



**HAL**  
open science

**Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées**

Mathilde Goulu

► **To cite this version:**

Mathilde Goulu. Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0031 . tel-01679944

**HAL Id: tel-01679944**

**<https://theses.hal.science/tel-01679944>**

Submitted on 10 Jan 2018

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

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

# Thèse de Doctorat

**Mathilde GOULU**

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

École doctorale : *VENAM*

Discipline : **Biologie de l'environnement**  
Unité de recherche : *Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM)*  
*UPRES- EA 2647 USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV*  
*UFR Sciences Université d'Angers 2, Boulevard Lavoisier 49045 Angers cedex 01 France*

Soutenue le *15 décembre 2015*  
Thèse N° : **78153**

## **Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées**

### **JURY**

Rapporteurs : **Mr Luc BELZUNCES**, Directeur de recherche, INRA Avignon  
**Mr Philippe LUCAS**, Directeur de recherche, INRA Versailles

Examineurs : **Mr Fabrice CHANDRE**, Chargé de recherche, IRD Montpellier  
**Mme Laurence GARNIER**, Ingénieur de recherche, Ministère de la Défense

Directeur de Thèse : **Mr Bruno LAPIED**, Professeur, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **Mme Véronique APAIRE-MARCHAIS**, Professeur, Université d'Angers



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, le Pr Bruno Lapied et le Pr Véronique Apaire-Marchais sans qui cette aventure n'aurait jamais eu lieu. Merci à vous de m'avoir donné cette opportunité de travailler sur un sujet aussi intéressant et important pour la lutte anti-vectorielle. Je vous remercie pour votre confiance et pour tout ce que vous avez pu m'apprendre durant ces trois années.

Je remercie la Région Pays de la Loire et la Direction Générale de l'Armement d'avoir accepté de financer ce projet.

Je remercie Valérie Raymond qui m'a permis d'effectuer mes recherches au sein du laboratoire RCIM dans des conditions de travail agréables et optimales.

Mes remerciements vont aussi à Philippe Lucas et Luc Belzunces pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie Fabrice Chandre, Laurent Lagadic et Laurence Garnier d'avoir fait partie de mon CST et de m'avoir aidé à orienter certaines recherches.

Je souhaite tout particulièrement remercier Olivier List sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir. Olivier, tu as été pour moi un mentor pour les techniques d'électrophysiologie, un puits de connaissances chaque fois que j'avais besoin d'une information, un soutien inespéré lorsque les manips ne fonctionnaient pas toujours comme prévu. Je n'oublierais jamais tout ce que tu as fait pour moi afin que je puisse grandir dans le monde de la recherche.

Bien entendu, je souhaite adresser mes remerciements à mes collègues qui ont partagé avec moi ces trois dernières années riches en échanges et en rebondissements. Lydie, je te suis reconnaissante d'avoir partagé avec Olivier et moi notre bureau ensoleillé durant la première année. Grâce à toi, notre petit monde a été joyeux et animé. Delphine, tu as été pour moi une amie formidable et je ne te serais jamais assez reconnaissante pour toutes ces fois où tu étais présente pour me rassurer ou partager ma joie. Kaouther, partager avec toi ce vaste bureau de 2<sup>e</sup> année a été un véritable plaisir. Tous ces moments passés à rire, à discuter et à débattre ont été une véritable bouffée d'oxygène entre deux manips. Merci à Fabienne, Céline, Emiliane et Antoine pour toutes les discussions que nous avons pu avoir et pour tous les conseils que vous avez pu me donner. Merci Yassine d'avoir partagé ces quelques pauses café. Je vous souhaite à Javier et toi bonne continuation pour la suite.

Mes remerciements vont à Patrice Chiron et Cyril Le Corre pour avoir géré l'élevage de blattes. Merci à Josy Froger et Delphine Goven pour toutes ces fois où vous m'avez aidé avec bienveillance, que ce soit pour les manips ou les commandes. Merci à Sylvia Anton et Christophe Gadenne pour votre bienveillance et tous ces moments de partage autour d'un bon repas. Je remercie toutes les personnes passées par le laboratoire et notamment les stagiaires qui ont partagé notre bureau. Kali, Julie, Manon, Jodie, Olivia, je vous souhaite toutes une longue et heureuse carrière dans la recherche.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire MIVEGEC, de l'IRD de Montpellier, notamment Fabrice Chandre pour m'avoir accueilli durant ces trois semaines formidables. Marie Rossignol, merci pour tous ces conseils et ces moments de partage scientifiques. Carole Ginibre, merci de m'avoir accordé du temps pour m'expliquer en détails l'élevage de moustiques. Lyse, merci d'avoir rendu ce séjour agréable par ta présence et ta passion des petites bêtes. Bon courage pour la suite.

Bien entendu, je ne pourrais terminer sans remercier ma famille. Papa, maman, je vous suis reconnaissante d'avoir toujours cru en moi et de montrer de l'intérêt pour ce que je fais, même si ce n'est pas toujours évident de tout comprendre. Merci Claude d'avoir pris régulièrement de mes nouvelles et de m'avoir toujours poussé de l'avant. Merci Nanie et Dadou pour vos encouragements et votre enthousiasme concernant mon travail. Jess, même si ce fut trois années où nous nous sommes peu vues, je te remercie d'avoir été un soutien constant et une amie sincère.

A tous ceux que j'ai pu oublier et qui ont cru en moi et ce projet, je vous remercie du fond du cœur.

# Table des Matières

Liste des abréviations.....	7
PRÉAMBULE.....	9

## Partie 1 : Introduction

<b>Chapitre I — Moustiques : vecteurs de maladies.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Cycle de vie du moustique.....</b>	<b>13</b>
1.1. Œuf.....	14
1.2. Larves.....	15
1.3. Nymphes.....	16
1.4. Adultes.....	16
<b>2. Mécanisme de piqûres.....</b>	<b>18</b>
2.1. Comportement trophique.....	18
2.2. Choix de l'hôte.....	19
2.3. Repérage de l'hôte.....	19
2.4. Piqûre.....	20
2.5. Risque d'infection.....	21
<b>3. Rôle dans la transmission vectorielle.....</b>	<b>22</b>
3.1. Le paludisme.....	22
3.1.1. Épidémiologie.....	22
3.1.2. Vecteurs.....	23
3.2. La dengue.....	24
3.2.1. Épidémiologie.....	24
3.2.2. Vecteurs.....	25
3.3. Le chikungunya.....	26
3.3.1. Épidémiologie.....	26
3.3.2. Vecteurs.....	27
<b>Chapitre II – Lutte anti-vectorielle.....</b>	<b>29</b>
<b>1. L'armée, premier acteur de la lutte anti-vectorielle.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Lutte mécanique.....</b>	<b>31</b>
2.1. Gîtes larvaires.....	32
2.2. Pièges à moustiques.....	33

<b>3. Lutte biologique</b> .....	<b>34</b>
3.1. <i>Prédateurs naturels</i> .....	34
3.2. <i>Micro-organismes pathogènes</i> .....	35
<b>4. Lutte génétique</b> .....	<b>37</b>
4.1. <i>Mâles stériles</i> .....	38
4.2. <i>Gènes létaux</i> .....	38
4.3. <i>Immunisation du moustique</i> .....	39
<b>5. Lutte chimique</b> .....	<b>39</b>
5.1. <i>Lutte larvicide</i> .....	40
5.2. <i>Lutte adulticide</i> .....	40
5.3. <i>Protection personnelle</i> .....	41
<b>Chapitre III – Répulsifs</b> .....	<b>44</b>
<b>1. Généralités</b> .....	<b>44</b>
1.1. <i>Caractéristiques</i> .....	44
1.2. <i>Répulsifs naturels</i> .....	45
1.3. <i>Répulsifs chimiques</i> .....	47
1.1.1. <i>Pyréthrine et ses dérivés</i> .....	47
1.1.2. <i>DEET</i> .....	48
1.1.3. <i>KBR3023</i> .....	50
1.1.4. <i>IR3535</i> .....	51
<b>2. Mode d'action des répulsifs</b> .....	<b>51</b>
2.1. <i>Système olfactif du moustique</i> .....	52
2.2. <i>Perturbation de l'olfaction induite par les répulsifs</i> .....	54
2.2.1. <i>Effet comportemental</i> .....	54
2.2.2. <i>Action sur le complexe OR/ ORco</i> .....	55
2.2.3. <i>Effet anti-appétant</i> .....	56
<b>3. Toxicité des répulsifs</b> .....	<b>56</b>
<b>Chapitre IV – Insecticides</b> .....	<b>58</b>
<b>1. Mode d'action des insecticides</b> .....	<b>58</b>
1.1. <i>Insecticides d'origine naturelle</i> .....	58
1.2. <i>DDT</i> .....	59
1.3. <i>Pyréthroïdes</i> .....	59
1.4. <i>Organophosphorés et Carbamates</i> .....	62
1.5. <i>Néonicotinoïdes</i> .....	63
<b>2. Résistances aux insecticides</b> .....	<b>64</b>
2.1. <i>Apparitions de résistances</i> .....	65

2.2. Modifications comportementales.....	66
2.3. Changements physiologiques.....	67
2.4. Résistances métaboliques.....	68
2.5. Modifications de cibles.....	68
2.5.1. Canal sodium.....	69
2.5.2. Acétylcholinestérase.....	70
<b>Chapitre V – Nouvelles stratégies de LAV.....</b>	<b>72</b>
<b>1. Gestion des résistances.....</b>	<b>72</b>
<b>2. Synergie de deux produits chimiques.....</b>	<b>73</b>
1.1. Deux insecticides.....	73
1.2. Insecticides/répulsifs.....	75
<b>3. Optimisation de l'efficacité des produits chimiques.....</b>	<b>76</b>
<b>Chapitre VI – Objectif.....</b>	<b>78</b>

## Partie 2 : Matériels et méthodes

<b>Chapitre I – Modèle biologique : la blatte <i>Periplaneta americana</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>1. Les Dorsal Unpaired Median (DUM) neurones de la Blatte <i>Periplaneta americana</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>2. Critères morphologiques des DUM neurones.....</b>	<b>85</b>
<b>3. Critères électrophysiologiques des DUM neurones.....</b>	<b>86</b>
<b>4. Critères biochimiques des DUM neurones.....</b>	<b>86</b>
<b>Chapitre II – Techniques expérimentales sur neurones isolés.....</b>	<b>88</b>
<b>1. Dissociation des DUM neurones.....</b>	<b>88</b>
1.1. Présentation du matériel biologique.....	88
1.2. Protocole de dissociation.....	88
1.3. Prélèvements des derniers ganglions abdominaux.....	89
1.4. Digestion enzymatique.....	90
1.5. Dissociation mécanique.....	90
<b>2. Technique d'imagerie calcique sur neurones isolés.....</b>	<b>91</b>
2.1. Principe.....	91
2.2. Dispositif expérimental.....	93
<b>3. Technique électrophysiologique du patch-clamp sur neurones isolés.....</b>	<b>95</b>
3.1. Principe.....	95
3.2. Dispositif d'enregistrement.....	97
3.3. Composition des solutions.....	99

<b>Chapitre III – Test de sensibilité des moustiques adultes aux insecticides et répulsifs.....</b>	<b>100</b>
1. Présentation du matériel biologique.....	100
2. Test de rétention et de séchage des moustiquaires.....	100
3. Imprégnation de moustiquaires.....	101
4. Préparation des tests en cône.....	101
5. Test en cône.....	102

## **Partie 3 : Résultats**

---

<b>Chapitre I – Mécanismes d’action du répulsif DEET sur les DUM neurones de blatte <i>Periplaneta americana</i>.....</b>	<b>108</b>
---	------------

1. Effet du répulsif DEET sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire des DUM neurones.....	108
2. Effet du DEET <i>via</i> la modulation des récepteurs cholinergiques de type muscarinique d’insectes.....	110
3. Pertinence de l’utilisation du DEET dans un mélange répulsif/insecticide comme stratégie alternative en LAV.....	112

<b>Chapitre II – Mécanismes d’action du répulsif IR3535 sur les DUM neurones de blatte <i>Periplaneta americana</i>.....</b>	<b>114</b>
--	------------

1. Effet du répulsif IR3535 sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire des DUM neurones.....	114
2. Origines des variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par le répulsif IR3535 à faible concentration.....	116
2.1. Localisation de la variation de la concentration en calcium intracellulaire.....	116
2.2. Implication des canaux calcium dépendants du potentiel.....	118
2.3. Implication des récepteurs cholinergiques de type muscarinique.....	119
2.4. Implication du calcium intracellulaire.....	120
2.5. Récapitulation de l’effet de l’IR3535 à faible concentration.....	122
3. Origines des variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par le répulsif IR3535 à forte concentration.....	124
3.1. Localisation de la variation de la concentration en calcium intracellulaire.....	124
3.2. Implication des canaux calcium dépendants du potentiel.....	125
3.3. Implication des récepteurs cholinergiques de type muscarinique.....	126
3.4. Implication du calcium intracellulaire.....	127
3.5. Récapitulation de l’effet d’IR3535 à forte concentration.....	128

<b>4. Effet du répulsif IR3535 sur l'activité électrique des DUM neurones.....</b>	<b>129</b>
4.1. <i>Effet du répulsif IR3535 à faible concentration sur l'activité électrique des DUM neurones.....</i>	<i>130</i>
4.2. <i>Effet du répulsif IR3535 à forte concentration sur l'activité électrique des DUM neurones.....</i>	<i>131</i>
<b>Chapitre III – Etudes de l'effet synergique du mélange IR3535/thiaclopride sur les DUM neurones de blatte <i>Periplaneta americana</i>.....</b>	<b>133</b>
<b>1. Etude d'un insecticide néonicotinoïde sur les propriétés électrophysiologiques des DUM neurones de blatte.....</b>	<b>133</b>
1.1. <i>Choix de l'insecticide.....</i>	<i>133</i>
1.2. <i>Etudes électrophysiologiques des effets du thiaclopride sur les DUM neurones à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière dans des conditions de potentiel imposé.....</i>	<i>135</i>
<b>2. Effets du prétraitement des DUM neurones de blatte par l'IR3535 sur l'action du thiaclopride.....</b>	<b>136</b>
2.1. <i>Effet de l'association IR3535/thiaclopride sur les DUM neurones.....</i>	<i>136</i>
2.2. <i>Etudes de l'influence du calcium sur l'amplitude des courants ioniques entrants induits par de fortes concentrations de thiaclopride en présence d'IR3535.....</i>	<i>139</i>
<b>Chapitre IV – Etudes de l'effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur les moustiques <i>Anopheles gambiae</i>.....</b>	<b>143</b>
<b>1. Estimation des concentrations des substances actives à utiliser.....</b>	<b>143</b>
<b>2. Résultats des tests en cône OMS.....</b>	<b>144</b>
2.1. <i>Observation de l'effet KD induit par l'association IR3535/thiaclopride.....</i>	<i>144</i>
2.2. <i>Observation de l'effet de l'association IR3535/thiaclopride sur la mortalité des moustiques.....</i>	<i>146</i>
<b>3. Résultats préliminaires des tests réalisés en tunnel.....</b>	<b>149</b>

## Partie 4 : Discussion et perspectives

<b>Chapitre I - Compréhension du mécanisme d'action cellulaire de l'IR3535.....</b>	<b>153</b>
1. <b>Mécanisme d'action cellulaire de l'IR3535.....</b>	<b>153</b>
2. <b>Hypothèses concernant l'effet de l'IR3535 sur les mAChRs de sous-type M1 des DUM neurones.....</b>	<b>155</b>
<b>Chapitre II - Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride <i>in vitro et in vivo</i>.....</b>	<b>158</b>

1. Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur neurones d'insectes <i>in vitro</i> .....	158
2. Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur moustiques <i>in vivo</i> .....	159
Chapitre III – Perspectives de recherche.....	161
1. Perspectives de recherche sur les mécanismes d'action cellulaires de l'IR3535..	161
2. Perspectives de recherches sur l'association IR3535/thiaclopride <i>in vitro</i> .....	162
3. Perspectives de recherches sur l'association IR3535/thiaclopride <i>in vivo</i> .....	164
3.1. Améliorer les connaissances sur l'effet de l'association IR3535/thiaclopride <i>in vivo</i> .....	164
3.2. Tester de nouvelles associations IR3535/néonicotinoïdes.....	164
3.3. Tester l'effet de l'association IR3535/thiaclopride sur le terrain.....	166
Conclusion.....	168
Liste des figures et tableaux.....	169
Références bibliographiques.....	175
Annexe 1.....	189
Annexe 2.....	197

## Liste des abréviations

---

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : concentration en calcium intracellulaire

ω-ctx : ω-conotoxine

ACh : acétylcholine

AChE : acétylcholinestérase

*Ae.* : *Aedes*

AL : lobe antennaire

AM : acétoxyméthylester

AMP<sub>c</sub> : adénosine monophosphate cyclique

*An.* : *Anopheles*

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOP : amplificateur opérationnel

ATP : adénosine triphosphate

BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

*Bti* : *Bacillus thuringiensis israeli*

Calmoduline : calcium modulated protein

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CdCl<sub>2</sub> : chlorure de cadmium

CNEV : Centre National d'Expertise sur les Vecteurs

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

CTL : lectine type-C

*Cx.* : *Culex*

DAG : diacylglycérol

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DEET : N,N-diethyl-m-toluamide ou N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide

DGA : dernier ganglion abdominal

DUM neurone : Dorsal Unpaired Median neurone

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

EDTA : éthylène dinitrile tétraacétate

EGTA : éthylène glycol tétraacétate

EPSP : potentiel post-synaptique excitateur

GABA : acide-γ-aminobutyrique

GRN : neurone de type récepteur gustatif

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate

IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'inositol triphosphate

IR3535 : Insect repellent 3535 ou éthylbutylacétylamino propionate

IRD : Institut de recherche et développement

KBR3023 : icaridine ou picaridine

KD : knock-down

Kdr : knock-down resistance

LAV : lutte anti-vectorielle

LP : liquide physiologique

mAChR : récepteur cholinergique de type muscarinique

MIVEGEC : laboratoire des Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle

MT7 : toxine muscarinique 7

nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique

NA<sub>v</sub> : canal sodium dépendant du potentiel

OBP : protéine olfactive de transport

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OP : organophosphoré

OR : récepteur olfactif

ORco : co-récepteur olfactif

ORN : neurone récepteur olfactif

PA : potentiel d'action

PBO : piperonyl butoxide

PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PLC : phospholipase C

PMD : citriodiol ou p-menthane-3,8-diol

PZP : pirenzépine

RCIM : laboratoire des Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires

TMB-8 : 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8

## PRÉAMBULE

---

Depuis quelques années, les autorités sanitaires mondiales nous alertent sur l'inquiétante recrudescence des maladies à transmission vectorielle. Ces pathologies, transmises d'un individu à un autre par l'intermédiaire d'un vecteur, sont à l'origine de nombreuses pandémies historiques. On retiendra par exemple l'épisode de la « Peste Noire » du XIV<sup>e</sup> siècle durant laquelle un quart de la population européenne succomba à la maladie (Blancou et Meslin, 2000). Jusqu'à la première Guerre Mondiale, les maladies transmissibles furent notamment les premières causes de mortalité parmi les soldats et les civiles des pays en guerre.

Une grande partie des maladies infectieuses est transmise à l'homme *via* des insectes ou des acariens. C'est le cas notamment de la trypanosomiase africaine, autrement connue sous le nom de maladie du sommeil, inoculée par la mouche tsé-tsé *Glossina sp.* (Organisation Mondiale de la Santé, OMS, 2014), la leishmaniose véhiculée par le phlébotome ou la maladie de Lyme transmise à l'homme par la tique (Institut Pasteur, 2013). Parmi ces pathologies, celles impliquant les moustiques comme espèces vectrices font partie des plus importantes, que ce soit en terme de gravité ou d'aire de répartition. C'est le cas de la fièvre jaune, connue par les colons dès le XV<sup>e</sup> siècle et qui jusqu'au XIX<sup>e</sup> siècle, était considérée comme l'une des maladies les plus graves sévissant dans les Amériques. La dengue hémorragique (transmise par *Aedes sp.*), le chikungunya (*Aedes sp.*), l'encéphalite japonaise (*Culex sp.*) ou encore le virus de la Vallée du Rift (*Anopheles sp.*) sont autant de maladies infectieuses inoculées par les moustiques (Gratz, 1999).

Bien que l'implication des vecteurs dans ces pathologies soit connue depuis le XIX<sup>e</sup> siècle, le contrôle des populations d'insectes nuisibles demeure aujourd'hui encore une préoccupation des autorités sanitaires mondiales, notamment au sein des armées. En effet, les maladies à transmission vectorielle représentent une menace permanente pour les capacités opérationnelles des forces militaires déployées à travers le monde autant que pour les populations civiles qu'elles défendent.

Le contexte actuel de changement climatique ainsi qu'une mondialisation globale des échanges, résultant d'une économie florissante et de moyens de transport de plus en plus performants, entraîne des difficultés certaines à contrôler la dimension épidémiologique de ces pathologies. De nombreuses maladies infectieuses sont ainsi devenues émergentes, notamment grâce à la pullulation de l'espèce vectrice (les changements climatiques entraînant une extension de sa zone de répartition), mais aussi à cause du comportement à risque des hommes (déforestation, transport de marchandises sans contrôle sanitaire...). C'est le cas du virus de la Vallée du Rift qui, dans les années 2000, s'étend de l'Afrique au

Proche-Orient, notamment par la multiplication des moustiques vecteurs potentiels (OMS, 2010).

D'autres pathologies déjà bien connues sont en recrudescence, comme la dengue, ou continuent de faire des milliers de victimes, comme le paludisme. L'accentuation de l'urbanisation, des échanges commerciaux et du réchauffement planétaire entraîne la réapparition du paludisme dans des zones géographiques où il avait été autrefois éradiqué. Ainsi, on considère aujourd'hui le paludisme, inoculé à l'homme par le moustique *Anopheles sp.*, comme la maladie à transmission vectorielle la plus importante dans le monde (OMS, 2015).

Si l'on retrouve la plupart de ces pathologies dans les pays en voie de développement, les pays industrialisés sont depuis quelques années eux aussi concernés, notamment par l'extension de la zone de répartition de certains vecteurs. Ainsi, on a par exemple retrouvé *Aedes albopictus* dans le sud de l'Europe (Aranda *et al*, 2006). Ce moustique étant l'un des vecteurs de la dengue et du chikungunya, il devient dès lors une menace potentielle, notamment dans le sud de la France métropolitaine.

L'ensemble de ces constats explique ainsi le besoin vital pour l'homme de trouver des méthodes de lutte toujours plus efficaces contre ces moustiques vecteurs de maladies. C'est dans le but de trouver une nouvelle stratégie de lutte adaptée aux conditions actuelles, c'est-à-dire de conserver une efficacité maximale tout en diminuant les doses de produits toxiques et en contournant les problèmes de résistance des moustiques aux insecticides, que s'inscrit ce projet de thèse.

# **Partie 1 :**

# **Introduction**



## Chapitre I — Moustiques : vecteurs de maladies

Les moustiques sont des insectes de l'ordre des Diptères (deux ailes) faisant partie de la famille des *Culicidae*, identifiable par un système buccal de type piqueur-suceur. Actuellement, on compte plus de 3500 espèces regroupées en 41 genres (Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2012). Les *Culicidae* se divisent en deux sous-familles (**Figure 1**) :

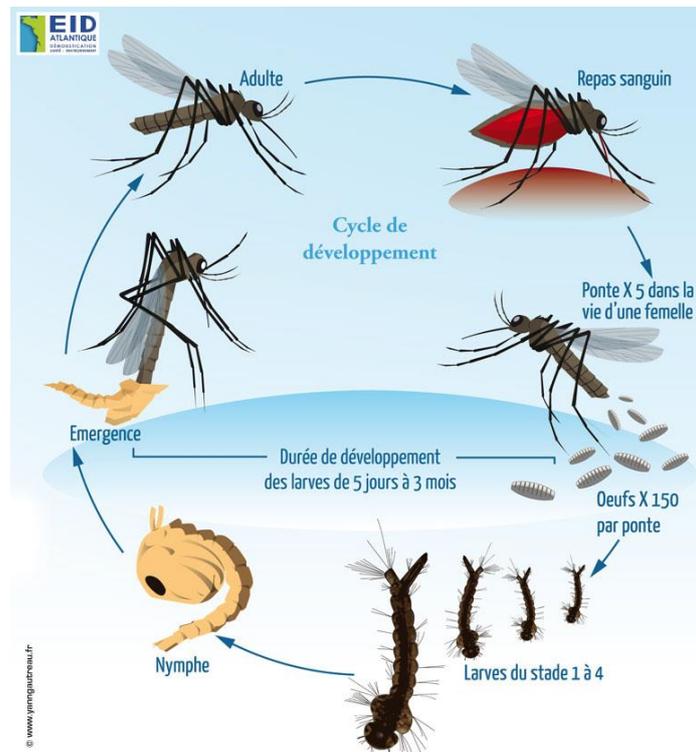
- La sous-famille *Anophelinae* comprend tous les genres responsables de la transmission du parasite *Plasmodium* à l'origine du paludisme. C'est au sein de cette sous-famille que l'on retrouve le genre *Anopheles* (*An.*), décrite pour la première fois en 1818 par J.W. Meigen (Reinert, 2001).
- La sous-famille *Culicinae* regroupe l'ensemble des genres autres que ceux de la seconde sous-famille. On y retrouve notamment les genres *Culex* (*Cx.*) et *Aedes* (*Ae.*), principaux vecteurs de la dengue et du chikungunya.



**Figure 1 :** Photographies des espèces représentatives de deux sous-familles de moustiques. A- *Anopheles gambiae*. B- *Culex quinquefasciatus*. C- *Aedes aegypti*.

### 1. Cycle de vie du moustique

Les moustiques sont des insectes holométaboles suivant un cycle de métamorphose complète passant par le stade d'œuf, de larve et de nymphe pour enfin aboutir à l'adulte (**Figure 2**) (Carnevale et Robert, 2009). Chaque stade de développement possède une morphologie externe différente, adaptée au milieu de vie (aquatique pour les trois premiers stades, aérien pour le stade adulte) et spécifique à chaque sous-famille et espèce de moustiques. Il est ainsi possible d'identifier la plupart des moustiques par une simple reconnaissance visuelle.



**Figure 2 :** Cycle de vie d'un moustique (EID Atlantique, 2014). Les moustiques sont des insectes holométaboles suivant un cycle de métamorphose complète de l'œuf jusqu'au stade imaginal.

### 1.1. Œuf

Afin de se reproduire, une femelle moustique n'a généralement besoin d'être fécondée que par un seul mâle. En effet, la spermathèque, la poche dans laquelle sont stockés les spermatozoïdes, permet de conserver le sperme. Suite à l'accouplement, la femelle doit effectuer un premier repas de sang qui fournira les nutriments de base nécessaires à la maturation des œufs.

Ce n'est qu'une fois ces œufs fécondés et maturés que la femelle part en quête d'un gîte de ponte aquatique propice au développement des larves. Ces gîtes larvaires sont variés, notamment suivant les genres de moustiques. S'il s'agit généralement d'eau stagnante, les femelles *Anopheles* privilégieront les eaux résiduelles naturelles se trouvant dans les fossés ou les champs, tandis qu'*Aedes* choisira préférentiellement les gîtes anthropiques urbains tels que les ornements de jardins, les poubelles ou récipients abandonnés (Carnevale et Robert, 2009). De plus, au sein d'un même genre, certaines espèces ont un large choix concernant le site de ponte, allant de l'eau douce à l'eau saumâtre, d'un site ensoleillé ou ombragé, avec ou sans végétation. D'autres au contraire ont des contraintes écologiques strictes. *Aedes albopictus* préfère ainsi les sites plus riches en matière organique qu'*Aedes aegypti* (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Cette variabilité des

gîtes larvaires explique notamment la difficulté à contrôler et réguler les populations d'espèces vectrices.

Un pont de moustique compte généralement 50 à 400 œufs flottant à la surface de l'eau. Suivant le genre de moustiques, les critères de reconnaissance morphologique des œufs diffèrent. Les œufs d'anophèles sont pondus de façon isolée et possèdent des flotteurs latéraux, tandis que ceux des espèces *Aedes*, s'ils sont eux aussi isolés, ne possèdent pas de flotteurs, mais sont extrêmement résistants à la dessiccation. Les œufs de *Culex* sont quant à eux reconnaissables par leur regroupement en nacelles (Carnevale et Robert, 2009).

Quelle que soit l'espèce de moustique, l'œuf doit se trouver dans des conditions idéales pour pouvoir éclore, généralement en 48 heures. Une diminution de la température ou du taux d'humidité peut entraîner des délais d'éclosion. Ainsi, l'éclosion d'œufs d'*Anopheles gambiae* se trouvant sur un substrat sec diminue de 80% dès le premier jour (Shililu *et al*, 2004). Au contraire, les œufs d'*Ae. Albopictus* sont capables de rentrer en diapause le temps que les conditions soient de nouveau favorables (Bonizzoni *et al*, 2013).

## 1.2. Larves

Lors de l'éclosion en milieu aquatique, les larves de moustiques mesurent environ 2 millimètres (mm). Elles subissent par la suite trois mues successives permettant un accroissement de la taille jusqu'à 15 mm. Les larves passent ainsi par quatre stades larvaires (dits L1 à L4) dont la morphologie comparable se résume à trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen (Carnevale et Robert, 2009).

La tête est composée d'une paire d'antennes et de deux paires d'yeux composés, dont une non fonctionnelle, prémices des futurs yeux de l'adulte. Elle est aussi pourvue de brosses buccales servant à brasser l'eau afin de filtrer les particules alimentaires et les attirer vers l'appareil masticateur.

Le thorax se découpe en trois segments : pro-, méso- et métathorax. La disposition des soies sur le thorax permet une identification spécifique des larves selon l'espèce.

L'abdomen se décompose en neuf segments dont les deux derniers sont morphologiquement différents des autres. Le 8<sup>ème</sup> segment possède des excroissances servant à peigner ses brosses buccales et, dans le cas des larves d'*Anopheles*, des papilles respiratoires permettant une position de repos parallèle à la surface de l'eau. Le 9<sup>ème</sup> segment porte une brosse ventrale natatoire et ainsi qu'un siphon respiratoire que l'on retrouve chez les *Aedes* et les *Culex*, entraînant une position de repos oblique (Carnevale et

Robert, 2009). La durée de vie de larve est d'une à deux semaines, bien qu'elle puisse être accrue en cas d'hibernation.

### 1.3. Nymphes

Au bout d'une semaine environ, la larve subit une métamorphose complète durant laquelle la cuticule se fend pour former une nymphe (Singh *et al*, 2012). La tête et le thorax fusionnent en un céphalothorax volumineux et sclérifié à travers lequel il est possible de distinguer les futurs organes de l'adulte.

Tout comme la larve, la nymphe a une respiration aérienne, rendue possible grâce à deux trompes respiratoires se trouvant sur le céphalothorax. Ces trompes possèdent des différences morphologiques suivant les genres de moustiques. Ainsi, les *Anopheles* ont des trompes respiratoires courtes et évasées alors que les *Culicinae* ont des trompes longues et régulières (Carnevale et Robert, 2009).

L'abdomen composé de neuf segments porte deux palettes natatoires en position apicale. Ces palettes, par l'intermédiaire de contractions de l'abdomen, permettent à la nymphe de rester mobile. Contrairement aux précédents stades, il existe un dimorphisme sexuel. En effet, les nymphes mâles sont plus petites et se développent plus vite.

Le stade nymphal dure généralement 24 à 48 heures durant lesquelles s'opère une importante métamorphose interne aboutissant à la transformation en adulte ailé (Singh *et al*, 2012). L'émergence ne dure que quelques minutes, mais il s'agit d'un moment risqué pour le moustique puisqu'il est alors vulnérable face aux prédateurs et risque la noyade.

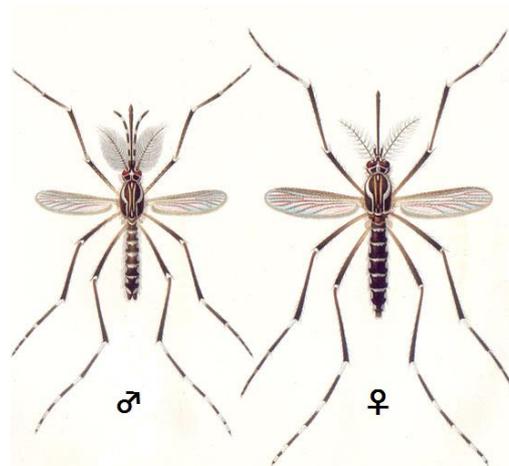
### 1.4. Adultes

La forme adulte, ou imago, du moustique mesure entre 5 et 40 mm selon l'espèce, bien que dépassant rarement les 10 mm. Morphologiquement, il est composé, comme pour la larve, de trois parties : tête, thorax et abdomen.

Exceptés les deux yeux composés et les deux palpes maxillaires, la tête des moustiques porte deux éléments remarquables possédant un dimorphisme sexuel. Chez les mâles, les antennes sont dotées de soies longues et plumeuses permettant la perception des phéromones, tandis que chez les femelles, ces soies sont verticillées, courtes et moins fournies servant principalement au repérage de l'hôte pour le repas de sang (**Figure 3**).

De même, l'appareil buccal diffère selon le sexe du moustique. Chez le mâle, il s'agit d'un appareil buccal de type suceur qui lui permet de se nourrir du nectar ou de la sève des

plantes. L'appareil buccal des femelles est de type vulnérant. En effet, contrairement au mâle, la femelle est hématophage et possède une double circulation de fluide permettant l'injection de la salive *via* l'hypopharynx et l'aspiration du sang *via* la trompe, aussi appelée proboscis.



**Figure 3 :** Dimorphisme sexuel chez le moustique *Aedes aegypti* (d'après Wikipedia, 2015).

Le thorax est segmenté en trois parties, chacune portant une paire de pattes longues, fines et articulées en neuf parties (coxa, trochanter, fémur, tibia et cinq tarsi). Le segment médian, dit segment alaire, est hypertrophié et cependant très développé puisqu'en plus de la paire de pattes, il porte une paire d'ailes membraneuses. Les ornements alaires composés d'écaillés sont typiques de la famille des *Culicinae*. Leur pigmentation le long des nervures permet de faire la distinction entre les différents genres de moustiques.

L'abdomen se compose de dix segments recouverts d'écaillés dont la disposition permet de déterminer les différentes espèces. Les sept premiers segments sont composés de deux plaques chitineuses reliées par une membrane souple capable de se dilater lors de l'alimentation ou l'oogénèse. C'est en effet dans l'abdomen que se trouvent l'intestin ainsi que les ovaires. Chez la femelle, le 9<sup>ème</sup> segment, dit génital, porte le vagin fermé par deux lèvres et deux cerques. Chez le mâle, ce segment est lié au 10<sup>ème</sup> segment, dit anal, pour former les genitalia et arbore des forcipules nécessaires pour s'accrocher à la femelle lors de la copulation.

La durée de vie du moustique au stade imaginal dépend de nombreux paramètres, notamment des conditions climatiques et écologiques telles que la température, l'humidité, la présence de prédateurs... Dans la nature, on considère qu'un moustique adulte femelle peut vivre jusqu'à 4 semaines dans les régions au climat chaud et tropical. (Carnevale et Robert, 2009) Néanmoins, dans des zones plus tempérées, le phénomène d'hibernation permet

d'accroître la longévité des femelles de certaines espèces jusqu'à plusieurs mois. Dans une étude effectuée en République de Corée, il a même été démontré une saisonnalité des espèces, *Anopheles pullus* semblant plus adapté au phénomène d'hibernation qu'*Anopheles sinensis* (Oh *et al*, 2010). Quelle que soit l'espèce ou les conditions extérieures, les mâles ont toujours une durée de vie inférieure à celle des femelles, de l'ordre généralement de quelques jours.

## 2. Mécanisme de piqûres

Comme pour de nombreux arthropodes, seules les femelles moustiques sont hématophages. En effet, elles ont besoin des protéines présentes dans le sang des animaux vertébrés pour la maturation de leurs œufs.

### 2.1. Comportement trophique

La période de la prise de sang des moustiques femelles varie selon le genre et définit un cycle dit d'agressivité qui dépend de l'état d'appétence. L'étude de ces cycles permet notamment de mieux connaître les lieux et les périodes de risques de transmission afin d'adapter les moyens de lutte. Ainsi, le genre *Aedes* pique préférentiellement le jour avec parfois des pics d'agressivité au lever du jour et au crépuscule comme pour le cas d'*Ae. albopictus* (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). *Culex* et *Anopheles* sont plutôt des moustiques nocturnes piquant entre le coucher et le lever du soleil. Les moustiques anophèles ont généralement des pics d'agressivité vers 1 heure du matin, puis vers 5-6 heures, bien qu'on puisse observer des variations interspécifiques (Lundwall *et al*, 2005). Dans le cas d'*An. gambiae*, on estime que le cycle d'agressivité est aussi en relation avec l'augmentation de l'humidité et la chute de température observées dès 18 heures (Carnevale et Robert, 2009).

Une même espèce de moustique peut avoir un cycle d'agressivité différent selon sa localisation ou la saison. Il a notamment été observé qu'*Anopheles minimus* pique entre 21 et 22 heures en Thaïlande alors qu'il pique plutôt entre 22 heures et 3 heures au Vietnam (Garros *et al*, 2006). En Corée, il a été vu qu'*An. sinensis* pique en début de nuit au printemps (période froide), et après minuit en été (période chaude) (Ree, 2005). De même en Afrique de l'Ouest, *An. gambiae* semble beaucoup plus agressif durant la saison sèche que la saison des pluies (Pennetier *et al*, 2009).

Enfin, il a été constaté que l'agressivité pouvait varier selon l'état physiologique de la femelle. En effet, une femelle *An. gambiae* vierge aura une activité plus intense en début de nuit alors qu'une femelle fécondée aura une activité qui se maintiendra tout au long de la nuit (Carnevale et Robert, 2009).

Les moustiques peuvent aussi avoir des lieux de préférence pour leur repas de sang. Certains sont endophages, préférant se nourrir à l'intérieur des habitations, comme *An. gambiae* (Carnevale et Robert, 2009). D'autres sont plutôt exophages et se nourrissent en extérieur, comme *Ae. albopictus* (Bonizzoni *et al*, 2013). Cette différence est notamment due à la zone de vol plus ou moins restrictive, *Ae. albopictus* ne s'éloignant généralement pas plus de 600m de son gîte larvaire (Chareonviriyaphap *et al*, 2013).

## 2.2. Choix de l'hôte

Le choix de l'hôte pour les moustiques hématophages est une étape cruciale pour leur survie. En effet, le repas de sang est un moment dangereux pouvant s'avérer fatal si l'hôte est alerté par la présence de l'insecte. Il est donc nécessaire pour le moustique de bien sélectionner sa proie en évaluant les risques potentiels en fonction de la qualité de la source de nourriture.

Selon les espèces de moustiques, les femelles ont une préférence pour l'hôte qui servira à leur repas de sang. Si certaines choisissent exclusivement les êtres humains selon un comportement anthropophile, d'autres se montrent plus opportunistes, piquant à la fois les hommes et les vertébrés qui les entourent, notamment le bétail. *Ae. albopictus* notamment possède une large gamme d'hôtes puisqu'il pique aussi bien les humains que le bétail, les animaux domestiques ou même les animaux sauvages (Bonizzoni *et al*, 2013 ; Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Ce choix de l'hôte peut être influencé par la proximité des habitations humaines et des étables. *An. arabiensis* est un moustique avec une tendance à la zoophilie accrue lorsque le bétail est gardé hors des villages (Githeki *et al*, 1994).

Il existe généralement un lien entre l'anthropophilie et l'endophilie. On le constate notamment pour *An. gambiae* qui est principalement anthropophile et endophage (Carnevale et Robert, 2009). De même en Thaïlande, il a été constaté qu'*Ae. aegypti* est anthropophile et qu'il aura tendance à choisir son site de repos dans les maisons (Chareonviriyaphap *et al*, 2013).

## 2.3. Repérage de l'hôte

La première phase de recherche d'un repas de sang est souvent non orientée, voire aléatoire, jusqu'à percevoir un stimulus émis par un hôte potentiel. Un moustique s'appuie sur différents sens pour localiser un hôte. Sur de longues distances, il perçoit tout d'abord les courants d'air provoqués par les mouvements et la respiration de l'hôte. Puis, les stimuli olfactifs sont perçus par les chémorécepteurs présents sur les antennes. Ceux-ci permettent

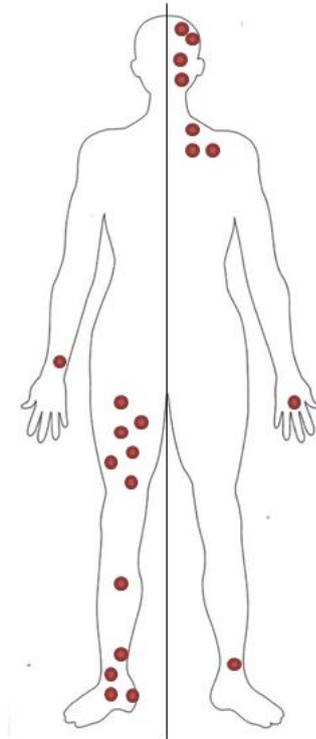
notamment de repérer les odeurs corporelles comme l'acide lactique, le dioxyde de carbone ou des composés se retrouvant dans la sueur (Ghaninia *et al*, 2007 ; Paluch *et al*, 2010). Les différentes combinaisons d'odeurs, de chaleur et d'humidité, ont ainsi une influence sur le comportement du moustique lui permettant de déterminer quels individus seraient les plus susceptibles d'être des hôtes (Cardé et Gibson, 2012).

La perception olfactive se traduit par un changement dans l'orientation du vol, qui passe d'un vol aléatoire à un vol orienté. Lorsqu'il est suffisamment proche (entre 5 et 20 mètres), le moustique est alors capable de distinguer des variations de forme et d'intensité lumineuse grâce à ses yeux composés. On sait ainsi que les moustiques sont attirés par les couleurs sombres, comme le bleu et le marron (Wen *et al*, 1997).

#### 2.4. Piqûre

L'endroit où le moustique va se poser sur le corps de son hôte diffère selon l'espèce, mais aussi selon la position de l'individu. Les vecteurs principaux du paludisme, *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. funestus* vont ainsi piquer préférentiellement au niveau des chevilles lorsque l'hôte est debout, mais n'aura plus de préférence lorsque celui-ci est couché (Lundwall *et al*, 2005 ; Braack *et al*, 2015). La température corporelle joue aussi un rôle essentiel, *An. gambiae* préférant les zones où la température est plus faible, alors qu'*An. atroparvus* choisit les zones où la température est plus élevée (Carnevale et Robert, 2009) (**Figure 4**).

Une fois posée, la femelle moustique va entrer dans une phase d'exploration durant laquelle elle va déployer son labre pour chercher des vaisseaux sanguins à l'aide de ses stylets. Le sondage dure en moyenne une minute et se solde par un échec une fois sur deux. Dès lors que les stylets ont traversé la paroi d'un vaisseau sanguin, le sang est ingéré par aspiration. La salive injectée par l'hypopharynx durant le processus empêche l'agrégation des plaquettes et donc la coagulation. Si la femelle effectue le repas nécessaire à la maturation de ses œufs, il peut arriver qu'elle soit interrompue. Elle va alors multiplier les piqûres.



**Figure 4 :** Schéma des zones de piqûres préférentielles d'*Anopheles gambiae* (à gauche) et d'*Anopheles atroparvus* (à droite).

Après son repas de sang, le moustique cherche un lieu de repos pour la maturation de ses œufs. Selon l'espèce, il peut choisir de rester à l'intérieur de l'habitation, il est dit endophile. C'est le cas d'*An. funestus*, qui est à la fois extrêmement endophage et endophile, ce qui permet de réguler plus facilement sa population par des moyens de lutte intradomiciliaire (Carnevale et Robert, 2009). Le moustique peut aussi chercher un site à l'extérieur, dont le choix est influencé par des facteurs de luminosité et de température. Il est alors exophile, comme *An. melas* qui préfère généralement sortir des maisons après son repas de sang (Carnevale et Robert, 2009).

### 2.5. Risque d'infection

C'est durant la phase d'ingestion que le moustique risque de devenir un vecteur. En effet, si le sang est contaminé, l'agent pathogène est ingéré puis traverse la paroi stomacale pour se répliquer dans les glandes salivaires. Le temps d'incubation varie selon la nature de l'agent pathogène. En moyenne, une semaine pour le virus du chikungunya, 10 jours pour celui de la dengue. Une fois infecté, le moustique reste un vecteur toute sa vie. A chaque nouvelle piqûre, il transmet l'agent pathogène à son hôte *via* la salive.

Le cycle de transmission est d'autant plus important que la présence du pathogène semble avoir une influence sur le comportement du moustique. Ainsi, lorsqu'une femelle anophèle est infectée par *Plasmodium*, elle aurait tendance à interrompre plus souvent son repas de sang qu'une femelle non infectée. Pour compléter son repas, elle aura donc tendance à piquer davantage de personnes au cours de la nuit (Koella *et al*, 1998).

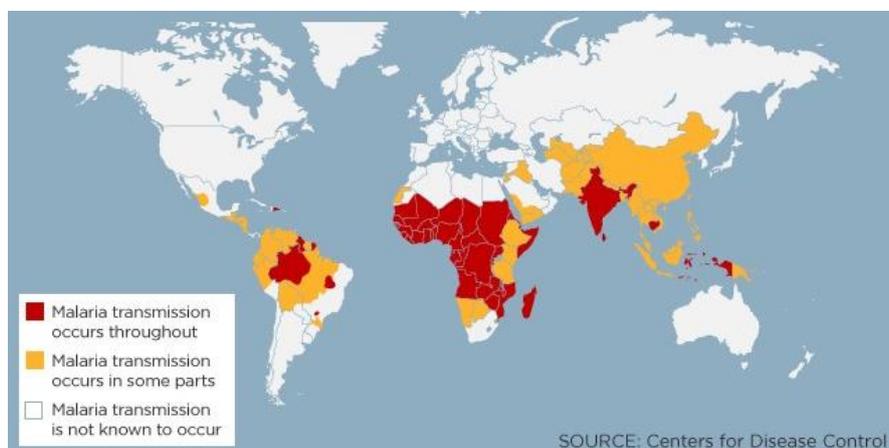
### 3. Rôle dans la transmission vectorielle

On désigne sous le terme de « vecteur » un arthropode hématophage capable de transmettre par des processus biologiques un agent pathogène d'un vertébré à un autre vertébré (CNEV, 2014). Les moustiques sont des représentants majeurs de ces vecteurs puisqu'ils sont à l'origine de la propagation de nombreuses pathologies graves, dont le paludisme, la dengue ou encore le chikungunya.

#### 3.1. Le paludisme

##### 3.1.1. Epidémiologie

Le paludisme, dû à un parasite du genre *Plasmodium*, est l'une des maladies à transmission vectorielle les plus meurtrières. Son aire d'exposition transcontinentale englobe l'Asie, l'Afrique, l'Amérique latine et centrale (**Figure 5**), ce qui représente 3,3 milliards d'individus concernés (soit environ 45% de la population mondiale). Si le nombre de cas cliniques par an a diminué de plus de moitié en quelques années, passant de 500 millions à 198 millions en 2013, cette maladie a fait près de 584 000 morts en 2013, essentiellement en Afrique subsaharienne (OMS, 2015).



**Figure 5** : Carte des territoires affectés par le paludisme (CDC, 2014).

Fort heureusement, les campagnes antipaludiques menées par l'OMS, préconisant l'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticides, et l'amélioration des traitements préventifs, notamment à base de chloroquine, sont à l'origine d'une diminution non négligeable du nombre de décès imputables au paludisme un peu partout dans le monde. Il est toutefois à noter que ces progrès durement obtenus sont menacés par l'apparition de résistances à la chloroquine chez les parasites *Plasmodium* (World Malaria Report, 2014).

De plus, les continents ne sont pas tous concernés de manière uniforme par les épidémies de paludisme qui varient selon la gravité des symptômes et le nombre de cas. En effet, la pathogénicité et la morbidité sont différentes d'une espèce de parasite à l'autre. *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, et *Plasmodium malariae* sont des espèces distribuées de manière inégale dans le monde, mais ne sont pas mortelles. L'espèce la plus pathogène, *Plasmodium falciparum*, est aussi responsable des cas mortels de paludisme (Institut Pasteur, 2013). Sa présence dominante sur le continent africain explique le pourcentage extrêmement important de décès, soit 90% des cas déclarés dans le monde.

C'est dans les années 1950 que débute un programme mondial de lutte contre le paludisme, employant de façon intensive des produits chimiques tels que le DDT puis plus tard, les pyréthrinoides. Ce programme d'éradication permit une diminution spectaculaire du taux de morbidité dû au paludisme dans de nombreux pays à risque, notamment en Thaïlande (Chareonviriyaphap *et al*, 2013).

Historiquement, le paludisme existe en Europe depuis l'Antiquité, mais fut éradiqué au cours du XXe siècle, notamment grâce à l'emploi d'insecticides (IRD, 2014). Depuis quelques années, les cas de paludisme sont essentiellement des cas d'importation. En France métropolitaine, 3500 cas d'importation ont été répertoriés en 2011 (Institut Pasteur, 2014).

### 3.1.2. Vecteurs

Le parasite *Plasmodium* se transmet exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. Or ce genre comprend plus de 400 espèces distinctes se répartissant sur une très large zone géographique aussi bien dans l'hémisphère sud, notamment en Afrique Subsaharienne et en Amérique latine, que dans l'hémisphère nord, en Europe et en Amérique du Nord. A ce jour, on compte une soixantaine d'espèces vectrices, dont les plus efficaces se situent en Afrique où l'on recense 90% des cas de paludisme dans le monde (OMS, 2015).

Le complexe *An. gambiae* comprenant sept espèces intervient dans 90% des cas de transmission en Afrique subsaharienne et intertropicale. Leur répartition dépend des

conditions climatiques. Ainsi, *An. melas* et *An. merus* vivent plutôt dans les eaux saumâtres, sur les côtes de l'Afrique de l'Ouest et de l'Est, respectivement. *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont des espèces d'eau douce. *An. arabiensis* est présent au Sahel et en Afrique méridionale, englobant l'aire de répartition d'*An. gambiae* qui s'étend des zones forestières jusqu'aux savanes humides à la limite de la ceinture sahélienne (Sinka *et al*, 2012).

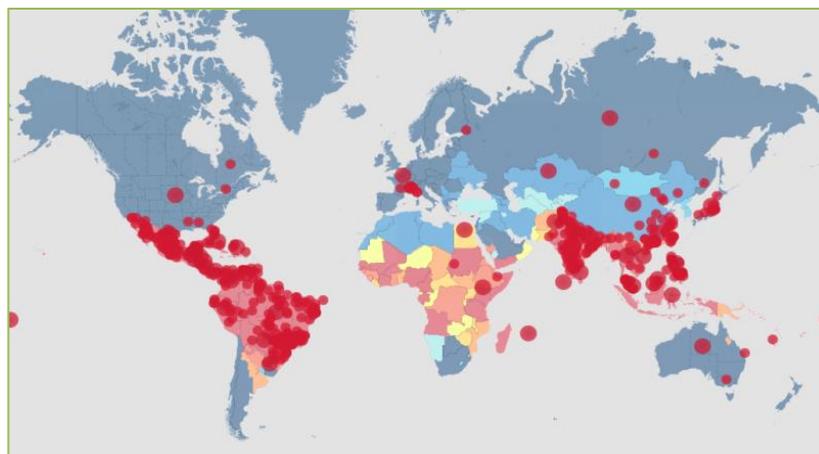
Il a été démontré qu'il existe au sein de la population de moustiques *An. gambiae* deux formes moléculaires distinctes, appelées Mopti (M) et Savane (S). La forme S se développe préférentiellement aux abords de gîtes larvaires temporaires sur l'ensemble de l'aire de répartition d'*An. gambiae*, alors que la forme M se retrouve plutôt près de gîtes anthropiques permanents, soit plus particulièrement en Afrique Centrale ou le long du fleuve Niger (della Torre *et al*, 2001).

Parmi les autres espèces vectrices du paludisme, on retrouve en Asie des espèces telles qu'*An. dirus*, *An. minimus* ou encore *An. philippinensis* (Chareonviriyaphap *et al*, 2013).

### 3.2. La dengue

#### 3.2.1. Epidémiologie

La dengue est une arbovirose provoquant de fortes fièvres et dans les cas les plus graves, des fièvres hémorragiques. Son aire de répartition est extrêmement vaste puisqu'elle touche plus de 100 pays à travers le monde (**Figure 6**), soit près de la moitié de la population mondiale exposée (OMS, 2015). Cette pathologie a une diffusion très rapide. Ainsi, on estime que l'incidence mondiale a augmenté de plus de 30 fois au cours des 50 dernières années, provoquant chaque année 100 000 cas de dengue.



**Figure 6 :** Carte des territoires affectés par la dengue (CDC, 2014).

Cette pathologie sévit principalement dans les régions tropicales et subtropicales, notamment en Amérique latine et dans le sud de l'Asie. Au début des années 1980, la dengue sévit surtout en Asie du sud-est, avec 400 000 cas répertoriés en Chine. Cette maladie vectorielle va peu à peu toucher l'Océan Indien puis les Antilles et l'Amérique latine dans les années 2000. Ainsi en Thaïlande par exemple, le nombre total de cas de dengue augmente chaque année, passant de 56 651 en 2008 à 78 337 en 2011 (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). 2.5 millions de cas sont déclarés sur l'ensemble des Amériques en 2013 (Institut Pasteur, 2014).

Historiquement, les 4 stéréotypes du virus de la dengue avait disparu de la région européenne depuis plus d'un demi-siècle. Cependant, depuis quelques années, on constate des cas sporadiques dans plusieurs pays du sud de l'Europe. Ainsi, en 2010, 1143 cas ont été déclarés après un retour d'un séjour à l'étranger dans les pays à risque (ECDC, 2013). Jusqu'en 2012, peu de cas de transmissions autochtones ont été signalés. En Croatie, 17 cas ont été identifiés en 2010. En France métropolitaine, 2 cas ont été recensés en 2010 (Institut Pasteur, 2014). En 2014, 4 cas autochtones ont été confirmés dans la région des Bouches-du-Rhône alors qu'en 2015, se sont 6 nouveaux cas qui ont été répertoriés à Nîmes (InVS, 2015). En octobre 2012, une importante épidémie a eu lieu à Madère, avec plus de 1000 cas confirmés en mars 2013 (ECDC, 2013).

### 3.2.2. Vecteurs

Le principal vecteur de la dengue est *Ae. aegypti*, originaire de l'Afrique de l'Ouest. Ce moustique s'est dispersé dans les zones tropicales et subtropicales, puis à l'ensemble des villes portuaires du sud de l'Europe, notamment grâce au trafic de plus en plus important des navires de commerce. Jusqu'aux années 1950, plusieurs flambées épidémiques ont été recensées dans les grands ports de France (Schaffner *et al*, 2014). Des années 1960 jusqu'aux années 2000, les cas de dengue en Europe ont cessé, correspondant à la disparition d'*Ae. aegypti* dans la région méditerranéenne. Cette absence du vecteur s'explique par son seuil de température de persistance qui est de 10 °C (OMS, 2015). De plus, les œufs d'*Ae. aegypti* sont sensibles au gel, induisant un taux de mortalité élevé lors de fortes gelées. Ceci explique que cette espèce ne puisse prospérer dans des régions où les hivers sont rigoureux.

Cependant, depuis quelques années, le réchauffement climatique de quelques degrés a modifié certaines régions européennes en habitat approprié pour *Ae. aegypti*, notamment les zones périurbaines. Les antécédents de présence dans certains pays méditerranéens et les cas de réintroduction de plus en plus fréquents, comme à Madère, laissent planer des doutes sur de possibles risques d'épidémie en Europe.

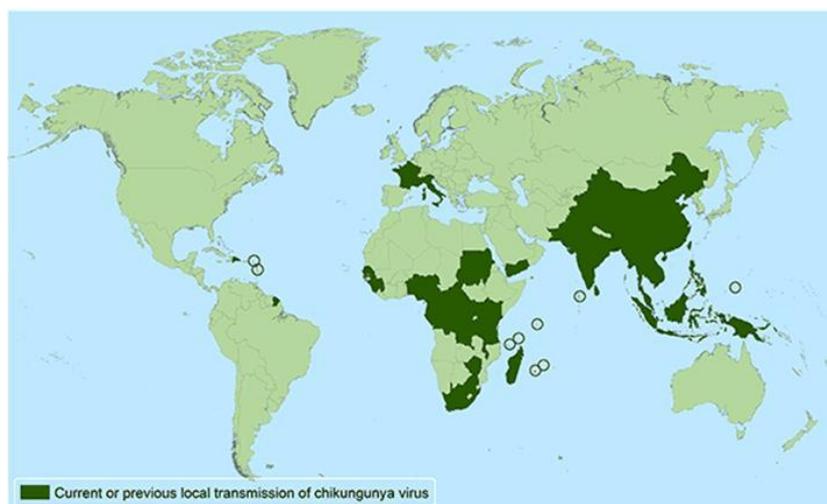
Le second vecteur de la dengue est *Ae. albopictus*, qui provient du sud-est de l'Asie (Aranda *et al*, 2006). Contrairement à *Ae. aegypti*, cette espèce est résistante au froid et peut hiberner durant plusieurs mois. Elle s'est ainsi rapidement établie en Europe ces dernières années, notamment sur la côte méditerranéenne, mais aussi sur les bords de la Mer Noire (Schaffner *et al*, 2014). En France, il est installé dans le sud, en Corse, dans la région Rhône-Alpes, jusqu'aux Pyrénées Orientales.

### 3.3. *Le chikungunya*

#### 3.3.1. Epidémiologie

Le chikungunya, « maladie de l'homme qui marche courbé », est une arbovirose qui s'illustre par des douleurs articulaires invalidantes provoquant une posture recroquevillée chez les personnes atteintes. Cette pathologie est connue depuis les années 1950 et touche majoritairement les populations africaines et asiatiques, bien qu'elle se soit largement répandue dans l'Océan Indien depuis une dizaine d'années (**Figure 7**). L'épidémiologie et les symptômes cliniques de cette pathologie restent proches de ceux de la dengue, ce qui provoque parfois des confusions d'identification lorsque les deux maladies coexistent.

En Afrique, des flambées épidémiques sont régulièrement constatées, notamment dans les zones rurales de l'Afrique subsaharienne. La dernière flambée de grande importance a été observée au Gabon en 2007, avec plus de 5000 cas suspectés (Institut Pasteur, 2012). La fréquence des épidémies est cependant plus importante en Asie du sud-est. C'est notamment en 2006 qu'une pandémie de grande ampleur s'est déclarée en Inde, avec environ 1.4 millions de personnes infectées recensées (InVS, 2008).



**Figure 7 :** Carte des territoires affectés par le chikungunya (OMS, 2014).

Dans l’Océan Indien, les cas de chikungunya ont commencé à apparaître sur l’île de la Réunion dès 2005, touchant près de 266 000 personnes, soit un tiers de la population (InVS, 2012 ; Chareonviriyaphap *et al*, 2013). C’est durant cette période que de nombreuses îles ont été touchées : Mayotte, Madagascar, les Seychelles. Des cas d’importation depuis l’Océan Indien se sont par la suite déclarés dans les Antilles avant de devenir des flambées épidémiques. Ainsi depuis 2013, plus de 100 000 cas de chikungunya y ont été recensés (Institut Pasteur, 2014).

Comme pour le cas de la dengue, on constate depuis quelques années des cas de chikungunya en Europe. En septembre 2007, une épidémie se répand dans le nord-est de l’Italie, touchant plus de 300 personnes. Des analyses ont montré que cette flambée rapide est due à une mutation améliorant la réplication des virus au sein du vecteur *Ae. albopictus* (Bonizzoni *et al*, 2013). En 2010, 2 cas autochtones sont déclarés dans le sud de la France (InVS, 2011). En 2014, ce sont plus de 400 cas importés des îles d’Outre-Mer recensés, ainsi que 11 cas autochtones dans un quartier de Montpellier (InVS, 2014).

### 3.3.2. Vecteurs

Comme pour la dengue, les vecteurs du chikungunya sont des moustiques du genre *Aedes*. Dans l’Océan Indien, le vecteur principal est *Ae. albopictus*, appelé couramment moustique tigre en raison de son abdomen rayé noir et blanc. Ce moustique est originaire de l’Asie du sud-est (Aranda *et al*, 2006), mais a progressivement migré vers l’ouest du continent à la faveur des échanges commerciaux. En effet, sa capacité à vivre dans des régions tempérées, voire froides, ainsi que son choix varié de sites de reproduction, permettent à ce moustique de proliférer dans des zones rurales, mais aussi périurbaines (Bonizzoni *et al*, 2013 ; OMS, 2015). Une fois installé, il est pratiquement impossible de l’éradiquer.

*Ae. albopictus* a ainsi atteint l’Amérique, l’Afrique, l’Australie puis l’Europe, devenant en quelques décennies l’espèce de moustique la plus invasive au monde. On retrouve ce moustique en Europe dans plus de 15 pays, notamment en Albanie où il fut isolé pour la première fois sur un territoire européen, et en Espagne (Aranda *et al*, 2006). En France métropolitaine, *Ae. albopictus* s’est implanté dès 2004. S’étant rapidement adapté à son environnement, on le retrouve désormais dans 22 départements comprenant le bassin méditerranéen et les Bouches-du-Rhône (InVS, 2015).

En Asie, le vecteur est principalement *Ae. aegypti*, qui s’adapte aux habitats artificiels des villes. Il existe aussi de nombreux vecteurs, notamment en Afrique, d’origine sylvestre. *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* ou encore *Ae. taylori* participent ainsi à la transmission du

virus du chikungunya dans les zones forestières où de multiples animaux, principalement des primates, peuvent servir de réservoir (OMS, 2015).

## Chapitre II – Lutte anti-vectorielle

---

Si certaines pathologies véhiculées par des vecteurs biologiques bénéficient de moyens de prophylaxie médicale spécifiques comme la vaccination (fièvre jaune, encéphalite japonaise...) ou les traitements (chloroquine et quinine comme traitement antipaludique...), la plupart ne possèdent pas encore de traitements efficaces (Anses, 2013). Ainsi, le moyen de lutte conventionnel pour endiguer l'expansion de ces maladies reste la prophylaxie sanitaire préventive. Cette méthode de prévention comprend une sensibilisation des populations concernant les moyens de protection disponibles ainsi et surtout qu'une diminution des populations de vecteurs, principalement par l'utilisation d'insecticides.

Les moyens de lutte employés dépendent ainsi du vecteur, de l'environnement, du contexte épidémiologique et du niveau socio-économique des populations autochtones. Le plus souvent, plusieurs méthodes sont mises en place dans un processus de lutte anti-vectorielle (LAV) intégrée.

### 1. L'armée, premier acteur de la lutte anti-vectorielle

De tout temps, les maladies à transmissions vectorielles furent des facteurs importants, voire historiques, du déroulement des guerres. Jusqu'à la moitié du XXe siècle et l'arrivée massive des produits chimiques, elles furent même la cause d'annulation d'opérations militaires. Ce fut notamment le cas de l'Autriche en 1566 qui abandonna la reconquête de la Hongrie après une épidémie de typhus (Pagès, 2009). Afin de limiter l'incidence des maladies à transmission vectorielle et réduire les coûts directs et indirects qui y sont liés (DeParis et al, 2001), l'armée est ainsi fortement impliquée dans l'avancée de nouvelles stratégies de LAV.

Historiquement, il faut remonter à la guerre russo-japonaise de 1904-1905 pour voir les mesures d'hygiène militaire et de contrôle des maladies évoluées avec la vaccination, les traitements antibiotiques ou la mise en place de protections personnelles (Pagès *et al*, 2010). Progressivement les pathologies transmissibles deviennent curables, diminuant ainsi le nombre de morts parmi les soldats autant que les civils. Cependant l'émergence et la réémergence de maladies, nommées « fléaux de guerre », s'avèrent être un problème prépondérant pour l'activité militaire, particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales.

Parmi, les fléaux de guerre, le paludisme est une pathologie dont le lien avec les opérations militaires remonte à des siècles. Déjà présente durant l'Antiquité, il faut attendre

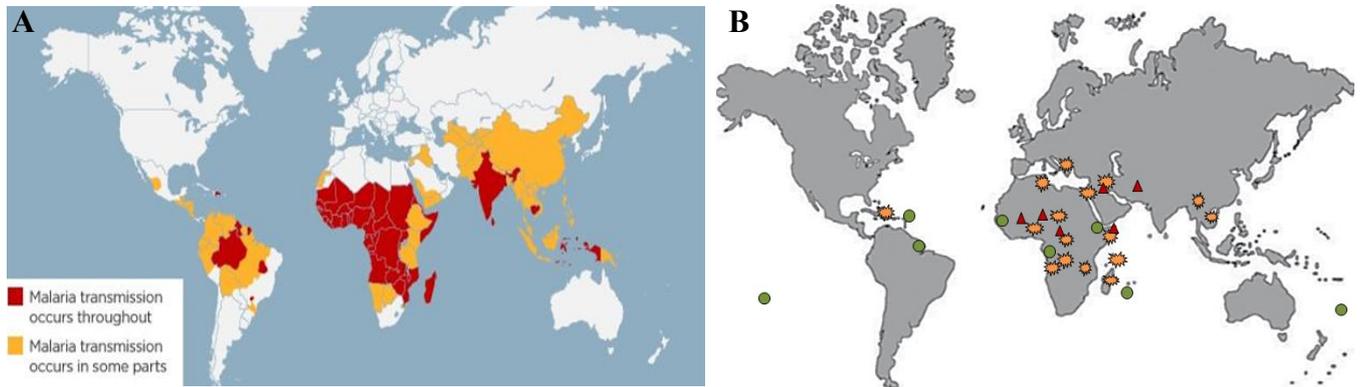
la Guerre de Sécession américaine et la découverte de la quinine au XIXe siècle pour que débute un semblant de prophylaxie. Ce fut la découverte du rôle des vecteurs dans la transmission des maladies au début de XXe siècle qui permis aux armées de mieux cibler la menace. Ainsi en 1901, l'armée américaine découvrit que la fièvre jaune était transmise par les moustiques du genre *Aedes* (Kitchen *et al*, 2009). Ceci permit de mettre en place la lutte mécanique avec la destruction des gîtes de pontes, mais aussi la protection personnelle en utilisant des vêtements couvrants (Pagès, 2009). Ce fut aussi le début de l'utilisation des premiers insecticides à base de pyrèthre.

Grâce à l'expérience des précédentes guerres, l'armée américaine crée dès 1940 un nouveau service de médecine pour lutter contre le paludisme. En parallèle, elle met en place la Direction de lutte contre les insectes et les rongeurs. C'est le début l'application aérienne de pesticide et de l'utilisation d'insecticides comme le DDT, abondamment employé par les militaires pour éliminer les vecteurs du paludisme et du typhus exanthématique (Davies *et al*, 2007). Cette efficacité constatée par l'armée permettra son utilisation lors des campagnes d'éradication de l'OMS. L'armée américaine s'approprie aussi l'utilisation de la quinacrine, un produit antipaludique à l'origine découvert par les allemands. Cette préparation permit aux forces alliées de garder l'avantage sur les Japonais (Pagès, 2009).

Malgré cela, on compta en 1942 dans les Philippines jusqu'à 700 hospitalisations de soldats américains par jour, soit l'équivalent d'un bataillon décimé par le paludisme. Outre le paludisme, d'autres maladies transmissibles notamment par le moustique sévissent durant cette période. A Saipan, en 1944, un tiers des troupes américaines déployées ont été infecté par le virus de la dengue (Pagès *et al*, 2010). L'après-guerre mondiale fut une période où le contrôle des épidémies palustres fut plus aisé, jusqu'à l'apparition de la résistance à la chloroquine durant la guerre du Vietnam.

Si de nouvelles molécules prophylactiques ont été créées durant ces trente dernières années, il reste difficile pour les armées en déplacement dans les zones à risques d'appliquer toutes les mesures nécessaires pour limiter les épidémies. Afin de limiter le développement de résistances en utilisant inutilement les produits prophylactiques dans des zones où les moustiques sont non infectés, un kit appelé VecTest® est utilisé par l'armée américaine pour déterminer la présence ou non du parasite pathogène chez le moustique (Debboun *et al*, 2006). Ce test détecte en 15 minutes les protéines présentes sur le virus à l'aide d'anticorps spécifiques. Cependant, ces précautions restent insuffisantes. Aujourd'hui, les troupes américaines interviennent dans plus de 130 pays comprenant de nombreuses régions où les vecteurs de maladies sont répandus (Kitchen *et al*, 2009), la majorité des forces françaises est déployée en Afrique et dans les régions d'outre-mer (DeParis *et al*,

2001) (**Figure 8**). En absence de traitements prophylactiques efficaces pour l'ensemble des maladies transmissibles, l'amélioration constante des stratégies de LAV reste la seule défense pour les troupes armées autant que pour les civils.



