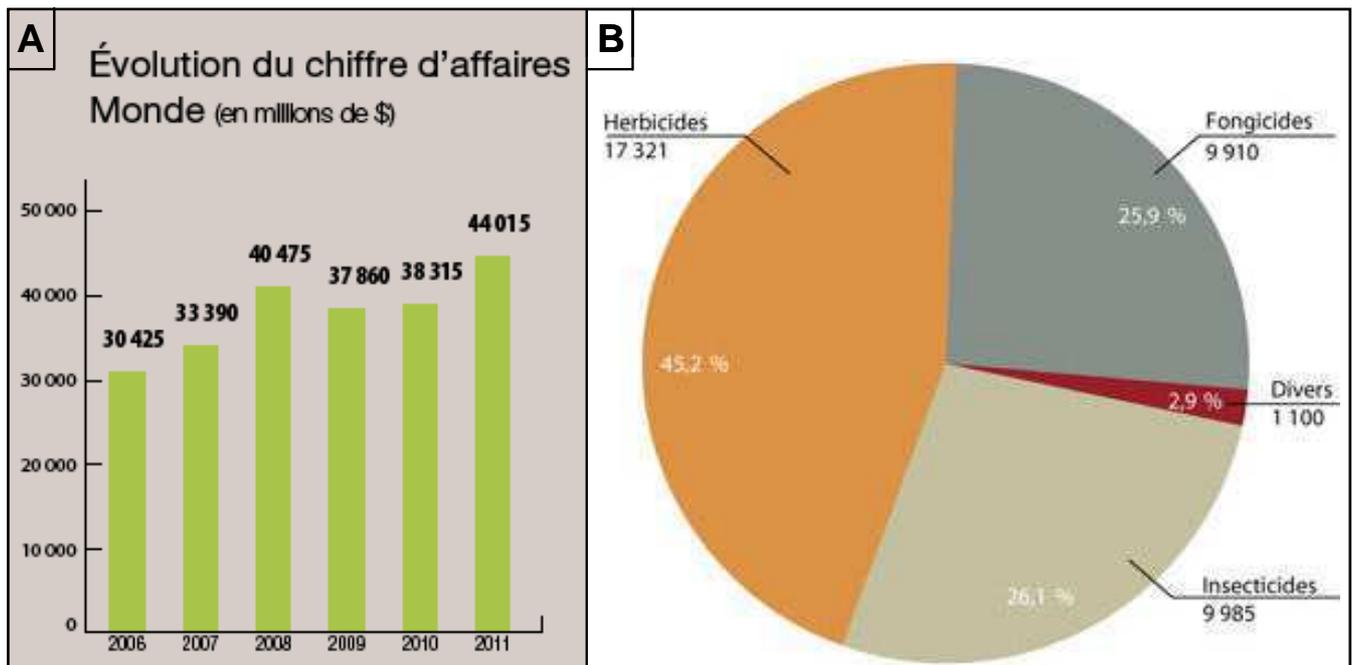


Figure 1: Marché mondial des produits phytosanitaires. (A) Evolution du marché mondial des produits phytosanitaires depuis 2006. (B) Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2010 (rapport d'activité UIPP 2011/2012).

1.3-Risques liés à l'utilisation des produits phytosanitaires.

La seconde moitié du XX^{ème} siècle a été le témoin d'une utilisation progressive et massive des produits phytosanitaires dans le monde. En effet, la consommation de ces produits a doublé tous les dix ans de 1945 à 1985. Cependant l'utilisation de ces produits phytosanitaires n'est pas sans conséquences sur les écosystèmes. Après application en champs, ces substances vont être disséminées dans les sols et dans les airs. Les éléments comme la pluie et le vent vont favoriser cette dispersion provoquant la contamination des sols, des lacs, des fleuves... parfois très loin du site d'épandage de ces produits chimiques. Ces substances ont par exemple été retrouvées dans les embruns océaniques ou dans la neige de l'Arctique (Van der Werf, 1997).

La publication en 1962 du livre ``Silent Springs'', printemps silencieux en français, écrit par la biologiste Rachel Carson, a suscité une prise de conscience des problèmes liés aux produits phytosanitaires sur l'environnement. Elle fut la première à dénoncer les effets nocifs de ces produits chimiques sur les organismes non cibles comme les oiseaux. Cet ouvrage a entraîné l'interdiction du DDT aux Etats-Unis en 1972. En plus d'avoir un impact sur les organismes non cibles, l'usage intensif des produits phytosanitaires favorise l'apparition de résistance chez les insectes ravageurs. Une mauvaise utilisation de ces produits peut donc entraîner leur propre inefficacité sur les nuisibles.

Aujourd'hui, l'impact des produits phytosanitaires sur l'environnement et les organismes vivants est reconnu et devient une préoccupation sociétale. Une réglementation est donc apparue pour encadrer l'utilisation de ces produits.

1.4-Réglementation des produits phytosanitaires.

Les autorités ont mis en place l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'usage des produits phytosanitaires. Une AMM est délivrée pour un produit phytosanitaire et pour un ou plusieurs usage(s) précis. Un usage précis correspond à une culture, un mode de traitement, un ravageur, une dose à employer et les conditions d'application. Les AMMs de ces produits sont encadrées au niveau européen et au niveau national.

La législation européenne est régie par le règlement 1107/2009/CE, qui s'applique depuis le 14 juin 2011. Il permet l'harmonisation des réglementations dans l'Union Européenne et la mise en place d'une procédure stricte sur l'évaluation des risques des produits phytosanitaires. Le but de ce règlement est de garantir une protection élevée vis-à-vis de la santé humaine,

animale et de l'environnement tout en préservant la compétitivité agricole de l'union européenne. Avant d'obtenir une AMM, l'entreprise doit fournir un dossier d'évaluation des risques toxicologiques et écotoxicologiques à l'agence européenne de sécurité alimentaire (EFSA). Ce dossier doit comporter une évaluation des risques pour les utilisateurs du produit phytosanitaire avec la dose journalière admissible (DJA) obtenue à partir de la dose nommée NOAEL (no observable adverse effect level) correspondant à la quantité de produits qui peut être consommée chaque jour sans conséquences sur la santé humaine, le niveau acceptable d'exposition de l'opérateur (NAEO) et la dose aiguë de référence (DARf). Si le produit phytosanitaire est destiné à la conservation de denrées alimentaires, une limite maximale de résidus du produit (LMR) est à fournir. Le dossier doit contenir la preuve de l'efficacité du produit phytosanitaire en conformité avec les conditions réelles d'utilisation. Le dossier doit également faire figurer les risques liés aux métabolites du produit phytosanitaire, la composition exacte du produit, l'incidence sur la santé humaine (effets indésirables) et le devenir du produit dans l'environnement (persistance, bioaccumulation, capacité à se propager dans l'environnement). Après une expertise scientifique du dossier, l'EFSA rend un avis favorable seulement si l'expertise conclût à: ``La substance ne présente pas d'effet nocif inacceptable pour la santé humaine et l'environnement``. La commission européenne procède ensuite à l'examen du dossier et autorise (ou non) la mise sur le marché pour une période de dix ans. Le produit phytosanitaire est ensuite inscrit sur la liste des substances ayant une AMM (540/2011/UE).

Au niveau national, l'AMM est délivrée par le ministère de l'Agriculture après examen du dossier par l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES). Cependant un produit phytosanitaire ne peut pas recevoir une AMM en France si celui-ci n'a pas reçu au préalable une AMM au niveau européen.

De plus, les normes actuelles visent à réduire la consommation de produits phytosanitaires pour ``parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable`` en Europe (128/2009/CE). En France, un plan a été adopté puis mis en place en 2008 pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires, le ``plan Ecophyto 2018``. Il envisage de réduire l'utilisation de ces produits de 50% si possible d'ici 2018. Ce plan s'organise selon 8 axes visant principalement à favoriser les cultures économes en produits phytosanitaires pour réduire leur utilisation et évaluer les risques liés à l'usage de ces produits.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif d'étudier les conséquences liées à l'utilisation de deux insecticides, l'imidaclopride et la dieldrine chez un organisme modèle la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Je vais donc me focaliser par la suite sur cette classe de produits phytosanitaires, les insecticides.

II-Les insecticides

Les insecticides sont des substances qui permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis à vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles.

II.1-Historique.

La lutte contre ces organismes existe depuis des millénaires. L'usage du soufre est apparu chez les Sumériens vers 2000 ans avant Jésus-Christ et l'arsenic était recommandé par Pline (naturaliste romain) en tant qu'insecticide. En 1690, Jean de la Quintinie a décrit les propriétés insecticides du tabac (nicotine). Cependant, ce n'est qu'au XIXe siècle que l'utilisation des pesticides a connu un développement important. Différents éléments ont favorisé ce développement: l'accroissement démographique de la population humaine (obligation d'augmenter la productivité agricole), l'affaiblissement des terres agricoles (épidémies dans les cultures), l'apparition du machinisme agricole ainsi que les progrès considérables dans le domaine de la chimie organique de synthèse. Les traitements des cultures par les insecticides apparaissent alors avec l'utilisation de l'arsenic pour lutter contre les insectes ravageurs (ex: arséniate de plomb contre l'Eudémis de la vigne).

Néanmoins, le véritable essor des pesticides de synthèse débute au XXe siècle. On assiste à un développement considérable des insecticides organiques qui sont majoritairement des composés organochlorés. Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) a été synthétisé en 1874 par Othman et Zeidler et ses propriétés insecticides furent découvertes en 1939 par Müller et Weissman. Il fut très efficace dans la lutte contre les insectes ravageurs comme les moustiques vecteurs du paludisme. D'autres organochlorés furent utilisés comme le HCH (hexachlorocyclohexane), l'endosulfan, l'aldrine ou la dieldrine.

Au cours de la seconde moitié du XXe siècle, de nombreuses découvertes ont permis d'enrichir la famille des pesticides dans le domaine agricole notamment par les recherches menées sur les gaz de combat durant la seconde guerre mondiale. Des insecticides très efficaces apparaissent alors. Tout d'abord, la famille des organophosphorés dont les propriétés ont été mises en évidence en 1936 et qui se développent à partir de 1944 avec le malathion, le dichlorvos ou encore le parathion. En 1957, le premier insecticide appartenant à une nouvelle famille, les carbamates, est décrit: le carbaryl qui sera suivi par le carbofuran ou encore l'aldicarbe. Dans les années 1970-1980, une autre famille d'insecticides est découverte: les pyréthrinoïdes, analogues de synthèse des pyréthrines, substances présentes dans les fleurs de chrysanthème. Certaines molécules sont encore utilisées actuellement comme la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine. Les benzoylurées apparaissent en 1972 avec le diflubenzuron puis les phénylpyrazoles en 1993 avec le fipronil. Dans les années 1970s puis 1980s, des recherches basées sur la structure de la nicotine ont permis le développement d'une nouvelle famille d'insecticides, les néonicotinoïdes (Jeschke et Nauen, 2008). La commercialisation de l'imidaclopride débute en 1994 et il sera suivi par d'autres substances comme le thiaclopride, le nitenpyrame ou encore le clothianidine. Les néonicotinoïdes dominent actuellement le marché des insecticides.

II.2-Les différentes familles d'insecticides et leurs modes d'action.

Au cours de ces dernières années de nombreuses familles d'insecticides sont apparues. Elles peuvent être classées par groupe selon leurs modes d'action et la cible visée (Insecticide mode of action classification, IRAC 2012). Ces cibles sont variées et correspondent à des enzymes, des protéines, des canaux, des récepteurs... Certaines familles agissent sur la croissance en perturbant la mue des insectes (famille des diacylhydrazines), d'autres comme les benzoylurées perturbent leurs développements (tableau 1). Les insecticides interviennent également dans la respiration cellulaire ou encore au niveau des muscles pour une toute petite partie d'entre eux. Certaines bactéries comme *Bacillus thuringiensis* peuvent être aussi utilisées car elles produisent des endotoxines, délétères pour l'insecte (tableau 1).

CIBLE	ACTION	FAMILLES	EXEMPLES DE MOLECULES
Croissance et développement	biosynthèse de la chitine	benzoylurées	chlorfluazuron, diflubenzuron, lufénuron, novaluron
	récepteur à l'ecdysone	diacylhydrazines	chromafénozide, halofénozide, tébufénozide
Respiration cellulaire	ATP synthase mitochondriale		azocyclotine, cyhexatine, diafenthiuron
	transport des électrons dans la mitochondrie		acequinocyl, pyridabène, phosphine
	acétyl CoA carboxylase		spirodiclofène, spiromésifène, spirotetramate
Intestin			<i>Bacillus thuringiensis</i>
Système nerveux	canal sodium voltage-dépendant	organochlorés	DDT, méthoxychlore
		pyréthriinoïdes	cyperméthrine, deltaméthrine, pyréthrine, téfluthrine
	acétylcholinestérase	organophosphorés	chlorpyrifos, diazinon, malathion, parathion
		carbammates	aldicarbe, carbaryl, carbosulfan, thiocarbe
	récepteur nicotinique à l'acétylcholine	néonicotinoïdes	acétamipride, imidaclopride, nitenpyrame, thiaméthoxam
		spinosynes	spinétorame, spinosad
	récepteurs GABAergiques	phénylpyrazoles	éthiprole, fipronil
		organochlorés	chlordan, endosulfan
	récepteur à l'octopamine		amitraze
récepteur à la ryanodine	diamines	flubendiamide, chlorantraniliprole	

Tableau 1: Liste des principales classes d'insecticides utilisées à ce jour. D'après la classification de l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (février 2012).

Cependant une classe reste largement majoritaire de part son efficacité élevée, elle correspond aux neurotoxiques. Ils agissent au niveau du système nerveux et renferment plusieurs familles d'insecticides comme les organochlorés ou les néonicotinoïdes (Tableau 1). D'autres insecticides sont également utilisés mais la cible et le mode d'action restent incertains ou méconnus comme le bifénazate (Casida, 2009). Toutes ces familles d'insecticides agissent donc au niveau de cibles bien distinctes que je vais détailler par la suite.

II.2.1. Les perturbateurs des processus de croissance et de développement chez l'insecte.

Ces insecticides ayant un rôle sur la croissance et le développement de l'insecte sont souvent utilisés en cas d'échec d'autres familles d'insecticides. Chez le moustique en particulier, après l'apparition de résistance aux pyréthriinoïdes et aux organophosphates, des insecticides de ce type ont été utilisés (Belinato et al., 2013). Ils agissent en tant que régulateurs de croissance

des insectes (IGR, Insect Growth Regulators). Les IGRs ont été classés en 2 groupes, le premier correspond aux inhibiteurs de la synthèse de la chitine qui intervient dans la formation de la cuticule et le deuxième correspond à des substances qui perturbent l'action des hormones spécifiques des insectes (hormones juvéniles et ecdysone) (Tunaz et Uygun, 2004).

II.2.1.1. Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine.

La chitine est un biopolymère très répandu dans la nature qui est produit par les insectes en particulier. Elle est le composant majeur de la cuticule qui constitue l'exosquelette chez les insectes. La chitine est également présente dans la matrice péritrophique, couche protectrice de l'intestin moyen des insectes contre l'attaque de pathogènes ou de toxines (Merzendorfer et Zimoch, 2003). La chitine est un polymère linéaire composé de N-acétyl-glucosamines. La biosynthèse de ce polymère fait intervenir plusieurs enzymes pour convertir différents sucres (glucose, tréhalose) en UDP-N-acétyl-glucosamine (Merzendorfer, 2011). La dernière étape est synthétisée par une enzyme très importante, la chitine synthase (Figure 2).

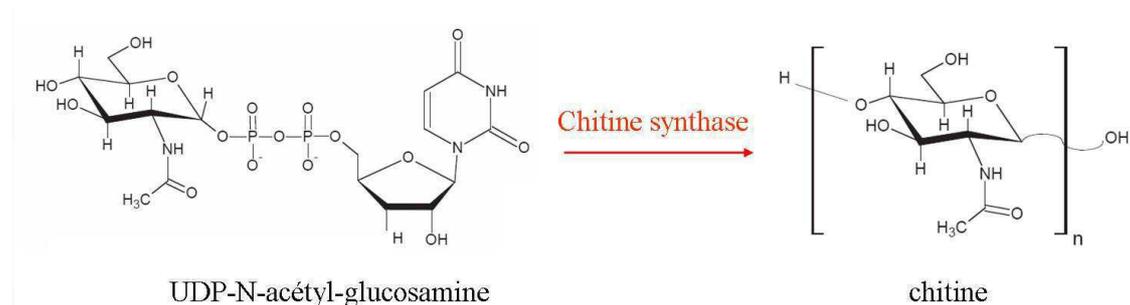


Figure 2: Synthèse de la chitine à partir de l'UDP-N-acétyl-glucosamine par la chitine synthase.

Ce mécanisme requiert le UDP-N-acétyl-glucosamine comme substrat et la présence de cations divalents comme le Mg^{2+} (Merzendorfer 2006). La chitine est transportée à travers la membrane plasmique dans le domaine extracellulaire par un processus méconnu. Deux hypothèses ont été proposées (Merzendorfer et Zimoch, 2003). Dans la première hypothèse, des vésicules endoplasmiques transportent la chitine synthase au niveau de la membrane plasmique. Suite à la fusion des vésicules avec la membrane, la chitine synthase est activée et produit les polymères de chitine dans le domaine extracellulaire (Figure 3A). La deuxième hypothèse propose que la chitine est synthétisée et accumulée à l'intérieur des vésicules endoplasmiques par la chitine synthase. Les vésicules fusionnent avec la membrane

plasmique pour libérer les polymères de chitine quand cela est nécessaire (Figure 3B). Une fois dans le domaine extracellulaire, les polymères s'assemblent ensuite de manière spontanée pour former des microfibrilles de diamètre et de longueur variables.

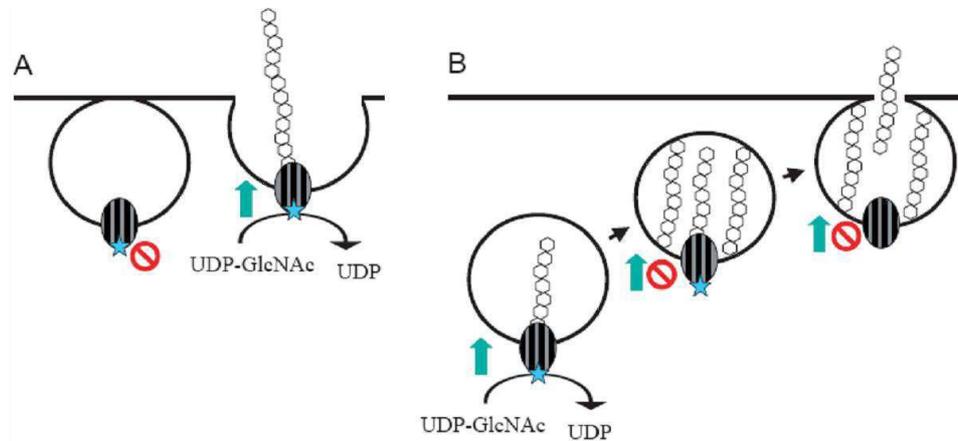


Figure 3: Modèles pour le transport de la chitine au niveau de la membrane plasmique. (A) Après transport des vésicules contenant la chitine synthase à la membrane plasmique, la membrane des vésicules fusionne avec la membrane plasmique. La chitine synthase est activée par les enzymes protéolytiques contenues dans le domaine extracellulaire pour produire la chitine. (B) La synthèse de la chitine débute dans les vésicules durant leurs transports au niveau de la membrane plasmique. Après fusion des vésicules, la chitine est libérée dans le domaine extracellulaire. L'étoile bleue indique le site catalytique de la chitine synthase. (d'après Merzendorfer et Zimoch, 2003).

La synthèse de la chitine est un processus crucial pour la croissance et le développement de l'insecte. En effet, elle est le constituant majoritaire de la cuticule que l'insecte remplace régulièrement à travers le phénomène de mue. L'inhibition de la synthèse de la chitine induit des perturbations dans la formation de la cuticule et la mue avorte. C'est pourquoi des inhibiteurs de la synthèse de la chitine ont été développés en tant qu'insecticides comme les benzoylurées (Figure 4). Cependant, le mécanisme d'action de ces insecticides reste inconnu. Ils n'agiraient pas sur la chitine synthase directement mais plutôt sur le transport de la chitine via les vésicules endoplasmiques ou le transport à travers la membrane plasmique (Merzendorfer, 2006). Ces insecticides ont une faible persistance dans l'environnement et ils sont presque sans danger pour les organismes non cibles. Ces insecticides restent utilisés dans le domaine de l'arboriculture, la sylviculture et la santé publique pour l'élimination des moustiques vecteurs de maladies humaines. Les benzoylurées représentent 3% du marché mondial (Sparks, 2013).

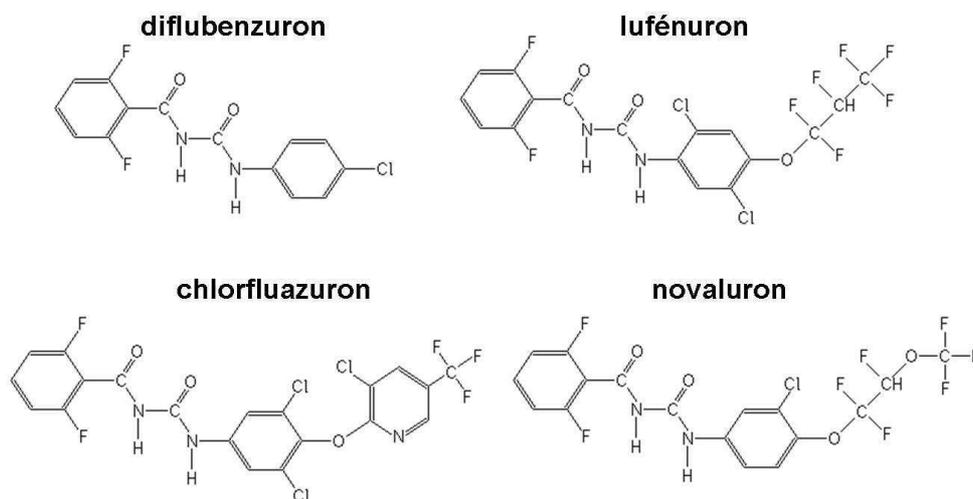


Figure 4: Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des benzoylurées.

II.2.1.2. Les perturbateurs hormonaux.

Chez les insectes, le développement est rythmé par des processus de mues. Les mues de croissance permettent à la larve d'augmenter sa taille alors que les mues de métamorphose induisent de nombreux changements morphologiques aboutissant à l'imago. Ces différentes étapes sont régulées par deux hormones principales: l'ecdysone, hormone stéroïdienne de mue (active sous forme de 20-hydroxyecdysone, 20E) et les hormones juvéniles (JH) (Dhadialla et al., 1998).

Au niveau moléculaire, la cible de la 20E est un récepteur nucléaire, un hétérodimère composé de EcR (ecdysteroid receptor) et de USP (ultraspiracle). Ces deux protéines font partie de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et présentent un domaine de liaison à l'ADN. Le complexe 20E-récepteur va ensuite se lier à l'ADN au niveau de sites spécifiques et jouer le rôle de facteur de transcription pour des gènes cibles impliqués dans les processus de mues (Dubrovsky, 2005). Ce processus démarre avec l'augmentation de la quantité de la 20E. Chez la drosophile, cette hormone est sécrétée par les glandes prothoraciques au niveau du cerveau de la larve. Suite à l'augmentation de la 20E, la larve arrête de se nourrir. L'ancienne cuticule se détache des cellules de l'épiderme (l'apolyse) et crée un espace qui se remplit de liquide exuvial contenant des enzymes chitinolytiques inactives. Sous l'influence de la 20E, les cellules de l'épiderme s'organisent pour produire massivement les constituants de la nouvelle cuticule. Une fois que la quantité de 20E diminue, les enzymes chitinolytiques sont activées pour digérer une partie de l'ancienne cuticule. Le liquide exuvial est ensuite réabsorbé suivi d'une libération de l'hormone d'éclosion

permettant l'exuviation. Le déclenchement des mues est donc dû à une augmentation de 20E. Si cette hormone agit en synergie avec les hormones juvéniles, une mue larvaire sera déclenchée (Figure 5).

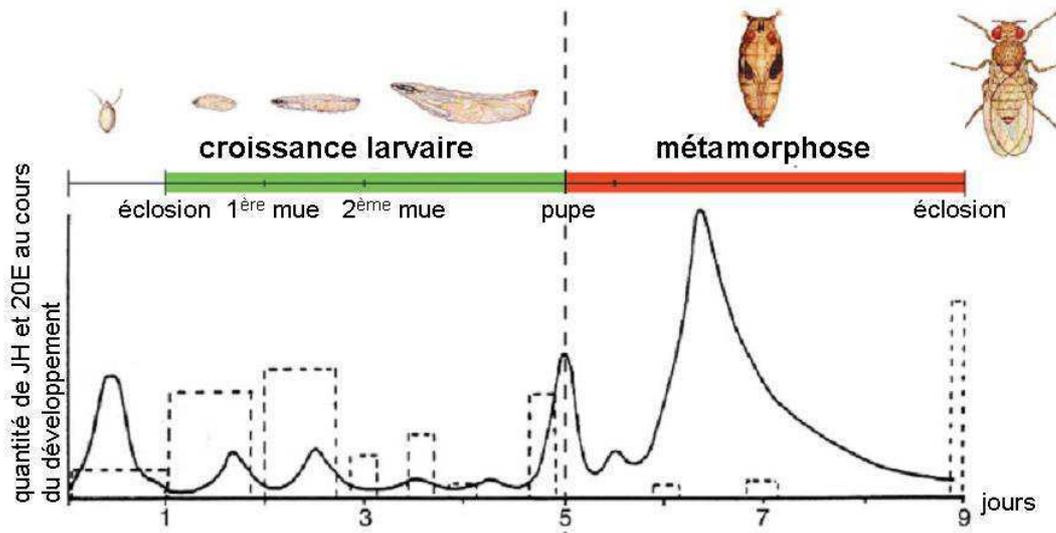


Figure 5: Variation du titre de la 20-hydroxyecdysone (20E) et des hormones juvéniles (JHs) durant le développement de *Drosophila melanogaster*. 20E, ligne pleine et JHs ligne en pointillés (d'après Dubrovsky, 2005).

Durant le dernier stade larvaire, une action de la 20E en absence d'hormones juvéniles va permettre l'induction non plus de mues larvaires mais de mue de métamorphose. Ces processus de croissance et de développement sont très bien coordonnés principalement par la 20E et les hormones juvéniles. Une perturbation dans l'homéostasie d'une de ces hormones peut avoir des conséquences dramatiques pour l'insecte.

Ainsi des analogues d'hormones spécifiques des insectes ont été utilisés comme insecticides pour le contrôle des nuisibles en agriculture. La famille la plus importante correspond aux diacylhydrazines, agonistes d'ecdystéroïdes (Figure 6).

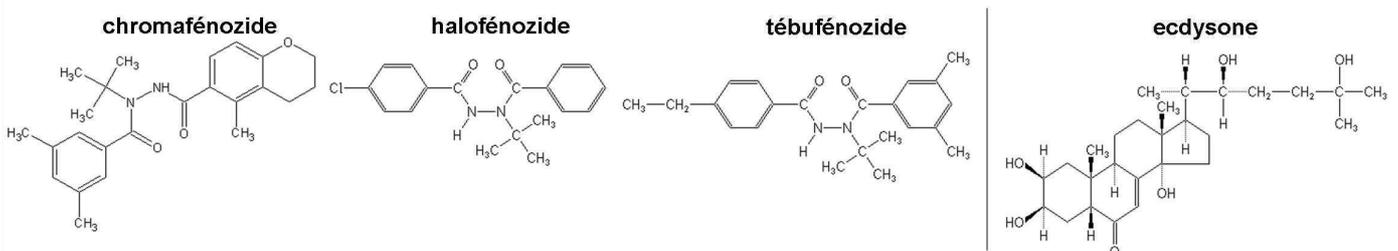


Figure 6: Formules chimiques de plusieurs insecticides appartenant à la famille des diacylhydrazines et de l'ecdysone.

Découverts par Rohm et Haas dans les années 1980s, ces composants provoquent une mue prématurée chez les insectes cibles, qui conduit à la mort de la larve. Ces produits sont donc désignés comme accélérateurs de mues (Fahrbach et al, 2012). L'avantage de ces insecticides réside dans leur spécificité d'action. Par exemple, le tebufénozide est toxique pour les lépidoptères mais très faiblement toxique pour les autres espèces comme les coléoptères, les diptères, les pollinisateurs comme l'abeille ainsi que les mammifères (Dhadialla et al., 1998). Ils ont également une faible rémanence dans l'environnement. D'autres études ont permis le développement de nouveaux insecticides comme le tétrahydroquinoline pour lutter spécifiquement contre les moustiques (Fahrbach et al, 2012). Ces insecticides sont principalement utilisés dans l'arboriculture et la viticulture. Cependant ces insecticides ont une action plus lente que les neurotoxiques, ce qui provoque des pertes plus importantes dans les cultures utilisant ces insecticides. Les diacylhydrazines représentent 1% du marché mondial des insecticides (Sparks, 2013).

II.2.2. Les inhibiteurs de la respiration cellulaire.

La respiration cellulaire fournit l'énergie nécessaire à la cellule pour fonctionner et est apparue comme une cible possible pour lutter contre les organismes nuisibles en agriculture. La mitochondrie est le centre énergétique de la cellule. L'énergie produite provient d'une voie métabolique appelée chaîne respiratoire mitochondriale. Elle a pour but de phosphoryler l'ADP (adénosine diphosphate) en ATP (adénosine triphosphate) fournisseur énergétique universel. Les enzymes de cette voie, situées dans la membrane interne de la mitochondrie, sont impliquées dans 5 complexes différents (I-V). Les complexes I à IV permettent le passage de protons dans l'espace intermembranaire (Figure 7). Ces protons sont ensuite captés par l'ATPase (complexe V) pour phosphoryler l'ADP en ATP dans la matrice de la mitochondrie (Figure 7). D'autres enzymes auront en charge le transport de l'ATP dans l'espace intermembranaire (l'ATP/ADP translocase) puis dans le cytoplasme de la cellule (la porine). Certains insecticides ont la propriété d'inhiber les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 8). Ils vont agir en perturbant soit les réactions d'oxydation soit le gradient de protons. Il en résulte une perturbation dans la synthèse de l'ATP. Ces insecticides sont principalement utilisés dans les cultures arboricoles en France. En général, ils présentent une faible toxicité vis-à-vis des mammifères ainsi qu'une faible persistance dans l'environnement. Par exemple, le pyridabène est utilisé pour lutter contre les mites et les insectes comme les pucerons en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire

II.2.3. Utilisation de certaines bactéries comme insecticides.

Certaines bactéries, en particulier *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), sont pathogènes pour certaines catégories d'insectes (coléoptères, diptères, lépidoptères principalement) surtout durant les stades larvaires (Bravo et al., 2011). *Bt* a la capacité de synthétiser des inclusions cristallines associées aux spores ayant des propriétés insecticides. Elles sont formées de protéines variées appelées toxines Cry (Bravo et al., 2011). Une fois ingérées (inclusions cristallines-spores) par les larves des insectes, les protoxines contenues dans les inclusions sont solubilisées par les protéases de l'intestin moyen, libérant ainsi les δ -endotoxines. Ces protéines toxiques vont ensuite se lier aux récepteurs cadherin-like situés à la surface des microvillosités des cellules épithéliales et subir une protéolyse. Cette étape va permettre l'oligomérisation des protéines toxiques puis la liaison avec d'autres types de récepteurs (GPI anchored receptor) et enfin l'insertion dans la membrane des cellules épithéliales pour former des pores (Figure 9). Cette étape va induire un choc osmotique au niveau de l'intestin moyen et favoriser la germination des spores. *Bt* va alors se multiplier et se répandre dans l'organisme provoquant la mort de l'insecte par septicémie (Nielsen-LeRoux et al., 2012).

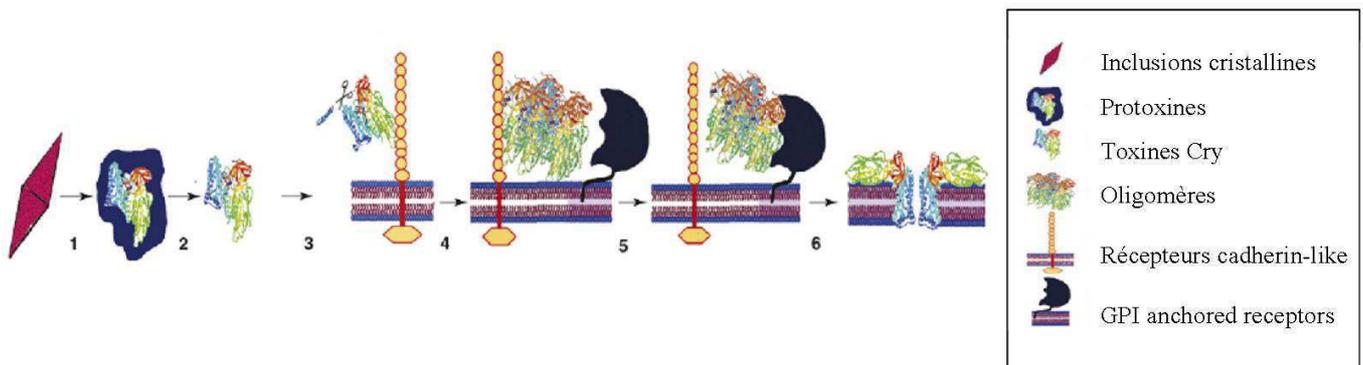


Figure 9: Modèle probable du mode d'action des toxines Cry. Solubilisation (1) et activation des toxines Cry par les protéases de l'intestin moyen (2), liaison aux récepteurs cadherin like et clivage de l'hélice $\alpha 1$ des toxines (3), oligomérisation des toxines Cry(4), liaison aux récepteurs du type GPI anchored receptors (5) puis insertion dans la membrane pour former un pore (6). (d'après Bravo et Soberon, 2008).

Malgré un grand nombre d'études qui mettent en évidence la formation de pores dans le mécanisme d'action des toxines Cry, un autre modèle a récemment été proposé qui pourrait également intervenir dans ce processus chez les insectes (Soberon et Bravo, 2009). L'interaction entre les protéines toxiques et les récepteurs cadherin-like va activer une

cascade de transductions impliquant une protéine G, l'adénylate cyclase et la protéine kinase A et conduire à la mort cellulaire.

Grâce à ses propriétés insecticides, Bt est utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles dans certaines cultures (vignes, arbres fruitiers), dans le domaine de la sylviculture, le stockage de graines et contre les moustiques, vecteurs de maladies humaines. Les insecticides contenant Bt représentent environ 2% du marché mondial actuel (Bravo et al., 2011). Ces insecticides sont principalement commercialisés sous forme de suspension de spores mais l'usage commercial est limité. En effet le traitement des cultures doit être fréquent car les δ -endotoxines sont sensibles aux radiations solaires et deviennent inactives rapidement. Le problème a été contourné par l'utilisation de cultures transgéniques (principalement coton et maïs) capables d'exprimer les toxines Cry (James, 2009). Cependant, l'utilisation et l'impact sur l'environnement de ces cultures restent controversés (Vain, 2007; Michaud, 2005).

II.2.4. Le système nerveux des insectes, cible majeure des insecticides.

Les neurotoxiques restent la classe la plus importante qui correspond à plus de 75% du marché mondial des insecticides (Casida, 2009). Ils agissent au niveau du système nerveux des insectes en perturbant la transmission synaptique. Les neurotoxiques ont l'avantage d'agir rapidement et efficacement pour stopper les dégâts engendrés dans les cultures. Ils agissent également sur les insectes vecteurs de maladies humaines comme le moustique (Casida et Durkin, 2013). Ces neurotoxiques ont pour cibles majeures: (1) les récepteurs canaux de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), cibles des phénylpyrazoles et de certains organochlorés, (2) les canaux sodium voltage-dépendant, cibles des pyréthriinoïdes et de certains organochlorés, (3) l'acétylcholinestérase, cible des organophosphorés et des carbamates et (4) le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR), cible des spinosynes et des néonicotinoïdes.

II.2.4.1. Le récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Le récepteur canal du GABA est la cible des phénylpyrazoles et de certains organochlorés (cyclodiènes). Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur et il joue un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale (hyperpolarisation membranaire) chez les vertébrés et les invertébrés. Son récepteur, le récepteur canal GABAergique est un récepteur pentamérique faisant partie de la superfamille des récepteurs ``Cys-loop`` comme les

récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChRs) ou encore les récepteurs de type 3 de la sérotonine (5-HT₃). Chaque sous-unité du récepteur possède un domaine extracellulaire N-terminal contenant les sites de liaison au neurotransmetteur suivi de quatre domaines transmembranaires (M1-M4) (Figure 10). Le domaine M2 contient les résidus responsables de la formation du canal qui permet le passage des ions chlorure (Buckingham et al., 2005).

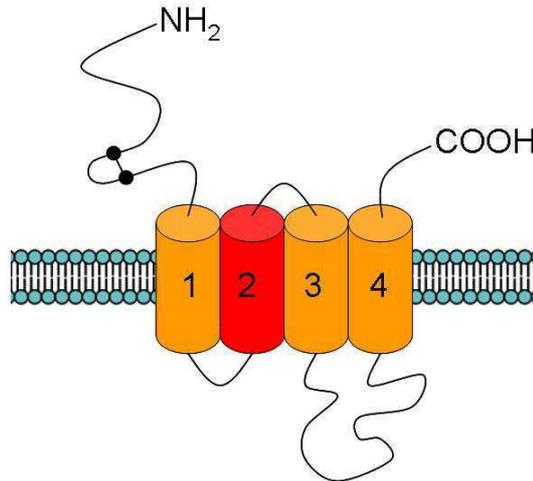


Figure 10: Schéma de la structure d'une sous-unité d'un récepteur canal au GABA. Une sous-unité possède 4 domaines transmembranaires et 2 résidus cystéine dans le domaine extracellulaire N-terminal (ronds noirs).

Chez les vertébrés, il existe deux types de récepteurs GABA ionotropes en fonction de leurs propriétés pharmacologiques et de leur composition en sous-unités: les récepteurs GABA_A et les récepteurs GABA_C. Les récepteurs GABA_A (composés des sous-unités α_{1-3} , β_{1-6} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π_{1-3}) sont sensibles aux modulateurs allostériques comme les benzodiazépines et également sensibles à la bicuculline. À l'inverse, les récepteurs GABA_C (composés des sous-unités ρ_{1-3}) sont insensibles à la bicuculline et à la plupart des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A (Buckingham et al., 2005).

Les récepteurs GABA des insectes ne peuvent pas être classés dans l'un des deux groupes vus précédemment car ils présentent une sensibilité vis-à-vis des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A mais ils présentent aussi une insensibilité à la bicuculline (Hosie et al., 1997). La composition en sous-unités des récepteurs des insectes reste méconnue. Actuellement trois sous-unités ont été clonées chez *Drosophila melanogaster* qui se nomment RDL (resistance to dieldrin), GRD (GABA and glycine-like receptor of *Drosophila*) et LCCH3 (ligand-gated chloride channel homologue 3) (Raymond-Delpech et al., 2005).

RDL est la sous-unité qui a été la plus étudiée après sa découverte par ffrench-Constant comme responsable de la résistance aux cyclodiènes chez *Drosophila melanogaster* (ffrench-

Constant et al., 1991). Cette sous-unité du récepteur a pu être exprimée de manière hétérologue dans des ovocytes de xénope (*Xenopus laevis*) pour former un récepteur homo-oligomérique fonctionnel (Hosie et al., 1997). L'étude pharmacologique de ces récepteurs a montré une insensibilité à la bicuculline comparable à la majorité des récepteurs GABAergiques natifs des insectes (Buckingham et al., 2005). Les homomères de RDL mimant l'action des récepteurs natifs, ils ont été utilisés comme modèle pour l'étude de l'action des insecticides sur les récepteurs GABA des insectes (Grolleau et Sattelle, 2000).

Il a été montré qu'une mutation, induisant le remplacement d'une alanine par une sérine en position 302 dans le domaine M2 (Figure 11), confère la résistance aux cyclodiènes et au fipronil chez la drosophile (French-Constant et al., 2004). Le remplacement de l'alanine en position 302 est retrouvé dans d'autres espèces comme le moustique ou le puceron du pêcher, suggérant un rôle crucial de cet acide aminé dans le site de liaison aux insecticides. D'autres études basées sur le déplacement de radio-ligands montrent que les insecticides agissent de manière similaire à la picrotoxine, antagoniste connu des récepteurs GABA (Casida et Durkin, 2013).

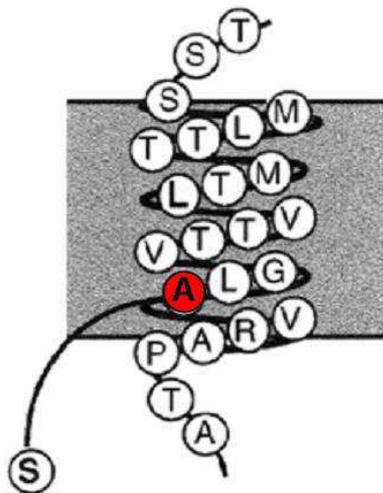


Figure 11: Schéma de la structure du domaine transmembranaire M2 de la sous-unité RDL (résistance to dieldrin) du récepteur GABA. L'alanine en position 302 est noté en rouge.

Actuellement les organochlorés (Figure 12) qui ciblent les récepteurs GABA des insectes sont interdits car ils présentent une forte persistance dans l'environnement, une bioaccumulation dans la chaîne alimentaire ainsi qu'une faible sélectivité insectes/mammifères. Mais d'autres insecticides sont apparus sur le marché mondial comme le fipronil, appartenant à la classe des phénylpyrazoles (Figure 12). Il présente une meilleure sélectivité vis-à-vis des insectes et une

rémanence dans l'environnement plus faible que les organochlorés. Les phénylpyrazoles représentent 5% du marché mondial des insecticides (Sparks, 2013).

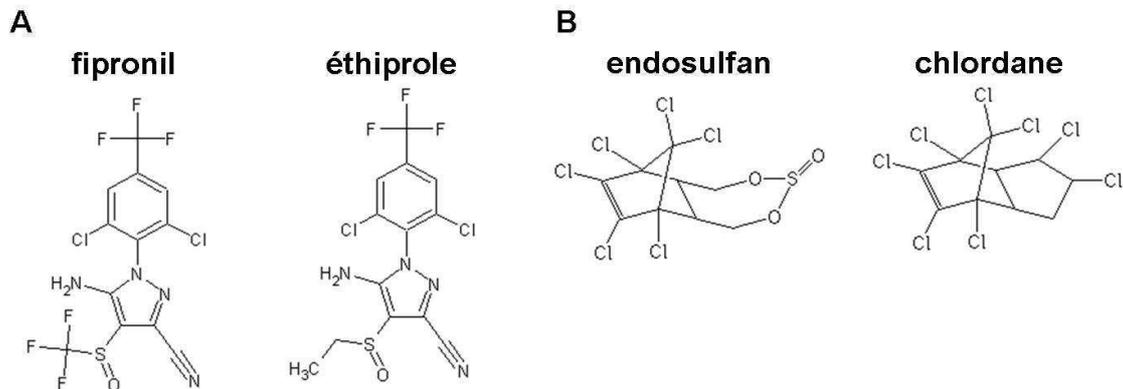


Figure 12: Formules chimiques de plusieurs insecticides agissant sur le récepteur GABA. (A) insecticides appartenant à la famille des phénylpyrazoles. (B) insecticides appartenant à la famille des organochlorés.

Le fipronil reste actuellement utilisé dans le domaine vétérinaire comme traitement anti-puces, ou comme traitement des semences pour certaines cultures (maïs, tournesol). Cependant, le fipronil a été interdit en raison de l'impact de cet insecticide sur les abeilles. Le traitement des semences (maïs et tournesol) est suspendu pour une période de deux ans à compter du 31 décembre 2013 dans l'union européenne.

II.2.4.2. Le récepteur canal sodium voltage-dépendant.

Le canal sodium voltage-dépendant est la cible des pyréthriinoïdes et de certains organochlorés en particulier le DDT. Ce canal joue un rôle important dans la propagation des potentiels d'action dans les cellules neuronales chez les vertébrés comme les invertébrés. Chez les mammifères, ce canal est formé par une seule sous-unité α (Figure 13). Il correspond à un polypeptide composé de quatre domaines homologues (I-IV) comprenant chacun six hélices transmembranaires (S1-S6). Les hélices S5 et S6 permettent la formation du canal alors que les hélices S1 à S4 sont responsables de la sensibilité au potentiel de membrane (Figure 13). Après une dépolarisation de la membrane, les hélices S4 (des domaines I et II) chargées positivement se déplacent, induisant un changement conformationnel du récepteur ce qui permet le passage sélectif des ions Na^+ (Catterall, 2000). Par la suite, la perméabilité aux ions Na^+ diminue et le récepteur devient inactif (état intermédiaire) ne permettant plus le

passage des ions. La repolarisation de la membrane induit une désactivation du récepteur (Davies et al., 2007).

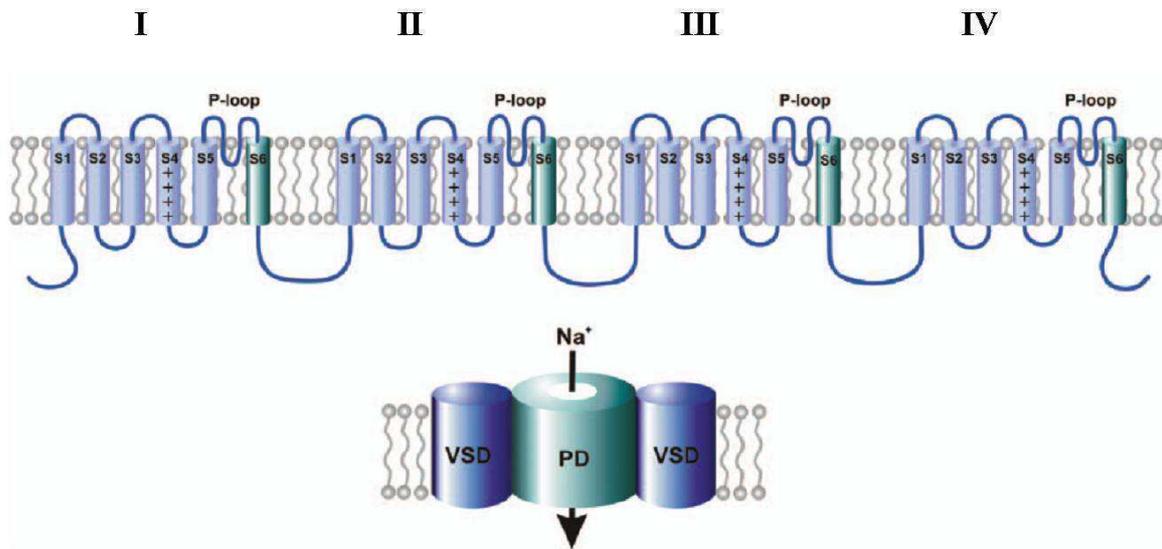


Figure 13: Schéma de la structure du canal sodium voltage-dépendant. La sous-unité α est formée par un polypeptide unique avec 4 domaines homologues (I-IV) composés eux-mêmes de 6 hélices transmembranaires (S1-S6). Les 4 domaines homologues s'assemblent au niveau des hélices S5, S6 et des boucles S5-S6 (P-loops) pour former un pore (PD) permettant le passage d'ions Na^+ . Les autres hélices (S1 à S4) sont responsables de la sensibilité au potentiel de membrane du récepteur en formant 4 domaines senseurs (VSD). (d'après Davies et al., 2007).

Chez les insectes, la sous-unité α est codée par le gène *para* et présente une forte homologie structurelle et fonctionnelle avec la sous-unité α des mammifères (Bourdin et al., 2013). Il a été cloné chez la drosophile d'où son nom (situé au niveau du locus *paralysis* sur le chromosome X) (Davies et al., 2007).

Chez les insectes, le DDT et les pyréthrinoïdes provoquent des mouvements convulsifs, la paralysie puis la mort. Au niveau moléculaire, ces insecticides se fixent préférentiellement sur le canal sodium ouvert. Cette liaison ralentit la fermeture du canal conservant ainsi le passage d'ions Na^+ à travers la membrane. (Davies et al., 2007). Cette étape engendre la mise en place d'un état stable hyperexcité de la cellule qui produit un effet paralysant chez l'insecte appelé "knock down". Les pyréthrinoïdes sont classées en deux groupes (type I et II) en fonction de leurs effets chez l'insecte et de la présence (type II) ou non (type I) d'un groupe cyano en position α de la partie alcool benzyle. Les pyréthrinoïdes de type I entraînent la paralysie de l'insecte alors que les pyréthrinoïdes de type II, qui sont plus efficaces, entraînent des mouvements convulsifs. Cette différence s'explique par le fait que les pyréthrinoïdes de type

II prolongent l'ouverture du canal sodium plus longtemps que les pyréthriinoïdes de type I. Les courants sodiques sont perturbés pendant dix à cent millisecondes pour les pyréthriinoïdes de type I alors que cette perturbation est de quelques secondes pour les pyréthriinoïdes de type II (Davies et al., 2007).

Les études expérimentales sur la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT ont mis en évidence l'implication de régions particulières. Dans la plupart des cas, la boucle entre les hélices S4 et S5, l'hélice S5 et l'hélice S6 du domaine II sont impliquées. Par exemple, la mutation *knr* qui correspond au remplacement d'une leucine par une phénylalanine en position 1014 (hélice S6 du domaine II) est retrouvée dans de nombreuses espèces comme la mouche domestique, le moustique commun, le doryphore ou encore le puceron du pêcher (Davies et al., 2007). En se basant sur ces données expérimentales, O'Reilly et ses collaborateurs ont pu suggérer un modèle d'interaction des insecticides avec le canal sodium (Figure 14). L'étude a été menée sur un modèle homologue du canal sodium de la mouche domestique, le canal potassium Kv1.2 chez le rat. Le modèle permet d'inclure dans la cavité hydrophobe, la plupart des résidus associés à la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT chez les insectes (O'Reilly et al., 2006).

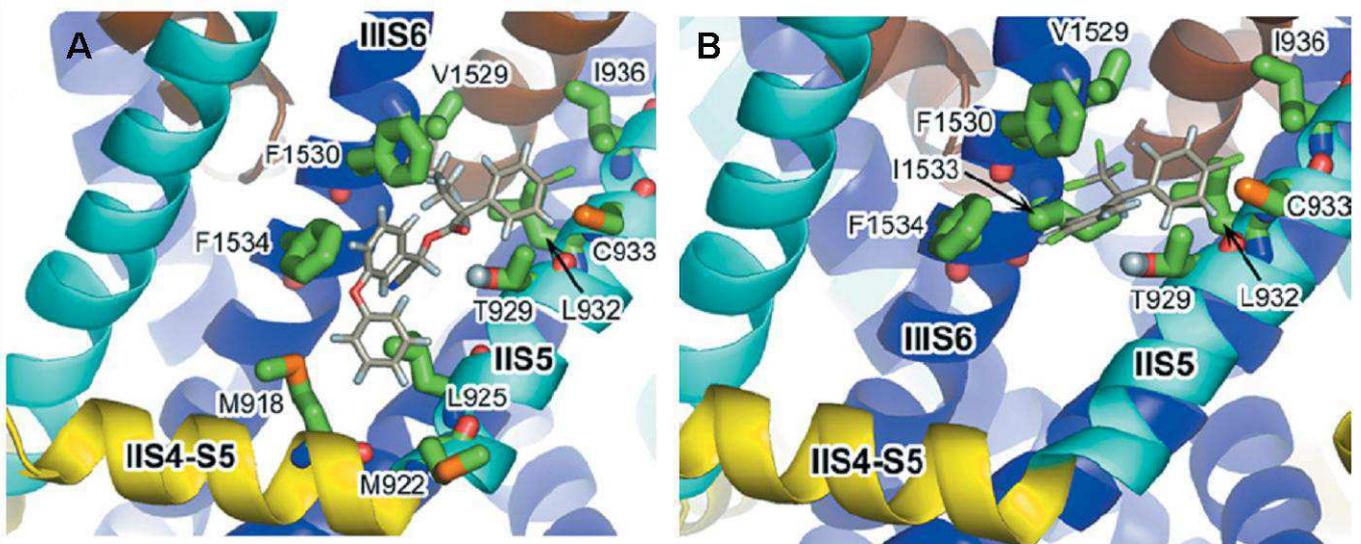


Figure 14: Prédiction des sites de liaisons d'un pyréthriinoïde, le fenvalérate (A) et du DDT (B) au niveau du canal sodium voltage dépendant. Le modèle prévoit une cavité hydrophobe entre la boucle S4-S5 (en jaune), l'hélice S5(en bleu clair) et l'hélice S6 (en bleu foncé) du domaine II du récepteur. Les résidus (en vert) impliqués dans la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT sont positionnés à la surface de la cavité hydrophobe suggérant une interaction possible avec les insecticides.

Le DDT est actuellement interdit en agriculture à cause de sa persistance dans l'environnement et de sa bioaccumulation à travers la chaîne alimentaire. Il reste cependant utilisé contre les moustiques vecteurs du paludisme dans de nombreux pays car aucune alternative efficace n'a été trouvée à ce jour. Les pyréthriinoïdes quant à eux restent utilisés en agriculture car ils présentent une forte sélectivité insectes/mammifères, une forte toxicité contre les nuisibles et une persistance dans l'environnement plus faible que les composés organochlorés comme le DDT (Figure 15). Les pyréthriinoïdes représentent actuellement 17% du marché mondial des insecticides (Sparks, 2013).

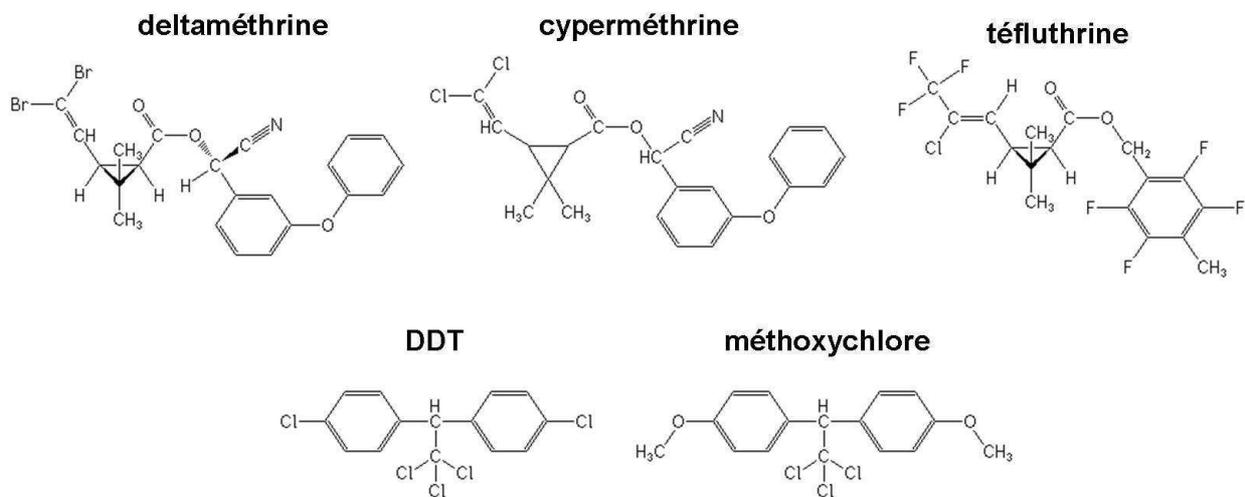


Figure 15: Formules chimiques de plusieurs insecticides agissant sur le canal sodium voltage-dépendant. (haut) insecticides appartenant à la famille des pyréthriinoïdes. (bas) insecticides appartenant à la famille des organochlorés.

II.2.4.3. L'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est la cible des organophosphorés et des carbamates. Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine pour stopper la transmission synaptique et réguler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique.

L'acétylcholine réagit avec les sites actifs de l'acétylcholinestérase (site anionique et la triade catalytique: Ser-His-Glu) et subit une hydrolyse. La choline est ainsi libérée et un intermédiaire ``acétyl-enzyme`` est formé (Soreq et Seidman, 2001). Une deuxième étape d'hydrolyse permet la libération d'acétate et régénère l'acétylcholinestérase (Figure 16).

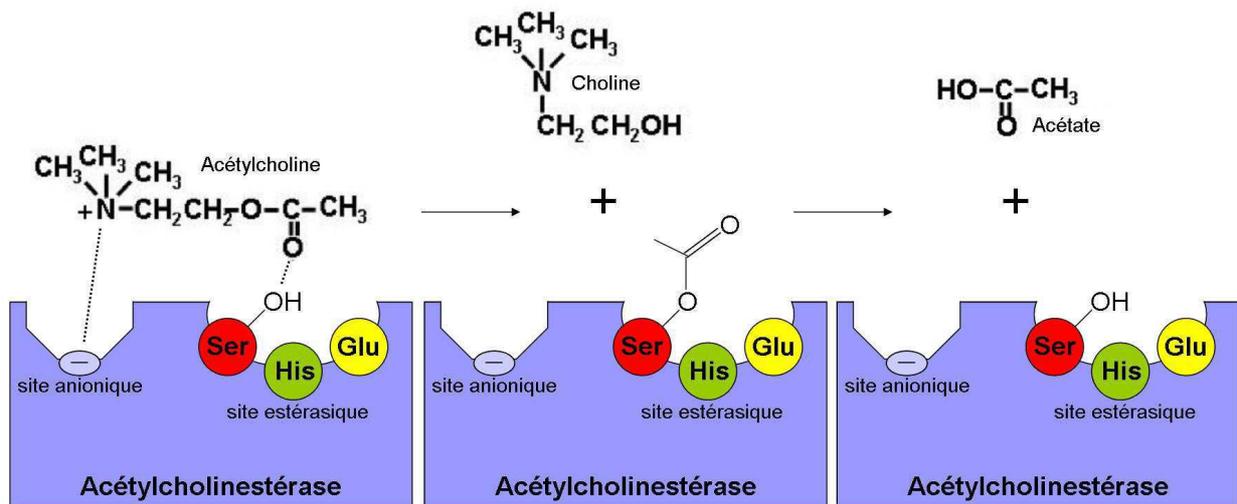


Figure 16: Réaction enzymatique de l'acétylcholinestérase. Réaction de l'acétylcholine avec les sites actifs (site anionique et site estérasique) de l'acétylcholinestérase. L'hydrolyse de l'acétylcholine permet ensuite la libération de la choline et la formation de l'acétyl-enzyme. Une deuxième hydrolyse permet la libération de l'acétate et régénère l'acétylcholinestérase.

Ce mécanisme est perturbé par les organophosphorés et les carbamates. Certains organophosphorés comme le parathion ou le chlorpyrifos contiennent un atome de soufre attaché à un atome de phosphore par une double liaison (Figure 17). Pour que ces composés deviennent actifs, une étape de bioactivation métabolique est nécessaire, réalisée par des monooxygénases via une désulfuration oxydative (Figure 17) (Costa, 2006).

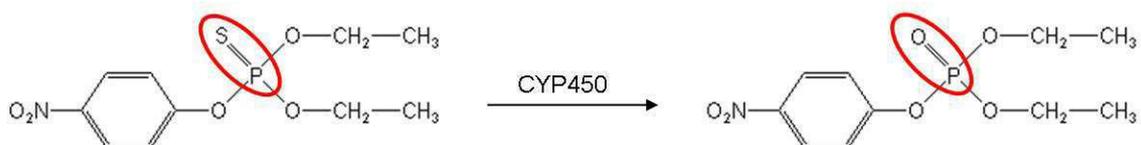


Figure 17: Réaction de désulfuration oxydative par une cytochrome P450 monooxygénase (CYP). La CYP agit au niveau de l'atome de soufre attaché à l'atome de phosphore par une double liaison (cercle rouge). La réaction permet de métaboliser le parathion en paraoxon.

Une fois actif, les composés vont interagir avec le résidu sérine du site actif estérasique de l'acétylcholinestérase et une forme phosphorylée inactive de l'enzyme apparaît (Figure 18). Cependant la liaison entre l'atome de phosphore et le site estérasique de l'enzyme étant très stable, elle empêche l'hydrolyse spontanée qui régénère l'enzyme (Figure 16). Cette inhibition est souvent irréversible et entraîne une accumulation de l'acétylcholine dans la synapse cholinergique conduisant à une hyperexcitation des neurones. Ces insecticides provoquent une paralysie qui conduit à la mort de l'insecte.

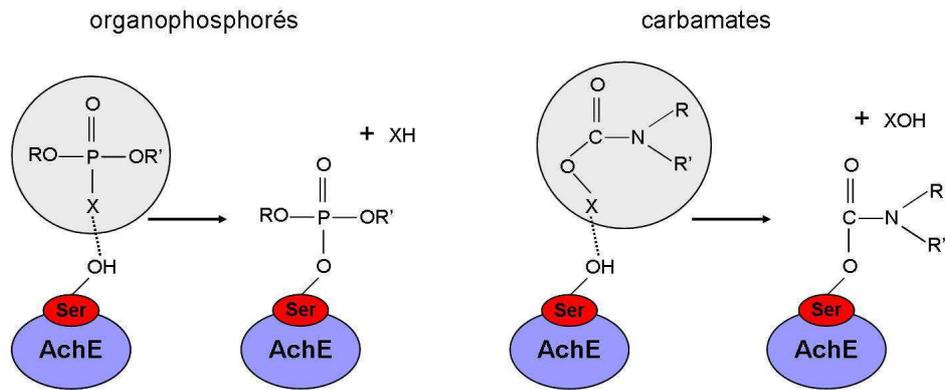


Figure 18: Schéma de l'action d'un organophosphoré ou d'un carbamate sur le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE). (R et R') groupements basiques, (X) groupement acide. La liaison entre l'insecticide et l'acétylcholinestérase conduit à une forme inactive de l'enzyme très stable.

Le mode d'action des carbamates sur le site actif de l'acétylcholinestérase est similaire. Dans ce cas, la réaction sur le résidu sérine est une carbamoylation qui libère une forme carbaryl-enzyme inactive (Figure 18). Il empêche l'hydrolyse de l'acétylcholinestérase mais cette étape est réversible. L'inhibition de l'acétylcholinestérase est donc plus faible dans le cas des carbamates. La structure de l'acétylcholinestérase chez la drosophile a été résolue par Harel et ses collaborateurs en 2000. Cette étude met en évidence une structure tridimensionnelle proche de la structure de l'acétylcholinestérase de la torpille (*Torpedo californica*) en particulier au niveau des sites actifs de l'enzyme.

Les carbamates et les organophosphorés sont toujours utilisés à ce jour contre les moustiques vecteurs de maladies humaines, en agriculture et horticulture (Figure 19). Des études sont en cours pour améliorer la sélectivité insectes/mammifères. Actuellement, les organophosphorés représentent 13% et les carbamates 6% du marché mondial (Sparks, 2013).

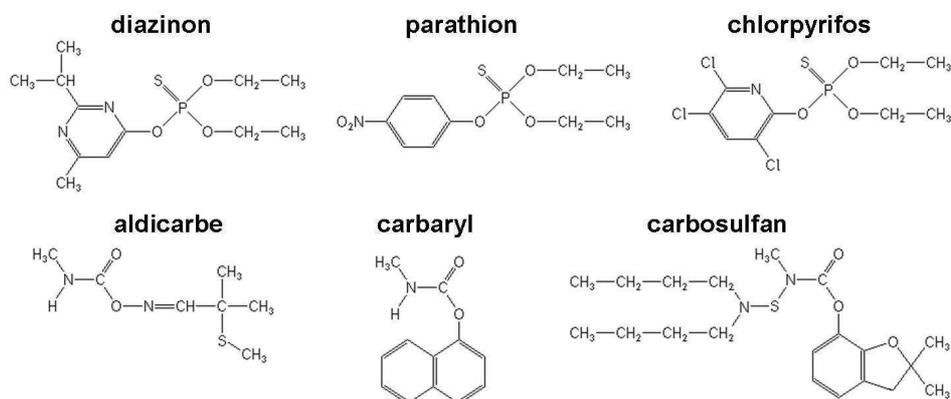


Figure 19: Formules chimiques de plusieurs insecticides agissant sur l'acétylcholinestérase. (haut) insecticides appartenant à la famille des organophosphorés. (bas) insecticides appartenant à la famille des carbamates.

II.2.4.4. Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine

Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est la cible des néonicotinoïdes et des spynosynes. L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central des insectes permettant une neurotransmission rapide. Les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine font partie de la superfamille des récepteurs "Cys loop" comme les récepteurs GABA que nous avons détaillés précédemment. Comme eux, les nAChRs sont des récepteurs pentamériques. Les sous-unités du récepteurs sont formées d'un domaine N-terminal extracellulaire qui contient six régions distinctes (boucles A à F impliquées dans le site de liaison à l'acétylcholine) puis de quatre domaines transmembranaires et d'un domaine C-terminal extracellulaire (Figure 20).

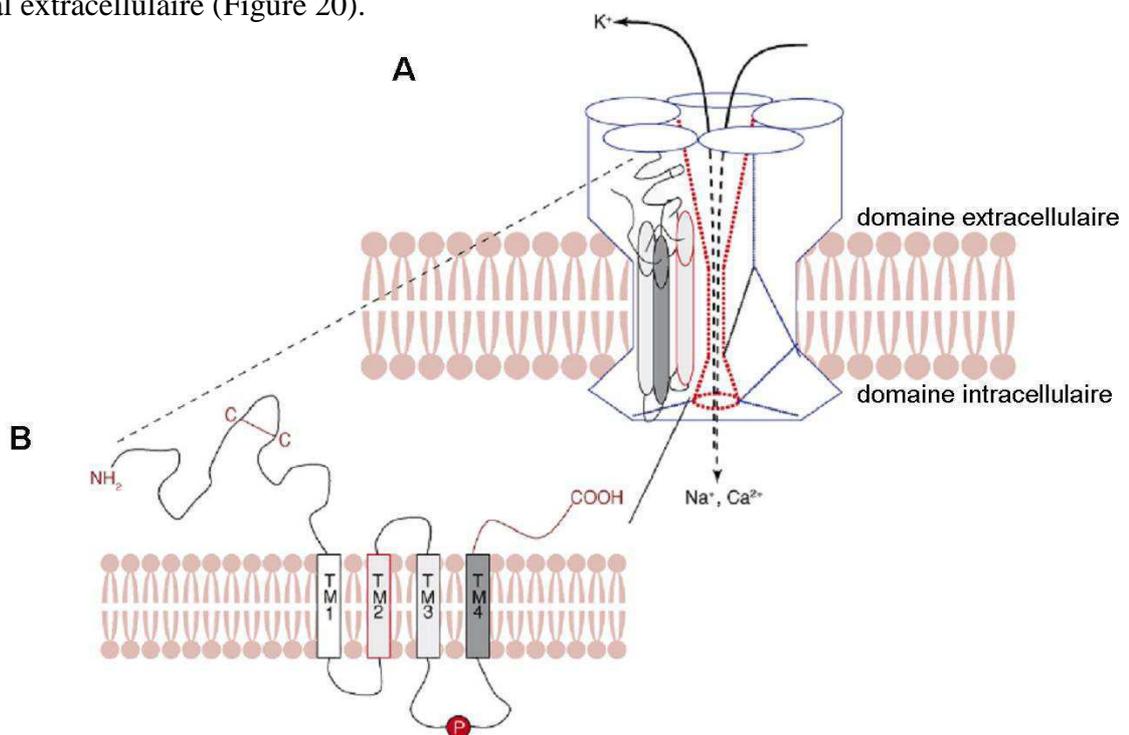


Figure 20: Structure du récepteur nicotinique à l'acétylcholine. (A) récepteur pentamérique formant un pore sélectif aux ions Na⁺, Ca²⁺, K⁺ à travers la membrane plasmique. (B) chaque sous-unité est composée de 4 domaines transmembranaires (TM1-TM4). La boucle intracellulaire entre le domaine TM3 et TM4 présente un site potentiel de phosphorylation. (d'après Thany et al., 2007).

Une fois libérée dans la fente synaptique, l'acétylcholine va se fixer sur le nAChR au niveau du site de liaison. Cette fixation va induire un changement conformationnel du récepteur permettant l'ouverture du canal et le passage sélectif d'ions (un courant entrant d'ions Na⁺ et Ca²⁺ et un courant sortant K⁺). Ces courants vont perturber l'équilibre du potentiel de membrane et induire une dépolarisation membranaire permettant la neurotransmission.