**Figure 8 :** Comparaison de la carte de répartition du paludisme (A) (CDC, 2014) et de la carte des interventions des forces armées françaises depuis la Seconde Guerre Mondiale (B) (complétée d'après Pages *et al*, 2009). Triangle rouge : opérations militaires depuis 2014 ; rond vert : position des forces armées françaises ; étoile orange : conflits post-seconde guerre mondiale

Cette LAV s'appuie sur des recherches multidisciplinaires impliquant les sciences biologiques, chimiques, épidémiologiques, biomathématiques ainsi que les sciences humaines, économiques et politiques. Ainsi, il est tout aussi important de savoir correctement identifier les vecteurs compétents d'une pathologie que de trouver un moyen de se prémunir de leurs piqûres. Le choix de la stratégie employée par l'armée autant que par les organismes humanitaires doit donc s'appuyer sur l'ensemble des connaissances disponibles, ceci afin de répondre à la problématique de deux grands axes de la LAV. D'une part, il faut permettre une réduction des populations d'insectes vecteurs, ceci de façon physique (destruction des gîtes larvaires), biologique (introduction de prédateurs dans le milieu), chimique (utilisation d'insecticides) ou génétique (conception de mâles stériles) (Bonizzoni *et al*, 2013). D'autre part, il est nécessaire d'envisager des méthodes de protection personnelle grâce à l'utilisation de produits répulsifs à application cutanée ou de textiles traités avec des insecticides.

## 2. Lutte mécanique

La lutte mécanique consiste à limiter la population de moustique par des moyens plus ou moins techniques, le plus simple étant d'éliminer les gîtes larvaires en drainant les marais et en limitant les points d'eau stagnante comme les soucoupes des pots de fleurs. Mais il

existe aussi des études plus ou moins abouties d'installation de pièges à moustiques fonctionnant CO<sub>2</sub>, à l'électricité et à l'énergie solaire.

### 2.1. Gîtes larvaires

Agir sur le stade larvaire du moustique est particulièrement intéressant puisque contrairement au stade adulte, la larve est dépendante de son environnement. En effet, la larve a une vie aquatique, généralement dans des eaux stagnantes. Il devient alors essentiel de pouvoir limiter ou détruire les sites de pontes dans lesquels les larves pourraient se développer.

Dans ce cadre, il est souvent préconisé en milieu urbain de supprimer tout ce qui pourrait servir de réservoir potentiel d'eau stagnante. Les autorités sanitaires vont ainsi recommander de limiter les pots de fleurs ou les vases, de nettoyer régulièrement les gouttières, de fermer correctement les poubelles ou encore de remplir les fosses de gravier (**Figure 9**). De même, il est nécessaire de respecter les normes d'hygiène et de gestion des déchets (OMS, 2014). Pour les récipients ne pouvant être vidés (comme les collecteurs d'eau de pluie), ou les lieux ne pouvant être bouchés (puits...), il est possible de recouvrir d'une moustiquaire ou encore de laisser une fine couche d'huile à la surface, ce qui empêche les larves et les nymphes de respirer.



**Figure 9 :** Exemple de gestes simples préconisés par les autorités locales pour limiter les gîtes larvaires de moustiques (Métropole de Lyon).

Dans certains cas, les autorités sanitaires peuvent compléter ces mesures par la mise en place de pièges larvaires. Ces points d'eau mis bien en évidence permettent de contrôler les sites de pontes de femelles. Lorsque les larves éclosent, l'eau est filtrée, ce qui permet de tuer les moustiques avant qu'ils n'arrivent au stade imaginal.

Au sein des zones périurbaines et agricoles, ce genre de pratiques ne pouvant être appliqué, les autorités sanitaires préconisent des modifications permanentes de l'environnement impliquant l'étude des points d'eau, des sols, mais aussi de la végétation avoisinantes. L'assèchement des marais est souvent la technique la plus utilisée, bien qu'elle implique généralement la perturbation, voire l'anéantissement de tout un écosystème aquatique.

Au contraire, les aménagements agricoles peuvent créer de nouveaux sites de ponte pour les moustiques dans des régions où ceux-ci étaient très limités. C'est le cas de l'importation de la riziculture dans de nombreux pays d'Afrique qui a permis aux vecteurs du paludisme comme *An. gambiae* de proliférer, accentuant de ce fait les cas d'épidémies (Doannio *et al*, 2006). D'autres aménagements tels que la création de lacs artificiels ou de barrages peuvent aussi être à l'origine de l'apparition ou de l'augmentation brutale de populations de moustiques. Tout ceci démontre qu'il est nécessaire d'étudier les effets à court et long terme de l'activité humaine pour limiter la propagation de vecteurs de maladies.

## 2.2. Pièges à moustiques

S'il peut paraître relativement aisé de limiter les populations de larves de moustiques en réduisant les sites de ponte, il devient plus difficile de réguler les populations imaginaires du fait de leur milieu de vie aérien. Les espèces de moustiques ayant des comportements distincts, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, il devient alors nécessaire de connaître leur préférence (endophile ou exophile...), afin de pouvoir adapter les moyens de lutte mécanique.

Aujourd'hui, il existe de nombreux types de pièges pour moustiques adultes. Malheureusement, ceux-ci ne sont pas forcément adaptés à toutes les populations de moustiques se trouvant dans une région. Les pièges électrifiés sont très souvent composés d'une grille électrifiée et d'une lampe émettant des ultra-violets permettant d'attirer les moustiques. Malheureusement, ces pièges ont tendance à attirer toutes sortes d'insectes et ne sont pas efficaces contre les moustiques diurnes (*Aedes*). Les dispositifs sonores sont quant à eux considérés comme totalement inefficaces pour repousser les moustiques (Revay *et al*, 2013).

D'autres pièges à moustiques imitent le comportement humain, notamment en produisant des courants d'air chaud ou en émettant des stimuli olfactifs similaires à ceux produits par la peau. Ceci permet d'attirer les moustiques avant de les aspirer pour les dessécher. Cependant, certaines études tendent à démontrer qu'il n'existe aucune variation de l'activité des moustiques à proximité de tels pièges par rapport à de simples pièges lumineux (Henderson *et al*, 2006). Selon certaines études, une forte concentration en CO<sub>2</sub> peut même avoir un effet inverse à celui désiré, puisqu'elle attirerait les moustiques dans des proportions trop importantes pour qu'ils puissent être tous capturés, augmentant de ce fait le risque de piqûre. (Revay *et al*, 2013).

Récemment, Eric Johanson et Nathan Myhrvold ont développé un prototype de clôture photonique se basant sur le principe d'un laser non létal détectant les moustiques avant d'enclencher le laser létal (Intellectual Ventures Lab, 2015). Selon ces deux chercheurs, les risques pour les autres espèces sont minimes puisqu'il suffit de programmer le logiciel pour l'adapter aux cibles désirées. Cependant, il s'agit d'un prototype que certains experts pensent trop coûteux, notamment pour une installation dans les zones où il n'existe aucun réseau d'alimentation électrique.

### 3. Lutte biologique

La lutte biologique est l'un des moyens de lutte alternative couramment envisagés pour limiter l'emploi de produits chimiques. Plus respectueuses de l'environnement, elle vise à restreindre ou détruire les populations larvaires ou imaginaires en utilisant des organismes vivants, comme des prédateurs ou des micro-organismes pathogènes pour le moustique vecteur de maladie.

#### 3.1. Prédateurs naturels

Dans le cadre de la LAV, l'utilisation de prédateurs naturels est plutôt récurrente, notamment pour limiter les populations de larves de moustiques. Les poissons larvivores font partie des premiers prédateurs à avoir été introduit dans les milieux aquatiques servant de sites de ponte et sont toujours largement utilisés, notamment en Inde. Le plus représentatif est *Gambusia affinis*, connu aussi sous le nom de faux-guppy. Très efficace contre les moustiques, notamment du genre *Culex*, ce petit poisson survit dans de nombreuses conditions de salinité, d'oxygénation et de turbidité (Ghosh et Dash, 2007). De plus, des études récentes montrent que sa simple présence dans un étang peut dissuader les femelles moustiques à pondre, diminuant de ce fait les populations locales de moustiques (Chobu *et al*, 2015). Malheureusement, c'est une espèce compétitive, il aura tendance à faire

disparaître les autres poissons ainsi que les batraciens, donc potentiellement, les autres prédateurs larvivores. *Poecilia reticulata* ou guppy, est la seconde espèce de poisson la plus utilisée en lutte biologique contre les moustiques. Supportant davantage les eaux polluées que le faux-guppy, il reste néanmoins tout aussi vorace pour la faune locale (Ghosh et Dash, 2007).

Certains arthropodes sont aussi des prédateurs de larves de moustiques, comme les copépodes qui sont de petits crustacés parasites. Ainsi, il a été observé au Vietnam que l'utilisation de copépodes dans les grands réservoirs d'eau permettait d'éliminer les larves d'*Aedes* et *Anopheles* (Kay and Vu, 2005). La présence de Notonectes, qui sont de petites punaises aquatiques prédatrices, peut aussi dissuader les femelles moustiques de pondre dans le même bassin. Enfin, certaines larves de moustiques non hématophages, comme *Toxorhynchites sp*, sont larvivores et mangent les larves des autres espèces, notamment d'*Ae. aegypti* (Bonizzoni *et al*, 2013). Ce type de prédateurs est cependant difficile à utiliser en LAV, car il est sujet à la prédation, au cannibalisme et à certaines exigences d'habitat.

Concernant les prédateurs des moustiques adultes, les plus connus restent les chiroptères insectivores. Ainsi dans certaines villes françaises, des nichoirs pour chauve-souris ont été installés afin d'attirer de nouvelles populations qui favorisent la démoustication naturelle. C'est le cas de la municipalité de Saint-Tropez qui propose aux particuliers la vente de nichoirs pour augmenter les populations de chauve-souris (Mairie de Saint-Tropez, 2015). Parmi les prédateurs aériens, on retrouve aussi de nombreux oiseaux comme les hirondelles ou les martinets.

Que ce soit pour la lutte biologique contre les adultes ou contre les larves, ces moyens restent le plus souvent insuffisants seuls et sont généralement employés avec d'autres moyens de prophylaxie, notamment la prévention et la communication auprès des populations autochtones.

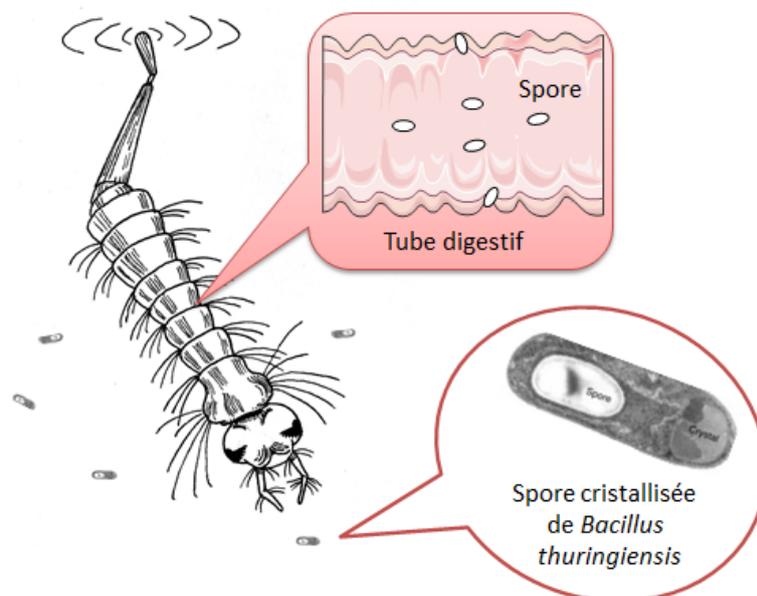
### 3.2. *Micro-organismes pathogènes*

De nos jours, l'utilisation de micro-organismes pathogènes des insectes, et particulièrement des moustiques, est extrêmement surveillée en LAV. Il est en effet important d'employer des micro-organismes qui soient sans dangers pour le reste de la faune ainsi que pour l'être humain. Parmi, ces micro-organismes entomopathogènes, les plus utilisés sont des biolarvicides bactériens ou fongiques.

*Bacillus thuringiensis israeli (Bti)*, sérotype H14, est une bactérie à Gram positif qui, en sporulant, produit une toxine mortelle pour les larves de moustiques, en particulier du genre *Aedes* (**Figure 10**) (Mittal, 2003). N'étant pas dangereuse pour les autres insectes ou

pour les organismes aquatiques, elle est spécifique aux moustiques et aux mouches (Bonizzoni *et al*, 2013). Cette toxine cristallisée n'a pas besoin que la bactérie qui la produit soit vivante pour être efficace. Ces caractéristiques en font ainsi l'un des larvicides les plus utilisés dans le monde, notamment dans les régions où ont été détectées des résistances aux insecticides chez les moustiques vecteurs de maladies.

Son efficacité est cependant limitée par sa faible rémanence en milieu aquatique. En effet, en raison de sa faible flottabilité, le produit aura tendance à couler, quand les larves de moustiques se nourrissent exclusivement en surface. Des études tentent de contourner le problème en intégrant la toxine dans des microcapsules. Yang et ses collaborateurs ont notamment montré en 2012 qu'une microcapsule en polyélectrolyte permet de protéger la toxine de la dégradation, mais aussi de la libérer en fonction du pH du milieu. Le polymère ionique utilisé étant sensible aux pH alcalins, il aura tendance à se désagréger dans l'intestin des larves, permettant une diffusion ciblée de la molécule toxique. Une autre étude plus récente a montré que l'emploi de colorants synthétiques ou naturels pouvait augmenter l'activité de la toxine en diminuant sa dégradation par exposition au soleil (Chandrashekar *et al*, 2015). Cependant, la méconnaissance sur le transfert potentiel de gènes du Bti à d'autres organismes remet en cause son utilisation systématique, notamment dans les eaux potables (Bonizzoni *et al*, 2013).



**Figure 10 :** Mode d'action de la spore de Bti sur la larve de moustique. La spore cristallisée est dispersée dans les gîtes larvaires et absorbée par la larve. Dans le tube digestif, la toxine contenue dans la spore est libérée, attaquant la paroi digestive et créant des perforations fatales dans la muqueuse.

*Bacillus sphaericus* est une autre bactérie utilisée comme biolarvicide en lutte anti-vectorielle. Produisant elle aussi des toxines lorsqu'elle sporule, elle est principalement utilisée contre les moustiques du genre *Culex*, notamment dans les eaux usagées (Mittal, 2003).

Issue de la bactérie *Saccharopolyspora spinosa*, le spinosad a été proposé comme substituts aux insecticides larvicides synthétiques tels que le téméphos (Kirst, 2010). Composés d'un mélange de deux toxines, les spinosynes A et D, le spinosad agit à la fois sur les récepteurs GABA et nicotiniques des insectes, provoquant des contractions musculaires involontaires et une paralysie aboutissant à la mort. Ce larvicide a démontré son efficacité sur les souches d'*An. gambiae*, d'*Ae. aegypti* et de *Cx. quinquefasciatus* sensibles et résistantes aux organophosphorés et carbamates (Darriet *et al*, 2005). S'il est peu toxique pour les mammifères et la faune aquatique, il est cependant très toxiques pour les insectes non cibles et notamment les abeilles.

Parmi les micro-organismes employés comme biolarvicides, on retrouve les oomycètes, et notamment *Lagenidium giganteum* qui est un parasite facultatif des stades larvaires du moustique. Sous sa forme sporulée mobile, il est capable de détecter un hôte potentiel et de s'y fixer avant de se ramifier dans l'ensemble du corps de l'hôte. Si cet oomycète est efficace contre les larves de moustique, il est néanmoins extrêmement sensible à la température, ne se développant qu'entre 16 et 32 °C, ainsi qu'aux résidus de pesticides que l'on peut retrouver dans l'eau (Kerwin, 2007). De même, l'utilisation du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* dans les pots servant de gîtes larvaires permet de considérablement réduire la durée de vie des moustiques *An. gambiae* et *An. funestus* (Farenhorst *et al*, 2008).

#### 4. Lutte génétique

Plus récente que la lutte mécanique ou la lutte biologique, la lutte génétique s'appuie sur la connaissance du patrimoine génétique du moustique afin d'en modifier une séquence. Ces manipulations ont pour but de limiter les populations de *Culicidae* par l'introduction de moustiques stériles ou porteurs de gènes létaux pour les générations suivantes. Pour la plupart à l'état d'études expérimentales, elles représentent néanmoins un ensemble de méthodes alternatives et prometteuses de contrôle des populations de moustiques, notamment dans le contexte actuel de prise de conscience environnementale.

#### 4.1. Mâles stériles

La technique de l'insecte stérile est utilisée depuis les années 1970 dans la lutte contre les insectes ravageurs de culture (Alphey *et al*, 2010). Dans le cadre de la LAV, le principe est d'élever en laboratoire des moustiques mâles qui contrairement aux femelles, ne piquent pas et donc ne risquent pas d'accroître l'expansion des épidémies. Ils sont stérilisés par exposition aux rayonnements ionisants puis relâchés en grand nombre dans la zone d'intérêt afin d'entrer en compétition avec la population locale (Nolan *et al*, 2011). La femelle ne s'accouplant généralement qu'une seule fois, on obtient ainsi de fortes probabilités de voir un effondrement du nombre d'individus la génération suivante. Le lâcher régulier de ces mâles stériles peut à terme entraîner la disparition de l'espèce vectrice. En Italie par exemple, le lâchés de mâles stériles a permis une suppression locale d'*Ae. albopictus* (Bonizzoni *et al*, 2013).

L'exposition aux rayonnements ionisants pouvant néanmoins affaiblir le mâle et le rendre moins attractif pour la femelle, les chercheurs ont essayé de déterminer les critères de sélection du partenaire idéal afin de modifier le patrimoine génétique du mâle stérile. Ainsi pour *An. gambiae*, sait-on qu'il est préférable d'obtenir des mâles de taille moyenne, six fois plus attractifs pour les femelles que des mâles de grande taille (Ng'habi *et al*, 2008). Ne présentant aucun danger pour l'environnement, la technique du mâle stérile est particulièrement efficace dans les régions sujettes aux épidémies dues à une espèce vectrice principale.

#### 4.2. Gènes létaux

Avec l'amélioration des connaissances sur les principes de la génétique et la possibilité de modifier le patrimoine génétique des insectes, des études prometteuses en LAV ont commencé à émerger. Ainsi, de la technique de l'insecte stérile découlent notamment les manipulations génétiques impliquant des gènes létaux pour la descendance des moustiques. Ces gènes entraînent la mort prématurée des larves (Nolan *et al*, 2011).

Depuis quelques années, Coast et son équipe (2005) étudient la manipulation hormonale chez les femelles *An. gambiae*. En effet, lorsque la femelle fait son repas de sang, elle double de volume, ce qui entraîne une gêne pour le décollage. Elle expulse donc l'eau inutile grâce à une hormone diurétique. La manipulation de cette hormone pourrait entraîner un dérèglement de l'exsudation et donc une déshydratation fatale pour le moustique.

La manipulation de l'expression d'un gène d'endonucléase intervenant dans le développement des œufs fécondés pourrait être aussi un choix intéressant dans l'utilisation de gènes létaux (Nolan *et al*, 2011). De même, la dérégulation des gènes pro-apoptotiques chez *Drosophila melanogaster* induit la mort des individus. Or ces gènes sont phylogénétiquement conservés d'une espèce à une autre, il est donc possible de les envisager en LAV (Nolan *et al*, 2011).

#### 4.3. Immunisation du moustique

Outre les stratégies de lutte génétique visant à exterminer les populations d'espèces vectrices, des études sont menées sur l'immunisation des moustiques contre les agents pathogènes responsables des maladies à transmission vectorielle. Ainsi, depuis quelques années, l'équipe de Scott O'Neill travaille sur la création de moustiques résistant au virus de la dengue (Hoffmann *et al*, 2011). Pour se faire, ils ont infecté des moustiques avec *Wolbachia pipientis*, une bactérie naturellement pathogène pour de nombreuses espèces d'arthropodes dont *Ae. albopictus* (Bonizzoni *et al*, 2013). Selon les souches bactériennes, elles peuvent réduire l'espérance de vie des moustiques, mais aussi se transmettre de génération en génération *via* les oocytes infectés de la femelle (Hoffmann *et al*, 2011). Une autre souche de *Wolbachia*, moins virulente pour le moustique, induit une résistance encore inexplicquée au virus de la dengue. Si les essais sur le terrain dans deux villes d'Australie sont concluants, il s'avère néanmoins que cette méthode encore expérimentale n'a pas démontré son efficacité sur le long terme. Ainsi, de nouvelles études sont notamment envisagées en Chine, au Vietnam, en Indonésie et au Brésil (Bonizzoni *et al*, 2013).

D'autres études portant sur l'immunisation des moustiques s'appliquent à déterminer et favoriser les gènes du système immunitaire de l'insecte empêchant le développement du parasite au sein de son hôte. Des chercheurs ont notamment découvert chez *An. gambiae* deux lectines type-C (CTL) qui favorisent le développement de *Plasmodium* dans l'intestin (Osta *et al*, 2004). L'inhibition expérimentale de ces CTL rend les moustiques moins sensibles au parasite, malheureusement les variabilités génétiques des parasites comme des espèces vectrices rendent ces résultats difficiles à obtenir sur le terrain.

### 5. Lutte chimique

A ce jour, la lutte chimique ou biocide en LAV reste largement employée à travers le monde, malgré les questionnements sur l'impact environnemental. Pouvant être utilisés à tous les stades de développement, les insecticides font partie de diverses familles chimiques (organophosphorés, pyrétrinoïdes...) avec des modes d'action distincts. Le choix de

l'insecticide dépend du contexte épidémiologique et de l'écologie des espèces vectrices présentes sur le terrain. Ainsi pour certaines espèces, il est préférable d'utiliser un produit larvicide, tandis que pour d'autres espèces, la lutte chimique sera plus efficace contre les adultes.

Particulièrement efficaces, les insecticides sont néanmoins de plus en plus souvent utilisés en association ou en alternance avec d'autres moyens de prophylaxie afin de limiter les impacts négatifs sur l'environnement, mais aussi le développement de résistances chez les moustiques (Anses, 2013).

### 5.1. Lutte larvicide

Comme son nom l'indique, la lutte larvicide vise à éliminer les moustiques au stade larvaire, par l'utilisation de produits chimiques spécifiques. Cependant, contrairement à certains traitements antilarvaires (Bti ou spinosad), les insecticides ne peuvent être utilisés dans les eaux consommées par les populations humaines. Il s'agit donc de traitements employés dans le cas de gîtes permanents, généralement dans les zones agricoles. Ces insecticides sont essentiellement des organophosphorés, le fenthion étant utilisé contre les moustiques *Culex*, le chlorpyrifos étant plus efficace dans les eaux polluées et le téméphos servant généralement contre les larves d'*Anopheles* (Carnevale et Robert, 2009). Ces produits sont faiblement toxiques pour les mammifères et sont disponibles sous formulation de longue durée (Bonizzoni *et al*, 2013).

Plus récemment, pour contourner les problèmes de résistance au téméphos, des études ont envisagé les huiles essentielles de plantes comme des molécules potentiellement larvicides. Dias et Moraes (2014) ont ainsi fait un travail de compulsion de la littérature sur le sujet, démontrant que sur 361 huiles essentielles testées, 60% ont un effet larvicide sur *Ae. aegypti* ( $LC_{50} < 100$  mg/L).

### 5.2. Lutte adulticide

La lutte adulticide contre les moustiques a été envisagée dès les premières campagnes mondiales d'éradication des espèces vectrices lors des années 1950. Celles-ci préconisaient notamment l'aspersion intradomiciliaire d'insecticides rémanents durant les épidémies de paludisme, afin de contrôler puis d'envisager la disparition de la maladie à moyen terme. Dans ce cadre, il a été envisagé l'utilisation massive d'un insecticide organochloré, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), déjà abondamment utilisé en agriculture. Selon les régions, les résultats se sont avérés plus ou moins prometteurs.

Néanmoins, des questions environnementales, ainsi que l'apparition de résistances chez les moustiques ont poussé les autorités sanitaires à envisager de nouvelles stratégies de LAV dès 1969 (Davies *et al*, 2007).

Depuis, de nouveaux insecticides ont été utilisés en aspersions intradomiciliaires, notamment les organophosphorés, tel le malathion, les carbamates, comme le propoxur, ou encore les pyréthrinoïdes, telle que la deltaméthrine, qui restent à ce jour les insecticides les plus utilisés en LAV. Ainsi en Thaïlande, la deltaméthrine est couramment utilisée depuis 1994 pour limiter les épidémies de dengue (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Les pyréthrinoïdes sont par ailleurs particulièrement appréciés en LAV pour leur effet rapide et leur faible toxicité sur les mammifères (Bonizzoni *et al*, 2013). Malheureusement, pour la plupart de ces insecticides, une utilisation incontrôlée notamment en agriculture, a entraîné le développement de résistances chez les moustiques ciblés. C'est pour cette raison que l'emploi d'aspersions intradomiciliaires demeure limité aux zones où la maladie reste instable. (Carnevale et Robert, 2009)

Dans les régions où les espèces vectrices sont plus exophiles, les autorités sanitaires préconisent les pulvérisations spatiales lors des phases épidémiques. S'agissant d'une dispersion d'insecticides en milieu extérieur, la formulation du produit employé est différente de celle pour l'aspersion intradomiciliaire. Ainsi, seuls les pyréthrinoïdes sont recommandés par l'OMS, généralement en association avec une substance chimique synergique, comme le piperonyl butoxide (PBO), un inhibiteur d'oxydases qui dégradent les molécules insecticides. Dans le cas de régions où un fort taux de résistance aux pyréthrinoïdes a été constaté, comme en Guyane, une dérogation exceptionnelle permet l'utilisation du malathion (organophosphorés) (Institut Pasteur, 2014). Les forces militaires utilisent aussi la pulvérisation spatiale péri-domiciliaire d'organophosphorés et de pyréthrinoïdes lors de recrudescence des épisodes palustres. Malheureusement, ceci n'ayant d'effet que sur le stade adulte des moustiques, la méthode reste forte coûteuse car doit être réutilisée régulièrement (DeParis *et al*, 2001).

### 5.3. Protection personnelle

La protection personnelle est une mesure de protection contre les piqûres applicables au niveau individuel. A cette fin, différents types de protection peuvent être utilisés selon le contexte et la préférence des individus. Dans le cas des soldats partant sur le terrain, il s'agit généralement du seul moyen de protection contre les moustiques (Pagès, 2009). Au sein du domicile, il est possible d'utiliser des insecticides d'appoint en aérosols, ou encore des répulsifs qui repoussent les moustiques en perturbant leurs perceptions olfactives. Ces

répulsifs, composés de produits chimiques, mais aussi de produits d'origine naturelle comme les huiles essentielles de citronnelle ou de géraniole, peuvent se décliner sous la forme de serpentins fumigènes, de diffuseurs électriques ou de bougies. Leur efficacité diffère selon le type de substance active contenue, les produits chimiques s'avérant généralement plus efficaces que les produits naturels, mais sur de petits périmètres, inférieurs à 5 mètres (Revay *et al*, 2013).

Dans les zones à risque épidémiologique, les gens de passage utilisent le plus souvent des répulsifs cutanés. Connus sous le nom de Cinq sur cinq® ou d'Insecte Ecran®, ces produits commerciaux sont constitués de molécules actives telles que le DEET ou l'IR3535. Ils se déclinent sous forme de bracelets diffuseurs, cependant leur efficacité étant contestée, les autorités sanitaires recommandent de ne pas les utiliser (sante.gouv.fr, 2014). Ces répulsifs s'appliquent aussi sous forme de lotions et de crèmes (Fradin and Day, 2002). Utilisés aussi bien par les touristes que les troupes armées, leur efficacité dépend notamment de l'activité de la personne. Ainsi un même produit contenant 50% de DEET pourra être efficace durant 4 heures sur une personne sédentaire, mais seulement 2 heures sur un combattant en plein effort physique (DeParis *et al*, 2001). L'intérêt de ces molécules est plus largement développé Chapitre III.

Certaines études montrent que le simple fait de porter des vêtements protégeant les zones de préférence des moustiques, comme les chevilles et les jambes, permet de réduire le risque de piqûres de plus de 58% (Braack *et al*, 2015). Si le port de vêtements couvrants ou l'utilisation de moustiquaires a toujours constitué une protection physique naturellement employée par les populations autochtones, ce moyen de lutte a notamment été renforcé par les forces militaires avec l'imprégnation d'insecticides de la famille des pyréthrinoïdes. Ainsi, on estime qu'un vêtement imprégné d'insecticide permet de prévenir une infection au paludisme de 75 % (Lundwall *et al*, 2005). Résistantes, ces combinaisons traitées à leur fabrication peuvent être ré-imprégnées par les soldats tous les quatre mois avec une pulvérisation de deltaméthrine (DeParis *et al*, 2001). De même en 2009, la combinaison de l'utilisation d'un répulsif cutané et du port d'un uniforme imprégné de perméthrine est recommandée par le département de la défense américaine, car il permet une protection contre les piqûres d'insectes de 99,9% durant une période de 9 heures (Banks *et al*, 2014).

De nos jours, les moustiquaires imprégnées d'insecticides constituent un outil majeur dans la lutte contre certaines maladies infectieuses, notamment en Afrique subsaharienne ou en Asie, que ce soit pour les troupes militaires ou les populations autochtones (Greenwood *et al*, 2005). En Afrique, ces moustiquaires ont permis de réduire significativement la mortalité infantile de 15 à 63% au Burkina Faso et en Gambie (Lengeler *et al*, 1997). De même, on estime que l'utilisation de la moustiquaire par 80% d'une

population permet de protéger l'ensemble de la communauté contre la transmission des maladies vectorielles (Lundwall *et al*, 2005). L'utilisation de la moustiquaire imprégnée a fortement augmenté en Afrique subsaharienne en moins de dix ans, passant de 4% à 49% de la population à risque entre 2004 et 2013 (World Malaria Report, 2014). Cette augmentation s'explique notamment grâce à l'amélioration du textile utilisé. Initialement composées de coton et imprégnées de perméthrine, elles ont une durée d'efficacité inférieure à 4 mois (Pagès, 2009). Cependant, grâce aux études récentes, des moustiquaires synthétiques à imprégnation permanente, simple d'utilisation pour les populations locales, gardent désormais leur efficacité jusqu'à 25 lavages, soit 5 ans, ce qui réduit les coûts et leur entretien quotidien (Katz *et al*, 2008).

Comme pour tous les autres textiles, les moustiquaires ne peuvent être imprégnées que par des insecticides de type pyréthriinoïdes, leur conférant différents avantages. Elles peuvent avoir un effet répulsif qui maintiendra les moustiques à l'extérieur ou un effet excito-répulsif qui aura un effet sur plus courte distance. Elles peuvent aussi entraîner un effet knock-down, ainsi les moustiques entrant en contact avec la moustiquaire imprégnée seront assommés, ce qui permettra notamment à leurs prédateurs comme les fourmis de les attraper (Deparis *et al*, 2001). Enfin, elles peuvent avoir un effet létal et tuer l'insecte sous 24 heures (Carnevale et Robert, 2009). Le type d'insecticide pyréthriinoïde utilisé dépend essentiellement du coût de production et des résistances déjà développées par les populations de moustiques.

## Chapitre III – Répulsifs

---

### 1. Généralités

Par principe, un répulsif est une substance d'origine synthétique ou naturelle très volatile capable de repousser tout animal nuisible ou nuisant pour l'homme. Contrairement aux insecticides, les répulsifs insectifuges ne sont normalement pas létaux pour les insectes. Néanmoins, à l'égard de certains insecticides pouvant être répulsifs à de faibles concentrations (pyréthrinoides), les répulsifs peuvent être toxiques pour les insectes à plus forte concentration (voir Chapitre II-4-c). Considérés comme non toxiques pour l'homme, ils sont généralement utilisés en applications cutanées, bien qu'ils puissent aussi être diffusés avec des bougies ou des fumigènes (Katz *et al*, 2008).

C'est en LAV plus particulièrement que les répulsifs insectifuges ont été évalués pour protéger les populations des vecteurs de maladies. Dès le début du XX<sup>e</sup> siècle, la volonté des autorités militaires fut de protéger les soldats partis en mission dans des zones à risques (Paluch *et al*, 2010). Ceci a ainsi contribué à l'essor de nouveaux produits insectifuges de synthèse, tel que le DEET en 1946, l'IR3535 en 1969 ou encore le KBR3023 (picaridine) dans les années 1990 (Semmler *et al*, 2014). En parallèle, les chercheurs continuent d'exploiter le potentiel de substances naturelles issues de plantes, comme les huiles essentielles de citronnelle ou de géranio.

#### 1.1. Caractéristiques

Pour être considérée comme un bon répulsif, une substance insectifuge doit posséder des propriétés excito-répulsives efficaces contre les insectes ciblés. Pour cela, il doit être non toxique pour l'homme et avoir une durée d'action suffisamment importante. La durée d'efficacité varie selon plusieurs facteurs incluant la concentration du produit, le volume d'application, l'exposition au soleil, à la température, à l'humidité... De même, les répulsifs sont des composés volatils et certains s'évaporent plus rapidement que d'autres, ce qui réduit la durée d'efficacité. Le DEET appliqué seul sur un tissu s'évapore plus vite que la picaridine (Klun *et al*, 2006). Ainsi, il est estimé qu'un répulsif est plus efficace lorsqu'il possède un point d'ébullition compris entre 110 °C et 127 °C. Selon le type d'applications et l'utilisation, le répulsif sera donc plus ou moins efficace.

Dans les régions où les moustiques sont considérés comme des insectes nuisant au bien-être de la population, comme en France métropolitaine, les produits insectifuges servent essentiellement à éviter les gênes occasionnées par les piqûres, comme la sensation d'inflammation ou le gonflement cutané.

Dans les zones à risques où les espèces vectrices sont présentes, les enjeux sont tout autres. Utilisés en association avec d'autres moyens de protection comme la moustiquaire imprégnée ou les traitements insecticides ciblés, les répulsifs permettent notamment de contourner les problèmes de résistance des moustiques aux insecticides rencontrés depuis une vingtaine d'années.

Outre son efficacité reconnue, le répulsif en application cutanée doit répondre à plusieurs critères primordiaux, comme une texture agréable, non grasse, non odorante et surtout non irritante pour les muqueuses (Katz *et al*, 2008). Il est aussi important que le produit ne puisse pas dégrader les matériaux, comme les textiles des vêtements couvrants ou le plastique des montres ou des lunettes. Ainsi par exemple, si le DEET est l'une des substances actives les plus efficaces pour repousser les moustiques, il a été démontré qu'elle pouvait avoir certains inconvénients comme dégrader le plastique (Fradin and Day, 2002).

Jusqu'à très récemment classé dans la catégorie des produits cosmétiques, les répulsifs font de plus en plus souvent l'objet d'études approfondies pour déterminer leurs mécanismes d'action cellulaires et moléculaires. Suivant une nouvelle réglementation européenne sur l'usage des produits biocides, les répulsifs, qu'ils soient chimiques ou d'origine naturelle, doivent désormais répondre aux normes de sécurité et de toxicologie des autorités sanitaires (Lundwall *et al*, 2005).

## 1.2. Répulsifs naturels

Les répulsifs d'origine naturelle sont utilisés depuis des siècles à travers le monde. Dès l'Antiquité, des écrits d'historiens rapportent l'emploi d'huile végétale pour chasser les moustiques (Paluch *et al*, 2010). Aujourd'hui encore en Afrique, il est courant de planter de la citronnelle devant les maisons, car les croyances veulent que son odeur repousse les moustiques. En Inde et en Afrique, on fait brûler de l'huile de graine de jatropha pour repousser les insectes. Dans de nombreux pays, ils font partie des bases de la médecine traditionnelle, privilégiée par les populations locales pour son aspect culturel et son faible coût (Rehman *et al*, 2014).

Biodégradables, respectueuses de l'environnement, peu toxiques pour les mammifères, les huiles essentielles font partie des produits d'origine naturelle les plus employés en LAV (Deletre *et al*, 2013). Les essences de citronnelle, d'eucalyptus ou encore de géranium sont autant d'huiles essentielles que l'on retrouve dans la composition de produits répulsifs cutanés (Rehman *et al*, 2014). L'huile de citronnelle en particulier est considérée depuis le début du XXe siècle comme le standard naturel des répulsifs anti-

moustiques, bien qu'ayant une efficacité de répulsion inférieure à 30 minutes (Paluch *et al*, 2010).

Le citriodiol ou p-menthane-3,8-diol ou encore PMD se trouve en petite quantité dans l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Eucalyptus citriodora*. Cet arbre originaire d'Australie, est maintenant cultivé dans de nombreuses régions chaudes du monde entier. L'huile essentielle raffinée qui contient environ 64% de PMD (un mélange de cis et trans isomères du p-menthane-3,8-diol) et a été notifiée comme produit biocide dans l'UE (règlement n°528/2012) sous le nom commercial de Citriodiol® (PMDRBO). Utilisée en pulvérisation à une concentration de 40%, elle serait aussi efficace que le produit de synthèse DEET à 10%, soit une protection durant 4 à 7 heures sur les moustiques les plus agressifs (Katz *et al*, 2008). Cependant, elle reste inefficace contre certains arthropodes, comme la tique, et ne doit pas être utilisée chez les enfants de moins de 3 ans.

Récemment, il a été montré que ces huiles essentielles possèdent des propriétés distinctes suivant la concentration en substances actives. Par exemple l'huile essentielle de thym a des effets irritants, répulsifs puis toxiques selon la concentration testée (0.01% à 1 %). Au contraire, l'essence d'aneth est répulsive puis irritante pour les moustiques, mais ne montre aucune propriété toxique (Deletre *et al*, 2013). L'étude approfondie des différents effets de ces huiles essentielles permet de les envisager comme alternative aux produits chimiques.

Bien qu'ayant démontré leur intérêt pour repousser les moustiques, les huiles essentielles restent moins efficaces et surtout moins rémanentes que les substances de synthèse. Ainsi, il a été montré que les concentrations d'huile essentielle de lavande et de géraniol (généralement inférieur à 1%), utilisées dans la formulation de répulsifs cutanés, n'étaient pas suffisantes pour induire un effet répulsif durable (Semmler *et al*, 2014). De plus, la durée de répulsion peut être différente d'une espèce vectrice à une autre, s'avérant généralement moins efficace pour les moustiques les plus agressifs, comme *Ae. aegypti* (Semmler *et al*, 2014).

Cette faible rémanence s'explique notamment par l'importante volatilité de leurs résidus qui, sans adjuvant, réduit leur durée d'action. Les formulations contenant de 5 à 12% de citronnelle ont ainsi une efficacité inférieure à 20 minutes (Fradin and Day, 2002 ; Katz *et al*, 2008). Néanmoins, les études de formulation ont montré un effet synergique des huiles essentielles avec la vanilline, augmentant ainsi la durée de l'effet répulsif de près de 8 heures (Deletre *et al*, 2013 ; Rehman *et al*, 2014). Cependant, la composition des huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de molécules actives, rend difficile leur application sur les textiles, et notamment les moustiquaires imprégnées.

Les huiles essentielles sont donc majoritairement utilisées dans la composition de produits à application cutanée. Néanmoins, leur emploi n'est pas sans risque pour l'homme puisque certains composants peuvent avoir des effets secondaires, comme une irritation de la peau, une photosensibilisation ou encore des risques d'allergie (Rehman *et al*, 2014 ; Semmler *et al*, 2014). C'est notamment pourquoi il est fortement déconseillé d'utiliser certaines huiles essentielles non homologuées par les autorités sanitaires.

### 1.3. Répulsifs chimiques

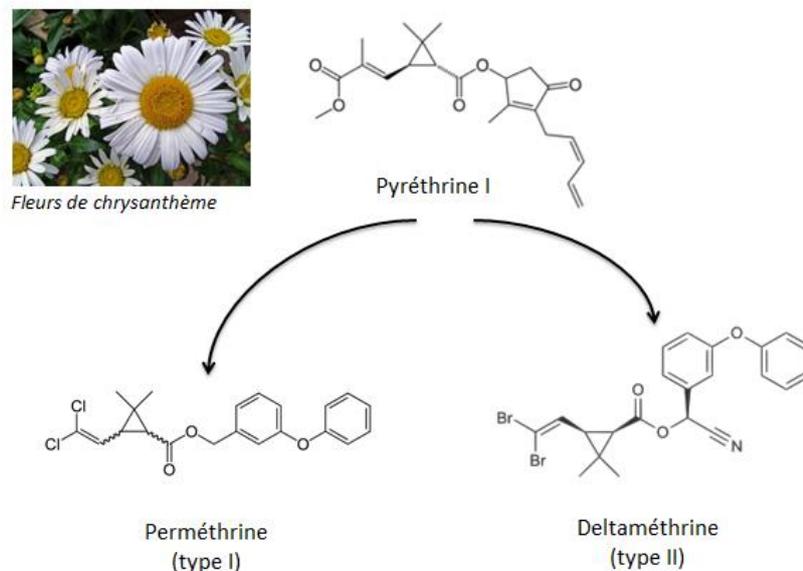
Jusqu'au début du XXe siècle, seules les substances issues de plantes étaient envisagées pour leur pouvoir répulsif, parfois insuffisant lors des épidémies. C'est dans l'optique d'améliorer l'efficacité de répulsion de ces produits naturels qu'ont été développées les substances de synthèse (Semmler *et al*, 2014). Parmi elles, on retrouve les molécules dérivées des principes actifs de plantes, comme la pyréthrine, ou des molécules issues d'expérimentations préalables sur des composés chimiques simples, comme le DEET.

#### 1.3.1. Pyréthrine et ses dérivés

La pyréthrine, dérivée de fleur de chrysanthème, est à l'origine de la famille chimique des pyréthrinoïdes. Utilisée principalement pour ses propriétés répulsives, elle imprègne les textiles pour des concentrations inférieures à 4%. Des études ont montré que cette substance ne présentait pas d'effet toxique, génotoxique ou mutagène pour le mammifère (Singh *et al*, 2012).

A partir de la pyréthrine ont été créés les pyréthrinoïdes de synthèse, produits chimiques ayant des propriétés irritantes à faibles concentrations, mais aussi des propriétés insecticides, plus amplement expliquées chapitre IV (**Figure 11**). De nombreuses études ont montré que la perméthrine présentait un fort taux de protection contre les piqûres de vecteurs de maladies, comme la tique (97%) ou les mites (74%) (Banks *et al*, 2014). Ce pyréthrinoïde permet aussi de se protéger des piqûres de moustiques, notamment d'*Ae. albopictus* (100 %) (Schreck et McGovern, 1989). Possédant une efficacité comparable à la molécule d'origine, les pyréthrinoïdes, notamment la perméthrine, sont utilisés en imprégnation sur des vêtements et des moustiquaires. Leur efficacité sur les moustiquaires imprégnées a notamment permis de réduire la mortalité induite par le paludisme de 75% (Lundwall *et al*, 2005). Ce sont des produits particulièrement intéressants qui agissent par irritation (avec contact), plutôt que par répulsion (sans contact), permettant ainsi leur action à la fois répulsive et insecticide. Des études menées sur différentes espèces d'*Anopheles* ont

notamment permis de décrire le phénomène d'excito-répulsion pour la deltaméthrine (Chareonviriyaphap *et al*, 2013).



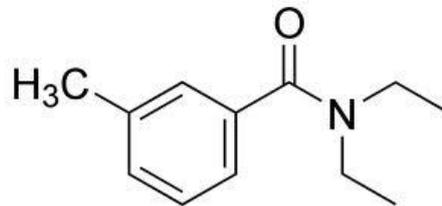
**Figure 11 :** Représentations schématiques de la structure moléculaire de la pyréthrine I issue des fleurs de chrysanthème et de deux de ses dérivés pyréthrinoïdes, la perméthrine et la deltaméthrine.

Ces produits chimiques ne sont pas formulés pour des applications directes sur la peau, car ils ont été classés parmi les produits potentiellement cancérigènes. De plus, comme précédemment expliqués, ils doivent entrer en contact avec l'insecte pour agir, ce qui n'est pas recommandé pour une utilisation cutanée, notamment dans le cadre de LAV (Katz *et al*, 2008). Les tests sur les uniformes militaires imprégnés de perméthrine (0.125 mg/cm<sup>2</sup>) ont néanmoins prouvé l'absence de toxicité ou de risque cancérigène pour ce type d'application, tout en garantissant une protection maximale (Banks *et al*, 2014). S'ils sont efficaces, il reste néanmoins nécessaire de trouver des substances alternatives, notamment à cause des résistances développées par les moustiques (voir Chapitre IV-2).

### 1.3.2. DEET

Utilisé depuis les années 1950, le N,N-diethyl-m-toluamide ou N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET) est un alkylamide aromatique à large spectre d'action repoussant de nombreuses espèces d'insectes nuisant comme les mouches, les tiques et les moustiques (**Figure 12**). Proposé au grand public en application cutanée ou pour imprégner

les vêtements, il est rapidement devenu le répulsif le plus utilisé dans le monde durant ces six dernières décennies (Katz *et al*, 2008). Deux cent millions de personnes utilisent ainsi chaque année une solution à base de DEET et plus de huit milliards d'applications ont été réalisées (Lundwall *et al*, 2005 ; Lapied *et al*, 2010).



**Figure 12 :** Représentation schématique de la structure moléculaire du DEET.

Des études ont ainsi démontré que de faibles concentrations de DEET s'avéraient suffisamment efficaces pour repousser les moustiques durant plusieurs heures. Fradin et Day (2002) ont montré que la formulation à 23% de principe actif permettait une protection maximale durant plus de 300 minutes, ce qui est 15 fois supérieur au produit à base d'huile essentielle de citronnelle à 10%. Une seule application du produit peut protéger jusqu'à 12 heures d'affilée. Sa concentration optimale est estimée à une concentration comprise entre 30 et 50 %, au-delà est observé un effet plateau (Fradin and Day, 2002).

Cependant, ce produit présente de nombreux inconvénients, notamment une faible résistance à l'humidité ou aux fortes températures, ou encore une capacité à dissoudre certains plastiques ou tissus synthétiques (Fradin and Day, 2002 ; Katz *et al*, 2008 ; Paluch *et al*, 2010). De plus, des études récentes suggèrent que le DEET pourrait avoir un effet toxique sur les mammifères. En effet, l'une des cibles moléculaires du DEET est l'acétylcholinestérase, présente chez le moustique comme chez le mammifère. Le DEET inhibe l'activité de l'enzyme et favorise l'accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses (Corbel *et al*, 2009). Par prévention, de nombreuses autorités sanitaires recommandent de limiter le nombre d'applications par jour, notamment pour les enfants (Lundwall *et al*, 2005). De même, une directive de l'Union Européenne en 2010 recommande de restreindre l'utilisation du DEET à une concentration inférieure à 15%.

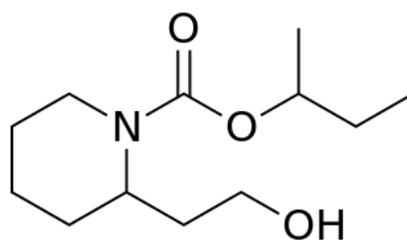
De plus, des phénomènes de tolérance aux répulsifs comme le DEET commencent à apparaître. En Australie, le DEET n'offre une protection contre *An. meraukensis* que durant 1 heure (Lundwall *et al*, 2005). Aux Etats-Unis, *An. albimanus*, vecteur principal du paludisme dans la région, commence à devenir résistant au DEET (Katz *et al*, 2008). C'est pourquoi,

malgré son efficacité avérée, les industriels et les autorités sanitaires cherchent des alternatives au DEET.

Des expériences ont été menées pour tenter d'améliorer l'efficacité du DEET et diminuer ses effets négatifs. Des essais de substitutions sur le groupement benzène (noyau aromatique), ont montré un effet répulsif plus important des groupements alkyles que des groupements hydroxyles. De même, un allongement de la chaîne carbonée entre le noyau aromatique et le groupement amide diminuait l'efficacité de répulsion (Paluch *et al*, 2010). Ceci indique une importance particulière de ces deux groupements que l'on retrouve chez d'autres substances actives.

### 1.3.3. KBR3023

Afin de pallier les effets secondaires du DEET, d'autres produits chimiques ont été créés. L'icaridine, nommée aussi picaridine ou KBR3023, est une substance de synthèse récente conçue en 1996 par les laboratoires Bayer (Paluch *et al*, 2010). Dérivé pipéridine portant un amide cyclique, le KBR3023 a une configuration structurale proche de celle du DEET (**Figure 13**). Efficace, il est généralement utilisé pour des concentrations allant jusqu'à 20% qui induisent une protection efficace 8 à 10 heures (Katz *et al*, 2008). De plus, on considère que sa demi-vie sur la peau est supérieure à celle du DEET, respectivement 4 heures et 3 heures (Lundwall *et al*, 2005). Il est aussi efficace que le DEET contre les moustiques *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *An. gambiae* (Costantini *et al*, 2004 ; Licciardi *et al*, 2006).

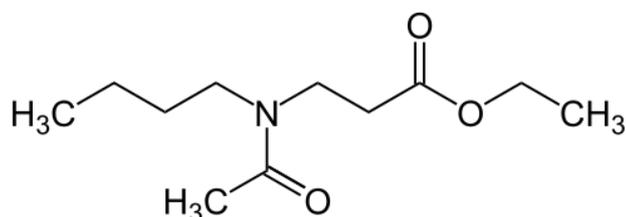


**Figure 13** : Représentation schématique de la structure moléculaire de l'icaridine.

S'il a une efficacité similaire à celle du DEET, son mécanisme d'action est encore méconnu, tout comme son profil toxicologique. On estime toutefois qu'il ne présente aucun effet irritant, cancérigène ou mutagène. Il reste toutefois l'un des répulsifs les plus utilisés dans le monde et est recommandé par l'OMS en LAV, notamment dans les zones où le paludisme est endémique (Costantini *et al*, 2004).

### 1.3.4. IR3535

Substance synthétique d'origine naturelle, l'Insect Repellent 3535 (IR3535) ou éthylbutylacétylamino propionate est un analogue de la bêta-alanine, un acide aminé (**Figure 14**). De plus, il porte un groupement amide, comme le DEET, qui expliquerait son effet répulsif. Pour certaines espèces de vecteurs, comme la tique, il semble plus efficace que le DEET (Boulangier et Lipsker, 2014). De même, il induit une bonne protection, notamment contre les moustiques *An. gambiae* et *An. funestus* (Licciardi *et al*, 2005). Il reste néanmoins moins efficace que d'autres produits chimiques. Ainsi une étude a montré qu'*An. gambiae* a une sensibilité moins importante pour l'IR3535 que pour le DEET et l'icaridine (Costantini *et al*, 2004). De même, IR3535 induit chez *Ae. aegypti* un temps de protection moyen jusqu'à quatre fois inférieur à celui du DEET (respectivement 22,9 minutes pour 7,5% d'IR3535 et 88,4 minutes pour 4,75% de DEET) (Fradin and Day, 2002). Néanmoins, moins nocif pour le mammifère, plus facile à incorporer dans les cosmétiques, il n'a été rapporté aucun cas d'irritation cutanée ou d'allergie. Il reste ainsi l'un des répulsifs cutanés les plus utilisés, notamment chez l'enfant.



**Figure 14** : Représentation schématique de la structure moléculaire de l'IR3535.

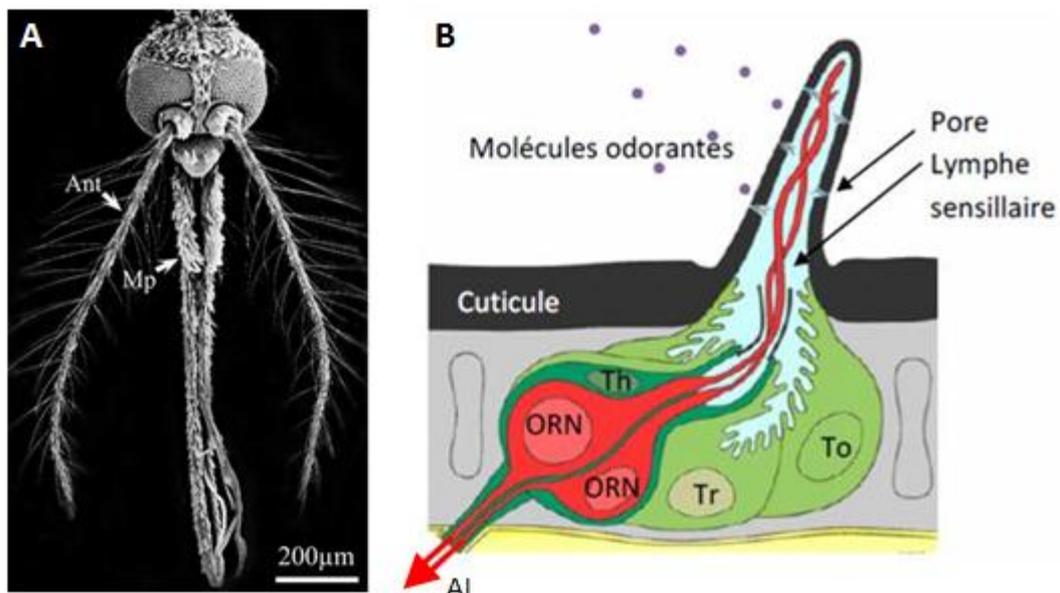
## 2. Mode d'action des répulsifs

La qualité des répulsifs est d'empêcher la piqûre de moustique qui pourrait être irritante, voire transmettre des maladies vectorielles. Si l'on connaît parfaitement leur capacité de protection et leurs effets sur le comportement général des femelles hématophages, le mode d'action cellulaire et moléculaire des répulsifs reste encore mal défini. Néanmoins, les études montrent que ce mécanisme d'action s'appuie principalement sur la perturbation du système olfactif de l'insecte, l'empêchant de ce fait de repérer sa proie (Klun *et al*, 2006). En effet, comme il a été expliqué chapitre I, l'olfaction joue un rôle essentiel dans le comportement de recherche d'un hôte de la femelle moustique, notamment en captant les odeurs de sueur et de CO<sub>2</sub> émises par les individus (Ghaninia *et al*, 2007).

### 2.1. Système olfactif du moustique

Les moustiques, et plus largement les insectes, détectent les odeurs grâce à un système olfactif extrêmement développé capable de détecter nombre d'informations sensorielles grâce aux antennes et aux palpes maxillaires (Paluch *et al*, 2010). Ces organes, qui se trouvent à l'interface avec l'environnement de l'insecte, permettent de relayer des informations olfactives, mais aussi gustatives, mécaniques ou encore thermiques. Typiques du dimorphisme sexuel du moustique, elles sont plus filiformes chez les femelles que les mâles.

A la surface des antennes se trouvent de minuscules poils appelés sensilles (**Figure 15**). Au nombre de 1000 par antenne, ces soies innervées se distinguent selon cinq types, les sensilles trichoïdes étant les principales (Ghaninia *et al*, 2007). Chaque sensille est dotée de pores sur sa surface cuticulaire, permettant le passage des molécules odorantes jusqu'à des neurones récepteurs olfactifs (ORN). Ces ORNs, au nombre de 1 à 3, baignent dans un liquide appelé lymphe sensillaire et présentent une dendrite unique exprimant des récepteurs olfactifs (OR) et un axone se projetant dans le centre d'intégration olfactif, le lobe antennaire (AL).



**Figure 15 :** A- Photographie au microscope électronique à balayage d'une tête de moustique femelle *Aedes aegypti* (d'après Ghaninia *et al*, 2007). Ant : antenne ; Mp : palpe maxillaire. B- Représentation schématique d'une sensille olfactive d'insecte (d'après Lucas *et al*, 2010) AL : lobe antennaire ; ORN : neurone récepteur olfactif ; Th : cellule thécogène ; To cellule tormogène ; Tr : cellule trichogène.

A côtés de ces ORNs, se trouvent trois cellules nommées thécogène (Th), trichogène (Tr) et tormogène (To). Ces cellules accessoires participent au développement des sensilles et à la sécrétion de protéines olfactives de transport (OBP). Ainsi, lorsque les molécules odorantes pénètrent dans les sensilles de l'antenne au niveau des pores, elles sont solubilisées dans la lymphe sensillaire puis transportées par les OBP vers les ORNs. Là, le complexe formé par le transporteur et la molécule odorante se fixe aux OR membranaires. Les ORs hétéromériques sont des récepteurs canaux formés d'une sous-unité détectant la molécule olfactive (ORx) et d'un co-récepteur (ORco ou GPROR7 chez le moustique (Sato *et al*, 2008)). Ainsi, une substance odorante peut activer plusieurs types d'OR et un OR peut être activé ou inhibé par plusieurs types de composés (Ghaninia *et al*, 2007). Parmi les récepteurs spécifiques, OR8 est notamment réceptif à l'octénol, tandis que les récepteurs OR2 et OR10 sont plus sensibles à l'indole (Dickens et Bohbot, 2013). Quant à l'activation de certains récepteurs ORs dit généralistes par plusieurs molécules chimiques distinctes, ceci s'expliquerait par un site de reconnaissance spécifique à géométrie variable, ou de multiples sites de liaisons (Dickens et Bohbot, 2013).

L'activation des OR permet la transduction du signal par l'intermédiaire d'une cascade moléculaire induisant une dépolarisation de la membrane. Cette variation de conductance permet ainsi l'ouverture de canaux dépendant du potentiel, provoquant l'apparition de potentiels d'action au sein du soma. Si l'on s'accorde à dire que le canal formé par OR et son co-récepteur permettent le passage d'ions calcium, depuis quelques années, deux théories s'opposent concernant la genèse de la dépolarisation. Selon certains chercheurs, l'hétérodimère OR/ORco formant le canal est uniquement ionotropique (Sato *et al*, 2008). Dans une seconde théorie, le canal formé d'OR seul est métabotropique ou ionotropique selon la concentration de la molécule odorante, respectivement à faible et forte concentration (Wicher *et al*, 2008).

Le potentiel d'action se propage le long de l'axone de l'ORN vers le lobe antennaire où le message olfactif sera intégré par les neurones centraux des glomérules. L'activation distincte des différents glomérules permet d'assurer la discrimination des odeurs (Ghaninia *et al*, 2007). Le signal est par la suite transmis aux corps pédonculés du système nerveux, considéré comme le centre supérieur de l'apprentissage olfactif et la mémorisation des odeurs. La perception du message olfactif permet alors au moustique de s'orienter vers l'hôte de son futur repas de sang.

## 2.2. Perturbation de l'olfaction induite par les répulsifs

Si l'on sait que les répulsifs agissent sur la perception des informations olfactives, on connaît encore mal leurs modes d'action. De ce fait, plusieurs hypothèses tentent d'expliquer l'effet répulsif de certaines substances.

### 2.2.1. Effet comportemental

La réponse comportementale d'un insecte hématophage à une substance répulsive se mesure selon plusieurs critères. Ainsi, les chercheurs vérifient l'effet répulsif qui implique le système olfactif, mais aussi l'effet irritant qui s'observe au contact du produit. Dans la plupart des études, ces effets comportementaux se traduisent simplement par un temps de protection moyen, caractérisé par le comptage du nombre de piqûres, et dont l'expérimentation se fait sur un sujet vivant. Cependant, ces études sont loin d'être exhaustives puisque les molécules répulsives sont aussi utilisées en application sur des surfaces, notamment textiles, qui modifient les caractéristiques de ces substances. Extrêmement volatiles, les répulsifs imprégnant les moustiquaires sont généralement plus persistants dans le temps.

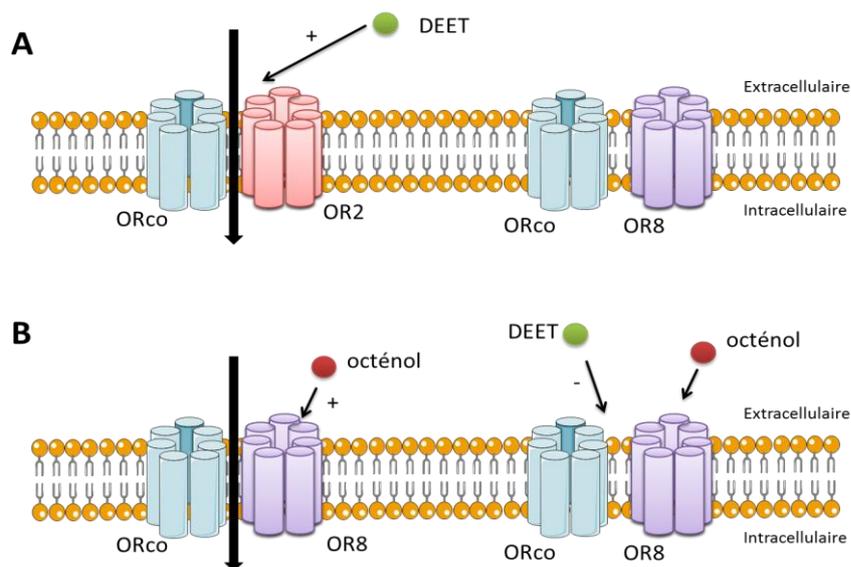
Pour combler le manque d'information concernant les mécanismes sensoriels des répulsifs, certaines études ont pris le parti de s'affranchir de cobaye vivant. En 2006, Licciardi et ses collaborateurs ont ainsi décidé d'étudier les effets des répulsifs chimiques les plus courants, DEET, IR3535 et KBR3023, en les appliquant sur du papier filtre. Ils ont pu ainsi mesurer l'effet répulsif et irritant, mais aussi l'effet knock-down (paralysie temporaire), voire la mortalité sur des moustiques femelles *Ae. aegypti*. Les résultats ont pu démontrer l'effet à la fois répulsif, mais aussi toxique imputable au DEET, tandis que le KBR3023 interférerait essentiellement avec la perception olfactive de l'hôte. Ceci prouve que les substances répulsives n'agissent pas sur une même cible, mais impliquent un ensemble de mécanismes cellulaires.

L'effet sur le comportement des moustiques varie selon le répulsif utilisé, mais aussi selon l'espèce vectrice ciblée. Il est à noter que selon certaines études, des espèces d'anophèles sont plutôt tolérantes à l'ensemble des répulsifs couramment employés en LAV. En Australie notamment, le DEET et l'IR3535, formulés à la concentration démontrant une efficacité maximale, n'ont en réalité un effet répulsif que d'une heure contre le moustique *An. meraukensis* (Lundwall *et al*, 2005).

### 2.2.2. Action sur le complexe OR/ ORco

L'action des répulsifs sur le complexe OR-ORco est très difficile à comprendre, notamment à cause du caractère multimérique de ces récepteurs. De nombreuses études électrophysiologiques menées sur les effets du DEET, mais aussi de la picaridine et de l'IR3535, ont ainsi montré que les répulsifs pouvaient avoir différents mécanismes d'action cellulaires au niveau des ORNs. Selon certaines études, les répulsifs pourraient inhiber la réponse des ORNs normalement sensibles aux attractifs. Ainsi notamment, le DEET diminue la sensibilité des ORNs à l'acide lactique, un composant de la sueur humaine (Dickens et Bohbot, 2013). D'autres études montrent que les répulsifs activent des ORNs insensibles aux molécules attractives, suggérant que ces ORNs transmettraient un message perturbant la perception des odorants.

Dans plusieurs études, Bohbot et Dickens (2010) ont montré que les répulsifs chimiques DEET, IR3535 et KBR3023 possédaient des effets antagonistes ou agonistes suivant les ORs testés, ainsi que la concentration en molécules odorantes présentes. Ainsi, en l'absence d'agoniste naturel, le DEET active le complexe OR2-ORco, mais pas le complexe OR8-ORco. Cependant, en présence d'octénol, le ligand naturel, le complexe OR8-ORco est inhibé (**Figure 16**).



**Figure 16** : Représentation schématique de l'effet du DEET sur le complexe ORco-OR. A- En l'absence d'agoniste naturel, le DEET active le complexe ORco-OR2 mais pas ORco-OR8. B – en présence de ligand naturel comme l'octénol, le DEET inhibe le complexe ORco-OR8.

Un constat similaire a été fait pour le KBR3023 et l'IR3535. Cependant, les mécanismes d'action exacts des répulsifs sur ces ORs, à savoir s'ils se fixent sur le site allostérique ou bien des sites orthostériques, restent encore méconnus. Néanmoins, il est à noter que les résultats cités sont observés pour de fortes concentrations de répulsifs (mM), suggérant la possible interaction avec des sites allostériques (Dickens et Bohbot, 2013).

### 2.2.3. Effet anti-appétant

Si de nombreuses études ont cherché à expliquer le lien entre le système olfactif et les répulsifs, certains chercheurs ont montré que les répulsifs les plus utilisés, à savoir le DEET, l'IR3535 et le KBR3023, pouvaient aussi avoir un effet dissuasif sur l'alimentation. A 100mM, ces trois substances induisent plus de 80% d'inhibition appétitive chez les larves de *Lymantria dispar*, une noctuelle (Sanford *et al*, 2014). Ce constat a aussi été fait chez différentes espèces de drosophiles et de moustiques (Klun *et al*, 2006 ; Dickens et Bohbot, 2013). Selon des études électrophysiologiques, cette inhibition implique l'activation d'un seul neurone de type récepteur gustatif (GRN), présent sur les sensilles du labelle de la trompe (Sanford *et al*, 2014). Les GRNs étant des chémorécepteurs de contact, les composés peu volatils pourraient agir à faibles doses sur ces récepteurs. Ceci expliquerait ainsi pourquoi les composés particulièrement volatils sont nécessaires à fortes concentrations pour inhiber l'appétence chez la mouche à viande (Dickens et Bohbot, 2013). De même, le fait que l'IR3535 ait un effet plus important que le DEET sur le système gustatif pourrait s'expliquer par sa conformation structurale impliquant un groupement pipéridine proche du groupement amide.

## 3. Toxicité des répulsifs

Comme précisée précédemment, la différence entre une molécule à effet répulsif ou à effet toxique se situe parfois dans la concentration utilisée en substance active. C'est le cas des pyréthrinoïdes, dérivés de la pyréthrine, qui à faibles concentrations ont des effets répulsifs et irritants, mais qui deviennent toxiques à fortes doses. C'est aussi le cas du DEET, qui depuis quelques années, fait l'objet d'études de plus en plus poussées sur son possible effet toxique. En effet, lors d'études comportementales, il a notamment été constaté que le DEET avait un effet knock-down, voire létal (Licciardi *et al*, 2006). De même, des études menées sur *An. gambiae* ont montré que le DEET et le KBR3023 possédaient des propriétés insecticides à fortes concentrations (Pennetier *et al*, 2007).

Récemment, le DEET, répulsif jusqu'à lors le plus couramment utilisé dans le monde, a démontré un aspect encore méconnu de son mécanisme d'action. Outre son action sur les ORNs du système olfactif et les GRNs du système gustatif, le DEET possède un effet toxique similaire à certains insecticides ciblant la transmission synaptique cholinergique (Corbel *et al*, 2009 ; Lapied *et al*, 2010). Comme les carbamates, le DEET inhibe les acétylcholinestérases (AChE), enzymes responsables de la dégradation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des fentes synaptiques. Cette inhibition induit l'accumulation d'ACh provoquant une hyperexcitabilité des neurones, souvent létale pour le moustique. Ces résultats sont appuyés par des études démontrant un phénomène de compétition entre le DEET et les insecticides carbamates sur le site actif de l'AChE, ce qui induit potentiellement un effet synergique de la toxicité.

Outre l'effet toxique de ce répulsif sur le moustique, il est à noter un risque potentiel pour les mammifères. En effet, selon Corbel et ses collaborateurs, les AChE de mammifères seraient plus sensibles au DEET que les AChE d'insectes. Ceci expliquerait ainsi de nombreux cas d'intoxications, mais aussi, notamment le syndrome de la Guerre du Golfe, pouvant être imputable à un mélange de DEET et de carbamate (Corbel *et al*, 2009 ; Lapied *et al*, 2010). A cela s'ajoutent les symptômes résultant d'une hyperexcitabilité neuronale, à savoir céphalées, tremblements ou convulsions.

Si les chercheurs affirment que les concentrations utilisées en DEET sont trop faibles pour être toxiques pour l'homme, le constat est néanmoins alarmant et a remis en question la distinction entre les produits biocides (TP18) et les répulsifs classés parmi les substances cosmétiques (TP19). Le DEET étant à ce jour le seul répulsif à faire polémique, il est désormais nécessaire d'envisager l'emploi d'autres répulsifs pour répondre aux problématiques de LAV.

# Chapitre IV – Insecticides

---

## 1. Mode d'action des insecticides

Contrairement aux répulsifs, les insecticides sont des substances souvent chimiques, toxiques pour les insectes. Issus de différentes familles chimiques, ils peuvent avoir différentes actions, selon le stade de développement de l'insecte, le type de molécule, la concentration en substance active, le mode de dissémination. A l'heure actuelle, 90% des insecticides ont des propriétés neurotoxiques, les autres agissant principalement sur la formation de la cuticule ou sur la perturbation de la mue. Parmi ces insecticides neurotoxiques, 70% font partie de quatre familles chimiques : les organophosphorés (OP), les carbamates, les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes.