Chez les vertébrés, il existe différents types de sous-unités α ($\alpha 1-10$), β ($\beta 1-4$), γ , δ qui permettent la formation de multiples récepteurs. Au niveau de la région neuromusculaire, on trouve principalement le sous type $2(\alpha 1)\beta 1\gamma\delta$. Au niveau du système nerveux, les nAChRs sont composés par les sous-unités α ($\alpha 2-10$) et β ($\beta 2-4$). Ces sous types de récepteurs sont classés en deux groupes en fonction de leur sensibilité à l' α -bungarotoxine (toxine qui provient d'un serpent, *Bungarus multicinctus*). Les sous-unités $\alpha 7$ à $\alpha 10$ forment des récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine alors que les sous-unités $\alpha 2$ à $\alpha 6$ et $\beta 2$ à $\beta 4$ s'assemblent pour former des récepteurs insensibles à l' α -bungarotoxine. Les sous types majeurs du système nerveux des vertébrés sont l'homopentamère $\alpha 7$ (sensible à l' α -bungarotoxine) et l'hétéropentamère $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (insensible à l' α -bungarotoxine) (Vo et al., 2010). Ces différents sous types de récepteurs montrent également une sensibilité différente à l'acétylcholine. La composition en sous-unités a donc une influence sur les propriétés pharmacologiques du récepteur (Figure 21).

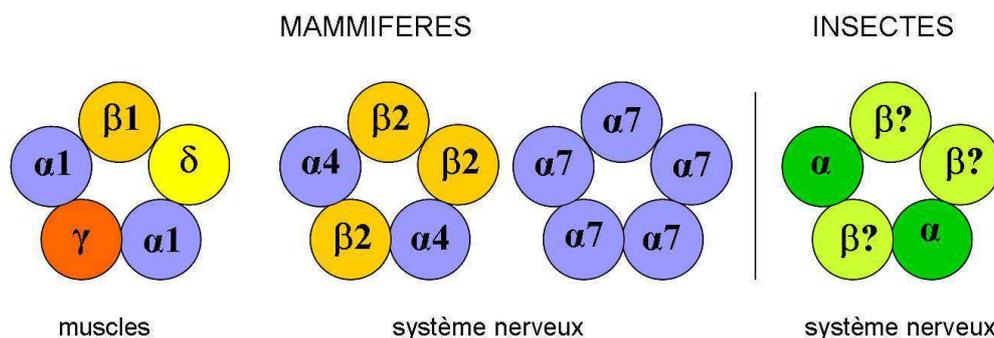


Figure 21: Assemblage des différentes sous-unités pour former les nAChRs chez les mammifères et les insectes.

Chez les insectes, la composition des nAChRs en sous-unités reste mal connue. Cependant, des études de comportement chez l'abeille permettent de supposer la présence de plusieurs sous types de récepteurs, deux en particulier, en fonction de la sensibilité à l' α -bungarotoxine (Thany et al., 2007). Chez les insectes, il existe deux types de sous-unités du nAChR: α et β . La famille des gènes qui codent les sous-unités du nAChR a été décrite: chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), avec dix sous-unités dont sept α ($\alpha 1-7$) et trois β ($\beta 1-3$), chez le moustique vecteur du paludisme (*Anopheles gambiae*) avec dix sous-unités dont neuf α ($\alpha 1-9$) et une sous-unité $\beta 1$ et chez l'abeille (*Apis mellifera*) avec onze sous-unités dont neuf α ($\alpha 1-9$) et deux β ($\beta 1-2$) (Jones et al., 2007). Ce nombre relativement faible de sous-unités chez les

insectes comparé aux mammifères est compensé par des phénomènes d'édition et d'épissage alternatif permettant la formation de plusieurs isoformes pour chaque sous-unité (Sattelle et al., 2005).

L'expression hétérologue des nAChRs d'insectes ne permet pas d'obtenir des récepteurs fonctionnels. Des études utilisant l'expression de récepteurs hybrides contenant des sous-unités d'insectes et de mammifères, ou des récepteurs chimériques contenant le domaine N-terminal de la sous-unité d'intérêt couplé avec les domaines transmembranaires et C-terminal du récepteur à la sérotonine (5-HT₃) ont été réalisées (Millar, 2009). Ces études permettent d'apporter des informations sur les sites de liaison d'agonistes du nAChR comme les insecticides (néonicotinoïdes et spinosynes).

La fixation des néonicotinoïdes sur le nAChR entraîne l'ouverture du canal qui permet l'entrée d'ions Na⁺ et Ca²⁺ et la sortie d'ions K⁺. Ces courants ioniques perturbent le potentiel de membrane qui conduit au phénomène de dépolarisation. Ces insecticides ne peuvent être dégradés par l'acétylcholinestérase dans la fente synaptique, leurs actions se prolongent donc au niveau du nAChR et conduit à une dépolarisation permanente de la membrane, ce qui provoque chez l'insecte la paralysie puis la mort. L'expression de récepteurs hybrides drosophile-poulet Dα2-Ggβ2 et Dα1-Ggβ2 dans les ovocytes de xénope met en évidence l'activation du récepteur Dα2-Ggβ2 par des analogues de néonicotinoïdes alors que ces analogues sont inefficaces sur le récepteur Dα1-Ggβ2 (Thany et al., 2007). Ces résultats montrent que les sous-unités α, chez l'insecte, contribuent à la sélectivité du récepteur aux néonicotinoïdes. De plus, les récepteurs hybrides drosophile-rat Dα3-β2 et Dα3-β4 montrent une différence d'affinité pour l'imidaclopride qui est supérieure dans le cas du récepteur hybride Dα3-β2 (Vo et al., 2010) ce qui implique également les sous-unités β dans la sensibilité aux néonicotinoïdes.

Pour les spinosynes, des études ont également été réalisées pour déterminer le site de liaison du spinosad sur le nAChR. Plusieurs études ont identifié la sous-unité α6 comme la cible du spinosad chez *Drosophila melanogaster* et *Plutella xylostella* (Watson et al., 2010; Rinkevich et al., 2010). De plus, une mutation nulle de la sous-unité α6 confère la résistance au spinosad chez *Drosophila melanogaster* (Perry et al., 2007). Ces études suggèrent que le site de liaison des néonicotinoïdes et du spinosad sur le nAChR implique des sous-unités différentes.

Ces deux classes d'insecticides (Figure 22) présentent une forte sélectivité vis-à-vis des insectes comparés aux mammifères (Tomizawa et Casida, 2003, 2005). Les spinosynes sont utilisées en agriculture car ils sont particulièrement efficaces contre les lépidoptères et ont

l'avantage d'être rapidement dégradés dans l'environnement. Ces insecticides sont également utilisés dans le domaine vétérinaire et représentent 3% du marché mondial. Les néonicotinoïdes sont utilisés comme agents systémiques contre de nombreux ravageurs (pucerons, cicadelles.....) dans la majorité des cultures. Ils représentent 26% du marché mondial ce qui correspond à la classe la plus importante des insecticides (Jeschke et al., 2011). Cependant, certains néonicotinoïdes sont mis en cause dans la forte mortalité des abeilles ces dernières années. En 2013, la commission européenne a interdit l'usage de trois néonicotinoïdes (clothianidine, imidaclopride, thiaméthoxame) pour les traitements de semences, au sol et foliaires et concerne plus de 75 cultures. Cette interdiction prend effet au 1^{er} décembre 2013 pour une période de deux ans.

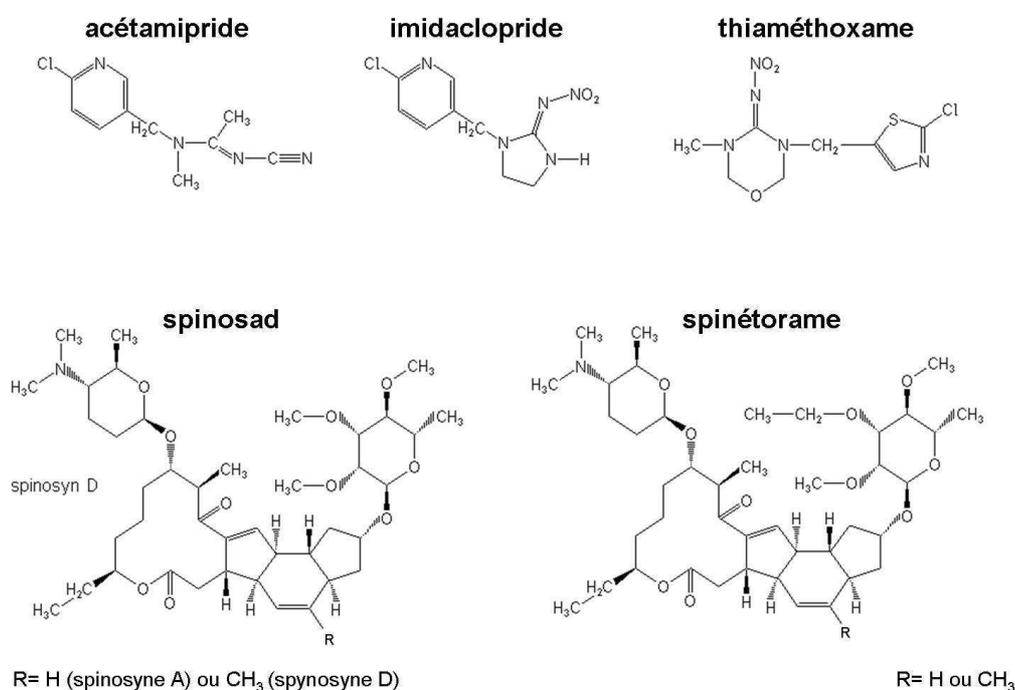


Figure 22: Formules chimiques de plusieurs insecticides agissant sur le nAChR. (haut) insecticides appartenant à la famille des néonicotinoïde. (bas) insecticides appartenant à la famille des spinosynes.

III-Utilisation des insecticides: conséquences sur l'environnement.

L'utilisation massive d'insecticides a des conséquences néfastes sur les écosystèmes, en particulier l'apparition de la résistance chez les insectes ravageurs et des effets indésirables chez les espèces non cibles comme les insectes dits bénéfiques et l'homme.

III.1-La résistance chez les insectes.

Ce phénomène compromet le contrôle à long terme des insectes ravageurs d'autant plus que le nombre d'espèces résistantes est en constante augmentation (Figure 23). De plus, ces phénomènes de résistance apparaissent très tôt après l'application des insecticides comme chez la mouche domestique (Lindquist et al., 1948). Il est donc nécessaire de comprendre les bases moléculaires de la résistance pour améliorer la lutte contre les insectes nuisibles dans le futur.

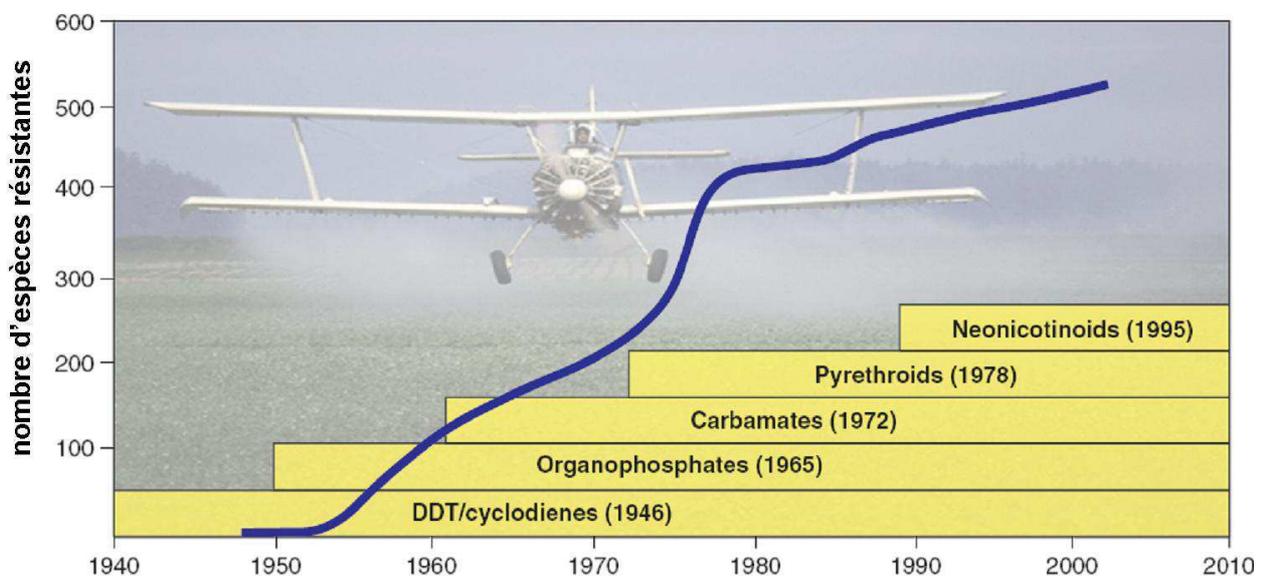


Figure 23: Augmentation du nombre d'espèces résistantes aux insecticides au cours du temps. La ligne bleue correspond au nombre d'espèces résistantes, les bandes jaunes signifient depuis quand la classe d'insecticides est utilisée et la date entre parenthèse l'année où la résistance a été documentée pour la première fois (Denholm et al., 2002).

III.2-Les mécanismes de résistances aux insecticides.

Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides. Ces mécanismes peuvent être comportementaux (comportement différent de l'insecte en présence de l'insecticide), physiologiques (modifications au niveau de la cuticule ou modifications du métabolisme) ou encore par modifications au niveau des cibles de l'insecticide.

III.2.1. La résistance comportementale.

La résistance comportementale correspond à un changement de comportement suite à une exposition aux insecticides. Ce mécanisme permet de réduire ou d'éviter le contact avec ces produits toxiques et donc d'améliorer la survie de l'insecte. Une étude menée sur la blatte (*Blattella germanica*) montre que certains individus présentent une répulsion vis-à-vis du gel contenu dans les appâts pour insectes. Ces insectes ne mangent très peu voire pas ce gel et sont beaucoup plus tolérants à l'insecticide utilisé le fipronil (37,5% de mortalité pour la souche résistante contre 100% pour la souche sensible après 7 jours) (Wang et al., 2004). Le capucin des grains montre une réduction importante de son activité locomotrice suite à l'exposition à la phosphine par fumigation (organophosphorés). Cette diminution de l'activité locomotrice est perçue comme un comportement protecteur car il permet une diminution de la respiration et donc une diminution de la prise d'insecticides (Pimentel et al., 2012). Cependant, ces mécanismes ont été peu étudiés car un changement de comportement est difficilement quantifiable (Haubruge et Amichot, 1998).

III.2.2. La résistance cuticulaire.

Ce mécanisme correspond à un ralentissement de la pénétration d'un insecticide à travers la cuticule de l'insecte grâce à une modification biochimique de celle-ci. Cette cuticule qui joue le rôle de protection de l'organisme vis-à-vis du milieu extérieur est riche en lipides. Les insecticides lipophiles comme les pyréthriinoïdes ou les organophosphorés vont pouvoir passer cette barrière biologique par diffusion puis être transportés via l'hémolymphe jusqu'aux organes cibles. Dans une étude menée chez le moustique (*Anopheles funestus*), des mesures de l'épaisseur de la cuticule ont été réalisées. Une souche résistante à la perméthrine présente une cuticule plus épaisse de 9,5 à 10% qui permet un taux d'absorption plus faible de

l'insecticide (Wood et al., 2010). D'autres études ont mis en évidence ce mode de résistance chez la mouche domestique (*Musca domestica*), la teigne (*Plutella xylostella*) ou encore la noctuelle de la tomate (*Helicoverpa armigera*). Une mesure de la quantité de deltaméthrine radiomarquée à l'extérieur de l'insecte après une heure d'exposition montre une pénétration significativement plus faible chez les souches résistantes que chez la souche sensible de la noctuelle (Ahmad et al., 2006). Ces mécanismes permettraient de ralentir la pénétration de l'insecticide dans l'organisme et pourraient renforcer l'effet d'autres mécanismes de résistance.

III.2.3. La résistance via une évolution des cibles de l'insecticide.

Un changement conformationnel de la protéine cible de l'insecticide peut provoquer une diminution de la capacité de liaison de l'insecticide et donc une diminution de son effet. Dans la plupart des cas, ce type de résistance s'explique par la présence d'une mutation qui entraîne une substitution d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence protéique de la cible de l'insecticide (ffrench-Constant et al., 2004). Actuellement le marché des insecticides est largement dominé par les neurotoxiques (Sparks, 2013). Nous avons vu précédemment que les cibles majeures de ces neurotoxiques étaient le récepteur GABA, le canal sodium voltage-dépendant, l'acétylcholinestérase et le nAChR. Nous allons donc nous focaliser sur ces quatre cibles pour décrire la résistance due aux modifications des cibles de l'insecticide.

III.2.3.1. Modifications du récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Ces récepteurs sont la cible de certains organochlorés comme la dieldrine et des phénylpyrazoles comme le fipronil. Ces insecticides se fixent sur le récepteur et bloquent le passage d'ions chlorure. Une mutation dans le segment M2 de la sous-unité du récepteur RDL a été mise en évidence pour la première fois chez une souche de drosophile résistance à la dieldrine (ffrench-Constant et al., 1991). Cette mutation entraîne la substitution d'une alanine par une sérine ou une glycine en position 302 (A302S/G) (Figure 24) (ffrench-Constant et al., 1994, 2000). Cette mutation a été retrouvée dans différentes espèces comme la mouche domestique (*Musca domestica*), la blatte (*Blattella germanica*), le vers de farine (*Tribolium castaneum*) ou encore chez différentes espèces de moustiques (ffrench-Constant et al., 2004; Asih et al., 2012). Cette mutation provoquerait une altération du site de liaison des insecticides sur le récepteur et stabiliserait également l'état ouvert du récepteur (Zhang et al.,

1994). De plus, une autre étude réalisée sur une souche de *Drosophila simulans* montre une possible implication d'une substitution d'une thréonine par une méthionine en position 350 (T350M) dans la résistance aux phénylpyrazoles (Figure 24) (Le Goff et al., 2005).

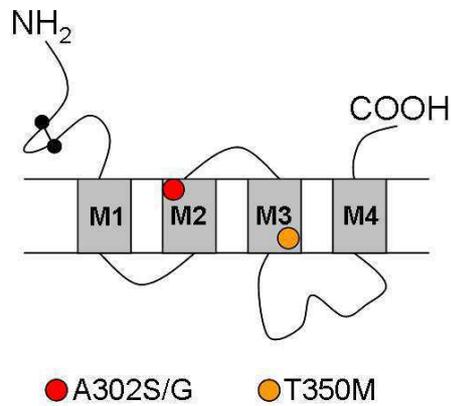


Figure 24: Schéma topologique d'une sous-unité du récepteur canal au GABA. Localisation des mutations impliquées dans la résistance aux insecticides.

III.2.3.2. Modifications du récepteur canal sodium voltage-dépendant.

Les pyréthriinoïdes et le DDT se fixent sur le récepteur canal sodium voltage-dépendant et retardent sa fermeture ce qui perturbe la transmission synaptique. Le plus souvent la résistance à ces insecticides est due à une mutation dans le gène nommé *kdr*. La résistance a été mise en évidence pour la première fois chez la mouche domestique exposée au DDT (Busvine, 1951). Elle correspond à une substitution d'une leucine par une phénylalanine en position 1014 (L1014F) dans le segment 6 du domaine II (Figure 25) (Burton et al., 2011). Cette mutation est retrouvée chez le moustique (*Culex pipiens*) et le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*). D'autres substitutions ont été découvertes au même locus: L1014H chez le puceron du pêcher (*Myzus persicae*) et L1014S chez le moustique (*Anopheles gambiae*) par exemple (Davies et al., 2007). Il existe également une substitution d'une méthionine par une thréonine en position 918 (M918T) dans la boucle entre les segments 4 et 5 du domaine II (Figure 25). Elle confère une résistance plus importante aux pyréthriinoïdes d'où son nom *super-kdr*. D'autres mutations ont également été identifiées chez différentes espèces d'insectes comme T929V chez l'aleurode du tabac (*Bemisia tabaci*) ou F1538I chez la tique du bovin (*Boophilus microplus*) (Davies et al., 2007).

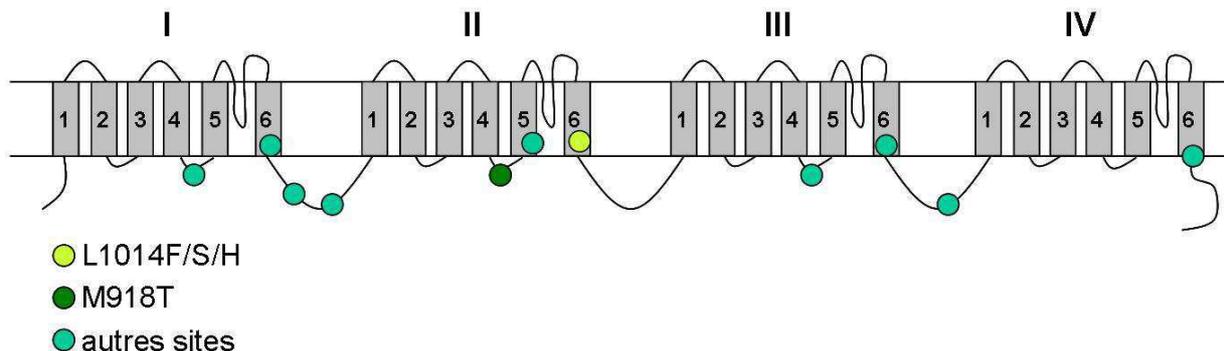


Figure 25: Schéma topologique du récepteur canal sodium voltage-dépendant. Localisation des mutations impliquées dans la résistance aux insecticides.

Ces mutations peuvent induire un changement conformationnel qui induit une diminution de l'affinité des insecticides pour le canal sodium voltage-dépendant. D'après le modèle tri-dimensionnel du canal sodium voltage-dépendant réalisé par O'Reilly et ses collaborateurs en 2006, les résidus M918 et T929 seraient impliqués dans l'interaction avec les insecticides. La mutation de ces résidus (M918T, T929V) perturberait l'interaction entre ces résidus et les insecticides et donc induirait la résistance (Davies et al., 2008). Pour les résidus L932 et F1538 qui n'interagissent pas directement avec les insecticides, une mutation provoquerait un changement conformationnel au niveau du site de liaison des insecticides et donc une perturbation de l'interaction des insecticides avec le récepteur (Davies et al., 2008). Ces mutations peuvent également altérer la cinétique d'ouverture et fermeture du canal sodium voltage-dépendant. La substitution d'une leucine par une phénylalanine ou par une histidine en position 1014 (mutation *kdr*) conduit à l'apparition de canaux moins sensibles à la dépolarisation de la membrane et l'ouverture de ces canaux est moins fréquente. Sachant que les insecticides se fixent préférentiellement sur les canaux ouverts, l'effet de ces composés chimiques est donc moins important (Burton et al., 2011). Basés sur le modèle du canal sodium voltage-dépendant de la mouche domestique, O'Reilly et ses collaborateurs ont suggéré le mécanisme possible impliqué dans ce phénomène (O'Reilly et al., 2006). Suite à la dépolarisation de la membrane, la boucle entre le IIS4 et le IIS5 se déplace permettant la pliure du IIS6 et l'ouverture du canal. Un résidu glycine en position 1012 permettrait cette pliure. La substitution L1014F ou L1014H imposerait une contrainte au niveau du résidu G1012 et empêcherait la pliure du IIS6 et donc l'ouverture du canal.

III.2.3.3. Modifications de l'acétylcholinestérase.

Les carbamates et les organophosphorés se fixent sur l'acétylcholinestérase et l'empêchent de dégrader l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques conduisant à un état hyperexcité. De nombreuses mutations ont été identifiées provoquant la résistance aux organophosphorés et aux carbamates qui sont répertoriées par Fournier (2005). Par exemple, plusieurs substitutions ont été découvertes chez différentes souches de drosophiles: F115S, I199V/T, G303A et F368Y (Mutero et al., 1994). Certaines de ces substitutions sont également retrouvées chez la mouche domestique (Kozaki et al., 2001). Une autre substitution d'une glycine en sérine en position 119 (G119S) est retrouvée chez plusieurs populations de moustiques d'Afrique et d'Europe. Ce résidu muté est situé au niveau du site actif de l'enzyme et confère une forte résistance vis-à-vis des organophosphorés et des carbamates (Weill et al., 2003). Un autre résidu, F290, présent dans le site actif de l'enzyme est muté chez différentes espèces comme la drosophile (F290Y), la mouche domestique (F290Y) ou encore chez le moustique (F290V) (Fournier, 2005; Alout et al., 2007).

III.2.3.4. Modifications du récepteur nicotinique à l'acétylcholine.

Les spinosynes et les néonicotinoïdes sont des agonistes du nAChR et provoquent une activation continue de ce récepteur. Une étude menée chez la cicadelle (*Nilaparvata lugens*) a mis en évidence une mutation qui conduit à la substitution d'une tyrosine par une sérine en position 151 (Y151S) dans deux sous-unités différentes N1 α 1 et N1 α 3 chez une souche résistante à l'imidaclopride (Figure 26) (Liu et al., 2005). L'expression hétérologue de ces sous-unités dans des cellules S2 de drosophile, a confirmé l'implication de cette substitution Y151S dans la résistance aux néonicotinoïdes. Une seconde étude réalisée chez le puceron du pêcher (*Myzus persicae*) a comparé la séquence nucléotidique de six sous-unités du nAChR entre une souche sensible et une souche résistante aux néonicotinoïdes. Cette étude a permis de mettre en évidence une substitution d'une arginine par une thréonine en position 81 (R81T) au niveau de la boucle D de la sous-unité β 1 du nAChR (Figure 26) (Bass et al., 2011b). La boucle D pourrait jouer un rôle important dans l'interaction entre le nAChR et l'imidaclopride (Liu et al., 2010). Chez la drosophile, quatre souches résistantes au nitenrypam (néonicotinoïdes) ont été générées par mutagenèse (EMS comme agent mutagène). L'analyse a mis en évidence l'implication des sous-unités D α 1 et D β 2 dans la résistance aux néonicotinoïdes (Perry et al., 2008).

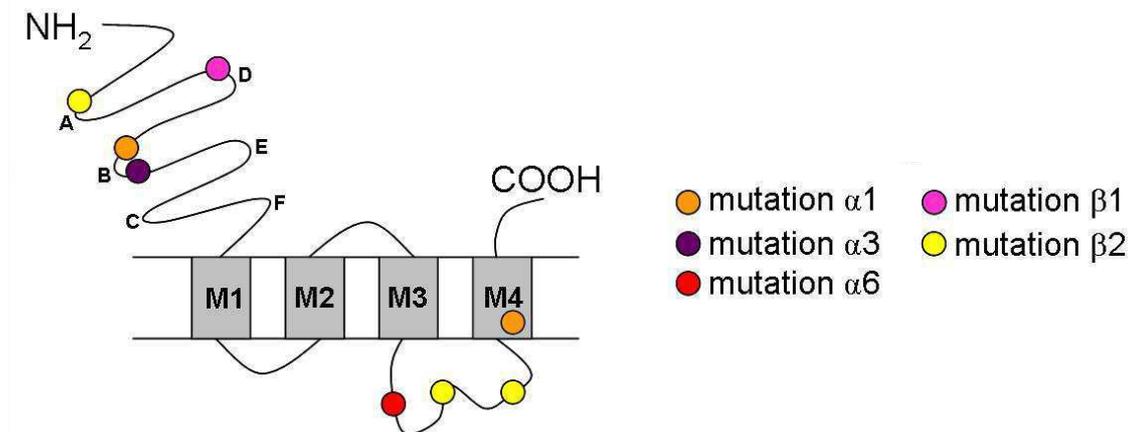


Figure 26: Schéma topologique d'une sous-unité du récepteur nAChR. Localisation des mutations impliquées dans la résistance aux insecticides.

Pour la résistance aux spinosynes, l'implication de la sous-unité $\alpha 6$ a été montrée chez la drosophile (Perry et al., 2007; Watson et al., 2010) puis chez une souche de *Plutella xylostella* collectée à Hawaii en 2001 (Baxter et al., 2010). Pour cette souche de *Plutella xylostella* résistante au spinosad, une mutation est retrouvée au niveau d'un site d'épissage (G en A) dans l'intron 9. Cette mutation entraîne la perte du site d'épissage après l'exon 9 et l'ajout de 40pb dans la séquence de l'ARNm. Ce phénomène conduit à l'apparition d'un codon stop, et à la production d'une protéine tronquée au niveau de la boucle intracellulaire entre le domaine M3 et M4. La sous-unité $\alpha 6$ serait non fonctionnelle et entraînerait à elle seule la résistance au spinosad. Ces études supposent que les sites de liaison sur le nAChR pour les spinosynes et les néonicotinoïdes sont différents.

III.2.4. La résistance métabolique.

Les insecticides doivent atteindre leurs cibles pour exercer leurs effets toxiques. Avant de les atteindre, ils sont transportés à travers l'organisme où ils subissent un processus de biotransformation comme de nombreux composés étrangers à l'organisme (xénobiotiques). Ce processus biochimique implique des enzymes à large spectre de substrats appelées enzymes de détoxification. Elles permettent de transformer des composés lipophiles comme les insecticides en composés hydrophiles non toxiques facilement excrétables par l'insecte. Ces enzymes de détoxification, qui sont retrouvées chez les vertébrés comme chez les invertébrés, peuvent intervenir au cours de la phase I ou de la phase II du métabolisme.

La phase I ou phase de fonctionnalisation a pour but d'inactiver les xénobiotiques présents dans l'organisme comme les insecticides. Les réactions enzymatiques de cette phase sont des réactions d'oxydation, d'hydrolyse ou encore de réduction qui permettent de greffer un groupement fonctionnel sur le xénobiotique pour faciliter l'action des enzymes de la phase II (Figure 27). La majorité des enzymes de la phase I appartient à la famille des monooxygénases à cytochromes P450 qui catalysent une réaction d'oxydation (Chung et al., 2009). Cependant il existe d'autres classes d'enzymes qui interviennent durant cette phase comme les déshydrogénases ou les estérases qui sont capables d'hydrolyser certains insecticides comme les organophosphorés (Jackson et al., 2013).

La phase II permet de conjuguer des substrats très hydrophiles endogènes avec les métabolites issus de la phase I ou les xénobiotiques pour favoriser leur élimination par excrétion. Cette phase de conjugaison fait intervenir différentes classes d'enzymes ayant chacun un cofacteur spécifique. Par exemple les UDP-glucuronyl transférases ont pour substrat l'acide glucuronique, les N-acyltransférases les acides aminés tandis que les glutathion S-tranfèreses conjugue les xénobiotiques ou les métabolites avec le glutathion. Certaines de ces glutathion S-tranfèreses ont la capacité de métaboliser certains insecticides comme le DDT (Low et al., 2010).

Cependant un xénobiotique n'est pas obligatoirement métabolisé par les enzymes des deux phases. Il peut être directement éliminé ou pris en charge par une seule des deux phases avant d'être éliminé par l'organisme (Figure 27). De plus, un xénobiotique peut être métabolisé par des enzymes de la phase II et ensuite par des enzymes de la phase I. Ces réactions enzymatiques peuvent également générer des intermédiaires très réactifs avec une toxicité plus importante que le xénobiotique de départ. Ces mécanismes peuvent entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les intermédiaires peuvent également se lier à des macromolécules comme l'ADN, les protéines et/ou les lipides et ainsi conduire à une toxicité.

Les enzymes de détoxification peuvent également jouer un rôle dans la résistance aux insecticides. En effet, une augmentation de la métabolisation de ces composés entraîne une diminution de la quantité d'insecticides dans l'organisme et donc une diminution de la quantité qui atteindra la cible. L'insecte devient tolérant à l'insecticide. Cette résistance métabolique résulte de différents mécanismes provoquant soit une production plus importante d'enzymes de détoxification soit une meilleure efficacité de l'enzyme pour son substrat (Perry et al., 2011). Chez les insectes, les enzymes qui sont impliquées dans la résistance

métabolique appartiennent à trois grandes classes d'enzymes, les carboxylestérases (COEs), les monooxygénases à cytochromes P450 (CYPs) et les glutathion S-transférases (GSTs).

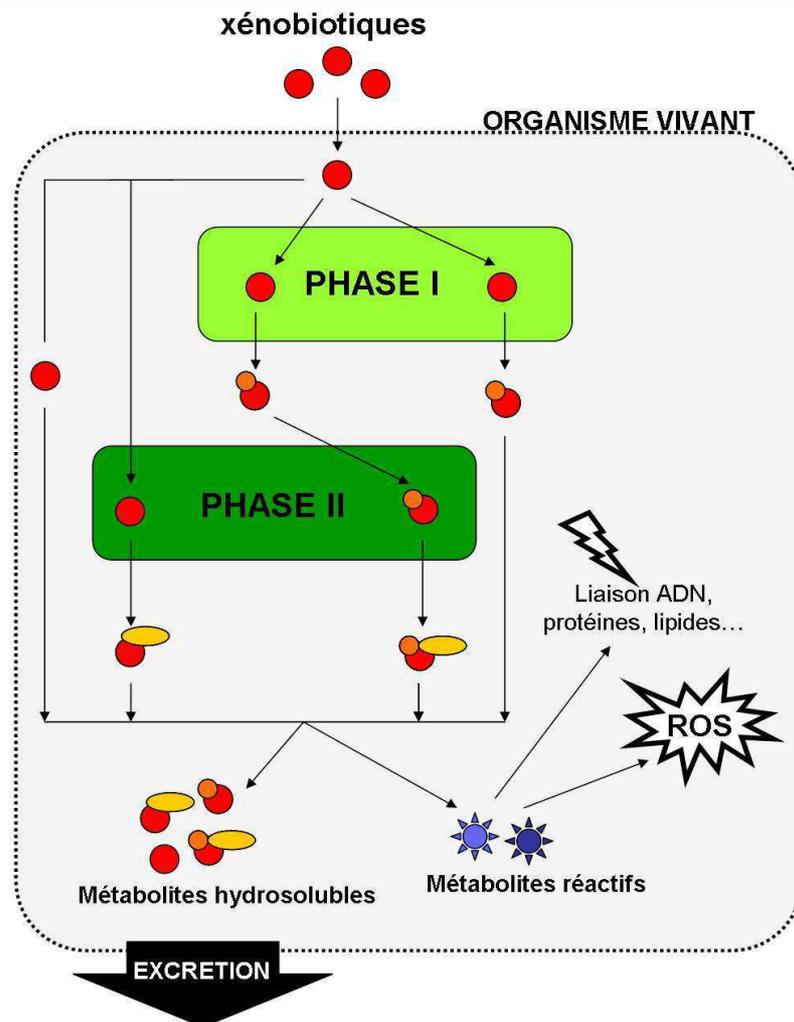


Figure 27: Les différentes étapes possibles du métabolisme des xénobiotiques. Les xénobiotiques (●) peuvent être métabolisés ou non par les enzymes de la phase I (vert clair) et de la phase II (vert foncé). Ce métabolisme permet la formation de métabolites hydro-solubles mais également des métabolites réactifs (●, ●) ayant une toxicité importante.

III.2.4.1. Les carboxylestérases (COEs).

Les carboxylestérases sont impliquées dans la détoxification de phase I. Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters permettant la libération d'un alcool et d'un acide carboxylique (Figure 28). Elles sont capables de métaboliser plusieurs molécules car elles présentent une faible spécificité de substrat. Les carboxylestérases sont des enzymes ubiquitaires impliquées dans le métabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes (Montella et al., 2012).

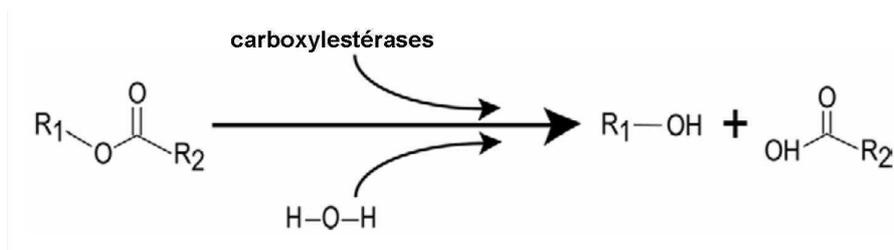


Figure 28: Réaction d'hydrolyse d'un substrat par les carboxylestérasés. (d'après Montella et al., 2012).

Chez *Drosophila melanogaster*, 35 COEs ont été identifiées, 51 COEs chez le moustique (*Anopheles gambiae*) et 24 COEs chez l'abeille (*Apis mellifera*) (Ranson et al., 2002; Claudianos et al., 2006).

III.2.4.1.1. Carboxylestérasés et résistances aux insecticides.

De nombreux insecticides comme les organophosphorés ou les carbamates contiennent des liaisons esters susceptibles d'être hydrolysées par les carboxylestérasés. En effet, ces enzymes ont été identifiées chez plusieurs insectes comme responsables de la résistance aux insecticides (Li et al., 2007). Cette résistance peut résulter de trois mécanismes distincts: l'amplification de gènes, la surexpression de gènes et des mutations dans la séquence codante des gènes.

L'amplification de gènes permet d'augmenter le nombre de copies d'un ou plusieurs gènes. Ce phénomène a été décrit chez différentes espèces d'insectes comme le puceron, la cicadelle ou le moustique (Li et al., 2007). Chez *Myzus persicae*, deux gènes sont issus d'une duplication récente et présentent une forte homologie de séquence: *E4* et *FE4*. Chez les souches résistantes aux organophosphorés, une duplication est observée mais d'un gène seulement (*E4* ou *FE4*). De plus, une corrélation a été observée entre le niveau de résistance et le nombre de duplication du gène (Field et al., 1999). La résistance aux organophosphorés chez *Culex pipiens* peut également provenir d'une amplification génique. Chez le moustique, il s'agit principalement de coamplification comme *esta2-estβ2* ou *esta4-estβ4* (Bass et Field, 2011a).

La surexpression est également impliquée dans la résistance aux organophosphorés chez ces insectes. Les cytosines des îlots CpG contenu dans le gène *E4* peuvent être méthylées (expression du gène) ou déméthylées (absence de l'expression du gène) chez *Myzus persicae*. Ces mécanismes semblent être réversibles, une déméthylation spontanée du gène *E4* serait

associée à une absence d'insecticides (Field et al., 1999, 2000). Une surexpression de certains gènes comme *esta1* induirait une résistance chez *Culex pipiens* (Li et al., 2007).

Enfin, une mutation dans la séquence codante d'un gène conduisant à une modification de la séquence protéique de l'enzyme peut provoquer une résistance aux insecticides. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence qu'une diminution de l'activité carboxylestérase est associée à une augmentation de l'activité hydrolase et induit une résistance aux organophosphorés. Chez la mouche verte (*Lucilia cuprina*), la résistance au diazinon (insecticide organophosphoré) est associée à une baisse d'activité carboxylestérase d'une enzyme spécifique E3. Cette perte d'activité est due à la substitution d'une glycine par une asparagine en position 137 (G137D) au niveau du site actif de l'enzyme. Cependant cette baisse d'activité carboxylestérase est associée à l'apparition d'une activité hydrolase qui permet de métaboliser les organophosphorés (Newcomb et al., 1997). Cette substitution induirait un changement de l'orientation du résidu sérine du site actif de l'enzyme E3 qui faciliterait l'hydrolyse du diazinon (Newcomb et al., 1997). Cette même substitution est également retrouvée chez la mouche domestique suggérant un mécanisme similaire pour la résistance aux organophosphorés (Claudianos et al., 1999). Une autre substitution a également été découverte chez *Lucilia cuprina*. Le remplacement d'un tryptophane par une leucine en position 251 (W251L) est responsable de la résistance au malathion (Campbell et al., 1998).

III.2.4.2. Les monooxygénases à cytochromes P450 (CYPs).

Les monooxygénases à cytochromes P450 appartiennent aux classes d'enzymes intervenant pendant la phase I de métabolisation. Ces enzymes sont présentes chez les vertébrés (mammifères, oiseaux...) mais également chez les insectes et les plantes (Scott, 1999). Les CYPs sont très importants pour l'organisme car ils sont impliqués dans le métabolisme de composés endogènes (hormones, acides gras, stéroïdes) mais également dans le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, pesticides...).

III.2.4.2.1. Mode d'action des CYPs.

Les CYPs ont été découverts en 1958 dans les microsomes de foie de rat et identifiés comme pigments qui avaient la propriété d'absorber fortement à 450nm une fois réduits et complexés avec le monoxyde de carbone (Klingenberg, 1958). Ces ``pigments`` seront ensuite reconnus comme hémoprotéines et appelés cytochrome P450s (Omura et Sato, 1962). Les CYPs sont

présents dans le réticulum endoplasmique et dans la mitochondrie chez les eucaryotes. Par exemple, chez les vertébrés les CYPs de la mitochondrie sont uniquement impliqués dans le métabolisme des stéroïdes et de la vitamine D (Feyereisen, 2006).

Ces hémoprotéines catalysent des réactions d'oxydation. Un atome d'oxygène va être incorporé au substrat à partir d'oxygène moléculaire. Pour catalyser cette réaction, les CYPs ont besoin de cofacteurs, le NADPH/H⁺, le FAD (flavine adénine dinucléotide), le FMN (flavine mononucléotide) et de partenaires, la NADPH cytochrome P450 réductase. Cette enzyme va permettre le transfert d'électrons au niveau du CYP qui pourra oxyder le substrat et libérer une molécule d'eau (Figure 29).

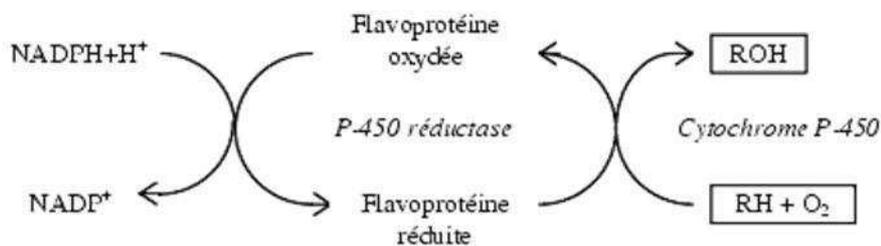


Figure 29: Schéma simplifié de la réaction d'oxydation d'un xénobiotique (RH) par les CYPs. FMN (flavoprotéine réduite) et FAD (flavoprotéine oxydée).

Ces enzymes sont capables de catalyser des réactions diversifiées et donc de métaboliser de nombreux substrats. Certains CYPs vont catalyser un grand nombre de substrats comme CYP1A1 chez l'homme (20 substrats) alors que d'autres n'ont qu'un substrat connu comme CYP7A1 (Scott, 1999). De plus, certains xénobiotiques peuvent être catalysés par différents CYPs et différents CYPs produisent le même métabolite. A ces caractéristiques s'ajoute le fait qu'un changement d'un seul acide aminé dans la séquence d'un CYP peut modifier la spécificité du substrat. Tous ces mécanismes compliquent l'étude du rôle de chaque CYP dans le métabolisme des xénobiotiques (Scott, 1999).

III.2.4.2.2. Nomenclature des CYPs.

Depuis leur découverte en 1958, le nombre de CYPs caractérisés n'a cessé d'augmenter. Actuellement, 18500 molécules correspondant aux CYPs chez une centaine d'espèces sont connues (Nelson, 2013). Une nomenclature proposée en 1996 par Nelson et ses collaborateurs permet donc de classer les différents CYPs en fonction de la similitude entre les séquences protéiques (Figure 30). Le préfixe *cyp* définit les gènes qui codent pour les CYPs. Il est suivi

d'un chiffre correspondant à la famille puis d'une lettre correspondant à la sous-famille et enfin d'un chiffre pour le gène (Feyereisen, 2006). Avec cette nomenclature, les séquences en acides aminés des CYPs faisant partie d'une même famille présentent une identité de plus de 40% d'identité et plus de 55% d'identité au sein d'une même sous-famille (Bergé et al., 1998).

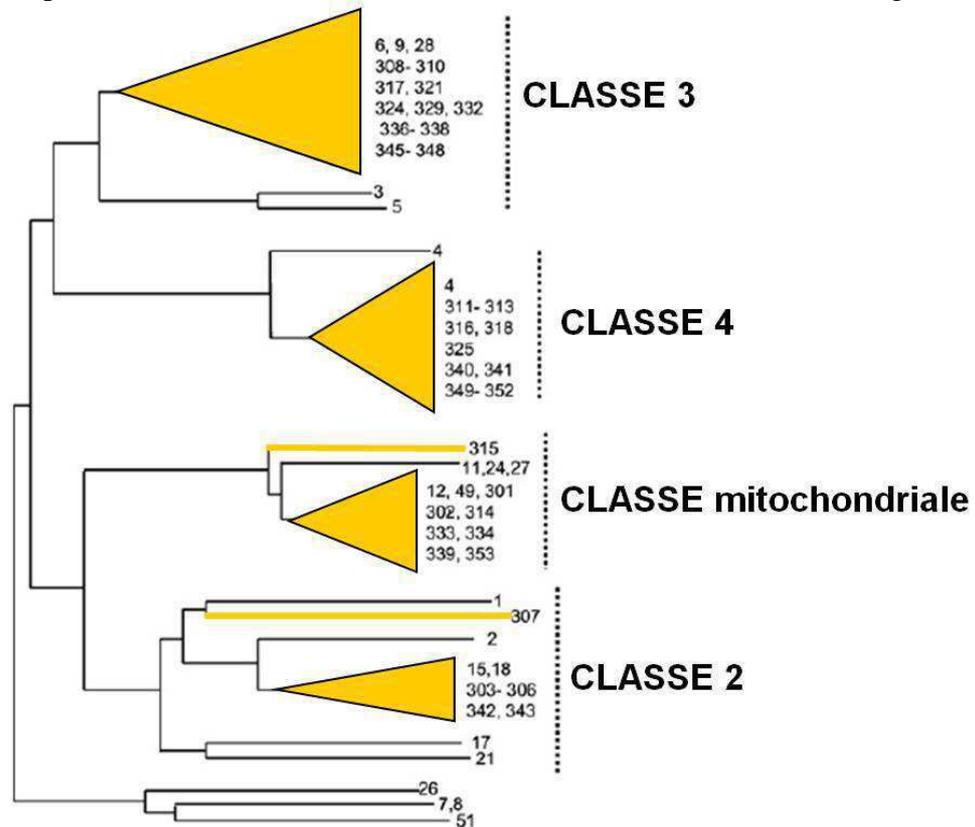


Figure 30: Arbre phylogénétique permettant de classer les différentes familles de CYPs d'insectes et les relations avec les familles de CYPs des vertébrés. Les familles de CYPs d'insectes sont soulignées en jaune et chaque famille de CYPs porte un numéro. (d'après Feyereisen, 2006).

III.2.4.2.3. Les CYPs chez les insectes.

Le nombre de gènes codant des CYPs varie en fonction des espèces d'insectes. Par exemple, chez la drosophile 89 gènes ont été identifiés, 111 chez le moustique (*Anopheles gambiae*) et seulement 46 gènes ont été identifiés chez l'abeille (*Apis mellifera*) (Ranson et al., 2002; Claudianos et al., 2006). Chez les insectes, les fonctions physiologiques des CYPs restent moins bien définies que chez les vertébrés. Cependant, ils sont impliqués dans divers processus biologiques notamment le développement. Plusieurs CYPs jouent un rôle dans la voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes spécifiques des insectes. Chez la drosophile, il existe quatre gènes qui codent des CYPs appartenant à la famille des gènes *Halloween*

(*Cyp302a1*, *Cyp306a1*, *Cyp315a1* et *Cyp307a2*) qui interviennent dans la biosynthèse de l'hormone de mue permettant la conversion du cholestérol en ecdysone (Gilbert, 2004; Ono et al., 2006). Le gène *Cyp306a1* est également retrouvé chez le ver à soie (*Bombyx mori*) (Warren et al., 2004). Ces CYPs sont exprimés dans les glandes prothoraciques durant les derniers stades embryonnaires et les stades larvaires. Le gène *Cyp314a1* est plutôt exprimé dans l'intestin, les corps gras et les tubes de Malpighis permettant de catalyser la dernière étape de la voie de biosynthèse de l'ecdysone, libérant la forme active de l'hormone la 20E (Gilbert, 2004). Chez la blatte (*Diploptera punctata*), une étude a montré l'implication du CYP15A1 dans la biosynthèse des hormones juvéniles III au niveau des corps allates (Helvig et al., 2004). Ces études soulignent l'importance des CYPs dans le développement via la voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes chez les insectes.

Les CYPs sont également impliqués dans d'autres processus biologiques comme le développement des organes sensoriels externes, avec l'expression du gène *Cyp303a1* dans les soies chez *Drosophila melanogaster* (Willingham et Keil, 2004). Certains CYPs sont aussi associés au comportement comme CYP6A20 dans le comportement agressif et CYP4D21 dans le comportement sexuel chez le mâle de la drosophile (Chung et al., 2009).

Les CYPs jouent un rôle important dans le métabolisme de nombreux composés pour protéger l'insecte contre les xénobiotiques présents dans son environnement. Plusieurs CYPs sont également impliqués dans la résistance aux insecticides chez de nombreuses espèces (Li et al., 2007).

III.2.4.2.4. CYPs et résistance aux insecticides.

Les CYPs ont été impliqués dans la résistance métabolique pour plusieurs classes d'insecticides dont les pyréthrinoïdes, les organophosphorés, les néonicotinoïdes chez différents insectes ravageurs. Cette résistance peut être induite par trois mécanismes différents: l'amplification, la surexpression ou la présence de mutations dans la séquence des gènes qui codent les CYPs.

La résistance aux insecticides peut être due à l'amplification de gènes qui codent les CYPs. Ce phénomène a été décrit chez quelques espèces. Chez *Drosophila melanogaster*, une duplication du gène *Cyp6g1* a été mise en évidence chez une souche résistante au DDT. Les deux copies nommées *Cyp6g1a* et *Cyp6g1b* contiendraient un élément transposable *Accord* mais un deuxième élément transposable serait également présent *HMS-beagle* en amont de *Cyp6g1a* (Schmidt et al., 2010). Chez le moustique, la duplication d'un gène qui code

Cyp9m10 est en partie responsable de la résistance aux pyréthriinoïdes (Bass et Field, 2011a). Un autre exemple d'amplification de gènes a été découvert chez une souche de puceron (*Myzus persicae*) provenant de Grèce. Un test de synergie avec un inhibiteur des CYPs a mis en évidence le rôle des CYPs dans la résistance à différents néonicotinoïdes. Des analyses complémentaires (puces et PCR quantitative) ont mis en évidence une surexpression d'un seul *Cyp*, *Cyp6cy3* et la surexpression était due en partie à une amplification du gène de 2 à 18 copies chez la souche résistante (Bass et Field, 2011a).

La surexpression est également un mécanisme impliqué dans la résistance aux insecticides. Celle-ci est la cause principale de la résistance via les CYPs. Les gènes qui subissent ce phénomène sont retrouvés dans quatre familles (*Cyp4*, *Cyp6*, *Cyp9* et *Cyp12*) suggérant un rôle important de ces familles dans le métabolisme de composés exogènes. Chez *Drosophila melanogaster*, le taux d'expression de deux gènes *Cyp6a2* et *Cyp6a8* situés sur le chromosome II a été mesuré pour différentes souches. La quantité d'ARNm est très faible chez les souches sensibles au malathion et au DDT suggérant une faible expression de *Cyp6a2* et *Cyp6a8*. Cependant pour la souche résistante 91-R, une surexpression de ces gènes a été détectée (Maitra et al., 2000). Des analyses supplémentaires ont permis de mettre en évidence l'implication d'éléments régulateurs présents sur le chromosome III. En temps normal, ces éléments réprimerait l'expression de *Cyp6a2* et *Cyp6a8*. Une mutation dans l'élément régulateur serait à l'origine de la surexpression de ces deux gènes chez la souche 91-R (Maitra et al., 2000). De manière similaire, la résistance aux pyréthriinoïdes est induite par une surexpression de *Cyp6a1* et *Cyp6d1* chez *Musca domestica*. Ce phénomène serait dû à une mutation perte de fonction sur le chromosome II où se situent les éléments qui régulent négativement ces deux gènes (Li et al., 2007). La surexpression de certains CYPs a également été montrée dans la résistance aux néonicotinoïdes chez plusieurs espèces. Chez *Bemisia tabaci*, la résistance à l'imidaclopride est due à la surexpression de *Cyp6cm1* (Karunker et al., 2008). La résistance aux néonicotinoïdes est due à la surexpression de *Cyp6a1*, *Cyp6d1* et *Cyp6d3* chez une souche de *Musca domestica* récoltée au Danemark (Markussen et Kristensen, 2010b). La résistance au DDT chez la drosophile a été localisée dans une région particulière sur le chromosome II nommé *Rst(2)DDT* qui comporte six gènes codant pour les CYPs: *Cyp6g1*, *Cyp6g2*, *Cyp6t3*, *Cyp12d1*, *Cyp301a1*, *Cyp9h1* (Brandt et al., 2002). La surexpression du *Cyp6g1* est corrélée à la résistance au DDT chez des souches ``des champs`` de drosophile comme la souche Hikone R (Daborn et al., 2002). Un élément transposable *Accord* est inséré dans la région 5' du gène ce qui entraîne sa surexpression et probablement la résistance (Daborn et al., 2001, 2002). Cependant d'autres études montrent que la

corrélation entre la résistance au DDT et la surexpression du *Cyp6g1* n'est pas si évidente (Kuruganti et al., 2007). La souche Hikone R qui montre une surexpression très importante du *Cyp6g1* est plus sensible au DDT que les souches 91-R et Wisconsin qui présentent une surexpression plus faible du *Cyp6g1* (Festucci-Buselli et al., 2005). Après exposition au DDT, l'expression du *Cyp12d1* est induite chez ces trois souches de drosophiles (Hikone R, 91-R et Wisconsin), impliquant au moins le *Cyp6g1* et le *Cyp12d1* dans la résistance au DDT (Festucci-Buselli et al., 2005). De plus, les gènes *Cyp12d1* et *Cyp6a8* sont surexprimés dans différentes souches de drosophiles résistantes au DDT, Wisconsin et WIS11lab (Le Goff et al., 2003). Une étude récente a mis en évidence que la surexpression du *Cyp6g1* était corrélée à 100% avec la présence de l'élément *Accord* mais pas avec la résistance au DDT. En effet, la souche de drosophile CM2 contient l'élément *Accord* et présente une surexpression du *Cyp6g1* mais est sensible vis-à-vis du DDT (Li et al., 2012). Cependant, cette étude montre une forte relation entre la résistance à la nicotine et la surexpression du *Cyp6g1*. Des analyses de liaisons entre génotypes et résistance à la nicotine permettraient de mettre en évidence une forte corrélation entre la surexpression de *Cyp6g1* et la résistance à la nicotine (Li et al., 2012). Hors certaines souches qui présentent l'élément *Accord* sont résistantes aux néonicotinoïdes (insecticides dérivés de la nicotine) et CYP6G1 est capable de métaboliser l'imidaclopride (Daborn et al., 2002; Jousset et al., 2008). Ce résultat suggère que la fixation de l'allèle contenant l'insertion de l'élément *Accord* dans les populations de drosophiles des champs a pu être sélectionnée par la nicotine. Ce composé naturel aux propriétés insecticides est en effet présent chez de nombreuses plantes. Ces études mettent en évidence la complexité du phénomène de résistance et l'implication possible de différents cytochromes pour la résistance à un composé chimique comme le DDT (Pedra et al., 2004).

Enfin, une mutation dans la séquence codante d'un gène conduisant à une modification de la séquence protéique du CYP peut entraîner à une résistance aux insecticides. Certaines mutations présentent dans la séquence de *Cyp6a2* sont associées à la résistance au DDT chez la drosophile. Ces substitutions (R335S, L336V et V476L) sont très proches du site actif et provoquent une augmentation du métabolisme du DDT (Amichot et al., 2004).

III.2.4.3. Les glutathion S-transférases (GSTs).

Les glutathion S-transférases représentent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles actives durant la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Ces protéines sont retrouvées chez les vertébrés comme les invertébrés et sont principalement localisées au niveau du

cytosol. Elles sont impliquées dans le transport intracellulaire, la biosynthèse d'hormones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Enayati et al., 2005)

III.2.4.3.1. Mode d'action des GSTs.

Les GSTs catalysent principalement une réaction de conjugaison qui permet d'associer le substrat au groupement thiol de la molécule de glutathion réduit (GSH) (Figure 31). Cette conjugaison neutralise les sites électrophiles des substrats pour protéger les différents composés de la cellule (Enayati et al., 2005). Elle rend également le substrat hydrosoluble facilitant ainsi son excrétion.

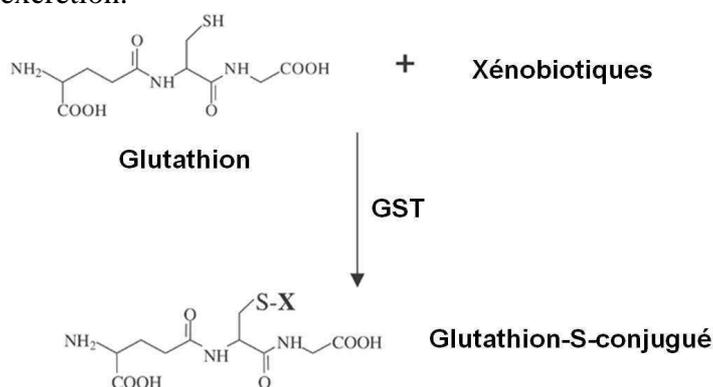


Figure 31: Schéma de conjugaison d'un substrat avec le glutathion réalisée par une GST.

La faible spécificité de substrat des GSTs leur permet de métaboliser un grand nombre de xénobiotiques comme les insecticides mais aussi des composés endogènes comme les époxydes, les hydroperoxydes organiques, les produits de peroxydation des lipides et les carbonyles insaturés (Li et al., 2007). Certaines GSTs ont la capacité de catalyser une réaction de déhydrochlorination en utilisant cette fois le GSH comme un cofacteur.

III.2.4.3.2. Nomenclature des GSTs.

Les GSTs sont classées en deux groupes en fonction de leur localisation dans la cellule, les GSTs cytosoliques et les GSTs microsomales. Un troisième groupe, la classe Kappa, présent dans la mitochondrie n'est retrouvé que chez les mammifères. Il existe une seule GST microsomale chez *Drosophila melanogaster* (Enayati et al., 2005). La majorité des GSTs sont donc cytosoliques. Elles étaient regroupées au départ en trois classes I, II et III. Avec l'annotation des génomes d'insectes, de nombreuses GSTs ont été identifiées et la classification a dû évoluer. La nomenclature des GSTs de mammifères a ensuite été utilisée.

Chez les mammifères, il existe neuf classes: Alpha, Mu, Pi, Theta, Omega, Sigma, Zeta, Kappa et une classe pour les GSTs microsomales. Les GSTs qui présentent plus de 40% d'identité entre les séquences en acides aminés appartiennent généralement à la même classe (Chelvanayagam et al., 2001). La comparaison phylogénétique des GSTs d'insectes et de mammifères ont mis en évidence une orthologie entre les GSTs du groupe II des insectes et la classe Sigma des mammifères. Plusieurs classes ont été trouvées comme spécifiques des insectes, le groupe I initial renommé en classe Delta et le groupe III renommé en classe Epsilon. L'évolution indépendante de ces deux classes de GSTs chez *Drosophila melanogaster* et *Anopheles gambiae* suggère un rôle important de ces enzymes dans l'adaptation de l'organisme à l'environnement (Ranson et al., 2002). Les autres GSTs appartiennent aux classes Zeta, Theta et Omega (Figure 32).

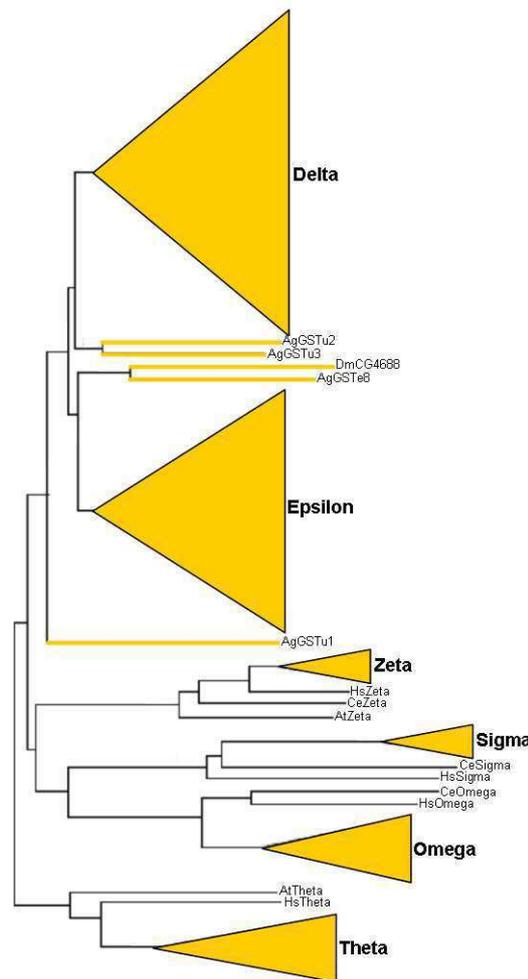


Figure 32: Arbre phylogénétique permettant de classer les différentes GSTs d'insectes (en jaune). Alignement des séquences protéiques des GSTs de *Drosophila melanogaster* et de *Anopheles gambiae* avec les GSTs de mammifères, de plantes et de nématodes. Dm (*Drosophila melanogaster*), Ag (*Anopheles gambiae*), Hs (*Homo sapiens*), At (*Arabidopsis thaliana*) et Ce (*Caenorhabditis elegans*). (d'après Enayati et al., 2005).

Les noms des gènes qui codent les différentes GSTs d'insectes correspondent donc à la nouvelle nomenclature. Le nom de chaque gène commence par les initiales de l'espèce dans laquelle il a été isolé, ensuite de l'acronyme GST, puis de la lettre qui désigne la classe et enfin d'un chiffre correspondant au gène. Par exemple, DmGSTE1 correspond au gène qui code la GST 1 de la classe Epsilon chez *Drosophila melanogaster*. Chez cet insecte, 31 GSTs ont été identifiées, 39 chez le moustique (*Anopheles gambiae*) et seulement 10 chez l'abeille (*Apis mellifera*) (Ranson et al., 2002; Claudianos et al., 2006).

III.2.4.3.3. GSTs et résistance aux insecticides.

Les GSTs ont été impliquées dans la résistance à différents insecticides appartenant aux organochlorés, aux organophosphorés et aux pyréthrinoïdes (Li et al., 2007).

L'amplification de gènes codant des GSTs a été démontrée pour deux gènes différents chez deux espèces différentes. Chez *Musca domestica*, une souche Cornell-R résistante aux organophosphorés contient dans son génome 12 copies du gène qui code MdGSTD3 au lieu de 3 copies chez la souche sensible (Syvanen et al., 1996). Chez une souche résistante aux pyréthrinoïdes de *Nilaparvata lugens*, un gène codant pour NIGSTD1 est surexprimé par rapport à une souche sensible. Une analyse par Southern a permis de mettre en évidence la présence d'un nombre plus important de copies du gène qui code NIGSTD1 indiquant une amplification de ce gène, provoquant la résistance aux pyréthrinoïdes (Vontas et al., 2002). Cependant, les GSTs ne seraient pas capables de métaboliser directement les pyréthrinoïdes mais elles seraient plutôt impliquées dans la séquestration de ces insecticides et la métabolisation des produits de peroxydation des lipides induits par ces mêmes insecticides (Vontas et al., 2001; Kostaropoulos et al., 2001).

Certaines GSTs sont capables de catalyser une réaction de déhydrochlorination en particulier la déhydrochlorination du DDT en un métabolite secondaire, le DDE en utilisant le GSH en cofacteur (Figure 33).

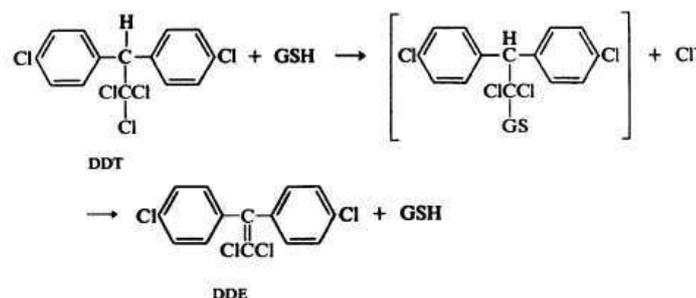


Figure 33: Modèle de la réaction de déhydrochlorination du DDT par une GST. (d'après Enayati et al., 2005).

Cette propriété de certaines GSTs a été associée à la résistance au DDT chez plusieurs espèces comme le moustique ou la drosophile. Chez le moustique *Anopheles gambiae*, une GST *AgGSTE2* est surexprimée chez une souche résistante au DDT. Après expression de cette GST chez *E. coli*, des mesures de son activité de déhydrochlorination du DDT ont montré une forte activité de cette enzyme (Ranson et al., 2001). L'orthologue de *AgGSTE2* chez une espèce de moustique (*Anopheles aegypti*) nommé *AaGSTE2* est surexprimé chez une souche PMD-R résistante au DDT et aux pyréthriinoïdes (Lumjuan et al., 2005). L'expression hétérologue de cette *AaGSTE2* a permis de mettre en évidence une activité de déhydrochlorination du DDT mais également une activité glutathion peroxydase (Lumjuan et al., 2005). Chez une troisième espèce de moustique *Culex pipiens*, deux GSTs *CpGSTD1* et *CpGSTD2* sont surexprimées et conduisent à la résistance aux pyréthriinoïdes. En particulier, *CpGSTD1* qui présente une activité peroxydase et une activité déhydrochlorinase (Samra et al., 2012). Des résultats similaires ont été démontrés chez la drosophile avec la surexpression de *DmGSTD1*, impliquée dans la résistance au DDT (Low et al., 2010), chez *Nilaparvata lugens* et chez *Plutella xylostella* (Vontas et al., 2001; Sonoda et Tsumuki, 2005).

III.3-L'impact des insecticides sur les organismes non cibles.

L'utilisation intensive des insecticides dans les cultures depuis plus de 50 ans a amené à une contamination progressive de l'environnement. Actuellement, des résidus de ces pesticides sont retrouvés dans les sols, dans l'eau des lacs, des rivières, dans les eaux de pluie mais aussi dans l'air. De plus, la nourriture permet également d'apporter à l'organisme une dose importante de ces résidus (fruits, légumes). Les organismes vivants sont donc continuellement en présence de très faibles doses de ces pesticides. Ces dernières, appelées doses sublétales, ne provoquent pas la mort de l'organisme mais peuvent cependant déclencher des effets indésirables ou effets secondaires. Pendant longtemps ces effets ont été négligés surtout au niveau des insectes dits bénéfiques et chez l'homme en particulier pour les populations à risque comme les agriculteurs, les personnes travaillant dans l'industrie des insecticides et les personnes qui désinsectisent les bâtiments (Desneux et al., 2007; Damalas et Eleftherohorinos., 2011).

III.3.1. Les insectes non cibles.

Les insectes dits bénéfiques peuvent être classés en deux groupes, les insectes pollinisateurs comme les abeilles ou les bourdons et les prédateurs des insectes nuisibles comme la coccinelle ou la chrysope verte. Du fait de leur importance économique en particulier pour les pollinisateurs, plusieurs études se sont intéressées aux effets à des doses sublétales d'insecticides (doses qui n'induisent pas la mort) au niveau du comportement et de la physiologie chez ces insectes.

III.3.1.1. Effets sur le comportement des insectes.

L'exposition aux insecticides à des doses sublétales peut conduire à des défauts dans le comportement des insectes. Différents comportements peuvent être altérés comme la mobilité, la recherche de nourriture ou d'hôtes mais aussi le comportement alimentaire.

L'exposition aux insecticides peut provoquer une diminution de la mobilité chez différents insectes. Par exemple, chez *Melipona quadrifasciata* (abeille originaire du Mexique), l'exposition des larves à des doses sublétales d'imidaclopride (0,0056 à 0,112 μ g/abeille) provoque une diminution de l'activité locomotrice des adultes âgés de quatre jours ou plus (Tomé et al., 2012). La guêpe *Trissolcus basalis* (parasite de la punaise verte *Nezara viridula*) présente une réduction importante de l'activité locomotrice chez des femelles deux heures après une exposition à la deltaméthrine (pyréthrianoïde). Cependant, cette diminution de l'activité locomotrice n'est pas permanente et les femelles retrouvent leurs capacités 24 heures après l'exposition à l'insecticide (Salerno et al., 2002). Cette réduction de la mobilité peut avoir un impact sur les capacités des insectes, comme une efficacité plus faible du parasitisme, un risque plus important vis-à-vis de la prédation ou encore une diminution de l'accès à la nourriture.