### 1.1. Insecticides d'origine naturelle

Comme précédemment expliqué dans le chapitre III, de nombreux produits à effet répulsif, mais aussi insecticide, ont été développés à partir de substances d'origine naturelle. Héritage de longs siècles de pratiques agricoles, il est connu que certaines plantes produisent des molécules toxiques pour les insectes.

Les fleurs de pyrèthres et de chrysanthèmes (*Chrysanthemum cinerifolius*) sont composées de molécules à effet insecticide nommées couramment pyréthrines. Il s'agit d'un mélange de substances dont les dérivés pyréthrines sont majoritaires, bien qu'on retrouve aussi des jasmolines et des cinérines (Davies *et al*, 2007). Utilisées sous forme de poudre de fleurs séchées depuis l'époque de la Chine ancienne et de la Perse, les pyréthrines ont démontré une efficacité contre les insectes ravageurs de culture (Davies *et al*, 2007). Ces molécules naturelles rapportées en Europe au XIXe siècle, peu stables et à l'extraction coûteuse, sont à l'origine de la famille des insecticides chimiques de type pyréthriinoïde. Ils ont démontré un profil toxicologique pour la faune aquatique et sont responsables de symptômes tels que vomissements et rougeurs cutanées lorsqu'ils sont utilisés à fortes concentrations.

Issue d'espèces végétales de la famille des *Fabaceae*, la roténone est l'une des plus anciennes molécules utilisées à des fins insecticides. Importées d'Indonésie par les Européens, les plantes riches en roténone furent progressivement abandonnées au profit des produits de synthèse comme le DDT, avant d'être réhabilitées en raison du profil environnemental de la roténone. Agissant sur la synthèse d'ATP au niveau mitochondrial,

certaines chercheurs estiment que son mode d'action toxique peut être à l'origine de la maladie de Parkinson chez les utilisateurs de roténone (Goldstein *et al*, 2015).

Plus connue pour l'usage personnel des individus dans l'optique d'en faire un stimulant, la nicotine issue naturellement du tabac *Nicotiana tabacum* possède aussi des propriétés insecticides (Millar et Denholm, 2007). Cette molécule agit comme agoniste sur des récepteurs ionotropes appelés récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR). Malheureusement, elle a une toxicologie relativement élevée pour les mammifères (Millar et Denholm, 2007). Elle est aussi à l'origine d'une famille d'insecticides de synthèse appelés néonicotinoïdes.

### 1.2. DDT

Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un insecticide organochloré, fut le premier insecticide de synthèse utilisé contre les insectes vecteurs de maladies. Synthétisé en 1874, il fut utilisé durant la seconde Guerre Mondiale contre les insectes vecteurs du paludisme et du typhus (Davies *et al*, 2007). Par la suite, il fut abondamment utilisé durant de nombreuses campagnes d'éradication de l'OMS, notamment contre le paludisme. Malheureusement, il est rapidement confronté à des problèmes de résistances, dus notamment à une absence totale de communication sur l'utilisation du produit dans les zones à risque. Ainsi en Thaïlande, l'utilisation intensive de DDT a entraîné le développement de résistance chez plusieurs espèces d'anophèles vecteurs du paludisme comme *An. aconitus*, *An. culicifacies*, *An. nivipes* et *An. philippinensis* (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). En 1962, Rachel Carson écrit son livre « *Silent Spring* » qui met en garde contre les effets néfastes du DDT sur la faune, en particulier la diminution des populations d'oiseaux. Dès 1970, l'usage du DDT est interdit en agriculture (Davies *et al*, 2007 ; Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Malgré tout, l'utilisation du DDT et de certains organochlorés reste tolérée dans la lutte contre les vecteurs de maladies, particulièrement durant les épisodes épidémiques.

Le DDT agit, comme les pyréthriinoïdes, sur le canal sodium dépendant du potentiel (Na<sub>v</sub>), provoquant une dépolarisation et une fréquence répétée des potentiels d'action. Ceci induit une paralysie pouvant entraîner la mort des insectes.

### 1.3. Pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des produits synthétiques dont la structure chimique est fortement similaire à celle des pyréthrines des fleurs de chrysanthèmes (*Chrysanthemum cinerariifolium*) (voir **Figure 11**) (Raymond-Delpech *et al*, 2005 ; Davies *et al*, 2007). Les

premiers analogues de pyrèthres étant fortement instables dans les conditions de température et d'humidité environnementales, il a fallu attendre les années 1970, pour qu'apparaissent des composés stables, efficaces contre les insectes et peu toxiques pour les mammifères, comme la perméthrine et la deltaméthrine (Narahashi, 2000 ; Davies *et al*, 2007).

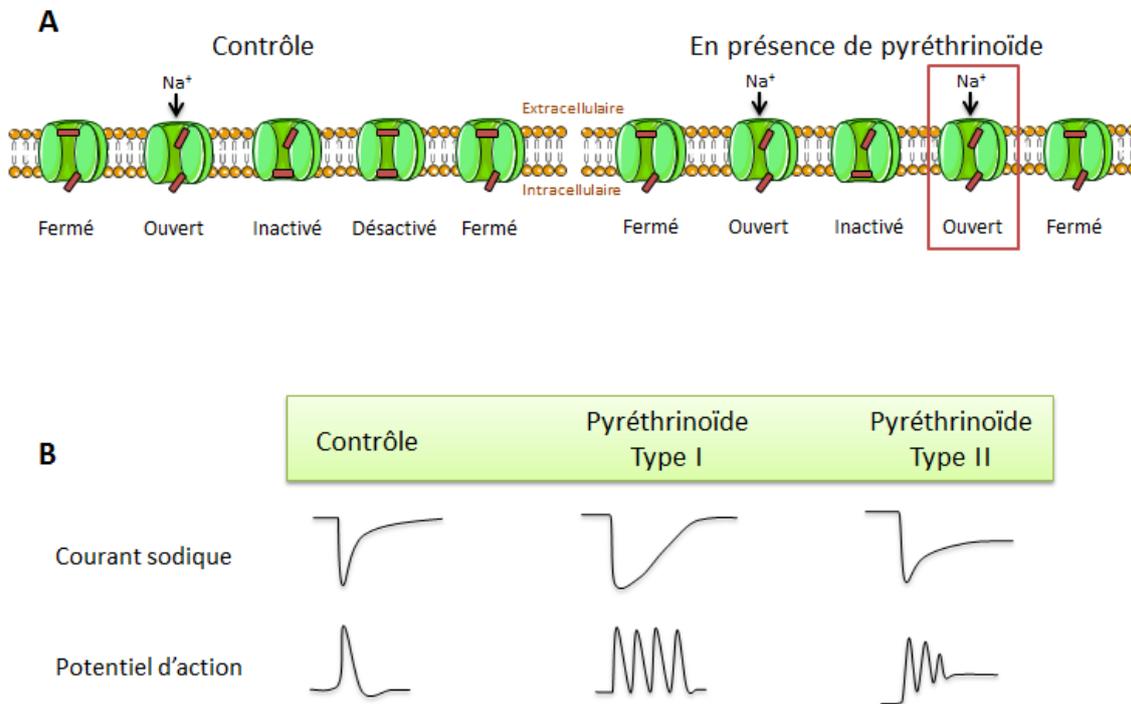
Ces molécules synthétiques sont classées en deux types selon leur structure chimique et leur mode d'action. Les pyréthrinoïdes de type I, tel que la perméthrine, ne portent pas de groupement  $\alpha$ -cyané et sont responsables chez les mammifères de symptômes tels que l'hyperexcitation, l'ataxie, les convulsions, aboutissant à une paralysie pouvant être fatale (Narahashi, 2000 ; Raymond-Delpech *et al*, 2005). Ils sont souvent utilisés pour l'imprégnation des textiles, vêtements moustiquaires, plus facilement transportables dans les régions d'épidémie palustre (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Les pyréthrinoïdes de type II, telle la deltaméthrine, sont caractérisés par un groupement  $\alpha$ -cyané et produisent des symptômes se rapportant à de l'hypersensibilité, des mouvements involontaires, des convulsions, et un effet « knock-down » (Narahashi, 2000 ; Raymond-Delpech *et al*, 2005). Cet effet knock-down est réversible en présence d'une dose insuffisante d'insecticide (Carnevale et Robert, 2009).

Ces différences de symptômes se traduisent au niveau cellulaire par leur mode d'action sur leur cible principale, le canal sodium dépendant du potentiel ( $\text{Na}_v$ ). En effet, plusieurs études sur les axones géants de blattes ont démontré que les pyréthrinoïdes agissent sur les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux sodium, modifiant la durée des flux ioniques (Narahashi, 2000 ; Raymond-Delpech *et al*, 2005 ; Davies *et al*, 2007).

Les pyréthrinoïdes de type I se fixent sur les canaux  $\text{Na}_v$  à leur état ouvert (Raymond-Delpech *et al*, 2005) (**Figure 17**). Ils déplacent la dépendance au potentiel d'activation des canaux vers des valeurs plus faibles, induisant un ralentissement de la cinétique d'activation du courant sodique et donc une augmentation de la durée de ce courant. Ceci entraîne un courant de queue plus important en termes d'amplitude et de durée, ainsi qu'une répétition des potentiels d'action (PA) (Shafer *et al*, 2005). Cette transmission répétée de l'information neuronale est responsable de l'hyperexcitation observée (Davies *et al*, 2007).

Les pyréthrinoïdes de type II se fixent préférentiellement sur les canaux sodium à leur état fermé (Raymond-Delpech *et al*, 2005) (**Figure 17**). Ceci prolonge l'ouverture du canal sodium suffisamment pour induire une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation déplace le gradient électrochimique responsable de l'activation des canaux sodium, induisant progressivement une diminution de l'amplitude des potentiels d'action, jusqu'à la perte totale d'excitabilité neuronale (Shafer *et al*, 2005). Ceci est notamment identifiable par

un courant de queue continu. La transmission continue de l'influx nerveux induit un effet knock-down et une paralysie de l'insecte (Davies *et al*, 2007).



**Figure 17 :** A- États du canal  $Na_v$  en conditions contrôles ou en présence de pyréthriinoïde. En condition contrôlée, l'ouverture du canal permet une entrée d'ions sodium dans la cellule. Le canal s'inactive pour retourner rapidement à un état fermé, limitant ainsi le flux d'ions sodium. En présence de pyréthriinoïdes, le canal ne se désactive plus, entraînant un flux d'ions sodium plus important. B- Effet des pyréthriinoïdes de type I et de type II sur le courant sodique et le potentiel d'action. En présence de pyréthriinoïdes, les canaux  $Na_v$  restent ouverts, produisant un courant de queue. Les pyréthriinoïdes de type I entraînent une augmentation de la durée du courant et une répétition des potentiels d'action. Les pyréthriinoïdes de type II entraînent une dépolarisation prolongée, induisant une diminution progressive de l'amplitude des potentiels d'action jusqu'à la perte d'excitabilité neuronale (d'après Shafer *et al*, 2005).

Bien que les pyréthriinoïdes puissent avoir un effet similaire sur les canaux sodium de mammifères et d'insectes, on considère que les pyréthriinoïdes ont une toxicité sélective pour les insectes. Cette différence de toxicité s'explique en partie par une dépendance des molécules insecticides à la température. En effet, il a été constaté que l'efficacité des pyréthriinoïdes était accrue pour de faibles températures (15-20 °C), correspondant à celles du corps des insectes (Narahashi, 2000). De plus, le phénomène de détoxification est plus efficace chez les mammifères. Et surtout, il existe une différence de sensibilité des canaux sodiques, dépendant de la composition moléculaire du canal. Ainsi, le canal sodium de drosophile est 100 fois plus sensible à la perméthrine que celui du rat (Narahashi, 2000).

L'ensemble de ces constats explique la popularité des pyréthriinoïdes dans l'utilisation de produits chimiques, que ce soit contre les ravageurs de culture ou les vecteurs de maladie. En Thaïlande, leur utilisation contre la dengue et le paludisme (hors moustiquaires) représentait 80% du marché en 2007, soit plus de 1127 tonnes (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). Ce sont aussi les seuls insecticides recommandés par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires. Malheureusement, l'usage intensif de ces insecticides depuis les années 1970 est responsable de développements importants de résistances chez les insectes ciblés, rendant parfois ces produits chimiques totalement inefficaces. Ceci a suscité l'inquiétude des autorités sanitaires mondiales, d'autant que comme précisé dans le chapitre précédent, les pyréthriinoïdes sont aussi des répulsifs très efficaces.

#### 1.4. Organophosphorés et Carbamates

La voie de l'acétylcholine est essentielle dans le processus nerveux de l'insecte, l'acétylcholine étant un médiateur de la transmission nerveuse au niveau des synapses cholinergiques du système nerveux central (Haubruge et Amichot, 1998 ; Casida et Durkin, 2013). L'influx nerveux présynaptique permet la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique où se trouvent ses récepteurs, responsables de l'activation des canaux sodium et potassium. L'ouverture des canaux entraîne une dépolarisation à l'origine de l'influx nerveux post-synaptique (Haubruge et Amichot, 1998). Cette voie fait intervenir plusieurs acteurs protéiques, notamment l'acétylcholinestérase (AChE), cible des carbamates et des organophosphorés (OP).

Les OP, comme le malathion ou le téméphos, sont des composés chimiques possédant un groupement phosphate. Originellement créés durant la Seconde Guerre Mondiale sous forme de gaz de combat, ils sont introduits dans l'usage insecticide depuis les années 1940 (Casida et Durkin, 2013). Ils inhibent l'enzyme de manière irréversible. En effet, la liaison entre le phosphore de la substance toxique et le site estérasiq ue de l'enzyme est plus stable que la liaison carbone-enzyme, ce qui la rend beaucoup difficile à rompre (Costa *et al*, 2006). Or, la plupart des OP présentent une sélectivité relativement limitée pour les insectes, leur usage est donc de plus en plus limité. Ainsi, le téméphos est l'un des rares insecticides à être autorisé comme larvicide dans le cadre de la LAV, puisqu'il reste notamment plus efficace que le Bti dans les gîtes larvaires riches en matière organique (Anses, 2013).

Les carbamates, tel que le propoxur, sont arrivés plus tardivement sur le marché que les OP, dans les années 1960 (Casida et Durkin, 2013). Dérivés de l'acide carbamique, ils

inhibent l'AChE de manière réversible. Ces produits sont autorisés dans la formulation pour les pulvérisations intradomiciliaires.

Dans les deux cas, l'enzyme ne peut plus hydrolyser l'ACh, provoquant une stimulation répétée qui entraîne la paralysie de l'insecte (Costa *et al*, 2006). L'excès d'ACh finit par induire un mécanisme de feed-back négatif en activant les mAChRs présynaptiques qui inhibent la libération du neurotransmetteur (Corbel *et al*, 2006). Les résistances apparues chez les insectes a, depuis les années 2000, drastiquement diminué l'utilisation des produits anticholinestérasiques en agriculture, au profit d'insecticides possédant un mode d'action différent, comme les néonicotinoïdes (Casida et Durkin, 2013).

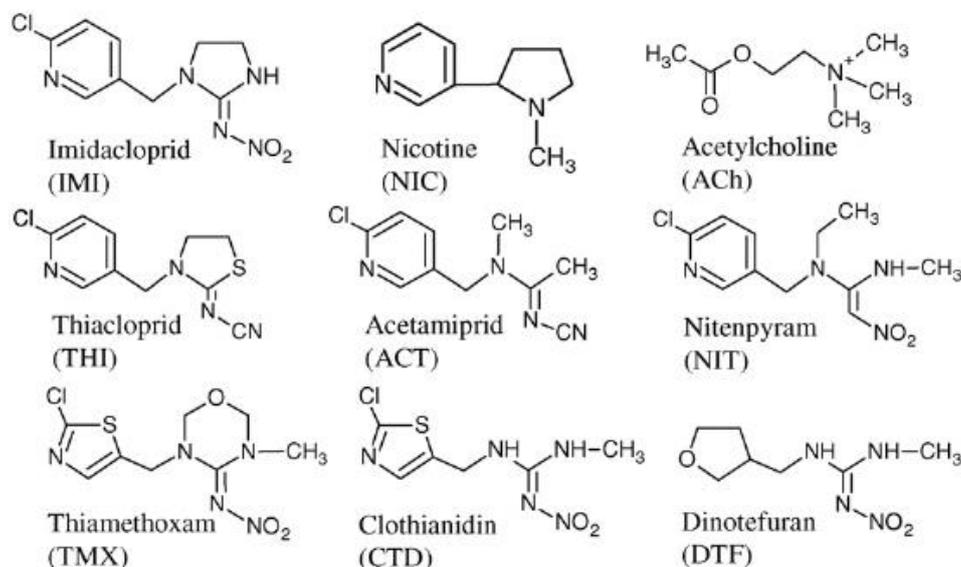
### 1.5. Néonicotinoïdes

Parmi les insecticides neurotoxiques, près de la moitié des produits vendus sur le marché actuel agissent sur la voie de l'acétylcholine (ACh). C'est le cas des néonicotinoïdes ciblant les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs).

Les premiers néonicotinoïdes sont apparus dans les années 1970 et forment des dérivés de la nicotine (Millar et Denholm, 2007). Selon leur structure moléculaire (**Figure 18**), les néonicotinoïdes ont une sélectivité et une spécificité pour certains types d'applications. Ainsi, contrairement à la nicotine qui est un agoniste plus spécifique des récepteurs cholinergiques des mammifères, les néonicotinoïdes, notamment la clothianidine et le dinotéfurane, ont un ratio de sélectivité en faveur des insectes (Millar et Denholm, 2007). Des études ont démontré que 90% des récepteurs mammaliens à haute affinité pour la nicotine sont insensibles à l'imidaclopride, même à forte dose, mais que cette molécule agit sur les récepteurs des insectes (Shimomura *et al*, 2004). Cette différence de sélectivité s'expliquerait donc par une différence de composition du récepteur cible chez les vertébrés et les insectes. En effet, des études de liaison ont démontré notamment chez la drosophile une plus haute affinité pour certaines sous-unités (Millar et Denholm, 2007).

Selon plusieurs études, l'impact de ces insecticides neurotoxiques diffère selon leur mode d'application. Selon qu'il soit administré par la voie topique ou orale, l'imidaclopride n'aura pas la même toxicité sur l'abeille (Nauen *et al*, 2001). De même, en agriculture, l'imidaclopride pulvérisé sur les feuilles reste dans sa globalité sous sa forme originelle alors qu'il est métabolisé de façon plus ou moins complète par la plante lorsqu'il sert au traitement des graines, donnant des dérivés tel que l'oléfine potentiellement plus toxique que la molécule mère (Nauen *et al*, 2001). Ainsi, selon qu'ils soient préalablement métabolisés par la plante ou en contact direct avec le ravageur de culture, les produits peuvent avoir une toxicité variable.

Si ces diversités d'efficacité sont avérées, leurs explications restent cependant laborieuses, du fait de la méconnaissance de la composition structurale des récepteurs cholinergiques de l'insecte et du mode d'action moléculaire des insecticides néonicotinoïdes.



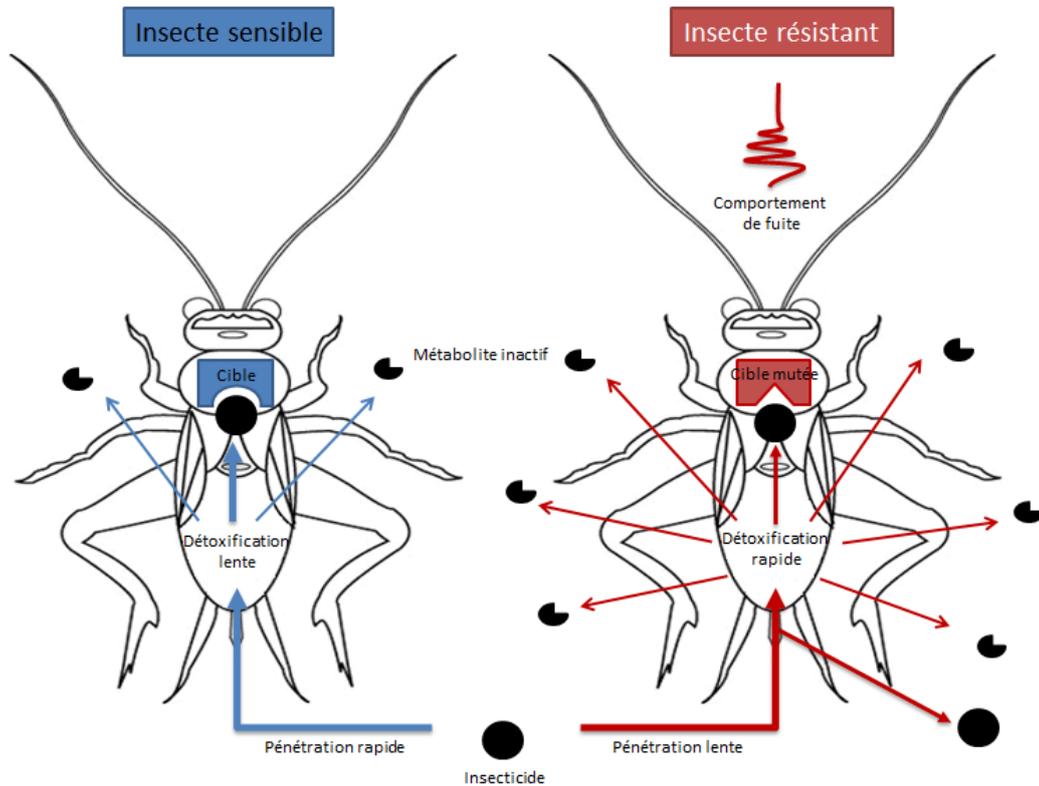
**Figure 18 :** Représentation schématique de la structure moléculaire des principaux néonicotinoïdes ainsi que de la nicotine et de l'acétylcholine (d'après Tan *et al*, 2007).

## 2. Résistances aux insecticides

La résistance aux insecticides peut se définir comme étant : « Une modification héréditaire de la sensibilité d'une population de nuisibles, qui se traduit par l'incapacité répétée d'un produit à obtenir le niveau de contrôle attendu lorsqu'il est utilisé conformément au mode d'emploi pour cette espèce de nuisibles » (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC, 2014).

Selon cette définition, les insecticides utilisés au quotidien sont une pression de sélection naturelle permettant aux insectes naturellement résistants à ces produits chimiques de devenir plus nombreux au sein d'une population donnée. Lorsque l'insecticide est appliqué de façon répétée, comme dans un champ, la pression de sélection est telle que seuls les insectes résistants survivent. Par exemple, les moustiques qui portent des mutations favorables pour leur survie se reproduisent au détriment des populations sensibles. La fréquence d'individus porteurs de gènes de résistance augmente (Weill *et al*, 2003). Le produit chimique devient totalement inefficace, ce qui induit de réels problèmes, que ce soit en agriculture ou en LAV, puisqu'il n'existe alors plus de moyens de réguler les populations nuisibles. Aujourd'hui, des résistances ont été observées chez la majeure partie des espèces vectrices de maladies dans le monde. (Carnevale et Robert, 2009).

Il existe plusieurs types de résistances aux insecticides impliquant une modification du comportement, une modification de l'absorption et de l'excrétion des produits, une modification de l'activité métabolique ou une modification de la cible aux insecticides (Figure 19).



**Figure 19 :** Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez l'insecte (d'après Haubruge et Amichot, 1998).

### 2.1. Apparitions de résistances

Depuis le début de l'utilisation de produits de synthèse comme biocides dans la lutte des ravageurs de culture et des vecteurs de maladies, l'absence souvent généralisée de communication, de contrôle et d'études approfondies sur les effets métaboliques de ces substances a abouti inévitablement à l'apparition de résistances chez les populations d'insectes ciblés. Ainsi, la plupart des pressions de sélection observée chez les moustiques vecteurs sont imputables aux traitements agricoles qui par ruissellement, polluent les gîtes larvaires à des doses largement supérieures à celles appliquées en LAV.

Le DDT ayant été couramment utilisé en LAV, notamment durant les campagnes antipaludiques de l’OMS, les résistances à ce produit chimique chez *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* se sont largement répandues à travers le monde (Marcombe *et al*, 2014). En Asie, ces résistances sont observables depuis les années 1960, notamment en Chine (Cui *et al*, 2006). De telles résistances se retrouvent aux Etats-Unis, dans l’état de Floride (Marcombe *et al*, 2014).

De même par leur capacité à agir comme répulsif et insecticide, les pyréthriinoïdes ont été largement utilisés en LAV. Or, depuis quelques années, il a été constaté une diminution de mortalité et une augmentation du temps de l’effet knock-down chez les moustiques cibles, suggérant un développement de résistances (Chandre *et al*, 1999). En Afrique, les mécanismes de résistances se développent plus rapidement que prévu. Dans les années 1990, *An. gambiae* présente une résistance aux pyréthriinoïdes dans trois pays de l’Ouest de l’Afrique, Côte d’Ivoire, Bénin et Burkina Faso. Cette résistance concerne à la fois les pyréthriinoïdes de type I et de type II (Chandre *et al*, 1999). En 2013 en Côte d’Ivoire, Koffi et ses collaborateurs ont montré des populations d’*An. gambiae* résistantes aux pyréthriinoïdes et au DDT avec des niveaux de tolérance à la perméthrine dans les zones urbaines, sous-entendant l’implication importante de l’utilisation des produits chimiques en agriculture dans le développement de résistances (Koffi *et al*, 2013). Récemment en Martinique, les populations d’*Ae. aegypti* ont démontré des résistances à la deltaméthrine, mais aussi au téméphos (Marcombe *et al*, 2012).

La résistance aux néonicotinoïdes est aujourd’hui plutôt répandue dans les populations cibles de ravageurs de culture. En Espagne, la résistance à l’imidaclopride chez l’aleurode du tabac a été découverte en 1996 ; aux Etats-Unis les doryphores ravageurs des cultures de pommes de terre ont montré une résistance à ce même insecticide dès 1997 (Millar et Denholm, 2007). Fort heureusement, les néonicotinoïdes n’ont été employés sur moustiques qu’à titre expérimental, ce qui limite leur impact sur la sélection de résistances chez ces vecteurs.

## 2.2. Modifications comportementales

Pour qu’un insecticide soit efficace, il faut qu’il entre en contact avec l’insecte ciblé. Ainsi, la résistance due à une modification comportementale résulte d’un phénomène d’évitement ou de limitation de la durée de contact avec le produit toxique. Cette résistance comportementale sera due à une exposition répétée à une concentration sub-létale d’un produit. La substance toxique est alors détectée par les récepteurs sensoriels comme étant un produit irritant (qui limite le temps de contact) ou répulsif (qui repousse sans contact),

diminuant de ce fait l'efficacité de l'insecticide. Ce type de comportements se retrouve notamment chez les Diptères, capable d'éviter un contact prolongé avec la deltaméthrine (Haubruge et Amichot, 1998).

Chez les moustiques, cela se traduit notamment par un comportement exclusivement exophile quand les domiciles sont aspergés de produits chimiques (Carnevale et Robert, 2009). Des études ont montré que certaines populations d'*Ae. albopictus* en Thaïlande ou d'*An. albimanus* au Panama étaient sensibles au DDT malgré une utilisation intensive en aspersion intradomiciliaire (Chareonviriyaphap *et al*, 2013). L'absence de résistances pour cet insecticide suggère une absence de contact avec le produit et donc un comportement d'évitement de la part des vecteurs. De même, les pyréthriinoïdes possédant un profil à la fois d'insecticides et de répulsifs, il est important de définir correctement l'utilisation de ces produits chimiques afin de contrôler le phénomène d'excito-répulsion.

La majeure partie des études font part d'un comportement inné impliquant des mécanismes de réflexes en réponse à des stimuli plutôt qu'une adaptation physiologique résultant d'une sélection de résistance génétique.

### 2.3. Changements physiologiques

Les résistances des insectes aux insecticides peuvent aussi se traduire par des modifications physiologiques. Celles-ci se manifestent généralement par une accumulation des produits toxiques dans certains tissus (notamment les tissus adipeux), une réduction de la perméabilité, ou encore une augmentation de l'excrétion. En effet pour agir efficacement, les insecticides doivent atteindre leurs cibles moléculaires. La barrière physiologique constituée par la cuticule et la muqueuse intestinale est donc l'un des premiers facteurs de résistance chez les insectes. Ainsi, on observe une augmentation des phospholipides de la cuticule chez les mouches *Musca domestica* résistantes par rapport à celles sensibles aux pesticides (Haubruge et Amichot, 1998).

Dans un même ordre d'idée, la résistance physiologique peut se traduire par une excrétion rapide des produits toxiques pour l'insecte, résultant notamment d'une surexpression des gènes codant pour les protéines impliquées. Certaines modifications de la pénétration cuticulaire accompagnent souvent des résistances métaboliques, comme la résistance au DDT due aux glutathion-S-transférases (Carnevale et Robert, 2009).

## 2.4. Résistances métaboliques

L'activité enzymatique permettant la détoxification des produits exogènes, comme les insecticides, est extrêmement importante puisqu'elle permet de rendre les substances toxiques plus hydrophiles, ce qui favorise leur excrétion. Chez les insectes, les enzymes responsables, comme les estérases, les monooxygénases à cytochrome P-450 et les glutathion-S-transférases, subissent des modifications au niveau génétique ou fonctionnel (Haubruge et Amichot, 1998). Un changement de conformation d'une enzyme peut accroître son affinité pour un insecticide, rendant la détoxification plus efficace. Chez plusieurs espèces d'anophèles, la résistance au malathion (OP) est due à une modification des propriétés catalytiques d'une carboxylase (estérases) (Carnevale et Robert, 2009).

Une production accrue de la protéine enzymatique peut quant à elle être due à une surexpression du gène codant ou une modification d'un gène responsable de la régulation de l'expression de l'enzyme. Des souches de *Culex pipiens* résistantes aux organophosphorés possèdent 50 fois plus d'estérases que les souches sensibles, augmentation résultant d'une amplification du gène codant pour l'enzyme (Weill *et al*, 2003). De même, une surproduction de monooxygénases à cytochrome P-450 a été mise en évidence chez plusieurs espèces d'*Anopheles* et d'*Aedes* résistantes aux pyréthriinoïdes, *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. stephensi* ou encore *Ae. aegypti* (Carnevale et Robert, 2009 ; Marcombe *et al*, 2012). A noter que le facteur de résistance lié aux monooxygénases à cytochrome P-450 peut être diminué en utilisant du pipéronylbutoxide (PBO) (Casida et Durkin, 2013).

Certains mécanismes enzymatiques confèrent une résistance croisée pour plusieurs insecticides, due à des caractéristiques communes à ces substances toxiques. C'est le cas des liaisons ester pouvant être hydrolysées par les estérases, que l'on retrouve chez les OP, mais aussi les carbamates et les pyréthriinoïdes (Carnevale et Robert, 2009). Concernant les monooxygénases à cytochrome P-450, la résistance concerne aussi bien le DDT, les carbamates, les OP et les pyréthriinoïdes (Haubruge et Amichot, 1998).

## 2.5. Modifications de cibles

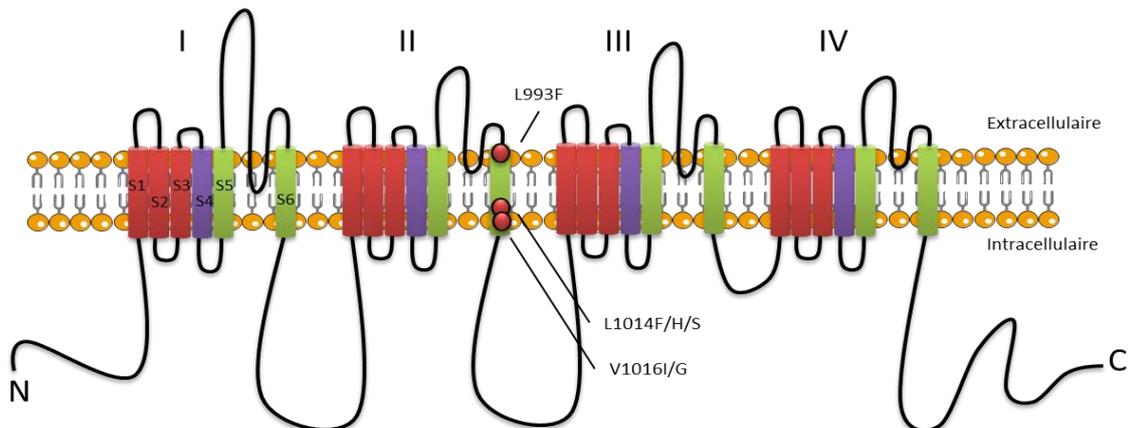
Parmi tous les insecticides ciblant le système nerveux des insectes vecteurs de maladies, la majeure partie possède les mêmes cibles moléculaires, à savoir le canal sodium ou la voie de l'acétylcholine (Haubruge et Amichot, 1998). Des modifications dites mutations ponctuelles sur les gènes de ces récepteurs et canaux cibles peuvent entraîner des modifications structurales au niveau de la protéine, entraînant parfois une diminution de son affinité pour l'insecticide. Parce qu'un changement d'acide aminé doit réduire l'affinité de

l'insecticide tout en garantissant la fonctionnalité de la protéine, ces mutations se retrouvent généralement d'une espèce d'insecte à une autre.

### 2.5.1. Canal sodium

Comme vu précédemment, les pyréthrinoides, comme le DDT, induisent un effet knock-down chez les insectes, s'apparentant à une paralysie brutale pouvant entraîner la mort. Ce symptôme est dû à la fixation de l'insecticide sur sa cible moléculaire, le canal sodium voltage-dépendant ( $\text{Na}_v$ ) (Raymond-Delpech *et al*, 2005).

Le canal sodium est une protéine à quatre domaines homologues (I-IV) formés de six segments transmembranaires (S1-S6) (**Figure 20**). Le segment S4 se comporte comme le capteur de tension, tandis que S5 et S6 forment le pore du canal à travers lequel transitent les ions sodium responsables de la phase ascendante du potentiel d'action (Wicher *et al*, 2001). Une variation de potentiel modifie sa conformation, permettant l'ouverture du pore et la traversée des ions.



**Figure 20 :** Représentation schématique d'un canal sodium dépendant du potentiel. Le canal sodium est composé de quatre domaines (I à IV), chacun divisé en six segments (S1 à S6). Le segment S4 sert de capteur de tension, S5 et S6 forment le pore du canal. De nombreuses mutations ponctuelles se trouvant sur le domaine II segment 6 sont à l'origine de la résistance *kdr*.

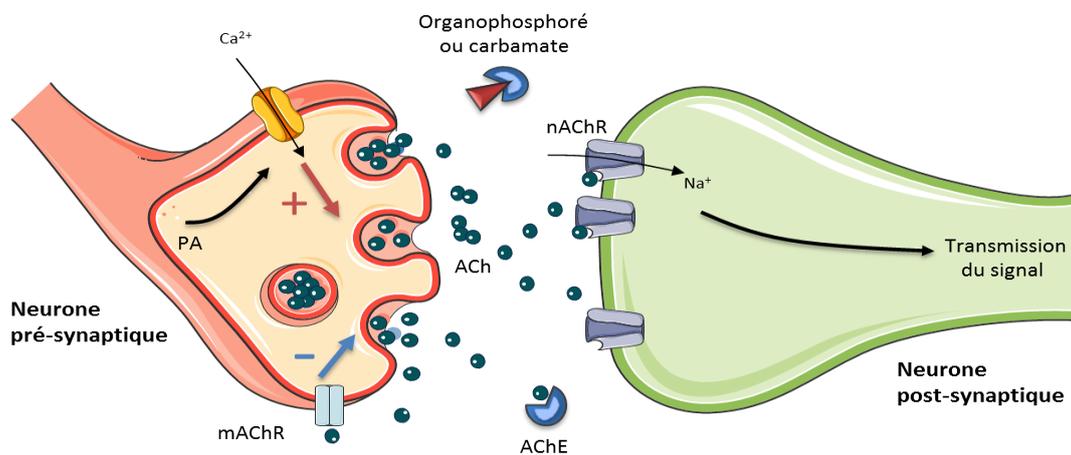
Les pyréthrinoides se fixent sur l'un des six sites d'action empêchant la fermeture du canal, ce qui perturbe la transmission synaptique. Or, de plus en plus d'insectes, et notamment de moustiques, deviennent résistants à l'effet knock-down. Cette résistance, appelée *knock-down resistance (kdr)*, est due à une mutation ponctuelle sur le gène codant pour la protéine, responsable d'une modification d'un acide aminé au niveau du domaine II, segment 6 (Carnevale et Robert, 2009). Cette mutation L993F IIS6 induit une diminution de la sensibilité à la deltaméthrine de 5 fois (Raymond-Delpech *et al*, 2005). On estime que cette résistance croisée est à l'origine due à l'utilisation massive de DDT au début du XXe

siècle, ciblant le même site que les pyréthriinoïdes (Haubruge et Amichot, 1998 ; Marcombe *et al*, 2012).

Très rapidement, de nouvelles mutations ont été mises en exergue, notamment chez la mouche domestique. En Martinique, la mutation V1016I *kdr* chez *Ae. aegypti* induit une meilleure récupération de l'effet knock-down et donc une meilleure survie des moustiques adultes (Marcombe *et al*, 2012). En Côte d'Ivoire, on retrouve la mutation L1014F chez les deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (Koffi *et al*, 2013). Certaines mutations, souvent inefficaces seules, entraînent une résistance jusqu'à 500 fois plus importante pour les pyréthriinoïdes de type II lorsqu'elles sont associées à la mutation *kdr* (Raymond-Delpech *et al*, 2005). Ces doubles résistances provoquant des effets synergiques et touchant à la fois les sites du DDT et des pyréthriinoïdes sont appelées mutations super-*kdr*.

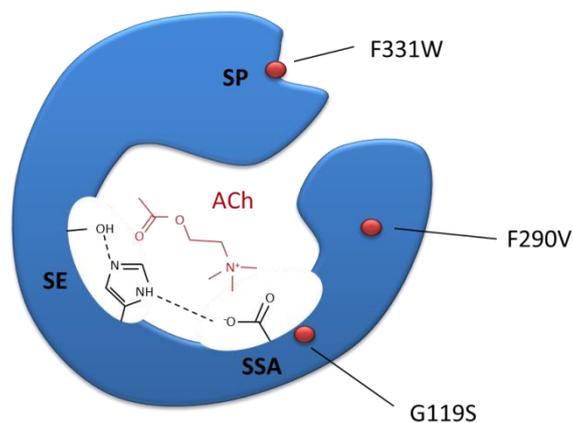
### 2.5.2. Acétylcholinestérase

L'AChE est l'enzyme hydrolysant l'acétylcholine dans la fente synaptique, permettant la fermeture des canaux liés aux récepteurs cholinergiques (Weill *et al*, 2003). En présence de carbamates ou d'OP, l'AChE est séquestrée par l'insecticide qui se fixe sur le site catalytique de l'enzyme, formant un complexe stable incapable d'exercer son rôle enzymatique. L'acétylcholine s'accumule alors dans la fente synaptique, ce qui finit par paralyser l'insecte avant de le tuer (Haubruge et Amichot, 1998 ; Carnevale et Robert, 2009) (**Figure 21**).



**Figure 21 :** Représentation schématique d'une fente synaptique. L'arrivée d'un potentiel d'action (PA) induit une dépolarisation de la membrane activant les canaux calcium dépendants du potentiel. L'entrée de calcium provoque la migration des vésicules et la sécrétion de l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. La libération d'ACh permet l'activation de récepteur cholinergique de type nicotinique (nAChR) post-synaptiques, ce qui induit une entrée d'ions sodium et donc la transmission du signal. Lorsque l'ACh s'accumule, elle se fixe sur les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChR) pré-synaptiques, permettant un rétrocontrôle de la libération de l'ACh. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme hydrolysant l'ACh ce qui permet au neurone post-synaptique de revenir à son état de repos. L'insecticide carbamate ou organophosphoré se fixe sur le site catalytique de l'enzyme, empêchant l'hydrolyse de l'ACh.

Chez *An. gambiae*, il existe deux gènes, *ace-1* et *ace-2*, codant respectivement pour AChE1 et AChE2 qui ont un pourcentage d'homologie de 53%. Cependant, l'AChE2 codée par *ace-2*, homologue du gène codant pour l'AChE de la drosophile, n'est pas la cible des OP et des carbamates qui agissent préférentiellement sur l'AChE1 codée par *ace-1* (Weill *et al*, 2003). C'est pourquoi les phénomènes de mutations n'ont été découverts que sur ce gène. Par exemple, on retrouve la mutation G119S du gène *ace-1*, qui génère une résistance croisée aux carbamates et aux OP, chez *An. gambiae*, *An. albimantus* et *Cx. pipiens* (Weill *et al*, 2003 ; Carnevale et Robert, 2009). Deux autres mutations ont été identifiées, F290V chez *Cx. pipiens* et F331W chez *Cx. triaeniorhynchus*, tous deux résistants au dichlorvos, un OP (Alout *et al*, 2008) (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Représentation schématique de l'AChE1. De nombreuses mutations se retrouvent au niveau du site catalytique, entraînant une résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates. SE : site estérasique, SP : site de liaison périphérique, SSA : site de liaison de substrat anionique (d'après Soreq et Seidman, 2001 ; Dvir *et al*, 2010).

## Chapitre V – Nouvelles stratégies de LAV

---

### 1. Gestion des résistances

Les stratégies de LAV ont contribué à améliorer la santé publique dans de nombreux pays, notamment les pays en voie de développement. Les épidémies de paludisme ont nettement diminué depuis quelques années. Néanmoins, l'utilisation massive de certains produits chimiques dans la gestion des vecteurs a mis en péril leur efficacité par l'apparition de résistances aux pyréthrinoïdes, aux carbamates et aux OP. En effet, la résistance aux pyréthrinoïdes a été signalée dans 41 pays à travers le monde, soulignant la nécessité urgente de trouver une alternative à ces insecticides (World Malaria Report 2011).

Pour contourner ces problèmes de résistances, il est nécessaire de savoir prévenir et de limiter la croissance des individus résistants au sein d'une population ciblée. Pour cela, il devient important d'avoir une meilleure compréhension et une meilleure évaluation des réponses physiologiques et comportementales des moustiques par rapport aux produits chimiques. Ainsi, l'une des stratégies envisagées est d'associer ce que l'on nomme la gestion raisonnée de la résistance aux insecticides (*Insecticide Resistance Management*) avec l'utilisation de nouvelles substances biocides ou non-biocides possédant des modes d'action différents de ceux couramment employés (Haubruge et Amichot, 1998).

La gestion des résistances implique de connaître l'état de développement de résistances d'une population d'insectes. Cette étude est possible notamment en utilisant des biomarqueurs présents dans l'environnement de l'insecte cible. Ces biomarqueurs, comme les poisons présents dans les gîtes larvaires, possèdent des enzymes de biotransformation pouvant être inductibles ou inhibées par la présence d'un produit exogène toxique, comme un insecticide. L'analyse de la perturbation de ces enzymes permet ainsi d'évaluer l'exposition à cet insecticide et d'en diminuer l'impact en adaptant les traitements (Haubruge et Amichot, 1998).

La gestion raisonnée des résistances passe aussi par une utilisation contrôlée des substances toxiques afin de maintenir une population d'insectes sensibles, généralement plus viables que les insectes résistants dans un milieu sans insecticides. Pour cela, il est nécessaire de comprendre l'impact des facteurs liés aux traitements, à savoir la nature des produits utilisés, la rémanence, les doses employées, la fréquence et le mode d'application, ainsi que l'étendue et l'homogénéité des traitements. Malheureusement, les insecticides tels que les pyréthrinoïdes sont déjà utilisés pour de fortes concentrations.

La stratégie la plus viable à l'heure actuelle reste donc d'employer, à de faibles doses et de manière raisonnée, des substances possédant un mode d'action différent des pyréthriinoïdes, des carbamates ou des OP. L'intérêt d'utiliser une substance chimiqu agissant différemment des insecticides fréquemment impliqués en LAV est avant tout de pouvoir s'affranchir des résistances déjà fortement exprimées dans les populations d'insectes ciblés. Cette stratégie peut être d'autant plus optimisée en combinant deux types de produits de familles chimiques distinctes. En effet, si l'apparition d'une résistance à un insecticide est considérée comme un évènement relativement rare, la probabilité de voir une résistance apparaître pour chaque composé du mélange devient d'autant plus rare (Curtis, 1985). L'association de deux produits chimiques est donc particulièrement intéressante pour contourner les problèmes de résistances en LAV.

## 2. Synergie de deux produits chimiques

Le terme de synergie s'emploie lorsque l'exposition simultanée à plusieurs produits chimiques provoque des effets sur l'organisme supérieurs à la somme des effets provoqués par les produits utilisés séparément. Ainsi l'effet synergique de produits de familles chimiques différentes permet d'augmenter l'efficacité de l'insecticide tout en réduisant les doses utilisées pour chacun des produits chimiques (Corbel *et al*, 2006).

### 2.1. Deux insecticides

Le mélange de plusieurs produits chimiques pour contourner le problème de résistance à déjà été envisagé dans de nombreuses études. En agriculture, l'utilisation d'une association entre des pyréthriinoïdes et des OP a permis de retardé l'apparition de résistance à ces deux types de familles chimiques durant plus de 20 ans chez *Helicoverpa armigera*, une larve ravageuse des cultures de coton en Afrique de l'Ouest (Martin *et al*, 2000).

Depuis le début des années 2000, les études se multiplient sur les vecteurs de maladies. En 2003, Corbel et ses collaborateurs ont testé un mélange de propoxur (carbamate) et de perméthrine (pyréthriinoïde) sur les larves sensibles de *Cx. quinquefasciatus*. Une synergie entre ces deux produits a été observée, entraînant un taux de mortalité proportionnel à la concentration du mélange (Corbel *et al*, 2003). L'année suivante, ils ont démontré un effet synergique sur les larves résistantes aux pyréthriinoïdes, mais un effet antagoniste sur les larves résistantes aux carbamates (Corbel *et al*, 2004a). Récemment, une étude menée sur des chiens a permis de montrer l'efficacité de l'effet répulsif de la combinaison fipronil (phénylpyrazole) et perméthrine sur plusieurs espèces de moustiques : *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* et *Cx. pipiens* (Fankhauser *et al*, 2015).

L'ajout d'inhibiteurs d'enzyme, comme le tribufos pour les estérases ou le PBO pour les oxydases, améliore l'effet synergique des mélanges d'insecticides. En Côte d'Ivoire, des essais de mélange avec de la perméthrine (pyréthrianoïde) et du carbosulfan (carbamate) ont montré une augmentation significative du taux de mortalité chez les populations d'*An. gambiae* résistantes pré-exposées au PBO (Koffi *et al*, 2013). De même, l'association d'insecticides néonicotinoïdes (thiaméthoxame, nitenpyrame ou thiaclopride) avec de la deltaméthrine et du PBO est efficace contre les moustiques *Ae. aegypti* résistants aux pyréthrianoïdes, induisant une mortalité comprise entre 55,9% et 70,7%, contre 17% pour la deltaméthrine seule (Darriet et Chandre, 2013).

Cet effet synergique peut être explicable selon deux théories. La combinaison des deux insecticides surpasse les capacités de détoxification du moustique. En effet, certains insecticides étant le substrat des mêmes enzymes, la présence compétitive de deux produits empêcherait la dégradation de l'un d'eux, ce qui peut favoriser son effet toxique (Corbel *et al*, 2004a). On peut aussi supposer que les deux produits ont un impact plus important en agissant simultanément sur des cibles moléculaires différentes. Les carbamates et les OP inhibent l'AChE, ce qui provoque une accumulation de l'ACh dans la fente synaptique. Dans un même temps, les pyréthrianoïdes bloquent les canaux sodium dans leur état ouvert, induisant une répétition des PA et donc une libération accrue d'ACh. L'excès cumulé d'ACh au niveau des synapses induit ainsi une mortalité pour de plus faibles doses de produits (Corbel *et al*, 2003).

En 2006, une étude basée sur des expériences biologiques et électrophysiologiques chez la blatte a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet synergique des deux insecticides. L'accumulation d'ACh dans la fente synaptique active les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChR) présents en position présynaptique et impliqués dans le mécanisme de rétro-action négative. Ce mécanisme entraîne une diminution du potentiel post-synaptique exciteur (EPSP) susceptible de déclencher un potentiel d'action (Corbel *et al*, 2006).

Récemment, il a été constaté qu'il était aussi possible d'améliorer l'effet d'un insecticide par l'induction d'une perturbation métabolique. Ainsi, l'utilisation de pesticides de type formamidine, interagissant avec les récepteurs à l'octopamine, provoque une diminution du développement larvaire chez *Ae. aegypti*. De plus, un effet synergique a été constaté en présence de deltaméthrine (pyréthrianoïde), de dinotéfurane (néonicotinoïde) ou de thiaméthoxame (néonicotinoïde), se traduisant par une libération accrue de glucose et donc un épuisement rapide des larves (Ahmed *et al*, 2015).

Toutes ces études apportant une meilleure compréhension du mécanisme d'action d'un mélange synergique de deux insecticides permettent d'envisager une meilleure utilisation de ces produits en lutte anti-vectorielle.

## 2.2. Insecticides/répulsifs

Les tests de synergie avec les pyréthriinoïdes sont nombreux, malheureusement les résistances des moustiques à ces insecticides restent toujours présentes. L'intérêt de mélanger un insecticide non-pyréthriinoïde avec un répulsif prend alors tout son sens, puisque cette combinaison permet de récupérer l'effet knock-down des pyréthriinoïdes, essentiel dans la protection contre les vecteurs de maladie.

En 2005, une étude effectuée sur une combinaison de propoxur (CL30) et de DEET a montré chez *Ae. aegypti* un effet irritant similaire à celui induit par de la deltaméthrine (CL100) (Pennetier *et al*, 2005). Plus tard, cet effet est confirmé chez *An. gambiae* en présence de DEET ou de KBR3023 et d'un OP, le pyrimiphos méthyl (Pennetier *et al*, 2007). Cet effet synergique est supérieur ou égal à celui observé en présence d'un mélange de pyréthriinoïdes et de carbamate ou d'OP contre les moustiques *Anopheles*.

Ce n'est qu'en 2009, que des tests sur le terrain montrent une efficacité de ce type de combinaison contre les populations de moustiques sauvages résistant aux pyréthriinoïdes et aux carbamates. Ainsi, les mélanges pyrimiphos méthyl et DEET / KBR3023 sont non seulement efficace contre les moustiques résistants, mais de plus ils ne favorisent pas de pression de sélection de résistances (Pennetier *et al*, 2009).

Dans une autre étude, Bonnet et ses collaborateurs suggèrent l'implication des monooxygénases à cytochrome P-450 dans les interactions synergiques entre le DEET et le propoxur, confirmant un réel intérêt pour ce genre de combinaisons chimiques contre les moustiques développant des résistances métaboliques (Bonnet *et al*, 2009). Ceci est d'autant plus intéressant que la synergie observée permet de diminuer les doses de produits toxiques utilisés pour l'application sur moustiquaire, jusqu'à environ six fois par rapport à l'insecticide seul (Pennetier *et al*, 2005).

Si toutes ces combinaisons présentent un intérêt certain en LAV, la méconnaissance du mode d'action moléculaire des répulsifs et donc de leur interaction avec un insecticide ne permet pas d'anticiper les effets potentiellement toxiques pour l'être humain, particulièrement à plus fortes doses. Dans ce contexte, un mélange de produits chimiques doit être considéré comme un nouveau produit chimique avec les évaluations de toxicité et d'écotoxicité qui y sont liées (Pennetier *et al*, 2009). Ainsi, si les répulsifs ont jusqu'à présent des profils

toxicologiques acceptables, certaines études suggèrent qu'en présence d'autres produits chimiques, ils peuvent induire des phénomènes de toxicité. On considère notamment que les interactions entre la perméthrine, le DEET et le pyridostigmine bromide, un inhibiteur des AChE prévenant des effets des gaz de combat, sont potentiellement à l'origine des syndromes de la Guerre du Golfe (Riviere *et al*, 2002).

Aussi, afin de limiter les risques de contact avec des insecticides non recommandés pour l'application sur moustiquaire, comme les carbamates, des études ont été menées en séparant les deux types de produits chimiques. En appliquant un pyréthrianoïde sur moustiquaire et un carbamate sur une bâche plastique couvrant la partie supérieure des murs, il est possible de limiter le contact direct tout en maintenant une bonne efficacité, notamment contre les populations d'*An. gambiae* résistantes (Djèrontin *et al*, 2009).

### 3. Optimisation de l'efficacité des produits chimiques

La combinaison entre deux substances de famille chimique distincte semble être une stratégie de LAV très prometteuse. Malheureusement, les répulsifs sont des composés très volatils, il a donc fallu envisager de nouvelles formulations pour prolonger l'efficacité des combinaisons des produits imprégnant les tissus.

En 2012, Faulde et ses collaborateurs ont testé un mélange de perméthrine et de répulsif sur une moustiquaire avec une multicouche de revêtement de polymère permettant une plus longue durée du produit. Si l'utilisation d'IR3535 ne permet pas une liaison optimale des multi-couches de polymère imprégnées de perméthrine, diminuant la concentration en insecticide, un effet knock-down (KD) synergique était visible sur *Ae. aegypti*. Ainsi, le temps pour obtenir 100% de moustiques KD était réduit de 14 à 26%. L'utilisation du DEET en combinaison avec la perméthrine est cependant nettement plus efficace que la combinaison de deltaméthrine et d'IR3535, permettant une protection contre les piqûres d'*Ae. aegypti* durant un maximum de 83 semaines (Faulde et Nerhing, 2012).

Depuis quelques années, la micro-encapsulation est une méthode de formulation des produits chimiques de plus en plus envisagée. Dans une étude récente, la pulvérisation de DEET micro-encapsulé a démontré le potentiel insecticide de ce répulsif, provoquant un taux de mortalité similaire à celui du pyrimiphos méthyl (Kitau *et al*, 2014). De même, des tests menés sur *Ae. albopictus* ont montré que la micro-encapsulation de DEET et de perméthrine permet d'augmenter le temps d'efficacité après lavage des moustiquaires. Ainsi les moustiquaires imprégnées conservent une activité insecticide supérieure à 60% après 20 lavages alors qu'elle descend à 0% avec les produits non encapsulés (Yao *et al*, 2015).

L'utilisation de virus spécifiques aux insectes apparaît aussi comme une stratégie de lutte prometteuse. Ainsi notamment l'infection de cellules d'insecte par le baculovirus *Autographa californica* induit une augmentation de calcium intracellulaire (Licznar *et al*, 2014). Or, des études antérieures ont montré que les voies de signalisation calcium dépendantes sont impliquées dans la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides (Lavialle-Defaix *et al*, 2010 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012). L'augmentation de calcium induite par le baculovirus a ainsi augmenté la sensibilité des AChE au chlorpyrifos-méthyl (OP) (Licznar *et al*, 2014).

## Chapitre VI – Objectif

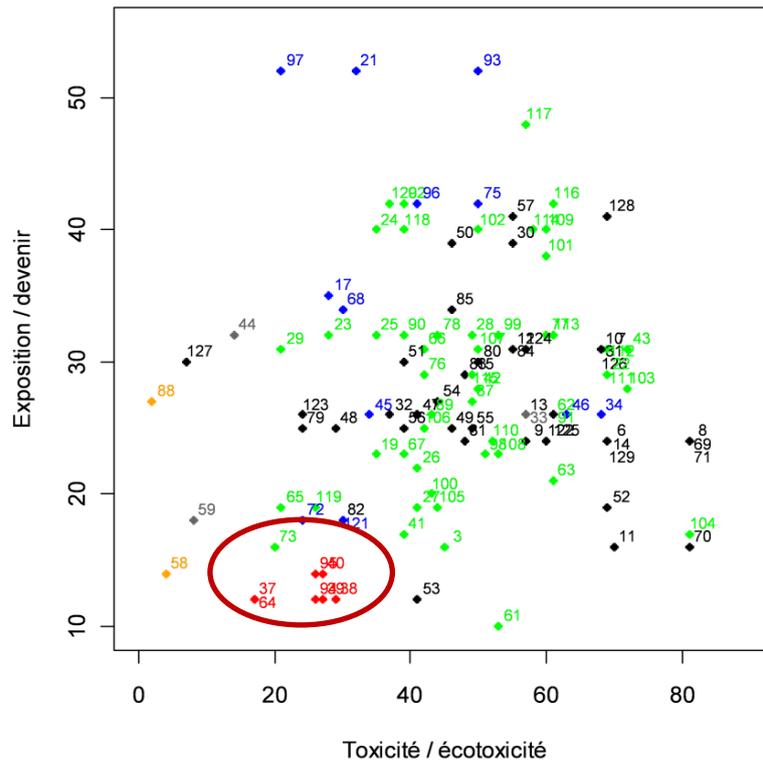
---

Dans ce contexte de réémergence de maladie vectorielle et de pression de sélection de résistances toujours plus pesant sur l'efficacité de la LAV, il est nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies efficaces permettant à la fois de contourner ces phénomènes de résistances aux insecticides, d'optimiser le traitement et de diminuer les doses afin de limiter les risques de toxicité pour la santé publique et environnementale.

Les synergies de deux produits toxiques de familles chimiques distinctes semblent être un moyen de lutte des plus attrayants. Malheureusement la méconnaissance du mode d'action des produits déjà sur le marché, ainsi que la conception d'une combinaison de deux substances comme étant un nouveau produit, limitent l'utilisation de ces synergies.

Dans une première partie, nous chercherons à montrer l'intérêt d'employer un répulsif dans une association synergique, notamment en déterminant s'il est capable d'induire un effet synergique potentialisateur de l'insecticide *via* le calcium intracellulaire. En effet, des études antérieures ont montré l'implication des voies de signalisation calcium-dépendantes dans la modulation des cibles moléculaires aux insecticides (Lavialle *et al*, 2010 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012). Ainsi, grâce à la technique d'imagerie calcique, il est possible de mesurer les variations de calcium induites par les répulsifs sélectionnés, le DEET et l'IR3535.

Dans un second temps, nous étudierons les effets synergiques du répulsif sélectionné avec un insecticide néonicotinoïde sur les propriétés électrophysiologiques des neurones d'insectes grâce à la technique du patch-clamp. Le choix de la famille d'insecticides à tester fait suite au rapport d'expertise collective publié par l'Anses en 2011 et 2013 (**Figure 23**). Dans ce rapport, les différentes conclusions indiquent que les néonicotinoïdes constitueraient une famille d'insecticides d'intérêt en LAV. De plus, des études réalisées au laboratoire ont montré que l'efficacité des néonicotinoïdes dépend du calcium intracellulaire (Courjaret et Lapied, 2001 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012). Parmi les néonicotinoïdes, il a été rapporté très récemment que le thiaclopride présente un profil toxicologique/écotoxicologique acceptable (Darriet et Chandre, 2013). Par conséquent, ce néonicotinoïde semble particulièrement intéressant dans le cadre d'une association avec un répulsif.



**Figure 23 :** Carte des scores SIRIS pour les différentes familles chimiques de substances utilisées ou potentiellement utilisables comme adulticides en LAV. Noir : Pyréthrinoïdes, Gris : Benzoylurées, Vert : OP et carbamates, Orange : Autres IGR, Rouge : Néonicotinoïdes, Bleu : Neurotoxiques divers (d'après rapport d'expertise collective de l'Anses, 2011)

Une dernière partie permettra d'exposer les résultats obtenus avec le mélange sélectionné en condition *in vivo* sur des moustiques femelles *An. gambiae*. Ces tests, appelés tests en cône, exposent les moustiques à des moustiquaires imprégnées, permettant d'évaluer leur efficacité en conditions de laboratoire.



# **Partie 2 :**

# **Matériels et méthodes**



## Chapitre I – Modèle biologique : la blatte *Periplaneta americana*

---

Dans le cadre des expérimentations *in vitro*, le modèle d'étude biologique est le Dorsal Unpaired Median (DUM) neurone de la blatte *Periplaneta americana*. Ces cellules neurosécrétrices sont couramment utilisées pour étudier le mode d'action des molécules à effet insecticide car elles expriment les canaux et les récepteurs cibles des insecticides, elles sont facilement isolables et maintenues en culture (Lapied *et al*, 1989), elles conservent les caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques des neurones *in situ* et elles sont adaptées à la technique d'imagerie calcique et à la technique électrophysiologique du patch-clamp.

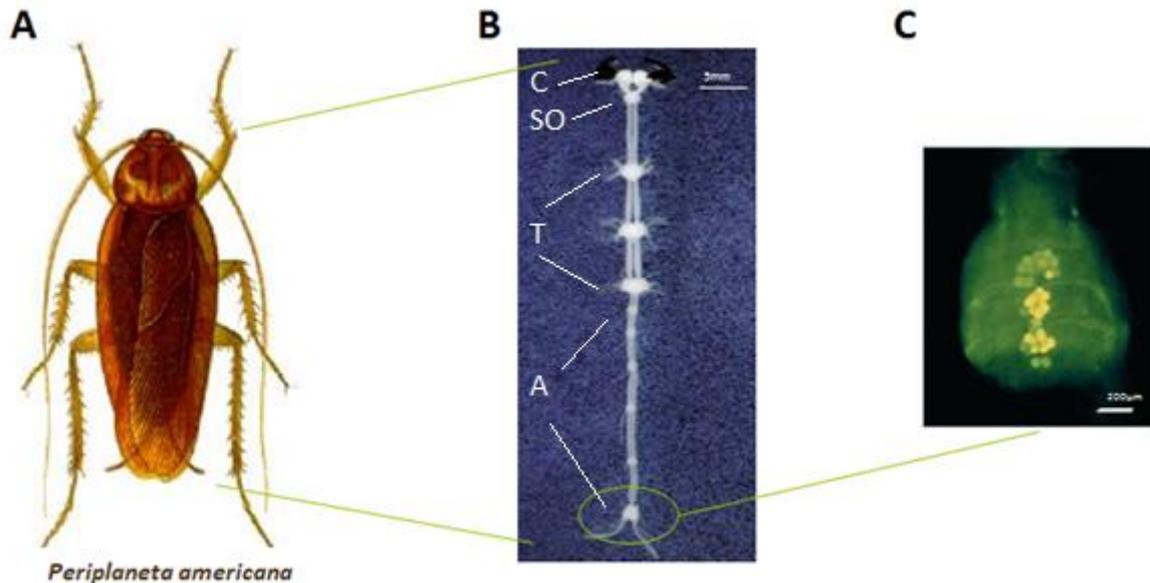
### 1) Les Dorsal Unpaired Median (DUM) neurones de la Blatte *Periplaneta americana*

La blatte est insecte relativement ancien, classé dans la famille des *Blattidae*. Plus de 350 espèces sont répertoriées, mais seulement quelques-unes sont considérées comme des nuisibles en colonisant les habitations. C'est le cas de la blatte américaine *Periplaneta americana* (**Figure 24A**), considérée comme un modèle neurophysiologique intéressant en raison de la taille et de la connaissance des caractéristiques biophysiques de ses neurones (Stankiewicz *et al*, 2012).

Comme pour les autres insectes, le système nerveux central (SNC) de la blatte *Periplaneta americana* est constitué d'une double chaîne nerveuse ventrale située sous le tube digestif. Cette chaîne nerveuse, partant du cerveau pour rejoindre les cerques, est formée de masses ganglionnaires reliées entre elles par des connectifs entourés d'une gaine conjonctive (**Figure 24B**). Chaque ganglion correspond à un segment du corps de l'insecte et agit comme un cerveau secondaire. La répartition se fait selon leur localisation anatomique : les ganglions cérébroïdes (C) correspondent au cerveau, les ganglions sous-œsophagiens (SO) agissent sur les pièces buccales, les ganglions thoraciques (T1 à T3) innervent les pattes et les ailes, et les ganglions abdominaux (A1 à A6) contrôlent notamment les organes reproducteurs.

Au sein de chaque ganglion de la chaîne nerveuse ventrale (à l'exception des ganglions cérébroïdes), il est possible d'identifier une population de cellules

neurosecrétices, appelées Dorsal Unpaired Median (DUM) neurones en raison de leur position médiane sur la surface dorsale des masses ganglionnaires. En effet, ces neurones, dénommés ainsi à partir de l'étude réalisée par Hoyle et ses collaborateurs (1974), proviennent de cellules souches impaires nommées neuroblastes médians (Median Neuroblaste, MNB) localisés dans les primordia, les ébauches aboutissant au développement des ganglions (Bräunig et Pflüger, 2001).

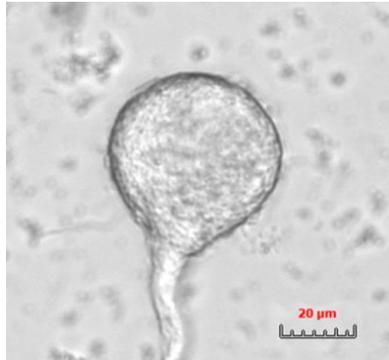


**Figure 24 :** A- Représentation d'une blatte mâle *Periplaneta americana*. B- Photographie d'une chaîne nerveuse de blatte *Periplaneta americana* A : ganglions abdominaux, C : ganglion cérébroïde, SO : ganglion sous-œsophagien, T : ganglions terminaux (d'après Mizunami, 2006). C- Localisation des corps cellulaires des DUM neurones du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (d'après Sinakevitch *et al*, 1995).

Si les DUM neurones se situent dans tous les ganglions exceptés les ganglions cérébroïdes, on les retrouve majoritairement au sein du dernier ganglion abdominal (DGA ou A6) sous la forme d'îlots de DUM neurones (**Figure 24C**). En effet, le DGA correspond à la fusion de cinq ganglions primitifs (A7 à A11), corrélée avec la fusion des derniers segments du corps de l'insecte (Sinakevitch *et al*, 1995). Les DUM neurones peuvent être facilement isolés du reste des populations neuronales selon plusieurs critères décrits dans les parties suivantes.

## 2) Critères morphologiques des DUM neurones

Les DUM neurones sont caractérisés par un corps cellulaire pyriforme de 30 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre (Bräunig et Pflüger, 2001). Comme pour toute cellule neuronale, il émerge de ce corps cellulaire un neurite primaire dont l'arborisation définit la classification des DUM neurones (**Figure 25**).



**Figure 25 :** Photographie d'un DUM neurone visualisé au microscope optique (grossissement x40).

Les DUM neurones efférents présentent une arborisation en « T » dont les neurites secondaires sortent symétriquement du ganglion *via* des nerfs périphériques. Ils sécrètent et libèrent de l'octopamine, une amine biogène considérée comme étant un neuromodulateur, un neurotransmetteur et une neurohormone (Bräunig et Pflüger, 2001). Ils innervent principalement les muscles squelettiques et viscéraux, mais sont aussi impliqués dans la modulation des organes sensoriels (Ramirez et Orchard, 1990, Bräunig et Pflüger, 2001). Ainsi, les DUM neurones thoraciques vont principalement moduler les pattes et les ailes tandis que les DUM neurones se trouvant au niveau de l'abdomen vont innervent les muscles squelettiques du système respiratoire et de la reproduction (Sinakevitch *et al*, 1995 ; Roeder, 1999).

Les DUM neurones intersegmentaires possèdent une arborisation en « H » permettant de relier deux ganglions entre eux grâce aux connectifs. Ils synthétisent essentiellement de l'acide- $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Ils participent de ce fait à la propagation des informations le long de la chaîne nerveuse.

Les DUM interneurones locaux sont également des cellules de types GABAergiques mais ont quant à elles une arborisation neuritique qui se propage uniquement au sein du ganglion. Ainsi, ils permettent l'intégration des signaux au sein de la masse ganglionnaire. Ils sont reconnaissables par leur diamètre plus petit (20-30 $\mu\text{m}$ ).

### 3) Critères électrophysiologiques des DUM neurones

Les DUM neurones, notamment les DUM neurones efférents du DGA, ont un potentiel de membrane compris entre -45 mV et -60 mV. Ils se distinguent par une activité électrique de type pacemaker. Ainsi, ils génèrent spontanément des potentiels d'action (PA) de grande amplitude (entre 90 et 110 mV) à une fréquence régulière sans excitation afférente (Lapied *et al*, 1989). Cette propriété intrinsèque au corps cellulaire est déclenchée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel et modulée par des canaux ioniques générant des courants dits « de repos » (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher *et al*, 2001 ; Defaix et Lapied 2005 ; Laviaille-Defaix *et al*, 2006). L'utilisation de la technique électrophysiologique du patch-clamp a permis d'étudier les caractéristiques des canaux impliqués ainsi que les mécanismes de régulation de ces différents courants ioniques (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher *et al*, 2001 ; Defaix et Lapied 2005 ; Laviaille-Defaix *et al*, 2006).

### 4) Critères biochimiques des DUM neurones

Les études menées sur les DUM neurones ont permis d'identifier de nombreux canaux et récepteurs ionotropes susceptibles d'être impliqués dans la transmission de l'influx nerveux et pouvant être des cibles potentielles pour les insecticides neurotoxiques couramment utilisés dans la lutte contre les ravageurs de culture et les vecteurs de maladies.

Il est connu notamment que les DUM neurones expriment les canaux sodium dépendants du potentiel ciblés par le DDT et les pyréthriinoïdes (Lapied *et al*, 1999). Ainsi en 2009, le gène du canal PaNa<sub>v</sub>1, orthologue à DmNa<sub>v</sub> de la drosophile, a été identifié chez la blatte *Periplaneta americana* (Moignot *et al*, 2009). Différents canaux calcium sont aussi présents à la membrane du corps cellulaire du DUM neurone (Grolleau et Lapied, 1996 ; Wicher, 2001). De même, des voies de signalisation intracellulaire dépendant du calcium ont été identifiées (Ryglewski *et al*, 2007).

Des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR) ont été caractérisés dans de nombreuses études. Ainsi, chez *Periplaneta americana*, deux types de nAChRs sont insensibles à l'alpha-bungarotoxine. Le nAChR1, qui est bloqué par la d-tubocurarine, est sensible à l'imidaclopride, alors que le nAChR2, bloqué par l'α-conotoxine, est naturellement insensible à cet insecticide (Courjaret et Lapied, 2001). De plus, des récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChR), de sous-type M1, ont été identifiés au niveau du soma des DUM neurones (Lapied *et al*, 1992).

Les DUM neurones expriment aussi des récepteurs au glutamate et des récepteurs au GABA, deux neurotransmetteurs inhibiteurs. Ces deux types de récepteurs perméables aux ions chlorures induisent une hyperpolarisation membranaire et sont les cibles d'un insecticide de type phénylpyrazole, le fipronil (Raymond *et al*, 2000 ; Le Corronc *et al*, 2002).

## Chapitre II – Techniques expérimentales sur neurones isolés

---

### 1) Dissociation des DUM neurones

#### 1.1. Présentation du matériel biologique

Les DUM neurones, employés dans notre étude comme matériel biologique de référence pour l'imagerie calcique et la technique du patch-clamp, sont des cellules isolées du dernier ganglion abdominal (DGA) des blattes *Periplaneta americana*. Ces blattes sont élevées au sein du laboratoire à une température constante de 29 °C et une photopériode alternant 12 heures de lumière artificielle et 12 heures d'obscurité. Les insectes sont nourris avec des granulés ainsi que des pommes, assurant un apport en eau et permettant une réduction de la masse adipeuse. Pour des raisons pratiques, seules les blattes adultes mâles sont prélevées. En effet, le système nerveux central de cet insecte est plus accessible chez le mâle que la femelle, car il est recouvert de moins de tissus adipeux, facilitant ainsi la dissection des ganglions. De ce fait, la majeure partie des connaissances biologiques et physiologiques concernant ce modèle biologique proviennent d'expérimentations effectuées sur des mâles (Hue et Callec, 1990).

#### 1.2. Protocole de dissociation

L'isolement des corps cellulaires de DUM neurones du DGA résulte d'une dissociation à la fois mécanique et enzymatique (**Figure 26**). Mise au point au sein du laboratoire (Lapied *et al*, 1989), cette technique de dissociation est réalisée sous une hotte à flux laminaire horizontal, permettant ainsi de limiter le risque de contamination bactérienne et fongique des cellules mises en culture. Une fois la paillasse et les instruments nettoyés à l'alcool (70 %), différents liquides physiologiques (LP), dont la composition se trouve **Tableau 1**, sont préparés extemporanément puis filtrés grâce à des filtres stériles (Ministart Sartorius®, 0,2 µm).

**Tableau 1 :** Compositions des différents liquides physiologiques (LP) utilisés pour la dissociation cellulaire et la mise en culture des DUM neurones issus de ganglions de blatte adulte mâle.

Composés	LP1	LP2	LP3	LP4
NaCl (mM)	200	200	200	200
KCl (mM)	3,1	3,1	3,1	3,1
MgCl <sub>2</sub> (mM)	4	4	4	4
CaCl <sub>2</sub> (mM)	5	5	5	5
HEPES (mM)	10	10	10	10
Saccharose (mM)	50	50	50	50
Pénicilline (UI/mL)	/	100	/	50
Streptomycine (mg/mL)	/	10	/	5
Collagénase (UI/mL)	/	/	600	/
SVF (%)	/	/	/	5
pH (ajusté avec NaOH 1M)	7,4	7,4	7,4	7,4

### 1.3. Prélèvements des derniers ganglions abdominaux

Les blattes ont été préalablement placées au réfrigérateur à 4 °C durant 15 minutes afin de les anesthésier. Après avoir sectionné la tête, les pattes et les ailes, chaque blatte est positionnée sur sa face dorsale. En effet, le système nerveux central des insectes étant situé face ventrale, la dissection sur le dos permet de réduire le risque de contamination qui résulterait de la manipulation du tube digestif. Ainsi, la blatte est épinglée sur un support en polystyrène recouvert d'aluminium et préalablement désinfecté à l'alcool (70 %). Sous la loupe binoculaire (grossissement x 6,4), la cuticule recouvrant la face ventrale de l'abdomen de l'insecte est découpée à l'aide de microciseaux, puis soulevée avec une pince. La cavité abdominale est alors hydratée avec du LP1 auquel est ajouté des antibiotiques (pénicilline à 100UI/mL et streptomycine à 100 µg/mL, Sigma, France), ceci afin d'éviter le dessèchement ainsi que la contamination de la préparation lors de la manipulation des viscères.

Après avoir écarté, à l'aide d'une pince, la glande conglobée et les glandes accessoires, il est possible de discerner la chaîne nerveuse, identifiable grâce à ces connectifs translucides. Le prélèvement du DGA se fait alors par sectionnement des nerfs cercaux, puis des connectifs reliant ce ganglion au reste de la chaîne nerveuse. Le DGA prélevé est alors déposé dans une boîte de culture (35 mm, stérile R, Falcon®, AES, France) contenant du LP2. Un nettoyage minutieux est alors effectué à l'aide d'aiguilles (21G, stérile EO, Neolus Terumo®) afin de retirer les ramifications nerveuses et les restes trachéens. Cette étape est répétée six fois, cette technique nécessitant la dissociation de six ganglions pour récupérer un nombre suffisant de DUM neurones.

#### 1.4. Digestion enzymatique

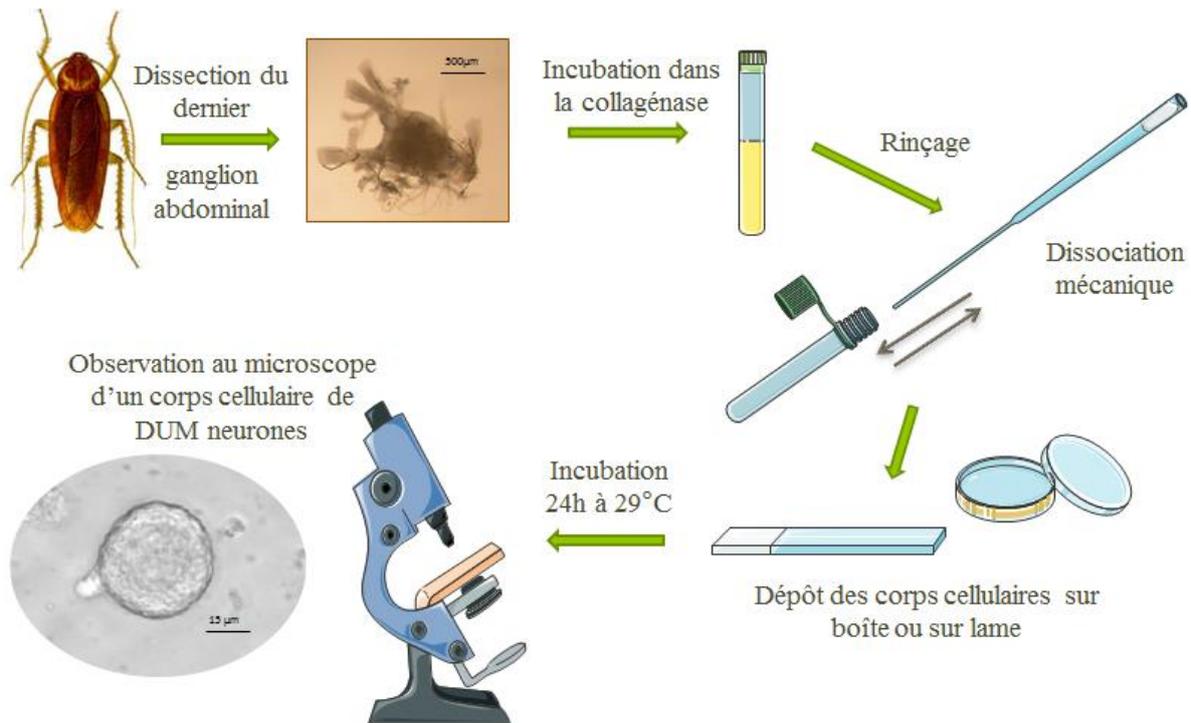
Les six ganglions prélevés sont déposés dans un tube à hémolyse stérile contenant de la collagénase type IA (280UI/mL, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA) diluée dans du LP (LP3) de façon à avoir 600U nécessaires à la digestion des lipides maintenant les cellules en îlot. Cette digestion enzymatique est effectuée au sein d'une étuve maintenue à température constante de 29 °C en atmosphère humide durant 45 minutes. Les ganglions sont alors rincés dans un bain de LP1 durant environ 5 minutes.

#### 1.5. Dissociation mécanique

Suite au rinçage, les ganglions sont transférés dans un tube à hémolyse contenant du LP4 enrichi en sérum de veau fœtal (Invitrogen, USA) qui permet de stabiliser les membranes cellulaires. La dissociation mécanique des cellules neuronales s'effectue par aspirations-refoulements successifs à l'aide de pipettes Pasteur de verre dont le diamètre est progressivement réduit à la flamme. Le premier et plus large diamètre permet de désorganiser la structure des ganglions, le deuxième assure l'isolement des îlots de DUM neurones, enfin le troisième et dernier diamètre sert à individualiser les corps cellulaires.

Pour les expériences d'imagerie calcique, les cellules isolées sont déposées sur des lamelles de verre (20x40mm, Propper, Smehtwick, Angleterre) dans l'optique de limiter les interférences entre le support et le faisceau lumineux. Ces lames sont préalablement traitées avec de la poly-D-lysine (100 µg/mL, MM 70000-150000, Sigma, France) qui permet l'adhérence des corps cellulaires neuronaux sur la surface de verre. Ces lamelles contenues dans des boîtes de Pétri (50 mm stérile R, Falcon, AES France) sont ensuite placées dans l'étuve à 29 °C en atmosphère humide durant 24 heures.

Pour les expériences de patch-clamp, les DUM neurones sont déposés directement dans des boîtes de Pétri (35 mm, stérile R, Falcon, AES France) préalablement traitées avec de la Poly-D-lysine selon les conditions vues précédemment. Les boîtes sont alors incubées dans l'étuve à 29 °C en atmosphère humide durant 24 heures.



**Figure 26 :** Protocole de dissociation et de mise en culture à court terme des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*.

## 2) Technique d'imagerie calcique sur neurones isolés

### 2.1. Principe

L'imagerie calcique est une technique permettant de visualiser le calcium dans une cellule ou un milieu, ce qui rend possible le suivi de l'activité interne ou sécrétoire d'une cellule stimulée. En effet, le calcium joue un rôle essentiel dans la physiologie des cellules, et notamment dans la signalisation intracellulaire où il participe à l'activation enzymatique, l'expression des protéines ou encore le maintien du potentiel de membrane. Au niveau présynaptique, il participe notamment à l'exocytose des neurotransmetteurs (Grienberger et Konnerth, 2012).

La mesure de la concentration en calcium intracellulaire au sein des corps cellulaires de neurones est possible en utilisant des indicateurs se liant au calcium. Ces marqueurs peuvent être répartis selon trois groupes principaux :

1- les photoprotéines, telles que les aequorines issues des méduses *Aequorea*, sont considérées comme des marqueurs luminescents, car, en se liant au calcium, elles changent de conformation et émettent de la lumière (Grienberger et Konnerth, 2012).

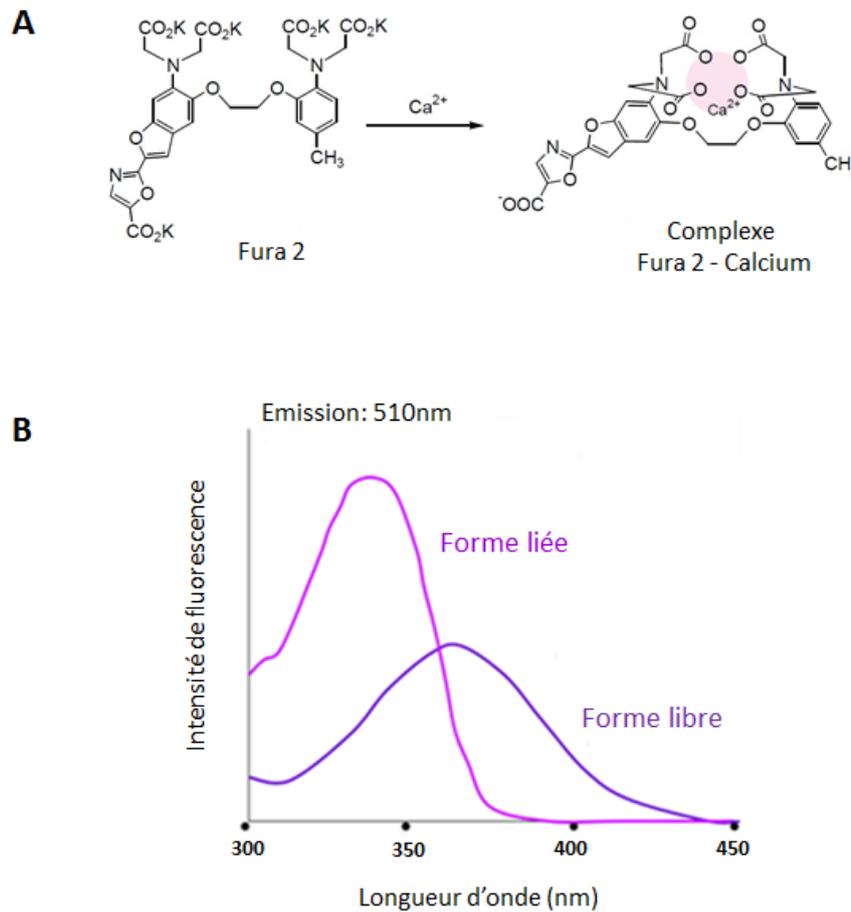
2- les indicateurs fluorescents chimiques (Fura-2, Fluo-4...) possèdent une fluorescence d'excitation ou d'émission variable selon leur liaison au calcium (Grienberger et Konnerth, 2012).

3- les indicateurs codés génétiquement sont des protéines recombinantes sensibles au calcium. Elles sont constituées de l'association entre une protéine fluorescente, telle la GFP (Green Fluorescent Protein), et la calmoduline (calcium-modulated protein), protéine monomérique ubiquitaire formant un complexe avec le calcium intracellulaire.

De nombreuses sondes fluorescentes sont couramment utilisées pour suivre les variations de calcium intracellulaire, comme le BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) et l'EDTA (éthylène dinitrile tétraacétate) associé à un fluorophore. En effet, leur structure présente une forte homologie avec les chélateurs de calcium à haute affinité. De plus, de nombreux types cellulaires peuvent être chargés par simple incubation de la forme acétoxyméthylester (AM) des sondes fluorescentes. Cette forme liposoluble, pouvant pénétrer facilement les membranes cellulaires, est alors clivée sous sa forme hydrosoluble par une réaction estérase au sein du cytoplasme, libérant des groupements carboxyliques dont les molécules d'oxygène électronégatives permettent de piéger les ions calcium.

Dans le cas de mesure de variations du calcium intracellulaire au sein des DUM neurones, le marqueur Fura-2 est le plus couramment utilisé, car il permet d'effectuer des mesures ratiométriques (Grienberger et Konnerth, 2012). Cette sonde dite à « double excitation/ simple émission » possède la particularité d'émettre à deux longueurs d'onde distinctes suivant sa conformation (**Figure 27**). Lorsqu'il est sous forme libre, le Fura-2 présente une longueur d'onde optimale de 380nm, sous sa forme liée au calcium, sa longueur d'onde d'excitation passe alors à 340nm. Dans les deux cas, la longueur d'onde d'émission permettant d'enregistrer la fluorescence émise est de 510nm. L'emploi de cette double excitation permet de calculer un rapport entre la fluorescence émise à 340nm et à 380nm ( $R = 340/380$ ).

L'évolution du rapport permet de mesurer directement les variations de concentrations du calcium intracellulaire au sein des corps cellulaires tout en s'affranchissant des artefacts expérimentaux.



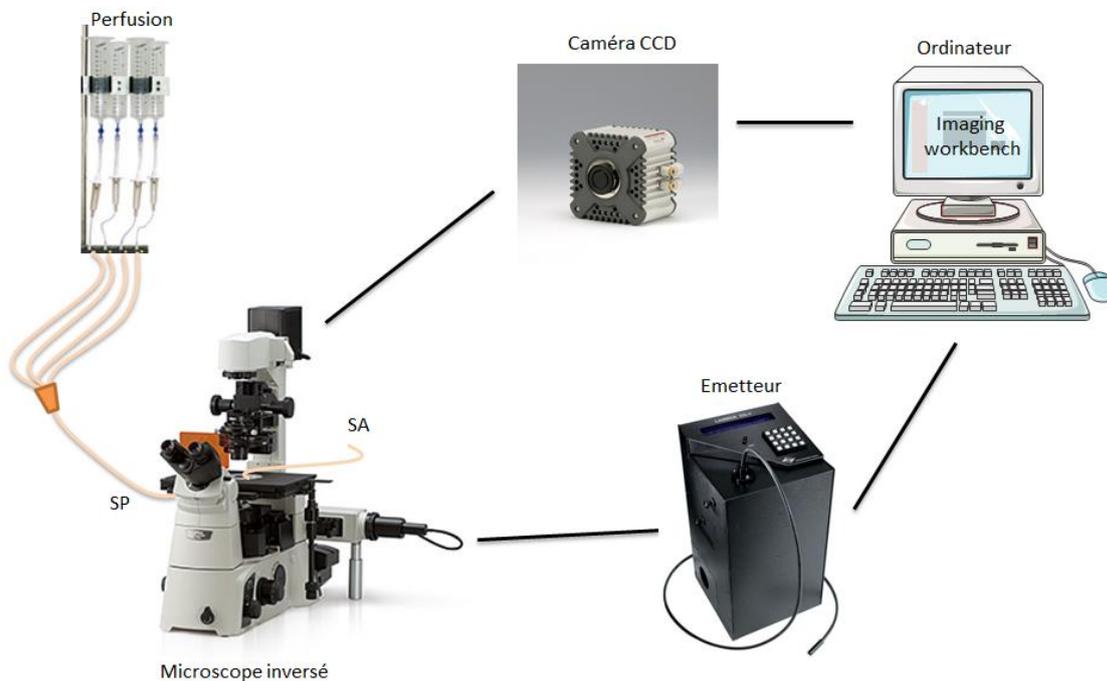
**Figure 27 :** A - Représentation structurale de la molécule de Fura-2 libre et liée au calcium. B - Représentation schématique des spectres d'excitation du Fura-2 sous sa forme liée au calcium (340nm) et sous sa forme libre (380nm).

## 2.2. Dispositif expérimental

Suite à la dissociation des DUM neurones dont le protocole a été décrit précédemment (Chapitre 2 – 1), les corps cellulaires incubés durant 24 heures à l'étuve sont chargés avec du LP1 contenant 5  $\mu$ M de Fura-2AM (Sigma, France) durant 45 minutes à 37 °C. Cette étape permet à la sonde sous sa forme liposoluble de pénétrer dans les cellules. Les lames sont par la suite rincées 3 fois avec 750  $\mu$ L de LP1, puis incubées de nouveau 1 heure à 37 °C afin de permettre le clivage de la sonde dans le cytoplasme et donc sa liaison au calcium.

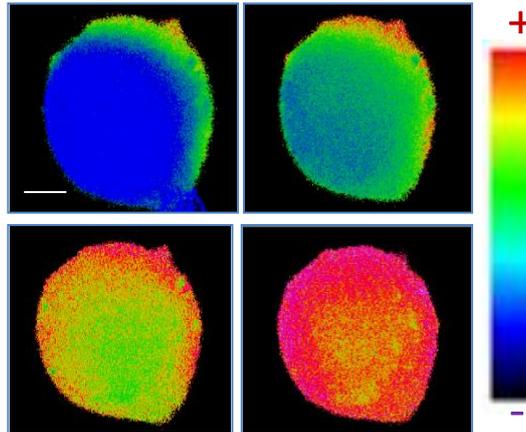
Suite à trois nouveaux rinçages avec le LP1, les lames sont montées dans une chambre d'enregistrement (Warner Instruments, Hamden, USA) déposée sur la platine d'un microscope inversé (eclipse Ti, Nikon Instruments, France) et reliée à système de perfusion gravimétrique.

Les longueurs d'onde d'excitation sont produites par un émetteur (sutter instrument  $\lambda$ -DG4, One Digital Drive, Novato, USA) et la fluorescence émise est captée par une caméra digital charged-coupled device CCD (orca-R<sup>2</sup> C10600, Hamamatsu Photonics, Massy, France) reliée à un ordinateur (**Figure 28**). La mise au point se fait sous l'objectif x20 et l'enregistrement sous l'objectif x40.



**Figure 28:** Représentation schématique de l'installation du poste d'imagerie calcique. Le système de perfusion (SP) est relié à la chambre de perfusion positionnée sur la platine du microscope. Un système d'aspiration (SA) assure le renouvellement rapide à un niveau constant du liquide extracellulaire. Les longueurs d'excitation de la sonde sont produites par un émetteur et captées par une caméra CCD reliée à l'ordinateur. Les enregistrements sont effectués sur l'ordinateur grâce au système d'acquisition Imaging Workbench.

Le logiciel Imaging Workbench (version 6.0, INDEC BioSystems, USA) permet de commander l'expérimentation en sélectionnant les longueurs d'onde, le temps d'exposition (100ms), les pseudo-couleurs définissant les nuances de détection (**Figure 29**). L'enregistrement des photographies et de l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire se fait en temps réel (la prise d'image est réglée sur 0,33 Hz, soit une image toutes les trois secondes, afin de limiter le problème de photoblanchiment et de cytotoxicité).



**Figure 29 :** Visualisation des variations de la concentration en calcium intracellulaire au sein d'un corps cellulaire de DUM neurones grâce à l'ajout de pseudo-couleurs par le logiciel Imaging Workbench. Echelle : 10 $\mu$ m.

Les résultats ont été analysés grâce au logiciel Prism (version 5.0, GraphPad Software Inc., Etats-Unis). Les comparaisons statistiques des multiples conditions expérimentales ont été effectuées à l'aide d'un test t de Student ou d'un test ANOVA.

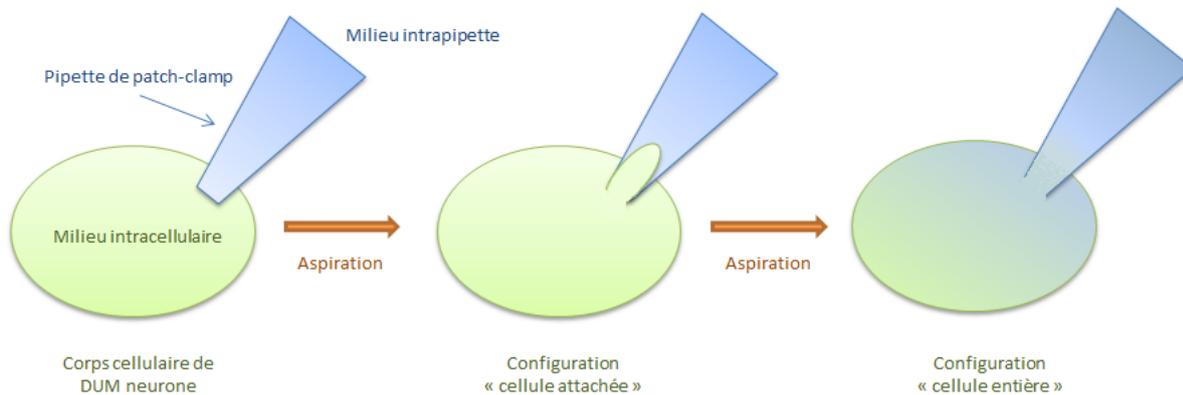
### 3) Technique électrophysiologique du patch-clamp sur neurones isolés

#### 3.1. Principe

La technique du patch-clamp a été inventée dans les années 1970 par les chercheurs allemands Sakmann et Neher (Neher *et al*, 1978), désireux de comprendre le fonctionnement des canaux ioniques membranaires. Elle fut par la suite améliorée par Hamill et ses collaborateurs (Hamill *et al*, 1981). La technique du patch-clamp permet d'enregistrer des courants ioniques transitant à travers les glycoprotéines canaux ou canaux ioniques des membranes cellulaires grâce à une micropipette en verre accolée à la membrane.

Cette micropipette en verre, dont le diamètre est de l'ordre du micromètre, est remplie d'une solution ionique de composition définie en fonction des différentes configurations utilisées (i.e., cellule attachée, cellule entière, outside out et inside out). Cette pipette de verre est approchée progressivement de la membrane d'une cellule isolée. Lorsque la pointe de la pipette plonge dans le milieu extracellulaire, une pression positive est appliquée afin de limiter les risques de contamination par des débris. Une fois la micropipette en contact avec la cellule, une pression négative est appliquée imposée afin de créer une zone de scellement entre le verre de la pipette et la membrane pour d'isoler électriquement la portion de membrane sous la pointe de l'électrode. Cette aspiration crée une zone de forte résistance

nommée résistance de scellement ou « seal », dont la valeur dépasse le giga-ohm. Cette configuration est ainsi appelée « cellule attachée » (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière » en patch-clamp. La pipette est approchée progressivement de la membrane cellulaire. Une légère pression négative est appliquée, créant un scellement hermétique entre la pipette et la cellule (configuration « cellule attachée »). Une seconde pression négative provoque la rupture de la membrane, permettant une continuité physique et électrique entre la pipette et le cytoplasme de la cellule (configuration « cellule entière »).

Pour mesurer l'activité électrique globale de la cellule résultant de l'activité des canaux ioniques et/ou récepteurs présents à la membrane cellulaire, une pression négative supplémentaire est effectuée afin de rompre la membrane sous la pointe de la pipette. Cette configuration, nommée « cellule entière », permet d'obtenir une continuité physique et électrique entre la solution intrapipette et le milieu extracellulaire (**Figure 30**). La configuration « cellule entière », contrairement à la configuration « cellule attachée », permet de contrôler le milieu extracellulaire et intracellulaire, mais aussi de tester des agents pharmacologiques ne pouvant passer la membrane cellulaire.

Cette configuration peut être utilisée selon deux modes distincts : le potentiel imposé qui permet la mesure de l'activité électrique des canaux membranaires et le courant imposé qui permet de mesurer les variations de potentiel.

L'inconvénient majeur de la configuration « cellule entière » reste la dilution des composants intracellulaires par la solution intrapipette. Cette dilution peut entraîner une diminution progressive du courant par perte d'éléments métaboliques essentiels au maintien des caractéristiques fonctionnelles des canaux ioniques et des récepteurs. Afin de réduire ce phénomène, il est possible d'enrichir la solution intrapipette en composés énergétiques tels que l'ATP ou le GTP, et de seconds messagers impliqués dans les voies de signalisations intracellulaires comme par exemple l'AMPc, le calcium, etc...

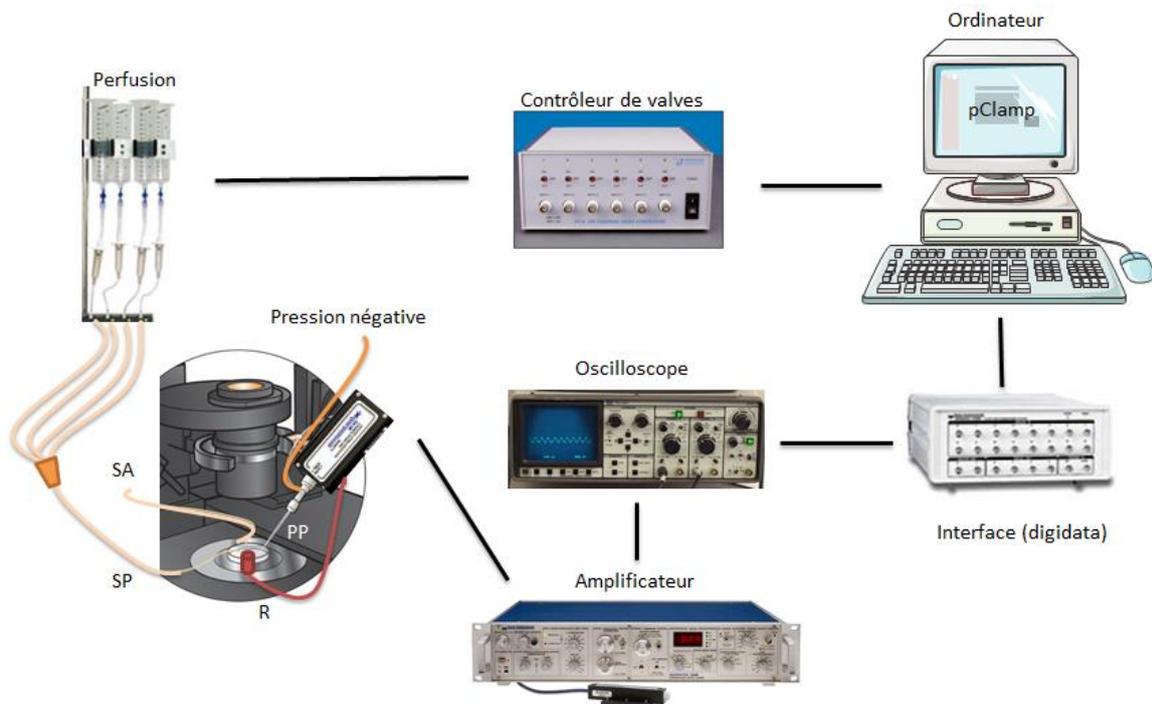
### 3.2. Dispositif d'enregistrement

Durant mon travail de recherche, j'ai utilisé la configuration cellule entière de la technique de patch clamp adaptée aux corps cellulaires des DUM neurones isolés du DGA de la blatte *Periplaneta americana* (Lapied *et al*, 1989) dans des conditions de courant et potentiel imposés. Ainsi, après 24 heures d'incubation (voir Chapitre 2–1), les boîtes de culture contenant les DUM neurones isolés sont placées sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, Rungis, France). Celui-ci, positionné sur une table antivibratoire, est intégré dans une cage de Faraday qui isole l'expérimentation des nuisances électriques parasites extérieures.

Les DUM neurones étudiés sont identifiés grâce à leur morphologie. En effet, les cellules doivent présenter un corps cellulaire piriforme réfringent d'un diamètre compris entre 40 et 60  $\mu\text{m}$  (Sinakevitch, 1995). De plus, les cellules doivent avoir une activité électrique spontanée (Grolleau et Lapied, 2000) aisément vérifiable dans des conditions de courant imposé.

Les micropipettes de patch sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicatés (GC 150 T-10, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) au moyen d'une étireuse horizontale P-97 (Sutter Instruments, Novato, Etats-Unis). Leur résistance doit être comprise entre 1,8 et 2,2 M $\Omega$ . Elles sont fixées sur un porte-électrode se trouvant sur la partie mobile de l'amplificateur opérationnel et peuvent être déplacées à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique tridimensionnel (Burleigh TS-5000-150, Burleigh Instruments, New-York, Etats-Unis) permettant un déplacement précis de l'électrode de patch-clamp. L'électrode est connectée à un amplificateur (Axopatch 200A, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis) permettant d'amplifier les signaux électriques de la cellule. Ces signaux électriques sont par la suite filtrés à l'aide d'un filtre passe-bas d'une fréquence de 5 kHz.

Le dispositif comporte un amplificateur opérationnel (AOP) fonctionnant en convertisseur courant-tension. L'AOP maintient une tension nulle à ses bornes à travers la boucle de contre-réaction. Le système force ainsi le potentiel de la pipette, relié à la borne négative de l'AOP, à suivre le potentiel appliqué par l'expérimentateur à la borne positive. Le courant ionique, alors converti en courant électrique (I), passe intégralement dans la résistance de contre-réaction. Un amplificateur différentiel permet par la suite de comparer les valeurs à la sortie de l'AOP et le potentiel imposé par l'expérimentateur.



**Figure 31 :** Représentation schématique de l'installation du poste de patch-clamp. Le système de perfusion (SP) est connecté un contrôleur de valves relié à l'ordinateur, permettant l'activation programmée des différentes voies. Un système d'aspiration (SA) assure le renouvellement rapide à un niveau constant du liquide extracellulaire. La pipette de patch-clamp (PP) est fixée sur un porte-pipette relié à un amplificateur. Cet amplificateur mesure la différence de potentiel entre la pipette de patch-clamp et l'électrode de référence (R). Pour visualiser les variations de courant ou de potentiel, l'amplificateur est relié à un oscilloscope. Les enregistrements sont effectués, via une interface digidata, sur l'ordinateur grâce au système d'acquisition pClamp.

Les réponses électrophysiologiques (potentiels d'action et courants ioniques) sont ainsi visualisées sur un oscilloscope (Nicolet 3091, Nicolet Instrument Corporation, Madison, Etats-Unis). Les enregistrements sont effectués sur un ordinateur PC connecté à une interface Digidata 1322A (Axon instruments, Foster City, Etats-Unis), à l'aide du logiciel pClamp (versions 10.0, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis) (**Figure 31**). L'amplitude des courants ioniques et l'activité électrique sont mesurées et analysées à l'aide du logiciel Clampfit (version 10.0, Axon instruments, Foster City, Etats-Unis). Les données numériques sont analysées sous le logiciel Prism (version 5.0, GraphPad Software Inc., Etats-Unis). Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t de Student ou d'un test ANOVA.

### 3.3. Composition des solutions

Les solutions extracellulaires (**Tableau 2**) sont appliquées sur la cellule à l'aide d'un système de perfusion gravimétrique multicanaux fixé sur un micromanipulateur (Prior, Cambridge, UK), permettant de le positionner au plus près du corps cellulaire du neurone. Ce système contrôlable par ordinateur via un contrôleur de valves (VC-6, Warner Instruments, Hamden, USA) présente l'intérêt de pouvoir définir un programme d'ouverture et fermeture des voies de perfusion, permettant de changer rapidement la composition du milieu cellulaire. Un système d'aspiration à l'opposé de la perfusion garantit le renouvellement régulier et un volume constant du milieu extracellulaire, ce qui donne la possibilité de tester différentes substances pharmacologiques.

**Tableau 2.** Composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées lors des expériences de patch-clamp.

Composés	Solution extracellulaire	Solution intrapipette pour potentiel d'action	Solution intrapipette pour nicotinique
NaCl (mM)	200	10	10
KCl (mM)	3,1	/	/
K D-Gluconate (mM)	/	160	160
K Fluoride (mM)	/	10	10
MgCl <sub>2</sub> (mM)	4	1	1
CaCl <sub>2</sub> (mM)	5	0.5	0.5
EGTA	/	10	10
HEPES (mM)	10	10	10
ATP	/	1	3
AMPc	/	/	0.1
pH (ajusté avec NaOH ou KOH 1M)	7,4	7.4	7.4

## Chapitre III – Test de sensibilité des moustiques adultes aux insecticides et répulsifs

---

Afin d'évaluer l'efficacité du mélange répulsif/insecticide testé *in vitro*, des tests sur moustiques adultes femelles ont été effectués au sein du laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC) de l'IRD de Montpellier. Le test en cône OMS (OMS, 1998) permet d'évaluer l'efficacité et la rémanence du produit sur un type de matériau, ici la moustiquaire. Les résultats s'expriment en pourcentage d'effet knock-down (KD) après 1 heure de contact et de mortalité après 24 heures.

### 1) Présentation du matériel biologique

Les moustiques utilisés pour cette étude sont des femelles *An. gambiae*, souche sensible de référence Kisumu originaire du Kenya élevée au sein du laboratoire MIVEGEC. Ces moustiques sont élevés à 27 °C dans 80 % d'humidité pour une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Ils sont élevés dans des bacs d'eau et nourris avec de la nourriture de poisson jusqu'au stade nymphal. Après émergence, les adultes sont placés dans une cage couverte de tulle moustiquaire et nourris au jus sucré (eau + 10 % de miel). Les femelles adultes prélevées pour le test sont toutes âgées de 2 à 5 jours et n'ont jamais fait de repas de sang.

### 2) Test de rétention et de séchage des moustiquaires

Afin de préparer les échantillons de tulles moustiquaires à tester, il faut au préalable calculer le pouvoir de rétention et la vitesse de séchage de chaque type de moustiquaire. Dans le cadre du projet, il n'a été utilisé qu'un seul type de moustiquaire, en polyester 100 deniers en 180x190x150cm (Siamdutch mosquito netting, Thaïlande). La moustiquaire a été coupée en échantillon de 24,9 x 27x8cm, soit 0,069 m<sup>2</sup>.

Tout d'abord, il faut calculer le taux de rétention par unité de surface à partir d'une surface théorique de 1 m<sup>2</sup>. Pour cela, il faut laver la moustiquaire pour éliminer les résidus qui masqueraient le pouvoir de rétention réel. Puis, l'échantillon est pesé à sec avant d'être placé 5 minutes dans un gobelet d'eau osmosée. L'échantillon est alors légèrement essoré afin qu'il ne goutte pas, puis de nouveau pesé. La différence entre la pesée à sec et la pesée après trempage correspond au pouvoir de rétention de l'échantillon en mL.

Par la suite, un échantillon est plié en quatre et placé dans une boîte de Pétri carré de 12x12cm. Il est imprégné avec un volume d'eau osmosée équivalent au pouvoir de rétention mesuré. Pour garantir une imprégnation uniforme, l'eau osmosée est déposée en goutte à goutte avec une pipette tout le long de l'échantillon. L'expérimentateur appuie alors légèrement avec le doigt afin de bien faire pénétrer l'eau. La moustiquaire est laissée à sécher durant 4 fois 30 minutes durant lesquelles elle est retournée sur chacune de ses 4 faces, permettant un séchage plus uniforme. Puis, elle est suspendue sur un fil à linge avec un trombone, limitant ainsi la perte de produit sur le fil à linge. Le temps restant de séchage est alors estimé de visu.

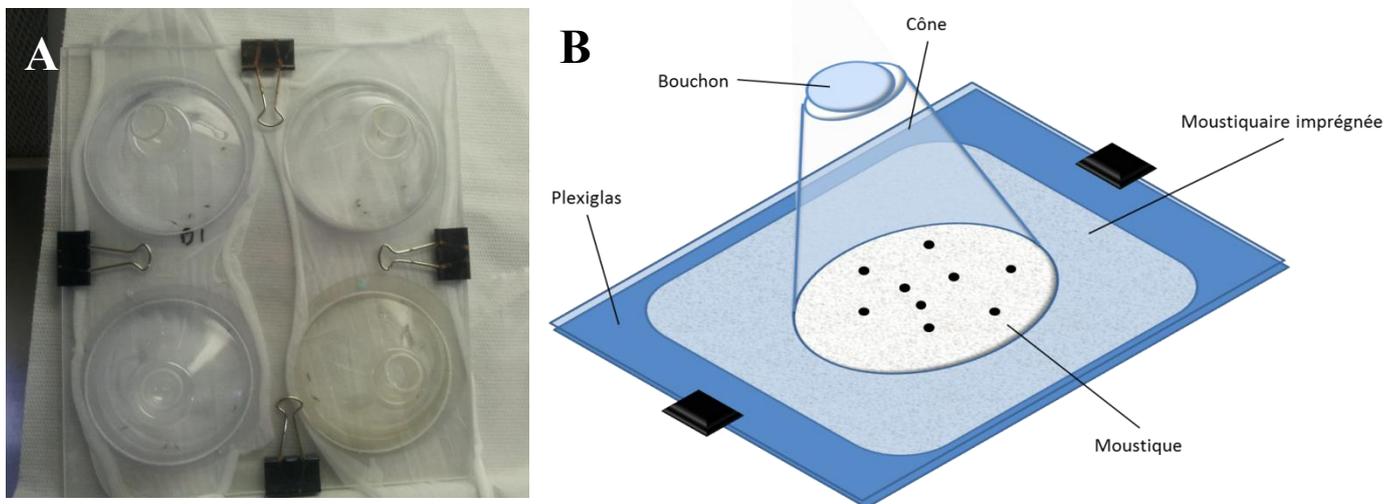
### 3) Imprégnation de moustiquaires

Les solutions d'insecticides et de répulsifs étant solubles dans l'eau, elles sont diluées dans de l'eau osmosée. Les dilutions sont estimées en fonction du pouvoir de rétention de l'échantillon et de la formulation de la solution mère de chaque produit. Dans le cadre du projet, les échantillons comprennent un témoin négatif avec de l'eau osmosée, un témoin positif avec deltaméthrine (formulation K-othrine SC 10, Bayer CropScience) à 25 mg/m<sup>2</sup> correspondant à 100 % de mortalité, des tests thiaclopride (formulation Calypso, 480 g/L 40,3 % m/m, Bayer CropScience) à 367 mg/m<sup>2</sup>, des tests IR3535 (99,8 %, Merck) à des concentrations comprises entre 3,67 et 367 mg/m<sup>2</sup> et des tests avec le mélange thiaclopride et IR3535 aux différentes concentrations. Les moustiquaires sont ensuite imprégnées avec un volume de produits correspondant au pouvoir de rétention calculé précédemment. Après séchage, si les tests ne sont pas effectués dans l'immédiat, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4 °C.

### 4) Préparation des tests en cône

Tout d'abord, il faut préparer les supports maintenant les moustiquaires. Pour cela, la moustiquaire est placée entre deux plaques de plexiglas transparent de 24x27cm percées de quatre trous de 95 mm de diamètre. Les cônes en PVC standardisés par l'OMS sont placés sur chacun de ces trous. Cette matière plastique empêche les moustiques de s'y déposer, ce qui favorise le contact avec la moustiquaire. Ceci permet de s'assurer que les moustiques entrent bien en contact avec le produit testé tout au long de l'exposition.

L'ensemble du dispositif est maintenu avec des pinces doubles clips puis les supports sont placés en oblique à 40° sur une surface en inox recouverte de sopalin. Les cônes sont alors fermés avec bouchons en polyéthylène qui empêcheront les moustiques de s'échapper durant le test (**Figure 32**).



**Figure 32 :** Photographie (A) et représentation schématique (B) du test en cône permettant de tester la sensibilité des moustiques adultes aux insecticides et répulsifs. Les moustiquaires imprégnées sont placées entre deux plaques de plexiglas et couvertes de cônes PVC de l'OMS. Le dispositif est maintenu par des pinces et les cônes sont fermés par des bouchons en polyéthylène.

## 5) Test en cône

Les moustiques testés sont des femelles *An. gambiae* âgées de 2 à 5 jours. Avec un aspirateur à bouche, composé d'un tuyau et d'un tube plastique fermé par un filtre, elles sont placées par 5 ou 15 individus par cône selon le temps d'exposition, respectivement 3 et 30 minutes. Durant l'expérience, les cônes sont maintenus à 25 °C sous une lumière tamisée.

A la fin de l'exposition, les moustiques sont transférés dans des gobelets recouverts de tulle et bouchés avec du coton. L'effet KD est observé au bout de 60 minutes après exposition. Puis les moustiques sont nourris avec un coton imbibé de jus sucré (eau + miel 10 %) avant d'être placés en observation durant 24 heures dans une étuve Binder maintenue à 27 °C et 80 à 100 % d'humidité. Au bout de 24 heures, le nombre de morts est compté. Les moustiques capables de voler sont considérés comme vivants. Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité dans le témoin négatif soit inférieure à 10 % et celle du témoin positif supérieure à 95 %.

Le test est validé après correction selon la formule d'Abbott donnant la mortalité corrigée en fonction de la mortalité naturelle :

$$Mc = \frac{\% \text{ mortalité traités} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}} \times 100$$



# **Partie 3 :**

# **Résultats**



Afin de répondre à la nécessité de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les vecteurs de maladies, l'objectif de ce travail est de déterminer le mélange d'un répulsif avec un insecticide qui présente la meilleure efficacité. Pour cela, il faut sélectionner un répulsif capable de provoquer les variations de la concentration en calcium intracellulaire suffisante pour modifier la sensibilité des cibles aux insecticides. Puis, il faut vérifier s'il existe un effet synergique entre le répulsif et l'insecticide choisis.

Le premier chapitre porte sur l'étude des effets du répulsif DEET sur les variations de calcium intracellulaire du DUM neurone, complétant ainsi les données préalablement obtenues au sein du laboratoire sur les mécanismes d'action intracellulaires induits par ce répulsif (Abd-Ella *et al*, 2015, voir annexe 2).

Le second chapitre est consacré à l'étude du mode d'action induit par le répulsif IR3535 sur les DUM neurones de blatte. Contrairement au DEET, les connaissances sur son mode d'action sont extrêmement limitées, obligeant à effectuer des études plus approfondies. Pour cela, les effets de l'IR3535 ont tout d'abord été étudiés à l'aide de la technique d'imagerie calcique, ce qui a permis de caractériser un effet impliquant des mécanismes d'action intracellulaires calcium-dépendants. Dans un second temps, la technique électrophysiologique du patch-clamp a été utilisée afin de déterminer l'effet de ce répulsif sur l'activité électrique des DUM neurones et sur le courant ionique obtenu par application d'un insecticide de type néonicotinoïde.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'effet synergique du mélange avec l'IR3535 et un néonicotinoïde, le thiaclopride en fonction de la concentration testée. Cet effet synergique a été étudié à l'aide des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie.

Le quatrième chapitre, enfin, se concentre sur l'étude effectuée *in vivo* sur des moustiques femelles adultes *Anopheles gambiae*, afin d'évaluer le potentiel synergique du mélange susceptible d'être appliqué sur moustiquaire.

## Chapitre I – Mécanismes d'action du répulsif DEET sur les DUM neurones de blatte *Periplaneta americana*

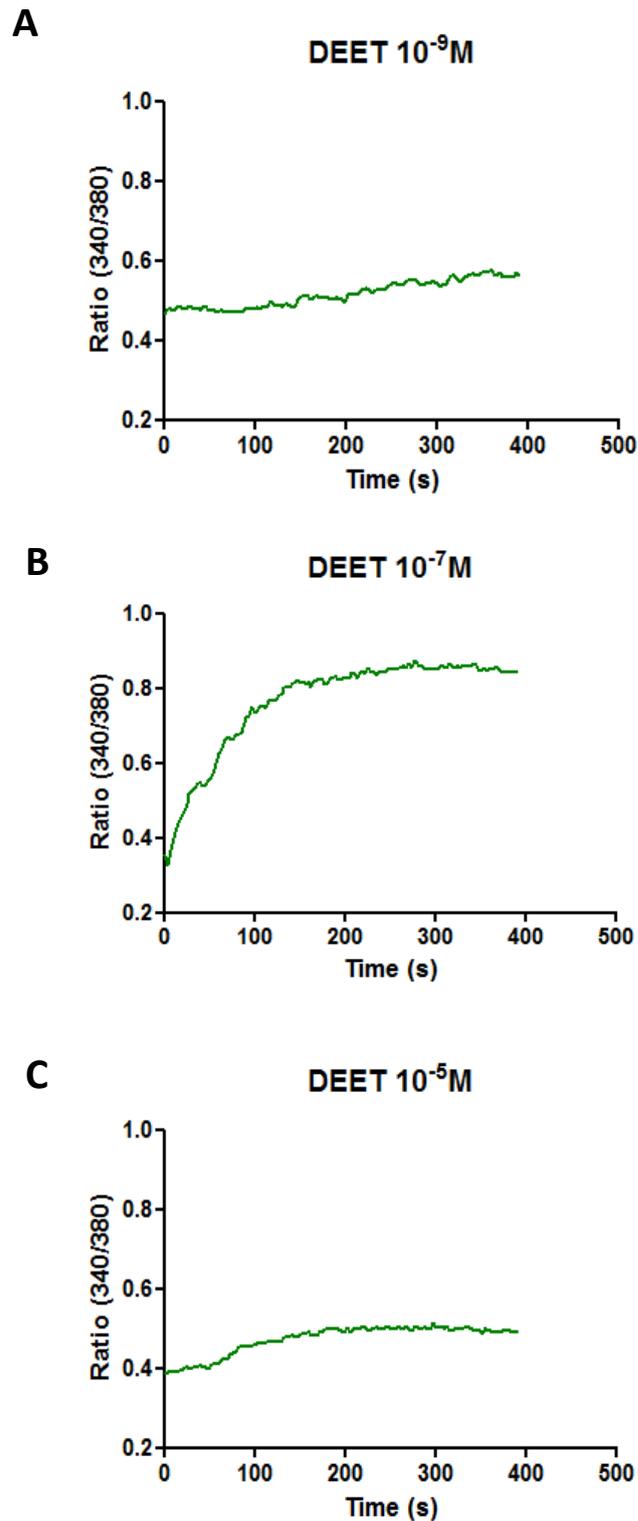
---

Le DEET est le répulsif anti-moustique le plus utilisé au monde, notamment grâce à son efficacité avérée contre les moustiques vecteurs. Des études préliminaires ont démontré un effet synergique lorsque ce répulsif est associé à d'autres insecticides de type non pyréthrinoides sans que les mécanismes cellulaires à l'origine de cette potentialisation soient connus (Pennetier *et al*, 2007 ; 2008 ; 2009 ; Bonnet *et al*, 2009). Par conséquent, ce composé semblait être un candidat intéressant pour le développement d'un nouveau mélange répulsif/insecticide permettant de restituer le double effet des pyréthrinoides c'est-à-dire répulsif et insecticide. Mais avant cela, il fallait obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette synergie potentialisatrice. Comme nous avons démontré que le calcium était un facteur cellulaire important dans la modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides (Lavialle-Defaix *et al*, 2010 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Licznar *et al*, 2014), notre première étude a porté sur les effets du répulsif DEET sur les variations de calcium intracellulaire du DUM neurone de blatte afin de compléter les données déjà disponibles (Abd-Ella *et al*, 2015, voir annexe 2).

### 1. Effet du répulsif DEET sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire des DUM neurones

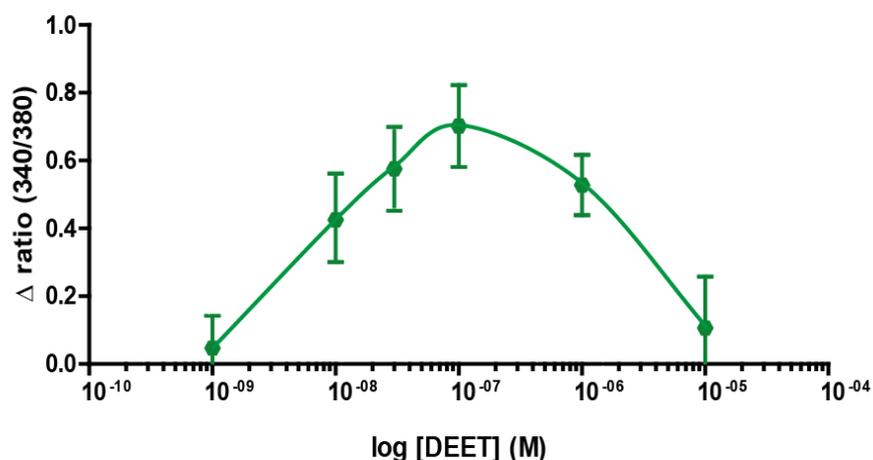
Suite aux résultats obtenus au laboratoire par Abd-Ella et ses collaborateurs (2015, voir annexe 2), des expériences complémentaires ont été réalisées à l'aide de la technique ratiométrique d'imagerie calcique.

Le DEET a été testé avec des concentrations comprises entre  $10^{-9}$ M et  $10^{-5}$ M. Les résultats ont montré que le DEET induit bien une variation de la concentration en calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ), mais dont la dépendance vis-à-vis de la concentration en répulsif utilisée est atypique (**Figure 33A, B et C**).



**Figure 33 :** Exemples de spectres illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de DEET utilisé à  $10^{-9}$  M (A),  $10^{-7}$  M (B) et  $10^{-5}$  M (C) sur des DUM neurones isolés.

Une courbe dose-réponse a été construite à partir des moyennes des différences de ratios 340/380 calculées entre la valeur de base de la  $[Ca^{2+}]_i$  et la valeur de la  $[Ca^{2+}]_i$  maximale après perfusion du DEET ( $\Delta$ ). Le profil de la courbe présente un décours en forme de cloche suivant la concentration de DEET testée (**Figure 34**). Pour une faible concentration de DEET ( $10^{-7}M$ ), la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est maximale, avec un  $\Delta$  de  $0,70 \pm 0,12$  ( $n=4$ ). À l'inverse, l'utilisation de DEET à plus forte concentration ( $10^{-5}M$ ) produit une variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  sept fois plus faible ( $\Delta=0,11 \pm 0,15$  ;  $n=4$ ), proche de ce qui est observé pour de très faibles concentrations de répulsif ( $10^{-9}M$ ) ( $\Delta=0,05 \pm 0,09$  ;  $n=5$ ). Ces premiers résultats inattendus laissent suggérer un double effet de ce répulsif sur la  $[Ca^{2+}]_i$  en fonction de la concentration utilisée.

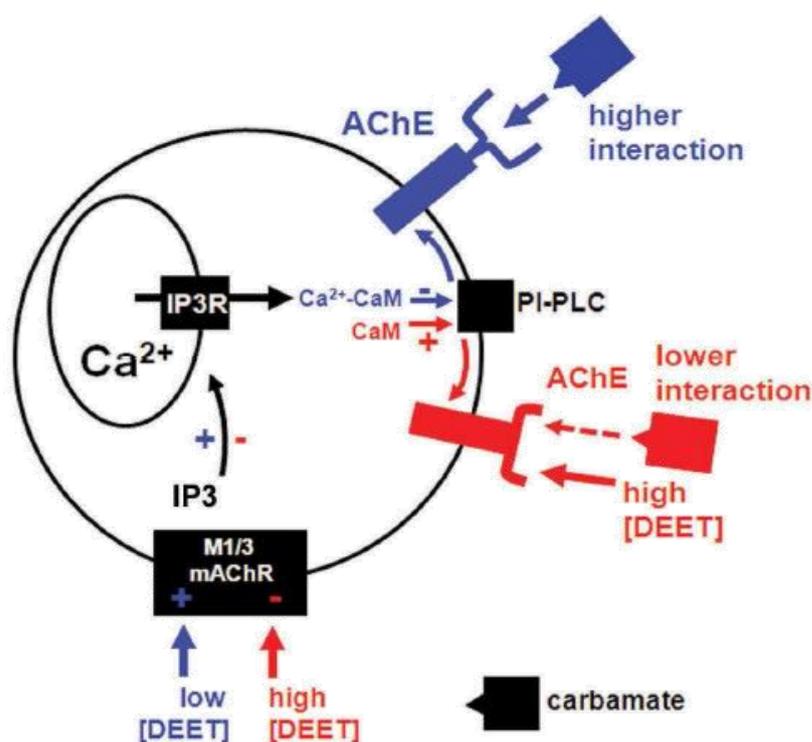


**Figure 34** : Courbe dose-réponse illustrant les variations de calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration de DEET utilisée. Les variations de calcium intracellulaire (exprimées en ratios 340/380) sont calculées à partir des moyennes des valeurs obtenues pour chaque concentration de DEET testée. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ( $n= 4-5$ ).

## 2. Effet du DEET *via* la modulation des récepteurs cholinergiques de type muscarinique d'insectes

Les résultats obtenus avec la technique d'imagerie calcique confirment les résultats précédemment obtenus au laboratoire sur le mécanisme d'action du DEET (Abd-Ella *et al*, 2015, voir annexe 2). En effet, il a été montré qu'un des effets du DEET, en fonction de sa concentration, est observé *via* la modulation des récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChRs) de sous-types M1/M3. Ces mAChRs, couplés à une voie de signalisation intracellulaire calcium-dépendante de type PLC/DAG/IP<sub>3</sub> (Wenzel *et al*, 2002 ;

Courjaret *et al*, 2003), sont caractérisés chez les insectes par un site dit orthostérique qui lie l'agoniste, c'est-à-dire l'acétylcholine ou la muscarine, un site haute affinité et un site basse affinité impliqués respectivement dans la modulation positive et négative des mAChRs M1/M3 (Abd-Ella *et al*, 2015 ; annexe 2). Des études en électrophysiologie effectuées sur ces mAChRs M1/M3 ont montré un profil de courbe multiphasique indiquant qu'une faible concentration de DEET ( $10^{-9}$ M) augmentait l'effet de la muscarine sur ces récepteurs. À l'inverse, une forte concentration de DEET ( $10^{-5}$ M) provoque une diminution de la fixation de l'agoniste, ce qui confirme bien l'existence de deux sites, haute et basse affinités (Abd-Ella *et al*, 2015, voir annexe 2).



**Figure 35 :** Schéma résumant les différents événements moléculaires impliqués dans l'effet synergique du DEET sur l'action d'un insecticide anticholinestérasique, le propoxur (d'après Abd-Ella *et al*, 2015). A faible concentration, le DEET agit sur le site haute affinité, favorisant la fixation de l'agoniste. Ceci entraîne l'activation d'une voie de signalisation calcium-dépendante, rendant l'AChE plus sensible au propoxur. A forte concentration, le DEET agit sur le site basse affinité, inhibant la fixation de l'agoniste sur le site orthostérique et donc diminuant la sensibilité de l'AChE au propoxur. AChE : acétylcholinestérase ; CaM : calmoduline ; PI-PLC : phosphatidylinositol phospholipase C ; IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate ; IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub> ; mAChR : récepteur cholinergique de type muscarinique.

Comme illustré dans la **figure 35**, les mécanismes d'action intervenant dans l'effet synergique du DEET sur l'action du propoxur ont ainsi pu être caractérisés. A faible concentration, le DEET agit sur le site haute affinité des mAChRs M1/M3, potentialisant l'effet de l'agoniste, l'ACh. Ceci induit l'activation des voies de signalisation de type PLC/DAG/IP<sub>3</sub>. La production et la fixation d'IP<sub>3</sub> sur les récepteurs du réticulum endoplasmique entraîne la libération de calcium intracellulaire. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui en résulte conduit à la formation du complexe calcium/calmoduline qui permet de diminuer l'activité de la PI-PLC impliquée dans la régulation négative de l'AChE. Dans ces conditions, l'enzyme devient plus sensible au propoxur. A l'inverse, à fortes concentrations, le DEET se fixe sur le site basse affinité des mAChRs M1/M3, diminuant l'effet de l'ACh sur ce récepteur, ayant pour conséquence une diminution de la sensibilité de l'AChE au propoxur (Abd-Ella *et al*, 2015, voir annexe 2).

### 3. Pertinence de l'utilisation du DEET dans un mélange répulsif/insecticide comme stratégie alternative en LAV

Bien que des études effectuées au laboratoire indiquent que le DEET à faibles concentrations pourrait être intéressant comme répulsif à utiliser dans un mélange pour potentialiser l'effet d'un insecticide, comme le propoxur, d'autres études suggèrent le contraire pour différentes raisons.

En effet, les mélanges de produits, impliquant notamment le DEET, pourraient être à l'origine de diverses pathologies, comme les encéphalopathies infantiles ou le syndrome de la Guerre du Golfe. Abdel-Rahman (2004) a notamment montré chez le rat certains effets provenant d'une exposition prolongée à un mélange de DEET, de perméthrine et de pyridostigmine bromide, un composant des gaz des combats. Ce mélange, associé à une situation de stress similaire à celui ressenti par les soldats sur le terrain, inhibe l'activité de l'AChE et augmente la liaison du ligand sur le récepteur muscarinique. Ceci provoquerait des lésions cérébrales importantes, entraînant des anomalies du comportement ou des pertes de mémoire. Une autre étude a montré que ce même mélange pouvait provoquer des altérations du système locomoteur (Hoy *et al*, 2000). De même, l'exposition à un mélange de 400mg/kg de DEET et de 1,3mg/kg de perméthrine chez le rat induit l'apoptose des cellules neuronales, alors que les deux produits seuls n'induisent aucun processus apoptotique (Abu-Quare et Abou-Donia, 2001).

Si le lien entre certaines pathologies neurologiques et l'exposition au DEET en association avec un autre produit reste dans certains cas spéculatif, l'utilisation de ce répulsif dans un mélange biocide s'avère problématique. C'est d'autant plus important que ce

répulsif pourrait être associé à d'autres composés dans le cas des traitements de textiles imprégnés d'insecticides couramment utilisée pour protéger la population.

Enfin, de nombreuses études ont montré l'impact environnemental de ce répulsif. Le DEET est si largement utilisé par la population, qu'il se retrouve à des concentrations élevées dans les eaux usées et les rivières près des zones rurales, particulièrement durant l'été. Une forte accumulation de DEET dans le milieu aquatique est potentiellement toxique pour la faune non cible, comme le montrent certains modèles de prédictions (Aronson *et al*, 2011).

Dans ce contexte, il nous a semblé important d'étudier les effets d'un autre répulsif susceptible d'être utilisé comme agent synergisant. C'est la raison pour laquelle les études réalisées avec le DEET ne seront pas considérées de façon plus importante dans ce travail de recherche.

## Chapitre II – Mécanismes d'action du répulsif IR3535 sur les DUM neurones de blatte *Periplaneta americana*

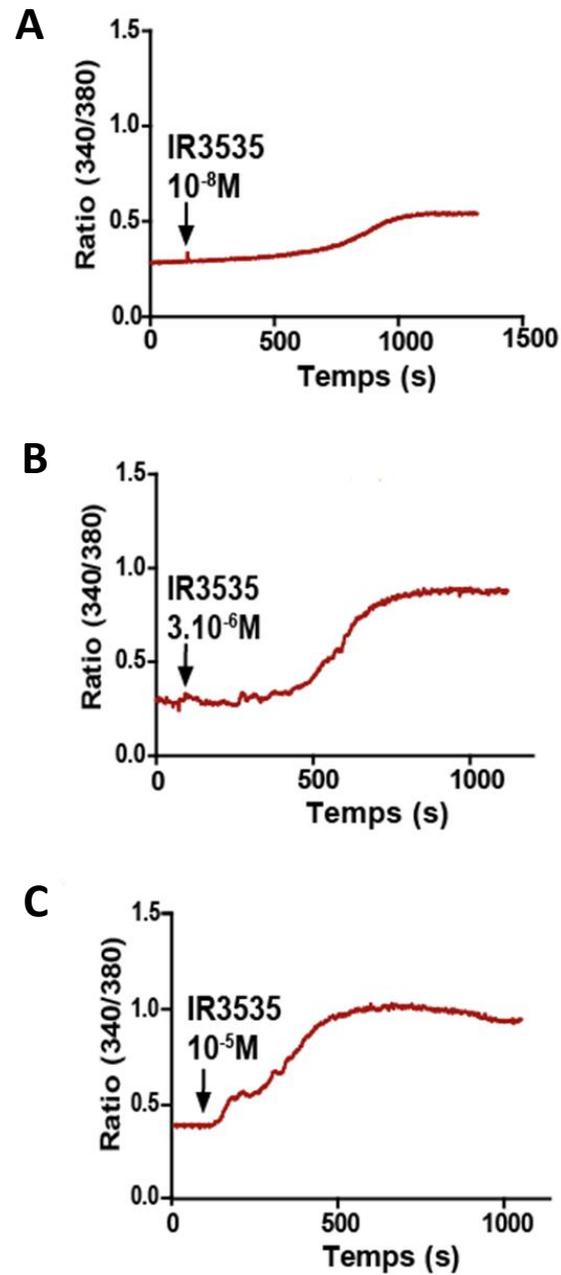
---

L'IR3535 est également l'un des répulsifs le plus couramment utilisé en application cutanée contre les moustiques nuisibles ou vecteurs de maladies. A la différence du DEET, il possède de nombreux atouts. Il est notamment plus efficace que le DEET contre certains vecteurs de maladies, comme la tique (Boulanger et Lipsker, 2014), et induit une bonne protection contre *An. gambiae*, vecteur du paludisme (Licciardi *et al*, 2006). L'IR3535 semble donc particulièrement intéressant pour l'utiliser en association avec un insecticide. Cependant, puisque son mode d'action cellulaire a été très peu étudié jusqu'à maintenant (Bohbot et Dickens, 2010 ; Sanford *et al*, 2014), une étude approfondie a été envisagée afin de déterminer si l'IR3535 pouvait être considéré comme un meilleur agent synergisant que le DEET.

### 1. Effet du répulsif IR3535 sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire des DUM neurones

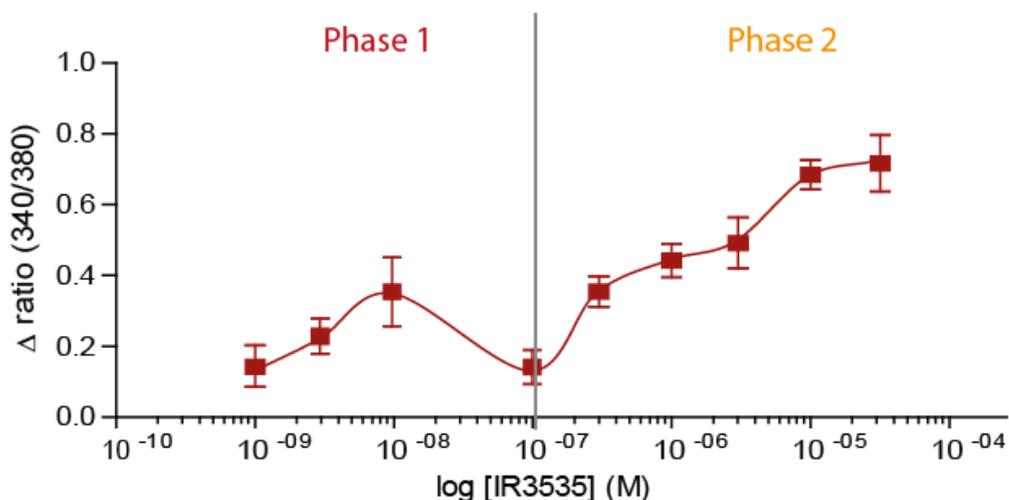
Comme le DEET, l'effet de l'IR3535 a été étudié à l'aide de la technique d'imagerie calcique à des concentrations comprises entre  $10^{-9}$ M et  $3.10^{-5}$ M. Les premiers résultats obtenus nous ont permis d'observer un effet dépendant de la concentration testée encore une fois très atypique. De faibles concentrations de répulsif ( $10^{-9}$ M à  $10^{-8}$ M) provoquent une augmentation lente de la  $[Ca^{2+}]_i$  avec un premier maximum atteint pour une concentration d'IR3535 de  $10^{-8}$ M ( $\Delta=0,37\pm0,12$  ;  $n=5$ ) (**Figure 36A**). De façon surprenante, de plus fortes concentrations de répulsif induisent un retour de la variation de calcium au niveau de base. Enfin pour des concentrations supérieures à  $10^{-7}$ M, l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  observée est plus importante (**Figure 36B**), atteignant un nouveau maximum pour une concentration de  $3.10^{-5}$ M ( $\Delta=0,71\pm0,07$  ;  $n=5$ ) (**Figure 36C**).

Ces résultats ont permis de construire une courbe dose-réponse au profil multiphasique complexe (**Figure 37**), différent de celui obtenu précédemment avec le DEET (**Figure 34**). Le décours de la courbe peut être séparé en deux phases principales. La phase 1 correspond à l'effet de l'IR3535 obtenu pour de faibles concentrations de répulsif, avec un effet maximum atteint pour une concentration de  $10^{-8}$ M. La phase 2 illustre l'effet de ce répulsif à fortes concentrations, avec un maximum atteint pour une concentration de  $3.10^{-5}$ M.



**Figure 36 :** Exemples de spectres illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire en présence d'IR3535 utilisé à  $10^{-8}M$  (A),  $3 \cdot 10^{-6}M$  (B) et  $10^{-5}M$  (C) sur DUM neurones isolés.

Ce décours multiphasique de la courbe dose-réponse laisse suggérer l'implication possible de plusieurs cibles cellulaires dans l'effet de l'IR3535. Afin de présenter de façon plus simple les différents résultats obtenus, deux parties distinctes correspondant à la phase 1 (faible concentration :  $10^{-8}$ M) et à la phase 2 (forte concentration :  $10^{-5}$ M) seront abordées, comme indiqué dans la **figure 37**.