Dans la nature, les insectes consacrent une grande partie de leur vie à la recherche de nourriture, de proies ou d'hôtes. Ce processus implique différents mécanismes comme la reconnaissance de multiples signaux chimiques ou sensoriels, la mémoire, l'apprentissage. Pour les espèces qui vivent en groupe, la communication est également un mécanisme important (Desneux et al., 2007). Chez le prédateur *Acanthaspis pedestris*, l'exposition à la cyperméthrine (pyréthrianoïde) à des doses semblables à celles retrouvées dans la nature, induit une forte diminution de la prédation (Claver et al., 2003). La libération de kairomones par l'hôte provoque chez la guêpe *Trissolcus basalis* un changement de comportement en particulier une augmentation du temps passé dans la zone contaminée (présence de

kairomones). L'exposition à la deltaméthrine des femelles *Trissolcus basalis* engendre une diminution du temps dans la zone contaminée comparé aux femelles non exposées suggérant une capacité de parasitisme plus faible pour les guêpes exposées à la deltaméthrine (Salerno et al., 2002). Les pollinisateurs sont également affectés. Des abeilles ont été exposées à des doses sublétales d'imidaclopride pendant leur développement (0,04ng/larve). Cette exposition n'affecte pas le développement des larves mais les adultes présentent des défauts dans le comportement associé à l'olfaction. Ce défaut de comportement suggère une diminution de la mémorisation et de l'apprentissage des adultes qui ne seraient plus capables de localiser la nourriture et la direction de la ruche entraînant une réduction importante du nombre d'individus de la colonie (Yang et al., 2012). Une autre étude menée chez le bourdon (*Bombus terrestris*) a permis de mieux appréhender ce processus. Les colonies de bourdons sont placées en laboratoire, mais un système relie les colonies à l'environnement extérieur permettant aux butineuses de rechercher la nourriture dans le milieu naturel pendant que les travailleuses entretiennent la colonie. Ce processus est vital pour la survie de la colonie car les travailleuses nourrissent les larves qui donneront les futurs adultes (Gill et al., 2012). L'exposition à différents insecticides (doses semblables à celles retrouvées dans la nature) a été testée pendant quatre semaines. L'imidaclopride (néonicotinoïde) provoque une diminution de l'efficacité du butinage. En effet, les butineuses sont absentes de la ruche pendant une période plus longue et rapportent une quantité moindre de pollen par rapport aux butineuses non exposées (Gill et al., 2012). La quantité de nourriture n'est plus suffisante pour la colonie et plusieurs travailleuses sont amenées à sortir de la ruche pour rechercher de la nourriture. Il y a donc moins de travailleuses présentes dans la ruche pour l'entretenir et pour nourrir les larves ce qui affecterait le développement et entraînerait une diminution du nombre de naissance. Pour les colonies exposées à la λ -cyalothrine (pyréthrianoïde), une forte mortalité des travailleuses est observée, 36% pour les colonies exposées contre seulement 9% pour les colonies non exposées mais cet insecticide n'a pas d'effets sur les butineuses. Une exposition aux deux insecticides (imidaclopride et λ -cyalothrine) a été testée. Des effets cumulatifs, plus importants sont observés conduisant à la perte de deux colonies (Gill et al., 2012). D'autres insecticides comme les carbamates et les organophosphorés provoquent une incapacité des abeilles à communiquer le lieu de la nourriture par une danse très spécifique (Thompson, 2003).

Les insecticides peuvent également avoir un effet répulsif sur les insectes dit bénéfiques. Chez la coccinelle (*Coccinella septempunctata*), les adultes et les larves consomment une quantité plus faible de pucerons s'ils ont été traités au préalable au diméthoate, un organophosphoré

(Singh et al., 2004). Les larves de coccinelles évitent également les zones traitées de la plante provoquant une restriction du prédateur (la coccinelle) au niveau de zones non traitées. Le spinosad (spynosyne) présente un effet répulsif pour trois prédateurs du thrips des petits fruits (*Frankliniella occidentalis*). Cet effet répulsif est présent durant les deux premiers jours de la vie des prédateurs qui évitent les zones traitées au spinosad (Rahman et al., 2011). Ces dernières seront donc dépourvues de plusieurs prédateurs de *Frankliniella occidentalis*.

III.3.1.2. Effets physiologiques.

Le développement chez les insectes peut être perturbé par différents insecticides, se traduisant généralement par un rallongement de la durée de développement, l'apparition de malformations morphologiques ou par une augmentation de la mortalité larvaire ou pupale. Le développement de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* (prédateur naturel des ravageurs des cultures de maïs) est retardé en présence de doses sublétales de certains neurotoxiques comme le spinosad et l'indoxacarbe (Galvan et al., 2005). Le fénoxycarbe, un analogue d'hormone juvénile, allonge également la durée de développement au cours des stades larvaires chez le prédateur *Chrysoperla rufilabris* (Liu et Chen, 2001). Un neurotoxique, la λ -cyalothrine provoque un allongement de la durée de développement aux stades larvaire ($10,14 \pm 0,06$ comparé au contrôle $9,76 \pm 0,06$) et prépupal ($10,04 \pm 0,05$ comparé au contrôle $9,38 \pm 0,06$) chez le parasite *Trichogramma pretiosum* (Consoli et al., 1998). Chez l'abeille (*Apis mellifera*), les œufs et les larves sont exposés à différents pesticides via la nourriture et la composition du nid induisant un ralentissement du développement à partir du quatrième jour (Wu et al., 2011).

Les insecticides peuvent également induire des perturbations au cours du développement conduisant à des malformations à la naissance. Des doses sublétales d'organophosphorés sont à l'origine de plusieurs malformations au niveau des testicules, des ovaires et de l'intestin chez le prédateur *Rhynocoris kumari* (Desneux et al., 2007). L'exposition à une dose sublétale de spinosad ($0,046 \mu\text{g/larve}$) chez la larve de la guêpe parasite (*Hyposoter didymator*) provoque une forte mortalité durant le stade pupal (72,0%). Ce neurotoxique induirait des mouvements involontaires ce qui entraînerait l'incapacité chez la larve à former le cocon (Schneider et al., 2004). Chez les prédateurs des insectes nuisibles, ces malformations entraînent une diminution de l'efficacité du parasitisme ou de la prédation. Le fénoxycarbe provoque des malformations de la larve et de la puppe chez l'abeille (*Apis mellifera*) conduisant à la mort directement dans la ruche (Desneux et al., 2007). Chez les abeilles, le

volume des corps pédonculés augmente avec l'âge. Cependant, l'exposition à des doses sublétales d'imidaclopride des larves de *Melipona quadrifasciata* durant le développement, perturbe l'augmentation du volume des corps pédonculés (structures spécifiques du cerveau) chez l'adulte (Tomé et al., 2012). Une réduction de 36% du volume est observée pour une dose de 0,11µg/larve chez des abeilles âgées de 8 jours. Cette réduction est probablement à l'origine des défauts dans le comportement chez ces insectes (Tomé et al., 2012).

L'effet des doses sublétales sur la réduction de la longévité des insectes a été rapporté pour différentes espèces. Cependant, l'effet sur une population reste difficile à évaluer car la durée de vie dépend de nombreux paramètres comme l'accessibilité à la nourriture, la reproduction, la communication et le contact entre les différents insectes de la même colonie (Desneux et al., 2007). Une étude a été menée chez la chrysope verte (*Chrysoperla carnea*) pour déterminer l'impact de différents types de cultures en Espagne. La longévité est la plus importante pour les individus dont les parents sont issus des cultures sans insecticide comparé aux cultures qui reçoivent trois traitements insecticides par an (Corrales et Campos, 2004). Chez le parasitoïde *Eretmocerus warrae*, l'exposition des œufs ou des larves à l'azadirachtine conduit à une réduction de la longévité chez les adultes. L'exposition au spinosad ou à l'abamectine des œufs, des larves ou des pupes entraîne une forte réduction de la durée de vie de ce parasitoïde (Kumar et al., 2008). Le spinosad engendre également une diminution de la longévité chez la guêpe *Hyposoter didymator* (Schneider et al., 2004). Ce phénomène est aussi retrouvé chez les pollinisateurs. L'exposition à divers pesticides durant le développement entraîne une réduction de la durée de vie de quatre jours chez les abeilles (Wu et al., 2011).

Certains insecticides peuvent avoir un effet sur la fécondité ou la fertilité chez les femelles exposées, provoquant une diminution du nombre de descendants pour la génération suivante. *Tuta absoluta* est un insecte ravageur originaire d'Amérique du Sud qui peut engendrer de nombreux dégâts dans les cultures de tomates. Deux prédateurs de cet insecte (*Macrolophus pygmaeus* et *Nesidiocoris tenuis*) pourraient être utilisés dans les cultures de tomates en complément d'insecticides. Il est donc important de déterminer l'impact de ces insecticides sur ces deux espèces de prédateurs (Arno et Gabarra, 2011). L'exposition des femelles au spinosad ou à l'azadirachtine induit une réduction du nombre de descendants par femelle. Cependant, les deux insecticides n'ont pas le même effet sur les prédateurs, le spinosad réduit fortement le nombre de descendant chez *Macrolophus pygmaeus* alors que l'azadirachtine a un effet plus important chez *Nesidiocoris tenuis* (Arno et Gabarra, 2011).

L'effet de trois insecticides (régulateurs de croissance: chlorfluazuron, flufenoxuron, teflubenzuron) sur le parasitisme de la guêpe (*Cotesia plutellae*) a été testé. Des femelles âgées d'une journée sont exposées (insecticides contenus dans la nourriture) pendant une période de deux jours puis transférées une par une dans des cages permettant le parasitisme (présence d'hôtes). L'efficacité du parasitisme est significativement réduite pour les guêpes exposées aux trois insecticides comparées aux guêpes non exposées. Cette réduction pourrait être due à une baisse de la fécondité chez les femelles après exposition aux régulateurs de croissance (Haseeb et Amano, 2002). Chez le bourdon (*Bombus terrestris*), une étude a été menée sur 75 colonies exposées ou non à l'imidaclopride (doses semblables à celles retrouvées dans la nature) pendant deux semaines en laboratoire puis les colonies ont été placées pendant 6 semaines en plein champ. Le nombre de reines produites est réduit de 85% pour les colonies exposées à l'imidaclopride (2 reines) comparées aux colonies non exposées (13,72 reines). Ces résultats suggèrent que l'imidaclopride pourrait avoir un impact très important sur les colonies de bourdons car durant l'hiver seules les nouvelles reines survivent et reforment de nouvelles colonies au printemps suivant (Whitehorn et al., 2012).

Même à des doses très faibles, les insecticides peuvent avoir des effets négatifs sur le comportement ou la physiologie des insectes dits bénéfiques qui participent à l'élimination des ravageurs et à la pollinisation de nombreux végétaux.

III.3.2. Autres organismes.

L'usage des insecticides par l'homme et leur dissémination via les éléments comme le vent ou la pluie a conduit à une contamination importante de l'environnement. De ce fait, de nombreux organismes non cibles sont exposés à ces composés chimiques comme les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux ou encore les mammifères. L'exposition même à des doses faibles d'insecticides peut provoquer chez les espèces touchées des changements comportementaux et physiologiques pouvant conduire à une baisse de la survie et de la reproduction (Kegley et al., 1999).

Chez **les poissons** par exemple, l'exposition aux produits phytosanitaires peut engendrer des malformations, une diminution de la fertilité, une réduction de la capacité de nage, ou encore perturber le système immunitaire. Les poissons sont donc plus vulnérables vis-à-vis des prédateurs et des maladies (Kegley et al., 1999). Chez le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), pour se reproduire, les femelles libèrent une phéromone ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dans leur urine qui est reconnue par des récepteurs olfactifs de l'épithélium chez les mâles et provoquent chez ces

individus une augmentation de la concentration en hormones sexuelles dans le plasma et dans la laitance. Chez des mâles exposés à des doses sublétales de carbofuran (carbamate), on observe une diminution de la détection de la phéromone femelle et une diminution des hormones sexuelles dans le plasma des mâles. Les premières étapes dans le processus de la reproduction sont donc perturbées par une exposition au carbofuran (Waring et Moore, 1997). Ce processus est également perturbé chez ce poisson par une exposition à des doses sublétales de cyperméthrine, un pyréthrianoïde (Moore et Waring, 2001). Chez le poisson arc-en-ciel australien (*Melanotenia fluviatilis*), l'exposition à l'esfenvalérate (pyréthrianoïde) à des doses sublétales induit une diminution du nombre d'œufs pondus par femelle ainsi qu'une réduction du taux d'éclosion (Barry et al., 1995).

Les amphibiens sont plus sensibles aux variations de l'environnement car ils doivent faire face aux perturbations du milieu aquatique et du milieu terrestre. De plus, la peau des amphibiens est très perméable et joue un rôle physiologique important dans les échanges (gaz, eau, électrolytes) avec le milieu extérieur. C'est pourquoi ces organismes présentent une forte sensibilité vis-à-vis des produits phytosanitaires (Brühl et al., 2011). Par exemple, chez la grenouille oxyrhine (*Rana arvalis*), l'exposition à la cyperméthrine (pyréthrianoïde) à des doses retrouvées dans la nature (0,1 et 1µg/l) provoque des effets néfastes comme une augmentation de la mortalité des têtards, des malformations physiques, des perturbations du comportement, un allongement de la durée de la métamorphose et une réduction de la masse chez l'adulte (Greulich et Pflugmacher, 2003).

L'impact des insecticides chez **les oiseaux** est reconnu depuis la publication de "Silent spring" dans les années 1960s, dénonçant l'utilisation intensive du DDT aux Etats-Unis et qui avait conduit à une forte mortalité des oiseaux d'où le nom de printemps silencieux (absence de chants d'oiseaux). En Europe entre 1980 et 2006, la population d'oiseaux a diminué de 10% dans les zones forestières et de 48% dans les zones agricoles. On estime que la cause principale du déclin des populations d'oiseaux est l'utilisation de composés chimiques en agriculture (Mitra et al., 2011). Les rapaces comme l'aigle, le faucon pèlerin ou encore le hibou grand-duc se trouvent en haut de la chaîne alimentaire et ils sont très vulnérables vis-à-vis de certains insecticides. En effet, les organochlorés sont stockés dans les tissus et vont s'accumuler le long de la chaîne alimentaire. Les animaux appartenant au niveau le plus haut de cette chaîne sont donc exposés à de fortes doses pour ces composés chimiques. Les organochlorés en particulier le DDT ont joué un rôle majeur dans le déclin des populations d'oiseaux. Un des métabolites du DDT, le p,p'DDE est à l'origine de la réduction de l'épaisseur de la coquille des œufs des oiseaux. Par exemple, les œufs du faucon pèlerin

collectés dans l'arctique canadien avaient une coquille plus fine de 15% par rapport aux œufs collectés avant la mise sur le marché du DDT (Lundholm, 1997). Ce phénomène représente l'un des principaux effets indésirables due à l'exposition des insecticides chez les oiseaux et il a été retrouvé chez de nombreuses espèces (Lundholm, 1997). Les œufs présentent une coquille plus fine et beaucoup plus fragile qui peut se briser plus facilement. Cette fragilité conduit à une réduction du nombre d'œufs qui éclosent et donc une diminution du nombre d'individus pour l'espèce considérée. Les insecticides peuvent également provoquer des malformations chez les poussins, une diminution du taux d'éclosion ou une réduction du nombre d'œufs pondus (Mitra et al., 2011). L'exposition aux insecticides peut également perturber la reproduction chez les oiseaux. L'exposition au parathion (organophosphoré) des perruches à collier (*Psittacula krameri*) induit une perturbation des fonctions testiculaires (diminution du poids des testicules, diminution du diamètre des tubes séminifères...) chez les mâles (Maitra et Mitra, 2008). Le comportement d'accouplement est perturbé chez la tourterelle rieuse (*Streptopelia risoria*) après une exposition à des doses sublétales de p,p'DDE (Walker, 2003). Des goélands argentés (*Larus argentatus*) exposés à de nombreux polluants dans la région du lac Ontario partent rapidement du nid en laissant leur progéniture sans surveillance conduisant à une diminution du nombre d'individus (Peakall, 1996). Chez le bruant à gorge blanche (*Zonotrichia albicollis*), certains métabolites du DDT entraînent une perturbation de son activité nocturne (Walker, 2003). De plus, l'usage d'insecticides induit une forte diminution du nombre d'insectes soit une diminution de la quantité de nourriture pour certaines espèces. Chez les oiseaux les organochlorés et les organophosphorés sont les insecticides les plus néfastes. L'interdiction de nombreux organochlorés aux Etats-Unis et en Europe a permis de limiter le déclin des populations d'oiseaux mais de nombreuses espèces restent menacées.

Chez **les reptiles**, la détermination du sexe est dépendante de la température à travers l'activité d'hormones stéroïdiennes. En effet, l'exposition à certaines de ces hormones peut conduire à une inversion de la détermination du sexe (De Solla et al., 1998). Certains insecticides sont des perturbateurs endocriniens et pourraient perturber ce processus. Par exemple, une forte baisse d'une population d'alligators d'Amérique (*Alligator mississippiensis*) a été mise en évidence au niveau du lac Apopka en Floride, lac fortement contaminé par le DDT et le dicofol (insecticides organochlorés). Les jeunes alligators de cette population présentaient des concentrations anormales d'hormones sexuelles (estradiol et testostérone) ainsi que des défauts morphologiques au niveau des ovaires et des testicules pouvant perturber la reproduction chez ces individus (Guillette et al., 1994). On observe une

féménisation des mâles chez des populations de tortues serpentines (*Chelydra serpentina serpentina*) présentes au niveau de sites contaminés par de nombreux produits chimiques en particulier des insecticides comme le DDT ou la dieldrine (De Solla et al., 1998).

III.3.3. L'homme.

L'homme est également exposé aux insecticides de par son environnement, son alimentation et ses activités professionnelles ou privées. L'homme est donc en contact avec de nombreux composés chimiques au cours de sa vie. Il est donc important d'évaluer les risques liés à cette exposition et l'impact sur la santé humaine. Le développement de certaines maladies a pu être associé à une exposition aux insecticides, comme le développement de certains cancers, l'apparition d'allergies, de troubles neurologiques ou encore la perturbation de la reproduction sont les effets les plus courants (Mnif et al., 2011).

III.3.3.1. Effets sur le système endocrinien et la reproduction.

Certains insecticides (DDT, métoxychlore, cyperméthrine, dieldrine, endosulfan) sont des perturbateurs endocriniens et peuvent être à l'origine d'effets délétères chez l'homme en particulier sur la reproduction. De nombreux perturbateurs endocriniens agissent via les récepteurs aux oestrogènes et les récepteurs aux androgènes provoquant une perturbation de l'homéostasie oestrogènes/androgènes importante pour le fonctionnement normal des processus impliqués dans la reproduction (Marques-Pinto et Carvalho, 2013). Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre l'exposition aux pesticides et une incidence plus importante de certaines anomalies du système reproducteur masculin comme une réduction de la qualité du sperme (spermatogenèse affectée), une cryptochidie (incapacité d'un testicule d'atteindre le scrotum), une hypospadias (ouverture de l'urètre au niveau de la face inférieure du pénis) et du cancer des testicules (Nordkap et al., 2012). Une étude menée en Inde sur 117 adolescents âgés de 10 à 19 ans suggère que l'exposition à l'endosulfan (organochloré) induit un retard de la maturité sexuelle et une perturbation de la synthèse des hormones sexuelles (Saiyed et al., 2003). L'incidence des malformations du système reproducteur masculin (hypospadias et cryptochidie) à la naissance est plus importante dans des zones d'agriculture intensive (Carbone et al., 2006). Le fœtus, le nourrisson et l'enfant sont particulièrement sensibles aux perturbateurs endocriniens (Mnif et al., 2011). L'exposition de la mère à ces composés durant la grossesse et l'allaitement peut induire chez

l'enfant des effets sur les fonctions de reproduction et du système nerveux et des malformations congénitales (Ribas-Fito et al., 2006; Mnif et al., 2011). Par exemple, l'exposition prénatale au DDT et à ses métabolites est associée à un retard dans le développement neuronal chez le nourrisson (Eskenazi et al., 2006).

III.3.3.2. Effets cancérigènes.

L'exposition aux pesticides peut jouer un rôle dans l'apparition des cancers chez l'homme en particulier chez des populations exposées de manière importante comme les agriculteurs (Bassil et al., 2007; Alavanja et al., 2013). Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une association positive entre l'exposition aux pesticides et certains cancers comme les cancers du sein, de la prostate, des reins, des poumons, du cerveau mais également des leucémies, des myélomes et des lymphomes non hodgkiniens (Bassil et al., 2007; Cohn et al., 2007; Band et al., 2011; Alavanja et al., 2013; Freeman et al., 2005; McDuffie et al., 2001). Certaines études montrent une corrélation possible entre l'exposition aux pesticides et l'augmentation du risque de développer un cancer de la prostate (Mullins et Loeb, 2012). Une étude épidémiologique a été menée sur des individus atteints d'un cancer de la prostate ou des individus atteints d'un autre type de cancer. Ils ont mis en évidence une association entre le risque de développer un cancer de la prostate et une exposition à certains insecticides comme le DDT, le lindane (organochlorés) mais aussi le malathion, le diazinon (organophosphorés) et le carbaryl (carbamate) (Band et al., 2011). Une autre étude épidémiologique a montré une incidence plus élevée du cancer de la prostate chez les agriculteurs comparé à la population générale. De plus, une exposition aux pesticides conduit à une augmentation importante du risque de développer un cancer de la prostate chez des individus ayant des antécédents familiaux pour ce cancer. Ces données ont amené les auteurs à suggérer un lien probable entre susceptibilité génétique, exposition aux pesticides et risque de développement du cancer de la prostate (Alavanja et al., 2013). Des études ont été menées pour déterminer si l'exposition aux pesticides en particulier aux insecticides organochlorés pouvait avoir un rôle dans l'étiologie du cancer du sein (Alavanja et al., 2013). L'exposition au DDT augmente le risque de développer un cancer du sein si les femmes ont été exposées avant l'âge de 14 ans suggérant un effet sur le long terme de cet insecticide (Cohn et al., 2007). Une étude menée en Iowa et en Californie, a mis en évidence une association entre l'exposition au diazinon et le cancer des poumons ainsi que les leucémies chez des professionnels utilisant des pesticides (Freeman et al., 2005). L'exposition aux insecticides pendant l'enfance peut également augmenter le

risque de développer des leucémies chez l'enfant (Turner et al., 2011). L'exposition aux organophosphorés et aux carbamates augmente le risque de développer des lymphomes non hodgkiniens. Une étude menée au Canada chez des hommes exposés aux pesticides a mis en évidence une association entre l'exposition à certains insecticides (aldrine, malathion, carbaryl) et une augmentation du risque de développer un lymphome non hodgkinien (McDuffie et al., 2001).

III.3.3.3. Effets sur le système immunitaire.

Les pesticides sont aussi capables de perturber le système immunitaire. Cependant, les études épidémiologiques concernent l'exposition aux pesticides surtout chez les enfants (exposition durant, la grossesse, l'allaitement et l'enfance) (Gascon et al., 2013). Une étude menée sur 584 femmes enceintes en Espagne a mis en évidence une association entre l'exposition prénatale au DDE (métabolite du DDT) et le développement d'infections respiratoires chez le nourrisson durant la première année de sa vie (Sunyer et al., 2010). Glynn et ses collaborateurs ont suggéré qu'une exposition postnatale au DDE pouvait également augmenter le risque d'infections respiratoires chez le nourrisson (Glynn et al., 2008). Chez l'adulte, l'exposition chronique aux pesticides peut être impliquée dans le développement de maladies respiratoires comme la bronchite chronique et l'asthme en particulier dans le cas d'une exposition professionnelle aux pesticides (Salameh et al., 2006a, 2006b). Une autre étude épidémiologique réalisée chez les Inuits montre une corrélation entre l'exposition aux insecticides organochlorés et l'augmentation d'otites chez le nourrisson (Dewailly et al., 2000). D'autre part, des études ont permis de mettre en évidence une réponse humorale après l'exposition aux pesticides. L'augmentation des IgE dans le cordon ombilical est associée à une augmentation de la quantité de pesticides en particulier les organochlorés dans le placenta de nouveaux-nés, ce qui suggère une sensibilisation allergique chez les individus exposés aux pesticides (Reichrtová et al., 1999). Chez des enfants âgés de 7 à 10 ans, une augmentation des IgE dans les basophiles, des IgA et IgG est également associée aux pesticides en particulier le DDE (Karmaus et al., 2005).

III.3.3.4. Effets neurologiques et comportementaux.

Actuellement, la majorité des insecticides présents sur le marché sont des neurotoxiques et une exposition chronique à certains de ces composés peut conduire à l'apparition de troubles neurologiques (Burns et al., 2013). Le développement du système nerveux est sensible aux toxines présentes dans l'environnement. L'exposition durant les stades précoces (*in utero*, chez le nourrisson et l'enfant) peut conduire à l'apparition de certaines pathologies comme l'autisme, la dyslexie, un retard mental, une perte de la concentration, une hyperactivité (Hass, 2006). L'exposition prénatale aux organophosphorés induirait un retard de développement neuronal chez le nourrisson. De plus, une enzyme (paraoxonase 1) impliquée dans le métabolisme de ces pesticides serait un facteur de risque important dans l'apparition de ces troubles neurologiques (Engel et al., 2011). Une autre étude épidémiologique suggère un lien possible entre l'exposition (*in utero*) aux organophosphorés en particulier le malathion et une réduction de la durée de la gestation (Eskenazi et al., 2004). Raulh et ses collaborateurs suggèrent que l'exposition au chlorpyrifos (insecticide organophosphoré) durant la période prénatale pourrait induire un déficit intellectuel et une perturbation de la mémoire de travail chez des enfants âgés de 7 ans (Rauh et al., 2011). L'exposition prénatal au DDT peut également perturber les fonctions cognitives en particulier chez les filles âgées de 4 ans (Ribas-Fito et al., 2006). Chez l'adulte l'exposition chronique aux pesticides peut également conduire à des désordres neurologiques en particulier des troubles neurodégénératifs comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (Parron et al., 2011; Thany et al., 2013). Une étude menée en France (Bordeaux) met en évidence des effets neuropsychologiques chez des ouvriers viticoles exposés de manière chronique à des faibles doses de pesticides (Baldi et al., 2001). Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une association probable entre la maladie de Parkinson et l'exposition aux pesticides en particulier avec la roténone, la dieldrine et le paraquat (Tanner et al., 2011; Freire et Koifman, 2012; Weisskopf et al., 2010). Par exemple, une étude menée sur une population de l'est du Texas a mis en évidence une association entre l'exposition aux pesticides organiques comme la roténone et le risque de développer la maladie de Parkinson (OR=10,9) (Dhillon et al., 2008). Une autre étude épidémiologique réalisée en Espagne entre 1999 et 2005 a mis en évidence une augmentation significative du risque de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose en plaques et du suicide chez des populations vivant dans des zones où l'utilisation de pesticides est importante. De plus, le risque est plus important chez les hommes pour certains troubles neurologiques comme les neuropathies périphériques, la dépression ou le suicide (Parron et al., 2011). En effet, un taux important de suicides est également retrouvé chez les

agriculteurs comparés à la population générale. Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation avec une exposition aux organophosphorés soit par empoisonnement ou par exposition chronique avec des désordres affectifs (dépression, anxiété) pouvant conduire au suicide (London et al., 2012). Une autre étude a mis en évidence une association entre l'exposition aux pesticides et le développement de la dépression chez des agriculteurs et leurs épouses dans le Colorado (Stallones et Beseler, 2002). Par conséquent, ces études suggèrent une perturbation du système nerveux central en particulier après une exposition aux organophosphorés pouvant conduire au suicide chez ces individus.

L'exposition aux pesticides peut donc conduire à des effets néfastes sur la santé humaine. Cependant, il reste difficile de déterminer l'impact de chaque pesticide car l'homme est en contact avec de nombreux composés qui peuvent interagir entre eux et l'effet de synergie peut être à l'origine de l'effet indésirable. De plus, il est difficile de quantifier une exposition aux pesticides chez l'homme (produits utilisés, temps d'exposition, chronique ou aiguë) et les études épidémiologiques sont réalisées dans différents types d'environnement.

IV-Objectifs de la thèse.

L'utilisation intensive des insecticides durant ces 50 dernières années a provoqué une contamination importante de l'environnement. Malgré une prise de conscience des effets néfastes de ces produits phytosanitaires, ils restent actuellement très utilisés en particulier dans le domaine agricole. Par conséquent, ces insecticides continuent à être disséminés dans la nature et à polluer l'environnement. De ce fait, plusieurs problèmes se posent face à cette utilisation constante: (i) l'apparition de résistance aux insecticides chez les insectes ravageurs, (ii) l'impact d'une exposition aux insecticides en particulier une exposition chronique à des doses faibles sur les organismes comme l'homme. Apporter des réponses face à ces problèmes reste essentiel pour mieux appréhender les effets des insecticides et se tourner vers une "utilisation intelligente" de ces produits dans le futur. Le travail de thèse que je présente ici s'inscrit dans ce cadre et se découpe en deux parties distinctes:

La première partie concerne l'effet d'un néonicotinoïde, l'imidaclopride sur un insecte non cible, la drosophile. Deux modes d'exposition ont été utilisés: en intoxication chronique à des doses faibles et en intoxication aiguë à des doses élevées. Ces deux modes d'exposition permettaient de modéliser les différentes situations rencontrées dans la nature. Lorsque j'ai débuté ma thèse, cette étude avait déjà été initiée par Gaël Charpentier (étudiant master 2). Dans un premier temps, mon travail a consisté à compléter les résultats obtenus. Au cours de cette étude, nous avons observé qu'une souche (Orléans) capturée dans la nature dans les années 2000 présentait une résistance accrue à l'imidaclopride par rapport à une souche de laboratoire (Oregon-R). Pour comprendre les mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance chez la souche Orléans, des analyses biochimiques et transcriptionnelles ont été réalisées. Ces expériences ont mis en évidence deux mécanismes différents pouvant jouer un rôle dans la résistance à l'imidaclopride de la souche Orléans.

Dans la seconde partie de ma thèse, les résultats contribuent à montrer l'intérêt d'utiliser la drosophile pour modéliser l'impact d'insecticides impliqués dans l'étiologie de maladies neurodégénératives chez l'homme. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un organochloré, la dieldrine, chez la drosophile à des doses semblables à celles retrouvées dans la nature. Au cours de cette étude, de nouvelles méthodes originales ont été utilisées permettant de visualiser la morphologie du cerveau de la drosophile (IRM, Imagerie par Résonance Magnétique) et d'étudier le métabolisme (HRMAS, High Resolution Magic Angle

Spinning) sur des drosophiles vivantes. Des études complémentaires ont également été réalisées sur le comportement des drosophiles et sur l'épigénome. Les résultats obtenus montrent tout l'intérêt de la drosophile pour ce genre d'étude et ouvrent de nombreuses pistes pour mieux comprendre l'effet d'une exposition à un organochloré comme la dieldrine.

CHAPITRE II: Etude de l'effet d'un néonicotinoïde, l'imidaclopride chez la drosophile

I-Introduction

I.1-L'imidaclopride, un néonicotinoïde.

L'imidaclopride est un insecticide neurotoxique qui fait partie de la famille des néonicotinoïdes (Figure 34). Il fut le premier néonicotinoïde commercialisé dans le monde en 1991 par le groupe Bayer CropScience. Le succès de cette classe d'insecticides est dû à une faible persistance de ces insecticides dans l'environnement qui s'accompagne d'une bonne efficacité à des dosages faibles en particulier dans le domaine des enrobages de semences. De plus, ces insecticides présentent une forte sélectivité vis-à-vis des insectes comparés aux mammifères (Tomizawa et Casida, 2003). Les néonicotinoïdes dominent actuellement le marché des insecticides dans le monde (Sparks, 2013). L'imidaclopride est le néonicotinoïde le plus commercialisé (41,5% du marché des néonicotinoïdes) ce qui fait de lui l'insecticide le plus utilisé dans le monde (Jeschke et al., 2011).

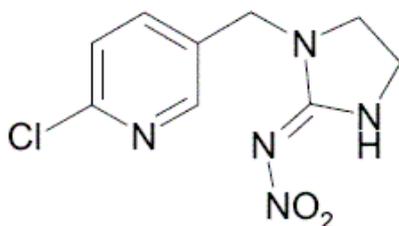


Figure 34: Formule chimique de l'imidaclopride, insecticide appartenant à la famille des néonicotinoïdes.

L'imidaclopride est actuellement utilisé dans le domaine vétérinaire comme traitement anti-puces (Advantage®) et contre les tiques, dans le domaine du jardinage ou en usage

domestique pour l'élimination des termites (Merit®) ou des cafards. Il est également utilisé dans le domaine agricole (plus de 140 cultures) contre les cochenilles, les thrips, les insectes suceurs en arboriculture (Confidor®) et dans les cultures de céréales (Gaucho®). Les insecticides peuvent être utilisés selon trois modes d'application différents: traitement des parties aériennes, traitement du sol ou enrobage de semences (agent systémique). Le succès de l'imidaclopride réside aussi dans le fait qu'il soit commercialisé selon les trois modes d'application connus.

1.2-La cible de l'imidaclopride: le récepteur nicotinique à l'acétylcholine.

L'imidaclopride est un neurotoxique qui agit spécifiquement sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) situés dans le système nerveux des insectes. Ces récepteurs sont composés de cinq sous-unités qui forment un canal permettant le passage sélectif d'ions Na^+ , Ca^{2+} et K^+ . Chaque sous-unité est composée d'un domaine C-terminal extracellulaire, de quatre domaines transmembranaires (TM1-TM4) et d'un domaine N-terminal extracellulaire qui contient 6 régions distinctes (boucle A-F) importantes dans le site de liaison à l'acétylcholine. Chez la drosophile, il existe 10 sous-unités différentes ($\text{D}\alpha 1$ - $\text{D}\alpha 7$, $\text{D}\beta 1$ - $\text{D}\beta 3$). Les gènes qui codent les sous-unités $\text{D}\alpha 3$ et $\text{D}\alpha 7$ sont localisés sur le chromosome I, les gènes qui codent les sous-unités $\text{D}\alpha 5$, $\text{D}\alpha 6$ et $\text{D}\beta 3$ sur le chromosome II et les gènes qui codent les sous-unités $\text{D}\alpha 1$, $\text{D}\alpha 2$, $\text{D}\alpha 4$, $\text{D}\beta 1$ et $\text{D}\beta 2$ sont localisés sur le chromosome III. La composition en sous-unités des récepteurs est en revanche mal connue car l'expression de ces nAChRs dans des systèmes hétérologues conduit à la formation de récepteurs non fonctionnels. Une cause possible de cette incapacité à former des récepteurs fonctionnels serait la nécessité de protéines chaperonnes pour l'assemblage des récepteurs (Thany et al., 2007). Le site de liaison de l'imidaclopride sur le récepteur nAChR a donc été étudié en utilisant l'expression de récepteurs hybrides avec des sous-unités de mammifères. L'expression dans les ovocytes de xénope de récepteurs hybrides drosophile-poulet $\text{D}\alpha 1$ -Gg $\beta 2$ ou $\text{D}\alpha 2$ -Gg $\beta 2$ permet de mettre en évidence l'activation du récepteur $\text{D}\alpha 2$ -Gg $\beta 2$ et l'inactivation du récepteur $\text{D}\alpha 1$ -Gg $\beta 2$ par des analogues de l'imidaclopride (Ihara et al. 2003). Cette expérience montre la contribution de certaines sous-unités α dans la sélectivité du nAChR à l'imidaclopride. De plus, une expérience menée sur ce même récepteur hybride $\text{D}\alpha 2$ -Gg $\beta 2$, montre l'implication de deux régions (la boucle C et la région entre les boucles B et C) dans la sensibilité du récepteur à l'imidaclopride. Une substitution d'une proline par

l'acide glutamique en position 242 (P242E) dans la boucle C induit une forte diminution de l'activation du récepteur. Le remplacement de la région entre la boucle B et C de la sous-unité D α 2 par la région équivalente de Gg α 4 induit également une diminution de l'activation du récepteur (Shimomura et al., 2004). D'autres études ont mis en évidence l'implication de la boucle D des sous-unités β dans la sélectivité des nAChRs à l'imidaclopride (Shimomura et al., 2006; Yao et al., 2008). Ces résultats mettent en évidence l'implication possible de la région contenant la boucle B et C des sous-unités α et de la boucle D des sous-unités β dans la sélectivité des nAChRs à l'imidaclopride.

Aucun nAChR d'insecte n'a été cristallisé permettant d'identifier de manière plus précise les sites possibles de liaison de l'imidaclopride au nAChR. Cependant, un homologue du nAChR, l'acetylcholine binding protein (AChBP) a été cristallisée en complexe avec l'imidaclopride chez les mollusques *Aplysia californica* (Talley et al., 2008) et *Lymnea stagnalis* (Ihara et al., 2008). *Aplysia* AChBP a une affinité plus importante pour les néonicotinoïdes que les nicotinoïdes alors que c'est l'inverse pour *Lymnea* AChBP. Ces données définissent préférentiellement *Aplysia* AChBP comme modèle pour les nAChRs d'insectes et *Lymnea* AChBP pour les nAChRs de vertébrés (Tomizawa et Casida, 2009). Celles-ci permettent également de définir les résidus probablement impliqués dans le site de liaison de l'imidaclopride aux nAChRs d'insectes (Figure 35).

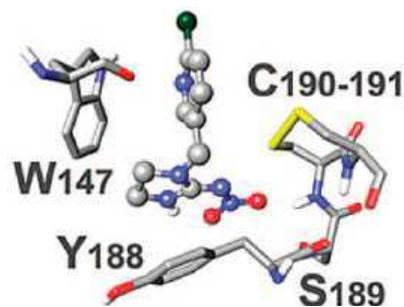


Figure 35: Site de liaison de l'imidaclopride sur l'AChBP (acetylcholine binding protein). Interaction entre l'imidaclopride, le résidu de la boucle B (W147) et les résidus de la boucle C (Y188, S189, C190, C191). (d'après Tomizawa et Casida 2009).

1.3-L'effet de l'imidaclopride chez la drosophile.

L'utilisation des insecticides comme des produits phytosanitaires en général est de plus en plus surveillée. En effet, l'utilisation grandissante de ces produits a provoqué une contamination des sols, des lacs, des rivières... L'impact de ces produits sur l'environnement

n'est pas négligeable et la compréhension et la caractérisation de cet impact reste une question très importante. L'imidaclopride est un insecticide dont l'utilisation est très répandue à l'heure actuelle. Il est donc important de caractériser les effets létaux et sublétaux induits par cet insecticide. Cependant, la relation entre les effets induits par une exposition à l'imidaclopride et les mécanismes impliqués reste difficile à définir. La drosophile a donc été utilisée comme modèle car elle offre de nombreux avantages. Plusieurs outils génétiques sont disponibles, son cycle de vie est relativement court et son génome a été séquencé (Adams et al., 2000). Ces outils nous ont donc permis d'étudier l'impact de l'imidaclopride chez un insecte modèle, la drosophile.

II-Caractérisation des effets létaux et sublétaux après exposition à l'imidaclopride chez la drosophile

II.1-Introduction à l'article I.

Dans la nature, les insectes comme les drosophiles sont confrontés à une exposition aux insecticides. Ces insecticides peuvent avoir des effets indésirables plus ou moins importants en fonction de leur concentration dans l'environnement et du mode de dissémination. Au cours de cette étude, nous avons pu déterminer les effets d'une exposition à l'imidaclopride chez une souche de drosophile nommée Orléans capturée dans la nature en 2000. Deux modes d'intoxication ont été utilisés: en intoxication chronique à des doses faibles (situation souvent rencontrée dans la nature) et une intoxication aiguë à des doses fortes (ce qui peut modéliser une exposition en plein champ juste après l'épandage d'un insecticide). L'exposition à l'imidaclopride à des doses sublétales en intoxication chronique induit des effets sur l'accouplement et la fécondité des drosophiles. Même à doses très faibles, l'imidaclopride peut donc avoir un effet néfaste sur les organismes, qui dans la nature n'est sans doute pas restreint à la drosophile. En effet, l'impact d'insecticides à des doses sublétales a également été mis en évidence chez d'autres espèces comme le bourdon (Whitehorn et al., 2012), ou chez deux prédateurs d'un ravageur des cultures de tomates qui présentent également une baisse de la fécondité (Arno et Gabarra, 2011). Ces résultats sont présentés dans l'article I qui sera publié dans le journal «*Environmental Science & Technology*».

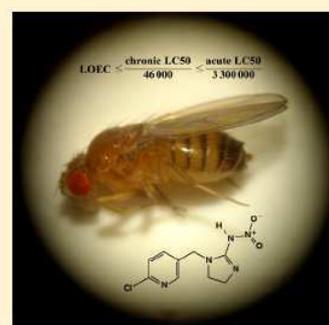
1 Lethal and Sublethal Effects of Imidacloprid, After Chronic Exposure, 2 On the Insect Model *Drosophila melanogaster*

3 Gaël Charpentier,[†] Fanny Louat,[†] Jean-Marc Bonmatin,^{*,†} Patrice A. Marchand,[†] Fanny Vanier,[†]
4 Daniel Locker,^{†,‡} and Martine Decoville^{†,‡}

5 [†]Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 45071 Orléans, France

6 [‡]Université d'Orléans, 45100 Orléans, France

7 **ABSTRACT:** Neonicotinoids are subjected to vigilance because of environmental
8 contaminations and deleterious effects on bees. Imidacloprid (IMI) is one of the most
9 representative insecticides of this family. At chronic exposure, concentration-effect
10 relationships are non linear. An insect model should allow a better description of this
11 toxicity. We compared the lethal concentration 50% (LC50) of IMI for a *Drosophila*-field
12 strain, after acute and chronic exposure. Relative to the acute LC50, the chronic LC50 was
13 lowered by a factor of 29 for males (1.3 mM/45 μ M), 52 for larvae (157 μ M/3 μ M) and
14 more than 172 for females (>3.1 mM/18 μ M). Chronic exposure also revealed significant
15 lethal and sublethal effects, at concentrations 3–5 orders of magnitude lower than the
16 chronic LC50. Mean mortalities reached 28% (at 3.91 nM) and 27% (at 39.1 nM) for
17 females and males, respectively. Fecundity decreased of 16% at 1.96 nM. Mating increased
18 of 30% at 0.391 nM. The LOEC (lowest observed effect concentration: 0.391 nM) was
19 46000 times lower than the chronic LC50 for males; it was 115 000 times lower than the
20 chronic LC50 for females. This study illuminates effects that neonicotinoids can induce at very low concentrations. This is of
21 particular interest for nontarget insects and for insect dependent species.



22 ■ INTRODUCTION

23 Most of chemical pesticides are herbicides, fungicides, or
24 insecticides. There is increasing interest to reduce their impacts
25 on the environment, especially on nontarget species. Since the
26 mid 90s, the class of neonicotinoids has become the most
27 widely used and fastest growing family of insecticides
28 worldwide.^{1–4} This neonicotinoid family includes imidacloprid,
29 thiamethoxam, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, dinotefur-
30 an, and imidaclothiz.⁵ Neonicotinoid insecticides interact with
31 the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) of the central
32 nervous system. They target and bind to postsynaptic nAChRs
33 of insects and to their body cell nAChRs.^{4,6} They induce a
34 neuronal hyper-excitation and accumulation of acetylcholine,
35 leading to the insect's death within minutes.¹ Generally, lethal
36 doses induce to tetanic contractions, with intense trembling
37 (legs), body convulsions and paralysis. This is accompanied by
38 nerve and muscle destruction.⁷ They are significantly more
39 selective toward insects than toward vertebrates.^{8,9} As a general
40 fact, flying insects were found to be the most vulnerable species
41 to neonicotinoid pesticides.

42 Imidacloprid (IMI), [1-(6-chloronicotiny)-2-nitroimino-imidazolidine], is one of the most representative chemical of the
43 neonicotinoid insecticide family.³ IMI has a very high activity
44 against insects and lethal doses 50% (LD50) or lethal
45 concentrations 50% (LC50) are very low, by topical and oral
46 exposures. The chemical structure of IMI ensures its diffusion
47 within treated plants, by xylemic and phloemic transport.¹⁰ This
48 systemic property gives IMI the advantage as a soil treatment
49

50 and for treatment of seeds, with doses ranging from 50 to 100
51 g/ha, to protect the whole field.

52 The sublethal effects of IMI have already been studied in
53 nontarget insects;¹¹ mainly those of economic importance such
54 as honey bees.^{12–16} However, relationships between effects and
55 mechanisms of action are complex and difficult to establish. In
56 order to better understand the effects of IMI, we used the
57 *Drosophila* model for which all parameters can be managed with
58 confidence. The advantages of *Drosophila* include a short life
59 cycle as well as the efficiency and extensivity of tools about its
60 genetics and genomics. *Drosophila* has already been used to
61 investigate the genotoxic effects of pesticides such as IMI and
62 acetochlor.¹⁷

63 Our main goal was to identify and to differentiate
64 concentration ranges where sublethal and lethal effects occur.
65 The LC50 was first determined from acute exposure for larvae
66 and adults (females and males) of a fruit fly strain fully
67 managed in our laboratory. Chronic exposure over 8 days
68 defined chronic LC50 for females and males. By investigating
69 lower concentrations, additional effects on the survival, mating,
70 and fecundity were characterized.

Received: December 5, 2013

Revised: February 23, 2014

Accepted: March 3, 2014

71 ■ EXPERIMENTAL SECTION

72 All experiments were conducted at $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Test
73 experiments (all tested concentrations of IMI) and controls
74 were done in parallel (synchronicity). All experiments were
75 performed over a 1.5 month period (March–April). All
76 experiments were repeated at least six times. The number of
77 flies tested for each data point is defined as N.

78 **Strain and Medium.** A wild type stock of flies, named
79 Orleans, derived from specimens caught in fields near Orléans
80 (France) in 2000 and maintained in the laboratory by
81 inbreeding, was used in this study. The stock of flies was
82 maintained in our laboratory by mass culture at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ on a
83 standard medium. The composition for 4 L of standard
84 medium was as follows: 362 g of cornmeal, 200 g of dry yeast
85 (inactive and not hydrolyzed), 60 g of agar and 150 mL of a
86 10% solution of methyl-4-hydroxybenzoate (CAS number: 99–
87 76–3) in ethanol. All experiments were done with the same
88 batch of cornmeal and yeast (Dominique Dutcher, Brumath,
89 France).

90 **Solvents, Reagents, and Chemicals.** All solvents
91 (acetone CAS number: 67–64–1, acetonitrile CAS number:
92 75–05–8, dimethyl sulfoxide CAS number: 67–68–5,
93 methanol CAS number: 67–56–1, ethanol CAS number
94 CAS number: 64–17–5, and water CAS number: 7732–18–
95 5) were purchased from VWR (Fontenay-Sous-Bois, France)
96 and are at least HPLC grade (ACS grade for DMSO). IMI
97 (MW: 255.66 g/mol, Purity 99.5%) was obtained from CIL
98 Cluzeau (Sainte-Foy-la-Grande, France). The starting solution
99 (100 g/L) of IMI was prepared in DMSO as this solvent is a
100 component of the commercial formulation¹⁸ and because
101 solubility of IMI in water is relatively low.¹⁹ Other IMI
102 solutions were obtained by dilution in distilled water. Test
103 solutions of IMI were obtained by diluting this starting solution
104 in water. DMSO was always present in test solutions and
105 controls, at the same concentration, always lower than 1% (v/
106 v). Other reagents, such as salt compounds (KH_2PO_4), were
107 analytical grade and obtained from Aldrich (Saint-Quentin
108 Fallavier, France).

109 **Acute Toxicity.** Males and females of three to four days old,
110 in groups of about 20 flies, were transferred to vials without
111 food for 6 h, and then to vials containing a blotting paper
112 moistened with a 5% sucrose (CAS number: 57–50–1)
113 solution with the tested concentration of IMI. Flies were left in
114 these conditions for 18 h. The control groups were fed with 5%
115 sucrose or 5% sucrose containing the same concentration of
116 DMSO. For instance, DMSO was 1% (v/v) for IMI = 3.91
117 mM; DMSO was 10^{-3} % (v/v) for IMI = 3.91 μM and DMSO
118 was 10^{-6} % (v/v) for IMI = 3.91 nM. After 18 h, all flies were
119 transferred into vials containing a standard medium. After 8
120 days, the flies still alive were counted. Series of ten
121 concentrations, ranging from 7.8 μM to 3.1 mM, were used
122 for adults. Because we limited the DMSO content at less than
123 1% (v/v), tests at higher concentrations were precluded.

124 To obtain the third-instar larvae, eggs were collected during a
125 3 h period and kept at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Four days later, groups of 20
126 larvae were transferred into individual Petri dishes containing
127 agar 2% and some yeast paste prepared with a solution of IMI
128 at the tested concentration. The larvae were transferred 18 h
129 later into vials containing the standard medium. Larvae were
130 kept on this medium and the surviving adults were counted.
131 Control experiments were done with the same protocol but the
132 yeast paste was prepared without IMI and with a solution

where DMSO was at the same concentration as in the test
133 solutions. Seven concentrations, ranging from 11.7 μM to 0.5
134 mM, were used for larvae.

Chronic Toxicity. Males and females were tested separately.
136 Groups of 20 flies, 3-to-4 days old, were transferred into vials
137 containing a fresh drosophila Instant Medium (DIM; Carolina
138 Biological Supply, Burlington NC) prepared with distilled water
139 containing the test IMI concentration (1.5 g rehydrated with
140 4.5 mL of test solution). Flies were kept in these vials
141 continually. Flies, still alive 8 days later, were scored.
142

For larvae, the eggs were collected during a 3 h period.
143 Immediately after hatching, larvae were transferred into vials
144 containing fresh DIM rehydrated with the test solutions. Larvae
145 were maintained on this medium, and the adults which
146 emerged were counted. Control experiments for adults and
147 larvae were done by using solutions at the same concentration
148 of DMSO as the test solutions.
149

Mating Tests. Sets of five virgin males and sets of five virgin
150 females (all flies <6 h old) were randomly recovered from the
151 stock in presence of IMI. They were placed into vials
152 containing the fresh DIM with IMI. After 5 days, five females
153 and five males were transferred without anesthesia into empty
154 vials. These vials were observed for 20 min to determine how
155 many females, in each vial, had mated. Note that this is the total
156 duration of mating for drosophila. Because males and females
157 used in this test were exposed to IMI during their rearing, we
158 chose concentrations which allowed their larval development,
159 far below the chronic LC50. Control experiments, using DMSO
160 at the same concentration, were run in parallel. For consistency,
161 N represents the number of females for mating tests.
162

Fecundity Tests. virgin males and virgin females (<6 h old)
163 were randomly selected from the stock in presence of IMI and
164 transferred in vials containing the fresh DIM with IMI. Males
165 were raised individually and females were raised in groups of
166 five flies per vial. After 5 days, one female and one male were
167 transferred into a vial containing the standard medium. The
168 vials were observed until the pair copulated, after which the
169 male was removed. Each female could lay eggs for 24 h in this
170 vial. Then the female was transferred into a new vial for 24 h
171 where it could lay further eggs. This transfer was repeated five
172 times. At the end, the female was transferred into a new vial
173 where it could lay eggs until day 15. Adult emergence was
174 scored for all vials. We only used data from females that
175 produced offspring. We checked that the number of females
176 producing offspring were as numerous in test as in controls. As
177 for the mating tests, we chose low concentrations. Control
178 experiments, using DMSO at the same concentration, were run
179 in parallel.
180

Analytical Measurements. Adult flies (4-to-5 days old)
181 were starved for 6 h and were placed in a vial containing
182 blotting paper moistened with the IMI test solutions.
183 Immediately after the knockout effect, flies were frozen at
184 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ by batches of 20. Batches of flies (directly taken from
185 the freezer) were ground in a glass test tube containing 1 mL
186 acetonitrile with a Turrax 5G (IKA) for 2 min (twice). After
187 evaporation of the solvents, the residue was transferred with
188 acetone in order to proceed to a further purification step by
189 SPE on Bond Elut 500 mg/3 mL, purchased from Varian Inc.
190 and conditioned with acetone (2 mL). The first five fractions
191 were collected ($5 \times 5\text{ mL}$), evaporated and solubilized in 200
192 μL methanol. 50 μL of this solution was then injected in a
193 HPLC column through a rheodyne type valve. HPLC/UV
194 analyses were performed, according to Obana et al.,²⁰ with a
195

196 Merck apparatus (L-6200A Intelligent Pump; L-4000 UV
197 detector; D-2500 Chromato Integrator) coupled with a C18
198 HPLC column, 3 μm diameter (250×4.6 mm i.d.) purchased
199 from VWR. IMI was detected at 270 nm with a retention time
200 of 18.4 min. The calibration curve was calculated from 5 points
201 (1, 10, 100, 400, and 800 mg/L), with $R^2 = 0.9988$.

202 **Statistical Analyses.** Data were statistically analyzed with
203 the R software from R Core team (2013), R Foundation for
204 statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org/>). A general linear model (GLM) was used with a logistic
205 link function (logit). The model has investigated main effects of
206 (i) the IMI concentration, (ii) the sex of flies, and (iii)
207 concentration–sex interactions, for survival data after chronic
208 exposure. The model has investigated only the effect of IMI
209 concentration for mating data. Additionally, comparison tests of
210 independent proportions were used to identify significant
211 differences between each experimental and control groups. For
212 fecundity data, Mann–Whitney tests were used for compar-
213 isons. All these comparison tests were considered bilaterally,
214 that is, considering the possibility of positive or negative effects,
215 The statistical significance for all comparisons was set at $p <$
216 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), and at $p < 0.001$ (***)

217 We also used Stat Graphics XV (15.2.14) from SIGMA
218 PLUS (Levallois-Perret, France) to estimate the LC50 values
219 and their 95% confidence interval (CI95). This was done by
220 using the probit method developed by Finney.²¹

222 ■ RESULTS

223 **Acute Exposure. Survival.** Insecticidal effects of IMI on
224 larvae and adult drosophila were tested after acute treatment
225 (18 h). In the control experiment (DMSO control), the average
226 survival rate was 95% for adults and 82.5% for larvae. For adult
227 females, a LC50 value was not determined, because only 31% of
228 them died at the highest concentration used (3.1 mM). This
229 indicates the high resistance of the drosophila strain used in this
230 study. In contrast, at the same concentration (3.1 mM), 91% of
231 adult males were killed, allowing us to determine the
232 corresponding LC50 value at 1304 ± 92 μM (Table 1).

Table 1. Lethal Concentrations 50% (LC50 in μM) of Imidacloprid for *Drosophila melanogaster* (Orléans Wild Strain)

mode of exposure	LC ₅₀ (μM) ^a		
	adult males	adult females	larvae
acute	1304 ± 92	$>3100^b$	157 ± 25
chronic	45 ± 5	18 ± 1.5	3.0 ± 0.3

^aLC50 were calculated from sigmoid mortality curves. Mortalities were counted after 8 days following an acute exposure (18 h) or chronic exposure (8 days). The LC50 for adult flies (males and females) and for larvae were obtained with the same experimental conditions. The LC50 and their corresponding 95% confidence intervals (CI95) were determined by probit analysis (see the Experimental Section).

^bEstimated value because of the limited solubility of imidacloprid with respect to the experimental protocol.

233 For larvae, we did not discriminate between males and
234 females. The number and gender of adults emerging were
235 scored. No bias concerning female versus male was observed in
236 the offspring, suggesting that the two sexes were equally killed
237 by IMI at this larval stage. It should be noted that mortality
238 induced by IMI occurred during the larval stages, as no lethality
239 was observed in pupae stages. When compared to LC50 for

adult males (1.3 ± 0.1 mM), the LC50 for larvae is 8 times
240 lower (157 ± 25 μM), suggesting a higher acute toxicity of IMI
241 for larvae.

242 **Analyses of Flies.** To estimate the residual amounts of IMI
243 in insects, we performed measurements after intoxication of
244 adults (of both sexes) at two IMI concentration levels (Table
245 2). Results were normalized with respect to mass ratio between
246 12

Table 2. Amounts of imidacloprid (in ng) per adult drosophila, measured by chemical analysis

feeding concentration (mg/L)	imidacloprid content (ng) per adult drosophila ^{a,b}	
	males	females
800	452 ± 142	475 ± 111
333	184 ± 24	163 ± 36

^aChemical analyses were done following an acute exposure and after the knockout effect. ^bConfidence intervals at 95% (CI95), issued from statistical analysis, are reported.

male and female (1:1.4). We found the same amount of IMI in
247 adult males and females, 452 ± 142 ng/male and 475 ± 111
248 ng/female, respectively, this when feeding was done on
249 solutions at 3.1 mM (800 mg/L). Values were 184 ± 24 ng/
250 male and 163 ± 36 ng/female when feeding was done on
251 solutions at 1.3 mM (333 mg/L). Thus, masses of IMI in males
252 and in females were statistically equivalent and were propor-
253 tional to the exposure levels.

254 **Chronic Exposure. Survival.** We first determined LC50
255 values. The control experiments (with DMSO) always
256 displayed a survival rate over 94% for adults and it was over
257 83% for larvae. For the highest concentrations, results revealed
258 typical sigmoid curves for which mortality increased sharply
259 with concentrations (Figure 1). Table 1 shows LC50 values for
260 adults and larvae. A distinction between sexes was made for
261 adults. For adult males, the LC50 is 45 ± 5 μM instead of $18 \pm$
262 1.5 μM for adult females. These data indicate that females seem
263 slightly more sensitive than males, after chronic exposure to
264 IMI. The chronic LC50 was determined at 3 ± 0.3 μM for
265

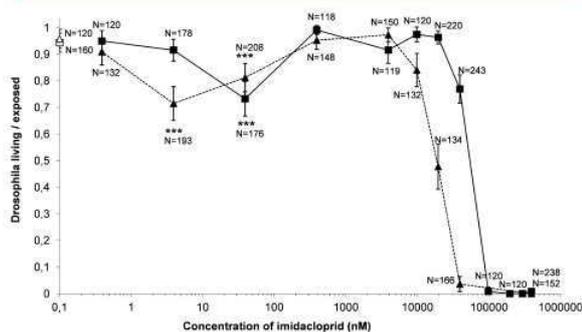


Figure 1. Average ratios of surviving drosophila after chronic exposure. Data are reported for adult flies: males (■) and females (▲). Concentrations of imidacloprid ranged from 0.391 nM to 0.391 mM. Ratios are given from the number of flies still alive, after chronic exposure to imidacloprid (8 days), over the number of flies exposed (see the Experimental Section). N: number of flies. Bars corresponding to 95% confidence intervals (CI95) are reported for each data point. Ratios for controls are indicated on the vertical axis: males (□) and females (△). Significant differences are indicated in the low concentration range only (***) when $p < 0.001$.

266 larvae (Table 1). IMI is then more toxic (from 6 to 15 times)
 267 for larvae than for adults, after chronic exposure.
 268 For adults we observed a particular shape of the survival
 269 curve, this shape seemed to be conserved between males and
 270 females but shifted with respect to the concentration scale
 271 (Figure 1). Statistical analysis (GLM) confirmed that there are
 272 significant effects of (i) the IMI concentration, (ii) the sex of
 273 flies, and (iii) the concentration–sex interactions. The shape
 274 (in form of V), showed a highly significant increase in mortality
 275 for females at 3.91 nM and 39.1 nM, and for males at 39.1 nM
 276 ($p < 0.001$). At these concentrations, the maximum value of
 277 mortality was 28% and 27% for females and males, respectively.
 278 **Mating.** We studied the mating rate (during 20 min) of sets
 279 of five couples after chronic exposure of flies during their whole
 280 life (larvae and adult). This was done between 0.0196 nM and
 281 391 nM of IMI (Figure 2). Data suggested that IMI could

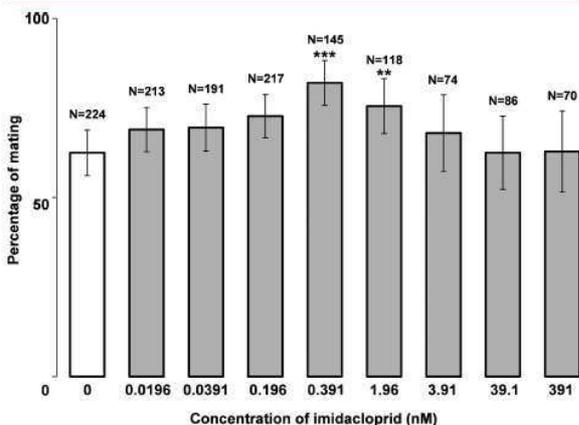


Figure 2. Average percentage of mating, depending on imidacloprid concentration. Mating was counted during a period of 20 min, after chronic exposure to imidacloprid (see the Experimental Section). Concentrations of imidacloprid were between 0.196 nM and 391 nM. For clarity, the horizontal axis has a non linear scale. Result for controls are given on the left (controls: white; tests: gray). N: number of females tested. Bars corresponding to 95% confidence intervals (CI95) are reported for each data point. Significant differences are indicated (*** when $p < 0.001$ and ** when $p < 0.01$).

282 induce an increase of the mating rate at 0.391 nM. At this
 283 concentration, the mean number of females which had mated
 284 within 20 min was 4.1, instead of 3.1 in the control experiment.
 285 However, statistical analysis (GLM) of all data points did not
 286 indicate any effect of IMI within this large concentration range.
 287 But, when comparing each data point with respect to the
 288 control, significant differences (30%) were confirmed at 0.391
 289 nM ($p < 0.001$) and at 1.96 nM ($p < 0.01$).
 290 **Fecundity.** We counted the number of offspring per female
 291 after chronic exposure of flies during their whole life (larvae and
 292 adult). This was done for various concentrations of IMI: from
 293 0.391 nM to 391 nM. A first set of experiments included both
 294 males and females exposed to IMI (Figure 3A). Here we
 295 observed a significant decrease in fecundity at 1.96 nM,
 296 3.91nM, and 39.1 nM ($p < 0.05$) when compared to controls.
 297 At a lower concentration (0.391 nM) or at a higher
 298 concentration (39.1 nM or 391 nM), there was no significant
 299 statistical difference between controls and exposed flies. To
 300 assess the origin of this decrease in fecundity (effects on males
 301 or on females), we also exposed to IMI (3.91 nM) only males,

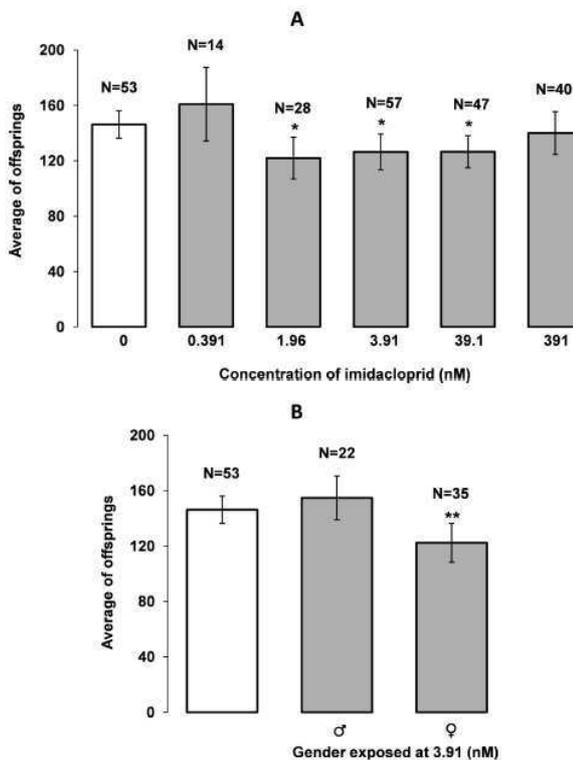


Figure 3. Average number of offsprings per female. Offsprings were counted after chronic exposure to imidacloprid (see the Experimental Section). Concentrations of imidacloprid were between 0.391 nM and 391 nM. N: number of females tested. Bars corresponding to 95% confidence intervals (CI95) are reported for each data point. Significant differences are indicated (* when $p < 0.05$ and ** when $p < 0.01$). In (A), both male and female flies were exposed (controls: white; tests: gray). In (B), only one gender was exposed at a concentration of 3.91 nM (controls: white; tests: gray; ♂: males; ♀: females).

or only females. The result showed that the decrease in
 302 fecundity can be attributed to the exposure of female flies only
 303 ($p < 0.01$), whereas there is no difference with control when
 304 only males were exposed (Figure 3B).
 305

In order to better understand this decrease in fecundity, we
 306 compared the rate of hatching of embryos laid by control
 307 females, to that of exposed females. No significant difference
 308 was observed and about 95% of embryos had hatched into
 309 larvae in both cases. We also checked the possible lethality
 310 during larval or pupal stages. As matter of fact, no significant
 311 lethality was observed during these two developmental stages
 312 (data not shown).
 313

DISCUSSION

Effects of IMI and LC50 (Acute and Chronic). We
 315 observed that the LC50 after chronic exposure was 29 times
 316 lower for adults and 43 times lower for larvae, when compared
 317 to an acute treatment (Table 1). In a previous paper which
 318 studied the genotoxic effects of IMI and of acetochlor in
 319 *Drosophila melanogaster*, the LC50 for IMI was determined after
 320 acute and chronic treatment on a mutant strain kept in
 321 laboratory.¹⁷ When comparing adults, the Orléans strain is
 322 more resistant to IMI than the mutant one. Here, the acute
 323

LC50 (adults) is 10 times higher than the value from Frantziou et al. In contrast, the chronic LC50 for adults of the Orléans strain is slightly lower than the chronic LC50 determined by the same authors (Orléans: 17.6 μM for ♀ and 44.9 μM for ♂ versus 60 μM for the mutant strain). Note that Frantziou et al. did not distinguish between males and females. Concerning larvae, the Orléans strain also appears more resistant after acute treatment (LC50 157 \pm 25 μM versus 75.5 μM), but less resistant after chronic treatment (LC50 3 μM versus 26.7 μM). The discrepancies observed between the two studies are probably explained by differences in the genetic background of each strain of flies. However, the Orléans strain appeared more resistant to mortality than the Oregon-R strain (data not shown) and as resistant as the Hikone-R strain, the latter one known to be resistant to DDT and IMI.²² It cannot be excluded that the Orléans strain could be issued from wild type flies selected for resistance from 1994 (introduction of IMI on the local market) to 2000.

Note that our study was performed in spring. It would be interesting to compare results obtained in various seasons and for various *Drosophila* strains.

The analysis of the survival curves after chronic exposure revealed that, above 3.91 μM , mortality was directly related to the logarithm of concentrations (Figure 1). In this case, data have typical representations with sigmoid shapes and LC50 values were determined as mentioned above. However, it can be observed that more than one-fourth of flies died at 3.91 nM (females) and 39.1 nM (males). Three hypotheses can be mentioned related to these results. First, the processes of detoxification of IMI (for instance by cytochrome P450) would not be initiated so efficiently (concentration threshold) so a much larger fraction of the consumed IMI could reach the nAChRs. Second, IMI could bind to different receptors with different affinities (low and high affinity). Third, it cannot be excluded that a synergistic effect between DMSO and IMI could have occurred, but is unlikely because such a synergy (i) has little chance to only occur for very low amount of DMSO and (ii) has little chance to differ between males and females. However, data are still lacking to validate these hypotheses.

Differences of LC50 Depending on Fly Sex. In our experiments, females appeared more resistant than males after acute treatment. We tested the hypothesis that females could take less IMI than males. For this, we have determined the mass of IMI in the body of females and males. Therefore, we showed that the two sexes contained the same mass of IMI per insect (Table 2). Thus, we can make the reasonable assumption that both sexes have taken about the same quantity of IMI, although differences (amount, frequency) in food intake between the two sexes cannot be excluded. It is interesting to note that, when exposure was chronic, females are less resistant than males. Such a difference between sexes was also observed for various xenobiotics, as for example, caffeine,²³ cycloheximide,²⁴ endosulfan, and malathion²⁵ or cypermethrin and fenvalerate.²⁶

Differences of LC50 between Larvae and Adults. In larvae the LC50 was about 10-fold lower than the corresponding ones for adults, for both modes of intoxication, demonstrating a higher sensitivity of larvae to IMI (Table 1). An explanation is that larvae are in continuous contact with IMI during the experiment. Therefore, IMI could also diffuse through the integument and the digestive tract, leading to both topical and oral exposure. In contrast, IMI enters mainly through the digestive tract of adults. According to this hypothesis, a higher amount of IMI should be found in the

larval body than in the adult body. Analyses were done, and we quantified IMI after acute exposure of larvae. The results suggested that the amounts of IMI were similar in larvae and adults. However, if results are normalized according to the body weight, for an identical feeding concentration, larvae were submitted to higher doses of IMI than the adults. Such a difference of exposure could account for the difference of LC50 between larvae and adults.