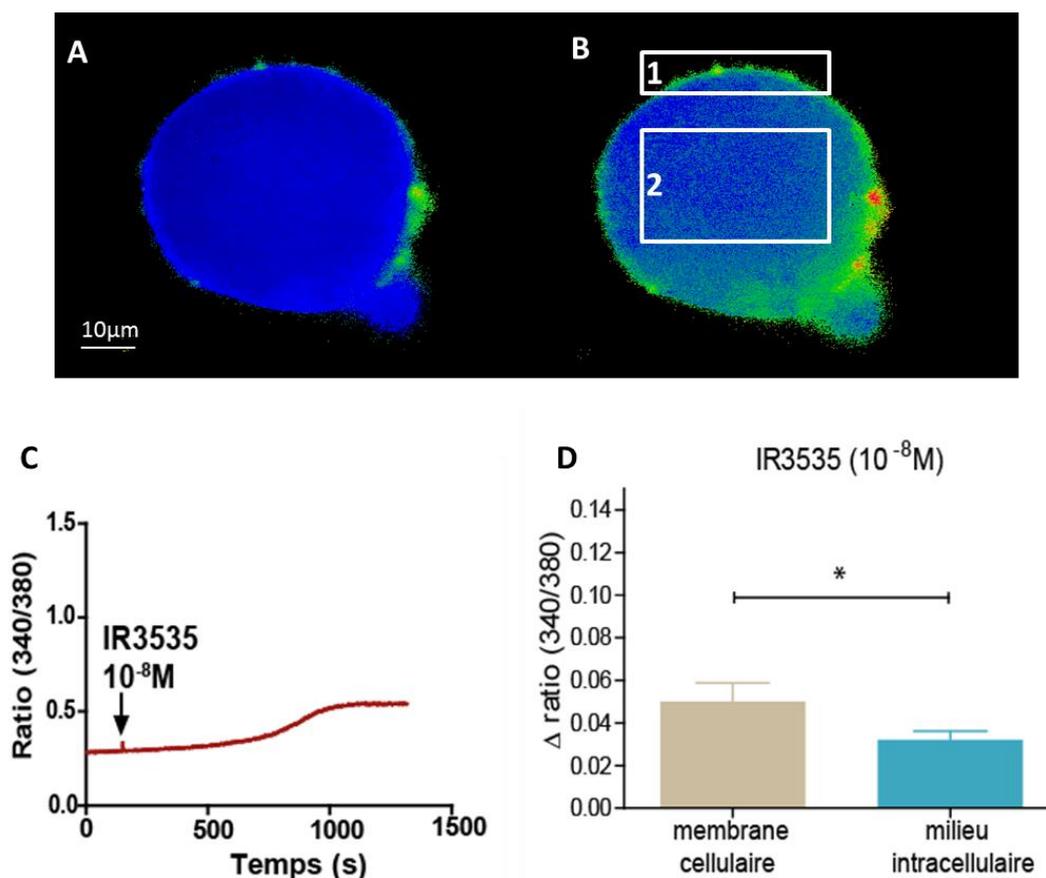
**Figure 37 :** Courbe dose-réponse illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée. Les variations de la concentration en calcium intracellulaire (exprimées en ratios 340/380) sont calculées à partir des moyennes des valeurs obtenues pour chaque concentration d'IR3535 testée. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. (n=5).

## 2. Origines des variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par le répulsif IR3535 à faible concentration

### 2.1. Localisation de la variation de la concentration en calcium intracellulaire

La première étape, pour déterminer l'origine de l'augmentation de calcium au sein du corps cellulaire du DUM neurone, consiste à vérifier si le calcium est d'origine intracellulaire ou extracellulaire. En effet les corps cellulaires des DUM neurones sont connus pour exprimer des canaux calcium membranaires permettant l'entrée d'ions calcium exogènes, mais aussi posséder des stocks de calcium intracellulaire impliqués dans des mécanismes de libération auto-catalytiques du calcium (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher *et al*, 2001 ; Courjaret *et al*, 2003 ; Gautier *et al*, 2008).

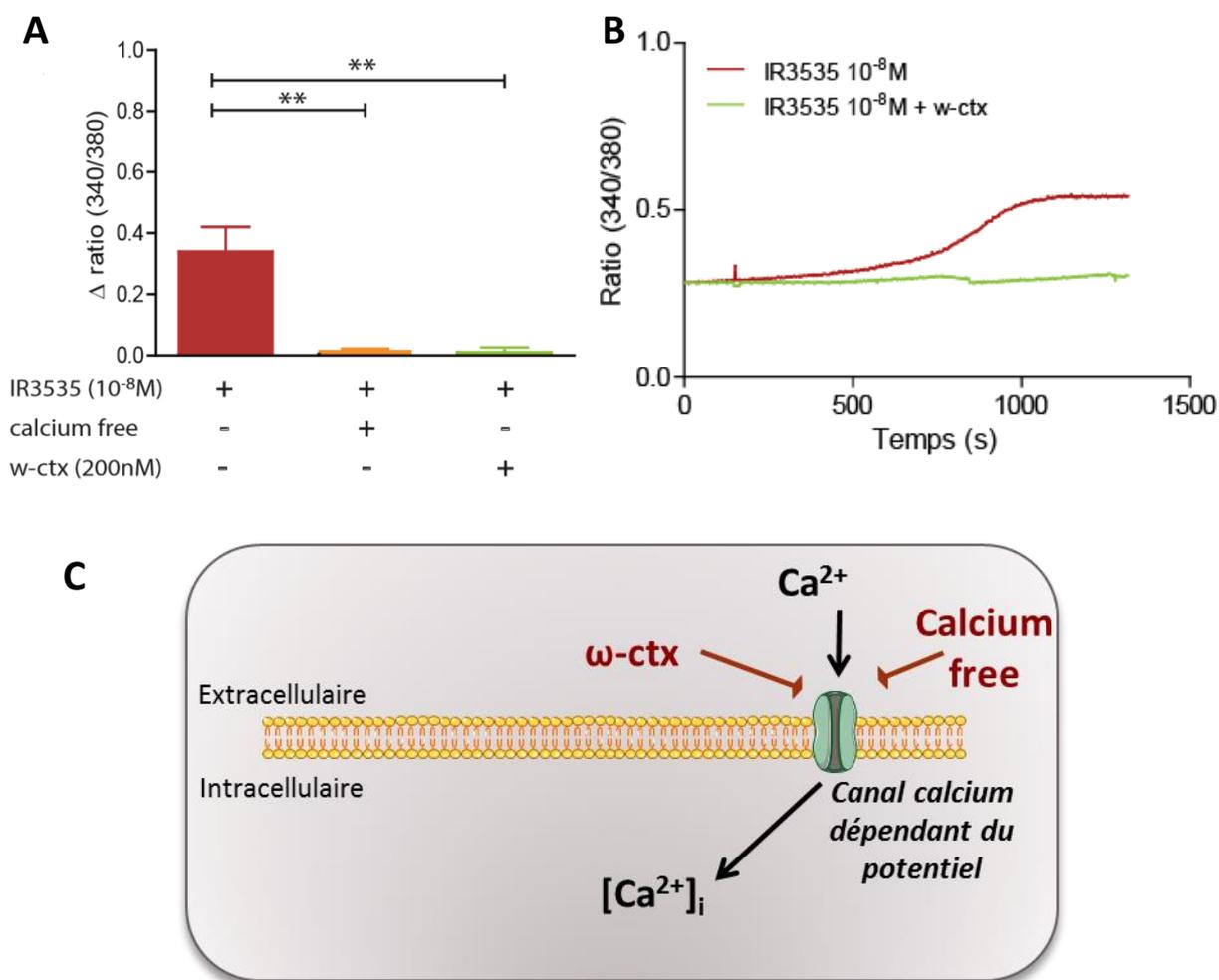
Grâce à la technique d'imagerie calcique ratiométrique, il est possible de localiser en temps réel l'origine des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  (**Figure 38A, B et C**). Les variations des pseudo-couleurs correspondant au ratio 340/380 peuvent évoluer différemment pour un temps donné entre le cytoplasme et la membrane cellulaire. Ainsi, au début de l'application de faibles concentrations d'IR3535 (**Figure 38A, B**), les mesures simultanées de la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme (**Figure 38B et D**) révèlent une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  au niveau de la membrane plasmique plus importante que dans le cytoplasme, suggérant une participation du calcium exogène dans l'effet de l'IR3535.



**Figure 38 :** Comparaison des variations de la concentration en calcium intracellulaire au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme induites par l'application d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. A- Visualisation d'un corps cellulaire de DUM neurone dans des conditions contrôles et au début de l'application d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M (B). 1 : membrane cellulaire, 2 : cytoplasme. C- Spectre illustrant la variation de la concentration en calcium intracellulaire en présence d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. D- Histogramme comparatif représentant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme induites par l'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. \*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.05$  ; n= 5).

### 2.2. Implication des canaux calcium dépendants du potentiel

Afin de caractériser les canaux ioniques membranaires impliqués dans la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , une solution dépourvue d’ions calcium contenant de l’EGTA, un chélateur des ions calcium, a été utilisée. L’absence d’ions calcium dans le milieu extracellulaire induit une inhibition totale de la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  initialement observée avec le répulsif dans des conditions contrôle (**Figure 39A**). Ces résultats indiquent l’importance du calcium exogène dans l’effet de l’IR3535 obtenu à faibles concentrations.



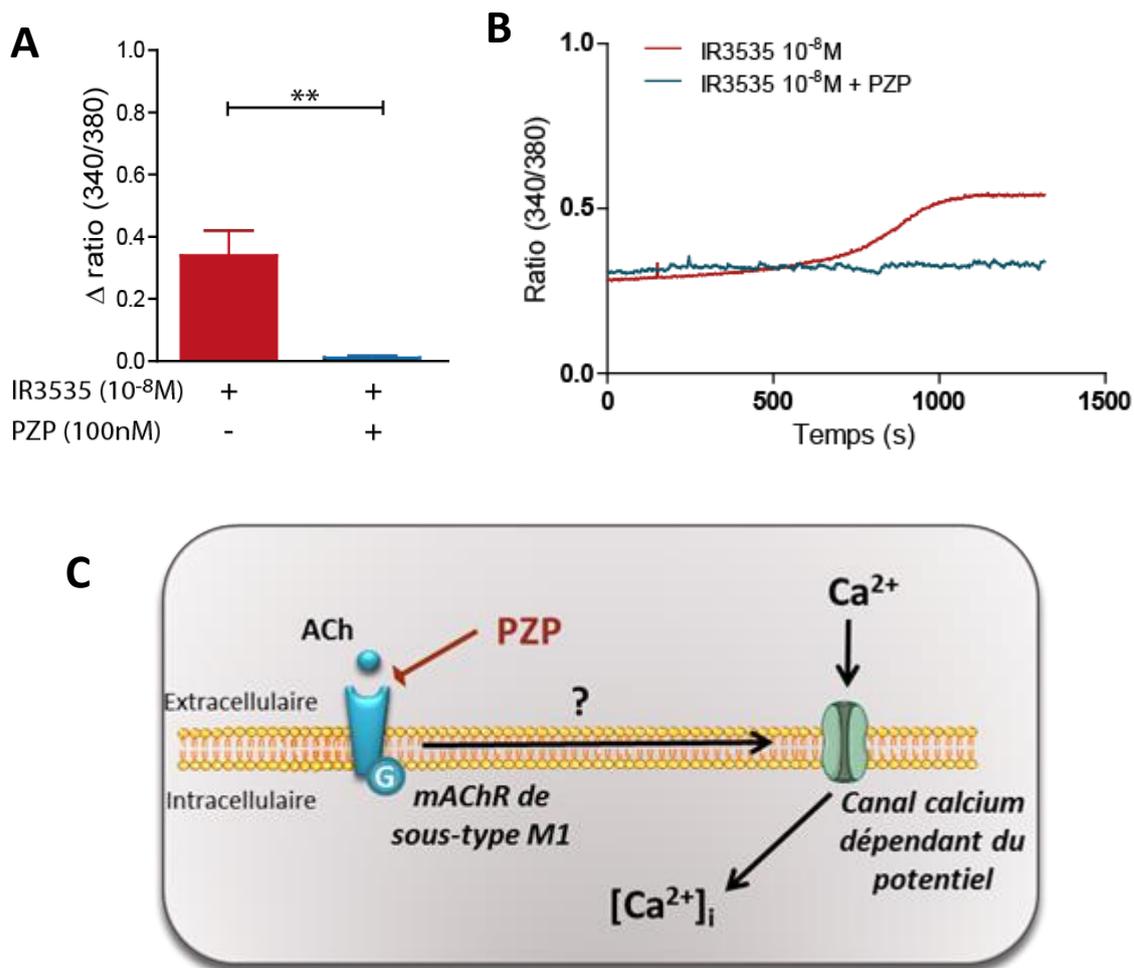
**Figure 39 :** A- Effet d’une solution extracellulaire dépourvue d’ions calcium (calcium free) et de la toxine de cône, l’ $\omega$ -conotoxine ( $\omega$ -ctx) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l’application d’IR3535 à  $10^{-8}M$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.01$  ;  $n = 5$ ). B- Spectres illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire induite par l’IR3535 testé à  $10^{-8}M$  seul (tracé rouge) ou en présence d’ $\omega$ -conotoxine (200nM, tracé vert). C- Représentation schématique illustrant la participation des canaux calcium dépendants du potentiel dans l’effet produit par l’IR3535 testé à  $10^{-8}M$ .

Parmi les canaux ioniques et/ou TRP membranaires des DUM neurones (Grolleau et Lapied 2000 ; Wicher *et al.*, 2001), les canaux calcium dépendants du potentiel de type N sont connus pour jouer un rôle majeur dans l'influx calcique (Wicher *et al.*, 2001 ; Grolleau *et al.*, 2006). C'est la raison pour laquelle une solution extracellulaire contenant de l' $\omega$ -conotoxine à 200nM, une toxine de cônes qui bloque spécifiquement les canaux calcium membranaires dépendants du potentiel de type N sur les DUM neurones (Grolleau et Lapied, 1996 ; Wicher *et al.* 2001 ; Grolleau *et al.*, 2006), a été testée. Dans ce cas également, une inhibition totale des variations de  $[Ca^{2+}]_i$  induites par l'IR3535 a été observée (**Figure 39A et B**). L'ensemble de ces résultats confirme l'implication des canaux calcium dépendants du potentiel dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  provoqués par l'IR3535 à faible concentration dans les DUM neurones (**Figure 39C**).

### 2.3. Implication des récepteurs cholinergiques de type muscarinique

A partir des résultats ci-dessus, il était devenu intéressant de déterminer les mécanismes cellulaires susceptibles d'être impliqués dans l'activation de ces canaux calcium dépendants du potentiel. Des études précédentes réalisées au laboratoire ont montré que l'effet du DEET faisait intervenir des récepteurs mAChRs de sous-type M1/M3 (Abd-Ella *et al.*, 2015, voir annexe 2).

Par conséquent, nous avons voulu vérifier si les mAChRs étaient également impliqués dans l'effet de l'IR3535 à faible concentration. Pour cela, la pirenzépine (PZP à 100nM), un antagoniste sélectif des mAChRs de sous-type M1, a été testée. La perfusion de PZP provoque une inhibition totale de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'IR3535 (**Figure 40A, B**), confirmant l'implication des mAChRs dans l'effet de l'IR3535 à  $10^{-8}$ M.

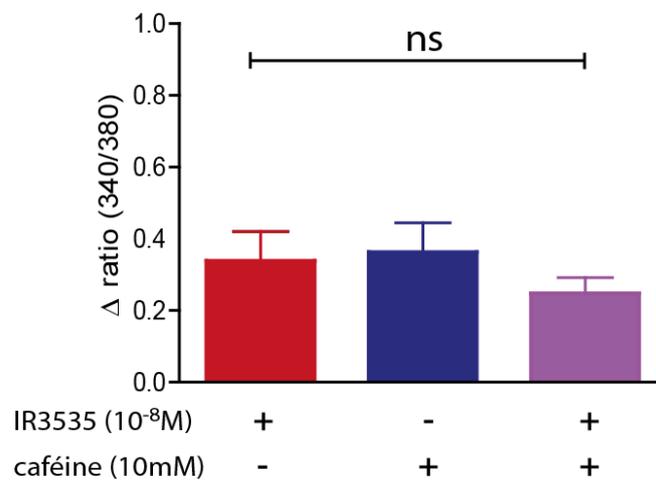


**Figure 40 :** A- Effet de la pirezépine (PZP, 100nM), antagoniste sélectif des mACHRs de sous-type M1, sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.01$ ) (n=5). B- Exemples de spectres illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire induite par l'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M seul et en présence de pirezépine (PZP, 100nM). C- Schéma récapitulatif illustrant l'implication des mACHRs de sous-type M1 dans l'effet de l'IR3535 testé à faible concentration. ACh : acétylcholine.

#### 2.4. Implication du calcium intracellulaire

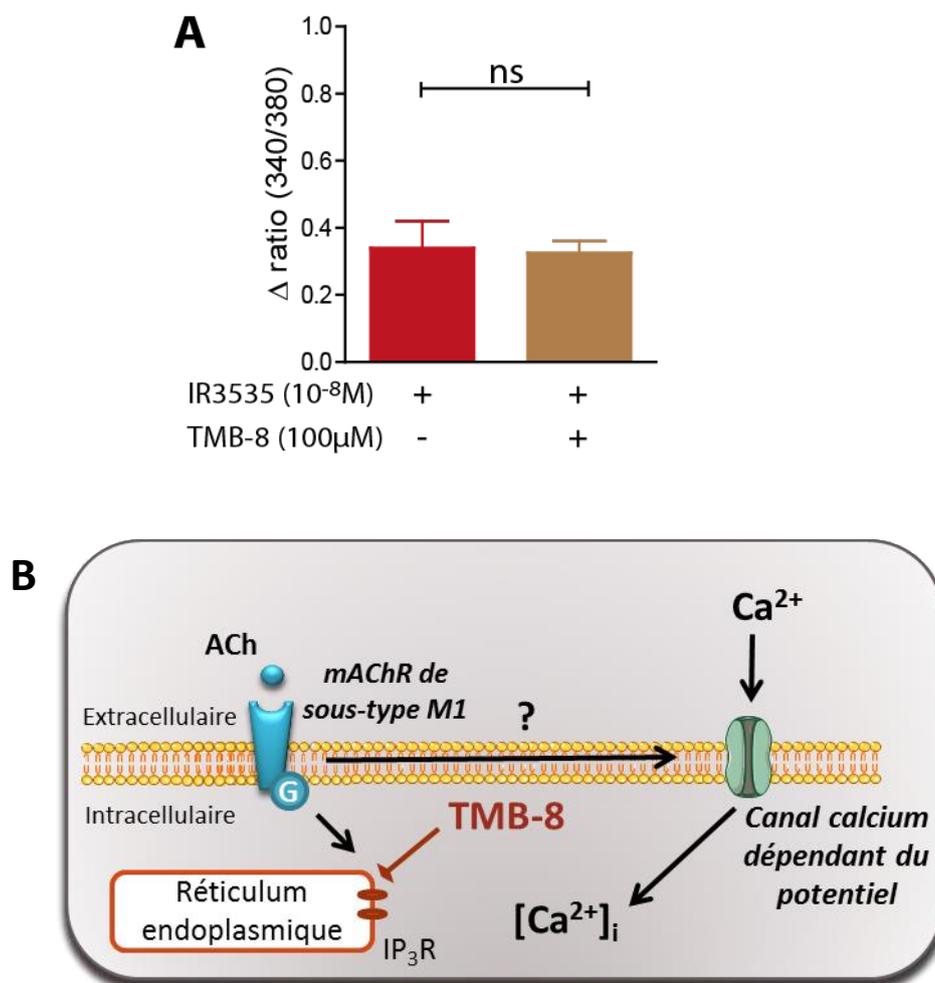
Les mACHRs de sous-type M1/M3 des DUM neurones sont des récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans l'activation des voies de signalisation intracellulaires faisant intervenir la PLC/DAG/IP<sub>3</sub> (e.g., Courjaret *et al*, 2003). Afin de vérifier si les stocks de calcium intracellulaire interviennent également dans l'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induite par de faibles concentrations d'IR3535, une solution à 10mM de caféine a été testée. La caféine est en effet connue pour déclencher la libération de calcium des stocks de calcium intracellulaire (Courjaret *et al*, 2003 ; Gautier *et al*, 2008). Si l'application de caféine seule

induit bien une augmentation de calcium, elle n'a, à l'inverse, aucun effet significatif sur les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par de faibles concentrations de répulsif (**Figure 41**). Ces résultats suggèreraient l'absence de participation des stocks de calcium intracellulaire dans l'effet de l'IR3535 à faible concentration.



**Figure 41 :** Histogramme comparatif illustrant les effets de la caféine (10mM) utilisée seule et en présence d'IR3535 testé à  $10^{-8}$ M sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ns : non significatif (n= 5-6).

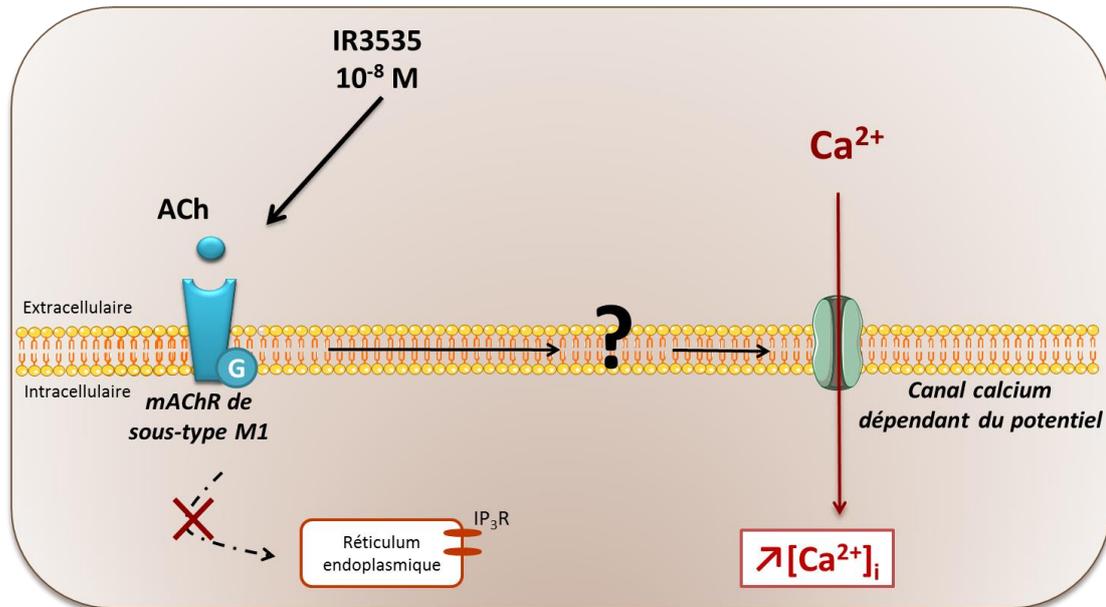
Afin de confirmer cette hypothèse, des expérimentations ont été réalisées en présence de TMB-8 (100 $\mu$ M), un antagoniste des récepteurs à l' $IP_3$  (Fellner *et al*, 2005). Les résultats obtenus ne montrent aucune effet significatif de ce composé sur la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'IR3535 (**Figure 42A**).



**Figure 42 :** A- Absence d'effet du TMB-8 (100 μM) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ns : non significatif (n= 5). B- Schéma récapitulatif illustrant l'absence de l'implication des stocks de calcium intracellulaire dans l'effet induit par l'IR3535 testé à 10<sup>-8</sup>M. ACh : acétylcholine ; IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>.

### 2.5. Récapitulation de l'effet de l'IR3535 à faible concentration

Nous pouvons ainsi conclure que pour de faibles concentrations de répulsif IR3535 (10<sup>-8</sup>M), l'origine des variations de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est majoritairement extracellulaire (**Figure 43**). Pour cela, l'activation des canaux calcium dépendants du potentiel est nécessaire pour générer un influx calcique. Il reste cependant à déterminer par quels mécanismes les mAChRs de sous-type M1 peuvent induire l'activation des canaux calcium. Une des hypothèses retenues sera développée ci-dessous et dans la partie discussion de ce mémoire.

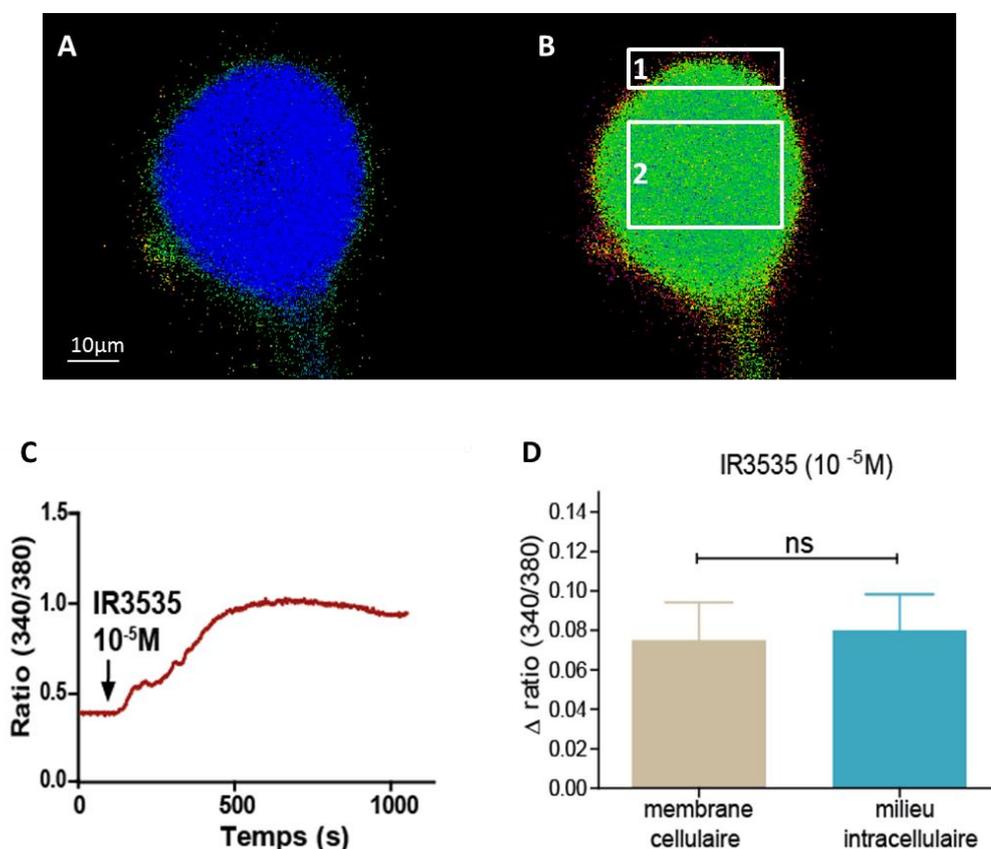


**Figure 43 :** Schéma récapitulatif résumant les mécanismes physiologiques impliqués dans les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'IR3535 testé à  $10^{-8}$ M. ACh : acétylcholine ;  $IP_3$ R : récepteur à l' $IP_3$ .

### 3. Origines des variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par le répulsif IR3535 à forte concentration

#### 3.1. Localisation de la variation de la concentration en calcium intracellulaire

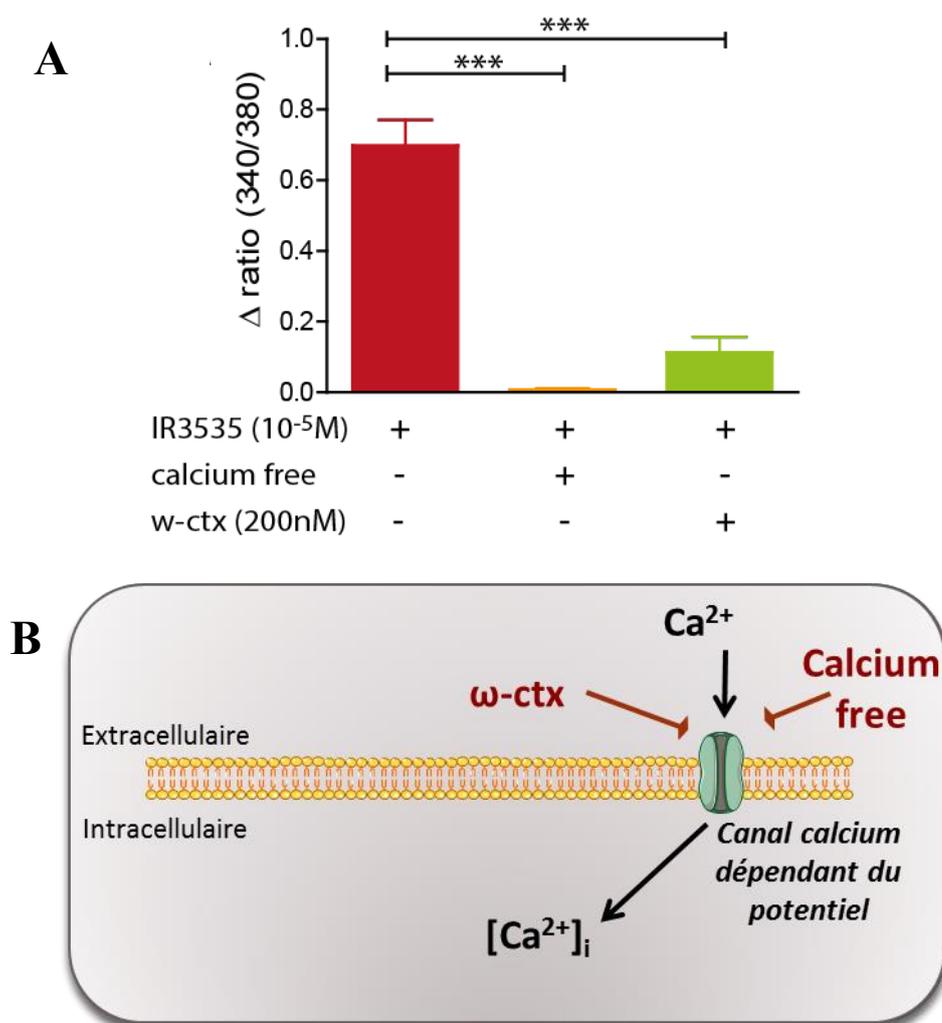
Dans un second temps, nous avons étudié l'origine des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  observée pour une forte concentration d'IR3535 ( $10^{-5}M$ , **Figure 44A, B et C**). Les valeurs de ratios mesurées simultanément au début de l'application au niveau de la membrane et du cytoplasme de la cellule sont relativement identiques (**Figures 44D**). Ces données suggèrent que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le répulsif pourrait être due à la fois à une entrée du calcium du milieu extracellulaire et à une libération du calcium des stocks de calcium intracellulaire.



**Figure 44 :** Comparaison des variations de la concentration en calcium intracellulaire au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme induites par l'application d'IR3535 à  $10^{-5}M$ . A- Visualisation d'un corps cellulaire de DUM neurone dans des conditions contrôles et au début de l'application d'IR3535 à  $10^{-5}M$  (B). 1 : membrane cellulaire, 2 : cytoplasme. C- Spectre illustrant la variation de la concentration en calcium intracellulaire en présence d'IR3535 testé à  $10^{-5}M$ . D- Histogramme comparatif illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurée au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme de la cellule induites par l'IR3535 testé à  $10^{-5}M$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ns : non significatif (n= 5).

### 3.2. Implication des canaux calcium dépendants du potentiel

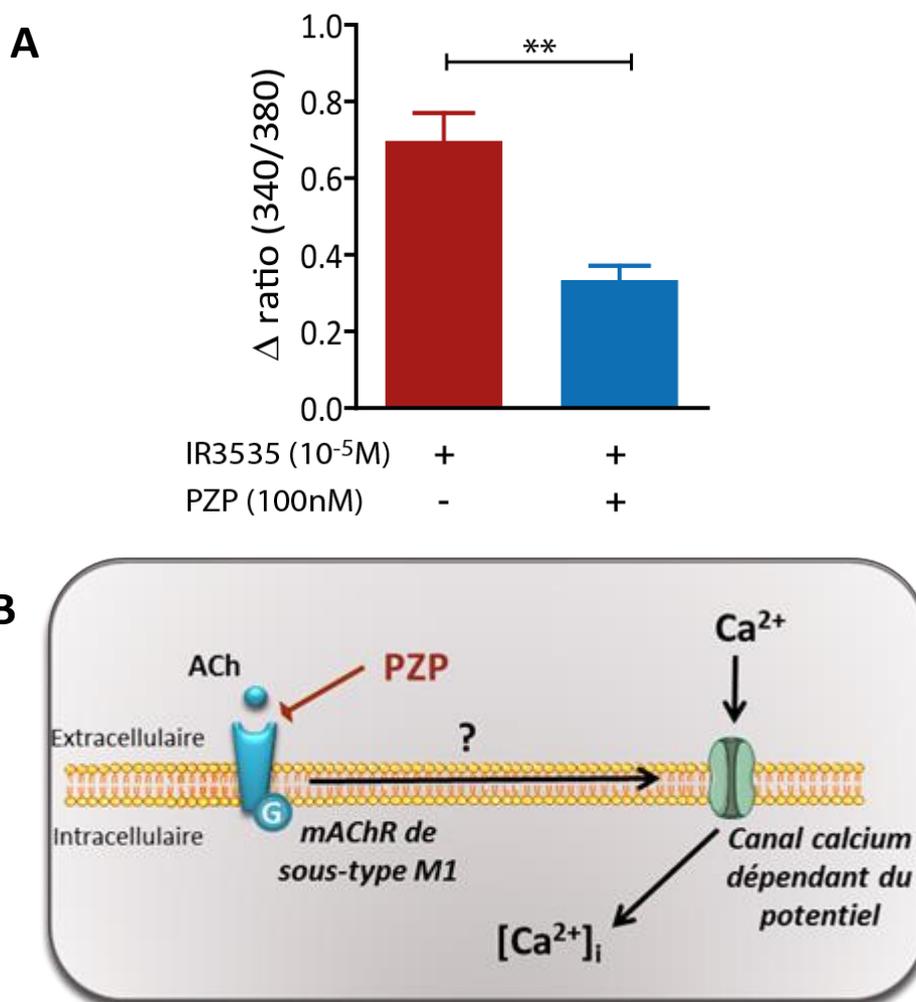
Afin de vérifier l'implication du calcium exogène, l'IR3535 à  $10^{-5}$ M a été testé en présence d'une solution dépourvue d'ions calcium (calcium free). Dans ce cas, il a été observé une inhibition totale de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'IR3535. L'utilisation d' $\omega$ -ctx à 200nM provoque également une forte réduction de la variation de calcium produite par l'IR3535 mais qui n'est pas totale (**Figure 45A**). Ces résultats confirment la participation du calcium exogène *via* l'activation des canaux calcium dépendants du potentiel dans l'effet de l'IR3535 utilisé cette fois-ci à forte concentration (**Figure 45B**).



**Figure 45 :** A- Effet d'une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (calcium free) et de l' $\omega$ -conotoxine ( $\omega$ -ctx, 200nM) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à  $10^{-5}$ M. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. \*\*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.001$  ;  $n=5$ ). B- Représentation schématique illustrant la participation des canaux calcium dépendants du potentiel dans l'effet produit par l'IR3535 testé à  $10^{-5}$ M.

### 3.3. Implication des récepteurs cholinergiques de type muscarinique

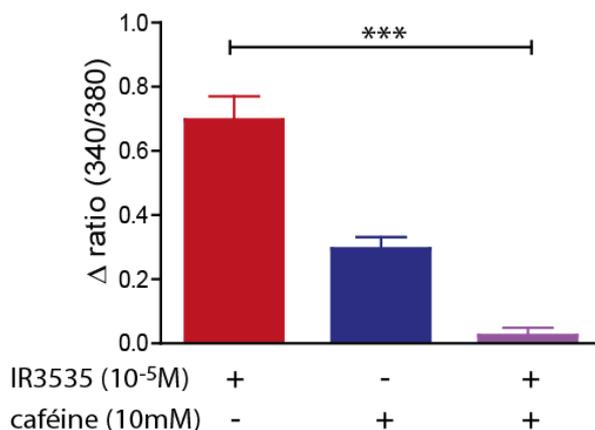
Afin de confirmer également la participation des mAChRs de sous-type M1/M3 dans l'effet de l'IR3535 utilisé à forte concentration, les expériences ont été réalisées en présence de PZP (100nM). Comme illustré dans la **Figure 46A**, même si l'utilisation de PZP provoque une réduction significative de la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'IR3535, elle ne provoque pas néanmoins une inhibition totale.



**Figure 46 :** A- Effet de la pirezépine (PZP, 100nM) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à  $10^{-5}M$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.01$  ;  $n=4-5$ ). B- Schéma récapitulatif illustrant l'implication des mAChRs de sous-type M1 dans l'effet de l'IR3535 testé à  $10^{-5}M$ . ACh : acétylcholine.

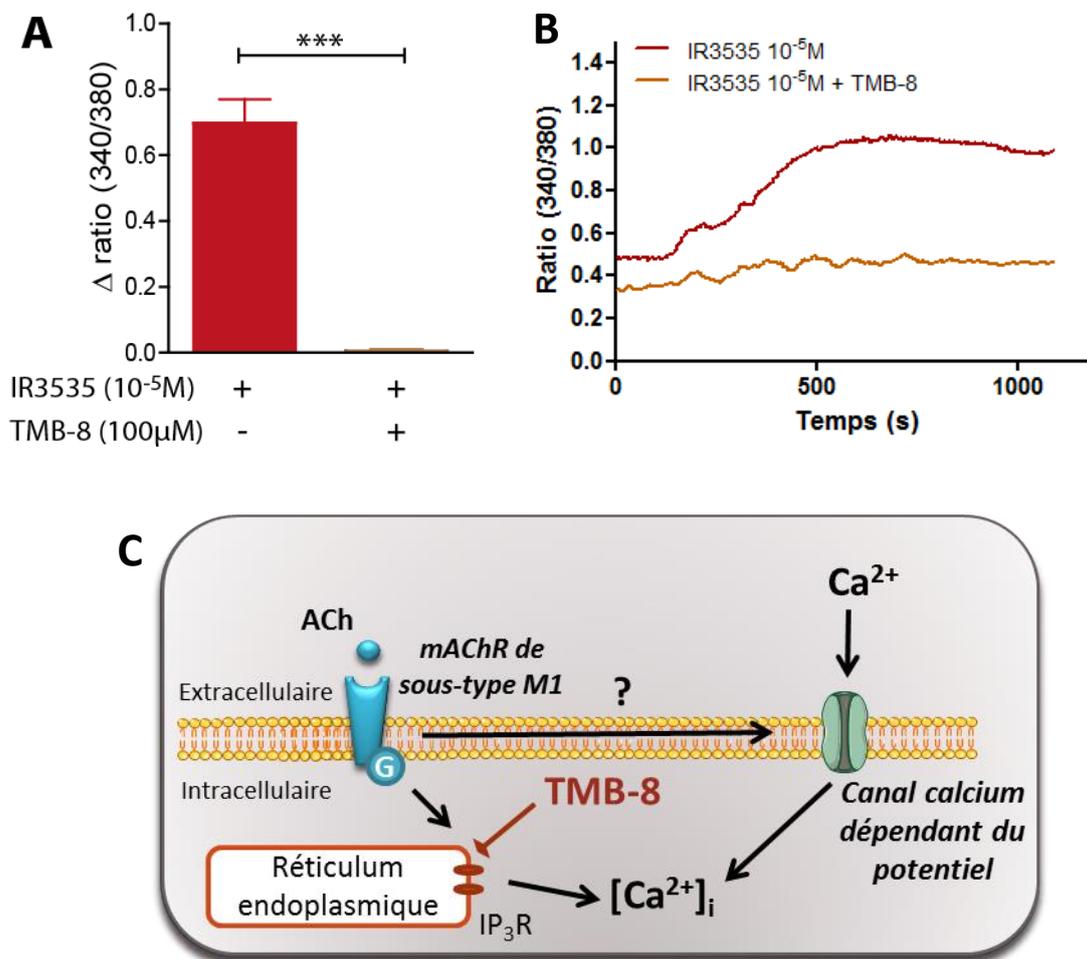
### 3.4. Implication du calcium intracellulaire

Une solution de caféine à 10mM a été testée afin de vérifier l'implication du calcium d'origine intracellulaire. L'application de caféine réduit fortement les variations de la concentration en calcium produites par l'IR3535 (**Figure 47**).



**Figure 47 :** Histogramme comparatif illustrant les effets de la caféine (10mM) utilisée seule et en présence d'IR3535 testé à 10<sup>-5</sup>M sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. \*\*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.001$  ;  $n=5$ ).

Puisqu'il est connu que les mAChRs sont couplés au système PLC/DAG/IP<sub>3</sub> sur les DUM neurones (Courjaret *et al*, 2003), des expériences supplémentaires ont été réalisées en présence de TMB-8. Les résultats obtenus montrent une inhibition totale de l'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induit par de fortes concentrations d'IR3535 (**Figure 48A et B**). L'activation des mAChRs de sous-type M1 par de fortes concentrations de répulsif induit ainsi l'activation des voies de signalisation permettant de produire de l'IP<sub>3</sub>, responsable de la libération du calcium des stocks de calcium intracellulaire (**Figure 48C**).

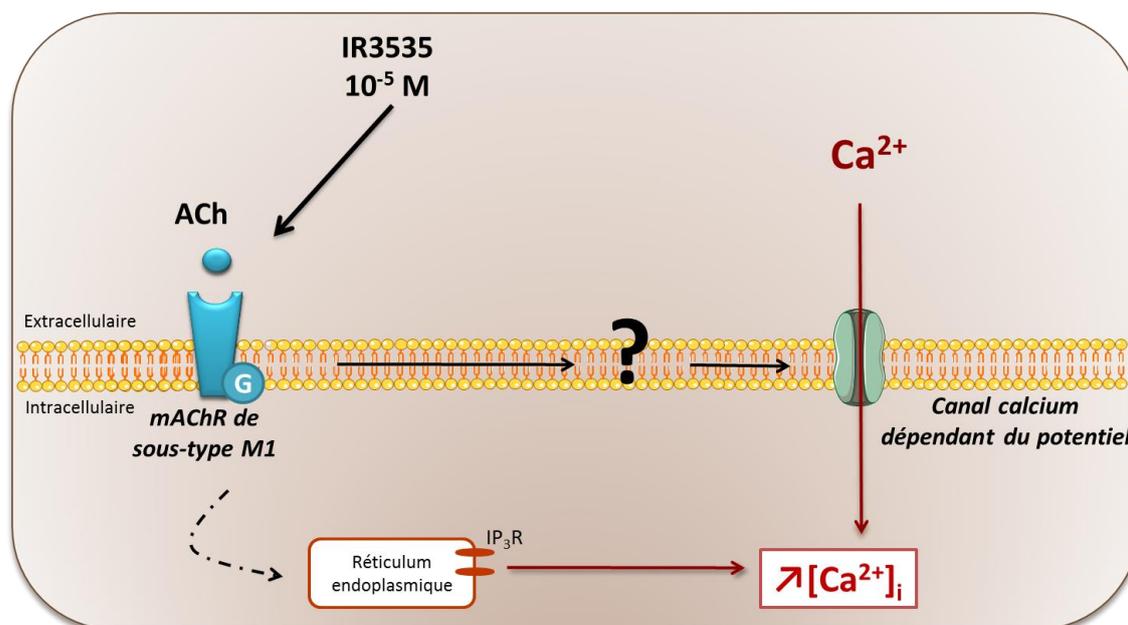


**Figure 48 :** A- Effet du TMB-8 (100 μM) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à 10<sup>-5</sup>M. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. \*\*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0.001$  ; n=5). C- Schéma récapitulatif illustrant la participation du calcium intracellulaire *via* les stocks de calcium intracellulaire dans l'effet de l'IR3535 testé à 10<sup>-5</sup>M. ACh : acétylcholine ; IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>.

### 3.5. Récapitulation de l'effet d'IR3535 à forte concentration

Pour de fortes concentrations d'IR3535 (10<sup>-5</sup>M), l'origine des variations de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est à la fois extracellulaire et intracellulaire. L'interaction de l'IR3535 avec les mAChRs de sous-type M1 entraîne l'activation des canaux calcium dépendants du potentiel, induisant une entrée d'ions calcium du milieu exogène dans le cytoplasme de la cellule. En parallèle, l'activation de ces récepteurs mAChRs active la voie de signalisation de type PLC/DAG/IP<sub>3</sub> *via* les protéines G, provoquant une cascade d'évènements intracellulaires aboutissant à la production d'IP<sub>3</sub> responsable de la libération de calcium des stocks de calcium intracellulaire. La variation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> observée est donc bien d'origine extracellulaire et intracellulaire (**Figure 49**). Comme indiqué pour de faibles concentrations d'IR3535, il reste à déterminer

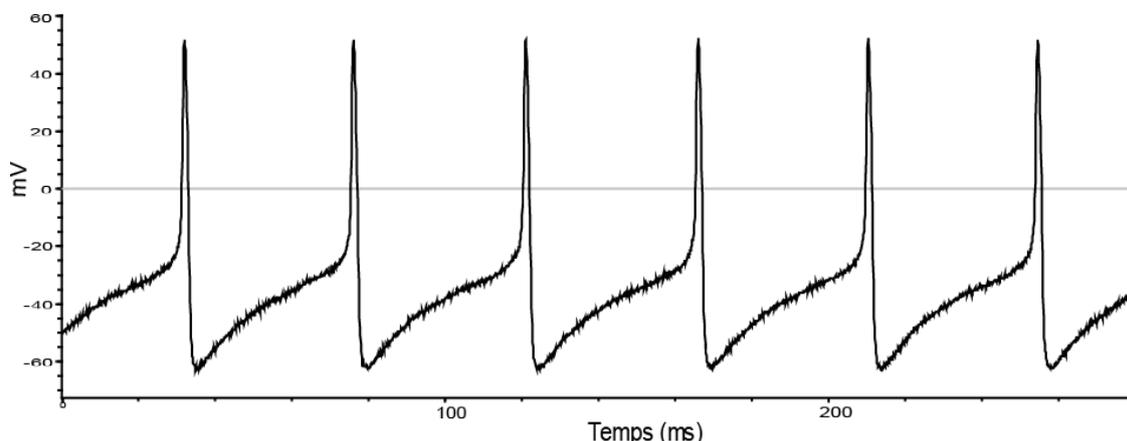
les mécanismes à l'origine de l'activation des canaux calcium dépendants du potentiel suite à l'interaction de l'IR3535 avec les mAChRs de sous-type M1.



**Figure 49** : Schéma récapitulatif résumant les mécanismes physiologiques impliqués dans les variations de calcium intracellulaires induites par l'application d'IR3535 testé à  $10^{-5}$  M. ACh : acétylcholine ; IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>.

#### 4. Effet du répulsif IR3535 sur l'activité électrique des DUM neurones

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mode d'action de l'IR3535 sur les DUM neurones, une étude électrophysiologique a été réalisée à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. Les DUM neurones de blatte sont des cellules neurosécrétrices qui se distinguent des autres cellules nerveuses d'insectes par une activité électrique pacemaker intrinsèque avec un potentiel de membrane compris entre -45 et -60mV et des potentiels d'action de grande amplitude (environ 100mV) séparés par une phase de pré-dépolarisation qui permet d'atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action suivant (**Figure 50**). Des études électrophysiologiques effectuées au laboratoire ont permis de caractériser tous les courants ioniques dépendants et indépendants du potentiel impliqués dans cette activité électrique spontanée (Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher *et al*, 2001 ; Dugravot *et al*, 2003 ; Defaix et Lapied 2005 ; Laviaille-Defaix *et al*, 2006).

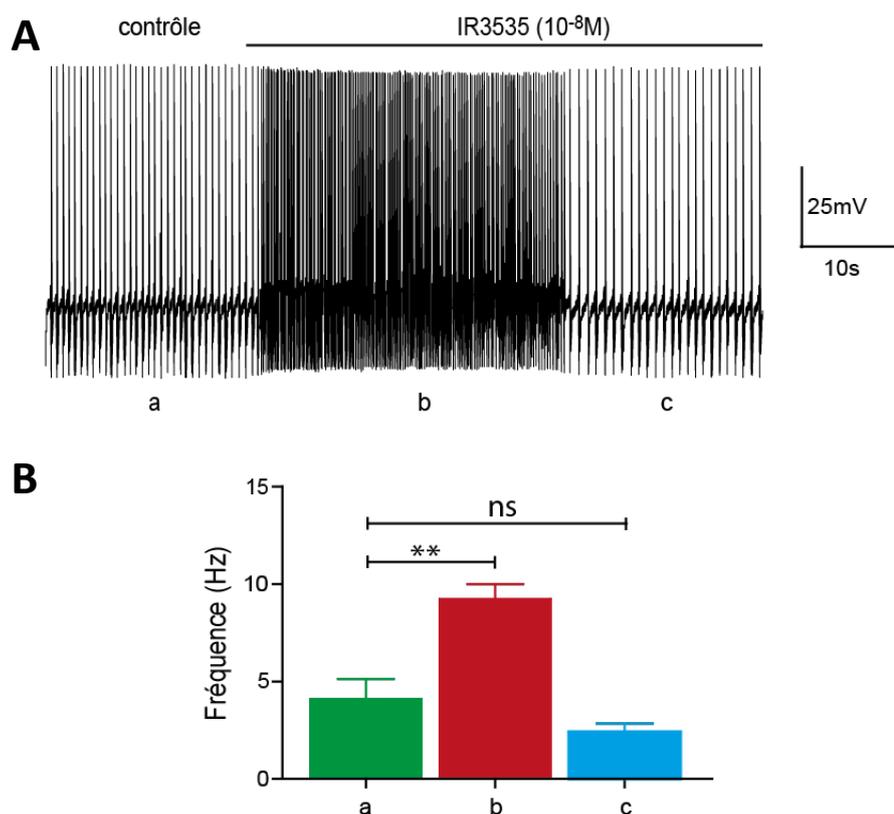


**Figure 50 :** Activité électrique spontanée d'un DUM neurone isolé du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse ventrale de la blatte *Periplaneta americana*, enregistrée à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

#### 4.1. Effet du répulsif IR3553 à faible concentration sur l'activité électrique des DUM neurones

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'IR3535 à faible concentration ( $10^{-8}M$ ), sur l'activité électrique du corps cellulaire d'un DUM neurone isolé. Le répulsif a été perfusé en continu et les effets sur l'activité électrique ont été enregistrés et mesurés grâce au logiciel pclamp (**Figure 51**).

Lors de la perfusion d'IR3535, il est possible d'observer une variation transitoire de l'activité électrique spontanée de la cellule. En effet, durant un épisode relativement court, de l'ordre de quelques dizaines de secondes, on observe une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action de  $3,73 \pm 0,58$  Hz à  $11,22 \pm 2,69$  Hz ( $n=6$ ), avant de revenir à une fréquence comparable à la valeur contrôle (**Figure 51A et B**). De même, durant cette augmentation de fréquence, il est constaté une réduction de l'amplitude des potentiels d'action associée à une légère dépolarisation membranaire (entre 4 et 7mV). Bien que ce dernier effet puisse paraître faible, cette variation de potentiel peut être suffisante pour provoquer une activation des canaux calcium dépendants du potentiel (Grolleau *et al*, 2006).



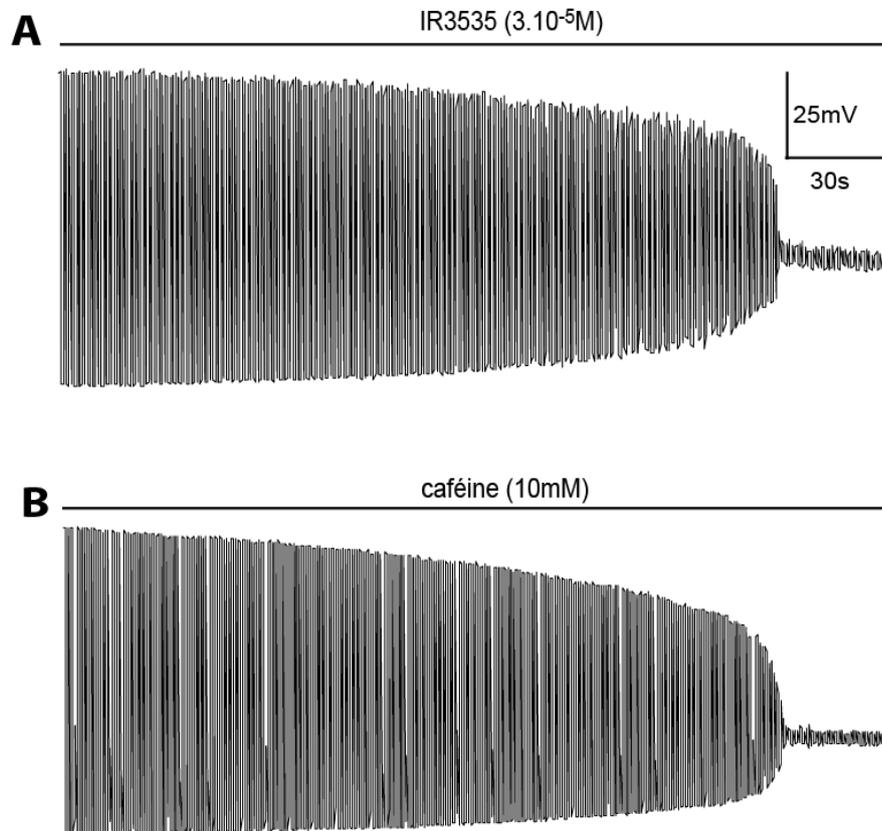
**Figure 51 :** A- Effet de l'IR3535 utilisé à  $10^{-8}$ M sur l'activité électrique d'un DUM neurone isolé enregistré à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. B- Histogramme comparatif illustrant les variations de la fréquence de décharge des potentiels d'action au cours du traitement par l'IR3535. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ns : non significatif, \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,01$  ;  $n = 6$ ).

#### 4.2. Effet du répulsif IR3535 à forte concentration sur l'activité électrique des DUM neurones

Sachant que l'IR3535 induit différents mécanismes selon la concentration, nous avons par la suite voulu étudier l'effet sur l'activité électrique spontanée du DUM neurones de l'IR3535 à plus forte concentration (e.g.,  $3 \cdot 10^{-5}$ M) (**Figure 52**).

Comme illustré dans la **Figure 52A**, durant l'application du répulsif à  $3 \cdot 10^{-5}$ M, il a été possible d'observer une diminution progressive de l'amplitude des potentiels d'action jusqu'à une disparition totale de l'activité électrique. Parce qu'il a été montré que l'IR3535 à forte concentration déclenchait la libération de calcium des stocks de calcium intracellulaire *via* une interaction avec les mAChRs de sous-type M1, nous avons testé dans les mêmes conditions expérimentales l'effet d'une solution de caféine à 10mM. Dans ces conditions, les effets observés sont très proches de ceux observés en présence d'IR3535 à forte

concentration, à savoir une diminution progressive de l'amplitude des potentiels d'action et une disparition totale de l'activité électrique (**Figure 52B**).



**Figure 52 :** A- Effet de l'IR3535 à  $3.10^{-5}$ M sur l'activité électrique spontanée d'un DUM neurone de blatte. B- Effet de la caféine à 10mM sur l'activité électrique pacemaker d'un DUM neurone de blatte.

## Chapitre III – Etudes de l'effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur les DUM neurones de blatte *Periplaneta americana*

---

Le premier objectif de ce travail de thèse consistait à déterminer si un autre répulsif que le DEET pouvait induire une variation de la concentration en calcium intracellulaire. C'était une étape importante car comme indiqué dans la partie Introduction de ce mémoire, il a été montré le rôle important du calcium, *via* des voies de signalisation calcium-dépendantes, dans la modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides (Courjaret et Lapiéd, 2001 ; Thany *et al*, 2007 ; Laviaille-Defaix *et al*, 2010 ; Murillo *et al*, 2011 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Calas-List *et al*, 2012 ; Licznar *et al*, 2014 ; List *et al*, 2014). Nous venons de montrer que l'IR3535 induit une augmentation de calcium à très faible concentration ( $10^{-8}$ M), c'est-à-dire à une concentration plus faible que le DEET. Par conséquent, ce répulsif semble être un bon candidat pour être utilisé comme agent synergisant pour augmenter l'efficacité d'un insecticide.

Ainsi, nous avons décidé d'utiliser le répulsif IR3535 à  $10^{-8}$ M pour étudier ses effets synergiques potentiels sur un insecticide donné. Pour ce faire, il a fallu sélectionner un insecticide susceptible d'être utilisé en combinaison avec l'IR3535 qui puisse avoir un intérêt potentiel en LAV.

### 3. Etude d'un insecticide néonicotinoïde sur les propriétés électrophysiologiques des DUM neurones de blatte

#### 3.1. Choix de l'insecticide

Afin de déterminer quelle combinaison répulsif/insecticide pourrait être envisagée comme nouvelle stratégie en LAV, la première question a été de considérer quel insecticide serait le plus intéressant pour être associé à l'IR3535. Pour cela, nous nous sommes référés aux rapports d'expertise du Groupe de Travail LAV de l'Anses (2011 et 2013). Dans ces rapports, il a été recensé un ensemble de données sur les insecticides (larvicides et adulticides) utilisés en LAV afin de les hiérarchiser en trois classes selon une analyse multicritère SIRIS. Ainsi, 32 substances actives au mode d'action distinct ont pu être classées en se basant sur leur efficacité larvicide ou adulticide contre les moustiques vecteurs de maladies (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Classement des 32 substances actives en trois classes selon le niveau de connaissances sur l’efficacité sur moustiques (Rapport d’expertise collective de l’Anses, 2011).**

Classe A				Classe B		Classe C	
Larvicides		Adulticides		Larvicides	Adulticides	Larvicides	Adulticides
Gîtes naturels	Gîtes « hors sol »	Spatial	Résiduel				
<i>Bt</i> * (+ <i>Bs</i> *)	<i>Bt</i> * (+ <i>Bs</i> *)	Deltaméthrine*	Deltaméthrine*	Cyromazine*	Alléthrine*	Dicyclanil	-
Pyriproxyfène*	Diflubenzuron*	Malathion	Malathion	Imidaclopride*	Dinotefuran*	Hydroprène	
Téméphos**	Spinosad*		Fenthion		Imidaclopride*	Spinetoram	
	Pyriproxyfène*		Chlorpyrifos-méthyle		Indoxacarbe*	Acétamipride*	
	Téméphos**		Bendiocarbe*			Chlorantraniliprole	
	Triflumuron*					Clothianidine*	
	Chlorpyrifos-méthyle					Cycloprothrine	
						Ethiprole	
						Formothion	
						Imiprothrine*	
						Métaflumizone	
						Nitenpyram	
						Silafluofen	
						Thiaclopride	
						Thiamethoxam*	

\* autorisée ou en cours d’évaluation dans le cadre de la réglementation européenne biocides

\*\* peut éventuellement bénéficier d’une dérogation d’utilisation jusqu’en 2014

Le classement différencie les substances actives ayant une efficacité prouvée sur le terrain (A), celles ayant une efficacité prouvée en condition de laboratoire (B), et celles ayant une efficacité contre d’autres types d’insectes que les moustiques (C). Comme indiqué dans le **tableau 3**, les molécules classées en A sont des substances actives déjà couramment utilisées en LAV. Or, pour la plupart, l’émergence de résistances à ces produits chez les moustiques a été observée. Elles ne semblent donc pas correspondre aux meilleures candidates pour l’étude d’une nouvelle association avec un répulsif. Parmi les substances classées en B et C, on retrouve beaucoup d’insecticides de type néonicotinoïdes. Ces insecticides semblent particulièrement intéressants puisqu’ils présentent des profils toxicologiques/écotoxicologiques favorables et que l’expertise collective de l’Anses les envisage en association dans un mélange de molécules à mode d’action complémentaire. Les néonicotinoïdes agissant en effet comme agonistes sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChRs) (Casida et Durkin, 2013), ils touchent des cibles cellulaires différentes des substances actives couramment utilisées contre les moustiques vecteurs de maladies.

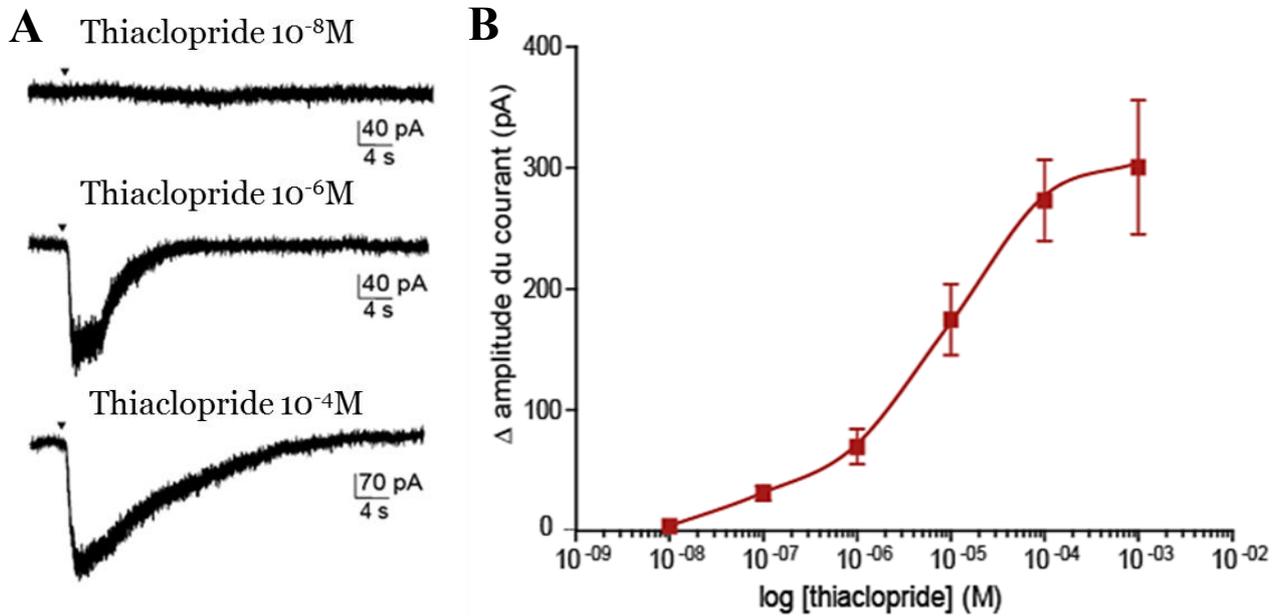
Parmi ces néonicotinoïdes, plusieurs ont été sélectionnés dans une étude menée par Darriet et Chandre (2013). Il a été évalué sur des moustiques résistants aux pyréthriinoïdes l'efficacité de six néonicotinoïdes seuls ou en combinaison avec la deltaméthrine et le piperonyl butoxide (PBO). Les résultats ont montré un effet synergique de la deltaméthrine et du PBO avec trois néonicotinoïdes distincts, le thiaméthoxame, le nitenpyrame et le thiaclopride. Parmi ces trois insecticides, le thiaclopride présente le profil toxicologique le plus acceptable pour les organismes non cibles, notamment les abeilles. Le thiaclopride a donc été sélectionné pour l'étudier dans une association avec l'IR3535.

### *1.2. Etudes électrophysiologiques des effets du thiaclopride sur les DUM neurones à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière dans des conditions de potentiel imposé*

Afin de pouvoir estimer si l'IR3535 possède un effet synergique sur l'effet du thiaclopride, il a tout d'abord fallu étudier l'effet de cet insecticide seul sur les DUM neurones. Des études électro-pharmacologiques précédentes réalisées au laboratoire ont permis de caractériser sur ces cellules neurosécrétrices trois grands types de récepteurs cholinergiques : 1) les récepteurs cholinergiques de type nicotiques (nAChRs) insensibles à l' $\alpha$ -bungarotoxine (Courjaret et Lapied 2001 ; Courjaret *et al*, 2003 ; Thany *et al*, 2007 ; 2008 ; Calas-List *et al*, 2012 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012), 2) des récepteurs cholinergiques ayant un profil pharmacologique mixte nicotino-muscarinique (Lapied *et al*, 1990 ; Grolleau *et al*, 1996) et des mAChRs de sous-type M1/M3 et M2 (Lapied *et al*, 1992 ; Courjaret *et al*, 2003). Les nAChRs des DUM neurones sont connus pour être la cible à différents néonicotinoïdes qui agissent comme des agonistes sur ces récepteurs comme par exemple l'imidaclopride, l'acétamipride, la clothianidine (Buckingham *et al*, 1997 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany *et al*, 2007 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Calas-List *et al*, 2012). A partir de ces données, une étude électrophysiologique à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (conditions de potentiel imposé) a été menée dans un premier temps avec le thiaclopride.

Le thiaclopride a été appliqué durant une période de 5 secondes sur des DUM neurones isolés dont le potentiel de référence a été maintenu à -50mV. Pour établir la courbe dose-réponse, les concentrations testées ont été comprises entre  $10^{-8}$ M et  $10^{-3}$ M. Dans ces conditions, l'application de thiaclopride génère un courant entrant dont l'amplitude augmente avec la concentration de thiaclopride utilisée (**Figure 53A**). A partir de la courbe dose-réponse illustrée dans la **figure 53B**, il a été observé que l'insecticide commence à générer un courant entrant de faible amplitude à partir de  $10^{-7}$ M ( $-31 \pm 6,1$ pA ; n=4) dont l'intensité augmente en fonction de la concentration (e.g.,  $10^{-6}$ M ;  $-69,4 \pm 14,6$ pA ; n=6) pour

atteindre un maximum de  $-300,5 \pm 59,6 \text{ pA}$  ( $n=6$ ) à  $10^{-3} \text{ M}$  de thiaclopride. A partir de la courbe, il a été possible de déterminer l' $\text{EC}_{50}$  de cet insecticide qui est de  $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .



**Figure 53 :** A- Exemples de courants ioniques entrants induits par l'application de thiaclopride à des concentrations comprises entre de  $10^{-3} \text{ M}$  et  $10^{-8} \text{ M}$ . B- Courbe dose-réponse obtenue à partir des mesures des amplitudes des courants entrants induits par le thiaclopride pour chaque concentration testée. Potentiel de référence :  $-50 \text{ mV}$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ( $n= 4-6$ ).

#### 4. Effets du prétraitement des DUM neurones de blatte par l'IR3535 sur l'action du thiaclopride

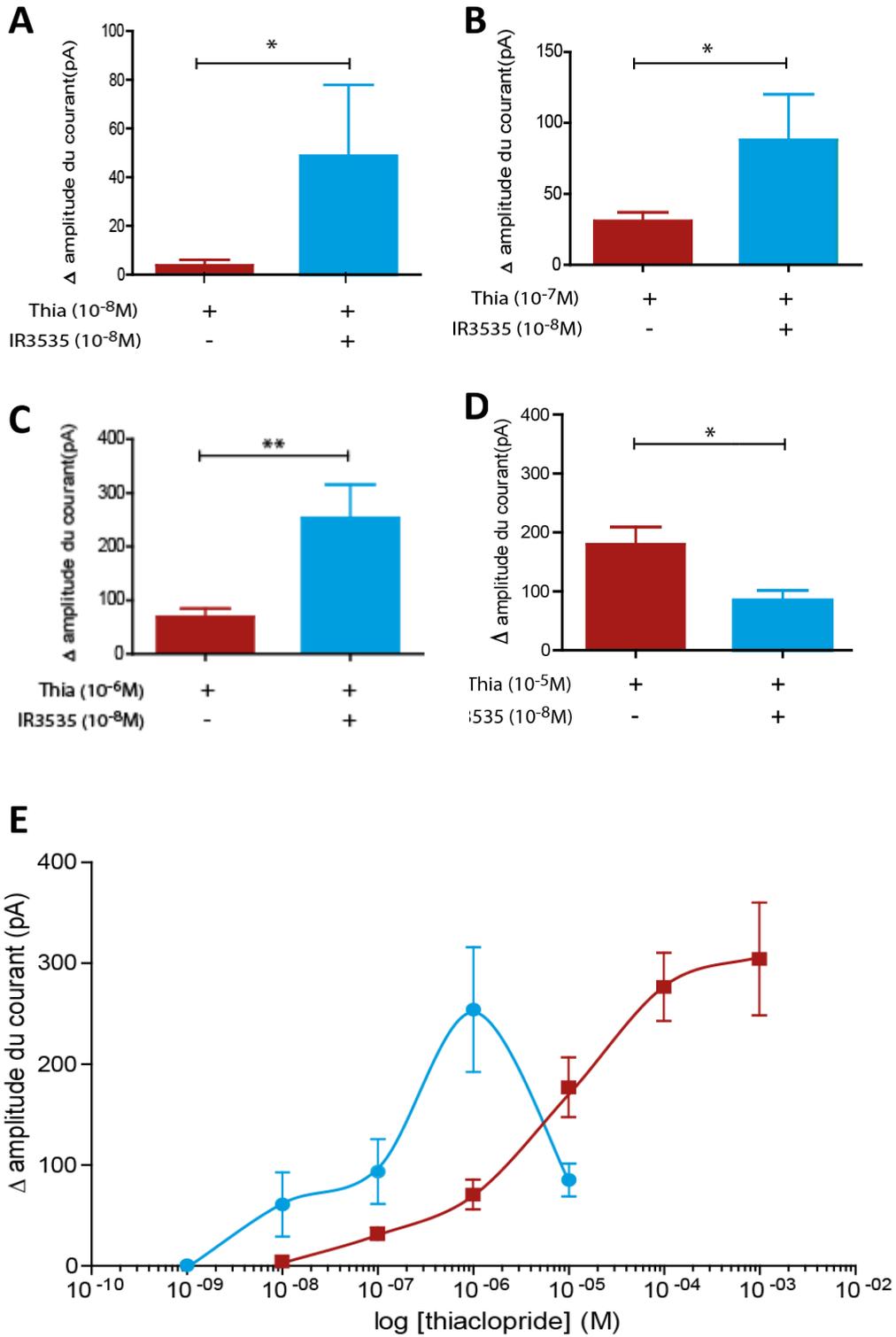
##### 4.1. Effet de l'association IR3535/thiaclopride sur les DUM neurones

Afin de déterminer si l'IR3535 génère une potentialisation de l'action du thiaclopride, les effets de l'insecticide utilisé à différentes concentrations de  $10^{-9} \text{ M}$  à  $10^{-5} \text{ M}$  ont été testés en présence d'IR3535 ( $10^{-8} \text{ M}$ ). L'IR3535 à faible concentration produisant une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lente, le répulsif a donc été appliqué pendant 600 secondes afin d'obtenir une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suffisante. Un mélange d'IR3535 et de thiaclopride a ensuite été appliqué.