Sublethal Effects. Chronic exposure at very low concentrations of IMI showed significant effects on mating, with a maximum of +30% at 0.391 nM (Figure 2). It has been shown that the *Drosophila* courtship is a behavior affected by experience during the first days of adult life. Moreover, nAChRs are exclusively neuronal in *Drosophila*.^{27,28} Therefore, we can expect that exposure to very low doses, which affects neuronal plasticity during the early life, can result in alteration of the mating behavior. A similar effect has already been observed in *Drosophila* after exposure to lead.²⁹

Significant effects were also revealed when studying the fecundity after chronic treatment of both genders with IMI (Figure 3A). This decrease of fecundity (maximum 16%) also displayed a shape in form of V and was linked to exposure of females only (Figure 3B). Several hypotheses can be proposed to explain this result. First, chronic exposure to IMI could affect oogenesis, as it is the case for cocaine.³⁰ However, a first inspection of ovaries has not revealed evident anomalies of egg chambers. Second, exposure to IMI could indirectly induce some paralysis of the muscle fibers of the reproductive tract. However, Middleton et al. have demonstrated that the contraction in the *Drosophila* ovary is under octopaminergic neuromodulation.³¹ Third, the continuous presence of IMI in the medium could alter the hormonal status of females and could affect egg production. For instance an increase of ecdysone reduces egg production.³²

Finally, IMI induced sublethal effects and mortalities on this *Drosophila* strain far below the LC50. This was substantiated when the exposure mode for larvae, or adults, was chronic. The lowest observed effect concentration (LOEC) was 0.391 nM and concerned mating. LOEC was 4 orders of magnitude lower than the chronic LC50 for females. It was 5 orders of magnitude lower than the chronic LC50 for males. Such effects of IMI are certainly not restricted to our *Drosophila* strain. For instance, there is also 5 orders of magnitude between the acute LC50 and significant mortalities after chronic exposure of bees over 10 days.³³ Such effects are also consistent with the reduction of colony growth and the drastic reduction of queen production for bumble bees exposed to field-realistic concentrations of IMI.³⁴

Implications and Perspectives. *Drosophila melanogaster* may be a convenient model for toxicity studies of chemicals such as IMI. It is convenient for determining chronic LC50 which is a relevant parameter for realistic exposure of non target species. It also allows time-to-effect studies which have been exemplified by Tennekes and Sanchez-Bayo for neonicotinoids³⁵ in the cases of aquatic invertebrates and other arthropods. These latter studies are of particular importance because IMI can have direct effects on pollinators and birds³⁶ or indirect effects on insectivorous species.^{37,38} In this view, two recent studies focused on adverse effects of neonicotinoids on large ecosystems including pollinators, aquatic species, and mammals.^{39,40} New works for studying other nicotinoids and other systemic insecticides should be performed by using *Drosophila* as a laboratory model.

450 ■ AUTHOR INFORMATION

451 Corresponding Author

452 *Phone: +33 (0)2 38 25 55 87; fax: +33 (0)2 38631517; e-
453 mail: bonmatin@cncs-orleans.fr.

454 Notes

455 The authors declare no competing financial interest.

456 ■ ACKNOWLEDGMENTS

457 We thank the Conseil Général du Loiret (France) for their
458 financial support. We acknowledge Bertin Pharma (Orléans)
459 for their collaboration. We thank Franck Brignolas for his
460 advices in statistics. We thank Patrice Robert for maintenance
461 of drosophila strains. The authors thank the Task Force on
462 Systemic Pesticides for fruitful discussions.

463 ■ REFERENCES

- 464 (1) Tomizawa, M.; Casida, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology:
465 Mechanism of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*,
466 247–268.
- 467 (2) Brown, L. A.; Ihara, M.; Buckingham, S. D.; Matsuda, K.; Sattelle,
468 D. B. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist
469 actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.*
470 **2006**, *99*, 608–615.
- 471 (3) Jeschke, P.; Nauen, R.; Schindler, M.; Elbert, A. Overview of the
472 status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.*
473 **2011**, *59*, 2897–2908.
- 474 (4) Buckingham, S. D.; Lapiéd, B.; Le Corronch, H.; Grolleau, F.;
475 Sattelle, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine
476 receptors. *J. Exp. Biol.* **1997**, *200*, 2685–2692.
- 477 (5) Wood, A. Compendium of Pesticide Common Names. [http://
478 www.alanwood.net/pesticides/](http://www.alanwood.net/pesticides/).
- 479 (6) Matsuda, K.; Shimomura, M.; Ihara, M.; Akamatsu, M.; Sattelle,
480 D. B. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their
481 nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and
482 receptor modeling studies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1442–
483 1452.
- 484 (7) Mehlhom, H.; Menke, N.; Hansen, O. Effect of imidacloprid on
485 adult and larval stages of flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in
486 vitro application: A light- and electron-microscopy study. *Parasitol. Res.*
487 **1999**, *85*, 625–637.
- 488 (8) Matsuda, K.; Buckingham, S. D.; Kleier, D.; Rauh, J. J.; Grauso,
489 M.; Sattelle, D. B. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect
490 nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*,
491 573–580.
- 492 (9) Liu, G. Y.; Ju, X. L.; Cheng, J. Selectivity of Imidacloprid for fruit
493 fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling.
494 *J. Mol. Model.* **2010**, *16*, 993–1002.
- 495 (10) Bromilow, R. H.; Chamberlain, K.; Evans, A. A. Physicochemical
496 aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Sci.* **1990**, *38*,
497 305–314.
- 498 (11) Kunkel, B. A.; Held, D. W.; Potter, D. A. Lethal and sublethal
499 effects of bendiocarb, halofenozide, and imidacloprid on *Harpalus*
500 *pennsylvanicus* (Coleoptera: Carabidae) following different modes of
501 exposure in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* **2001**, *94*, 60–67.
- 502 (12) Medrzycki, P.; Montanari, R.; Bortolotti, L.; Sabtini, A. G.;
503 Maini, S. Effect of imidacloprid administered in sub-lethal concen-
504 trations on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull. Insect.* **2003**,
505 *56*, 59–62.
- 506 (13) Colin, M. E.; Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Gaimon, C.; Brun,
507 S.; Vermandere, J. P. A Method to quantify and analyze the foraging
508 activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by
509 systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 387–
510 395.
- 511 (14) Decourtye, A.; Devillers, J.; Genecque, E.; Le Menach, K.;
512 Budzinski, H.; Cluseau, S.; Pham-Delègue, M. H. Comparative
513 sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances
of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *514*
48, 242–250. 515
- (15) Mommaerts, V.; Reynders, S.; Boulet, J.; Besard, L.; Sterk, G.;
516 Smagghe, G. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against
517 bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicol-
518 ogy* **2010**, *19*, 207–215. 519
- (16) Henry, M.; Béguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J. F.;
520 Aupinel, P.; Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A. A common
521 pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*
522 **2012**, *336*, 348–350. 523
- (17) Frantziou, G.; Paptiki, K.; Sidiropoulou, B.; Lazaridis, G.;
524 Theophilidis, G.; Mavragani-Tsipidou, P. Evaluation of insecticidal and
525 genotoxic effects of imidacloprid and acetochlor in *Drosophila*
526 *melanogaster*. *J. Appl. Entomol.* **2008**, *132*, 583–590. 527
- (18) Costa, C.; Silvani, V.; Melchini, A.; Catania, S.; Heffron, J. J.;
528 Trovato, A.; De Pasquale, R. Genotoxicity of imidacloprid in relation
529 to metabolic activation and composition of the commercial product.
530 *Mutat. Res.* **2009**, *672*, 40–44. 531
- (19) Kong, M. Z.; Shi, X. H.; Cao, Y. C.; Zhou, C. R. Solubility of
532 imidacloprid in different solvents. *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 615–
533 618. 534
- (20) Obana, H.; Okihashi, M.; Akustu, K.; Kitagawa, Y.; Hori, F.
535 Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues
536 in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography
537 with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4464–4467. 538
- (21) Finney, D. J. The adjustment for a natural response rate in
539 probit analysis. *Ann. Appl. Biol.* **1949**, *36*, 187–195. 540
- (22) Daborn, P. J.; Yen, J. L.; Bogwitz, M. R.; Le Goff, G.; Feil, E.;
541 Jeffers, S.; Tijet, N.; Perry, T.; Heckel, D.; Batterham, P.; Feyereisen,
542 R.; Wilson, T. G.; French-Constant, R. H. A single p450 allele
543 associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* **2002**, *297*,
544 2253–2256. 545
- (23) Zimmering, S.; Kofkoff, R.; Osgood, C. Survival of caffeine-fed
546 adult males and females from strains of *Drosophila melanogaster*. *Mutat.*
547 *Res.* **1977**, *43*, 453–456. 548
- (24) Marcos, R.; Lloberas, J.; Creus, A.; Xamena, N.; Cabre, O. Effect
549 of cycloheximide on different stages of *Drosophila melanogaster*.
550 *Toxicol. Lett.* **1982**, *13*, 105–112. 551
- (25) Creus, A.; Xamena, N.; Marcos, R. Sensitivity of different strains
552 of *Drosophila melanogaster* to endosulfan and malathion. *Toxicol. Lett.*
553 **1983**, *16*, 323–330. 554
- (26) Batiste-Alentom, M.; Xamena, N.; Velazquez, A.; Creus, A.;
555 Marcos, R. Studies on the toxicity of cypermethrin and fenvalerate in
556 different strains of *Drosophila melanogaster* Meig. (Insecta, Diptera).
557 *Environ. Res.* **1987**, *43*, 117–125. 558
- (27) Gundelfinger, E. D.; Hess, N. Nicotinic acetylcholine receptors
559 of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta*
560 **1992**, *1137*, 299–308. 561
- (28) Lee, D.; O'Dowd, D. K. Fast excitatory synaptic transmission
562 mediated by nicotinic acetylcholine receptors in *Drosophila neurons*. *J.*
563 *Neurosci.* **1999**, *19*, 5311–5321. 564
- (29) Hirsch, H. V.; Mercer, J.; Sambaziotis, H.; Huber, M.; Stark, D.
565 T.; Torno-Morley, T.; Hollocher, K.; Ghiradella, H.; Ruden, D. M.
566 Behavioral effects of chronic exposure to low levels of lead in
567 *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* **2003**, *24*, 435–442. 568
- (30) Willard, S. S.; Koss, C. M.; Cronmiller, C. Chronic cocaine
569 exposure in *Drosophila*: Life, cell death and oogenesis. *Dev. Biol.* **2006**,
570 *296*, 150–163. 571
- (31) Middleton, C. A.; Nongthomba, U.; Parry, K.; Sweeney, S. T.;
572 Sparrow, J. C.; Elliott, C. J. Neuromuscular organization and aminergic
573 modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol.* **2006**, *4*,
574 17. 575
- (32) Bownes, M.; Scott, A.; Shirras, A. Dietary components modulate
576 yolk protein gene transcription in *Drosophila melanogaster*. *Develop-
577 ment* **1988**, *103*, 119–128. 578
- (33) Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. Discrepancy between
579 acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites
580 in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2482–2486. 581

- 582 (34) Whitehorn, P. R.; O'Connor, S.; Wackers, F. L.; Goulson, D.
583 Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen
584 production. *Science* **2012**, *336*, 351–352.
- 585 (35) Tennekes, H. A.; Sanchez-bayo, F. (2011) Time dependant
586 toxicity of nicotinoids and other toxicants: Implications for a new
587 approach to risk assessment. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **2012**, S4–001.
- 588 (36) Lopez-Antia, A.; Ortiz-Santaliestra, M. E.; Mougeot, F.; Mateo,
589 R. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to
590 seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicol.*
591 **2013**, *1*, 125–138.
- 592 (37) Benton, T. G.; Bryant, D. M.; Cole, L.; Crick, H. Q. P. Linking
593 agricultural practice to insect and bird populations: A historical study
594 over three decades. *J. Appl. Ecol.* **2002**, *39*, 673–687.
- 595 (38) Peach, W. J.; Vincent, K. E.; Fowler, J. A.; Grice, P. V.
596 Reproductive success of house sparrows along an urban gradient.
597 *Anim. Conserv.* **2008**, *11*, 493–503.
- 598 (39) van der Sluijs, J. P.; Simon-Delso, N.; Goulson, D.; Maxim, L.;
599 Bonmatin, J. M.; Belzunces, L. P. (2013) Neonicotinoids, bee
600 disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin.*
601 *Environ. Sustainability* **2013**, *5*, 1–13.
- 602 (40) Mason, R.; Tennekes, H.; Sanchez-Bayo, F.; Jepsen, P. U.
603 Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of
604 global wildlife declines. *J. Environ. Immunol. Toxicol.* **2013**, *1*, 3–12.

II.2-Résultat complémentaire: Effet «knock-down» de l'imidaclopride sur la drosophile.

Lors de l'intoxication aiguë des drosophiles à l'imidaclopride, nous avons constaté un effet «knock-down» comme il avait déjà été décrit pour d'autres insectes. Quelques minutes après une simple prise d'imidaclopride à la dose de $3129\mu\text{M}$, les drosophiles sont prises de tremblements et très rapidement tombent tétanisées. Beaucoup montrent aussi des ailes redressées. Certaines seront capables de récupérer leur mobilité progressivement en quelques jours. Cependant le phénotype ailes redressées persiste même après 8 jours de récupération sur un milieu normal sans imidaclopride. Ce phénotype ailes redressées correspond à une hypercontraction au niveau des muscles du thorax. La persistance de ce phénotype peut signifier que l'hypercontraction a engendré une dégénérescence au niveau des muscles du thorax. Nous avons donc essayé de visualiser les muscles du thorax des drosophiles exposées à l'imidaclopride par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Cette technique est particulièrement adaptée pour visualiser les tissus mous, elle est basée sur le phénomène physique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la résonance magnétique de certains noyaux atomiques (numéro atomique impair comme les noyaux d'hydrogènes) contenus dans un organisme, c'est à dire la réponse de ces noyaux atomiques soumis à un champ magnétique extérieur intense B_0 et à une excitation électromagnétique. Les noyaux se comportent alors comme de petits aimants et vont s'aligner dans la direction du champ B_0 . Pour obtenir un signal, il faut exciter ces noyaux. Ceci permet au système d'être en résonance et un transfert d'énergie entre l'onde radiofréquence et les noyaux est possible: c'est le phénomène d'excitation. Dès l'arrêt de l'onde radiofréquence, les noyaux reviennent à l'équilibre: c'est le phénomène de relaxation qui produit un signal RMN (FID: free induction decay). A partir de ce signal, une transformée de Fourier à 2 dimensions est utilisée pour l'obtention d'images. En IRM, on utilise surtout les protons de l'eau pour faire de l'imagerie car l'organisme en est composé à 80%. La séquence d'impulsions choisie pour notre étude permet d'utiliser les protons de l'eau pour réaliser l'imagerie sur la drosophile. Cependant, la drosophile est un animal de très petite taille et une séquence d'impulsions adaptée à cet organisme a dû être mise au point au laboratoire (Même et al., 2013).

II.2.1. Matériel et méthode:

-III.2.1.1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les drosophiles sont placées dans des capillaires (diamètre interne 1.6mm, diamètre externe 2mm) remplis d'huile fluorocarbonée (C_2ClF_3)_n (huile 10S voltatef, VWR) pour diminuer les artefacts de susceptibilité magnétique (Null et al., 2008). Les expériences sont réalisées à l'aide d'un spectromètre 9,4T (Bruker Biospec). Une séquence de type écho de gradient (FLASH: Fast Low Angle Shot) a été utilisée (TE/TR: 10/230 ms). La résolution des images 2D est de 10.10.80 μ m (taille de matrice= 512 \times 512, champ de vue= 0.53 \times 0.53cm, α =60°, épaisseur de coupe 80 μ m) pour une durée d'acquisition de 2 heures. Les images sont ensuite reconstruites avec le Maximum Intensity Projection (MIP).

-III.2.1.2. Protocole d'exposition à l'imidaclopride.

Des drosophiles femelles ou mâles âgées de 3 à 5 jours sont placées dans un tube vide pendant 6 heures à 22°C. Les drosophiles sont ensuite transférées dans un tube contenant un papier absorbant humecté avec une solution sucrée (5%) contenant l'imidaclopride à 3129 μ M. Dès la première prise d'imidaclopride, les drosophiles sont tétanisées et présentent un phénotype ailes redressées en quelques minutes. Elles sont alors placées dans un tube contenant un milieu standard. Au bout de 8 jours, les drosophiles qui ont récupérées leur mobilité sont imagées.

II.2.2. Résultat: étude de l'effet «knock-down» par IRM.

Les drosophiles qui montraient des ailes redressées après une exposition à l'imidaclopride et qui avaient récupéré leur activité locomotrice ont été imagées. Les images obtenues avec une résolution de 10.10.80µm sont présentées sur la figure 36.

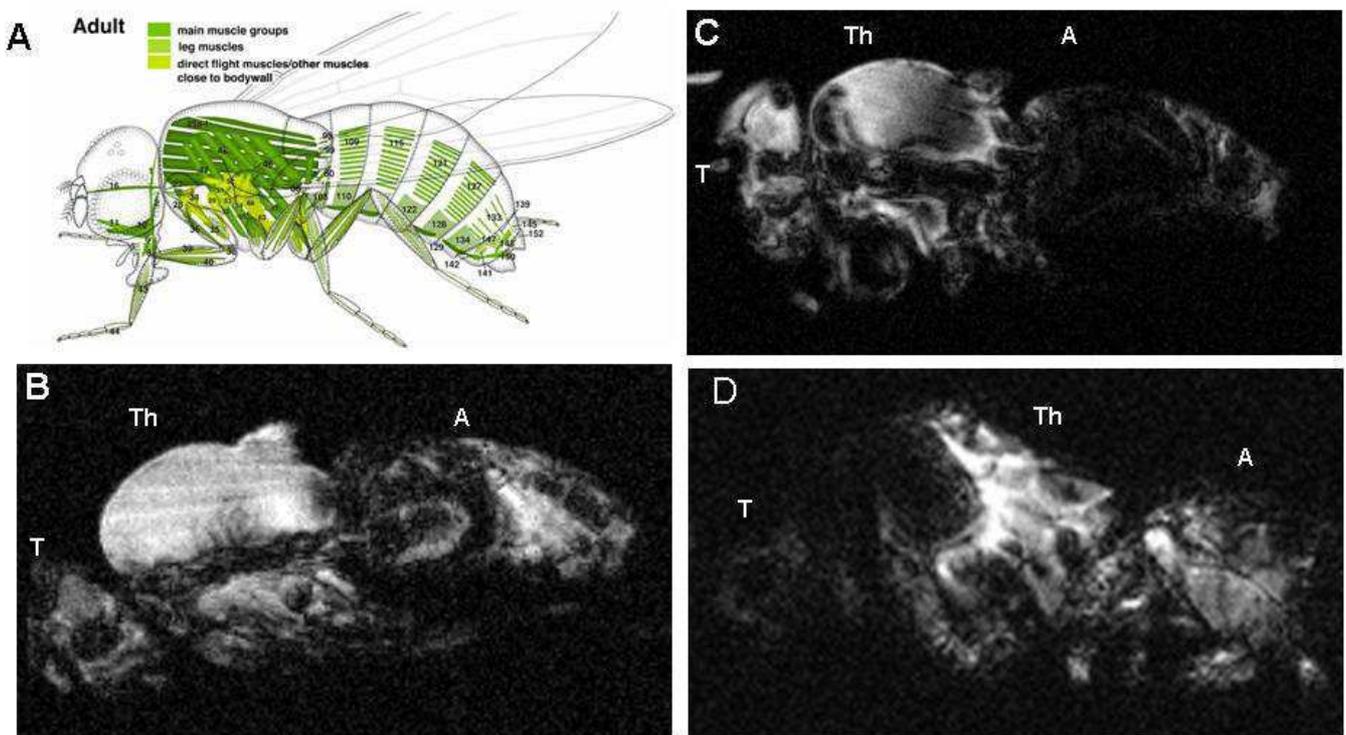


Figure 36: Images IRM des muscles du thorax de drosophiles avec le phénotype ailes redressées après exposition à l'imidaclopride. (A) Schéma des muscles chez l'adulte. (B) Image des muscles du thorax d'une drosophile normale, non exposée à l'imidaclopride. (C,D) Images des muscles du thorax des drosophiles ayant des ailes redressées suite à l'exposition à l'imidaclopride. T: tête, Th: thorax, A: abdomen.

On distingue bien sur l'image obtenue pour une drosophile normale, non exposée, les différents muscles longitudinaux (Figure 36B). Au contraire les images obtenues à partir des drosophiles exposées à l'imidaclopride (3129µM) montrent des altérations importantes des muscles longitudinaux caractéristiques d'une hypercontraction dégénérative. En effet, ces images IRM (Figure 36C et D) sont très semblables à celles obtenues dans l'équipe pour un mutant *up¹⁰¹* (gène *upheld* codant pour la troponine T) connu pour développer de l'hypercontraction dégénérative des muscles du thorax (Même et al., 2013). Ces résultats montrent bien l'effet de l'imidaclopride sur l'intégrité des muscles, et qu'une simple prise d'imidaclopride à forte dose suffit à engendrer une dégénérescence musculaire qui finira par tuer l'insecte.

III-Caractérisation de la résistance de la souche Orléans.

Les résultats décrits dans l'article précédent tendent à montrer que la souche Orléans utilisée dans cette étude présente un comportement particulier vis-à-vis de l'imidaclopride. En effet elle montre une résistance à l'imidaclopride supérieure aux souches de laboratoire utilisées par Frantzios et ses collaborateurs (2008). Nous avons donc voulu déterminer les mécanismes pouvant jouer un rôle dans la résistance à l'imidaclopride chez la souche Orléans.

III.1-La souche Orléans est plus résistante que la souche Oregon R.

Nous avons comparé la sensibilité des souches Orléans et Oregon-R en mode d'intoxication aiguë. La souche Oregon-R est une souche de laboratoire établie depuis les années 1930. Le protocole expérimental utilisé est le même que celui décrit dans l'article précédent. Les résultats sont présentés sur la figure 37. On peut constater que plus de 75% (76,7%) des femelles Oregon-R meurent pour la dose de 3129 μ M d'imidaclopride, alors que seulement 30% des femelles Orléans sont mortes pour la même dose.

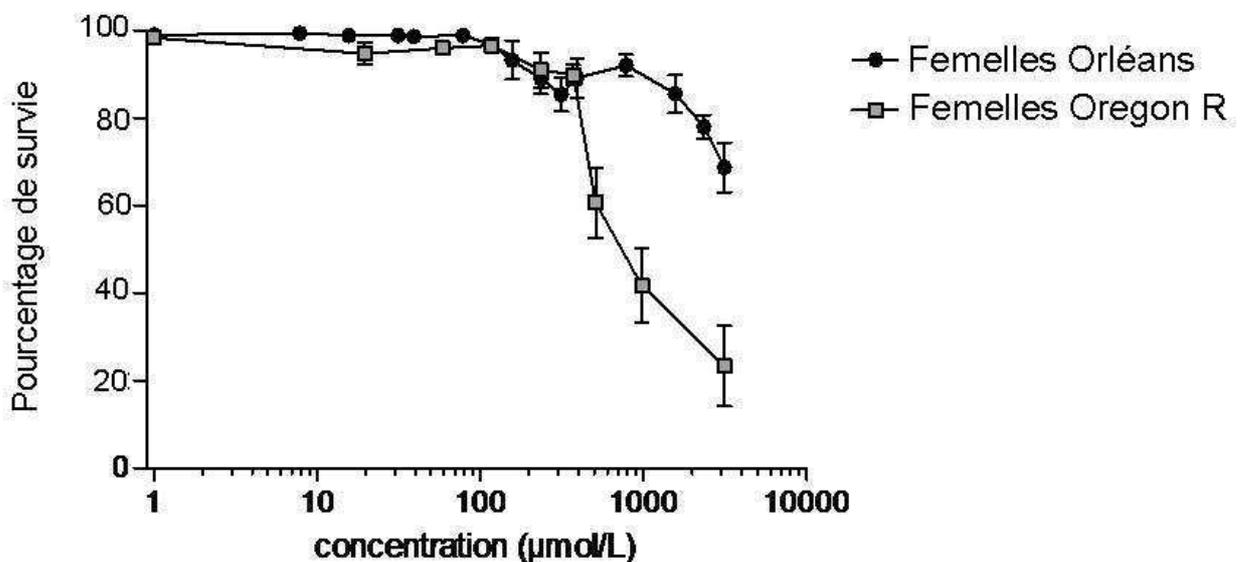


Figure 37: Survie des femelles Orléans et Oregon-R après une intoxication aiguë à l'imidaclopride. Les drosophiles sont assoiffées pendant 6 heures. Elles sont ensuite introduites dans des tubes contenant un papier absorbant imbibé d'une solution d'imidaclopride à différentes concentrations pendant 24 heures. Les drosophiles sont ensuite placées sur un milieu standard pendant 8 jours (22°C) et le nombre de survivantes est noté. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne.

Nous avons ensuite voulu savoir si le phénotype de résistance de la souche Orléans était ou non dominant. Pour cela nous avons étudié la sensibilité à l'imidaclopride de femelles F1 issues des croisements ♀ Oregon-R × ♂ Orléans ou ♀ Orléans × ♂ Oregon-R. Dans les deux cas nous avons constaté que les femelles F1 avaient un phénotype vis-à-vis de l'imidaclopride comparable à celui des femelles Orléans (résultats non présentés). En conclusion, la souche Orléans est donc bien plus résistante que la souche de laboratoire Oregon-R, et la résistance est un caractère dominant.

III.2-Introduction à l'article II.

L'objectif de l'étude était donc de déterminer le mécanisme impliqué dans le phénomène de résistance chez les femelles de la souche Orléans. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la résistance métabolique. Ce type de résistance fait intervenir des enzymes de détoxification. Plusieurs études ont montré l'implication des cytochromes P450 dans la résistance à l'imidaclopride. Par exemple, chez la drosophile, la résistance à l'imidaclopride peut être corrélée à la présence d'un élément transposable *Accord* dans la région 5' du gène codant *Cyp6g1* conduisant à une surexpression de ce gène (Daborn et al., 2001, 2002). Cet élément est absent chez la souche Orléans. En utilisant des inhibiteurs des CYPs ou des GSTs, nous avons mis en évidence l'implication des GSTs dans la résistance à l'imidaclopride chez les femelles de la souche Orléans. Ensuite, l'étude des nAChRs, cibles de l'imidaclopride a mis en évidence l'implication de la sous-unité Dβ1. Cette sous-unité est sous exprimée chez les femelles de la souche Orléans. La résistance à l'imidaclopride chez la souche Orléans est donc un mécanisme faisant intervenir différents acteurs. Ces résultats sont présentés dans l'article II qui sera soumis à publication en 2014 soit dans le journal «*Ecotoxicology*» soit dans le journal «*Insect Biochemistry and Molecular Biology*».

Low expression of nicotinic receptor subunit Dbeta1 and GST-mediated imidacloprid resistance in *Drosophila melanogaster*.

Fanny Louat (1), Julien Robert-Paganin (2), Marie-Claude Lesage-Descauses (3), Jean-Marc Bonmatin (1), Martine Decoville (1).

(1) Centre de biophysique moléculaire, centre national de la recherche scientifique, rue Charles Sadron, Orléans, France. (2) Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, UMR 8015-Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France. (3) INRA, UR0588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France.

Abstract

Neonicotinoids are the most used insecticides, and among them imidacloprid is the most representative. They were extensively used because they were toxic against pests that were resistant to other classes of insecticides. However, resistance to neonicotinoids appeared in various field populations of insects. Resistance is a complex phenomenon, involving metabolic processes and/or modifications of the targets of the insecticide. Understanding the mechanisms involved in resistance is of crucial importance in particular for agriculture.

We have used a new *Drosophila melanogaster* strain, collected in field near Orléans in France in the 2000s. Previous studies have revealed that this strain was more resistant to imidacloprid than the laboratory strain Oregon-R. We have studied the effect of inhibitors of two detoxification classes of enzymes: CYP450s and GSTs and the sequence and expression level of genes encoding α and β nAChRs subunits which are the targets of imidacloprid. Comparison of the expression level of genes encoding D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 nAChRs subunits in the Orléans and Oregon-R strains has revealed a lower expression level in the resistant strain for the D β 1 subunit. However, no mutations have been detected in genes encoding these subunits in the resistant strain. These results suggest that imidacloprid resistance in the Orléans strain may involve reduced expression of its nAChRs targets containing D β 1. In addition studies on synergist effects of PBO (inhibitor of CYP450s) and DEM (inhibitor of GSTs) suggest that GSTs may have an important role in imidacloprid detoxification.

1.Introduction

Neonicotinoids, synthetic analogues of nicotine, are the most used insecticides. They act on post synaptic nAChRs, which are present in the nervous system of insects (Matsuda et al. 2001). They induce opening of the channel, leading to continuous depolarization of post synaptic neurons which results in paralysis and death. Neonicotinoids target selectively insect nAChRs because of their low-binding affinity and activity on vertebrate nAChRs (Tomizawa et al., 2003). The nAChRs are pentameric transmembrane complexes made up of α -subunits and non- α -subunits (β) in insects. The variety of the functional nAChRs emerges from a combination of α subunits or a combination of α and β subunits. The number of subunits is relatively fewer in insects than in mammals, for example 12 genes in *Bombyx mori* (Bm α 1-Bm α 9, Bm β 1-Bm β 3 (Shao et al., 2007), 11 genes in *Apis mellifera* (Am α 1-Am α 9, Am β 1-Am β 2 (Jones et al., 2006), and 10 genes in *Drosophila melanogaster* (Dm α 1-Dm α 7, Dm β 1-Dm β 3 (Sattelle et al., 2005). Moreover, the small number of nAChRs is offset by post-transcriptional modifications such as alternative splicing and RNA editing (Sattelle et al., 2005).

The neonicotinoid family includes thiamethoxam, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, dinotefuran, imidacloprid, and imidacloprid (IMI) (Wood A., 1995-2010) which is the most representative chemical of this family. IMI was used for the first time in the early 1990s and was extensively used because of its high efficiency and long-lasting effect. In addition, neonicotinoids are toxic against pests that have developed resistance to other classes of insecticides (Casida et al., 1998). However resistance to neonicotinoids become to appear in 2005, in particular in field populations of insects, and in some species the resistance was present prior to commercial introduction. Thus, understanding the development of insecticide resistance is a challenge to control agricultural production.

Several studies have related resistance to neonicotinoids, with cytochromes P450, known to metabolize a broad range of compounds. In whitefly (*Bemisia tabaci*), over-expression of a single P450 gene *CYP6CM1* was strongly associated with imidacloprid resistance in B and Q biotypes (Karunker et al., 2008). Moreover, resistance to neonicotinoids is also associated with P450s activity in two Danish resistant strains of the house fly (*Musca domestica*). Indeed, feeding bioassays with piperonyl butoxide, a P450s inhibitor, suppress significantly imidacloprid resistance in these strains. Markussen and Kristensen (2010a) have also shown that resistance is associated with over-expression of three P450s genes. For example, in *D. melanogaster*, the presence of a retrotransposon *Accord* inserted in the 5' end of *Cyp6g1* which induces its over-expression has been linked to DDT and imidacloprid resistance (Daborn et al., 2001; Daborn et al. 2002). Mutations in α -subunits of nAChRs have also been related to IMI resistance. For example, a Y151S mutation on two nAChRs subunits (N1 α 1 and N1 α 3) is highly correlated with insensitivity against imidacloprid in a laboratory selected field strain of the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2009). Moreover, a single point mutation leading to R81T substitution in the nAChR β 1 subunit confers resistance to neonicotinoids in *Myzus persicae* (Bass et al., 2011). The same mechanism is found in *Drosophila melanogaster*, where mutations in D α 1 or D β 2 confer resistance to neonicotinoids probably by interfering with subunit assembly (Perry et al., 2008). In addition, resistance to IMI was also correlated with an alteration in gene profiling expression. For example, in *Musca domestica*, the expression of the nicotinic acetylcholine receptor M α 2 of two resistant strains is significantly lower than in the susceptible strain (Markussen and Kristensen, 2010b).

A recent study, performed in the author's laboratory, on a new *Drosophila melanogaster* strain collected in field in 2000 near Orléans in France, indicated that this new strain was less susceptible to IMI than the old laboratory strain Oregon-R. In order to understand the

mechanisms involved in the IMI resistance in the Orléans strain, involvement of detoxification enzymes and of nAChRs subunits was undertaken. Effect of diethyl maleate (DEM) or piperonyl butoxide (PBO), inhibitors of GSTs or P450s respectively, was studied after acute exposition to IMI. The sequence and the expression level of genes encoding α and β nAChRs subunits were also determined. Our results suggest a correlation between the expression level of the nAChR subunits and the sensitivity to IMI. In addition, it appears that GSTs, if not directly involved in IMI resistance, may have an important role in detoxification.

2. Materials and methods

D. melanogaster strains and medium.

Oregon-R was obtained from the Bloomington Stock Center (Indiana University Bloomington, IN). Orléans strain derived from a capture made in fields near Orléans (France) in 2000 and maintained in the laboratory by inbreeding. The fly stocks were maintained in our laboratory by mass culture at 22°C on a standard medium (for 4 liters: 362g of cornmeal, 200g of dry yeast, 60g of agar and 150mL of a 10% solution of methyl-4-hydroxybenzoate in alcohol).

Chemicals.

All solvents (dimethyl sulfoxide, ethanol) were purchased from VWR and are at least HPLC grade (ACS grade for DMSO). Imidacloprid or IMI (MW: 255.66g/mol, Purity 99.5%) was obtained from CIL Cluzeau (France). Diethyl maleate (DEM) (purity 97%) and piperonylbutoxide (PBO) (purity 97,5%) were obtained from Sigma (St Louis, MO). The

starting solution (391mM) of IMI was set in DMSO while DEM and PBO were dissolved in ethanol.

Acute toxicity and synergist tests.

Females of three to four days old, by groups of 20, were transferred to vials without food for 6 hours at 22°C, and then to vials containing a blotting paper moistened with a 5% sugar solution with the desired concentration of IMI. The control groups were fed with 5% sugar solution containing DMSO (2,5%) and ethanol (1,1%). For inhibitor of P450s, the test group was fed with 5% sugar solution with IMI only at 3129µM, PBO only at 1mM or a combination of imidacloprid (3129µM) and PBO (1mM). For inhibitor of GSTs, the tests groups were fed with 5% sugar solution with IMI only at the desired concentration or a combination of IMI at the desired concentration and DEM at 10mM. After exposure during 24 hours, the flies were transferred into vials containing a standard medium. After 8 days at 22°C, the flies still alive were counted. For the controls (DMSO and ethanol), we used n=59 flies for Orléans strain and n=80 for Oregon-R strain. For tests groups with imidacloprid (3129µM) only, we used n=115 flies for Orléans strain and n=154 for Oregon-R strain. For tests groups with PBO (1mM) only, we used n=36 flies for Orléans strain and n=60 for Oregon-R strain. For tests groups with imidacloprid (3129µM) and PBO (1mM), we used n=80 flies for Orléans strain and n=100 for Oregon-R strain. Then, for synergist tests with GST inhibitors, groups with imidacloprid only were done for Orléans strain at 117µM with n=330 flies; 234µM with n=333; 391µM with n=312; 782µM with n=113; 3129µM with n=115 and for Oregon R strain at 117µM with n=177 flies; 234µM with n=198; 508µM with n=159; 977µM with n=156; 3129µM with n=154. Synergist tests with DEM 10mM and imidacloprid were done for Orléans strain at 117µM with n=99 flies; 234µM with n=100; 391µM with n=120; 782µM with n=100; 3129µM with n=100 and for Oregon-R strain at

117 μ M with n=100 flies; 234 μ M with n=100; 391 μ M with n=89, 782 μ M with n=100; 3129 μ M with n=100.

Glutathione S-transferases assays

These assays were performed on flies non exposed or flies exposed to IMI (782 μ M) after 24h of acute toxicity. Fifty adult females were frozen in liquid nitrogen and homogenized in 500 μ L of assay buffer (component C of the Sensolyte® GST Activity Assay Kit *Fluorimetric*, Anaspec, Inc). Homogenates were incubated for 10 min at 4°C and then centrifuged for 15 min at 10000 g at 4°C. The supernatants were used for enzyme analysis. Protein concentrations were determined using the Bradford method. BSA was used as a standard. GST activity was measured by using the Sensolyte® GST Activity Assay Kit *Fluorimetric* (Anaspec, Inc). To determine glutathione-S-transferase activity, the reaction was performed in microtiter plates, in 100 μ L total volume with 0,2mg of proteins, 25 μ L of reduced glutathione and 25 μ L of GST substrate. The measurement was performed at a wavelength of 495nm. A fluorescent plate reader (victor3V, Perkin Elmer) was used to monitor the activity at 25°C during 30 min with measurements taken every 1min. Inhibitor of GSTs was DEM. DEM was added to enzyme homogenate (final concentration 1mM) and allowed to incubate at 37°C during 10 min before the addition of GST substrate solution. Two independent experiments were performed.

DNA extraction and PCR experiment.

Genomic DNA was isolated from adult flies of each strain using a modification of the single fly DNA extraction protocol (Jowett, 1986). Instead of one fly, 10 flies were used for each DNA extraction and the volumes of buffers used were modified accordingly. To analyze the presence of *Accord* element upstream of the *Cyp6g1* gene, DNA was amplified via PCR using

primers described in Kuruganti et al. (2007). PCR was performed by using Master Mix. Thirty PCR cycles were run using the following cycling parameter: 94°C for 30s, 50°C for 45s, 72°C for 1 min. The amplified DNA was electrophoresed on 1,5% agarose gel for size determination.

Total RNA extraction and cDNA synthetis.

Thirty females were crushed in liquid nitrogen with a mortar and pestle (RNase free). Total RNA was extracted using the SV total RNA isolation kit (Promega). Two total RNA extract were performed. Crushed drosophilae were homogenized in 1,5mL RNase-free Eppendorf tubes containing 175µL of RNA lysis buffer. Samples were mixed by reversal and 350 µL of RNA dilution buffer was added. Then, samples were incubated for 3 min at 70°C and centrifuged for 10 min at 12,000 ×g at room temperature. The supernatant was transferred to a fresh tube and 200µL of 95% ethanol was added. After having mixed by pipetting, the mixture was transferred to a Spin column Assembly and purification of RNA was performed according to the manufacturer's protocol. Samples were then stored at -80°C before further processing. Gel electrophoresis and spectrophotometry (OD absorption at 260nm with NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer) were performed to assess the integrity and the concentration of each RNA sample. First-Strand cDNA was synthesized by using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR kit (Invitrogen) in 20µL total volume using 1µg of total RNA, following the manufacturer's protocol. cDNA was stored at -20°C until used.

Primers design

The specific forward and reverse primers (table 1) for target genes and for reference gene were designed using QuantPrime software (S. Arvidsson et al., 2008).

Quantitative real-time PCR.

qPCR assays were set up using epMotion® 5070 automated pipetting system (Eppendorf). Amplification reaction was performed in 12µL total volume with 2µL of first-strand cDNA, obtained from 2µg of total RNA (diluted 1:2 for target genes and 1:8 for reference gene), 200nM of each primer and 6µL of Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen). Each sample was performed in technical triplicate using a Mastercycler® Realplex (Eppendorf) in 96-well optical plates (twin.tec real-time PCR plates semi-skirted, Eppendorf). The cycling conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. A final dissociation step was always performed to generate a melting curve which corresponds to temperature increasing level of 0.1°C from 60°C to 95°C during 20 min. This step was added to verification of amplification product specificity. Two independent experiments were performed.

Data analysis

Unpaired 2-tailed Student's t tests were used to compare difference between experimental groups for synergist tests and glutathion-S transferases assays with Prism (version 5, GraphPad). For RT-qPCR data, fold change relative to the expression of the sample genes and reference gene was calculated using the Rieu method (Rieu et Powers, 2009). These data are presented as the mean of fold change relative expression \pm standard error of two biological replicates. Unpaired 2-tailed Student's t test was used to test the statistical significance of normalized gene expression in different comparisons with Prism (version 5, GraphPad).

3.Results

The Orléans strain has been used in a previous study on sublethal effects of IMI (Charpentier et al., submitted). During this work, it appears that Orléans strain was more resistant to IMI than Oregon-R after acute intoxication, and was in fact more similar to Hikone-R, a known resistant strain to DDT and IMI (Daborn et al., 2001) (data not shown). We were interested to determine the biological functions involved in the IMI resistance of Orléans strain.

3.1 Orléans strain does not contain the Accord transposable element at the *Cyp6g1* locus.

It has been suggested that, in drosophila, resistance to DDT or IMI was the result of the insertion of the transposable element *Accord* upstream of *Cyp6g1* which encodes a P450 (Daborn et al., 2002). In order to test the presence of this transposable element upstream of *Cyp6g1* in Orléans strain, we have performed a PCR experiment using primers located on both sides of the insertion site of *Accord* as described in Daborn et al. (2002); the PCR product will be longer if the *Accord* element is present at this locus. As a negative control, we used Oregon-R and as a positive control Hikone-R. The result showed the *Accord* element is absent in Orléans strain, as the PCR product has the same size than that of Oregon-R (Fig. 1).

3.2 Synergism of P450s inhibitor

In order to evaluate the contribution of P450s in the IMI resistance of Orléans flies, we used an inhibitor of P450s, the piperonyl butoxide (PBO). When given alone at 1mM, PBO does not show any effect, all flies (Orléans or Oregon-R) were still alive 8 days after exposition. When flies were exposed to IMI alone at 3129 μ mol/L, 68.7 \pm 6.2% Orléans flies survived, but only 23.3 \pm 9.8% Oregon-R flies survived (Fig. 2). When flies were treated with both IMI and PBO, the Orléans and the Oregon-R strains showed the same survival rate than with IMI alone (Fig. 2). Intoxication with IMI and PBO led to 70 \pm 11.7% of survival for the Orléans

strain, versus $68.7 \pm 6.2\%$ with IMI alone, indicating that P450s are not involved in Orléans resistance ($P > 0.05$). IMI with PBO decreased the survival rate of Oregon-R from $23.3 \pm 9.1\%$ to $12 \pm 5.1\%$, but this decrease was not significant ($P > 0.05$).

3.3 Synergism of GSTs inhibitor.

Another class of detoxification enzymes could be involved in resistance to IMI: the GSTs. To inhibit GST activity we used diethyl maleate (DEM) at a concentration of 10mM. At this concentration, no fly died after acute exposition with DEM alone. When Orléans flies were simultaneously treated with DEM (10mM) and IMI, a strong decrease of the survival rate was observed for greatest concentrations (Fig. 3). Addition of both IMI at $3129 \mu\text{mol/L}$ and DEM at 10mM led to $17 \pm 6.0\%$ of survival for the resistant strain, versus $68.7 \pm 6.2\%$ with IMI alone. This treatment decreased significantly the survival by more than 3-fold ($P < 0.001$), leading to a survival rate similar to that of Oregon-R. The survival rate of Oregon-R was also affected by treatment with both DEM and IMI ($P > 0.05$), but to a lesser extent. This result suggests that GSTs have a role in resistance of Orléans strain.

3.3 Comparison of GST activity between Orléans and Oregon-R strains.

If GSTs are involved in resistance in Orléans strain, the GST activity might be higher in Orléans strain than in Oregon-R strain. Glutathione S-transferases activities were examined *in vitro* using non-fluorescent component which upon conjugation with reduced glutathione (GSH) bring fluorescence as the GST substrate. Protein extracts were also treated with the GST inhibitor DEM, to examine the suppression of GST activity. We have first compared GST activity between Orléans and Oregon-R strains without treatment with IMI. The two strains demonstrate the same rate of GST activity (Fig. 4). The baseline of GST activity in the Oregon-R strain was 657 ± 22.64 . Orléans strain had 587.2 ± 30.47 baseline activity, which was

not significantly different compared with Oregon-R strain ($P>0.05$). Inhibitor treatment also significantly suppressed activities in both strains, 42% for Orléans strain ($P<0.001$) and 44% for Oregon-R strain ($P<0.001$).

Then, the same experiment was performed after exposition to IMI ($3129\mu\text{mol/L}$). GST activity was not different between Orléans and Oregon-R flies (399.5 ± 14.61 for Oregon-R, versus 380.8 ± 9.95 for Orléans) (Fig. 4). In addition GST activity was not induced after exposition to IMI of the two strains. The baseline of GST activity in Orléans strain was 614 ± 27.91 after IMI exposition, versus 587.2 ± 30.47 without IMI ($P>0.05$).

3.4. D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 nAChR subunits sequence analysis and comparisons.

It has already been reported that neonicotinoïd resistance could implicate multiple nAChR subunits. We focused our attention on four nAChR subunits D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 which corresponded potentially to the subunits the most involved in imidacloprid resistance. We have performed sequencing of each exon of the genes encoding these subunits from Orléans and Oregon-R DNA. When comparing the two sequences no SNP correlating with IMI resistance in Orléans strain were revealed. The polymorphisms detected did not result in amino acid substitutions. Some SNPs were detected in introns of Orléans strain, but they do not create new splicing sites.

3.5. D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 nAChR subunits expression

In order to investigate if the resistance of Orléans flies was correlated with a difference in the rate of expression of a nAChR subunit, whole-body expression of D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 was established in pool of adult females from Orléans and Oregon-R strains. The D α 1, D α 2 and D β 2 expression levels did not vary between Orléans and Oregon-R strains (Fig. 5). In contrast D β 1 expression level was lower in Orléans females compared with Oregon-R

females. ($P < 0.05$). Orleans females showed 260-fold lower expression of D β 1 nAChR subunit than Oregon-R females.

4. Discussion

We were interested by understanding the mechanism involved in resistance to IMI in the drosophila strain Orléans. This strain was captured in the early 2000s and maintained in laboratory by inbreeding. Previous experiments on sublethal effects of IMI on drosophila revealed that this strain, and more particularly females, was more resistant to IMI than the common used Oregon-R strain. We have shown that gene expression of the nAChR D β 1 subunit was lower, by a factor of 260, in Orléans females than in Oregon-R females. Orléans males, which are less resistant to IMI than females, showed a higher nAChR D β 1 subunit expression than the Orléans females, and are more similar to Oregon-R males (data not shown). Therefore, this reduced expression of nAChR D β 1 subunit appeared specific to females. Reduced expression of this subunit can lead to a reduced expression of IMI target sites and then to a lower sensibility to IMI. If IMI targets are lower, the effect of IMI binding will be lower, that is excitatory post synaptic potential. However, we have not shown that the decrease of the nAChR D β 1 mRNA have an impact on the protein level. Thus, further experiments are needed to mRNA level and protein level. Nevertheless, our results strongly suggest that a lower expression of D β 1 is involved in IMI resistance in Orléans strain. This is consistent with findings of Markussen and Kristensen (2010b), which have found that a decrease in Mda2 expression was involved in the resistance of two resistant strains in *Musca domestica*.

Changes affecting neonicotinoïd target proteins such as nAChR have already been involved in insensitivity. (ffrench-Constant et al., 2004). A Y151S mutation on two nAChRs subunits

(N1 α 1 and N1 α 3) is highly correlated with target-site insensitivity against imidacloprid in a laboratory selected field strain of the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Liu et al., 2005, Zhang et al., 2009). In *Myzus persicae*, a single point mutation leading to R81T substitution in the nAChR β 1 subunit confers resistance to neonicotinoids (Bass et al., 2011). In *Drosophila melanogaster* mutations in three nAChR subunits D α 1, D α 2 or D β 2 have been correlated with resistance to neonicotinoids probably by interfering with subunits assembly (Shimomura et al., 2005; Perry et al., 2008). However, no mutations have been detected in D α 1, D α 2, D β 1 and D β 2 genes in Orleans strain as compared to OregonR.

Many cases of insecticides resistance have been shown to be correlated with higher expression of detoxification enzymes such as esterases, glutathione S-transferases (GSTs) and cytochromes P450 monooxygenases (P450s) (Li et al., 2007). However, P450s appears to be the primary mechanism of neonicotinoid resistance. In whitefly (*Bemisia tabaci*), over-expression of a single P450 gene, *CYP6CM1*, was strongly associated with imidacloprid resistance in B and Q biotypes (Karunker et al., 2008). Moreover, resistance to neonicotinoids is also associated with P450s activity in two Danish resistant strains of the house fly (*Musca domestica*). Indeed, feeding bioassays with piperonyl butoxide, a P450s inhibitor, suppress significantly imidacloprid resistance in these strains. Markussen and Kristensen (2010a) have also shown that resistance is associated with over-expression of three P450s genes. In *D. melanogaster*, DDT and imidacloprid resistance has also been associated with overexpression of P450s, in particular overexpression of *Cyp6g1* gene (Daborn et al., 2001, Daborn et al. 2002). Recently, involvement of GSTs in neonicotinoid resistance has been suggested for the first time by Yang et al. (2013) in *Bermisia tabaci*.

Insecticide resistance is in fact a complex mechanism which can be the result of both detoxification and target site alteration. Thus we have investigated the effect of PBO and

DEM, two inhibitors of P450s and GSTs respectively. No synergism has been detected between IMI and PBO, suggesting that P450s are not involved in IMI resistance in Orléans strain. In contrast, we have observed a strong effect of DEM. Treatment with IMI and DEM significantly increased susceptibility to imidacloprid. In particular Orléans strain demonstrates the same IMI sensitivity than Oregon-R in presence of DEM, suggesting that GSTs could be involved in IMI resistance in Orléans strain. However, when measuring GST activity *in vitro* before and after intoxication with imidacloprid, no difference was observed between the two strains. At first sight, these two results appeared contradictory. Nevertheless, we can hypothesize that GSTs are involved in detoxification of IMI in our exposure conditions (short time, high dose), and that when GSTs activity is lowered, IMI metabolites accumulate and induce mortality in the same manner in Oregon-R and Orléans strains. Metabolism of IMI has been studied in various animals (mammals, some insect species such as honeybees) as well as in plants and soil. In mammals, the main metabolites, obtained by oxidative cleavage, are 6-chloronicotinic acid and its glycine conjugate. Dechlorination of 6-chloronicotinic can be done through a glutathione conjugate and lead to 6-hydroxy nicotinic acid and to a methylmercapto nicotinic acid derivative. In insects, IMI metabolism is less known. In *Apis mellifera*, Suchail et al. (2004) have proposed a metabolic pathway involving only phase I enzymes. They found five metabolites: 4/5-hydroxy-imidacloprid, 4,5-dihydroxy-imidacloprid, 6-chloronicotinic acid, and olefin and urea derivatives. Among these, some are also neurotoxic, in particular 4,5-dihydroxy-imidacloprid, and olefin. In addition, it was proposed that IMI and IMI metabolites bind to different nAChRs with different affinities (Guez et al., 2001 ; 2003). If GSTs are inhibited, the level of some metabolites, 6-chloronicotinic or upstream metabolites, may increase and then activate specific nAChRs (without $\beta 1$ subunit) which do not bind IMI, and finally kill the insect.

To conclude, we have shown that a lower expression of the nAChR D β 1 subunit is correlated with tolerance to imidacloprid in Orléans strain, and that GSTs are probably involved in IMI metabolism in *Drosophila melanogaster*. Analysis of the different metabolites produced by this insect will provide useful informations to understand the function of GSTs in IMI detoxification. It also will be of interest to evaluate the sensitivity of Orléans strain to other neonicotinoïds.

Acknowledgements

We thank Patrice Robert for maintenance of drosophila strains. We thank the Conseil Général du Loiret (France) for their financial support. We acknowledge Jean-Charle Leple (INRA, Ardon, France) for his helpful assistance in statistical analysis of qPCR experiments.

Literature cited.

- Arvidsson S., Kwasniewski M., Riano-Pachon DM., Mueller-Roeber B. 2008. QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatic* 9: 465.
- Bass C., Puinean AM., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul VL., Crossthwaite AJ., Denholm I., Field LM., Foster SP., Lind R., Williamson MS., Slater R. 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience* 12:51.
- Casida JE., Quistad GB., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol* 43: 1-16.
- Daborn P., Boundy S., Yen J., Pittendright B., ffrench-Constant RH. 2001. DDT resistance in drosophila correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol Genet Genomics* 266: 556-563
- Daborn PJ., Yen JL., Bogwitz MR., Le Goff G., Feil E., Jeffers S., Tijet N., Perry T., Heckel D., Batterham P., Feyereisen R., Wilson TG., ffrench-Constant RH. 2002. A single allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.
- ffrench-Constant RH., Daborn PJ., Goff GL. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* 20: 163-170.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP. 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* . 76: 183-91.
- Guez D, Belzunces LP, Maleszka R. 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav*. 75: 217-22.

- Jones AK., Sattelle B. 2006. The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Inverteb. Neurosci* 6: 123-132.
- Jowett, T. 1986 Preparation of nucleic acids pp. 275-286 in *Drosophila a practical approach*, edited by D. B. ROBERTS. IRL PRESS, OXFORD.
- Karunker I., Benting J., Lueke B., Ponge T., Nauen R., Roditakis E., Vontas J., Gorman K., Denholm I., Morin S. 2008. Over-expression of cytochrome P450 *CYP6CM1* is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 38: 634-644.
- Kuruganti S, Lam V, Zhou X, Bennett G, Pittendrigh BR, Ganguly R. 2007. High expression of Cyp6g1, a cytochrome P450 gene, does not necessarily confer DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 388: 43-53.
- Li X., Schuler MA., Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanism of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-253.
- Liu ZW., Williamson MS., Lansdell SJ., Denholm I., Han ZJ., Millar NS. 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (Brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8420-8425.
- Markussen MDK., Kristensen M. 2010a. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. *Pestic Biochem Physiol* 98: 50-58.
- Markussen MDK., Kristensen M. 2010b. Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manag Sci* 66: 1257-1262.
- Matsuda K., Buckingham SD., Kleier D., Rauh JJ., Grauso M., Sattelle DB. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 573-580.

- Perry T., Heckel DG., McKenzie JA., Batterham P. 2008. Mutations in D α 1 or D β 2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 520-528
- Sattelle DB., Jones AK., Sattelle BM., Matsuda K., Reenan R., Biggin PC. 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bio Essays* 27: 366-376.
- Shao YM., Dong K., Zhang CX. 2007. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 8: 324.
- Shimomura M, Satoh H, Yokota M, Ihara M, Matsuda K, Sattelle DB. 2005. Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the N-terminus of the *Drosophila* D α 2 subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity. *Neurosci Lett*. 385: 168-72.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci*. 60: 291-6.
- Rieu I, Powers SJ. 2009. Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. *Plant Cell*. 21: 1031-3.
- Tomizawa M., Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48: 339-364.
- Wood, A (1995–2010). Compendium of Pesticide Common Names. Available: <http://www.alanwood.net/pesticides/> via the Internet. Accessed 26April 2012.
- Yang N, Xie W, Jones CM, Bass C, Jiao X, Yang X, Liu B, Li R, Zhang Y. 2013. Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. *Insect Mol Biol*. 22:485-96.

-Zhang YX., Liu ZW., Han ZJ., Song F., Yao XM., Shao Y., Li J., Millar NS. 2009. Functional co-expression of two insect nicotinic receptor subunits (Nl α 3 and Nl α 8) reveals the effects of a resistance-associated mutation (Nl α 3^{Y151S}) on neonicotinoid insecticides. *J. Neurochem.* 110: 1855-1862.

Table 1. Sequence of primers used in the qPCR analysis.

Gene	Primer sequence F/R
RP49	5'-ATCGTGAAGAAGCGCACCAAGC-3' 5'-TTGCGCCATTTGTGCGACAG-3'
nAcRalpha-1	5'-ACCTACGATGGTTACATGGTGGAC-3' 5'-ATGTCCCCTCCACGGAGATGTAG-3'
nAcRalpha-2	5'-CAGGACGAGTTCAATGCGGAAG-3' 5'-CACAAATGTGCCACCAAGGATG-3'
nAcRbeta-1	5'-CCTGCAAATCCTGGCTGTTGTG-3' 5'-TCTTCATCTTCGGATGCACTGACC-3'
nAcRbeta-2	5'-GCGTGCGGTCAGATTTATTGCG-3' 5'-ACTTCCAGTCCTCCACAATCTCG-3'

Figure legends.

Fig. 1. The Orléans strain does not carry the *Accord* transposable element at the 5' end of the *Cyp6g1* locus. Survey of fly strains with a PCR-based diagnostic to detect the presence or absence of the *Accord* element in the 5' end of the *Cyp6g1*. Hikon-R contains the *Accord* element at the 5' end of *Cyp6g1* (band of higher molecular weight), but not Orléans (O) and Oregon-R (OR) (band of lower molecular weight).

Fig. 2. Synergism of P450s inhibitor. (A) Survival of Orléans females exposed to imidacloprid only (3129 μ M), to piperonyl butoxide 1mM (PBO) only or to the combination of imidacloprid 3129 μ M and PBO 1mM. (B) Survival of Oregon-R females exposed to imidacloprid only (3129 μ M), to piperonyl butoxide 1mM (PBO) only or to the combination of imidacloprid 3129 μ M and PBO 1mM. Data are mean \pm SEM (bars).

Fig. 3. Synergism of GSTs inhibitor. Survival of Orléans drosophila females (■,□) and Oregon-R females (●,●) after exposure to imidacloprid alone (■,●), or to the combination of imidacloprid and diethyl maleate 10mM (DEM) (□,●). Concentrations of imidacloprid ranged from 117 to 3129 μ M. Survivals are given from the number of flies still alive 8 days after exposition (see Materials and Methods). Data are mean \pm SEM (bars). IMI, imidacloprid.

Fig. 4. GSTs activities. (A) Comparison of glutathione S-transferases activities between Orléans and Oregon-R females without exposition and suppression of the activities by glutathione S-transferases inhibitor, diethyl maleate (DEM). (B) Comparison of glutathione S-transferases activities between Orléans and Oregon-R females after exposition to imidacloprid (3129 μ M) and suppression of the activities by glutathione S-transferases inhibitor, diethyl maleate (DEM) . Data are mean \pm SEM (bars). Stars on the top of bars indicate significant difference ($P < 0.001$) between treatments.

Fig. 5. Whole-body gene expression of nAChR subunits ($D\alpha 1$, $D\alpha 2$, $D\beta 1$ and $D\beta 2$) in adult females from Orléans and Oregon-R strains, measured by quantitative real-time PCR. Stars of the top of bars indicate significant difference ($P < 0.05$) of expression between Orléans and Oregon-R strains. Data are mean \pm SE (bars).

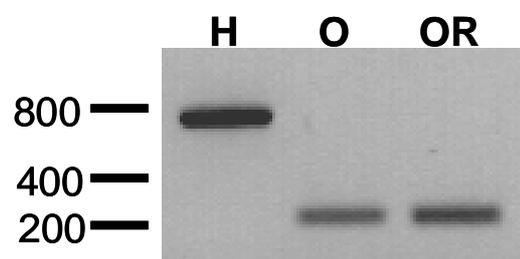


Fig 1.

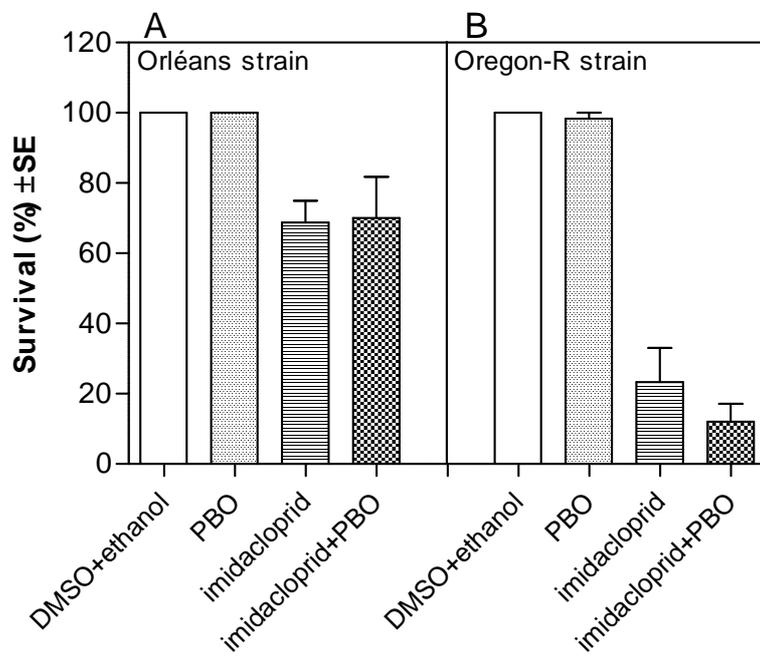


Fig 2.

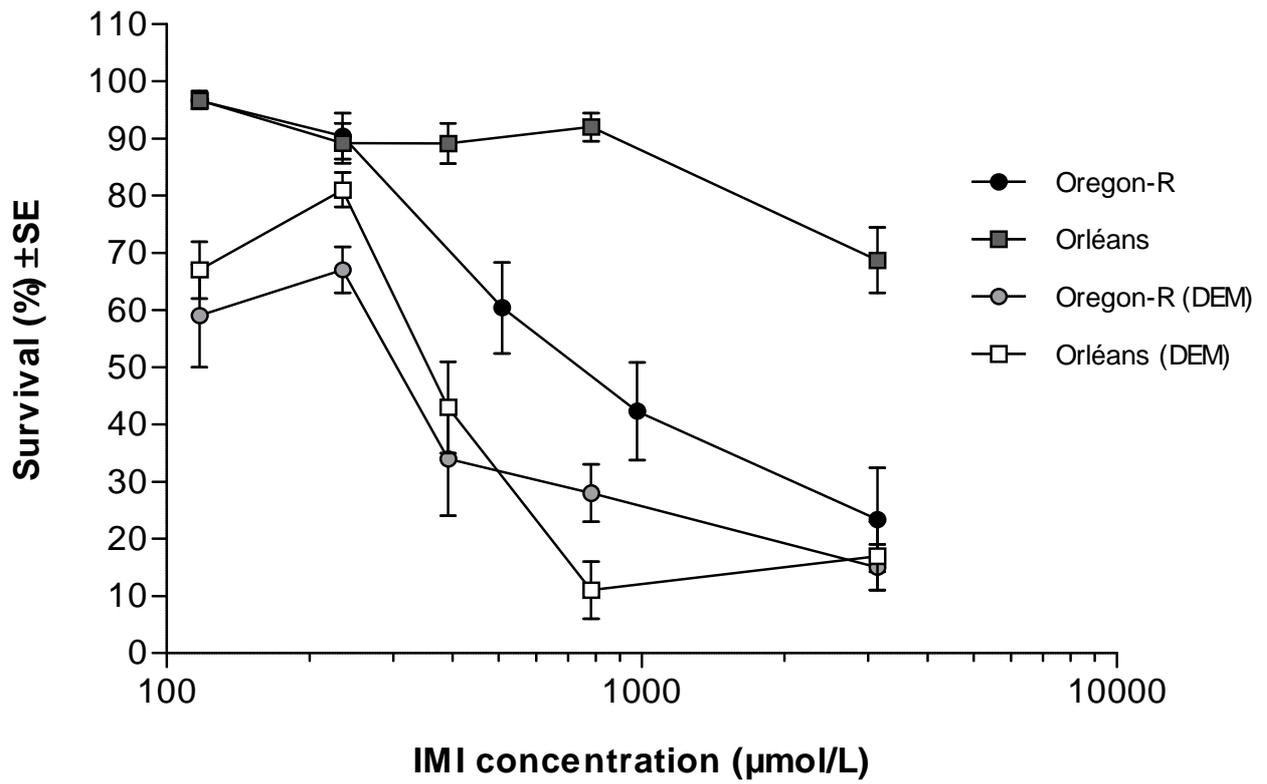


Fig 3.

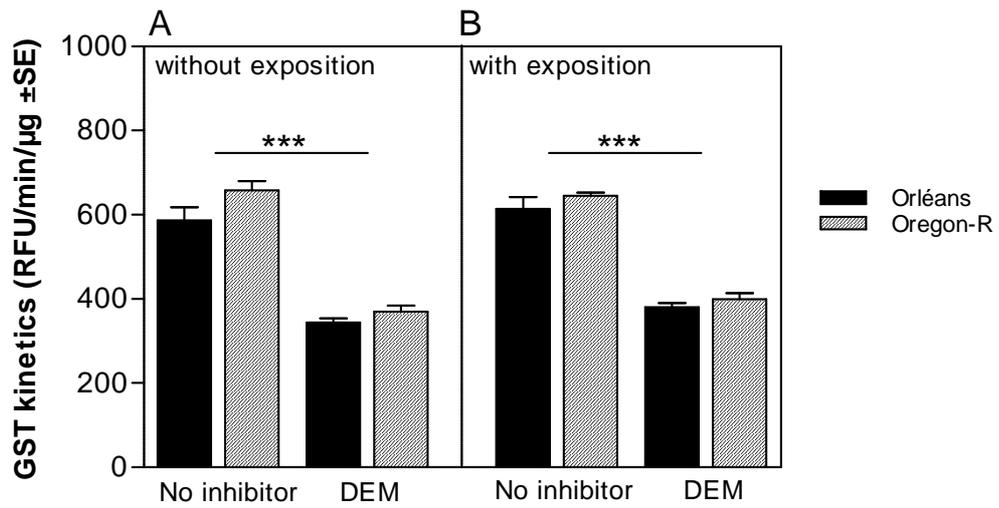


Fig 4.

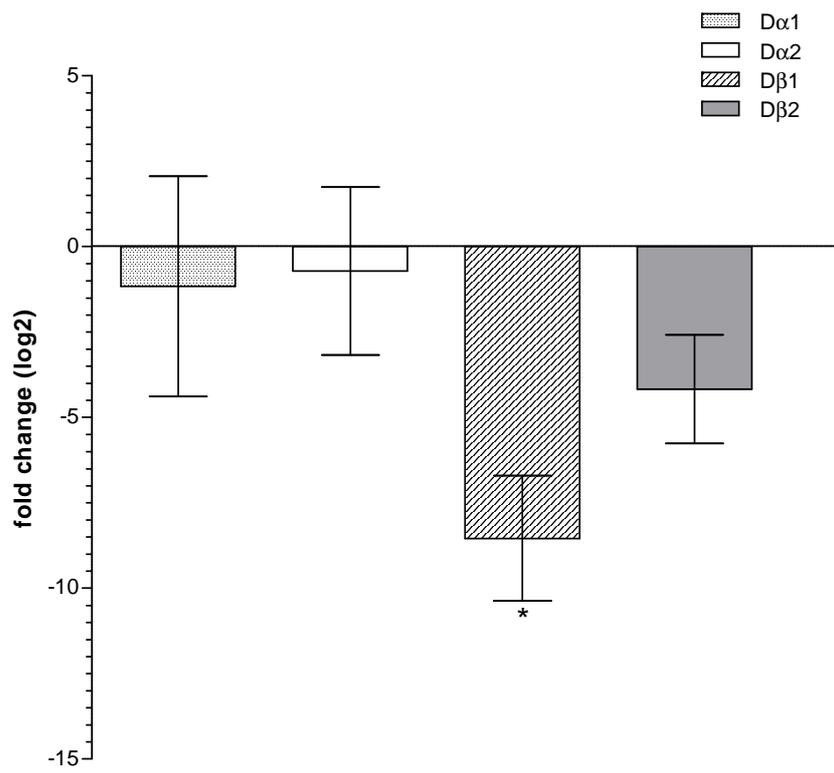


Fig 5

IV-Discussion.

Le but de cette étude était d'évaluer la toxicité d'un insecticide, l'imidaclopride, chez un insecte modèle, la drosophile. Pour cela, deux modes d'intoxication ont été utilisés: un mode d'intoxication chronique à faibles doses et un mode d'intoxication aiguë à fortes doses. Ces expériences ont permis de mettre en évidence trois points majeurs qui sont: une différence de sensibilité à l'imidaclopride entre les mâles et les femelles, l'impact de l'imidaclopride chez la drosophile à des doses sublétales et la résistance à cet insecticide chez les femelles Orléans après une intoxication aiguë.

IV.1-Différence de sensibilité à l'imidaclopride entre les mâles et les femelles.

Tout d'abord, quel que soit le mode d'intoxication utilisé, la réponse aux insecticides est différente entre les mâles et les femelles de la souche Orléans. La sensibilité à l'imidaclopride est donc variable en fonction du sexe de l'individu. En effet, en mode d'intoxication chronique, la CL50 (concentration entraînant la mort de 50% des individus exposés) est de 44,9 μ M chez les mâles alors que chez les femelles la CL50 est seulement de 17,9 μ M. A l'inverse, en mode d'intoxication aiguë, la CL50 des mâles est de 1304 μ M et chez les femelles, elle n'a pas pu être déterminée (>3100 μ M) car les femelles Orléans sont trop résistantes à l'imidaclopride. Cette différence de tolérance est également retrouvée pour d'autres insecticides comme l'endosulfan, le malathion, la cyperméthrine ou encore le fenvalérate (Creus et al., 1983; Batiste-Alentorn et al., 1987).

Certaines enzymes comme les P450s ou les GSTs sont impliqués dans le métabolisme des produits phytosanitaires et ils sont exprimés de manière différente chez les mâles et chez les femelles. En effet, une étude a montré que le mâle exprimait 81 fois plus le *Cyp312a1* que la femelle alors que les gènes *Cyp315a1* et *Cyp302a1* (cytochromes impliqués dans la biosynthèse de l'ecdysone) étaient exprimés de manière plus importante chez les femelles (Kasai et Tomita, 2003). Une autre étude a montré qu'après traitement à l'atrazine (herbicide) ou au phénobarbital (médicament), les gènes de P450s et de GSTs induits n'étaient pas exactement les mêmes chez les femelles que chez les mâles. De plus pour 4 de ces gènes (*Cyp6a2*, *Cyp6a8*, *Cyp6d5*, *Cyp12d1*), l'expression constitutive de ceux-ci est plus importante chez les mâles que chez les femelles (Le Goff et al., 2006). Le niveau d'induction de ces gènes après exposition est cependant plus important chez les femelles pour atteindre un niveau d'expression semblable chez les mâles et les femelles (Le Goff et al., 2006).

Ces informations pourraient expliquer nos résultats obtenus après une intoxication chronique à l'imidaclopride chez la souche Orléans. L'hypothèse proposée est la suivante: si les mâles expriment de manière plus importante certains cytochromes par rapport aux femelles, ils métabolisent donc une quantité plus importante de l'insecticide qui pourrait conduire à la sensibilité plus faible à l'imidaclopride chez les mâles. La différence de sensibilité à l'imidaclopride entre les mâles et les femelles pourrait être due à une expression différente des P450s et des GSTs, enzymes capables de métaboliser les insecticides.

IV.2-Impact de l'imidaclopride chez la drosophile à des doses sublétales.

Nous avons montré également qu'une exposition à des doses sublétales d'imidaclopride perturbe le comportement sexuel (accouplement) et la fécondité chez la drosophile. On observe une baisse de la fécondité pour les femelles exposées à l'imidaclopride pour des doses sublétales. Ce phénomène est retrouvé chez d'autres espèces comme *Bemisia tabaci* ou *Bombus Terrestris*, exposées à l'imidaclopride (He et al., 2013; Whitehorn et al., 2012).

L'environnement peut avoir un effet sur le comportement de ponte chez les insectes. Certains pesticides peuvent être répulsifs pour les insectes provoquant une diminution du nombre d'œufs pondus. L'effet répulsif des insecticides peut également induire une diète ou une baisse de l'alimentation chez l'insecte pouvant conduire à une réduction de la fécondité (Li et al., 2007). L'effet de doses sublétales d'insecticides peut donc avoir un impact sur la survie des insectes. En effet, une diminution de la fécondité après exposition à l'imidaclopride peut entraîner une diminution de la population de l'insecte considéré. Sachant qu'une intoxication chronique à faibles doses est un mode d'intoxication qui se rapproche le plus des situations que l'on retrouve dans la nature, il est donc important de considérer les effets de ces doses sublétales chez les différentes populations d'insectes. La drosophile s'est révélée être un modèle intéressant pour ces études de toxicité.

IV.3-Résistance à l'imidaclopride chez les femelles Orléans (intoxication aiguë).

L'étude a mis en évidence la résistance à l'imidaclopride des femelles de la souche Orléans en intoxication aiguë. Ces dernières années le nombre d'espèces résistantes est en constante augmentation ce qui pourrait compromettre à terme l'utilisation massive des insecticides pour le contrôle des insectes ravageurs dans les cultures. Il est donc important d'utiliser de manière "intelligente" les insecticides (quantité plus faible, période spécifique) et d'étudier la résistance chez l'insecte pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques induits par une exposition aux insecticides.

Au laboratoire, les femelles de la souche Orléans présentent une résistance à l'imidaclopride en mode d'intoxication aiguë. L'étude de ce phénomène nous a permis de mettre en évidence deux mécanismes impliqués. Tout d'abord, une forte diminution de l'expression de la sous-unité D β 1 est retrouvée uniquement chez les femelles et pas chez les mâles de la même souche, qui eux sont sensibles à l'imidaclopride. Cette sous-unité est également impliquée dans la résistance à l'imidaclopride chez le puceron *Myzus persicae* (Bass et al., 2011b). Cette réduction d'expression de la sous-unité D β 1 pourrait induire une diminution des sites de liaisons à l'imidaclopride. Il y aurait donc moins de cibles pour l'insecticide ce qui se traduirait par un effet physiologique moins important, d'où l'apparente résistance. Ce type de résistance est également retrouvé chez la mouche domestique *Musca domestica* qui présente une diminution de l'expression de la sous-unité M α 2 chez une souche résistante aux néonicotinoïdes (Markussen et Kristensen, 2010a).

Nous avons également mis en évidence l'implication des GSTs dans la sensibilité à l'imidaclopride. En effet, nous avons montré par un test de synergie avec le diéthyl maléate que la résistance de la souche Orléans était abolie. Les GSTs sont connues pour être impliquées dans la résistance aux organophosphorés, aux pyréthriinoïdes ou au DDT mais pas dans la résistance aux néonicotinoïdes. Une première étude a montré le rôle probable d'une GST (famille Sigma) dans la résistance au thiametoxam (Yang et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas pu montrer une différence d'activité GST dans la souche Orléans. Comment expliquer alors, que l'inhibition des GSTs conduise à la perte de la résistance de la souche Orléans?

On peut proposer qu'une inhibition de l'activité des GSTs puisse induire une accumulation de certains métabolites de l'imidaclopride qui sont aussi toxiques pour l'insecte. Il a été montré que certains métabolites de l'imidaclopride comme le 5-hydroxyimidaclopride et l'oléfine avaient également des propriétés insecticides (Nauen et al., 1998). De plus, ces métabolites

seraient responsables de la mort de l'insecte plutôt que l'imidaclopride, insecticide dégradé très rapidement et en grande quantité (Suchail et al., 2004). Chez l'abeille, des études ont été menées pour déterminer l'effet de l'imidaclopride et de ses métabolites sur le réflexe d'extension du proboscis (PER). Guez et ses collaborateurs ont mis en évidence que le 5-hydroxyimidaclopride et l'oléfine avaient des effets opposés sur le PER et que ces effets variaient en fonction de l'âge de l'abeille (Guez et al., 2001; 2003). Ces résultats suggèrent qu'il existerait différents types de nAChRs (nAChR1 et nAChR2) ayant des affinités différentes pour le 5-hydroxyimidaclopride et l'oléfine. Ils ont proposé le modèle suivant (Guez et al., 2003) (Figure 38). L'oléfine agirait comme agoniste sur le nAChR1. L'imidaclopride agirait comme agoniste sur le nAChR1 et le nAChR2 mais avec une affinité plus forte pour le nAChR2. Enfin, le 5-hydroxyimidaclopride agirait comme agoniste du nAChR2. Chez l'abeille, le nAChR2 serait exprimé uniquement à partir du 8^{ème} jour de la vie de l'insecte, date à laquelle l'abeille commence à rechercher de la nourriture en dehors de la ruche (Guez et al., 2001).

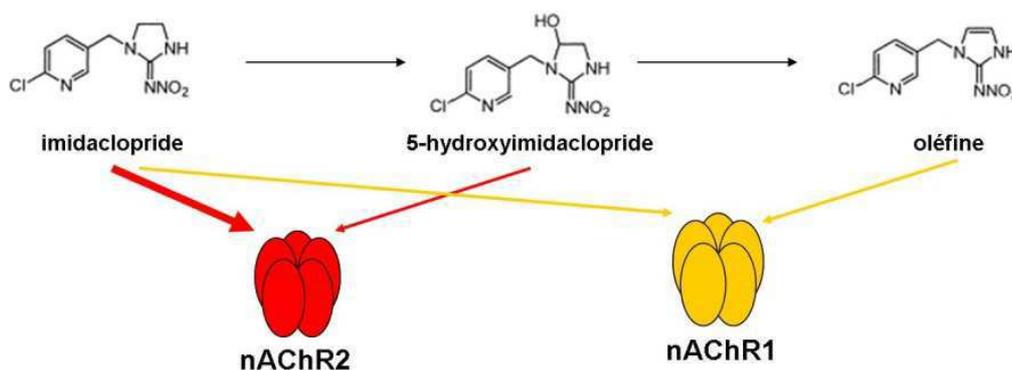


Figure 38: Interaction possible entre l'imidaclopride, le 5-hydroxyimidaclopride et l'oléfine avec les nAChRs chez l'abeille. nAChR1, nAChR2: différents types de nAChRs (récepteurs nicotiques à l'acétylcholine) (d'après Guez et al., 2003).

A partir de ces résultats, nous pouvons poser une hypothèse concernant l'implication des GSTs dans le métabolisme de l'imidaclopride et le rôle dans la résistance à l'imidaclopride chez les femelles de la souche Orléans. L'imidaclopride serait métabolisé en 5-hydroxyimidaclopride puis en partie en acide 6-chloronicotinique qui pourrait être partiellement pris en charge par les GSTs pour former l'acide 6-hydroxynicotinique (Figure 39).

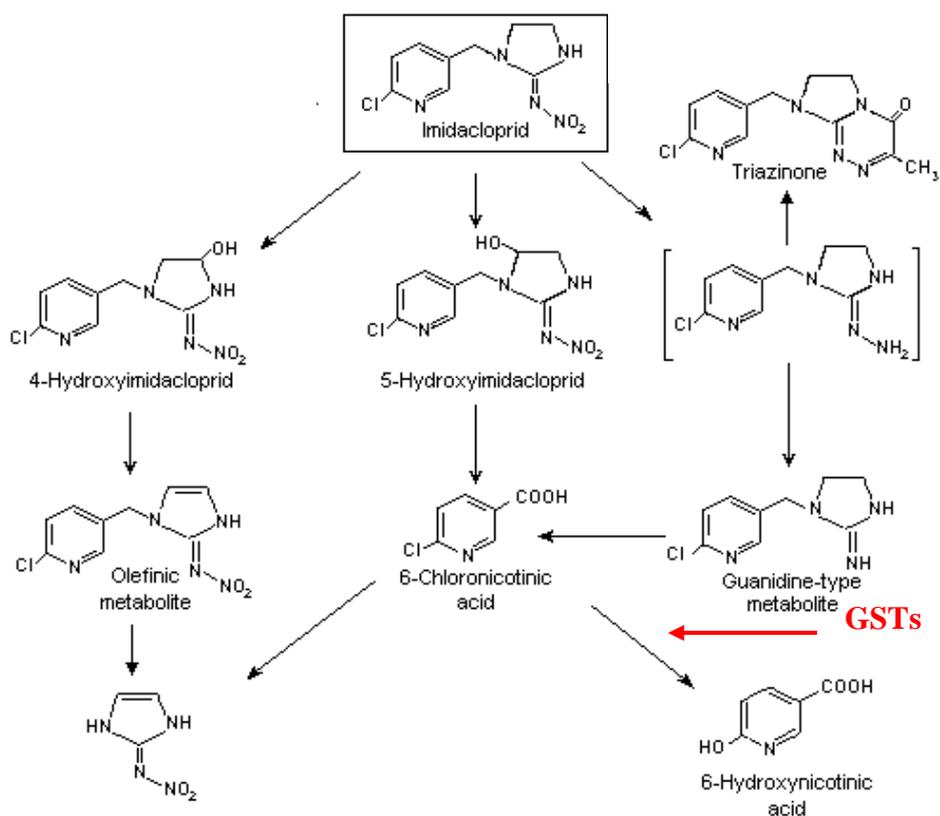


Figure 39: Voie métabolique hypothétique de l'imidaclopride chez la drosophile, d'après le schéma de la voie métabolique de l'imidaclopride proposée chez le rat. L'imidaclopride est métabolisé en plusieurs métabolites. Les glutathion *S*-transférases (GSTs) interviendraient pour la métabolisation en acide 6-hydroxynicotinique.

En absence de GSTs, l'acide 6-chloronicotinique et les métabolites en amont pourraient augmenter en quantité. S'ils se fixent sur un récepteur (nAChR1) qui ne possède pas la sous-unité D β 1, alors leur toxicité serait identique chez la souche Oregon-R et la souche Orléans (Figure 39). La toxicité de l'imidaclopride et de ses métabolites agirait donc via des récepteurs différents. Si la sous-unité D β 1 est présente uniquement au niveau du nAChR2, chez les femelles Orléans, la sous-expression de cette sous-unité affecterait la composition du nAChR2 et donc limiterait la toxicité due à l'imidaclopride conduisant à la résistance à l'imidaclopride chez ces femelles. En présence d'inhibiteurs de GSTs, ces femelles ne seraient plus résistantes à l'imidaclopride car la toxicité serait liée aux métabolites qui agirait via le récepteur nAChR1. La baisse d'expression de la sous-unité D β 1 ne serait donc plus impliquée dans la résistance à l'imidaclopride.

CHAPITRE III: Etude de l'effet d'un organochloré, la dieldrine chez la drosophile

I-Introduction

I.1-La dieldrine, un organochloré.

La dieldrine est un neurotoxique qui est un insecticide cyclodiène appartenant à la famille des organochlorés (Figure 40). Il fut synthétisé pour la première fois en 1946 à Denver par le laboratoire Julius Hyman & Company. Sa commercialisation en tant qu'insecticide débute ensuite en 1950. La dieldrine est un insecticide très utilisé dans les années 1970s principalement contre les insectes du sol comme les termites, les sauterelles, les coléoptères dans le domaine agricole pour le traitement des sols et des semences. Il fut commercialisé pour lutter contre certains vecteurs de maladies humaines comme le paludisme, la fièvre jaune ou encore la maladie de Carrion ainsi que dans le domaine vétérinaire (INERIS, 2011). Il était également utilisé dans l'industrie pour protéger les fondations, les charpentes mais aussi les câbles électriques et téléphoniques (Kanthasamy et al., 2005).

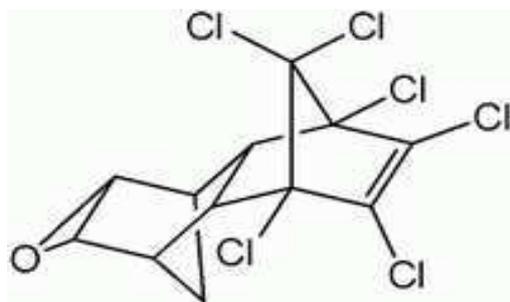


Figure 40: Formule chimique de la dieldrine, insecticide appartenant à la famille des organochlorés.

La persistance importante de la dieldrine dans l'environnement et sa bioaccumulation dans les organismes vivants ont conduit à son interdiction dans de nombreux pays. En effet, le programme pour l'environnement des nations unies (UNEP) en 1994 classe la dieldrine parmi les 12 substances les plus persistantes dans l'environnement (POPs: persistent organic pollutants), appelée la ``dirty dozen'', et la convention de Stockholm de 2001 prévoit leur interdiction totale dans la plupart des pays. Cependant certains pays comme l'Italie et les Etats-Unis n'ont pas ratifié cette convention. Cette convention prévoit l'interdiction de la production de dieldrine mais autorise l'utilisation des stocks existants. La dieldrine est donc utilisée dans certains pays en voie de développement comme agent termiticide (Népal, Ethiopie...). Les stocks de dieldrine ont également été utilisés en Finlande pour le traitement du bois. En France, la dieldrine est interdite depuis 1972 (arrêté du 4 octobre 1972) dans le domaine agricole et depuis 1992 (arrêté du 2 octobre 1992) dans la protection des charpentes et fondation des immeubles. En 1994, l'interdiction devient totale avec l'élimination des stocks contenant ce composé chimique (France).

La dieldrine est un insecticide très persistant avec une demi-vie qui peut atteindre 25 ans dans l'environnement (Kanthasamy et al., 2005). De plus, un autre insecticide classé parmi les POPs l'aldrine, est dégradé en dieldrine dans l'environnement conduisant à une accumulation d'autant plus importante de la dieldrine. Actuellement, cet insecticide est retrouvé dans les sédiments, dans l'eau des rivières et dans l'atmosphère dans différentes régions du monde, il est donc toujours présent dans l'environnement (Bossi et al., 2013; Garrison et al., 2013; Lee et al., 2013; El Nemr et al., 2012). Il est retrouvé dans les tissus de certains organismes vivants comme la loutre ou le caïman en Amérique du Nord (Carpenter et al., 2013; Grant et al., 2013). Il faut également noter que parmi les pesticides détectés chez ces espèces, la dieldrine arrive en tête. Malgré une interdiction de commercialiser cet insecticide depuis plusieurs années, les organismes vivants comme l'homme sont donc toujours exposés via la nourriture, l'eau de boisson et l'environnement. De plus, la dieldrine est un composé très lipophile qui a tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux et est capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Cet insecticide peut donc être présent dans l'organisme pendant une durée relativement longue, par exemple chez l'homme le temps de demi-vie de la dieldrine est d'environ 300 jours (Kanthasamy et al., 2005).

1.2-La cible de la dieldrine: le récepteur canal de l'acide γ -aminobutyrique.

La dieldrine est un neurotoxique qui agit spécifiquement sur les récepteurs canaux à l'acide γ -aminobutyrique (GABAR). Ces récepteurs pentamériques permettent le passage d'ions chlorures. Chaque sous-unité est composée d'un domaine C-terminal extracellulaire, de 4 domaines transmembranaires (M1-M4) et d'un domaine N-terminal extracellulaire qui contient 6 régions distinctes (boucle A-F) importantes dans le site de liaison au GABA. Actuellement, trois sous-unités ont été identifiées chez la drosophile: RDL (resistance to dieldrin), LCCH3 (ligand-gated chloride channel homologue 3) et GRD (GABA and glycine-like receptor of *Drosophila*). Les gènes codant les sous-unités RDL et GRD sont situés sur le chromosome III alors que le gène codant la sous-unité LCCH3 est situé sur le chromosome I. Cependant, la composition en sous-unités du GABAR reste méconnue. La sous-unité RDL est présente au niveau des GABARs du système nerveux mais elle serait absente au niveau des GABARs des cellules musculaires chez la blatte. Ce résultat suggère une localisation spécifique de la sous-unité RDL au niveau du système nerveux (Buckingham et al., 2005). L'expression hétérologue de la sous-unité RDL dans les ovocytes de xénope permet la formation d'un récepteur homo-oligomérique fonctionnel sensible à la dieldrine (Hosie et al., 1996). Cependant, l'expression hétérologue des sous-unités GRD et LCHH3 dans les ovocytes de xénope permet la formation de récepteurs fonctionnels insensibles à la dieldrine (Gisselman et al., 2004). La fixation de la dieldrine sur le GABAR semble spécifique à la sous-unité RDL. La sous-unité LCCH3 est localisée principalement au niveau du corps cellulaire du neurone alors que la sous-unité RDL est localisée au niveau des prolongements neuronaux (axones, dendrites) (Hosie et al., 1997).

1.3-La dieldrine et la maladie de Parkinson.

1.3.1. La maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient généralement entre 45 et 70 ans. Elle correspond à la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie se traduit par l'apparition de troubles locomoteurs (rigidité musculaire, tremblements, bradykinésie et mouvements involontaires) et de troubles cognitifs (dépression, altération de l'odorat, trouble du sommeil). La cause principale est une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNpc) qui joue un rôle important dans le contrôle de la locomotion. Cette

neurodégénérescence entraîne une diminution de la dopamine dans la voie nigro-striée. On observe des inclusions cytoplasmiques dans les neurones appelées corps de Lewy constituées en partie d' α -synucléine. Le dysfonctionnement de la mitochondrie et le stress oxydatif jouent également un rôle important dans la maladie de Parkinson (Lin et Beal, 2006; Jenner, 2003; Mounsey et Teismann, 2010). Dans la plupart des cas, la cause de la maladie de Parkinson est méconnue et elle apparaît de plus en plus comme une maladie multifactorielle impliquant des facteurs de risques génétiques et environnementaux comme l'exposition aux pesticides (Freire et Koifman, 2012; Moretto et Colosio, 2011).

I.3.2. La dieldrine: implication dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.

Des études épidémiologiques ont mis en évidence une association possible entre l'exposition aux insecticides, comme par exemple la dieldrine, et la maladie de Parkinson (Freire et Koifman, 2012). Les personnes qui travaillent en contact avec ces substances comme les agriculteurs sont les premiers exposés. Une étude menée sur 22341 hommes utilisant des insecticides, suggère une augmentation du risque vis-à-vis de la maladie de Parkinson suite à l'exposition à différents composés en particulier la dieldrine (Kamel et al., 2007). Une autre étude épidémiologique a été réalisée en Finlande en analysant la concentration de différents insecticides dans des échantillons de sérum collectés de 1966 à 1972. Les individus ayant développé la maladie de Parkinson après la collecte des échantillons ont été répertoriés (apparition de la maladie entre 1972 et 1994). Une comparaison fut ensuite réalisée entre les individus ayant développé cette maladie (n=101) et les individus sains (n=349). Les résultats ont mis en évidence une association entre l'exposition à la dieldrine et la maladie de Parkinson en particulier sur la population non fumeur (odd ratio: 1,95; intervalle de confiance 1,26-3,02; p=0,003) (Weisskopf et al., 2010). D'autres études ont également été réalisées sur des échantillons de cerveaux post-mortem provenant d'individus atteints de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer ainsi que des individus contrôles. Fleming et ses collaborateurs (1994) ont détecté la dieldrine dans 6 des 20 cerveaux provenant des patients atteints de la maladie de Parkinson, dans 1 des 7 cerveaux provenant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et dans aucun des 14 cerveaux provenant des individus contrôles. Cette étude met en évidence une corrélation significative entre la présence de dieldrine et la maladie de Parkinson (p=0,031). Deux autres études réalisées en Angleterre mettent également en relation la concentration de dieldrine dans des échantillons de cerveaux et la maladie de Parkinson. La quantité de dieldrine est significativement plus importante dans des

échantillons de cerveaux (au niveau du noyau caudé et de la substance noire) provenant des patients atteints de la maladie de Parkinson que chez les individus contrôles (Corrigan et al., 1998, 2000). Ces études épidémiologiques suggèrent un lien probable entre l'exposition des individus à la dieldrine et le développement de la maladie de Parkinson. Cependant la relation entre la toxicité de la dieldrine et l'augmentation du risque vis-à-vis de la maladie de Parkinson reste indéterminée. De plus, dans la nature l'homme est souvent exposé à des doses très faibles durant une période relativement longue et les effets de cette exposition chronique restent mal connus (Kamel, 2013).

I.3.3. Modélisation de la maladie de Parkinson chez la drosophile.

Des modèles de la maladie de Parkinson ont été développés chez la drosophile. Ils sont de 2 types: des modèles génétiques et des modèles «pharmacologiques».

Les modèles génétiques sont basés sur l'expression d'une protéine humaine mutée conduisant à la maladie de Parkinson chez l'homme comme l' α -synucléine et la parkine (Whitworth, 2011). Le premier modèle développé induisait l'expression de l' α -synucléine humaine dans tout le cerveau de la drosophile. Ce modèle présente une dégénérescence des cellules dopaminergiques, la formation d'inclusions ainsi qu'un déficit locomoteur, caractéristiques importantes de la maladie de Parkinson chez l'homme (Feany et Bender, 2000). Une autre étude a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de la protéine Hsp70 dans un modèle exprimant l' α -synucléine humaine dans les neurones dopaminergiques et les neurones sérotoninergiques chez la drosophile (Auluck et al., 2002). D'autres modèles ont été développés permettant l'expression de la parkine humaine mutée chez la drosophile. Par exemple, Sang et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'expression de la parkine humaine mutée (parkine^{T240R}, parkine^{Q311X}) induisait une dégénérescence des neurones dopaminergiques ainsi qu'un déficit locomoteur en fonction de l'âge. D'autres études ont également permis d'associer la perte de neurones dopaminergiques, un déficit locomoteur ou une réduction de la durée de vie chez des drosophiles exprimant une autre forme mutée de la parkine humaine ou chez des mutants nul pour l'orthologue de la parkine chez la drosophile (Wang et al., 2007; Whitworth et al., 2005; Greene et al., 2003).

Les modèles «pharmacologiques» correspondent au développement d'un syndrome parkinsonien après une exposition à un produit, en particulier après exposition aux pesticides. Par exemple, un modèle a été réalisé chez la drosophile par exposition au paraquat, un herbicide. Ce modèle présente un déficit locomoteur et une perte de neurones

dopaminergiques. Dans ce modèle, la modulation de la production de dopamine provoque une susceptibilité variable chez les drosophiles exposées au paraquat suggérant un rôle important de la dopamine dans la neurotoxicité au paraquat (Chaudhuri et al., 2007). La drosophile a également été utilisée pour modéliser un syndrome Parkinsonien suite à l'exposition à la roténone. Cet insecticide est un inhibiteur du complexe I de la mitochondrie et provoque un dysfonctionnement de celle-ci puis un stress oxydatif, facteurs importants associés à la maladie de Parkinson (Lin et Beal, 2006). Une étude réalisée en 2004 a permis de mettre en évidence pour la première fois que l'exposition à la roténone provoquait une perte de neurones dopaminergiques et un déficit locomoteur chez la drosophile, caractéristiques principales de la maladie de Parkinson (Coulom et Birman, 2004). Ce modèle a ensuite été utilisé pour étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place d'un syndrome parkinsonien chez les drosophiles exposées à la roténone. Par exemple, une étude a permis de mettre en évidence le rôle neuroprotecteur d'une protéine mitochondriale humaine, hUCP2. Cette protéine perturbe le gradient de protons induit par la chaîne respiratoire de la mitochondrie conduisant à une diminution de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). L'expression de cette protéine dans les neurones dopaminergiques chez la drosophile protège des effets néfastes d'une exposition à la roténone (perte de neurones dopaminergiques, diminution de la dopamine, altération du comportement locomoteur) ainsi qu'une augmentation de l'activité du complexe I de la mitochondrie (Islam et al., 2012). Une autre étude montre l'effet protecteur de la créatine (dérivé d'acide aminé ayant des propriétés énergisante, antioxidante). L'ajout de créatine dans le milieu d'élevage permet de diminuer la mortalité des drosophiles exposées à la roténone mais aussi de restaurer en partie l'activité locomotrice et la diminution de dopamine chez ces drosophiles. Une diminution du stress oxydatif de la mitochondrie est également observée, comme par exemple une baisse des ROS, pour ces drosophiles (Hosamani et al., 2010).

La dopamine pourrait également jouer un rôle dans le développement de la maladie de Parkinson. En effet, une surexpression du transporteur de la dopamine dans les vésicules synaptiques (VMAT, vesicular monoamine transporters) permet d'éviter la perte de neurones dopaminergiques chez les drosophiles exposées à la roténone. A l'inverse, une souche mutante pour ce transporteur montre une perte plus importante de neurones dopaminergiques que la souche sauvage après une exposition à la roténone (Lawal et al., 2010). De plus, une autre étude montre que la réduction de la quantité de dopamine cellulaire (chez une souche mutante de drosophile) a un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques pour des drosophiles exposées à la roténone (Bayersdorfer et al., 2010). Ces résultats suggèrent que

l'homéostasie de la dopamine jouerait un rôle important dans la toxicité vis-à-vis des neurones dopaminergiques suite à l'exposition à un insecticide comme la roténone.

I.3.4. Objectif de l'étude: modéliser l'impact d'une exposition à la dieldrine chez un insecte modèle, la drosophile.

L'exposition aux insecticides peut être considérée comme facteur de risque pour certaines maladies humaines. Des études épidémiologiques ont permis de suggérer un lien possible entre la maladie de Parkinson et l'exposition à la dieldrine. Cependant, les études chez l'homme restent limitées et difficiles à mettre en œuvre. Il est donc nécessaire de développer des modèles animaux. Jusqu'à présent, seuls quelques modèles ont été développés pour modéliser l'exposition à la dieldrine.

Une étude, réalisée sur des cellules en culture, a mis en évidence la possible sélectivité de la dieldrine vis-à-vis des neurones dopaminergiques: EC_{50} deux fois plus faible pour les cellules dopaminergiques de rat (Kitazawa et al., 2001). Il a été montré également, dans des cultures de cellules dopaminergiques de rat, que la dieldrine induisait une hyperacétylation des histones ainsi que l'apoptose (Song et al., 2010; Kitazawa et al., 2004). Enfin, toujours dans des cellules en culture, l'exposition à la dieldrine a été impliquée dans différents mécanismes comme le stress oxydatif, l'apoptose, le fonctionnement de la mitochondrie ou du protéasome et l'agrégation de protéines comme l' α -synucléine (Kansathamy et al., 2005; Sun et al., 2005). Par exemple, la dieldrine provoque la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et la réduction du potentiel de membrane, signes probables de l'apoptose dans des cultures de lymphocytes humains (Michalowicz et al., 2013). L'exposition à la dieldrine a également été modélisée chez la souris. Une étude réalisée montre que l'exposition à la dieldrine durant la gestation conduit à une perturbation du système dopaminergique chez les individus F1. Par la suite, les neurones dopaminergiques chez ces individus apparaissent plus sensibles à d'autres neurotoxiques comme le MPTP⁺ en particulier chez les mâles (Richardson et al., 2006). Hatcher et ses collaborateurs (2007) ont également montré que l'exposition durant 30 jours à la dieldrine conduit à des dommages oxydatifs dans la voie nigro-striée chez la souris.

Peu de modèles ont donc été développés, c'est pourquoi nous avons choisi de modéliser l'effet d'une exposition chronique à des doses faibles de dieldrine chez la drosophile. Cet insecte modèle offre de nombreux avantages comme des outils génétiques sophistiqués, un cycle de vie court, une facilité et un faible coût d'élevage. De plus il s'est avéré être un

modèle tout à fait pertinent pour étudier les processus biologiques impliqués dans la maladie de Parkinson. Nous pourrions ainsi comparer les résultats avec ceux obtenus chez les différents modèles génétiques et pharmacologiques réalisés chez la drosophile.

II-Matériel et méthodes.

II.1-Les souches de drosophiles et conditions d'élevage.

Les souches **Oregon-R**, **32186** (w^* ; $P\{10XUAS-IVS-mCD8::GFP\}attP40$), **9334** ($y^1 w^{1118}$; $Gcn5^{Q186st} P\{FRT(w^{hs})\}2A e^1/TM3$, $P\{ActGFP\}JMR2$, Ser^1), **11633** ($P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/TM3, ry^{RK} Sb^1 Ser^1$) et **3729** ($w^* nej^3/FM7c$) ont été fournies par le Bloomington Stock Center (Université d'Indiana, Bloomington, USA). La lignée contenant le driver *TH-Gal4* a été fournie par Serge Birman (ESPCI, Paris, FR). Les drosophiles sont élevées à 22°C sur un milieu standard (pour 4 litres: 362g de farine de maïs, 200g de levure de bière, 60g d'agar et 150ml d'une solution à 10% de méthyl-4-hydroxybenzoate dans de l'alcool) selon un cycle jour nuit 12:12 heures.

II.2-Conditions d'exposition à la dieldrine.

Une solution mère (10mM) de dieldrine (Sigma, pureté 97,9%) est réalisée dans du DMSO, puis les dilutions pour obtenir des doses de 0,1µM, 0,5µM et 1µM sont réalisées dans de l'eau distillée. L'exposition des drosophiles à la dieldrine est réalisée en utilisant le milieu instantané Formula 4-24® Instant *Drosophila* Medium (Sordalab). Pour 1 tube d'élevage, 1g de flocons est réhydraté avec 3,5ml de solution contenant la dieldrine à la concentration souhaitée, ou du DMSO à la même concentration que dans la solution de dieldrine à 1 µM. Pour une bouteille d'élevage, 12g de flocons sont réhydratés avec 36ml. Quelques grains de levure sont ajoutés dans les tubes et les bouteilles.

II.3-Test de la durée du développement.

Des drosophiles femelles et mâles (500 individus environ) sont placées dans une cage de ponte à 22°C (cycle jour nuit 12:12h) en présence d'un milieu gélosé (pour 500ml: 15g d'agar, 16g de sucre, 1g méthyl-4-hydroxybenzoate et 166ml de jus de pomme) et de levure de boulangerie. Le milieu gélosé et la levure de boulangerie sont changés tous les jours. Après un temps d'adaptation pour les drosophiles (2 jours), des pontes de 2 heures sont réalisées. Les embryons sont ensuite récoltés et disposés par 20 dans un tube contenant du milieu instantané réhydraté avec une solution à la concentration souhaitée de dieldrine ou de DMSO. Les tubes sont placés à 22°C (cycle jour nuit 12:12h). Le nombre de pupes puis d'adultes dans

les tubes est compté tous les jours à 17 heures. Les tests ont été réalisés sur 540 embryons selon deux expériences indépendantes durant la période de mars à juillet.

II.4-Test de la longévité.

Les drosophiles femelles ou mâles sont collectées un jour après l'éclosion (développement sur un milieu flocons contenant ou non de l'insecticide à la dose souhaitée) puis elles sont placées par groupe de 20 dans un tube contenant le milieu flocons avec la dieldrine ou le DMSO. Les drosophiles sont maintenues à 22°C (cycle jour nuit 12:12h) et transférées dans des nouveaux tubes tout les deux ou trois jours. Le nombre de drosophiles mortes par tube est compté presque tous les jours. Pour les femelles, le test est réalisé sur 175 mouches pour le groupe contrôle (DMSO) puis sur 187 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,1µM, sur 302 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,5µM, sur 377 mouches pour le groupe exposé à la dose 1µM, sur 225 mouches pour le groupe exposé uniquement jusqu'au premier jour de la vie de la mouche (dose 1µM) et sur 227 pour le groupe exposé uniquement durant le stade adulte (dose 1µM). Pour les mâles, le test est réalisé sur 241 mouches pour le groupe contrôle (DMSO) puis sur 148 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,1µM, sur 265 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,5µM, sur 403 mouches pour le groupe exposé à la dose 1µM, sur 205 mouches pour le groupe exposé uniquement jusqu'au premier jour de la vie de la mouche (dose 1µM) et sur 222 mouches pour le groupe exposé uniquement durant le stade adulte (dose 1µM). Deux expériences indépendantes ont été réalisées durant la période de mars à juillet.

II.5-Test de préférence alimentaire.

Pour ce test, deux colorants alimentaires sont utilisés comme marqueurs pour visualiser la prise de nourriture chez la mouche. Le colorant bleu (bleu brillant FCF ou E133) est utilisé à la concentration de 0,5mg/ml et le colorant rouge (carmoisine ou E122) est utilisé à la concentration de mg/ml. Ces composés n'interfèrent pas avec le test et ne sont pas toxiques pour les mouches à ces concentrations (Tanimura et al., 1982). Ce test est pratiqué selon le protocole de Tanimura et ses collaborateurs pour déterminer si les mouches ont une préférence ou non vis-à-vis de la dieldrine pour se nourrir. Les tests sont réalisés sur une microplaque de 96 puits. Chaque puits est rempli avec 250µl de solution contenant soit un

colorant (le bleu par exemple), la dieldrine (concentration finale 1 μ M) et 1% d'agar soit l'autre colorant (le rouge), le DMSO (concentration identique à celle utilisée pour la dieldrine) et 1% d'agar (Figure 41A). Le test est fait de la manière suivante: 150 femelles âgées de 5 à 6 jours sont assoiffées pendant 20 heures dans des tubes vides à 22°C. Ces 150 femelles sont ensuite placées sur la microplaque contenant les deux solutions pendant 2h à l'obscurité à 22°C. Les femelles sont alors récupérées et la couleur de leur abdomen est examinée. Le nombre d'individus ayant l'abdomen bleu, rouge ou les deux (abdomen noir) est compté (Figure 41B). Ces résultats sont exprimés selon un index de préférence (PI) qui correspond au pourcentage de $[N^B+N^N/2]/[N^B+N^N+N^R]$ quand la dieldrine est associée au colorant bleu, N^B = le nombre de drosophiles ayant l'abdomen bleu, N^R = le nombre de drosophiles ayant l'abdomen rouge et N^N = le nombre de drosophiles ayant l'abdomen noir (Tanimura et al., 1982). L'expérience a été réalisée deux fois, la première fois la dieldrine était associée au colorant bleu et la deuxième fois au colorant rouge.

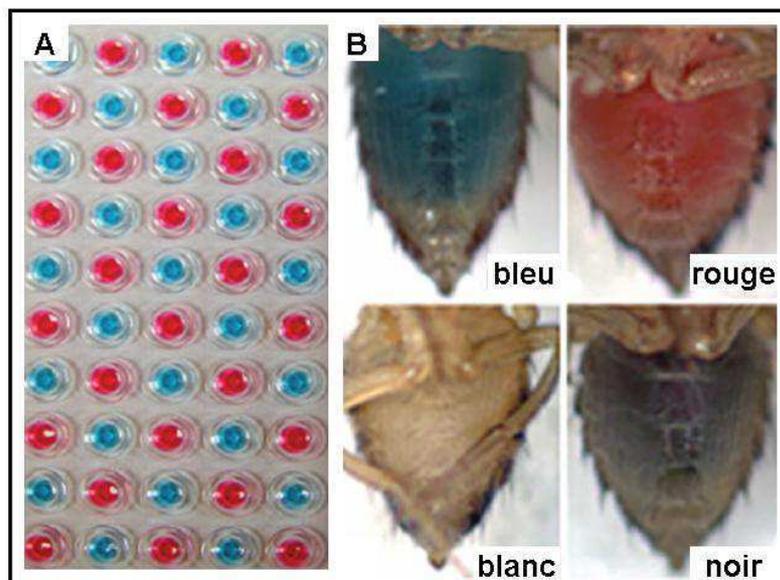


Figure 41: Test de préférence alimentaire. (A) microplaque contenant les deux solutions avec les colorants rouge et bleu permettant aux drosophiles de choisir entre une solution contenant ou non de la dieldrine. (B) la nourriture ingérée par les drosophiles est visible grâce à leur abdomen qui est translucide. Bleu ou rouge (ingestion d'une seule solution), blanc (pas d'ingestion), noir (ingestion des deux solutions). (d'après Gordesky-Gold et al., 2008).

II.6-Test pour l'activité locomotrice.

Les expériences sont réalisées sous lumière inactinique rouge. Sept femelles sont placées dans un tube vide (longueur 9cm, diamètre 2cm). Le premier test est réalisé sur des drosophiles âgées de 4 jours, puis toutes les semaines à heure fixe (entre 15 h et 16 h). Le test est réalisé de la façon suivante: après 15 minutes sous lumière inactinique, les tubes sont tapés pendant 3 secondes de façon à ce que les drosophiles se retrouvent toutes au fond du tube. On compte ensuite le nombre de drosophiles capables d'atteindre le haut du tube en 15 secondes. Ceci est répété 5 fois avec un intervalle de cinq minutes. Pour les femelles Oregon-R, le test est réalisé sur 84 mouches pour le groupe contrôle (DMSO) puis sur 70 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,1 μ M, sur 70 mouches pour le groupe exposé à la dose 0,5 μ M, sur 77 mouches pour le groupe exposé à la dose 1 μ M, sur 77 mouches pour le groupe exposé uniquement jusqu'au premier jour de la vie de la mouche (dose 1 μ M), sur 63 mouches pour le groupe exposé uniquement durant le stade adulte, sur 98 pour le groupe exposé à la L-DOPA (1mM), sur 91 pour le groupe exposé à la dieldrine (1 μ M) et à la L-DOPA (1mM), sur 77 mouches pour le groupe exposé à la trichostatine A (10mM) et sur 84 pour le groupe exposé à la dieldrine (1 μ M) et à la trichostatine A (10mM). Pour les mâles Oregon-R, le test est réalisé sur 77 mouches pour le groupe contrôle (DMSO) puis sur 70 mouches pour les groupes exposés aux doses 0,1; 0,5 et 1 μ M. Pour les femelles *w118*, le test est réalisé sur 42 mouches pour le groupe contrôle (DMSO) et sur 49 mouches pour le groupe exposé à la dose 1 μ M. Pour les femelles *P{PZ}Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶ ry⁵⁰⁶/+*, le test est réalisé sur 63 mouches pour le groupe témoin (DMSO) et sur 70 mouches pour le groupe exposé à la dose 1 μ M. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats sont présentés comme le pourcentage de drosophiles arrivées en haut du tube.

II.7-Immunohistochimie sur les cerveaux de larves et d'adultes.

La méthode utilisée est décrite par Riemensperger et ses collaborateurs (2011). Les drosophiles adultes (âgées de 5 ou 10 jours) anesthésiées par le froid et les larves de troisième stade sont placées dans une solution de Ringer (sans calcium) pour la dissection du cerveau. Les cerveaux sont ensuite fixés dans une solution de 1 \times PBS (DPBS 10 \times without Ca and Mg, PAN-Biotech GmbH) avec 4% de para-formaldéhyde (Electron Microscopy Science) pendant 2 heures sur de la glace et sous agitation puis 3 lavages sont réalisés dans du 1 \times PBS avec 0,5% Triton-X100 (PBS-T). Les cerveaux sont traités par une solution de PBS-T avec 2%

d'albumine bovine (BSA, Euromedex) toute la nuit à 4°C puis ils sont incubés deux heures à température ambiante sous agitation dans une solution de PBS-T avec 2% BSA et les anticorps primaires (dilution au 1/100 de l'anticorps anti-GFP ABfinityTM recombinant rabbit monoclonal antibody-unconjugated, Invitrogen). Après trois lavages de 20 minutes dans du PBS-T à température ambiante sous agitation, les cerveaux sont incubés dans une solution de PBS-T avec 2% BSA et les anticorps secondaires (dilution au 1/500 de l'anticorps Alexa Fluor® 647 dye-labeled goat anti-rabbit IgG antibodies, Invitrogen) sous agitation à température ambiante. Les cerveaux sont ensuite lavés trois fois avec du PBS-T puis trois fois dans du 1×PBS sous agitation et à température ambiante (20 minutes par lavage). Finalement, les cerveaux sont montés entre lame et lamelle dans une solution contenant du Mowiol (Mowiol® 4-88, Sigma). Pour les drosophiles âgées de 5 jours, l'immunohistochimie a été réalisée sur 32 cerveaux pour le groupe témoin (DMSO) et sur 32 cerveaux pour le groupe exposé à la dieldrine (1µM). Pour les drosophiles âgées de 10 jours, l'immunohistochimie est réalisée sur 29 cerveaux pour le groupe témoin et sur 30 cerveaux pour le groupe exposé à la dieldrine. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence Axio Observer Z1 ; Plan Apo chromat 20×, ON=0,75 ; module pour l'excitation LED=625nm (Colibri) ; émission à 650/690nm (Carl Zeiss, SAS).

II.8-L'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les drosophiles sont placées dans des capillaires (diamètre interne 1.6mm, diamètre externe 2mm) remplis d'huile fluorocarbonée (C₂ClF₃)_n (huile 10S voltatef, VWR) pour diminuer les artefacts de susceptibilité magnétique (Null et al., 2008). Les expériences sont réalisées à l'aide d'un spectromètre 9,4T (Bruker Biospec). Pour les images 2D, une séquence de type écho de gradient (FLASH: Fast Low Angle Shot) a été utilisée (TE/TR: 10/230ms). La résolution des images 2D est de 10.10.80µm (taille de matrice= 512×512, champ de vue= 0.53×0.53cm, α=60°, épaisseur de coupe 80µm) pour une durée d'acquisition de 2 heures. Pour les images 3D, la même séquence FLASH a été utilisée (TE/TR: 10/230 ms). La résolution des images 3D est de 10.10.20µm (taille de matrice= 512×256×128, champ de vue= 0.50×0.25×0.25cm, α=60°) pour une durée d'acquisition de 4 heures. Les images sont ensuite reconstruites avec le Maximum Intensity Projection (MIP).

II.9-Analyse des métabolites par HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning).

Après anesthésie par le froid (3°C), les drosophiles sont placées dans un insert puis dans un rotor HRMAS. Nous utilisons un rotor de 4mm de diamètre interne pour la spectroscopie 1D ¹H HRMAS pour une durée d'acquisition de 20 minutes. Les expériences sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Wide Bore 750MHz (17,6T) *Bruker Avance III*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le CEMTHI Orléans (conditions extrêmes et matériaux: haute température et irradiation) dans le cadre d'un contrat TGIR.

II.10-Analyse des modifications d'histones par Western blot.

Dix têtes de drosophiles femelles sont broyées (sur la glace) dans 20µL de 1×PBS contenant un inhibiteur d'histones désacétylases (10mM de butyrate de sodium). On prélève alors 4µl auxquels on ajoute 4µl de 1×PBS, butyrate de sodium 10mM et 4µl de tampon de charge. Chaque échantillon ainsi préparé est chauffé à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide. La migration est réalisée sur un gel SDS/PAGE 18% pendant deux heures à 160V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF 0,45µm (Amersham Hybond-P, GE Healthcare) pendant 1h30 à 0.8 mA/cm². Les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de TBS-T (Tris-buffered saline avec 0.05% de Tween 20) et 3% d'albumine bovine (BSA, Euromedex) pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Les membranes sont incubées avec une solution de TBS-T contenant les anticorps primaires anti-H3 acétylées (1/2000) (Active motif) et 1% de lait écrémé sous agitation pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages de 10 minutes dans une solution de TBS-T à température ambiante, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin conjugués à la peroxydase (1/200, Thermo Scientific Pierce) pendant une heure sous agitation à température de la pièce. Ensuite les membranes sont lavées trois fois (10 minutes par lavage) dans du TBS-T puis une fois dans du TBS. Le marquage est révélé grâce à une solution de chimiluminescence (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific Pierce). Pour un contrôle de la quantité d'histones, les membranes sont décapées deux fois 5 minutes à température de la pièce avec une solution de NaOH 0,2M, puis lavées une fois 5 minutes avec de l'eau distillée et enfin 1 fois 5 minutes avec du TBS. Le même protocole que celui exposé précédemment est ensuite utilisé pour mettre en évidence les histones H3 en utilisant comme anticorps primaire un anticorps anti-H3 (Active motif) dilué au 1/15000. Pour la quantification, les membranes sont scannées avec le système d'images

PXi (Syngene) et l'intensité des bandes est mesurée en utilisant le logiciel GeneTools analysis (Syngene). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

II.11-Analyses statistiques.

Les résultats des différentes expériences (durée du développement, activité locomotrice, immunohistochimie et western blots) ont été soumis à des analyses statistiques. Un test d'ANOVA a été utilisé suivi d'un test de Tukey pour analyser les différences entre les groupes expérimentaux et le groupe contrôle à l'aide du logiciel Prism (version 5, GraphPad).

III-Résultats expérimentaux.

III.1-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur la durée de vie.

III.1.1. Effet de la dieldrine sur la durée du cycle de vie.

Nous voulons étudier l'effet de la dieldrine à des doses semblables à celles rencontrées dans la nature. Pour cela, nous nous sommes basées sur les travaux de Hatcher et al. (2007) et de Song et al. (2010) réalisés chez la souris. Dans ces études, les souris sont exposées à des doses entre 1 à 5mg/kg quotidiennement. A partir de ces valeurs, nous avons défini trois doses auxquelles les drosophiles seront exposées par la suite: 0,1; 0,5 et 1 μ M.

Pour évaluer l'effet d'une exposition à la dieldrine sur la durée du cycle de la drosophile, nous avons déposé des embryons venant de drosophiles ``naïves`` (jamais exposées à la dieldrine) sur un milieu contenant une concentration donnée de dieldrine (0,1; 0,5 ou 1 μ M). Le nombre de pupes puis d'adultes présents dans les tubes est compté au cours du temps. Une première expérience a été réalisée en déposant les embryons 1 par 1 dans les tubes contenant le milieu flocons. Cependant j'ai constaté une forte mortalité des embryons: environ 20% des embryons ne donnaient pas d'adultes aussi bien pour le témoin DMSO que pour les groupes exposés à la dieldrine. Cette mortalité pouvait être due soit à une mauvaise manipulation lors du transfert des embryons dans les tubes soit à une mortalité induite par le DMSO ou bien les deux. La même expérience réalisée en utilisant comme solution de l'eau distillée a conduit à un même taux de mortalité. La mauvaise manipulation durant le transfert des embryons était donc la cause de cette forte mortalité. L'expérience a donc été refaite en manipulant le moins possible les embryons. Ils ont été uniquement regroupés par 20 sur le milieu gélosé et cette fois-ci c'est le milieu gélosé qui a été découpé et placé dans les tubes contenant le milieu flocons. Dans ces conditions seulement 10% des embryons ne donnent pas d'adultes, ceci aussi bien pour les tubes témoins que pour les tubes exposés. On peut donc en déduire que l'exposition aux doses choisies de dieldrine n'affecte pas la viabilité des embryons, larves ou pupes.

Dans un premier temps, nous avons regardé l'effet de l'exposition à la dieldrine sur la durée nécessaire aux embryons pour devenir des pupes (Figure 42). Pour le groupe témoin traité avec le DMSO (même concentration que pour le groupe traité à la dieldrine 1 μ M), nous observons que 59,8% des embryons donnent des pupes après 6 jours et 90,2% des embryons donnent des pupes après 8 jours. Ce nombre n'augmente pas, même si on attend plus longtemps. Le temps nécessaire à la pupaison (8 jours) dans le groupe témoin DMSO est en accord avec ce que l'on attend pour un développement à 22°C. Le DMSO à la concentration

utilisée n'a donc pas d'effet sur la durée de vie embryonnaire et larvaire. Pour les groupes exposés à la dieldrine aux différentes doses (0,1; 0,5; 1 μ M), on n'observe pas de différence pour le temps nécessaire à la pupaison. En effet, 86,5% des embryons donnent des pupes pour le groupe exposé à 0,1 μ M au bout de 8 jours. Pour le groupe exposé à 0,5 μ M, le temps nécessaire à la pupaison est de 8 jours avec 90,4% des embryons ayant donné des pupes et pour le groupe exposé à 1 μ M, le temps nécessaire est également de 8 jours avec 88,5% des embryons donnant des pupes avec un maximum de 90,0% atteint à 9 jours (Figure 42). On peut donc conclure que l'exposition à la dieldrine aux doses 0,1; 0,5 et 1 μ M n'affecte pas la viabilité des embryons et des larves et n'a pas d'effet sur le temps nécessaire à la pupaison.

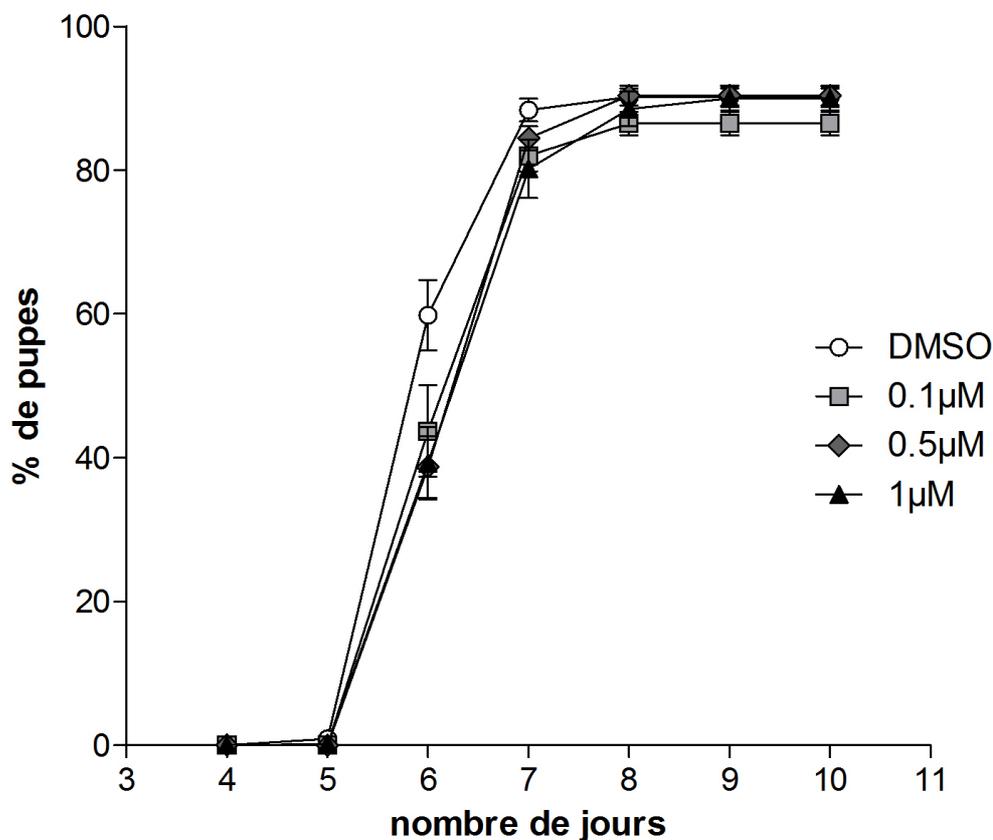


Figure 42: *Durée de développement du stade embryonnaire au stade pupal pendant une exposition à la dieldrine.* Au jour 1, les embryons sont déposés sur du milieu contenant différentes concentrations de dieldrine: 0,1 μ M (■, n=540), 0,5 μ M (◆, n=540) et 1 μ M (▲, n=540). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=540). L'apparition des pupes est ensuite notée au cours du temps. Les premières pupes apparaissent au jour 6. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne.

Dans un second temps, nous avons comparé la durée du stade pupal en absence et en présence de dieldrine (Figure 43). Pour le groupe témoin (DMSO), les adultes naissent entre le jour 11

et le jour 14. Au jour 11, 45,8% des pupes ont donné des adultes et on atteint le maximum des naissances au jour 14 (Figure 43). Pour le témoin, la durée du stade pupal est donc de 6 jours à 22°C. Dans le cas des groupes exposés à la dieldrine aux doses 0,1µM; 0,5µM et 1µM, les adultes naissent aussi principalement entre le jour 11 et le jour 14 malgré quelques adultes qui naissent au jour 15 (entre 0,4 et 1,9%). Cependant on observe un léger retard puisqu'au jour 11 seulement 11,8% des adultes sont nés pour la dose 0,1µM, 9,8% pour la dose 0,5µM, et 7,6% pour la dose 1µM, contre 45,8% pour le témoin. Cette différence est significative ($p < 0,001$; test de Tukey) et un effet de dose est probable car plus la dose est importante plus le pourcentage d'adulte est faible au jour 11. Cependant ce léger retard est compensé au jour suivant (Figure 43) et la durée du stade pupal (6 jours) est identique au témoin pour les trois groupes exposés à la dieldrine.

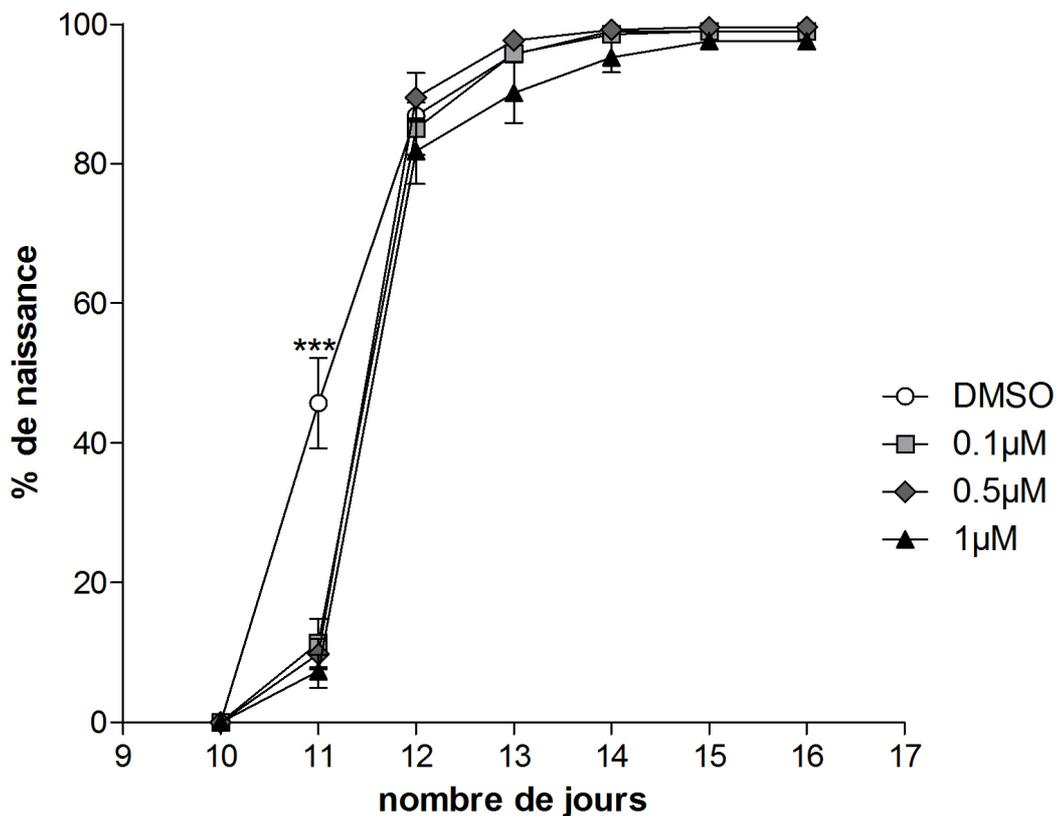


Figure 43: *Durée du stade pupal après une exposition à la dieldrine. Au jour 1, les embryons sont déposés sur du milieu contenant différentes concentrations de dieldrine: 0,1µM (■, n=467), 0,5µM (◆, n=488) et 1µM (▲, n=486). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=487). L'apparition des adultes est notée au cours du temps. Les premiers adultes naissent au jour 11. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles indiquent une différence significative (***) $p < 0,001$; test de Tukey).*

En conclusion, on peut dire que les doses de dieldrine que nous avons choisies (0,1; 0,5 et 1 μ M) n'induisent pas de mortalité au stade embryonnaire, larvaire ou pupal, mais un retard de 24 heures sur le développement. Un examen attentif des adultes n'a pas montré de défauts morphologiques visibles.

III.1.2. Effet de la dieldrine sur la longévité.

Nous avons ensuite étudié la durée de vie des drosophiles adultes exposées en mode chronique (tout au long de leur vie) à la dieldrine. L'étude est réalisée parallèlement chez les mâles et chez les femelles. Pour les mâles, on observe une mortalité de 50% (durée de vie moyenne) au jour 109 pour le témoin soit une durée de vie moyenne d'un peu plus de 3 mois (Figure 44). Pour les mâles exposés à la concentration la plus faible, soit 0,1 μ M de dieldrine, on observe une durée de vie moyenne de 104 jours soit une réduction de 5 jours par rapport au témoin (Figure 42). La durée de vie moyenne est de 89 jours pour la concentration de 0,5 μ M en dieldrine et 78 jours pour la concentration de 1 μ M en dieldrine (Figure 44). On observe donc une réduction de la durée de vie moyenne des mâles qui est dose dépendante. Une diminution de 31 jours est observée pour la dose la plus forte.

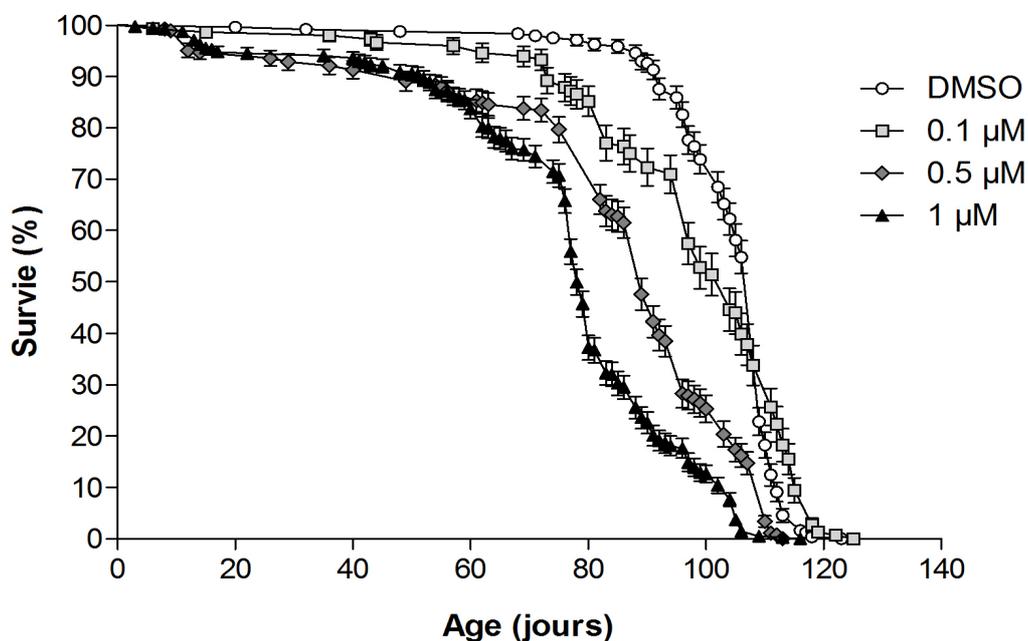


Figure 44: *Durée de vie des mâles exposés à la dieldrine.* Les mâles sont élevés tout au long de la vie en présence de différentes concentrations de dieldrine: 0,1 μ M (■, n=148); 0,5 μ M (◆, n=265) et 1 μ M (▲, n=403). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=241). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence un raccourcissement de la longévité des mâles exposés de manière dose dépendante.

Chez les femelles, les résultats obtenus sont similaires (Figure 45). Pour le témoin, on observe une durée de vie moyenne de 91 jours soit 3 mois. Pour les femelles exposées à la concentration la plus faible en dieldrine, la durée de vie moyenne n'est pas différente du témoin (94 jours). Au contraire pour les expositions aux concentrations 0,5 μ M et 1 μ M, la durée de vie des femelles est réduite de manière dose dépendante. En effet, la durée de vie moyenne est réduite de 6 jours pour les femelles exposées à la concentration de 0,5 μ M et de 78 jours pour les femelles exposées à la concentration de 1 μ M (Figure 45). Pour cette dernière concentration, on observe une réduction très importante (divisée par 4) de la durée de vie chez les femelles exposées.

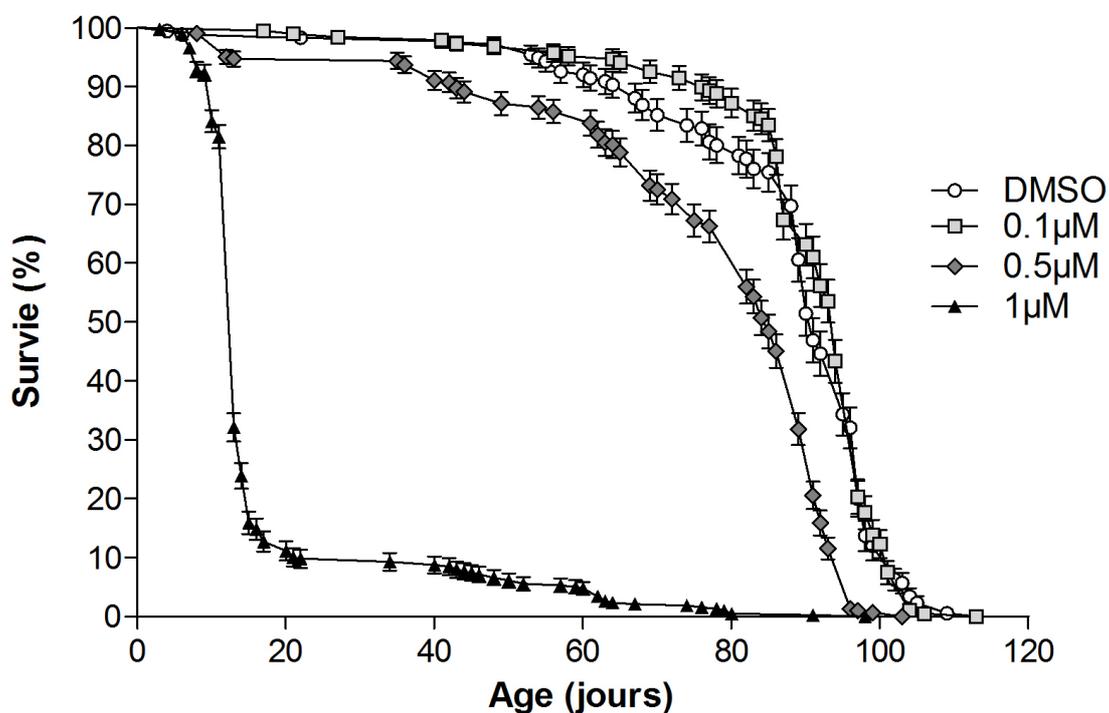


Figure 45: Durée de vie des femelles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie en présence de différentes concentrations de dieldrine: 0,1 μ M (■, n=187); 0,5 μ M (◆, n=302) et 1 μ M (▲, n=377). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=175). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence un raccourcissement de la longévité des femelles exposées dose dépendante.

Si on compare les résultats obtenus chez les mâles et les femelles, on constate des disparités. Tout d'abord, les mâles montrent une durée de vie supérieure à celle des femelles (109 contre 91). Mais le point le plus important est que les mâles apparaissent beaucoup moins sensibles à la dieldrine que les femelles.

III.1.3. Exposition à la dieldrine chez la larve ou l'adulte: conséquence sur la longévité.

Durant ces expériences les drosophiles sont exposées à la dieldrine tout au long de leur vie (embryon→adulte). Nous avons cherché à savoir si l'effet observé (baisse de la survie) était plutôt le résultat de l'exposition au stade larvaire ou au stade adulte, ou résultait de l'accumulation des effets aux stades larvaire et adulte. Pour répondre à cette question, nous avons exposés les drosophiles soit juste pendant la vie larvaire (entre embryon et adulte), soit juste pendant le stade adulte. Ceci a été réalisé seulement pour la dose 1 μ M qui induisait une diminution de la durée de vie aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Les conditions d'élevage sont identiques aux tests réalisés précédemment.

Chez les mâles, l'exposition à la dieldrine seulement pendant le stade larvaire n'altère que peu la durée de vie moyenne, contrairement à une exposition à la fois au stade larvaire et au stade adulte. En effet, la durée de vie moyenne des drosophiles exposées seulement pendant le stade larvaire est augmentée de 27 jours par rapport aux drosophiles exposées à la même dose tout au long de leur vie et rejoint la durée de vie moyenne des témoins exposés au DMSO (Figure 46, courbe larve). Cependant si on regarde l'allure globale de la courbe, on constate que les adultes commencent à mourir dès les premiers jours et au bout de 100 jours, seulement 57,8% des individus sont encore en vie. Cette situation est très différente de celle observée pour les groupes contrôles qui montrent presque 100% de survie jusqu'au jour 85. Il apparaît donc que l'exposition seulement au stade larvaire puisse en partie affecter la durée de vie de l'adulte. En comparant les drosophiles exposées seulement au stade adulte avec les drosophiles en présence constante de dieldrine (courbe 1 μ M), les mâles présentent une durée de vie plus longue de 12 jours (Figure 46, courbe adulte). Pour la durée de la vie, l'effet de la dieldrine apparaît plus important au stade adulte. De plus, on observe un effet cumulatif de l'effet de la dieldrine aux stades embryonnaire+larvaire puis au stade adulte qui provoque une réduction plus importante de la durée de vie chez les drosophiles exposées tout au long de la vie.

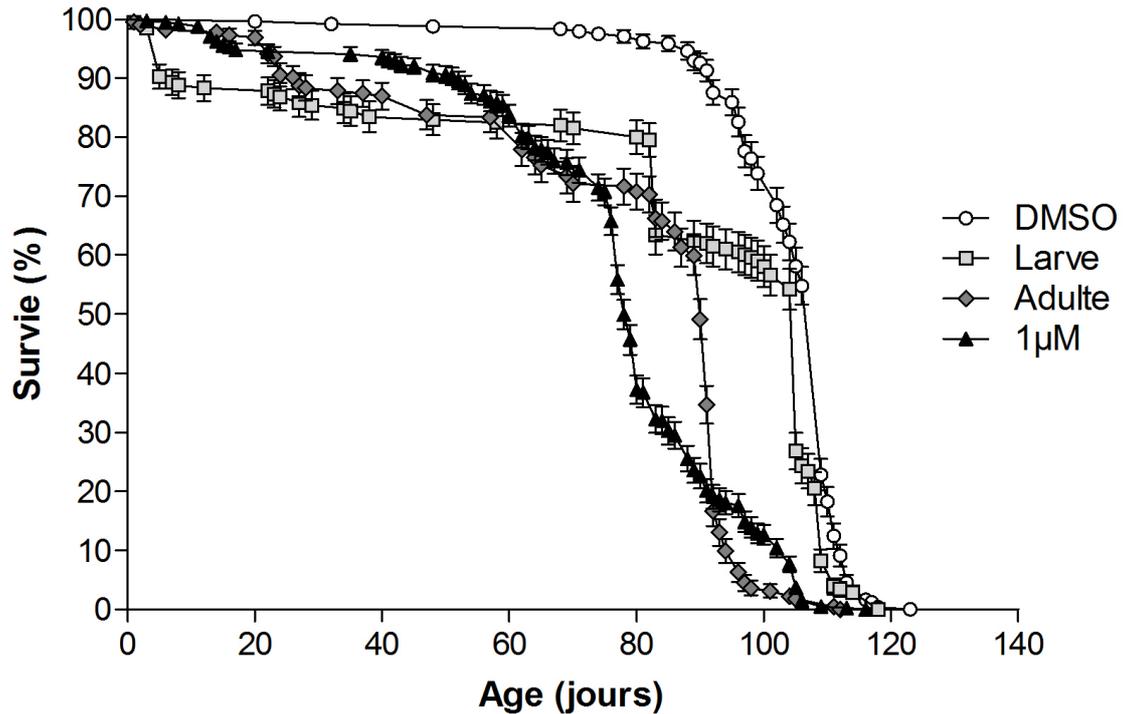


Figure 46: Durée de vie des mâles exposés à la dieldrine à différents stades de développement. Les mâles sont exposés à la dieldrine (1µM) tout au long de la vie (▲, n=403); uniquement au stade adulte (◆, n=222) ou uniquement au stade larvaire (■, n=205). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=241). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence un raccourcissement de la longévité des mâles exposés uniquement au stade larvaire, uniquement au stade adulte ou tout au long de la vie. Un effet cumulatif (effet de la dieldrine aux stade larvaire et stade adulte) est observé conduisant à une réduction plus importante de la longévité chez les mâles exposés tout au long de la vie.