En présence d'IR3535 ( $10^{-8} \text{ M}$ ), il est possible d'observer un courant entrant de faible amplitude ( $-64 \pm 32,8 \text{ pA}$  ;  $n=5$ ), induit par le thiaclopride à  $10^{-8} \text{ M}$ , alors que le thiaclopride seul

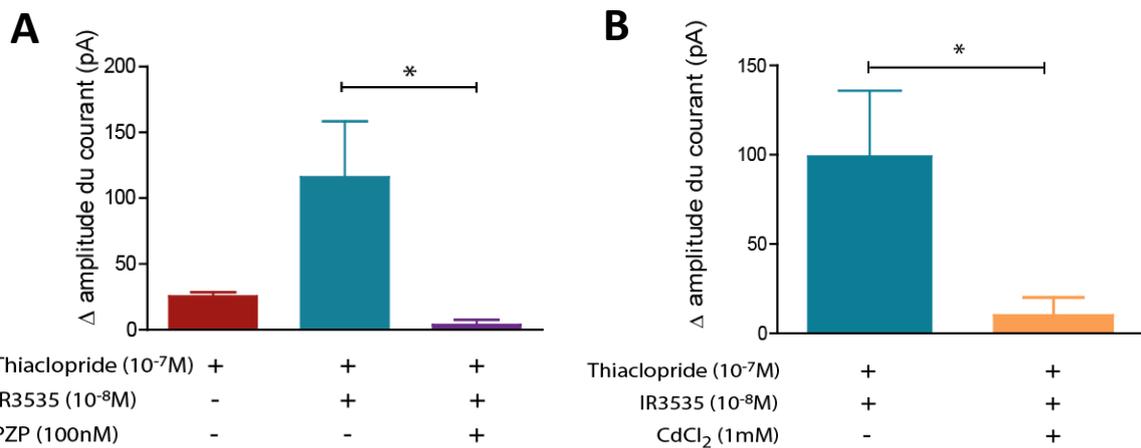
utilisé à la même concentration n'induit aucun courant (**Figure 54A et E**). De la même façon, le courant entrant induit par le thiaclopride utilisé à  $10^{-7}$ M et à  $10^{-6}$ M a une amplitude significativement plus importante en présence d'IR3535 par rapport aux courants mesurés avec l'insecticide seul (**Figure 54B, C et E**).

Ainsi, les valeurs des amplitudes du courant entrant sont de  $-31 \pm 6,1$  pA ( $n=4$ ) en présence de thiaclopride seul à  $10^{-7}$ M et de  $-99,4 \pm 32,8$  pA ( $n=5$ ) avec le mélange d'IR3535/thiaclopride, soit une amplitude 2,6 fois plus importante en présence du répulsif. L'amplitude du courant entrant est de  $-69,4 \pm 14,6$  pA ( $n=6$ ) en présence de thiaclopride seul à  $10^{-6}$ M et de  $-254 \pm 61,7$  pA ( $n=5$ ) avec un mélange IR3535/thiaclopride, soit une amplitude 3,7 fois plus importante en présence du répulsif. Cependant, en présence d'IR3535, il est observé une diminution très importante de l'amplitude du courant entrant lorsque le thiaclopride est utilisé à forte concentration (e.g.,  $10^{-5}$ M). Cet effet est responsable du décours en cloche atypique de la courbe dose-réponse (**Figure 54D et E**).



**Figure 54 :** A-D- Histogrammes comparatifs illustrant l’effet d’un prétraitement à l’IR3535 10<sup>-8</sup>M sur l’amplitude du courant entrant induit par le thiaclopride (barre bleue) comparé au courant contrôle (barre rouge). E- Courbe dose-réponse de l’effet du thiaclopride en absence (tracé rouge) et en présence de répulsif IR3535 à 10<sup>-8</sup>M (tracé bleu). Potentiel de référence : -50mV. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. \* et \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  ; n= 4-6).

Nous avons vu que l’utilisation d’IR3535 permet d’augmenter l’effet du thiaclopride pour des concentrations d’insecticide allant de  $10^{-8}M$  à  $10^{-6}M$ . Afin de vérifier si cet effet est bien dû à la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  via les mAChRs, la combinaison des deux substances actives a été testée en présence de pirenzépine à 100nM, l’inhibiteur des mAChRs de sous-type M1, et de chlorure de cadmium à 1mM (**Figure 55A et B**). Dans les deux cas, la variation de l’amplitude du courant induit par la combinaison d’IR3535/thiaclopride est inhibée par la présence des agents pharmacologiques. Ceci démontre l’implication des mAChRs de sous-type M1 et de la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans la modulation des mAChRs de sous-type M1. L’ensemble des résultats démontre l’intérêt de combiner le thiaclopride à de faibles concentrations ( $10^{-8}M$  à  $10^{-6}M$ ) avec l’IR3535 à  $10^{-8}M$ .

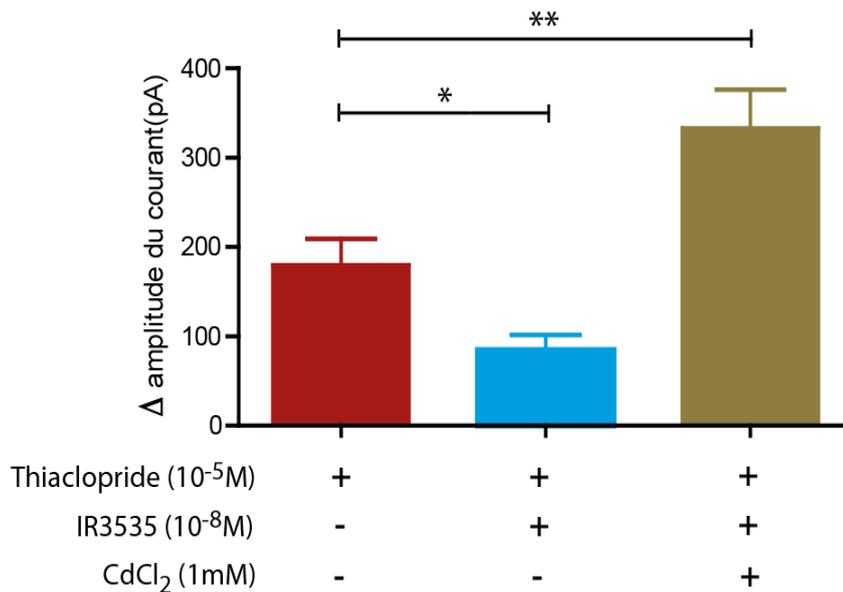


**Figure 55 :** Histogrammes comparatifs des effets de la PZP à 100nM (A) et de CdCl<sub>2</sub> à 1mM (B) sur l’amplitude des courants entrants induits par le thiaclopride après pré-traitement à l’IR3535 à faible concentration. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. ns : non significatif, \*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,05$ ). (n= 3-5).

#### 4.2. Etudes de l’influence du calcium sur l’amplitude des courants ioniques entrants induits par de fortes concentrations de thiaclopride en présence d’IR3535

Contrairement à ce qui pouvait être attendu, la combinaison IR3535/ thiaclopride à  $10^{-5}M$  provoque une réduction importante de l’amplitude du courant induit par l’insecticide par rapport au contrôle (**Figure 54D et E**). Dans la mesure où des résultats précédents ont rapportés que les propriétés fonctionnelles des nAChRs étaient modulées par les variations de calcium intracellulaire (Thany *et al*, 2008 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Calas-List *et al*, 2012), nous avons voulu déterminer si le calcium pouvait jouer un rôle dans l’effet observé sur l’amplitude du courant enregistré avec le mélange d’IR3535/thiaclopride à  $10^{-5}M$ . Pour ce

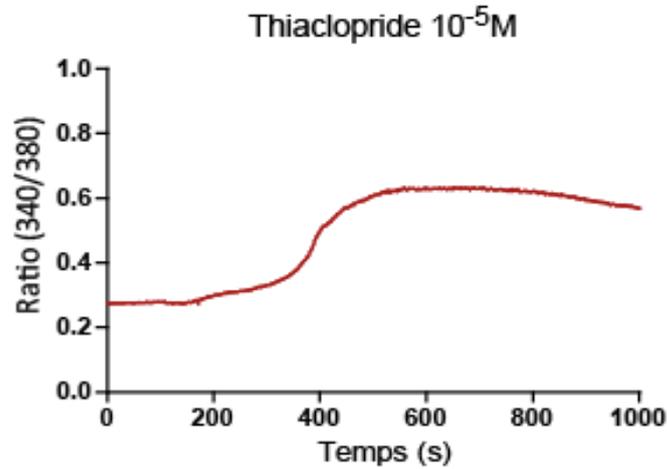
faire, des expérimentations ont été réalisées en présence d'une solution extracellulaire contenant du chlorure de cadmium (1mM) (**Figure 56**).



**Figure 56 :** Histogramme illustrant l'effet du CdCl<sub>2</sub> (1mM) sur l'amplitude du courant enregistré après application du mélange IR3535/thiaclopride à  $10^{-5}M$ . Potentiel de référence : -50mV. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. \* et \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  ;  $n = 4-6$ ).

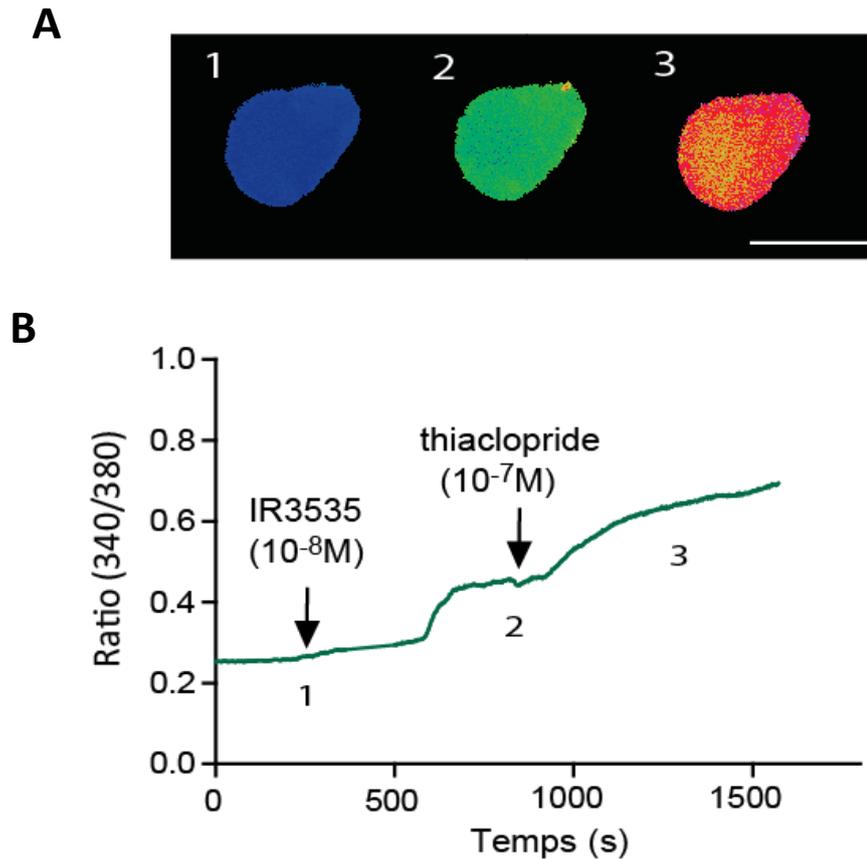
En présence de CdCl<sub>2</sub>, l'amplitude du courant enregistrée dans ces conditions expérimentale est beaucoup plus importante que pour l'amplitude du courant enregistré seul ou en présence d'IR3535 (**Figure 56**). Cette augmentation de l'amplitude du courant correspond tout à fait à l'amplitude du courant qui pourrait être extrapolée à partir de la courbe dose-réponse (tracé bleu, **Figure 54E**). Ces résultats semblent confirmer l'implication du calcium intracellulaire dans la modulation de la sensibilité des nAChRs au thiaclopride à forte concentration ( $10^{-5}M$ ).

La véritable question est de déterminer si une trop forte élévation de calcium à l'intérieur de la cellule n'induirait-elle pas une régulation négative des nAChRs qui par conséquent réduirait l'efficacité du mélange IR3535/thiaclopride  $10^{-5}M$  ? Pour cela, nous avons testé le thiaclopride ( $10^{-5}M$ ) seul sur les DUM neurones à l'aide de la technique d'imagerie calcique. Les résultats obtenus ont montré que l'insecticide à cette concentration provoque une forte augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (**Figure 57**).



**Figure 57 :** Exemple de spectre illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de thiaclopride à 10<sup>-5</sup>M.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'association de thiaclopride à forte concentration avec l'IR3535 pourrait induire une trop forte augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Par conséquent ces résultats soulignent le rôle extrêmement important du calcium dans l'effet synergique souhaité. En effet, il faudra choisir une concentration de thiaclopride qui ne provoque pas une élévation trop importante de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Il a été possible de montrer que cette augmentation de calcium produite d'une part par l'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M puis du mélange IR3535/thiaclopride 10<sup>-7</sup>M pouvait être importante (**Figure 58A et B**). A partir de ces résultats il est donc nécessaire que les concentrations du répulsif et de l'insecticide soient choisies de telle sorte que l'élévation de calcium intracellulaire, c'est-à-dire celle induite par l'IR3535 10<sup>-8</sup>M et par le thiaclopride, n'atteigne pas un seuil critique qui réduirait voire inhiberait l'effet synergique voulu.



**Figure 58 :** A- Corps cellulaire d'un DUM neurones enregistrés à l'aide de la technique d'imagerie calcique au cours de l'application d'IR3535 et du mélange IR3535/thiaclopride (1, 2 et 3) aux concentrations indiquées sur le graphe. B- Exemple de spectre illustrant l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire dans un corps cellulaire de DUM neurone suite à l'application d'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M et du mélange IR3535/thiaclopride à 10<sup>-7</sup>M.

## Chapitre IV – Etudes de l'effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur les moustiques *Anopheles gambiae* *in vivo*

---

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié *in vitro* les effets de l'association d'IR3535 et de thiaclopride. Ainsi, il a été démontré que l'utilisation d'IR3535 à  $10^{-8}$ M en association avec le thiaclopride pour des concentrations comprises entre  $10^{-8}$ M et  $10^{-6}$ M provoque un effet synergique. Sachant que les cibles de ces deux substances actives sont également exprimées par les neurones de moustiques (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011), nous avons voulu savoir si l'association de ces deux produits pouvait être utilisée en LAV. Ainsi, le mélange a été testé *in vivo* sur des moustiques femelles *Anopheles gambiae* au laboratoire MIVEGEC de l'IRD de Montpellier.

### 1. Estimation des concentrations des substances actives à utiliser

Afin d'estimer l'efficacité de l'association IR3535/thiaclopride sur les moustiques, des tests en cône OMS ont été effectués. Cependant, la concentration des produits utilisés *in vivo* est différente de celle employée lors des tests *in vitro*. En effet, pour les techniques d'imagerie calcique et de patch-clamp, l'IR3535 et le thiaclopride sont appliqués directement sur les neurones d'insectes. Ceci implique l'utilisation de concentrations extrêmement faibles comparativement à l'application que l'on peut faire directement sur moustiques. Comme énoncé dans l'introduction, pour être efficace, la substance active doit pénétrer à travers plusieurs barrières tissulaires et chez l'insecte, comme la cuticule, les muqueuses intestinales et ne pas être métabolisée ou transformée par les enzymes de détoxication (Haubruge et Amichot, 1998). La dose de substance active appliquée sur l'insecte est donc forcément plus importante que la dose appliquée sur les préparations cellulaires *in vitro*.

La concentration exacte d'IR3535 et de thiaclopride à utiliser en imprégnation sur moustiquaire est difficile à estimer. Cependant, en se basant sur les résultats obtenus en patch-clamp, nous savons que le mélange a un effet synergique pour une concentration d'IR3535 à  $10^{-8}$ M et de thiaclopride comprise entre  $10^{-8}$ M et  $10^{-6}$ M, soit une concentration d'IR3535 égale, 10 fois moins importante et 100 fois moins importante que la concentration de thiaclopride.

Pour déterminer la concentration d'IR3535 qui serait la plus adéquat pour moduler l'effet du thiaclopride, nous nous sommes basés sur l'étude de Darriet et Chandre (2013) qui

a testé sur moustiques, l'efficacité de six insecticides néonicotinoïdes seuls ou en associations. Le thiaclopride a été utilisé à la dose de 367mg/m<sup>2</sup> de moustiquaires. A partir de ces données, nous avons décidé de garder une dose constante de thiaclopride de 367mg/m<sup>2</sup> et de tester des concentrations d'IR3535 égale, 10 fois moins importante et 100 fois moins importante que celle du thiaclopride, soit respectivement 367mg/m<sup>2</sup>, 36,7mg/m<sup>2</sup> et 3,67 mg/m<sup>2</sup>. Cette démarche nous permettra de sélectionner la concentration d'IR3535 à utiliser en association avec le thiaclopride. Pour répondre à l'objectif de ce travail, la concentration de thiaclopride sera ensuite réévaluée afin d'obtenir la combinaison d'IR3535 et de thiaclopride ayant le meilleur effet synergique aux plus faibles concentrations.

Pour effectuer les tests en cône, des moustiquaires neutres ont été imprégnées avec les substances actives seules et les associations IR3535/thiaclopride aux différentes concentrations. Pour cela, il a été nécessaire d'estimer le pouvoir de rétention du tissu de la moustiquaire utilisé selon le protocole présenté dans la partie « matériels et méthodes » (p100). Après imprégnation avec de l'eau, il a été calculé que le morceau de tulle de 24cmx27cm avait un pouvoir de rétention de 3,5mL. Ce volume correspond au volume de substances actives à utiliser pour l'imprégnation.

## 2. Résultats des tests en cône OMS

La combinaison d'IR3535 et de thiaclopride a été appliquée sur moustiquaire. Les effets induits par cette association sur l'effet KD et sur la mortalité ont été comparés à ceux observés avec l'IR3535 et le thiaclopride appliqués seuls. Les tests ont été effectués à 3 et 30 minutes de contact. Puis l'effet KD a été observé au bout d'une heure et la mortalité a été observée au bout de 24 heures, ceci pour chaque concentration testée. Les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires, ce qui explique dans certains cas le nombre d'expérimentations faibles.

### 2.1. Observation de l'effet KD induit par l'association IR3535/thiaclopride

L'effet KD induit par le mélange d'IR3535/thiaclopride a été étudié par rapport aux deux produits appliqués seuls. Après 3 minutes de contact (**Tableau 4**), il est possible de comparer l'effet KD du thiaclopride seul avec l'effet KD de l'association IR3535/thiaclopride. Pour des concentrations équivalentes d'IR3535 et de thiaclopride (367mg/m<sup>2</sup> - 367mg/m<sup>2</sup>), bien qu'un léger effet KD soit obtenu avec le répulsif seul (7,84%), l'association avec le thiaclopride ne modifie pas l'effet KD obtenu avec le thiaclopride seul (respectivement 4,08% et 4%). Pour des concentrations d'IR3535 à 37,6mg/m<sup>2</sup> et 3,67mg/m<sup>2</sup>, l'effet KD induit par le mélange est négligeable (respectivement 0% et 1,99±1,41%).

**Tableau 4 :** Comparaison de l'effet KD induit après 3 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône OMS. Résultats exprimés en % de l'effet KD.

Tests Thiaclopride – IR3535	Thiaclopride	IR3535	Combinaison
367mg/m <sup>2</sup> - 367mg/m <sup>2</sup> (n=1)	4%	7,84%	4,08%
367mg/m <sup>2</sup> - 36,7mg/m <sup>2</sup> (n=2)	0%	1,96 ± 3%	0%
367mg/m <sup>2</sup> - 3,67mg/m <sup>2</sup> (n=3)	0%	0%	1,99 ± 1,41 %

L'effet KD a ensuite été observé après 30 minutes de contact (**Tableau 5**). L'effet KD observé est différent de celui obtenu à 3 minutes de contact. Pour l'association d'IR3535 et de thiaclopride à doses équivalentes (367mg/m<sup>2</sup>), il a été constaté que l'effet KD est environ 9 fois plus important qu'en présence de thiaclopride seul (respectivement 77,27% et 8,47%). Cet effet s'explique par la forte concentration d'IR3535 qui induit à lui seul 63,33% d'effet KD. Cet effet potentialisateur est retrouvé pour les trois combinaisons d'IR3535/thiaclopride testées.

**Tableau 5 : Comparaison de l'effet KD induit après 30 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône OMS. Résultats exprimés en % de l'effet KD.**

Tests Thiaclopride – IR3535	Thiaclopride	IR3535	Combinaison
367mg/m <sup>2</sup> - 367mg/m <sup>2</sup> (n=1)	8,47%	63,33%	77,27%
367mg/m <sup>2</sup> - 36,7mg/m <sup>2</sup> (n=2)	0%	1,70 ± 2 %	4,92 ± 0,23%
367mg/m <sup>2</sup> - 3,67mg/m <sup>2</sup> (n=3)	2,62 ± 0,63%	13,11 ± 16,06%	18,28 ± 21,41%

L'association d'IR3535/thiaclopride avec une concentration 100 fois moins importante d'IR3535 (3,67mg/m<sup>2</sup>) semble avoir un effet KD plus important que l'association contenant une concentration 10 fois moins importante d'IR3535 (36,7mg/m<sup>2</sup>) (respectivement 18,28±21,41% et 4,92%±0,23%). Le faible nombre de réplicats ne permet cependant pas de conclure si une plus faible concentration d'IR3535 associée au thiaclopride induit un effet KD plus important. Pour approfondir cette étude préliminaire, il faudrait augmenter le nombre de réplicats avec les différentes concentrations d'IR3535.

## 2.2. Observation de l'effet de l'association IR3535/thiaclopride sur la mortalité des moustiques

Le taux de mortalité induit au bout de 24 heures par la combinaison d'IR3535/thiaclopride a été comparé aux taux de mortalité induits par les produits utilisés seuls. Après 3 minutes de contact (**Tableau 6**), la mortalité induite par le thiaclopride seul est en moyenne de 6,3% alors que celle induite par l'IR3535 seul diminue proportionnellement avec la concentration de répulsif testée (de 4,2% à 0,67%).

Le taux de mortalité constaté en présence de l'association IR3535/thiaclopride à doses équivalentes (367mg/m<sup>2</sup>) est de 66%, soit 10,5 fois plus que celui observé avec le thiaclopride seul.

Bien que l'expérience pour cette association n'ait été effectuée qu'une fois, il est possible d'envisager que l'association d'IR3535 et de thiaclopride à 367mg/m<sup>2</sup> puisse

induire un effet synergique de l'insecticide. Lorsque la concentration d'IR3535 est 10 ou 100 fois moins importante que celle du thiaclopride, nous observons une plus faible mortalité, respectivement de  $10,5 \pm 2,12\%$  et de  $10,17 \pm 2,72\%$ .

**Tableau 6 : Comparaison de la mortalité induite après 3 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône. Résultats exprimés en % de mortalité.**

Tests Thiaclopride – IR3535	Thiaclopride	IR3535	Combinaison
367mg/m <sup>2</sup> - 367mg/m <sup>2</sup> (n=1)	6,3 %	4,2 %	66 %
367mg/m <sup>2</sup> - 36,7mg/m <sup>2</sup> (n=2)	6 %	2 %	10,5 ± 2,12 %
367mg/m <sup>2</sup> - 3,67mg/m <sup>2</sup> (n=3)	6,73 ± 0,78 %	0,67 ± 0,82 %	10,17 ± 2,72 %

Ensuite, la mortalité des moustiques a été mesurée après 30 minutes de contact (**Tableau 7**). L'association IR3535/thiaclopride à concentrations équivalentes induit une mortalité de 94,7 %, soit 1,7 fois plus que le thiaclopride seul (55,80%). Cependant, il est à noter que pour cette concentration d'IR3535 (367mg/m<sup>2</sup>), l'IR3535 seul induit lui-même 31,20% de mortalité. Ceci peut s'expliquer par la forte concentration d'IR3535 qui induit un effet KD important à 30 minutes de contact (66,33%). Dans le cadre du test en cône, cet effet KD force les moustiques à rester en contact avec la moustiquaire et donc avec l'insecticide. Cependant, en condition de terrain, les moustiques entrant en contact avec la moustiquaire et percevant les effets répulsifs du mélange ne resteraient pas suffisamment en contact pour être intoxiqués par le thiaclopride. De plus, il s'agit de très fortes concentrations de substances actives pour l'imprégnation de moustiquaires, ce qui n'est pas recommandée en LAV.

**Tableau 7 :** Comparaison de la mortalité induite après 30 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône. Résultats exprimés en % de mortalité.

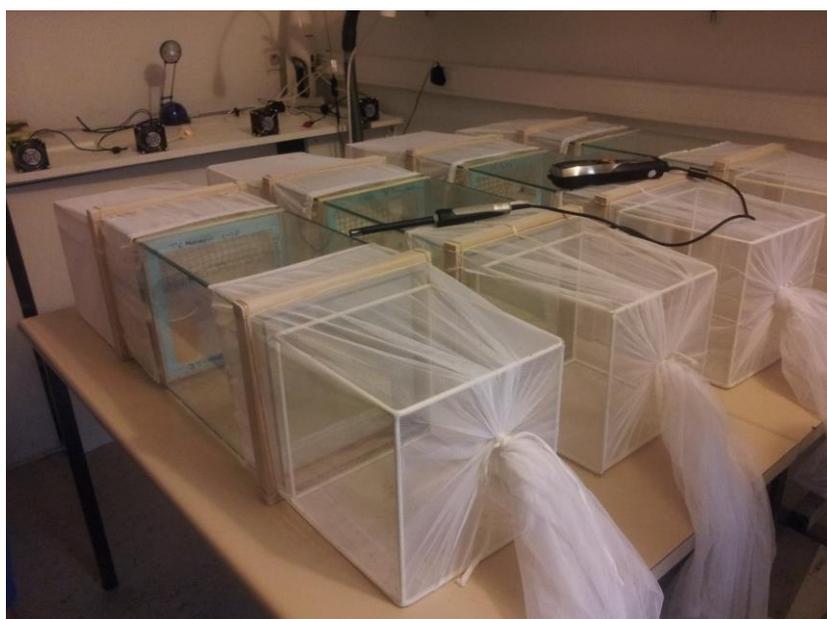
Tests Thiaclopride – IR3535	Thiaclopride	IR3535	Combinaison
367mg/m <sup>2</sup> - 367mg/m <sup>2</sup> (n=1)	55,80 %	31,20 %	94,70 %
367mg/m <sup>2</sup> - 36,7mg/m <sup>2</sup> (n=2)	17,85 ± 10,82 %	0 %	22,45 ± 12,94 %
367mg/m <sup>2</sup> - 3,67mg/m <sup>2</sup> (n=3)	34,87 ± 6,94 %	1,67 ± 2,04 %	52 ± 9,73 %

L'association avec 10 fois moins d'IR3535 que de thiaclopride induit une mortalité de 22,45±12,94%, soit 1,2 fois plus que la mortalité induite par le thiaclopride seul. L'association avec 100 fois moins d'IR3535 que de thiaclopride induit une mortalité de 52±9,73%, soit 1,5 fois plus que le thiaclopride seul. Cette seconde association semble induire un effet sur la mortalité plus important que la combinaison avec 10 fois moins d'IR3535 que de thiaclopride. Cependant, il existe une variation de la mortalité induite par le thiaclopride seul pour chaque série d'expérimentations, ce qui ne nous permet pas de conclure sur la comparaison de l'effet induit par les différentes associations. Il est donc essentiel d'augmenter le nombre d'expériences pour chaque association d'IR3535/thiaclopride.

L'association avec 100 fois moins d'IR3535 que de thiaclopride paraît particulièrement intéressante à utiliser pour l'imprégnation de moustiquaires. En effet, lors de ces tests préliminaires, cette association induit une mortalité supérieure à celle obtenue avec le thiaclopride seul après 3 minutes et 30 minutes de contact. Cependant, le test en cône ne représente pas l'utilisation des moustiquaires sur le terrain, puisqu'il force les moustiques à entrer en contact avec la moustiquaire. Il est donc nécessaire d'effectuer des tests en tunnel avec le mélange, afin de se rapprocher des conditions expérimentales de terrain.

### 3. Résultats préliminaires des tests réalisés en tunnel

Afin de vérifier l'intérêt de l'association avec 100 fois moins d'IR3535 que de thiaclopride, un test préliminaire en tunnel a été effectué (**Figure 59**). Il s'agit de mettre dans un tunnel en verre séparé en deux par une moustiquaire trouée, d'un côté un cobaye servant d'appât et de l'autre une centaine de moustiques femelles à jeun. Ce dispositif, adapté du modèle mis au point par Elissa et Curtis (1995), permet de vérifier l'effet répulsif de la moustiquaire en regardant si les moustiques passent par les trous et se gorgent sur le cobaye. Il permet aussi de vérifier l'effet sur la mortalité en comptant le nombre de morts de chaque côté de la moustiquaire. Ainsi, le comptage se fait en fonction de l'état des moustiques et de leur localisation dans le dispositif.



**Figure 59 :** Photographie du dispositif expérimental du test en tunnel pour tester l'efficacité des moustiquaires imprégnées sur l'effet répulsif et sur la mortalité.

Les résultats préliminaires n'ont pas été concluants puisque la moustiquaire imprégnée avec l'association d'IR3535/thiaclopride a un effet sur la mortalité des femelles *An. gambiae* moins important que le thiaclopride seul, dont l'efficacité est elle-même limitée (3% et 11% respectivement). Il s'agit cependant d'une première expérimentation sur des moustiques *in vivo*. Cette expérience devra être répétée pour pouvoir conclure sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées avec la combinaison d'IR3535/thiaclopride. Ces résultats préliminaires ne nous ont pas permis de conclure sur un effet synergique de l'association d'IR3535 et de thiaclopride en imprégnation de moustiquaires. De nouvelles concentrations de ces substances devront être testées pour déterminer un effet synergique. Néanmoins, ils

nous permettent d'envisager l'utilisation en LAV d'une combinaison associant le répulsif IR3535 et un insecticide de la famille des néonicotinoïdes.

# **Partie 4 :**

## **Discussion et perspectives**



# Chapitre I – Mécanisme d'action cellulaire de l'IR3535

---

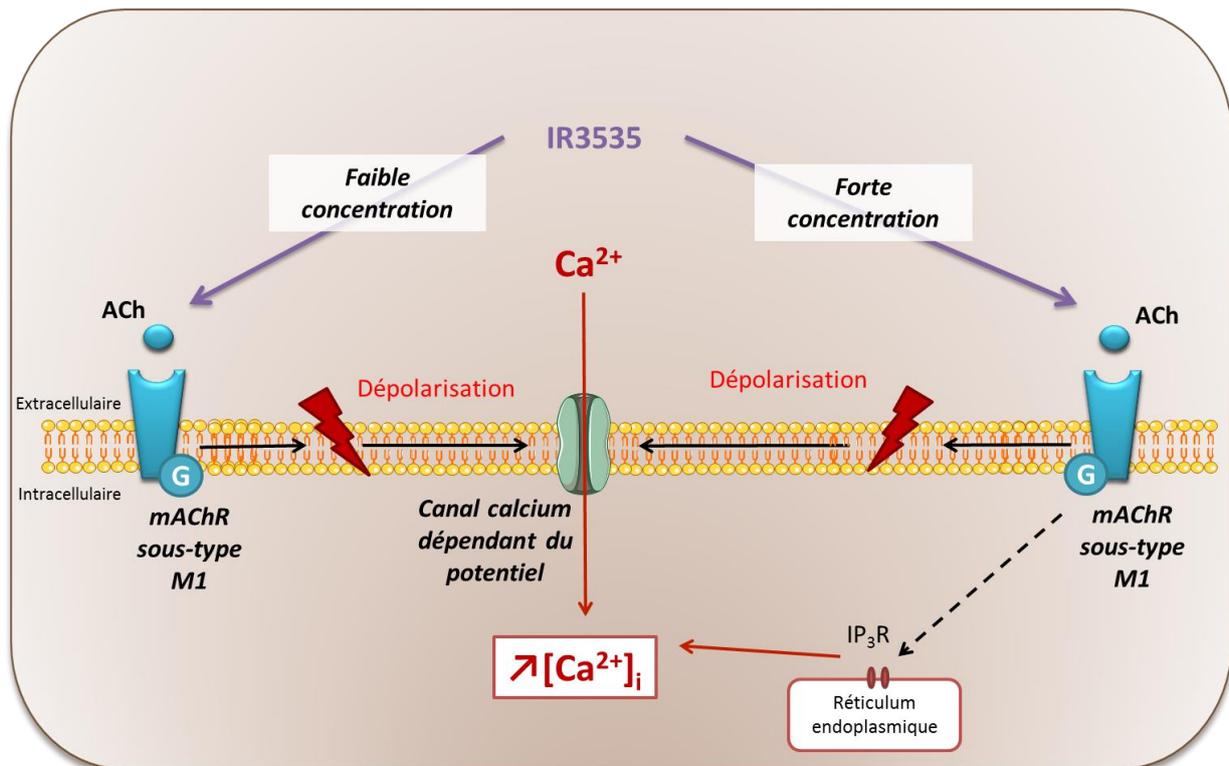
## 1. Mode d'action de l'IR3535 sur neurones d'insectes

Actuellement, les autorités sanitaires recherchent de nouvelles stratégies de LAV capables de contourner les phénomènes de résistances chez les insectes et les risques de toxicité sur les organismes non-cibles et pour l'environnement. Pour répondre à ce problème, notre objectif était de proposer une nouvelle stratégie basée sur l'étude de la synergie entre un répulsif et un insecticide néonicotinoïde afin d'améliorer l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses de produits utilisées.

Pour cela, il a fallu tout d'abord sélectionner un répulsif capable d'induire une variation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , variation connue pour moduler la sensibilité des cibles aux insecticides chez l'insecte (Lavialle-Defaix *et al*, 2010 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012). Grâce aux données bibliographiques, aux connaissances récentes obtenues au laboratoire et dans le cadre de ce travail de thèse sur les mécanismes d'action du DEET testé dans un premier temps, nous avons démontré un double effet dépendant du calcium intracellulaire de ce répulsif sur l'activité anticholinestérasique d'un insecticide carbamate, le propoxur en fonction de la concentration utilisée (Abd-Ella *et al*, 2015 ; voir annexe 2). Bien qu'un mélange DEET/insecticide non pyréthrianoïde produise un effet synergique sur la mortalité des moustiques (Bonnet *et al*, 2009 ; Pannetier *et al*, 2007, 2008, 2009), certains travaux suggèrent un effet toxique du DEET lorsqu'il est associé avec d'autres substances actives (Hoy *et al*, 2000 ; Abdel-Rahman *et al*, 2004) ou donnent des indications en particulier sur sa rémanence dans l'environnement et sa toxicité et/ou écotoxicité éventuelles pour l'environnement (Aronson *et al*, 2011). C'est pourquoi, nous avons préféré étudier l'IR3535, le second répulsif le plus utilisé à travers le monde. Cette partie discussion sera donc focalisée sur les effets de l'IR3535 et sur son utilisation potentielle comme agent synergisant pour optimiser l'effet d'un insecticide de type néonicotinoïde.

Jusqu'à maintenant, très peu de données sont accessibles dans la littérature sur les modes d'action cellulaires et moléculaires de l'IR3535. La majorité des études indiquent que les répulsifs, en général, sont connus pour interagir avec différents types de récepteurs exprimés par des neurones sensoriels chez les insectes ayant pour conséquences une modification de leurs comportements à différents niveaux (Syed *et al*, 2008 ; Xia *et al* 2008 ; Bohbot et Dickens, 2012 ; Dickens et Bohbot, 2013 ; Kain *et al*, 2013 ; Sanford *et al*, 2013, 2014 ; Xu *et al*, 2014). Exceptées certaines données qui indiquent que le DEET se comporte comme un composé anticholinestérasique (Corbel *et al*, 2009 ; Abd-Ella *et al*, 2015, annexe 2) et qu'il peut agir au niveau des synapses octopaminergiques pour provoquer une neuroexcitation chez l'insecte (Swale *et al*, 2014), les données concernant la neurotoxicité

des répulsifs, en général, et de l'IR3535 chez les insectes, en particulier, sont pratiquement inexistantes. Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche nous ont permis, et ceci pour la première fois, de caractériser un des mécanismes d'action cellulaires induit par l'IR3535 sur neurones d'insectes. L'ensemble des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de l'IR3535 peuvent être résumés dans le schéma récapitulatif illustré dans la **Figure 60**.



**Figure 60 :** Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires impliqués dans le double effet de l'IR3535 en fonction de la concentration appliquée sur DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. ACh : acétylcholine ; IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>.

A faibles concentrations, l'IR3535 interagit avec les mACHRs de sous-type M1, ce qui provoque une dépolarisation de la membrane cellulaire de faible amplitude, mais suffisante pour activer les canaux calcium dépendants du potentiel (Grolleau *et al*, 2006). Cette activation va provoquer un influx calcique dans le corps cellulaire du DUM neurone. Bien que nous n'ayons pas directement investigué les mécanismes membranaires responsables de cette dépolarisation, il a pu être montré précédemment au laboratoire que l'activation des mACHRs de sous-type M1/M3 induit une inhibition des canaux potassium dépendants du calcium de base impliqués dans le maintien du potentiel de membrane. Cette inhibition est suffisante pour produire une faible dépolarisation (Tribut 1994). A partir de ces résultats, il

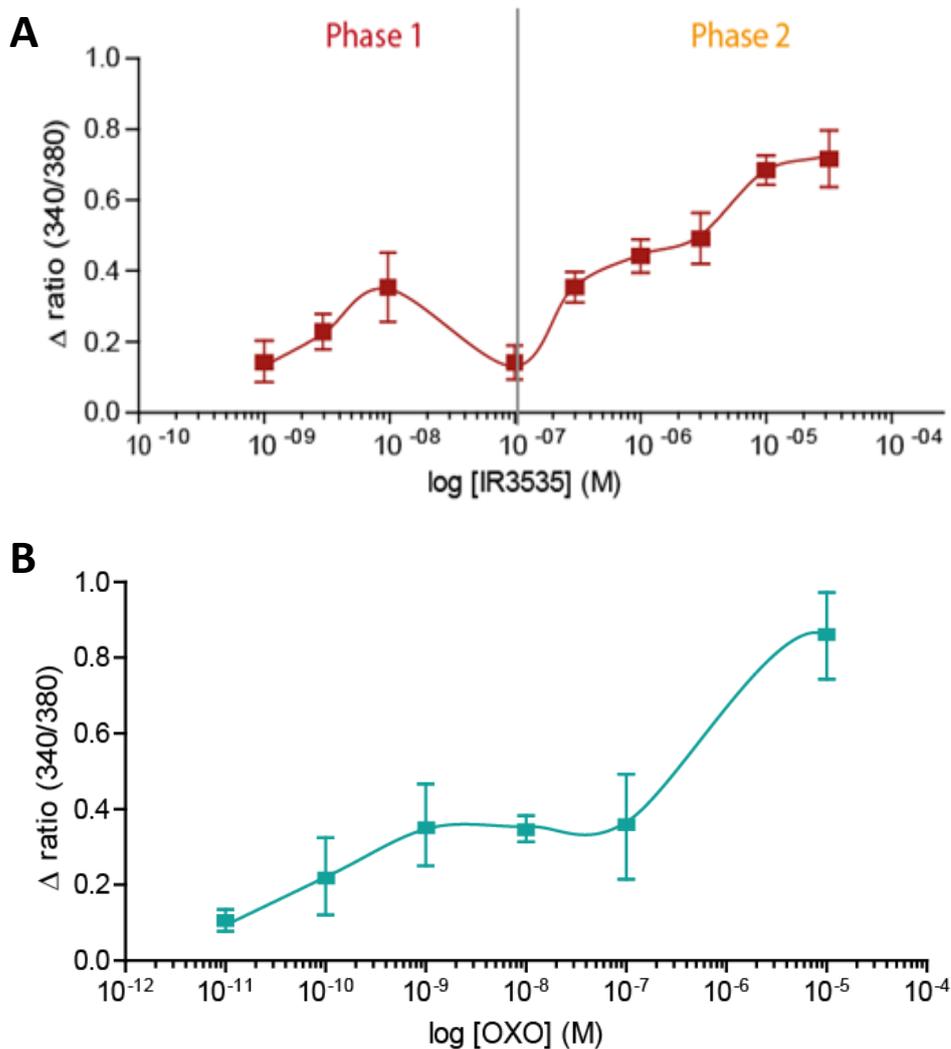
est possible d'envisager un mécanisme similaire dans la dépolarisation induite par l'IR3535 *via* l'activation des mAChRs de sous-type M1. Cette hypothèse reste bien sûr à vérifier directement.

A plus forte concentration, le répulsif interagit également avec les mAChRs de sous-type M1, induisant une élévation de la concentration en calcium intracellulaire plus importante. Nous avons pu montrer que la libération de calcium des stocks de calcium intracellulaire *via* l'activation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> était en plus impliquée pour de fortes concentrations d'IR3535 (**Figure 60**). Dans ces conditions, il est observé une disparition totale de l'activité spontanée du DUM neurone synonyme de mort cellulaire. Cette disparition de l'activité pacemaker peut s'expliquer par une inhibition des canaux calcium à bas seuil d'activation. Il a été montré précédemment sur la même préparation neuronale que ces canaux, qui jouent un rôle essentielle dans la phase de pré-dépolarisation nécessaire pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action, étaient inhibés par une forte élévation de calcium intracellulaire produisant une réduction, voire une disparition de l'activité spontanée (Grolleau *et al*, 1996 ; Grolleau et Lapied, 2000 ; Wicher *et al*, 2001).

## 2. Hypothèses concernant l'effet de l'IR3535 sur les mAChRs de sous-type M1 des DUM neurones

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche ont montré que l'IR3535 interagit avec les mAChRs de sous-type M1 grâce à l'utilisation d'un antagoniste compétitif sélectif de ces mAChRs, la pirenzépine. A faible concentration d'IR3535, cet antagoniste bloque complètement l'effet produit par le répulsif. A forte concentration, une inhibition incomplète est observée en présence de la même concentration de pirenzépine. Ces derniers résultats laissent envisager que l'IR3535 utilisé à forte concentration rentre en compétition avec l'antagoniste limitant ainsi l'effet de la pirenzépine. Cette hypothèse expliquerait la réduction de l'effet observé et non une inhibition totale comme observé dans le cas de l'IR3535 utilisé à faible concentration et suggérerait que l'IR3535 puisse interagir avec le site orthostérique des mAChRs de sous-type M1. Cette hypothèse pourrait être confirmée grâce aux résultats préliminaires obtenus avec un agoniste compétitif des mAChRs de sous-type M1, l'oxotrémorine (**Figure 61**). L'utilisation de la technique d'imagerie calcique a permis d'établir la courbe dose-réponse de l'effet de l'oxotrémorine sur la variation de calcium intracellulaire (**Figure 61B**). La courbe obtenue pour l'oxotrémorine possède un profil relativement similaire à celui de la courbe dose-réponse obtenue avec l'IR3535 (**Figure 61A**), à savoir une première augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  pour de faibles concentrations ( $10^{-11}M$  à  $10^{-7}M$ ) ( $\Delta=0,30\pm 0,1$  ;  $n=5$ ), puis une seconde augmentation de la

$[Ca^{2+}]_i$  pour de plus fortes concentrations d'oxotrémorine ( $10^{-5}M$ ) ( $\Delta=0,80\pm0,14$  ;  $n=4$ ). L'IR3535 pourrait donc interagir avec le site orthostérique des mAChRs de sous-type M1.



**Figure 61:** A- Courbe dose-réponse illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée. B- Courbe dose-réponse illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'oxotrémorine (oxo) utilisée. Les variations de la concentration en calcium intracellulaire (exprimées en ratios 340/380) sont calculées à partir des moyennes des valeurs obtenues pour chaque concentration d'oxotrémorine testée. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-5$ ).

Une question, cependant reste posée. Quels sont les mécanismes responsables de la première phase de la courbe dose-réponse obtenue avec l'IR3535 ? En d'autres termes, pourquoi avec une concentration d'IR3535 utilisée à  $10^{-7}M$ , la variation de calcium revient à une valeur proche du niveau de base. Une analyse statistique effectuée sur les résultats obtenus avec  $10^{-8}M$ ,  $10^{-7}M$  et  $3.10^{-7}M$  montre que toutes les différences sont statistiquement

significatives. Ce qui confirme la validité des effets. Pour tenter d'expliquer cet effet atypique, il est possible d'envisager que l'IR3535, à partir d'une certaine concentration, interagisse avec un autre site que le site orthostérique, réduisant ainsi l'effet observé sur la variation de calcium intracellulaire. Il a été montré précédemment qu'un autre répulsif, le DEET, à faible concentration, était capable d'augmenter l'effet d'un insecticide, le propoxur, *via* une interaction sur le site haute affinité des mAChRs de sous type M1 (Abd-Ella *et al*, 2015, annexe 2). A l'inverse, le DEET à forte concentration interagit avec le site basse affinité des mAChRs, provoquant les effets contraires. A partir de ces données, il est possible de suggérer que l'IR3535 à plus forte concentration puisse interagir avec un site différent du site orthostérique comme un site basse affinité par exemple. Il est évident que des expérimentations supplémentaires sont également nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Enfin, nous avons montré que l'IR3535, en fonction de la concentration utilisée, provoquait une augmentation de calcium intracellulaire *via* l'activation de deux mécanismes différents, l'activation des canaux calcium dépendants du potentiel et la libération du calcium des stocks de calcium intracellulaire. L'IR3535 à très faible concentration induit majoritairement son effet *via* la dépolarisation membranaire (voir hypothèse ci-dessus) et l'activation des canaux calcium de type N. La libération de calcium *via* les stocks de calcium intracellulaire ne semble pas jouer un rôle majeur dans ces conditions. Il a été montré au laboratoire qu'il fallait une certaine concentration d'agoniste agissant sur les mAChRs de sous-type M1 pour activer la voie de signalisation intracellulaire spécifique de ces mAChRs (Pennetier C et Lapied B, observations personnelles). Il y aurait donc dans ce cas notion de seuil d'activation de la voie de signalisation intracellulaire PLC/DAG/IP<sub>3</sub> en fonction de la concentration d'agoniste ou d'IR3535 utilisée. Pour de fortes concentrations d'agonistes et d'IR3535 ce « seuil » serait atteint et la production d'IP<sub>3</sub> possible, augmentant de façon importante l'élévation de calcium intracellulaire.

## Chapitre II – Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride *in vitro* et *in vivo*

---

### 1. Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur neurones d'insectes *in vitro*

Sachant qu'une trop forte concentration d'IR3535 inhibe l'effet synergique souhaité, il semble essentiel d'utiliser une faible concentration de répulsif. Ceci répond d'autant plus à l'objectif fixé, puisque dans le cadre d'une nouvelle stratégie de LAV, il est souhaitable d'utiliser de plus faibles concentrations de produits tout en conservant une efficacité maximale. Ainsi, suivant les résultats obtenus, la concentration de  $10^{-8}$ M d'IR3535 (effet maximum de la phase 1 semble la plus appropriée pour induire un effet synergique sur l'efficacité d'un insecticide de type néonicotinoïde (voir **Figure 61A**). De plus, une faible concentration de répulsif est indispensable si nous ne voulons pas que l'IR3535 induise un effet répulsif strict. Dans ce cas, les insectes ne seraient jamais en contact du mélange répulsif/insecticide. Une faible concentration de répulsif dans notre stratégie n'est utilisée que comme agent synergisant pour déclencher une réaction en chaîne nécessaire pour augmenter l'effet insecticide.

Les néonicotinoïdes ont été envisagés dans cette étude pour être utilisés en association avec l'IR3535 suite à des rapports d'expertise collective de l'Anses ayant hiérarchisé 32 substances actives utilisables en LAV (GT Anses 2011, 2013). Ces rapports indiquent que les néonicotinoïdes présentent un bon profil écotoxicologique. Parmi ces néonicotinoïdes, le thiaclopride semble particulièrement intéressant pour une association avec une autre substance active utilisée comme agent synergisant. Basé sur une étude réalisée par Darriet et Chandre (2013), cet insecticide fait partie des néonicotinoïdes présentant un effet synergique avec la deltaméthrine et le PBO. De plus, il présente un profil toxicologique acceptable pour les insectes non cibles, comme les abeilles. Toutes ces raisons justifient l'utilisation de thiaclopride pour une association avec l'IR3535.

Les résultats obtenus grâce à l'utilisation des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie nous ont permis de montrer que l'IR3535 induit un effet synergique *via* l'élévation du calcium intracellulaire sur neurones d'insectes. Ainsi, nous avons montré qu'un pré-traitement à l'IR3535 utilisé à faible concentration était capable d'augmenter l'effet de faibles concentrations de thiaclopride (de  $10^{-8}$ M à  $10^{-6}$ M). Le courant dans ces conditions a une amplitude jusqu'à 3,7 fois plus importante que de celle obtenue avec le thiaclopride seul. L'effet synergique est particulièrement significatif pour une combinaison IR3535 ( $10^{-8}$ M)/thiaclopride ( $10^{-6}$ M).

Cependant, il a été constaté une forte réduction de l'effet de l'insecticide lorsque celui-ci était utilisé à forte concentration ( $10^{-5}$ M) en présence d'IR3535 ( $10^{-8}$ M). Cette réduction n'est pas observée en présence de chlorure de cadmium, un bloqueur inorganique des canaux calcium membranaires. Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que les propriétés fonctionnelles des nAChRs des DUM neurones sont modulées par le calcium intracellulaire (Thany *et al*, 2007, 2008). De plus, cette variation du calcium intracellulaire est également impliquée dans la sensibilité des nAChRs aux néonicotinoïdes (Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Calas-List *et al*, 2012). A partir de ces données et compte tenu des résultats présentés dans ce mémoire qui montrent une élévation de calcium intracellulaire en présence de thiaclopride à  $10^{-5}$ M, l'association IR3535/thiaclopride doit obligatoirement prendre en compte ces caractéristiques pour que la combinaison proposée n'induisse pas un effet antagoniste sur l'effet insecticide. Ces derniers résultats confirment bien ceux obtenus précédemment qui révèlent l'importance de la  $[Ca^{2+}]_i$  et des voies de signalisation intracellulaires dans la modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides (Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany *et al*, 2007 ; Laviaille-Defaix *et al*, 2010 ; Bodereau-Dubois *et al*, 2012 ; Calas-List *et al*, 2012 ; Licznar *et al*, 2014 ; Abd-Ella *et al*, 2015, annexe 2 ).

Enfin, ces résultats démontrent l'intérêt d'utiliser des concentrations plus faibles de substances actives, ce qui rejoint les préconisations de l'Anses en LAV. De plus, comme déjà mentionné ci-dessous, le calcium représente un élément important dans la modulation de la sensibilité aux néonicotinoïdes. L'augmentation de l'amplitude du courant induit par le thiaclopride indique que les nAChRs deviennent plus sensibles à ces insecticides en présence de calcium. Cette augmentation de l'amplitude peut avoir plusieurs origines comme par exemple une augmentation de la densité des nAChRs fonctionnels sensibles à ces insecticides et/ou un processus de phosphorylation/dephosphorylation qui modifierait la conductance ionique de ces nAChRs. Il est clair que des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser de façon précise, comme dans le cas du DEET, les mécanismes cellulaires responsables de l'effet synergique observé..

## 2. Effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur moustiques *in vivo*

Afin d'avoir une idée sur l'effet synergique de l'association d'IR3535 ( $10^{-8}$ M) avec le thiaclopride (de  $10^{-8}$ M à  $10^{-6}$ M) observé *in vitro*, des études préliminaires ont été menées *in vivo* sur des moustiques femelles *An. gambiae*. En se basant sur les concentrations de thiaclopride appliquées sur moustiquaires par Darriet et Chandre (2013), nous avons effectué différentes associations d'IR3535 et de thiaclopride afin d'étudier leurs effets KD

ainsi que leurs effets sur la mortalité. Les données présentées dans ce mémoire montrent que les tests en cône OMS ont donné des premiers résultats intéressants.

L'association IR3535/thiaclopride à des doses équivalentes (367mg/m<sup>2</sup>) a un effet KD et un effet sur la mortalité très largement supérieur au thiaclopride seul après 30 minutes de contact. Cependant, la forte concentration d'IR3535 produit à lui seul un fort effet KD, obligeant les moustiques à rester en contact avec la moustiquaire et donc avec l'insecticide. Il est possible qu'en condition de terrain, l'effet répulsif de l'IR3535 repousse les moustiques qui ne resteraient pas suffisamment en contact pour être intoxiqués par le thiaclopride. Or, nous cherchons à utiliser des concentrations d'IR3535 qui potentialise l'effet toxique de l'insecticide sans avoir d'effet répulsif. Afin de vérifier si l'IR3535 à 367mg/m<sup>2</sup> induit un effet répulsif trop important, il faudrait effectuer des expérimentations en tunnel, dont le dispositif a été adapté pour se rapprocher davantage des conditions de terrain. Outre ce problème d'effet répulsif qui empêcherait le contact avec l'insecticide, l'utilisation de fortes concentrations de substances actives pour l'imprégnation de moustiquaires n'est pas recommandée en LAV. En effet, le risque d'intoxication pour les populations utilisant ces moustiquaires devient alors trop important.

De plus faibles concentrations d'IR3535 en association avec une concentration constante de thiaclopride induisent également des effets intéressants. L'association avec 100 fois moins d'IR3535 (3,67mg/m<sup>2</sup>) que de thiaclopride induit une mortalité 1,5 fois plus importante que le thiaclopride seul après 30 minutes de contact.

Les résultats préliminaires obtenus *in vivo* sont prometteurs, mais il semble nécessaire d'effectuer de nouveaux réplicats des tests en cône pour les différentes combinaisons utilisées. En effet, sur les quelques expérimentations menées, il est possible de voir une différence de mortalité pour la même concentration de thiaclopride. Ceci peut être dû à un problème d'imprégnation des moustiquaires. De même, les répulsifs sont des molécules très volatiles. Même si la méthode d'imprégnation a toujours été effectuée dans les mêmes conditions, elle ne permet pas de contrôler l'évaporation de l'IR3535 lors du séchage. Il pourrait être intéressant d'analyser les résidus présents sur la moustiquaire afin de vérifier si les concentrations de thiaclopride et d'IR3535 varient d'un échantillon à l'autre.

## Chapitre III – Perspectives de recherche

---

### 1. Perspectives de recherche sur les mécanismes d'action cellulaires de l'IR3535

Nous savons que l'IR3535 interagit avec les mAChRs de sous-type M1 et que des résultats préliminaires avec l'oxotrémorine, agoniste du site orthostérique de ces récepteurs, permettent d'obtenir une courbe dose-réponse dont le profil est similaire à celle obtenue avec l'IR3535. Pour approfondir ces données, des agents pharmacologiques spécifiques des différents sites des mAChRs de sous-type M1 pourraient être utilisés. Ainsi, la toxine muscarinique 7 (MT7) provenant du venin de serpent *Dendroaspis* s'avère être particulièrement intéressante puisqu'elle possède une forte affinité et sélectivité pour les mAChRs de sous-type M1. En se fixant sur un site basse affinité du récepteur, elle se comporte comme un modulateur allostérique réduisant les interactions des agonistes sur le site orthostérique (Servent et Fruchart-Gaillard, 2009 ; Marquer *et al*, 2010). L'utilisation de MT7 permettrait de déterminer si l'IR3535, à fortes concentrations, peut se fixer sur le site basse affinité.

L'action de l'IR3535 sur les mAChRs de sous-type M1 provoque une dépolarisation suffisante pour activer les canaux calciques dépendants du potentiel. Or, il a été démontré que l'activation de ces récepteurs implique une inhibition de la conductance potassique dépendante du calcium (Tribut, 1994). Afin de vérifier 1) si l'activation des mAChRs de sous-type M1 par l'IR3535 est impliquée dans l'inhibition d'une telle conductance et 2) le mode de couplage entre les mAChRs de sous-type M1, il sera utile de réaliser des études électrophysiologiques supplémentaires à l'aide d'outils pharmacologiques sélectifs pour caractériser le mode de couplage intracellulaire entre mAChRs et canaux potassium dépendants du calcium de base.

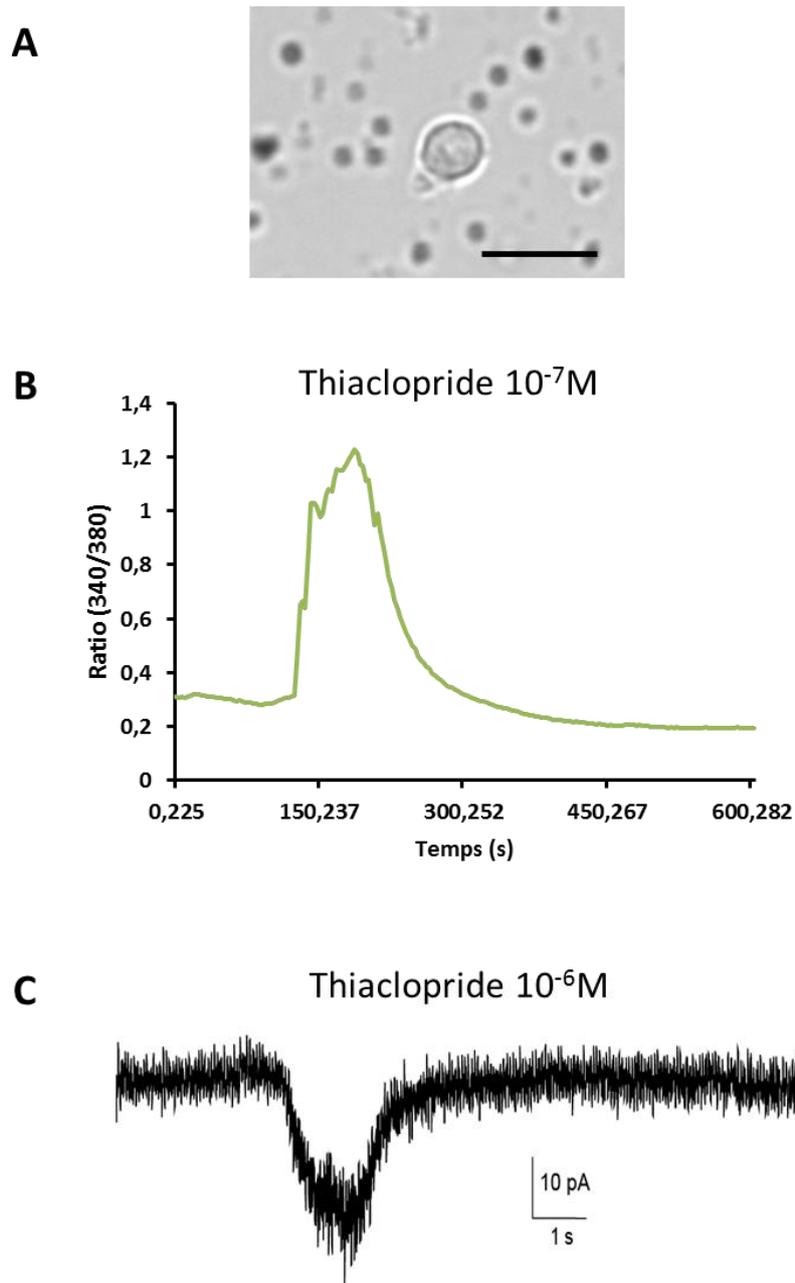
De plus, afin de connaître plus précisément les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induites par de fortes concentrations d'IR3535, il sera également intéressant de tester des agents pharmacologiques spécifiques des voies de signalisation PLC/DAG/IP<sub>3</sub>. Il est notamment possible d'agir sur les phospholipases C (PLC), responsables de l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub>, le ligand des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, à l'aide du composé U73122, par exemple, connu pour être un inhibiteur de la PLC (Torfs *et al*, 2000). L'utilisation de W-7 permettrait de bloquer le complexe Ca-CaM, qui joue un rôle important dans la modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides dans les DUM neurones (Courjaret et Lapied, 2001 ; Thany *et al*, 2007 ; Lavalie-Defaix *et al*, 2010 ; Calas-List *et al*, 2012).

## 2. Perspectives de recherche sur l'association IR3535/thiaclopride *in vitro*

L'ensemble des études *in vitro* menées dans ce travail de recherche a été effectué sur les DUM neurones de blatte *Periplaneta americana* qui sont un modèle biologique couramment utilisées pour étudier le mode d'action des molécules à effet insecticide. Néanmoins, dans le cadre d'une stratégie de LAV, il serait intéressant d'étudier plus en détails l'effet synergique de la combinaison IR3535/thiaclopride sur les neurones de moustiques.

Des études préliminaires ont déjà commencées au laboratoire RCIM afin d'étudier l'effet du thiaclopride sur neurones de moustiques *An. gambiae* (**Figure 62A**). Les premiers résultats obtenus grâce à la technique d'imagerie calcique ratiométrique indiquent que le thiaclopride à  $10^{-7}$ M induit une importante variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\Delta=0,92$ ) (**Figure 62B**). En parallèle, le thiaclopride a été testé grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp, en configuration cellule entière dans des conditions de potentiel imposé à des concentrations comprises entre  $10^{-7}$ M et  $10^{-5}$ M. L'insecticide induit un courant entrant de faible amplitude avec un effet maximum à  $10^{-6}$ M (-22pA) (**Figure 62C**).

Ces résultats préliminaires confirment l'intérêt d'utiliser les insecticides néonicotinoïdes en association avec un répulsif contre les moustiques vecteurs de maladies. Il serait intéressant de poursuivre les expérimentations afin de vérifier l'implication du calcium dans l'effet de l'IR3535 sur neurones de moustiques ainsi que l'effet de l'association IR3535/thiaclopride sur l'activité électrique des neurones de moustiques.



**Figure 62:** A- Microphotographie d'un corps cellulaire de neurone (échelle :  $10\mu m$ ) isolé par dissociation mécanique de têtes de moustique *An. gambiae*. B- Exemple de spectre illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de thiaclopride utilisé à  $10^{-7}M$  sur neurone de moustique (résultat obtenu au laboratoire, communication de Josy Froger). C- Exemple de courant ionique entrant induit par l'application de thiaclopride à  $10^{-6}M$  sur neurone de moustique. Potentiel de référence :  $-50mV$  (résultat obtenu au laboratoire, communication d'Olivier List).

### 3. Perspectives de recherches sur l'association IR3535/thiaclopride *in vivo*

#### 3.1. Améliorer les connaissances sur l'effet de l'association IR3535/thiaclopride *in vivo*

Nous avons montré que l'association d'IR3535 à  $10^{-8}$ M et de thiaclopride à  $10^{-5}$ M induit une diminution de l'amplitude du courant par rapport au thiaclopride utilisé seul à la même concentration. Pour respecter l'objectif de diminuer les doses d'insecticide utilisées en LAV, il semble intéressant, une fois la concentration d'IR3535 sélectionnée, d'étudier l'association IR3535/thiaclopride avec des concentrations plus faibles de thiaclopride.

De nombreuses populations de moustiques vecteurs de maladies ont développé des résistances aux insecticides couramment employés, comme les pyréthriinoïdes, les carbamates ou les organophosphorés. Ce phénomène explique la diminution de l'efficacité des produits chimiques couramment employés en LAV et donc la nécessité pour les autorités sanitaires de trouver de nouvelles stratégies de lutte. Afin de vérifier l'intérêt de l'association IR3535/thiaclopride en LAV, il sera donc intéressant d'effectuer les tests *in vivo* sur des moustiques résistants aux pyréthriinoïdes, comme par exemple des moustiques *An. gambiae* présentant une mutation *kdr* (Chandre *et al*, 1999 ; Koffi *et al*, 2013).

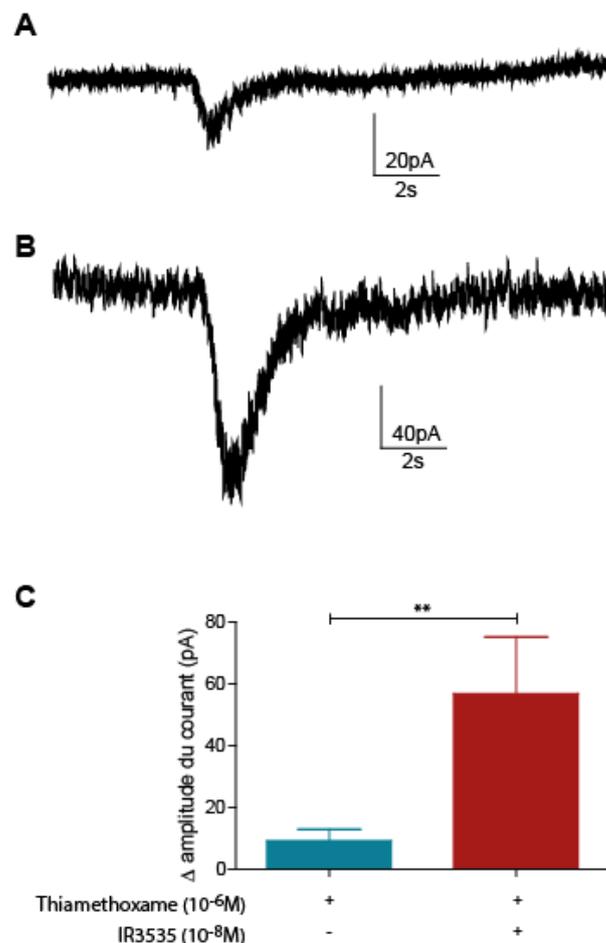
De plus, les tests en tunnel doivent être poursuivis en effectuant d'autres réplicats avec ce dispositif expérimental. Les résultats obtenus nous permettront d'avoir une idée sur l'efficacité de l'association IR3535/thiaclopride en conditions proches du terrain.

#### 2.1. Tester de nouvelles associations IR3535/néonicotinoïdes

Les résultats obtenus avec l'association IR3535/thiaclopride paraissent prometteurs. Cependant, pour compléter cette étude, nous pouvons envisager de tester le répulsif IR3535 à faible concentration en association avec d'autres insecticides néonicotinoïdes recommandés par le rapport d'expertise collective de l'Anses (2011, 2013).

Dans l'étude de Darriet et Chandre (2013), six néonicotinoïdes avaient été testés afin de connaître leur efficacité seuls ou dans des associations sur *Ae. aegypti* et *An. gambiae*. Il avait été montré que le nitenpyrame, le thiaméthoxame et le thiaclopride en association avec la deltaméthrine et le PBO présentaient les meilleurs résultats en termes d'associations synergiques. Le thiaclopride présentant le meilleur profil écotoxicologique, cet insecticide a été utilisé dans notre projet de thèse. Cependant, considérant que l'application sur moustiquaire est différente de l'aspersion pouvant impacter les insectes non cibles comme les abeilles, il est possible de considérer le thiaméthoxame comme potentiellement

intéressant pour une association à effet synergique. Dans ce contexte, nous avons testé une autre association avec cette fois-ci le thiaméthoxame. En effet, cet insecticide représente près de 40% des parts de marchés des néonicotinoïdes utilisés (Bass *et al*, 2015). Comme illustré dans la figure 63, l'application de cet insecticide seul à  $10^{-6}$ M, dans les mêmes conditions expérimentales précédemment décrites, induit un courant entrant de faible amplitude (**Figure 63A et C**). Après un pré-traitement à l'IR3535 ( $10^{-8}$ M), il est possible d'observer un effet du thiaméthoxame beaucoup plus important (**Figure 63B et C**). Ces résultats confirment que notre stratégie d'utiliser une association d'IR3535 avec des néonicotinoïdes permet d'obtenir un effet synergique et donc de potentialiser l'effet de cette famille d'insecticides qui utilisés seuls ne montrent qu'une action relativement faible sur neurones d'insectes.



**Figure 63 :** A-B Exemples de courants ioniques entrants induits par l'application de thiamethoxame à  $10^{-6}$ M et après un prétraitement à l'IR3535 à  $10^{-8}$ M. Potentiel de référence : -50mV. C- Histogramme comparatif illustrant l'effet d'un prétraitement à l'IR3535  $10^{-8}$ M sur l'amplitude du courant entrant induit par le thiamethoxame (barre rouge) comparé au courant contrôle (barre bleue). \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,01$  ; n= 3-4).