Chez les femelles, les résultats sont presque identiques. L'exposition à la dieldrine au stade larvaire ne provoque pas une réduction de la durée de vie chez les femelles. La durée de vie moyenne est de 94 jours comparé au témoin où la durée de vie moyenne est de 91 jours (Figure 47), alors qu'une exposition tout au long de la vie conduit à une diminution de la durée de vie moyenne à 78 jours. Pour les drosophiles qui sont exposées uniquement au stade adulte, la durée de vie moyenne est réduite de 39 jours par rapport au témoin (50% de mortalité au jour 52 comparé au témoin: jour 91), mais est plus longue que pour les drosophiles exposées tout au long de leur vie. (Figure 47).

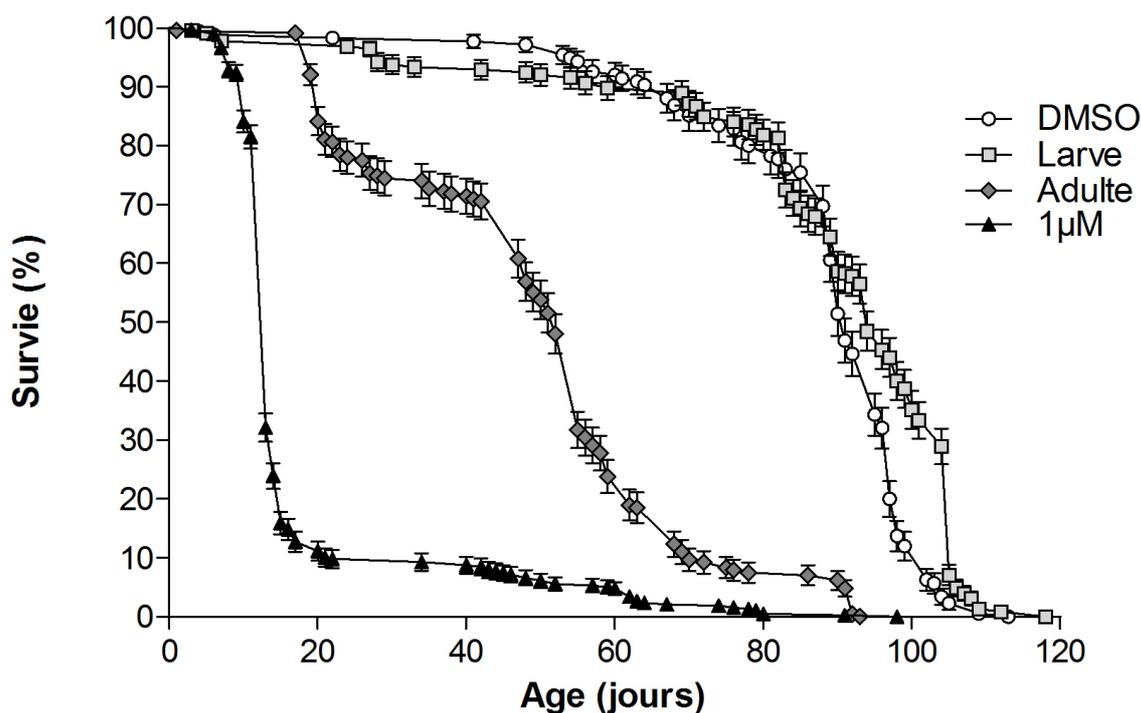


Figure 47: Durée de vie des femelles exposées à la dieldrine à différents stades de développement. Les femelles sont exposées à la dieldrine ($1\mu\text{M}$) tout au long de la vie (\blacktriangle , $n=377$); uniquement au stade adulte (\blacklozenge , $n=227$) ou uniquement au stade larvaire (\blacksquare , $n=225$). La courbe témoin correspond au DMSO (\circ , $n=175$). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence un raccourcissement de la longévité des femelles exposées à la dieldrine uniquement au stade adulte ou tout au long de la vie. L'exposition à la dieldrine au stade larvaire n'a pas d'effet sur la longévité des femelles.

De ces résultats, il ressort que c'est l'exposition au stade adulte qui semble affecter le plus la durée de vie moyenne. Toutefois, il faut remarquer que la simple exposition au stade adulte ne suffit pas à récapituler les résultats de l'exposition tout au long de la vie. Il faut donc imaginer qu'il y a un effet cumulatif de l'exposition au stade larvaire et au stade adulte.

Une explication simple de l'effet de la dieldrine sur la durée de vie moyenne, et surtout de l'effet prépondérant de l'exposition au stade adulte, pourrait être que les drosophiles adultes soient repoussées par la dieldrine et donc qu'elles s'alimentent moins. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé un test de préférence alimentaire.

III.1.4. Etude de l'effet de la dieldrine sur la prise de nourriture.

Dans cette étude nous avons regardé si les femelles avaient une préférence pour une nourriture qui ne contenait pas de dieldrine. Pour cela, un test a été réalisé en laissant le choix aux drosophiles pour se nourrir soit avec une solution contenant de la dieldrine soit avec une solution contenant uniquement le DMSO (concentration identique à celle présente dans la solution contenant l'insecticide). Chaque solution (DMSO ou dieldrine 1 μ M) contient également un colorant de couleur différente qui sert de marqueur. Un premier test a été réalisé sur 150 femelles en associant la dieldrine avec le colorant bleu. A la fin du test, les femelles présentes sur la microplaque sont récupérées puis triées en fonction de la couleur de leur abdomen. Sur 131 femelles testées, 121 présentent un abdomen coloré, 92,3% des drosophiles se sont donc nourries pendant l'expérience. La plupart des femelles présentent un abdomen de couleur noir (60,3%) ce qui signifie que ces drosophiles ont ingéré les deux solutions sans avoir de préférence. Seulement 32% des femelles n'ont pas ingéré les deux solutions: 20,6% des femelles ont un abdomen rouge (solution contenant le DMSO) et 11,4% des femelles ont un abdomen bleu (solution contenant la dieldrine) (Figure 48). L'index de préférence de la dieldrine est de 45%, ce qui signifie que les femelles n'ont pas de préférence particulière vis-à-vis de la solution de dieldrine ou de la solution de DMSO. Une deuxième expérience a ensuite été réalisée en associant cette fois-ci la dieldrine avec le colorant rouge. Les résultats sont similaires à la première expérience. Sur 140 femelles testées, 94,3% des drosophiles ont un abdomen coloré. Parmi les femelles ayant ingéré les solutions, 68,6% présentent un abdomen de couleur noir, ces femelles n'ont donc pas de préférence pour l'une des deux solutions. Enfin, 13,6% des femelles ont un abdomen bleu (solution contenant le DMSO) et 12,1% des femelles ont un abdomen rouge (solution contenant la dieldrine) (Figure 48). Pour cette expérience, l'index de préférence est de 49%. Il y a donc autant de femelles qui se nourrissent avec la solution contenant la dieldrine que de femelles qui se nourrissent avec la solution contenant seulement le DMSO. Ces tests mettent en évidence que les femelles ne sont pas repoussées par la présence de dieldrine dans le milieu. Un effet répulsif de la dieldrine ne peut donc pas rendre compte de la diminution de la durée de vie moyenne des drosophiles exposées.

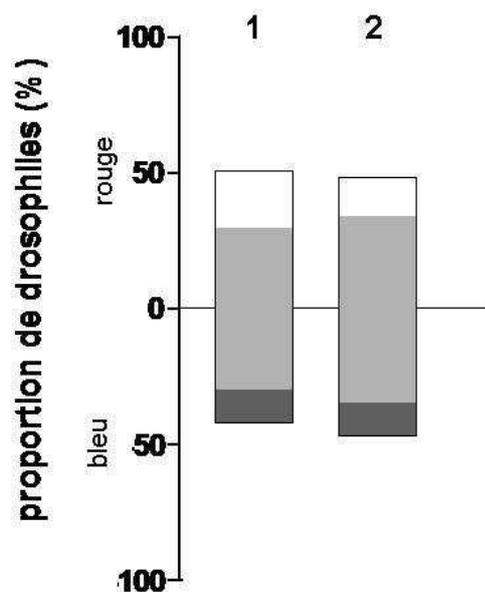


Figure 48: *Test de préférence alimentaire entre deux solutions contenant ou non la dieldrine. Les femelles sont assoiffées puis placées sur une microplaque contenant 2 solutions: une solution contient la dieldrine à 1 μ M et un colorant alimentaire (ex,bleu); l'autre solution contient le DMSO et un autre colorant alimentaire (ex, rouge). Les femelles sont ensuite classées selon 3 groupes en fonction de la couleur de leur abdomen, bleu (ingestion d'une seule solution, carré gris foncé), rouge (ingestion d'une seule solution, carré blanc) et noir (ingestion des 2 solutions, carré gris clair). Le graphique met en évidence une proportion majoritaire de femelles avec un abdomen noir (ingestion des 2 solutions), ce qui signifie que les femelles n'ont pas de préférence pour l'une des 2 solutions.*

III.2-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur l'activité locomotrice.

III.2.1. Effet de la dieldrine sur l'activité locomotrice.

Chez l'homme, la dieldrine peut être considérée comme un facteur de risque dans l'étiologie de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la maladie de Charcot ou la maladie d'Alzheimer (Weisskopf et al., 2010; Kamel et al., 2012; Singh et al., 2013). Les modèles pharmacologiques ou génétiques de la maladie de Parkinson développés chez la drosophile montrent en particulier des déficits de l'activité locomotrice (Feany et Bender, 2000; Sang et al., 2007; Wang et al., 2007; Auluck et al., 2002, Coulom et Birman, 2004). Nous avons donc voulu savoir si l'exposition à la dieldrine affectait également ce comportement locomoteur. Pour cela nous avons choisi de réaliser un test de géotaxie

négative. L'activité locomotrice est évaluée toutes les semaines sur une période de 40 jours en parallèle chez les mâles et chez les femelles.

Chez les mâles témoins, l'activité locomotrice est de 75,6% au jour 4 (Figure 49). Pour les mâles exposés à la dieldrine, l'activité locomotrice au jour 4 est de 68% pour la concentration de 0,1 μ M, de 82% pour la concentration de 0,5 μ M et de 63% pour la concentration de 1 μ M. Les différences observées ne sont pas significatives. L'activité locomotrice diminue ensuite pour tous les groupes (Figure 49) pour atteindre une valeur moyenne de 35% au jour 39 (DMSO: 33,8%; 0,1 μ M: 39,1%; 0,5 μ M: 30% et 1 μ M: 31,8%). Il apparaît que l'exposition des mâles à la dieldrine n'induit pas d'effet significatif sur l'activité locomotrice ($p > 0,05$, test de Tukey).

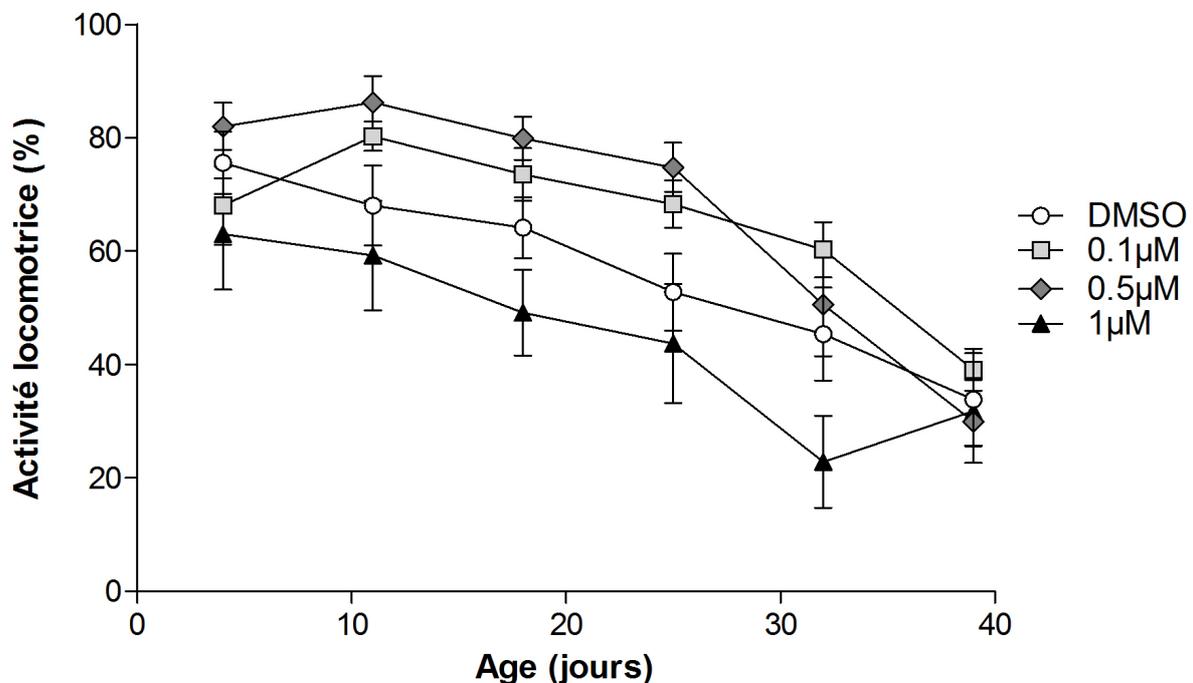


Figure 49: *Evaluation de l'activité locomotrice des mâles exposés à la dieldrine. Les mâles sont élevés tout au long de la vie en présence de différentes concentrations de dieldrine: 0,1 μ M (■, n=70); 0,5 μ M (◆, n=70) et 1 μ M (▲, n=70). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=77). L'activité locomotrice est mesurée toute les semaines dans un environnement spécifique (voir matériel et méthodes) et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique montre que l'exposition à la dieldrine des mâles n'affecte pas leur activité locomotrice.*

Chez les femelles, les résultats sont très différents. Les témoins présentent une activité locomotrice de 79,6% au jour 4, ce qui est semblable au résultat obtenu chez les mâles (Figure 49). Pour les femelles exposées à la dieldrine aux doses 0,1 μ M et 0,5 μ M, l'activité locomotrice est respectivement de 80,3% et 89,7% au jour 4 et donc comparable à l'activité locomotrice des témoins (Figure 50). Puis elle décroît au cours du temps de la même manière que pour les témoins (DMSO: 19,5%; 0,1 μ M: 21,3%; 0,5 μ M: 12,7% au jour 39) (Figure 50). Au contraire, pour une exposition à la dose de 1 μ M, le comportement locomoteur est très affecté. En effet, dès le jour 4, l'activité locomotrice est réduite de manière significative ($p < 0,001$; test de Tukey), puisque seulement 42,1% des drosophiles sont capables d'atteindre le haut du tube (Figure 50). Cette réduction de l'activité locomotrice persiste tout au long du test de climbing (Figure 50). L'exposition aux insecticides peut donc avoir un impact sur le comportement locomoteur chez les femelles.

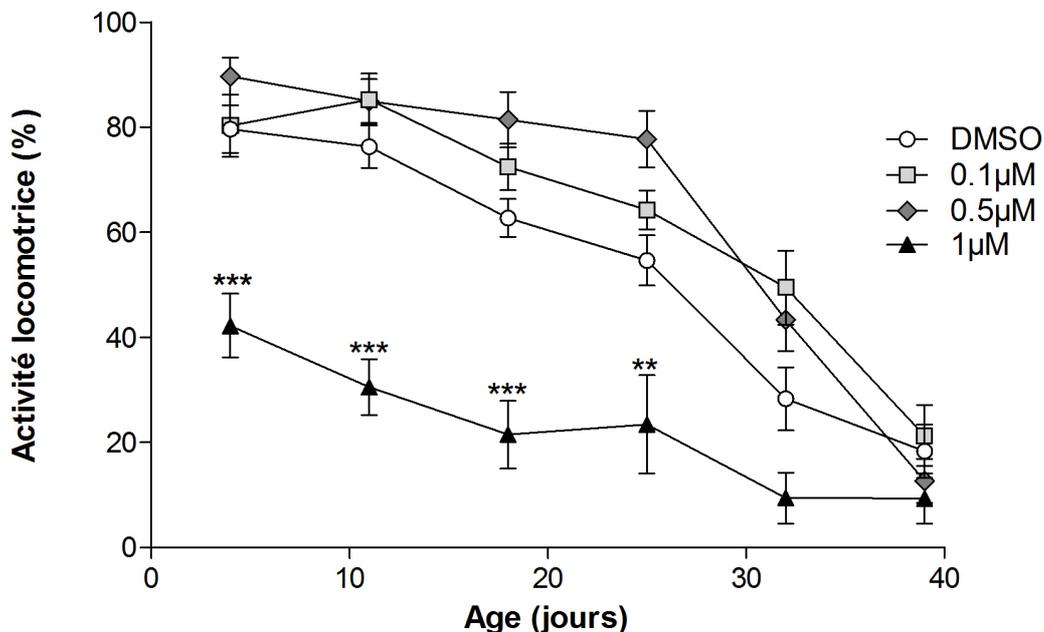


Figure 50: Evaluation de l'activité locomotrice des femelles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie en présence de différentes concentrations de dieldrine: 0,1 μ M (\blacksquare , n=70); 0,5 μ M (\blacklozenge , n=70) et 1 μ M (\blacktriangle , n=77). La courbe témoin correspond au DMSO (\circ , n=84). L'activité locomotrice est mesurée toute les semaines dans un environnement spécifique (voir matériel et méthodes) et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique montre que l'exposition à la dieldrine des femelles pour la dose 1 μ M affecte de manière significative leur activité locomotrice. Les étoiles indiquent une différence significative (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; test de Tukey).

Ces résultats montrent que l'exposition à la dieldrine n'a pas d'effet sur l'activité locomotrice chez les mâles, même pour la plus forte dose. Au contraire, chez les femelles, on observe un effet très important pour la dose la plus élevée. On peut donc dès à présent remarquer que la dieldrine a des effets très différents en fonction du sexe des individus.

III.2.2. Exposition à la dieldrine chez la larve ou l'adulte: effet sur l'activité locomotrice.

Durant les expériences sur la durée de vie des drosophiles, l'exposition à la dieldrine durant le stade adulte avait un impact plus important que l'exposition à la dieldrine au stade larvaire. Il est donc intéressant de regarder si on observe le même type de résultat pour l'activité locomotrice. Ces expériences ont été réalisées uniquement chez les femelles car la dieldrine n'affecte pas l'activité locomotrice chez les mâles.

Chez les femelles, l'exposition à la dose la plus forte (1 μ M) provoque une diminution importante de l'activité locomotrice (Figure 50). Nous avons donc exposé les femelles à cette dose seulement à l'âge adulte ou durant le stade larvaire. Les résultats obtenus pour les femelles sont présentés sur la figure 51. Pour les femelles exposées durant le stade adulte, on n'observe pas de différence significative avec le témoin DMSO pour tous les âges du test ($p > 0,05$; test de Tukey). Pour les femelles exposées au stade larvaire on observe une réduction de l'activité locomotrice comparée au témoin dès 4 jours (Figure 51). En effet, ces femelles présentent une activité de 47,9% alors que le témoin présente une activité de 79,6% ($p < 0,01$; test de Tukey). Cette différence est similaire à celle observée au jour 4 pour les femelles exposées tout au long de leur vie à l'insecticide. Cependant, on constate que l'activité locomotrice des femelles exposées juste pendant le stade larvaire est stable au cours du temps, alors qu'elle continue à diminuer pour les femelles exposées tout au long de leur vie (Figure 51). L'exposition à la dose 1 μ M chez la larve provoque donc une perturbation du comportement locomoteur chez les femelles adultes. Si ces adultes continuent à être en présence de l'insecticide, le comportement locomoteur est d'autant plus affecté.

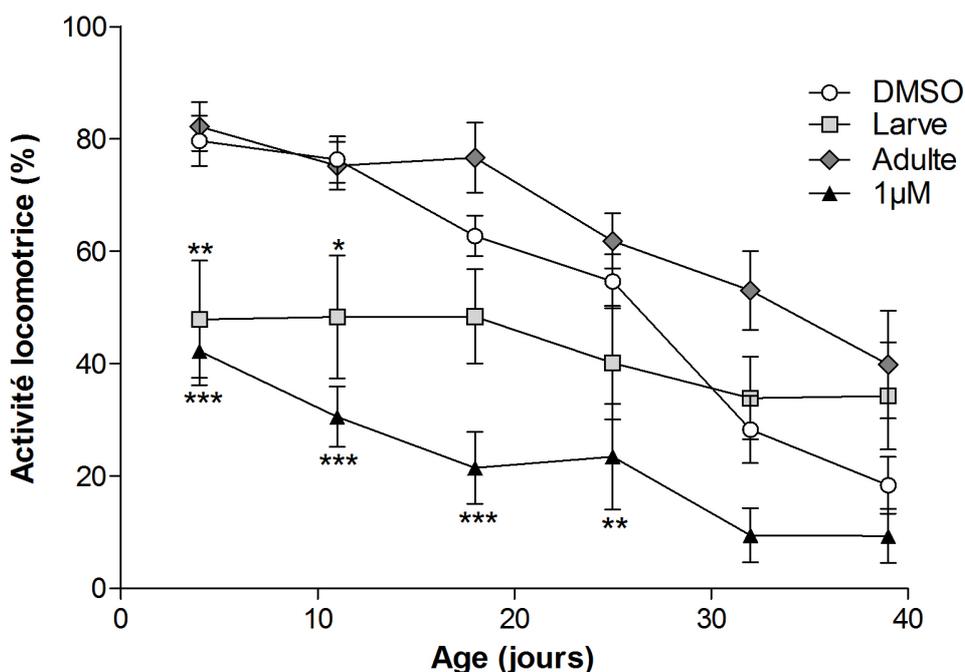


Figure 51: Evaluation de l'activité locomotrice des femelles exposées à la dieldrine à différents stades de développement. Les femelles sont exposées à la dieldrine (1µM) tout au long de la vie (▲, n=77), uniquement à l'âge adulte (◆, n=63) ou uniquement au stade larvaire (■, n=77). La courbe témoin correspond au DMSO (○, n=84). L'activité locomotrice est mesurée toute les semaines dans un environnement spécifique (voir matériel et méthodes) et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique montre que l'exposition à la dieldrine (1µM) des femelles tout au long de la vie ou uniquement au stade larvaire affecte de manière significative leur activité locomotrice. Les étoiles indiquent une différence significative (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; test de Tukey).

L'exposition à la dieldrine provoque donc des effets néfastes sur la durée de vie et sur le comportement locomoteur de ces insectes. Ces effets sont très importants chez les femelles exposées à la dose de 1µM avec une réduction de 4 fois de la durée de vie et une réduction de moitié pour l'activité locomotrice. Ces données physiologiques (durée de vie, activité locomotrice) sont souvent associées à une dégénérescence du système nerveux. De plus, la dieldrine est un insecticide neurotoxique. Il est donc légitime de s'interroger sur la structure du cerveau des drosophiles exposées à la dieldrine en particulier les femelles exposées à 1µM. C'est pourquoi, les expériences suivantes seront réalisées chez les femelles exposées à la dieldrine (1µM) tout au long de leur vie.

III.3-Exposition chronique à la dieldrine: neurodégénérescence?

La dieldrine est un insecticide neurotoxique et il a été montré qu'il était toxique en particulier pour les neurones dopaminergiques. De plus, la dieldrine est potentiellement impliquée dans la maladie de Parkinson dont une des caractéristiques est une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire chez l'homme. Chez la drosophile, certains neurones dopaminergiques seraient impliqués dans le comportement locomoteur (White et al., 2010; Kong et al., 2010). Nous avons donc, dans un premier temps, voulu savoir si les neurones dopaminergiques étaient impliqués dans la toxicité induite par la dieldrine. Pour cela nous avons regardé (i) l'effet d'un apport dans le milieu de L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) qui est un précurseur de la voie de biosynthèse de la dopamine, utilisé en clinique pour le traitement de la maladie de Parkinson, (ii) l'effet de la dieldrine sur le nombre de neurones dopaminergiques dans le cerveau de la larve et de l'adulte.

III.3.1. Effet de la L-DOPA sur l'activité locomotrice.

Nous avons donc étudié l'effet de la L-DOPA sur l'activité locomotrice des femelles exposées à la dieldrine. En effet, une étude menée chez la drosophile exposée à la roténone montrait un déficit locomoteur qui pouvait être restauré par un ajout de L-DOPA dans le milieu d'élevage (Coulom et Birman, 2004). En se basant sur cette étude, les femelles de la souche Oregon-R sont donc exposées simultanément à la dieldrine (1 μ M) et à la L-DOPA (1mM). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 52.

L'exposition des drosophiles à la L-DOPA seule n'induit pas d'effets sur l'activité locomotrice comparée au témoin (DMSO) (Figure 52). En effet, l'activité locomotrice des femelles exposées au DMSO ou à la L-DOPA (1mM) est de 80% (76,3% et 82,2% respectivement). La baisse d'activité locomotrice induite par l'exposition à la dieldrine est en grande partie sauvée par l'apport de L-DOPA 1mM. Les femelles exposées uniquement à la dieldrine (1 μ M) présentent une activité locomotrice de seulement 30,5%, alors qu'après ajout de L-DOPA on observe une activité locomotrice de 75,1%, comparable à celle trouvée chez les témoins. La différence d'activité locomotrice est significative entre les deux groupes ($p < 0,001$, test de Tukey; Figure 52). On peut donc en conclure que la L-DOPA permet d'améliorer la performance des drosophiles femelles exposées à la dieldrine. Ce résultat suggère que la dieldrine a un effet sur les neurones dopaminergiques.

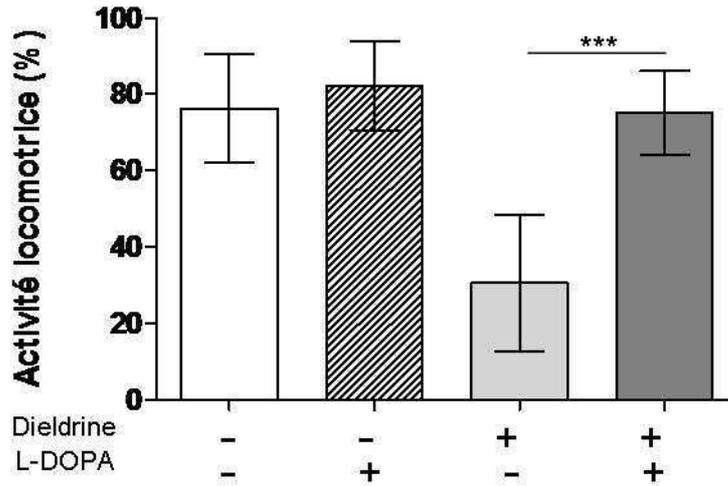


Figure 52: La L-DOPA restaure le phénotype locomoteur des femelles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie soit en absence de dieldrine et de L-DOPA (- -, n=84), soit en présence de L-DOPA 1mM (- +, n=98), soit en présence de dieldrine 1µM (+ -, n=77) ou soit en présence de dieldrine 1µM et de L-DOPA 1mM (+ +, n=91). L'activité locomotrice a été mesurée sur des femelles âgées de 11 jours et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles indiquent une différence significative (***) $p < 0,001$; test de Tukey).

III.3.2. Effet de la dieldrine sur le nombre de neurones dopaminergiques.

Pour visualiser les neurones dopaminergiques nous avons utilisé le système *UAS-Gal4* pour exprimer spécifiquement la GFP dans les neurones dopaminergiques grâce au driver *TH-Gal4* (*TH-Gal4* × *UAS-mCD8::GFP*). La tyrosine hydroxylase (TH) est une protéine impliquée dans la biosynthèse de la dopamine et est exprimée spécifiquement dans les neurones dopaminergiques (Friggi-Grelin et al., 2003). Un marquage avec des anticorps dirigés contre la GFP a permis d'identifier les différents neurones dopaminergiques présents chez la larve et chez l'adulte.

III.3.2.1. Les neurones dopaminergiques chez la larve.

Les larves de III^{ème} stade femelles sont récupérées et gardées pour réaliser la dissection du cerveau et l'immunohistochimie. Après marquage avec des anticorps dirigés contre la GFP on obtient les images présentées sur la figure 53. On distingue les différents clusters de neurones

dopaminergiques aussi bien pour le groupe non exposé (DMSO) que pour le groupe exposé (dieldrine, 1 μ M).

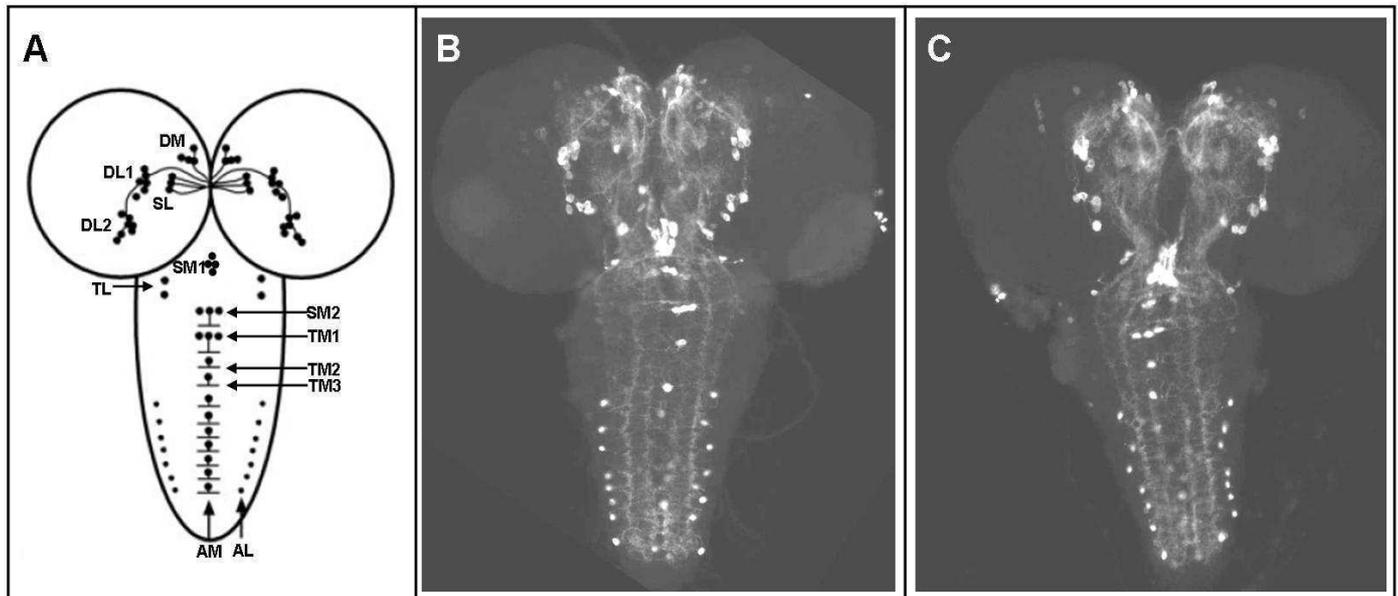


Figure 53: Les neurones dopaminergiques dans le cerveau des larves de III^{ème} stade exposées à la dieldrine (*TH-Gal4>UAS-mCD8::GFP*). (A) Schéma de la localisation des neurones dopaminergiques dans le cerveau de la larve de III^{ème} stade, d'après Friggi-Grelin et al., 2003. (B, C) Les larves sont élevées sur un milieu contenant ou non de la dieldrine (1 μ M). Les cerveaux des larves de III^{ème} stade (*TH-Gal4>UAS-mCD8::GFP*, expression spécifique de la GFP dans les neurones dopaminergiques) sont ensuite disséqués puis une immunohistochimie est réalisée pour mettre en évidence la présence de GFP. (B) Visualisation des neurones dopaminergiques du cerveau des larves témoins (DMSO, n=19). (C) Visualisation des neurones dopaminergiques du cerveau des larves exposées à la dieldrine (1 μ M, n=16). (Axio Observer Z1; Plan Apo chromat 20 \times , ON=0,75; Carl Zeiss, SAS).

J'ai alors compté le nombre de neurones dopaminergiques correspondant à chaque cluster pour les cerveaux de larves exposées ou non à la dieldrine. Les résultats sont présentés sur la figure 54. On constate que quelque soit le cluster considéré le nombre de neurones dopaminergiques ne varie pas entre les cerveaux des larves exposées et non exposées à la dieldrine. Le nombre de neurones dopaminergiques est en moyenne de 57,8 \pm 2,0 pour le groupe témoin (comptage réalisé sur 19 cerveaux) et de 59,6 \pm 1,8 (comptage réalisé sur 16 cerveaux) pour le groupe exposé à la dieldrine. Il n'y a donc pas de différence significative entre le groupe témoin et le groupe exposé à la dieldrine ($p > 0,05$; test de Tukey).

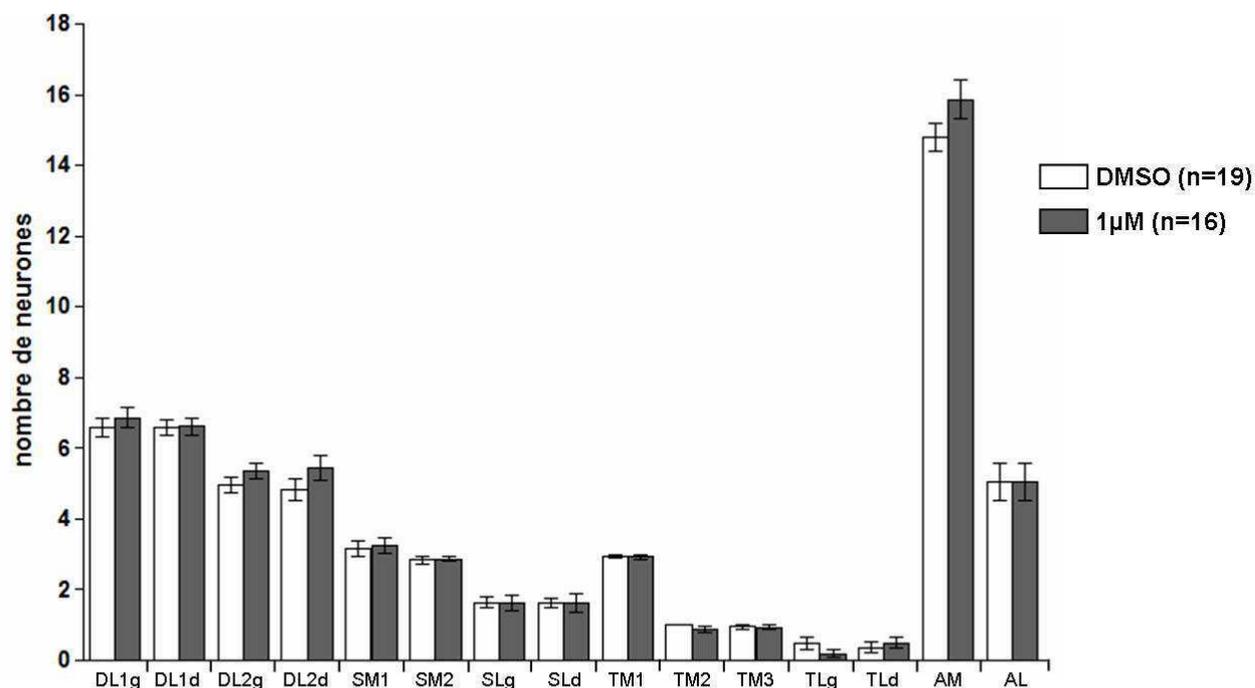


Figure 54: Quantification du nombre de neurones dopaminergiques dans le cerveau de la larve. Les larves sont élevées sur un milieu contenant ou non de la dieldrine (1µM). Les cerveaux des larves de III^{ème} stade (*TH-Gal4>UAS-mCD8::GFP*) sont ensuite disséqués puis une immunohistochimie est réalisée pour visualiser les neurones dopaminergiques. Pour tous les cerveaux analysés (larves témoin n=19, larves exposées à la dieldrine n=16), le nombre de neurones de chaque cluster est noté. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne.

III.3.2.2. Les neurones dopaminergiques chez l'adulte.

La même expérience que précédemment a été réalisée, mais cette fois, le nombre de neurones dopaminergiques a été évalué dans le cerveau des drosophiles adultes âgées de 5 ou 10 jours et exposées ou non à la dieldrine tout au long de leur vie.

Pour le cerveau des femelles âgées de 5 jours, les images obtenues sont présentées sur la figure 55 (groupe témoin, n=32 et groupe exposé à la dieldrine, n=27). On est capable de visualiser les différents clusters de neurones dopaminergiques (Figure 55A). Ensuite nous avons essayé d'évaluer les variations du nombre de neurones dopaminergiques. Un comptage précis n'a pas pu être réalisé à partir de mes images. Cependant, une diminution des neurones dopaminergiques a pu être constatée au niveau du cluster PPM3 pour 40,7% des cerveaux des femelles exposées à la dieldrine (Figure 55B et C).

Pour le cerveau des femelles âgées de 10 jours, on observe également une perte de neurones dopaminergiques au niveau du cluster PPM3 dans 30,8% des cas (groupe témoin, n=29 et groupe exposé à la dieldrine, n=26).

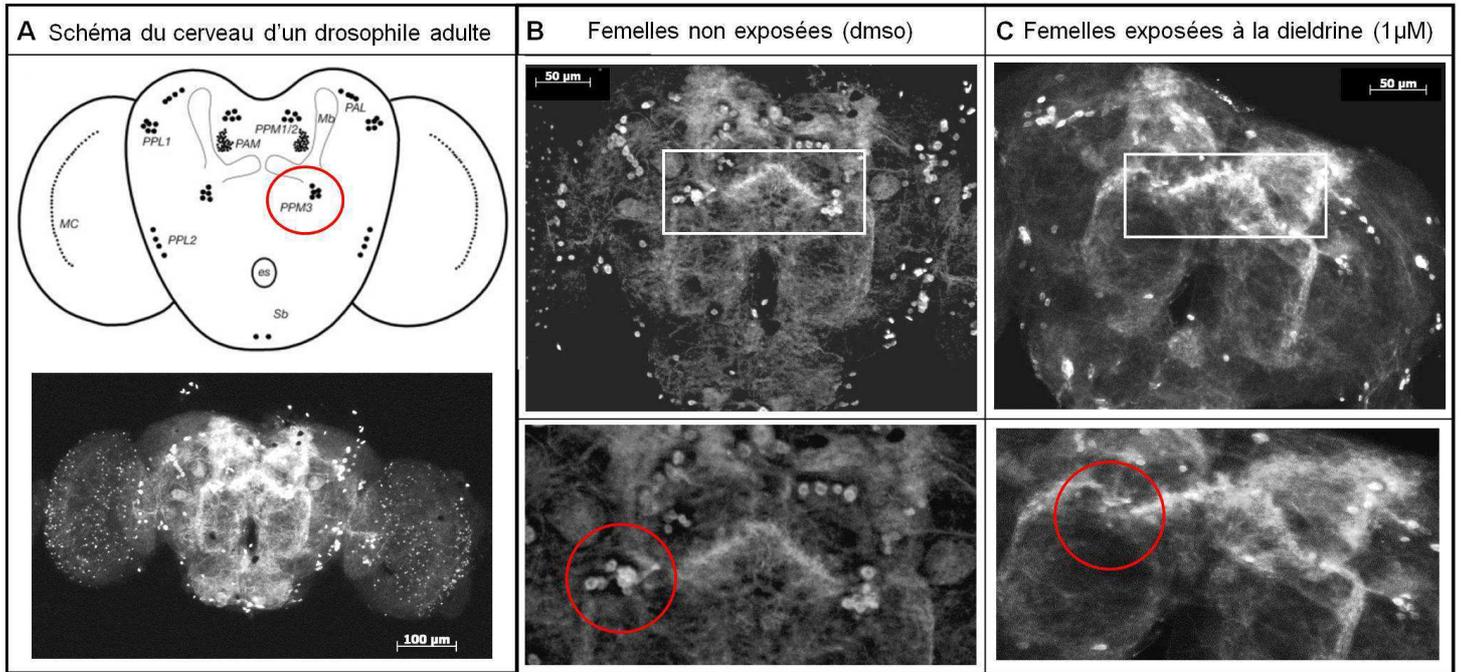


Figure 55: Les neurones dopaminergiques du cerveau adulte des femelles exposées à la dieldrine. (*TH-Gal4>UAS-mCD8::GFP*). (A) Schéma de la localisation des différents clusters de neurones dopaminergiques du cerveau de l'adulte comparé à une image obtenue pour un cerveau entier (d'après Friggi-Grelin et al., 2003). (B, C) Les femelles sont élevées sur un milieu contenant ou non de la dieldrine ($1\mu\text{M}$). Les cerveaux des adultes âgés de 5 jours (*TH-Gal4>UAS-mCD8::GFP*, expression spécifique de la GFP dans les neurones dopaminergiques) sont ensuite disséqués puis une immunohistochimie est réalisée pour mettre en évidence la présence de GFP. (B) Visualisation des neurones dopaminergiques du cerveau des femelles non exposées (DMSO, $n=32$). (C) Visualisation des neurones dopaminergiques du cerveau des femelles exposées à la dieldrine ($1\mu\text{M}$, $n=27$). Le cercle rouge montre une perte de neurones dopaminergiques (cluster PPM3) pour le cerveau de femelles exposées à la dieldrine. (Axio Observer Z1; Plan Apo chromat 20 \times , ON=0,75; Carl Zeiss, SAS).

III.3.3. Imagerie par Résonance Magnétique: structure globale du cerveau des drosophiles.

L'analyse précédente par microscopie optique nous a permis de mettre en évidence un déficit au niveau des neurones dopaminergiques après exposition à la dieldrine. Cependant ceci ne nous a pas permis de savoir s'il y avait d'autres modifications sur la structure du cerveau. Nous avons alors décidé d'utiliser la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM). En effet, cette technique peut être utilisée pour visualiser la structure du cerveau chez la drosophile.

L'étude a été menée sur des drosophiles exposées ou non à la dieldrine âgées de 5 ou 10 jours. Les premières images que nous avons obtenues avaient une résolution de $10.10.80\mu\text{m}$ pour un

temps d'acquisition de 1h30. Pour chaque cerveau un ensemble de 5 coupes a été obtenu. Chaque coupe a été analysée visuellement pour rechercher des différences entre les cerveaux exposés et les cerveaux témoins. Dans une majorité de cerveaux exposés, des anomalies de signal ont été constatées au niveau de 2 coupes qui sont présentées sur la figure 56. On constate une baisse de signal dans une région du cerveau pour les femelles âgées de 5 jours exposées à la dieldrine. Cette baisse de signal est aussi retrouvée chez les femelles âgées de 10 jours dans la même région du cerveau mais elle apparaît plus importante. Une baisse du signal (avec la séquence particulière utilisée) peut être synonyme soit d'une diminution de la concentration en eau dans la région considérée soit d'une augmentation de la mobilité des molécules d'eau. Dans tous les cas il s'agit d'une modification certaine de la structure tissulaire de la région considérée pouvant être signe de neurodégénérescence.

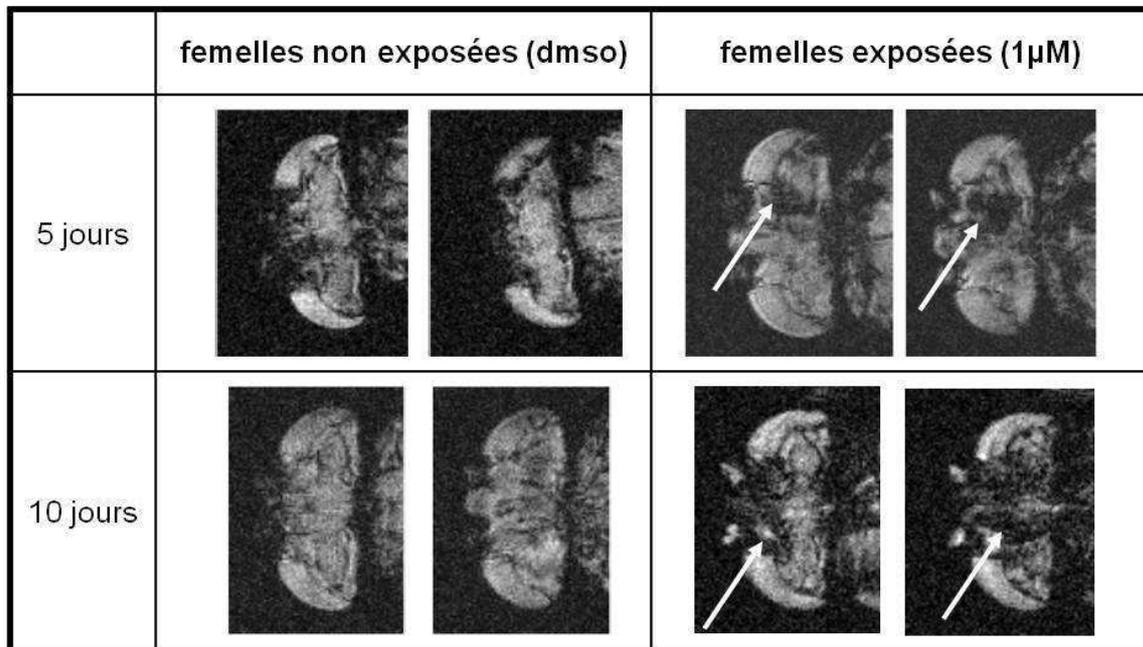


Figure 56: Images IRM permettant de visualiser la structure du cerveau des drosophiles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie soit en absence (DMSO) ou en présence de dieldrine 1 μ M. Les drosophiles, âgées de 5 ou 10 jours, sont introduites dans un capillaire rempli d'huile fluorocarbonée puis l'ensemble est placé dans un spectromètre 9,4T. La résolution des images obtenues est de 10.10.80 μ m pour un temps d'acquisition de 1h30. Les flèches blanches mettent en évidence les défauts dans la structure du cerveau des femelles exposées à la dieldrine.

Nous avons essayé d'améliorer la résolution des images pour pouvoir préciser les régions affectées. Pour cela, une autre séquence d'acquisition permettant d'obtenir des images avec une résolution plus fine (10.10.20 μ m) a été mise en place (temps d'acquisition 4h). Cette

nouvelle séquence d'impulsions a généré un ensemble de 25 coupes pour chaque cerveau imagé. Cette étude a permis d'annoter certaines structures du cerveau visibles en IRM (Figure 57). On distingue le protocerebrum, la lamina, les lobes antennaires (centre de traitement de l'olfaction) ou encore le ganglion sub-oesophagien (centre de traitement de la gustation).

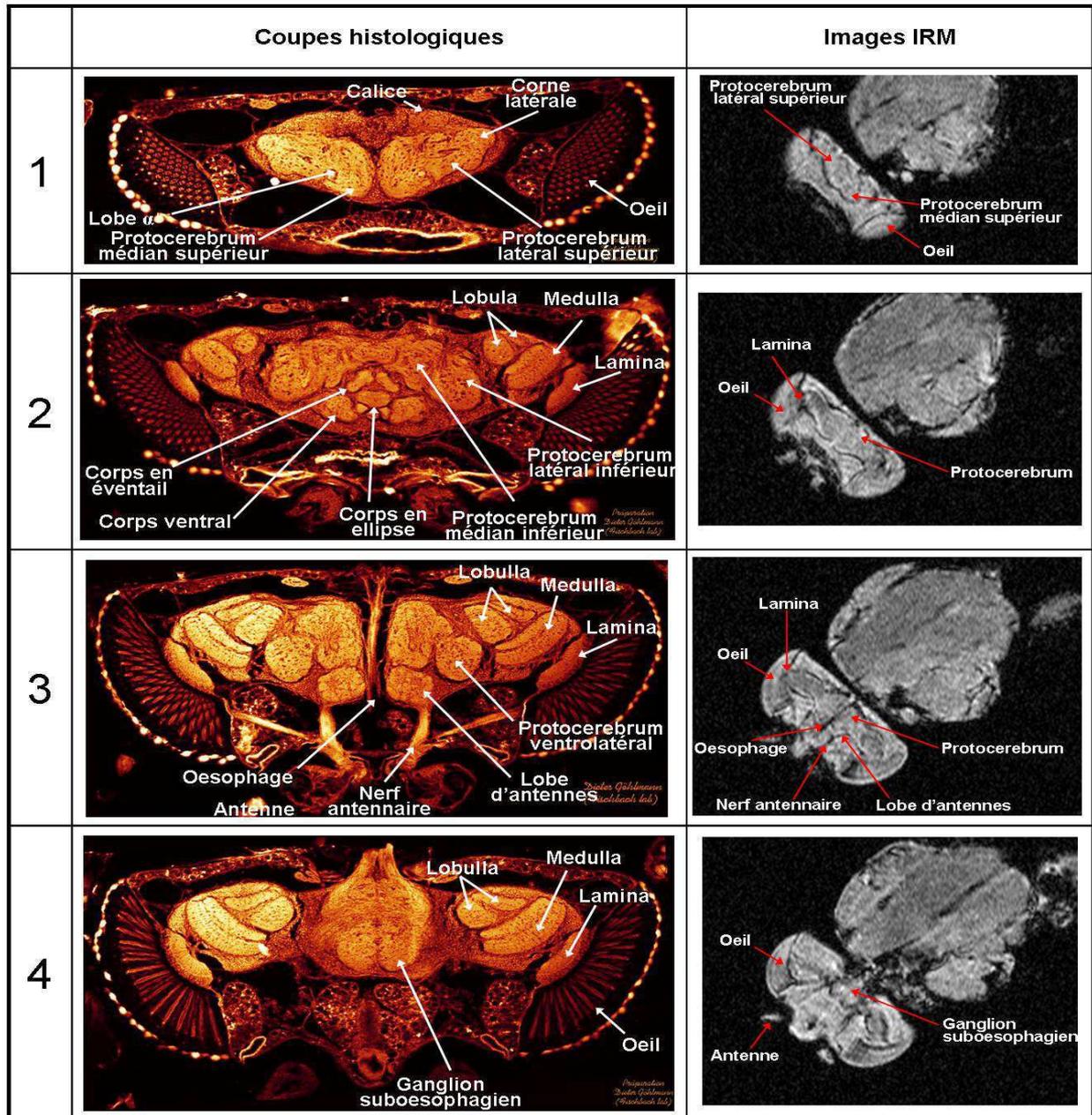


Figure 57: Annotation des différentes structures du cerveau de la drosophile visibles en IRM. Les coupes histologiques (7µm d'épaisseur) ont été obtenues sur le site de l'université de Freiburg (<http://filab.biologie.uni-freiburg.de/Atlas/text/paraffinFi.html>). Les images IRM ont été obtenues à partir d'une drosophile âgée de 10 jours introduite dans un capillaire rempli d'huile fluorocarbonée puis l'ensemble est placé dans un spectromètre 9,4T. La résolution des images IRM est de 10.10.20µm pour un temps d'acquisition de 4 heures. Les flèches mettent en évidence les différentes structures du cerveau de la drosophile.

Cette séquence d'impulsions a alors été utilisée pour l'étude des cerveaux des drosophiles exposées ou non à la dieldrine âgées de 5 ou 10 jours. Nous avons à nouveau analysé visuellement chaque coupe obtenue pour les 2 cerveaux témoins et les 4 exposés qui ont été imagés. Cette étude a révélé des anomalies en général dans 4 coupes sur les 25 pour les cerveaux des drosophiles âgées de 5 jours exposées à la dieldrine (en comparaison avec les cerveaux témoins) (figure 58). On obtient cette fois des images avec une meilleure définition du cerveau de la drosophile. On peut ainsi définir les structures affectées chez les femelles exposées à la dieldrine: la medulla et le protocerebrum (Figure 58).

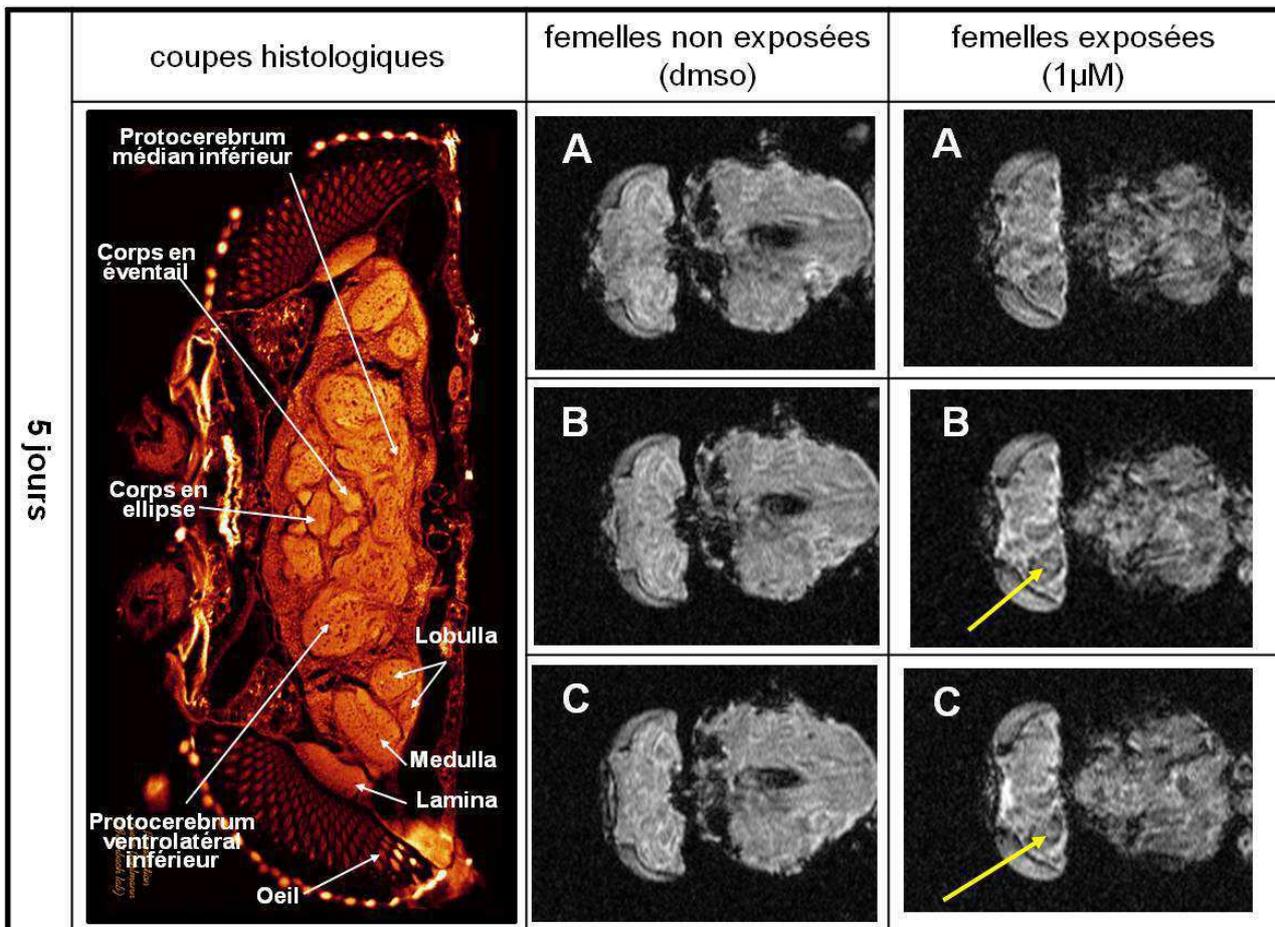


Figure 58: Images IRM permettant de visualiser la structure du cerveau des drosophiles, âgées de 5 jours, exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie soit en absence (DMSO) ou en présence de dieldrine 1µM. Les drosophiles, âgées de 5 jours, sont introduites dans un capillaire rempli d'huile fluorocarbonée puis l'ensemble est placé dans un spectromètre 9,4T. La résolution des images est de 10.10.20µm pour un temps d'acquisition de 4 heures. Les lettres A, B, C correspondent à des coupes différentes du cerveau de la même drosophile. Les flèches jaunes montrent les modifications dans la structure du cerveau des femelles exposées à la dieldrine. Le protocerebrum, la medulla sont altérés après l'exposition à la dieldrine.

Pour les femelles âgées de 10 jours, les images obtenues pour 1 cerveau témoin et 4 exposés ont été analysées. On observe une zone d'hyposignal pour les femelles exposées à la dieldrine (Figure 59). Les structures affectées sont le protocerebrum, le lobe antennaire et la medulla. Les défauts dans la structure du cerveau de la drosophile âgée de 10 jours apparaissent plus importants que chez la drosophile âgée de 5 jours. Les femelles exposées à la dieldrine présentent donc une modification de la structure du cerveau qui devient plus importante avec l'âge. De plus cette modification signifie la présence d'un tissu moins dense qui pourrait résulter d'une neurodégénérescence.

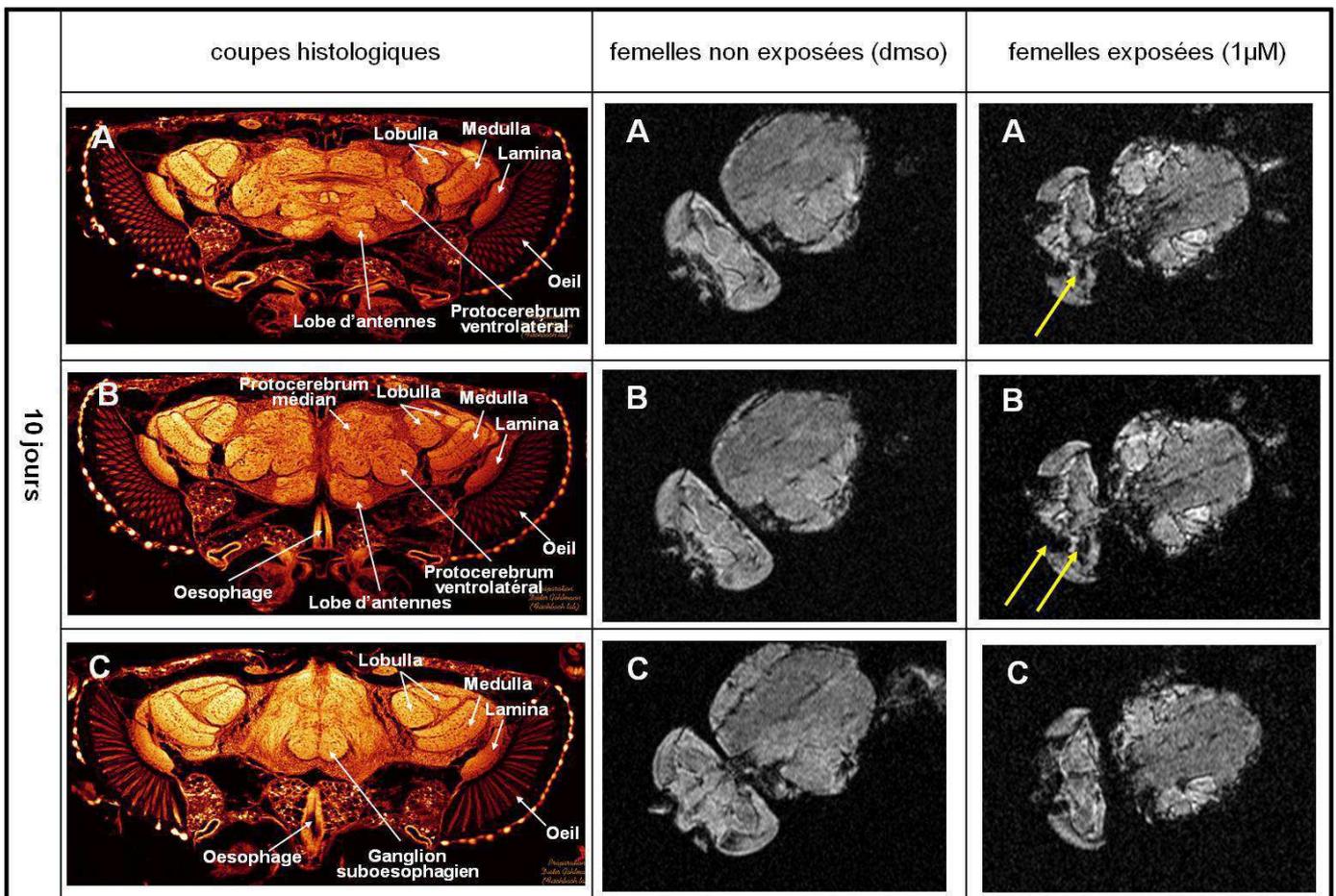


Figure 59: Images IRM permettant de visualiser la structure du cerveau des drosophiles âgées de 10 jours, exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie soit en absence (DMSO) ou en présence de dieldrine 1 μ M. Les drosophiles, âgées de 10 jours, sont introduites dans un capillaire rempli d'huile fluorocarbonée puis l'ensemble est placé dans un spectromètre 9,4T. La résolution des images est de 10.10.20 μ m pour un temps d'acquisition de 4 heures. Les lettres A, B, C correspondent à des coupes différentes du cerveau de la même drosophile. Les flèches jaunes montrent les modifications dans la structure du cerveau. Le protocerebrum, la medulla et les lobes antennaires sont altérés après l'exposition à la dieldrine.

La résolution des images IRM a été améliorée au laboratoire permettant une première annotation des structures du cerveau de la drosophile sur les images. Nous avons pu ainsi déterminer les structures du cerveau affectées chez les femelles exposées à la dieldrine : la medulla, le protocerebrum et le lobe antennaire. Ces structures sont impliquées dans le traitement d'informations concernant l'olfaction (lobe antennaire), la vue (la medulla) et la locomotion (protocerebrum). Le protocerebrum est composé de plusieurs structures dont le complexe central impliqué dans le contrôle de la locomotion chez la drosophile (Strauss, 2002). Nous pouvons faire l'hypothèse que la réduction de l'activité locomotrice chez les femelles exposées à la dieldrine est due à une perturbation des structures du cerveau impliquées dans la locomotion.

L'exposition à la dieldrine provoque donc une dégénérescence de certains neurones dopaminergiques (cluster PPM3) chez la drosophile à l'âge adulte. L'étude par IRM a également mis en évidence un défaut dans la structure de certaines parties du cerveau comme le protocerebrum ou le lobe antennaire. La neurodégénérescence et la modification de la structure du cerveau peuvent conduire à des désordres dans le fonctionnement et le métabolisme du cerveau. Nous avons donc voulu déterminer si ces deux phénomènes s'accompagnaient d'une perturbation du métabolisme chez les drosophiles exposées à la dieldrine.

III.4-Exposition chronique à la dieldrine: conséquences sur le métabolisme.

Nous nous sommes posé la question de savoir si l'exposition à la dieldrine se traduisait par une modification du métabolisme. Pour répondre à cette question nous avons utilisé une technique particulière de RMN: la technique HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning). Cette technique permet l'obtention de spectres RMN avec une haute résolution de manière non invasive et *in vivo* (Righi et al., 2010). Elle combine la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) et la rotation de l'échantillon (HRMAS). Les drosophiles sont placées dans un rotor spécifique qui va être introduit dans le spectromètre (Figure 60A). La rotation à 2630Hz du rotor est ensuite effectuée à un angle particulier ($54,7^\circ$) de l'axe du champ magnétique permanent encore appelé angle magique (Figure 60B). Cette technique permet de se libérer partiellement des problèmes liés à l'hétérogénéité du substrat, se

traduisant par une augmentation du rapport signal sur bruit et de la résolution du spectre de haute résolution ainsi obtenu.

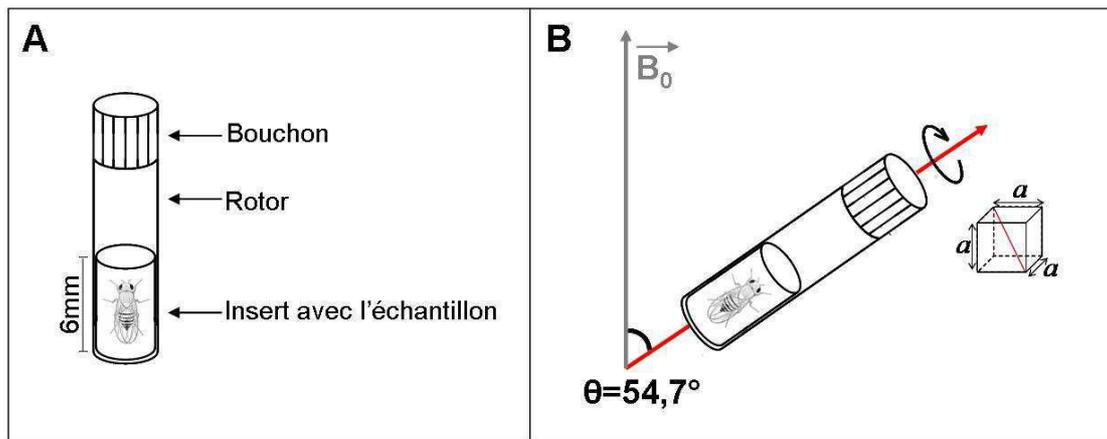


Figure 60: Dispositif utilisé pour les expériences de spectroscopie HRMAS. (A) Schéma du rotor utilisé durant les expériences. La drosophile est introduite dans un insert lui-même placé dans le rotor fermé par un bouchon. (B) Positionnement schématique du dispositif (rotor, insert, drosophile) dans le spectromètre 17,6T (B_0) à l'angle magique ($\theta=54,7^\circ$).

Cette étude a été menée en duo avec un autre doctorant de l'équipe, Nicolas Joudiou. Les expériences ont été réalisées sur des groupes de 10 drosophiles exposées ou non à la dieldrine ($1\mu\text{M}$) et à des âges différents (5, 10 et 20 jours). Nous avons obtenu des spectres "mouche entière" pour un temps d'acquisition de 20 minutes. Pour les témoins, les spectres obtenus correspondent à la figure 61 quelque soit l'âge.

Sur le spectre obtenu, on observe des pics qui correspondent à des petits métabolites, à des acides gras ou encore à des sucres. Les spectres sont tout d'abord normalisés en utilisant la méthode PULCON disponible sur les spectromètres Bruker (Wider and Dreier, 2006). L'identification des signaux a été obtenue classiquement, à partir d'une expérience de RMN à 2 dimensions homonucléaire TOBSY (Andronesi et al., 2008) et par comparaison avec la littérature (Righi et al., 2010). On peut noter que les pics les plus importants correspondent aux acides gras. Un agrandissement de la zone (de 2,5 à 6ppm) permet de visualiser les différentes espèces présentes comme la β -alanine, la phosphocholine (PhC), la phosphoéthanolamine (PhEth) ou encore la taurine (Figure 61).

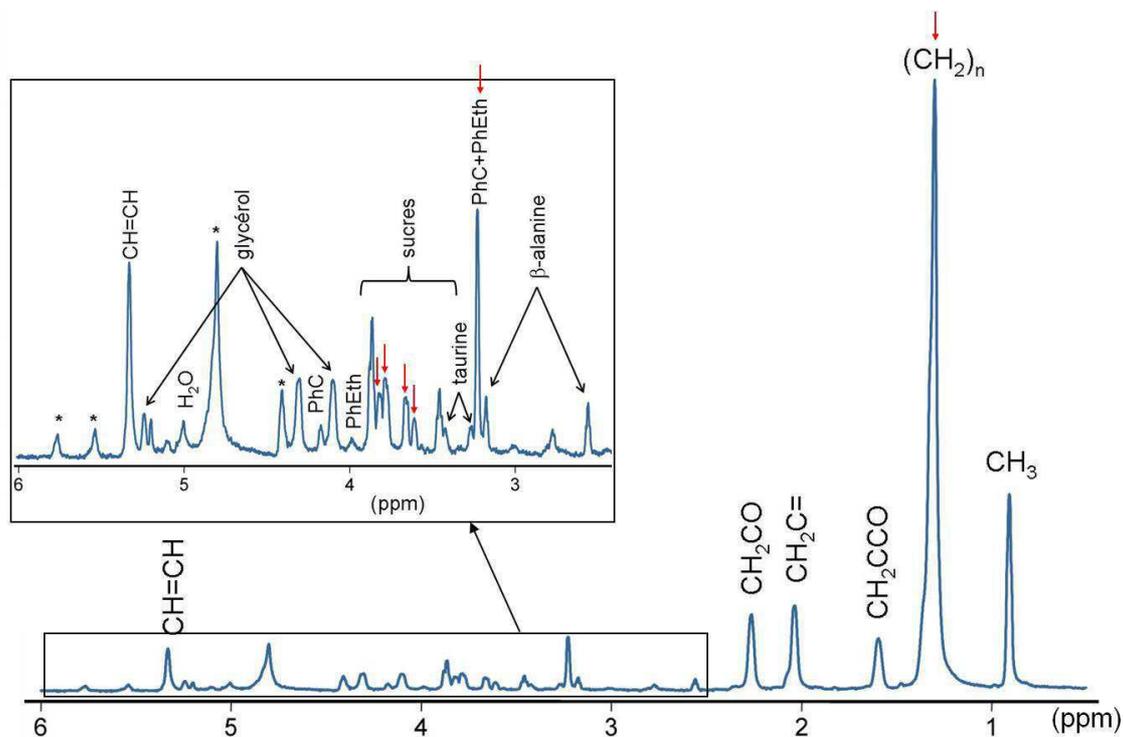


Figure 61: Spectre HRMAS obtenu pour une drosophile témoin. Les drosophiles sont anesthésiées au froid et introduites dans l'insert puis dans le rotor. Le dispositif est placé dans le spectromètre 17,6T. Un spectre est obtenu après un temps d'acquisition de 20 minutes. Des spectres similaires sont obtenus pour toutes les drosophiles témoins quel que soit l'âge (5, 10 ou 20 jours). (PhC) phosphocholine. (PhEth) phosphoéthanolamine. (*) pics correspondant aux bandes de rotation (à ne pas prendre en compte). Les flèches rouges correspondent aux pics utilisés dans l'analyse en composantes principales (ACP).

Les spectres ont ensuite été obtenus à partir de drosophiles exposées à la dieldrine (1 μ M). La comparaison des spectres des femelles âgées de 5 jours exposées ou non à la dieldrine est présentée sur la figure 62. Des résultats identiques sont obtenus pour les femelles âgées de 10 jours. On constate que les spectres avec et sans dieldrine ne sont pas équivalents et que des différences importantes sont visibles au niveau des pics qui correspondent aux acides gras ((CH₂)_n 1.33ppm; CH₂CCO 1.58ppm; CH₂C= 2.02ppm; CH₂CO 2.24ppm et CH=CH 5.33ppm), au glycérol (4.10, 4.30, 5.22ppm), à la phosphocholine (3.22, 4.14ppm) et à la phosphoéthanolamine (3.22, 3.98ppm). On observe une diminution du taux des acides gras et du glycérol après l'exposition à la dieldrine. Au contraire les pics correspondant à la phosphocholine et à la phosphoéthanolamine ont une surface plus importante après exposition à la dieldrine, indiquant une augmentation du taux de ces deux phospholipides. Il est à noter qu'on n'observe aucune différence pour le pic correspondant à la taurine qui est un agoniste des récepteurs GABA (cible de la dieldrine) chez les vertébrés (Sergeeva, 2013).

On peut également noter que chez les femelles exposées à la dieldrine, on observe une augmentation des pics qui correspondent aux sucres (3,2-4ppm). Un spectre du milieu flocons sur lequel sont élevées les drosophiles montre des pics en particulier dans la zone des sucres. Si la drosophile a ingéré de la nourriture juste avant l'expérience ou si elle en présente sur le corps, le spectre "mouche entière" sera modifié particulièrement dans la zone des sucres. Il faudrait donc quantifier la prise de nourriture des drosophiles pour savoir si la différence observée est due soit à la prise de nourriture ou rend compte d'une réelle différence entre les femelles exposées et les femelles non exposées à la dieldrine.

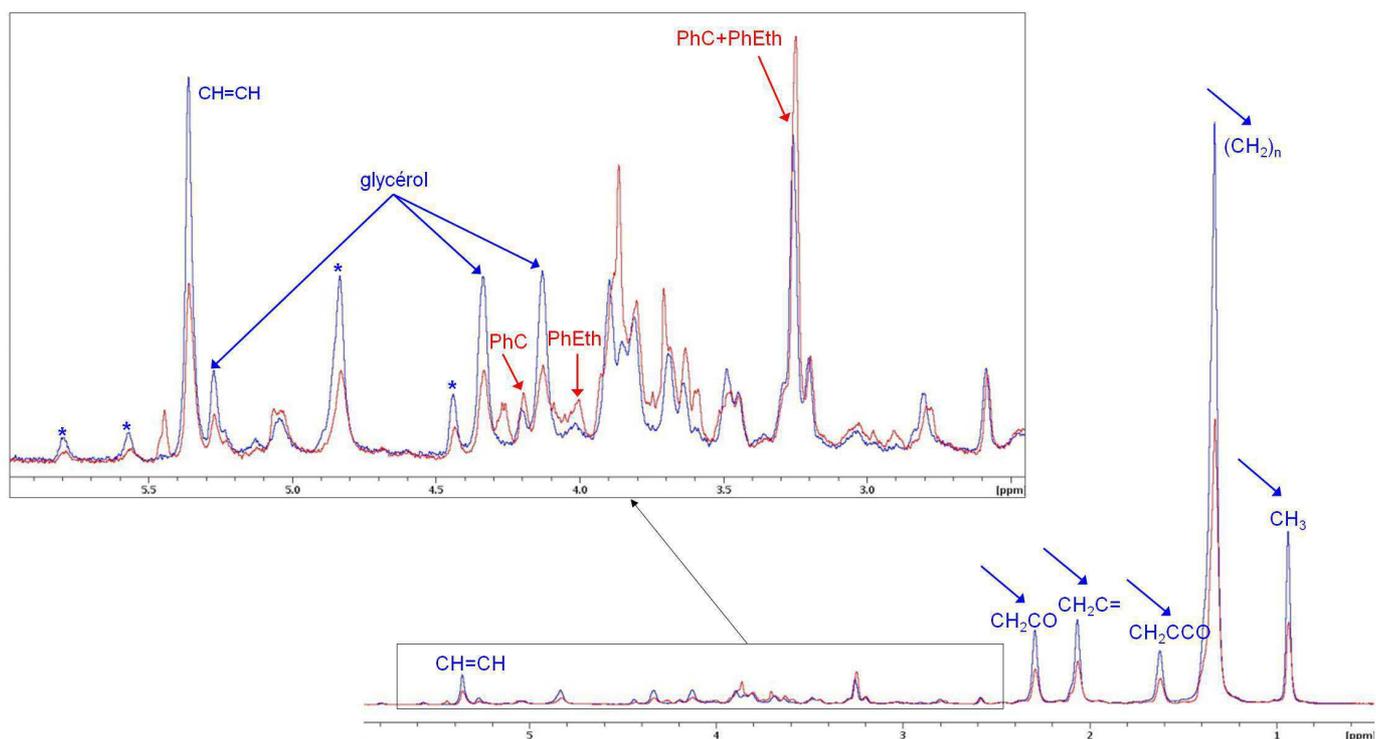


Figure 62: Différences entre les spectres obtenus pour les femelles exposées (rouge) ou non (bleu) à la dieldrine. Les drosophiles sont anesthésiées au froid et introduites dans l'insert puis dans le rotor. Le dispositif est placé dans le spectromètre 17,6T. Les spectres sont obtenus après un temps d'acquisition de 20 minutes. Le spectre bleu correspond aux femelles témoins (âge: 5 jours) et le spectre rouge correspond aux femelles exposées à la dieldrine 1 μ M (âge: 5 jours). Les flèches rouges indiquent une augmentation de la surface des pics après exposition à la dieldrine, qui correspondent à la phosphocholine (PhC) et à la phosphoéthanolamine (PhEth). Les flèches bleues indiquent les pics qui ont diminué en surface après exposition à la dieldrine et qui correspondent aux lipides et au glycérol.

L'analyse des spectres a ensuite été réalisée par la méthode d'analyse par composantes principales (ACP). Cette méthode permet de prendre en compte n variables (chaque pic

contenu dans le spectre) pour p échantillons (drosophiles exposées ou non à la dieldrine). Les données sont ensuite projetées sur un plan à 2 dimensions pour faciliter la visualisation des résultats en essayant de garder le maximum d'informations possibles. Lors de notre étude 6 variables ont été prises en compte pour tous les spectres obtenus (Figure 61, flèches rouges). Nous avons choisi des variables qui apportent le plus d'informations possibles et qui évitent la redondance (variables qui apportent la même information). Les résultats présentés sur la figure 63 mettent en évidence deux groupes distincts. Un premier groupe englobe toutes les drosophiles non exposées (points bleus) et les drosophiles âgées de 20 jours exposées à la dieldrine (ronds rouges). Un autre groupe englobe seulement des drosophiles exposées à la dieldrine âgées de 5 et 10 jours (carrés et triangles rouges).

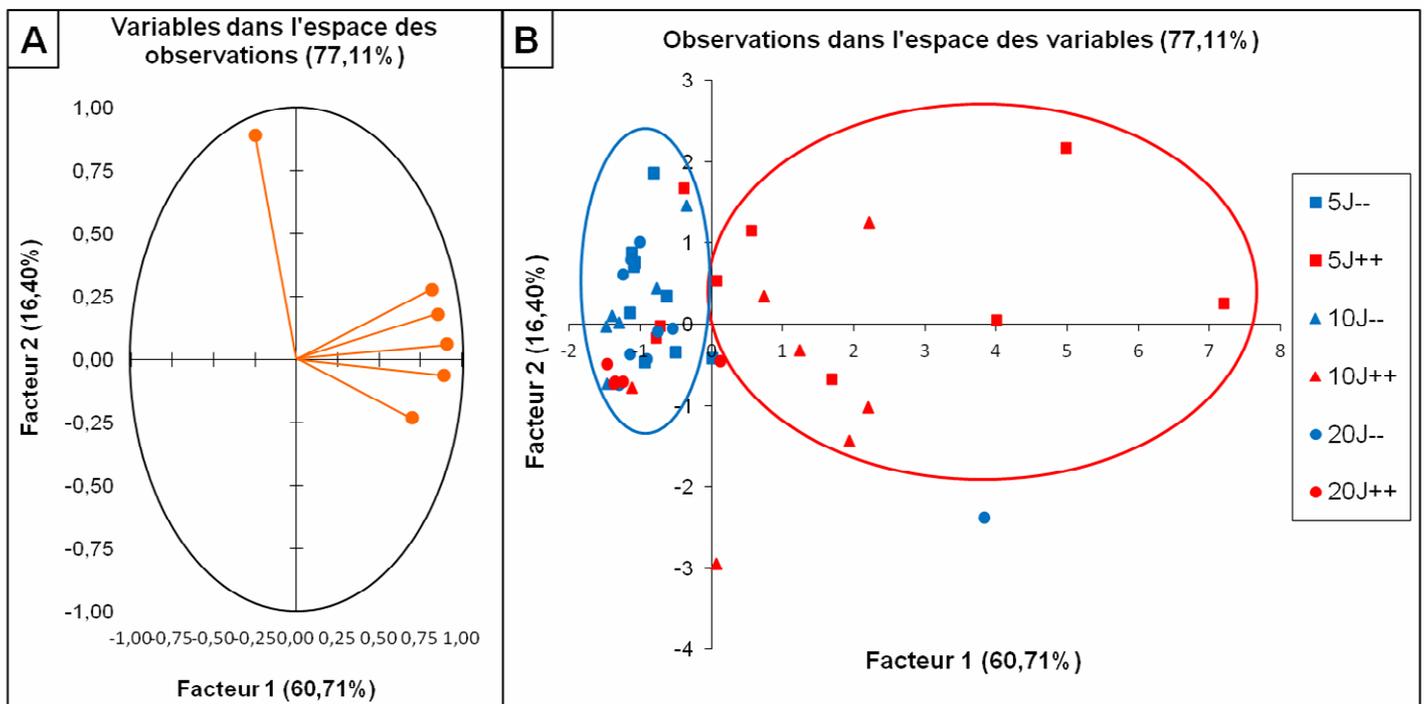


Figure 63: Résultat de l'analyse par composantes principales des différents spectres obtenus. (A) Cercle des corrélations permettant de visualiser les 6 variables prises en compte. (B) L'analyse prend en compte 6 variables (ou pics identifiés par des flèches rouges sur la figure 61) pour tous les spectres analysés (45 spectres: 9 correspondant aux femelles 5J--, 9 correspondant aux femelles 5J++, 6 correspondant aux femelles 10J--, 7 correspondant aux femelles 10J++, 9 correspondant aux femelles 20J-- et 5 correspondant aux femelles 20J++). Les 2 axes factoriels font référence à une combinaison linéaire des 6 variables (facteur 1: 60,71% et facteur 2: 16,40%) soit une inertie cumulée de 77,11%.

Pour les drosophiles exposées à l'insecticide, on observe une distribution linéaire selon l'axe des abscisses: plus les drosophiles sont jeunes plus le profil métabolique est différent des

individus témoins. Cette méthode permet donc de représenter les données de manière lisible et de discriminer plusieurs groupes qui mettent en évidence un profil métabolique différent chez certaines drosophiles exposées à l'insecticide. L'ACP a mis en évidence un profil métabolique identique entre les femelles âgées de 20 jours exposées ou non à la dieldrine. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'à 20 jours la plupart des drosophiles femelles exposées à la dieldrine à une concentration de 1µM sont mortes. Les drosophiles qui ont survécu se comportent comme les femelles témoins (DMSO), il est donc logique d'obtenir des spectres semblables pour ces deux populations de drosophiles.

L'étude du métabolisme des drosophiles par la technique RMN «HRMAS», a permis de mettre en évidence des profils métaboliques différents chez les individus exposés à la dieldrine. En effet, ces résultats montrent des différences pour les acides gras, le glycérol et certains métabolites (phosphocholine et phosphoéthanolamine) entre les individus exposés ou non à la dieldrine dès l'âge de 5 jours. Ces résultats pourraient indiquer une perturbation possible dans le stockage de réserves énergétiques chez la drosophile.

III.5-Exposition chronique à la dieldrine: effet sur l'acétylation des histones.

Les maladies neurodégénératives sont souvent associées à des modifications au niveau de l'épigénome (Collotta et al., 2013, Migliore et Coppedè 2009). Par exemple il a été montré que des modèles chez la drosophile de la chorée de Huntington ou de la maladie de Parkinson présentaient des défauts dans l'acétylation des protéines comme les histones (Pallos et al., 2008; Steffan et al., 2001; Outeiro et al., 2007; Chuang et al., 2009). Les modifications des histones comme la méthylation, l'ubiquitinylation, la phosphorylation ou l'acétylation sont impliquées dans de nombreux mécanismes comme la mémoire, l'apprentissage, la croissance, le développement ou encore l'apoptose (Kanthasamy et al., 2012). D'autre part, on sait que certains produits phytosanitaires (Anway et al., 2005) peuvent être aussi à l'origine de modifications de l'épigénome, voire des modifications épigénétiques qui peuvent se transmettre à la descendance. Dans le cas de la dieldrine, il a été montré chez la souris qu'une exposition à cet insecticide induisait l'acétylation des histones H3 et H4 dans des cultures de neurones dopaminergiques (N27). De plus, les souris exposées durant 30 jours à la dieldrine (5mg/kg tout les 3 jours) présentaient une hyperacétylation des histones H4 au niveau du striatum et de la substance noire (Song et al., 2010). Nous avons donc cherché à savoir si des

modifications de l'épigénome pouvaient être induites chez la drosophile exposée à la dieldrine. Chez cette dernière, ces modifications concernent essentiellement les histones, l'ADN de la drosophile étant peu méthylé.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressées à l'acétylation des histones. Ce processus est réalisé par les histones acétyl-transférases (HATs) et permet le relâchement de la structure de la chromatine et donc l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. Au contraire, les histones désacétylases (HDACs) sont à l'origine d'une hypoacétylation des histones ce qui provoque une condensation de la chromatine et conduit à la répression de la transcription. Une perturbation dans la balance entre l'activité des HATs et des HDACs peut conduire à l'apparition de processus neurodégénératifs en particulier une perte de l'activité des HATs (Saha et Pahan, 2006).

III.5.1. Implication des HDACs et des HATs dans l'effet induit par l'exposition à la dieldrine.

Dans un premier temps nous avons voulu savoir quel serait l'effet de la trichostatine A, un inhibiteur des HDACs, sur le phénotype locomoteur des drosophiles exposées. Si l'exposition à la dieldrine induit des modifications de l'acétylation des histones à l'origine du déficit locomoteur, alors l'utilisation de la trichostatine A devrait soit sauver le phénotype soit aggraver le phénotype des drosophiles exposées à la dieldrine. Des drosophiles femelles ont donc été exposées simultanément à la dieldrine (1 μ M) et à la trichostatine A (10mM) puis l'activité locomotrice a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 64. Nous avons tout d'abord vérifié que la trichostatine A seule, à la dose utilisée n'avait pas d'effet sur l'activité locomotrice. On constate qu'après traitement à la trichostatine A, 82,7% des drosophiles arrivent en haut du tube contre 76,3% pour le contrôle. La trichostatine A seule ne montre donc pas d'effet sur l'activité locomotrice dans nos conditions. Lorsque les femelles sont exposées simultanément à la dieldrine et à la trichostatine A, elles présentent une activité locomotrice normale puisque 79,3% des individus arrivent en haut du tube, alors que seulement 30,5% des drosophiles exposées à la dieldrine arrivent en haut du tube.

La trichostatine A permet donc de sauver le phénotype des femelles exposées à la dieldrine. Cette molécule provoque l'inhibition des histones déacétylases et donc induit une augmentation de l'acétylation des histones. On peut donc déjà proposer que la dieldrine induirait une diminution de l'acétylation des histones responsable du déficit locomoteur des drosophiles.

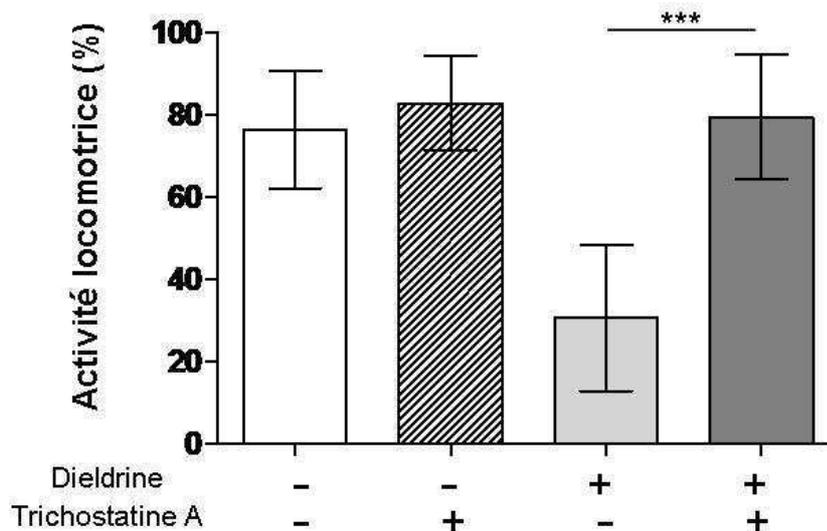


Figure 64: La trichostatine A restaure le phénotype locomoteur des femelles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie soit en absence de dieldrine et de trichostatine A (- -, n=84), soit en présence de trichostatine A 10mM (- +, n=77), soit en présence de dieldrine 1µM (+ -, n=77) ou soit en présence de dieldrine 1µM et de trichostatine A 10mM (+ +, n=84). L'activité locomotrice a été mesurée sur des femelles âgées de 11 jours et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles indiquent une différence significative (*** p<0,001; test de Tukey).

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier ce résultat en étudiant l'activité locomotrice d'un mutant perte de fonction d'une HDAC exposé à la dieldrine. D'après les résultats précédents, nous nous attendons à récupérer, au moins en partie, une activité locomotrice normale. Pour cela nous avons utilisé la souche *P{PZ}Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶ ry⁵⁰⁶/TM3, ry^{RK} Sb^I Ser^I* (BL:11633). Le gène *Rpd3* code une HDAC qui induit la désacétylation des résidus lysines des histones H3 et H4, et qui ne montre donc pas de spécificité particulière vis-à-vis d'une histone ou d'une lysine particulière. L'allèle *Rpd3⁰⁴⁵⁵⁶* est décrit comme un allèle nul ou fortement hypomorphe (Chen et al., 1999) résultant de l'insertion d'un élément P dans l'unité de transcription *Rpd3* (à 47pb du site d'initiation de la transcription déterminée par le Berkeley *Drosophila* Genome Project). Ces auteurs ont montré que les embryons hétérozygotes pour cet allèle avaient un taux réduit d'expression de *Rpd3* dans la tête et qu'il n'y avait aucune expression dans les embryons homozygotes. Nous avons voulu éliminer le chromosome balancier *TM3* pour effectuer le test de climbing pour être sûre que les mutations portées par ce chromosome n'interféraient pas avec l'activité locomotrice ou la sensibilité à la dieldrine. Nous avons donc réalisé un croisement avec la souche Oregon-R

jusqu'à-là utilisée. Le croisement a été effectué sur un milieu contenant de la dieldrine à la concentration de 1µM. Les femelles F1 $P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$ ont ensuite été utilisées pour le test de climbing. Les résultats sont présentés sur la figure 65.

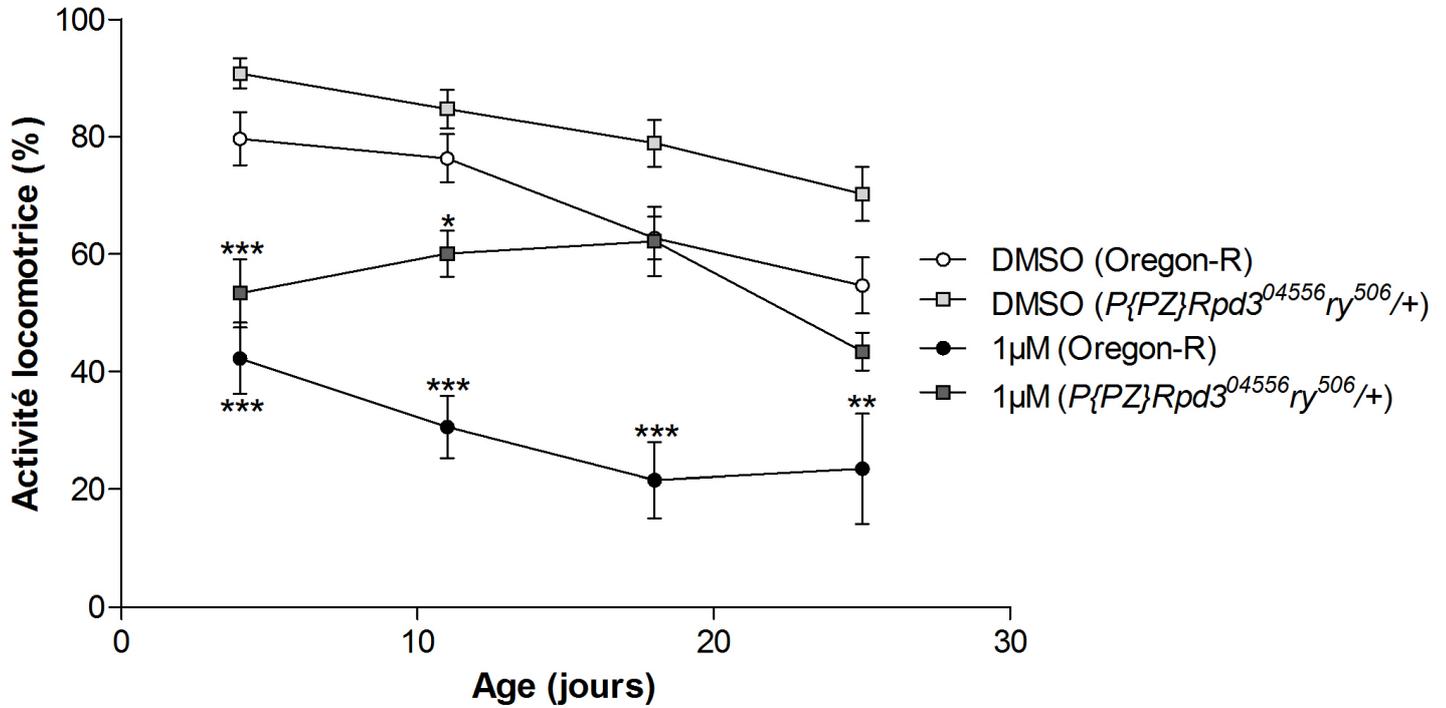


Figure 65: Activité locomotrice des femelles ($P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$) exposées à la dieldrine. L'activité locomotrice des femelles ($P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$) en absence (■, n=63) ou en présence de dieldrine 1µM (■, n=70) a été comparée à celle des femelles Oregon-R exposées (●, n=84) ou non (○, n=77) à la dieldrine 1µM au cours du temps. L'activité locomotrice est mesurée toute les semaines dans un environnement spécifique (voir matériel et méthodes) et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence une amélioration de l'activité locomotrice chez les femelles ($P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$) comparé aux femelles Oregon-R exposées à la dieldrine. Les étoiles indiquent une différence significative (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; test de Tukey).

On constate que les femelles F1 témoins, $P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$, exposées au DMSO montrent une activité locomotrice semblable à celle des femelles Oregon-R témoins. Lorsque les femelles F1 $P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$ ont été exposées à la dieldrine, leur activité locomotrice est réduite, mais d'une façon moindre comparée aux femelles Oregon-R exposées. En effet, l'activité locomotrice est réduite au jour 4, mais ensuite elle n'évolue pas

et finalement au jour 18 l'activité locomotrice des F1 $P\{PZ\}Rpd3^{04556} ry^{506}/+$ exposées est semblable à celle des témoins. On constate donc une amélioration de l'activité locomotrice pour les femelles exposées à la dieldrine qui présentent une dose en moins du gène *Rpd3*. Une diminution de la quantité de l'HDAC RPD3 permet donc de sauver partiellement le déficit locomoteur lié à l'exposition à la dieldrine. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus avec la Trichostatine A.

Dans un troisième temps, nous avons voulu tester l'effet d'une mutation cette fois dans une HAT. En effet, d'après les résultats précédents, une diminution de l'activité HAT devrait aggraver le déficit locomoteur induit par la dieldrine. Pour cela nous avons voulu utiliser la souche $y^1 w^{1118}; Gcn5^{Q186st} P\{FRT(w^{hs})\}2A e^1/TM3, P\{ActGFP\}JMR2, Ser^1$ (BL: 9334) qui porte un allèle perte de fonction du gène *Gcn5* (Carré et al., 2005). Le gène *Gcn5* code une HAT impliquée principalement dans l'acétylation des lysines K9 et K14 de l'histone H3. Comme précédemment nous avons utilisé les femelles F1 $y^1 w^{1118}/+; Gcn5^{Q186st} P\{FRT(w^{hs})\}2A e^1/+$ issues du croisement ♂ 9334 × ♀ Oregon-R. Au cours du test de climbing, nous avons constaté que les femelles F1 $y^1 w^{1118}/+; Gcn5^{Q186st} P\{FRT(w^{hs})\}2A e^1/+$ témoins, exposées juste au DMSO, présentaient une activité locomotrice très réduite. En effet, peu d'entre elles arrivaient en haut du tube pendant le temps imparti. En fait elles se remettent bien du choc de départ, commencent à grimper, mais pas en ligne droite et de plus elles ont tendance à vouloir redescendre, d'où le petit nombre qui arrive en haut du tube. Il nous a donc été pratiquement impossible d'évaluer l'effet de la perte d'une dose de *Gcn5* sur le déficit locomoteur induit par une exposition à la dieldrine. L'exposition à la dieldrine des femelles F1 $y^1 w^{1118}/+; Gcn5^{Q186st} P\{FRT(w^{hs})\}2A e^1/+$ conduit à une perte quasi-totale de la mobilité. Pratiquement aucune F1 n'atteint le haut du tube. Elles ont beaucoup de mal à se remettre du choc de départ et montrent ensuite très peu de mobilité. Cependant, compte tenu du phénotype du témoin, il est très difficile d'affirmer que la perte d'une dose de *Gcn5* aggrave le déficit locomoteur induit par la dieldrine. D'autres expériences seront nécessaires pour l'affirmer, en choisissant un autre test locomoteur par exemple.

III.5.2. Etude des modifications de l'épigénome induites par une exposition à la dieldrine.

Les résultats précédents nous ont montré que l'exposition à la dieldrine devait conduire à une modification du degré d'acétylation des histones, et plus particulièrement une diminution du taux d'acétylation. Nous avons cherché à savoir si l'exposition à la dieldrine engendrait une modification globale du taux d'acétylation des histones, et si les histones H3 étaient affectées.

L'acétylation des histones a été étudiée à partir de têtes provenant de drosophiles adultes exposées ou non à la dieldrine, pour deux âges: 2 et 6 jours. Une analyse par western blot a été réalisée pour déterminer tout d'abord la quantité d'histones H3 acétylées. Les résultats sont présentés sur la figure 66. Pour les femelles âgées de 2 jours, la quantité d'histones H3 acétylées est similaire chez les témoins et chez les individus exposés à la dieldrine. Cependant pour les femelles âgées de 6 jours, une différence entre les deux groupes est observée. L'acétylation des histones H3 apparaît plus importante chez les témoins. Cependant la différence d'acétylation des histones H3 entre les deux groupes n'est pas significative ($p > 0,05$, test de Tukey). Ce résultat suggère néanmoins que la dieldrine pourrait induire une baisse globale de l'acétylation des histones H3 pour les femelles exposées à l'insecticide en particulier au niveau du cerveau.

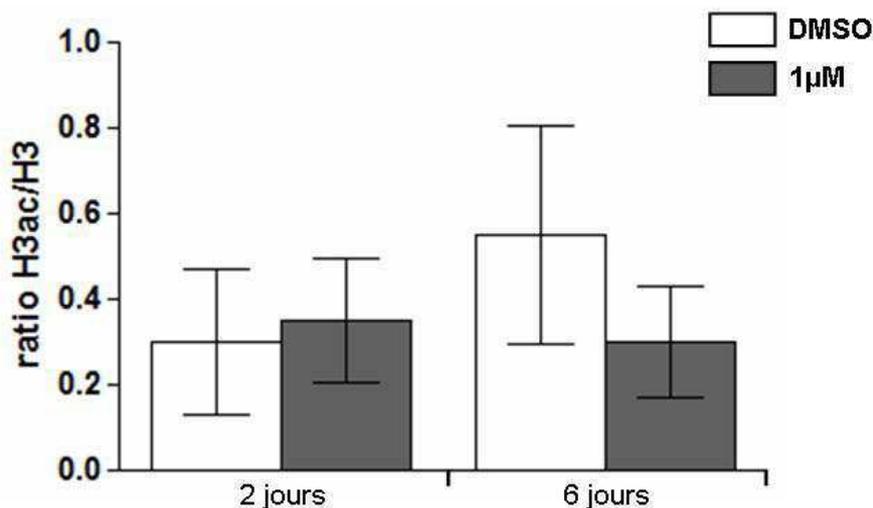


Figure 66: Quantification de l'acétylation des histones H3 chez des femelles exposées à la dieldrine. Les femelles sont élevées tout au long de la vie en absence ou en présence de dieldrine. Une extraction d'histones est réalisée à partir des têtes de drosophiles âgées de 2 ou 6 jours exposées (gris) ou non (blanc) à la dieldrine 1µM. L'acétylation des histones H3 est ensuite évaluée par Western blot. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique ne montre pas de différence significative pour l'acétylation des histones H3 entre les femelles exposées ou non à la dieldrine.

De plus, ces résultats sont en accord avec les expériences précédentes car la trichostatine A (favorise l'état acétylé des histones) restaure le phénotype locomoteur des drosophiles exposées à la dieldrine. Il serait également intéressant de regarder l'état de l'acétylation des histones H4.

III.6-Un transporteur ABC impliqué dans la sensibilité à la dieldrine?

Au cours des expériences précédentes concernant l'étude du rôle des HDACs ou HATs dans le déficit locomoteur induit par la dieldrine, nous avons rencontré un problème qui finalement peut se révéler intéressant. Nous voulions tester l'effet d'une perte de fonction dans deux gènes codant des HATs différentes, à savoir *nejire* (*nej*) qui code la CBP et *Gcn5*. Le gène *nej* avait été choisi car une étude menée chez la souris avait montré une augmentation de la protéine CBP après une exposition à la dieldrine dans des cellules dopaminergiques en culture (Song et al., 2010). Pour cela, la souche *w[*] nej[3]/FM7c* (BL: 3729), qui porte un allèle nul de *nejire*, a été utilisée. Cette souche étant dans un fond génétique mutant pour *white*, nous avons comparé l'effet de la dieldrine sur l'activité locomotrice des femelles *w[*] nej[3]/FM7c* et des femelles *w¹¹¹⁸* comme témoins. Au cours du test de climbing, nous avons rapidement constaté que les femelles témoins *w¹¹¹⁸* ne réagissaient pas de la même façon que les femelles Oregon-R à la dieldrine. En effet l'activité locomotrice des femelles *w¹¹¹⁸* n'est pas affectée par l'exposition à la dieldrine, contrairement à ce qui est observé pour les femelles Oregon-R. Même après plus de trois semaines, plus de 60% des femelles *w¹¹¹⁸* sont toujours capables de grimper qu'elles soient exposées ou non à la dieldrine (figure 67) alors qu'à cet âge la plupart des femelles Oregon-R exposées sont mortes. Il apparaît donc que le mutant *w¹¹¹⁸* présente une sensibilité à la dieldrine moindre que les drosophiles Oregon-R. Le gène *white* code pour un transporteur ABC qui joue un rôle dans le transport des pigments de l'œil. Le transporteur White pourrait donc jouer un rôle dans la neurotoxicité vis-à-vis de la dieldrine.

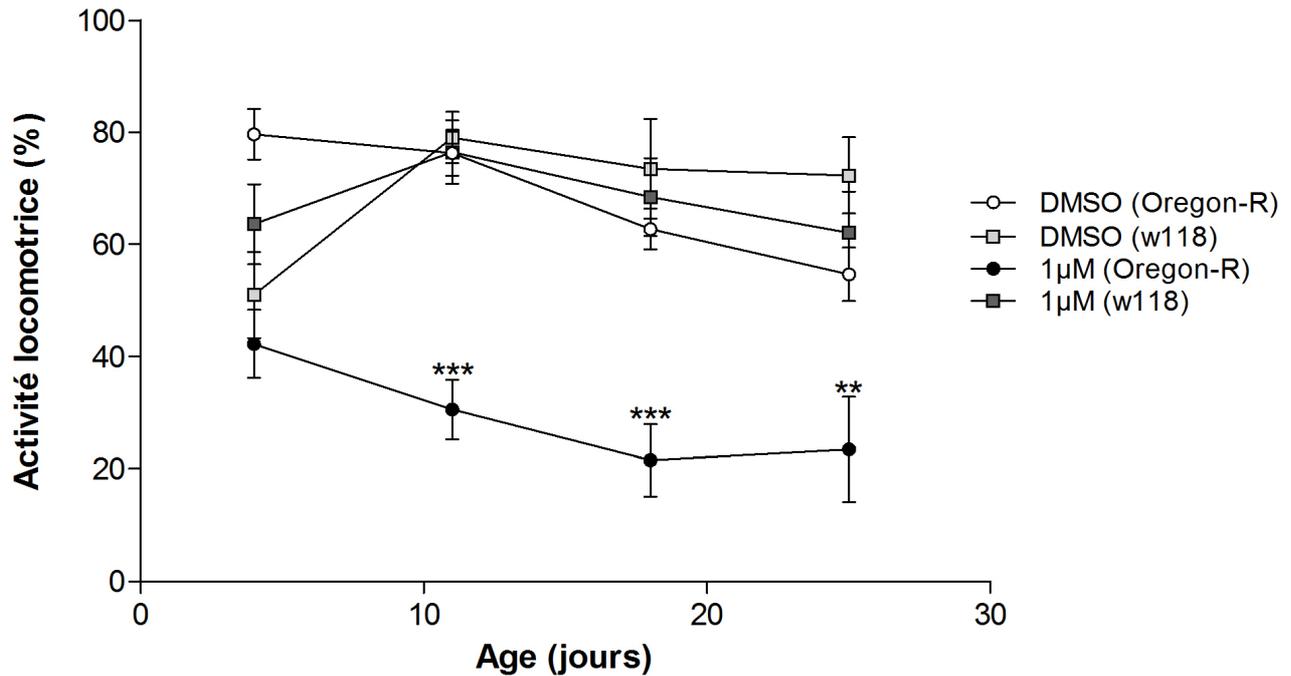


Figure 67: Activité locomotrice des femelles w^{118} exposées à la dieldrine. L'activité locomotrice des femelles w^{118} en absence (■, $n=49$) ou en présence de dieldrine $1\mu\text{M}$ (■, $n=42$) a été comparée à celle des femelles Oregon-R exposées (●, $n=77$) ou non (○, $n=84$) à la dieldrine $1\mu\text{M}$ au cours du temps. L'activité locomotrice est mesurée toute les semaines dans un environnement spécifique (voir matériel et méthodes) et correspond au pourcentage de drosophiles capables de grimper en haut d'un tube en 15s. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Le graphique met en évidence que l'exposition à la dieldrine des femelles w^{118} n'affecte pas leur activité locomotrice. Les étoiles indiquent une différence significative (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; test de Tukey).

IV-Discussion.

Le but de ce travail était de savoir si on pouvait modéliser chez la drosophile la neurodégénérescence induite par des insecticides neurotoxiques chez l'homme. Pour cela la dieldrine a été choisie car elle semble être un facteur favorisant la maladie de Parkinson. L'étude s'est donc portée sur l'effet d'une exposition chronique à la dieldrine sur la souche de drosophiles Oregon-R. Les doses de dieldrine que nous avons utilisées sont des doses faibles, le plus proche possible de ce qui peut être retrouvé dans la nature.

IV.1-La dieldrine induit une neurodégénérescence chez la drosophile.

La neurodégénérescence peut se traduire chez la drosophile par plusieurs phénotypes comportementaux: une diminution de la durée de vie, un déficit d'activité locomotrice, une perte de la capacité d'apprentissage ou de la mémoire (Hirth, 2010). Lors de cette étude, nous avons donc choisi de nous focaliser sur la durée de vie et l'activité locomotrice.

La durée de vie de la drosophile est comprise entre 40 et 120 jours, et dépend de la nature de l'alimentation et de facteurs de stress (Piper et al., 2005; Pletcher et al., 2005). Par exemple, une source de nourriture riche en sucres et en cholestérol (e.g; 15% sucres/levure) diminue la durée de vie des drosophiles (Figure 68).

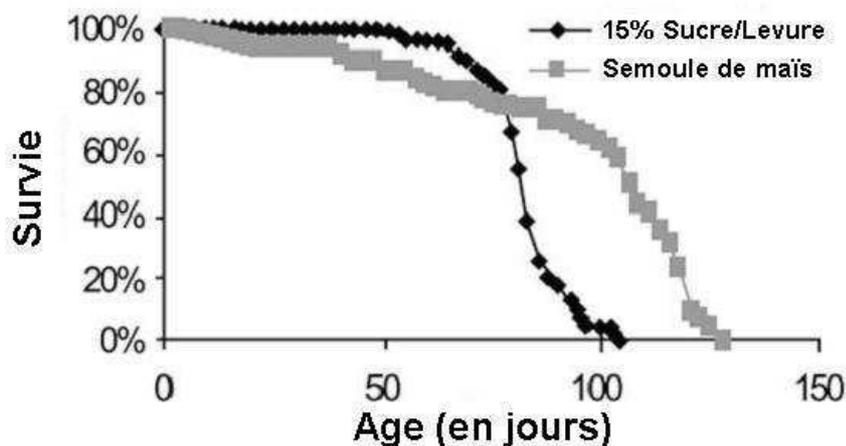


Figure 68: *Durée de vie de la drosophile en fonction du régime alimentaire. La drosophile vit moins longtemps en présence d'un milieu riche (◆) supplémenté en cholestérol et en sucres. (d'après Hirth, 2010).*

De plus, il a été montré dans de nombreux modèles de maladies neurodégénératives chez la drosophile, une altération de la durée de vie (Shulman et al., 2003). Ces similarités entre les facteurs influençant le vieillissement et la durée de vie chez l'homme et chez la drosophile, permettent d'utiliser ce phénotype comme un des éléments clés pour caractériser la neurodégénérescence induite par la dieldrine.

Le milieu de culture utilisé au cours de cette étude est un milieu standard (Formula 4-24 ® Instant *Drosophila* Medium) qui permet une durée de vie de l'ordre de 120 jours pour les groupes témoins exposés seulement au DMSO dans lequel est préparée la dieldrine. Si on compare aux résultats publiés dans la littérature, on peut constater que c'est une durée de vie attendue pour ce type de milieu. Les résultats que nous avons obtenus, après exposition à la dieldrine, montrent bien que la durée de vie de l'adulte est considérablement diminuée, en particulier chez les femelles pour la dose 1µM où la durée de vie est réduite d'un facteur 4. Cette diminution de la durée de vie est dose dépendante et apparaît surtout à partir de la dose 0,5µM. Une hypothèse possible pour expliquer la réduction de la durée de vie pour la dose 1µM était que les drosophiles adultes se nourrissaient peu ou pas à cause d'un effet répulsif de la dieldrine. Nous avons pu écarter cette hypothèse en réalisant un test de préférence alimentaire qui a montré que la dieldrine n'avait pas d'effet répulsif chez les adultes. On peut donc proposer que la diminution de la durée de vie des drosophiles exposées à la dieldrine reflète une neurodégénérescence.

L'activité locomotrice est un autre facteur reflétant l'état du système nerveux. Chez l'homme les maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou de Huntington, se traduisent par des problèmes de coordination des mouvements. De même les modèles de la maladie de Parkinson développés chez la drosophile montrent aussi des problèmes locomoteurs (Feany et Bender, 2000; Auluck et al., 2002; Martin, 2003) en particulier chez un modèle d'exposition à la roténone (Coulom et Birman, 2004). L'activité locomotrice peut se mesurer de plusieurs façons: soit on mesure l'activité locomotrice spontanée (basé sur le trajet effectué par la drosophile en un temps donné), soit on réalise un test de "climbing" qui est basé sur le géotaxisme négatif de la drosophile. C'est ce dernier test, couramment utilisé, qui a été appliqué dans cette étude. Les résultats montrent clairement que l'exposition à la dieldrine affecte l'activité locomotrice chez les femelles puisque seulement 42,1% des drosophiles exposées arrivent en haut du tube pendant le temps imparti contre 79,6% pour les drosophiles témoins (âge: 4 jours). Là encore, nous avons constaté que

l'effet de la dieldrine sur l'activité locomotrice était dose dépendante (effet le plus fort à 1 μ M). Il est intéressant de remarquer à ce stade, que c'est l'exposition à l'état larvaire qui est plus importante pour induire une diminution de l'activité locomotrice. Toutefois, l'effet d'une exposition à la fois au stade larvaire et au stade adulte a des effets plus importants, ce qui suggère qu'il y a des effets cumulatifs. La dieldrine a donc déclenché des événements durant le stade larvaire qui auront des répercussions sur l'activité locomotrice de l'adulte et qui s'ajouteront aux effets de l'exposition chez l'adulte.

Ces deux premiers résultats, effet sur la durée de vie et sur l'activité locomotrice, suggèrent donc fortement que la dieldrine pouvait induire des phénomènes de neurodégénérescence chez la drosophile. Nous avons alors cherché à savoir plus précisément quelles structures du cerveau étaient affectées par l'exposition à la dieldrine. Cette dernière est connue pour être toxique vis-à-vis des neurones dopaminergiques chez la souris (Drechsel et Patel, 2008). S'il en est de même chez les drosophiles exposées à la dieldrine, alors on pouvait imaginer que le déficit locomoteur serait sauvé par un apport de L-DOPA dans le milieu de culture. La L-DOPA est un précurseur de la dopamine qui est d'ailleurs administrée aux patients parkinsoniens pour compenser la perte de dopamine due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques. De plus, Riemensperger et ses collaborateurs (2011) ont montré chez la drosophile que le comportement locomoteur était modulé par le taux de dopamine dans le système nerveux. Nous avons effectivement constaté que la présence de L-DOPA dans le milieu d'élevage restaurait en grande partie l'activité locomotrice des drosophiles, ce qui suggérait très fortement que chez la drosophile, les neurones dopaminergiques étaient aussi affectés par la dieldrine. Un marquage des neurones dopaminergiques chez la larve et l'adulte a donc été effectué. Chez la larve, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'altérations des neurones dopaminergiques. Toutefois, il faut remarquer qu'aux doses utilisées, la dieldrine n'a pas d'effet sur la viabilité des larves, et leur activité locomotrice n'a pas été évaluée. L'absence d'altération des neurones dopaminergiques dans le cerveau de la larve ne reflète peut être pas le fait que la dieldrine n'induit pas d'effets directs sur la larve.

Chez l'adulte, les résultats obtenus suggèrent une perte au niveau des neurones du cluster PPM3 (protocerebral posterior medial 3) chez les drosophiles adultes exposées à la dieldrine. Les neurones du cluster PPM3 se projettent dans des structures spécifiques comme le FSB (fan-shaped body) et le EB (ellipsoid body) qui composent le complexe central impliqué dans le contrôle du comportement locomoteur (White et al., 2010; Kong et al., 2010). De plus, la dégénérescence des neurones dopaminergiques du cluster PPM3 est également retrouvée pour

des modèles de la maladie de Parkinson chez la drosophile, présentant des déficits locomoteurs. Ces modèles concernent l'étude de certains gènes impliqués dans la maladie de Parkinson chez l'homme comme l'expression de différents variants humains de *LRRK2* (Liu et al., 2008; Ng et al., 2009) et l'inactivation de l'expression de *PINK1* par un ARN interférence (Wang et al., 2006). La maladie de Parkinson peut également être modélisée chez la drosophile après exposition à la roténone (Coulom et Birman, 2004). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'exposition des adultes à la roténone affectait le comportement locomoteur (géotaxie négative) pour des doses sublétales de cet insecticide, dès 25µM. Ce déficit locomoteur a été corrélé à une perte des neurones dopaminergiques. Cette perte est observée pour tous les groupes de neurones dopaminergiques. Dans les cas les plus graves, les auteurs ont constaté une perte totale pour le cluster PPM3 ou les clusters PAM et PAL. Ils ont également montré que le déficit locomoteur était en partie sauvé par un apport de L-DOPA, mais pas la perte de neurones dopaminergiques. Ces résultats sont en partie semblables à ceux que nous obtenons à savoir un déficit locomoteur des drosophiles exposées à la dieldrine sauvé par un apport de L-DOPA. Cependant, l'exposition à la dieldrine n'affecte pas aussi gravement les neurones dopaminergiques. En effet, nous n'observons pas de perte des neurones dopaminergiques dans tous les clusters, seul le cluster PPM3 serait affecté après une exposition à la dieldrine. Cette différence pourrait refléter des mécanismes d'action différents. La roténone du fait de son action inhibitrice sur le complexe I mitochondrial pourrait être à l'origine d'une accumulation de ROS et donc de stress oxydatif auquel les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles. Ceci est renforcé par le fait que l'addition de L-DOPA sauve le déficit locomoteur mais pas la perte des neurones dopaminergiques alors que la mélatonine, un antioxydant, sauve à la fois le déficit locomoteur et la perte des neurones dopaminergiques (Coulom et Birman, 2004). Dans le cas de notre étude, il serait intéressant de regarder si la dieldrine induit un stress oxydatif chez les drosophiles exposées à la dieldrine. En effet, chez la souris, l'exposition durant 30 jours à la dieldrine induit une augmentation du glutathion dans le striatum suggérant un stress oxydatif (Hatcher et al., 2007). De plus, une autre étude montre une production de ROS dans des cellules PC12 (cellules dopaminergiques de rats) après 5 min d'exposition à la dieldrine. L'ajout de SOD (superoxyde dismutase) inhibe la production de ROS mais aussi l'apoptose des cellules PC12 traitées à la dieldrine (Kitazawa et al, 2001). Il faudrait déterminer si dans notre modèle, l'exposition à la dieldrine induit également un stress oxydatif en (i) en évaluant la quantité de certains marqueurs de stress oxydatif ou (ii) en ajoutant des molécules ayant des propriétés antioxydantes dans le milieu d'élevage. (i) Pour cela, il faudrait évaluer la quantité de ROS

dans le corps entier de drosophiles exposées ou non à la dieldrine ou encore en mesurant l'activité enzymatique de la SOD (Hosamani et al., 2010). (ii) Il serait également intéressant d'évaluer l'effet d'antioxydants sur le comportement locomoteur des drosophiles exposées à la dieldrine en ajoutant de la créatine ou de la mélatonine dans le milieu d'élevage. En effet, ces produits ont déjà montré leur efficacité chez des drosophiles exposées à la roténone (Hosamani et al., 2010; Coulom et Birman, 2004).

Il faut aussi remarquer, que dans les modèles de la maladie de Parkinson basés sur l'expression d' α -synucléine humaine, la perte des neurones dopaminergiques est beaucoup plus restreinte (20 à 50%) dans 2 clusters (DM: dorsomedial, DL1: dorsolateral 1) de neurones dopaminergiques (Feany et Bender, 2000; Auluck et al., 2002). Récemment, Riemensperger et ses collaborateurs (2013) ont montré que l'expression d'une forme pathologique de l' α -synucléine (A30P) dans un petit groupe de 15 neurones dopaminergiques du cluster PAM suffisait à induire une perte de l'activité locomotrice. De façon intéressante ils ont également montré que ce déficit ne s'accompagnait pas de la perte de neurones dopaminergiques, mais plutôt de défauts au niveau des terminaisons synaptiques. Il est possible que dans notre modèle, la perte d'activité locomotrice soit due non pas à une perte de neurones dopaminergiques mais plutôt à des défauts au niveau des terminaisons synaptiques pour ces neurones. Pour cela, il faudrait tout d'abord valider si oui ou non, une perte de neurones dopaminergiques est effectivement observée chez les drosophiles exposées à la dieldrine. Un marquage par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la caspase 3 clivée pourrait mettre en évidence l'apoptose dans ces neurones.

IV.2-Mise au point de l'Imagerie par Résonance Magnétique.

L'exposition à la dieldrine affecte les neurones dopaminergiques chez l'adulte, mais nous avons voulu savoir si d'autres structures du cerveau pouvaient être altérées par cette exposition. Pour cela nous avons utilisé une nouvelle technique qui commençait à être mise au point dans notre équipe. Il s'agit de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'IRM est couramment utilisée chez l'homme, en particulier pour visualiser les tissus mous comme le cerveau, et aussi chez les petits animaux comme le lapin, le rat ou la souris. Jusque-là, quelques études IRM avaient été réalisées sur de gros insectes comme le sphinx du tabac, la mouche à viande, le scarabée ou encore l'abeille (Michaelis et al., 2005; Jasanoff et Sun, 2002; Haddad et al., 2004; Hart et al., 2003; Schilling et al., 2012). Une seule étude a été

réalisée chez la drosophile en utilisant un aimant à très haut champ 18,8T (Null et al., 2008). Le problème pour faire de l'IRM sur la drosophile, et en particulier sur son cerveau, est sa très petite taille, ce qui pose des problèmes de sensibilité. Ceux-ci ont pu être résolus par l'équipe, en développant de nouvelles bobines et séquences d'acquisition avec un aimant à haut champ, 9,4T (Même et al., 2013). J'ai d'ailleurs participé au cours de mon stage de Master 1 aux premiers essais d'IRM chez la drosophile, ce qui m'a permis d'utiliser facilement cette technique pour l'étude des cerveaux des drosophiles exposées à la dieldrine. Dans un premier temps, les séquences d'acquisition utilisées nous ont permis d'atteindre une résolution de 10.10.80 μ m pour un temps d'acquisition raisonnable de 1h30. Les premières images ainsi obtenues montraient clairement que l'exposition à la dieldrine induisait des modifications importantes de la structure du cerveau. En effet des zones d'hyposignal (plus sombres) étaient visibles, ce qui signifiait une structure moins dense soit une altération de la structure tissulaire du cerveau. Toutefois, il était difficile avec cette résolution, de dire quelles structures du cerveau étaient affectées. De nouvelles séquences d'acquisition, permettant d'atteindre une résolution de 10.10.20 μ m en 4 heures, ont alors été mises en place. La résolution alors obtenue m'a permis de commencer à identifier différentes structures sur les images IRM, en comparant les images IRM avec les images d'histologie de l'université de Freiburg (<http://filab.biologie.uni-freiburg.de/Atlas/text/paraffinFi.html>). En utilisant ces nouvelles séquences, nous avons alors pu commencer à identifier les régions du cerveau qui étaient en hyposignal après exposition à la dieldrine (structure moins dense). Une altération a ainsi pu être mise en évidence pour les structures suivantes: le protocerebrum, la medulla et le lobe antennaire. Le protocerebrum est une structure complexe composée elle-même de 4 structures: les corps pédonculés, la *pars intercerebralis*, les lobes optiques et le complexe central. Or cette dernière structure est impliquée dans le contrôle de l'activité locomotrice chez la drosophile (Strauss, 2002; Kong et al., 2010). De plus, les neurones dopaminergiques PPM3 affectés par la dieldrine se projettent dans cette structure. L'exposition des femelles à la dieldrine peut donc conduire à une perturbation importante de cette voie neuronale. Le lobe antennaire est une structure également affectée après exposition à la dieldrine. Cette structure est impliquée dans le traitement des informations olfactives. Certains neurones GABAergiques (multiglomerular local interneurons, LNs) jouent un rôle dans l'inhibition des neurones du lobe antennaire dans les phénomènes d'acoutumance. De plus, l'augmentation de la transmission GABAergique est suffisante pour perturber l'olfaction chez la drosophile (Das et al., 2011). Sachant que la dieldrine est un neurotoxique pour les récepteurs GABA, cet insecticide pourrait donc perturber le système olfactif chez la drosophile. Il serait donc

possible de regarder le comportement olfactif chez les drosophiles exposées à la dieldrine par un test Y-maze par exemple. Dans les cas les plus graves, la dieldrine est donc capable d'induire des altérations globales du cerveau chez la drosophile, non restreintes aux neurones dopaminergiques, alors que le modèle roténone (Coulom et Birman, 2004) est spécifique des neurones dopaminergiques et ne montre pas d'altérations visibles de la morphologie ou de la taille du cerveau. A nouveau, ceci suggère que les mécanismes impliqués dans ces deux modèles doivent être, au moins en partie, différents. Cependant, les méthodes utilisées sont bien différentes. Dans notre cas, nous avons utilisés l'IRM alors que pour le modèle roténone, les auteurs ont utilisés un immunomarquage des neurones du cerveau de la drosophile (immunomarquage avec un anticorps anti-Elav). Chez les drosophiles exposées à la dieldrine, un immunomarquage des neurones du cerveau serait donc nécessaire pour déterminer si la neurodégénérescence est spécifique des neurones dopaminergiques ou au contraire répandu à d'autres types de neurones, ce qui est suggéré par les résultats obtenus avec l'IRM.

L'avantage de cette technique IRM est évident, surtout en terme de temps: 4 heures d'acquisition, contre plusieurs jours pour avoir un résultat en immunohistochimie, ou en coupes histologiques. D'autre part on peut avoir une information sur toutes les structures du cerveau en une seule expérience sans à priori. Evidemment, les informations données par cette technique ne sont pas forcément de la même nature que celles obtenues en immunohistochimie, mais elles sont complémentaires et peuvent permettre d'orienter rapidement une analyse immunohistochimique vers une structure particulière du cerveau. De plus, des modifications visibles en IRM peuvent être non détectables par les méthodes classiques de microscopie puisque le principe sur lequel est basée l'imagerie est complètement différent.

IV.3-La dieldrine affecte l'homéostasie des phospholipides: étude par HRMAS.

Quel est l'impact de l'exposition à la dieldrine sur le métabolome de la drosophile? Le cas échéant, les modifications du métabolome peuvent elles expliquer la neurodégénérescence induite par la dieldrine? C'est à ces questions que nous avons voulu apporter des réponses.

Le métabolome peut être défini comme l'ensemble des petites molécules de signalisation comme le glucose, l'ATP, les neurotransmetteurs, les lipides présents dans les cellules, les tissus ou les fluides du corps (Kristal and Shurubor 2005). Différentes méthodes permettent

d'appréhender le métabolome d'un organisme comme la spectroscopie de masse ou la RMN du liquide. Ces deux méthodes sont évidemment destructives pour l'échantillon si on s'intéresse aux tissus. Nous avons décidé d'utiliser une méthode qui permet de travailler sur la drosophile entière et vivante, il s'agit de RMN par rotation à l'angle magique (HRMAS). Cette méthode a été développée au cours de ma thèse en collaboration avec le CEMHTI (CNRS, Orléans) et avec Nicolas Joudiou aussi en thèse dans notre équipe. Righi et ses collaborateurs avaient montré la faisabilité de cette approche chez la drosophile, et cette technique a été adaptée au CEMHTI sur le spectromètre 17,6T (Righi et al., 2010). Nous avons montré par cette technique que les drosophiles exposées à la dieldrine pouvaient se caractériser d'une part par une diminution des acides gras et du glycérol et d'autre part par une augmentation de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine. L'augmentation de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine dans les drosophiles exposées vient d'être confirmée au laboratoire par une étude en RMN liquide du proton sur des extraits de drosophiles entières.

Le glycérol est un intermédiaire important dans la synthèse des triacylglycérols ou TG (Kennedy pathway). En effet la phosphorylation du glycérol conduit au glycérol-3-phosphate (G-3-P) qui entre directement dans le cycle de Kennedy (Figure 69) (Kühnlein, 2012). La synthèse des TGs nécessite aussi la présence d'acides gras.

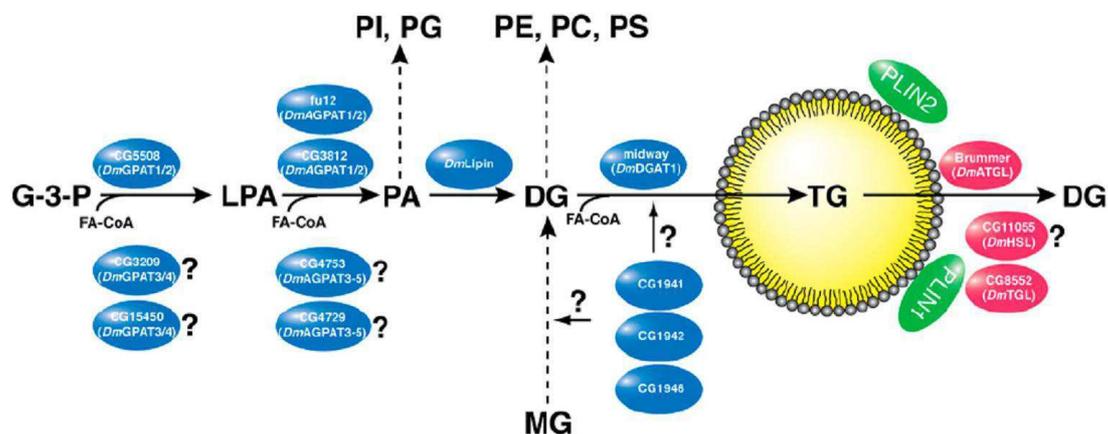


Figure 69: Voie de synthèse des triacylglycérols (TGs) et stockage dans les gouttelettes lipidiques (LDs). Les enzymes de la voie de biosynthèse du glycérol-3-phosphate sont représentées en bleu, les lipases en vert et les protéines modulatrices associées au LDs en rouge. G-3-P: glycérol-3-phosphate; LPA: acide lysophosphatidique; PA: acide phosphatidique; DG: diacylglycérol; MG: monoacylglycérol; TG: triacylglycérol; PI: phosphatidylinositol; PG: phosphatidylglycérol; PE: phosphatidyléthanolamine; PC: phosphatidylcholine; PS: phosphatidylsérine; FA-CoA: acide gras-coenzyme A; PLIN1,2: périlipine1 et périlipine2. (d'après Kühnlein, 2012).

La diminution du taux de glycérol et des acides gras chez les drosophiles exposées à la dieldrine suggère qu'elles peuvent présenter un défaut dans la production de TGs et donc qu'elles sont déficitaires en réserves énergétiques. En effet, les TGs constituent la forme majeure de stockage des lipides et sont retrouvés au niveau de gouttelettes lipidiques (Lipid droplets ou LDs).

Chez la larve, les LDs sont localisées essentiellement au niveau du corps gras, organe de stockage chez la drosophile. On trouve aussi des LDs dans d'autres organes ou cellules, comme dans des régions particulières de l'intestin, au niveau de la musculature de ``l'hindgut`` ou encore au niveau des tubes de Malpighi. Au cours de la métamorphose, le corps gras est détruit, mais les cellules (``flat cells``) qui le constituaient persistent et flottent librement dans la puppe. L'adulte qui émerge, contient ces ``flat cells``, qui dérivent de la larve, pendant les premiers jours de la vie. Ces cellules sont ensuite détruites et la majorité des LDs est alors stockée dans le corps gras de l'adulte. Le corps gras constitue le tissu principal de stockage de molécules de réserves énergétiques comme le glycogène et les TGs. Il faut remarquer que la dieldrine est principalement stockée au niveau des corps gras et de fait peut altérer la fonction de stockage de réserves énergétiques de ce tissu, soit directement en induisant une destruction du corps gras, soit indirectement en interférant avec le métabolisme ou les voies établies entre le cerveau et le corps gras permettant de maintenir le métabolisme énergétique.

Comment expliquer l'augmentation de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine après exposition à la dieldrine? Ces deux molécules sont des intermédiaires dans la biosynthèse de 2 phospholipides (figure 70A): la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylethanolamine (PE) et proviennent respectivement de la phosphorylation de la choline et de l'éthanolamine. Elles peuvent aussi provenir de la dégradation des phospholipides (figure 70B).

Il faut remarquer que la synthèse des phospholipides dépend de la voie de synthèse des TGs. En effet la synthèse de la PC ou de la PE nécessite les DGs qui sont des intermédiaires de la voie des TGs. On peut donc imaginer que, comme chez les drosophiles exposées à la dieldrine le pool de glycérol et d'acides gras est plus faible, il y a peu de synthèse de PC et de PE et donc accumulation de phosphocholine et de phosphoéthanolamine.

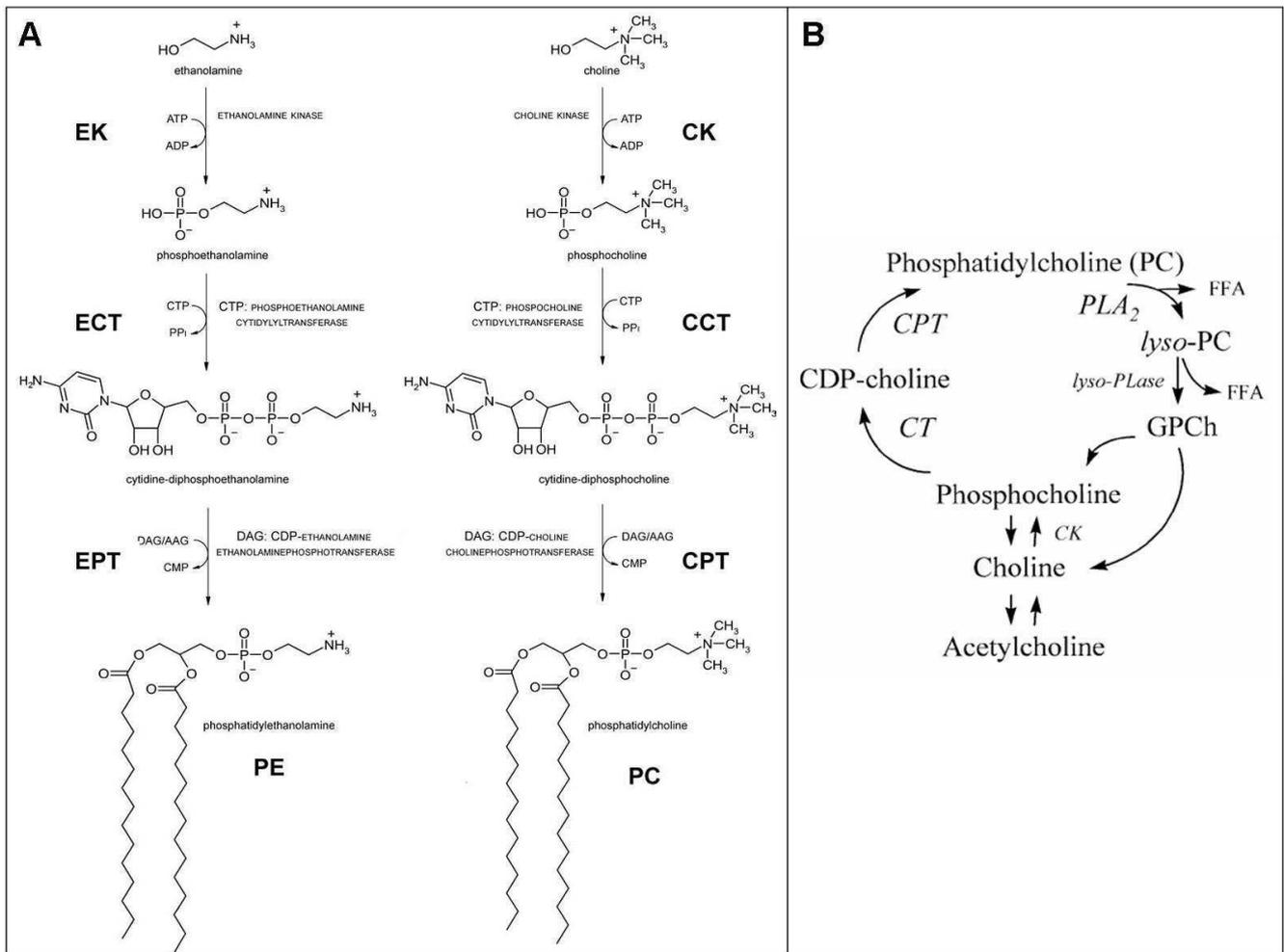


Figure 70: Voie de biosynthèse de la phosphatidyléthanolamine (PE) et de la phosphatidylcholine (PC). (A) Synthèse de la PE à partir de l'éthanolamine et de la PC à partir de la choline. (B) Biosynthèse et dégradation de la PC. La PC est dégradée par la PLA_2 (phospholipase 2) pour former des acides gras libres (FFA) et du lyso-PC. Celui-ci est ensuite converti en glycérophosphocholine (GPCh) et en acides gras par des lysophospholipases (lyso-PLase). Différentes diestérases permettent la transformation du GPCh en phosphocholine et en choline. La phosphocholine peut ensuite être condensée avec du CTP par la cytidyltransférase (CT) pour former du CDP-choline qui sera ensuite couplée à l'acide phosphatidique (choline phosphotransférase, CPT).

Les phospholipides, et en particulier la PE et la PC sont très importants pour la constitution des membranes cellulaires, en particulier pour la formation des membranes des neurones (Futerman and Banker 1996). Ils forment l'architecture des membranes et sont responsables de leur fluidité et de leur perméabilité. Ces phospholipides sont aussi nécessaires pour la croissance axonale (Chaves et al. 1995). En plus de leur rôle dans l'architecture des membranes des neurones, les phospholipides constituent également une source de lipides

comme seconds messagers. On peut donc imaginer: si la dieldrine induit une diminution de la synthèse de PE et PC, cela aura un impact important sur l'intégrité des membranes, en particulier sur les membranes des neurones. On peut donc imaginer que les modifications du métabolisme des lipides induites par l'exposition à la dieldrine se traduisent par des troubles neurologiques, expliquant ainsi le déficit d'activité locomotrice chez les drosophiles traitées à la dieldrine. De plus, le déficit en PE et PC doit avoir un effet sur la fluidité des membranes des neurones ce qui peut, peut être, rendre compte des modifications de signal observées en IRM. Il existe des exemples de maladies neurodégénératives qui semblent liées à des modifications du métabolisme des phospholipides. En particulier il a été montré que dans un modèle de la maladie de Sandhoff chez la souris, le métabolisme des phospholipides était affecté avec, en particulier, une baisse des taux de phospholipides (Buccoliero et al., 2004). De même il a été montré sur des cerveaux provenant de sujets atteints de la maladie de Tay Sachs ou de Sandhoff des taux réduits de phospholipides (Sandhoff et al. 1971). Il est intéressant de noter que des taux anormaux de PC ont aussi été observés pour d'autres maladies neurodégénératives (Klein, 2000).

Pour conclure, il apparaît que l'exposition à la dieldrine induit des modifications importantes du métabolisme des lipides et probablement en particulier des phospholipides (PE et PC). Cela peut avoir deux conséquences sur la drosophile: (i) diminution de ses réserves énergétiques, (ii) altération des membranes cellulaires et des neurones en particulier. Ces observations peuvent rendre compte, au moins en partie, des phénotypes observés comme la diminution de la durée de vie et le déficit de l'activité locomotrice.

Evidemment, des expériences complémentaires sont à réaliser pour conforter ces hypothèses, comme par exemple: (i) Montrer une altération des phospholipides spécifiquement dans le cerveau. Cela pourra être réalisé soit par HRMAS localisée, les séquences étant maintenant au point au CEMHTI, soit par RMN ^1H sur des extraits de têtes de drosophiles exposées ou non à la dieldrine, ou par des méthodes de chromatographie. (ii) Montrer que le métabolisme des lipides au niveau du corps gras est affecté. Plusieurs méthodes permettent de détecter les TGs dans l'hémolymphe (TGs circulants), dans l'ensemble de la drosophile, ou encore dans un organe particulier par coloration (Oil-Red-O et BODIPY) (Kohyama-Koganeya et Hirabayashi, 2010). (iii) Etudier le corps gras chez l'adulte en utilisant des lignées exprimant la GFP spécifiquement dans le corps gras. La mesure de la GFP nous renseignera sur l'état du corps gras.