Un autre néonicotinoïde, le dinotéfurane, a déjà été testé sur les moustiques *An. gambiae*, *Ae. aegypti* et *Cx. quinquefasciatus* (Corbel *et al*, 2004b). Bien que sa toxicité soit moins importante que celle d'autres insecticides, il a montré une efficacité constante contre les moustiques sensibles et résistants aux pyréthrinoïdes. De même, une combinaison de dinotéfurane, de deltaméthrine et de PBO a permis de retrouver une efficacité maximale contre les moustiques *An. gambiae* résistants aux pyréthrinoïdes (Darriet et Chandre, 2011). Le dinotéfurane pourrait donc être un autre insecticide à étudier en association avec l'IR3535.

L'association du répulsif IR3535 à faible concentration avec un insecticide néonicotinoïde pourrait ainsi être envisagée comme nouvelle stratégie de LAV, ce qui permettrait de contourner les problèmes de résistances retrouvées chez les moustiques vecteurs, notamment aux pyréthrinoïdes, tout en réduisant les doses de substances actives utilisées.

## 2.2. Tester l'effet de l'association IR3535/thiaclopride sur le terrain

Les forces armées françaises sont déployées en Afrique et dans les régions d'Outre-mer où sévissent de nombreuses maladies à transmission vectorielle (Deparis *et al*, 2001). Malgré une baisse significative du nombre de cas de paludisme recensés dans les troupes armées depuis 2001, la France est le premier pays d'Europe en termes d'incidence annuelle (BEH, InVS, 2008). Ainsi, de nombreuses épidémies continuent de survenir, compromettant les capacités opérationnelles des troupes en place. Pour ces forces armées en déplacement dans des zones à risques, les maladies à transmission vectorielle sont donc de véritables enjeux contre lesquels il est nécessaire d'avoir les meilleures protections. Les tenues de combat et les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes, possédant une action à la fois insecticide et répulsive, font parties des moyens de protection fournis aux soldats lors de leurs déplacements. Malheureusement, l'apparition de résistances au sein des populations de moustiques remet en cause leurs efficacités et donc leurs utilisations.

Pour remplacer efficacement ces insecticides, limiter l'apparition de résistances chez les moustiques vecteurs de maladies et diminuer la dose d'insecticide utilisée, de nouvelles stratégies de LAV s'appuient sur la synergie potentielle de plusieurs molécules à effets insecticides et/ou répulsifs. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet synergique d'une nouvelle combinaison IR3535/néonicotinoïde.

Afin de vérifier l'efficacité d'une association IR3535/néonicotinoïde en imprégnation sur des textiles, il sera nécessaire d'effectuer des tests sur le terrain, notamment au Bénin ou au Burkina Faso. Les moustiquaires et les tenues de combat imprégnées pourront être testées en cases pièges sur des sujets volontaires. Ce type d'expérimentations a déjà été utilisé dans de nombreuses études (Darriet *et al*, 1998 ; N'Guessan *et al*, 2001 ; Pennetier *et al*, 2008 ; Pennetier *et al*, 2010). Il sera possible de mesurer l'efficacité et la rémanence des moustiquaires imprégnées contre les populations naturelles de moustiques vecteurs de maladies. Pour cela, des sujets volontaires passent la nuit dans une case expérimentale équipée d'ouverture permettant l'entrée des moustiques, mais empêchant leur sortie. Lors de la capture, les moustiques sont triés en fonction de leur état (vivant/mort, gorgé/non gorgé) et de leur localisation. Ceci permet de connaître l'effet répulsif, l'inhibition du gorgement et l'effet létal de la moustiquaire imprégnée.

## Conclusion

---

Dans un contexte d'émergence/réémergence des maladies à transmissions vectorielles, telles le paludisme, la dengue et le chikungunya, les autorités sanitaires mondiales cherchent de nouvelles stratégies pour diminuer le risque d'infection. Il s'agit notamment de limiter les contacts avec les moustiques vecteurs de ces pathologies souvent sévères pour lesquelles il n'existe pas de vaccin et le plus souvent pas de traitement, en utilisant principalement des substances chimiques afin de traiter divers textiles (habits, toiles de tente, moustiquaires ...). Aujourd'hui, dans le cadre de cette LAV, la plupart des textiles sont imprégnés d'insecticides pyréthrinoïdes possédant une action à la fois insecticide et répulsive. Malheureusement, l'apparition de résistances au sein des populations de moustiques remet en cause leurs efficacités et donc leurs utilisations.

Pour remplacer efficacement ces insecticides, limiter l'apparition de résistances chez les moustiques vecteurs de maladies et diminuer la dose d'insecticide utilisée, de nouvelles stratégies de LAV s'appuient sur la synergie potentielle de plusieurs molécules à effets insecticides et/ou répulsifs. Dans ce contexte, mon projet de recherche consistait à développer une stratégie de protection en utilisant une association de deux composés de familles chimiques différentes, à savoir un répulsif et un insecticide de type néonicotinoïde. Nous avons démontré que l'IR3535 en association avec le thiaclopride, un néonicotinoïde, induit un effet synergique en augmentant l'efficacité du thiaclopride. Ces résultats prometteurs nous ont permis d'envisager plusieurs perspectives de recherches :

- améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action intracellulaires induits par l'IR3535.
- étudier l'effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur les neurones de moustique *in vitro* et *in vivo* par des études en tunnel et sur le terrain.
- étudier l'effet synergique de l'association IR3535/thiaclopride sur des souches de moustiques résistants.
- tester l'IR3535 en association avec d'autres insecticides de la famille des néonicotinoïdes.

## Liste des figures et tableaux

---

### Introduction

<b>Figure 1</b> : Photographies des espèces représentatives de deux sous-familles de moustiques.....	13
<b>Figure 2</b> : Cycle de vie d'un moustique (EID Atlantique, 2015).....	14
<b>Figure 3</b> : Dimorphisme sexuel chez le moustique <i>Aedes aegypti</i> (d'après Wikipédia, 2015).....	17
<b>Figure 4</b> : Schéma des zones de piqûres préférentielles d' <i>Anopheles gambiae</i> (à gauche) et d' <i>Anopheles atroparvus</i> (à droite).....	21
<b>Figure 5</b> : Carte des territoires affectés par le paludisme (CDC, 2014).....	22
<b>Figure 6</b> : Carte des territoires affectés par la dengue (CDC, 2014).....	24
<b>Figure 7</b> : Carte des territoires affectés par le chikungunya (OMS, 2014).....	26
<b>Figure 8</b> : Comparaison de la carte de répartition du paludisme (A) (CDC, 2014) et de la carte des interventions des forces armées françaises depuis la Seconde Guerre Mondiale (B) (complétée d'après Pages <i>et al</i> , 2009).....	31
<b>Figure 9</b> : Exemple de gestes simples préconisés par les autorités locales pour limiter les gîtes larvaires de moustiques (Métropole de Lyon).....	32
<b>Figure 10</b> : Mode d'action de la spore de Bti sur la larve de moustique.....	36
<b>Figure 11</b> : Représentations schématiques de la structure moléculaire de la pyréthrine I issue des fleurs de chrysanthème et de deux de ses dérivés pyréthrinoïdes, la perméthrine et la deltaméthrine.....	48
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique de la structure moléculaire du DEET.....	49
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de la structure moléculaire de l'icaridine.....	50
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique de la structure moléculaire de l'IR3535.....	51
<b>Figure 15</b> : Photographie au microscope électronique à balayage d'une tête de moustique femelle <i>Aedes aegypti</i> (d'après Ghaninia <i>et al</i> , 2007).....	52
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de l'effet du DEET sur le complexe ORco-OR.....	55
<b>Figure 17</b> : Etats du canal Na <sub>v</sub> en condition contrôle ou en présence de pyréthrinoïde.....	61
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique de la structure moléculaire des principaux néonicotinoïdes ainsi que de la nicotine et de l'acétylcholine (d'après Tan <i>et al</i> , 2007).....	64
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez l'insecte (d'après Haubruge et Amichot, 1998).....	65
<b>Figure 20</b> : Représentation schématique d'un canal sodium dépendant du potentiel.....	69
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique d'une fente synaptique.....	70
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique de l'ACHÉ1.....	71

**Figure 23 :** Carte des scores SIRIS pour les différentes familles chimiques de substances utilisées ou potentiellement utilisables comme aduicticides en LAV.....79

## Matériels et méthodes

**Figure 24 :** A- Représentation d'une blatte mâle *Periplaneta americana*. B- Photographie d'une chaîne nerveuse de blatte *Periplaneta americana* (d'après Mizunami, 2006). C- Localisation des corps cellulaires des DUM neurones du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana* à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (d'après Sinakevitch et al, 1995).....84

**Figure 25 :** Photographie d'un DUM neurone visualisé au microscope optique (grossissement x40).....85

**Tableau 1 :** Compositions des différents liquides physiologiques (LP) utilisés pour la dissociation cellulaire et la mise en culture des DUM neurones issus de ganglions de blatte adulte mâle.....89

**Figure 26 :** Protocole de dissociation et de mise en culture à court terme des neurones DUM issus du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*.....91

**Figure 27 :** A - Représentation structurale de la molécule de Fura-2 libre et liée au calcium. B - Représentation schématique des spectres d'excitation du Fura-2 sous sa forme liée au calcium (340nm) et sous sa forme libre (380nm).....93

**Figure 28:** Représentation schématique de l'installation du poste d'imagerie calcique.....94

**Figure 29 :** Visualisation des variations de la concentration en calcium intracellulaire au sein d'un corps cellulaire de DUM neurones grâce à l'ajout de pseudo-couleurs par le logiciel Imaging Workbench.....95

**Figure 30 :** Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière » en patch-clamp.....96

**Figure 31 :** Représentation schématique de l'installation du poste de patch-clamp.....98

**Tableau 2.** Composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées lors des expériences de patch-clamp.....99

**Figure 32 :** Photographie (A) et représentation schématique (B) du test en cône permettant de tester la sensibilité des moustiques adultes aux insecticides et répulsifs.....102

## Résultats

**Figure 33 :** Exemples de spectres illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de DEET utilisé à  $10^{-9}$  M (A),  $10^{-7}$  M (B) et  $10^{-5}$  M (C) sur des DUM neurones isolés.....109

**Figure 34 :** Courbe dose-réponse illustrant les variations de calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration de DEET utilisée.....110

**Figure 35 :** Schéma résumant les différents évènements moléculaires impliqués dans l'effet synergique du DEET sur l'action d'un insecticide anticholinestérasique, le propoxur (d'après Abd-Ella et al, 2015).....111

<b>Figure 36</b> : Exemples de spectres illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire en présence d'IR3535 utilisé à $10^{-8}$ M (A), $3 \cdot 10^{-6}$ M (B) et $10^{-5}$ M (C) sur DUM neurones isolés.....	115
<b>Figure 37</b> : Courbe dose-réponse illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée.....	116
<b>Figure 38</b> : Comparaison des variations de la concentration en calcium intracellulaire au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme induites par l'application d'IR3535 à $10^{-8}$ M.....	117
<b>Figure 39</b> : Effet d'une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (calcium free) et de la toxine de cône, l' $\omega$ -conotoxine ( $\omega$ -ctx) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à $10^{-8}$ M.....	118
<b>Figure 40</b> : Effet de la pirenzépine (PZP, 100nM) antagoniste sélectif des mAChRs de sous-type M1, sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à $10^{-8}$ M.....	120
<b>Figure 41</b> : Histogramme comparatif illustrant les effets de la caféine (10mM) utilisée seule et en présence d'IR3535 testé à $10^{-8}$ M sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire.....	121
<b>Figure 42</b> : Absence d'effet du TMB-8 (100 $\mu$ M) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à $10^{-8}$ M.....	122
<b>Figure 43</b> : Schéma récapitulatif résumant les mécanismes physiologiques impliqués dans les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'IR3535 testé à $10^{-8}$ M.....	123
<b>Figure 44</b> : Comparaison des variations de la concentration en calcium intracellulaire au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme induites par l'application d'IR3535 à $10^{-5}$ M.....	124
<b>Figure 45</b> : Effet d'une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (calcium free) et de l' $\omega$ -conotoxine ( $\omega$ -ctx) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 à $10^{-5}$ M.....	125
<b>Figure 46</b> : Effet de la pirenzépine (PZP, 100nM) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 testé à $10^{-5}$ M.....	126
<b>Figure 47</b> : Histogramme comparatif illustrant les effets de la caféine (10mM) utilisée seule et en présence d'IR3535 testé à $10^{-5}$ M sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire.....	127
<b>Figure 48</b> : Effet du TMB-8 (100 $\mu$ M) sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire induites par l'application d'IR3535 testé à $10^{-5}$ M.....	128
<b>Figure 49</b> : Schéma récapitulatif résumant les mécanismes physiologiques impliqués dans les variations de calcium intracellulaires induites par l'application d'IR3535 à $10^{-5}$ M.....	129
<b>Figure 50</b> : Activité électrique spontanée d'un DUM neurone isolé du dernier ganglion abdominal du de la chaîne nerveuse ventrale de la blatte <i>Periplaneta americana</i> , enregistrée à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.....	130
<b>Figure 51</b> : Effet de l'IR3535 utilisé à $10^{-8}$ M sur l'activité électrique d'un DUM neurone isolé enregistré à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.....	131
<b>Figure 52</b> : Effet de l'IR3535 à $3 \cdot 10^{-5}$ M sur l'activité électrique spontanée d'un DUM neurone de blatte.....	132
<b>Tableau 3</b> : Classement des 32 substances actives en trois classes selon le niveau de connaissances sur l'efficacité sur moustiques (Rapport d'expertise collective de l'Anses, 2011).....	134

**Figure 53 :** A- Exemples de courants ioniques entrants induits par la perfusion de thiaclopride à des concentrations comprises entre  $10^{-4}$ M et  $10^{-8}$ M. B- Courbe dose-réponse obtenue à partir des mesures des amplitudes des courants entrants induits par le thiaclopride pour chaque concentration testée.....136

**Figure 54 :** A-D- Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement à l'IR3535  $10^{-8}$ M sur l'amplitude du courant entrant induit par le thiaclopride (barre bleue) comparé au courant contrôle (barre rouge). E- Courbe dose-réponse de l'effet du thiaclopride en absence (tracé rouge) et en présence de répulsif IR3535 à  $10^{-8}$ M (tracé bleu).....138

**Figure 55 :** Histogrammes comparatifs des effets de la PZP à 100nM (A) et de CdCl<sub>2</sub> à 1mM (B) sur l'amplitude des courants entrants induits par le thiaclopride après pré-traitement à l'IR3535 à faible concentration.....139

**Figure 56 :** Histogramme illustrant l'effet du CdCl<sub>2</sub> (1mM) sur l'amplitude du courant enregistré après application du mélange IR3535/thiaclopride à  $10^{-5}$ M.....140

**Figure 57 :** Exemple de spectre illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de thiaclopride à  $10^{-5}$ M.....141

**Figure 58 :** A- Corps cellulaire d'un DUM neurones enregistrés à l'aide de la technique d'imagerie calcique au cours de l'application d'IR3535 et du mélange IR3535/thiaclopride (1, 2 et 3) aux concentrations indiquées sur le graphe. B- Exemple de spectre illustrant l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire dans un corps cellulaire de DUM neurone suite à l'application d'IR3535 à  $10^{-8}$ M et du mélange IR3535/thiaclopride à  $10^{-7}$ M.....142

**Tableau 4 :** Comparaison de l'effet KD induit après 3 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône.....145

**Tableau 5 :** Comparaison de l'effet KD induit après 30 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône.....146

**Tableau 6 :** Comparaison de la mortalité induite après 3 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône.....147

**Tableau 7 :** Comparaison de la mortalité induite après 30 minutes de contact avec le thiaclopride seul, l'IR3535 seul et l'association des deux substances actives sur les moustiques femelles *Anopheles gambiae* en tests en cône.....148

**Figure 59 :** Photographie du dispositif du test en tunnel pour tester l'efficacité des moustiquaires imprégnées sur l'effet répulsif et sur la mortalité.....149

## Discussion et perspectives

**Figure 60 :** Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires impliqués dans le double effet de l'IR3535 en fonction de la concentration appliquée sur DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*.....154

**Figure 61:** A- Courbe dose-réponse illustrant les variations de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée. B- Courbe dose-réponse illustrant les variations

de la concentration en calcium intracellulaire mesurées en fonction de la concentration d'oxotrémorine (oxo) utilisée.....156

**Figure 62:** A- Microphotographie d'un corps cellulaire de neurone (échelle : 10µm) isolé par dissociation mécanique de têtes de moustique *An. gambiae*. B- Exemple de spectre illustrant les variations de calcium intracellulaire en présence de thiaclopride utilisé à 10<sup>-7</sup>M sur neurone de moustique (résultat obtenu au laboratoire, communication de Josy Froger). C- Exemple de courant ionique entrant induit par l'application de thiaclopride à 10<sup>-6</sup>M sur neurone de moustique. Potentiel de référence : -50mV (résultat obtenu au laboratoire, communication d'Olivier List).....163

**Figure 63 :** A-B Exemples de courants ioniques entrants induits par l'application de thiamethoxame à 10<sup>-6</sup>M et après un prétraitement à l'IR3535 à 10<sup>-8</sup>M. Potentiel de référence : -50mV. C- Histogramme comparatif illustrant l'effet d'un prétraitement à l'IR3535 10<sup>-8</sup>M sur l'amplitude du courant entrant induit par le thiamethoxame (barre rouge) comparé au courant contrôle (barre bleue). \*\*, résultat statistiquement différent ( $p < 0,01$  ; n= 3-4).....165



## Références bibliographiques

---

### Publications

- Abd-Ella A, Stankiewicz M, Mikulska K, Nowak W, Pennetier C, Goulu M, Fruchart-Gaillard C, Licznar P, Apaire-Marchais V, List O, Corbel V, Servent D, Lapied B (2015) *The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases*. PLoS One. 10(5):e0126406.
- Abdel-Rahman A, Abou-Donia S, El-Masry E, Shetty A, Abou-Donia M (2004) *Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum*. J Toxicol Environ Health A. 67(2):163-92.
- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB (2001) *Combined exposure to DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) and permethrin-induced release of rat brain mitochondrial cytochrome c*. J Toxicol Environ Health A. 63(4):243-52.
- Ahmed MA, Vogel CF, Matsumura F (2015) *Unique biochemical and molecular biological mechanism of synergistic actions of formamidine compounds on selected pyrethroid and neonicotinoid insecticides on the fourth instar larvae of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Pestic Biochem Physiol. 120:57-63.
- Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M (2008) *Comparison of Anopheles gambiae and Culex pipiens acetylcholinesterase 1 biochemical properties*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 150(3):271-7.
- Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL (2010) *Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis*. Vector Borne Zoonotic Dis. 10(3):295-311.
- Aranda C, Eritja R, Roiz D (2006) *First record and establishment of the mosquito Aedes albopictus in Spain*. Med Vet Entomol. 20(1):150-2.
- Aronson D, Weeks J, Meylan B, Guiney PD, Howard PH (2011) *Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET)*. Integr Environ Évaluer Manag. 8 (1): 135-66.
- Banks SD, Murray N, Wilder-Smith A, Logan JG (2014) *Insecticide-treated clothes for the control of vector-borne diseases: a review on effectiveness and safety*. Med Vet Entomol. 28(1):14-25.
- Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R (2015) *The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides*. Pestic Biochem Physiol. 121:78-87.
- Blancou J et Meslon FX (2000) *Brefs rappels sur l'histoire des zoonoses*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 19(1):15-22.
- Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal PY, Thany SH, Lapied B (2012) *Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides*. J Pharmacol Exp Ther. 341(2):326-39.

- Bohbot JD, Dickens JC (2012) *Odorant receptor modulation: ternary paradigm for mode of action of insect repellents*. *Neuropharmacology*. 62(5-6):2086-95.
- Bohbot JD, Dickens JC (2010) *Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity*. *PLoS One*. 5(8):e12138.
- Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA (2013) *The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives*. *Trends Parasitol*. 29(9):460-8.
- Bonnet J, Penetier C, Duchon S, Lapied B, Corbel V (2009) *Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes*. *Parasit Vectors*. 2(1):17.
- Boulanger N, Lipsker D (2014) *[Protection against tick bites]* *Ann Dermatol Venerol*. 142(4):245-51.
- Braack L, Hunt R, Koekemoer LL, Gericke A, Munhenga G, Haddow AD, Becker P, Okia M, Kimera I and Coetzee M (2015) *Biting behaviour of African malaria vectors: 1. where do the main vector species bite on the human body?* *Parasites & Vectors*. 8:76
- Bräunig P and Pflüger H. J (2001) *The unpaired median neurons of insects*. *Adv Insect Physiol*, 28:185-266.
- Buckingham S, Lapied B, Corronc H, Sattelle F (1997) *Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors*. *J Exp Biol*. 200(21):2685-92.
- Calas-List D, List O, Thany SH (2012) *Nornicotine application on cockroach dorsal unpaired median neurons induces two distinct ionic currents: implications of different nicotinic acetylcholine receptors*. *Neurosci Lett*. 518(1):64-8.
- Cardé RT, Gibson G (2012) *Host finding by female mosquitoes: mechanisms of orientation to host odours and other cues*. *Olfaction in vector-host interactions* Edited by Publishers WA.
- Carnevale P and Robert V (2009) *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*, Marseille : IRD Editions
- Casida JE, Durkin KA (2013) *Anticholinesterase insecticide retrospective*. *Chem Biol Interact*. 203(1):221-5.
- Chandrashekhar P, Rahul S, Hemant B, Chandrakant N, Bipinchandra S, Satish P (2015) *Maintenance of residual activity of Bt toxin by using natural and synthetic dyes: a novel approach for sustainable mosquito vector control*. *Nat Prod Res*. 20:1-5.
- Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P (1999) *Status of pyrethroid resistance in Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*. 77(3):230-4.
- Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R (2013) *Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand*. *Parasit Vectors*. 6:280.
- Chobu M, Nkwengulila G, Mahande AM, Mwang'onde BJ, Kweka EJ(2015) *Direct and indirect effect of predators on Anopheles gambiae sensu stricto*. *Acta Trop*. 142:131-7

- Coast GM, Garside CS, Webster SG, Schegg KM and Schooley DA (2005) *Mosquito natriuretic peptide identified as a calcitonin-like diuretic hormone in Anopheles gambiae (Giles)*. J. Exp. Biol. 208:3281 -3291.
- Corbel V, M Stankiewicz, Pennetier C, Fournier D, Stojan J, Girard E, Dimitrov M, Molgó J, Hougard JM, Lapied B (2009) *Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet*. BMC Biol. 7:47.
- Corbel V, Stankiewicz M, Bonnet J, Grolleau F, Hougard JM, Lapied B (2006) *Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system*. Neurotoxicology. 27(4):508-19.
- Corbel V, Raymond M, Chandre F, Darriet F, Hougard JM (2004a) *Efficacy of insecticide mixtures against larvae of Culex quinquefasciatus (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates*. Pest Manag Sci. 60(4):375-80.
- Corbel V, Duchon S, Zaim M, Hougard JM (2004b) *Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes*. J Med Entomol. 41(4):712-7.
- Corbel V, Chandre F, Darriet F, Lardeux F, Hougard JM (2003) *Synergism between permethrin and propoxur against Culex quinquefasciatus mosquito larvae*. Med Vet Entomol. 17(2):158-64.
- Costa LG (2006) *Current issues in organophosphate toxicology*. Clin Chim Acta. 366(1-2):1-13.
- Costantini C1, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E (2004) *Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against Anopheles gambiae complex and other Afrotropical vector mosquitoes*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 98(11):644-52.
- Courjaret R, Grolleau F, Lapied B (2003) *Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons)*. Eur J Neurosci. 17(10):2023-34.
- Courjaret R, Lapied B (2001) *Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons)*. Mol Pharmacol. 60(1):80-91.
- Cui F, Raymond M, Qiao CL (2006) *Insecticide resistance in vector mosquitoes in China*. Pest Manag Sci. 62(11):1013-22.
- Curtis C (1985) *Theoretical methods of the use of insecticide mixtures for management of resistance*. Bull Entomol Res. 75 :259-265.
- Darriet F, Chandre F (2013) *Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant Aedes aegypti and Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae)*. Pest Manag Sci. 69(8):905-10.
- Darriet F, Chandre F (2011) *Combining piperonyl butoxide and dinotefuran restores the efficacy of deltamethrin mosquito nets against resistant Anopheles gambiae (Diptera : Culicidae)*. J Med Entomol. 2011, 48(4): 952-955.

- Darriet, F, Duchon S, Hougard JM (2005) *Spinosad: a new larvicide against insecticide resistant mosquito larvae*. J Am Mosq Control Assoc. 21: 495-496.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, Carnevale P (1998) *[Impact of resistance of Anopheles gambiae s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets]*. Med Trop, 58(4):349-54.
- Davies, TGE, Field, LM, Usherwood, PNR and Williamson, MS (2007) *DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels*. IUBMB Life, 59: 151–162.
- Debboun M, Frances S, Strickman D (2006) *Insect repellents : principles, methods and use* Taylor and Francis Edition, p 405-415
- Defaix A, Lapied B (2005) *Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons*. Invert Neurosci. 5:135-146.
- Deletre E, Martin T, Campagne P, Bourguet D, Cadin A, Menut C, Bonafos R, Chandre F (2013) *Repellent, irritant and toxic effects of 20 plant extracts on adults of the malaria vector Anopheles gambiae mosquito*. PLoS One. 8(12):e82103.
- della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V, Coluzzi M (2001) *Molecular evidence of incipient speciation within Anopheles gambiae s.s. in West Africa*. Insect Mol Biol. 10(1):9-18.
- Deparis X, Boutin JP, Michel R, Galois-Guibal L, Meynard JB, Pages F, Matton T, Spiegel A, Baudon D (2001) *La stratégie de lutte antivectorielle dans les armées françaises*. Med Trop. 61(1):87-90.
- Dias CN, Moraes DF (2014) *Essential oils and their compounds as Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review*. Parasitol Res. 113(2):565-92.
- Dickens JC, Bohbot JD (2013) *Mini review: Mode of action of mosquito repellents*. Pestic. Biochem. Physiol. 106(3):149–55.
- Djènonstin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F (2009) *Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets*. Malar J. 8: 233.
- Doannio JMC, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibé ME, Chauvancy G and Rivière F (2006) *Comparaison de la composition spécifique et de la dynamique des populations de moustiques dans deux villages du centre de la Côte-d'Ivoire, avec et sans périmètre de riziculture irriguée*. Bull Soc Pathol Exot. 99:31.
- Dugravot S, Grolleau F, Macherel D, Rochetaing A, Hue B, Stankiewicz M, Huignard J, Lapied B (2003) *Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels*. J Neurophysiol. 90(1):259-70.
- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL (2010) *Acetylcholinesterase: from 3D structure to function*. Chem Biol Interact. 187(1-3):10-22.
- Fankhauser B, Dumont P, Hunter JS 3rd, McCall JW, Kaufmann C, Mathis A, Young DR, Carroll SP, McCall S, Chester ST, Soll MD (2015) *Repellent and insecticidal efficacy of a new*

*combination of fipronil and permethrin against three mosquito species (Aedes albopictus, Aedes aegypti and Culex pipiens) on dogs.* Parasit Vectors. 8:64.

- Farenhorst M, Farina D, Scholte EJ, Takken W, Hunt RH, Coetzee M, Knols BG (2008) *African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae to the malaria vectors Anopheles gambiae s.s. and Anopheles funestus.* Am J Trop Med Hyg. 78(6):910-6.
- Faulde MK, Nehring O (2012) *Synergistic insecticidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique.* Parasitol Res. 111(2):755-65.
- Fellner SK, Rybczynskib R, Gilbertb LI (2005) *Ca<sup>2+</sup> signaling in prothoracicotropic hormone-stimulated prothoracic gland cells of Manduca sexta: Evidence for mobilization and entry mechanisms.* Insect Biochem Mol Biol, 35: 263–275.
- Fradin MS, Day JF (2002) *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites.* N Engl J Med. 347 (1):13-8.
- Garros C, Van Bortel W, Trung HD, Coosemans M, Manguin S (2006) *Review of the Minimus Complex of Anopheles, main malaria vector in Southeast Asia: from taxonomic issues to vector control strategies.* Trop Med Int Health. 11(1):102-14.
- Gautier H, Auger J, Legros C, Lapied B (2008) *Calcium-activated potassium channels in insect pacemaker neurons as unexpected target site for the novel fumigant dimethyl disulfide.* J Pharmacol Exp Ther. 324(1):149-59.
- Ghaninia M, Ignell R, Hansson BS (2007) *Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, Aedes aegypti.* Eur J Neurosci. 26(6):1611-23.
- Ghosh SK and Dash AP (2007) *Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 101(11):1063-1064.
- Githeki AK, Service MW, Mbogo CM, Atieli FK, Juma FO (1994) *Origin of blood meals in indoor and outdoor resting malaria vectors in western Kenya.* Acta Trop. 58(3-4):307-16.
- Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, Jinsmaa Y, Kopin IJ, Sharabi Y (2015) *Rotenone decreases intracellular aldehyde dehydrogenase activity: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease.* J Neurochem. 2015 Apr;133(1):14-25.
- Gratz NG (1999) *Emerging and resurging vector-borne diseases* Annu Rev Entomol 44:51-75
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA (2005) *Malaria.* Lancet. 365:1487-98.
- Grienberger C, Konnerth A (2012) *Imaging calcium in neurons.* Neuron. 73(5):862-85.
- Grolleau F, Stankiewicz M, Kielbasiewicz E, Martin-Eauclaire MF, Lavialle C, De Vente J, Lapied B (2006) *Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry is the final step involved in the neurotoxic effect of Tityus serrulatus scorpion beta-toxin.* Eur J Neurosci. 23(6):1465-78.

- Grolleau F, Lapied B (2000) *Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity*. J Exp Biol. 203:1633-1648.
- Grolleau F, Lapied B (1996) *Two distinct low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons*. J Neurophysiol. 76(2):963-76.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) *Improved patchclamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches*. Pflugers Arch. 391:85-100.
- Haubruge E, Amichot M, (1998) *Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2(3) :161–174.
- Henderson JP, Westwood R, Galloway T (2006) *An assessment of the effectiveness of the Mosquito Magnet Pro Model for suppression of nuisance mosquitoes*. J Am Mosq Control Assoc. 22(3):401-7.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL (2011) *Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission*. Nature. 476(7361):454-7.
- Hoy JB, Cornell JA, Karlix JL, Tebbett IR, van Haaren F (2000) *Repeated coadministrations of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin alter locomotor behavior of rats*. Vet Hum Toxicol. 42(2):72-6.
- Hoyle G, Dagan D, Moberly B, Colquhoun W (1974) *Dorsal unpaired median insect neurons make neurosecretory ending on skeletal muscle*. J Exp Zool. 187:159-165.
- Hue B, Callec JJ (1990) *Electrophysiology and pharmacology of synaptic in the central nervous system of the cockroach. Cockroaches as model for neurobiology. Applications in biochemical research* I. Huber, E. P. Masler and B. R. Rao. Boca-Raton, CRC Press. 149-168.
- Kain P, Boyle SM, Tharadra SK, Guda T, Pham C, Dahanukar A, Ray A (2013) *Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents*. Nature. 502(7472):507-12.
- Katz TM, Miller JH, Hebert AA (2008) *Insect repellents: historical perspectives and new developments*. J Am Acad Dermatol. 58(5):865-71.
- Kay B, Vu SN (2005) *New strategy against Aedes aegypti in Vietnam*. Lancet. 365(9459):613-7.
- Kerwin JL (2007) *Oomycetes: Lagenidium giganteum*. J Am Mosq Control Assoc. 23(2 Suppl):50-7.
- Kirst HA (2010) *The spinosyn family of insecticides : realizing the potential of natural products research*. J. of antibiotics. 63, 101-111.
- Kitau J, Oxborough R, Matowo J, Moshia F, Magesa SM, Rowland M (2014) *Indoor residual spraying with microencapsulated DEET repellent (N, N-diethyl-m-toluamide) for control of Anopheles arabiensis and Culex quinquefasciatus*. Parasit Vectors. 7:446.

- Kitchen LW, Lawrence KL, and Coleman RE (2009) *The role of the United States military in the development of vector control products, including insect repellents, insecticides, and bed nets.* J Vector Ecol 34 (1): 50-61.
- Klun JA, Khiridian A, Debboun M (2006) *Repellent and deterrent effects of SS220, Picaridin, and Deet suppress human blood feeding by Aedes aegypti, Anopheles stephensi, and Phlebotomus papatasi.* Med Entomol. 43(1):34-9.
- Koella JC, Sorensen FL, Anderson RA (1998) *The malaria parasite, Plasmodium falciparum, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, Anopheles gambiae.* Proc Biol Sci. 265(1398):763-768.
- Koffi AA, Ahoua Alou LP, Kabran JP, N'Guessan R, Pennetier C (2013) *Re-visiting insecticide resistance status in Anopheles gambiae from Côte d'Ivoire: a nation-wide informative survey.* PLoS One. 8(12):e82387.
- Lapied B, Lavalie-Defaix C, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D et Corbel V (2010) *Le paradoxe répulsif en Santé Publique : Peut-on recommander des composés à mode d'action inconnu pour se protéger des insectes nuisants et vecteurs de maladies ?* SEST 2011
- Lapied B, Stankiewicz M, Grolleau F, Rochat H, Zlotkin E, Pelhate M (1999) *Biophysical properties of scorpion alpha-toxin-sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons).* Eur J Neurosci. 11(4):1449-60.
- Lapied B, Tribut F, Hue B (1992) *Effects of McN-A-343 on insect neurosecretory cells: evidence for muscarinic-like receptor subtypes.* Neurosci Lett, 139(2):165-168.
- Lapied B, Malecot CO, Pelhate M (1990) *Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones.* J Exp Biol. 151: 387-403.
- Lapied, B, Malécot CO, Pelhate M (1989) *Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach Periplaneta americana.* J Exp Biol. 144: 535-549.
- Lavalie-Defaix C, Moignot B, Legros C, Lapied B (2010) *How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons?* J Pharmacol Exp Ther. 333(1):264-72.
- Lavalie-Defaix C, Gautier H, Defaix A, Lapied B, Grolleau F (2006) *Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons.* J Neurophysiol. 96: 2437-2450.
- Le Corronc, H, Alix, P, Hue B (2002) *Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxin.* J Insect Physiol 48:419-431.
- Lengeler C, Cattani J, de Savigny D (1997) *Un mur contre la malaria : du nouveau dans la prévention des décès dus au paludisme.* Ottawa : OMS/ CRDI.
- Licciardi S, Herve JP, Darriet F, Hougard JM, Corbel V (2006) *Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on Aedes aegypti mosquitoes in laboratory assays.* Med Vet Entomol. 20(3):288-93.

- Licznar P, List O, Goven D, Nna RN, Lapied B, Apaire-Marchais V (2014) *A novel method using Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus for increasing the sensitivity of insecticide through calcium influx in insect cell line.* J Virol Methods. 195:72-5.
- List O, Calas-List D, Taillebois E, Juchaux M, Heuland E, Thany SH (2014) *Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents.* J Neurochem. 130(4):507-13.
- Lundwall E, Pennetier C, Corbel V, de Gentile L, Legros F (2005) *Paludisme: se protéger des piqûres d'anophèles.* La Revue du Praticien. 55
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM (2014) *Insecticide resistance status of United States populations of Aedes albopictus and mechanisms involved.* PLoS One. 9(7):e101992.
- Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz MA, Poupardin R, Sélion S, Darriet F, Reynaud S, Yébakima A, Corbel V, David JP, Chandre F(2012) *Insecticide resistance in the dengue vector Aedes aegypti from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors.* PLoS One. 7(2):e30989.
- Marquer C, Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Grandjean O, Girard E, le Maire M, Brown S, Servent D (2010) *Influence of MT7 toxin on the oligomerization state of the M1 muscarinic receptor.* Biol Cell. 2010 Apr 9;102(7):409-20.
- Martin T, Ochou GO, Hala-N'Klo F, Vassal JM, Vaissayre M (2000) *Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hübner), in West Africa.* Pest Manag Sci. 56(6): 549–554.
- Millar NS, Denholm I (2007) *Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides.* Invert Neurosci. 7(1):53-66.
- Mittal PK (2003) *Biolarvicides in vector control: challenges and prospects.* J Vector Borne Dis. 40(1-2):20-32.
- Moignot B, Lemaire C, Quinchart S, Lapied B, Legros C (2009) *The discovery of a novel sodium channel in the cockroach Periplaneta americana: evidence for an early duplication of the para-like gene.* Insect Biochem Mol Biol. 39:814-823.
- Murillo L1, Hamon A, Es-Salah-Lamoureux Z, Itier V, Quinchart S, Lapied B (2011) *Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells.* Neurotoxicology. 32(6):828-35.
- Narahashi T (2000) *Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future.* J Pharmacol Exp Ther. 294(1):1-26.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R (2001) *Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae).* Pest Manag Sci. 57(7):577-86.
- Neher E, Sakmann B, Steinbach JH (1978) *The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes.* Pflugers Arch, 375: 219-228.

- Ng'habi KR, Huho BJ, Nkwengulila G, Killeen GF, Knols BGJ, Ferguson HM (2008) *Sexual selection in mosquito swarms: may the best man lose?* Animal Behaviour. 76, 105:112
- N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P (2001) *Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus after 3 years' field use in Cote d'Ivoire.* Med Vet Entomol. 15(1):97-104.
- Nolan T, Papathanos P, Windbichler N, Magnusson K, Benton J, Catteruccia F, Crisanti A (2011) *Developing transgenic Anopheles mosquitoes for the sterile insect technique.* Genetica. 139(1):33-9.
- Oh SS, Hur MJ, Joo GS, Kim ST, Go JM, Kim YH, Lee WG, Shin EH (2010) *Malaria vector surveillance in Ganghwa-do, a malaria-endemic area in the Republic of Korea.* Korean J Parasitol. 48(1):35-41.
- OMS (2014) *World Malaria Report 2014*, 142p.
- OMS (2011) *World Malaria Report 2011*, 107p.
- Osta MA Christophides GK, Kafatos FC (2004) *Effects of mosquito genes on Plasmodium development.* Science. 303(5666):2030-2.
- Pagès F, Faulde M, Orlandi-Pradines E, Parola P (2010) *The past and present threat of vector-borne diseases in deployed troops.* Clin Microbiol Infect. 16(3):209-24
- Pagès F (2009) *La lutte antivectorielle dans les armées : une nécessité historique, une adaptation indispensable.* Med Trop. 69(2):165-72.
- Paluch G, Bartholomay L, Coats J (2010) *Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction.* Pest Manag Sci. 66(9):925-35.
- Pennetier C, Chabi J, Martin T, Chandre F, Rogier C, Hougard JM, Pages F (2010) *New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites.* Parasit Vectors. 3:81.
- Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, Chandre F, Hougard JM (2009) *Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying An. gambiae mosquitoes.* PLoS One. 4(11):e7896.
- Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, Chandre F, Hougard JM (2008) *Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors.* Emerg Infect Dis. 14(11):1707-14.
- Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapied B, Hougard JM (2007) *Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae.* Malar J. 6:38.
- Pennetier C, Corbel V, Hougard JM (2005) *Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes.* Am J Trop Med Hyg. 72(6):739-44.
- Ramirez J, Orchard I (1990). *Octopaminergic modulation of the forewing stretch receptor in the locust Locusta migratoria.* J Exp Biol 149: 255-279.

- Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB (2005) *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides*. *Invert Neurosci.* 5(3-4):119-33.
- Raymond, V, Sattelle DB, Lapied B (2000) *Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity*. *Neuroreport*, 11: 2695-2701.
- Ree HI (2005) *Studies on Anopheles sinensis, the vector species of vivax malaria in Korea*. *Korean J Parasitol.* 43(3):75-92.
- Rehman JU, Ali A, Khan IA (2014) *Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: A review*. *Fitoterapia.* 95:65-74.
- Reinert JE (2001) *Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes*. *J Am Mosq Control Assoc.* 17(1):51-5.
- Revay EE, Kline DL, Xue RD, Qualls WA, Bernier UR, Kravchenko VD, Ghattas N, Pstygo I, Müller GC (2013) *Reduction of mosquito biting-pressure: spatial repellents or mosquito traps? A field comparison of seven commercially available products in Israel*. *Acta Trop.* 127(1):63-8.
- Riviere JE, Monteiro-Riviere NA, Baynes RE (2002) *Gulf War related exposure factors influencing topical absorption of 14C-permethrin*. *Toxicol Lett.* 135(1-2):61-71.
- Roeder T (1999) *Octopamine in invertebrates*. *Prog Neurobiol*, 59: 533-561.
- Ryglewski S1, Pflueger HJ, Duch C (2007) *Expanding the neuron's calcium signaling repertoire: intracellular calcium release via voltage-induced PLC and IP3R activation*. *PLoS Biol.* 5(4):e66.
- Sanford JL, Barski SA, Seen CM, Dickens JC, Shields VD (2014) *Neurophysiological and behavioral responses of gypsy moth larvae to insect repellents: DEET, IR3535, and picaridin*. *PLoS One.* 9(6):e99924.
- Sanford JL, Shields VD, Dickens JC (2013) *Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften.* 100(3):269-73.
- Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K (2008) *Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels*. *Nature.* 452(7190):1002-6.
- Schaffner F, Fontenille D, Mathis A (2014) *Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirosis in Europe*. *The Lancet Infectious Diseases.* 14(11):1044
- Schreck CE, McGovern TP (1989) *Repellents and other personal protection strategies against Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 5(2):247-50.
- Semmler M, Abdel-Ghaffar F, Schmidt J, Mehlhorn H (2014) *Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects*. *Parasitol Res.* 113(1):185-8.
- Servent D, Fruchart-Gaillard C (2009) *Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors*. *J Neurochem.* 2009 Jun;109(5):1193-202.

- Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM (2005) *Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs*. Environ Health Perspect. 113(2):123-36.
- Shililu JI, Grueber WB, Mbogo CM, Githure JI, Riddiford LM, Beier JC (2004) *Development and survival of Anopheles gambiae eggs in drying soil: influence of the rate of drying, egg age, and soil type*. J Am Mosq Control Assoc. 20(3):243-7.
- Shimomura M, Yokota M, Matsuda K, Sattelle DB, Komai K (2004) *Roles of loop C and the loop B–C interval of the nicotinic receptor a subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects*. Neurosci Lett. 363(3):195-8.
- Sinakevitch IG, Geffard M, Pelhate M, Lapied B (1995) *Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colleterial glands of the female cockroach Periplaneta americana*. J Exp Biol, 198: 1539-1544.
- Singh B, Singh PR, Mohanty MK (2012) *Toxicity of a plant based mosquito repellent/killer*. Interdiscip Toxicol. 5(4):184-91.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. (2012) *A global map of dominant malaria vectors*. Parasit Vectors. 5:69.
- Soreq H and Seidman S (2001) *Acetylcholinesterase — new roles for an old actor*. Nature Reviews Neuroscience 2:294-302.
- Stankiewicz M, Dabrowski M, de Lima ME (2012) *Nervous System of Periplaneta Americana Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View*. J Toxicol. 2012:143740.
- Swale DR, Sun B, Tong F, Bloomquist JR (2014) *Neurotoxicity and mode of action of N, N-diethyl-meta-toluamide (DEET)*. PLoS One. 9(8):e103713.
- Syed Z, Leal WS (2008) *Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET*. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(36):13598-603.
- Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM (2007) *Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons*. Neurotoxicology. 28(4):829-42.
- Thany SH, Courjaret R, Lapied B (2008) *Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2*. Neurosci Lett. 438(3):317-21.
- Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B (2007) *Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors*. Trends Pharmacol Sci. 28(1):14-22.
- Torfs H, Shariatmadari R, Guerrero F, Parmentier M, Poels J, Van Poyer W, Swinnen E, De Loof A, Akerman K, Vanden Broeck J (2000) *Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable Drosophila Schneider 2 cell line*. J Neurochem. 74(5):2182-9.
- Tribut F (1994) *Effet de l'axotomie sur les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des récepteurs cholinergiques des cellules neurosécrétrices : les "Dorsal*

*Unpaired Median" (DUM) neurons du dernier ganglion abdominal de la blatte Periplaneta americana.* Thèse de doctorat de l'Université d'Angers, 240p

- Weill M, Duron O, Labbe P, Berthomieu A, Raymond M, (2003) *La résistance du moustique Culex pipiens aux insecticides.* Medecine Sciences. 19:1190-1192.
- Wen Y, Muir LE, Kay BH (1997) *Response of Culex quinquefasciatus to visual stimuli.* J Am Mosq Control Assoc. 13(2):150-2.
- Wenzel B, Elsner N, Heinrich R (2002) *mAChRs in the grasshopper brain mediate excitation by activation of the AC/PKA and the PLC second-messenger pathways.* J Neurophysiol. 87(2):876-88.
- Wicher D, Schäfer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS (2008) *Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels.* Nature. 452(7190):1007-11.
- Wicher D (2001) *Peptidergic modulation of insect voltage-gated Ca(2+) currents: role of resting Ca(2+) current and protein kinases A and C.* J Neurophysiol. 86(5):2353-62.
- Wicher D, Walther C, Wicher C (2001) *Non-synaptic ion channels in insects--basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles.* Prog Neurobiol. 64(5):431-525.
- Xia Y, Wang G, Buscariollo D, Pitts RJ, Wenger H, Zwiebel LJ (2008) *The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in Anopheles gambiae larvae.* Proc Natl Acad Sci U S A. 105(17):6433-8.
- Xu P, Choo YM, De La Rosa A, Leal WS (2014) *Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate.* Proc Natl Acad Sci U S A. 111(46):16592-7
- Yang W, He K, Zhang J, Guo S (2012) *pH-controlled Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin loading and release from polyelectrolyte microcapsules.* PLoS One. 7(9):e45233.
- Yao TT, Wang LK, Cheng JL, Hu YZ, Zhao JH, Zhu GN (2015) *Optimization of pyrethroid and repellent on fabrics against Stegomyia albopicta (=Aedes albopictus) using a microencapsulation technique.* Med Vet Entomol. 29(1):37-43.

### Sites internet

- Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2013) *Utilisation du téméphos pour la lutte antivectorielle.* <https://www.anses.fr/fr/content/utilisation-du-t%C3%A9m%C3%A9phos-pour-la-lutte-antivectorielle>, consulté le 05/07/2015
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2012) *Anopheles mosquitoes.* <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>, consulté le 10/11/2014
- CNEV, Centre National d'Expertise sur les Vecteurs (2014) *Définition d'un vecteur.* <http://www.cnev.fr/index.php/definition-dun-vecteur>, consulté le 10/11/2014
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control (2013) *Dengue outbreak in*

Madeira, Portugal.

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/dengue-madeira-ECDC-mission-2013.pdf>, consulté le 10/11/14

- EID Atlantique (2014) Le cycle de vie du moustique.  
<http://www.eidatlantique.eu/page.php?P=144>, consulté le 10/11/2014
- Institut Pasteur (2014) Chikungunya.  
<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/chikungunya>, consulté le 10/11/14
- Institut Pasteur (2014) Dengue.  
<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/dengue>, consulté le 10/11/14
- Institut Pasteur (2014) Leishmaniose.  
<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/leishmaniose>, consulté le 10/11/14
- Institut Pasteur (2013) Paludisme.  
<http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/paludisme> consulté le 10/11/14
- Intellectual Ventures Lab (2015) Photonic Fence.  
<http://www.intellectualventureslab.com/work/photonic-fence>, consulté le 05/07/15
- InVS, Institut de Veille Sanitaire (2015) Chikungunya et dengue - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2015.  
<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Chikungunya/Donnees-epidemiologiques/France-metropolitaine/Chikungunya-et-dengue-Donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-France-metropolitaine-en-2015>, consulté le 10/10/15
- InVS, Institut de Veille Sanitaire (2014) Foyer de cas autochtones de chikungunya à Montpellier, septembre-octobre 2014.  
[http://www.invs.sante.fr/beh/2015/13-14/2015\\_13-14\\_2.html](http://www.invs.sante.fr/beh/2015/13-14/2015_13-14_2.html), consulté le 05/07/15
- InVS, Institut de Veille Sanitaire (2012), La surveillance épidémiologique du chikungunya à La Réunion entre 2005 et 2011.  
[http://www.invs.sante.fr/pmb/invs/%28id%29/PMB\\_10885](http://www.invs.sante.fr/pmb/invs/%28id%29/PMB_10885), consulté le 10/11/14
- InVS, Institut de Veille Sanitaire (2008), Paludisme.  
<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Paludisme/Aide-memoire>, consulté le 10/11/14
- InVS, Institut de Veille Sanitaire (2008) BEH, bulletin épidémiologique hebdomadaire n°23-24  
[http://www.invs.sante.fr/beh/2008/23\\_24/beh\\_23\\_24\\_2008.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2008/23_24/beh_23_24_2008.pdf), consulté le 10/10/15
- IRAC, Insecticide Resistance Action Committee (2014) Resistance.  
<http://www.irac-online.org/about/resistance/>, consulté le 10/11/14
- IRD, Institut de la Recherche pour le Développement (2014) Vaincre le paludisme.  
[http://www.suds-en-ligne.ird.fr/Web\\_suds-en-ligne/paludisme/](http://www.suds-en-ligne.ird.fr/Web_suds-en-ligne/paludisme/), consulté le 10/11/14
- Mairie de Saint-Tropez (2015) La démoustication.

<http://www.saint-tropez.fr/fr/Environnement/Lenvironnement%C3%A0Saint-Tropez/D%C3%A9moustication/tabid/620/Default.aspx>, consulté le 05/07/15

- Métropole de Lyon (2015) Lutte contre le moustique tigre.  
<http://www.grandlyon.com/services/lutte-contre-le-moustique-tigre.html>, consulté le 05/07/15
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé (2015) Chikungunya.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/fr/>, consulté le 05/07/15
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé (2015) Dengue et dengue sévère.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/>, consulté le 05/07/15
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé (2015), Paludisme.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>, consulté le 05/07/15
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé (2014), Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/fr/>, consulté le 10/11/14
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé (2010), Fièvre de la vallée du Rift.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/fr/>, consulté le 10/11/14

# Annexe 1





filiale de

LU  
nam

Inserm



## DECLARATION D'INVENTION

N° dossier Interne :

Gestionnaire :

Ayants-droits / références :

Réservé à OUEST VALORISATION

Cette déclaration doit être établie pour toute invention quelles que soient les circonstances et les conditions de protection conformément aux articles R611-1 à 14 du code de la propriété intellectuelle, accessible gratuitement via le service Legifrance : [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr)

Une copie sera transmise par OUEST VALORISATION aux tutelles de(s) unité(s) de recherche concernée(s).

Ce document est composé de trois parties :

- PARTIE A : Contexte de l'invention
- PARTIE B : Description de l'invention
- PARTIE C : Perspectives d'applications

Cette déclaration d'invention signée est le **pré-requis pour l'instruction de tout projet de valorisation** auprès de votre établissement. Ce document pourra être établi avec l'aide de OUEST VALORISATION.

Vous certifiez sur l'honneur l'exactitude de cette déclaration et des documents joints. Vous vous engagez à signaler tous changements modifiant cette déclaration et à en informer le (les) Directeur(s) du(des) Laboratoire(s) (cf. Annexe1 pour formaliser les échanges).

Une fois signé et paraphé par l'ensemble des inventeurs identifiés, ce document doit être adressé à votre correspondant de OUEST VALORISATION et/ou à l'adresse ci-dessous :

OUEST VALORISATION  
Pôle Propriété Intellectuelle  
14 C rue du Pâtis Tatelin  
METROPOLIS 2  
35700 RENNES  
T : 02 99 87 56 10 / 02 99 87 56 01 (standard)  
M : pi@ouest-valorisation.fr

Déclaration d'Invention conforme  
au Référentiel Qualité

- 1 -

Paraphes :

## PARTIE A → CONTEXTE DE L'INVENTION

## A.1) INTITULE DE L'INVENTION

Utilisation d'une association d'un répulsif (l'IR3535) comme agent synergisant et d'un insecticide (néonicotinoïde) pour optimiser l'efficacité du traitement dans la lutte anti-vectorielle tout en diminuant les doses.

## A.2) CLASSIFICATION THEMATIQUE DE L'INVENTION (code LOLF)

- 106 - Sciences de la vie, biotechnologie et santé  
 107 - Mathématiques, sciences et techniques de l'information et de la communication, micro et nanotechnologies  
 108 - Physique chimie et sciences pour l'ingénieur  
 109 - Physique nucléaire et des hautes énergies  
 110 - Sciences de la terre, de l'univers et de l'environnement  
 111 - Sciences de l'homme et de la société  
 112 - Recherche universitaire interdisciplinaire et transversale

## A.3) ORIGINES DE L'INVENTION

- Recherche propre (y compris thèse, master, stagiaire), précisez le cadre: ...

Thèse de doctorat en sciences

- Contrat de recherche.

Si oui, lequel :

- Contrat de collaboration, CIFRE  
 Contrat européen  
 Projet ANR, Région, FUI, ...  
 Contrat d'aide à l'innovation (OSEO)  
 Material Transfert Agreement (MTA)  
 Autres types (ANRT, AFM, ARC, EMBO, LIGUE, MENRT, PREDIT,...) : ....

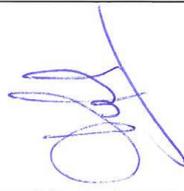
Préciser le nom du projet et/ou les partenaires impliqués (préciser le nom de l'ensemble des inventeurs associés, académiques et industriels, à l'invention) :

**Titre du projet :** Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées

**Co-inventeurs :** Mathilde GOULU, Véronique APAIRE-MARCHAIS, Olivier LIST, Valérie RAYMOND et Bruno LAPIED

## A.4) TABLEAU DES INVENTEURS

Est inventeur toute personne, chercheur, ingénieur, technicien, ayant contribué directement à la conception et/ou à la réalisation de tout ou partie d'une invention. Il doit y avoir un apport inventif personnel à la concrétisation de l'invention. Ne sont pas considérées comme inventeurs les personnes ayant uniquement contribué par des tâches d'exécution. Cette désignation se fait de façon objective, indépendamment de toute autre considération, qu'elle soit honorifique, de présence, hiérarchique ou financière. Ne pas confondre co-inventeur d'une invention et co-auteur d'une publication scientifique.

Nom	Prénom	Nationalité	Statut au moment de l'invention	Coordonnées des inventeurs	Contribution inventive <sup>(3)</sup>	Signature <sup>(4)</sup>
GOULU	Mathilde	Française	Organisme employeur <sup>(1)</sup> : Université d'Angers Laboratoire / Equipe : RCIM UPRES EA 2647/USC INRA 1330 Grade : Docteurante Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Réalisation des expériences in vitro sur neurones d'insectes (électrophysiologie + imagerie calcique) Classement de l'invention <sup>(5)</sup> : Mission <sup>(5a)</sup> <input checked="" type="checkbox"/> Hors Mission <sup>(5b, 5c)</sup> <input type="checkbox"/> si Hors-Mission préciser :	Adresse personnelle <sup>(2)</sup> : 23 rue Bouchetière 49140 Fontaine-Milon Téléphone : 06 76 36 61 94 Courriel : mathilde.goulu@gmail.com N° de sécurité sociale : 2 89 12 49 007 262 47	25%	
APAIRE-MARCHAIS	Véronique	Française	Organisme employeur <sup>(1)</sup> : Université d'Angers Laboratoire / Equipe : RCIM UPRES EA 2647/USC INRA 1330 Grade : Professeur Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : Co-direction de thèse Classement de l'invention <sup>(5)</sup> : Mission <sup>(5a)</sup> <input checked="" type="checkbox"/> Hors Mission <sup>(5b, 5c)</sup> <input type="checkbox"/> si Hors-Mission préciser :	Adresse personnelle <sup>(2)</sup> : 9 rue G. Brassens 49100 Angers Téléphone : 06 62 49 53 52 Courriel : veronique.marchais@univ-angers.fr N° de sécurité sociale : 2 65 06 36 044 082	25%	

(1) Merci de vous référer à votre bulletin de salaire

(2) Indiquer une adresse « stable », notamment pour les personnels non-statutaires (ex : adresse des parents)

(3) Pourcentage de contribution à l'invention (information obligatoire pour les inventeurs académiques)

(4) Faire signer au minimum l'ensemble des inventeurs académiques (incluant stagiaires, ...)

(5) Invention de mission (a) : Invention obtenue par un salarié (public ou privé) dans l'exécution soit d'un contrat de travail comportant une mission inventive qui correspond à ses fonctions effectives, soit d'études et de recherches qui lui sont explicitement confiées.  
Invention hors mission :



BL VAN RIG  
VR OC

- *Invention hors mission attribuable (b) : Invention obtenue par un salarié en dehors du cas (a), mais en utilisant des moyens, connaissances ou données de l'employeur ; OU invention tombant dans le domaine d'activités de l'employeur.*
- *Invention hors mission non attribuable (c) : Invention obtenue ni dans le cas (a) ni dans le cas (b).*

CONFIDENTIEL

Paraphes: BL VAN MG  
VR OC

Nom	Prénom	Nationalité	Statut au moment de l'invention	Coordonnées des inventeurs	Contribution inventive <sup>(3)</sup>	Signature <sup>(4)</sup>
LIST	Olivier	Française	Organisme employeur <sup>(1)</sup> : Université d'Angers Laboratoire /Equipe : RCIM UPRES EA 2647/JSC INRA 1330 Grade : Assistant Ingénieur	Adresse personnelle <sup>(2)</sup> : 80 rue de la chataigneraie, 49080 Bouchemaine Téléphone : 09 81 08 05 58 Courriel : olivier.list@univ-angers.fr N° sécurité sociale : 1 80 06 57 631 096 05	10%	
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : <b>Encadrement des expériences en électrophysiologie sur neurones d'insectes in vitro</b> Classement de l'invention <sup>(5)</sup> : Mission <sup>(5a)</sup> <input checked="" type="checkbox"/> Hors Mission <sup>(5b, 5c)</sup> <input type="checkbox"/> si Hors-Mission préciser :						
RAYMOND	Valérie	Française	Organisme employeur <sup>(1)</sup> : Université d'Angers Laboratoire /Equipe : RCIM UPRES EA 2647/JSC INRA 1330 Grade : Professeur	Adresse personnelle <sup>(2)</sup> : 7 impasse de la Bayotière 49080 Bouchemaine Téléphone : 06 99 40 95 62 Courriel : valerie.raymond@univ-angers.fr N° sécurité sociale : 2 74 10 49 125 032	10%	
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : <b>Aide à l'organisation des protocoles expérimentaux</b> Classement de l'invention <sup>(5)</sup> : Mission <sup>(5a)</sup> <input checked="" type="checkbox"/> Hors Mission <sup>(5b, 5c)</sup> <input type="checkbox"/> si Hors-Mission préciser :						
LAPIED	Bruno	Française	Organisme employeur <sup>(1)</sup> : Université d'Angers Laboratoire /Equipe : RCIM UPRES EA 2647/JSC INRA 1330 Grade : Professeur	Adresse personnelle <sup>(2)</sup> : 23 rue des Terras 49100 Angers Téléphone : 06 72 70 08 95 Courriel : bruno.lapied@univ-angers.fr N° sécurité sociale : 1 61 08 75 120 161	30%	
Contribution de l'inventeur à l'invention (succinctement) : <b>Direction de thèse</b> Classement de l'invention <sup>(5)</sup> : Mission <sup>(5a)</sup> <input checked="" type="checkbox"/> Hors Mission <sup>(5b, 5c)</sup> <input type="checkbox"/> si Hors-Mission préciser :						

Paraphes : **BL VAN OL TIG**  
**VR.**

CONFIDENTIEL

Paraphes: BL VAN TG  
UR OL

# Annexe 2



## RESEARCH ARTICLE

# The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects *via* Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases

Aly Abd-Ella<sup>1,7</sup>, Maria Stankiewicz<sup>2</sup>, Karolina Mikulska<sup>3</sup>, Wieslaw Nowak<sup>3</sup>, Cédric Pennetier<sup>4</sup>, Mathilde Goulu<sup>1</sup>, Carole Fruchart-Gaillard<sup>5</sup>, Patricia Licznar<sup>1</sup>, Véronique Apaire-Marchais<sup>1</sup>, Olivier List<sup>1</sup>, Vincent Corber<sup>4,6</sup>, Denis Servent<sup>8</sup>, Bruno Lapied<sup>1\*</sup>


 OPEN ACCESS

**Citation:** Abd-Ella A, Stankiewicz M, Mikulska K, Nowak W, Pennetier C, Goulu M, et al. (2015) The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects *via* Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases. PLoS ONE 10(5): e0126406. doi:10.1371/journal.pone.0126406

**Academic Editor:** Israel Silman, Weizmann Institute of Science, ISRAEL

**Received:** December 16, 2014

**Accepted:** April 1, 2015

**Published:** May 11, 2015

**Copyright:** © 2015 Abd-Ella et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** A.A. was supported by the Egyptian government grant. M.G. was supported by a doctoral fellowship from the Direction Générale de l'Armement—Ministère de la Défense and from the Région Pays de la Loire.

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

**1** Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM) UPRES EA 2647/USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, Université d'Angers, UFR SCIENCES, Angers cedex, France, **2** Faculty of Biology and Environment Protection, N. Copernicus University, Torun, Poland, **3** Institute of Physics, Faculty of Physics, Astronomy and Informatics, N. Copernicus University, Torun, Poland, **4** Institut de Recherche pour le Développement, UMR 224 Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Montpellier, France, **5** CEA, IBI/TecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Laboratoire de Toxicologie Moléculaire et Biotechnologie, Gif sur Yvette, France, **6** Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand, **7** Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, Egypt

\* [bruno.lapied@univ-angers.fr](mailto:bruno.lapied@univ-angers.fr)

## Abstract

Insect vector-borne diseases remain one of the principal causes of human mortality. In addition to conventional measures of insect control, repellents continue to be the mainstay for personal protection. Because of the increasing pyrethroid-resistant mosquito populations, alternative strategies to reconstitute pyrethroid repellency and knock-down effects have been proposed by mixing the repellent DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide) with non-pyrethroid insecticide to better control resistant insect vector-borne diseases. By using electrophysiological, biochemical, *in vivo* toxicological techniques together with calcium imaging, binding studies and *in silico* docking, we have shown that DEET, at low concentrations, interacts with high affinity with insect M1/M3 mAChR allosteric site potentiating agonist effects on mAChRs coupled to phospholipase C second messenger pathway. This increases the anticholinesterase activity of the carbamate propoxur through calcium-dependent regulation of acetylcholinesterase. At high concentrations, DEET interacts with low affinity on distinct M1/M3 mAChR site, counteracting the potentiation. Similar dose-dependent dual effects of DEET have also been observed at synaptic mAChR level. Additionally, binding and *in silico* docking studies performed on human M1 and M3 mAChR subtypes indicate that DEET only displays a low affinity antagonist profile on these M1/M3 mAChRs. These results reveal a selective high affinity positive allosteric site for DEET in insect mAChRs. Finally, bioassays conducted on *Aedes aegypti* confirm the synergistic interaction between DEET and propoxur observed *in vitro*, resulting in a higher mortality of

mosquitoes. Our findings reveal an unusual allosterically potentiating action of the repellent DEET, which involves a selective site in insect. These results open exciting research areas in public health particularly in the control of the pyrethroid-resistant insect-vector borne diseases. Mixing low doses of DEET and a non-pyrethroid insecticide will lead to improvement in the efficiency treatments thus reducing both the concentration of active ingredients and side effects for non-target organisms. The discovery of this insect specific site may pave the way for the development of new strategies essential in the management of chemical use against resistant mosquitoes.

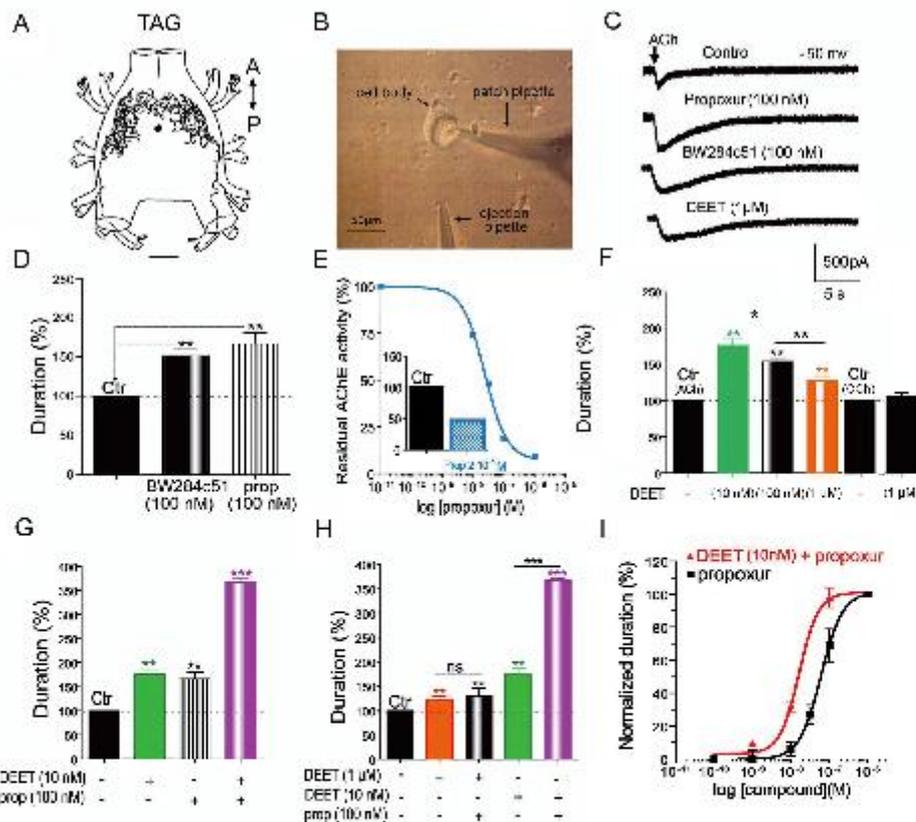
## Introduction

In recent years, because of the increasing pyrethroid-resistant mosquito populations [1,2], repellents and particularly DEET, considered as the standard product against mosquitoes, have gained increasing interest in public health for protecting people. Previous data have indicated that DEET displays a complex broad-spectrum action. It affects various types of insect sensory receptor neurons [3–12] such as olfactory receptor neurons, odorant receptors, and gustatory receptor neurons conditioning insect avoidance behavior and it alters fine-tuning of functionally olfactory receptor neurons. Additionally, it has been reported that DEET is not only a behaviour-modifying agent. It blocks, at peripheral nervous system level, insect neuromuscular junction and affects central octopaminergic synapses to induce neuroexcitation and toxicity [13]. Furthermore, DEET is also considered as a reversible inhibitor of insect acetylcholinesterase (AChE), an enzyme involved in the rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine at cholinergic synapses in the central nervous system and is able to strengthen the toxicity of anticholinesterase insecticides such as carbamates [14]. According to these data, alternative strategies to reconstitute pyrethroid repellency and knock-down effects have been proposed by mixing DEET with non-pyrethroid insecticide to better control resistant insect vector-borne diseases [15–17]. However, except few findings, which report that cytochrome-P450 monooxygenases are responsible for the enhanced toxicity observed between DEET and the carbamate propoxur in mosquitoes *Aedes aegypti* [18], the underlying cellular mechanisms involved in the synergism remain unknown. In the cockroaches *Periplaneta americana* central nervous system, pacemaker neurosecretory cells, named the Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons [19,20] are known neuronal model used for electro-pharmacological studies [21]. Because adult DUM neuron cell bodies express different cholinergic receptors including nAChR resistant to  $\alpha$ -bungarotoxin, muscarinic AChR subtypes (mAChR) and AChR with "mixed" nicotinic-muscarinic pharmacology activated by ACh, which is regulated by AChE [22–24], they represent a suitable cellular model to investigate the mode of action of both repellents and insecticides on the insect cholinergic system. Consequently, the following study has been designed to bring new insights on the neurophysiological action of DEET and to identify new molecular targets underlying the synergistic effect.

## Results and Discussion

### Positive interaction between DEET and propoxur

DUM neuron cell bodies (Fig 1A and 1B) display membrane potential properties regulated by the activation of cholinergic receptors [22–24] (S1A Fig). We first demonstrated the contribution of AChE in modulating the ACh response in DUM neurons with the selective AChE



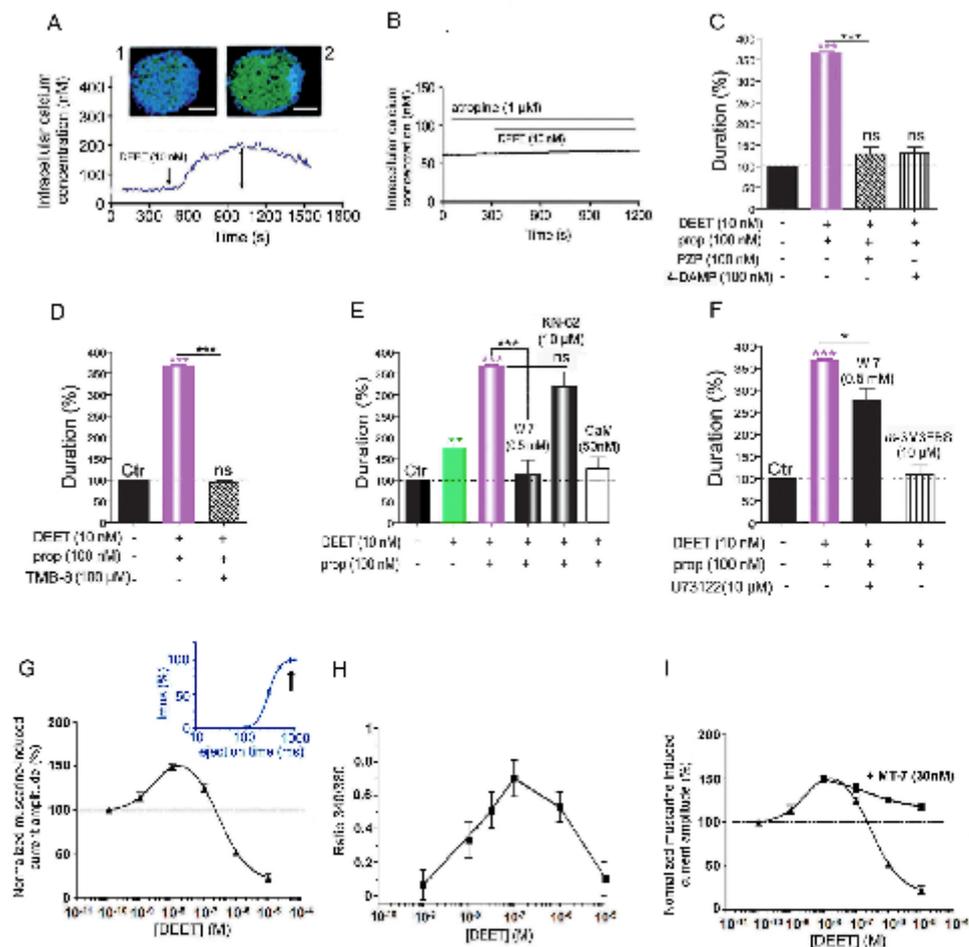
**Fig 1. DEET potentiates the carbamate-induced anticholinesterase effect in insect DUM neurons.** A) Dorsal view camera lucida drawing of typical DUM neuron morphology revealed by anterograde cobalt staining performed on a soma located along the midline of the cockroach terminal abdominal ganglion (TAG) of the nerve cord. A, anterior; P, posterior; scale bar 120  $\mu$ m. B) Light micrograph of the whole cell patch-clamp technique adapted on the isolated DUM neuron cell body obtained after enzymatic digestion and mechanical dissociation of the TAG. C) Anticholinesterase effects of the carbamate, propoxur, the anticholinesterase compound BW284c51 and the repellent DEET on the duration of the ACh-induced inward currents (measured at 50% of the maximum current amplitudes) obtained in whole-cell voltage-clamp at a steady-state holding potential of -50 mV. D) Comparative bar graph summarizing the anticholinesterase effect of the specific inhibitor BW284c51 (100nM) and the carbamate, propoxur (prop) (100nM) measured on the duration of the ACh-induced inward currents (measured at 50% of the maximum current amplitudes) obtained in whole-cell voltage-clamp at a steady-state holding potential of -50 mV. E) Concentration-dependent inhibition of the residual AChE activity determined spectrophotometrically induced by propoxur and expressed as percentage of initial activity (i.e., without propoxur). The curve represents the best fit to the data points according to the Hill equation yielding the corresponding  $IC_{50}$  (i.e., the concentration of propoxur that produces 50% inhibition of the AChE enzymatic activity) as illustrated in the comparative bar graph shown in inset. This indicates that isolated DUM neurons express functional AChE. F) Bar graph summarizing the unexpected concentration-dependent effect of DEET on the ACh-induced inward current duration. At low concentration (10nM), DEET produces a more important anticholinesterase effect than those observed with higher concentrations (i.e., 100nM and 1 $\mu$ M). By contrast, DEET (1 $\mu$ M) do not produce any effect on the carbamylcholine (CCh)-induced current. G) Comparative bar graph illustrating the anticholinesterase effects of DEET (10nM) and propoxur (100nM) tested alone and in combination (DEET/propoxur). Pretreatment of DUM neuron with low concentration of DEET (10nM), for 15 minutes, strongly potentiates the propoxur-induced anticholinesterase effect. H) Comparative bar graph showing that synergistic effect between DEET and propoxur is only observed at low concentration of DEET (i.e., 10nM) and not with higher concentration (i.e., 1 $\mu$ M). I) Semi-logarithmic concentration-response curves for the anticholinesterase effect induced by propoxur applied alone and in the presence of 10nM DEET. The sigmoid curves represent the best fit to the mean data points according to the Hill equation yielding the corresponding  $IC_{50}$  of  $2.10^{-6}$ M and  $6.10^{-6}$ M estimated for DEET and propoxur applied in combination and for propoxur applied alone,

respectively. Number of experiments varies from 10 to 16 cells. Data are means  $\pm$  S.E.M. \*\* and \*\*\*, values significantly different,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively; ns, not significant ( $p > 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0126406.g001

inhibitor, BW284c51 [25] (100nM) and propoxur (100nM), an anticholinesterase carbamate insecticide. In both cases, the toxic activity resulted in an increase of the duration of the ACh-induced current (measured at 50% of the full current amplitude) obtained at a steady-state holding potential of -50 mV, following pneumatic pressure application of ACh (Fig 1B–1D). This indicates that inhibition of ACh hydrolysis prolongs the effect of ACh. Expression of AChE in DUM neurons was confirmed biochemically by measuring AChE enzymatic activity in the presence of propoxur. The carbamate inhibited, in a concentration-dependent manner, the AChE enzymatic activity yielding an  $IC_{50}$  value of  $2.10^{-8}$ M (Fig 1E). These results reveal that isolated DUM neuron cell bodies express membrane-bound AChE. Electrophysiological experiments performed with the repellent DEET (1 $\mu$ M), indicated that it produced an anticholinesterase effect, as previously observed at synaptic level [14]. It should be indicated that the current mediated by carbamylcholine (CCh), a non-hydrolysable cholinergic agonist was not modified in the presence of 1 $\mu$ M DEET (Fig 1F). The anticholinesterase effect of DEET occurred in an unusual concentration-dependent manner. Very low concentration (10nM) produced a stronger effect on the ACh-induced current duration than that of induced by 1 $\mu$ M (Fig 1F). Furthermore, pre-treatment with DEET (1 $\mu$ M) or propoxur (100nM), applied alone prevented any additional anticholinesterase effects of DEET/propoxur mixture (S1B and S1C Fig). Interestingly, co-application of lower concentration of DEET (10nM) with propoxur (100nM) on DUM neurons pre-treated with DEET (10nM) resulted in a strong synergistic anticholinesterase effect of propoxur (Fig 1G) never observed with higher concentration of DEET (1 $\mu$ M; Fig 1H). Propoxur effects alone and in the presence of 10nM DEET were also measured more quantitatively in DUM neurons. Mean values for percentage of ACh-induced current durations were plotted against the logarithm of the non-cumulative concentration of propoxur. The sigmoid curve, corresponding to the best fit (correlation coefficient  $r = 0.998$ ) according to the Hill equation, gave an  $IC_{50}$  value for propoxur alone of  $6.10^{-8}$ M (Fig 1I). In the presence of DEET (10nM), we observed a significant shift to the left in a parallel manner of the curve of propoxur ( $IC_{50}$  DEET/propoxur  $2.10^{-8}$ M; Fig 1I). Pre-treatment with low concentration of DEET renders AChE more sensitive to the carbamate propoxur.

It is known that calcium-dependent phosphorylation/dephosphorylation process modulates sensitivity of targets to insecticides [26–30]. To determine whether the DEET-induced potentiation effect was mediated through calcium mobilization, calcium imaging experiments were performed on Fura2-loaded DUM neurons (Fig 2A). Bath application of DEET (10nM) produced a relatively slow elevation of intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). The cytofluorescence intensity was first detected in the middle part of the cell whereas there was no fluorescence detected at the cell body periphery (inset 2; Fig 2A). This illustrates that calcium rise mostly involved calcium from intracellular stores. Because i) experiments were performed in the presence of  $\alpha$ -bungarotoxin to inhibit "mixed" AChR and ii) DUM neuron mAChRs are not permeable to calcium [22–24], the involvement of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) was suspected. This was confirmed by using atropine (1 $\mu$ M), a specific mAChR antagonist, which completely blocked the calcium rise induced by 10nM DEET (Fig 2B). It should be mentioned that high extracellular potassium concentration, known to depolarize DUM neurons, still increased  $[Ca^{2+}]_i$  in the presence of 1 $\mu$ M atropine (not shown). It is also interesting to mention that calcium spark-like events were detected in isolated DUM neuron under control conditions (inset 1; Fig 2A). These events, which completely disappeared in the presence of 1 $\mu$ M atropine suggest that DUM neurons display active ACh-activated mAChRs present in the



**Fig2. Synergism between DEET and propoxur occurs through a positive allosteric-like modulation of insect M1/M3 muscarinic receptors and intracellular calcium-dependent signaling pathways.** A) Bath application of 10nM DEET increases intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in *Fus-2* loaded DUM neurons (inset 2). Note that, under control condition, calcium spark-like events are detected (inset 1). B) Pretreatment with 1 $\mu$ M atropine, a specific antagonist of muscarinic receptors (mAChRs), completely blocks the enhancement of  $[Ca^{2+}]_i$  produced by 10nM DEET, indicating the involvement of mAChRs. C) Bar graph summarizing the inhibitory effect of M1 and M3 mAChR antagonists pirenzepine (PZP) and 4-DAMP, respectively, on the synergism between DEET and propoxur. D) Bar graph illustrating that TMB-8 (100 $\mu$ M) also completely blocks the synergism between DEET and propoxur. E,F) Characterization of the intracellular calcium-dependent molecular events involved in the synergistic action of DEET on the propoxur-induced anticholinesterase effect. Intracellular application of 0.5mM W7, the calmodulin inhibitor and 50nM calmodulin (CaM) inhibit the positive potentiating effect of DEET on the toxic activity of propoxur. By contrast, KN-62 (10 $\mu$ M), which binds to CaM kinase II and blocks its activation by calmodulin, does not produce any effect (E). If pretreatment with 10 $\mu$ M of U73122, an inhibitor of PI-PLC known to regulate AChE activity, partially counteracts the effect of 0.5mM W7, application of the PI/PLC activator, m-3M3FBS (10 $\mu$ M) produces similar inhibition of the synergism between DEET and propoxur to that of observed with W7 tested alone (F). G) Modulation of the maximum amplitude of muscarine-elicited currents versus the concentration of DEET applied. The limited window of DEET concentration within which a maximum response potentiating effect is observed, is around 10nM (G). For higher DEET concentrations, the sensitizing effect is counteracted and eventually outweighed by an inhibitory action of DEET. Inset illustrates the semi-logarithmic dose-response curve for the muscarine-induced current applied by pressure ejection. Arrow indicates that the maximum current amplitude is obtained for pressure ejection duration of

500 ms. H) DEET induces a transient concentration-dependent  $[Ca^{2+}]_i$  rise in Fura-2-loaded DUM neuron cell bodies. The changes in  $[Ca^{2+}]_i$  response amplitudes and the window of concentrations for DEET action were very similar with those illustrated in 2G. I) Bath application of MT-7 (30 nM), which is known to bind on M1 mAChR allosteric site, partially reversed the inhibitory effect observed for high concentration of DEET. Number of experiments varies from 8 to 13 cells. Data are means  $\pm$  S.E.M. \*, \*\* and \*\*\*, values significantly different,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. ns, not significant ( $p > 0.05$ ). Scale bar: 20  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0126406.g002

membrane vicinity that contribute to regulate electrical activity. The use of more selective M1/M3 mAChR antagonists, pirenzepine (100 nM) and 4-DAMP (100 nM) inhibited the synergy between DEET and propoxur (Fig 2C). Furthermore, the antagonists only reduced the effects of DEET on the ACh-induced current duration (10 nM) but not those induced by propoxur (S2A and S2B Fig), suggesting a possible effect of DEET *via* mAChRs.

### Synergism between DEET and propoxur occurs *via* mAChRs

M1/M3 mAChRs are known to be mainly coupled to phospholipase C (PLC) second messenger pathway. To examine if the synergistic effect of DEET was related to the downstream activation of inositol triphosphate (IP3) receptors which thereby increase  $[Ca^{2+}]_i$ , TMB-8 (100  $\mu$ M), an IP3 receptor antagonist, was tested. TMB-8 inhibited the DEET-induced potentiating effect (Fig 2D), confirming the role of calcium released from internal stores. The influence of  $[Ca^{2+}]_i$  was confirmed with caffeine, known to stimulate the release of calcium from internal stores and BAPTA, a fast efficient calcium chelator. If caffeine (10 mM) mimicked the effect of DEET by increasing the anticholinesterase action of propoxur, BAPTA (10 mM) decreased the effect of carbamate (S2C Fig). These results together with those relating that DEET, even in the presence of pirenzepine, potentiate the effect of propoxur when relatively high calcium was introduced into the DUM neuron through the patch pipette (no EGTA, S2D Fig) argue in favor of the regulatory role of intracellular calcium on AChE sensitivity, modulating the potentiated effect of propoxur.

We next focused our study on the characterization of the calcium-dependent events involved in the regulation of AChE sensitivity to propoxur, following changes in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by low concentration of DEET. In insect, calcium acting through the calcium-receptor protein calmodulin (CaM) is an important signal that regulates diverse enzymatic activities [24]. The possible regulatory role of the calcium/CaM complex in the AChE sensitivity to propoxur was examined using the calmodulin inhibitor W7 (0.5 mM). W7 completely suppressed the potentiation previously observed (Fig 2E). KN-62 (10  $\mu$ M), known to block CaM-kinase II activated by the calcium/CaM complex in DUM neurons [26,27,29] did not produce any effect on the DEET-induced potentiation (Fig 2E). Thus, it seems that calcium/CaM complex indirectly regulates AChE sensitivity. This hypothesis is reinforced by recent knowledge about the molecular architecture of AChE [31]. AChEs exist in multiple molecular forms reflecting differences in their mode of attachment to cellular membranes. In insects, the mode of attachment is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. This GPI anchor, covalently attached to the hydrophobic domain of the AChE C-terminus, could be sensitive to the action of phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC) [32], an enzyme which is regulated by a calcium-dependent mechanism. Additional experiments were carried out with U73122 and *m*-3M3FBS, the specific inhibitor and activator of phospholipase C, respectively [33]. Application of 10  $\mu$ M *m*-3M3FBS inhibited the synergy between DEET and propoxur (Fig 2F). Moreover, in the presence of 10  $\mu$ M U73122, it was possible to counteract the inhibition produced by intracellular application of W7 (0.5 mM), which blocked the synergism (Fig 2E and 2F). This indicates that DEET-induced intracellular calcium rise regulates negatively PI-PLC through the calcium/CaM complex formation rendering AChE more sensitive to propoxur. By contrast, the absence

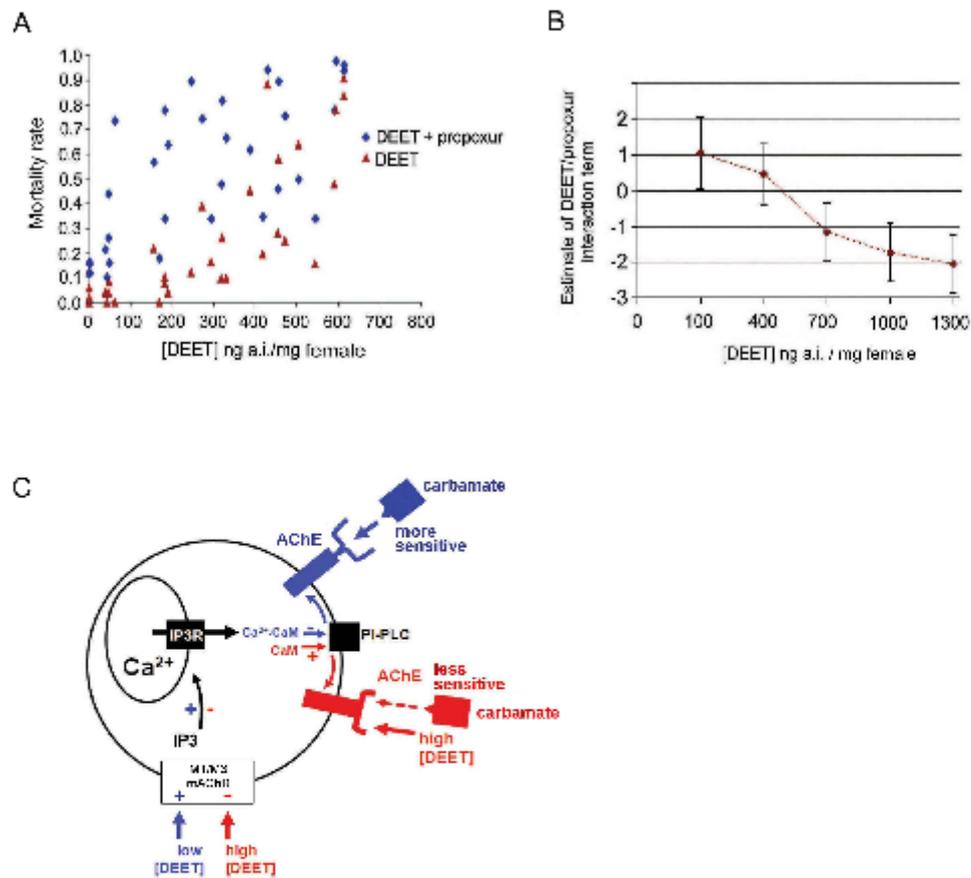
of significant intracellular calcium elevation observed with high concentration of DEET (e.g., Fig 2H) could result in a constitutive positive modulation of PI-PLC by CaM alone, inducing a less sensitive AChE to the carbamate. This was confirmed by applying intracellularly excess calmodulin (50nM), which strongly reduced the synergism (Fig 2E). This opposite dual effect depending on the concentration, leads us to consider DEET as a positive and/or negative modulator for insect M1/M3 mAChRs, depending on the concentration used.

To test this hypothesis, we performed experiments using pressure ejection application of muscarine. The average muscarine-induced inward current amplitudes were plotted versus different concentrations of DEET. The biphasic concentration-response curve (Fig 2G) indicated that the sensitizing effect of DEET on the muscarinic response was produced in a limited window of concentrations, which began at  $10^{-9}$ M and extended to about  $10^{-8}$ M. In this case, the DEET-induced potentiation of the current amplitude was not due to a direct effect on M1/M3 mAChR orthosteric site since muscarine applied by 500ms pressure ejection in duration resulted in full saturation of the receptors (inset Fig 2G). Beginning after  $10^{-8}$ M, the sensitizing effect was counteracted and outweighed by an inhibitory action of DEET. Interestingly, similar bell-shaped relationship was observed by measuring M1/M3 mAChR-induced  $[Ca^{2+}]_i$  variations in the presence of different concentrations of DEET (Fig 2H). From these results, we then propose that DEET, at low concentrations, may act as a positive allosteric modulator of the muscarine action on mAChRs. Because DEET used at high concentrations exerted an inhibitory action (Fig 2G and 2H), we postulated that DEET may interact with a distinct low affinity site on M1/M3 mAChR.

We then examined the effect of the Muscarinic Toxin 7 (MT-7), known to bind specifically with the allosteric site of the M1 mAChR [34]. Pretreatment of isolated DUM neuron with 30nM MT-7 counteracted the effect of DEET only for concentrations higher than  $10^{-8}$ M, corresponding to the inhibitory action of the repellent on M1/M3 mAChRs (Fig 2I). MT-7 interaction blocks selectively the accessibility of DEET to its low affinity interaction site without affecting its binding to the high affinity site. Taken together, our results suggest that DEET, at low concentrations, induces a positive allosteric effect of muscarinic agonist function on insect M1/M3 mAChRs. This produces  $[Ca^{2+}]_i$  rise and the calcium/CaM complex formation. At high concentrations, DEET produces opposite effects by interacting with a low affinity site. This unusual concentration-dependent dual opposite effects of DEET was also observed, at synaptic level, on postsynaptic mAChRs known to be involved in the modulation of integrative properties of the giant interneurons [35]. Using the single oil-gap technique (S3A Fig), it is possible to record unitary excitatory postsynaptic potential (S3B Fig) resulting from the activity of presynaptic cercal mechanoreceptors [36] and to measure the postsynaptic membrane potential [35,36] (S3C Fig). Bath application of low concentrations of DEET (100nM and 500nM) produced a concentration-dependent slow postsynaptic membrane depolarization completely blocked by 1 $\mu$ M atropine, whereas higher concentrations (10 $\mu$ M), produced an inhibitory action (S3C and S3D Fig).

### Synergy between DEET and propoxur against *Ae. Aegypti*

To investigate the interaction between DEET and propoxur *in vivo*, we made topical applications of increasing doses of DEET on the thorax of female *Ae. aegypti* in the presence/absence of propoxur used at LD<sub>10</sub> (the lethal dose for 10% of exposed mosquitoes). The mortality rates of *Ae. aegypti* relative to the increasing concentrations of DEET applied alone and combined with propoxur at LD<sub>10</sub> (Fig 3A) were compared. The variation of the estimate of the DEET/propoxur interaction term in our general linear model (S1 Table) relative to the applied doses of DEET (Fig 3B) indicated that when the interaction term was significantly above 0 the



**Fig 3. Synergism between DEET and propoxur is effective *in vivo*, in female mosquitoes *Aedes aegypti*.** A) Mortality rates relative to the increasing concentrations of DEET (ng of active ingredient (a.i.) / mg female) applied on the thorax of females *Aedes aegypti* in the presence/absence of propoxur (red triangles represent the mortality rates induced by increasing doses of DEET alone and blue diamonds represented the increase of mortality rates when increasing doses of DEET were combined with propoxur at LD<sub>50</sub>). B) Variation of the estimate of DEET/propoxur interaction term in our general linear model relative to the applied doses of DEET. When the interaction term is significantly above 0 (non overlapping of 95%CI), the interaction between DEET and propoxur is synergistic; when the interaction term is significantly below 0, the interaction is antagonistic. C) Proposed model summarizing the essential components of the intracellular signaling pathway that may explain the synergism between DEET and propoxur in insect cell (see text for details). AChE, acetylcholinesterase; CaM, calmodulin; PI-PLC, phosphatidylinositol (PI)-specific phospholipase C; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; IP3R, receptor; mAChR, muscarinic ACh receptor.

doi:10.1371/journal.pone.0126406.g003

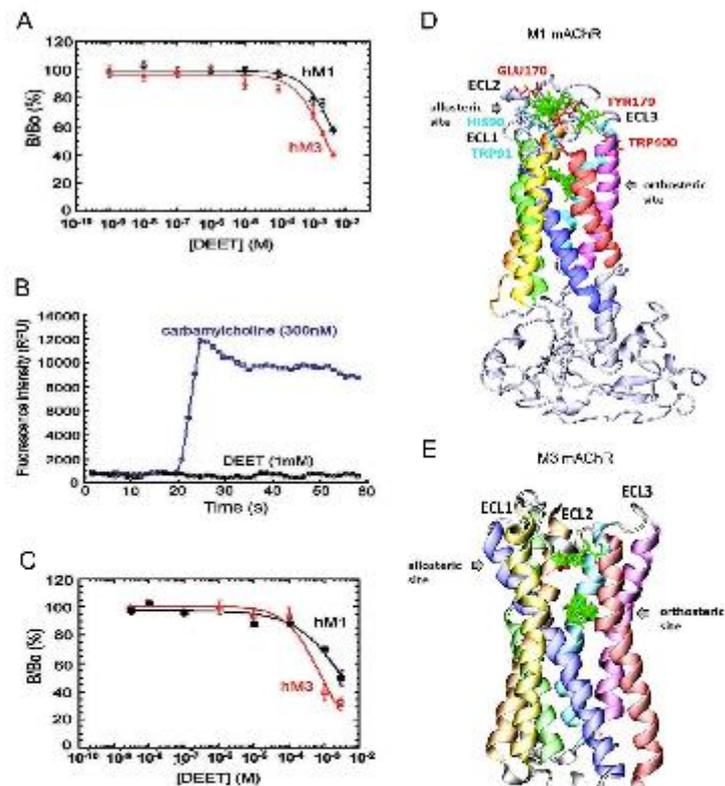
interaction between DEET and propoxur was synergistic. By contrast, when the interaction term was significantly below 0, the interaction was considered as antagonistic. These results, which correlated well with the *in vitro* studies, confirm that interaction between DEET and propoxur switches from antagonism to synergism with low doses of DEET, resulting in a significant increase of the mortality rate of *Ae. aegypti*.

### DEET and mammalian mAChRs

We then asked whether DEET could affect human M1 and M3 mAChRs. Binding experiments performed on CHO cells stably expressing human M1 and M3 mAChRs showed that DEET displaced the [<sup>3</sup>H]N-Methyl Scopolamine (NMS) binding from M1 and M3 mAChRs but only in the millimolar range. Even if the complete competition binding curves could not be obtained, due to the maximal DMSO percentage tolerated in the assay, the affinity constant of the DEET for the two receptors could be calculated according to the Cheng & Prusoff equation and was equal to  $0.69 \pm 0.19$  mM and  $0.37 \pm 0.02$  mM for the M1 and M3 mAChRs, respectively (Fig 4A). To better characterize the DEET-mAChR interactions, its effect was also evaluated by measuring changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . First, the effect of increasing concentrations of DEET (nM to mM) was evaluated directly on the cells and the signal was compared to control condition obtained with the cholinergic agonist CCh (300nM). As observed (Fig 4B), for the M1 receptor and also observed on M3 receptor (data not shown), addition of relatively high concentration of DEET (1mM) did not induce intracellular calcium release as it is the case for CCh. Thus, DEET, used at high concentration, was not considered as an agonist of both receptor subtypes. Pre-incubation of the cells with increasing concentrations of DEET abolished, in a dose-dependent manner, the CCh-induced activation of both M1 and M3 mAChRs (Fig 4C). The antagonist potency of DEET on both mAChRs was estimated to be  $3 \pm 1$  mM and  $0.7 \pm 0.2$  mM, in good agreement with the affinity determined in binding experiments. These results indicate that DEET, only displays a low affinity antagonist profile on human M1 and M3 mAChR in a relatively high concentration range. But the most interesting feature is that we have never observed a positive modulation of these mAChRs function at low concentrations of DEET (Fig 4A–4C), suggesting the existence of a selective high affinity positive allosteric site for DEET in insects.

We next carried out experiments by studying the binding site of DEET in human M1 mAChR. Recently, M2 and M3 mAChR structures were published [37,38]. However no crystallographic structure of human M1 mAChR subtype is available yet. MambStruk computational method to predict M1 mAChR structure and the HierDock method were initially used to determine the binding sites of a series of M1 mAChR agonists and antagonists [39]. Recently, it was possible to construct another 3D model of M1 mAChR through the fragmental homology modeling procedure [40]. A model of a dimeric human M1 mAChR, which binds the MT-7 toxin was also developed [41] and very recently, allosteric modulation was studied using homology model of M1 mAChR based on human  $\beta_2$  adrenoceptor [42].

Despite different approaches used in modeling strategies, we may conclude that the fold and transmembrane (TM) helices arrangements of all the discussed M1 mAChR structures were similar. Here, the AutoDock 4.2 code was used to determine plausible DEET binding sites in M1 and M3 mACh receptors [43,44]. Because our *in silico* docking of ACh molecule led to the same pose as reported earlier, we performed, for the first time, *in silico* docking of DEET to M1 mAChR model (Fig 4D) using the same methodology. A cluster of poses (from the range #30–#120) was identified in the vicinity of the extracellular loops ECL2 (Figs 4D and 5B) having binding energies (from -4.12 to -3.47 kcal/mol). These poses were grouped into three binding regions located between ends of TM1-TM2, TM4-TM5 and TM5-TM6 helices. Since this area, particularly the TM4-TM5 region, was close to the region identified as the MT-7 neurotoxin site in M1 mAChR [41] outlined by residues GLU170, TYR179, HIS90, and TRP91, we hypothesized that this could be part of high affinity allosteric M1 mAChR site, located extracellularly (Figs 4D and 5B). Alternatively, *in silico* docking place was located on a second site close to the ACh site from the extracellular side. The amino acids building the DEET binding pocket

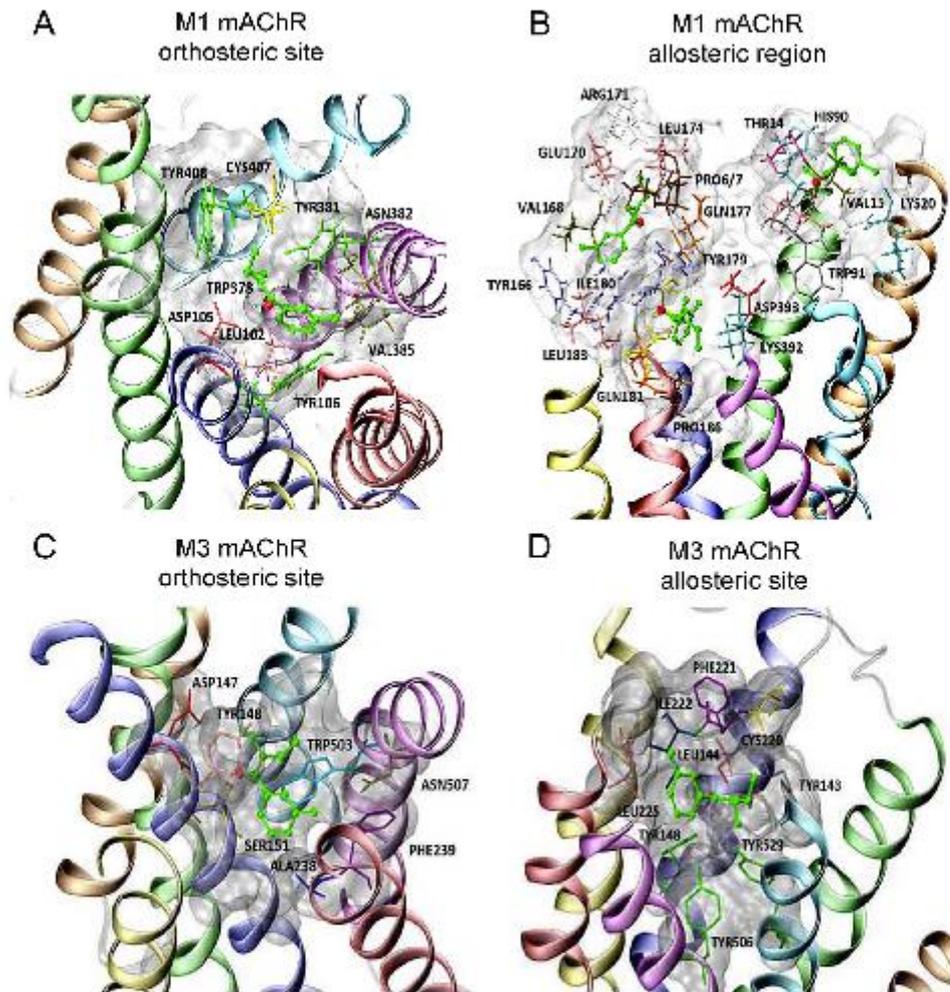


**Fig 4. DEET interacts with mammalian M1 and M3 muscarinic receptors.** The functional properties of DEET are investigated using CHO cells expressing human M1 (hM1) and M3 (hM3) mAChR subtypes. A) Dose-dependent inhibition of [ $^3$ H]-NMS binding to M1 and M3 human muscarinic ACh receptor (mAChR) subtypes by DEET. The results are expressed as the ratio of the specific [ $^3$ H]-NMS binding measured with (B) or without DEET (Bo). B-C) Signals acquired for calcium fluorescence after the addition at 20 sec of carbamylcholine (CCh) (300nM) and DEET (1mM) on CHO-hM1 cells ( $n=3$ ). DEET inhibition of the  $Ca^{2+}$  mobilization after pretreatment of the cells with increasing concentrations of DEET (3nM to 3mM), followed by a sub-maximal concentration of CCh (100 nM) (C). D-E) *In silico* Docking of DEET into human M1 and rat M3 mAChRs. The two binding regions (allosteric and orthosteric sites) of DEET molecules (green) in human M1 mAChR are represented (D). In red are shown residues of a M1 mAChR monomer interacting with MT-7 loops previously identified. Analogous interaction residues from the second M1 mAChR monomer are indicated in blue (D) close to the hypothetical M1 mAChR allosteric site occupied by DEET. The *in silico* docking results to rat M3 mAChR crystal structure 4DAJ (E) also show that DEET binds on two distinct sites (allosteric and orthosteric sites). Ten DEET poses from each group located in both sites are shown in green. The following colour coding for transmembrane helices used: TM1—orange, TM2—green, TM3—dark blue, TM4—yellow, TM5—red, TM6—magenta, TM7—light blue. ECL, extracellular loop.

doi:10.1371/journal.pone.0126406.g004

(orthosteric site) were indicated (Figs 4D and 5A). The detailed distances between DEET molecules docked and M1 mAChR residues were presented, (S2 Table).

The *in silico* docking of DEET to the rat M3 crystallographic structure (pdb code 4DAJ) gave similar results (Fig 4E). The majority of DEET poses were located in the orthosteric site (Fig 5C),



**Fig 5. Orthosteric and allosteric binding sites of mammal M1 and M3 muscarinic receptors.** In all panels, the M1 and M3 mAChRs orthosteric and allosteric binding sites are shown with the ligand DEET in green. Residues observed in vicinity of DEET in M1 mAChR orthosteric site (A) and allosteric region (B) and in M3 mAChR orthosteric site (C) and allosteric site (D) are shown in licorice representations. The following colour coding for transmembrane helices used: TM1—orange, TM2—green, TM3—dark blue, TM4—yellow, TM5—red, TM6—magenta, TM7—light blue.

doi:10.1371/journal.pone.0126406.g005

however, a second cluster of poses was revealed in the vicinity of BCL2, a region which corresponded to the high affinity allosteric site (Figs 4E and 5D, S2 Table). Based on *in silico* docking results with M1 and M3 mAChRs, we expected that, at low concentration, DEET molecules occupied preferentially these allosteric sites. These are in good agreement with *in vitro* studies.

## Conclusion

We report here that mixing low doses of the repellent DEET with the carbamate propoxur increases mortality rate of female *Ae. aegypti*. The first attractive aspect of this study is that *in vitro* studies performed in insect neurons, showing synergism between these two compounds, correlate well with the increased lethal effect observed *in vivo*. The molecular events underlying the synergism are summarized as shown (Fig 3C). DEET interacts with positive cooperativity and high affinity on M1/M3 mAChR allosteric site, potentiating the effect of cholinergic agonist on mAChRs. This leads to activation of PLC causing IP3 production. The latter produces the release of calcium from internal stores, which results in the calcium/CaM complex formation reducing the PI-PLC activity involved in the regulation of AChE. This finally renders AChE more sensitive to propoxur. At the opposite, high concentrations of DEET binds with low affinity on distinct mAChR interaction site inducing antagonism function, which decreases AChE sensitivity to propoxur.

Previous data have reported synergism between DEET and propoxur in *Aedes aegypti* [18]. Because this synergistic interaction disappears in the presence of piperonyl butoxide (PBO), the involvement of cytochrome-P450 monooxygenases is supposed to be essential for this positive interaction observed between DEET and propoxur [18]. However, even if the precise molecular event involved in the synergism is still unknown, the results reported in the present study may help to understand further the physiological implication of cytochrome-P450 monooxygenases in the synergistic interactions occurring between DEET and propoxur. Previously, it has been shown that intracellular calcium ions may mediate calcium-dependent up-regulation of cytochrome-P450 monooxygenases via the activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase [45,46]. Based on these ensemble outcomes, it is tempting to postulate that DEET-induced intracellular calcium rise occurring, via the mechanism described above, may also serve as an additional calcium-dependent effector mechanism to regulate basal activity of cytochrome-P450 monooxygenases, which will thereby increase the synergism between DEET and propoxur.

Finally, the second interesting aspect of this present study is that *in vitro* studies and *in silico* docking performed on human M1/M3 mAChRs indicate that the positive interaction does not exist, revealing a new insect selective site. These findings open novel perspectives to maximize prevention against insects that transmit many deadliest diseases. The increased efficiency, based on the positive interaction between two compounds will help to design more adapted treatments to control insect vector-borne diseases.

## Materials and Methods

### Cell isolation, whole-cell patch-clamp technique and statistical analysis

Experiments were carried out on insect neurosecretory cells identified as Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons [19,20] isolated from the midline of the terminal abdominal ganglion (TAG) of the nerve chord of adult male cockroaches (*Periplaneta americana*). Cockroaches were obtained from our laboratory stock colonies maintained at 29°C on 12h light/dark cycle. Animals were immobilized ventral side up on a dissection dishes. The ventral cuticle and the accessory gland were removed to allow access to the TAG which was carefully dissected under a binocular microscope and placed in normal cockroach saline containing (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 50 sucrose and pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of adult DUM neuron somata was performed under sterile conditions using enzymatic digestion by collagenase (Type IA, 300 IU/mL; Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, USA) at 29°C during 35 minutes. Then, a mechanical dissociation through fire-polished

Pasteur pipettes was used in order to isolate DUM neurons from the TAG [47]. DUM neuron somata were maintained at 29°C for 24h before electrophysiological experiments were carried out.

ACh- and muscarine-induced currents were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under voltage-clamp mode. Ejection pipettes and patch-clamp electrodes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC150T-10; Clark Electromedical Instruments Harvard Apparatus, UK) using a P-97 model puller (Sutter Instruments, USA). Patch pipettes had resistances ranging from 1 to 1.2M $\Omega$  when filled with internal pipette solution (see composition below). The liquid junction potential between extracellular and intracellular solutions was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>3G $\Omega$ ). Signals were recorded with an Axopatch 200A (Axon instruments, USA). Ionic currents induced by ACh were displayed on a computer with software control pClamp (version 6.0.3, Axon Instruments, USA) connected to a 125-kHz labmaster DMA data acquisition system (TL-1; Axon Instruments, USA). DUM neuron somata were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -50mV (except when otherwise stated). Experiments were carried out at room temperature. Bath solution superfusing the cells contained (in mM): 200 NaCl; 3.1 KCl; 5 CaCl<sub>2</sub>; 4 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Patch pipettes were filled with solution containing (in mM): 160 K<sup>+</sup>/D-Gluconate; 10 KF; 10 NaCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 0.5 CaCl<sub>2</sub>; 3 ATP; 0.1 cAMP; 10 EGTA; 20 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with KOH.

ACh (1M) and muscarine (10mM) were applied by pneumatic pressure ejection (15psig) [22,23,28,29] with a pneumatic pressure system (Miniframe, Medical System Corporation, USA) to minimize receptor desensitization resulting from bath application of agonists. The pressure ejection was made through a controlled calibrated patch pipette geometry obtained according to the protocol described just above (with a resistance of 1.8M $\Omega$  when filled with agonists) positioned in extracellular solution within 50 $\mu$ m from the isolated neuron cell body. Using this protocol, the logarithmic concentration of cholinergic agonist, at any point of the cell body, will be proportional to the pulse duration of the cholinergic agonist applications (at constant pressure), as previously reported on the same preparation<sup>16</sup>. Pharmacological agents such as  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -bgt; 0.5 $\mu$ M), DEET (used at different concentrations ranging from 10nM to 1 $\mu$ M), caffeine (10mM), TBM-8 (100 $\mu$ M), BW284c51 (100nM), pirenzepine (100nM), 4-DAMP (100nM), MT-7 (30nM), U73122 (10 $\mu$ M), *m*-3M3FBS (10 $\mu$ M) and propoxur (100nM) were added to external solution. W7 (0.5mM), BAPTA (10mM), KN-62 (10 $\mu$ M) and calmodulin (50nM) were added in the internal pipette solution immediately before use.

Data analysis was performed using the software Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Data were analysed using one-way ANOVA and data are presented as mean  $\pm$  S.E.M (Standard Error Mean).

### Calcium imaging

Falcon 1006 Petri dishes with glass coverslips were coated with poly-D-lysine hydrobromide (mol. wt. 70,000–150,000; Sigma Chemical, Isle d'Abeau Chesnes, France), and isolated DUM neuron cell bodies were plated as described above. External recording solution contained (in mM): 200 NaCl; 3.1 KCl; 5 CaCl<sub>2</sub>; 4 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES buffer; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The cells were incubated in the dark with 10 $\mu$ M Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Sigma Chemical) for 60min at 37°C. After loading, cells were washed three times in saline. The glass coverslips were then mounted in a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Imaging experiments were performed with an Olympus IX50 inverted microscope (Olympus, Rungis, France)

equipped with epifluorescence. Excitation light was provided by a 75-W integral xenon lamp (Life Science Resources, Cambridge, UK). Excitation wavelengths (340nm and 380nm) were applied using a computer-driven Spectramaster (Life Science Resources). Images were collected with an Olympix digital charge-coupled device (CCD) camera (AstroCam; Life Science Resources), and they were recorded in the computer with Merlin software, version 2.0 (Life Science Resources). Exposure times at 340nm and 380nm were usually 150ms, and images were collected at various frequencies. Data were expressed as the ratio of emitted fluorescence (340/380nm) [48].

### Biochemical assay of acetylcholinesterase activity

Six TAG of the ventral nerve cord of an adult male cockroach *Periplaneta americana* were placed in 1200 $\mu$ L normal cockroach saline buffer containing (in mM): 200 NaCl; 3.1 KCl; 5 CaCl<sub>2</sub>; 4 MgCl<sub>2</sub>; 50 sucrose and 10 HEPES, pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of DUM neuron cell bodies was performed as previously described just above. 90 $\mu$ L of the suspension were incubated for 15min with 10 $\mu$ L of the carbamate insecticide, propoxur. Dilutions ( $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $5.10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M and  $10^{-9}$ M) from the initial concentration (1M) were used for propoxur. Acetylcholinesterase (AChE) residual activity was determined spectrophotometrically according to the method described elsewhere [49], at 405 nm at 30°C for 30min using 100 $\mu$ L of 0.1mM acetylthiocholine (ATC) (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) and 100 $\mu$ L of 1mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), Sigma-Aldrich) for each dilution, and was expressed as a percentage of initial activity (i.e., without insecticide).

### Synaptic transmission—Single-fibre oil-gap method

The TAG with the nerve cord were carefully dissected and placed in normal cockroach saline containing (in mM): 208 NaCl; 3.1 KCl; 10 CaCl<sub>2</sub>; 26 sucrose; 10 HEPES; pH was adjusted to 7.2 with NaOH. The synaptic preparation was composed of a cercus, the corresponding cercal nerve XI, the de-sheathed TAG (containing the studied synapse) and the abdominal part of the nerve cord. Electrophysiological recordings of synaptic events were obtained using the single-fibre oil-gap method [36]. With this technique, it is possible to record the cholinergic synaptic transmission by measuring the post-synaptic polarisation. During experiments, this resting potential was continuously monitored on a pen chart recorder. DEET (used at various concentrations) and atropine (1 $\mu$ M) were bath-applied directly onto the TAG during periods of 30–60min. Experiments were conducted at room temperature (20°C). Data were expressed as a mean  $\pm$  S.E.M.

### Binding of [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamine assays

CHO cells stably expressing the human M1 and M3 muscarinic receptors (kindly provided by Prof. P. O. Couraud; ICGM, Paris, France) were grown in plastic Petri dishes incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidified air in Ham F12 medium pre-complemented with L-glutamine and bicarbonate (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). At 100% confluence, the medium was removed and the cells were harvested using a Versene buffer (PBS+5mM EDTA). The cells were washed with ice-cold phosphate buffer and centrifuged at 1700g for 10min (4°C). The pellet was suspended in ice-cold buffer (1mM EDTA, 25mM Na phosphate, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) and homogenized using an Elvehjem-Potter homogenizer (Fisher Scientific Labosi, Elancourt, France). The homogenate was centrifuged at 1700g for 15min (4°C). The sediment was re-suspended in buffer, homogenized and centrifuged at 1700g for 15min (4°C). The combined supernatants were centrifuged at 35000g for 30min (4°C) and the pellet re-suspended in the

same buffer (0.1mL/dish). The membrane preparations were aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein concentrations were determined by the Lowry method using bovine serum albumin as standard.

All binding experiments of [ $^3\text{H}$ ]-Methylscopolamine ([ $^3\text{H}$ ]-MS) were carried out at room temperature, in 10mM sodium phosphate, pH 7.2, 135mM NaCl, 2.5mM KCl pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin (PBS-BSA). The effect of DEET on the equilibrium binding of a fixed concentration of [ $^3\text{H}$ ]-MS was determined in inhibition experiments. CHO-hM1 and CHO-hM3 membranes, at a protein concentration where no more than 10% of added radioligand was bound (ca. 1500cpm), were incubated overnight in PBS-BSA at  $25^{\circ}\text{C}$ , with [ $^3\text{H}$ ]-MS (0.5nM) and varying concentrations of DEET, in a final assay volume of 300 $\mu\text{L}$ . Nonspecific binding was determined in the presence of 50 $\mu\text{M}$  atropine. The reaction was stopped by addition of 3mL of ice-cold buffer (Tris 10mM), immediately followed by filtration through Whatman GF/C glass fibre filters pre-soaked in 0.5% polyethylenimine. The filters were washed once with 3mL ice-cold buffer (PBS), dried, and the bound radioactivity counted by liquid scintillation spectrometry. Each experiment was done at least three times. The binding data from individual experiments ( $n = 3$ ) were analyzed by nonlinear regression analysis using Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software, Reading, PA). The affinities of DEET in inhibiting the binding of [ $^3\text{H}$ ]-MS, expressed as  $K_i$ , were calculated from the  $\text{IC}_{50}$  values by applying the Cheng-Prussoff correction [ $K_i = \text{IC}_{50}/(1 + L^*/K_d)$ ], with  $K_d$  NMS for human M1 and M3 equal to 0.1nM. [ $^3\text{H}$ ]-MS, (78Ci/mmol) was from PerkinElmer Life Sciences (Courtabouef, France). Carbamylcholine and atropine were from Sigma-Aldrich.

### Functional calcium assays

CHO cells stably expressing human M1 or M3 receptors were plated (30000 to 50000 cells/well in 100 $\mu\text{L}$ ) on black-walled 96-well plates (Greiner). 24h after coating the cells were first incubated with DEET for 45min and then for 45 additional min with the CaKit dye resuspended in Hank Balanced Salt Solution (HBSS) buffer complemented with HEPES 20mM, at pH 7.4 (R8041, Molecular Devices Ltd, Wokingham, UK). The fluorescence was recorded using a FLEXstation II plate reader (Molecular Devices Ltd) with excitation and emission wavelengths fixed at 485nm and 525nm, respectively. Drug dilutions in assay buffer were prepared in a separate 96-well plate. Parameters for drug addition to the cell plate were preprogrammed and delivery of the agonist carbamylcholine (100nM) was automated through an 8-tip head pipettor, 20sec after the beginning of the recording. Dose-response curves were constructed by measuring the fluorescence intensity after normalization to the maximal response to carbamylcholine, measured in the absence of DEET. All data points were measured in duplicate. FLEXstation calcium assay kit (Molecular Devices Ltd) was the calcium-specific fluorescent dye used in this study and the calcium flux measurement was done on a FLEXstation machine (Molecular Devices Ltd).

### Molecular *in silico* docking of DEET into human muscarinic acetylcholine receptor

The *in silico* docking of DEET into human Muscarinic acetylcholine receptor M1 (M1 mAChR, P11229 UniProtKB) was performed using the well established AutoDock program (version 4.2) [40]. The structure of the receptor was kindly provided by Dr M. Michael Espinoza-Fonesca [34]. The docked ligand was flexible, the protein was frozen, nonpolar hydrogens were united with carbons and charges were determined using the Gasteiger method. For DEET M1-mAChR system 256 starts of the Lamarckian genetic algorithm were initiated with a maximum number of 2,500,000 energy evaluations and a maximum number of 27,000 generations allowed. Grid maps of increasing density were used to determine precisely the

optimum DEET *in silico* docking place: 70x70x112Å with grid point spacing 1.0Å or 126 x 126 x 126Å with grid points spacings 0.408Å and 0.375Å. The same protocol was used to prepare DEET *in silico* docking to the rat M3 mAChR crystallographic structure (pdb code 'DAJ' [32]). Analysis of results and figures were prepared using the VMD 1.9 code [41] and home-made scripts.

### Insecticide/repellent interaction studies on mosquitoes

A susceptible strain of *Aedes aegypti* named Bora originating from French Polynesia, which has been colonized in the laboratory for many years and free of any detectable resistance mechanisms was used. Bioassays were carried out with technical grades of active ingredients diluted in acetone. Propoxur (2-isopropoxyphenylmethylcarbamate) 99.6% was provided by Bayer CropScience (Monheim, Germany). DEET 97% was provided by Sigma-Aldrich.

Topical applications were used to measure the interactions occurring between technical insecticide and repellent on *Ae. aegypti*. This method allows estimating the intrinsic toxicity of a product excluding all other effects linked to mosquito's behaviour, especially when exposed to an irritating or repellent compound. Non blood-fed females of *Ae. aegypti*, aged 2–5 days, were first anaesthetised by limited contact with carbon dioxide (45 sec) and deposited on a cold plate (4°C) to maintain anaesthesia during manipulation. Fifty females were used for each dose. A volume of 0.1µL of acetone solution (containing the product(s) at the required concentration(s)) was applied on the upper part of female's pronotum using a micro-capillary. Fifty females that received 0.1µL of pure acetone served as control. Females were preserved at 4°C on the cold plate during this interval of time, to ensure the diffusion of enzyme inhibitor through mosquito body prior to insecticide treatment. After manipulation, females were transferred into plastic cups, provided with sugar solution and held for 24 hours at 27°C and 80% RH. Mortality rates were recorded 24 hours after testing. Data were expressed in nanograms of active ingredient per milligram of mosquito female body weight. Six replicates were done for each tested concentration using different batches and generations of mosquitoes.

Data of mortality induced by DEET alone and in combination with propoxur were analyzed through a logistic regression using the proportion of dead mosquitoes among the mosquitoes exposed to chemicals as the response variable. The analysis consisted in logistic regression modeling of the probability of a mosquito to die in relation to explanatory variables:

- concentration of DEET,
- mean weight of tested mosquitoes (for each replicate),
- presence of a dose of propoxur killing 10% of exposed mosquitoes when used alone,
- interaction between DEET and propoxur

Using these explanatory variables, we performed an analysis of deviance in order to construct the final general linear model. All the analyses were performed using R software [17].

### Supporting Information

#### S1 Fig. Isolated DUM neuron cell bodies express functional acetylcholinesterase (AChE).

A) Semi-logarithmic dose-response curve for the acetylcholine-induced depolarization shown in inset. Acetylcholine (1M, 15psig, 300ms, corresponding to the ED<sub>50</sub>, which is the Effective pressure ejection Duration of ACh needed to obtain half of the maximal response and to avoid receptor desensitization) is applied by pneumatic pressure ejection onto isolated DUM neuron cell bodies held at a holding potential of -48mV. The smooth line represents the best fit ( $r = 0.998$ ) through the mean data points according to the Hill equation. B-C) Comparative

histograms showing the anticholinesterase effect of DEET (1  $\mu$ M) and propoxur (100nM), applied alone, on the duration of ACh-induced currents. Interestingly, when DEET and propoxur were applied in combination on the isolated DUM neuron cell bodies, pretreated by either DEET (1  $\mu$ M) or propoxur (100nM) for 10 minutes, no additional effects were observed in both experimental conditions. This indicates that DEET and propoxur act similarly on the same target (i.e., AChE). Data are means  $\pm$  S.E.M. (n = 10 to 16 cells; Ctr: control, ns: not significant, \*\* values significantly different  $p < 0.01$ ).

(EPS)

**S2 Fig. Selective M1/M3 muscarinic acetylcholine receptor subtype antagonists and intracellular calcium affect the anticholinesterase effects of DEET and propoxur and the synergism between DEET and propoxur.** A-B) Bath application of the selective M1/M3 mAChR subtypes antagonists, pirenzepine (PZP) and 4-DAMP reduce the anticholinesterase effect of DEET (10nM) (A). By contrast, these antagonists do not produce any significant effects on propoxur-induced anticholinesterase action (B). C) Histogram summarizing that high calcium buffering using intracellular perfusion of 10mM BAPTA reduces the effect of propoxur observed on the duration of the ACh-induced currents. Opposite effect is obtained when DUM neuron cell body is treated with caffeine, known to stimulate the release of calcium from internal stores. Caffeine (10mM) induced a strong potentiation of the anticholinesterase effect of propoxur, as it is observed with DEET (10nM). This indicates the existence of an intracellular calcium-dependent mechanism involved in the synergism between DEET and propoxur. D) Even in the presence of PZP, it is possible to counteract the inhibitory effect of these antagonists on the synergism between DEET and propoxur by increasing internal calcium concentration (i.e., without EGTA in the patch pipette). Number of experiments varies from 8 to 14 cells. Data are means  $\pm$  S.E.M. (Ctr: control, ns: not significant, \*\* and \*\*\*, values significantly different  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively).

(EPS)

**S3 Fig. Dose-dependent opposite effects of DEET on insect synaptic muscarinic ACh receptors.** A) Scheme illustrating the perspex experimental chamber suitable for studying the cholinergic synaptic transmission using the single-fiber oil-gap technique [36]. The cockroach *Periplaneta americana* synaptic preparation is composed of a cercus, the corresponding cercal nerve XI, the de-sheathed Terminal Abdominal Ganglion (TAG), containing the studied synapse and the abdominal part of the nerve cord. With this electrophysiological technique it is possible to record the effect of DEET resulting from its interaction with post-synaptic muscarinic ACh receptors (mAChR) of giant interneuron (GI). B) Typical example of unitary excitatory postsynaptic potentials (uEPSP) reflecting spontaneous activity of presynaptic cercal mechanoreceptors. C) Bath application of 500nM DEET produces a depolarization of the post-synaptic membrane, which is completely inhibited by the mAChR antagonist atropine (1  $\mu$ M). By contrast, higher concentration of DEET (10  $\mu$ M) fails to induce any significant variation of the postsynaptic potential. D) Comparative histogram illustrating the unexpected dose-dependent effect of DEET on the post-synaptic mAChRs. Low concentrations of DEET (100nM and 500nM) increase the postsynaptic membrane depolarization amplitude. By contrast, higher concentration of DEET (10  $\mu$ M) produces an opposite effect. Data are means  $\pm$  S.E.M. (n = 4). St, stimulation; TAG, Terminal Abdominal Ganglion, Cs, cercus; A, amplifier; and recording system; b, c, saline compartments; d, oil compartment.

(EPS)

**S1 Table. Summary of the generalized linear model of mortality.** Through topical applications on the mosquito thorax of active ingredients in an ethanol solution, we investigated the

dose-dependent relationship between DEET and a single dose of propoxur (raw data are illustrated in the Fig 3A). Response variable was the mortality and the explanatory variable were the DEET concentration, the mean mass of the mosquito tested, and the addition of the propoxur (prop). A logit link and binomial error structure were used and interactions were defined as products. Coefficients were given along with their standard errors. Treatment contrasts were used and the significance of the main effects and interaction terms was  $< 0.05$ . The residual deviance was 4458 on 4904 r.d.. The weight of the mosquitoes explained a significant part of the deviance, leading us not to remove this term of the model. The dose-dependent pattern of the interaction term, illustrated in the Fig 3B, indicates that the interaction between DEET and propoxur switches from synergism to antagonism with increasing concentrations of DEET (s.e., standard error).

(DOC)

**S2 Table. Amino acid residues involved in the interactions of DEET with the different sites of mAChR subtypes.** Residues located in a close proximity to DEET docked poses found in the allosteric regions and in the orthosteric site of human M1 mAChR model (Figs 4D, 5A and 5B). Residues involved in the interactions with MT-7 toxin, i.e. members of the allosteric site determined experimentally, are shown in bold. Residues interacting with MT-7 and present in M1 ECL2 loop are shown in italics. In the second part of the table, residues located in the close proximity of the poses of DEET found in allosteric and orthosteric sites of rat M3 mAChR receptor are listed as well (Figs 4E, 5C and 5D). mAChR, muscarinic acetylcholine receptor; TM, transmembrane; Ang, Angström.

(DOC)

### Acknowledgments

A.A. was supported by the Egyptian government grant. M.G. was supported by a doctoral fellowship from the Direction Générale de l'Armement—Ministère de la Défense and from the Région Pays de la Loire.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BL DS WN CP. Performed the experiments: AA MS WN KM CP MG CP OL CFG DS PL VAM. Analyzed the data: BL AA MS WN KM CP MG CP OL CFG DS PL VAM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AA MS WN KM CP MG CP OL CFG DS PL VAM VC. Wrote the paper: BL DS WN CP.

### References

1. Ranson H, et al. (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27, 91–98. doi: [10.1016/j.pt.2010.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004) PMID: [20843745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20843745/)
2. Silva APB, Santos JMM, Martins AJ (2004) Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids—a review. *Parasites & Vectors* 7, 450.
3. Dickens JC, Bohbot JD (2013) Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pest Biochem Physiol* 106, 149–155.
4. Syed Z, Leal WS (2008) Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 13598–13603. doi: [10.1073/pnas.0905312105](https://doi.org/10.1073/pnas.0905312105) PMID: [18711137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18711137/)
5. Xia Y, et al. (2008) The molecular basis of olfactory-based behavior in *Anopheles gambiae* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6433–6438. doi: [10.1073/pnas.0801007105](https://doi.org/10.1073/pnas.0801007105) PMID: [18427108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18427108/)
6. Ditzel M, Pellegrino M, Vosshall LB (2008) Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* 319, 1838–1842. doi: [10.1126/science.1153121](https://doi.org/10.1126/science.1153121) PMID: [18339904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18339904/)

7. Kain P, et al. (2013) Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature* 502, 507–512. doi: [10.1038/nature12594](https://doi.org/10.1038/nature12594) PMID: [24089210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24089210/)
8. Lee Y, Kim SH, Montell C (2010) Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron* 67, 555–561. doi: [10.1016/j.neuron.2010.07.006](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.006) PMID: [20797533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20797533/)
9. Pellegriño M, Steinbach N, Stensmyr MC, Hansson BS, Vosshall LB (2010) A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odour receptor. *Nature* 478, 511–518.
10. Paluch G, Bartholomay L, Coats J (2010) Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction. *Pest Manag Sci* 66, 925–935. doi: [10.1002/ps.1974](https://doi.org/10.1002/ps.1974) PMID: [20623705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20623705/)
11. Xu P, Choo YM, De La Rosa A, Leal WS (2014) Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.
12. Stanford JL, et al. (2014) Neurophysiological and behavioral responses of gypsy moth larvae to insect repellents: DEET, IR3535, and Picaridin. *PLoS One* 9, e99924. doi: [10.1371/journal.pone.0099924](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099924) PMID: [24956823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24956823/)
13. Swale DR, Sun B, Tong F, Bloomquist JR (2014) Neurotoxicity and Mode of Action of N,N-Diethyl-Meta-Toluamide (DEET). *PLoS One*, 9(8), e103713. doi: [10.1371/journal.pone.0103713](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103713) PMID: [25101788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25101788/)
14. Corbel V, et al. (2009) Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET. *BMC Biol* 7, 47. doi: [10.1186/1741-7007-7-47](https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-47) PMID: [19656357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19656357/)
15. Penner C, et al. (2007) Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria J* 6, 38.
16. Penner C, et al. (2008) Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis* 14, 1707–1714. doi: [10.3201/eid1411.071575](https://doi.org/10.3201/eid1411.071575) PMID: [18978553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18978553/)
17. Penner C, et al. (2009) Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: Efficacy and behavioural response of natural free-flying *An. gambiae* mosquitoes. *PLoS One* 4, e7896. doi: [10.1371/journal.pone.0007896](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007896) PMID: [19936249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19936249/)
18. Bonnet J, Penner C, Duchon S, Lapied B, Corbel V (2009) Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasites & Vectors* 2:17.
19. Grolleau F, Lapied B (2000) Dorsal unpaired median neurons in the insect central nervous system: Towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol* 203, 1633–1648. PMID: [10804154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10804154/)
20. Wicher D, Walther C, Wicher C (2001) Non-synaptic ion channels in insects—basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog Neurobiol* 64, 431–525. PMID: [11301158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11301158/)
21. Stankiewicz M, Dabrowski M, de Lima ME (2012) Nervous system of *Pariplaneta americana* cockroach as a model in toxicological studies: A short historical and actual view. *J Toxicol* 2012, 1–11.
22. Lapied B, Le Corre H, Hue B (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res* 533, 132–136. PMID: [2085724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2085724/)
23. Courjaret R, Grolleau F, Lapied B (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an  $\alpha$ -bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci* 17, 2023–2034. PMID: [12786968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12786968/)
24. Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 14–22. PMID: [17156860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17156860/)
25. Badiou A, Brunet JL, Balzouros L (2007) Existence of two membrane-bound acetylcholinesterases in the honey bee head. *Arch Insect Biochem Physiol* 66, 122–134. PMID: [17966129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17966129/)
26. Lavialle-Delais C, Moignot B, Lagros C, Lapied B (2010) How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decabomethoxylated JWO62 (DCJW) in insect pacemaker neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 264–272. doi: [10.1124/jpet.109.163519](https://doi.org/10.1124/jpet.109.163519) PMID: [20056780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056780/)
27. Mufflo L, et al. (2011) Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology* 32, 828–835. doi: [10.1016/j.neuro.2011.05.015](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.05.015) PMID: [21684305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21684305/)
28. Bodereau-Dubois B, et al. (2012) Transmembrane potential polarization, calcium influx and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 326–339. doi: [10.1124/jpet.111.188060](https://doi.org/10.1124/jpet.111.188060) PMID: [22286500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22286500/)
29. Courjaret R, Lapied B (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Mol Pharmacol* 60, 80–91. PMID: [11408603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408603/)

30. Calas-List D, List O, Quinched S, Thany SH (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *NeuroToxicology*, 37, 127–133. doi: [10.1016/j.neuro.2013.04.011](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.04.011) PMID: [23632304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632304/)
31. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL: Acetylcholinesterase: 3D structure to function. *Chem Biol Interact* 2010, 187:10–22. doi: [10.1016/j.cbi.2010.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042) PMID: [20138030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20138030/)
32. Paulik MG, Bertozzi CR (2008) The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex-membrane anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47, 6991–7000. doi: [10.1021/bi8006324](https://doi.org/10.1021/bi8006324) PMID: [18557633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18557633/)
33. Bae YS, et al. (2003) Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* 63, 1043–1050. PMID: [12695632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12695632/)
34. Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Marquer C, Menez A, Servent D (2006) Identification of various allosteric interaction sites on M1 muscarinic receptor using  $^{125}$ I-MeT35-oxidized muscarinic toxin 7. *Mol Pharmacol* 69, 1641–1651. PMID: [16439611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16439611/)
35. Le Corrionc H, Hue B (1993) Pharmacological and electrophysiological characterization of a postsynaptic muscarinic receptor in the central nervous system of the cockroach. *J Exp Biol* 181, 257–278.
36. Hue B, Callec JJ (1990) Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In Huber, L., Master, E. P., Rao, B. R. editors. *Cockroach as models for neurobiology: Applications in biomedical research*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, p. 149–168.
37. Haga K, et al. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an agonist. *Nature* 482, 547–552. doi: [10.1038/nature10753](https://doi.org/10.1038/nature10753) PMID: [22278061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22278061/)
38. Kruse AC, et al. (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482, 552–558. doi: [10.1038/nature10867](https://doi.org/10.1038/nature10867) PMID: [22358844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22358844/)
39. Peng JY, Vaidehi N, Hall SE, Goddard WA (2006) The predicted 3D structures of the human M1 muscarinic acetylcholine receptor with agonist or antagonist bound. *ChemMedChem* 1, 878–890. PMID: [16902941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16902941/)
40. Espinoza-Fonseca LM, Pedretti A, Vistoli G (2008) Structure and dynamics of the full-length M1 muscarinic acetylcholine receptor studied by molecular dynamics simulations. *Arch Biochem Biophys*, 469, 142–150. PMID: [17935687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17935687/)
41. Marquer C, et al. (2011) Structural model of ligand-G protein-coupled receptor (GPCR) complex based on experimental double mutant cycle: MT7 snake toxin bound to dimeric M1 muscarinic receptor. *J Biol Chem* 286, 31661–31675. doi: [10.1074/jbc.M111.261404](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261404) PMID: [21685390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685390/)
42. Abdul-Fidha A, et al. (2014) Molecular determinants of allosteric modulation at the M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 289, 6067–6079. doi: [10.1074/jbc.M113.539080](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539080) PMID: [24443568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443568/)
43. Morris GM, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30, 2785–2791. doi: [10.1002/jcc.21256](https://doi.org/10.1002/jcc.21256) PMID: [19399780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780/)
44. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33–38. PMID: [8744570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8744570/)
45. Seals RC, Urban RJ, Sekar N, Veldhuis JD (2004) Up-regulation of basal transcriptional activity of the cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (CYP11A) gene by isoform-specific calcium-calmodulin-dependent protein kinase in primary cultures of ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 145, 5616–5622. PMID: [15319355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15319355/)
46. Han EH, et al. (2009) Up-regulation of CYP1A1 by sataecarpine is dependent on aryl hydrocarbon receptor and calcium. *Toxicology* 266, 38–47. doi: [10.1016/j.tox.2009.10.013](https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.10.013) PMID: [19853001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19853001/)
47. Lapied B, Malécot CO, Pelhate M (1989) Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurons isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* 144, 535–549.
48. Gaufer H, Auger J, Legros C, Lapied B (2008) Calcium-activated potassium channels in insect pace-maker neurons as unexpected target site for novel fumigant dimethyl disulfide. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 149–159. PMID: [17942746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942746/)
49. Eilman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88–95. PMID: [13726518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13726518/)



# Thèse de Doctorat

Mathilde GOULU

## Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les

Development of a novel strategy against mosquito-transmitted diseases based on repellent/insecticide mixture to increase treatment efficacy while reducing doses.

### Résumé

Actuellement, la plupart des textiles utilisés pour limiter les contacts avec les moustiques vecteurs de maladies sont imprégnés d'insecticides pyréthroïdes possédant une action insecticide et répulsive. Cependant, l'apparition de résistances au sein des populations de moustiques remet en cause cette efficacité.

La nouvelle stratégie de lutte contre les moustiques s'appuie sur l'effet synergique obtenu lors d'une association de deux molécules de familles chimiques différentes à effet insecticide et répulsif. Les effets de deux répulsifs, le DEET et l'IR3535 ont été étudiés sur des cellules neurosecrétices isolées du système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana*. A l'aide de la technique d'imagerie calcique, il a été possible de montrer que ces composés induisent une augmentation dose-dépendante complexe de la concentration en calcium intracellulaire. L'utilisation d'outils pharmacologiques spécifiques a permis de caractériser les cibles et les événements moléculaires impliqués dans ces effets. A partir de ces résultats, l'IR3535 s'est avéré être le meilleur répulsif pour une association avec un insecticide néonicotinoïde, le thiaclopride. Grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp adaptée sur neurones d'insecte, l'effet synergique produit par l'association IR3535/thiaclopride a été observé et le rapport de concentrations répulsif/insecticide qui donne le meilleur effet synergique sur le courant entrant induit par le thiaclopride déterminé. Des tests *in vivo* réalisés sur moustiques ont confirmé cet effet synergique, démontrant l'intérêt de proposer l'association IR3535/thiaclopride comme nouvelle stratégie de lutte anti-vectorielle.

### Mots clés

Lutte antivectorielle – Moustique – Synergie – Répulsif – DEET – IR3535 – Néonicotinoïde

### Abstract

Today, most of the textiles used to limit contact with mosquitoes are impregnated with pyrethroid insecticides having both insecticidal and repellent activities. However, the development of resistance in mosquito populations reduces their efficacy.

The new strategy proposed against mosquito-transmitted diseases is based on the potential synergy observed with the combination of two different compounds with insecticidal and repellent effects. In this context, the effects of two repellents DEET and IR3535 have been studied on neurosecretory cells isolated from the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. Using calcium imaging, both DEET and IR3535 induce a dose-dependent complex elevation of intracellular calcium concentration. Specific pharmacological tools have allowed to characterize the different targets together with the molecular events involved in the repellent-induced calcium rise. From these results, it has been possible to identify IR3535 as the most suitable compound to be used in association with the insecticide neonicotinoid, thiacloprid. Using the whole-cell patch-clamp technique adapted on isolated insect neurons, the synergistic effect of the IR3535/thiacloprid mixture has been observed on the thiacloprid-induced current and the most efficient ratio between repellent and insecticide has also been determined. In addition, cone tests performed on *in vivo* mosquitoes confirm this synergistic effect, demonstrating that IR3535/thiacloprid mixture could be an alternative strategy in the management of chemical use against resistant mosquitoes.

### Key Words

Vector control – Mosquito – Synergy – Repellent – DEET – IR3535 – Neonicotinoid