IV.4-Des processus épigénétiques sont impliqués dans la neurodégénérescence induite par la dieldrine.

Notre étude de l'impact d'une exposition à la dieldrine chez la drosophile a également mis en évidence l'implication de processus épigénétiques. On observe une baisse de l'acétylation des histones H3 chez les femelles exposées à la dieldrine âgées de 6 jours. De plus, la présence d'un inhibiteur des histones désacétylases (trichostatine A) dans le milieu d'élevage restaure l'activité locomotrice, de même que la perte d'une dose de *Rpd3* qui code une HDAC. La balance entre l'activité des HATs et des HDACs est un processus très important qui permet de réguler l'expression des gènes conduisant à une activité neuronale normale. Une perturbation de l'homéostasie entre l'activité des HATs et des HDACs pourrait induire des défauts dans l'expression des gènes en particulier favoriser l'expression de gènes proapoptotiques et diminuer l'expression de gènes permettant la survie de la cellule, conduisant à une neurodégénérescence (Saha et Pahan, 2006). De nombreuses maladies neurodégénératives ont d'ailleurs été reliées à des altérations épigénétiques comme par exemple les maladies de Parkinson, de Huntington ou encore l'ataxie de Friedreich qui ont été corrélées à une hypoacétylation des histones (Portela et Esteller, 2010). Ces données permettraient d'expliquer les résultats obtenus avec la trichostatine A et la baisse d'acétylation des histones H3 qui pourrait conduire à une neurodégénérescence. Cependant, nos résultats restent des résultats préliminaires qu'il faut confirmer et compléter. Plusieurs pistes sont envisagées: (i) étudier d'autres modifications d'histones, comme la méthylation des lysines ou la phosphorylation, et étudier ces modifications au cours du temps chez des drosophiles exposées, (ii) poursuivre les études sur les mutants de différentes HDACs, (iii) reprendre l'étude sur les mutants HATs, en utilisant une autre stratégie qui consisterait à inhiber une HAT spécifiquement dans le cerveau des drosophiles en utilisant des souches exprimant des RNAi spécifiques de HATs sous contrôle des séquences UAS et des drivers Gal4 spécifiques du cerveau, voire de certaines régions du cerveau, (iv) regarder les gènes qui sont concernés par ces modifications épigénétiques (ChIP Seq par exemple).

IV.5-Les mâles et les femelles ne montrent pas la même sensibilité à la dieldrine.

Au cours des différents tests réalisés, nous avons constaté qu'après exposition à la dieldrine, les mâles et les femelles ne se comportaient pas de la même façon. En effet, les mâles sont apparus beaucoup moins sensibles à la dieldrine que les femelles. L'exposition à la

dieldrine a peu d'effets sur la durée de vie des mâles qui se trouve diminuée de 31 jours pour la dose la plus forte alors qu'elle est diminuée de 78 jours pour la même dose chez les femelles. Nous avons également constaté que l'activité locomotrice n'était pas affectée chez les mâles, contrairement à ce qui est observé chez les femelles. Pourquoi cette différence entre les deux sexes?

Il est bien connu que chez la drosophile, les mâles et les femelles ne répondent pas de la même façon à des modifications génétiques ou environnementales qui rallongent la durée de vie (Shen et al., 2009). De même, la différence de comportement entre les mâles et les femelles vis-à-vis d'un xénobiotique est assez courante. Par exemple, l'étude sur l'imidaclopride présentée dans la première partie de ma thèse a également montré une différence entre les deux sexes, avec les mâles moins sensibles que les femelles dans le cas d'une intoxication chronique. Ces phénomènes sont mal compris, en grande partie, aussi, parce qu'on connaît mal les mécanismes de vieillissement. Comme discuté dans le premier article on peut faire l'hypothèse que cette différence reflète une différence dans l'expression de cytochromes P450 entre les mâles et les femelles. Une autre possibilité est que le cerveau des mâles n'est pas identique à celui des femelles et qu'il est moins sensible à la neurodégénérescence induite par la dieldrine. Il est aussi souvent proposé que la différence de durée de vie entre mâles et femelles est liée à des fonctions de reproduction. Par exemple, chez l'Homme, l'augmentation de la durée de vie a été corrélée avec un petit nombre de descendants (Westendorp et Kirkwood, 1998). On peut alors proposer une troisième hypothèse qui est liée au fait que la dieldrine induit une baisse importante des réserves énergétiques. Les fonctions reproductrices de la femelle ont probablement un coût en terme de réserves énergétiques plus importantes. En effet au cours de l'ovogénèse, celles-ci produisent des ovocytes qui stockent des gouttelettes lipidiques (lipid droplets ou LDs) pour assurer le développement embryonnaire. Elles seraient donc plus affectées par une exposition à la dieldrine. Il a été montré que l'élimination des cellules germinales chez l'adulte induit une augmentation de la durée de vie moyenne plus importante chez les femelles que chez les mâles (Flatt et al., 2008). L'élimination des cellules germinales chez la drosophile conduit également à une augmentation de l'expression des *dilps* (*Drosophila insulin-like peptides*). Il serait, évidemment, très intéressant de caractériser la fécondité des femelles exposées à la dieldrine, comme ce qui a été réalisé pour l'exposition à l'imidaclopride, et également d'évaluer l'impact de l'exposition à la dieldrine sur la voie de l'insuline.

IV.6-Un transporteur ABC pourrait être impliqué dans la sensibilité à la dieldrine.

La coloration de l'œil chez la drosophile est due à la présence de 2 pigments: la drosoptérine (pigment rouge) et un ommochrome (pigment brun). Les gènes *white*, *scarlet* et *brown* codent des sous-unités qui forment des transporteurs hétérodimériques (White/Scarlet ou White/Brown) de type ABC. Ils permettent le transport du tryptophane (White et Scarlet) et de la guanine (White et Brown) à travers la membrane des cellules pigmentaires de l'œil (Figure 71). Ces composés sont les précurseurs des pigments de l'œil (drosoptérines et ommochromes). Cependant, une étude a montré que ces gènes n'étaient pas seulement exprimés dans les cellules pigmentaires de l'œil mais également dans le cerveau (Campbell et Nash, 2001). Dans cette étude, les auteurs ont montré que, le mutant *white* et le mutant *brown* étaient moins sensibles aux anesthésiques que les individus sauvages ce qui suggère que ces deux gènes ont également une fonction dans le système nerveux de la drosophile.

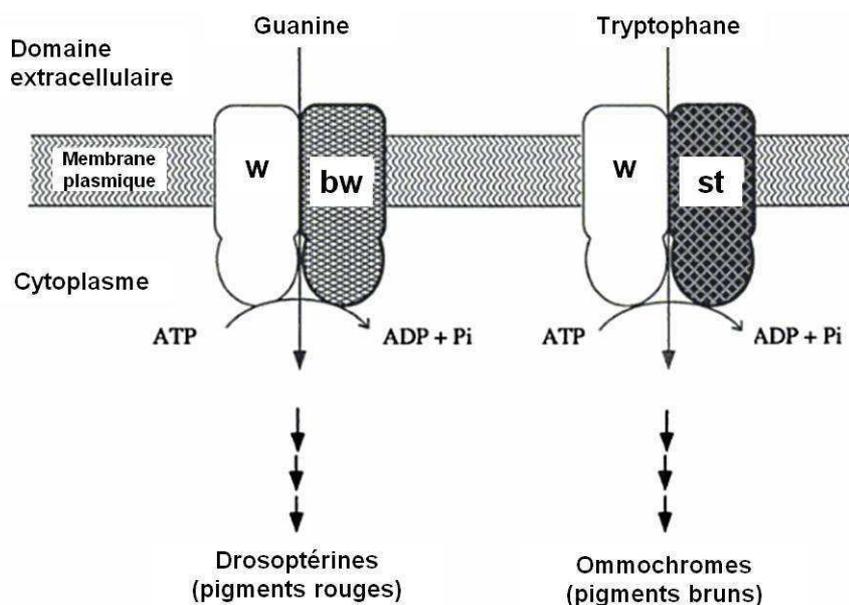


Figure 71: Transporteurs ABC permettant le passage à travers la membrane plasmique de la guanine et du tryptophane, précurseurs des pigments de l'œil chez la drosophile. Les transporteurs ABC sont des hétérodimères composés de (w) White, (bw) Brown et (st) Scarlet. Les pigments de l'œil de drosophile sont les drosoptérines et les ommochromes.

Le transporteur hétérodimère White/Brown est impliqué dans le transport de la guanine qui sera ensuite transformée en GTP puis en dihydroneoptérine triphosphate. Dans les cellules pigmentaires, ce composé est ensuite utilisé comme précurseur des drosoptérines. Dans les

cellules non pigmentaires, la dihydronéoptérine triphosphate est transformée en tétradihybioptérine, qui joue un rôle important dans la synthèse de bioamines comme la dopamine (Campbell et Nash, 2001).

Le transporteur hétérodimère White/Scarlet pourrait également avoir un rôle au niveau du système nerveux et être impliqué dans des maladies neurodégénératives. En effet il permet l'entrée du tryptophane dans la cellule ce qui conduit à la formation de 3-hydroxykynurénine (3-HK) ou d'acide kynurénique (KYNA) (Figure 72).

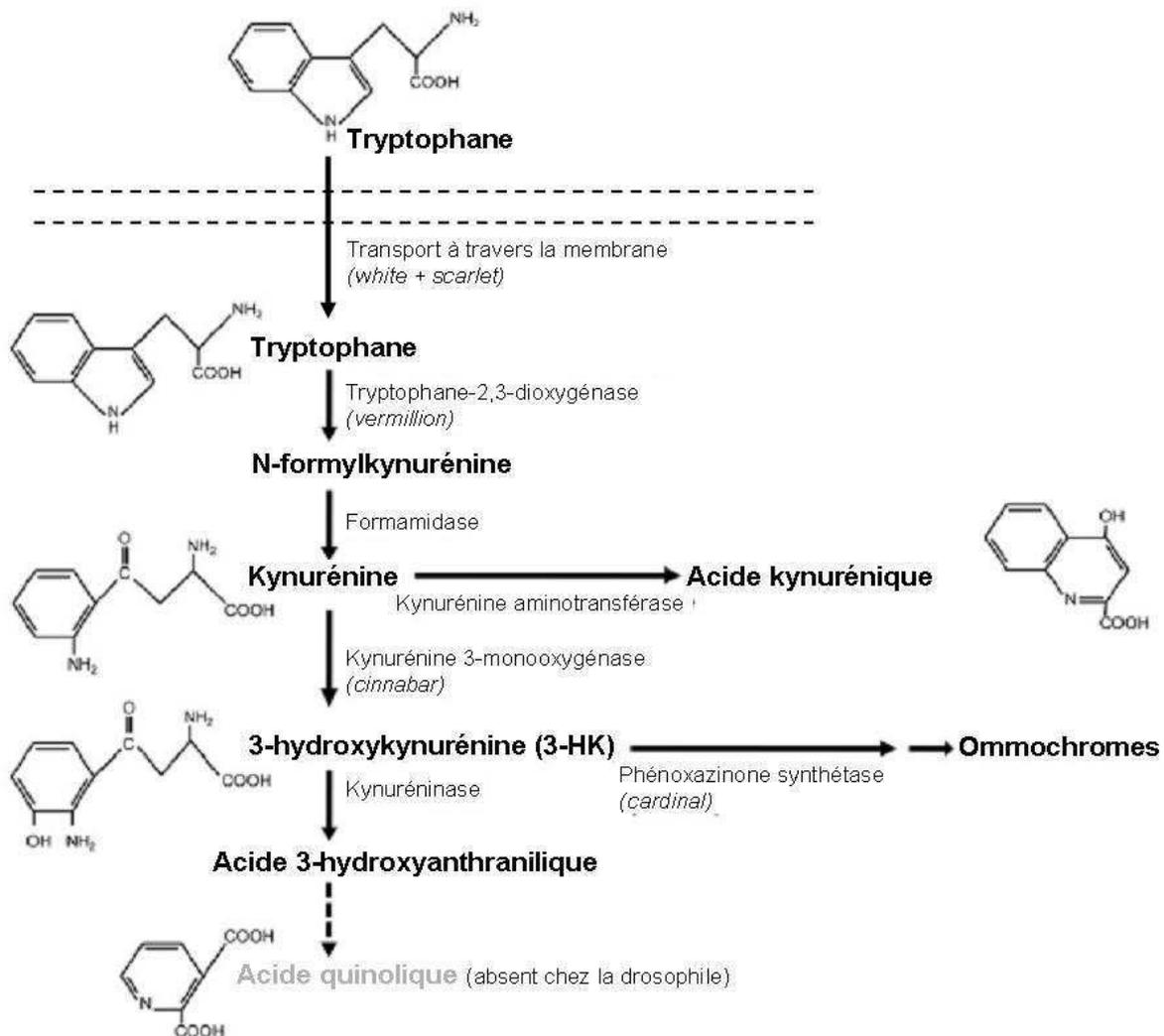


Figure 72: Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la kynurénine chez la drosophile. Les métabolites de la kynurénine sont impliqués dans la voie de biosynthèse de certains pigments de l'œil de la drosophile, les ommochromes. Les noms entre parenthèses correspondent au nom des gènes (d'après Campesan et al., 2011).

Chez la drosophile, un modèle de la maladie de Huntington présente une augmentation du rapport 3-HK/KYNA. Une inhibition de la synthèse de 3-HK conduit à un effet neuroprotecteur chez ces drosophiles due à une augmentation de KYNA (métabolite neuroprotecteur) par rapport au 3-KH (métabolite neurotoxique) (Campesan et al., 2011). Ce mécanisme a été mis en évidence chez des mutants de la voie de biosynthèse de la kynurénine (*cinnabar* et *vermillion*). De plus, un ajout d'inhibiteur de la kynurénine monooxygénase (UPF 648) dans le milieu d'élevage a aussi un effet neuroprotecteur chez les drosophiles modèles de la maladie de Huntington (Campesan et al., 2011). A l'inverse, l'ajout de 3-HK dans le milieu d'élevage conduit à une augmentation du rapport 3-HK/KYNA chez un modèle de la maladie de Huntington dans un contexte mutant pour *cinnabar* (*Htt93Q cn/cn*) et à une neurodégénérescence (Campesan et al., 2011). Le rapport entre la 3-HK et le KYNA joue donc un rôle important dans la mise en place de la neurodégénérescence dans un modèle de la maladie de Huntington chez la drosophile.

Durant notre étude, il est apparu que la souche w^{1118} était résistante à la dieldrine. En effet, son activité locomotrice n'était pas affectée même pour la plus forte dose de dieldrine. Comment expliquer ce comportement inattendu? Plusieurs hypothèses de travail peuvent être envisagées.

La première hypothèse implique l'hétérodimère White/Brown. En effet celui-ci pourrait être impliqué dans la synthèse de la dopamine. Chez le mutant *white*, Borycz et ses collaborateurs observent une réduction importante de la quantité de sérotonine, d'histamine et de dopamine au niveau de la tête (Borycz et al., 2008). De manière surprenante, le mutant *white* est résistant à la dieldrine et présente une quantité moindre de dopamine au niveau de la tête. Or, les expériences précédentes ont montré que l'ajout de L-DOPA (précurseur de la dopamine) dans le milieu d'élevage restaure l'activité locomotrice pour la souche Oregon-R, sensible à la dieldrine. Il a été montré que l'homéostasie de la dopamine est importante dans la susceptibilité des neurones dopaminergiques vis-à-vis de facteurs environnementaux comme l'exposition aux insecticides. En effet, une étude réalisée chez la drosophile montre que la surexpression du transporteur vésiculaire des monoamines (dVMAT) bloque la dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par la roténone (Lawal et al., 2010). Les auteurs proposent que la surexpression du transporteur provoquerait une diminution de la dopamine dans le cytosol par séquestration dans les vésicules synaptiques. Il y aurait donc moins de dopamine dans le cytosol qui pourrait interagir avec la roténone et augmenter son potentiel cytotoxique (Lawal et al., 2010). Une réduction de la dopamine cellulaire aurait

donc un effet neuroprotecteur chez la drosophile exposée à la roténone mais également chez un modèle exprimant l' α -synucléine humaine (Bayersdorfer et al., 2010), ce qui pourrait expliquer la résistance du mutant *white* vis-à-vis de la dieldrine. Si tel est le cas, les mutants *brown* devraient, comme les mutants w^{118} , être résistants à la dieldrine.

Une seconde hypothèse pourrait impliquer le transporteur White/Scarlet. En effet, on peut imaginer que la baisse du taux de 3-HK et du KYNA chez les mutants w^{118} protège de la neurodégénérescence induite par la dieldrine comme dans le cas de la maladie de Huntington. Pour tester cette hypothèse des souches mutantes pour *scarlet* seront testées vis-à-vis de la dieldrine. Nous proposons également de regarder si l'ajout de 3-HK dans le milieu en même temps que la dieldrine conduit à un déficit locomoteur chez les mutants w^{118} . Dans ce cas, l'élevage de drosophiles de la souche Oregon-R (sensible à la dieldrine) sur un milieu contenant un inhibiteur de la kynurénine monooxygénase et la dieldrine devrait permettre de restaurer le phénotype locomoteur.

IV.7-Conclusion.

Au cours de ce travail, nous avons pu apporter des premiers éléments montrant que l'exposition à la dieldrine induisait différents phénotypes caractéristiques de neurodégénérescence, comme la baisse de la durée de vie, le déficit de l'activité locomotrice, et la diminution de neurones dopaminergiques particuliers. Ces observations sont en accord avec des observations faites chez l'homme ou encore chez la souris. Nous avons également apporté les premiers arguments pour dire que l'exposition à la dieldrine peut affecter le métabolisme des lipides, ce qui peut expliquer nos observations, mais qui peut aussi avoir des conséquences importantes sur d'autres processus biologiques que nous n'avons pas encore explorés, comme par exemple la réponse immunitaire. L'ensemble de ce travail a permis de définir des pistes qui devront être explorées de manière plus importante par la suite. Ces résultats montrent aussi que la drosophile constitue un bon modèle pour comprendre les effets de pesticides neurotoxiques chez l'homme.

J'ai aussi été amenée, au cours de ce travail, à appliquer de nouvelles méthodes d'étude à la drosophile comme l'IRM et le HRMAS. Les résultats présentés ici constituent la première application à un problème biologique de ces méthodes. Par ce travail, nous avons pu montrer tout l'intérêt de l'utilisation de ces modes d'approche.

CHAPITRE IV: Conclusion générale.

L'usage intensif ces 50 dernières années des produits phytosanitaires en particulier les insecticides a conduit à une contamination importante de l'environnement et à l'apparition d'effets néfastes sur de nombreux organismes vivants comme l'homme. Malgré une prise de conscience des effets indésirables de ces produits à la suite de la publication de Silent spring en 1962, les produits phytosanitaires restent très utilisés notamment dans le domaine agricole. De ce fait, plusieurs problèmes liés à l'utilisation de ces produits se posent. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée aux effets de deux insecticides, l'imidaclopride et la dieldrine chez un insecte modèle, la drosophile pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu après une exposition aux insecticides.

Actuellement, l'imidaclopride est l'insecticide le plus utilisé au monde en particulier dans le domaine agricole et est impliqué dans le déclin des abeilles domestiques. Mon travail de thèse avait pour but d'évaluer la toxicité de l'imidaclopride chez la drosophile. Ce travail a permis de mettre en évidence des effets néfastes de cet insecticide même à des doses très faibles que l'on retrouve dans la nature sur la reproduction chez la drosophile. Ces effets ne sont sans doute pas limités à cet insecte modèle et d'autres espèces pourraient être touchés par une exposition faible à l'imidaclopride conduisant à des effets délétères sur les populations naturelles d'insectes. L'utilisation des insecticides dans l'agriculture peut également induire l'apparition de résistance chez les insectes ravageurs qui compromet fortement l'usage de ces produits dans le futur et donc le contrôle de la productivité agricole. Une souche des champs de drosophile (Orléans) élevée au laboratoire montre une résistance à l'imidaclopride chez les femelles après une exposition aiguë. Ce résultat nous a permis d'étudier ce phénomène de résistance chez la drosophile et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Pour ces femelles Orléans, la résistance est due à la sous expression de la sous-unité D β 1 et l'implication des GSTs a été mis en évidence dans le métabolisme de l'imidaclopride. Cependant la détermination de la composition en sous-unités des nAChRs sensibles à l'imidaclopride est encore méconnue et l'étude des phénomènes de résistance peut apporter des réponses quant à la composition de ces récepteurs. L'usage des insecticides conduit donc à l'apparition d'effets néfastes sur les organismes non cibles mais également sur les insectes ravageurs.

Parmi les organismes vivants exposés aux insecticides, un organisme est de plus en plus étudié, c'est l'homme. En effet, nous consommons toujours plus de produits phytosanitaires à travers notre environnement et notre nourriture et des conséquences sur la santé peuvent apparaître. Pour évaluer les conséquences liées à l'exposition aux insecticides chez l'homme, nous avons décidé de modéliser l'impact de la dieldrine chez la drosophile, un des insecticides potentiellement impliqué dans l'étiologie de la maladie de Parkinson. Nous avons montré que cet insecticide induisait une neurodégénérescence aux doses retrouvées dans la nature. Cette neurodégénérescence apparaît spécifique aux neurones dopaminergiques cependant des études complémentaires pourront permettre de valider ce résultat. La toxicité à la dieldrine implique également des mécanismes épigénétiques comme l'acétylation des histones. Ces mécanismes peuvent conduire à une dérégulation de certains gènes et donc à la mort de la cellule. De plus, la modification de l'acétylation des histones induite par une exposition de la dieldrine peut-elle être transmise à la génération suivante? Il serait important de déterminer le rôle exact de ces mécanismes dans la toxicité à la dieldrine. De manière inattendue, nous avons également mis en évidence la résistance à cet insecticide chez un mutant *white* qui ne permet plus le transport dans les cellules du tryptophane et de la guanine. Le transport de ces composés est bien connu pour son rôle dans la pigmentation de l'œil chez la drosophile. Cependant ce transporteur White ne serait pas seulement impliqué dans ce mécanisme mais il aurait également un rôle dans le fonctionnement du système nerveux et donc un rôle potentiel dans la neurotoxicité des insecticides comme la dieldrine. Cette étude nous a permis de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu dans la toxicité à la dieldrine et montre la complexité des différents processus impliqués suite à une exposition aux insecticides.

D'un point de vue général, cette thèse a permis de mieux comprendre certains mécanismes impliqués dans la réponse à une exposition aux insecticides. Cependant de nombreux résultats ont également soulevés plusieurs questions qui restent en suspend mais des études complémentaires pourront par la suite fournir des réponses. L'étude de l'exposition aux insecticides reste un processus complexe qui fait intervenir de nombreux acteurs pouvant interagir entre eux. L'étude de ces mécanismes reste néanmoins essentielle pour améliorer l'utilisation des insecticides à l'avenir et donc diminuer les impacts sur les organismes vivants comme l'homme.

A

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Ahmad, M., Denholm, I., Bromilow, R.H., 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* 62, 805–810.
- Alavanja, M.C., Ross, M.K., Bonner, M.R., 2013. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: a cancer journal for clinicians.* 63(2), 120-42.
- Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A., Weill, M., 2007. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 41–47.
- Amichot, M., Tarès, S., Brun-Barale, A., Arthaud, L., Bride, J.-M., Bergé, J.-B., 2004. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 Cyp6a2 enable DDT metabolism. *Eur. J. Biochem.* 271, 1250–1257.
- Andronesi, O.C., Mintzopoulos, D., Struppe, J., Black, P.M., Tzika, A.A., 2008. Solid-state NMR adiabatic TOBSY sequences provide enhanced sensitivity for multidimensional high-resolution magic-angle spinning ¹H MR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 193, 251-258.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–1469.
- Arnó, J., Gabarra, R., 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Pest Science.* 84, 513–520.
- Asih, P.B., Syahrani, L., Rozi, I.E., Pratama, N.R., Marantina, S.S., Arsyad, D.S., Mangunwardoyo, W., Hawley, W., Laihah, F., Shinta, Sukowati, S., Lobo, N.F., Syafruddin, D., 2012. Existence of the rdl mutant alleles among the anopheles malaria vector. *Indonesia. Malar. J.* 11, 57.

-Auluck, P.K., Chan, H.Y.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., Bonini, N.M., 2002. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295, 865–868.

B

-Baldi, I., Filleul, L., Mohammed-Brahim, B., Fabrigoule, C., Dartigues, J.-F., Schwall, S., Drevet, J.-P., Salamon, R., Brochard, P., 2001. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: results from the French Phytoner study. *Environmental Health Perspectives* 109, 839.

-Band, P.R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R.P., Le, N.D., 2011. Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *The Prostate* 71, 168–183.

-Barry, M.J., O'Halloran, K., Logan, D.C., Ahokas, J.T., Holdway, D.A., 1995. Sublethal effects of esfenvalerate pulse-exposure on spawning and non-spawning Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Archives of environmental contamination and toxicology* 28, 459–463.

-Bass, C., Field, L.M., 2011a. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 67, 886–890.

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

-Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J., 2007. Cancer health effects of pesticides Systematic review. *Canadian Family Physician* 53, 1704–1711.

-Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Velazquez, A., Creus, A., Marcos, R., 1987. Studies on the toxicity of cypermethrin and fenvalerate in different strains of *Drosophila melanogaster* Meig.(Insecta, diptera). *Environmental research* 43, 117–125.

-Baxter, S.W., Chen, M., Dawson, A., Zhao, J.-Z., Vogel, H., Shelton, A.M., Heckel, D.G., Jiggins, C.D., 2010. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor alpha6 are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet.* 6, e1000802.

-Bayersdorfer, F., Voigt, A., Schneuwly, S., Botella, J.A., 2010. Dopamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* models of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 40, 113–119.

-Belinato, T.A., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Valle, D., 2013. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. *Parasit Vectors* 6, 83.

-Bergé, J.B., Feyereisen, R., Amichot, M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 353, 1701–1705.

- Borycz, J., Borycz, J.A., Kubów, A., Lloyd, V., Meinertzhagen, I.A., 2008.** *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J. Exp. Biol.* 211, 3454–3466.
- Bossi, R., Skjøth, C.A., Skov, H., 2013.** Three years (2008-2010) of measurements of atmospheric concentrations of organochlorine pesticides (OCPs) at Station Nord, North-East Greenland. *Environ Sci Process Impacts* 15, 2213–2219.
- Bourdin, C.M., Moignot, B., Wang, L., Murillo, L., Juchaux, M., Quinchard, S., Lapied, B., Guérineau, N.C., Dong, K., Legros, C., 2013.** Intron retention in mRNA encoding ancillary subunit of insect voltage-gated sodium channel modulates channel expression, gating regulation and drug sensitivity. *PLoS ONE* 8, e67290.
- Brandt, A., Scharf, M., Pedra, J.H.F., Holmes, G., Dean, A., Kreitman, M., Pittendrigh, B.R., 2002.** Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the Rst(2)DDT locus. *Insect Molecular Biology* 11, 337–341.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011.** *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008.** How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- Brühl, C.A., Pieper, S., Weber, B., 2011.** Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2465–2472.
- Buccoliero, R., Bodennec, J., Van Echten-Deckert, G., Sandhoff, K., Futerman, A.H., 2004.** Phospholipid synthesis is decreased in neuronal tissue in a mouse model of Sandhoff disease. *J. Neurochem.* 90, 80–88.
- Buckingham, S.D., Biggin, P.C., Sattelle, B.M., Brown, L.A., Sattelle, D.B., 2005.** Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol. Pharmacol.* 68, 942–951.
- Burns, C.J., McIntosh, L.J., Mink, P.J., Jurek, A.M., Li, A.A., 2013.** Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 16, 127–283.
- Burton, M.J., Mellor, I.R., Duce, I.R., Davies, T.G.E., Field, L.M., Williamson, M.S., 2011.** Differential resistance of insect sodium channels with *kdr* mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 723–732.
- Busvine, J.R., 1951.** Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature* 168, 193–195.

C

- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G.**, 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 139–150.
- Campbell, J.L., Nash, H.A.**, 2001. Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the white and brown genes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of neurobiology* 49, 339–349.
- Campesan, S., Green, E.W., Breda, C., Sathyaikumar, K.V., Muchowski, P.J., Schwarcz, R., Kyriacou, C.P., Giorgini, F.**, 2011. The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Curr. Biol.* 21, 961–966.
- Carbone, P., Giordano, F., Nori, F., Mantovani, A., Taruscio, D., Lauria, L., Figa-Talamanca, I.**, 2006. Cryptorchidism and hypospadias in the Sicilian district of Ragusa and the use of pesticides. *Reproductive toxicology* 22, 8–12.
- Carpenter, S.K., Mateus-Pinilla, N.E., Singh, K., Lehner, A., Satterthwaite-Phillips, D., Bluett, R.D., Rivera, N.A., Novakofski, J.E.**, 2013. River otters as biomonitors for organochlorine pesticides, PCBs, and PBDEs in Illinois. *Ecotoxicology and environmental safety*. [Epub ahead of print]
- Carré, C., Szymczak, D., Pidoux, J., Antoniewski, C.**, 2005. The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8228–8238.
- Casida, J.E.**, 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619.
- Casida, J.E., Durkin, K.A.**, 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- Catterall, W.A.**, 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13–25.
- Chaudhuri, A., Bowling, K., Funderburk, C., Lawal, H., Inamdar, A., Wang, Z., O'Donnell, J.M.**, 2007. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. *J. Neurosci.* 27, 2457–2467.
- Chaves, E.P. de, Vance, D.E., Campenot, R.B., Vance, J.E.**, 1995. Axonal synthesis of phosphatidylcholine is required for normal axonal growth in rat sympathetic neurons. *J Cell Biol* 128, 913–918.
- Chelvanayagam, Gareth, Parker, Michael W., Board, PhilipG.**, 2001. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions.* 133(1-3): 256-260.

- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A.J.**, 1999. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218–2230.
- Chuang, D.-M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.-J., Chiu, C.-T.**, 2009. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends in neurosciences* 32, 591–601.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P., Daborn, P.J.**, 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *PNAS* 106, 5731–5736.
- Claudianos, C., Russell, R.J., Oakeshott, J.G.**, 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 675–686.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G.**, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636.
- Claver, M.A., Ravichandran, B., Khan, M.M., Ambrose, D.P.**, 2003. Impact of cypermethrin on the functional response, predatory and mating behaviour of a non-target potential biological control agent *Acanthaspis pedestris* (Stål) (Het., Reduviidae). *Journal of Applied Entomology* 127, 18–22.
- Cohn, B.A., Wolff, M.S., Cirillo, P.M., Sholtz, R.I.**, 2007. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental Health Perspectives* 115, 1406.
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V.**, 2013. Epigenetics and Pesticides. *Toxicology*. 10;307:35-41.
- Consoli, F.L., Parra, J.R.P., Hassan, S.A.**, 1998. Side-effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lep., Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology* 122, 43–47.
- Corrales, N., Campos, M.**, 2004. Populations, longevity, mortality and fecundity of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae) from olive-orchards with different agricultural management systems. *Chemosphere* 57, 1613–1619.
- Corrigan, F.M., Murray, L., Wyatt, C.L., Shore, R.F.**, 1998. Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 150, 339–342.
- Corrigan, F.M., Wienburg, C.L., Shore, R.F., Daniel, S.E., Mann, D.**, 2000. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 59, 229–234.
- Costa, L.G.**, 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* 366, 1–13.

- Coulom, H., Birman, S.**, 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience* 24, 10993–10998.
- Creus, A., Xamena, N., Marcos, R.**, 1983. Sensitivity of different strains of *Drosophila melanogaster* to endosulfan and malathion. *Toxicology letters* 16, 323–330.

D

- Daborn, P., Boundy, S., Yen, J., Pittendrigh, B., ffrench-Constant, R.**, 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol. Genet. Genomics* 266, 556–563.
- Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G., ffrench-Constant, R.H.**, 2002. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297, 2253–2256.
- Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G.**, 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 8, 1402–1419.
- Das, S., Sadanandappa, M.K., Dervan, A., Larkin, A., Lee, J.A., Sudhakaran, I.P., Priya, R., Heidari, R., Holohan, E.E., Pimentel, A.**, 2011. Plasticity of local GABAergic interneurons drives olfactory habituation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E646–E654.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S.**, 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162.
- Davies, T.E., O'Reilly, A.O., Field, L.M., Wallace, B., Williamson, M.S.**, 2008. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest Manag. Sci.* 64, 1126–1130.
- De Solla, S.R., Bishop, C.A., Van Der Kraak, G., Brooks, R.J.**, 1998. Impact of organochlorine contamination on levels of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelydra serpentina serpentina*) in Ontario, Canada. *Environmental Health Perspectives* 106, 253.
- Dekeyser, M.A.**, 2005. Acaricide mode of action. *Pest Management Science* 61, 103–110.
- Denholm, I., Devine, G.J., Williamson, M.S.**, 2002. Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science* 297, 2222–2223.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M.**, 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M., Roy, R.**, 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 108, 205–211.

- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P.**, 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 545–569.
- Dhillon, A.S., Tarbutton, G.L., Levin, J.L., Plotkin, G.M., Lowry, L.K., Nalbone, J.T., Shepherd, S.**, 2008. Pesticide/Environmental Exposures and Parkinson's Disease in East Texas. *Journal of Agromedicine* 13, 37–48.
- Drechsel, D.A., Patel, M.**, 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1873–1886.
- Dubrovsky, E.B.**, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 6–11.

E

- El Nemr, A., Moneer, A.A., Khaled, A., El-Sikaily, A.**, 2012. Levels, distribution, and risk assessment of organochlorines in surficial sediments of the Red Sea coast, Egypt. *Environmental monitoring and assessment* 1–19.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J.**, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8.
- Engel, S.M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D.B., Canfield, R.L., Wolff, M.S.**, 2011. Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental Health Perspectives* 119, 1182.
- Eskenazi, B., Harley, K., Bradman, A., Weltzien, E., Jewell, N.P., Barr, D.B., Furlong, C.E., Holland, N.T.**, 2004. Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environmental health perspectives* 112, 1116.
- Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D.B., Jewell, N.P.**, 2006. In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodipenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics* 118, 233–241.

F

- Fahrbach, S.E., Smagghe, G., Velarde, R.A.**, 2012. Insect nuclear receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 83–106.
- Feany, M.B., Bender, W.W.**, 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398.
- Festucci-Buselli, R.A., Carvalho-Dias, A.S., de Oliveira-Andrade, M., Caixeta-Nunes, C., Li, H.-M., Stuart, J.J., Muir, W., Scharf, M.E., Pittendrigh, B.R.**, 2005. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 14, 69–77.

- Feyereisen, R.**, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions* 34, 1252–1255.
- ffrench-Constant, R.H., Mortlock, D.P., Shaffer, C.D., MacIntyre, R.J., Roush, R.T.**, 1991. Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7209–7213.
- ffrench-Constant, R.H.**, 1994. The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 335–345.
- ffrench-Constant, R.H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T., Stilwell, G.**, 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 449–466.
- ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G.**, 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20, 163–170.
- Field, L.M., Blackman, R.L., Tyler-Smith, C., Devonshire, A.L.**, 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* 339, 737–742.
- Field, L.M.**, 2000. Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* 349 3, 863–868.
- Flatt, T., Min, K.-J., D’Alterio, C., Villa-Cuesta, E., Cumbers, J., Lehmann, R., Jones, D.L., Tatar, M.**, 2008. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6368–6373.
- Fleming, L., Mann, J.B., Bean, J., Briggie, T., Sanchez-Ramos, J.R.**, 1994. Parkinson’s disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann. Neurol.* 36, 100–103.
- Fournier, D.**, 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 257–261.
- Frantzios, G., Papsiki, K., Sidiropoulou, B., Lazaridis, I., Theophilidis, G., Mavragani-Tsipidou, P.**, 2008. Evaluation of insecticidal and genotoxic effects of imidacloprid and acetochlor in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Applied Entomology* 132, 583–590.
- Freeman, L.E.B., Bonner, M.R., Blair, A., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Lubin, J.H., Dosemeci, M., Lynch, C.F., Knott, C., Alavanja, M.C.**, 2005. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. *American journal of epidemiology* 162, 1070–1079.
- Freire, C., Koifman, S.**, 2012. Pesticide exposure and Parkinson’s disease: Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology* 33, 947–971.
- Friggi-Grelin, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J., Birman, S.**, 2003. Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *Journal of neurobiology* 54, 618–627.

-**Futerman, A.H., Banker, G.A.**, 1996. The economics of neurite outgrowth—the addition of new membrane to growing axons. *Trends in neurosciences* 19, 144–149.

G

-**Galvan, T.L., Koch, R.L., Hutchison, W.D.**, 2005. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 34, 108–114.

-**Garrison, V.H., Majewski, M.S., Foreman, W.T., Genualdi, S.A., Mohammed, A., Massey Simonich, S.L.**, 2013. Persistent organic contaminants in Saharan dust air masses in West Africa, Cape Verde and the eastern Caribbean. *Science of The Total Environment* 468, 530–543.

-**Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M.**, 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environment international* 52, 51–65.

-**Gilbert, L.I.**, 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 1–10.

-**Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E.**, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491, 105–108.

-**Gisselmann, G., Plonka, J., Pusch, H., Hatt, H.**, 2004. *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Br. J. Pharmacol.* 142, 409–413.

-**Glynn, A., Thuvander, A., Aune, M., Johannisson, A., Darnerud, P.O., Ronquist, G., Cnattingius, S.**, 2008. Immune cell counts and risks of respiratory infections among infants exposed pre- and postnatally to organochlorine compounds: a prospective study. *Environ Health* 7, 62.

-**Gordesky-Gold, B., Rivers, N., Ahmed, O.M., Breslin, P.A.**, 2008. *Drosophila melanogaster* prefers compounds perceived sweet by humans. *Chemical senses* 33, 301–309.

-**Grant, P.B., Woudneh, M.B., Ross, P.S.**, 2013. Pesticides in blood from spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) downstream of banana plantations in Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2576–2583.

-**Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B. & Pallanck, L. J.**, 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4078–4083.

-**Greulich, K., Pflugmacher, S.**, 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic toxicology* 65, 329–336.

-**Grolleau, F., Sattelle, D.B.**, 2000. Single channel analysis of the blocking actions of BIDN and fipronil on a *Drosophila melanogaster* GABA receptor (RDL) stably expressed in a *Drosophila* cell line. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1833–1842.

- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M., Maleszka, R., Belzunces, L.P.,** 2001. Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees *Apis mellifera*. *Neurobiology of Learning and Memory* 76, 183–191.
- Guez, D., Belzunces, L.P., Maleszka, R.,** 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 217–222.
- Guillette Jr, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R.,** 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental health perspectives* 102, 680.

H

- Haddad, D., Schaupp, F., Brandtm, R., Manz, G., Menzel, R., Haase, A.,** 2004. NMR imaging of the honeybee brain. *Journal of Insect Science* 4.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I., Sussman, J.L.,** 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.* 9, 1063–1072.
- Hart, A.G., Bowtell, R.W., Köckenberger, W., Wenseleers, T., Ratnieks, F.L.W.,** 2003. Magnetic resonance imaging in entomology: a critical review. *Journal of Insect Science* 3.
- Haseeb, M., Amano, H.,** 2002. Effects of contact, oral and persistent toxicity of selected pesticides on *Cotesia plutellae* (Hym., Braconidae), a potential parasitoid of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). *Journal of Applied Entomology* 126, 8–13.
- Hass, U.,** 2006. The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* 22, 148–156.
- Hatcher, J.M., Richardson, J.R., Guillot, T.S., McCormack, A.L., Di Monte, D.A., Jones, D.P., Pennell, K.D., Miller, G.W.,** 2007. Dieldrin exposure induces oxidative damage in the mouse nigrostriatal dopamine system. *Exp. Neurol.* 204, 619–630.
- Haubruge, E., Amichot, M.,** 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 2, 161–174.
- He, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Weng, Q., Biondi, A., Desneux, N., Wu, K.,** 2013. Assessment of potential sublethal effects of various insecticides on key biological traits of the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 246–255.
- Helvig, C., Koener, J.F., Unnithan, G.C., Feyereisen, R.,** 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4024–4029.

- Hirth, F.**, 2010. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets* 9, 504.
- Hosamani, R., Ramesh, S.R., Muralidhara**, 2010. Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine. *Neurochem. Res.* 35, 1402–1412.
- Hosie, A.M., Ozoe, Y., Koike, K., Ohmoto, T., Nikaido, T., Sattelle, D.B.**, 1996. Actions of picrodendrin antagonists on dieldrin-sensitive and -resistant *Drosophila* GABA receptors. *Br. J. Pharmacol.* 119, 1569–1576.
- Hosie, A.M., Aronstein, K., Sattelle, D.B., ffrench-Constant, R.H.**, 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* 20, 578–583.

I

- Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V., Sattelle, D.B.**, 2003. Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila* chicken SAD $\beta 2$ and ALS $\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* 45, 133–144.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Hirata, K., Nishiwaki, H., Morimoto, T., Akamatsu, M., Ashikawa, Y., Kuroda, S.**, 2008. Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invertebrate Neuroscience* 8, 71–81.
- Islam, R., Yang, L., Sah, M., Kannan, K., Anamani, D., Vijayan, C., Kwok, J., Cantino, M.E., Beal, M.F., Fridell, Y.-W.C.**, 2012. A neuroprotective role of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) in a *Drosophila* Parkinson's disease model. *Neurobiol. Dis.* 46, 137–146.

J

- Jackson, C.J., Liu, J.-W., Carr, P.D., Younus, F., Coppin, C., Meirelles, T., Lethier, M., Pandey, G., Ollis, D.L., Russell, R.J., Weik, M., Oakeshott, J.G.**, 2013. Structure and function of an insect α -carboxylesterase (α Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10177–10182.
- James**, 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009 brief 41. ISAAA, International Service for the acquisition of Agri-Biotech applications.
- Jasanoff, A., Sun, P.Z.**, 2002. In vivo magnetic resonance microscopy of brain structure in unanesthetized flies. *J. Magn. Reson.* 158, 79–85.
- Jenner, P.**, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3, S26–36; discussion S36–38.
- Jeschke, P., Nauen, R.**, 2008. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084–1098.

- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Jones, A.K., Brown, L.A., Sattelle, D.B., 2007. Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invert Neurosci* 7, 67–73.
- Joussen, N., Heckel, D.G., Haas, M., Schuphan, I., Schmidt, B., 2008. Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Manag. Sci.* 64, 65–73.

K

- Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., Comyns, K., Goldman, S., Korell, M., Langston, J., Ross, G., Sandler, D., 2007. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* 165, 364–374.
- Kamel, F., Umbach, D.M., Bedlack, R.S., Richards, M., Watson, M., Alavanja, M.C., Blair, A., Hoppin, J.A., Schmidt, S., Sandler, D.P., 2012. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology* 33, 457–462.
- Kamel, F., 2013. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* 341, 722–723.
- Kanthasamy, A.G., Kitazawa, M., Kanthasamy, A., Anantharam, V., 2005. Dieldrin-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Neurotoxicology* 26, 701–719.
- Kanthasamy, Anumantha, Jin, H., Anantharam, V., Sondarva, G., Rangasamy, V., Rana, A., Kanthasamy, Arthi, 2012. Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology* 33, 833–837.
- Karmaus, W., Brooks, K.R., Nebe, T., Witten, J., Obi-Osius, N., Kruse, H., 2005. Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a cross-sectional study. *Environ Health* 4, 5.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., Morin, S., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 634–644.
- Kasai, S., Tomita, T., 2003. Male specific expression of a cytochrome P450 (Cyp312a1) in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 894–900.
- Kegley, S., Neumeister, L., Martin, T., Network, P.A., 1999. Disrupting the balance. Ecological impacts of pesticides in California. *Pesticide Action Network* 99.

- Kitazawa, M., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G.**, 2001. Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1473–1485.
- Kitazawa, M., Anantharam, V., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G.**, 2004. Dieldrin promotes proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase and apoptosis in dopaminergic cells: protective effect of mitochondrial anti-apoptotic protein Bcl-2. *Neurotoxicology* 25, 589–598.
- Klein, J.**, 2000. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm* 107, 1027–1063.
- Klingenberg, M.**, 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.
- Kohyama-Koganeya, A., Hirabayashi, Y.**, 2010. The *Drosophila* 7-pass transmembrane glycoprotein BOSS and metabolic regulation: What *Drosophila* can teach us about human energy metabolism. *Meth. Enzymol.* 480, 525–538.
- Kong, E.C., Woo, K., Li, H., Lebestky, T., Mayer, N., Sniffen, M.R., Heberlein, U., Bainton, R.J., Hirsh, J., Wolf, F.W.**, 2010. A Pair of Dopamine Neurons Target the D1-Like Dopamine Receptor DopR in the Central Complex to Promote Ethanol-Stimulated Locomotion in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5, e9954.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E.**, 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313–319.
- Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T., Kono, Y.**, 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 991–997.
- Kristal, B.S., Shurubor, Y.I.**, 2005. Metabolomics: opening another window into aging. *Science's SAGE KE.* 2005, pe19.
- Kühnlein, R.P.**, 2012. Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *Journal of Lipid Research.* 53, 1430-6.
- Kumar, P., Whitten, M., Thoeming, G., Borgemeister, C., Poehling, H.-M.**, 2008. Effects of bio-pesticides on *Eretmocerus warrae* (Hym., Aphelinidae), a parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology* 132, 605–613.
- Kuruganti, S., Lam, V., Zhou, X., Bennett, G., Pittendrigh, B.R., Ganguly, R.**, 2007. High expression of Cyp6g1, a cytochrome P450 gene, does not necessarily confer DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 388, 43–53.

L

- Lawal, H.O., Chang, H.-Y., Terrell, A.N., Brooks, E.S., Pulido, D., Simon, A.F., Krantz, D.E.**, 2010. The *Drosophila* vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons. *Neurobiol Dis* 40, 102–112.

- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, P.J., Yen, J.L., Sofer, L., Lind, R., Sabourault, C., Madi-Ravazzi, L., ffrench-Constant, R.H.**, 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 701–708.
- Le Goff, G., Hamon, A., Bergé, J.-B., Amichot, M.**, 2005. Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J. Neurochem.* 92, 1295–1305.
- Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., Feyereisen, R.**, 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect biochemistry and molecular biology* 36, 674–682.
- Lee, S.-H., Ra, J.-S., Choi, J.-W., Yim, B.-J., Jung, M.-S., Kim, S.-D.**, 2013. Human health risks associated with dietary exposure to persistent organic pollutants (POPs) in river water in Korea. *Science of The Total Environment*. [Epub ahead of print]
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R.**, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231–253.
- Li, X., Bai, S., Cass, B.N.**, 2012. Accord insertion in the 5' flanking region of CYP6G1 confers nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 502, 1–8.
- Lin, M.T., Beal, M.F.**, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Lindquist, A.W., Wilson, H.G.**, 1948. Development of a Strain of Houseflies Resistant to DDT. *Science* 107, 276.
- Liu, G.-Y., Ju, X.-L., Cheng, J.**, 2010. Selectivity of Imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling. *J Mol Model* 16, 993–1002.
- Liu, T.-X., Chen, T.**, 2001. Effects of the insect growth regulator fenoxycarb on immature *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *Florida Entomologist* 628–633.
- Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Denholm, I., Han, Z., Millar, N.S.**, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8420–8425.
- Liu, Z., Wang, X., Yu, Y., Li, X., Wang, T., Jiang, H., Ren, Q., Jiao, Y., Sawa, A., Moran, T., Ross, C.A., Montell, C., Smith, W.W.**, 2008. A *Drosophila* model for LRRK2-linked parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2693–2698.
- London, L., Beseler, C., Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Colosio, C., Grandjean, P., Harari, R., Kootbodien, T., Kromhout, H., Little, F.**, 2012. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology* 33, 887–896.
- Low, W.Y., Feil, S.C., Ng, H.L., Gorman, M.A., Morton, C.J., Pyke, J., McConville, M.J., Bieri, M., Mok, Y.-F., Robin, C., Gooley, P.R., Parker, M.W., Batterham, P.**, 2010. Recognition and detoxification of the insecticide DDT by *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase D1. *J. Mol. Biol.* 399, 358–366.

-Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 861–871.

-Lundholm, C.E., 1997. DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p, p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 118, 113–128.

M

-Maitra, S., Dombrowski, S.M., Basu, M., Raustol, O., Waters, L.C., Ganguly, R., 2000. Factors on the third chromosome affect the level of cyp6a2 and cyp6a8 expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 248, 147–156.

-Maitra, S.K., Mitra, A., 2008. Testicular functions and serum titers of LH and testosterone in methyl parathion-fed roseringed parakeets. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 236–244.

-Markussen, Mette D K, Kristensen, M., 2010a. Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manag. Sci.* 66, 1257–1262.

-Markussen, Mette D.K., Kristensen, M., 2010b. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 50–58.

-Marques-Pinto, A., Carvalho, D., 2013. Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocrine connections* 2, R15–R29.

-Martin, J.R., 2003. Locomotor activity: a complex behavioural trait to unravel. *Behav. Processes* 64, 145–160.

-McDuffie, H.H., Pahwa, P., McLaughlin, J.R., Spinelli, J.J., Fincham, S., Dosman, J.A., Robson, D., Skinnider, L.F., Choi, N.W., 2001. Non-Hodgkin's Lymphoma and Specific Pesticide Exposures in Men Cross-Canada Study of Pesticides and Health. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10, 1155–1163.

-Même, S., Joudiou, N., Szeremeta, F., Mispelter, J., Louat, F., Decoville, M., Locker, D., Beloeil, J.-C., 2013. In vivo magnetic resonance microscopy of *Drosophilae* at 9.4 T. *Magn Reson Imaging* 31, 109–119.

-Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412.

-Merzendorfer, H., 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 176, 1–15.

-Merzendorfer, H., 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 759–769.

- Michaelis, T., Watanabe, T., Natt, O., Boretius, S., Frahm, J., Utz, S., Schachtner, J.**, 2005. In vivo 3D MRI of insect brain: cerebral development during metamorphosis of *Manduca sexta*. *Neuroimage* 24, 596–602.
- Michałowicz, J., Mokra, K., Rosiak, K., Sicińska, P., Bukowska, B.**, 2013. Chlorobenzenes, lindane and dieldrin induce apoptotic alterations in human peripheral blood lymphocytes (in vitro study). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 979–988.
- Michaud, D.**, 2005. Impact environnemental des cultures transgéniques: II. L’impact des caractères recombinants. *Phytoprotection* 86, 107.
- Migliore, L., Coppedè, F.**, 2009. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 667, 82–97.
- Millar, N.S.**, 2009. A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 78, 766–776.
- Mitra, A., Chatterjee, C., Mandal, F.B.**, 2011. Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Res J Environ Toxicol* 5, 81–96.
- Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B.**, 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International journal of environmental research and public health* 8, 2265–2303.
- Montella, I.R., Schama, R., Valle, D.**, 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 437–449.
- Moore, A., Waring, C.P.**, 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat. Toxicol.* 52, 1–12.
- Moretto, A., Colosio, C.**, 2011. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson’s disease. *Neurotoxicology* 32, 383–391.
- Mounsey, R.B., Teismann, P.**, 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinsons Dis* 2011, 617472.
- Mullins, J.K., Loeb, S.**, 2012. Environmental exposures and prostate cancer, in: Urologic Oncology: *Seminars and Original Investigations*. pp. 216–219.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D.**, 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5922–5926.

N

- Nauen, R., Tietjen, K., Wagner, K., Elbert, A.**, 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Science* 52, 53–57.

- Nelson, D.R.**, 2013. A world of cytochrome P450s. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368, 20120430.
- Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J., Oakeshott, J.G.**, 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7464–7468.
- Ng, C.-H., Mok, S.Z.S., Koh, C., Ouyang, X., Fivaz, M.L., Tan, E.-K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Yu, F., Lim, K.-L.**, 2009. Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 29, 11257–11262.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., Givaudan, A.**, 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 220–231.
- Nordkap, L., Joensen, U.N., Blomberg Jensen, M., Jørgensen, N.**, 2012. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Molecular and cellular endocrinology* 355, 221–230.
- Null, B., Liu, C.W., Hedehus, M., Conolly, S., Davis, R.W.**, 2008. High-resolution, in vivo magnetic resonance imaging of *Drosophila* at 18.8 Tesla. *PLoS One* 3, e2817.

O

- O'Reilly, A.O., Khambay, B.P.S., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E.**, 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396, 255–263.
- Omura, T., Sato, R.**, 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375–1376.
- Ono, H., Rewitz, K.F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J.T., Marqués, G., Shimell, M.J., Gilbert, L.I., O'Connor, M.B.**, 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.* 298, 555–570.
- Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.-C., McLean, P.J., Young, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T., Kazantsev, A.G.**, 2007. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317, 516–519.

P

- Pallos, J., Bodai, L., Lukacsovich, T., Purcell, J.M., Steffan, J.S., Thompson, L.M., Marsh, J.L.**, 2008. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 17, 3767–3775.

- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., Alarcón, R.,** 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and applied pharmacology* 256, 379–385.
- Peakall, D.B.,** 1996. Disrupted patterns of behavior in natural populations as an index of ecotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 104, 331.
- Pedra, J.H.F., McIntyre, L.M., Scharf, M.E., Pittendrigh, B.R.,** 2004. Genome-wide transcription profile of field- and laboratory-selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7034–7039.
- Perry, T., McKenzie, J.A., Batterham, P.,** 2007. A Dalpha6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 184–188.
- Perry, T., Heckel, D.G., McKenzie, J.A., Batterham, P.,** 2008. Mutations in Dalpha1 or Dbeta2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 520–528.
- Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J.,** 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 411–422.
- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.A., Corrêa, A.S., Guedes, R.N.C.,** 2012. Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Pest Manag. Sci.* 68, 1368–1373.
- Piper, M.D., Skorupa, D., Partridge, L.,** 2005. Diet, metabolism and lifespan in *Drosophila*. *Experimental gerontology* 40, 857–862.
- Pletcher, S.D., Libert, S., Skorupa, D.,** 2005. Flies and their golden apples: the effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age-dependent gene expression. *Ageing Res. Rev.* 4, 451–480.
- Portela, A., Esteller, M.,** 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–1068.

R

- Rahman, T., Spafford, H., Broughton, S.,** 2011. Compatibility of spinosad with predaceous mites (Acari) used to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Manag. Sci.* 67, 993–1003.
- Ranson, H., Rossiter, L., Orтели, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J.,** 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359, 295–304.

- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R., 2002.** Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179–181.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whyatt, R., 2011.** Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental health perspectives* 119, 1196.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B., 2005.** Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* 5, 119–133.
- Reichrtová, E., Ciznár, P., Prachar, V., Palkovicová, L., Veningerová, M., 1999.** Cord serum immunoglobulin E related to the environmental contamination of human placentas with organochlorine compounds. *Environ. Health Perspect.* 107, 895–899.
- Ribas-Fitó, N., Torrent, M., Carrizo, D., Muñoz-Ortiz, L., Júlvez, J., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2006.** In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *American journal of epidemiology* 164, 955–962.
- Richardson, J.R., Caudle, W.M., Wang, M., Dean, E.D., Pennell, K.D., Miller, G.W., 2006.** Developmental exposure to the pesticide dieldrin alters the dopamine system and increases neurotoxicity in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 20, 1695–1697.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., Hirsh, J., Birman, S., 2011.** Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 834–839.
- Riemensperger, T., Issa, A.-R., Pech, U., Coulom, H., Nguyễn, M.-V., Cassar, M., Jacquet, M., Fiala, A., Birman, S., 2013.** A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell Rep* 5, 952–960.
- Righi, V., Apidianakis, Y., Mintzopoulos, D., Astrakas, L., Rahme, L.G., Tzika, A.A., 2010.** In vivo high-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy of *Drosophila melanogaster* at 14.1 T shows trauma in aging and in innate immune-deficiency is linked to reduced insulin signaling. *International journal of molecular medicine* 26, 175.
- Rinkevich, F.D., Chen, M., Shelton, A.M., Scott, J.G., 2010.** Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Pxylα6* with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert. Neurosci.* 10, 25–33.

S

- Saha, R.N., Pahan, K., 2006.** HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13, 539–550.
- Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B., 2003.** Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental Health Perspectives* 111, 1958.

- Salameh, P., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., Saleh, B.A.**, 2006a. Respiratory diseases and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *J Epidemiol Community Health* 60, 256–261.
- Salameh, P.R., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., Saleh, B.A.**, 2006b. Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Eur. J. Epidemiol.* 21, 681–688.
- Salerno, G., Colazza, S., Conti, E.**, 2002. Sub-lethal effects of deltamethrin on walking behaviour and response to host kairomone of the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Pest Manag. Sci.* 58, 663–668.
- Samra, A.I., Kamita, S.G., Yao, H.-W., Cornel, A.J., Hammock, B.D.**, 2012. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens*. *Pest Manag. Sci.* 68, 764–772.
- Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., Jatzkewitz, H.**, 1971. Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease. *Journal of neurochemistry* 18, 2469–2489.
- Sang, T.-K., Chang, H.-Y., Lawless, G.M., Ratnaparkhi, A., Mee, L., Ackerson, L.C., Maidment, N.T., Krantz, D.E., Jackson, G.R.**, 2007. A *Drosophila* model of mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine. *The Journal of neuroscience* 27, 981–992.
- Sattelle, D.B., Jones, A.K., Sattelle, B.M., Matsuda, K., Reenan, R., Biggin, P.C.**, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 27, 366–376.
- Schilling, F., Dworschak, K., Schopf, R., Kühn, R., Glaser, S.J., Haase, A.**, 2012. Non-invasive lipid measurement in living insects using NMR microscopy. *The Journal of Experimental Biology* 215, 3137–3141.
- Schmidt, J.M., Good, R.T., Appleton, B., Sherrard, J., Raymant, G.C., Bogwitz, M.R., Martin, J., Daborn, P.J., Goddard, M.E., Batterham, P., Robin, C.**, 2010. Copy number variation and transposable elements feature in recent, ongoing adaptation at the *Cyp6g1* locus. *PLoS Genet.* 6, e1000998.
- Schneider, M.I., Smagghe, G., Pineda, S., Vinuela, E.**, 2004. Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control* 31, 189–198.
- Scott, J.G.**, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 757–777.
- Sergeeva, O.A.**, 2013. GABAergic transmission in hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys.* 536, 122-130.
- Shen, J., Ford, D., Landis, G.N., Tower, J.**, 2009. Identifying sexual differentiation genes that affect *Drosophila* life span. *BMC Geriatr* 9, 56.

- Shimomura, M., Yokota, M., Matsuda, K., Sattelle, D.B., Komai, K., 2004.** Roles of loop C and the loop B–C interval of the nicotinic receptor α subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects. *Neuroscience letters* 363, 195–198.
- Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., Matsuda, K., 2006.** Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. *Molecular pharmacology* 70, 1255–1263.
- Shulman, J.M., Shulman, L.M., Weiner, W.J., Feany, M.B., 2003.** From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurol.* 16, 443–449.
- Singh, N., Chhillar, N., Banerjee, B., Bala, K., Basu, M., Mustafa, M., 2013.** Organochlorine pesticide levels and risk of Alzheimer’s disease in north Indian population. *Hum Exp Toxicol* 32, 24–30.
- Singh, S.R., Walters, K.F., Port, G.R., Northing, P., 2004.** Consumption rates and predatory activity of adult and fourth instar larvae of the seven spot ladybird, *Coccinella septempunctata*(L.), following contact with dimethoate residue and contaminated prey in laboratory arenas. *Biological Control* 30, 127–133.
- Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2009.** Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1337–1349.
- Song, C., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Sun, F., Kanthasamy, A.G., 2010.** Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol. Pharmacol.* 77, 621–632.
- Sonoda, S., Tsumuki, H., 2005.** Studies on glutathione S-transferase gene involved in chlorfluazuron resistance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82, 94–101.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001.** Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.
- Sparks, T.C., 2013.** Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 8–17.
- Stallones, L., Beseler, C., 2002.** Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. *Annals of epidemiology* 12, 389–394.
- Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.-Z., Greenwald, M., 2001.** Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739–743.
- Strauss, R., 2002.** The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current opinion in neurobiology* 12, 633–638

- Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest management science* 60, 291–296.
- Sun, F., Anantharam, V., Latchoumycandane, C., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G., 2005. Dieldrin induces ubiquitin-proteasome dysfunction in alpha-synuclein overexpressing dopaminergic neuronal cells and enhances susceptibility to apoptotic cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 69–79.
- Sunyer, J., Garcia-Esteban, R., Alvarez, M., Guxens, M., Goñi, F., Basterrechea, M., Vrijheid, M., Guerra, S., Antó, J.M., 2010. DDE in mothers' blood during pregnancy and lower respiratory tract infections in their infants. *Epidemiology* 21, 729–735.
- Syvanen, M., Zhou, Z., Wharton, J., Goldsbury, C., Clark, A., 1996. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *J. Mol. Evol.* 43, 236–240.

T

- Talley, T.T., Harel, M., Hibbs, R.E., Radić, Z., Tomizawa, M., Casida, J.E., Taylor, P., 2008. Atomic interactions of neonicotinoid agonists with AChBP: molecular recognition of the distinctive electronegative pharmacophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7606–7611.
- Tanimura, T., Isono, K., Takamura, T., Shimada, I., 1982. Genetic dimorphism in the taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology* 147, 433–437.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives* 119, 866.
- Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., Lapied, B., 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 14–22.
- Thany, S.T., Reynier, P., Lenaers G., 2013. Neurotoxicité des pesticides: quel impact sur les maladies neurodégénératives? *Med Sci.* 29, 273-278
- Thompson, H.M., 2003. Behavioural effects of pesticides in bees--their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12, 317–330.
- Tomé, H.V.V., Martins, G.F., Lima, M.A.P., Campos, L.A.O., Guedes, R.N.C., 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE* 7, e38406.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.

- Tomizawa, M., Casida, J.E.**, 2005. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 247–268.
- Tomizawa, M., Casida, J.E.**, 2009. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Acc. Chem. Res.* 42, 260–269.
- Tunaz, H., Uygun, N.**, 2004. Insect growth regulators for insect pest control. *Turk J Agric For* 28, 377–387.
- Turner, M.C., Wigle, D.T., Krewski, D.**, 2011. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ciência & Saúde Coletiva* 16, 1915–1931.

V

- Van der Werf H. M. G.**, 1997. Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. Courrier de l'INRA n°31, août.
- Vain, P.**, 2007. Trends in GM crop, food and feed safety literature. *Nat. Biotechnol.* 25, 624–626.
- Vo, D.T., Hsu, W.H., Abu-Basha, E.A., Martin, R.J.**, 2010. Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 315–322.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J.**, 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., Hemingway, J.**, 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 362, 329–337.

W

- Walker, C.H.**, 2003. Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology* 12, 307–316.
- Wang, C., Scharf, M.E., Bennett, G.W.**, 2004. Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 97, 2067–2072.
- Wang, C., Lu, R., Ouyang, X., Ho, M.W.L., Chia, W., Yu, F., Lim, K.-L.**, 2007. *Drosophila* overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities. *J. Neurosci.* 27, 8563–8570.
- Wang, D., Qian, L., Xiong, H., Liu, J., Neckameyer, W.S., Oldham, S., Xia, K., Wang, J., Bodmer, R., Zhang, Z.**, 2006. Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13520–13525.

- Waring, C.P., Moore, A., 1997.** Sublethal effects of a carbamate pesticide on pheromonal mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 203–211.
- Warren, J.T., Petryk, A., Marqués, G., Parvy, J.-P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M.B., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., 2004.** Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 991–1010.
- Watson, G.B., Chouinard, S.W., Cook, K.R., Geng, C., Gifford, J.M., Gustafson, G.D., Hasler, J.M., Larrinua, I.M., Letherer, T.J., Mitchell, J.C., Pak, W.L., Salgado, V.L., Sparks, T.C., Stilwell, G.E., 2010.** A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 376–384.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M., 2003.** Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136–137.
- Weisskopf, M.G., Knekt, P., O'Reilly, E.J., Lyytinen, J., Reunanen, A., Laden, F., Altshul, L., Ascherio, A., 2010.** Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. *Neurology* 74, 1055–1061.
- Westendorp, R.G., Kirkwood, T.B., 1998.** Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature* 396, 743–746.
- White, K.E., Humphrey, D.M., Hirth, F., 2010.** The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Frontiers in neuroscience* 4, 205.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012.** Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351–352.
- Whitworth, A.J., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D., Pallanck, L.J., 2005.** Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8024–8029.
- Whitworth, A.J., 2011.** *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Adv. Genet.* 73, 1–50.
- Wider, G., Dreier, L., 2006.** Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2571–2576.
- Willingham, A.T., Keil, T., 2004.** A tissue specific cytochrome P450 required for the structure and function of *Drosophila* sensory organs. *Mech. Dev.* 121, 1289–1297.
- Wood, O., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., Brooke, B., 2010.** Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors* 3, 67.

-Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6, e14720.

Y

-Yang, E.-C., Chang, H.-C., Wu, W.-Y., Chen, Y.-W., 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE* 7, e49472.

-Yang, N., Xie, W., Jones, C.M., Bass, C., Jiao, X., Yang, X., Liu, B., Li, R., Zhang, Y., 2013. Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. *Insect Mol. Biol.* 22, 485–496.

-Yao, X., Song, F., Chen, F., Zhang, Y., Gu, J., Liu, S., Liu, Z., 2008. Amino acids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor beta subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 834–840.

Z

-Zhang, H.G., ffrench-Constant, R.H., Jackson, M.B., 1994. A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *J. Physiol.* 479, 65–75.

Fanny LOUAT

Etude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*

L'utilisation intensive des produits phytosanitaires, en particulier les insecticides, provoque des effets indésirables sur les organismes vivants et leur environnement. Mon travail de thèse a consisté à évaluer l'effet de deux insecticides chez un insecte modèle la drosophile. Une première étude concernait l'effet d'un néonicotinoïde, l'imidaclopride. Nous avons pu montrer que l'exposition chronique à des doses sublétales de cet insecticide perturbe la fonction de reproduction chez la drosophile. D'autre part, une exposition aiguë à l'imidaclopride a mis en évidence une résistance chez les femelles d'une souche de drosophile dite ``des champs``. Deux mécanismes différents ont été mis en évidence dans la résistance à l'imidaclopride de cette souche. Le premier concerne la sous expression d'une sous-unité (D β 1) du récepteur nicotinique à l'acétylcholine, cible de l'imidaclopride. Le deuxième concerne l'implication des glutathion S-transférases, enzymes de détoxification, dans le métabolisme de l'imidaclopride. Ces études montrent que les insecticides peuvent avoir en plus des effets sur les insectes ravageurs, des effets néfastes sur des organismes non cibles. La deuxième étude avait pour but de modéliser chez la drosophile, l'impact d'un organochloré, la dieldrine, potentiellement impliquée dans la maladie de Parkinson chez l'homme. L'exposition à cet insecticide conduit à une dégénérescence des neurones dopaminergiques ainsi qu'une perturbation de la structure de régions particulières du cerveau. Nous avons également montré des altérations du métabolisme et l'implication de processus épigénétiques dans la neurodégénérescence induite par la dieldrine. Au cours de ce travail, nous avons pu montrer l'intérêt de nouvelles méthodes comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou le High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) dans ce type d'étude.

Mots clés : Drosophile, Insecticides, Résistance, Neurodégénérescence, Imagerie par résonance magnétique IRM, High Resolution Magic Angle Spinning HRMAS.

Effects of insecticides exposure by using an insect model, *Drosophila melanogaster*

Pesticides have been used extensively and induce harmful effects on organisms and their environment. The aim of my PhD work was to investigate the effects of two insecticides by using *Drosophila* as a model. The first study concerns the effect of a neonicotinoid, imidacloprid. The results obtained have shown that a chronic exposure at sublethal doses of this insecticide affects reproduction in flies. Moreover, acute exposure at high doses has pointed out a resistance phenomenon in females of a field strain. We have shown that two mechanisms are implicated: (i) low expression of a subunit of a nicotinic acetylcholine receptor that is the target of imidaclopride and (ii) role of glutathione S-transférases, detoxication enzymes, in imidaclopride metabolism. These results highlight impact of insecticides, in particular imidaclopride, on non target organisms. The aim of the second study was to characterize in *Drosophila*, effects of an organochlorine, dieldrin, potentially implicated in the etiology of Parkinson's disease in humans. Dieldrin exposure at low doses promotes neurodegeneration of dopaminergic neurons and alters structures of particular regions of the brain. Disruption of metabolism is also induced after exposition to dieldrin. In addition, we have shown that epigenetic processes are implicated in neurodegeneration induced by dieldrin. This work show advantages of new techniques such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) and High Reslution Magic Angle Spinning in this kind of study.

Keywords : *Drosophila*, Insecticides, Resistance, Neurodegeneration, Magnetic resonance imaging MRI, High Resolution Magic Angle Spinning HRMAS.



**CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE
CNRS**

Rue Charles Sadron 45071 Cedex 2 Orléans

